



Università degli Studi di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE NEFROLOGICHE

Coordinatore: Prof. Sergio Stefoni

XX ciclo

SSD: MED/14 NEFROLOGIA

STRESS OSSIDATIVO NEL PAZIENTE PORTATORE DI
TRAPIANTO RENALE

Indirizzo: Nefrologia Sperimentale

Tutor

Chiar.mo Prof. Sergio Stefoni

Dottorando

Dr.ssa Nicole Lanci

Anno Accademico 2007 - 2008

SOMMARIO

1. INTRODUZIONE	4
1.1. Generalità sullo stress ossidativo	4
1.2. Principali radicali ossidanti e loro vie di produzione.....	4
1.3. Principali effetti delle specie radicali ossidanti	6
1.3.1. Effetto diretto sulle molecole biologiche.....	6
1.3.1.1. Lipidi.....	6
1.3.1.2. Proteine.....	6
1.3.1.3. DNA.....	6
1.3.2. Effetto indiretto sulle vie di segnalazione.....	8
1.3.2.1. Modificazioni del signalling intracellulare e induzione di apoptosi.	8
1.3.2.2. Modificazione dell'attività di fattori di trascrizione	9
1.3.3. Induzione dell'espressione di mediatori	11
1.4. Meccanismi antiossidanti	12
1.5. Equilibrio pro- / anti-ossidanti.....	13
1.6. Cellule che producono radicali	14
1.6.1. Fagociti	14
1.6.2. Piastrine.....	14
1.6.3. Eritrociti	15
1.7. Il trapianto e ROS.....	17
1.7.1. Insufficienza renale cronica, uremia e stress ossidativo	17
1.7.1.2. Aldeidi reattive	18
1.7.1.3. Gruppi tiolici.....	18
1.7.1.4. Perossidazione lipidica.....	18
1.7.2. Meccanismi molecolari di induzione dello stress ossidativo	19
1.7.3. Uremia e apoptosi	19
1.7.4. Trattamento dialitico sostitutivo.....	20
1.7.4.1. Infiammazione, citochine e stress ossidativo	22
1.7.5. Stress ossidativo nel contesto del trapianto renale	23
1.7.5.1. Terapia immunosoppressiva.....	23
1.7.5.2. Meccanismi molecolari della risposta immunitaria nel trapianto...	23
1.7.5.3. Inibitori della sintesi delle purine	25

1.7.5.4. Steroidi	25
1.7.5.5. Inibitori della Calcineurina.....	26
1.7.5.6. Inibitori del ciclo cellulare.....	27
1.7.5.7. Trapianto e stress ossidativo.....	28
2. OBIETTIVO E DESCRIZIONE DELLO STUDIO.....	30
2.1. Obiettivo	30
2.2. Razionale dello studio	30
2.3. Disegno dello studio.....	32
3. MATERIALI E METODI.....	33
3.1. Pazienti	33
3.2. Estrazione e congelamento di linfociti	35
3.3. Valutazione del danno ossidativo ad DNA Comet Assay	35
3.3.1. Protocollo Comet Assay.....	38
3.4. Dosaggio molecolare di citochine Searchlight 7-Plex Array	41
3.5. Analisi statistica	43
4. RISULTATI.....	44
4.1. Analisi parametri biochimici ed ematologici.....	44
4.2. Analisi frammentazione ed ossidazione del DNA	46
4.3. Analisi dei valori plasmatici delle citochine.....	48
4.4. Analisi di correlazione.....	52
5. DISCUSSIONE.....	55
6. CONCLUSIONI.....	59
7. BIBLIOGRAFIA	61

1. INTRODUZIONE

1.1. Generalità sullo stress ossidativo

La prima definizione di Stress Ossidativo risale al 1985 ad opera di Sies H. che così lo descrive: “A disturbance in the pro-oxidant – antioxidant balance in favour of the former, leading to potential damage” (*Una modificazione dell'equilibrio tra fattori pro- e anti- ossidanti in favore dei primi che può determinare un potenziale danno*) [Sies H, 1985] [Sies H, 1991].

In realtà è difficile definire lo stress ossidativo in poche parole poiché coinvolge una quantità considerevole di molecole, reazioni chimiche ed interazioni cellulari. È però ampiamente documentato che lo stress ossidativo partecipa alla patogenesi o al mantenimento di numerose malattie come ad esempio aterosclerosi, ipertensione, artrite reumatoide e danno da ischemia riperfusione [Irani K, 2000] [Babior BM, 2000].

1.2. Principali radicali ossidanti e loro vie di produzione

I principali attori dello stress ossidativo sono radicali liberi e specie chimiche altamente reattive che hanno un alto potere ossidante. Tali molecole hanno la caratteristica comune di essere particolarmente instabili poiché possiedono uno o più elettroni spaiati in uno degli orbitali molecolari. Questa forte instabilità li porta a reagire con altre molecole per cercare un equilibrio appropriandosi di un elettrone delle molecole con cui vengono in contatto. A seconda della composizione chimica i radicali ossidanti vengono distinti in due grandi categorie: le specie radicali dell'ossigeno (ROS) e le specie radicali dell'azoto (RNS).

Anione superossido (O_2^-), perossido di idrogeno (H_2O_2), radicale ossidrile (OH^-) e acido ipocloroso ($HOCl$) sono le principali molecole che costituiscono la classe di ROS [Descamps-Latscha B, 2001]. La classe dei RNS, invece, è costituita principalmente di NO e la specie radicale che si forma per ossidazione di NO, il perossinitrito ($ONOO^-$) [Davis KL, 2001].

La produzione intracellulare di ROS può essere il prodotto secondario di alcune reazioni metaboliche cellulari oppure può essere dovuta all'azione di enzimi specifici che li sintetizzano attivamente. Del primo caso fa parte la catena di trasporto degli elettroni attraverso le creste mitocondriali durante la quale l'1-2% degli elettroni sfugge portando alla formazione di O_2^- [Descamps-Latscha B, 2001] [Chandra J, 200] [Finkel T, 2000] [Kamata H, 1999]. Tra gli enzimi che generano attivamente specie radicali ricordiamo:

- Xantina ossidasi catalizza la reazione di ossidazione della xantina ad acido urico producendo una molecola di O_2^- . In alcuni casi la xantina ossidasi riduce l' O_2 producendo H_2O_2 oltre al radicale O_2^-
- NADPH ossidasi genera l'anione superossido attraverso la reazione $NADPH + 2O_2 \rightleftharpoons NADP^+ + 2O_2^- + H^+$
- Superossido dismutasi (SOD) genera H_2O_2 secondo la reazione $2O_2^- + 2H^+ \rightleftharpoons O_2 + H_2O_2$
- Mieloperossidasi (MPO) utilizza H_2O_2 per produrre HOCl secondo la reazione $Cl^- + H_2O_2 \rightarrow OCl^- + H_2O$
- Ossido nitrico sintasi (NOS) sintetizza NO a partire da L-Arg attraverso la reazione $L-Arg + O_2 + NADPH \rightarrow L-Citrullina + NO + NADP^+$. La reazione di NO con O_2^- porta alla formazione di $ONOO^-$, uno dei radicali dell'azoto più reattivi

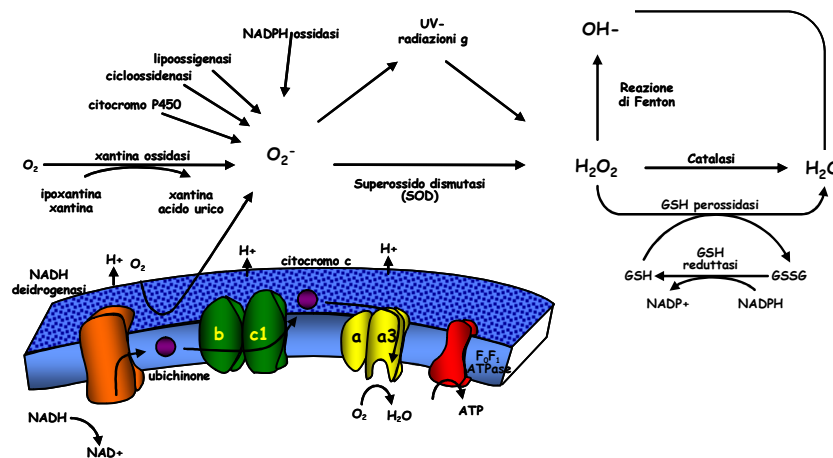


Figura 1 Produzione secondaria di anione superossido [Kamata H, 1999]

1.3. Principali effetti delle specie radicali ossidanti

La natura chimica dei ROS fa sì che essi tendano facilmente ad interagire con l'ambiente in cui si trovano inducendo alcuni cambiamenti. I ROS possono modificare chimicamente le molecole biologiche inducendo danni permanenti oppure possono agire in maniera indiretta interferendo con il signalling intracellulare .

1.3.1. Effetto diretto sulle molecole biologiche

Le modificazioni chimiche operate dai ROS possono riguardare tutte le macromolecole che costituiscono le cellule provocando danni strutturali e funzionali. Le modificazioni che avvengono possono riguardare i lipidi, le proteine e il DNA.

1.3.1.1. Lipidi

L'ossidazione di molecole di natura lipidica (perossidazione lipidica) modifica la struttura tridimensionale dei lipidi che costituiscono le membrane cellulari modificandone la fluidità e la permeabilità, compromettendone l'integrità di funzionamento.

1.3.1.2. Proteine

L'ossidazione delle proteine può agire su due livelli, da una parte può determinare un cambiamento della struttura tridimensionale della molecola impedendone il corretto funzionamento, dall'altra può modificare il sito catalitico di un enzima impedendo il legame con il substrato. A seconda del tipo di proteina coinvolta può esserci un mal funzionamento delle reazioni metaboliche cellulari (enzima), delle vie di trasduzione del segnale (recettore) o dei gradienti di membrana di diverse sostanze (trasportatori).

1.3.1.3. DNA

Il danno al DNA consiste in modificazioni chimiche dei nucleotidi che spesso danno origine a rotture del filamento di acido nucleico o a errori nella

replicazione con l'introduzione di mutazioni. Molto probabilmente il danno al DNA dei vari ROS è mediato dal radicale idrossile OH^\cdot . Ad esempio H_2O_2 entra nel nucleo dove si combina con ioni metallici quali Fe o Cu per essere trasformato in OH^\cdot [Halliwell B, 1991]. OH^\cdot è una molecola talmente reattiva che interagisce con tutti i componenti che costituiscono il DNA: deossiribosio, purine e pirimidine. L'interazione con lo scheletro zuccherino può dare origine a zuccheri radicali che possono rompersi in vari punti interrompendo la continuità della catena di acido nucleico. D'altra parte, l'interazione del radicale OH^\cdot con residui di guanina o adenina in posizione C-4, C-5 o C-8 porta alla formazione di basi modificate che, durante la replicazione, causano l'introduzione di mutazioni per mis-reading sulla stessa base o su basi adiacenti. Una delle alterazioni più caratteristiche è l'aggiunta di OH in posizione C-8 su una adenina o guanina. Tale modificazione può essere convertita per ossidazione in 8-idrossiadenina o 8-idrossiguanina oppure per apertura dell'anello si possono formare formamidodiammino pirimidine che durante la replicazione del DNA ne inducono un arresto [Halliwell B, 1991]. 8-OHdG è uno dei prodotti ossidativi del DNA più abbondanti e viene spesso utilizzato per misurare il danno ossidativo [Tarnag DC, 2000]. Anche i radicali dell'azoto hanno lo stesso meccanismo di azione: NO e ONOO^\cdot interagiscono direttamente con il DNA causando reazioni di deaminazione e cross-linking aumentando la mutagenesi oppure determinano la formazione di radicali degli zuccheri che causano la rottura del filamento di DNA [Davis KL, 2001] [Chandra J, 2000] [Akagi D, 2003] [Wink DA, 198].

Le modificazioni strutturali che interessano le macromolecole cellulari possono influenzare il destino della cellula. Infatti, limitati danni cellulari vengono in genere riparati da complessi enzimatici capaci di ripristinare la naturale struttura molecolare, basti pensare agli enzimi di riparazione del DNA. Se però la cellula subisce dei danni più consistenti, la normale architettura cellulare viene persa e la cellula va incontro alla morte per necrosi. In alcuni casi,

in particolare in seguito all'accumulo di rotture o mutazioni del DNA, la cellula induce una forma di morte cellulare più "fisiologica", l'apoptosi.

1.3.2. Effetto indiretto sulle vie di segnalazione

La presenza di radicali ossidanti interferisce con diverse vie di trasduzione del segnale anche se i meccanismi molecolari non sono ancora del tutto chiari. I ROS possono agire a diversi livelli: nel *signalling intracellulare* interferendo con la via di propagazione del segnale fino al nucleo, interagendo con *fattori di trascrizione* e inducendo *l'espressione di molecole* che attivano altri processi.

1.3.2.1. Modificazioni del signalling intracellulare e induzione di apoptosi

Anche se non sono note tutte le interazioni che i ROS alterano nella via di traduzione del segnale, probabilmente essi agiscono causando modificazioni chimiche che variano l'attività di recettori ed enzimi. Ad esempio possono legare i recettori di IL-1 e TNF- α mimando il meccanismo d'azione di queste molecole.

Uno dei processi maggiormente influenzati dai radicali ossidanti è l'apoptosi, che è il risultato di molteplici eventi che si verificano all'interno della cellula e che sono finemente regolati. Un ruolo centrale nell'apoptosi è svolto dalle caspasi, delle cistein-proteasi che vengono attivate da tagli enzimatici su residui di acido aspartico in modo da propagare il segnale fino al nucleo. Le caspasi effettrici attivano delle endonucleasi che entrano nel nucleo e tagliano il filamento di DNA in frammenti di circa 180 bp [Sakahira H, 1998]. Esistono tre modalità di attivazione delle caspasi che implicano rispettivamente il coinvolgimento di recettori di superficie della famiglia dei TNF-R, l'aumento di permeabilità dei mitocondri che permettono la fuoriuscita del citocromo C (Cyt C) e l'attività di granzima e perforina contenuti nei granuli citotossici [Sakahira H, 1998] [Chandra J, 2000].

Alcuni studi hanno dimostrato che il trattamento di colture cellulari con sostanze ossidanti induce l'apoptosi e che i ROS portano all'attivazione di endonucleasi Ca²⁺ dipendenti che tagliano lo scheletro di DNA [Chandra J, 2000] [Halliwell B, 1991].

Non è ancora chiaro come i ROS agiscano nell'attivazione dell'apoptosi, probabilmente la presenza di un eccesso di H_2O_2 nella cellula modifica le caratteristiche della membrana mitocondriale permettendo il rilascio del Cyt C. Nel citosol il Cyt C si lega ad Apaf-1 costituendo l'apoptosoma e inducendo l'attivazione delle caspasi [Chandra J, 2000]. La via di attivazione TNF-dipendente sembra invece influenzata dal perossinitrito attraverso nitrosilazione della caspasi-1 [Davis KL, 2001].

1.3.2.2. Modificazione dell'attività di fattori di trascrizione

I fattori di trascrizione costituiscono uno degli elementi finali nel trasferimento del segnale dalla membrana al nucleo dove viene attivata la trascrizione di diversi geni. Le specie radicali possono agire anche a questo livello attivando direttamente alcuni fattori di trascrizione coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare (p53), della traduzione (AP-1) e della trascrizione di molti geni (NF-kB) vedi figura 2.

p53 è un fattore di trascrizione che regola la risposta cellulare a particolari stimoli come il danno al DNA. A causa della sua breve emivita normalmente nella cellula è espresso a bassi livelli, ma quando si sommano più danni cellulari vengono innescate alcune modificazioni strutturali nella proteina che la rendono più stabile e si accumula nel citoplasma. L'aumento di p53 determina l'arresto del ciclo cellulare o l'induzione dell'apoptosi [Messmer UK, 1996]. Il meccanismo d'azione di p53 è quello tipico dei fattori di trascrizione: attraverso il legame con specifiche sequenze sul DNA viene attivata la trascrizione di geni bersaglio appartenenti alla famiglia Bcl-2 di cui fanno parte geni pro-apoptotici e geni anti-apoptotici (Bax, Puma, Noxa, Bid). L'attivazione dei geni bersaglio favorisce il rilascio di fattori pro-apoptotici dai mitocondri e l'attivazione della caspasi avviando il processo di apoptosi. p53 può anche attivare direttamente i geni che codificano per Apaf-1 (fattore pro-apoptotico) e caspasi-6 inducendo la cascata delle caspasi. Negli ultimi anni alcuni studi hanno messo in evidenza che p53 possa agire anche attraverso un meccanismo indipendente dalla trascrizione

pur non essendo ancora chiaro quali siano i fattori coinvolti nell'attivazione di tale processo [Fridman JS, 2003]. Sostanze ossidanti come H₂O₂ sono in grado di attivare p53 che a sua volta lega specifiche sequenze di DNA su geni pro-apoptotici inducendo l'apoptosi [Chandra J, 2000]. NO sembra avere un ruolo un po' controverso poiché alcuni autori hanno evidenziato che favorisca l'apoptosi aumentando l'espressione di p53, mentre altri hanno mostrato una sua attività anti-apoptotica [Wink DA, 1998] [Chandra J, 2000]. L'ipotesi più probabile è che a basse concentrazioni NO sia in grado di indurre l'espressione di p53, quindi l'arresto del ciclo cellulare e l'induzione dell'apoptosi, mentre ad alte concentrazioni ne riduca l'espressione funzionando da fattore anti-apoptotico.

AP-1 è un fattore di trascrizione formato per dimerizzazione delle proteine c-Fos/c-Jun o c-Jun/c-Jun. L'attivazione del fattore AP-1 segue la via delle MAP-chinasi: l'attivazione di un recettore di membrana tirosin-chinasi attiva la proteina Ras che stimola una delle MAP-chinasi ad attivare AP-1 [Kamata H, 1999]. AP-1 lega il promotore di alcune citochine come IL-2 e fattori coinvolti nella sopravvivenza cellulare, ad esempio induce l'espressione di Fas-L e regola l'espressione di alcune cicline che regolano il ciclo cellulare [Herbein G, 2006] [Shaulin E, 2002]. I ROS hanno la capacità di attivare AP-1 agendo a diversi livelli della catena di traduzione del segnale, ma sono anche in grado di indurre l'espressione genica [Kamata H, 1999].

NF-κB è una proteina eterodimerica composta da due subunità p65 e p50 che in condizioni normali si trova nel citoplasma legata alla proteina IκB in modo da rimanere inattiva. Quando la cellula viene attivata, IκB viene fosforilata e successivamente degradata ed NF-κB è libero di traslocare nel nucleo dove si lega a specifiche sequenze sul promotore di geni target [Halliwell B, 1991] [Barnes PJ, 1997]. Tra i geni che vengono trascritti ci sono geni di citochine proinfiammatorie (IL-1, IL-8, TNF-α), enzimi che generano mediatori dell'infiammazione (iNOS), chemochine e molecole di adesione. Molti stimoli possono attivare NF-κB: citochine, attivatori della proteina chinasi C, virus, ma

anche sostanze ossidanti come H₂O₂ [Barnes PJ, 1997]. Alcune delle citochine che vengono prodotte (IL-1, TNF- α) sono in grado di stimolare l'attivazione di NF-kB amplificando la risposta cellulare.

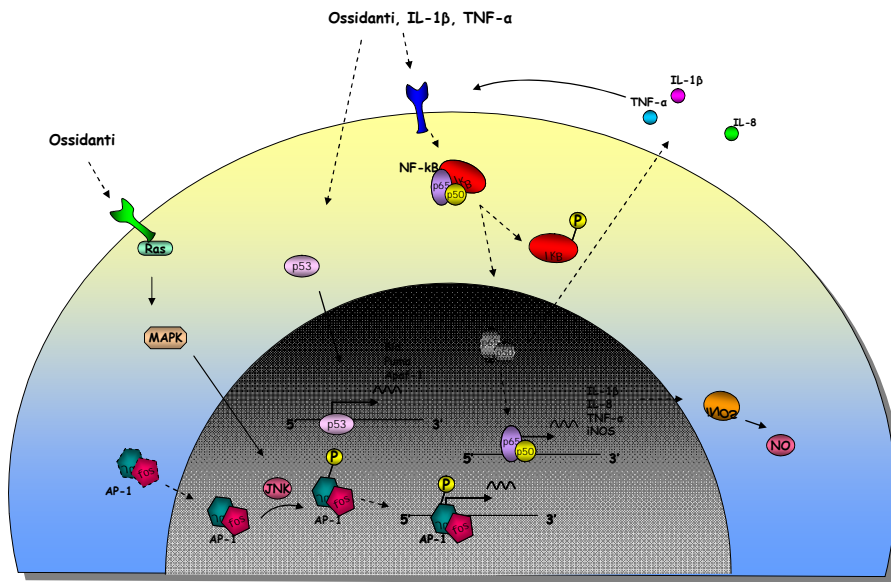


Figura 2 Attivazione di fattori di trascrizione

1.3.3. Induzione dell'espressione di mediatori

Attraverso l'attivazione dei fattori di trascrizione, i radicali ossidanti inducono l'espressione di particolari geni bersaglio che innescano nuovi processi all'interno della stessa cellula o in cellule vicine.

I geni delle citochine sono i principali geni target attivati in risposta a stimoli ossidativi e di infiammazione. Le citochine prodotte all'interno della cellula vengono secrete e si legano a specifici recettori sulla membrana della stessa cellula o di cellule vicine attivando le cellule immunitarie. Gli studi che hanno valutato l'espressione delle citochine indotta dai radicali ossidanti sono numerosi. Ad esempio la produzione di ROS ed NO a livello intracellulare o extracellulare induce l'espressione di IL-8 attraverso la via mediata da NF-kB ed AP-1. Al contrario, elevati livelli di molecole antiossidanti, come il glutatione ridotto, ne riducono la produzione [Aydin M, 2007] [Tarakcioglu M, 2003]. Un aumento dello stress ossidativo induce anche la produzione di IL-4 e IL-6

attraverso la via APE/Ref-1 che coinvolge la famiglia di proteine STAT [Lee TW, 2006] [Takeda K, 1997]. IL-4 è considerata una citochina pro-ossidante poiché aumenta il potenziale ossidativo di cellule target.

Le citochine spesso agiscono in maniera sinergica in modo da amplificare le risposte cellulari. Ad esempio TNF- α ed IL-1 β inducono la produzione di IL-8 e, in sinergia con IL-4, inducono l'espressione di IL-6 promuovendo le reazioni infiammatorie [Schulak JA, 2004] [Aydin M, 2007] [Lee TW, 2006] [Takeda K, 1997]. Le citochine, inoltre, possono influenzare la stessa via di trasduzione del segnale che ne ha indotto la produzione, autoalimentando le reazioni. H₂O₂, per esempio, attivando NF-kB induce l'espressione di TNF- α ed IL-1 β che, legandosi ai rispettivi recettori, inducono un segnale di attivazione dello stesso NF-kB [Barens PJ, 1997]. Uno dei geni bersaglio di NF-kB è l'enzima NOS che produce NO aumentando la produzione di radicali ossidanti [Sarkar SR, 2004] [Sethi S, 2000].

1.4. Meccanismi antiossidanti

Considerando tutta la serie di eventi scatenata dalle specie ossidanti, risulta chiaro che le cellule sono notevolmente influenzate dalla presenza delle specie reattive, per questo motivo hanno sviluppato alcuni sistemi di detossificazione per difendersi dai danni provocati dall'interazione dei ROS con le macromolecole cellulari (sistemi anti-ossidanti).

I sistemi anti-ossidanti sono costituiti da enzimi e molecole "tampone" che bloccano la capacità delle specie altamente reattive di arrecare danni cellulari. Tra gli enzimi più conosciuti come sistemi anti-ossidanti ricordiamo:

- catalasi che degrada H₂O₂ formando H₂O ed ossigeno
($H_2O_2 \rightleftharpoons O_2 + 2 H_2O$)
- superossido dismutasi che trasforma la specie più reattiva, O₂⁻ in H₂O₂
($2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$)
- glutazione perossidasi (GPx) che catalizza la reazione di degradazione di H₂O₂ per formare H₂O, ossidando il glutazione ridotto (GSH) alla sua

forma disolfito (GSSG); la GPx inoltre catalizza la reazione di riduzione dei lipidi perossidi ai loro rispettivi alcoli

Tra le molecole tampone hanno grande importanza il glutatione (GSH) che è un potente accettore di elettroni e altre molecole a basso peso molecolare (es. acido ascorbico) che si combinano con le specie altamente reattive riducendone l'instabilità impedendo così di interagire con le macromolecole [Chandra J, 2000] [Descamps-Latscha B, 2001].

Oltre alla capacità di tamponare le specie reattive, le cellule mettono in atto altre strategie per limitare i danni dovuti alle sostanze ossidanti. Queste strategie prevedono di riparare o eventualmente rimuovere le molecole danneggiate o di ridurre al minimo la produzione di specie reattive [Halliwell B, 1991].

1.5. Equilibrio pro- / anti-ossidanti

Nel normale funzionamento cellulare, la produzione di sostanze pro-ossidanti è equilibrata dai sistemi antiossidanti che limitano al minimo i danni ossidativi e consentono alla cellula di svolgere le normali funzioni a cui è deputata. Come descritto da Sies [Sies, 1985], lo sbilanciamento di questo equilibrio verso il sistema ossidante comporta l'accumulo di danni ossidativi che inducono un malfunzionamento della cellula. Questo sbilanciamento può essere dovuto ad un aumento della concentrazione di ROS oppure ad una minore capacità di neutralizzare i sistemi ossidanti. Nel primo caso, l'aumento della produzione di ROS può essere dovuta ad un'augmentata concentrazione di O_2^- , all'aumento della attivazione dei fagociti o all'esposizione diretta a tossine esogene (es. fumo di sigaretta). Nel secondo caso invece, la minore attività anti-ossidante può essere dovuta ad una riduzione dell'intake di antiossidanti (introduzione di antiossidanti con la dieta), aumento dell'escrezione di glutatione (GSH) o mutazioni geniche di enzimi antiossidanti che ne determinano un malfunzionamento.

1.6. Cellule che producono radicali

Dopo aver chiarito cos'è lo stress ossidativo, quali sono le molecole coinvolte e come agiscono, bisogna considerare quali sono le cause dell'accumulo di radicali ossidanti nell'organismo. Sicuramente lo stile di vita gioca un ruolo importante a causa dell'introduzione di ossidanti esterni o del minore apporto di sostanze anti-ossidanti. L'origine esogena di specie altamente reattive, è però accompagnata da una produzione endogena come prodotto di scarto di alcune reazioni metaboliche (produzione secondaria) [Himmelfarb J, 2003], oppure come produzione attiva da parte di alcuni tipi cellulari (produzione primaria). Tra tutti, i fagociti hanno un ruolo cruciale poiché producono ROS come meccanismo di difesa dai microrganismi, ma anche piastrine e cellule endoteliali sono coinvolte nella rilascio di specie radicali. La produzione di ROS viene fisiologicamente contrastata da cellule come gli eritrociti che costituiscono un importante sistema antiossidante.

1.6.1. Fagociti

Già dalla metà del secolo scorso era noto lo scoppio respiratorio dei fagociti, anche se non era ancora ben caratterizzato [Babior BM, 2000]. Oggi le conoscenze sull'attività dei fagociti sono sempre più precise e hanno permesso di individuare tutti gli enzimi e i meccanismi che inducono la produzione di specie radicali. La produzione di radicali dell'ossigeno è legata alla principale funzione dei fagociti che è quella di difendere l'organismo dai microrganismi esterni. Macrofagi e cellule polimorfonucleate contengono quattro tipi di enzimi, NADPH ossidasi, SOD, NOS, e mieloperossidasi che sintetizzano attivamente O_2^- , H_2O_2 , NO e HOCl secondo le reazioni descritte precedentemente [Sethi S, 2000] [Xia Y, 1997] [Himmelfarb J, 2002].

1.6.2 Piastrine

La produzione di ROS da parte delle piastrine risulta oggi ben caratterizzata ed è causata dalla presenza degli enzimi NADPH ossidasi, eNOS e lipoossigenasi.

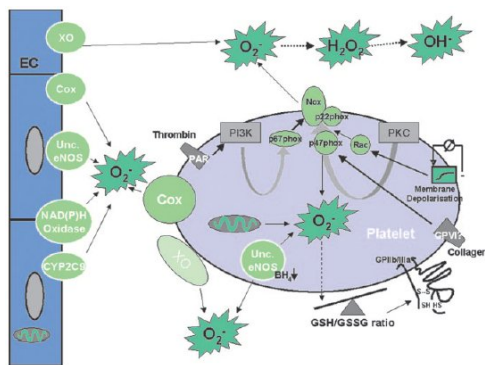


Figura 3 Produzione di ROS da parte delle piastrine [Krotz F, 2004]

Le piastrine oltre ad essere attive produttrici di specie reattive subiscono un processo di autoregolazione. La produzione di O_2^- a livello dell'endotelio dei vasi riduce la soglia di attivazione piastrinica e sembra indurre l'aggregazione spontanea. O_2^- , inoltre, aumenta la biodisponibilità di ADP incrementando il numero di piastrine aggiuntive reclutate. NO al contrario è un potente inibitore dell'attivazione piastrinica. La grande influenza che hanno i ROS nella fisiologia delle piastrine mette in evidenza che lo stress ossidativo ha un ruolo anche in patologie aterosclerotiche [Krotz F, 2004].

1.6.3. Eritrociti

Se si considera il ruolo principale degli eritrociti come cellule di trasporto di O_2 e CO_2 , risulta evidente come queste cellule siano coinvolte nei processi ossidativi. Infatti, l'alta concentrazione di O_2 nel sangue arterioso fa sì che la proteina trasportatrice di ossigeno, l'emoglobina, sia soggetta a processi di autoossidazione producendo l'anione superossido O_2^- . Un altro riscontro della produzione di ROS da parte degli eritrociti si evidenzia considerando lo stato di ossidazione del ferro Fe^{3+} indicando che durante il processo di formazione è stato perso un elettrone portando probabilmente al rilascio di O_2^- . La continua esposizione ad un ambiente ossidante ha fatto sì che gli eritrociti abbiano sviluppato dei sistemi antiossidanti come meccanismo di difesa sia attraverso complessi enzimatici, sia attraverso la presenza di molecole tampone. Nel citoplasma degli eritrociti si ritrovano elevate concentrazioni di enzimi

detossificanti: SOD, catalasi e glutazione perossidasi oltre ad alcuni enzimi che idrolizzano le proteine ossidate. Sono presenti anche grandi quantità di antiossidanti non-enzimatici come vitamine e glutazione (GSH) che si combinano con i radicali, neutralizzandoli. La mobilità degli eritrociti, infine, li rende un sistema antiossidante ideale non solo a livello locale, ma anche sistemico [Burak ÇIMEN MY, 2007].

1.7. Il trapianto e ROS

Una anomala produzione di ROS e di sostanze antiossidanti può influenzare la patogenesi di molte malattie e diventare un elemento caratterizzante nella diagnosi delle stesse. Anche nei pazienti portatori di trapianto renale ci sono evidenze di tali alterazioni. Per capire le modificazioni che si osservano nei trapiantati di rene bisogna partire dalla storia naturale dei pazienti nefropatici in cui si sviluppa l'insufficienza renale cronica per poi passare attraverso il trattamento dialitico sostitutivo fino all'intervento di trapianto. Bisogna infine considerare le alterazioni che si instaurano nel paziente trapiantato dovute soprattutto alla terapia immunosoppressiva.

1.7.1. Insufficienza renale cronica, uremia e stress ossidativo

L'insufficienza renale cronica è una condizione patologica in cui viene meno la normale funzione renale di escrezione che porta ad un accumulo nel sangue di prodotti di scarto del metabolismo cellulare. Progressivamente si osserva un aumento di azotemia, creatininemia, uricemia, fosfatemia e potassiemia.

In letteratura esistono diverse evidenze che dimostrano uno stretto legame tra uremia e stress ossidativo. Alcuni autori considerano l'uremia uno stato di aumentato stress ossidativo [Himmelfarb J, 2003], altri invece individuano nell'uremia l'evento scatenante che sbilancia l'equilibrio tra fattori pro- e anti-ossidanti [Floccari, 2005]. Questo sbilanciamento è dovuto sia ad un aumento della produzione di ROS, sia ad una riduzione della capacità antiossidante caratteristica dei pazienti uremici [Wu CC, 2005].

Indipendentemente dalla relazione di causa-effetto, lo stress ossidativo in fase uremica è caratterizzato dall'accumulo di aldeidi reattive e gruppi tiolici ossidati con una concomitante riduzione dei gruppi tiolici ridotti antiossidanti. L'ambiente altamente ossidante, inoltre, determina una elevata perossidazione lipidica che contribuisce al danno cellulare.

1.7.1.2. Aldeidi reattive

Le aldeidi reattive si formano come sottoprodotto di una serie di reazioni ossidative quali l'ossidazione di gruppi alcolici o gruppi amminici (es malondialdeide, MDA). Nell'uremia tendono ad accumularsi a causa di una riduzione del catabolismo renale o per aumentata produzione da parte delle cellule fagocitiche attraverso attivazione del sistema mieloperossidasi-catalasi. Come specie altamente reattive, sono coinvolte nelle modificazioni ossidative del colesterolo LDL partecipando alla progressione del danno cellulare nell'insufficienza renale cronica, promuovendo l'aterosclerosi [Himmelfarb 2002] [Himmelfarb 2003].

1.7.1.3. Gruppi tiolici

I gruppi tiolici appartengono ad una classe di composti organici solfuro-derivati caratterizzati dalla presenza di residui sulfidrilici nel loro sito attivo [Himmelfarb 2002]. Nell'organismo svolgono una importante funzione antiossidante costituendo il principale tampone redox. Gruppi tiolici intracellulari come il glutatione o la tioredossina sono essenziali per il mantenimento dell'ambiente altamente riducente all'interno della cellula, ma anche gruppi tiolici extracellulari costituiscono una importante difesa antiossidante. Nel plasma, ad esempio, i livelli di enzimi antiossidanti come SOD e glutatione perossidasi sono molto bassi e i gruppi tiolici costituiscono la principale difesa plasmatica contro il danno ossidativo [Himmelfarb 2003].

1.7.1.4. Perossidazione lipidica

Numerosi studi hanno valutato i livelli di perossidazione lipidica nel plasma di pazienti uremici dimostrando livelli sensibilmente maggiori rispetto al plasma di individui sani. Una conseguenza dell'aumento della perossidazione lipidica in pazienti uremici è una aumentata produzione di LDL modificate ossidativamente (LDL ossidate) che risultano essere particolarmente aterogene [Himmelfarb 2002] [Himmelfarb 2003].

1.7.2. Meccanismi molecolari di induzione dello stress ossidativo

Nel complesso quadro dell'uremia, in letteratura emergono recenti studi che correlano azotemia e uricemia all'aumento dello stress ossidativo.

In particolare è stato dimostrato che alte concentrazioni di urea plasmatica diminuiscono i livelli di glutatione ridotto aumentando lo stress ossidativo [Zhang Z, 2004]. Inoltre, interagendo con recettori tiron-chinasi, viene innescata una serie di eventi intracellulari che provocano il danno al DNA e l'aumento di espressione di mRNA di proteine del ciclo cellulare come la proteina 153 (GADD) inducibile dal danno cellulare.

Anche la produzione di acido urico contribuisce alla formazione di specie radicali, infatti, nella reazione catalizzata dalla xantina ossidasi, oltre alla produzione di acido urico, si forma una molecola di anione superossido. A livello sistemico l'acido urico inibisce il rilascio di NO da parte delle cellule endoteliali e stimola una risposta infiammatoria. Inoltre l'acido urico stimola l'enzima NADPH ossidasi presente in adipociti e cellule endoteliali favorendo la produzione di ROS [Ejaz AA, 2007].

1.7.3. Uremia e apoptosi

Nel considerare l'uremia in relazione allo stress ossidativo, non si può tralasciare il coinvolgimento dell'apoptosi. È stato riscontrato infatti che cellule mononucleate di sangue periferico prelevate da pazienti uremici se messe in coltura sono indotte rapidamente in apoptosi se confrontate con lo stesso tipo di cellule appartenenti a soggetti normali [Wu CC, 2005] [Matsumoto Y, 1995]. Nello studio di Matsumoto l'apoptosi di linfociti T di sangue periferico è stata valutata in termini di frammentazione del DNA ed è risultato che la frammentazione del DNA di cellule di pazienti uremici è maggiore rispetto a cellule di soggetti sani. Inoltre è emerso che il grado di apoptosi di pazienti uremici che non hanno iniziato il trattamento dialitico è sensibilmente maggiore rispetto a pazienti in dialisi. Dallo stesso studio emerge che il meccanismo di attivazione dell'apoptosi nelle suddette cellule è quello legato alla via Fas mediata. Questa molecola, valutata con metodiche citofluorimetriche, è infatti

maggiormente espressa nei linfociti di pazienti uremici rispetto ai quelli di soggetti normali.

1.7.4. Trattamento dialitico sostitutivo e stress ossidativo

Numerosissimi studi hanno messo in evidenza già da diversi anni che esiste una correlazione tra il trattamento dialitico sostitutivo e lo stress ossidativo, e più precisamente che la dialisi aumenta i livelli di stress ossidativo come dimostrano gli elevati livelli dei più comuni indici di ossidazione MDA (*Malondialdeide*) ed LDL (*Low Density Lipoprotein* ossidate [Ward RA, 2003]. È stato dimostrato che durante la dialisi si verifica un aumento della produzione di specie radicali valutata tramite misurazione della chemiluminescenza basale su sangue intero [Descamps-Latscha B, 2001].

Le problematiche dello stress ossidativo in pazienti in trattamento dialitico sostitutivo sono legate a due fattori principali: all'uremia e al trattamento di per se. Infatti bisogna ricordare che il paziente in dialisi è un paziente in cui sussiste uno stato uremico che, come è già stato descritto, partecipa allo stress ossidativo [Ward RA, 2003]. Le tossine uremiche possono causare delle modificazioni nella struttura tridimensionale delle proteine rendendole più suscettibili al taglio proteolitico, a cross-linking e a modificazioni chimiche con perdita o cambiamenti di funzione [Wratten ML, 2000]. Tali modificazioni, unite all'ossidazione delle LDL, scatenano lo scoppio ossidativo dei neutrofili [Ward RA, 2003].

Questa situazione viene aggravata da una serie di eventi indotti dal trattamento dialitico. Il continuo contatto del sangue periferico con le membrane di dialisi promuove l'attivazione dei leucociti che producono diversi mediatori dell'infiammazione (es. complemento e fattore di attivazione piastrinico) [Wu CC, 2005]. L'attivazione leucocitaria non è dovuta solo al riconoscimento di molecole allogeniche che costituiscono le membrane dialisi, ma anche alla contaminazione del dialisato con molecole di origine batterica. Tracce di endotossina contaminanti l'acqua possono attraversare le membrane di dialisi e

diffondere dal dialisato al sangue stimolando i leucociti a produrre ROS [Ward RA, 2003].

I granulociti neutrofilici e i fagociti in genere sembrano le cellule maggiormente coinvolte nella produzione di ROS. Ward et al. hanno evidenziato che i neutrofilici prelevati da pazienti emodializzati mostrano un aumento del tasso spontaneo di produzione di ROS rispetto a neutrofilici di soggetti sani [Ward RA, 2003]. Inoltre durante il passaggio del sangue attraverso la macchina di dialisi si verifica una ritenzione di granulociti che in risposta attivano i processi di degranolazione con rilascio di specie reattive, citochine pro-infiammatorie e mediatori di molecole di adesione [Handelman GJ, 2000] [Pertosa G, 2000]. Se da una parte la produzione di ROS induce la sintesi di citochine pro-infiammatorie attraverso l'attivazione di NF- κ B, dall'altra, le stesse citochine stimolano la produzione di ROS, si innesca così un circolo vizioso che si autoalimenta e che attiva diverse vie di segnalazione che mediano l'espressione di geni infiammatori, di regolazione del ciclo cellulare, di differenziamento e di apoptosi [Wratten ML, 2000] [Hamdelman GJ, 2000].

Nel corso del trattamento dialitico l'aumento della produzione di sostanze ossidanti è affiancato da una diminuzione delle difese antiossidanti, in particolare delle molecole idrosolubili che diffondono nel dialisato e vengono così eliminate [Wratten ML, 2000]. Si osserva una deplezione di proteine plasmatiche tioliche ridotte (come l'albumina), una riduzione dei livelli plasmatici di glutazione e dell'attività della glutazione perossidasi [Himmelfarb J, 2003] [Himmelfarb J, 2004]. Le stesse alterazioni si riscontrano in corso di dialisi peritoneale: diversi studi hanno mostrato la riduzione dei livelli plasmatici di glutazione, vitamina C ed E ed enzimi antiossidanti ed una diminuzione dell'attività della glutazione perossidasi nella progressione dell'uremia fino ad una drastica riduzione con l'inizio del trattamento dialitico [Tarnag DC, 2002] [Descamps-Latscha B, 2001].

Una conseguenza dell'aumentato stato ossidativo dei pazienti in dialisi è l'aumento del danno ossidativo del DNA calcolato misurando i livelli di 8-OHdG. 8-OHdG è uno dei prodotti ossidativi del DNA più abbondanti ed essendo una molecola particolarmente stabile è stata utilizzata per valutare il

danno ossidativo in patologie ROS-correlate [Tarnag DC, 2002] [Akagi S, 2003]. Studi condotti su linfociti di pazienti in emodialisi e dialisi peritoneale hanno evidenziato livelli di 8-OHdG significativamente maggiori rispetto a linfociti di pazienti con insufficienza renale cronica non in dialisi [Tarnag DC, 2002] [Tarnag DC, 2000] [Tarnag DC, 2000].

1.7.4.1. Infiammazione, citochine e stress ossidativo

Gli stessi stimoli discussi precedentemente che, durante la dialisi, promuovono l'attivazione leucocitaria e lo scoppio ossidativo con aumento dei radicali ossidanti, inducono la produzione di molecole che promuovono lo stato infiammatorio come proteina C reattiva, molecole di adesione ed alcune citochine [Himmelfarb J, 2004]. È ormai un dato certo che in dialisi sussiste un elevato stato infiammatorio, infatti si osservano cambiamenti nell'attivazione del complemento, nei markers di granulociti e nella funzione dei macrofagi. Inoltre valutando i livelli plasmatici di citochine pro-infiammatorie si evidenzia che tali valori sono 8-10 volte maggiori rispetto a quelli di controlli sani [Tarakcioglu M, 2003]. Le citochine hanno un ruolo centrale nei processi di regolazione dell'infiammazione agendo su diversi tipi cellulari e attivando molteplici vie di segnalazione.

D'altro canto è stata dimostrata una stretta correlazione tra le variazioni dello stress ossidativo e i livelli plasmatici delle citochine. In pazienti con insufficienza renale acuta o cronica, caratterizzati da un elevato stress ossidativo misurato in termini di proteine plasmatiche tioliche e di aldeidi reattive, si verifica una elevata produzione di IL-6, IL-8, TNF- α e MCP-1 [Himmelfarb J, 2004] [Pertosa G, 2000] [Pupim LB, 2004]. I livelli di IL-2, IL-4 e IL-10 sono invece ridotti in pazienti in dialisi rispetto ai controlli sani [Pertosa G, 2000]. Le stesse molecole sono state studiate per determinare se esiste una correlazione tra le diverse citochine ed in effetti sembra che i livelli plasmatici di IL-6 e IL-10 in pazienti emodializzati siano tra loro inversamente correlati [Pupim LB, 2004].

Se si considerano le vie di trasduzione del segnale dei ROS e delle principali citochine si nota che ci sono alcuni punti in comune, come il

coinvolgimento del fattore NF- κ B, si può quindi concludere che le citochine rappresentano il principale punto di comunicazione tra infiammazione e stress ossidativo.

1.7.5. Stress ossidativo nel contesto del trapianto renale

Il trapianto renale costituisce l'evento terapeutico d'elezione per il trattamento delle più importanti patologie renali poiché ripristina completamente la funzione renale. In tal modo vengono eliminate tutte le tossine uremiche che si accumulano nella progressione del danno renale e si ripristina una situazione che somiglia a quella fisiologica. In realtà con l'introduzione di un organo con caratteristiche immunologiche allogeniche, insorgono problematiche ad esso correlate che includono modificazioni di parametri ematologici ed umorali spesso legati anche alla terapia immunosoppressiva somministrata.

1.7.5.1. Terapia immunosoppressiva

La terapia immunosoppressiva serve a bloccare le reazioni di rigetto dovute al riconoscimento di antigeni allogenici. I farmaci che sono stati sviluppati agiscono a diversi livelli nel complesso sistema di attivazione linfocitaria descritto di seguito.

1.7.5.2. Meccanismi molecolari della risposta immunitaria nel trapianto

La cascata di eventi che porta all'attivazione linfocitaria dopo trapianto renale, inizia negli organi linfoidei secondari dove avviene il riconoscimento del complesso antigene-MHC da parte del recettore dei linfociti T (TCR). Solo se il legame tra TCR e MHC viene seguito dal segnale di costimolazione tra le molecole B7-CD28, si verifica l'attivazione di una serie di tirosin-chinasi che trasducono il segnale di attivazione attraverso tre pathway diversi che attivano tre diversi fattori di trascrizione AP-1, NFAT ed NF- κ B [Reynolds NJ, 2002] [Halloran PF, 2004]. La prima via coinvolge la fosfolipasi C (PLC) che utilizza i fosfatidil inositoli di membrana per formare IP3 e DAG. IP3 si lega al proprio recettore sul reticolo endoplasmatico liscio determinando l'aumento della

concentrazione di Ca^{2+} intracellulare e una conseguente attivazione della calcineurina, una serin-fosfatasi che interagisce direttamente con il fattore di trascrizione NFAT. Nel citoplasma la calcineurina così attivata, defosforila il fattore NFAT che in seguito ad un cambiamento conformazionale trasloca nel nucleo dove interagisce con il DNA. In realtà il singolo fattore NFAT ha una bassa affinità per il DNA, ma in combinazione con il fattore AP-1, si lega ai promotori di specifici geni di attivazione delle cellule T come IL-2 [Reynolds NJ, 2002] [Halloran PF, 2004].

La seconda via di trasduzione del segnale coinvolge le proteine Ras e “mitogen-activated protein kinase” (MAPK) che interagiscono con AP-1 stimolando la produzione di citochine che inducono la progressione del ciclo cellulare tra cui IL-2 e IL-2R. Il segnale di progressione del ciclo cellulare stimola la serin-treonin chinasi mTOR che fosforila uno dei fattori di inizio della sintesi proteica (4E-BP1) permettendo la traduzione di proteine coinvolte nel ciclo cellulare [Oshiro N, 2004].

Infine, la terza via di trasduzione del segnale attiva una protein chinasi che fosforila I κ B, l’inibitore di NF- κ B, che in questo modo viene degradato e permette la traslocazione nel nucleo di NF- κ B dove attiva l’espressione di geni coinvolti nella risposta immunitaria [Barnes PJ, 1997].

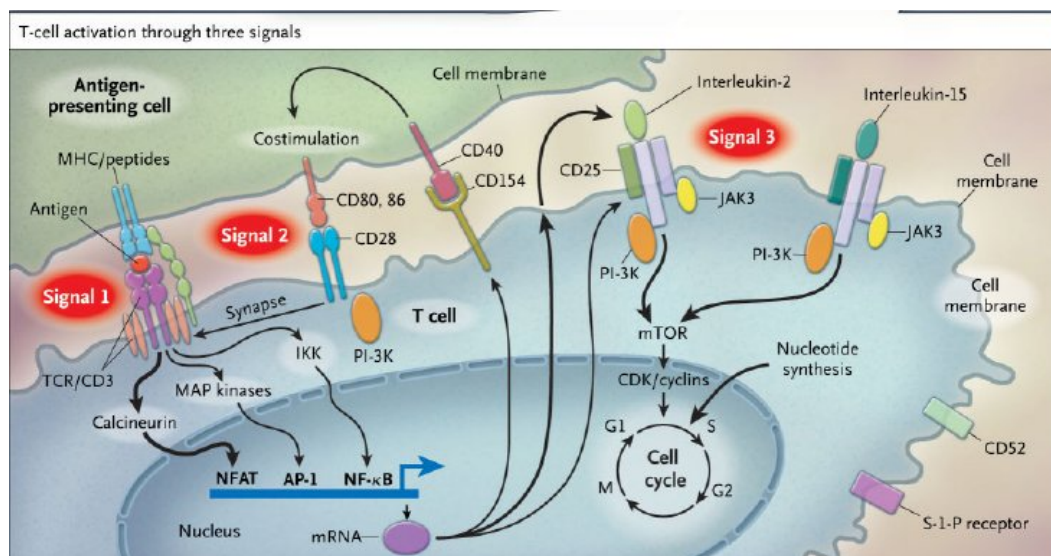


Figura 4 Meccanismi di attivazione linfocitaria [Halloran PF, 2004]

Le diverse strategie terapeutiche utilizzate sono state sviluppate per interferire con il segnale di attivazione linfocitaria a diversi livelli e, in genere, si utilizzano combinazioni di farmaci che agiscono su diverse vie di trasduzione per un effetto più completo minimizzando gli effetti avversi.

1.7.5.3. *Inibitori della sintesi delle purine*

L'azatioprina (Aza) è il primo farmaco immunosoppressore introdotto e appartiene alla classe degli antimetaboliti. Viene somministrato come profarmaco e convertito in due analoghi purinici, 6-mercaptopurina e metilnitroimidazolo. La 6-mercaptopurina è metabolizzata in acido tiinosinico ribonucleico che causa soppressione della sintesi di guanina e adenina e, quando viene incorporato negli acidi nucleici, causa rotture cromosomiche [Smith SL, 2002]. L'effetto finale è l'inibizione della sintesi di DNA ed RNA con blocco del ciclo cellulare e riduzione della proliferazione delle cellule immunitarie. Le principali cellule bersaglio sono i linfociti T CD8⁺, ma tra le altre cellule, anche le cellule staminali midollari sono sensibili all'azione del farmaco che ne arresta il ciclo cellulare causando i principali effetti collaterali (leucopenia, anemia, piastrinopenia) [Smith SL, 2002].

Il micofenolato mofetile (MMF) è una molecola antiproliferativa che inibisce l'enzima inositol-monofosfato deidrogenasi (IMPDH), un enzima coinvolto nella sintesi de novo delle purine, inibendo la sintesi di DNA ed RNA. MMF agisce sia sull'immunità cellulare sia su quella umorale bloccando la proliferazione dei linfociti T e B. Dal momento che il farmaco ha una massima affinità per un'isoforma dell'enzima presente nei linfociti, gli effetti collaterali sono ridotti rispetto all'azatioprina.

1.7.5.4. *Steroidi*

Gli steroidi sono piccole molecole di natura idrofobica che facilmente entrano nella cellula dove effettuano il loro effetto farmacologico legandosi ai recettori citoplasmatici per i glucorticoidi (GR) [Smith SL, 2002] [Schulak JA, 2004] [Barnes PJ, 1997] [Sies H, 1991]. In condizioni normali i GR sono

mantenuti in forma inattiva nel citoplasma tramite il legame con proteine hsp. Quando i glucocorticoidi entrano nella cellula, si legano ai GR determinando il distacco delle hsp e il complesso glucocorticoide-recettore trasloca nel nucleo dove lega il DNA in particolari sequenze di geni target chiamate glucocorticoid responsive element (GRE) attivando o inattivando la trascrizione di geni target [Barnes PJ, 1998]. Gli steroidi inibiscono l'espressione di alcune citochine infiammatorie o fattori di crescita come IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-11, TNF- α , GM-CSF e TNF α [Schulak JA, 2004]. La riduzione della sintesi di alcune proteine può avvenire tramite l'induzione della trascrizione di alcune ribonucleasi che tagliano l'mRNA di alcuni fattori di crescita. Inoltre i glucocorticoidi modificano la struttura della cromatina modificando l'accessibilità del DNA ai fattori di trascrizione. I glucocorticoidi interagiscono con NF-kB inducendo l'espressione di I κ B che nel citoplasma si riassocia con NF-kB terminandone l'attivazione e generando un feedback negativo. In questo modo gli steroidi inibiscono la sintesi di molte citochine e di mediatori dell'ossidazione come l'enzima iNOS [Barnes PJ, 1998] [Barnes PJ, 1997] [Rhen T, 2005]. Gli steroidi inoltre inducono la sintesi di IL-1 receptor antagonist che compete per la citochina IL-1 riducendone l'attività funzionale. Gli effetti finali della somministrazione dei corticosteroidi sono l'inibizione della presentazione dell'antigene e la riduzione della sopravvivenza cellulare delle cellule mononucleate promuovendone l'apoptosi [Barnes PJ, 1998] [Barnes PJ, 1997] [Rhen T, 2005] [Smith SL, 2002]. Agendo a diversi livelli sulla proliferazione e sopravvivenza cellulare, alte dosi di steroidi hanno come effetti collaterali linfopenia e monocitopenia dovuta anche ad una ridistribuzione di linfociti e monociti circolanti negli organi linfoidi e al blocco della risposta a fattori chemiotattici [Smith SL, 2002] [Schulak JA, 2004].

1.7.5.5. *Inibitori della Calcineurina*

Calcineurina (CsA) e Tacrolimus (TAC) sono i due farmaci immunosoppressori che agiscono sulla via di trasduzione che coinvolge la calcineurina. La ciclosporina, all'interno della cellula, lega la ciclofillina

formando un complesso che occupa il sito attivo della calcineurina impedendo la defosforilazione del fattore NFAT. Il tacrolimus agisce in modo molto simile ma lega un'altra proteina (FKBP-12) che appartiene alla stessa famiglia della ciclofillina, formando un complesso che interagisce con la calcineurina inibendone l'attività. La mancata fosforilazione del fattore NFAT inibisce la trascrizione di alcune citochine in particolare IL-2 che è fondamentale per il differenziamento dei linfociti T [Smith SL, 2002] [Reynolds NJ, 2002].

1.7.5.6. *Inibitori del ciclo cellulare*

La rapamicina è una molecola con una struttura simile al tacrolimus che formando un complesso con la proteina FKBP12, inibisce l'attività chinasi di mTOR inducendo una defosforilazione dei fattori di inizio della traduzione causando un blocco della progressione del ciclo cellulare [Reynolds NJ, 2002] [Oshiro N, 2004]. Il farmaco ha attività sia sui linfociti T, bloccandone il ciclo cellulare tra fase G1 e fase S, che sui linfociti B interferendo con alcune proteine coinvolte nella trasmissione del segnale.

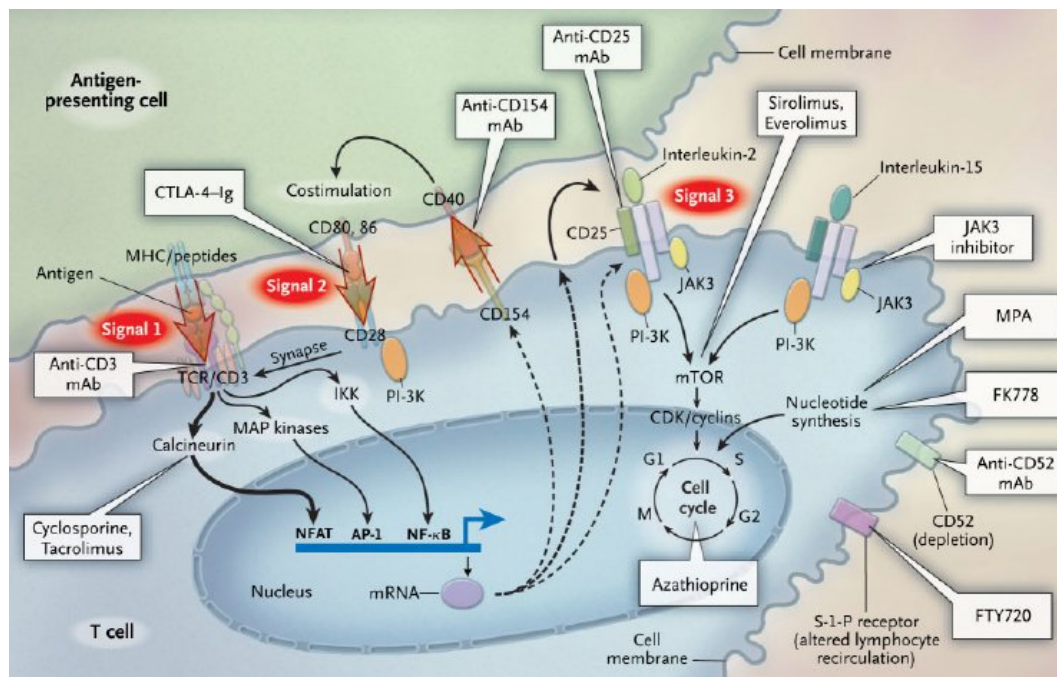


Figura 5 Farmaci immunosoppressori e loro siti di azione [Halloran PF, 2004]

Recenti studi hanno valutato la correlazione tra terapia immunosoppressiva e stress ossidativo misurando alcuni markers plasmatici di ossidazione. È emerso che la terapia immunosoppressiva aumenta i livelli plasmatici di MDA e in particolare la ciclosporina è correlata ad una aumentata perossidazione lipidica. Tuttavia i dati sono contrastanti poiché sembra che i valori di MDA siano aumentati in un gruppo di pazienti trattati con CsA ed MMF e siano invece diminuiti in un gruppo di pazienti trattati con MMF, tacrolimus e steroidi [Perrea DN 2006].

1.7.5.7. Trapianto e stress ossidativo

Alla luce di quanto descritto, si può ipotizzare una ripercussione nel complesso sistema dello stress ossidativo. In realtà in letteratura gli studi che hanno messo in correlazione il trapianto renale con lo stress ossidativo e più in particolare con il danno ossidativo del DNA, non sono numerosi. La maggior parte valuta parametri plasmatici che sono indice di ossidazione o enzimi che fanno parte dei sistemi antiossidanti. Anche se i dati sono in parte discordanti, il dato più frequente è un aumento dell'ossidazione nei pazienti trapiantati rispetto a soggetti sani ottenuto valutando elevati valori plasmatici di MDA. Gli stessi studi hanno valutato la capacità antiossidante del plasma misurando i livelli di GPx, SOD, Catalasi, ma in questo caso si osservano maggiori discrepanze, infatti alcuni evidenziano un aumento dello stato antiossidante [Minz M, 2006], altri mostrano livelli invariati o ridotti [Kim YH, 2000] [Moreno JM, 2005].

Accanto all'aumento dello stato ossidativo è stato dimostrato un aumento dei livelli plasmatici di citochine infiammatorie IL-6 e TNF- α confermando la stretta relazione tra infiammazione e ossidazione [Cueto-Manzano AM, 2005].

Tra gli studi condotti sul danno al DNA, uno è stato eseguito su biopsie renali di pazienti con diagnosi di rigetto acuto o cronico e ha evidenziato valori elevati di 8-OHdG e un'elevata frammentazione del DNA in cellule tubulari prossimali. Sembra anche che il tipo di terapia somministrata influisca sul danno tubulare, in particolare la ciclosporina aumenta l'apoptosi di cellule

mononucleate up-regolando l'espressione di Fas-L, l'MMF invece mostra proprietà anti-apoptotiche in cellule renali [Matsumoto S, 2006] [Ott U, 2007].

Infine il gruppo di Carpio et al. ha valutato l'apoptosi di linfociti di sangue periferico entro i primi 5 anni dopo trapianto renale. Mediante tecniche citofluorimetriche si è osservata una riduzione nella percentuale di linfociti apoptotici con l'aumentare del tempo intercorso dal trapianto. Modificazioni dell'espressione di Fas-L si verificano anche in base alla terapia somministrata [Carpio VN, 2006].

2. OBIETTIVO E DESCRIZIONE DELLO STUDIO

2.1. Obiettivo

L'obiettivo principale dello studio è la valutazione dell'entità dell'ossidazione e dell'apoptosi nel decorso clinico post trapianto a breve termine attraverso l'analisi della frammentazione del DNA e dei livelli plasmatici di molecole connesse con tali processi.

Tale finalità è stata raggiunta mediante l'utilizzo della metodica denominata "Comet Assay" in grado di fornire elementi chiarificatori nella valutazione dell'apoptosi e del danno ossidativo al DNA. La metodica Comet sfrutta la corsa elettroforetica di cellule che subiscono solo il processo di lisi cellulare e questo consente di stimare il grado di salute delle cellule, mentre, mediante trattamento delle cellule con l'enzima FPG, è possibile quantificare il danno ossidativo al DNA.

Ulteriore conferma alle variazioni osservate è stata cercata mediante l'analisi di molecole coinvolte nei processi ossidativi; sono state scelte molecole di cui in letteratura è nota una correlazione con insufficienza renale cronica e trattamento dialitico. Sono state analizzate le molecole, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ e TNF- α , mediante Serachlight® Custom Human 7-Plex Array (©Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, USA) allestito su misura per un'analisi simultanea.

2.2. Razionale dello studio

Lo studio è costituito da 3 fasi: una prima fase di analisi della letteratura, una fase di acquisizione della metodica e raccolta dei campioni e una fase di esecuzione degli esperimenti.

Lo studio è partito dall'analisi della letteratura per individuare quali fossero gli elementi caratteristici dello stress ossidativo. Sono emersi aspetti molto diversi tra loro che prendono in considerazione le singole specie radicali ossidanti attraverso misurazioni quantitative, per passare all'analisi qualitativa

degli enzimi coinvolti nella produzione di tali specie, fino alla valutazione di molecole che risentono del danno ossidativo. In particolare sono stati evidenziati studi che hanno tentato di quantificare i ROS attraverso la misurazione della chemiluminescenza basale sul sangue. Gli studi effettuati su enzimi produttori di specie radicali hanno valutato l'attività enzimatica in vitro di NADPH ossidasi, xantina ossidasi, NOS ed altri enzimi produttori di specie radicali, in alcuni casi è stata quantificata l'espressione genica o la quantità di proteina prodotta. Tra le molecole che risentono del danno ossidativo si evidenziano studi che valutano i livelli plasmatici dell'ossidazione delle LDL, i valori di MDA o dei prodotti di ossidazione delle proteine (AOPP). In alcuni casi è stata anche valutata l'ossidazione del DNA mediante misurazione dei livelli di 8-OHdG.

Come è già stato descritto precedentemente, le specie radicali sono molecole altamente reattive che hanno un'emivita molto breve, la loro quantificazione risulta perciò alquanto difficoltosa e spesso soggetta ad errori. Allo stesso modo, lo studio delle reazioni enzimatiche o di molecole intermedie nei processi ossidativi è altrettanto problematica poiché i fattori esterni, riferiti sia alla conservazione sia al contesto dell'esperimento, possono modificarne l'integrità. Per questi motivi, nel presente studio si è cercato di misurare l'effetto, piuttosto che la causa di ossidazione individuando una forma di danno che fosse permanente o almeno non transitoria, che non fosse eccessivamente influenzata dall'ambiente sperimentale e che fosse piuttosto stabile e non influenzata dallo stato momentaneo del paziente. L'elemento che meglio rappresenta questa condizione è la valutazione del danno ossidativo del DNA.

Per l'analisi dell'ossidazione del DNA è stata scelta la metodica "Comet Assay" che da alcuni anni viene utilizzata nello studio del danno del DNA in contesti molto diversi. Questa tecnica presenta numerosi vantaggi che ne promuovono la scelta, primi tra tutti la grande affidabilità dei risultati ottenuti e l'alta sensibilità che permette di evidenziare anche piccole differenze di ossidazione tra campioni. L'esecuzione degli esperimenti richiede una grande precisione per evitare che i risultati siano influenzati dalle differenze che caratterizzano ogni singolo esperimento. Occorre quindi ottimizzare

accuratamente le condizioni dell'esperimento per minimizzare gli errori che si commettono nella preparazione dei tamponi e nell'applicazione delle procedure. Infine, bisogna considerare che la metodica non si avvale di strumenti specifici, ma può essere allestita in ogni laboratorio opportunamente attrezzato.

Al contempo, oltre al danno ossidativo del DNA sono stati valutati i valori di numerose citochine plasmatiche che entrano con uno specifico ruolo nei processi ossidativi. Per queste misurazioni è stata utilizzata la metodica Serachlight® Custom Human 7-Plex Array che consente di misurare contemporaneamente 7 differenti citochine. La misurazione simultanea delle diverse molecole, a partire dallo stesso campione, permette di ridurre gli errori che si commettono normalmente in ogni esperimento consentendo una più corretta comparazione tra le citochine.

2.3. Disegno dello studio

L'assunto finale che è stato preso in considerazione pone in confronto la condizione di dializzato, corrispondente alla fase pre-trapianto (T1), con i successivi tempi dopo trapianto, in uno studio di tipo caso – controllo di se stesso, in cui le variabili principali considerate sono costituite dall'ossidazione e dalla frammentazione del DNA valutate attraverso Comet Assay ed espresse come percentuale di DNA frammentato.

Conferma dei dati di ossidazione è stata cercata attraverso valutazione di variabili accessorie considerando molecole plasmatiche, e nello specifico alcune citochine, non direttamente responsabili del danno ossidativo, ma ad esso correlate.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Pazienti

Nello studio sono stati inclusi 13 pazienti che hanno ricevuto un trapianto di rene presso l'U.O. di Nefrologia, Dialisi e Trapianto del Policlinico Universitario S. Orsola di Bologna. È stata considerata la presenza di un follow-up di almeno 6 mesi.

Le caratteristiche demografiche e cliniche della popolazione in studio sono riportate nella Tabella 1.

Per ogni paziente sono stati raccolti dei campioni di sangue intero ai seguenti tempi: T1, T2, T3, T4 definiti nella seguente tabella.

T1	→	Pre-Trapianto
T2	→	2 Giorni Post-Trapianto
T3	→	1 Mese Post-Trapianto
T4	→	6 Mesi Post-Trapianto

Per confrontare i valori di ossidazione e frammentazione dei pazienti trapiantati con soggetti sani, nello studio è stato incluso un gruppo costituito da 10 volontari sani.

Tutti i campioni di sangue sono stati utilizzati per l'estrazione e lo stoccaggio dei linfociti e per lo stoccaggio del plasma.

Per ogni paziente sono stati valutati i seguenti parametri ai diversi tempi: Creatinina plasmatica, Albuminemia, Emoglobina sierica, Pressione Arteriosa Sistolica (PAS), Pressione Arteriosa Diastolica (PAD), Frammentazione del DNA, Ossidazione del DNA, valori plasmatici di IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ e TNF- α .

Età del ricevente (anni)	55,69 ±12,66
Sesso	M: 9; F: 4
Età dialitica (anni)	5,69 ± 2,21
Tecnica dialitica	HD: 12; PD: 1
BMI	23,37 ± 4,16
Fumo pre-Tx	2/13
Nefropatia di base	
– Glomerulonefrile sclerosante focale	1/13
– Glomerulonefrite membranosa	1/13
– Malattia di Berger	2/13
– Malattia policistica	1/13
– Nefroangiosclerosi ipertensiva	2/13
– GNC	1/13
– Nefropatia tubulo interstiziale	2/13
– ESRD	3/13
Febbre Post-Tx	4/13
Infezioni	1/13
Rigetti Acuti	1/13
Compatibilità HLA-A	
Compatibilità HLA-B	
Compatibilità HLA-DR	
EGF	9/13
DGF	4/13
Terapia immunosoppressiva	
– St + CsA	3
– St + MMF + TAC	5
– St + TAC + AEB	1
– St + TAC	3
– MMF + TAC	1

Tabella 1 Descrizione demografica del campione

3.2. Estrazione e congelamento di linfociti

Per ogni campione è stata eseguita l'estrazione di linfociti da campioni di sangue periferico per gradiente di centrifugazione con *Ficoll-Paque PLUS* (*GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden*).

Il protocollo prevede l'utilizzo di circa 4 ml di sangue intero diluiti con 3 ml di PBS e stratificati al di sopra di 3 ml di *Ficoll-Paque PLUS* (*GE Healthcare Bio-Sciences*) contenuti in una provetta *Falcon* (*BD Biosciences, San Jose, CA, USA*) da 15 ml. Le provette così preparate vengono centrifugate alla temperatura di 4°C per 20 minuti alla velocità di 600 x g . Dopo la centrifugazione viene recuperato l'anello di linfociti ed effettuato un lavaggio con 10 ml di PBS a 4°C per 5 minuti alla velocità di 600 x g. Il pellet di linfociti viene risospeso in una soluzione di congelamento in modo da avere una concentrazione di 1.000.000 cellule per ml di soluzione. La soluzione di congelamento è costituita da terreno di coltura *RPMI* (*BioWhittaker/Cambrex, Europe*) con 10 % di *DMSO* (*Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA*) e 10% di *FCS* (*PAA Laboratories GmbH, Austria, Europe*). Per ogni campione sono state preparate alcune aliquote di linfociti da 1 ml che sono state congelate a -80°C in seguito ad un abbassamento graduale della temperatura di 1°C al minuto.

3.3. Valutazione del danno ossidativo ad DNA Comet Assay

Il Comet Assay o gel elettroforesi a singola cellula (SCGE) è una metodica che permette di valutare rotture di DNA a doppio o singolo filamento di qualsiasi tipo di cellula eucariotica sfruttando la capacità del DNA di migrare se immerso in un campo elettrico. Questa tecnica semplice, sensibile e piuttosto economica, da diversi anni viene applicata a diverse aree di studio, soprattutto per effettuare test di genotossicità, biomonitoraggio e studio dei sistemi di riparazione del DNA [Rojas E, 1999] [Collins A, 2004]. La combinazione del Comet Assay standard con enzimi che riconoscono nucleotidi ossidati e tagliano lo scheletro di DNA, ha reso questa tecnica un valido mezzo per lo studio del danno ossidativo del DNA. La metodica prevede l'utilizzo di cellule che vengono incluse in agarosio e poste su un vetrino per essere trattate con un buffer che

elimina tutte le componenti cellulari all'infuori del DNA. Il DNA così ottenuto viene sottoposto al trattamento con un enzima che, introducendo dei tagli in corrispondenza di nucleotidi ossidati, ne evidenzia la presenza. I vetrini vengono successivamente immersi in una soluzione tampone per eseguire la corsa elettroforetica in condizioni alcaline in modo da denaturare il DNA e consentire la migrazione dei frammenti ottenuti da rotture a singolo filamento. Dopo la corsa elettroforetica il DNA viene rinaturato e colorato con coloranti fluorescenti per l'analisi delle immagini al microscopio a fluorescenza. Per ogni cellula si forma un'immagine a forma di cometa di cui, la testa è costituita dal DNA integro e la coda da frammenti di DNA di varia lunghezza che hanno migrato lontano dal nucleo.

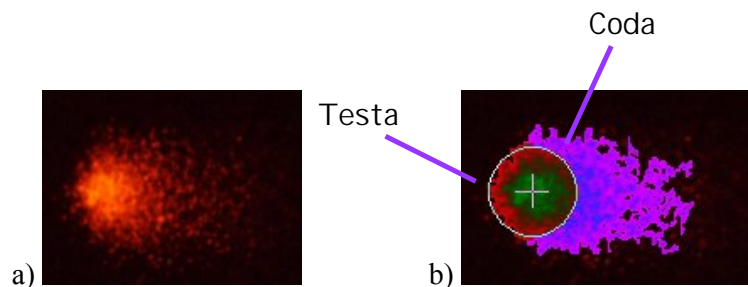


Figura 6 a) Immagine al microscopio a fluorescenza di una cellula ossidata
 b) Immagine della stessa cellula (a) analizzata al computer

Le immagini vengono successivamente analizzate mediante un programma che identifica e delimita l'area che costituisce la testa e quella che costituisce la coda. Per entrambe le aree il programma restituisce dei valori numerici che rappresentano le dimensioni e l'intensità di fluorescenza in termini percentuali. Il danno al DNA viene espresso come percentuale di fluorescenza nella coda (% tailDNA).

La figura 7 mostra le immagini di cellule con un diverso grado di frammentazione. Cellule sane avranno un DNA integro quindi l'immagine che ne deriva sarà priva di coda (a). Cellule molto danneggiate avranno DNA completamente frammentato, l'immagine che ne deriva sarà priva di nucleo (b, *cometa fantasma*). Tutte le cellule con un grado di frammentazione intermedio

avranno un'immagine in cui sono presenti testa e coda con dimensioni diverse a seconda del grado di danneggiamento. (c). La lunghezza della coda dipende dalle dimensioni dei frammenti di DNA, più sono piccoli più migrano lontano.

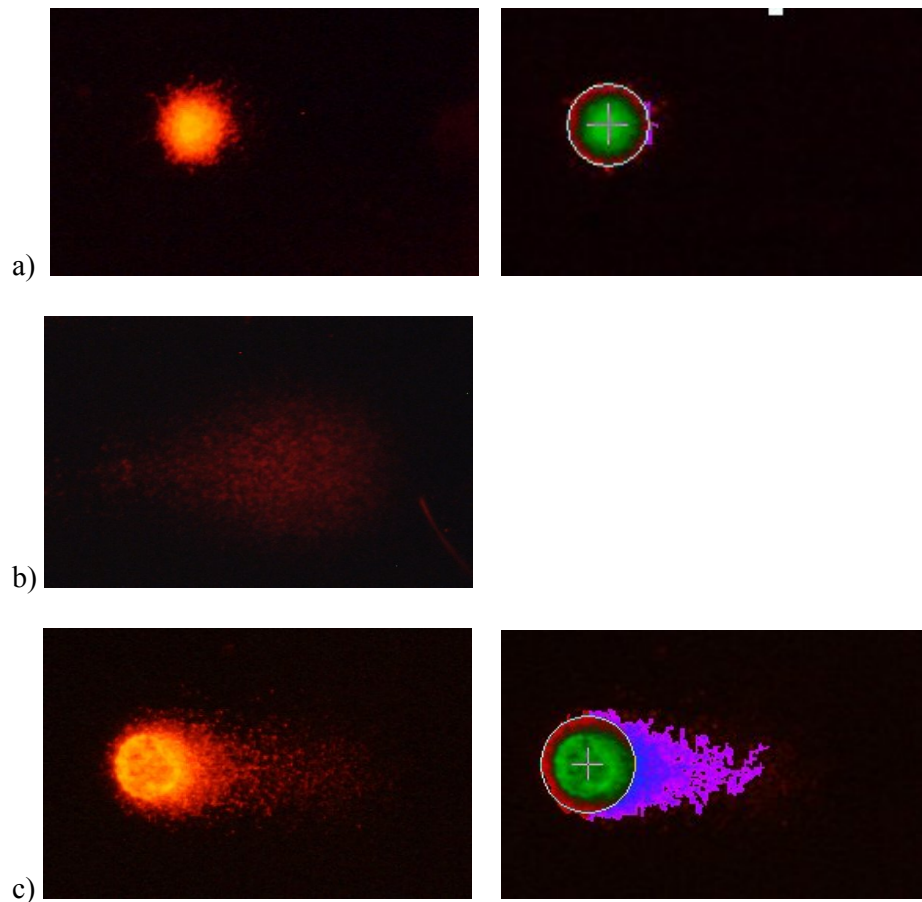


Figura 7 Immagini al microscopio a fluorescenza di cellule con differenti gradi di frammentazione

Per valutare il danno ossidativo al DNA, per ogni campione di cellule vengono preparati due vetrini che seguono lo stesso procedimento di preparazione all'infuori di un unico punto in cui un vetrino è trattato con l'enzima che riconosce le basi ossidate mentre l'altro è trattato solo con una soluzione tampone. I valori di ossidazione si ricavano sottraendo la % tailDNA del vetrino non trattato con l'enzima (che rappresenta la frammentazione di base del DNA) dalla % tailDNA del vetrino trattato con l'enzima.

Nel caso dello studio presentato, l'enzima utilizzato è la formammido pirimidina DNA glicosilasi (*FPG, Sigma-Aldrich Co.*) che è normalmente presente nelle cellule ed è utilizzato per riparare il DNA ossidato riconoscendo la 8-OHdG e tagliando il filamento di DNA.

3.3.1. Protocollo Comet Assay

Per eseguire il Comet Assay sono stati utilizzati dei vetrini precedentemente trattati con una soluzione di silano/acetone (3,2 % 8 ml in 242 ml) per favorire l'adesione dei successivi strati di agarosio. Il primo strato è costituito di una soluzione di agarosio normal melting (*Agarose Electrophoresis Grade, Invitrogen™ life technologies, Carlsbad, USA*) 1% preparata con PBS e lasciata asciugare all'aria.

Successivamente viene preparata una soluzione di Agarosio Low Melting (*L.M.P. Agarose, Invitrogen™ life technologies*) 0,7% in PBS mantenuta a 37°C per l'inclusione delle cellule. Le aliquote di linfociti vengono scongelate in un bagnetto termico a 37°C, lavate per 2 volte in PBS centrifugando a 4°C per 5 minuti alla velocità di 700 x g. Il pellet cellulare viene risospeso in 500 µl di *LMP Agarose (Invitrogen™ life technologies)* 0,7 % e disposto sui vetrini in modo da formare uno strato sottile. Dopo aver tenuto i vetrini a 4°C per permettere all'agarosio di solidificare, lo strato di cellule viene ricoperto da un altro strato *LMP Agarose (Invitrogen™ life technologies)* 0,7 %. I vetrini vengono poi immersi in una soluzione di lisi costituita da sali e detergenti per la degradazione di tutte le membrane cellulari. In seguito al trattamento di lisi sui vetrini rimane solo il DNA che, dopo alcuni lavaggi, viene trattato con enzima *FPG (Sigma-Aldrich Co.)* o tampone per evidenziare le basi ossidate. Tutti i vetrini vengono poi immersi in una soluzione alcalina a 4°C per denaturare il DNA e vengono sottoposti ad un campo elettrico per permettere la corsa elettroforetica dei frammenti di DNA. Alla fine dell'elettroforesi la soluzione di corsa viene sostituita con una soluzione a pH neutro per consentire al DNA di rinaturare. I vetrini vengono poi trattati con etanolo 100% per disidratarli e conservarli fino al momento dell'analisi. L'analisi dei vetrini viene fatta al

microscopio a fluorescenza (*Leica Microsystems S.p.A, Milano, Italy*) dopo colorazione con una soluzione di etidio bromuro 10 µg/ml utilizzando una fotocamera *Nikon (Nikon Instruments S.p.a., Firenze, Italy)* per acquisire 9-10 fotografie digitali per ogni vetrino. Dall'insieme delle fotografie di ogni vetrino vengono analizzate le immagini di almeno 50 cellule con l'aiuto del programma CASP calcolando successivamente il valore medio di tutte le immagini utilizzate per ogni vetrino.

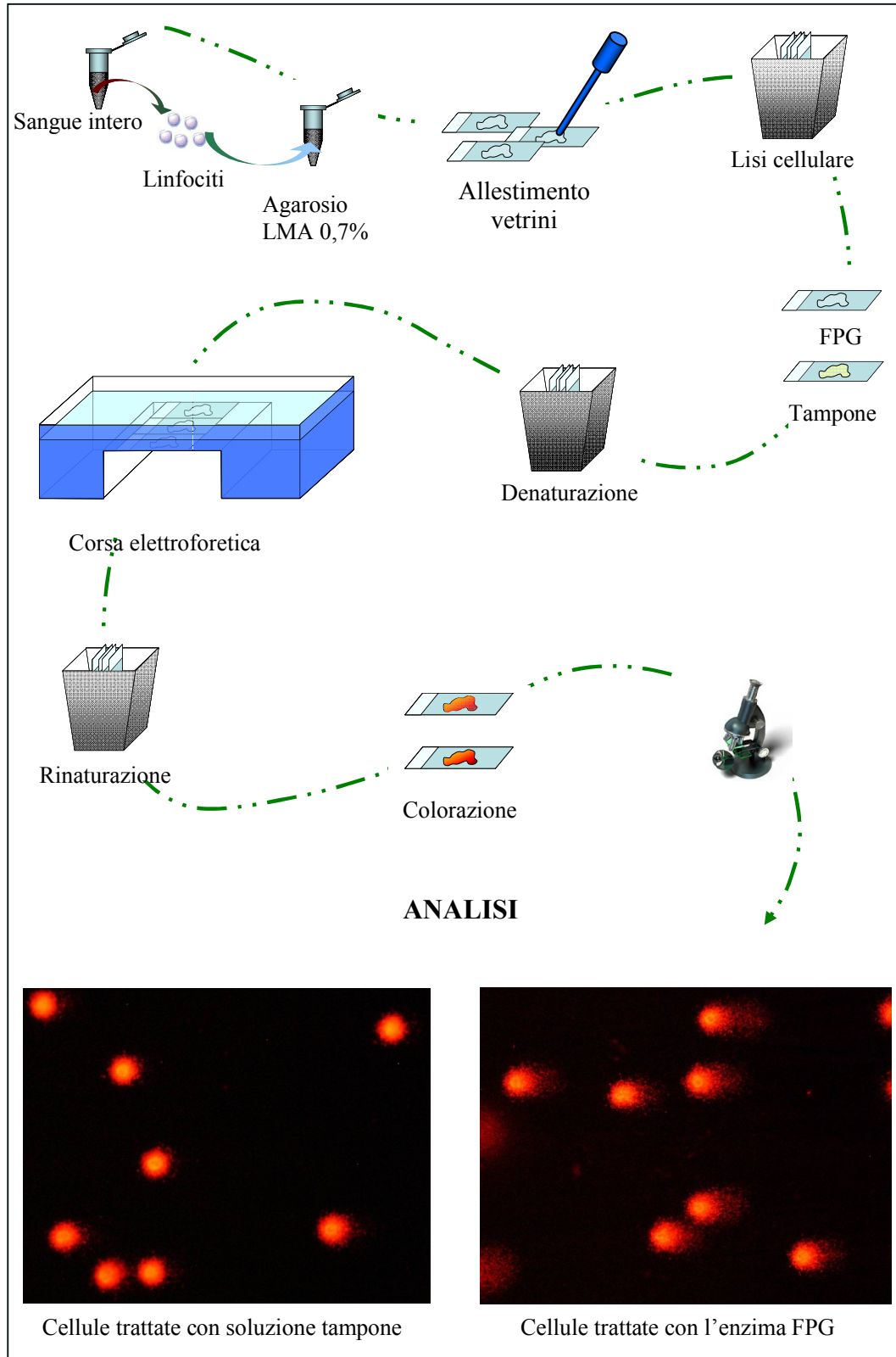


Figura 8 Descrizione schematica di Comet Assay

3.4. Dosaggio molecolare di citochine Searchlight 7-Plex Array

La metodica *Searchlight® Custom Human 7-Plex Array* (©Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, USA) è un multiplex sandwich ELISA per la misurazione quantitativa di 7 proteine target presenti nel siero, plasma o sovrinatante di colture cellulari. La metodica utilizza delle piastre da 96 pozzetti in cui ciascun pozzetto è pre-sensibilizzato con anticorpi specifici per le diverse proteine da analizzare. Gli anticorpi vengono fissati sul fondo dei pozzetti in spot separati in modo da poter localizzare e rilevare un segnale luminoso specifico per ogni tipo di proteina analizzata. La rilevazione è fatta mediante una videocamera collegata ad un software che è in grado di trasformare il segnale luminoso in una concentrazione, consentendo di discriminare anche piccole variazioni di intensità luminosa e quindi di concentrazione.

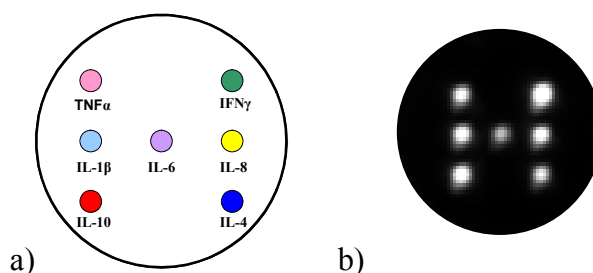


Figura 9 a) Schema del pozzetto di Searchlight® Custom Human 7-Plex Array
b) Immagine di un pozzetto durante l'acquisizione dei dati

La concentrazione viene misurata paragonando l'intensità luminosa dei campioni con quella ottenuta da pozzetti incubati con concentrazioni note di proteine target diluite in modo seriale.

La metodica prevede lo scongelamento a 4°C overnight dei campioni di plasma che vengono poi diluiti e aggiunti ai vari pozzetti per permettere agli anticorpi di captare le proteine target. Dopo alcuni lavaggi per eliminare le proteine che non sono state legate, vengono aggiunti gli anticorpi biotinilati che legano le proteine target riconoscendo un altro epitopo.

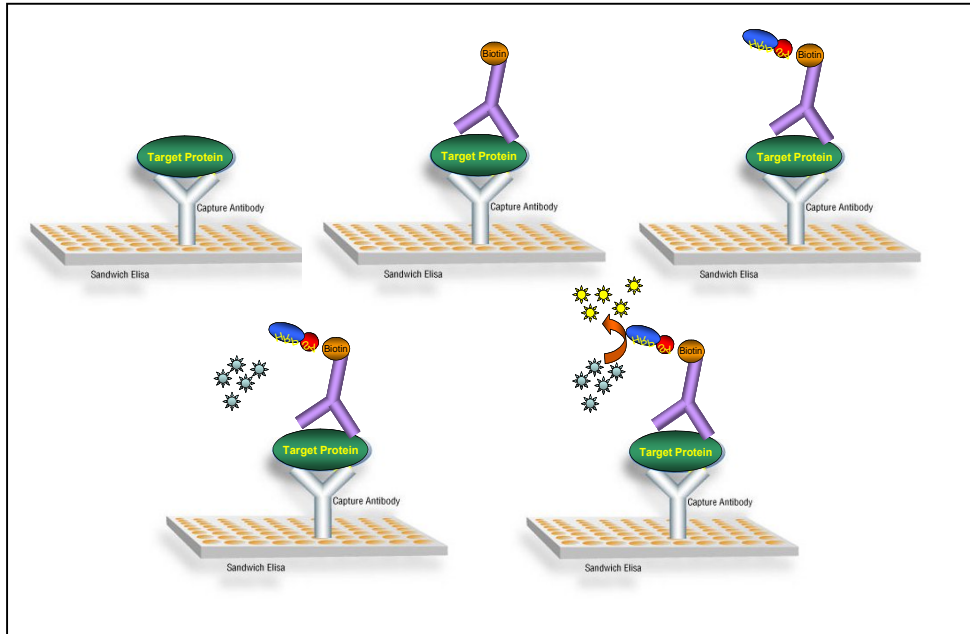


Figura 10 Descrizione schematica della metodica Serachlight

In seguito ad alcuni lavaggi, i pozzetti vengono incubati con la streptadivina legata all'enzima horseradish perossidasi (SA-HRP) e successivamente viene aggiunto un substrato che, dopo interazione con l'enzima HRP, emette un segnale luminescente.

3.5. Analisi statistica

Per verificare se nel tempo si verificano differenze significative nei valori di Creatininemia, Albuminemia, Emoglobina, PAS e PAD è stata effettuata una ANOVA a misure ripetute seguita da un'analisi post hoc con il Test di Tukey se l'ANOVA risultava significativamente significativa. Lo stesso tipo di analisi è stata impostata per l'analisi della varianza di frammentazione ed ossidazione del DNA.

Sono stati confrontati, inoltre, i valori di ossidazione e frammentazione ai vari tempi, con i valori medi dei controlli con il t-test di Student per normalità distributiva e con Wilcoxon Sum Rank Test se non c'è normalità distributiva.

Per l'analisi dei valori plasmatici delle citochine è stata utilizzata inizialmente l'ANOVA a misure ripetute per evidenziare le differenze nel tempo. Successivamente l'analisi di correlazione di Spearman ha permesso di evidenziare delle correlazioni tra le diverse citochine ai vari tempi, tra le citochine e i parametri biochimici e tra le citochine e i valori di ossidazione e frammentazione.

Per ogni test effettuato sono stati considerati statisticamente significativi valori di $p < 0,05$.

4. RISULTATI

4.1. Analisi parametri biochimici ed ematologici

I grafici 1, 2, 3, 4, mostrano l'andamento dei valori di alcuni parametri biochimici, ematologici e clinici ai diversi intervalli di tempo.

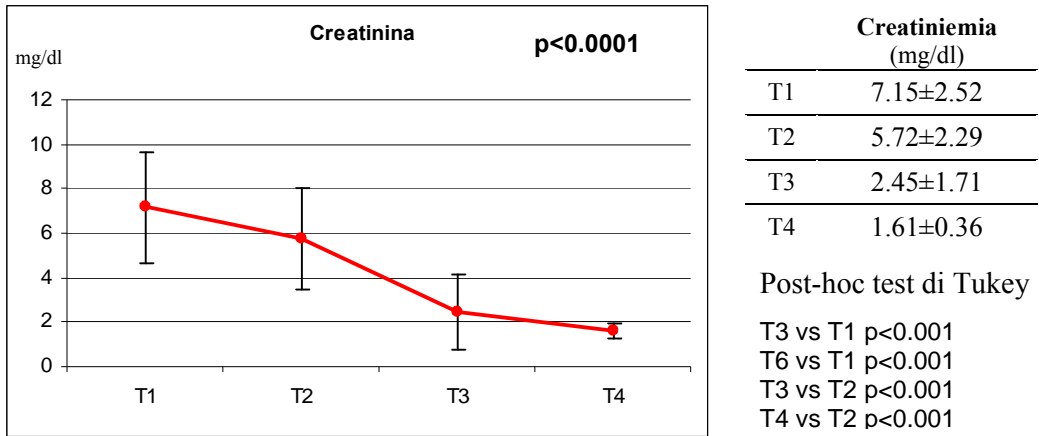


Grafico 1 Andamento della creatininemia nel tempo

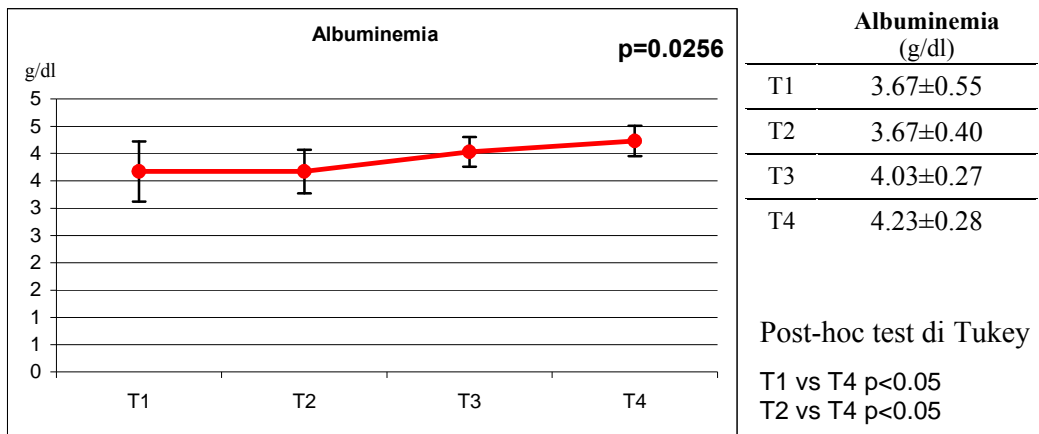
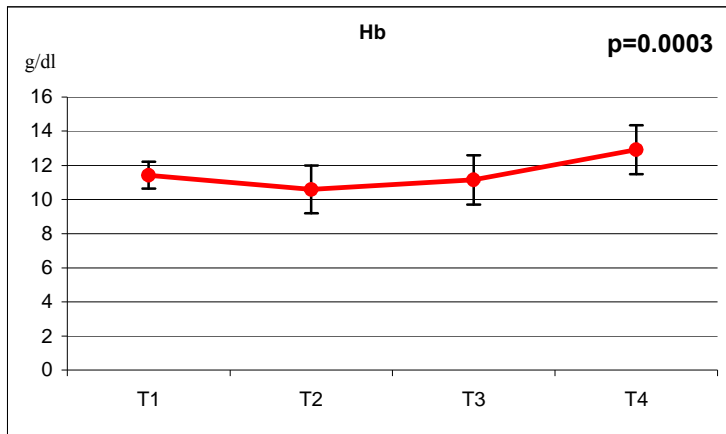


Grafico 2 Andamento della albumina plasmatica nel tempo



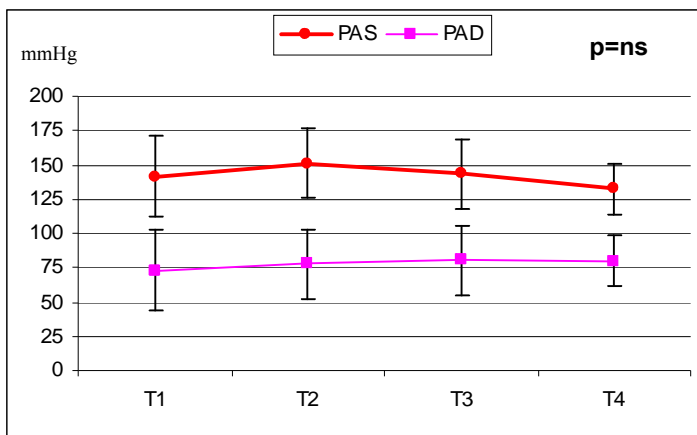
Hb (g/dl)	
T1	11.42±0.78
T2	10.59±1.40
T3	11.15±1.45
T4	12.91±1.43

Post-hoc test di Tukey

T2 vs T4 $p < 0.001$

T3 vs T4 $p < 0.05$

Grafico 3 Andamento della emoglobina sierica nel tempo



PAS (mmHg)	
T1	141.55±29.84
T2	150.91±25.38
T3	143.18±25.67
T4	132.27±18.08

PAD (mmHg)	
T1	73.08±14.51
T2	77.83±9.58
T3	80.14±11.07
T4	80.00±5.64

Grafico 4 Andamento della pressione arteriosa sistolica e diastolica nel tempo

Come si può osservare dai grafici, l'analisi della varianza dei valori plasmatici di Creatinina, Albumina ed Emoglobina, mostra delle differenze statisticamente significative nel decorso post-trapianto dei pazienti trapiantati. In particolari la concentrazione di creatinina plasmatica si riduce progressivamente entro 6 mesi dal trapianto, mentre i valori di albumina ed emoglobina aumentano.

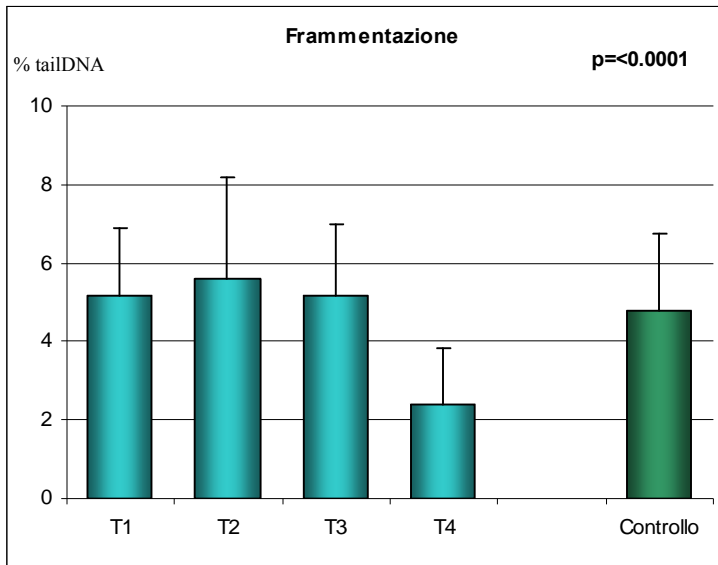
Le analisi post-hoc effettuate con test di Tukey mostrano differenze statisticamente significative nella concentrazione di:

creatinina ai tempi T1 vs T3, T1 vs T4, T2 vs T3, T2 vs T4;

albumina ai tempi T1 vs T4; T2 vs T4;

emoglobina ai tempi T2 vs T4, T3 vs T4;

4.2. Analisi frammentazione ed ossidazione del DNA

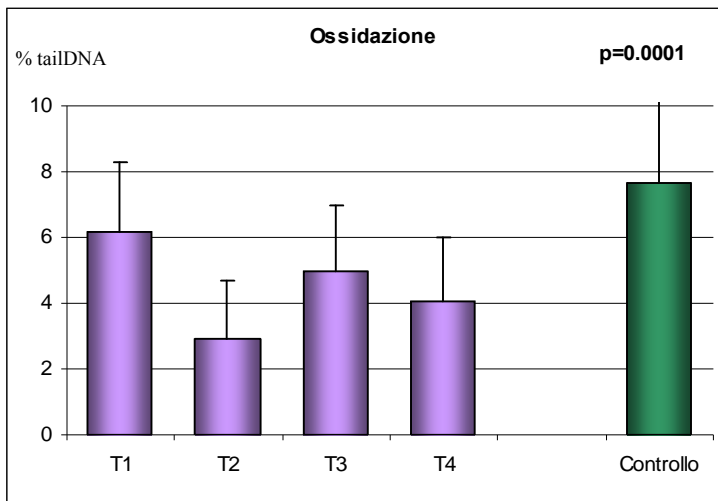


Frammentazione (% tailDNA)	
T1	5.16±1.74
T2	5.60±2.56
T3	5.19±1.78
T4	2.40±1.43
C	4.77±1.20

Post-hoc test di Tukey

T4 vs T1 p<0.01
 T4 vs T2 p<0.01
 T4 vs T3 p<0.01

Grafico 5 Distribuzione della frammentazione del DNA nel tempo



Ossidazione (% tailDNA)	
T1	4.47±0.55
T2	3.67±0.40
T3	4.03±0.27
T4	4.23±0.28
C	7.66±3.46

Post-hoc test di Tukey

T2 vs T1 p<0.001
 T4 vs T1 p<0.05

Grafico 6 Distribuzione dell'ossidazione del DNA nel tempo

L'analisi della varianza di frammentazione e ossidazione del DNA mostra una riduzione statisticamente significativa di entrambi i parametri entro 6 mesi dal trapianto. In particolare le analisi post-hoc evidenziano che:

- i valori di frammentazione del DNA a 6 mesi dal trapianto sono inferiori ai valori di pre-trapianto, 2 giorni post-trapianto e 1 mese post-trapianto in maniera statisticamente significativa;
- i valori di ossidazione del DNA dopo due giorni e dopo 6 mesi dal trapianto sono significativamente inferiori dei valori di pre-trapianto.

Frammentazione							
	T1 vs Controllo	T2 vs Controllo	T3 vs Controllo	T4 vs Controllo			
T1	5.72±2.61	T2	5.60±2.56	T3	5.47±1.98	T4	2.78±1.93
C	4.77±1.20	C	4.77±1.20	C	4.77±1.20	C	4.77±1.20
	p=ns		p=ns		p=ns		0.0160

Tabella 2 t-test di Student per confrontare i valori di frammentazione del DNA tra controlli e trapianti ai vari tempi

Ossidazione							
	T1 vs Controllo	T2 vs Controllo	T3 vs Controllo	T4 vs Controllo			
T1	6.18±2.08	T2	2.89±1.80	T3	4.97±1.99	T4	4.03±1.99
C	7.66±3.46	C	7.66±3.46	C	7.66±3.46	C	7.66±3.46
	p=ns		0.0021		0.0561		0.0330

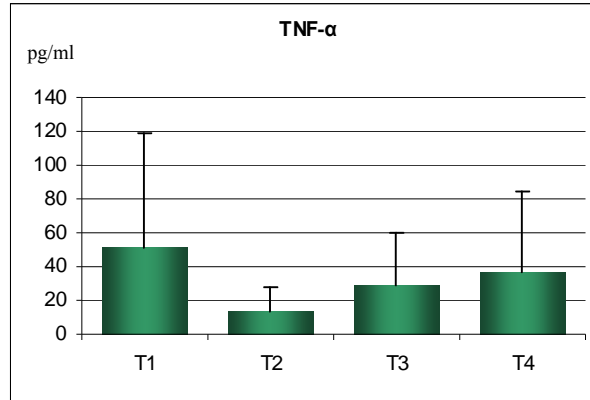
Tabella 3 t-test di Student per confrontare i valori di ossidazione del DNA tra controlli e trapianti ai vari tempi

Confrontando inoltre i valori di frammentazione del DNA ai vari tempi con i valori medi dei controlli, si osserva una differenza statisticamente significativa tra i valori a sei mesi dal trapianto e i controlli. Per quanto riguarda i valori di ossidazione del DNA, le differenze significative si osservano tra i controlli e i campioni eseguiti a 2 giorni, 1 mese e 6 mesi dal trapianto.

4.3. Analisi dei valori plasmatici delle citochine

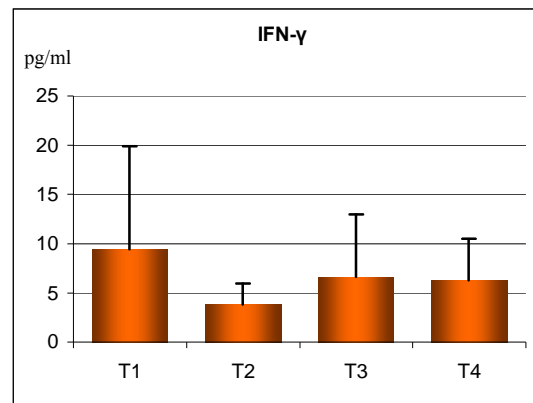
I grafici 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 mostrano la distribuzione ai vari tempi dei livelli plasmatici delle citochine prese in esame.

Grafico 7 Andamento dei valori di TNF- α



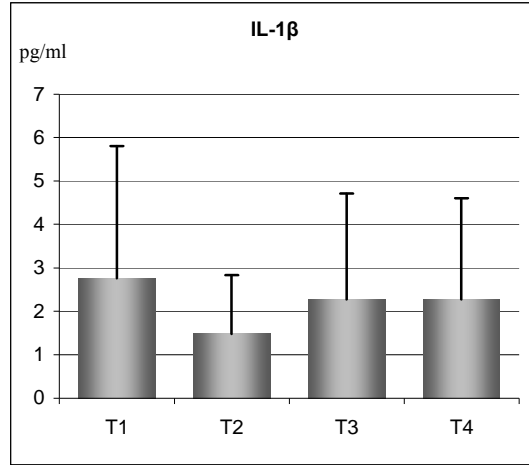
	T1	T2	T3	T4
TNF-α	51.60±67.57	13.80±14.34	29.22±31.24	36.53±47.43

Grafico 8 Andamento dei valori di IFN- γ



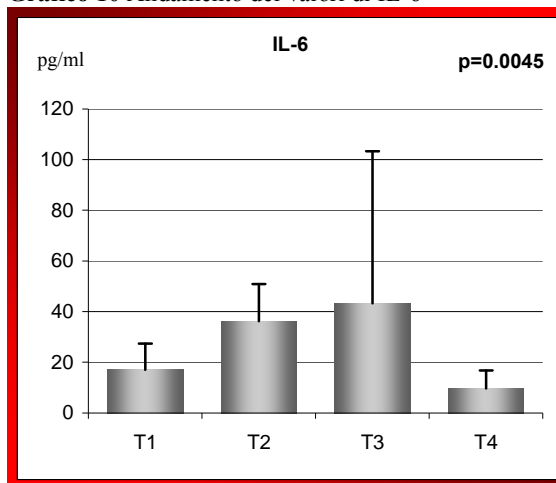
	T1	T2	T3	T4
IFN-γ	9.43±10.46	3.84±2.10	6.60±6.38	6.24±4.23

Grafico 9 Andamento dei valori di IL-1 β



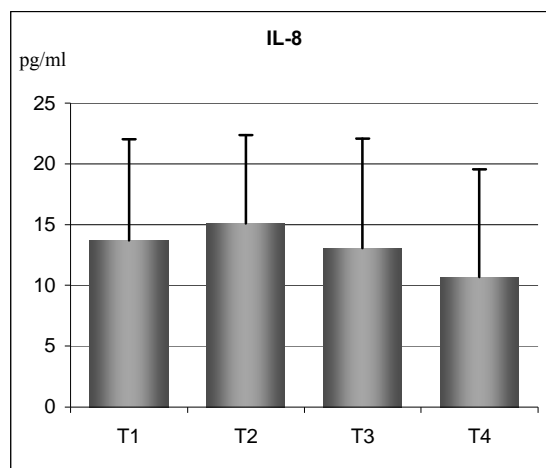
	T1	T2	T3	T4
IL-1β	2.76 \pm 3.05	1.48 \pm 1.35	2.27 \pm 2.44	2.27 \pm 2.34

Grafico 10 Andamento dei valori di IL-6



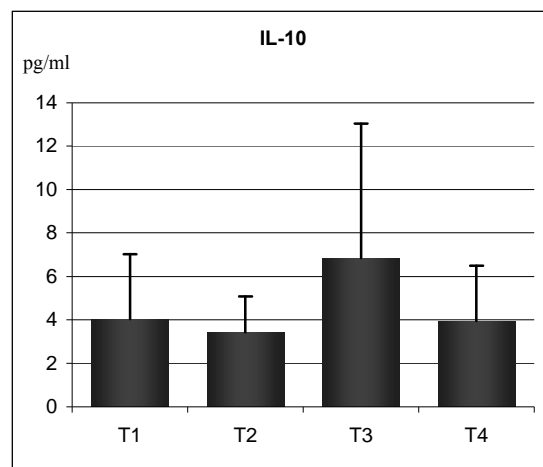
	T1	T2	T3	T4
IL-6	17.03 \pm 10.30	36.21 \pm 14.72	46.32 \pm 60.00	9.61 \pm 7.14

Grafico 11 Andamento dei valori di IL-8



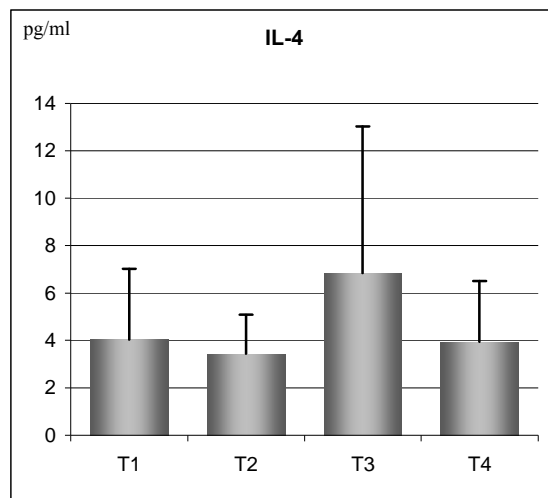
	T1	T2	T3	T4
IL-8	13.71±8.32	15.08±7.30	13.05±9.02	10.69±8.85

Grafico 12 Andamento dei valori di IL-10



	T1	T2	T3	T4
IL-10	4.03±2.99	3.43±1.65	6.844±6.20	3.94±2.56

Grafico 13 Andamento dei valori di IL-4



	T1	T2	T3	T4
IL-4	5.76±7.85	2.46±1.83	4.12±3.59	4.83±5.20

Le differenze osservate per le citochine TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-8, IL-10 e IL-4 non sono statisticamente significative, al contrario, per la citochine IL-6 si osserva una riduzione dei valori plasmatici a 6 mesi dal trapianto con valore di $p = 0,0045$.

4.4. Analisi di correlazione

Di seguito vengono riportate le tabelle utilizzate per le analisi di correlazione di Spearman per valutare le associazioni delle citochine studiate analizzate ai vari tempi

T1

		IL1_T1	IL6_T1	IL4_T1	IL10_T1	IL8_T1	INF_T1	TNF_T1
IL1_T1	Preason C	—	0.65035	0.98861	0.77622	0.72727	0.69930	0.825170
	P values	—	0.0220	<.0001	0.0030	0.0074	0.0114	0.0010
IL6_T1	Preason C	—	—	0.68337	0.50350	0.26573	0.61538	0.475520
	P values	—	—	0.0204	0.0952	0.4038	0.0332	0.1182
IL4_T1	Preason C	—	—	—	0.76993	0.83372	0.71071	0.81094
	P values	—	—	—	0.0056	0.0014	0.0142	0.0025
IL10_T1	Preason C	—	—	—	—	0.78322	0.48951	0.566430.
	P values	—	—	—	—	0.0026	0.1063	0.0548
IL8_T1	Preason C	—	—	—	—	—	0.42657	0.678320.
	P values	—	—	—	—	—	0.1667	0.0153
INF_T1	Preason C	—	—	—	—	—	—	0.84615
	P values	—	—	—	—	—	—	0.0005
TNF_T1	Preason C	—	—	—	—	—	—	—
	P values	—	—	—	—	—	—	—

Tabella 4 Analisi di correlazione di Spearman tra le citochine al tempo T1

T2

		IL1_T2	IL6_T2	IL4_T2	IL10_T2	IL8_T2	INF_T2	TNF_T2
IL1_T2	Preason C	—	0.11888	0.48402	0.47552	-0.07692	0.63636	0.11909
	P values	—	0.7129	0.1314	0.1182	0.8122	0.0261	0.7124
IL6_T2	Preason C	—	—	0.33334	0.26573	0.31469	0.12587	0.11909
	P values	—	—	0.3165	0.4038	0.3191	0.6967	0.7124
IL4_T2	Preason C	—	—	—	0.62101	0.07763	0.71690	0.23288
	P values	—	—	—	0.0414	0.8205	0.0130	0.4907
IL10_T2	Preason C	—	—	—	—	0.14685	0.36364	0.17163
	P values	—	—	—	—	0.6488	0.2453	0.5938
IL8_T2	Preason C	—	—	—	—	—	0.30769	0.48687
	P values	—	—	—	—	—	0.3306	0.1084
INF_T2	Preason C	—	—	—	—	—	—	0.31874
	P values	—	—	—	—	—	—	0.3126
TNF_T2	Preason C	—	—	—	—	—	—	—
	P values	—	—	—	—	—	—	—

Tabella 5 Analisi di correlazione di Spearman tra le citochine al tempo T2

T3

		IL1_T3	IL6_T3	IL4_T3	IL10_T3	IL8_T3	INF_T3	TNF_T3
IL1_T3	Preason C P values	—	-0.04895 0.8799	0.93706 <0.0001	0.22067 0.4907	0.10490 0.7456	0.82517 0.0010	0.83217 0.0008
IL6_T3	Preason C P values	—	—	0.06993 0.8290	0.76357 0.0039	0.51049 0.0899	0.00699 0.9828	0.16783 0.7004
IL4_T3	Preason C P values	—	—	—	0.31173 0.3239	0.13986 0.6646	0.79021 0.0022	0.87413 0.0002
IL10_T3	Preason C P values	—	—	—	—	0.55342 0.0620	0.18214 0.5710	0.49037 0.1055
IL8_T3	Preason C P values	—	—	—	—	—	0.20280 0.5273	0.27972 0.3786
INF_T3	Preason C P values	—	—	—	—	—	—	0.88811 0.0001
TNF_T3	Preason C P values	—	—	—	—	—	—	—

Tabella 6 Analisi di correlazione di Spearman tra le citochine al tempo T.3

T4

		IL1_T4	IL6_T4	IL4_T4	IL10_T4	IL8_T4	INF_T4	TNF_T4
IL1_T4	Preason C P values	—	0.76667 0.0159	0.95499 0.0008	0.74478 0.0213	0.56667 0.1116	0.78333 0.0125	0.91667 0.0005
IL6_T4	Preason C P values	—	—	0.68471 0.0897	0.97909 <0.0001	0.70000 0.0358	0.76667 0.0159	0.66667 0.0499
IL4_T4	Preason C P values	—	—	—	0.68471 0.0897	0.46849 0.2890	0.75679 0.0489	0.95499 0.0008
IL10_T4	Preason C P values	—	—	—	—	0.67783 0.0448	0.81172 0.0079	0.67783 0.0448
IL8_T4	Preason C P values	—	—	—	—	—	0.26667 0.4879	0.25000 0.5165
INF_T4	Preason C P values	—	—	—	—	—	—	0.86667 0.0025
TNF_T4	Preason C P values	—	—	—	—	—	—	—

Tabella 7 Analisi di correlazione di Spearman tra le citochine al tempo T4

Le analisi di correlazione di Spearman hanno evidenziato una strettissima associazione tra le varie citochine pro-infiammatorie analizzate. In particolare la citochina IFN- γ risulta sempre associata alle citochine IL-1 β e IL-4 con coefficienti di correlazione compresi tra 0,6 e 0,9 e valore di $p < 0,05$. Inoltre ai tempi T1, T3, T4 si ripropongono le associazioni TNF- α /IL-1 β , TNF- α /IL-4, TNF- α /IFN- γ e IL-4/IL-1 con valori di $p < 0,05$.

		IL1_T1	IL6_T1	IL4_T1	IL10_T1	IL8_T1	INF_T1	TNF_T1
Alb_T1	Preason C	-0.00483	-0.67828	-0.24672	-0.15426	-0.06391	-0.10522	-0.23941
	P values	0.98888	0.0218	0.4646	0.6506	0.8519	0.7582	0.4783
		IL1_T2	IL6_T2	IL4_T2	IL10_T2	IL8_T2	INF_T2	TNF_T2
Alb_T2	Preason C	-0.23860	-0.24562	-0.14462	-0.51930	0.18597	0.10176	0.51670
	P values	0.4552	0.4416	0.6538	0.0836	0.5628	0.7530	0.0854
		IL1_T3	IL6_T3	IL4_T3	IL10_T3	IL8_T3	INF_T3	TNF_T3
Alb_T3	Preason C	-0.21342	-0.34757	0.19635	-0.40245	0.08537	0.10366	-0.02439
	P values	0.5538	0.3251	0.5628	0.2489	0.8146	0.7757	0.9467
		IL1_T4	IL6_T4	IL4_T4	IL10_T4	IL8_T4	INF_T4	TNF_T4
Alb_T4	Preason C	0.10541	0.63246	0.50000	0.63246	-0.10541	0.31623	0.31623
	P values	0.8946	0.3675	0.6667	0.03675	0.8946	0.6838	0.6838

Tabella 8 Analisi di correlazione di Spearman tra le citochine ai vari tempi e l'albumina sierica

La tabella 8 mostra l'analisi di correlazione di Spearman per valutare l'associazione tra le diverse citochine e i valori di albumina sierica ai vari tempi. Al tempo T1, l'albumina sierica risulta inversamente correlata in maniera statisticamente significativa ai valori di IL-6 con coefficiente di correlazione pari a -0,68 e $p=0,02$.

5. DISCUSSIONE

Il presente studio è stato progettato per cercare di comprendere come il ripristino della funzione renale dopo trapianto, influenzi lo stress ossidativo. Il parametro considerato per questo scopo è il danno ossidativo del DNA valutato mediante Comet Assay, considerandone l'andamento nel tempo da fase pre-trapianto fino a 6 mesi dopo trapianto. Inoltre è stata esaminata la frammentazione del DNA come indice di apoptosi nel medesimo intervallo di tempo.

Nell'analizzare la problematica del trapianto renale bisogna prendere in considerazione gli eventi post-trapianto legati al ripristino della funzione renale e caratterizzati da aspetti immunologici, farmacologici e metabolici che in ugual misura potrebbero interferire con i processi ossidativi e potenzialmente potrebbero fornire una spiegazione per le modificazioni osservate. Inoltre, non si possono escludere anche le complicanze legate al trattamento dialitico sostitutivo pre-trapianto. Infatti, i pazienti in trattamento dialitico, presentano un quadro clinico alterato da vari elementi tra cui l'accumulo di sostanze tossiche che non vengono completamente eliminate dalla dialisi a causa della perdita della funzione emuntoria. La presenza di tali sostanze, accompagnata dal continuo contatto con le membrane dialisi, incide sullo stato infiammatorio contribuendo all'attivazione leucocitaria e piastrinica coagulativa e al rilascio di mediatori citochinici dell'infiammazione. La stretta correlazione tra infiammazione e stress ossidativo, in parte riesce a spiegare gli elevati valori di LDL (*Low Density Lipoprotein*) ossidate ed MDA (*Malondialdeide*) caratteristici dei pazienti dialitici, individuando una condizione generale di aumentata ossidazione.

Il presente studio, pur analizzando un numero di campioni abbastanza limitato, evidenzia che nel decorso clinico post-trapianto migliorano gli indici di ossidazione e apoptosi risultando particolarmente significativa la diminuzione di entrambi i parametri dopo i primi 6 mesi. In particolare i campioni analizzati singolarmente, pur con una variabilità nell'arco del primo mese, tendono a presentare un andamento sostanzialmente stabile, vale a dire che a distanza di 6

mesi, si rileva una diminuzione della frammentazione e dell'ossidazione del DNA con una significatività statistica caratterizzata da una sorprendente uniformità dei dati.

Alcuni studi di letteratura hanno messo in evidenza che farmaci inibitori della calcineurina (Ciclosporina e Tacrolimus) inducono un aumento della produzione di anione superossido in cellule endoteliali [Krötz F, 2007]. Questo dato si potrebbe ripercuotere sui livelli di ossidazione delle macromolecole biologiche come dimostrano gli aumentati livelli di MDA e AOPP (*Advanced Oxidation Protein Products*). Un andamento contrario, secondo alcuni autori, è causato dal trattamento con MMF (*Micofenolato mofetile*) che sembra ridurre i livelli di stress ossidativo intervenendo sulla produzione di anione superossido che si potrebbe tradurre in una riduzione di MDA e AOPP [Krötz F, 2007] [Perrea DN, 2006] [de Cal M, 2008]. Anche il trattamento con gli steroidi potrebbe avere effetti di riduzione dell'ossidazione poiché gli steroidi interferiscono con la stessa via di trasduzione del segnale delle specie radicali [Smith SL, 2002] [Barnes PJ, 1997] [Barnes PJ, 1997] [Rhen T, 1991].

In questo studio, come si evince dalla tabella 1, le associazioni terapeutiche di immunosoppressori utilizzate nei 13 pazienti sono molteplici e non uniformabili in sottogruppi predefiniti, non essendo questo un criterio di inclusione nello studio. Nonostante quindi una difformità degli schemi terapeutici, i parametri principali di ossidazione ed apoptosi si distribuiscono allo stesso modo non consentendo di isolare effetti legati ad ogni singolo farmaco.

I dati a disposizione permettono di valutare altri aspetti che possono essere connessi con le modificazioni riscontrate dopo trapianto. Il miglioramento delle condizioni cliniche osservato nel post-trapianto e valutato attraverso parametri biochimici ed ematologici potrebbe essere coinvolto nel miglioramento dello stress ossidativo. Tra i risultati emersi, infatti, dalla valutazione delle altre variabili statisticamente significativi si può osservare un aumento dell'albumina sierica entro 6 mesi dal trapianto che è correlata ad un migliore stato nutrizionale del paziente [Kalantar-Zadeh K, 2003]. Inoltre, le caratteristiche chimiche dell'albumina, vale a dire la presenza di gruppi -SH, la rendono una importante

difesa antiossidante extracellulare [Himmelfarb J, 2004] [Hu ML, 1993]. Inoltre, l'aumento statisticamente significativo dei valori di emoglobina può incidere sul miglioramento dello stress ossidativo poiché gli eritrociti possono essere anch'essi considerati un efficace sistema antiossidante circolante avendo al loro interno grandi quantità di enzimi antiossidanti (SOD e catalasi) e molecole tampone (GSH, vitamine) [Burak ÇIMEN MY, 2007].

La valutazione dei livelli plasmatici di citochine che, come è stato ampiamente dimostrato in letteratura, sono coinvolte in meccanismi infiammatori [Raj DS, 2005] [Pupim LB, 2004], ha presentato un andamento che permette di confermare i dati relativi ai parametri clinici e di ossidazione. L'analisi statistica della distribuzione dei livelli plasmatici delle citochine mostra un dato particolarmente significativo per quanto riguarda i valori di IL-6 che diminuisce a 6 mesi dopo trapianto. Questo dato trova riscontro in uno studio di letteratura in cui si è osservata una diminuzione di IL-6 e TNF- α a 6 mesi dal trapianto [Cueto-Manzano AM, 2005]. Nel nostro studio l'osservazione dell'andamento dei dati riferiti alle altre citochine evidenzia una riduzione dei valori di tutte le molecole analizzate dopo 6 mesi dal trapianto. Probabilmente la ridotta numerosità del campione non permette di raggiungere la significatività statistica, ma suggerisce che il raggiungimento di una condizione di stabilità clinica dopo 6 mesi dal trapianto migliora lo stato infiammatorio. L'analisi dei grafici delle singole citochine ha fatto emergere, inoltre, delle similitudini nell'andamento dei valori plasmatici indicando una possibile associazione tra le varie molecole ai vari tempi. I test di correlazione di Spearman hanno confermato questa ipotesi rendendo evidenti tali associazioni. In particolare esiste una stretta associazione tra le citochine IFN- γ , IL-1 β , IL-4 e TNF- α che ai tempi T1 e T6 risultano sempre associate con coefficienti di correlazione compresi tra 0,65 e 0,98 ($p < 0,05$). Anche le associazioni tra IL-6 e IL-1 β e IFN- γ assumono risultati statisticamente significativi nel pre-trapianto e dopo 6 mesi dal trapianto confermando una interazione con le altre citochine. I dati di associazione delle varie citochine sono in linea con i dati di letteratura che presentano un'attività sinergica di TNF- α , IL-1 β e IL-4 [Schulak JA, 2004] [Aydin M, 2007] [Lee YW,

2006] [Takeda K, 1997]. La significativa riduzione di IL-6 entro 6 mesi dal trapianto, unita all'andamento dei valori plasmatici delle altre citochine e alle associazioni esistenti tra loro, permette di ipotizzare un miglioramento dello stato infiammatorio dopo trapianto.

Nel complesso l'insieme dei dati analizzati in questo studio descrive una condizione caratteristica che si riscontra dopo trapianto renale. I fattori in gioco sono molteplici e con molta probabilità si condizionano reciprocamente. È stata dimostrata, ad esempio una stretta correlazione tra IL-6 e albumina sierica nei pazienti in dialisi [Pertosa G, 2000] [Kaizu Y, 1998] che, peraltro emerge anche in questo studio. Non è possibile definire quanto pesi ognuno dei fattori considerati, ma sicuramente tutti contribuiscono a modificare lo stress ossidativo dopo trapianto.

6. CONCLUSIONI

Lo studio che è stato presentato ha evidenziato che in pazienti portatori di trapianto renale, a distanza di 6 mesi dal trapianto, migliora lo stato ossidativo ed è ridotta la frammentazione del DNA di cellule mononucleate. Nonostante la non numerosità del campione, i risultati mostrano una uniformità nell'andamento che risulta altamente significativa.

Il trattamento dialitico appare una condizione in cui i processi ossidativi e di apoptosi sono aumentati, ma nel confrontare questi parametri con la popolazione generale i dati sembrano essere sovrapponibili. Questa condizione è già stata evidenziata da altri studi e potrebbe trovare una spiegazione nella terapia antiossidante somministrata ai pazienti dialitici.

Il dato che spicca maggiormente è che la popolazione di trapiantati sembra avere livelli di ossidazione e frammentazione del DNA meno elevati rispetto alla popolazione generale e al pool di pazienti dializzati. I fattori presi in considerazione per giustificare questa tendenza sono di natura diversa e comprendono la terapia immunosoppressiva, lo stato nutrizionale valutato in termini di albuminemia e l'emoglobina sierica.

Per quanto riguarda la terapia immunosoppressiva, l'andamento appare uniforme e non in relazione a particolari farmaci immunosoppressori. Più evidente è l'impatto dello stato nutrizionale che migliora con il trapianto anche se non è possibile confrontarlo con i controlli.

L'andamento delle citochine pro- e anti- infiammatorie ha evidenziato aspetti significativi. Esistono correlazioni specifiche tra i valori di frammentazione ed ossidazione e le citochine con significato con pro-infiammatorio, in particolare l'analisi di segregazione evidenzia un'influenza specifica di IFN- γ e IL-1.

La minore presenza di molecole infiammatorie a 6 mesi dopo trapianto potrebbe costituire un elemento sincrono e causale del minor stato ossidativo e di frammentazione cellulare.

Saranno necessari studi a distanza per valutare la riproducibilità delle condizioni descritte considerando un tempo di osservazione più ampio e un ulteriore approfondimento dei singoli fattori in gioco avendo a disposizione un campione più numeroso.

7. BIBLIOGRAFIA

- Akagi S, Nagake Y, et al. Significance of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in patients with chronic renal failure. *Nephrology* 2003; 8: 192-195.
- Aydin, M, Ozkok, E, et al. Relationship between interleukin-8 and the oxidant-antioxidant system in end-stage renal failure patients. *Exp Clin Transplant* 2007; 5: 610-613.
- Babior, BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 2000; 109: 33-44.
- Barnes, PJ and Karin, M. Nuclear Factor-kB - A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336: 1066-1071.
- Barnes, PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical Science* 1998; 94: 557-572.
- Burak ÇİMEN MY. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin Chim Acta* 2007;
- Carpio VN, Aquino-Dias EC, et al. Evaluation of Apoptosis in Peripheral Blood Lymphocytes of Renal Transplant Patients. *Transplant Proc* 2006; 38: 1898-1900.
- Chandra J, Samali A, et al. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 323-333.
- Collins A. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 2004; 26: 249-261.
- Cueto-Manzano AM, Morales-Buenrostro LE, et al. Markers of Inflammation Before and After Renal Transplantation. *Transplantation* 2005; 80: 47-51.
- Davis KL, Martin E, et al. Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 203-236.
- de Cal M, Silva S, et al. Oxidative stress and 'monocyte reprogramming' after kidney transplant: a longitudinal study. *Blood purification* 2008; 26: 105-110.
- Descamps-Latscha, B, Drueke, T, et al. Dialysis-induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences, and therapy. *Semin Dial* 2001; 14: 193-199.

- Ejaz AA, Mu W, et al. Could uric acid have a role in acute renal failure? *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 2007; 2: 16-21.
- Finkel, T and Holbrook, NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408: 239-247.
- Floccari F, Aloisi C, et al. Oxidative stress and uremia. *Med Res Rev* 2005; 25: 473-486.
- Fridman JS and Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 2003; 22: 9030-9040.
- Halliwell, B and Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 1991; 281: 9-19.
- Halloran, PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *New England Journal of Medicine* 2004; 351: 2715-2729.
- Handelman, GJ. Evaluation of oxidant stress in dialysis patients. *Blood Purif* 2000; 18: 343-349.
- Herbein G, Varin A, et al. NF-kappaB, AP-1, Zinc-deficiency and aging. *Biogerontology* 2006; 7: 409-419.
- Himmelfarb J, McMonagle E, et al. Oxidative stress is increased in critically ill patients with acute renal failure. *JASN* 2004; 15: 2449-2456.
- Himmelfarb J, Stenvinkel P, et al. The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int* 2002; 62: 1524-1538.
- Himmelfarb, J and Hakim, RM. Oxidative stress in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003; 12: 593-598.
- Himmelfarb, J, Hakim, RM, et al. Detection of granulocyte reactive oxygen species formation in whole blood using flow cytometry. *Cytometry* 1992; 13: 83-89.
- Himmelfarb, J. Linking oxidative stress and inflammation in kidney disease: which is the chicken and which is the egg? *Semin Dial* 2004; 17: 449-454.
- Hu ML, Louie S, et al. Antioxidant protection against hypochlorous acid in human plasma. *J Lab Clin Med* 1993; 121: 257-262.

- Irani, K. Oxidant Signaling in Vascular Cell Growth, Death, and Survival. *Circulation Research* 2000; 87: 179-183.
- Kaizu Y, Kimura M, et al. Interleukin-6 may mediate malnutrition in chronic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1998; 31: 93-100.
- Kalantar-Zadeh K, Ikizler TA, et al. Malnutrition-inflammation complex syndrome in dialysis patients: causes and consequences. *Am J Kidney Dis* 2003; 42: 864-881.
- Kamata H and Hirata H. Redox regulation of cellular signalling. *Cell signaling* 1999; 11: 1-14.
- Kim YH, Mun KC, et al. Oxidative damage in renal transplant patients. *Transplant Proc* 2000; 32: 1777-1778.
- Kosieradzki M, Kuczynska J, et al. Prognostic significance of free radicals: mediated injury occurring in the kidney donor. *Transplantation* 2003; 75: 1221-1227.
- Krötz F, Keller M, et al. Mycophenolate acid inhibits endothelial NAD(P)H oxidase activity and superoxide formation by a Rac1-dependent mechanism. *Hypertension* 2007; 49: 201-208.
- Krotz, F, Sohn, HY, et al. Reactive oxygen species: players in the platelet game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1988-1996.
- Lee YW and Hirani AA. Role of interleukin-4 in atherosclerosis. *Arch Pharm Res* 2006; 29: 1-15.
- Matsumoto S, Hanai T, et al. Can monitoring of serum 8-OHdG level for 2 hours after renal transplantation predict prognosis of the graft? *Transplant Proc* 2006; 38: 2014-2015.
- Matsumoto Y, Shinzato T, et al. Relationship between susceptibility to apoptosis and Fas expression in peripheral blood T cells from uremic patients: a possible mechanism for lymphopenia in chronic renal failure. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1995; 215: 98-105.
- Messmer UK and Brune B. Nitric oxide-induced apoptosis: p53-dependent and p53-independent signalling pathways. *Biochem J* 1996; 319: 299-305.

- Minz M, Heer M, et al. Oxidative status in stable renal transplantation. *Transplant Proc* 2006; 38: 2020-2021.
- Moreno JM, Ruiz MC, et al. Modulation factors of oxidative status in stable renal transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 1428-1430.
- Oshiro N, Yoshino K, et al. Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function. *Genes to cells* 2004; 9: 359-366.
- Ott U, Aschoff A, et al. DNA fragmentation in acute and chronic rejection after renal transplantation. *Transplant Proc* 2007; 39: 73-77.
- Perrea, DN, Moulakakis, KG, et al. Correlation between oxidative stress and immunosuppressive therapy in renal transplant recipients with an uneventful postoperative course and stable renal function. *Int Urol Nephrol* 2006; 38: 343-348.
- Pertosa G, Grandaliano G, et al. Clinical relevance of cytokine production in hemodialysis. *Kidney Int Suppl* 2000; 58: S104-S111.
- Pupim LB, Himmelfarb J, et al. Influence of initiation of maintenance hemodialysis on biomarkers of inflammation and oxidative stress. *Kidney Int* 2004; 65: 2371-2379.
- Raj DS, Dominic EA, et al. Skeletal muscle, cytokines, and oxidative stress in end-stage renal disease. *Kidney Int* 2005; 68: 2338-2344.
- Reynolds NJ and WI, A-D. Calcineurin inhibitors and sirolimus: mechanisms of action and applications in dermatology. *Clinical dermatology* 2002; 27: 555-5561.
- Rhen, T and Cidlowski, JA. Antiinflammatory action of Glucocorticoids - New Mechanisms for Old Drugs. *N Engl J Med* 2005; 353:
- Rojas, E, Lopez, M, et al. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B*, 1999; 722: 225-254.
- Sakahira, H, Enari, M, et al. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998; 391: 96-99.
- Sarkar SR, Kaitwatcharachai C, et al. Nitric oxide and hemodialysis. *Semin Dial* 2004; 17: 224-228.

- Schulak, JA. Steroid Immunosuppression in Kidney Transplantation: A Passing Era. *Journal of Surgical Research*, 2004; 117: 154-162.
- Sethi S and Dikshit M. Modulation of polymorphonuclear leukocytes function by nitric oxide. *Thromb Res* 2000; 100: 223-247.
- Shaulian E and Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature Cell Biology* 2002; 4: E131-E136.
- Sies H. Oxidative Stress: Introductory remarks. *Oxidative stress*, London; 1985, Academic Press, 1, 8
- Sies H. Role of Reactive Oxygen Species in Biological Processes. *Klin Wochenschr* 1991; 69: 965-968.
- Smith SL. Immunosuppressive therapies in organ transplantation. *Medscape* 2002;
- Takeda K, Kishimoto T, et al. STAT6: its role in interleukin 4-mediated biological functions. *Journal of molecular medicine* 1997; 75: 317-326.
- Tarakcioglu M, Erbagci AB, et al. Acute effect of hemodialysis on serum levels of the proinflammatory cytokines. *Mediators of inflammation* 2003; 12: 15-19.
- Tarng, DC, Huang, TP, et al. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine of leukocyte DNA as a marker of oxidative stress in chronic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2000; 36: 934-944.
- Tarng, DC, Liu, TY, et al. Protective effect of vitamin C on 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine level in peripheral blood lymphocytes of chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 2004; 66: 820-831.
- Tarng, DC, Wen Chen, T, et al. Increased oxidative damage to peripheral blood leukocyte DNA in chronic peritoneal dialysis patients. *JASN* 2002; 13: 1321-1330.
- Ward, RA and McLeish, KR. Oxidant stress in hemodialysis patients: what are the determining factors? *Artif Organs* 2003; 27: 230-236.
- Wink DA and Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 434-456.

- Wratten ML, Tetta C, et al. Oxidant stress in hemodialysis: prevention and treatment strategies. *Kidney Int Suppl* 2000; 76: S126-S132.
- Wu CC, Chen JS, et al. Aberrant activation of the TNF-alpha system and production of Fas and scavenger receptors on monocytes in patients with end-stage renal disease. *Artif Organs* 2005; 29: 701-707.
- Wu, CC, Chen, JS, et al. Myeloperoxidase serves as a marker of oxidative stress during single haemodialysis session using two different biocompatible dialysis membranes. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 1134-1139.
- Xia, Y and Zweier, JL. Direct measurement of nitric oxide generation from nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 12705-12710.
- Zhang, Z, Dmitrieva, NI, et al. High urea and NaCl carbonylate proteins in renal cells in culture and in vivo, and high urea causes 8-oxoguanine lesions in their DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101: 9491-9496.