

# ***Alma Mater Studiorum – Università di Bologna***

**DOTTORATO DI RICERCA IN**

**Scienze Mediche Specialistiche: Progetto n° 3  
Scienze Nefrologiche ed Uroandrologiche**

**Ciclo XXIII**

**Settore scientifico-disciplinare di afferenza: MED/14**

**Studio di sensibilità e specificità dei markers di acute  
kidney injury, per la diagnosi precoce delle  
complicanze nell'immediato decorso post trapianto  
renale**

**Presentata da: Dr.ssa Olga Baraldi**

**Coordinatore Dottorato**

**Prof. S. Mattioli**

**Relatore**

**Prof. G. La Manna**

**Esame finale anno 2011**

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b>	pag. 4
<b>2. IL TRAPIANTO DI RENE</b>	pag. 6
2.1 Delayed Graft Function (DGF)	pag. 8
2.2 Creatinina e altri marker classici	pag. 11
2.3 Cistatina C	pag. 13
2.4 Nuovi marcatori di danno renale	pag. 14
2.4.1. NEUTROPHIL GELATINASE ASSOCIATED LIPOCALIN (NGAL)	pag. 16
2.4.2 NGAL: marker di danno renale nei pazienti sottoposti a trapianto	pag. 23
<b>3. OBIETTIVO DELLO STUDIO</b>	pag. 31
<b>4. PAZIENTI E METODI</b>	pag. 32
4.1 Protocollo di ricerca	pag. 32
4.2 Caratteristiche della popolazione	pag. 34
4.3 <a href="#">Stoccaggio ed analisi dei campioni</a>	pag. 42
4.4 Analisi statistica	pag. 43

<b>5. RISULTATI</b>	pag. 44
<b>6. DISCUSSIONE</b>	pag. 56
<b>7. CONCLUSIONI</b>	pag. 70
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	pag. 74

# INTRODUZIONE

Il National Institutes of Health (NIH) Biomarkers Definitions Working Group ha definito un marker biologico (biomarker) come “misurabile oggettivamente, valutabile come indicatore di un processo biologico fisiologico o patologico, o espressione della risposta farmacologica ad un intervento terapeutico” (1).

Tipicamente un biomarker dovrebbe possedere le seguenti caratteristiche:

- facilmente misurabile, non costoso e in grado di produrre rapidi risultati
- ottenibile senza approcci invasivi, ad es. da sangue o urine
- altamente sensibile, riconoscibile in modo precoce, senza sovrapposizioni tra i pazienti affetti ed i controlli sani
- altamente specifico, aumentando o diminuendo nella specifica patologia e senza risultare alterato dalle concomitanti comorbidità
- variare in modo rapido in risposta al trattamento
- aiutare nella stratificazione del rischio e possedere valore prognostico sull'outcome reale
- biologicamente plausibile e fornire informazioni sul sottostante meccanismo patogenetico (2)

La mancanza di specificità e la ritardata comparsa anche in caso di severa compromissione sono tra le prime ragioni per cui la determinazione della creatinina sierica risulta un marker

insoddisfacente di nefropatia, in particolare nelle situazioni di danno renale acuto (**AKI, acute kidney injury**). I livelli di creatinina variano infatti con fattori non correlati alla patologia renale come l'età, il genere, la dieta, le masse ed il metabolismo muscolare, la razza, l'esercizio fisico e lo stato di idratazione. Pertanto il valore di creatinina non rappresenta un indicatore reale della funzione renale: un suo aumento è apprezzabile solo quando circa il 50% della funzione renale globale risulta compromesso.

Negli ultimi anni, l'obiettivo di numerosi studi clinici è stata l'identificazione e la validazione di nuovi biomarker in grado di predire precocemente le situazioni di danno renale acuto, condizione potenzialmente reversibile se tempestivamente individuata ed adeguatamente trattata.

Allo stato attuale la proteina **NGAL (neutrophil gelatinase associated lipocalin)**, appartenente alla famiglia delle lipocaline, sembra essere uno dei principali candidati ad assumere il ruolo di indicatore precoce di AKI, come mostrano studi su animali e studi clinici, poiché, nel rene, la sua produzione aumenta in caso di danno acuto e ciò si riflette in un incremento dei suoi livelli sierici ed urinari.

In questo studio è stata presa in esame una popolazione di pazienti sottoposti a trapianto renale, terapia di elezione per l'insufficienza renale cronica in fase uremica. In questi soggetti il danno acuto conseguente all'ischemia-riperfusionazione del graft può provocare un ritardo nella ripresa funzionale dell'organo (**DGF o delayed graft function**) che, a sua volta, può incidere negativamente sull'outcome del trapianto. Abbiamo voluto studiare l'andamento di NGAL nei trapiantati, non solo per verificare la sua capacità di diagnosticare precocemente la DGF, ma anche e soprattutto per cercare una sua eventuale correlazione con l'andamento della funzione renale, in particolare a un mese dal trapianto.

## IL TRAPIANTO RENALE

Il report annuale dell'United States (USRDS) Renal Data System, riporta che negli Stati Uniti, nel corso dell'anno 2008, sono stati eseguiti 17.413 trapianti di rene, numero lievemente minore rispetto all'anno precedente ma che conferma una tendenza già presente negli ultimi anni (18.059 trapianti di rene nel 2006). Questo declino è apprezzabile non solo nei trapianti da donatore cadavere ma anche da donatore vivente, diminuiti rispettivamente di 0,6 e 1,2%. Il calo del numero di trapianti è contemporaneo alla riduzione dei nuovi casi di end-stage renal disease (ESRD), che appare diminuito di 1,3% rispetto ai dati del 2006 (498.1 per milione). Il numero dei pazienti in lista di attesa per trapianto di rene, tuttavia, continua ad aumentare, crescendo del 6% nel 2008 e raggiungendo oltre 77.000 pazienti alla fine dello stesso anno. Nondimeno, al termine del 2008, solo il 66% dei pazienti veniva considerato attivo in lista per un totale di 51.585 pazienti. Il tempo di attesa in lista continua a crescere: per i pazienti entrati in lista nel 2005, il tempo medio di attesa di un trapianto da donatore cadavere era mediamente pari a 3 anni (3).

Per quanto riguarda l'Italia, da un'analisi del Centro Nazionale Trapianti, emerge come la maggior parte dei trapianti eseguiti nel paese siano trapianti di rene. Alla fine del 2009 si stimava che su 9.331 pazienti in lista d'attesa per un trapianto d'organo, ben 6.808 fossero in lista per ricevere un rene, numero molto più alto rispetto agli altri trapianti d'organo (la lista d'attesa per un trapianto di cuore conta 702 pazienti, mentre per il fegato 1.447) e che è rimasto all'incirca

stabile dal 2002. Il tempo di attesa medio è di 2,97 anni per una mortalità durante la permanenza in lista di circa 1,5%. Il totale dei trapianti renali eseguiti nel 2009 è stato di 1.650, numero lievemente inferiore rispetto al picco massimo raggiunto nel 2004 di 1.746 trapianti, ma molto maggiore rispetto ai primi anni novanta, quando si eseguivano all'incirca 600 trapianti annui (4).

Il trapianto di rene migliora la qualità e la durata della vita rispetto al proseguimento della terapia dialitica (5-6). Attualmente, la sopravvivenza del rene a un anno dal trapianto è di circa il 91% nel trapianto di rene da donatore cadavere e di circa il 96% nel trapianto da donatore vivente (3).

Le complicanze precoci del trapianto renale possono essere di tipo chirurgico (ematuria, uropatia ostruttiva, stenosi o trombosi arteriosa, linfocele, emorragia post-operatoria...), o di tipo clinico, comprendendo, in queste ultime, cause immunologiche o non immunologiche (ad es. comparsa di rigetto acuto, nefrotossicità acuta da inibitori della calcineurina, infezioni, recidiva della nefropatia...). Tra queste ultime la più comune è la ritardata ripresa funzionale dell'organo (**Delayed Graft Function, DGF**) che può comparire fino nel 40% dei riceventi da donatori di oltre 55 anni (7).

La comparsa di DGF rappresenta uno dei principali fattori prognostici di ridotta sopravvivenza del graft nel trapianto renale da donatore cadavere. I dati dell'USRDS documentano che, nel 2008, la comparsa di DGF è stata pari al 3.6% per trapianti da donatori viventi, al 21.3% per i trapianti da donatori standard e al 29.6% per quei trapianti da donatori "marginali"; un aumento della DGF è stato inoltre notato nei donatori di età avanzata: i riceventi da donatori giovani hanno una bassa incidenza di DGF (approssimativamente 20%) in confronto ai riceventi da donatori di età > 55 anni (38%) (3).

## 2.1 Delayed Graft Function (DGF)

Al momento in letteratura non esiste una definizione univoca di DGF e ciò rende più difficoltoso il confronto tra i diversi studi (8); esistono 65 articoli pubblicati tra il 1984 e il 2007 in cui si cita la DGF: nel 49,75% viene definita come la necessità di dialisi dopo il trapianto, nel 10,14% come la persistenza di alti livelli di creatinina sierica dopo il trapianto e nel 6,11% i due parametri sopracitati vengono combinati. Negli studi che per caratterizzare la DGF usano il criterio della richiesta di dialisi dopo il trapianto non c'è un chiaro accordo sul lasso di tempo da prendere in esame, ma nella netta maggioranza dei casi (45 su un totale di 49 articoli) viene considerata la necessità di terapia sostitutiva artificiale entro una settimana dall'intervento, in un solo studio entro 4 giorni, in un altro entro 10 giorni e nei restanti due il fattore tempo non viene specificato. Anche se limitata ed imprecisa, la definizione più accettata è quella basata sulla necessità di dialisi nella prima settimana post-trapianto.

In ogni caso, la DGF è una delle complicanze precoci più importanti del trapianto, con un'incidenza pari al 4-10% se il donatore è vivente e al 5-50% se il donatore è cadavere.

I principali fattori di rischio riconosciuti per insorgenza di DGF sono:

- 1) l'età del donatore
- 2) l'utilizzo di donatore cadavere
- 3) le caratteristiche di preservazione e di impianto, in particolare il tempo di ischemia fredda
- 4) le variabili immunologiche come il PRA, il mismatch HLA e stati di immunizzazione
- 5) le caratteristiche del ricevente come la storia clinica e l'etnia

La DGF nel trapianto può essere considerata come una forma di *acute kidney injury*, causata da diversi tipi di danno; i più frequenti sono il danno immunologico cioè l'attivazione del sistema immunitario con rilascio di citochine e molecole di adesione e il danno da ischemia-



riperfusion, che spesso possono agire sinergicamente accentuando ulteriormente la lesione e riducendo la sopravvivenza del graft.

La DGF complica la gestione del paziente nel post-operatorio, prolunga l'ospedalizzazione, aumenta la morbilità predisponendo il graft a rigetto sia acuto che cronico e incrementando il rischio di nefropatia cronica e di perdita dell'organo e infine costituisce un fattore di rischio indipendente per un funzionamento sub-ottimale del graft a un anno dal trapianto.

Come mostrano numerosi studi, la sopravvivenza del graft a seguito di trapianto renale sembra essere correlata con la funzione dello stesso. Infatti pazienti che sviluppano una ritardata ripresa funzionale dell'organo impiantato, mostrano una sopravvivenza del graft, a lungo termine, ridotta rispetto a pazienti che hanno una lenta (**Slow Graft Function, SGF**) ovvero pronta (**Early Graft Function, EGF**) ripresa, con tassi di sopravvivenza a 6 mesi rispettivamente pari a 74%, 93% e 96%, ad 1 anno al 70%, 93% e 94% ( $p < 0.001$ ). Una ridotta sopravvivenza è riscontrabile in tutti quei pazienti che hanno sviluppato DGF a seguito di un trapianto, anche se in caso di donatore vivente consanguineo il tasso di sopravvivenza è maggiore rispetto a donatori viventi non consanguinei o donatori cadaveri (9). È noto inoltre come il danno da ischemia-riperfusion sia in grado di incrementare l'immunogenicità del rene trapiantato e quindi rendere più comune l'insorgenza di rigetto acuto. Il rischio di rigetto acuto entro 6 mesi dal trapianto è 25% in pazienti che non hanno sviluppato DGF, mentre incrementa sino al 42% in pazienti con DGF con una sopravvivenza del graft a 3 anni che cala dal 77% al 60% (10). Tuttavia la DGF è in grado di predire una ridotta sopravvivenza del graft anche indipendentemente dalla capacità di facilitare il rigetto acuto perché la necrosi tubulare acuta agisce negativamente sulla sopravvivenza causando, nei casi più gravi, una distruzione di nefroni con conseguente danno da iperfiltrazione della massa nefronica residua ed innesca lo sviluppo di una nefropatia cronica del graft a lungo termine. Infatti, anche in assenza di rigetto acuto, la DGF riduce la

sopravvivenza del rene trapiantato, ad un anno, dal 91% al 75% e la sua durata media da 13 a 8.8 anni (10).

La diagnosi di rigetto nei pazienti con DGF può essere ostacolata dall'iniziale riduzione dei livelli di creatinina. Per questo motivo alcuni Centri Trapianto somministrano sieri anti-linfocitari per prevenire un rigetto acuto nei pazienti con DGF.

Alternativamente l'esecuzione di biopsie renali seriate nei pazienti con DGF è stata proposta per individuare precocemente un rigetto acuto. Nonostante gli innegabili progressi verificatisi negli anni nel campo dei trapianti, l'incidenza di DGF è rimasta invariata: ciò è almeno in parte motivabile con l'utilizzo di organi prelevati da donatori marginali oppure espianati dopo la morte cardiaca del donatore.

Finora, per prevedere l'insorgenza di DGF, sono stati proposti svariati algoritmi clinici basati su fattori di rischio legati sia al donatore che al ricevente (11), primo tra tutti la durata del tempo di ischemia fredda, ma non sono ancora disponibili strumenti in grado di diagnosticare l'AKI nelle sue fasi iniziali dopo che il trapianto è avvenuto. La prevenzione della DGF e il precoce riconoscimento del rigetto sono importanti obiettivi per migliorare la sopravvivenza del graft.

A tal fine, la comunità scientifica ha speso notevoli energie nella ricerca di nuovi marcatori in grado di identificare precocemente condizioni che comportano un rischio di perdita del graft. Tra i più promettenti ricordiamo i **biomarkers urinari NGAL e IL-18**. I vantaggi che questi marcatori offrono sono molteplici: in primo luogo le tecniche usate per il loro prelievo non sono invasive; oltre a ciò, i loro livelli sono elevati già entro poche ore dall'atto chirurgico consentendo un significativo anticipo sulla diagnosi rispetto alle tecniche attualmente in uso e ponendo le basi per l'attuazione di nuove strategie terapeutiche.

## 2.2 Creatinina e altri marker classici

Il *glomerular filtration rate (GFR)* è il principale indice di funzione escretoria del rene. Poiché non può essere misurato direttamente, è necessario procedere ad una sua stima come clearance urinaria di marcatori di filtrazione glomerulare ideali, cioè sostanze endogene, liberamente filtrate a livello glomerulare, che non vengono né riassorbite né secrete dal tubulo e vengono eliminate solo dal rene. I valori fisiologici di GFR sono all'incirca di 130 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> nei maschi e 120 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> per le femmine con notevoli variazioni individuali. Nella pratica clinica la funzione renale viene monitorata principalmente attraverso la valutazione della concentrazione sierica di creatinina e la misurazione della sua clearance per la stima del GFR. Il GFR risulta essere direttamente proporzionale alla creatinina escreta con le urine e inversamente proporzionale alla creatinina sierica poiché una riduzione della filtrazione glomerulare porta ad accumulo di cataboliti azotati. Dai valori di creatinina sierica è possibile risalire al GFR tramite alcune formule basate su diversi parametri clinici e laboratoristici, le più utilizzate sono la formula di Cockcroft-Gault e la Modification of Diet in Renal Disease (MDRD). Tuttavia la creatinina, pur essendo affidabile nella rilevazione della funzionalità renale, sia in acuto che in cronico, non è utile per l'identificazione del danno in acuto per vari motivi. La creatininemia (v.n. 0,6-1,2 mg/dL), come già anticipato, risulta estremamente variabile da paziente a paziente dipendendo dall'età, dal sesso, dal peso corporeo, dall'etnia, dalla massa muscolare e dal metabolismo muscolare, dallo stato di idratazione, dall'assunzione di farmaci, dall'intake dietetico proteico, da infezioni etc. Inoltre il suo andamento in funzione della velocità di filtrazione glomerulare (*glomerular filtration rate, GFR*) non è di tipo lineare, si può avere un rialzo della creatininemia sostanziale solamente dopo che più del 50% della funzione renale è stata persa, a causa della presenza di una notevole riserva renale. Da ciò risulta evidente come la creatinina sia un indicatore tardivo di alterazione della funzione renale e non rifletta il tipo di danno renale (ad esempio,

se esso sia ischemico o tossico), né dia informazioni circa il momento dell'insulto o la sede della lesione (tubulare o glomerulare) (12).

Altri parametri laboratoristici che si alterano in caso di insufficienza renale acuta quali l'urea sierica, la frazione di escrezione del sodio con le urine, la presenza di proteine ad alto peso molecolare o di cilindri nelle urine non sono né specifici né sensibili per la diagnosi precoce di AKI poiché riflettono le conseguenze funzionali tardive del danno cellulare (13) e hanno dubbia utilità nei pazienti in terapia intensiva perché sottoposti a terapie massive con infusione di liquidi, diuretici, farmaci vasoattivi e nefrotossici. In particolare l'urea (v.n. 0,15-0,50 g/L) è il prodotto terminale del catabolismo proteico a livello epatico, un incremento acuto e importante di urea plasmatica è tipico dello sviluppo di una sindrome uremica e della ritenzione di numerose tossine uremiche. Viene liberamente filtrata a livello glomerulare e, successivamente, riassorbita passivamente dal tubulo e per questo motivo la clearance urinaria dell'urea tende a sottostimare la funzione renale. I limiti all'utilizzo di questo marcatore comprendono la notevole variabilità di produzione legata a diverse condizioni: aumenta in caso di iperalimentazione, stati catabolici, emorragie gastrointestinali, sepsi, ustioni, traumi e somministrazione di corticosteroidi o chemioterapici, al contrario è ridotta in caso di malnutrizione e di epatopatie. Inoltre, in stati di deplezione di volume il riassorbimento di urea è incrementato e perciò la clearance urinaria dell'urea si ridurrà molto più dell'effettiva riduzione del GFR, tendendo perciò a sottostimarla. Un altro marcatore classico della funzionalità renale è la proteinuria, cioè la presenza di proteine nelle urine. La proteinuria fisiologica non supera i 150 mg/die negli adulti e i 140 mg/m<sup>2</sup> nei bambini. Pazienti con AKI o riacutizzazioni di patologie renali croniche in reparti di terapia intensiva presentano nel 69% dei casi microalbuminuria (< 300 mg/g creatinina) o proteinuria (> 300 mg/g creatinina) in una singola misurazione urinaria al momento dell'accesso (14). Sebbene la microalbuminuria sia un marcatore suggestivo di incremento della permeabilità capillare alle proteine, non esistono studi che valutino la sua validità nel predire

o diagnosticare precocemente un danno renale acuto. Nei pazienti trapiantati generalmente la proteinuria è estremamente alta immediatamente dopo l'intervento, mentre decresce fino a raggiungere valori normali circa due mesi dopo il trapianto se non intervengono ulteriori danni. Sembra essere associata a patologie trapianto-specifiche come la nefropatia da danno da ischemia-riperfusion, la nefrotossicità da farmaci, danni immunologici come il rigetto acuto e glomerulopatie del graft oltre che del rene nativo. Si associa ad una riduzione della sopravvivenza del paziente e del rene trapiantato e ad un incremento del rischio cardiovascolare (15). Non viene considerata un marcatore di routine nella diagnosi di danno renale acuto però data la mancanza di una soddisfacente validazione come strumento di diagnosi precoce di AKI, di prognosi della successiva funzionalità renale, l'assenza di analisi standardizzate e la difficoltà di raccolta delle urine nelle 24 ore.

### **2.3 Cistatina C**

La cistatina C è una proteina basica non glicosilata sintetizzata da tutte le cellule nucleate e rilasciata nel plasma con una velocità relativamente costante. Grazie al suo basso peso molecolare, 13 kDa, e al suo elevato punto isoelettrico può essere liberamente filtrata dal glomerulo. Viene poi completamente riassorbita dal tubulo prossimale, grazie ad una endocitosi megalino-dipendente, dove viene catabolizzata e solo una piccola quota è escreta con le urine. Per questo motivo non si può misurare adeguatamente la produzione di cistatina C sulla base dell'escrezione nell'urina nè la sua clearance urinaria. I valori sierici normali sono compresi tra 0,54 e 1,55 mg/L, rimangono costanti tra un anno e 50 anni di età e sembrano indipendenti dall'altezza, il sesso e la massa muscolare, mentre si elevano dal momento della nascita fino ai 4 mesi di età, negli anziani, in caso di infiammazioni sistemiche con elevazione dei livelli di PCR e in relazione con patologie epatiche, tiroidee e terapia steroidea.

Recentemente è stata studiata come marker alternativo alla creatinina nella stima del GFR. Il vantaggio dell'utilizzo della cistatina C si deve al fatto che questa è una proteina endogena e non è necessario perciò introdurre sostanze estranee nell'organismo e raccogliere le urine delle 24 ore. Inoltre, a differenza della creatinina, non è influenzata da età, sesso, dieta, massa muscolare, stato di idratazione, infezioni, e la sua determinazione non è inficiata da iperbilirubinemia, emolisi e ipertrigliceridemia. Numerosi studi clinici hanno individuato una maggior efficacia della cistatina C nel rilevare cambiamenti precoci e moderati della funzionalità renale e nello stimare il GFR rispetto alla creatinina, soprattutto in pazienti con valori di creatinina sierica inferiori come anziani, bambini, riceventi trapianto renale (16). Nel caso di trapianto tuttavia, durante le prime giornate post-operatorie, i valori di cistatina C possono risultare falsati dalle elevate dosi di steroidi utilizzate (17). Perciò non rappresenta un marcatore valido di GFR nell'immediato post-trapianto e in caso di rigetto acuto, mentre acquista importanza successivamente a 6, 12 e 18 mesi, esiste infatti una buona correlazione con i livelli di creatinina plasmatica, la clearance della creatinina nelle urine delle 24 ore o calcolata con la formula di Cockcroft-Gault (18).

## **2.4 Nuovi marcatori di danno renale**

A fronte delle problematiche inerenti alla mancanza di marcatori capaci di identificare precocemente un danno renale, recentemente l'attenzione di numerosi studi in letteratura è rivolta a individuare biomarkers di danno tissutale idonei, dotati cioè di particolari caratteristiche già elencate in precedenza. In particolare devono essere *sensibili, specifici, facilmente e rapidamente rilevabili*, dotati di un buon *potere discriminatorio* per i diversi tipi di danno renale, sulla base dell'eziologia (ischemico, tossico o settico) e della sede della lesione (tubulare o glomerulare) (19), in grado di correlare con la

gravità della lesione e dare indicazioni circa la prognosi (20) e l'efficacia delle terapie.

Tra le principali molecole candidate ad assumere questo ruolo troviamo:

**NGAL** (*neutrophil gelatinase-associated lipocalin*) di cui discuteremo di seguito.

**KIM-1** (*kidney injury molecule 1*): una proteina transmembrana prodotta in quantità molto piccole dal rene sano, ma iperespressa dalle cellule epiteliali del tubulo prossimale nel rene a seguito di danno renale. La molecola subisce un taglio proteolitico e il dominio extracellulare viene escreto con le urine dove può essere dosato tramite specifici test. In studi preclinici e clinici è stato dimostrato che KIM-1 urinario è una molecola sensibile e specifica per danno renale acuto (21,22). Studi su animali indicano che l'espressione di KIM-1 aumenta ogni volta che il rene è sottoposto ad un insulto di natura ischemica o tossica che causi una dedifferenziazione delle cellule epiteliali del tubulo prossimale (23). La dedifferenziazione può essere conseguente o ad una proliferazione rapida e controllata, come nel caso della lesione renale acuta, oppure ad una proliferazione rapida e non controllata, come nel caso del carcinoma renale a cellule chiare. Poiché nessun altro organo produce KIM-1 in quantità significative, questa molecola risulta altamente specifica di danno renale (24). Inoltre, a differenza di NGAL, i livelli urinari di KIM-1 non sono influenzati da infezioni del tratto urinario o da una nefropatia cronica sottostante, tuttavia nelle fasi estremamente precoci di danno renale KIM-1 ha mostrato una sensibilità inferiore paragonata a NGAL.

**IL-18**: è una citochina proinfiammatoria rilasciata in risposta a un danno. Studi su pazienti con allotrapianto di rene hanno mostrato come elevati livelli urinari di IL-18 predicano la comparsa di una necrosi tubulare acuta e di una DGF sino a 24-48 ore prima che i tradizionali strumenti clinici, in particolare la creatininemia, si alterino o che compaia una insufficienza clinicamente evidente. Inoltre i livelli

sierici di IL-18 aumentano significativamente nei pazienti con rigetto acuto rispetto a quelli con un trapianto non complicato e il suo valore predittivo di AKI è stato dimostrato in pazienti con *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) e in pazienti sottoposti a interventi cardiocirurgici.

**NHE3 (*sodium hydrogen exchanger isoform 3*):** è un altro potenziale biomarker urinario che, in uno studio condotto su pazienti ricoverati in una Unità di Terapia Intensiva, si è rivelato in grado di distinguere i soggetti con AKI da quelli con un'insufficienza renale pre-renale (25); questa molecola sembra infatti utile più per la diagnosi differenziale che per predire l'AKI.

Ricordiamo infine altre molecole oggetto di studio come: NAG (*N-acetyl-β-D-glucosaminidase*), HGF (*hepatocyte growth factor*), L-FABP (*liver fatty acid binding protein*), IP-10 (*chemokine interferon-inducible protein 10*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*).

NGAL al momento appare la più promettente in quanto validata da numerosi studi.

#### **2.4.1 NEUTROPHIL GELATINASE ASSOCIATED LIPOCALIN (NGAL)**

##### *Caratteristiche della proteina*

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), nota anche come Lipocalina 2 (LCN-2) o siderocalina, è una proteina dal peso molecolare di 25 kDa, formata da 178 aminoacidi, appartenente alla famiglia delle lipocaline. Deve il suo nome al fatto di essere stata isolata per la prima volta in associazione con la gelatinasi (enzima importante nel processo della diapedesi dei neutrofili perché degrada il collagene delle membrane basali degli endoteli capillari) purificata ottenuta dal soprannatante di neutrofili umani attivati, alla quale risultava



legata mediante legame covalente (26). Solo successivamente è stato dimostrato come NGAL sia immagazzinata in specifici granuli dei neutrofili non solo sotto forma di eterodimero con la gelatinasi, ma anche come monomero o omodimero (27).

In condizioni non patologiche è espressa a livelli molto bassi in numerosi tessuti umani, inclusi rene, stomaco e colon, appendice, midollo osseo adulto, trachea, polmone, ghiandole salivari, utero e prostata. Gli epatociti, insieme ai granulociti neutrofili, rappresentano la principale fonte di NGAL circolante nel siero.

Dal punto di vista strutturale NGAL appartiene alla famiglia delle lipocaline. Tale famiglia comprende più di 30 piccole proteine, che non condividono sequenze ad elevata omologia (approssimativamente del 30%), ma sono bensì definite sulla base della loro struttura tridimensionale, altamente conservata, che consiste in otto foglietti  $\beta$  anti-paralleli che si ripiegano in modo tale da formare un  $\beta$ -barrel, ossia un calice, una tasca idrofobica capace di legare e trasportare una grandissima varietà di molecole a basso peso molecolare. Sono numerose le lipocaline umane, tra cui la retinol-binding protein (RBP), proteina sierica responsabile del trasporto della vitamina A e la glicoproteina acida, una proteina della fase acuta sintetizzata dal fegato che sequestra endotossine e  $\text{TNF}\alpha$  per modulare in senso negativo la risposta flogistica.

### *Funzioni di NGAL*

La funzione biologica fondamentale di NGAL è legata alla sua capacità di trasportare il ferro. Dr. Roland K. Strong et al., attraverso esperimenti di cristallizzazione, notarono come NGAL ricombinante generato dall'*E. Coli* fosse di colore rossastro a differenza di quanto accadeva nel NGAL ricombinante ottenuto dalle cellule di insetti (28). Successivamente Goetz et al. (29) dimostrarono che tale colorazione era dovuta alla presenza di una molecola di ferro intrappolata nel sideroforo dell'*E. Coli*, detto enterochelina, e che NGAL è una sideroforo binding-protein. Normalmente i batteri producono i

siderofori, molecole in grado di legare con alta affinità il ferro, per assicurarsi un continuo apporto di questo ione, fondamentale nei processi di crescita e sviluppo cellulare. NGAL, grazie alla sua capacità di legare i siderofori, è in grado di ridurre la biodisponibilità del ferro per i batteri. Esso viene rilasciato dai neutrofili nel sito di infezione o di infiammazione e viene prodotto dal fegato come proteina della fase acuta per agire come un **fattore batteriostatico** nel contesto dei meccanismi di difesa dell'immunità innata (30,31). L'azione batteriostatica di NGAL è piuttosto duratura ed è legata alla sua capacità di resistenza nei confronti delle proteasi circolanti e batteriche ed al suo rapido legame al recettore della lipocalina (megalina), espressa su numerose cellule epiteliali, con conseguente endocitosi, al fine di sottrarre definitivamente il ferro al batterio. NGAL si associa a numerosi altri presidi difensivi dell'immunità innata che hanno lo stesso meccanismo d'azione, cioè ridurre la biodisponibilità del ferro per il metabolismo batterico. Ricordiamo tra questi la lattoferrina che lega il ferro direttamente, Nramp1 che riduce la disponibilità di ferro nei vacuoli fagocitici, hepcidina che riduce il rilascio di ferro dalle cellule intestinali e dai macrofagi inducendo uno stato di sideropenia (31).

Il ferro però è fondamentale anche in numerosi processi di crescita, differenziazione e sopravvivenza cellulare nell'organismo umano. Ne sono prova la localizzazione di tale ione nel sito attivo di numerose proteine tra cui proteine regolatrici della sintesi del DNA, la funzione stabilizzatrice della struttura terziaria proteica e la capacità di regolazione, attraverso l'attivazione di meccanismi trascrizionali e post-trascrizionali, dell'espressione genica. Per questo motivo il suo metabolismo è regolato da numerose proteine. Il principale meccanismo di captazione del ferro è rappresentato dalla transferrina, una glicoproteina sierica di circa 80 kD prodotta soprattutto dal fegato in condizioni di carenza marziale. Lega due atomi di  $Fe^{3+}$  trasportandoli nel sangue. Una volta legatasi a specifici recettori sulla superficie cellulare, TfR, viene endocitata. Tali recettori subiscono un processo di regolazione post-trascrizionale da parte del ferro stesso, la

loro sintesi aumenta quando la domanda di ferro è alta. Una volta endocitato il Fe<sup>3+</sup> viene rilasciato a livello endosomiale dove viene ridotto a Fe<sup>2+</sup> per essere poi trasferito al citoplasma. Numerosi studi, hanno evidenziato come la via della transferrina non sia essenziale per il rilascio di ferro in numerosi tessuti, inclusi gli epitelii. Topi ipotransferrinemici (32,33) e uomini attransferrinemici (34,35) hanno mostrato severi deficit nell'ematopoiesi e nello sviluppo del sistema nervoso centrale, ma molti epitelii normalmente sviluppati. In maniera analoga, topi privi del TfR1 davano inizio all'organogenesi, ma morivano precocemente per i severi effetti dell'anemia (36). Alla luce di ciò risulta evidente come debbano esistere vie alternative all'acquisizione di ferro nelle cellule non emopoietiche (37), ed è probabile che sia proprio NGAL la proteina implicata nel **trasporto** e nel **metabolismo del ferro**. La quota di questo ione non trasportata da transferrina all'interno della cellula è detta *non transferrin-bound iron*, NTBI. Fin'ora sono stati identificati due recettori di NGAL. Il primo è la proteina 24p3R, un trasportatore di cationi organici. Il secondo è il cosiddetto *multiprotein receptor megalin-cubulin* o megalina, espresso dalle cellule del tubulo prossimale del rene (38). Questo recettore è responsabile del riassorbimento di NGAL sierico filtrato dal glomerulo (in particolare ne riassorbe il 99,8%), come dimostra lo studio di Mori et al. su topi geneticamente privi di megalina che perdono NGAL nelle urine (39). A seguito dell'endocitosi, recettore mediata, del complesso NGAL:sideroforo:Fe (holo-NGAL), questo raggiunge il compartimento endosomiale acido, con conseguente rilascio del ferro e accumulo nel citoplasma dove regola l'espressione di geni ferro-dipendenti come la ferritina e la transferrina. NGAL può anche legare siderofori non complessati con il ferro o non legare affatto siderofori (apo-NGAL). In tale circostanza il ruolo fondamentale di questa proteina è la deplezione del pool intracellulare di ferro mediante la sua captazione e il successivo trasferimento nello spazio extracellulare, inducendo apoptosi cellulare. NGAL liberato dal suo sideroforo può essere nuovamente rilasciato dalla cellula e tornare nello spazio extracellulare

oppure essere degradato all'interno dei lisosomi. E sembra proprio la presenza di ferro, piuttosto che del sideroforo, a determinare i differenti effetti biologici (38). Esperimenti condotti sul mesenchima metanefrico del ratto mostrano come NGAL:enterochelina:Fe sia in grado di indurre un processo di epitelizzazione a differenza di apo-NGAL o NGAL:enterochelina. Inoltre, nello stesso studio, la sostituzione del Fe con gallio nel complesso con il sideroforo, dava luogo ad una netta riduzione delle capacità di induzione del differenziamento epiteliale (37). Da questi studi risulta evidente quanto il ferro sia fondamentale nella crescita e proliferazione cellulare ed in particolare NGAL si trova ad essere implicato nei processi di **differenziazione e organizzazione strutturale dell'epitelio renale** durante l'organogenesi. Durante la vita embrionale la conversione delle cellule mesenchimali del metanefro in cellule epiteliali tubulari del rene definitivo è regolata da numerosi fattori secreti dalla gemma ureterale, uno di questi risulta essere proprio NGAL. Ad oggi è stato provato da Yang et al. (37) come nel rene primordiale NGAL agisca, nelle primissime fasi dello sviluppo, sulle cellule progenitrici epiteliali e sullo stroma, mantenendoli vitali e inducendo la proliferazione, a differenza della transferrina che agisce sui progenitori epiteliali in uno stadio più tardivo portando a termine il programma di differenziazione cellulare. Perciò queste proteine agiscono come meccanismi di acquisizione del ferro a diversi stadi di sviluppo e su diversi target cellulari con ruoli complementari ed entrambi necessari al fine del corretto sviluppo dell'organo.

Appare evidente, ad un'attenta analisi della letteratura, che NGAL rivesta grande importanza come **fattore di crescita cellulare**. Risulta cioè capace di agire su molteplici serie cellulari, tra cui il rene adulto. Posto in coltura con cellule del dotto collettore è in grado di indurre la loro proliferazione e la conseguente organizzazione in strutture tubulari ordinate. Al contrario, in caso di inibizione dell'espressione di questa molecola, si formeranno aggregati cellulari disorganizzati e strutture cistiche (40). Inoltre la sintesi di NGAL da parte delle cellule epiteliali e dei neutrofili è incrementata in caso di **infiammazione**. La sua sintesi

è aumentata nei cheratinociti in caso di traumi della cute (31), la concentrazione è elevata nell'espettorato di soggetti affetti da asma cronico e broncopneumopatia cronica ostruttiva (41) e in diverse condizioni flogistiche tra cui le diverticoliti, l'appendicite e le malattie infiammatorie intestinali. Anche nel cancro del colon e del retto (42) e in un certo numero di altre **neoplasie**, come il cancro della mammella, del pancreas, dell'ovaio e dell'esofago è documentato un incremento di NGAL che probabilmente è implicata nella crescita e nella progressione neoplastica, grazie al suo ruolo nel metabolismo del ferro e alla sua capacità di legare la metallo proteinasi-9 (MMP-9) stabilizzando la sua azione enzimatica e prevenendone la degradazione proteolitica. Quindi MMP-9 potrà esplicare la sua azione di digestione della matrice extracellulare e delle membrane basali con conseguente liberazione di VEGF (vascular endothelial growth factor) che stimola l'angiogenesi e promuove la crescita tumorale.

NGAL recentemente ha suscitato notevole interesse per il suo possibile utilizzo in ambito nefrologico come molecola correlata al danno renale. Mentre in condizioni fisiologiche NGAL è presente in basse concentrazioni sia a livello sierico che a livello urinario, in condizioni di danno renale è stato documentato un incremento rapido e significativo di questa proteina. La quota plasmatica viene filtrata liberamente a livello del glomerulo renale a causa del suo peso molecolare basso, ma più rapidamente riassorbita tramite endocitosi, megalina-dipendente, nel tubulo renale. Alcuni autori sostengono che eserciti **effetti protettivi** nei confronti dell'epitelio renale, come dimostrato dallo studio di Mori (39) e di Mishra et al. (43) su modelli murini a seguito di un danno da ischemia-riperfusion. NGAL sembra agire a livello istologico, riducendo l'apoptosi e incrementando la proliferazione delle cellule tubulari; inoltre, si è dimostrato in grado di migliorare gli indici di filtrazione glomerulare renale. A livello molecolare, è ipotizzabile che agisca aumentando l'espressione di un enzima antiossidante come l'eme ossigenasi 1 e favorendo l'espressione di N-caderina nell'epitelio tubulare prossimale, molecola

capace di mediare l'adesione tra le cellule tubulari. Ricordiamo che comunque tale azione è svolta da Holo-NGAL. Dato che la quota di NGAL sierico filtrata dal glomerulo viene quasi interamente riassorbita, NGAL urinario non dipenderà dalla GFR, ma bensì dalla sua produzione da parte delle cellule epiteliali del tubulo prossimale e soprattutto dell'ansa di Henle, e dei dotti collettori. Questa quota non passa in circolo e viene escreta direttamente con le urine svolgendo principalmente una funzione batteriostatica per il tratto urinario inferiore ed in piccola parte protettiva nei confronti di danno renale, favorendo la riparazione del danno tramite la modulazione ferro dipendente dell'espressione genica (38). Eccezione deve essere fatta per tutte quelle condizioni in cui esista un danno del tubulo prossimale che inibisca la capacità di assorbimento e/o di sintesi de novo di NGAL determinando una escrezione urinaria della quota plasmatica della molecola. Il rialzo dei valori sierici di NGAL invece sembra derivare da molteplici fattori. Innanzitutto qualsiasi diminuzione del GFR fa sì che diminuisca la clearance renale di NGAL e che la molecola si accumuli nel plasma; in secondo luogo, dosaggi di NGAL effettuati nella vena renale di un rene sottoposto a ischemia indicano che NGAL sintetizzato localmente non è sufficientemente introdotto in circolazione, ma piuttosto viene escreto nelle urine (38). Il pool plasmatico della molecola non deriva esclusivamente dal rene, ma sono implicati altri organi come il fegato, il polmone, la milza, i neutrofili, i macrofagi e forse anche altre cellule del sistema immunitario dal momento che le condizioni di *acute kidney injury* o AKI hanno ripercussioni a livello di organi extrarenali e rappresentano una condizione flogistica.

#### **2.4.2 NGAL come marker di danno renale nei pazienti sottoposti a trapianto renale**

La necessità di individuare precocemente una qualsiasi condizione di danno renale a seguito del trapianto è fondamentale per prevenire la

perdita del graft. La *delayed graft function*, DGF, nel trapianto può essere considerata come una forma di *acute kidney injury*, AKI, post-trapianto, conseguente nella maggior parte dei casi a un danno da ischemia-riperfusion e/o ad un danno immunologico, i quali spesso possono agire sinergicamente accentuando ulteriormente la lesione. L'AKI può essere definito come una riduzione della funzione renale nell'arco di ore o giorni che comporta l'accumulo nell'organismo di sostanze azotate (urea, acido urico e creatinina), alterazioni della omeostasi elettrolitica, alterazioni del pH e ritenzione di liquidi. L'identificazione precoce dell'AKI è fondamentale per poter instaurare tempestivamente la terapia più appropriata e migliorare così la prognosi di questi pazienti: esistono incoraggianti studi su animali da laboratorio nei quali si è visto che un danno renale da ischemia, che è la causa più frequente di AKI, può essere sia prevenuto che trattato con efficacia se si interviene nelle fasi immediatamente successive all'insulto ischemico (44). Purtroppo però, allo stato attuale, la diagnosi precoce di AKI rappresenta ancora una sfida per i clinici, soprattutto a causa della mancanza di marcatori capaci di individuare l'AKI nelle sue primissime fasi. Attualmente nella pratica clinica il marker più utilizzato per la valutazione della funzionalità renale, sia in acuto che in cronico, è la creatinina sierica. In realtà, però, vi è un pressoché totale accordo nella comunità scientifica riguardo ai suoi limiti e la sua inaffidabilità nell'identificare un danno renale all'esordio. Attualmente una delle molecole più promettenti tra quelle candidate al ruolo di indicatore precoce di AKI è senz'altro NGAL (45). Sulla base di incoraggianti scoperte sul modello animale, furono intrapresi studi clinici al fine di validare l'utilizzo di NGAL come biomarker di danno renale acuto anche nell'uomo. Esperimenti preclinici sul modello murino misero in evidenza come il gene di NGAL sia uno tra i pochi indotti nel rene di topo immediatamente dopo insulto ischemico (46). Successivi studi proteomici, eseguiti su topo, hanno confermato tale evidenza sperimentale, NGAL è una delle proteine prodotte più precocemente e in maggiore quantità dal rene a seguito di danno renale acuto

ischemico (47) o tossico (49) ed è facilmente riscontrabile nel sangue e nelle urine subito dopo AKI.

NGAL urinario deriva dal danneggiamento del tubulo renale prossimale che inibisce la capacità di riassorbimento della molecola liberamente ultrafiltrata a livello glomerulare e/o da un aumento di sintesi di NGAL ex novo da parte del rene e dei neutrofili in sede di danno. Il pool sierico invece origina da una riduzione della clearance di questa proteina legata alla diminuzione della GFR e dalla sintesi de novo. Però, come dimostrato da Schmidt-Ott et al, questa molecola non viene prodotta solamente dal rene, ma anche dal fegato e dal polmone, per le abnormi ripercussioni dell'AKI su organi extrarenali, e dai neutrofili, i macrofagi ed altre cellule immunitarie dal momento che NGAL è una proteina reattiva della fase acuta (38).

In pazienti ricoverati in unità di terapia intensiva con diagnosi di AKI, la proteina NGAL sierica ed urinaria può subire incrementi rispettivamente di dieci volte e cento volte rispetto a valori basali ed è rilevabile in elevata concentrazione a livello tubulare all'analisi immunoistochimica di prelievi biotici renali (39;49). In bambini sottoposti a bypass aorto-coronarico, NGAL sierico ed urinario, dosati 2 ore dopo l'intervento, si sono dimostrati predittori indipendenti di AKI altamente sensibili, specifici e precoci, precedendo almeno di 48 ore il rialzo della creatininemia (44). Risultati simili sono stati ottenuti in altri studi su adulti sottoposti ad interventi di cardiocirurgia (50) e su bambini affetti da sindrome emolitica uremica associata a diarrea (51). Inoltre alcune ricerche hanno esaminato e confermato il ruolo di NGAL come valido marker predittivo di nefrotossicità a seguito della somministrazione di mezzo di contrasto (52,53).

Nel contempo però NGAL sierico ed urinario non si è dimostrato capace di valutare adeguatamente la severità di AKI e la mortalità ad esso correlata (54). Inoltre i suoi livelli, sia sierici che urinari, appaiono incrementati in concomitanza di molte condizioni, quali le infezioni del tratto urinario e sistemiche, malattie renali preesistenti, il diabete



mellito, l'aterosclerosi, l'età avanzata, etc. incidendo sulla sensibilità e la specificità di questo marcatore, specialmente in un paziente anziano o con comorbidità importanti (41). Per questi motivi e per la complessità del fenomeno AKI, un solo marcatore, seppur promettente come NGAL, non può essere sufficiente: sarà necessario ricorrere a più marcatori per aumentare l'accuratezza della diagnosi.

La capacità di NGAL di prevedere l'insorgenza di danno renale acuto potrebbe dare notevoli vantaggi perciò nel campo del trapianto renale. NGAL infatti si è rivelato capace di predire la ripresa funzionale del graft e diagnosticare precocemente l'insorgenza di un danno acuto, in quanto la DGF (*delayed graft function*) nel trapianto può essere considerata come una forma di AKI post-trapianto. Si pensa che nel rene adulto l'aumentata espressione di NGAL, che si osserva dopo un insulto ischemico (come ad esempio il danno da ischemia-riperfusion nel graft), sia dovuta alla capacità di questa molecola di indurre riepitelizzazione: quest'ipotesi è suffragata sia dalla dimostrazione che NGAL in vitro regola la morfogenesi dell'epitelio tubulare (55), sia dalla scoperta del suo ruolo di trasportatore del ferro con azione complementare alla transferrina durante la nefrogenesi (37). È noto che se da un lato il ferro è cruciale per la crescita e lo sviluppo delle cellule (e perciò presumibilmente anche per la loro rigenerazione post-ischemica), dall'altro può essere tossico per l'epitelio tubulare: è dunque verosimile che NGAL possa fungere in questo contesto anche da chelante del ferro perso dalle cellule danneggiate, limitandone così gli effetti citotossici; siccome NGAL viene poi endocitato dal tubulo prossimale, può cedere il ferro precedentemente chelato alle cellule vitali stimolandone la crescita e lo sviluppo: la molecola ha quindi una doppia utilità. Passeremo ora in rassegna i lavori più significativi presenti in letteratura incentrati sullo studio di NGAL nei pazienti sottoposti a trapianto renale.

Partendo dalle osservazioni fatte sul topo, nel quale, come ricordato in precedenza, una delle proteine più sintetizzate dalle cellule tubulari

renali dopo un insulto ischemico è NGAL, Mishra et al. (2005) hanno verificato l'ipotesi che questa lipocalina potesse rappresentare un marker di AKI nella popolazione dei trapiantati (56): questo studio è stato condotto su 25 pazienti, 13 dei quali effettuato un trapianto di rene singolo da donatore cadavere (CAD) e 12 da vivente (LDR); da tutti sono stati prelevati dei campioni bioptici approssimativamente un'ora dopo la ri-perfusione: ad un primo esame istologico tutti i campioni LDR apparivano normali, mentre tutti quelli CAD mostravano vari gradi di danno da ischemia-ri-perfusione, tra cui apoptosi e necrosi a chiazze; in un secondo tempo i preparati istologici sono stati incubati con anticorpi policlonali diretti contro NGAL: mentre nei campioni LRD NGAL era presente in minime tracce o addirittura assente, in quelli del gruppo CAD era facilmente identificabile, soprattutto nei tubuli prossimali ma anche nei segmenti distali del nefrone; i glomeruli e l'interstizio invece non mostravano reattività verso NGAL (56). Il grado di *staining intensity* di NGAL rilevato nelle biopsie dei pazienti del gruppo CAD inoltre predice il grado di AKI e correla molto bene col picco postoperatorio della creatinina sierica e con la richiesta di dialisi post-operatoria; inoltre è emersa una significativa correlazione tra l'intensità di NGAL sul campione bioptico e il tempo di ischemia fredda: ciò potrebbe rendere questa molecola un importante predittore del grado di danno renale presente dopo il trapianto. Occorre tuttavia sottolineare che la biopsia è pur sempre una manovra non scevra da rischi e pertanto sarebbe preferibile utilizzare tecniche diagnostiche meno invasive. Dal momento che NGAL ha dimostrato altissimo potere predittivo di AKI, nel 2006 Parikh et al. hanno studiato il suo ruolo nei pazienti sottoposti a trapianto renale (57). A differenza dello studio di Mishra et al è stata dosata la concentrazione di NGAL nelle urine, e accanto a NGAL è stato considerato anche il possibile ruolo di IL-18, i cui livelli urinari risultano aumentati in pazienti con DGF accertata; inoltre qui la popolazione in esame è più numerosa, includendo 53 pazienti di cui 23 con organo ricevuto da vivente e 30 da cadavere (di questi ultimi 10 hanno avuto DGF). È emerso che i valori urinari di

NGAL al giorno 0 (corretti per *creatinine reduction ratio*, escrezione urinaria e tempo di ischemia fredda) predicono lo sviluppo di DGF nel primo periodo post-trapianto: in particolare ogni aumento di NGAL urinario di 100 ng/mg di creatinina è associato a un incremento del rischio di DGF pari al 20%. L'AUC di NGAL è 0.9, il che lo rende un eccellente biomarker; si è visto che la sensibilità e la specificità di NGAL sono ottimali a un cut-off di 1000 ng/mg di creatinina (sensibilità= 0.9; specificità= 0.83). Bassi valori urinari di NGAL al giorno 0 correlano col declino della creatinina sierica nei giorni successivi. Anche l'AUC di IL-18 è pari a 0.9. È stato così dimostrato che la misurazione di NGAL e IL-18 nelle urine entro 24 ore dal trapianto è in grado di farci prevedere l'insorgenza di DGF prima degli altri strumenti clinici attualmente in uso. La determinazione dei valori di NGAL non è invasiva (aspetto da non sottovalutare) ed è oggi facilmente attuabile grazie alla presenza in commercio di kit capaci di compiere questa procedura in sole 4 ore.

Nel 2009 Lebkowska et al. (58), hanno verificato la possibilità di usare come biomarker anche NGAL sierico, visto che il paziente trapiantato nei primi giorni è spesso anurico e ciò rende ovviamente impossibile l'utilizzo di NGAL urinario. L'aumento della concentrazione plasmatica di NGAL nel soggetto trapiantato può essere dovuto a: maggiore induzione della sua sintesi a causa del danno renale, diminuzione della clearance renale con conseguente accumulo della molecola in circolo, nefrotossicità dei farmaci immunosoppressivi. In questo studio sono stati arruolati 41 pazienti, ciascuno dei quali ha ricevuto il graft da donatore cadavere; su di essi sono stati eseguiti prelievi ematici nelle giornate 1, 3, 6 e 10 successive all'intervento per dosare NGAL, creatinina e cistatina C. È stata osservata una notevole riduzione di NGAL sierico già in prima giornata post-trapianto, mentre i livelli sierici di cistatina C e creatinina iniziavano a diminuire in maniera significativa solo dalla terza giornata; i valori di NGAL sono risultati correlati positivamente con quelli di creatinina e cistatina C e negativamente col volume urinario; in 4 pazienti si è verificata DGF e in ognuno di essi

non si è registrata una riduzione significativa dei livelli sierici di NGAL, cistatina C e creatinina, che in questo gruppo hanno presentato livelli sierici più elevati rispetto a quelli riscontrati nei pazienti con pronta funzione del graft (58). NGAL sierico dunque può affiancarsi a NGAL urinario nel ruolo di biomarker precoce di AKI e DGF; risultati analoghi sono stati ottenuti anche da Kusaka et al. (59) che hanno dimostrato come NGAL sia in grado di predire la ripresa funzionale del rene dopo DGF in pazienti che hanno ricevuto graft espianati dopo la morte cardiaca dei donatori.

In un altro studio, Malyszko et al. (2009) hanno voluto verificare se NGAL potesse rappresentare un nuovo e sensibile marker della funzionalità renale a lungo termine del graft (60). Lo studio è stato condotto su 80 pazienti non diabetici con CKD (*chronic kidney disease*) negli stadi da 2 a 4 (stabiliti secondo le linee guida NFK/DOQI), 80 pazienti non diabetici sottoposti a trapianto di rene in terapia con inibitori della calcineurina, e infine 32 volontari sani con un GFR stimato sopra i 90 mL/min: i valori di NGAL sierico e creatinina sono risultati notevolmente maggiori e quelli di GFR significativamente minori nei pazienti trapiantati e in quelli affetti da CKD rispetto al gruppo di controllo; a parità di stadio di CKD i livelli di NGAL erano più alti nei pazienti trapiantati che in quelli con CKD; i valori di NGAL aumentavano progressivamente con l'avanzare dello stadio di CKD, raggiungendo il picco allo stadio 4 (60). Per quanto riguarda i pazienti trapiantati, sappiamo che la ciclosporina, uno degli immunosoppressori più utilizzati, provoca vasocostrizione sia delle arteriole afferenti che di quelle efferenti, con conseguente riduzione del flusso ematico renale e del GFR. L'esposizione continua e a lungo termine alle dosi di mantenimento degli inibitori della calcineurina e la sua potenziale nefrotossicità rappresenta una causa di disfunzione cronica dell'organo trapiantato. È stato provato (61) che pazienti trapiantati che hanno sviluppato tubuliti di grado Ia/Ib (secondo la classificazione di Banff) mostrano livelli di NGAL urinario notevolmente maggiori rispetto a quelli stabili con normale quadro istologico o con tubulite subclinica.

Tuttavia non esistono marcatori in grado di differenziare chiaramente trapianti stabili con una istologia tubulare normale da pazienti con una tubulite subclinica, in tal caso l'esame di scelta rimane la biopsia. Poiché nello studio di Shaub (2007), preso in esame, è emerso che NGAL, nei soggetti trapiantati, correla positivamente non solo con gli indici di funzione renale, ma anche con la concentrazione di inibitori della calcineurina (61), determinando i valori di NGAL potremmo predire l'insorgenza di danno da nefrotossicità da inibitori della calcineurina con considerevole anticipo rispetto al dosaggio della creatinina. La capacità di NGAL di individuare una nefrotossicità da inibitori della calcineurina è stata indagata da Wasilewska et al. (2010) con uno studio condotto su un gruppo di 19 bambini con una sindrome nefrosica steroide-dipendente in terapia con ciclosporina e ace inibitori messi a confronto con un gruppo di controllo di 18 bambini sani (62). I bambini con sindrome nefrosica presentavano livelli di NGAL sierico, misurati prima dell'inizio della terapia con ciclosporina, non differenti dai valori rilevati nel gruppo di controllo. Al contrario, ai dosaggi a 3 e 6 mesi dall'inizio della terapia con ciclosporina, mostravano un incremento rispettivamente di tre e sei volte rispetto ai controlli, mentre a un anno andavano riducendosi. I livelli di NGAL urinario invece aumentavano durante tutto il corso della terapia e i valori di uNGAL/cr ratio correlavano positivamente con la concentrazione sierica del farmaco e non con la dose. I risultati ottenuti con la curva ROC indicano come uNGAL/cr ratio sia un miglior predittore di nefrotossicità per incrementi di oltre il 50% rispetto ai valori di base rispetto a sNGAL aumentato oltre il 50% rispetto ai valori di base, ma come non abbia ad ogni modo una buona sensibilità poiché la AUC è di 0.633 (62).

Dato che allo stato attuale in caso di DGF la diagnosi differenziale tra rigetto acuto e nefrotossicità da inibitori della calcineurina è ancora piuttosto difficoltosa, e che il tempo a disposizione per mettere in atto la terapia appropriata è estremamente ridotto, è chiaro quanto sia importante poter contare su un marker precoce di DGF come NGAL

per poter impostare al più presto o il trattamento dialitico o la terapia antirigetto.

## OBIETTIVO DELLO STUDIO

Lo scopo principale di questo studio è stato quello di verificare l'utilità di NGAL quale biomarker nel follow-up del paziente trapiantato (end-point primario). In particolare abbiamo valutato la sua efficacia quale:

- marcatore capace di predire l'insorgenza di DGF nell'immediato post trapianto
- predittore della funzione del graft nella fase di stabilizzazione del trapianto

Quali end-points secondari sono state valutate le variazioni di NGAL sierico ed urinario in relazione a parametri clinici sensibili quali:

- giorni di degenza post trapianto
- età dialitica
- età del donatore
- tempo di ischemia fredda
- terapia immunosoppressiva con inibitori della calcineurina
- trattamento dialitico pre trapianto (HD, PD)
- sesso del ricevente
- età del ricevente
- numero di mismatch

## PAZIENTI E METODI

La popolazione presa in esame include 44 soggetti trapiantati (29 maschi e 15 femmine) di età media pari a  $53,9 \pm 9,6$  anni, sottoposti a trapianto renale singolo o doppio da donatore cadavere da febbraio 2009 e maggio 2010 presso l'Unità Operativa di Nefrologia, Dialisi e Trapianto del Policlinico Universitario S. Orsola diretta dal prof S. Stefoni. In tutti i pazienti l'intervento chirurgico è stato eseguito dalla medesima Equipe, utilizzando gli stessi protocolli di gestione intra-operatoria.

### *Protocollo di ricerca*

Per i pazienti arruolati nello studio sono stati raccolti e analizzati campioni per dosare creatininemia, NGAL sierico ed NGAL urinario con la seguente tempistica:

- Giorno 1 = prima giornata post operatoria
- Giorno 3 = terza giornata post operatoria
- Giorno 7 = settima giornata post operatoria
- Giorno 14 = due settimane dopo l'intervento
- Giorno 30 = un mese dopo l'intervento

È stata inoltre valutata la diuresi in prima giornata.

Sono stati poi raccolti alcuni parametri clinici salienti quali i giorni di degenza post trapianto, l'età dialitica, l'età del donatore, il tempo di ischemia fredda, la terapia immunosoppressiva, il tipo di trattamento dialitico pre trapianto (HD, PD), il sesso del ricevente, l'età del ricevente, il numero di mismatch.

Le analisi che abbiamo condotto sulla base dei dati raccolti sono le seguenti:

- Nell'immediato post trapianto (Giorno 1 - Giorno 7) abbiamo confrontato l'andamento di NGAL nei pazienti con o senza DGF,



mediante tre diverse sottoanalisi a seconda che si intenda DGF come:

1. necessità di dialisi nella prima settimana post trapianto
2. persistenza di elevati livelli di creatinina sierica, a tal proposito abbiamo considerato i diversi tempi di dimezzamento della creatinina plasmatica
3. presenza di oliguria/anuria in prima giornata.

Infine abbiamo rapportato l'andamento di creatinina sierica ed NGAL plasmatico in funzione della capacità predittiva di DGF.

- Nella fase di stabilizzazione del trapianto (Giorno 7 - Giorno 30) abbiamo confrontato l'andamento di NGAL in pazienti con ripresa funzionale del graft più o meno efficace al termine del periodo di osservazione di questo studio prendendo come parametri di riferimento:

1. creatininemia a 30 giorni dal trapianto  $\leq$  o  $>$  2 mg/dL
2. GFR a 30 giorni dal trapianto  $\leq$  o  $>$  60 mL/min.

- Abbiamo infine verificato l'andamento di NGAL in funzione della variazione di alcuni parametri clinici sensibili da noi considerati, quali:

1. giorni di degenza post operatori superiori ed inferiori a 15 giorni
2. età dialitica superiore ed inferiore a 60 mesi
3. età del donatore inferiore o superiore a 60 anni
4. tempo di ischemia fredda superiore ed inferiore a 15 ore
5. protocolli di terapia immunosoppressiva, in particolare pazienti trattati con ciclosporina (CsA) e pazienti trattati con tacrolimus (Tac)
6. trattamento dialitico pre trapianto, HD o DP
7. sesso del ricevente
8. età del ricevente superiore o inferiore a 60 anni
9. numero di mismatch superiore o inferiore a 3

In tutti i casi sono stati presi in considerazione sia i campioni sierici che quelli urinari di NGAL.

### *Caratteristiche di base della popolazione*

L'intera popolazione studiata è di etnia caucasica; prima del trapianto tutti i pazienti erano sottoposti a terapia sostitutiva artificiale: l'età dialitica media al momento del trapianto era  $63,9 \pm 29,3$  mesi; 37 pazienti erano in trattamento con emodialisi, 7 con dialisi peritoneale. Tutti i pazienti hanno ricevuto il graft da cadavere; solo 2 soggetti sono stati sottoposti a doppio trapianto. L'età media dei donatori era di  $58,2 \pm 14,8$  anni; il tempo medio di ischemia fredda a cui gli organi espantati sono stati esposti è stato di  $14,5 \pm 4,9$  ore. Dopo il trapianto in 17 pazienti si è verificata DGF, intesa come necessità dialitica nella prima settimana post trapianto, in un caso si è assistito ad una *primary not function* e nei restanti 26 invece il graft ha avuto una pronta ripresa funzionale. Utilizzando gli altri criteri di DGF, 33 pazienti hanno avuto un tempo di dimezzamento della creatinina maggiore o uguale a 3 giorni e 18 pazienti hanno presentato oligoanuria in prima giornata post operatoria. Le altre principali complicanze osservate comprendono 6 casi di emorragia post operatoria che hanno richiesto il ricorso ad emotrasfusioni, 2 casi di fistola urinosa (uno dei quali accompagnato da rottura di cisti ovarica ed emorragia) trattati chirurgicamente e 1 caso di microlitiasi in cui è stato posizionato un catetere vescicale. Durante lo studio si è osservato un unico episodio di rigetto acuto, clinicamente sospetto, ma non accertato da biopsia, regredito prontamente a seguito di potenziamento della terapia immunosoppressiva.

Tra tutti i pazienti 35 sono stati sottoposti a terapia di induzione con basiliximab (20 mg pre-trapianto e 20 mg in quarta giornata post-operatoria), 7 non hanno eseguito tale trattamento e solo ad 1 è stato somministrato timoglobuline (dosaggio complessivo di 100 mg fino alla terza giornata post trapianto). Tutti i pazienti dopo l'intervento

hanno intrapreso una terapia immunosoppressiva di mantenimento: 12 pazienti assumono steroidi, tacrolimus e micofenolato mofetile; 8 steroidi, ciclosporina e micofenolato mofetile; 24 steroidi, ciclosporina ed everolimus. (Per le caratteristiche dei donatori e dei riceventi vedi Tabelle 2 e 3. Nella Tabella 4 sono riportate in modo analitico, paziente per paziente, tutte le caratteristiche del trapianto).

**Tabella 2:** caratteristiche dei donatori e del graft

ETA' MEDIA (anni)	58,2 ± 14,8
DONATORE	
➤ Vivente	0
➤ Cadavere	44
TEMPO DI ISCHEMIA FREDDA (ore)	14,5 ± 4,9

**Tabella 3:** caratteristiche dei riceventi

ETA' MEDIA (anni)	53,9 ± 9,6
SESSO	
➤ Maschi	29
➤ Femmine	15
CAUSA ESRD	
➤ Rene policistico tipo adulto	9
➤ Nefropatia da depositi di IgA	9
➤ Nefrite interstiziale da uropatia ostruttiva congenita o da urolitiasi	3
➤ Nefropatia su base vascolare	4
➤ Lupus nefrite	1
➤ Glomerulonefrite cronica	2
➤ Glomerulonefrite membranosa	2
➤ Necrosi corticale e/o tubulare	1
➤ IRC non diagnosticata	13
ETA' DIALITICA MEDIA (mesi)	63,9 ±29,3
TECNICA DIALITICA	
➤ Emodialisi	37
➤ Dialisi peritoneale	7

<p><b>RIPRESA FUNZIONALE DEL GRAFT:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ necessità dialitica nella prima settimana post trapianto <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Immediate graft function</i> 26</li> <li>➤ <i>Delayed graft function</i> 17</li> <li>➤ <i>Primary not function</i> 1</li> </ul> </li>   <li>▪ t<sup>1</sup>/<sub>2</sub> creatinina plasmatica ≥3 giorni <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Immediate graft function</i> 10</li> <li>➤ <i>Delayed graft function</i> 33</li> <li>➤ <i>Primary not function</i> 1</li> </ul> </li>   <li>▪ oligoanuria in prima giornata post trapianto <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Immediate graft function</i> 25</li> <li>➤ <i>Delayed graft function</i> 18</li> <li>➤ <i>Primary not function</i> 1</li> </ul> </li> </ul>	
<p><b>COMPLICANZE</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Rigetto acuto 1</li> <li>➤ Emorragia 6</li> <li>➤ Fistola urinosa 2</li> <li>➤ Microlitiasi 1</li> </ul>	
<p><b>TERAPIA POST-TRAPIANTO</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ ST+Tac+MMF 12</li> <li>➤ ST+CsA+MMF 8</li> <li>➤ ST+CsA+RAD 24</li> </ul>	

**Tabella 4:** caratteristiche di base del trapianto

P Z	ETA' PZ (anni )	MALAT- TIA DI BASE	ETA' DIALI- TICA (mesi)	TECNICA DIALITICA	ETA' DONOR (anni)	ISCHEMIA FREDDA (ore)	DGF
1	65	ESRD	94	HD	61	14	SI'
2	56	ADPHD	69	HD	44	11	SI'
3	38	N INT	128	HD	44	28	NO
4	55	N VASC	24	PD	49	13	NO
5	63	ADPHD	72	HD	74	12	SI'
6	55	ADPHD	102	HD	59	16	NO
7	60	ADPHD	39	HD	77	17	NO
8	50	Necr Cort	117	HD	55	10	SI'
9	38	LN	59	HD	28	11	SI'
1 0	32	ESRD	31	PD	24	10	NO
1 1	59	ESRD	61	HD	57	15	SI'
1 2	56	ESRD	95	HD	55	12,5	NO
1 3	62	ESRD	61	HD	59	19	SI'
1 4	63	N VASC	47	HD	59	24	NO
1 5	61	ESRD	34	HD	62	12	SI'
1 6	47	ADPHD	45	HD	62	16	SI'
1 7	65	N INT	10	PD	79	15	NO
1 8	46	N IgA	34	HD	63	9,5	SI'
1 9	53	N IgA	46	HD	67	15	NO
2 0	65	ESRD	75	HD	67	27	SI'

2 1	59	N INT	65	HD	73	21	NO
2 2	56	ESRD	17	PD	65	12	NO
2 3	60	ESRD	33	HD	65	21	NO
2 4	53	N VASC	24	HD	62	10	NO
2 5	58	ADPHD	41	HD	66	25	NO
2 6	49	GNC	115	HD	66	15	SI'
2 7	49	N IgA	96	HD	59	19	NO
P Z	ETA' PZ (anni )	MALAT- TIA DI BASE	ETA' DIALI- TICA (mesi)	TECNICA DIALITICA	ETA' DONOR (anni)	ISCHEMIA FREDDA (ore)	DGF
2 8	46	ADPHD	82	HD	46	11	PNF
2 9	35	N IgA	69	HD	23	12	NO
3 0	49	ADPHD	88	HD	46	15	SI'
3 1	54	GNC	28	HD	59	12	NO
3 2	56	ADPHD	61	HD	59	14,5	NO
3 3	49	ESRD	87	HD	66	10	NO
3 4	65	N IgA	82	HD	72	16	NO
3 5	37	GNM	46	PD	25	7	NO
3 6	40	N IgA	43	PD	27	12	NO
3 7	69	N IgA	53	HD	77	12	NO

7							
3	65	N VASC	87	HD	77	18	SI'
8							
3	63	ESRD	57	HD	62	16	NO
9							
4	70	GNM	47	HD	70	12	NO
0							
4	47	ESRD	56	HD	71	10	SI'
1							
4	61	N IgA	110	HD	70	9,5	SI'
2							
4	43	N IgA	92	PD	61	9	NO
3							
4	48	ESRD	89	HD	61	9	SI'
4							
<b>T</b>	<b>ME-</b>		<b>ME-</b>	<b>HD/PD:</b>	<b>MEDIA=</b>	<b>MEDIA</b>	<b>DGF/IGF:</b>
<b>O</b>	<b>DIA=</b>		<b>DIA=</b>	<b>37/7</b>	<b>58,2 ±</b>	<b>=</b>	<b>17/26</b>
<b>T</b>	<b>53,9</b>		<b>63,9 ±</b>		<b>14,8</b>	<b>14,5 ± 4,9</b>	
<b>44</b>	<b>± 9,6</b>		<b>29,3</b>				<b>PNF: 1</b>

Malattie di base: ESRD end stage renal disease ovvero IRC non diagnosticata; ADPHD malattia policistica autosomica dominante; N INT nefrite interstiziale da uropatia ostruttiva; Necr Cort necrosi corticale; LN lupus nefrite; N VASC nefropatia vascolare; N IgA nefropatia da depositi di IgA; GNC glomerulonefrite cronica; GNM glomerulonefrite membranosa. DGF: necessità dialitica nella prima settimana post operatoria.



### *Stoccaggio ed analisi dei campioni*

Tutti i campioni prelevati sono stati inviati al laboratorio centralizzato del Policlinico S. Orsola, ad eccezione dei campioni sierici ed urinari di NGAL, analizzati nel laboratorio della nostra Unità Operativa.

Qui i campioni di sangue e di urine sono stati conservati in frigorifero a 4°C fino al loro stoccaggio, che avveniva comunque sempre entro quattro ore dalla raccolta. I campioni di sangue sono stati centrifugati a 2500 rpm per 15 minuti, ed il siero è stato dunque congelato a -20°C fino al momento dell'analisi. I campioni di urine sono stati sottoposti a centrifugazione a 1500 rpm per 10 minuti e il soprannatante è stato congelato a -20°C fino al momento dell'analisi.

Per il dosaggio di NGAL in entrambi i fluidi biologici è stato usato il test ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), che consiste in un test immunoenzimatico in grado di rilevare la presenza di una data molecola nel siero, nel plasma o in altri campioni biologici. Questo saggio, che si effettua su una piastra da 96 pozzetti, utilizza uno specifico anticorpo monoclonale precedentemente adeso ai pozzetti. Per calcolare la concentrazione di campioni in studio, si ricorre all'utilizzo di standard che consentono la costruzione di una curva di riferimento. Dopo l'aggiunta di standard o di campione nei rispettivi pozzetti, la piastra è stata lasciata in incubazione per circa un'ora così che ogni analita potesse legarsi all'anticorpo immobilizzato sul fondo del pozzetto. Dopo 3-4 lavaggi con un tampone si è aggiunto un secondo anticorpo specifico legato a biotina. Questa seconda incubazione dura circa un'ora e dopo altri 3-4 lavaggi si è proseguito con l'aggiunta di un enzima coniugato a streptavidina che è capace di legare la biotina e dunque il secondo anticorpo. Dopo altri 3-4 lavaggi per eliminare tutti gli anticorpi rimasti in sospensione, è stato aggiunto un substrato specifico per l'enzima. A questo punto si verifica una reazione capace di sviluppare un'intensità di colore proporzionata alla quantità di analita legatosi nel primo passaggio. La reazione colorimetrica è stata fermata con l'aggiunta di una "soluzione di stop" e

la lettura è stata eseguita immediatamente con un lettore per micropiastre DV 990 BV5UV (GVD, Roma, Italia) misurando l'assorbanza a 450 nm.

### *Analisi statistica*

Per l'analisi statistica dei dati è stato utilizzato il software SAS System 9.1. I test impiegati sono test non parametrici: è stato usato il test di Wilcoxon in tutti i casi tranne che per il confronto dei livelli di NGAL nei tre gruppi di pazienti con differente output urinario in prima giornata e nei quattro gruppi di pazienti con differenti tempi di dimezzamento delle creatinina plasmatica, per il quale è stato usato il test di Kruskal-Wallis.

Sono stati considerati significativi valori di  $p < 0,05$ .

## RISULTATI

### ***NGAL nel follow up del paziente trapiantato nell'immediato post trapianto (Giorno 1 - Giorno 7)***

#### *NGAL e delayed graft function (DGF)*

In questo studio abbiamo valutato l'andamento di NGAL nei pazienti a seconda che abbiano sviluppato o meno DGF. In particolare abbiamo condotto tre diverse sottoanalisi in considerazione delle differenti definizioni di DGF, ovvero come necessità di terapia dialitica nella prima settimana post trapianto, come persistenza di elevati livelli di creatinina plasmatica e come mancata ripresa precoce di diuresi efficace post operatoria.

Per quanto riguarda la necessità di dialisi nella prima settimana post trapianto, dalla nostra analisi è risultato che i livelli sierici di NGAL nei 18 pazienti con ripresa funzionale non immediata (*delayed graft function*), includendo in questo gruppo anche il paziente con *primary not function*, sono maggiori (vedi tabella 5) rispetto ai pazienti con *immediate graft function* (IGF). Tale differenza risulta statisticamente significativa nei seguenti controlli (Figura 2):

- Giorno 1 (prima giornata post-operatoria) (p= 0,007)
- Giorno 3 (terza giornata post-operatoria) (p= 0,009)
- Giorno 7 (settima giornata post-operatoria) (p= 0,003)

Anche per quanto riguarda l'analisi della concentrazione di NGAL nei campioni urinari, i livelli sono maggiori in pazienti che hanno sviluppato DGF (vedi tabella 5) e le differenze sono risultate statisticamente significative nei seguenti tempi:

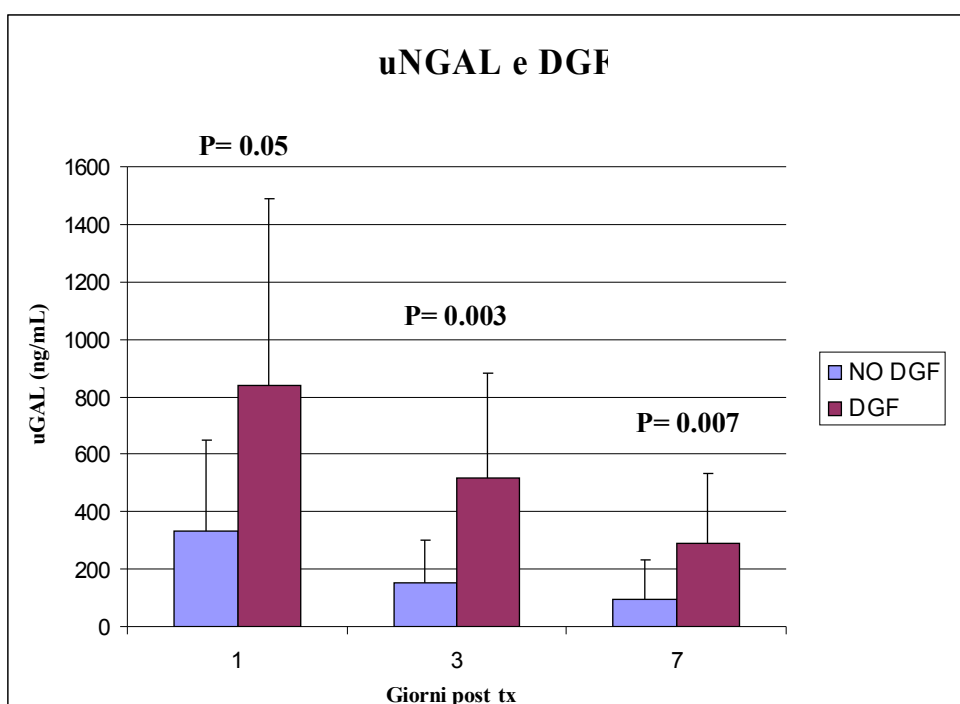
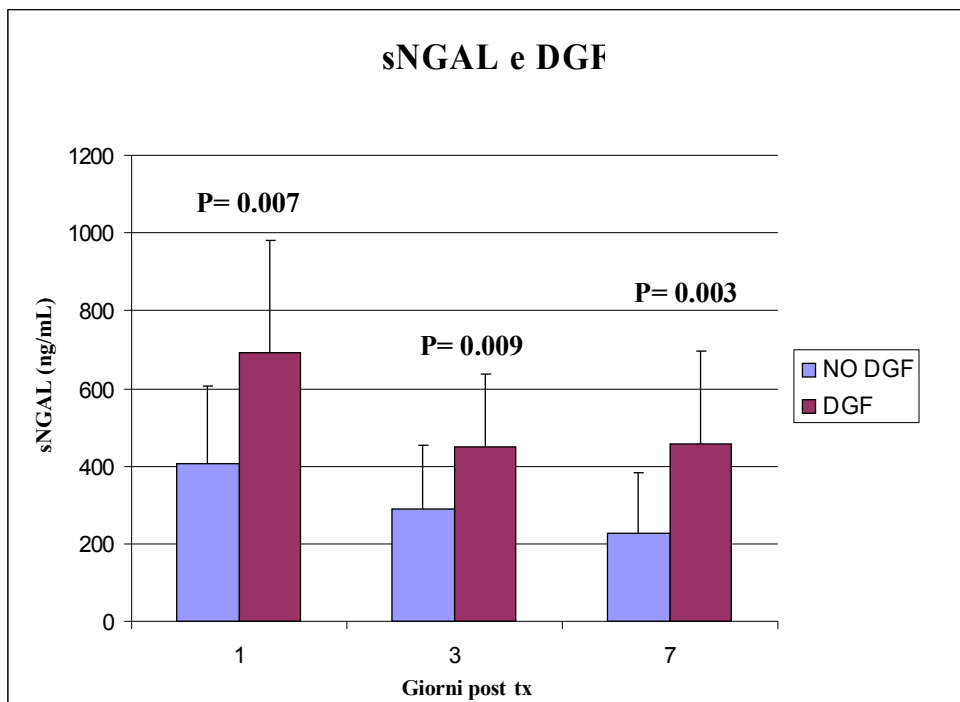
- Giorno 1 (p= 0,05)
- Giorno 3 (p= 0,003)
- Giorno 7 (p= 0,007)

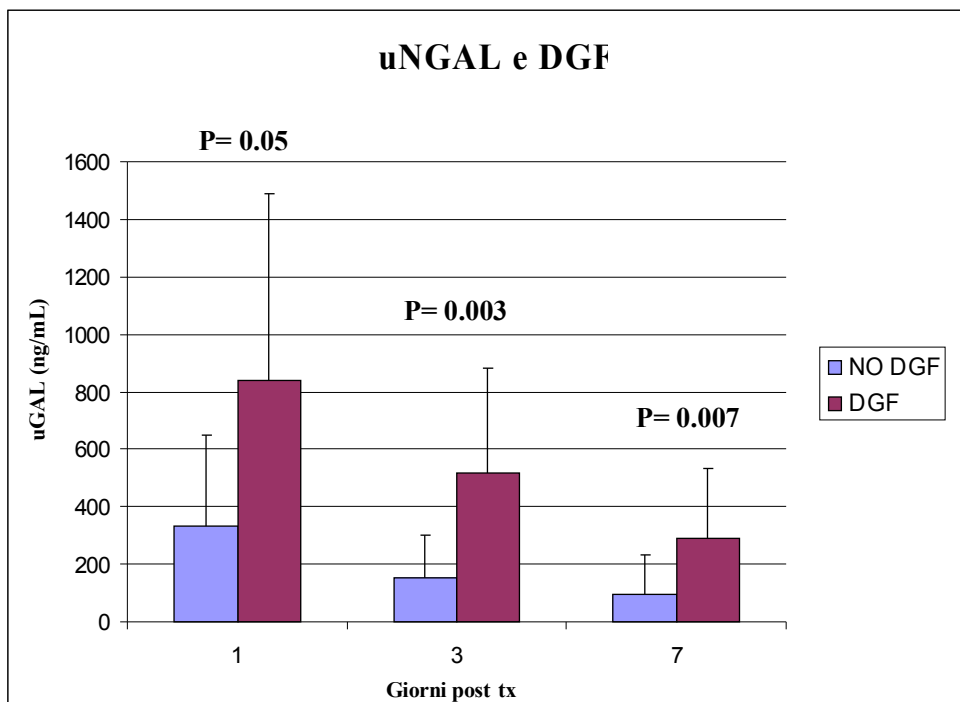
**Tabella 5:** valori medi di NGAL sierico, NGAL urinario e creatinemia nei diversi controlli nei pazienti con o senza DGF.

GIORNI POST TX	NGAL SIERICO		NGAL URINARIO		CREATININEMIA	
	NO DGF	DGF	NO DGF	DGF	NO DGF	DGF
Giorno 1	407,901 ±199,04 4	692,681 ±287,36 3	331,723 ±319,06 9	839,04 ±651,558	5,984 ±2,901	7,581 ±2,280
Giorno 3	287,772 ±167,51 6	448,662 ±186,60 8	151,944 ±151,50 6	515,75 ±365,259	3,616 ±2,088	7,038 ±2,67
Giorno 7	228,098 ±156,03 1	228,098 ±240,45 9	95,504 ±135,34 6	292,971 ±239,633	1,815 ±0,730	5,171 ±3,071
Giorno 14	170,51 ±118,39 4	334,402 ±225,88 8	73,741 ±96,715	297,763 ±414,369	1,491 ±0,506	3,066 ±1,9818
Giorno 30	192,545 ±98,289	253,958 ±208,37 8	83,504 ±86,269	183,174 ±286,044	1,575 ±0,527	1,575 ±0,406

Tutti i valori sono espressi come media ± deviazione standard. NGAL sierico e urinario sono misurati in ng/mL; la creatinemia in mg/dL.

**Figura 2:** Confronto dei livelli di NGAL tra pazienti con o senza *delayed graft function* (DGF), ovvero necessità di dialisi nella prima settimana post trapianto.

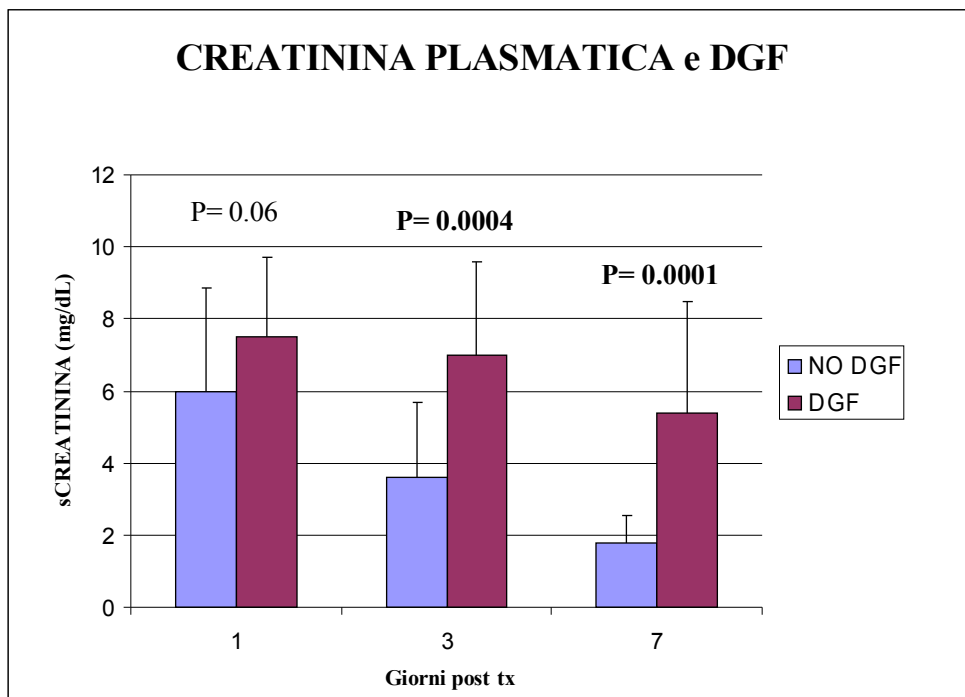




Per paragonare l'efficacia di NGAL e creatinina plasmatica rispetto alla diagnosi di DGF abbiamo verificato l'andamento della creatinina nei due gruppi di pazienti, a seconda che sviluppino o meno DGF (Figura 3), intesa come necessità di dialisi nella prima settimana post trapianto. I livelli di creatinina sono costantemente maggiori in pazienti che presentano una ritardata ripresa funzionale rispetto a coloro che invece hanno una pronta ripresa del graft. Diversamente da NGAL tale differenza risulta essere statisticamente significativa nelle seguenti rilevazioni:

- Giorno 3 ( $p= 0,0004$ )
- Giorno 7 ( $p= 0,0001$ )

**Figura 3:** Confronto dei livelli di creatinina tra pazienti con o senza *delayed graft function* (DGF), ovvero necessità di dialisi nella prima settimana post trapianto.





La DGF è definita anche come persistenza di alti livelli di creatinina sierica dopo il trapianto e, a tal proposito, abbiamo studiato l'andamento di NGAL in funzione di diversi tempi di dimezzamento ( $t_{1/2}$ ) della creatinina sierica nel post trapianto, dividendo la popolazione in quattro gruppi (Figura 4):

1. tempo di dimezzamento della creatinina sierica minore di 3 giorni
2. tempo di dimezzamento della creatinina sierica compreso tra 3 e 4 giorni
3. tempo di dimezzamento della creatinina sierica compreso tra 5 e 7 giorni
4. tempo di dimezzamento della creatinina sierica sopra i 7 giorni

Valori significativi di NGAL sierico nei pazienti con diversi tempi di dimezzamento della creatinina si ottengono nei seguenti tempi:

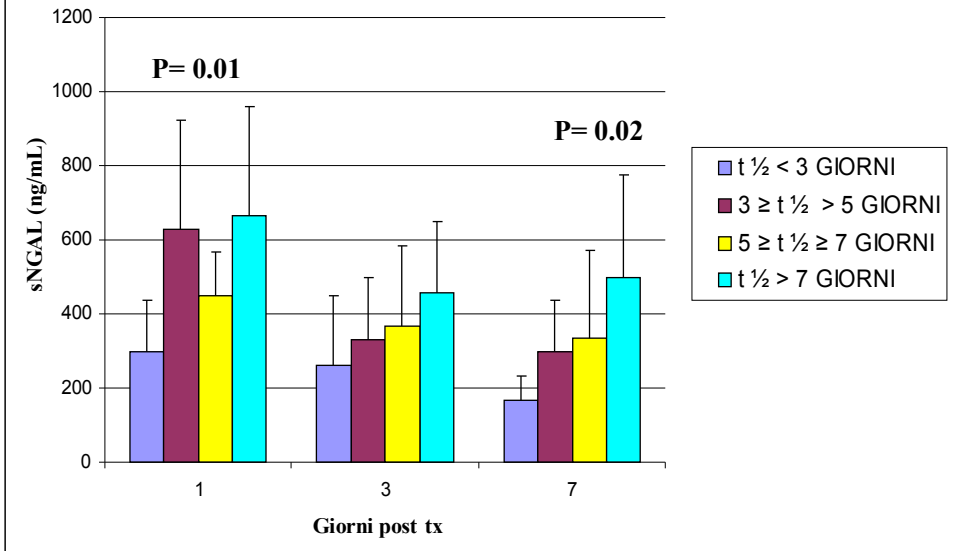
- Giorno 1 ( $p=0,01$ )
- Giorno 7 ( $p=0,02$ )

Valori significativi di NGAL urinario nei pazienti con diversi tempi di dimezzamento della creatinina si ottengono nei seguenti tempi:

- Giorno 1 ( $p=0,03$ )
- Giorno 3 ( $p=0,004$ )
- Giorno 7 ( $p=0,01$ )

**Figura 4:** Confronto tra pazienti con diversi tempi di dimezzamento della creatinina nel post trapianto, minore di 3 giorni, tra 3 e 4 giorni, tra 5 e 7 giorni, oltre 7 giorni.

### sNGAL e tempo di dimezzamento della creatinina



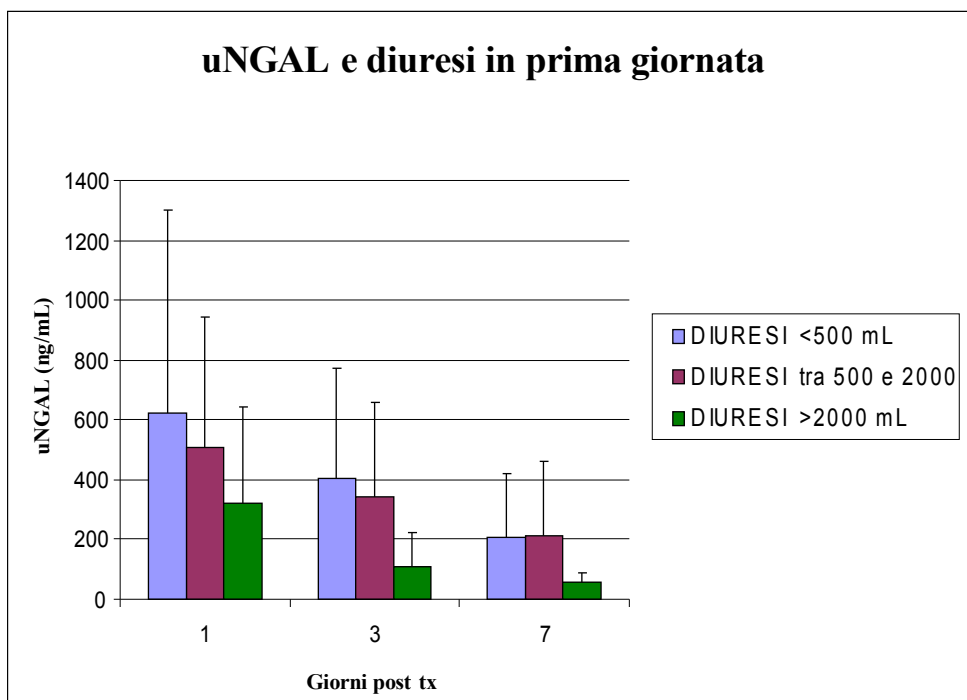
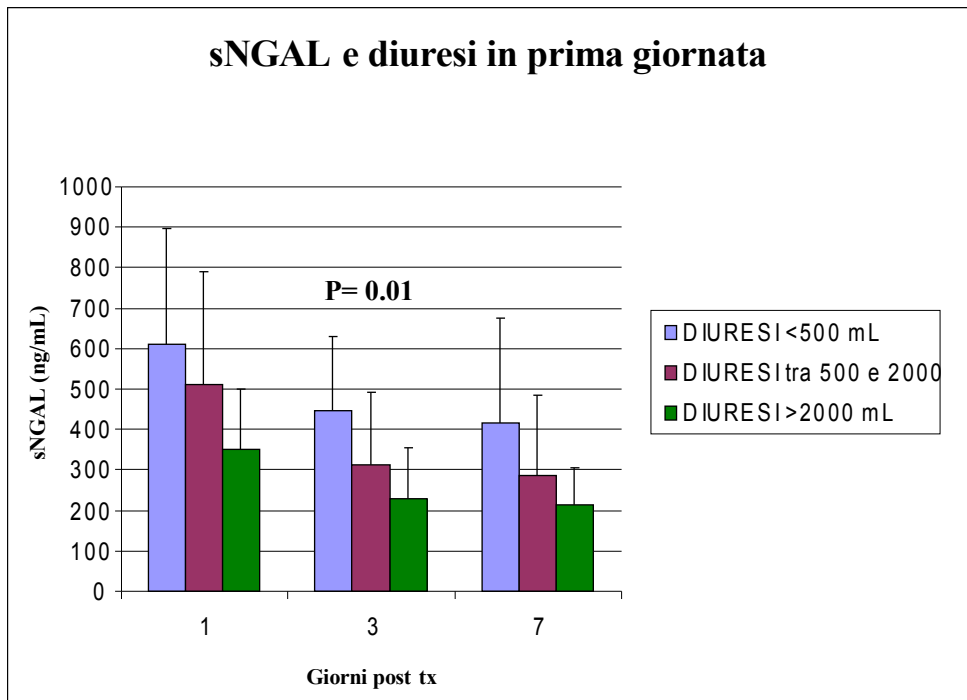
Pazienti che non presentano subito dopo il trapianto una ripresa della diuresi sono soggetti a ritardata ripresa funzionale del graft, ovvero DGF. Per questo motivo abbiamo confrontato l'andamento di NGAL con la diuresi in prima giornata post trapianto dividendo i pazienti in tre gruppi in base all'output urinario:

1. Diuresi inferiore ai 500 mL
2. Diuresi compresa tra 500 e 2000 mL
3. Diuresi superiore ai 2000 mL

Dall'analisi dei dati è risultato che i pazienti oligurici/anurici in prima giornata post trapianto hanno livelli sierici ed urinari di NGAL maggiori rispetto agli altri gruppi in ogni rilevazione nel primo mese post operatorio, in particolare se confrontati con pazienti con diuresi oltre i 2000 mL (Figura 5). Tale differenza risulta statisticamente significativa per i livelli sierici in terza giornata ( $p= 0,01$ ) dal trapianto.

Nei campioni urinari la significatività statistica non è raggiunta in nessuna rilevazione.

**Figura 5:** Confronto tra pazienti con differente diuresi in prima giornata post operatoria.



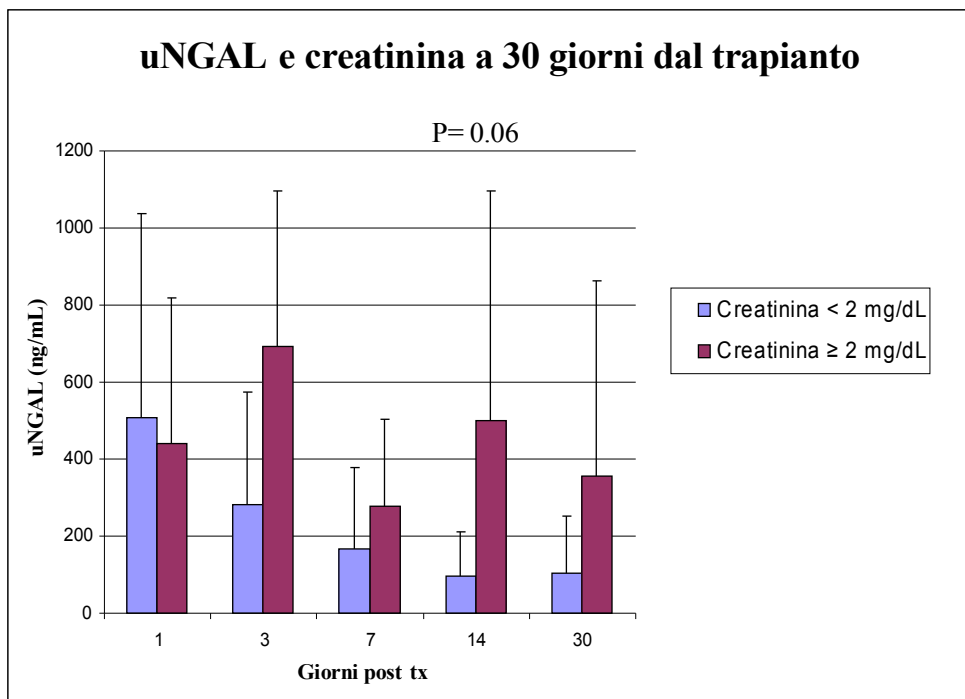
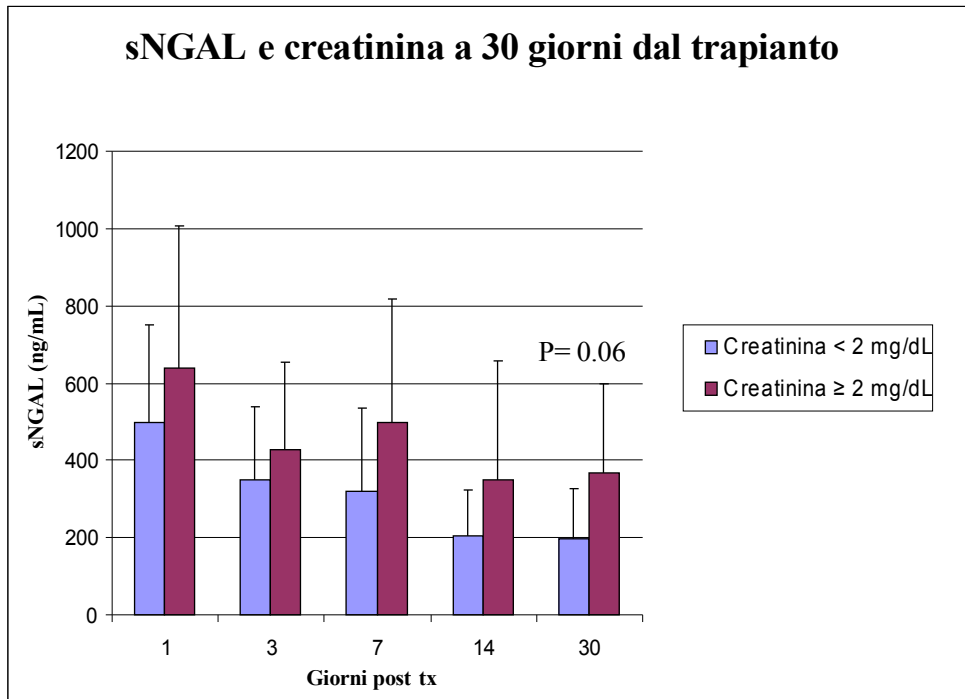
## ***NGAL nel follow up del paziente trapiantato nel periodo di stabilizzazione del trapianto (Giorno 7 - Giorno 30)***

### *NGAL e funzione renale a 30 giorni dal trapianto*

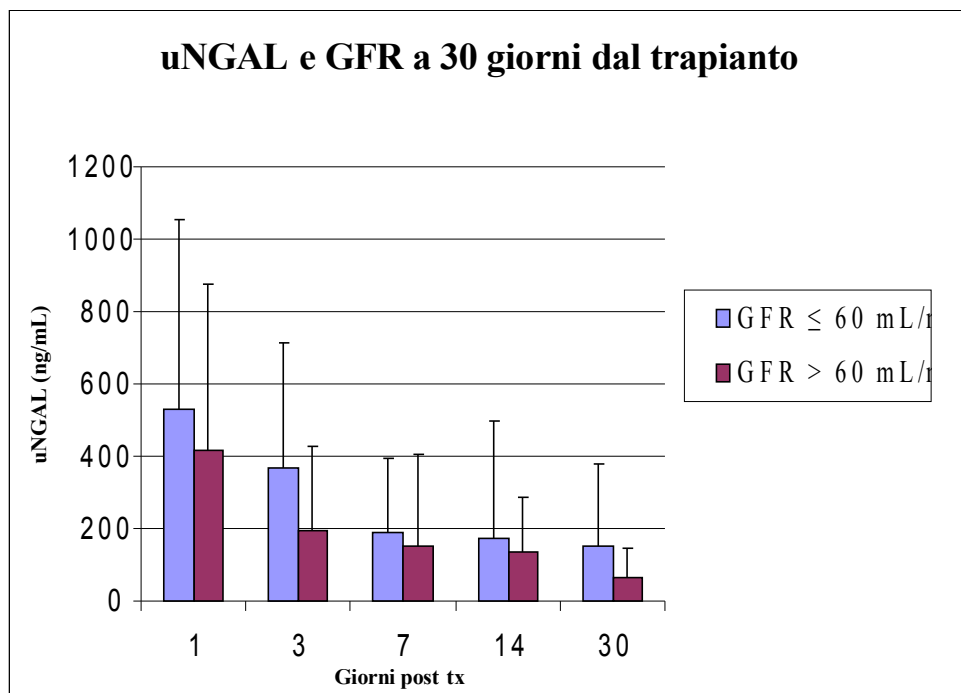
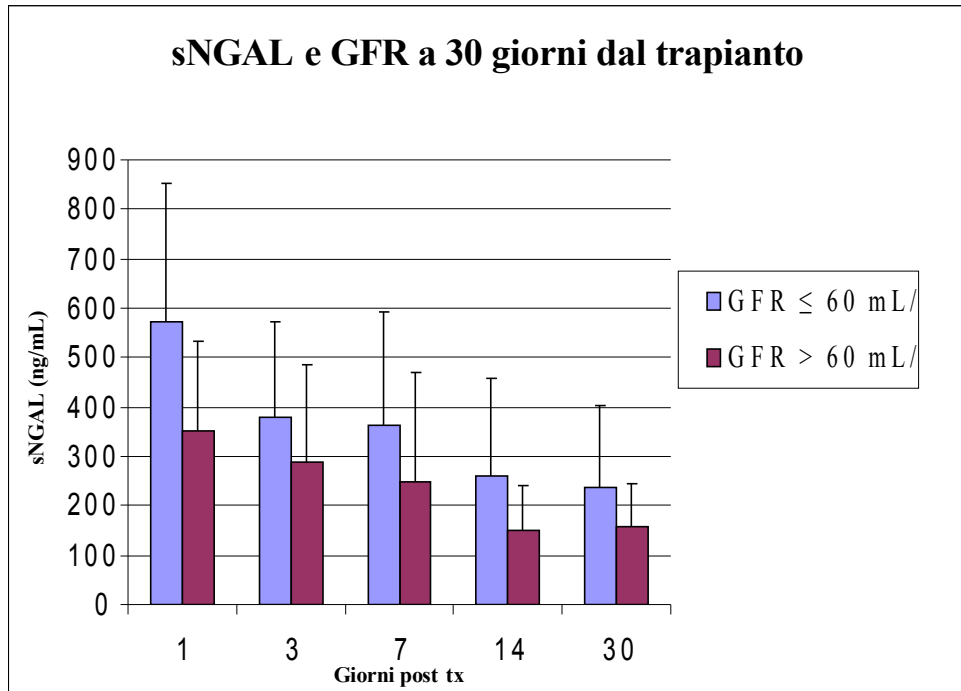
Dall'analisi dei dati raccolti si riscontra una correlazione positiva tra l'andamento sierico ed urinario di NGAL e quello della creatinina: i pazienti che a 30 giorni dal trapianto avevano una creatininemia  $> 2$  mg/dL, infatti, mostrano in tutti i controlli maggiori livelli di NGAL se confrontati con i pazienti con creatininemia  $\leq 2$  mg/dL (Figura 6); tuttavia nessuna delle rilevazioni si è dimostrata statisticamente significativa. Al limite della significatività sono i livelli di NGAL sierico a 30 giorni e urinario a due settimane dall'intervento.

Se invece confrontiamo l'andamento di NGAL sierico ed urinario con il GFR a 30 giorni dal trapianto (Figura 7), è possibile mettere in evidenza come pazienti con un GFR  $> 60$  mL/min (CKD stage 2) al termine del periodo di osservazione (un mese) mostrino livelli di NGAL, sia sierico che urinario, maggiori rispetto a pazienti con un GFR  $\leq 60$  mL/min (CKD stage 3-5). Tale dato tuttavia non raggiunge la significatività in nessuna rilevazione.

**Figura 6:** Confronto tra pazienti con differenti livelli di creatininemia a 30 giorni dal trapianto (cut-off = 2 mg/dL)



**Figura 7:** Confronto tra pazienti con differenti GFR a 30 giorni dal trapianto (cut-off = 60 mL/min).





## ***NGAL e parametri clinici***

Nella tabella 6 sono presentati i risultati dello studio dell'andamento dei livelli sierici ed urinari di NGAL al variare di alcuni parametri clinici considerati.

**Tabella 6:** parametri clinici prese in considerazione nello studio.

VARIABILE CLINICA	SIGNIFICATIVITÀ	
	sNGAL	uNGAL
GIORNI DI DEGENZA POST TRAPIANTO (cut-off 15 giorni)	NS	Giorno 3 <b>p= 0,03</b>
ETÀ DIALITICA (cut-off 60 mesi)	Giorno 3 <b>p= 0,01</b> Giorno 14 <b>p= 0,04</b>	Giorno 3 <b>p= 0,03</b>
ETÀ DEL DONATORE	NS	NS
TEMPO DI ISCHEMIA FREDDA (cut-off 15 ore)	NS	NS
TERAPIA IMMUNOSOPPRESSIVA CON INIBITORI DELLA CALCINEURINA (FK e CSA)	Giorno 14 <b>p= 0,04</b>	NS
TRATTAMENTO DIALITICO PRE TRAPIANTO (HD, PD)	NS	NS
SESSO DEL RICEVENTE	NS	NS
ETÀ DEL RICEVENTE (cut-off 60 anni)	NS	NS
NUMERO DI MISMATCH (cut-off 3)	NS	NS

Statisticamente non significativo (NS).

## DISCUSSIONE

Questo studio fa emergere che l'andamento di NGAL nella prima settimana dopo trapianto renale presenta specifiche correlazioni con l'andamento della funzione renale. Il primo periodo post-trapianto può essere diviso in 2 fasi principali:

1. il periodo perioperatorio che va dal giorno successivo al trapianto (Giorno 1) alla prima settimana post operatoria (Giorno 7), in cui i livelli di NGAL possono essere il risultato di diversi fattori tra cui la durata dell'intervento, l'eventuale presenza di complicanze durante l'atto chirurgico e la comparsa delle principali complicanze precoci del trapianto stesso:
  - complicanze chirurgiche
  - complicanze immunologiche
  - ritardata ripresa funzionale (DGF)
2. il periodo di stabilizzazione del trapianto, dalla quattordicesima giornata post operatorio, cioè a due settimane dall'evento trapianto, fino ad un mese dopo il trapianto (Giorno 30): da questo momento in poi, infatti, si assiste alla progressiva stabilizzazione funzionale del graft.

Un'entità clinica che ad oggi costituisce uno tra i principali fattori in grado di influire negativamente sull'outcome del trapianto è senz'altro la *delayed graft function* (DGF), ossia la ritardata ripresa funzionale del graft. Non esiste tuttavia una definizione univoca di questa condizione. Una delle possibili definizioni

consiste nella necessità di dialisi entro la prima settimana post operatoria; nella nostra casistica tale condizione si è verificata in 17 pazienti su 44, in un solo caso è stato possibile osservare una *primary not function*. Dal punto di vista istologico, un rene con DGF presenta le caratteristiche tipiche, *più o meno estese*, della necrosi tubulare acuta (NTA), causata da vari fattori tra cui danni cronici pre trapianto come ad esempio l'età avanzata del donatore e il danno da ischemia-riperfusionione a cui il graft è sottoposto durante il trapianto: il danno da ischemia-riperfusionione è dovuto all'insieme degli eventi che si susseguono dal momento dell'espianto dell'organo fino all'anastomosi tra i vasi del ricevente e quelli del graft, quando il sangue del ricevente può dunque perfondere il nuovo rene; in questi frangenti il metabolismo del graft da aerobio diventa anaerobio, col conseguente accumulo di acido lattico e di radicali liberi ossidanti; la reintroduzione di ossigeno nei tessuti che si verifica al momento della riperfusionione accentua ulteriormente la produzione dei radicali liberi. Il danno cellulare che ne deriva stimola l'immunità innata sia del ricevente che del donatore, con l'attivazione dei polimorfonucleati, del complemento, dei linfociti natural killer e dei toll-like receptors (TLR): si crea così uno stato pro-infiammatorio che favorisce la maturazione delle cellule dendritiche che a loro volta attivano i linfociti Th1, i quali inducono una risposta immunologica che può esitare in un rigetto acuto. È noto, infatti, che la necrosi tubulare acuta aumenta la suscettibilità del parenchima renale ad altri insulti, tra i quali appunto il rigetto acuto, ma anche un'ipoperfusionione da riduzione del volume circolante oppure la tossicità da inibitori della calcineurina (66). Terasaki et al. hanno proposto la seguente ipotesi: nel rene con DGF la riserva di nefroni è ridotta pertanto la comparsa di insulti aggiuntivi comporta un'ulteriore perdita di nefroni con conseguente danno da

iperfiltrazione sui glomeruli residui e progressiva insufficienza d'organo (67).

In numerosi studi, infatti, è stata constatata una ridotta sopravvivenza del graft nei pazienti che avevano precedentemente sviluppato DGF: in uno studio del 2007, Figueiredo et al. (68) hanno dimostrato l'influenza negativa della DGF sull'outcome del trapianto evidenziando la presenza di livelli di creatinemia ad un anno significativamente maggiori nei pazienti con DGF e la ridotta sopravvivenza del graft nel tempo negli stessi. Risultati analoghi sono riportati da Yarlagadda et al., i quali hanno dimostrato che la DGF è associata ad un aumento del rischio di perdita del graft pari al 41% e ad un incremento del rischio di rigetto entro il primo anno pari al 38% (69).

L'identificazione precoce della DGF e la diagnosi differenziale con altre condizioni aventi un'analogia presentazione clinica ci consentirebbero di compiere enormi passi avanti nella gestione dei pazienti trapiantati.

I risultati che abbiamo ottenuto rivelano la capacità di NGAL di predire la ritardata ripresa funzionale del graft. Confrontando i pazienti con DGF e PNF, ovvero che hanno avuto necessità di trattamento emodialitico nella prima settimana post trapianto, e quelli con IGF (Figura 2), sono emerse differenze statisticamente significative riguardo i livelli di questo marcatore, sia nei campioni urinari ( $p < 0,05$  in prima, terza e settima giornata post trapianto), sia in quelli sierici ( $p < 0,05$  in prima, terza e settima giornata post trapianto).

Utilizzando la stessa definizione di DGF, NGAL evidenzia una elevata sensibilità risultando aumentata più precocemente rispetto al calo della creatinina (Figura 2 e 3) in questi pazienti, sia nel siero che nelle urine, offrendo la possibilità di effettuare una diagnosi precoce rispetto alla sola rilevazione dei livelli sierici di creatinina. Ciò è possibile poiché i livelli sierici ed

urinari di NGAL sono significativamente maggiori in pazienti che sviluppano DGF a partire dalla prima giornata post operatoria, mentre i livelli plasmatici di creatinina si elevano in maniera significativa solo a partire dalla terza giornata post trapianto. Questo dato è in linea con quanto riportato in letteratura: l'utilità di NGAL urinario come indicatore di DGF è stata provata da Parikh et al. che hanno dimostrato una differenza statisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) già nella prima giornata post-operatoria tra i pazienti con IGF e quelli con DGF, con livelli di NGAL considerevolmente maggiori in questi ultimi; in questo studio è stato valutato contemporaneamente un altro marker, IL-18, anch'esso risultato predittivo di DGF: per tutti e due i marcatori è stata costruita una curva ROC (*receiver-operating characteristic curve*) e per valori di NGAL superiori a 1000 ng/mg l'AUC (*area under the curve*) era pari a 0,9, a dimostrazione della sua elevata sensibilità e specificità nell'identificare la DGF con notevole anticipo rispetto agli strumenti diagnostici oggi in uso (59). Un recentissimo studio, pubblicato nel settembre 2009, ribadisce ulteriormente tali asserzioni, affermando la superiorità di NGAL e IL-18 urinari rispetto alla creatinina sierica nella diagnosi precoce di DGF: Hall et al. (70) hanno preso in esame una popolazione composta da 91 trapiantati e li hanno suddivisi in tre gruppi a seconda della rapidità della ripresa funzionale del rene: 34 pazienti hanno avuto *delayed graft function* (DGF), 33 *slow graft function* (SGF), 24 *immediate graft function* (IGF); dal momento del trapianto in poi, per dosare nelle urine NGAL, IL-18 e KIM-1, sono stati effettuati diversi controlli (0 h, 6 h, 12 h, 18 h, prima e seconda giornata post-operatorie): NGAL si è rivelato il biomarker più affidabile, visto che i suoi livelli hanno mostrato differenze statisticamente significative nei 3 gruppi in tutti i tempi considerati con  $p < 0,001$  in tutti i controlli ad eccezione del primo (0 h) in cui si è registrata una  $p < 0,01$ ;

anche IL-18 si è dimostrato un buon indicatore di DGF, seppure con significatività leggermente inferiori a NGAL, mentre KIM-1 non è risultato predittivo di DGF (70).

Il motivo per cui la concentrazione di NGAL aumenta così rapidamente dopo il trapianto è verosimilmente spiegabile col ruolo che questa molecola riveste nel danno da ischemia-riperfusion, dove svolge un'azione protettiva nei confronti dell'epitelio tubulare; è plausibile, infatti, che NGAL in tale contesto sia responsabile di un duplice meccanismo: da un lato, chela il ferro perso dalle cellule danneggiate, limitandone così gli effetti citotossici; dall'altro, dopo essere stato endocitato dalle cellule tubulari ancora vitali, può rilasciare a queste ultime il ferro precedentemente legato, stimolando così la loro crescita e promuovendo dunque la riepitelizzazione del tubulo.

Un dato particolarmente degno di nota emerso dallo studio svolto è il seguente: accanto al più studiato NGAL urinario, anche NGAL sierico si è dimostrato altamente predittivo di DGF e ciò fornisce sicuramente un vantaggio in campo diagnostico; occorre, infatti, sottolineare che, dopo il trapianto, i pazienti, in special modo quelli con DGF, possono andare incontro a un periodo più o meno prolungato di oligo-anuria, nel quale il prelievo di campioni urinari può non essere agevole e questo rappresenta senz'altro un limite all'uso dei marcatori urinari. È chiaro perciò che la disponibilità di un biomarker sierico possa rappresentare un valido aiuto in tale frangente.

Essendo la DGF una condizione non univocamente definita è possibile considerarla anche come la persistenza di elevati livelli di creatinina plasmatica. A tal riguardo abbiamo potuto osservare una significatività nei diversi livelli di NGAL sierico ed urinario in funzione di diversi tempi di dimezzamento ( $t_{1/2}$ ) della creatinina sierica nel post trapianto, (Figura 4). Pazienti con DGF mostrano livelli di creatinina più elevati nel tempo, cioè tempi di dimezzamento superiori a 3 giorni, e livelli di NGAL sia

sierico che urinario più elevati nel tempo. La sensibilità di NGAL urinario risulta ancora maggiore di quella di NGAL sierico in quanto statisticamente correlato anche con tempi di dimezzamento della creatinina plasmatica maggiori o uguali a 3 giorni. Perciò è possibile affermare che elevati livelli di NGAL siano predittivi di tempi di dimezzamento della creatinina più prolungati. In particolare il tempo di dimezzamento della creatinina plasmatica è statisticamente significativo per valori sierici di NGAL elevati in prima ( $p= 0,01$ ) e settima giornata ( $p= 0,02$ ) dal trapianto. Per valori urinari la significatività è presente in prima ( $p= 0,03$ ), terza ( $p= 0,004$ ) e settima giornata ( $p= 0,01$ ) dal trapianto. Tale riscontro individua ancora una volta NGAL come biomarker capace di predire precocemente l'outcome funzionale del graft.

Da questo studio è emersa inoltre una correlazione tra i livelli di NGAL e la diuresi nella prima giornata post-trapianto (Figura 5): dall'analisi dei dati è risultato che i pazienti oligoanurici in prima giornata post operatoria hanno livelli sierici ed urinari di NGAL maggiori rispetto a pazienti con diuresi più abbondante in ogni rilevazione nel primo mese post operatorio; tale differenza risulta statisticamente significativa solo a livello sierico in terza giornata ( $p= 0,01$ ) dal trapianto. Nei campioni urinari la significatività statistica non si raggiunge in nessuna rilevazione. Questa correlazione inversa tra NGAL e volume urinario nei pazienti sottoposti a trapianto renale è stata dimostrata anche da Lebkowska et al. (60), infatti, nel loro studio i pazienti che hanno sviluppato DGF hanno mostrato livelli sierici di NGAL, cistatina C e creatinina più elevati rispetto a quelli riscontrati nei pazienti con pronta funzione del graft.

Nel campione studiato NGAL si è rivelato quindi un buon marker surrogato della ripresa della diuresi in quanto bassi livelli di NGAL si riscontrano nei pazienti con maggiore output urinario. A sostegno di tale dato possiamo ricordare uno studio

di Kusaka et al. (61), che si era posto l'obiettivo di verificare se NGAL sierico fosse in grado di predire la ripresa funzionale dell'organo dopo il trapianto. Un aspetto estremamente interessante messo in luce da questo lavoro riguarda la cinetica di NGAL nel siero: in particolare è stata osservata la presenza di un andamento bifasico di questo marker. Esso mostra immediatamente dopo il trapianto un primo picco, che solitamente diminuisce entro 5 giorni e comunque prima della caduta dei livelli di creatinemia; successivamente i suoi livelli tendono di nuovo ad aumentare tra il settimo e il decimo giorno dopo l'intervento: la diminuzione del secondo picco nei pazienti esaminati precedeva di diversi giorni l'aumento della diuresi e la stabilizzazione del quadro. Il primo picco può risentire di differenti condizioni; il secondo picco, invece, deriva verosimilmente dall'aumentata sintesi di NGAL ad opera del graft più o meno danneggiato in seguito al trapianto e rappresenta pertanto un indicatore prognostico più affidabile, riflettendo con maggiore accuratezza il decorso clinico e la ripresa della funzione renale. La caduta del secondo picco plasmatico di NGAL risulta predittiva della definitiva ripresa della diuresi dopo il trapianto, poiché si verifica in tutti i casi con alcuni giorni di anticipo rispetto all'aumento dell'azione escretoria del rene; il motivo alla base di questa sequenza di eventi non è ancora chiaro e necessita di ulteriori indagini. Diversamente dai dati riportati in questo lavoro da Kusaka et al., nei nostri pazienti la ripresa della diuresi è stata tendenzialmente più precoce e non è stato possibile osservare l'andamento bifasico dei livelli di NGAL, in quanto i livelli sierici ed urinari di NGAL hanno un andamento costante in diminuzione.

NGAL dunque si è dimostrato un biomarker predittivo di DGF e ciò potrebbe avere importanti risvolti nella pratica clinica: l'identificazione precoce dei pazienti a rischio di danno renale



acuto ci consentirebbe, infatti, di mettere in atto strategie terapeutiche preventive o comunque tese a contenere la lesione ed evitare o ridurre al minimo le conseguenze più temibili.

Anche nella fase di stabilizzazione del trapianto le determinazioni dei livelli di NGAL effettuate in ogni giornata post operatoria sono risultate correlate con l'andamento della funzione renale nei soggetti esaminati. È emerso come pazienti che ad un mese dal trapianto avessero livelli di creatinina plasmatica maggiori di 2 mg/dL presentassero livelli sierici ed urinari di NGAL più alti. Tale correlazione persiste anche in un'analisi complementare: i pazienti che ad un mese dal trapianto mostravano livelli plasmatici di creatinina minori di 2 mg/dl avevano anche valori sierici di NGAL inferiori rispetto al gruppo con creatinina a 30 giorni non ancora normalizzata (Figura 6), tale differenza tuttavia presenta solo una tendenza alla significatività a due settimane dal trapianto a livello urinario e ad un mese a livello sierico. È interessante inoltre la correlazione tra i livelli di NGAL e il GFR ad un mese dal trapianto (Figura 7). Infatti pazienti con  $GFR \leq 60$  mL/min al termine del follow-up di questo studio mostrano livelli di NGAL sierico maggiori rispetto a pazienti con funzione renale in netto miglioramento ( $GFR > 60$  mL/min), ma anche in questo caso tale differenza non è mai statisticamente significativa. Tali risultati trovano riscontro in quelli ottenuti da Kusaka et al. (61) precedentemente discusso. In particolare NGAL sierico e, nello specifico per questo studio, il secondo picco, si era dimostrato in grado di predire la ripresa funzionale dell'organo dopo il trapianto riflettendo con maggiore accuratezza il decorso clinico.

Per quanto riguarda i tempi di degenza nei pazienti arruolati nello studio i giorni di degenza mediamente sono stati  $19,9 \pm 8,5$ . Nella clinica, pazienti sottoposti a trapianto di rene hanno tempi di degenza minimi di 15 giorni in assenza di complicanze, nel caso invece di complicazioni tali tempi andranno ad aumentare. Risulta immediato come pazienti che sviluppano complicanze durante il periodo post operatorio presentino un maggior grado di sofferenza del graft che può manifestarsi con l'incremento dei livelli di NGAL sierici ed urinari. Per tal motivo questa categoria di pazienti necessita di tempi di ricovero di maggior durata per assicurare una adeguata ripresa funzionale dell'organo e stabilizzare il paziente stesso. Questo studio mette in evidenza come livelli di NGAL più elevati predicano precocemente, già in terza giornata post trapianto, l'allungamento dei tempi di degenza in maniera significativa ( $p=0,03$ ), soprattutto a livello urinario (vedi tabella 6). Tuttavia non sono presenti dati in letteratura che supportino la nostra analisi.

L'*outcome* del trapianto sappiamo essere influenzato anche dall'età dialitica, infatti, soprattutto per quanto riguarda le donazioni da vivente, esiste una evidenza su come trapianti "*pre-emptive*", cioè prima dell'inizio della dialisi, siano associati ad un minor rischio di fallimento del graft (72). L'età dialitica media dei pazienti considerati in questo studio è di  $63,9 \pm 29,3$  mesi, per questo motivo per l'analisi della variabilità di NGAL in funzione dell'età dialitica abbiamo utilizzato quale cut-off 60 mesi, ovvero 5 anni. La differenza che ne risulta si è rivelata statisticamente significativa nei due diversi gruppi di pazienti in terza giornata ( $p=0,01$ ) post trapianto e a dopo due settimane ( $p=0,04$ ) dal trapianto per i livelli sierici e in terza giornata per i livelli urinari ( $p=0,03$ ) di NGAL (vedi tabella 6). Se consideriamo NGAL come predittore della ripresa funzionale del trapianto, e quindi della comparsa di DGF, i nostri risultati

trovano conferma nello studio di Lauzurica et al. (73) secondo i quali uno stato infiammatorio pre trapianto può rappresentare un fattore di rischio per la comparsa di DGF. Tale dato può trovare giustificazione nel fatto che più a lungo i pazienti permangono in lista d'attesa in trattamento dialitico, maggiormente sono esposti agli effetti cronici della ESRD e della dialisi come la malnutrizione, lo stato infiammatorio cronico, l'alterato quadro immunologico e la clearance inefficace dei prodotti del catabolismo. A ciò si associano alterazioni della concentrazione dell'omocisteina, la produzione di prodotti di glicosilazione avanzata e di lipoproteine etc. che predispongono questi pazienti a danno cardiovascolare e vascolare renale del graft. Questo quadro fa sì che pazienti da lungo tempo in trattamento dialitico possano presentare maggior incidenza di DGF al momento del trapianto (73), una scarsa ripresa funzionale del graft ed una ridotta sopravvivenza del paziente a lungo termine (74). Tuttavia l'età dialitica rientra tra i fattori modificabili, perciò sarebbe auspicabile tenerne conto nella creazione e nell'applicazione di protocolli di gestione dei pazienti in lista.

L'età del donatore, in particolare per donatori oltre i 60 anni, è uno dei principali fattori che aumentano l'incidenza di DGF poiché questi graft hanno un minor numero di nefroni funzionanti a causa del processo di invecchiamento e delle comorbidity legate al donatore quali l'ipertensione e l'aterosclerosi. Tuttavia a causa della scarsa disponibilità di organi, sempre più frequentemente vengono usati donatori anziani. Nello studio svolto tuttavia l'età media dei donatori è piuttosto alta, ovvero di  $58,2 \pm 14,8$  anni e i livelli di NGAL non sembrano influenzati a priori da questa (vedi tabella 6), visto che non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra i pazienti che hanno ricevuto il graft da donatori

di età rispettivamente inferiore o superiore a 60 anni: NGAL dunque è un marcatore indipendente dal fattore età del donatore, il quale potenzialmente avrebbe potuto condizionarne l'espressione.

Un tempo di ischemia fredda prolungato è un noto fattore di rischio per lo sviluppo di DGF: Boom et al. (71), per esempio, hanno dimostrato che un'ischemia fredda superiore alle 28 ore aumenta il rischio di DGF (Odds ratio = 1,78). Nei pazienti arruolati in questo studio (vedi tabella 6) i tempi di ischemia fredda sono stati contenuti entro un limite di  $14,5 \pm 4,9$  ore. Sulla base di tale range sono stati individuati due gruppi di pazienti, quelli con tempi di ischemia inferiori alle 15 ore, e quelli con tempi di ischemia superiori a 15 ore. È risultata difficile l'individuazione di un'area di migliore o peggiore tempo di ischemia fredda poiché nessuno dei risultati ottenuti è statisticamente significativo e comunque in nessun caso tale condizione si è protratta oltre le 28 ore, che secondo quanto indicato da Boom rappresenta il cut-off ottimale per una buona ripresa funzionale del graft. Ciò è stato possibile grazie all'attuazione di protocolli trapianto che impediscono il raggiungimento di tempi di ischemia molto elevati.

Un ulteriore fattore che abbiamo voluto indagare è la possibile esistenza di una correlazione tra i livelli di NGAL e i diversi farmaci immunosoppressivi in uso, per capire soprattutto se NGAL potesse rappresentare uno strumento utile per guidare le scelte terapeutiche.

Sappiamo che la terapia immunosoppressiva rappresenta una parte integrante del trapianto, fondamentale per la buona riuscita dello stesso: il suo obiettivo principale è quello di prevenire il rigetto favorendo la tolleranza immunologica. Dall'inizio dell'attività trapiantologica molti nuovi farmaci sono

stati individuati e diversi schemi di combinazione tra farmaci sono stati attuati con il risultato di una netta riduzione dell'incidenza del rigetto acuto. Di difficile risoluzione invece è il problema della disfunzione cronica del trapianto che porta negli anni alla perdita di funzione del rene trapiantato e al fallimento del graft. Gli inibitori della calcineurina, insieme a steroidi, micofenolato mofetile e inibitori di mTor (*mammalian target of rapamycin*) sono attualmente il cardine del protocollo terapeutico post-trapianto; appartengono a questa classe di farmaci la ciclosporina e il tacrolimus: entrambi sono altamente lipofili e legano recettori intracitoplasmatici (rispettivamente la ciclofilina e l'FKBP-12); il loro meccanismo d'azione consiste nell'inibizione di un complesso di fosfatasi chiamato calcineurina che defosforilando le proteine NFAT (*nuclear factor activating T cells*) stimola la sintesi di IL-2, interleuchina necessaria per l'attivazione dei linfociti T. Questi farmaci quindi impediscono la formazione di IL-2, bloccando di fatto la risposta immunitaria. Purtroppo, però, entrambi hanno un'elevata nefrotossicità sia in acuto che in cronico: il meccanismo responsabile del danno è probabilmente da ricercare nell'azione vasocostrittrice che esplicano sia a livello locale sulle arteriole afferenti, determinando una riduzione del flusso ematico renale e del GFR, che a livello sistemico; tale vasocostrizione è mediata dall'aumento della produzione di angiotensina II e di endotelina-1 e dalla diminuzione della sintesi di sostanze vasodilatatrici come l'ossido nitrico e le prostacicline. A lungo andare la profonda vasocostrizione può indurre ischemia con conseguente atrofia tubulare e fibrosi interstiziale. Gli inibitori della calcineurina, in particolare il tacrolimus, ad oggi sono senz'altro la classe di immunosoppressori più potente sul mercato ma, per via della loro nefrotossicità, nei pazienti con DGF, può essere necessario ritardare di qualche giorno la loro introduzione, per

evitare di aggiungere un'altra potenziale causa di danno tubulare che possa ulteriormente ritardare la ripresa funzionale dell'organo. A tal proposito Hall et al. (70), suggeriscono che il dosaggio di biomarker come NGAL e IL-18 nella prima giornata post-operatoria può servire, non solo per quantificare la severità del danno che il graft ha subito durante le varie fasi del trapianto e stimare il tempo necessario per la sua ripresa, ma anche per indirizzare i clinici verso la scelta di un regime immunosoppressivo più blando fino al recupero funzionale del rene, per non aggravare il quadro con l'aggiunta di un eccessivo insulto tossico. NGAL, dunque, appare un valido indicatore nella scelta terapeutica nell'immediato post-trapianto. Nello studio svolto si è voluto verificare l'esistenza di differenze tra i livelli di NGAL nei pazienti che assumono la ciclosporina e in quelli che assumono tacrolimus: abbiamo notato la presenza di livelli di NGAL leggermente più elevati nel gruppo in terapia con tacrolimus. Tale differenza però non risulta mai essere statisticamente significativa a livello urinario, al contrario, una differenza statisticamente significativa si ottiene nei livelli sierici di NGAL in terza giornata (vedi tabella 6).

Ciò potrebbe essere coerente con il progressivo aumento dei livelli del farmaco nel sangue che si verifica col passare dei giorni dall'inizio della terapia e che potrebbe innescare eventuali effetti nefrotossici (in settima giornata la concentrazione media di tacrolimus nel sangue dei soggetti esaminati è pari a  $5 \pm 3$  ng/mL, a due settimane arriva fino a  $7,8 \pm 3,5$  ng/mL e ad un mese cresce ulteriormente raggiungendo  $10,5 \pm 3,9$  ng/mL).

In questo studio i livelli di NGAL sierico ed urinario non sono influenzati dal sesso e dall'età del ricevente, dall'età del donatore e dal numero di mismatch, perciò non è possibile per noi considerarli fattori che influenzano nel breve termine la

funzionalità del graft.

## CONCLUSIONI

Il trapianto renale costituisce oggi un'opportunità terapeutica che presenta una considerevole affidabilità in risposta alla grave insufficienza renale.

Limiti che tuttora rimangono irrisolti sono il limitato numero di organi disponibili e la durata in termini di efficacia funzionale del graft.

Questo studio è volto a migliorare le conoscenze relativamente a quest'ultimo fattore. La vita media di un trapianto di rene è di circa 10 anni, con ampie oscillazioni: a fronte di pazienti in cui il graft sopravvive pochi mesi, ne esistono altri, definiti *long survivors*, portatori d'organo da oltre 30 anni.

La maggiore difficoltà interpretativa è rappresentata dal non avere a disposizione esami funzionali sensibili e specifici in relazione alle varie complicanze chirurgiche, immunologiche e metaboliche alle quali il rene trapiantato può andare incontro.

NGAL, tra le altre sue caratteristiche, è considerato dalla comunità scientifica un marcatore di danno renale sia di tipo ischemico che tossico.

In questo studio è stato effettuato un follow-up ad un mese di una popolazione sottoposta a trapianto di rene; sono state pertanto analizzate la fase post-operatoria e l'immediato periodo di stabilizzazione del trapianto, osservando l'andamento di NGAL in relazione alle principali variabili incidenti.



La valutazione specifica dei risultati ha messo in evidenza che NGAL può essere considerato un indicatore affidabile di varie condizioni di danno renale nel periodo post trapianto.

In particolare nel **periodo perioperatorio**, ovvero dal primo al settimo giorno post trapianto NGAL si è dimostrato in grado di:

- predire la ritardata ripresa funzionale del rene trapiantato poiché è un efficace predittore di DGF intesa come necessità di dialisi nella prima settimana post trapianto, come livelli di creatinina plasmatica persistenti ovvero la mancata ripresa della diuresi e delle funzioni regolatrici idroelettrolitiche nella prima giornata post operatoria. In particolare, confrontato con la creatinina plasmatica, NGAL rappresenta un marcatore più precoce poiché si eleva già dalla prima giornata post trapianto a differenza della creatinina plasmatica i cui livelli risultano significativamente più elevati solo a partire dalla terza giornata
- dare indicazioni, ancora da verificare in modo più approfondito, sull'opportunità di evitare stimoli tossici legati alla terapia immunosoppressiva con inibitori della calcineurina, farmaci con riconosciuto effetto nefrotossico
- predire la necessità di minori/maggiori tempi di degenza.

Nella **fase di stabilizzazione** funzionale del graft, ovvero dal settimo giorno ad un mese di distanza dal trapianto, termine del periodo di osservazione sarebbe auspicabile l'utilizzo di NGAL quale strumento in grado di:

- predire il grado di recupero funzionale del graft in quanto la persistenza di elevati livelli sierici ed urinari di NGAL è predittiva di una peggiore funzionalità del rene trapiantato, intesa come la presenza di più elevati livelli di creatinina e di minore velocità di filtrazione renale (GFR) a un mese dal trapianto.

- fornire indicazioni sulla tossicità da inibitori della calcineurina, in particolare da tacrolimus.

Il riscontro di livelli superiori di NGAL sierico a due settimane ( $p= 0,01$ ) nei pazienti in terapia con tacrolimus rispetto a quelli che assumono ciclosporina è un elemento emerso da questo studio che risulta di non univoca interpretazione. I dati ottenuti, infatti, non ci consentono di dire se tale risultato sia in relazione al tipo di farmaco usato o alla sua concentrazione ematica; inoltre non è semplice stabilire la responsabilità di un singolo farmaco in relazione all'incremento dei livelli di NGAL, poiché ciascuno rientra in schemi terapeutici polifarmacologici. Occorrerà pertanto aumentare la numerosità del campione e prolungare il follow-up per valutare le capacità predittive di NGAL sulla terapia immunosoppressiva.

Altri indicatori, ritenuti incidenti negli studi condotti su grandi numeri di pazienti, quali l'età del donatore, il tempo di ischemia fredda, l'età ed il sesso del ricevente, il tipo di trattamento dialitico pre trapianto ed il numero di mismatch nel campione preso in esame sono invece risultati non incidenti o omogenei nell'ambito della popolazione esaminata.

In definitiva NGAL è risultato un marcatore che presenta una elevata efficacia nel predire e nel monitorare l'andamento delle prime fasi del trapianto renale, soprattutto in relazione agli eventi acuti che caratterizzano questa fase del trapianto. Minore risulta la capacità predittiva a lungo termine, spesso caratterizzata da basse significatività, verosimilmente di natura occasionale.

In ogni caso si conferma l'interesse verso questa molecola e ulteriori studi saranno utili in futuro per comprenderne maggiormente le funzioni e per validare questo nuovo

marcatore ed il suo utilizzo nella pratica clinica per la gestione del paziente trapiantato.

## BIBLIOGRAFIA

1. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:68:89-95.
2. Devarajan P. Proteomics for biomarker discovery in acute kidney injury. *Semin Nephrol* 2007;27:637-51.
3. United States Renal Data System. *USRDS 2010 Annual Data Report*
4. <http://www.trapianti.salute.gov.it/>
5. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 1999; 341: 1725–1730.
6. Gill JS, Tonelli M, Johnson N, Kiberd B, Landsberg D, Pereira BJ. The impact of waiting time and comorbid conditions on the survival benefit of kidney transplantation. *Kidney Int* 2005; 68: 2345–2351.
7. Cecka JM: The UNOS Scientific Renal Transplant Registry. In Cecka JM, Terasaki PI (eds): *Clinical Transplants 1998*. Los Angeles, UCLA Tissue Typing Laboratory, 1999, pp 1-16.
8. Yarlagadda SG, Coca SG et al. Marked variation in the definition and diagnosis of delayed graft function: a systematic review. *Nephrol Dial Transpl*. 2008 Sept; 23(9): 2995-3003
9. Zeraati A.A., Naghibi M., Kianoosh S. et al. Impact of slow and delayed graft function on kidney graft survival between various subgroups among renal transplant patients. *Transpl Proc*. (2009) 41, 2777-2780

10. Shoskes DA, Cecka JM. Deleterious effects of delayed graft function in cadaveric renal transplant recipients independent of acute rejection. *Transplantation*. 1998 Dec 27; 66(12): 1697-701
11. Irish WD, McCollum DA, Tesi RJ et al. Nomogram for predicting the likelihood of delayed graft function in adult cadaveric renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Nov; 14(11): 2967-74
12. Han WK, Waikar SS, Johnson A et al. Urinary biomarkers in the early diagnosis of acute kidney injury. *Kidney Int*. 2008; 73(7): 863-869
13. Vaidya VS, Waikar SS, Ferguson MA et al. Urinary biomarkers for sensitive and specific detection of acute kidney injury in humans. *Clin Transl Sci*. 2008; 1(3): 200-208
14. Thorevska N, Sabahi R, Upadya A et al. Microalbuminuria in critical ill medical patients: prevalence, predictors and prognostic significance. *Crit Care Med*. 2003; 31: 1075-1081
15. Knoll GA, MD, MSc. Proteinuria in Kidney Transplant Recipients: Prevalence, Prognosis, and Evidence-Based Management. *Am J Kidney Dis*. (2009) 54: 1131-1144
16. Poge U, Gerhardt T, Stoffel-Wagner B et al. Cystatin C-based calculation of glomerular filtration rate in kidney transplant recipients. *Kidney Int*. 2006; 70: 204-210
17. Geramizadeh B, Azarpira N, Ayatollahi M et al. Value of serum cystatin C as a marker of renal function in the early post kidney transplant period. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2009 Nov; 20(6): 1015-1017
18. Mendiluce A, Bustamante J, Martin D et al. Cystatin C as a marker of renal function in kidney transplant patients. *Transplant Proc*. 2005 Nov; 37(9):3844-47

19. Oberbauer R. Biomarkers- a potential route for improved diagnosis and management of ongoing renal damage. *Transplant. Proc.* 2008 Dec; 40 (10 Suppl.): S44-7
20. Ronco C. N-GAL: Diagnosing AKI as soon as possible. *Crit Care* 2007; 11 (6): 173
21. Han WK, Bailly V, Abichandani R et al. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney International* 2002; 62: 237-244
22. Van Timmeren MM, Van den Heuvel MC, Bailly V et al. Tubular kidney injury molecule-1 (KIM-1) in human renal disease. *J Pathol.* 2007; 212:209-217
23. Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V et al. Kidney injury molecule- 1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem.* 1998; 273:4135-4142
24. Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more. *Nephrol Dial Transpl.* 2009
25. Du Cheyron D, Daubin C, Poggioli J et al. Urinary measurement of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 3 (HNE3) protein as a new marker of tubule injury in critically ill patients with ARF. *Am J Kidney Dis.* 2003, 42: 497-506
26. Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelov H et al. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem.* 1993 May 15; 268(14) 10425-32

27. Kjeldsen L, Bainton DF, Sengelov H et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel matrix protein of specific granules in human neutrophils. *Blood* 1994, 83: 799-807
28. Strong RK, Bratt T, Cowland JB et al. Expression, purification, crystallization and crystallographic characterization of dimeric and monomeric human neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 1998 Jan 1; 54 (Pt1): 93-5
29. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N et al. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Molec Cell*. 10: 1033-1043, 2002
30. Flo TH, Smith KD, Sato S et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 432: 917-921, 2004
31. Borregaard N, Cowland JB. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, a siderophore-binding eukaryotic protein. *Biometab*. 2006 Apr; 19 (2): 211-5
32. Huggenevik J, Craven C, Idzerda R et al. A splicing defect in the mouse transferrin gene leads to congenital atransferrinemia. *Blood* 74: 482-486, 1989
33. Trenor C, Campagna D, Sellers V et al. The molecular defect in hypotransferrinemic mice. *Blood* 96: 1113-1118, 2000
34. Hamill R, Woods J and Cook B. Congenital atransferrinemia. A case report and review of the literature. *Am J Clin Pathol*. 96: 215-218, 1991

35. Hayashi A, Wada Y, Suzuki T et al. Studies on familial hypotransferrinemia: unique clinical course and molecular pathology. *Am J Hum Genet.* 53:201-213, 1993
36. Levy J, Jin O, Fujiwara Y et al. Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. *Nat Genet.* 21: 396-399, 1999
37. Yang J, Goetz D, Li JY et al. An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Molec Cell.* 10: 1045-56 Nov 2002
38. Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY et al. Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol.* 2007 Feb; 18 (2): 407-13
39. Mori K, Lee HT, Rapoport D et al. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest.* 2005 Mar; 115(3): 610-21
40. Bolignano D, Donato V, Coppolino G et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (N-GAL) as a marker of kidney damage. *Am J Kidney Dis.* 2008; 52:595-605
41. Nguyen MT, Devajaran P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Pediatr Nephrol.* 2008; 23: 2152-2157
42. Nielsen BS, Borregaard N, Bundgaard JR et al. Induction of NGAL synthesis in epithelial cells of human colorectal neoplasia and inflammatory bowel diseases. *Gut.* 1996; 38(3): 414-20
43. Mishra J, Mori K, Ma Q et al. Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Dec; 15(12): 3073-82



44. Mishra J, Dent C, Tarabishi R et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* 2005; 365: 1231-38
45. Ronco C. NGAL: an emerging biomarker of acute kidney injury. *Int J Artif Organs* 2008 Mar; 31(3): 199-200
46. Supakevin S, Zhang W, Kucherlapati R et al. Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion. *Kidney Int.* 2003; 63:1714-24
47. Mishra J, Ma Q, Prada A et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 4: 2534-43
48. Mishra J, Mori K, Ma Q et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel early urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity. *Am J Nephrol.* 2004; 24: 307-315
49. Zappitelli M, Washburn KM, Arian AA et al. Urine NGAL is an early biomarker of acute kidney injury in critically ill children. *Crit Care* 2007;11:R84
50. Wagener G, Jan M, Kim M et al. Association between increases in urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute renal dysfunction after adult cardiac surgery. *Anesthesiology* 2006; 105: 485-91
51. Trachtman H, Christen E, Cnaan A et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in D+HUS: a novel marker of renal injury. *Pediatr Nephrol.* 2006; 21: 989-94

52. Hirsch R, Dent C, Pfriem H et al. NGAL is an early predictive biomarker of contrast-induced nephropathy in children. *Pediatr Nephrol.* 2007; 22:2089-95
53. Bachorzewska-Gajewska H, Malyszko J, Sitniewska E et al. Neutrophil-gelatinase associated lipocalin and renal function after percutaneous coronary interventions. *Am J Nephrol.* 2006;26:287-92
54. Coca SG, Yalavarthy R, Concato J et al. Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: a systematic review. *Kidney Internat.* 2008; 73:1008-1016
55. Gwira JA, Wei F, Ishibe S et al. Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin regulates epithelial morphogenesis in vitro. *J Biol Chem.* 2005 Mar 4; 280(9):7875-82
56. Mishra J, Ma Q, Kelly C et al. Kidney NGAL is a novel early marker of acute injury following transplantation. *Pediatr Nephrol.* (2006) 21: 856-863
57. Parikh CR, Jani A, Mishra J et al. Urine NGAL and IL-18 are predictive biomarkers for delayed graft function following kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2006 Jul; 6(7): 1639-45
58. Lebkowska U, Malyszko J et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and Cystatin C could predict renal outcome in patients undergoing kidney allograft transplantation: a prospective study. *Transplant Proc.* 2009 Jan-Feb; 41(1): 154-7
59. Kusaka M, Kuroyanagy Y, Mori T et al. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a predictor of organ recovery from delayed graft function after kidney

- transplantation from donors after cardiac death. *Cell Transplant*. 2008; 17(1-2): 129-34
60. Malyszko J, Malyszko JS et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a new and sensitive marker of kidney function in chronic kidney disease patients and renal allograft recipients. *Transplant Proc*. 2009; 41:158-61
  61. Schaub S, Mayr M, Honger G et al. Detection of subclinical tubular injury after renal transplantation: comparisons of urine protein analysis with allograft histopathology. *Transplant*. 2007 Jul 15; 84(1): 104-12
  62. Wasilewska A, Zoch-Zwier W, et al Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a new biomarker of cyclosporine nephrotoxicity? *Pediatr Nephrol*. 2010; 25:889-897
  63. Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin-an emerging troponin for kidney injury. *Nephrol Dial Transpl* .2008; 23: 3737-43
  64. Geddes CC, Woo YM, Jardine AG. The impact of delayed graft function on the long term outcome of renal transplantation. *J Nephrol*. 2002; 15: 17-21
  65. Terasaki PI, Koyama II, Cecka JM et al. The hyperfiltration hypothesis in human renal transplantation. *Transplantation* 1994; 57: 1450-1454
  66. Figueiredo A, Moreira P, Parada B et al. Risk factor for delayed graft function and their impact on renal transplantation out come. *Transplant Proc.*, 39: 2473-2475 (2007)

67. Yarlagadda SG, Coca SG et al. Association between delayed graft function and allograft and patients survival: a systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant.* (2009) 24: 1039-1047
68. Hall IE, Yarlagadda SG, Coca SG et al. IL-18 and urinary NGAL predict dialysis and graft recovery after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol.* Sept 17 (2009) doi: 10.1681/ASN.2009030264
69. Boom H, Mallat MJK et al. Delayed graft function influences renal function, but not survival. *Kidney Int Vol* 58 (2000) pp. 859-866
70. Mange KC., Joffe MM., Feldman HI. Effect of the use or nonuse of long-term dialysis on the subsequent survival of renal transplants from living donors. *N Engl J Med.* 2001 Mar 8;344(10):726-31
71. Lauzurica R., Pastor MC., Bayés B. et al. Pretransplant inflammation: a risk factor for delayed graft function? *J Nephrol.* 2008 Mar-Apr;21(2):221-8.
72. Goldfarb-Rumyantzev A., Hurdle J. F., Scandling J., et al. Duration of end-stage renal disease and kidney transplant outcome. *Nephrol Dial Transplant.* (2005) 20: 167–175