



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FIRENZE

DIPARTIMENTO DI FISIOPATOLOGIA CLINICA UNITÀ DI ENDOCRINOLOGIA

Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Endocrinologiche e Metaboliche
XVII Ciclo

**“LA CHEMOCHINA CXCL10 COME MARKER PREDITTIVO DI
RISCHIO DI RIGETTO ACUTO NEL TRAPIANTO DI CUORE”**

Docente Guida:

Ch.mo Prof. Mario Serio

Dottorando:

Dott. Andrea Buonamano

Coordinatore:

Ch.mo Prof. Gianni Forti

INDICE

1. INTRODUZIONE	3
1.1.GENERALITA'	3
1.1.1. Cenni di risposta al danno del cuore adulto	5
1.1.2. Problematiche relative al trapianto cardiaco	7
1.1.3. Cenni di immunobiologia del trapianto	11
1.1.4.Terapia immunosoppressiva post-trapianto	13
1.2. CHEMOCHINE	17
1.2.1. Ruolo delle chemochine nel rigetto di trapianto	20
2. SCOPO DELLA TESI	25
3. MATERIALI E METODI	26
3.1. Pazienti	26
3.2. Test ELISA	28
3.3. Analisi Statistica	29
4. RISULTATI	31
5. DISCUSSIONE	35
6. TABELLE E FIGURE	41
7. BIBLIOGRAFIA	47

INTRODUZIONE

Generalità

Le malattie cardiovascolari rappresentano, nella loro totalità, le più frequenti cause di morte nei paesi occidentali, coinvolgendo circa 4.8 milioni di persone e con circa 400.000 nuovi casi l'anno solo negli Stati Uniti ^[1, 2, 3, 4].

Il trapianto di cuore rimane la terapia d'elezione nei casi terminali di disfunzione cardiaca. Tuttavia, questa procedura è limitata prima di tutto dalla disponibilità di organi isto-compatibili e poi dalla necessità di iniziare una terapia immunosoppressiva che si protrae per tutta la vita ^[5]. Accanto alla terapia farmacologica e al crescente avanzamento della tecnologia dei trapianti, anche per il miocardio la ricerca biomedica si è rivolta a strategie rigenerative, in particolare al trapianto di cellule staminali ^[6].

La recente scoperta di cellule staminali adulte all'interno del cuore, un organo da sempre considerato dogmaticamente come composto da cellule cardiache (cardiomiociti) terminalmente differenziate e incapaci di ripercorrere il ciclo cellulare, oltre a rappresentare una rivoluzione culturale ha favorito il proliferare di studi sulle strategie di attivazione, espansione, reclutamento e trapianto di queste cellule all'interno dell'organo

danneggiato [7, 8]. Se da una parte le ricerche sulle capacità rigenerative delle cellule staminali fanno delineare nuovi e affascinanti scenari terapeutici, dall'altra sussiste ancora una notevole controversia circa la loro effettiva abilità ad acquisire le corrette caratteristiche morfo-funzionali all'interno del miocardio danneggiato.

Il trapianto d'organo, pertanto, rimane al momento l'unico trattamento terapeutico possibile, anche se rimangono da risolvere le problematiche legate al rigetto che, nonostante la terapia immunosoppressiva, rappresenta una delle principali cause di morbilità e mortalità dopo il trapianto [9].

In trapiantologia, un altro tema particolarmente importante è quello relativo allo sviluppo di *markers* diagnostici che permettano, in ambito clinico, sia di conoscere anticipatamente i pazienti che presentano una maggiore possibilità di andare incontro alle complicazioni del rigetto, ma anche di modulare con maggiore efficacia le terapie immunosoppressive attualmente disponibili. Per raggiungere tale obiettivo l'attenzione dei ricercatori è rivolta alla comprensione dei meccanismi patogenetici attraverso i quali si realizza il danno immuno-mediato nel rigetto d'organo e, più in generale, nella patogenesi delle manifestazioni infiammatorie a prevalente componente Th1. Recentemente da alcuni studi è emerso il ruolo fondamentale della chemochina CXCL10/IP-10 (*interferon gamma inducible protein of 10kD*) nel promuovere il rigetto di trapianto di cuore [10, 11].

Di particolare rilievo è stata l'osservazione di un importante ruolo della chemochina CXCL10, prodotta dalle stesse cellule endoteliali dell'organo trapiantato, nell'iniziare ed amplificare la risposta immunitaria verso il trapianto ^[12].

Questi studi hanno permesso di ipotizzare la possibilità di poter intervenire farmacologicamente, in maniera mirata, sulla chemiotassi dei linfociti T allogenici verso l'organo trapiantato, attraverso la modulazione della risposta cellulare alle chemochine, senza per questo indurre contemporaneamente uno stato di immunosoppressione generalizzato ^[13, 14, 15]. I vantaggi clinici di una tale terapia sono facilmente comprensibili.

Cenni di risposta al danno del cuore adulto

Il tessuto muscolare striato cardiaco, o miocardio, rappresenta l'elemento cardine della funzionalità cardiaca ed è costituito da cellule muscolari striate definite miociti cardiaci o cardiomiociti. Questi, a differenza di quanto avviene nel tessuto muscolare striato scheletrico, non sono organizzati in sincizi polinucleati, ma si mantengono come elementi cellulari distinti, rimanendo connessi tra loro in corrispondenza di particolari sistemi di giunzione intercellulare detti strie o dischi intercalari, che ne mediano l'accoppiamento sia meccanico che elettrico. Sebbene l'unità morfo-funzionale di base per la contrazione muscolare sia rappresentata sempre dal sarcomero, e non esistano sostanziali differenze

nell'organizzazione spaziale dell'apparato acto-miosinico tra il miocardio e il tessuto muscolare scheletrico, le modalità di contrazione tra questi sono sostanzialmente differenti. Il tessuto cardiaco, infatti, si contrae ritmicamente, in maniera sincrona e autonoma.

Il cuore, negli individui adulti, è un organo caratterizzato da un *turnover* cellulare che si realizza attraverso il mantenimento di uno straordinario equilibrio tra la quota di elementi cellulari morti e quelli di nuova formazione. L'omeostasi tissutale del cuore è supportata, come già accennato, da un compartimento di cellule staminali adulte cardiache la cui recente identificazione ha permesso di superare la visione dogmatica del miocardio come organo terminalmente differenziato, post-mitotico, incapace di rigenerazione ^[6,16]. In condizioni fisiologiche queste sono sufficienti a modulare le capacità rigenerative intrinseche al tessuto cardiaco e al mantenimento della sua funzionalità. In seguito a danni di vario tipo, quali quello ischemico, emodinamico ed autoimmune, i cardiomiociti possono esibire una serie di adattamenti cellulari al danno che generalmente comportano la necrosi, l'apoptosi e l'ipertrofia ^[5]. Qualunque sia il meccanismo di adattamento al danno, questo può arrivare fino al punto in cui il rimodellamento morfologico, biochimico e molecolare dei cardiomiociti non è più in grado di compensare l'aumento del lavoro meccanico del muscolo cardiaco e la sua *performance* non è più assicurata.

Il tipo di risposta adattativa e la sua eventuale evoluzione patogenetica può variare da paziente a paziente e in genere dipende dal danno che l'ha instaurata.

Il trapianto d'organo rimane, al momento, il trattamento d'elezione nelle fasi finali del danno ma, come precedentemente riportato, risulta limitato dalla disponibilità di donatori istocompatibili e dalle complicazioni immunologiche, nefrotossiche e cardiovascolari legate alla terapia farmacologica immunosoppressiva ^[6, 17].

Problematiche relative al trapianto cardiaco.

Il successo del trapianto d'organo è strettamente legato alla possibilità di modulare la risposta immunitaria del ricevente in modo da evitare la reazione di rigetto, alla cui realizzazione concorre principalmente l'immunità cellulo-mediata, ma anche la risposta umorale. Il contributo relativo di questi due meccanismi varia a seconda del tipo di trapianto e si riflette spesso nelle caratteristiche istopatologiche degli organi rigettati ^[18].

In seguito a trapianto cardiaco, la reazione di rigetto rappresenta la causa principale di morbilità e mortalità nel primo anno dopo il trapianto ^[9].

Il rigetto d'organo è classificato tradizionalmente in tre tipi:

1. rigetto iperacuto;
2. rigetto acuto (cellulo-mediato e umorale);
3. rigetto cronico.

Il rigetto iperacuto avviene entro pochi minuti o al massimo qualche ora dal trapianto e trova la sua base patogenetica principalmente nella formazione di lesioni mediate da immuno-complessi a livello dell'endotelio vasale. Si tratta di un evento catastrofico (e fortunatamente ad oggi molto raro grazie alle moderne procedure di *matching* fra donatore e ricevente) iniziato da anticorpi "naturali", ovvero anticorpi (prevalentemente IgM) presenti ad elevato titolo anche prima all'esposizione ad alloantigeni. Il legame di questi anticorpi all'endotelio comporta l'attivazione *in situ* del complemento e, di conseguenza, i vasi vanno incontro a necrosi fibrinoide e diventano suscettibili di occlusione trombotica. Tutto ciò costituisce un ulteriore motivo di danno tissutale dell'organo trapiantato ^[9].

Il rigetto miocardico acuto avviene, invece, con maggiore frequenza fra il 3 e il 6 mese dal trapianto e si accompagna a infiltrazione linfo-monocitaria e a citolisi massiva della componente miocitaria ^[9].

Nei primi anni '80, più del 70% dei pazienti con trapianto cardiaco sviluppava un rigetto acuto di varia entità nei primi sei mesi conseguenti al trapianto ^[19]. Recentemente l'incidenza del rigetto acuto nei primi sei mesi dal trapianto cardiaco è stata stimata in una percentuale compresa tra il 40% e il 70% ^[20,21]. Si ritiene che nella induzione del rigetto acuto a prevalente componente T cellulare, possano agire due meccanismi, non mutuamente esclusivi, che fanno parte dei meccanismi di riconoscimento alloantigenico diretto e indiretto ^[22].

Brevemente:

1. nella modalità di presentazione diretta degli alloantigeni (o *direct allorecognition*) i linfociti T dell'ospite riconoscono molecole HLA allogeniche intatte presenti sulla superficie delle cellule presentanti l'antigene (*antigen presenting cells-APC*) del donatore.
2. la presentazione indiretta degli alloantigeni (*indirect allorecognition*) si verifica quando i linfociti T del ricevente riconoscono gli alloantigeni dell'organo trapiantato dopo che questi sono stati esposti sulle APCs del ricevente stesso. In altre parole le cellule APC del ricevente sono in grado di captare, processare ed esporre frammenti peptidici, derivati dalle molecole HLA delle cellule dell'organo trapiantato, ai linfociti T dell'ospite ^[22].

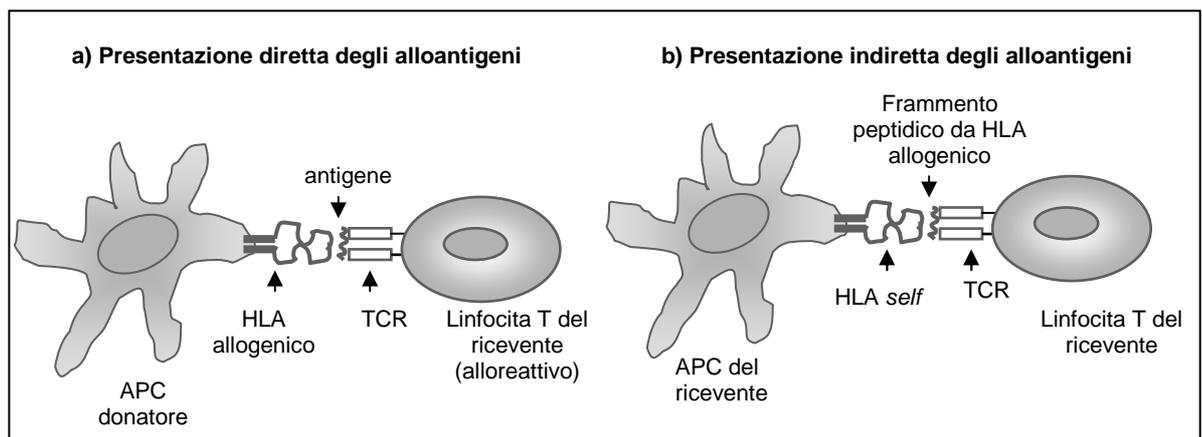


Figura 1 Rappresentazione schematica del meccanismo di riconoscimento degli alloantigeni secondo la modalità di presentazione a) diretta e b) indiretta.

Nel rigetto del trapianto d'organo, anche gli anticorpi diretti contro alloantigeni giocano un ruolo fondamentale. Il rigetto acuto su base umorale interessa circa il 7% dei pazienti con trapianto cardiaco. Esso è indirizzato contro l'endotelio vascolare dell'organo trapiantato e genera una manifestazione clinica spesso definita vasculite da rigetto ^[9,23,24].

Il rigetto cronico avviene in un intervallo di mesi o anni dopo il trapianto ^[42]. Il meccanismo patogenetico alla sua base non è stato completamente chiarito, ma si ritiene che possano essere interessati sia meccanismi di danno cellulo-mediati che umorali. Nel trapianto di cuore, il rigetto cronico porta ad una manifestazione clinica definita vasculopatia coronaria (CAV-*coronary allograft vasculopathy*), che si evidenzia come aterosclerosi diffusa con ispessimento intimale delle arterie coronarie, dovuta alla proliferazione nell'intima vascolare delle cellule muscolari lisce ^[9].

La CAV interessa circa il 50% dei pazienti con trapianto cardiaco e costituisce la principale causa di morte nei pazienti dopo il primo anno dal trapianto ^[25,26,27].

Nel loro insieme, le reazioni di rigetto vengono attenuate, e tenute sotto controllo, principalmente attraverso la messa appunto di un idoneo protocollo di immunosoppressione, mirato a determinare una diminuzione della risposta alloreattiva .

Cenni di immunobiologia del trapianto

Normalmente all'interno degli organi e dei tessuti è presente una popolazione di cellule dendritiche quiescenti e fenotipicamente immature.

In seguito al trapianto, alla ri-vascularizzazione e alla produzione locale di molecole ossidanti, citochine (quali IFN- γ , TNF- α e IL-1 β) e chemochine, si verifica la loro piena maturazione e attivazione ^[15].

In conseguenza di ciò le cellule dendritiche (sia del ricevente, che interne al trapianto) migrano verso i tessuti linfoidi secondari dove contribuiscono all'attivazione dei linfociti T alloreattivi attraverso i meccanismi di riconoscimento alloantigenico diretto e indiretto discussi nel precedente paragrafo ^[15]. Il reclutamento e la permanenza dei linfociti T nell'organo trapiantato sono eventi fondamentali per avviare quella cascata di eventi che culminano nella reazione di rigetto ^[28]. Il reclutamento leucocitario nel trapianto ad opera della produzione locale di chemochine e di citochine proinfiammatorie determina, a sua volta, un peggioramento del quadro flogistico.

Il rigetto acuto, come già accennato, è la manifestazione di un danno prevalentemente cellulo-mediato. Esso vede coinvolti soprattutto la sottopopolazione di linfociti T a fenotipo Th1 ^[29]. Le cellule Th1 sono caratterizzate funzionalmente dalla secrezione di citochine proinfiammatorie, tra cui interferon gamma (INF γ) e fattore di necrosi tumorale beta (TNF β), molecole critiche nei processi infiammatori e nella

loro cronicizzazione. I linfociti a fenotipo Th2 sono caratterizzati da un differente profilo di citochine (IL-4, IL-5 e IL-6) ed entrano in gioco soprattutto nella patogenesi delle malattie allergiche, modulando la secrezione delle immunoglobuline di tipo E (IgE) ^[30,31].

Dunque, nonostante rimanga in gran parte non noto il preciso meccanismo patogenetico alla base delle reazioni di rigetto, un ruolo fondamentale è certamente quello svolto dalle chemochine e dalle citochine proinfiammatorie ^[15]. Queste infatti, una volta rilasciate nel microambiente del trapianto, svolgono un'importante funzione nel modulare i meccanismi patogenetici che sottendono ai processi infiammatori.

In particolare, in seguito al trapianto d'organo, il trauma chirurgico e il successivo evento di ischemia-riperfusion, inducono una cascata infiammatoria che vede principalmente coinvolte le citochine TNF- α e IFN- γ ^[32, 15]. Queste citochine, oltre ad attivare la funzione effettrice delle altre cellule leucocitarie, promuovono l'attivazione e la completa maturazione delle cellule dendritiche, sia interne all'organo trapiantato che appartenenti al ricevente, e la loro successiva migrazione nei tessuti linfoidi secondari ^[15, 32,33]. Allo stesso tempo, TNF- α e IFN- γ inducono, da parte delle cellule tissutali ed endoteliali, la secrezione di chemochine e parallelamente incrementano l'espressione di molecole di adesione intercellulare ^[15]. Si realizza in questo modo un circuito molecolare che, promuovendo la diapedesi leucocitaria nell'organo trapiantato, contribuisce

alla formazione del substrato infiammatorio che conduce al danno immuno-mediato e al rigetto.

Terapia immunosoppressiva dopo il trapianto cardiaco

Il trattamento immunosoppressivo ha diverse finalità: prima di tutto è rivolto alla profilassi del rigetto nella fase precoce del trapianto, poi al mantenimento dell'immunosoppressione a lungo termine ed infine al trattamento del rigetto acuto.

I principali farmaci immunosoppressori adottati clinicamente nella prevenzione del rigetto del trapianto cardiaco comprendono: i corticosteroidi, gli agenti antiproliferativi (azatioprina e micofenolato mofetile), gli inibitori della calcineurina (ciclosporina), gli inibitori della chinasi mTOR, *Mammalian Target of Rapamicin* (Tacrolimus, Sirolimus) e gli anticorpi policlonali e monoclonali anti-linfociti T ^[9, 53,54].

I corticosteroidi sono i primi farmaci immunosoppressori adottati clinicamente nella prevenzione del rigetto di trapianto d'organo. Oggi sono comunemente utilizzati come componente standard nella terapia farmacologia anti-rigetto nel trapianto cardiaco, insieme ad altri farmaci come azatioprina o micofenolato. Attraverso l'azione su due importanti fattori di trascrizione, AP-1 (*activator protein 1*) e NF-kB (*nuclear factor kb*), gli agenti corticosteroidi sono in grado di diminuire l'espressione di

numerosi geni ad attività pro-infiammatoria, comprendenti fattori di crescita, citochine e molecole di adesione ^[54].

Azatioprina (AZA) è un pro-farmaco il cui metabolita attivo (6-mercaptopurina) interferisce con la sintesi delle purine, inibendo in questo modo la proliferazione cellulare ^[55]. Micofenolato mofetile, l'altro farmaco antiproliferativo, è un capostipite di composti che agiscono da inibitori reversibili e non competitivi dell'enzima inosina monofosfato deidrogenasi, essenziale per la sintesi de novo delle purine. I linfociti T e B attivati e proliferanti sono particolarmente sensibili all'azione di questi farmaci, poiché dipendono da questa via metabolica per la sintesi delle purine, avendo scarsa disponibilità della via alternativa della ipoxantina-guanina fosforibosil transferasi ^[54].

La ciclosporina, e in particolare la ciclosporina A (CsA), è il capostipite di una serie di molecole tra loro chimicamente correlate che devono la loro azione immunosoppressiva all'inibizione dell'attività della calcineurina. Questa è una proteina legante lo ione calcio e ad attività fosfatase che modula l'attività di numerosi fattori di trascrizione, tra cui NF-AT (*NF of activate T cells*), direttamente coinvolti nell'attivazione del programma trascrizionale di varie citochine, come IL-2. In questo modo si ha l'inibizione della proliferazione Ca-dipendente dei linfociti T ^[54].

Tacrolimus è un metabolita tossico di natura fungina, precedentemente conosciuto come FK506. Il suo meccanismo di azione è simile a quello

della ciclosporina. In particolare inibisce l'attività della calcineurina formando complessi citoplasmatici con la proteina FKBP-12. Anche Sirolimus è un metabolita fungino che agisce bloccando la chinasi mTOR, che è in grado di modulare l'attività di numerose proteine, molte delle quali risultano essere coinvolte nella progressione del ciclo cellulare ^[54]. Gli anticorpi policlonali anti-linfociti T sono in genere dei *cocktail* che inducono lo sviluppo della tolleranza immunologica oppure facilitano la deplezione dei linfociti T, mediandone la lisi da complemento o attivandone il programma apoptotico. Tra gli anticorpi monoclonali usati nella profilassi immunosoppressiva dei pazienti con trapianto cardiaco sono da ricordare Muromonab-CD3 (OKT3), specifico per la catena epsilon del complesso multiproteico CD3 associato al recettore per il riconoscimento antigenico dei linfociti T (TCR), e Dacluzumab e Basiliximab, che si legano alla subunità α del recettore per l'interleuchina 2, espresso sui linfociti T allo stato attivato ^[9].

I farmaci immunosoppressori producono, contestualmente ai desiderati effetti terapeutici, uno stato di immunodeficienza cronico che predispone i pazienti trattati allo sviluppo di infezioni e tumori. Occorre poi considerare anche gli effetti dovuti alla loro tossicità intrinseca che si manifesta spesso in forma di diabete, ipertensione ed insufficienza renale e le reciproche interazioni crociate ^[9].

Le infezioni batteriche, fungine e virali, sono molto frequenti e costituiscono una comune causa di morte nel primo anno dal trapianto cardiaco ^[43]. Nei trapiantati sono anche di comune riscontro disordini linfoproliferativi (specialmente linfomi a cellule B) e tumori della cute ^[9].

Chemochine

Le chemochine sono una grande famiglia di proteine fortemente basiche a basso peso molecolare (8-14 kDa) caratterizzate da una struttura modulare comune, mostrata schematicamente in Fig.3 ^[34,35].

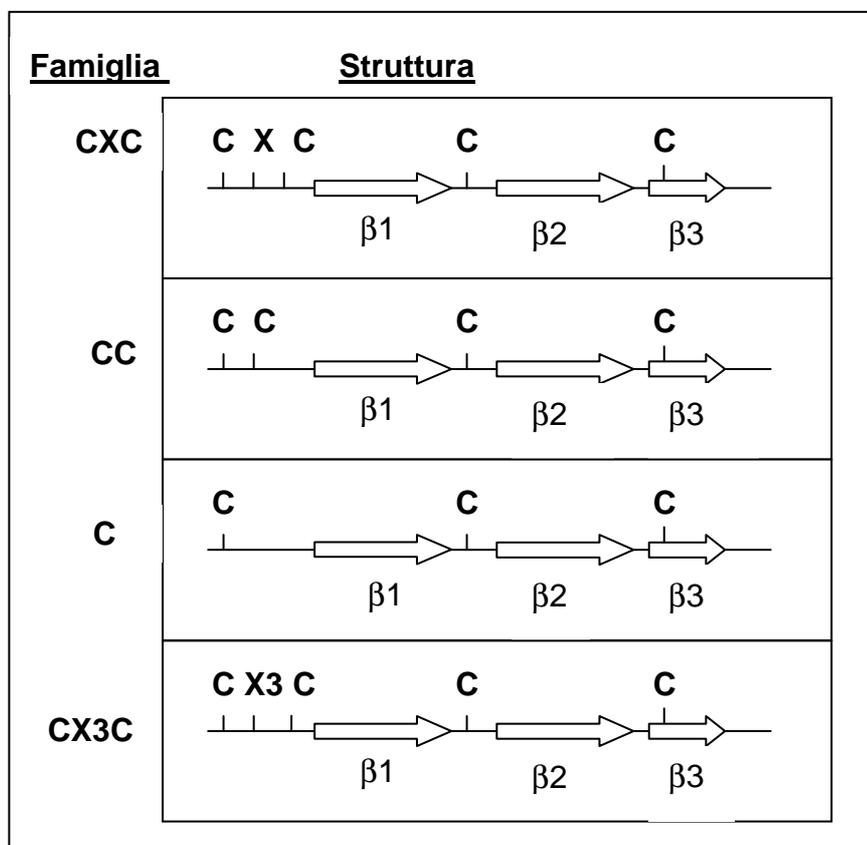


Figura 2 *Rappresentazione schematica dell'organizzazione strutturale delle chemochine.*

Possono presentarsi in diverse forme: monomeri, dimeri e oligomeri ed esibiscono diverse attività biologiche, anche se la loro funzione

fondamentale consiste nell'attivazione e nel reclutamento (*chemiotassi*) dei leucociti nei siti di flogosi ^[36,37]. Recentemente le chemochine sono state ridefinite e classificate sulla base della loro struttura chimica e delle loro caratteristiche funzionali ^[35, 38].

Inizialmente le chemochine sono state suddivise, in base alla posizione reciproca delle prime due residui di cisteina, in due grandi sottofamiglie: α -chemochine o chemochine CXC e β -chemochine o chemochine CC.

Entrambe contengono 4 residui di cisteine e due ponti disolfuro tra le cys 1-3 e 2-4. Le CXC possono essere ulteriormente suddivise in base alla presenza di un particolare motivo tripeptidico N-terminale (ac.glutammico-leucina-arginina) definito *ERL motif*. ^[39,40]

Le chemochine che contengono questo motivo (es. CXCL8/IL-8) svolgono un'azione chemiotattica nei confronti dei neutrofili e stimolano l'angiogenesi, mentre quelle che non lo contengono, come CXCL9/Mig, CXCL10/IP-10 e CXCL11/I-TAC attraggono i linfociti T ed esibiscono proprietà angiostatiche ^[41,42].

E' noto da tempo che i linfociti T, a fenotipo helper Th1 e Th2, presentano un'espressione differenziale dei recettori per chemochine e questa contribuisce alla loro polarizzazione funzionale. In particolare i linfociti T a fenotipo Th1, principalmente coinvolti nei processi infiammatori e nella loro cronicizzazione, esprimono preferenzialmente il recettore CXCR3 e CCR5, mentre i linfociti T a fenotipo Th2, coinvolti nelle malattie

allergiche, esprimono principalmente il recettore CCR4 e in minor misura CCR3^[41].

Sono state identificate altre due famiglie di chemochine, una fornita di un solo residuo di cisterna C, il cui prototipo è la linfotactina (uniche chemochine con solo 2 residui di cisteina dei quattro caratteristici) e un'altra dotata di due residui di cisterna separati da tre aminoacidi CX3C, il cui prototipo è la fractalchina, la cui caratteristica è quella di essere l'unica chemochina, insieme a CXCL16 che può esistere sia in forma solubile che associata a membrana^[34].

L'attività biologica delle chemochine si realizza attraverso il legame con specifici recettori accoppiati a proteine G eterotrimeriche (GPCRs, *G proteins coupled receptors*), localizzati sulle cellule bersaglio e costituiti da sette eliche transmembrana. I recettori hanno tipicamente 340-380 residui aminoacidici e il sito di legame sull'estremità ammino-terminale extracellulare^[43].

Sono stati identificati 18 recettori per chemochine: 6 recettori per le CXC chemochine (CXCR1-6), 10 per le CC chemochine (CCR1-10), un unico recettore per la linfotactina indicato con XCR1 e uno per la fractalina CX3CR^[34].

Le chemochine, infine, esibiscono in genere un certo grado di ridondanza; si registra infatti promiscuità nella interazione con i recettori, anche se i propri ligandi appartengono in genere ad una stessa classe.

Ruolo delle chemochine nel rigetto di trapianto di cuore

Attualmente stanno sempre più prendendo corpo le evidenze sperimentali di un coinvolgimento delle chemochine nelle reazioni di rigetto di trapianto d'organo e nei processi infiammatori in generale, anche di natura autoimmune ^[13, 37,42,43,44,45,46]. All'interno di questo dibattito, l'attenzione si è rivolta alle chemochine e ai loro recettori come possibili *targets* terapeutici per l'ablazione dello stato infiammatorio in assenza di immunosoppressione generalizzata ^[13,47,48]

Diversi studi hanno recentemente avvalorato l'ipotesi di un ruolo fondamentale delle chemochine, e in particolare della chemochina CXCL10, nella reazione di rigetto d'organo ^[12,49]. Dati ottenuti sia nel topo che nell'uomo hanno accertato che il recettore CXCR3 e, tra i suoi ligandi, in modo particolare la chemochina CXCL10, partecipano attivamente alla reazione di rigetto cardiaco ^[50]. Mediante la messa a punto di tre modelli murini, *Hancock e coll.* hanno dimostrato, *in vivo*, che in seguito ad ablazione genica allo stato omozigote del recettore CXCR3 (topi *knock-out* CXCR3^{-/-}) si sviluppa una profonda resistenza al rigetto acuto in seguito a trapianto cardiaco e l'organo trapiantato è tollerato per un periodo superiore a 60 giorni. Nei topi *wild type* CXCR3^{+/+} il rigetto cardiaco avviene invece entro una settimana. Inoltre, i topi CXCR3^{-/-} trattati con un breve ciclo di ciclosporina A, mantenevano in maniera permanente il

trapianto, mentre lo stesso trattamento nei topi CXCR3^{+/+} era in grado di prolungare la sopravvivenza al trapianto solo di pochi giorni. Infine, nei topi *wild type* CXCR3^{+/+} il trattamento con anticorpi monoclonali anti-CXCR3 prolungava significativamente il mantenimento dell'organo trapiantato, sia se somministrato al momento del trapianto che in corso di rigetto ^[5069]. In uno studio più recente, data l'importanza del recettore CXCR3 nella reazione di rigetto cardiaco acuto, gli stessi autori hanno investigato, sempre nel modello murino, la relativa importanza dei tre ligandi del recettore CXCR3 indotti da IFN- γ : CXCL9, CXCL10 e CXCL11 ^[12]. Le indagini sono state condotte mediante immunistochemica e Northern Blot sull'infiltrato leucocitario interno alle sezioni di tessuto cardiaco, provenienti sia da modelli di trapianto allogenico che singenico. Da questo studio è emerso che le chemochine indotte da IFN- γ compaiono nel seguente ordine temporale di espressione in seguito a trapianto allogenico: CXCL10, CXCL11 e CXCL9.

La chemochina CXCL10 è anche l'unica, tra quelle investigate in questo lavoro, la cui espressione può essere rivelata anche nei modelli di trapianto singenico. L'immunistochemica ha rivelato poi che, mentre all'inizio l'espressione di CXCL10 è confinata solo alle cellule endoteliali dell'organo trapiantato, intorno al terzo giorno essa è diffusamente espressa dalle cellule che compongono l'infiltrato leucocitario parenchimale ^[12].

Data l'importanza della chemochina CXCL10 nella promozione del rigetto cardiaco acuto, è stato testato anche l'effetto della somministrazione intraperitoneale di anticorpi neutralizzanti anti-CXCL10 sulla sopravvivenza al trapianto. L'uso di anticorpi anti-CXCL10 determinava, nei topi trattati, un raddoppiamento dei tempi di sopravvivenza al trapianto rispetto agli animali di controllo. Infine, topi *knock-out* per la chemochina CXCL10 (CXCL10^{-/-}) erano soggetti a rigetto acuto a tempi molto più prolungati rispetto a quelli *wild-type* CXCL10^{+/+}. Di particolare rilievo è stata l'osservazione che l'uso di donatori CXCL10^{-/-}, rispetto a quelli CXCL10^{+/+} si accompagnava significativamente ad una riduzione dell'infiltrato leucocitario nel miocardio del ricevente, dimostrando il ruolo chiave della chemochina CXCL10 prodotta dalle stesse cellule dell'organo trapiantato nell'iniziare il progressivo reclutamento leucocitario dell'organo e nell'amplificazione della risposta immunitaria verso il trapianto ^[12].

Sulla base delle osservazioni generate da modelli sperimentali animali, gli stessi autori hanno riportato, per mezzo di indagini immunoistochimiche e di RT-PC in 169 biopsie endomiocardiche umane, che il recettore CXCR3 e la chemochina CXCL10 correlano in maniera significativa con i livelli di infiltrazione T-linfocitaria in corso di rigetto acuto ^[11].

In un altro lavoro, nell'uomo, è stato dimostrato che il livello di CXCL10 non è apprezzabile nelle biopsie del miocardio del donatore prima del trapianto, ma si nota un consistente aumento della chemochina dopo

trapianto, che correla in maniera significativa allo sviluppo della reazione di rigetto acuta e della vasculopatia ad esso associata ^[51].

Infine un altro studio ancora ha preso in esame l'espressione delle chemochine indotte da IFN- γ e della chemochina CCL5/RANTES e dei loro recettori CXCR3 e CCR5 in 316 biopsie endomiocardiche umane, provenienti da 30 pazienti. Gli autori riportano anche l'analisi di espressione del recettore CXCR3 e CCR5 in 217 campioni di sangue periferico dei riceventi. Secondo questo studio le chemochine CXC indotte da IFN- γ , CCL5 e i loro recettori CXCR3 e CCR5, correlano in maniera significativa con la presenza di lesioni patologiche riconducibili a rigetto acuto del miocardio ^[52].

Sulla Base di tutte queste osservazioni si osserva chiaramente come alte espressioni della chemochina CXCL10 e del suo recettore CXCR3 correlano in maniera significativa con la vasculopatia post-trapianto [51]. Per di più emerge in maniera netta come il legame CXCL10-CXCR3 gioca un ruolo centrale nella patogenesi disfunzione d'organo dovuta a rigetto acuto ^[62].

E' interessante notare che l'importante ruolo della chemochina CXCL10 nel rigetto d'organo è stato ampiamente apprezzato anche nel trapianto di rene. In questo caso, un recente studio ha preso in esame i livelli di espressione di CXCL10 in biopsie renali ottenute da 22 pazienti. L'indagine immunohistochimica per la chemochina CXCL10 è stata estesa oltre l'infiltrato leucocitario, in modo da comprendere le strutture vascolari,

tubulari e glomerulari ^[55]. I dati ottenuti indicano che i livelli di espressione della chemochina CXCL10 sono più elevati nelle biopsie indicative di rigetto acuto e nefropatia cronica e non è limitata solo all'infiltrato leucocitario. In questo stesso studio l'analisi retrospettiva *post-mortem* sui livelli sierici di CXCL10 precedenti al trapianto, in 316 pazienti, ha portato gli autori alla conclusione che una quantità nel siero di CXCL10 superiore a 150pg/ml conferisce un'aumentata suscettibilità di sviluppare un precoce e severo rigetto acuto di rene e predispone conseguentemente alla nefropatia cronica ^[62]. Ciò non solo avvalorava l'ipotesi che dal *targeting* del recettore CXCR3 sia possibile derivare una potente arma per la riduzione del reclutamento dei linfociti T attivati all'interno dell'organo trapiantato, ma lascia intuire chiaramente che è possibile utilizzare la chemochina CXCL10 come *marker* diagnostico per prevedere l'evoluzione dei trapianti d'organo e più in generale delle patologie immuno-mediate a prevalente componente Th1.

SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo del nostro studio è stato quello di investigare e quindi rafforzare, il ruolo della chemochina CXCL10 utilizzata come marker predittivo di rigetto d'organo. A tale proposito abbiamo studiato una popolazione indicativa di 143 pazienti sottoposti a trapianto di cuore c/o l'Unità di Cardiocirurgia dei Trapianti di Siena dal 1997 al 2006.

Inoltre i livelli sierici di un'altra chemochina denominata CCL22/MDC sono stati utilizzati come controllo. Infatti è ampiamente dimostrato che tale chemochina correla positivamente con molte malattie a patogenesi infiammatoria, ma al contrario non ha alcun peso nella patogenesi del rigetto d'organo.

MATERIALI E METODI

Pazienti

Un numero di 143 pazienti sottoposti a trapianto ortotopico di cuore, su di un numero totale di 220 pazienti, effettuati presso il centro trapianti di Siena tra il 1997 e il 2007, sono stati esaminati nel nostro studio e seguiti per 6 mesi.

Sono stati esclusi dalla nostra valutazione i pazienti andati incontro a morte durante l'intervento chirurgico, come anche quei pazienti per i quali non è stato possibile recuperare un campione di siero utile per l'analisi. Il siero pre-trapianto dei 143 pazienti, è stato analizzato retrospettivamente per il contenuto di CXCL10 e CCL22. Tutti i pazienti hanno dato il consenso informato; le procedure utilizzate in questo studio sono state in conformità con il Comitato Etico regionale sulla sperimentazione umana. Tutti i pazienti in attesa di trapianto sono stati sottoposti alle misurazioni dei principali parametri ematochimici pre trapianto ogni 6 mesi. Un'aliquota di siero è stata ottenuta dall'ultimo campione di sangue intero, ricevuto dal Centro di Immunogenetica dell'Azienda Ospedaliera di Careggi in Firenze, è stato utilizzato per l'analisi finale di citotossicità cross-match e istocompatibilità HLA. Le altre aliquote sono state selezionate casualmente da tutti i campioni, appartenenti allo stesso paziente, conservate c/o lo stesso sopracitato Centro e raccolte almeno 6 mesi prima dell'ultimo

campione. Le aliquote di siero così ottenute sono state congelate a -70°C e conservate fino al momento del dosaggio. Tutti i pazienti riceventi di trapianto cardiaco erano caucasici.

I dati riguardanti le caratteristiche demografiche dei pazienti, i dati anamnestici, la terapia medica, l'ematochimica e le caratteristiche dei donatori sono stati raccolti nel database informatico dell'ospedale e sono riassunti in Tabella I.

Tutti i pazienti erano negativi per evento infettivo concomitante al momento del prelievo ematico utilizzato per la misurazione di CXCL10 e CCL22.

Il trattamento immunosoppressivo citolitico d'induzione è stato eseguito con corticosteroidi; corticosteroidi combinati con ATG (coniglio antihuman thymocyte globulina), oppure corticosteroidi combinati con basiliximab (anticorpo monoclonale chimerico mouse-human diretto contro la subunità α del recettore IL-2 presente sulle cellule T). La terapia immunosoppressiva post trapianto è stata mantenuta con una triplice terapia eseguita con l'utilizzo di ciclosporina o Tacrolimus, azatioprina o micofenolato mofetile e corticosteroidi, come da protocollo locale. La tipizzazione HLA e il pannello di reattività anticorpale Imfocitotossico (PRA) sono state eseguite presso il Laboratorio di Immunogenetica dell'Azienda Ospedaliera di Careggi di Firenze. Solo i pazienti che mostravano più del 5% di reattività anticorpale sono

stati classificati come sensibilizzati, tali pazienti rappresentavano l'1,4% di tutti i soggetti studiati.

Le biopsie endomiocardica sono state eseguite in base al seguente calendario: settimanalmente durante le prime quattro settimane, ogni quindici giorni da 5 settimane a 3 mesi e mensilmente da 3 a 6 mesi.

Gli episodi di rigetto acuto trattati con somministrazione di boli di steroidi erano quelli che mostravano all'analisi istologica del vetrino, infiltrati multifocali "aggressivi" e/o lesione miocitaria, che venivano classificati come grado 3A in base al grading del Rigetto Acuto secondo l'International Society of Heart Lung Transplantation (ISHLT) (Stewart S et al. 2005 J Heart Lung Transplant). Solo le biopsie che mostravano un quadro morfologico di rigetto acuto di grado 3° sono state utilizzate ai fini dell'analisi statistica.

Soggetti sani correlati per età e sesso ai pazienti trapiantati sono stati utilizzati come controllo (n = 67).

Test ELISA

I livelli sierici della chemochina CXCL10 sono stati determinati quantitativamente, nei vari esperimenti, mediante un kit ELISA disponibile sul mercato (*R&D Systems, Minneapolis, MN*). Si tratta, brevemente, di un saggio immunoenzimatico di tipo "a sandwich" caratterizzato da un *range*

di sensibilità da 0.41-4.46pg/ml [25]. I coefficienti di variazione intra ed interassay sono stati rispettivamente del 3% e 6,1%. Mentre i livelli sierici di CCL22 sono stati determinati quantitativamente, nei vari esperimenti, mediante un kit ELISA disponibile sul mercato (*R&D Systems, Minneapolis, MN*). Si tratta, brevemente, di un saggio immunoenzimatico di tipo “a sandwich” caratterizzato da un minimo valore misurabile di 62,5 pg/ml. I coefficienti di variazione intra ed interassay sono stati rispettivamente del 2,1% e 6,3%. Tutti i campioni di siero, che hanno dato al primo dosaggio un valore superiore al massimo livello rilevabile dal kit sono stati diluiti e nuovamente misurati e solo il valore finale è stato considerato. I sieri sono state piastrati in piastre “microliter” da 96 pozzetti e sono stati sempre analizzati in duplicato. La curva standard di controllo per i valori bassi, medi ed elevati era presente in ogni dosaggio.

Analisi Statistica

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software SPSS (SPSS, Inc, Evanston, IL). A causa della mancanza di una distribuzione normale dei valori, il confronto tra i livelli sierici di CXCL10 tra i diversi gruppi sono stati eseguiti mediante un Mann-Whitney U-test per dati non appaiati. Correlazione tra le due variabili è stata accertata mediante l'analisi di regressione lineare e correlazione Spearman's test in maniera appropriata.

Per il test degli effetti indipendenti delle diverse variabili prese in esame per valutare il fenomeno del rigetto cardiaco acuto, è stata eseguita l'analisi di regressione multipla e i coefficienti di correlazione parziale sono stati calcolati.

Un valore di $p < 0,05$ era considerato statisticamente significativo. I risultati sono espressi nel testo come mediana o media \pm SEM come appropriato.

RISULTATI

I livelli sierici pre-trapianto di CXCL10 e di CCL22 sono stati valutati in 143 sottoposti a trapianto ortotopico di Cuore e in 67 soggetti sani comparabili per sesso ed età, utilizzati come controlli. I pazienti riceventi mostravano valori mediani di contenuto sierico pre-trapianto di CXCL10 significativamente superiori rispetto ai valori mediani degli adulti sani presi come controllo (148,41 vs 80,08 pg/ml; $P = 0,0001$), come mostrato nella Figura 3A, mentre nessuna differenza significativa è stata osservata per quel che riguarda il valori mediani di concentrazione sierica di CCL22 tra i due gruppi (504,14 contro 517,13 pg/ml, Figura 3B).

Inoltre considerando i valori mediani dei livelli sierici di CXCL10 e CCL22 solo dei pazienti con cardiomiopatia end-stage e dividendoli in base alla eziopatogenesi della cardiomiopatia che li ha condotti fino al trapianto, è stato possibile evidenziare che non si trovava alcuna differenza statisticamente significativa tra il gruppo di pazienti affetti da CMD idiopatica e quelli affetti da CMD secondaria (post-ischemica, post-valvolare e iatrogena da antracicline), rispettivamente 343,43 vs 351,73 pg/ml per CXCL10 e 501,35 vs 512,15 pg/ml per CCL22 (dato non mostrato).

Abbiamo poi confrontato i livelli sierici di CXCL10 e di CCL22, tra i riceventi che non hanno mostrato segni istologici di rigetto acuto di trapianto (non rejectors) e i riceventi che hanno avuto almeno un episodio di rigetto acuto (rejectors). Entro 2 mesi dopo il trapianto, il contenuto sierico di CXCL10 era significativamente più elevato nei rejectors che nei non rejectors (204,17 contro 131,96 pg/ml, $P = 0,004$, rejectors $n=33$, non rejectors $n=110$), Figura 4A. Un analogo risultato è emerso dall'analisi statistica del contenuto sierico pre-trapianto di CXCL10 entro 6 mesi (166,48 vs 140,33 pg/ml, $P = 0,034$, rejectors $n = 55$, non rejectors $n = 88$), Figura 4B. Per quel che riguarda invece i livelli sierici pretrapianto di CCL22 i risultati sono venuti paragonabili e nessuna differenza statisticamente significativa è stata messa in evidenza entro 2 mesi (non mostrato) o entro 6 mesi dal trapianto (501,64 contro 504,76 pg/ml), Figura 4C.

Non sono state inoltre osservate differenze significative in fase di pre-trapianto per quanto riguarda i livelli sierici di CXCL10 e di CCL22, per la presenza di diabete o ipertensione polmonare, il tipo di terapia immunosoppressiva peri o post-trapianto (Dati non mostrati).

Al fine di valutare i rischi relativi per lo sviluppo di rigetto acuto nei

pazienti rejectors, due distinte analisi sono state effettuate a due e sei mesi dopo il trapianto. L'analisi di regressione logistica è stata eseguita ponendo l'episodio di rigetto acuto, come una variabile dipendente, mentre i livelli di CXCL10 e CCL22, età e sesso del ricevente, numero di mismatch per l'aplotipo HLA-A,-B,-DR, diagnosi di CMD, il tipo di induzione immunosoppressiva, il tempo ischemia fredda ed età e sesso dei donatori sono stati considerati come covariabili. I risultati hanno dimostrato un significativo aumento del rischio (risk ratio 1,212; CI 1.001-1.424, $p < 0,05$) di rigetto acuto solo per la variabile CXCL10 entro i primi due mesi dopo il trapianto.

Dall'analisi di regressione logistica questa volta effettuata nell'arco temporale di 6 mesi è stato possibile determinare un aumento del rischio di rigetto acuto legato alla variabile CXCL10 ed anche alla variabile CMV. Questo a voler significare che con il passare del tempo i meccanismi patogenetici che entrano in gioco nel fenomeno del rigetto sono multifattoriali.

Per valutare infine la potenza dei livelli sierici pre trapianto di CXCL10 come fattore predittivo di rigetto acuto soprattutto nei primi mesi dopo il trapianto, abbiamo costruito due curve ROC a due e sei mesi. E' stato possibile dimostrare dall'analisi del AUC per la curva relativa ai primi 2 mesi dopo il trapianto che la sensibilità e specificità del parametro

CXCL10 nel determinare l'evento di rigetto acuto era pari al 75-80 %. Mentre la percentuale di specificità e sensibilità scendeva al 50 % a 6 mesi. Inoltre è stato possibile individuare un valore di CXCL10, definito come valore di CUT-OFF, pari a 160 pg/ml, Figura 5. Volendo speculare su questo risultato potremo dire che, tale analisi sta ad indicare e suggerire che se la chemochina CXCL10 fosse misurata al paziente candidato al trapianto nella fase di valutazione pre trapianto, e se questa risultasse essere al di sotto di tale valore, ipoteticamente questo paziente avrebbe un 80 % circa di probabilità di non andare incontro ad un fenomeno di rigetto acuto nei primi mesi. Per questo paziente quindi ipoteticamente, nei primi mesi dopo il trapianto, potrebbe essere intrapreso un regime di terapia immunosoppressiva meno aggressivo rispetto ai pazienti con valori più alti di 160 pg/ml, e quindi con notevoli ripercussioni di gestione clinica ed economica.

DISCUSSIONE

Negli ultimi anni, anche in Italia, un numero progressivamente crescente di pazienti con insufficienza cardiaca severa ha potuto beneficiare di un miglioramento dell'attesa e della qualità della vita grazie al trapianto cardiaco ^[74].

Tuttavia, nonostante l'ottimizzazione delle tecniche chirurgiche, una più corretta selezione dei pazienti da trapiantare e una migliore preservazione dell'organo del donatore, il trapianto d'organo comporta tutta una serie di complicazioni acute o a lungo termine derivate soprattutto dal trattamento con i farmaci immunosoppressori ^[9].

Per questo motivo, nel campo della trapiantologia, si avverte sempre con maggiore urgenza la possibilità di disporre di strumenti terapeutici innovativi che permettano la rigenerazione dell'organo malato oppure di markers diagnostici che, correlando con la sopravvivenza dell'organo trapiantato nelle fasi precoci del follow-up, siano utili per modulare più efficacemente le strategie immunosoppressive ed ottimizzare così l'utilizzo degli organi da trapiantare.

Questo studio fornisce la prova che alti livelli sierici pre-trapianto di CXCL10 rappresentano un fattore di rischio per lo sviluppo di rigetto acuto, entro i primi due mesi dopo il trapianto di Cuore.

In questi anni il successo del trapianto di cuore è stato raggiunto attraverso una migliore comprensione dei meccanismi immunopatologici che sottostanno alla patogenesi del rigetto di trapianto, con l'applicazione anche di strategie per il suo riconoscimento, il trattamento e la prevenzione. Una delle principali cause di insufficienza cardiaca durante il primo anno dopo il trapianto rimane il rigetto acuto, nonostante la somministrazione di immunosoppressori. La biopsia endomiocardica (BEM) è ancora oggi il gold standard per la sorveglianza dell'evento rigetto ^[57], in quanto tale tecnica gode di un'alta sensibilità e specificità per la diagnosi di rigetto acuto ^[58,59], ma è un procedimento altamente invasivo ed ad alto rischio di complicanze ed inoltre è di enorme disagio per i pazienti. Un altro obiettivo primario degli immunologi è stato quello di sviluppare test affidabili per valutare il rischio pre-trapianto di rigetto acuto dei pazienti sottoposti a trapianto di Cuore. Fino ad ora nessuno dei biomarcatori analizzati, utilizzati in fase pre o post trapianto, sono risultati affidabili nel predire il fenomeno rigetto del graft ^[60].

Indubbiamente, un marcatore pre-trapianto non-invasivo, predittivo della funzione del graft, in relazione al sistema immunitario del ricevente sarebbe stato di grande beneficio clinico. E' noto inoltre che la buona riuscita del trapianto è strettamente correlato a variabili che agiscono nell'immediate fasi successive al trapianto ^[61], e vi è un crescente numero di evidenze che enfatizza e sottolinea il ruolo della chemochina CXCL10

nell'avvio e amplificazione del processo di risposta immune che precede il rigetto d'organo ^[62]. Risposta immunitaria e rigetto acuto sono legati al traffico di cellule Th1 diretto dalle chemochine leganti il proprio recettore CXCR3, denominate CXCL9, CXCL10, CXCL11 ^[63,64]. In particolare, la chemochina CXCL10 prodotta nell'organo del donatore, probabilmente dalle cellule endoteliali, sembra mediare il reclutamento di diversi sottopopolazioni linfocitarie esprimenti il recettore CXCR3 sulle proprie membrane cellulari ^[65], contribuendo così in maniera potente ai fenomeni immunitari che portano al rifiuto dell'organo ^[63]. Inoltre, è stato dimostrato che i cardiomiociti rappresentano di per sé una fonte di CXCL10, tale fenomeno inesorabilmente contribuisce a perpetuare la cascata immunitaria Th1-mediata ^[66].

La chemochina CXCL10 non solo media il reclutamento leucocitario durante le fasi della risposta immune del rigetto di trapianto, ma è anche critica nell'iniziare la risposta immune all'antigene ^[67]. Così, la chemochina CXCL10 sembra giocare un ruolo centrale nel dar luogo da una parte al perpetuare il circolo vizioso che si instaura durante la risposta infiammatoria e dall'altra alla risposta immunitaria determinante nel processo che porta al rigetto acuto di trapianto.

Nel trapianto di rene, la chemochina CXCL10 più probabilmente attiva la cascata immunitaria in risposta agli antigeni ^[67], recluta le cellule T nel rene trapiantato ^[68], e altera la funzione delle cellule endoteliali vascolari e delle

cellule muscolari lisce ^[69,13]. Questa duplice funzione di CXCL10 che interviene nella risposta immune e nell'alterare le funzioni delle cellule vascolari hanno già fatto di questa chemochina un importante obiettivo per il monitoraggio della terapia antirigetto ^[51]. Di fatto, la determinazione del livello sierico pre-trapianto di CXCL10 è stato recentemente dimostrato di predire il rischio di rigetto del trapianto di rene e della sopravvivenza dell'organo trapianto ^[56,62].

In questo studio, dei vari fattori di rischio legati al ricevente e al donatore, tra i quali il sesso l'età, la diagnosi pre trapianto, il tempo di ischemia fredda, la terapia di induzione peri-operatoria, la positività all'infazione da citomegalovirus, il numero di mismatch HLA-A,-B-DR e i livelli sierici pre-trapianto di CCL22, l'analisi di regressione logistica ha evidenziato che per livelli sierici pre trapianto di CXCL10 superiori a 160 pg/ml vi era un significativo potere predittivo del verificarsi un episodio di rigetto acuto, entro i primi due mesi dopo il trapianto. Questo risultato appare evidente se analizziamo gli episodi di rigetto acuto registrati nei primi sei mesi dopo il trapianto che sono circa il 38%. Bene ad un mese, tale fenomeno si era già verificato nel 17% dei pazienti e a due mesi nel 23%. Inoltre potrebbe essere ipotizzato che il rapporto tra i livelli sierici pre-trapianto di CXCL10 e rigetto acuto sia correlato ad una risposta infiammatoria aspecifica. Interessante risulta invece che nel trapianto di rene, il ruolo di questa chemochina sia direttamente legato alla patogenesi

del rigetto acuto, mentre l'aumentato sierico dei livelli della proteina C-reattiva (marcatore di risposta infiammatoria sistemica aspecifica) non sembra essere correlato all'evento di rigetto di trapianto ^[62].

Infatti, Arora et al. avevano ipotizzato per questo marcatore un possibile ruolo come indicatore di rigetto acuto di trapianto di cuore se monitorizzato nel primo anno dopo il trapianto, si è dimostrato altresì poco affidabile e con basso potere predittivo. Al medesimo risultato gli stessi ricercatori sono giunti prendendo in esame il peptide N-terminale pro-BNP, anche questo suggerito come marcatore non invasivo post-trapianto di rigetto acuto. D'altro canto la loro analisi combinata ha migliorato il loro valore predittivo almeno per quel che riguarda lo sviluppo della vasculopatia cronica da trapianto allogenico (CAV) e tutte le cause di mortalità ^[70,71,60].

E' stato riferito che lo stato infiammatorio del paziente del paziente sottoposto a trapianto non correla con i valori di CXCL10 o CXCL9 ^[72].

Queste chemochine, suggerite da Karason et al. come biomarcatori non invasivi nel periodo post-trapianto, non sembrano comunque avere un potere predittivo per quel che riguarda il rigetto acuto ^[72]. Inoltre, in contrasto a CXCL10, CXCL9 risulta prevalentemente presente nei macrofagi infiltranti, viene espresso solo durante il rigetto acuto e non si mantiene a livello tissutale in maniera persistente (come invece fa CXCL10) nel trapianto di cuore ^[51].

Noi non possiamo certo ignorare che il contenuto sierico di CXCL10 è stato indicato da alcuni autori come marcatore non affidabile per il monitoraggio del rigetto di trapianto, non avendo raggiunto una significatività statistica nell'analisi, probabilmente a causa del numero piccolo campione utilizzato [72].

Il nostro studio condotto invece con un numero maggiore di osservazioni, ha confermato come la chemochina CXCL10 sia un marcatore predittivo non invasivo rigetto acuto di trapianto di cuore, con una elevata sensibilità e specificità, soprattutto nei primi mesi dopo il trapianto. In effetti, i pazienti con livelli sierici pre-trapianto di CXCL10 superiore a 160 pg/ml mostrano il 75-80% di rischio di rigetto acuto, entro i primi due mesi, come indicato dalla curva ROC. Sei mesi dopo il trapianto, invece, i livelli sierici di CXCL10, pur rimanendo significativi, perdono la loro potenza predittiva (57% l'area sotto la curva ROC). Allo stesso tempo, l'infezione da citomegalovirus (CMV), nota per essere associata con un aumentato rischio di rigetto di trapianto [73], raggiunge un significativo valore predittivo. Sarebbe altresì da noi auspicabile, poter ampliare la casistica di questi studi sulla potenziale capacità diagnostica non invasiva di questi biomarcatori, tuttavia, dal nostro lavoro, che fornisce la prova di un'importante attendibilità clinica dei livelli sierici di CXCL10, emerge che la loro misurazione pre-trapianto, potrebbe essere uno strumento utile nell'immediato periodo post-trapianto, per individuare i destinatari HTx

con un alto rischio di AR, che potrebbero quindi così richiedere una diversa gestione dei regimi immunosoppressivi.

Tabella I

Demographic, clinical and biochemical data of the study population (n=143)

Recipient age (years)	54.51±0.72
Recipient sex (% males over total)	85.31%
Diagnosis (% CMPD 1° over total)	39.06%
Diabetes (% over total)	17.54%
Pulmonary hypertension (% over total)	43.41%
Creatinine (µmol/L)	1.32±0.04
Ejection fraction	20.32±0.58
CXCL10 (pg/ml)	178.98±9.51
CCL22 (pg/ml)	570.30±29.43
CMV (% over total)	19.47%
Cold ischemia time	195.10±3.95
Induction Therapy (% over total)	
Corticosteroids+ATG	88.39%
Corticosteroids+basiliximab	11.61%
Post-transplant therapy	
Donor age (years)	32.74±1.08
Donor sex (% males over total)	65.44%
HLA-A+ B + DR ≤3	11.9%
HLA-A+ B + DR >3	88.1%

Data are reported as mean±SE or as percent frequency, as appropriate.

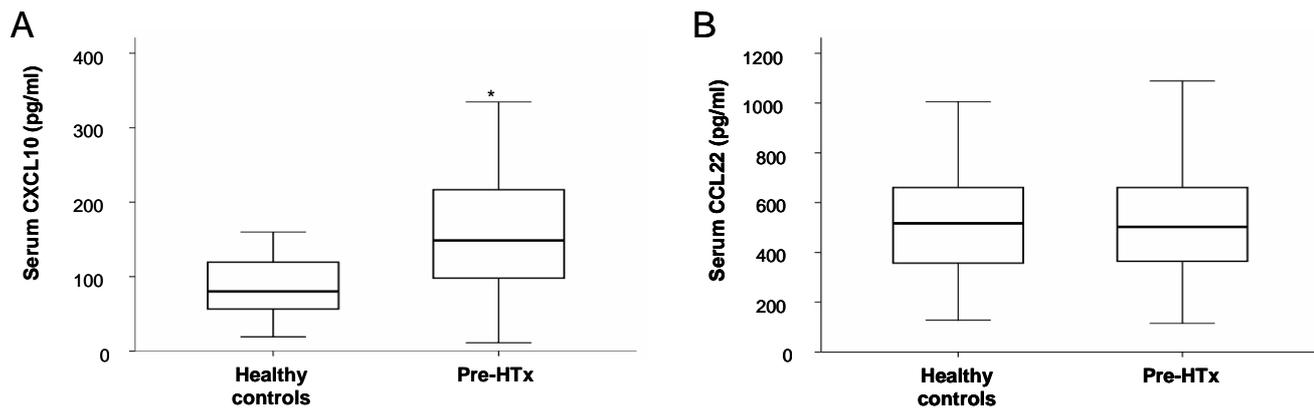


Figure 3 Pre-transplant serum CXCL10 and CCL22 levels in HTx recipients and healthy subjects. Panel A. ELISA determination revealed that CXCL10 content was significantly higher in HTx recipients (n=143) than in sex and age matched healthy subjects, taken as controls (n=67); median pre-transplant serum CXCL10: 148.41 vs. 80.08 pg/ml, respectively, *P=0.0001. Panel B CCL2 levels were similar in HTx recipients and in healthy controls; median pre-transplant serum CCL22 504.14 vs. 517.13 pg/ml, respectively.

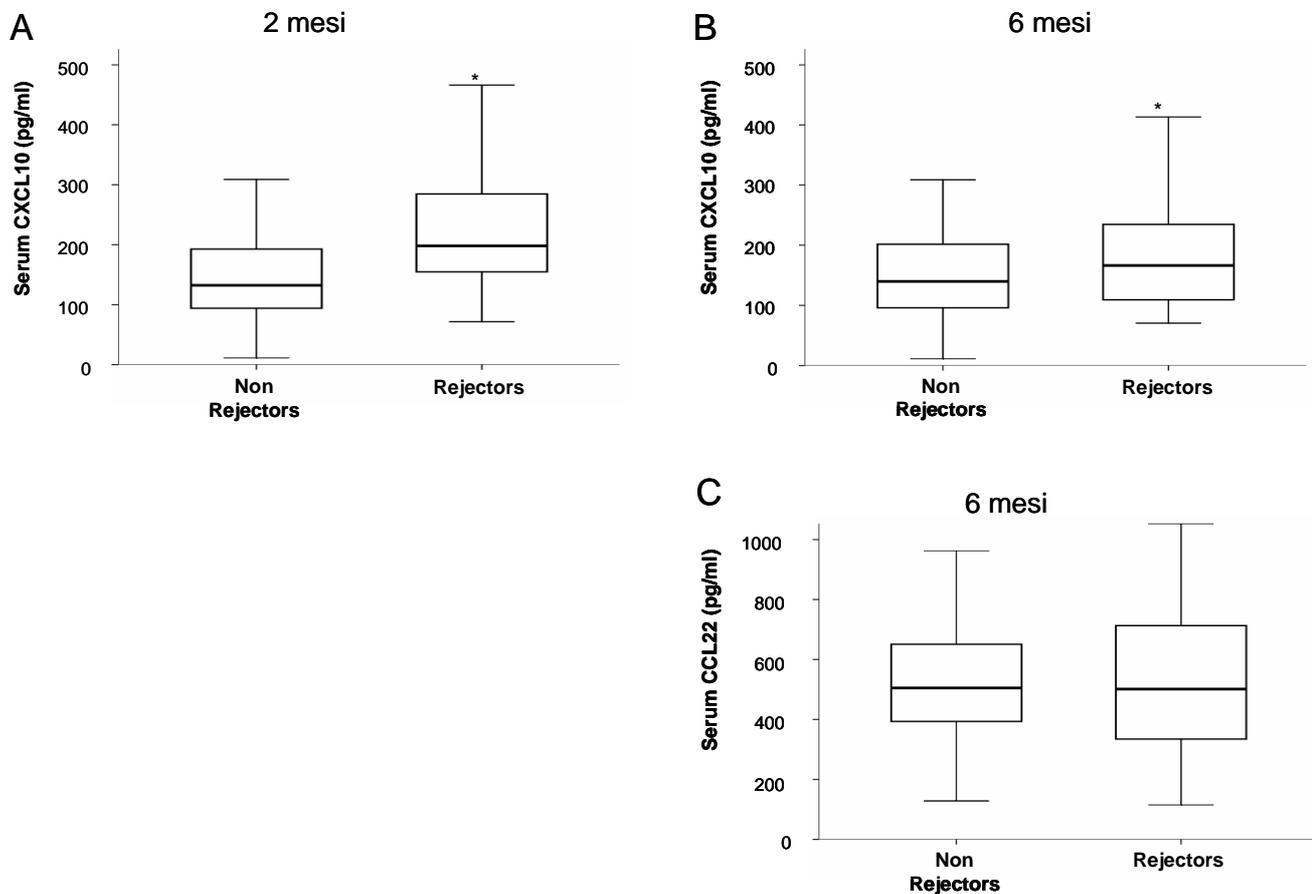


Figure 4 Pre-transplant serum CXCL10 and CCL22 levels in HTx recipients: comparison between rejectors and non rejectors. Panel A. In HTx recipients who experienced rejection episode (rejectors) within the first two months after HTx CXCL10 serum levels were significantly higher than in non rejectors: median pre-transplant serum CXCL10: 204.17 vs. 131.96 pg/ml, $P=0.004$, rejectors $n=33$, non rejectors $n=110$. Panel B Statistical analysis showed a similar results in rejectors compared with non rejectors within 6 months: median pre-transplant serum CXCL10: 166.48 vs. 140 pg/ml, $P=0.034$, rejectors $n=33$, non rejectors $n=110$. Panel C. No difference was shown in CCL22 levels either within 2 months (not shown) or within 6 months (501.64 vs. 504.76), median pre-transplant serum CCL22: 504.14 vs. 517.13 pg/ml.

Tabella II

Multivariate analysis showing the relative risk of allograft rejection episode according to selected risk factors

	2 month				6 month			
	p-value	Relative risk	95% CI Lower	Upper	p-value	Relative risk	95% CI Lower	Upper
CXCL10	0,0385	1,212462	1,001657	1,424405	0,0379	1,214026	1,001782	1,427446
CCL22	0,5294	0,999352	0,997336	1,001372	0,3274	0,999042	0,997128	1,00096
Recipient age	0,2394	0,937227	0,841278	1,04412	0.133	0,907944	0,824861	0,999397
Diagnosis	0,247	4,9954	0,416857	34,8110	0,0997	4,298749	0,757405	24,398091
Cold ischemia time	0,6592	1,005008	0,982938	1,027574	0,1466	0,984385	0,963689	1,005524
Donor age	0,666	0,983801	0,913486	1,059529	0,7357	1,012033	0,944139	1,084809
CMV	0,9341	0,918019	0,12074	6,979927	0,0348	4,830348	1,715364	13,126219
Induction therapy	0,7816	1,53888	0,073092	32,399648	0,247	3,736424	0,401047	34,811022
HLA A	0,1446	0,349881	0,085352	1,434248	0,9165	0,932777	0,253984	3,4257
HLA B	0,8407	0,823571	0,12411	5,465044	0,7148	1,3561	0,264621	6,949577
HLA DR	0,0716	4,995473	0,868198	28,743162	0,4448	1,749009	0,416857	7,338322
Mismatch sex	0,4617	2,334759	0,244165	22,32543	0,1239	5,519075	0,626468	48,622091

CI= confidence interval.
Significant variables are in bold

Curva R.O.C.

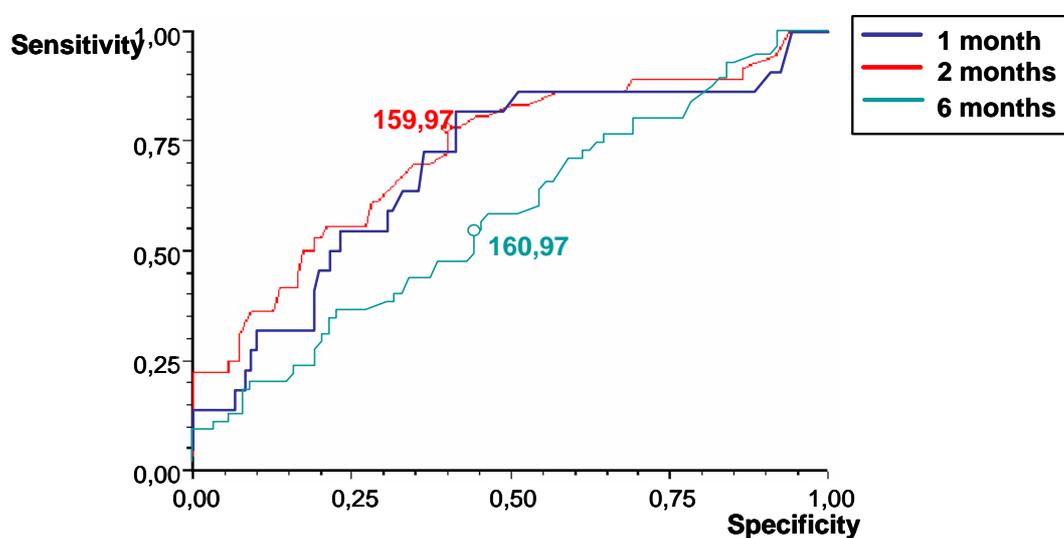


Figura 5 Receiver operating characteristic (ROC) curves calculated for retransplant CXCL10 serum levels as potential predictor for acute allograft rejection at different months after heart transplant (HTx). The graph shows a tendency toward reduction in the area under the ROC curve (AUC) from 1 to 6 months after HTx. AUC was 0.70 (with a 95% confidence interval [CI] ranging from 0.56 to 0.82, $P_{0.001}$) at 1 month; 0.70 (95% CI 0.58–0.81, $P_{0.001}$) at 2 months; and 0.58 (95% CI 0.47–0.67) at 6 months after HTx.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Cohn, J.N., Bristow, M.R., Chien, K.R. *et al.* (1997) *Circulation* **95**:766-770
- [2] Taylor, DO., Edwards, LB., Boucek, MM. *et al.* (2005) *J. Heart Lung Transplant* **24**: 945–955
- [3] Nir, SG., David, R., Zaruba, M. *et al.* (2003) *Cardiovasc. Res.* **58**:313-323
- [4] Orlic, D., Hill, JM., Arai, AE. (2002) *Circ. Res.* **91**:1092-1102
- [5] Narula, J., Haider, N., Virmani, R. *et al.* (1996) *N. Engl. J. Med.* **335**:1182-1189
- [6] Leri, A., Kajstura, J., Anversa, P. (2005) *Physiol. Rev.* **85**:1373-1416
- [7] Beltrami, AP., Urbanek, K., Kajstura, J., *et al.* (2001) *N. Engl. J. Med.* **344**:1750-1757
- [8] Beltrami, A.P., Barlucchi, L., Torella, D. *et al.* (2003) *Cell* **114**:763-776
- [9] Lindenfeld, J., Miller, GG., Shakar, SF., *et al.* (2004) *Circulation.* **110**:3734-40.
- [10] Hancock WW., Lu B., Gao W., *et al.* (2000) *J. Exp. Med.* **192**:1515-1520

- [11] Melter, M., Exeni, A., Reinders, ME. *et al.* (2001) *Circulation* **104**:2558-2564
- [12] Hancock, W.W., Gao, W., Csizmadia, V. *et al.* (2001). *J. Exp. Med.* **193**:975-980
- [13] Lazzeri, E., Romagnani, P. (2005) *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* **5**:109-118
- [14] Hancock, W.W., Wang, L., Ye, Q. *et al.* (2003) *Curr. Opin. Immunol.* **15**:479-486
- [15] Hancock, W.W. (2003) *Immunol. Rev.* **196**:37-50
- [16] VanBuskirk, A.M., Pidwell, D.J., Adams, P.W. *et al.* (1997) *JAMA* **278**:1993-1999
- [17] Hunt, S. (1983) *J. Heart Transplant.* **3**:70–78
- [18] Eisen, H.J., Hobbs, R.E., Davis, S.F. *et al.* (1999) *Transplantation* **68**:663–671
- [19] Kobashigawa, J., Miller, L., Renlund, D. *et al.* (1998) *Transplantation* **66**:507–515
- [20] Rogers, N.J., Lechler, R.I. (2001) *Am. J. Transplant.* **1**:97-102
- [21] Michaels, P.J., Espejo, M.L., Kobashigawa, J. *et al.* (2003) *J. Heart Lung Transplant.* **22**:58–69
- [22] Hammond, E.H., Yowell, R.L., Nunoda, S. (1989) *J. Heart Transplant.* **8**:430–443

- [23] Behrendt, D., Ganz, P., Fang, J.C. (2000) *Curr. Opin. Cardiol.* **15**:422–429
- [24] Taylor, D.O., Edwards, L.B. *et al.* (2003) *J. Heart Lung Transplant.* **22**:616–624
- [25] Weis, M, Von Scheidt, W. (1997) *Circulation* **96**:2069–2077
- [26] Jiang, S., Herrera, O., Lechler, R.I. (2004) *Curr. Opin. Immunol.* **16**:550-557
- [27] Romagnani, S. (1996) *Clin. Immunol. Immunopathol.* **80**:225-235
- [28] Romagnani, S. (1994) *Annu. Rev. Immunol.* **12**:227-257
- [29] Romagnani, S. (1994) *Eur. Cytokine Netw.* **5**: 7-12
- [30] Yopp. A.C., Krieger, N.R., Ochando, J.C., *et al.* (2004) *Curr. Opin. Immunol.* **16**: 571-577
- [31] Hall, B.M. (1991) *Transplantation* **51**: 1141-1151
- [32] Rot, A., Von Andrian, U.H. (2004) *Annu. Rev. Immunol.* **22**:891-928
- [33] Zlotnik, A., Yoshie, O. (2000) *Immunity* **12**: 121–127
- [34] Baggiolini, M. (1998) *Nature* **392**: 565-568
- [35] Charo, F.I., Ransohoff, R.M. (2006) *N. Engl. J. Med.* **354**: 610-621
- [36] Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F. *et al.* (2000) *Pharmacol. Rev.* **52**: 145–176
- [37] Luster, A.D. (1998) *N. Engl. J. Med.* **338**: 436-445
- [38] Rossi, D., Zlotnik, A. (2000) *Annu. Rev. Immunol.* **18**:217-242

- [39] Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P.P. *et al.*, (1998) *J. Exp. Med.* **187**: 29–134
- [40] Belperio, J.A., Keane, M.P., Arenberg, D.A. *et al.* (2000) *J. Leukoc. Biol.* **68**: 1–8
- [41] Horuk, R. (2001) *Cytokine Growth Factor Rev.* **12**: 313-335
- [42] Baggiolini, M. (2001) *J. Intern. Med.* **250**: 91-104
- [43] Kunkel, S.L., Godessart, N. (2002) *Autoimmun. Rev.* **1**: 313-320
- [44] Romagnani, P., Lasagni, L., Annunziato, F. *et al.* (2004) *Trends Immunol.* **25**: 201-209
- [45] Rotondi, M., Lazzeri, E., Romagnani, P. *et al.* (2003) *J. Endocrinol. Invest.* **26**: 177-180
- [46] Antonelli, A., Fallahi, P., Rotondi, M. *et al.* (2006) *Eur. J. Endocrinol.* **154**: 651-658
- [47] Wells, T.N., Power, C.A., Shaw, J.P. *et al.* (2006) *Trends Pharmacol. Sci.* **27**: 41-47
- [48] Pease, J.E., Williams, T.J. (2006) *Br. J. Pharmacol.* **147** Suppl 1:S212-221
- [49] Melter, M., McMahon, G., Fang, J. *et al.* (1999) *Pediatr. Transplant.* **3**: 10–21
- [50] Hancock, W.W., Lu, B., Gao, W. *et al.* (2000) *J. Exp. Med.* **192**: 1515-1520

- [51] Zhao, D.X., Hu, Y., Miller, G.G. *et al.* (2002) *J. Immunol.* **169**:1556-1560
- [52] Fahmy, N.M., Yamani, M.H., Starling, R.C. *et al.* (2003) *Transplantation* **75**: 72-78
- [53] Kobashigawa, J.A., Patel, J.K. (2006) *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **3**: 203-212
- [54] Lindenfeld. J., Miller, G.G., Shakar, S.F. *et al.* (2004) *Circulation* **110**: 3858-3865.
- [55] Maltzman, J.S., Koretzky, G.A. (2003) *J. Clin. Invest.* **111**: 1122-1124
- [56] Lazzeri, E., Rotondi, M., Mazzinghi, B. *et al.* (2005) *Transplantation* **79**: 1215-1220
- [57] Rodriguez ER. (2003) *J Heart Lung Transplant*; **22**:3-15.
- [58] Zerbe TR et al. (1988) *Hum Pathol.* **19**:1307-1314.
- [59] Wagner K et al. (2000) *Pediatr Transplant.* **4**:186-192.
- [60] Arora S et al. (2007) *Transplantation.* **84** : 1308-1315.
- [61] Stepkowski SM et al. (2000) *Transplantation* **69** :2480-2482.
- [62] Rotondi M et al.(2004) *AM J Transplantation* **4**:1466-1474.
- [63] D.X. Zhao et al. (2002) *J. Immunol.* **169** :1556–1560.
- [64] El-Sawy T et al. (2002) *Curr. Opin. Immunol.* **14** :562–568.
- [65] Haskova, Z. et al. (2007) *Transplantation* **83**:1595–1601.
- [66] Crescioli C. et al. (2008) *Exp Cell Res* **314**:1337-1350.
- [67] Campbell JD et al. (2004) *Faseb J* **18**:329-331.

- [68] Agostini et al. (2001) *J AM pathol* **158** :1703.
- [69] wang X. et al. (1996) *J Biol Chem* **271** :24286-24293.
- [70] Cuppoletti A et al. (2005) *Transplant Proc* **37** :4033.
- [71] Van GT et al. (1998) *Transplant Int* **11**:361-370.
- [72] Karason K et al. (2006) *BMC Cardiovascular Disorders* **6**:29-38.
- [73] Fishman JA, Rubin RH (1998) *N Engl J Med* **24**:1741-1751.
- [74] Hertz, M., Taylor, D. *et al.* (2002) *J. Heart Lung Transplant.* **21**: 950-970.