

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Fisiopatologia dell'insufficienza
Renale

Ciclo 22

TITOLO TESI

**EFFETTI ACUTI E CRONICI
DELL'ASSOCIAZIONE MICOFENOLATO
MOFETILE ED INIBITORI
DELLA FARNESILAZIONE SUL DANNO
ACUTO DA ISCHEMIA RIPERFUSIONE NEL
RATTO**

**Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Carlo Buzio**

**Tutor:
Chiar.mo Prof. Landino Allegri**

Dottorando: Dott. Vittorio Serio

INDICE

INTRODUZIONE	Pag. 3
MATERIALI E METODI	Pag. 9
RISULTATI	Pag. 19
DISCUSSIONE	Pag. 26
BIBLIOGRAFIA	Pag. 34
TABELLE	Pag. 42

INTRODUZIONE

Il fenomeno di ischemia / riperfusione renale (IRI) rappresenta un importante fattore di danno sia per la struttura che per la funzione del rene. Sebbene si ritenga comunemente che l'ischemia renale acuta sia associata ad un completo recupero della funzione renale, vi è chiara evidenza sia sperimentale che clinica che l'IRI ha un impatto negativo sia nei reni nativi che nei reni trapiantati, nel breve e nel lungo termine. Proprio nel rene trapiantato il danno da IRI, una conseguenza “inevitabile” della procedura chirurgica, rappresenta uno dei più importanti fattori in grado di influenzare l'outcome del trapianto stesso; è ben noto, infatti, che le conseguenze del danno da IRI, la necrosi tubulare e la ritardata ripresa funzionale del rene trapiantato, rappresentano un fattore di rischio per la successiva eventuale insorgenza di rigetto acuto e di nefropatia cronica del trapianto.

Lo studio dei meccanismi molecolari responsabili del danno renale che consegue all'IRI ha dimostrato un'attivazione precoce di

specifici geni a livello delle cellule tubulari ed endoteliali renali (1); a questa attivazione genica consegue una complessa sequela di eventi caratterizzata da: aumentata produzione di radicali liberi dell'ossigeno (RLO), sintesi di citochine e di molecole di adesione cellulari e reclutamento dei leucociti nelle aree interessate dalla lesione. Tutto ciò è responsabile di una intensa risposta infiammatoria (2-4) in grado di attivare meccanismi di apoptosi e necrosi cellulare che possono determinare necrosi tubulare acuta. Questo quadro, caratterizzato da profonde alterazioni della morfologia e della funzione renale (5), determina un aumento di immunogenicità del rene trapiantato (6), predisponendo il rene alla eventualità del rigetto acuto e, nel lungo termine, allo sviluppo della malattia cronica del trapianto che si rende clinicamente evidente con la comparsa di proteinuria, la progressiva riduzione del filtrato glomerulare e la progressiva sclerosi glomerulare (7-10).

Queste considerazioni, pertanto, suggeriscono che sia la formazione dei radicali liberi dell'ossigeno (RLO) che la infiammazione associata al danno ischemico possano rappresentare potenziali targets per nuovi interventi terapeutici specifici, in grado

di prevenire o ridurre il danno morfologico e funzionale renale. In un recente studio sperimentale, abbiamo dimostrato che la somministrazione di un inibitore specifico del sistema Ha-Ras di membrana, l'acido chetomellico, è in grado di ridurre in modo significativo lo stress ossidativo indotto da IRI, determinando una riduzione significativa del danno morfologico e funzionale renale in ratti mono-nefrectomizzati sottoposti a IRI. La riduzione dello stress ossidativo ad opera dell'acido chetomellico avveniva attraverso l'inibizione selettiva di una proteina G a basso peso molecolare appartenente alla famiglia Ras denominata Ha-Ras e sita a livello della membrana cellulare. L'acido chetomellico non determinava, invece, inibizione dell'isoforma Ki-Ras a localizzazione prevalentemente intracellulare (mitocondriale) capace di stimolare la degradazione dei RLO attraverso la sintesi della superossido-dismutasi, uno "scavenger" dei RLO, in chiara antitesi con Ha-Ras (11).

Questo risultato è di estremo interesse dal momento che il ritorno ad una normale funzione renale dopo IRI anche parziale, è associato col passare del tempo alla comparsa di proteinuria ed alla

progressiva riduzione della filtrazione glomerulare, fenomeni che caratterizzano nel paziente trapiantato la nefropatia cronica del trapianto. La prevenzione del danno cellulare nelle cellule tubulari del rene ischemico potrebbe risultare in una significativa conservazione della funzione renale anche nel long-term.

L'inibizione del sistema Ras ha, però, un effetto limitato su tutta la cascata infiammatoria successiva all'IRI non avendo attività sulla sintesi delle citochine infiammatorie e sull'attivazione linfocitaria e macrofagica. E' pertanto possibile ipotizzare l'associazione dell'acido chetomellico con sostanze antinfiammatorie ed in grado di inibire l'attività leucocitaria per limitare ulteriormente il declino acuto del filtrato glomerulare e quindi preservare la funzione renale nel lungo termine. In accordo con questa ipotesi abbiamo testato gli effetti sull'IRI del Micofenolato Mofetile (MMF), un immunosoppressore con proprietà antinfiammatorie. Il Micofenolato Mofetile inibisce sia in vivo che in vitro la biosintesi di ossido nitrico indotto da stimolo citochinico (12-13), limita l'espressione di alcune molecole di adesione coinvolte nel inizio e nell'amplificazione della risposta

infiammatoria (14) e determina una specifica deplezione leucocitaria. MMF, estere morfolinico dell'acido micofenolico, è normalmente usato per la prevenzione del rigetto acuto (15) e, per le sue particolari proprietà, nel trattamento delle malattie infiammatorie immunomediate come il Lupus eritematoso sistemico (16). In vivo inibisce l'enzima inosina-5-monofosfato deidrogenasi, controllando la sintesi de novo dei nucleotidi guanosina e deossiguanosina (17). Poiché la proliferazione dei linfociti B e dei linfociti T è strettamente dipendente dalla biosintesi "de novo" di queste purine, l'acido micofenolico inibisce la proliferazione dei linfociti (18). Inoltre, la deplezione di guanosina determina l'inibizione del trasferimento di mannosio e fucosio alle glicoproteine di membrana (19), tra le quali le proteine di adesione intercellulare (ICAM-1) coinvolte nella mediazione della risposta immunitaria. Quindi MMF potrebbe avere un effetto benefico sull'IRI sia attraverso la riduzione dell'infiammazione che sul reclutamento dei leucociti e dei macrofagi; ciò potrebbe associarsi alla già nota azione protettiva dell'acido chetomellico nei confronti del danno renale da IRI.

Lo scopo del presente lavoro sperimentale è di valutare, in un modello di ischemia-riperfusionione nel ratto, se la somministrazione del MMF, da solo e in combinazione con KM, sia in grado di ridurre il danno renale da IRI. Per accertare se questi effetti protettivi persistono anche nel lungo termine, prevenendo od almeno rallentando la nefropatia progressiva tardiva che si associa all'IRI, lo studio è condotto in due fasi: A) una fase acuta in cui dei gruppi di ratti venivano studiati 24 ore dopo l'induzione di IRI; B) una fase cronica in cui altri ratti sottoposti ad IRI erano studiati dopo un prolungato follow-up (6 mesi). L'ischemia - riperfusionione veniva effettuata in ratti resi precedentemente monorene con intervento chirurgico, sottoposti ad un periodo di ischemia seguito da opportuna riperfusionione, un modello che ricorda la condizione clinica che si osserva nell'intervento chirurgico del trapianto di rene.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto su 59 ratti maschi Sprague-Dawley di 3-4 mesi di età (peso corporeo iniziale tra 300 e 350 gr), nutriti con dieta contenente 18% di proteine e libero accesso all'acqua di rete, mantenuti a temperatura ed umidità costante. Tutti i ratti erano sottoposti a nefrectomia destra sotto leggera anestesia con sodio pentobarbital (Nembutal, 50mg/kg intraperitoneale) in condizioni di sterilità e suddivisi in ordine random in diversi gruppi sperimentali. Dopo 7 giorni, quando i processi di ipertrofia compensatoria erano ormai completati, i ratti erano preparati per il protocollo sperimentale e sottoposti ad intervento chirurgico per l'induzione di ischemia renale sinistra o erano sottoposti a sham-operation.

In tutti i ratti resi ischemici, l'induzione dell'IRI era identica. In breve, dopo anestesia, con Nembutal, 50 mg/kg ip, veniva incisa la parete muscolare anteriore dell'addome e dopo attento isolamento del peduncolo vascolare, l'arteria renale veniva clampata per 45 minuti. Al termine del periodo di ischemia, la

clamp veniva rimossa e si accertava macroscopicamente la riperfusione della superficie renale prima della chiusura della parte addominale.

Nei ratti sottoposti a sham-operation, l'arteria renale era isolata in modo analogo ma non veniva clampata. Alla fine dell'intervento chirurgico i ratti venivano riposti nelle loro gabbie.

Studio Acuto

Per la fase acuta dell'esperimento i ratti venivano suddivisi in ordine random in 5 gruppi sperimentali:

I
Gruppo CON: ratti sottoposti ad ischemia-riperfusione non trattati con farmaci. Quattro ore prima dell'ischemia ricevevano pari volumi del veicolo dell'acido chetomellico (0.25 ml di soluzione salina) come placebo (n = 8);

Gruppo MMF: ratti pre-trattati con MMF (20 mg/kg peso corporeo al giorno, in olio di oliva e DMSO 0,5%, somministrato attraverso sondino gastrico) per 4 giorni prima dell'induzione dell'IRI (n = 8);

Gruppo KM: ratti trattati con acido chetomellico (0.23 µg/kg peso corporeo disciolti in 0.25 ml di soluzione salina) iniettato per via intraperitoneale 4 ore prima dell'induzione della ischemia (n= 7);

Gruppo MMF + KM : ratti trattati con entrambi i farmaci allo stesso dosaggio e con le stesse modalità (n = 8);

Gruppo NORM: ratti ugualmente nefrectomizzati, sottoposti a sham-operation senza IRI ed utilizzati come gruppo controllo (n= 8); Questo gruppo comprendeva anche quattro ratti a cui veniva somministrato il veicolo del MMF con sondino per quattro giorni come per MMF.

Lo studio acuto era effettuato 24 ore dopo induzione di IRI e veniva effettuato utilizzando come anestetico Inactin (100mg/kg di peso corporeo ip). Lo studio prevedeva la determinazione della clearance dell'Inulina (GFR), del flusso plasmatico renale e delle resistenze vascolari renali (20-21). In breve, dopo tracheostomia, si incannulavano la vena giugulare, per le infusioni di soluzioni reidratanti contenenti inulina chimica (5%), e l'arteria femorale per la misurazione continua della pressione arteriosa mediante un trasduttore connesso ad un registratore (HP 7782) e

successivamente si cateterizzava la vescica per via sovrapubica per la raccolta completa delle urine. Dopo adeguata stabilizzazione (60'), si effettuavano 3-5 periodi di clearance, con raccolta completa delle urine e concomitanti prelievi di sangue arterioso; al termine delle raccolte si effettuava un prelievo di sangue dalla arteria femorale e, sotto osservazione microscopica, dalla vena renale utilizzando apposite micropipette di vetro (diametro 50 μm) per calcolare il gradiente artero-venoso di inulina e, da esso, calcolare la frazione di filtrazione renale. I parametri che regolano l'emodinamica renale erano calcolati, secondo formule standard, dai valori del GFR e della frazione di filtrazione. Al termine dello studio emodinamico, si provvedeva alla esecuzione di prelievi di sangue ed alla asportazione ed alla pesatura dei reni in condizioni di sterilità. Frammenti di tessuto renale erano quindi prelevati e congelati a -80°C fino alla esecuzione degli studi di immunoblotting e di immunoistochimica. Alcuni segmenti di tessuto renale venivano fissati in liquido di Bouin ed inclusi in paraffina per lo studio istologico.

Studio Cronico

La fase cronica dello studio veniva condotta su 20 ratti suddivisi in ordine random nei cinque gruppi dello studio acuto (NORM, MMF, CON, KM, KM + MMF, n= 5 in ogni gruppo). I ratti dopo essere stati sottoposti ad esperimento per induzione di ischemia riperfusione o sham-operation (NORM) venivano seguiti per sei mesi in gabbie individuali. Mensilmente veniva eseguita la raccolta delle urine delle 24 ore, all'interno di gabbie metaboliche, per la determinazione della proteinuria delle 24 ore. Al termine dei 6 mesi di osservazione, i ratti venivano sottoposti ad uno studio emodinamico analogo a quello eseguito per gli studi acuti.

Il dosaggio di acido chetomellico utilizzato in questo studio (0.23 µg/kg/peso corporeo) è lo stesso già impiegato in altre procedure sperimentali di IRI, nelle quali risultava protettivo sia per la funzione che per l'istologia renale (22). Il dosaggio di MMF somministrato per sondino gastrico (20mg/kg peso corporeo al giorno per quattro giorni) è lo stesso dosaggio usato nel ratto in altri studi nei quali si è dimostrata l'efficacia farmacologica in assenza di effetti tossici (14-23-24).

Immunoblotting sul tessuto renale

Il tessuto renale prelevato al termine dello studio emodinamico veniva scongelato, lavato ed omogeneizzato in potter-teflon con un tampone costituito da 250mM di sucrosio, 5mM di imidazolo (pH 6,5), 0,5mM di dithioiteitrolo (1:4 peso/volume). I campioni di tessuto renale venivano centrifugati a 800g a 4°C per 10 minuti. Successivamente, il sovrinatante era centrifugato a 10.000g in ultracentrifuga a 4°C per 45' per ottenere la separazione tra le frazioni tra citosol e membrana. Sia il sopranatante raccolto (citosol) che il pellet di membrane erano quindi risospesi in 50 µl di buffer di lisi. Le frazioni di citosol e di membrana erano poi incubate con un anticorpo specifico anti pan-Ras diluito, e anti Ki-Ras (11-22).

Istologia

Il campione di parenchima renale ottenuto alla fine dell'esperimento era immediatamente fissato in una miscela di Bouin attivato, fissato in formalina al 10% ed incluso in paraffina; sezioni di 3-5 µm erano colorate con Ematossilina-Eosina, Acido

Periodico di Shiff (PAS), e colorazione di Jones. Poiché il danno tubulare ischemico acuto è maggiormente evidente nella parte esterna della midollare esterna (OSOM), cinquanta tubuli prossimali di questa area venivano esaminati in ciascun ratto ad un ingrandimento di 400x e assegnati a tre distinte categorie: (I) tubuli con aspetto normale; (II) tubuli con segni di danno da moderato a sub-letale (perdita dell'orletto a spazzola apicale); (III) tubuli con segni necrosi tubulare acuta (includeva sia tubuli con isolati fenomeni di necrosi che tubuli con perdita completa dello strato epiteliale e membrana basale completamente nuda). Un punteggio istologico veniva assegnato in modalità cieca da un operatore non a conoscenza del protocollo sperimentale, del farmaco utilizzato e della provenienza del campione.

Immunoistochimica

I campioni di parenchima renale venivano raccolti alla fine dello studio emodinamico, fissati in paraffina e tagliati in sezioni di 4 μ m, erano de-paraffinati in xilene e reidratati in alcool; venivano quindi immersi in una soluzione di citrato di sodio 0,01M e

sottoposti a irradiazione con microonde. Dopo irradiazione, le fettine erano accuratamente risciacquate in acqua per 5 minuti. Poi venivano lavati in TBS (Ph 7.4) e incubati con anticorpi murini anti ED-1 per 60 minuti, seguiti da specifici anticorpi biotinilati e da streptavidina ossidasi (LSAB Dako). Il segnale veniva sviluppato utilizzando 3,3 diaminobenzidina cromogeno (DAKO) come substrato. Per tutte le sezioni i controlli negativi consistevano nell'incubazione con anticorpi aspecifici o con l'omissione del primo passaggio.

La colorazione immunoistochimica di ICAM-1 era ottenuta su sezioni congelate, fissate in acetone e incubate con anticorpi murini anti CD-45 per 60 minuti a temperatura ambiente, seguiti da anticorpi secondari e dallo stesso sistema di rilevazione (LSAB Dako). Le sezioni erano esaminate a microscopio ottico standard.

Il numero di cellule ED-1 positive veniva valutato contando le cellule colorate in 30 campioni scelti a caso osservati ad ingrandimento 400x ed espresso come media $\pm$ 1DS di cellule per campo. L'espressione di ICAM-1 veniva determinata usando un metodo semi-quantitativo (0-3) in un minimo di 15 sezione scelte in

modo random ed osservate ad ingrandimento 400x, in rapporto all'estensione della colorazione del parenchima renale dallo 0 a >75% (score: 0-3). La valutazione dei campioni veniva effettuata da due patologi in modalità cieca non a conoscenza del gruppo di appartenenza delle sezioni.

Metodi analitici

Le concentrazioni dell'Inulina nel plasma e nei campioni urinari erano determinati con il metodo della difenilamina (25); la concentrazione delle proteine urinarie era valutata mediante un kit commerciale (metodo al pirogallolo, Sigma). Il volume urinario veniva misurato per differenza di peso in cuvette pre-pesate. La frazione di filtrazione veniva misurata attraverso l'estrazione renale di inulina ($(A-V/A) \times 100$). Gli altri determinanti dell'emodinamica renale erano calcolati attraverso formule standard.

Statistica

L'analisi della varianza ad una via (ANOVA), seguita dal test di Student–Newman-Keuls, è stata utilizzata per confrontare le

medie e per trovare differenze significative tra i Gruppi sotto studio. Per l'analisi statistica dei dati istologici è stata invece utilizzato il metodo di Kruskal–Wallis ad una via (ANOVA), seguito dal test di comparazione multipla di Dunn. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo. I dati sono presentati come medie $\pm$ 1DS.

RISULTATI

Riduzione di attività di Ras nella membrana cellulare

Le sezioni di parenchima renale ottenuti dai ratti sottoposti allo studio emodinamico acuto venivano omogeneizzati e le frazioni di citosol e di membrana venivano sottoposti ad immunoblotting con anticorpi anti-Pan-Ras e anti-Ki-Ras (fig. 1). Nel gruppo KM il pre-trattamento con inibitori del Ras determinava una significativa riduzione della proteina Ras attiva in membrana (-30% vs CON, $p<0.01$), che rappresentava la riduzione di attività dell'isoforma Ha-Ras, poiché Ki-Ras non viene normalmente espresso sulla membrana. Il pre-trattamento con il acido chetomellico, quindi, determinava la significativa inibizione dei processi di attivazione del sistema Ras di membrana; la concomitante somministrazione di MMF (gruppo KM+MMF) non influenzava l'inibizione di Ha-Ras da parte dell'acido chetomellico (-32%).

Studi emodinamici 24 ore dopo ischemia

I dati dello studio emodinamico nei ratti acuti sono riportati nella Tabella 1. Non si riscontravano differenze nel peso corporeo tra tutti e cinque i gruppi di ratti sotto studio. Il filtrato glomerulare medio (GFR, misurato come clearance dell'Inulina corretta per il peso del ratto) era 0.85 ± 0.25 ml/ min. /100 g di peso corporeo nei ratti del Gruppo NORM (sham-operated) ed era ridotto in media del 75% nei ratti del Gruppo CON e MMF (entrambi $P < 0.0001$ vs NORM). In questi due gruppi, in particolare, non era possibile dimostrare un gradiente arterovenoso di inulina nella maggior parte dei ratti, come conseguenza dell'importante danno funzionale e morfologico renale: questo non permetteva di valutare le altre componenti dell'emodinamica renale. Nel gruppo KM, il pre-trattamento con acido chetomellico era in grado di preservare in modo significativo la funzione renale. Infatti, 24 ore dopo l'ischemia, il GFR era in media 0.52 ± 0.06 ml/ min/100 g di peso nei ratti (-39% vs CON, $p < 0.05$). Questa "protezione" era mantenuta anche nel gruppo KM+MMF (-46% vs CON, $p < 0.05$). In entrambi questi gruppi, il GFR risultava significativamente più

alto rispetto ai ratti dei Gruppi CON e MMF, rispettivamente ($p < 0.05$). Era possibile calcolare in entrambi tali gruppi la frazione di filtrazione che risultava significativamente ridotta nei gruppi KM e KM+MMF (-22% e -30%, rispettivamente) rispetto al valore riscontrato nei ratti del Gruppo NOR nei quali era in media $26 \pm 2.1\%$ ($p < 0.01$ verso entrambi i Gruppi). Nei ratti KM e KM+MMF, la riduzione del GFR era principalmente secondaria all'aumento delle resistenze vascolari renali (+36% nel gruppo KM; +32% nel gruppo KM+MMF vs NOR, NS), e la conseguente riduzione media del 25% del flusso plasmatico e, a parità di valori di ematocrito, anche del flusso ematico renale rispetto ai ratti normali del gruppo NOR.

Istologia

La figura 2 mostra i risultati delle biopsie effettuate nei cinque gruppi di ratti. Oltre il 90% delle cellule tubulari della striscia esterna della outer-medulla apparivano normali nei ratti del gruppo NOR. L'induzione dell'ischemia determinava nel gruppo CON un severo danno tissutale mostrando una considerevole percentuale di

cellule necrotiche, in media il 34%, con segni di danno tubulare presenti nella quasi totalità delle cellule. Il pre-trattamento con MMF non modificava l'istologia dopo IRI, con circa il 25% di cellule necrotiche, mentre un consistente miglioramento si osservava nel gruppo KM, in cui la necrosi cellulare era virtualmente assente, e il numero di cellule danneggiate era significativamente ridotto (52%) rispetto ai Gruppi precedenti. L'istologia del gruppo di ratti KM+MMF era sovrapponibile al gruppo KM.

Immunoistochimica

Il numero di cellule ED-1 positive e l'espressione di ICAM-1 24 ore dopo l'induzione dell'ischemia sono mostrate nella Figura 3. I ratti del gruppo CON, in cui era indotta ischemia ma non erano trattati con farmaci, mostravano un aumento della colorazione per ICAM-1 e per ED-1 sia nelle cellule endoteliali che tubulari. Lo staining immunoistochimico era significativamente ridotto nelle cellule renali degli animali trattati con MMF e negli animali trattati con l'associazione KM+MMF, con valori sovrapponibili a quelli

dei ratti del gruppo NOR. Nel gruppo KM, il trattamento con acido chetomellico riduceva leggermente la colorazione per ED-1 e ICAM-1 sulle cellule endoteliali e tubulari se confrontato con il Gruppo CON, ma non arrivava ai valori del gruppo trattato con MMF.

Follow-up a Lungo Termine

Gli effetti a lungo termine dell'IRI renale erano studiati dopo sei mesi di follow-up in 20 ratti suddivisi in cinque gruppi: ratti normali monorene non trattati (NOR); ratti resi ischemici non trattati con farmaci (CON); ratti trattati con MMF prima dell'ischemia (MMF); ratti trattati con acido chetomellico prima dell'ischemia (KM); ratti trattati prima dell'ischemia con MMF e acido chetomellico (MMF+KM). Modalità, tempi di somministrazione e dosi dei farmaci erano le stesse dello studio acuto. Durante i sei mesi di osservazione non vi erano differenze di crescita corporea nei gruppi di ratti sotto studio, indicando che l'utilizzo di acido chetomellico e di MMF non influenzava negativamente il benessere degli animali.

Si osservava la tendenza all'aumento dei valori di proteinuria delle 24 ore sia nei ratti CON che nei ratti MMF durante l'intero periodo di osservazione, a differenza con gli altri gruppi nei quali i valori di proteinuria si mantenevano costanti. Tale differenza diveniva statisticamente significativa a partire dal terzo mese di osservazione ed aumentava progressivamente fino alla fine dell'osservazione (Figura 4). I ratti dei Gruppi KM e KM+MMF erano parzialmente protetti: la loro proteinuria rimaneva infatti significativamente bassa rispetto a quella osservata nei gruppi CON e MMF fino all'ultimo mese di osservazione, e non era statisticamente differente dal gruppo NOR.

Simili risultati si osservavano negli studi di emodinamica renale (Tabella 2). Sei mesi dopo l'induzione di ischemia, infatti, il GFR era marcatamente ridotto sia nel Gruppo CON che nel Gruppo MMF nei confronti del gruppo NOR (-43%, $p < 0.001$), ma era significativamente preservato nel Gruppo KM e nel Gruppo KM+MMF (-20% vs NOR, NS). Il declino del GFR nei Gruppi CON e MMF era mediato dal significativo aumento delle resistenze

vascolari renali rispetto agli altri Gruppi con conseguente declino del flusso plasmatico e del flusso ematico renale.

DISCUSSIONE

Il processo di ischemia-riperfusionazione renale (IRI) rappresenta una delle più importanti cause di insufficienza renale acuta sia nel rene nativo che nel rene trapiantato; ciò ha favorito il proliferare di numerosi studi sperimentali in questo campo atti ad evidenziare i meccanismi responsabili del danno d'organo, nel tentativo di trovare nuovi rimedi farmacologici potenzialmente utilizzabili anche nell'uomo. Infatti, nonostante comunemente si ritenga che l'IRA ischemica (necrosi tubulare) nella maggior parte dei casi guarisca senza conseguenze, è invece ormai chiaro che con il tempo i soggetti che hanno sofferto di IRA vanno incontro a perdita progressiva della funzione renale, come già ampiamente dimostrato nel ratto. La conferma di questo quadro patologico è offerta dal trapianto renale, il più classico esempio di IRI nell'uomo: è ben noto che la ritardata ripresa funzionale o la necrosi tubulare acuta sono un fattore prognostico negativo per l'outcome del graft, predisponendo alla riduzione della funzione renale ed alla

proteinuria fino allo sviluppo precoce della CAN, oltre che del rigetto acuto.

Il trattamento dei donatori viventi di rene con MMF, prima dell'intervento chirurgico, potrebbe avere un impatto benefico sul trapianto stesso sia riducendo il processo di infiammazione che si innesca nel rene durante l'IRI sia determinando una relativa deplezione dei leucociti nel donatore con potenziali effetti positivi di tipo immunologico (28). Al momento non esistono dati clinici su questo e, sfortunatamente, i precedenti dati sperimentali sull'utilizzo di MMF in corso di danno renale acuto ischemico sono contraddittori. Infatti, la somministrazione di MMF (20mg /kg al giorno per 2 giorni) prima di indurre ischemia renale nei ratti, dopo 24 ore di riperfusione non migliorava la funzione renale rispetto ai ratti non trattati, anche se dopo 48 ore i ratti trattati mostravano un significativo miglioramento del GFR (14); quando somministrato dopo l'insulto ischemico MMF (20mg /kg al giorno per 5 giorni) aveva addirittura effetti dannosi poiché aggravava sia la funzione renale che il danno cellulare (23,24).

Anche in modelli sperimentali diversi di nefrotossicità non si sono osservati effetti positivi del trattamento col MMF: la somministrazione di MMF dopo iniezione di uranil-acetato ritardava i processi riparativi delle cellule tubulari rispetto a ratti non trattati (29).

Un differente comportamento del micofenolato è stato descritto in un modello di ischemia renale più lieve (30 minuti), se combinato ad agenti antiossidanti (bioflavonoidi): mentre una prolungata somministrazione di MMF (40mg/kg al giorno per 5-7 giorni) non aveva effetti sulla creatinina nei confronti dei ratti non trattati, la somministrazione contemporanea di bioflavonoidi e MMF conferiva una importante protezione nei confronti dell'IRI suggerendo che l'attività antinfiammatoria del farmaco possa influenzare la funzione renale (30).

Il trattamento con diverse dosi di MMF (40, 80, 120 mg/kg al giorno) prima dell'induzione dell'IRI era in grado di inibire in modo dose-dipendente l'espressione renale di iNOS e quella di ICAM-1, nonché di ridurre il reclutamento di monociti, realizzando una cospicua mitigazione dell'infiammazione renale post

ischemica; queste proprietà antinfiammatorie, però, non si associavano ad effetti protettivi sulla funzione renale (13,14).

La possibilità di combinare l'attività antiinfiammatoria di MMF con gli effetti anti apoptotici del KM precedentemente dimostrati nell'IRI (11), ci ha indotto ad effettuare questo studio nel tentativo di minimizzare il danno secondario ad IRI.

I risultati del presente studio mostrano che il trattamento con MMF prima dell'induzione di IRI non ha effetti sulla funzione renale, nonostante 4 giorni di terapia: dopo 24 ore di ri-perfusione, infatti, il GFR e l'istologia renale non mostravano differenze tra i ratti trattati con MMF ed i ratti ischemici non trattati; questo si verificava nonostante una significativa riduzione dell'espressione di ICAM-1 e in presenza di una marcata riduzione anche dei monociti nei ratti trattati.

Come atteso (11), l'inibizione di Ha-Ras nel gruppo KM era di grande beneficio: la somministrazione di KM, infatti, esitava in un importante effetto protettivo per la funzione renale e per la struttura morfologica del tessuto renale negli animali trattati. Inaspettatamente, la concomitante somministrazione di MMF e KM

non aveva effetti addizionali sulla protezione renale se confrontati i dati con i ratti che ricevevano solo KM.

Abbiamo successivamente ipotizzato che l'effetto positivo del MMF sull'infiammazione nella fase acuta del danno renale poteva influenzare la funzione renale nel lungo termine quando i ratti ischemici sviluppano ipertensione, proteinuria e insufficienza renale (7-9). I risultati del follow-up erano particolarmente interessanti. Infatti, i ratti non trattati mostravano un progressivo peggioramento della proteinuria a partire dal terzo mese di osservazione dopo IRI ed un significativo declino del GFR dopo sei mesi (-43% vs ratti non trattati). Il trattamento con MMF non era in grado di evitare lo sviluppo di proteinuria nè il declino del GFR. L'aumento della proteinuria, al contrario, era significativamente prevenuto nei ratti trattati con una singola dose di KM dimostrando che l'effetto protettivo del KM persisteva nel tempo, come anche dimostrato dalla migliore conservazione del GFR, ridotto solo del 20% nei confronti dei ratti controllo non trattati, sei mesi dopo l'IRI.

Sfortunatamente la concomitante somministrazione di MMF e KM non determinava ulteriori miglioramenti sui parametri di funzione renale da noi presi in considerazione, indicando che l'impatto positivo sull'infiammazione al momento dell'ischemia non modifica le conseguenze dell'IRI. E' possibile ipotizzare, in queste condizioni, che sia necessario un trattamento con MMF continuo e prolungato per mantenere un basso grado di infiammazione. Infatti, 12 settimane di somministrazione di MMF dopo IRI riduceva significativamente la proteinuria e la sclerosi glomerulare in ratti geneticamente ipertesi in confronto a ratti non trattati, con un leggero miglioramento della funzione renale (31). In ratti remnant (ablazione di 5/6 del parenchima renale), la prolungata somministrazione di MMF si è dimostrata in grado di attenuare il danni istologico e l'ipertensione, anche se non migliorava la proteinuria e il GFR (32).

Recentemente, in un modello sperimentale di ipertensione da un elevato introito salino, Pechman ha dimostrato che il trattamento prolungato con MMF in ratti sottoposti ad IRI determinava una minore caduta del GFR rispetto a ratti non trattati con MMF (33).

Prendendo insieme questi studi si può ipotizzare che la riduzione cronica dell'infiammazione è necessaria per ottenere risultati positivi sulla funzione renale dopo IRI.

La persistenza dell'effetto benefico di KM nel lungo termine dopo una singola somministrazione del farmaco è certamente secondaria al miglior grado di funzione renale osservato acutamente dopo IRI; è possibile ipotizzare che questa protezione nel long-term sia la conseguenza di qualche specifica regolazione genica (attivazione/inattivazione) avvenuta durante l'ischemia acuta .

In conclusione il nostro studio suggerisce che la somministrazione di MMF prima di indurre IRI non è in grado di indurre protezione funzionale o morfologica renale. La ricerca di nuove strategie mirate a minimizzare il danno da IRI deve concentrarsi nello studio della riperfusione post-ischemica renale poiché in questa è possibile un intervento clinico che non richieda il trattamento del donatore di rene. Una eccezione potrebbe essere rappresentata da KM, poiché il donatore di rene potrebbe essere perfuso con questa sostanza, dal momento che non sembra avere

effetti collaterali in acuto e permetterebbe di prevenire il danno da IRI per tutti gli organi da prelevare e trapiantare.

BIBLIOGRAFIA

1. Supavekin S, Zhang W, Kucherlapati R et al; Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion. *Kidney Inter.* 2003;63: 1714-1724
2. Scarff Rw, Keele CA. The effects of temporary occlusion of the renal circulation in the rabbit. *Br J Exp Pathol* 1943; 24:147
3. Pagtalunan ME, Olson JL, Tinley NL, Meyer TW. Late consequences of acute ischemic injury to a solitary kidney. *J Am Soc Nephrol* 1999, 10:366-373.
4. Basile DP, Rovak JM, Martin DR, Hammerman MR. Increased transforming growth factor factor β 1 expression in regenerating rat renal tubules following ischemic injury. *Am J Physiol* 1996; 270 (Renal 39) : F500-F509.

5. Goes N, Urmson J, Ramassar V et al. Ischemic acute tubular necrosis induces an extensive local cytokine response. *Transplantation* 1995; 59: 565-572.
6. Shoskes DA, Parfrey NA, Halloran PF. Increased major histocompatibility complex antigen expression in unilateral ischemic acute tubular necrosis in the mouse. *Transplantation* 1990; 49: 201-207
7. Cruzado JM, Torras J, Riera M, et al. Influence of nephrons mass in development of chronic renal failure after prolonged warm renal ischemia. *Am j Physiology (Renal)* 2000; 279: F259- 269.
8. Forbes JM, Hewitson TD, Becker GJ et al. Ischemic acute renal failure: a long term Histological perspective on cell and matrix accumulation in the rat. *Kidney Int.* 2000; 57: 2375-2385.
9. Forbes JM, Hewitson TD, Becker GJ et al. Simultaneous blockade of endothelin A and B receptor in ischemic acute renal failure is detrimental to long term kidney function: *kidney Int.* 2001; 59 :1333-1343.

10. Pagtalunan ME, Olson JL, Tinley NL et al. Late consequences of acute ischemic injury to a solitary Kidney. *J Am Soc Nephrol*. 1999; 10: 366-373.
11. Sabbatini M, Santillo M, Pisani A, et al: Inhibition of Ras/ERK1/2 signaling protects against postischemic renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290: F1408-1415
12. Senda M, Delusero B, Eugui E, et al. Mycophenolic acid, an inhibitor of IMP dehydrogenase that is also an immunosuppressive agent, suppresses the cytokine-induced nitric oxide production in mouse and rat vascular endothelial cells. *Transplantation* 1995; 60:1143-1148
13. Lui SL, Chan LYY, Zhang XH, et al. Effect of Mycophenolate mofetil on nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase gene expression during renal ischemia-reperfusion injury. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:1577-1582

14. Ventura CG, Coimbra TM, De Campos SB et al:
Mycophenolite mofetil attenuates renal ischemia
reperfusion injury. J Am Soc Nephrol 2002;13:2524-2533.
15. Halloran P, Mathew T, Tomlanovich S. et al.
Mycophenolate mofetil in renal allograft recipients: a
pooled efficacy analysis of three randomized, double-
blind, clinical studies in prevention of rejection.
Transplantation 1997;63:39-47
16. Appel As, Appel GB. An update on the use of
mycophenolate mofetil in lupus nephritis and other
primary glomerular disease. Nat clin Pract Nephrol 2009;
5: 132-142.
17. Franklin TJ, Cook JM,. The inhibition of nucleic acid
synthesis by micophenolic acid. Biochem J. 1969; 113:
515-523.
18. Griesmacher A, Weigel G, Seebacher G, et al. IMP-
dehydrogenase inhibition in human lymphocytes and
lymphoblast by mycophenolic acid and mycophenolic
acid glucuronide. Clin Chem 1997; 13:2312-2317

19. Allison AC, Kowalski WJ, Muller CJ et al. Mycophenolic acid and brequinar, inhibitors of purine and pyrimidine synthesis, block the glycosylation of adhesion molecules. *Transplant Proc.* 1993; 25:67-68
20. Sabbatini M, Sansone G, Uccello F, De Nicola L, Giliberti A, Sepe V, Magri P, Conte G, Andreucci VE. Functional versus structural changes in the pathophysiology of acute ischemic renal failure in aging rats. *Kidney Int* 1994, 45: 1355-1361
21. Sabbatini M, Pisani A, Uccello F, et al. Arginase inhibition slows the progression of renal failure in rats with renal ablation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; F284: F680-F687
22. Sabbatini M, Pisani A, Uccello F, et al. Atorvastatin improves the course of ischemic acute renal failure in aging rats. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:901-909
23. Chavez-Velasquez M, Pons H et al. Effects of Mycophenolate mofetil in ischemic acute renal failure in rats. *Nefrologia* 2007; 27 : 448-458

24. Gonzalez N, Alvarez V, Pons H et al. Mycophenolate mofetil aggravates postischemic acute renal failure in rats. *Transplant Proc* 2002; 34: 43-44
25. Walzer M, Davidson DG, Orlott J. The renal clearance of alkali-stable inulin. *J Clin Invest* 1995;34: 1520-1525.
26. Solez K, Benediktsson H, Cavallo T, et al. Report of the 3rd Banff conference on allograft pathology on classification and lesion scoring in renal allograft pathology. *Transplant Proc* 1996, 28:441-444
27. Karlberg L, Kallskog O, Norlen BJ, Wolgast M: Postischemic renal failure: Intrarenal blood flow and functional characteristic in the recovery phase. *Acta Physiol Scand* 115: 1-10, 1982.
28. Valentin JF, Brujin JA, Paul LC : Donor treatment with mycophenolate mofetil. *Transplantation* 2000; 69: 344-350
29. Sun DF, Fujigaki Y, Fujimoto T, et al. Mycophenolate mofetil inhibits regenerative repair in uranyl-acetate-

induced acute renal failure by reduced interstitial cellular response. Am J Pathol 2002; 161: 217-227

30. Jones EA, Shoskes DA. The effect of mycophenolate mofetil and poliphenolic bioflavonoids on renal ischemia reperfusion injury and repair. J Urol. 2000; 163: 999-1004
31. Bloudickova S, Rajinoch J, Loderenova A, et al. Mycophenolate mofetil ameliorates accelerated progressive nephropathy in rat. Kidney Blood Res 2006; 29: 60-66.
32. Fujimara CK, Zatz R, Noronha IL. Mycophenolate mofetil attenuates renal Injury in the rat remnant Kidney. Kidney Int 1998; 54: 1510-1519
33. Pechman KR, Basile DP, Lund H, et al. Immune suppression blocks sodium-sensitive hypertension fallowing recovery from ischemic acute renal failure. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2008; 294: R1234-1239

TABELLA 1. Dati emodinamici nei cinque gruppi di ratti sotto studio 24 ore dopo induzione di ischemia.

Gruppo	BW	PAM	HT	GFR/100g BW	RVR	RPF	RBF	FF
NORM	402	115	44***	0,85*	21,7	3,23	5,81	26
(n=8)	+/- 15	+/- 9	+/- 2	+/- 0,25	+/- 7,4	+/- 0,96	+/- 1,84	+/- 2,1
CON	383	114	43	0,20	NA	NA	NA	NA
(n=8)	+/-14	+/- 11	+/- 3	+/- 0,05				
MMF	360	119	40	0,21	NA	NA	NA	NA
(n=8)	+/-42	+/- 46	+/- 3	+/- 0,13				
KM	390	123	40	0,52 **	29,6	2,56	4,41	20,3
(n=7)	+/-18	+/- 8	+/- 3	+/- 0,06	+/- 7,5	+/- 0,74	+/- 1,21	+/- 2,6
KM + MMF	364	112	38	0,46 **	28,7	2,65	4,28	18,1
(n=8)	+/-46	+/- 13	+/- 2	+/- 0,15	+/- 9,2	+/- 1,08	+/- 1,56	+/- 4,1

NOR: ratti normali nefrectomizzati; **CON:** ratti non trattati sottoposti ad IRI; **MMF:** ratti pretrattati con **MMF** prima dell'IRI; **KM:** ratti trattati con acido ketomellico prima dell'IRI; **KM+MMF:** ; ratti trattati sia con KM sia con MMF prima dell'IRI.

Abbreviazioni: **PAM** Pressione arteriosa media (mm Hg); **Ht**, Ematocrito (%); **GFR**, velocità di filtrazione glomerulare (clearance dell'inulina/100 grammi di peso corporeo), ml/min; **RVR**, resistenze vascolari renali (mm Hg/ml/min); **RPF**, flusso plasmatico renale (ml/min); **RBF**, flusso ematico renale (ml/min); **FF**, Frazione di filtrazione(%)

* p<0.05 vs altri gruppi.

** p<0,05 vs CON e MMF

*** p<0,05 vs KM+MMF

Test ad una via ANOVA seguito dal test Student-Newman-Keuls.

TABELLA 2. Dati emodinamici nei cinque gruppi di ratti sotto studio dopo sei mesi dall'induzione di ischemia.

Gruppo	BW	PAM	HT	GFR/100g BW	RVR	RPF	RBF	FF
NORM	611	125	45	0,87**	22,1	3,18	5,65 *	28
(n=8)	± 62	± 5,7	± 1,1	± 0,06	± 2,77	± 0,10	± 0,24	± 2
CON	635	142	39,5	0,50	46,9****	1,95	3,24	26
(n=8)	±76	± 9,6	± 2	±0,12	±14,5	±0,52	±0,92	± 2
MMF	617	133	42	0,49	45,8****	1,70	2,94	29
(n=8)	±34	±2,2	±1,5	± 0,13	±3,85	±0,13	± 0,28	± 5
KM	638	122	42	0,69	29,8	2,24	4,10 ***	31
(n=7)	±85	±2,9	± 2,3	± 0,12	±4,13	±0,42	±0,56	± 2
KM + MMF	642	125	44	0,68	28,5	2,50	4,43***	28
(n=8)	±42	± 4,4	± 3	±0,08	± 3,12	± 0,41	±0,63	± 3

NOR: ratti normali nefrectomizzati; **CON** ratti nefrectomizzati, sottoposti ad ischemia senza trattamento farmacologico; **MMF:** ratti trattati con MMF prima dell' IRI; **KM:** ratti trattati con acido ketomellico prima dell'IRI; **KM+MMF:** ratti trattati sia con KM sia con MMF prima dell'IRI

Abbreviazioni ed unità di misura: **BW:** peso corporeo (g); **PAM:** Pressione arteriosa media (mm Hg); **Ht:** Ematocrito (%); **GFR:** velocità di filtrazione glomerulare (clearance dell'inulina/100 gdi peso corporeo), ml/min; **RVR:** resistenze vascolari renali (mm Hg/ml/min); **RPF:** flusso plasmatico renale (ml/min); **RBF:** flusso ematico renale (ml/min); **FF:** Frazione di filtrazione (%). Significatività statistica (ANOVA seguito dal test Student-Newman-Keuls), P<0,05 vs altri gruppi

* vs gli altri gruppi. ** vs gruppi CON e MMF. *** vs MMF e CON

**** vs NOR, KM, KM + MMF

Fig. 1

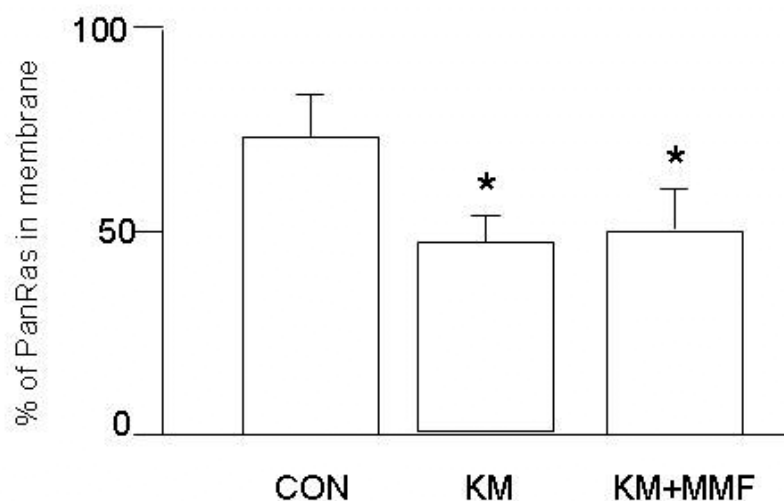


Fig. 1 . Spostamento della proteina Ras dalla membrana del tessuto renale di KM e KM + MMF 24 ore dopo ischemia. I tessuti di ratto erano sottoposti ad immunoblotting con anticorpi anti Pan-Ras e anti Ki-Ras (i dati di Ki-Ras non sono mostrati perché sono simili in tutti i gruppi). L'istogramma mostra la percentuale di Pan-Ras legante la membrana (HaRas+KiRas) nei differenti gruppi.

* $P < 0,05$ vs CON

Fig.2

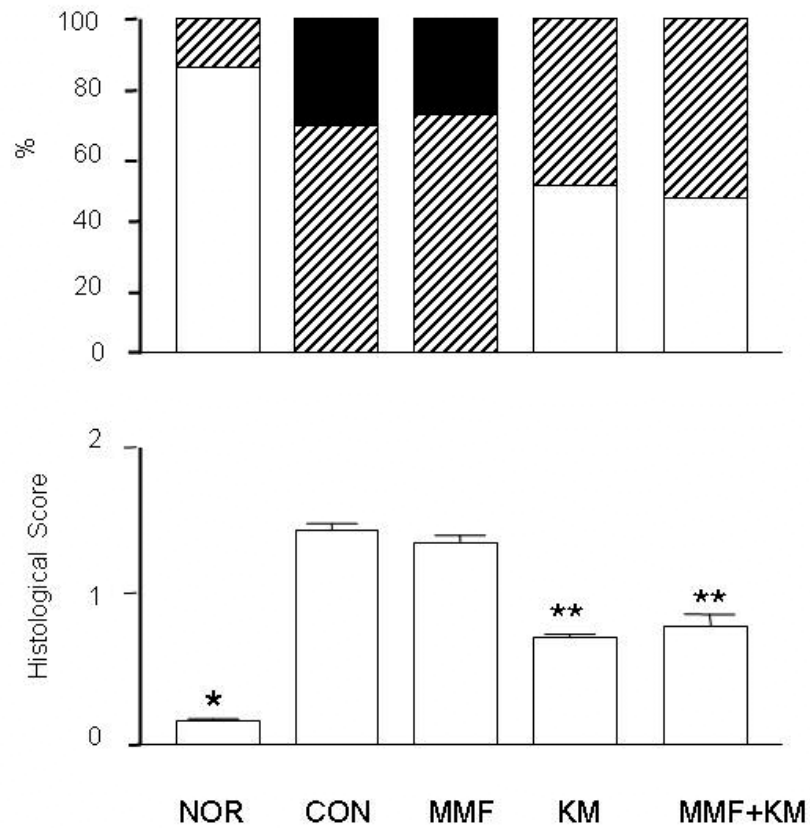


Fig 2. La valutazione istologica del danno tubulare renale 24 ore dopo l'ischemia. Il pannello superiore mostra la percentuale di tubuli prossimali della OSOM, suddivisa in tubuli di aspetto normale (bianco), tubuli con segni di danno subletale (linea tratteggiata) e tubuli con segni di necrosi tubulare acuta (colonna nera). Il pannello inferiore: tubuli con normale apparenza, tubuli con segni di danno endoteliale, tubuli con segni di necrosi acuta erano assegnati a punteggi rispettivamente di 0,1,2. Le colonne rappresentano i valori medi ($\pm$ SEM).

* $P < 0,01$ vs altri gruppi

** $P < 0,05$ vs CON e MMF.

Fig 3.

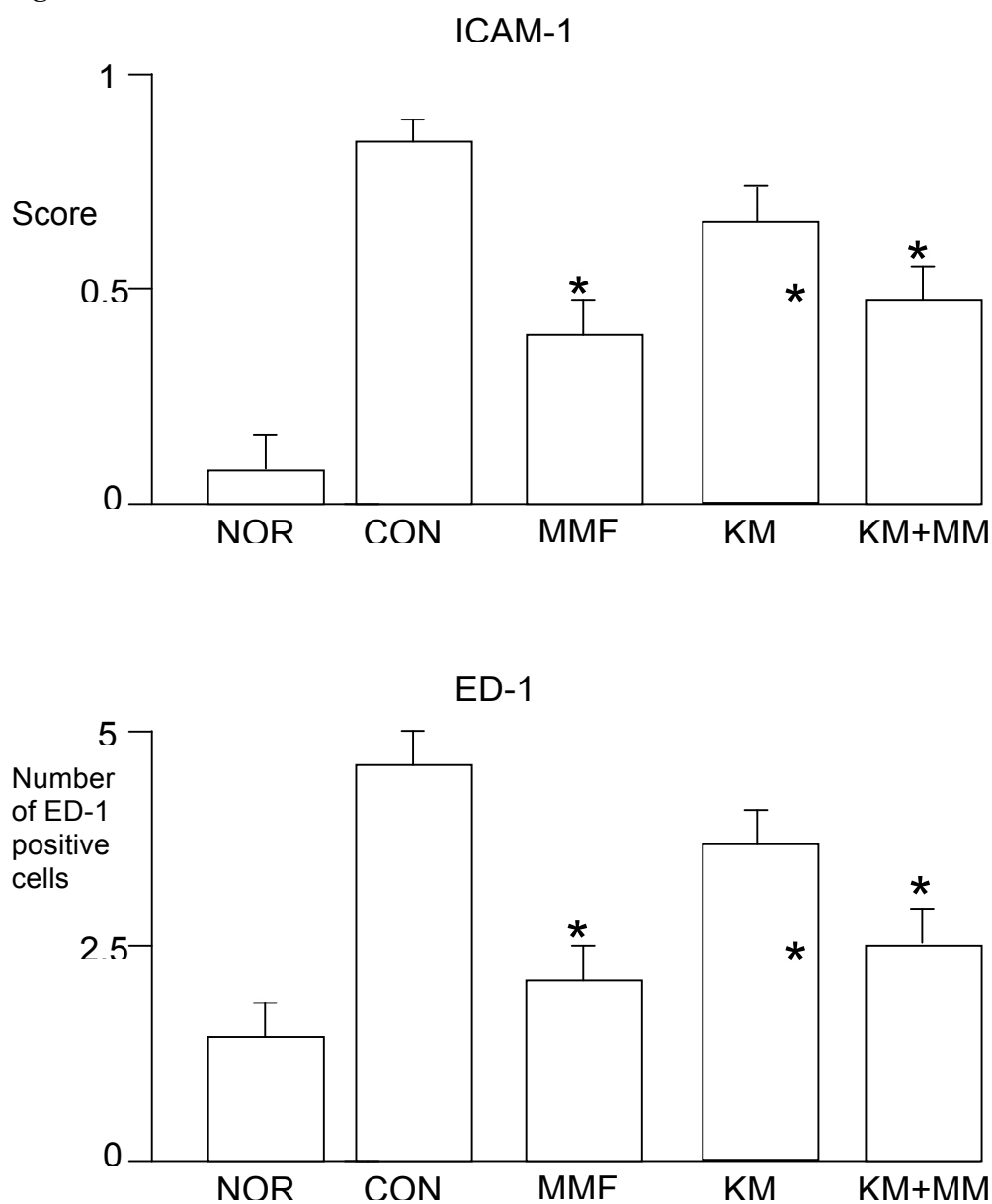


Fig 3. Espressione di ICAM-1 e presenza di cellule ED-1 positive 24 ore dopo ischemia nel gruppo sotto studio. L'espressione di ICAM-1 veniva determinata usando un punteggio semi-quantitativo (0-3) secondo l'estensione della colorazione nel parenchima renale (0%-75%). Il numero di cellule ED1-positive in ciascun caso era calcolato attraverso il conteggio del numero di cellule colorate in 30 campi selezionati in modo random osservati a ingrandimento 400X.

I valori sono espressi come medie $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ vs CON.

Fig.4

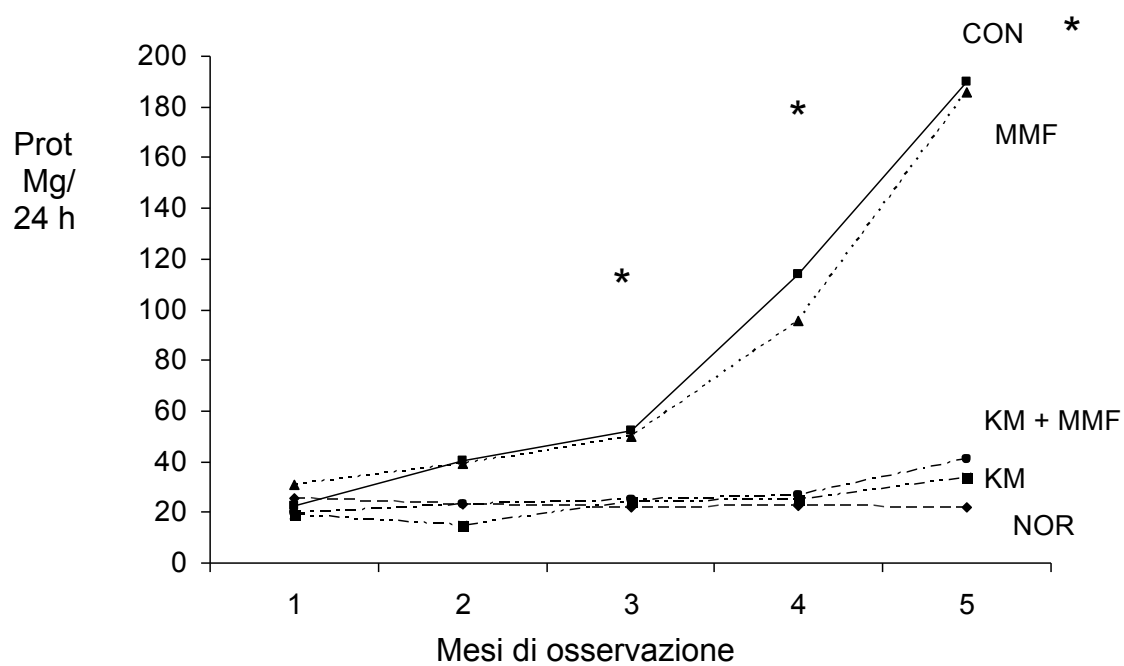


Fig 4. Valori di proteinuria delle 24 ore durante l'osservazione di 6 mesi nei diversi gruppi di ratti sotto studio.

* $P < 0,05$ gruppo CON e gruppo MMF vs altri gruppi.