



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

**DOTTORATO DI RICERCA MULTIDISCIPLINARE ED AVANZATA NEI TRAPIANTI
D'ORGANO- Ciclo XXVI**

DOTT.SSA ANNALaura PARATORE

**DIAGNOSI PRECOCE DEL DANNO DA ISCHEMIA RIPERFUSIONE E
DELLA DISFUNZIONE RENALE POSTTRAPIANTO:
RUOLO DELLA LIPOCALINA ASSOCIATA ALLA GELATINASI NEUTROFILA (NGAL)**

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

Relatore: Chiar.mo Prof Antonino Gullo

TRIENNIO ACCADEMICO 2010-2013

INTRODUZIONE

DANNO DA ISCHEMIA/RIPERFUSIONE E DELAYED GRAFT FUNCTION

LA LIPOCALINA ASSOCIATA ALLA GELATINASI NEUTROFILA

L'EME OSSIGENASI

SCOPO DELLO STUDIO

MATERIALI E METODI

RISULTATI

DISCUSSIONE

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

BIBLIOGRAFIA

Introduzione

Il tema relativo alla diagnosi precoce della disfunzione d'organo post trapianto di rene rappresenta un campo di notevole interesse nell'ambito della comunità scientifica ed è oggi campo di ricerca di numerosi studiosi. In particolare il danno da ischemia/riperfusionazione come causa di un ripristino ritardato della funzionalità degli organi trapiantati (*delayed graft function, DGF*) rappresenta una problematica aperta, anche per la mancanza di modelli sperimentali ed in considerazione delle numerosi variabili che caratterizzano il trapianto stesso (l'organo trapiantato, le caratteristiche del genotipo e della risposta bioumorale del ricevente).

Il danno da ischemia/riperfusionazione rappresenta una tra le principali cause di danno renale acuto sia nei reni nativi che nei reni trapiantati, ed è associato ad elevata morbilità e mortalità.

Nei pazienti in seguito a trapianto di rene non di rado si manifesta un certo grado di disfunzione renale che conduce al ritardato ripristino della funzionalità dell'organo trapiantato.

La DGF è una delle complicanze precoci più importanti del trapianto.

La DGF costituisce uno tra i principali fattori in grado di influire negativamente sull'outcome del paziente sottoposto a trapianto renale. Il danno da ischemia/riperfusionazione (IRI) che conduce alla necrosi tubulare acuta (NTA) post-trapianto è la causa più comune di DGF; gli effetti a lungo termine del danno tissutale indotto dall'ischemia, e dalla successiva riperfusionazione, e lo sviluppo della DGF sembrano esser correlati ad una maggiore incidenza di forme di rigetto e al declino della funzionalità renale

La DGF prolunga l'ospedalizzazione, aumenta la morbilità (rigetto, nefropatia cronica e perdita dell'organo) e costituisce un fattore di rischio indipendente per un funzionamento sub-ottimale del graft. (1,2)

La medicina dei trapianti non può prescindere dall' IRI: il danno da ischemiariperfusione è dovuto all'insieme degli eventi che si susseguono dal momento del prelievo dell'organo fino all'anastomosi tra i vasi del ricevente e quelli del graft: con conseguenti modifiche del metabolismo da aerobio ad anaerobio e la successiva riperfusione con la reossigenazione accentua il danno cellulare generando specie reattive dell'ossigeno.

Il miglioramento della gestione del paziente trapiantato, sia donatore che ricevente, così come i progressi in campo diagnostico e terapeutico hanno ridotto ma non eliminato l'incidenza di tale condizione patologica e non hanno limitato le conseguenze a breve e lungo termine.

L'identificazione precoce del danno renale è fondamentale per poter instaurare tempestivamente la terapia appropriata e migliorare la prognosi. (3)

La diagnosi precoce di danno renale acuto rappresenta ancora una sfida per i clinici, soprattutto a causa della mancanza di marcatori in grado di individuare il danno renale precocemente (4).

A questo fine negli ultimi anni numerosi studi clinici hanno tentato di identificare e validare nuovi biomarker in grado di diagnosticare precocemente la condizione di danno renale acuto, potenzialmente reversibile se tempestivamente individuata ed adeguatamente trattata.

L'attenzione della comunità scientifica si è rivolta ad individuare biomarkers di danno tissutale *sensibili, specifici, facilmente e rapidamente rilevabili*, dotati di un buon *potere discriminatorio* per i diversi tipi di danno renale alla luce soprattutto dei risvolti clinici e terapeutici che potrebbero derivarne. (5)

La comunità scientifica recentemente ha rivolto l'attenzione a nuove metodiche di laboratorio, con particolare riguardo verso "marcatori biologici", molecole endogene in grado di evidenziare uno stato di stress a carico delle strutture renali ed in grado di definire la presenza di un danno renale acuto con sufficiente sensibilità, specificità e precocità rispetto ai mezzi attualmente in uso nella pratica clinica.

In considerazione della crescente importanza della ricerca translazionale (bench to bedside) sono stati scelti 2 biomarcatori, recentemente introdotti nella ricerca clinica, per

verificare l'ipotesi di poterne validare l'efficacia e il livello di specificità. In particolare, il dosaggio della Lipocalina Associata alla Gelatinasi Neutrofila (NGAL) quale indice precoce di DGF nel post-trapianto e l'Eme ossigenasi (HO-1) quale indice precoce di danno renale.(6,7)

Scopo della ricerca è stato quello di studiare l'andamento di NGAL nei trapianti, non solo per verificare la sua capacità di diagnosticare precocemente la DGF, ma anche per cercare una sua eventuale correlazione con l'andamento della funzione renale.

L'identificazione precoce della DGF e la diagnosi differenziale con altre condizioni aventi un'analogia presentazione clinica ci consentirebbero di compiere enormi passi avanti nella gestione dei pazienti trapiantati, al fine di instaurare tempestivamente la terapia più appropriata e migliorare così la prognosi. (8)

L'obiettivo della ricerca è stato inoltre quello di verificare l'utilità dell' HO-1 sierico quale biomarker in grado di indicare il valore intrarenale dell' HO-1 tenendo conto che l'incremento intrarenale dell' HO-1 presenta specifiche correlazioni con l'insorgenza di danno renale acuto .

Danno da ischemia/riperfusion e Delayed graft function

Sindrome da ischemia riperfusione. Il danno da ischemia/riperfusion (IRI), descritto per la prima volta da Haimovici nel 1960 (9) è determinato dall'insieme di eventi che si susseguono dal momento del prelievo dell'organo fino all'anastomosi tra i vasi del ricevente e quelli del graft, il passaggio del metabolismo del graft da aerobio ad anaerobio e la successiva reintroduzione di ossigeno nei tessuti al momento della riperfusion il danno cellulare.

Il danno da ischemia/riperfusion (IRI) è caratterizzato da una cascata di eventi, riconducibili a fattori immunologici e non, risultante in un danno tissutale di ampia portata. (10)

Il trapianto di organi è divenuto opzione terapeutica ben consolidata, tuttavia la medicina dei trapianti non può prescindere dall'IRI: all'atto del prelievo dal donatore l'organo subirà un periodo di "ischemia calda" *definita come l'arco di tempo che intercorre tra l'arresto dell'irrorazione, al fine di poter svolgere la procedura di prelievo dell'organo stesso, ed il termine dell'intervento*, al quale farà seguito un periodo di "ischemia fredda" nel corso della quale il "graft" *mantenuto a temperatura di refrigerazione per un arco di tempo tra il prelievo ed il trapianto nel ricevente.*

Le tecniche di prelievo, conservazione e trapianto necessitano di procedure che causano, inevitabilmente, danno ischemico e riperfusion post ischemica.

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

L'ischemia determina una carenza di ossigeno e nutrienti, inducendo l'accumulo dei prodotti di scarto del metabolismo. A livello cellulare si ha inibizione del metabolismo ossidativo, deplezione di ATP, incremento dei processi di glicolisi anaerobia e inibizione della pompa Na/K-ATPasi.

La condizione ischemica porta all'attivazione di meccanismi citoprotettivi compensatori, il più importante dei quali corrisponde al rallentamento del metabolismo cellulare, oltre alla trascrizione di geni codificanti per molecole ad azione protettiva (eme ossigenasi 1) o, comunque, correlate alla

rigenerazione cellulare.(11,12)

La riperfusione determina il ripristino di una temperatura appropriata alle funzioni cellulari, un adeguato apporto di ossigeno ed il ripristino del metabolismo aerobio e della produzione di ATP.

Tali processi sono affiancati anche dalla generazione di ROS in elevata concentrazione. Durante la riperfusione anche l'organismo ospite concorre al potenziamento del danno dovuto ai ROS. Infatti le citochine e le chemochine rilasciate nel corso della generazione degli stessi radicali e della perossidazione lipidica, insieme all'aumentata espressione delle molecole di adesione della membrana cellulare, richiamano neutrofili e monociti responsabili a loro volta del rilascio di un'ulteriore quantità di ROS che andrà a potenziare l'insulto. (13)

Dopo pochi minuti dall'attivazione dell'endotelio le cellule immunocompetenti del ricevente infiltrano l'organo trapiantato causando un danno tubulare nel rene. Dunque il ripristino del flusso ematico aggrava i danni provocati dall'ischemia, non solo palesando le alterazioni già instauratesi in fase anossica ma perché da avvio ad una cascata di reazioni biochimiche ad elevato potenziale distruttivo. (14)

Le sostanze antiossidanti presenti a livello renale non riescono a bilanciare l'effetto dei ROS in corso di riperfusione del tessuto ischemico, in cui il potenziale protettivo viene rapidamente esaurito in seguito alla generazione di elevate quantità di ROS, risultando nell'induzione della morte cellulare per apoptosi (15) La sofferenza cellulare a livello tissutale post rivascolarizzazione è superiore a quella che si ha durante la fase anossica.

L'ischemia e la successiva riperfusione determinano a livello cellulare una complessa sequela di eventi schematicamente riassunti come segue:

- Aumento della produzione di radicali liberi dell'ossigeno (e porvabile diminuzione della rimozione)
- Aumento del contenuto intracellulare e intramitocondriale di calcio
- Attivazione di Fosfolipasi A2
- Attivazione dei leucociti polimorfonucleati

- Rilascio di enzimi lisosomiali e altre proteasi
- Riduzione del flusso distrettuale post riperfusione

E' chiaro che la possibilità di ripristinare l'equilibrio tra fattori ossidanti ed antiossidanti , alteratosi durante la riperfusione post-ischemica, rappresenta un importante approccio terapeutico per prevenire o ridurre l'insorgenza di danno renale e conseguente disfunzione nei trapianti d'organo.(16).

Delayed Graft Function è definita come necessità di ricorso alla dialisi entro i primi sette giorni dall'intervento e/o persistenti livelli di creatinina sierica post trapianto; dal punto di vista clinico è caratterizzata da oligoanuria posttrapianto e rappresenta una forma di danno renale acuto post trapianto con ritardata ripresa della funzionalità renale.

La più comune causa di DGF è il danno da ischemia riperfusione a cui consegue la Necrosi Tubulare Acuta post trapianto. Il danno immunologico con attivazione del sistema immunitario ,rilascio di citochine e molecole di adesione agisce sinergicamente al danno da ischemia-riperfusione, accentuando ulteriormente la lesione. I danni a carico dell'endotelio che si verificano nel corso del processo infiammatorio che caratterizza la DGF rivestono un ruolo determinante nel definire l'evoluzione della disfunzione dell'organo e si ipotizza siano alla base della maggior incidenza di rigetto e declino della funzionalità renale. Indipendentemente dalla capacità di facilitare il rigetto acuto la DGF è predittiva di una ridotta sopravvivenza del graft causa la necrosi tubulare acuta che nei casi più gravi determina lo sviluppo di una nefropatia cronica del graft a lungo termine.

La ripresa funzionale post-trapianto è correlata all'entità Necrosi Tubulare Acuta. Non è stato ancora chiarito il meccanismo molecolare che induce la morte delle cellule epiteliali in seguito al trapianto , le ipotesi sono correlate ad un diretto effetto dell'ischemia-riperfusione sulle cellule epiteliali oppure ad un effetto indiretto riconducibile alla distruzione dell'endotelio a causa dell'alterata perfusione. Tuttavia il danno da riperfusione post ischemica è un processo multifattoriale che vede il coinvolgimento di meccanismi apparentemente indipendenti, ma che, in

realtà, sono tutti correlati da una fitta rete di segnali intracellulari.

Una ridotta sopravvivenza del graft è riscontrabile in tutti quei pazienti che hanno sviluppato una ritardata ripresa funzionale dell'organo impiantato, anche se in caso di donatore vivente consanguineo il tasso di sopravvivenza è maggiore rispetto a donatori viventi non consanguinei o donatori cadaveri (17) (18)

I principali fattori di rischio riconosciuti per insorgenza di DGF secondo United States Renal Data System (19) sono riconosciuti nell'età del donatore, la tipologia del donatore (cadavere o vivente), le caratteristiche di preservazione e di impianto ed in particolare il tempo di ischemia fredda, le variabili immunologiche come il PRA, il mismatch HLA e stati di immunizzazione e le caratteristiche del ricevente come la storia clinica e l'etnia. (20,21,22,23)

In passato per prevedere l'insorgenza di DGF, sono stati proposti svariati algoritmi clinici basati su fattori di rischio legati sia al donatore che al ricevente (24,25)

Malgrado i progressi realizzati nelle terapie post-trapianto l'incidenza della ripresa funzionale ritardata è rimasta invariata, comportando la necessità di nuove opzioni terapeutiche. (26)

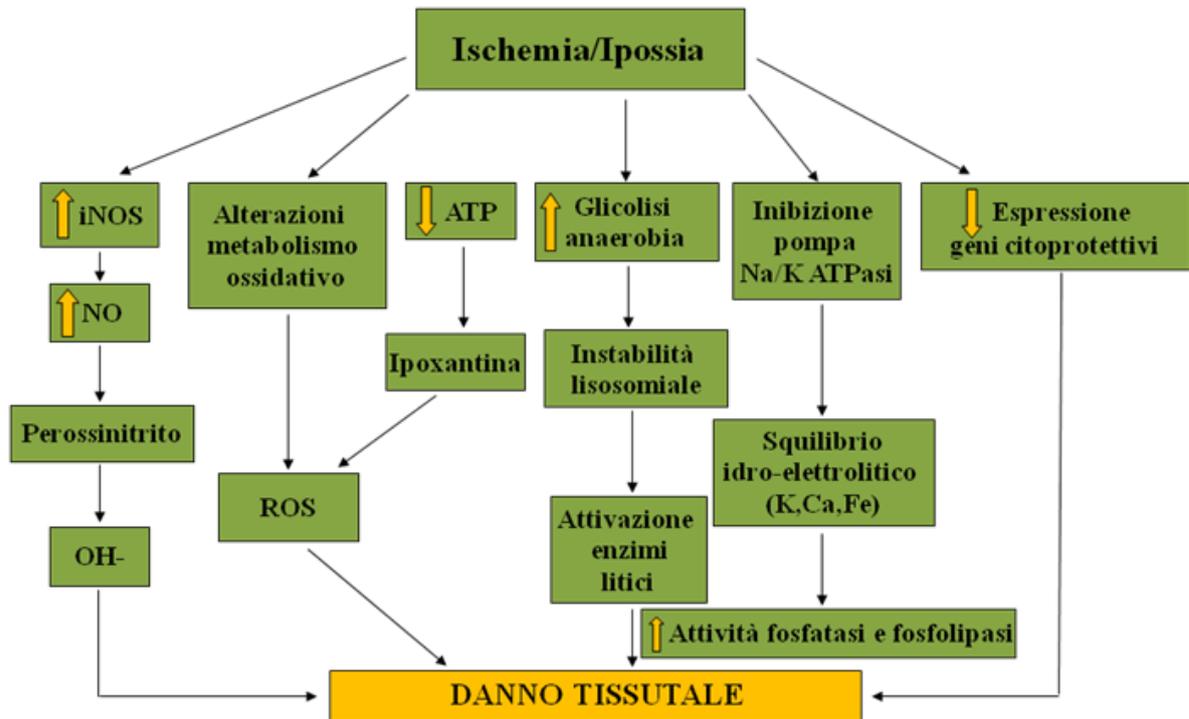


Fig.1 Sintesi degli eventi biochimici coinvolti nel danno tissutale da ipossia.

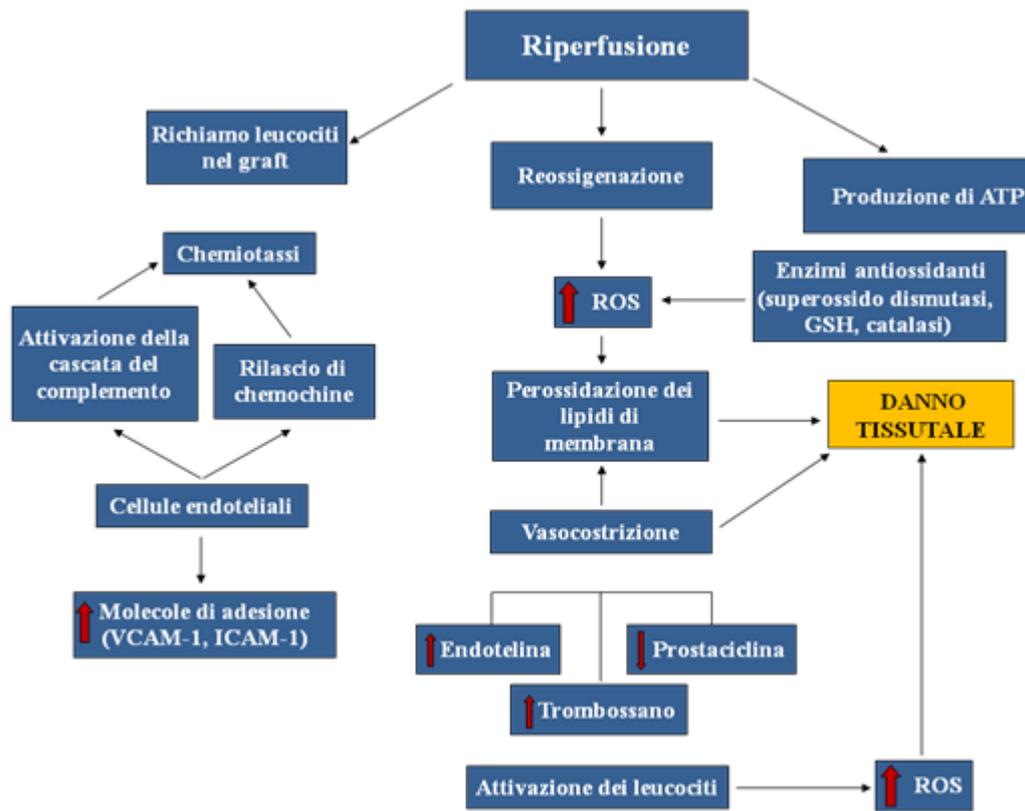


Fig. 2 Sintesi degli eventi biochimici coinvolti nel danno tissutale da riperfusione postischemica.

La Lipocalina Associata alla Gelatinasi Neutrofila (NGAL)

NGAL è una sigla acronimo che identifica la Neutrophil Gelatinase Associate Lipocalin, struttura proteica di 25-kDa identificata per la prima volta da L. Kjeldsen e coll. nel 1993 isolata in associazione con la gelatinasi dei neutrofili (27).

Struttura. Dal punto di vista strutturale NGAL appartiene alla famiglia delle lipocaline . Si presenta come monomero (immagine 1), dimero, trimero e anche sottoforma di un complesso di 92 kDa chiamato anche gelatinase B o metalloproteinase 9 (MMP-9): le forme complessate avrebbero maggiore resistenza all'idrolisi rispetto alle forme monomeriche (28). In condizioni non patologiche è espressa in basse concentrazioni da parte dei neutrofili in numerosi tessuti dell'organismo (dell'epitelio dell'apparato respiratorio, dell'epitelio dello stomaco, fegato, dai reni, trachea, utero, prostata).

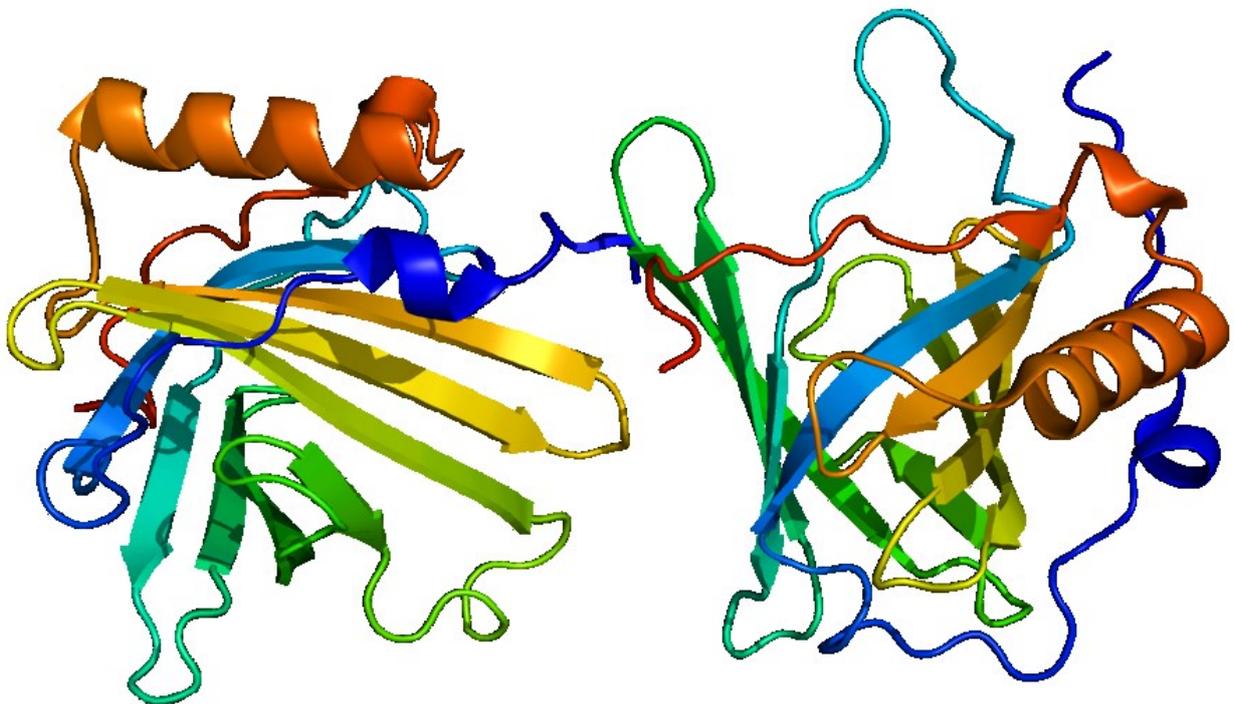


Immagine 1. Struttura della Lipocalina Associata alla Gelatinasi Neutrofila (NGAL) in forma monomerica.

Recettori. Descritti in letteratura due recettori, uno denominato 24p3-R che lega selettivamente Ngal [29], ed un altro recettore, chiamato “Megalina”[30], in grado di legare in maniera non selettiva l'NGAL(tale recettore sembra essere espresso in particolare a livello dell'epitelio dei tubuli renali.)

Funzioni biologiche di NGAL .

E' stato dimostrato che NGAL lega in maniera specifica le proteine “Siderophores”, proteine transmembrana di numerose specie di patogeni agenti come trasportatori di ioni ferro dall'esterno all'interno della cellula, bloccando tale trasporto.

La sintesi di NGAL da parte delle cellule epiteliali e dei neutrofilo è incrementata in caso di infiammazione. E' noto inoltre che l'espressione di NGAL da parte dei neutrofilo aumenta rapidamente a seguito di attivazione di Toll Like Receptor in presenza di una stimolazione del sistema immunitario, è molto probabile che l'NGAL abbia quindi una funzione di tipo batteriostatica nell'ambito dell'immunità innata e aspecifica. (31,32)

NGAL è una proteina reattiva della fase acuta e viene prodotta dal rene dal fegato e dal polmone, e dai neutrofilo, i macrofagi ed altre cellule immunitarie .E' stato recentemente dimostrato che NGAL promuove la differenziazione nel rene di elementi epiteliali immaturi in strutture glomerulari e tubulari (33)

Ad un'attenta analisi della letteratura inoltre NGAL riveste grande importanza come fattore di crescita cellulare, in grado di agire su molteplici serie cellulari, tra cui il rene adulto (34)

La conoscenza del ruolo biologico dei due recettori leganti Ngal a livello delle cellule dell'epitelio tubulare è ancora scarsa, in fase di studio, e potrebbe essere molto importante nella comprensione della fisiopatologia della molecola(33). Evidenze sperimentali indicano che, in vivo, l'attivazione dei recettori dell'NGAL si associa a una maggiore resistenza da parte degli epitelio che li esprimono al danno ischemico, per inibizione dell'apoptosi.

In particolare alcuni autori sostengono che eserciti effetti protettivi nei confronti dell'epitelio renale, come dimostrato da alcuni studi su modelli murini a seguito di un danno da ischemia-riperfusion (35,36).

NGal sierico origina dalla sintesi e/o da una riduzione della clearance di questa proteina legata alla diminuzione della filtrazione renale.

NGAL urinario deriva dal danneggiamento del tubulo renale prossimale con ridotta capacità di riassorbimento della molecola ultrafiltrata a livello glomerulare e/o da un aumento di sintesi di NGAL da parte del rene e dei neutrofilo in sede di danno.

I suoi livelli, sia sierici che urinari, appaiono incrementati in concomitanza di molte condizioni, quali le infezioni, sepsi, malattie renali, ischemia renale, insulti da agenti nefrotossici, diabete, in pazienti anziani, in presenza di comorbidità, incidendo sulla sensibilità e la specificità di questo marcatore.[37].

Alcune ricerche hanno esaminato e confermato il ruolo di NGAL come valido marker predittivo di nefrotossicità a seguito della somministrazione di mezzo di contrasto (38)

Esperimenti preclinici sul modello murino hanno evidenziato come il gene di NGAL sia indotto nel rene di topo immediatamente dopo danno renale acuto dovuto ad insulto ischemico; successivi studi proteomici, sempre eseguiti su topo, hanno confermato tale evidenza sperimentale(39,40,41).

NGAL come marker di danno renale nei pazienti sottoposti a trapianto renale

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

La ricerca nel campo dei biomarcatori sembra essere promettente con particolare riguardo all'utilizzo del biomarker Lipocalina associata alla gelatinasi neutrofila (NGAL) quale indice precoce di DGF nel post-trapianto.

L'NGAL è stato recentemente studiato in via sperimentale per caratterizzare la diagnosi precoce di Delayed Graft Function (ritardo di funzionalità renale post-trapianto) con risultati incoraggianti

[42,43,44].

Da esperimenti preclinici sul modello murino si è messo in evidenza come il gene di NGAL sia indotto nel rene di topo immediatamente dopo insulto ischemico; evidenza sperimentale poi confermato da successivi studi proteomici. Assunto che Ngal è una delle proteine più sintetizzate dalle cellule tubulari renali dopo un insulto ischemico è stato valutato il ruolo di questa lipocalina come marker di acute kidney injury (AKI) nella popolazione dei trapiantati (45). In questo studio condotto pazienti che effettuavano un trapianto di rene da donatore cadavere o da vivente il grado di *staining intensity* di NGAL rilevato nelle biopsie dei pazienti del gruppo cadavere predice il grado di AKI e correla col picco postoperatorio della creatinina sierica e con la richiesta di dialisi post-operatoria.

In un altro studio si è valutato il ruolo di NGAL urinario nei pazienti sottoposti a trapianto renale ed è emerso che i valori urinari di NGAL al giorno 0 predicono lo sviluppo di DGF nel primo periodo post-trapianto: bassi valori urinari di NGAL al giorno 0 correlano col declino della creatinina sierica nei giorni successivi. (46) supportando NGAL urinario come precoce predittore di DGF con una sensibilità superiore agli altri strumenti clinici.

In letteratura è stata verificata inoltre l'opportunità di usare come biomarker NGAL sierico, con i vantaggi legati all'impossibilità di utilizzare NGAL urinario nei primi giorni post trapianto in pazienti oligoanurici. (47)

In questo studio sono stati eseguiti prelievi ematici per il dosaggio di Ngal sierico nelle giornate 1, 3, 6 e 10 successive al trapianto, creatinina e cistatina C. E' stata osservata nei pazienti con pronta ripresa della funzione renale una riduzione di NGAL sierico già in prima giornata post-trapianto, a differenza dei livelli sierici di altri markers che iniziavano a diminuire in maniera significativa solo dalla terza giornata, invece nei pazienti in cui si è verificata DGF non si è registrata una riduzione significativa dei livelli sierici di NGAL che si sono mantenuti più elevati rispetto a quelli riscontrati nei pazienti con pronta funzione del graft (48).

Esistono altri studi in letteratura che supportano l'NGAL sierico nel ruolo di biomarker precoce di

danno renale acuto e DGF al fianco di NGAL urinario (49).

Inoltre è stato esaminato in letteratura anche il possibile ruolo di NGAL quale un nuovo e sensibile marker della funzionalità renale a lungo termine del graft (50,51).

L'identificazione precoce del danno renale è fondamentale per poter instaurare tempestivamente la terapia più appropriata. Allo stato attuale, la diagnosi precoce di DGF e la diagnosi differenziale tra rigetto acuto e nefrotossicità da inibitori della calcineurina è ancora piuttosto difficoltosa, appare ovvia l'importanza di avere a disposizione un marker precoce di DGF al fine di impostare una terapia mirata, ed influire sull'outcome.

L'Eme Ossigenasi

L'enzima eme-ossigenasi-1 (HO1) catalizza la degradazione dell'eme nei suoi prodotti monossido di carbonio (CO), biliverdina e Fe²⁺. Il CO è rilasciato in forma gassosa, la biliverdina viene convertita a bilirubina, ad opera dell'enzima biliverdina reduttasi, mentre il Fe²⁺, legato dalla ferritina, viene veicolato in circolo.

Struttura. Isolate due isoforme con differenti pesi molecolari, antigenicità, sensibilità al calore e risposta agli induttori.

HO1 è espressa ubiquitariamente nei tessuti dei mammiferi, presenta un peso molecolare di 32KDa e la sua espressione viene indotta da stimoli termici (heat shock protein- Hsp32)

HO-2, di 36 KDa localizzata prevalentemente a livello cerebrale e la cui espressione non è influenzata da stimoli termici(52).

A fronte della produzione di radicali liberi e mediatori dell'inflammatione che si verificano durante la condizione di ischemia e soprattutto riperfusione la cellula innesca dei meccanismi di difesa volti a limitare la formazione di queste specie dannose. Tra questi meccanismi particolare importanza riveste il sistema dell'eme ossigenasi.

HO1 è stato dimostrato possiede proprietà antiinflammatorie, antiapoptotiche, antiproliferative(53). L'espressione di HO1 viene principalmente regolata da segnali redox (54,55).

Eme ossigenasi 1 nel danno renale.

L'induzione dell'HO1, cosiddetta rate limiting enzyme nella degradazione dell'eme rappresenta una risposta indispensabile nella protezione contro la tossicità cellulare eme-indotta in vivo. La letteratura conferma la citotossicità dell'eme libero, l'HO1 oltre alla rimozione per degradazione dell'eme fornisce molecole potenzialmente citoprotettive come ferritina, bilirubina e monossido di carbonio (ruolo protettivo dell'eme ossigenasi contro il danno ossidativo nel rene)(56,57,58).

L'effetto protettivo esercitato dall'iperpressione dell'HO1 in condizioni di ri-perfusione postischemica renale ha rilevanti implicazioni terapeutiche nell'ambito dei trapianti d'organo; la capacità di alcune molecole di indurre l'espressione di HO1 potrebbe rappresentare un nuovo approccio terapeutico per la prevenzione dei danni da ri-perfusione postischemica (59).

Recenti studi hanno valutato la correlazione tra i livelli sistemici di HO1 e l'espressione intrarenale del HO1, constatando che in condizioni di danno renale acuto l'aumentata espressione intrarenale di HO1 correla con un incremento della concentrazione plasmatica ed urinaria di HO1.

I dati della letteratura suggeriscono che i livelli plasmatici ed urinari di HO1 hanno un potenziale ruolo di biomarker di danno renale acuto e correlano con lo status intrarenale di HO1 (60)

In letteratura è stata valutata la correlazione tra l'espressione della proteina HO-1 e la ripresa funzionale dell'organo, in seguito ad ischemia ri-perfusione, rivelando un possibile ruolo predittivo del livello di espressione di HO-1 nei confronti della sindrome clinica da ripresa funzionale ritardata (*delayed graft function, DGF*) (61,62,63)

L'obiettivo della nostra ricerca è stato di verificare l'utilità dell'HO-1 sierico quale biomarker in grado di indicare il valore intrarenale dell'HO-1 tenendo conto che l'incremento intrarenale dell'HO-1 presenta specifiche correlazioni con l'insorgenza di danno renale acuto

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

Scopo dello Studio

L'obiettivo principale della ricerca è stato quello di verificare:

- l'utilità di NGAL come marcatore precoce e indice predittivo di DGF nell'immediato post trapianto e se l'andamento di NGAL nella prima settimana dopo trapianto renale presenta specifiche correlazioni con l'andamento del suddetto organo.

- l'utilità dell' HO-1 sierico quale biomarker in grado di indicare il valore intrarenale dell' HO-1 tenendo conto che l'incremento intrarenale dell' HO-1 presenta specifiche correlazioni con l'insorgenza di danno renale acuto.

Il livelli e l'andamento di NGAL e dell' HO-1 saranno correlati con gli indici di funzionalità renale e gli indici clinici del paziente donatore e del ricevente

Materiali e Metodi

Sulla base di una rigorosa analisi del materiale sperimentale e clinico disponibile sono stati individuati alcuni elementi caratterizzanti :

1. i criteri selettivi di scelta della popolazione campione dello studio,
2. scelta dei parametri funzionali della metodologia procedurale relativa al ruolo del dosaggio di biomarcatori nel trapianto di rene,
3. verifica degli obiettivi utili ad evidenziare la precocità della diagnosi di disfunzione renale dell'organo trapiantato, il decorso clinico e di outcome anche in termini di qualità della vita.

Studio prospettico, la popolazione presa in esame include soggetti trapiantati (di sesso maschile e femminile) di età media compresa tra 18-65 anni, sottoposti a trapianto renale singolo o doppio da

donatore vivente o cadavere, nel periodo aprile 2012 - luglio 2013, presso l'Unità Operativa Centro Trapianti del Policlinico Universitario G.Rodolico di Catania diretto dal prof PF.Veroux.

In tutti i pazienti l'intervento chirurgico è stato eseguito dalla medesima Equipe, utilizzando gli stessi protocolli di gestione intraoperatoria. Il management anestesiologicalo dei riceventi ha seguito lo stesso protocollo intraoperatorio e postoperatorio.

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

- Tempo 0 = Al prelievo dell'organo- *donatore*. Prima del trapianto- *ricevente*
- Tempo 1 = prima giornata post operatoria- *donatore (se vivente) e ricevente*
- Tempo 3 = terza giornata post operatoria- *donatore (se vivente) e ricevente*

Inoltre sono stati raccolti e analizzati campioni per dosare HO-1 con la seguente tempistica:

- Tempo 0 = Al prelievo dell'organo- *donatore*. Prima del trapianto- *ricevente*
- Tempo 1 = prima giornata post operatoria - *donatore (se vivente) e ricevente*
- Tempo 3 = terza giornata post operatoria- *donatore (se vivente) e ricevente*

E' stata inoltre valutata la diuresi a 24h e 48 h.

Sono stati poi raccolti alcuni parametri clinici salienti quali età, sesso, parametri antropometrici del donatore e del ricevente.

Abbiamo confrontato l'andamento di NGAL con i livelli di creatinina sierica e diuresi , a seconda che si intenda DGF come persistenza di elevati livelli di creatinina sierica, necessita di dialisi nella prima settimana post trapianto e presenza di oliguria/anuria.

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

Abbiamo infine verificato l'andamento di NGAL in funzione della variazione di alcuni parametri clinici quali età del donatore inferiore o superiore a 60 anni, età del ricevente superiore o inferiore a 60 anni.

Abbiamo inoltre verificato l'andamento dell' HO-1 sierico, quale biomarker in grado di indicare il valore intrarenale dell' HO-1, correlandolo alla ripresa ritardata della funzionalità renale.

Stoccaggio e Analisi dei campioni. I campioni di sangue prelevati a tempi definiti, previsti dal protocollo sperimentale, sono stati esaminati previa conservazione in frigorifero a 4°C fino al loro stoccaggio, e centrifuga a 2500 rpm per 15 minuti, ed il siero è stato dunque congelato a -20°C fino al momento dell'analisi.

Per il dosaggio di NGAL è usato il test fluorimetrico e quantitativo (Biosite-Alere Triage meter) e per il dosaggio di HO-1 un test ELISA (Enzo life). I campioni di siero raccolti ed aliquotati in apposite provette (Eppendorf da 1,5 ml) ed immediatamente congelati a -20 °C per le successive determinazioni.

Risultati

Analisi Statistica. La significatività statistica dei risultati è stata determinata attraverso l'analisi della varianza (ANOVA) con una soglia di significatività pari a $p < 0.0001$ per NGAL sierico e $p < 0,05$ per Creatinina sierica.

La significatività statistica dei risultati è stata determinata attraverso Analisi Multivariata della varianza per HO1.

NGAL	To 594+/-140	T1 320+/-195	T3 207+/-135	P< 0,0001
CREATININA	To 8,8+/-3,4	T1 7,1+/-2	T3 5,4+/-3,5	P< 0,05
DIURESIS	To -	T1 3379+/-2382	T3 2972+/-1577	NS

Tab 1 Ngal, Creatinina e Diuresi Media +/- DS

HO1	To 2,8(1,9-4,9)	T1 5 (3,2-6,9)	T3 4 (3,8-6,3)	P< 0,001
-----	-----------------	----------------	----------------	----------

Tab 2 HO1 Mediana e percentili (25%-75%)

Dopo il trapianto in 7 pazienti si è verificata DGF, intesa come necessita dialitica nella prima settimana post trapianto, nei restanti invece il graft ha avuto una pronta ripresa funzionale.

2 pazienti hanno presentato oliguria in prima giornata post operatoria.

Dalla nostra analisi è emerso che i livelli sierici di NGAL nei 7 pazienti con ripresa funzionale non immediata (*delayed graft function*), sono maggiori rispetto ai pazienti con *immediate graft function* (IGF). Tale differenza risulta statisticamente significativa già in prima giornata post-operatoria ($p=0,007$) oltre che in terza ($p=0,009$). Confrontando i pazienti con DGF e quelli con IGF sono emerse differenze statisticamente significative riguardo i livelli di questo marcatore sierico ($p<0,05$ in prima, terza giornata post trapianto).

Abbiamo valutato anche l'andamento della creatinina nei due gruppi di pazienti, a seconda che sviluppino o meno DGF: i livelli di creatinina sono costantemente maggiori in pazienti che presentano una ritardata ripresa funzionale rispetto a coloro che invece hanno una pronta ripresa del graft; ma diversamente da NGAL tale differenza risulta essere statisticamente significativa in terza giornata post-operatoria ($p=0,0004$).

Abbiamo confrontato l'andamento di NGAL con la diuresi a 24 h e a 48h: dall'analisi dei dati è risultato che i pazienti oligurici in prima giornata post trapianto hanno livelli sierici di NGAL maggiori. Tale differenza risulta statisticamente significativa per i livelli sierici di ngal in terza giornata ($p=0,01$) dal trapianto.

I risultati relativi all'andamento dei valori sierici di ngal in correlazione ai parametri clinici ed antropometrici considerati sono risultati statisticamente non significativi.

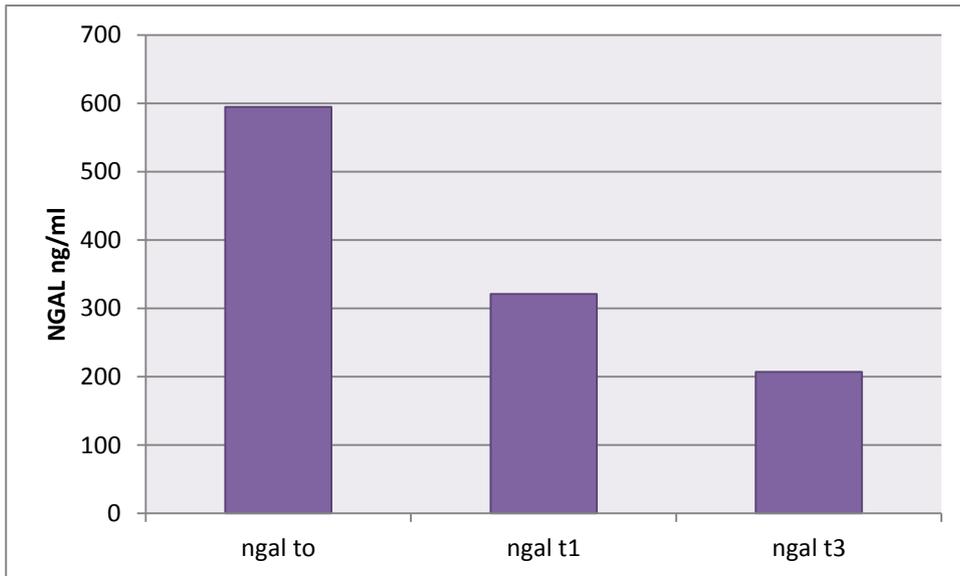


Grafico 1 Andamento di Ngal a T0,T1,T3

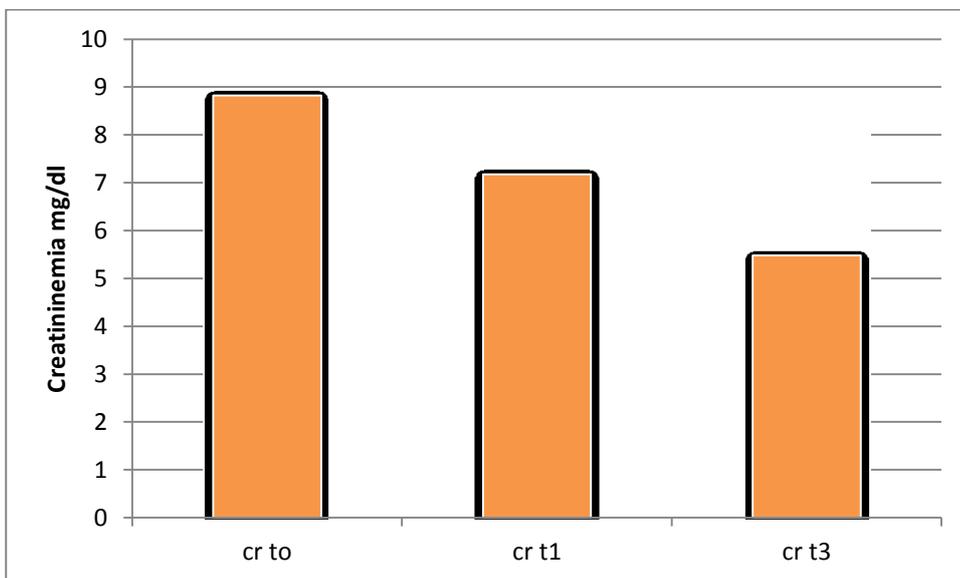


Grafico 2 Andamento di Creatinina a T0,T1,T3

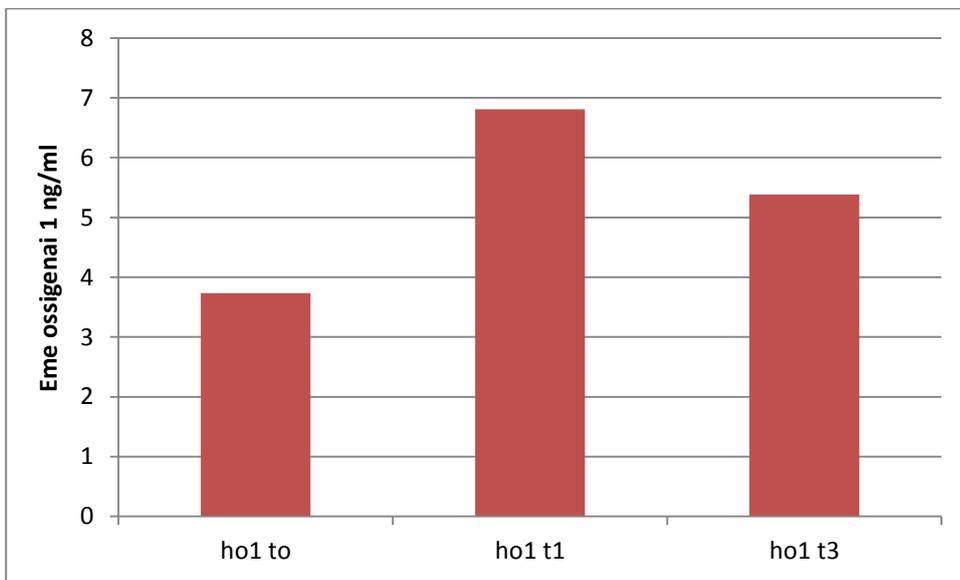


Grafico 3 Andamento di HO1 a T0,T1,T3

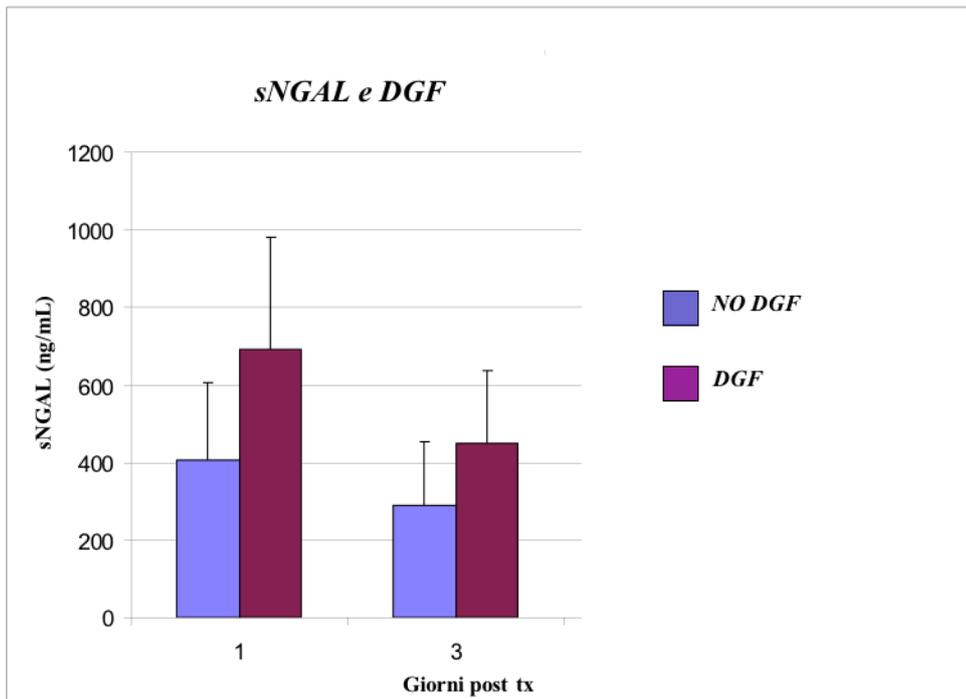


Grafico 4 Andamento di Ngal nei pazienti che sviluppano DGF vs pazienti con IGF

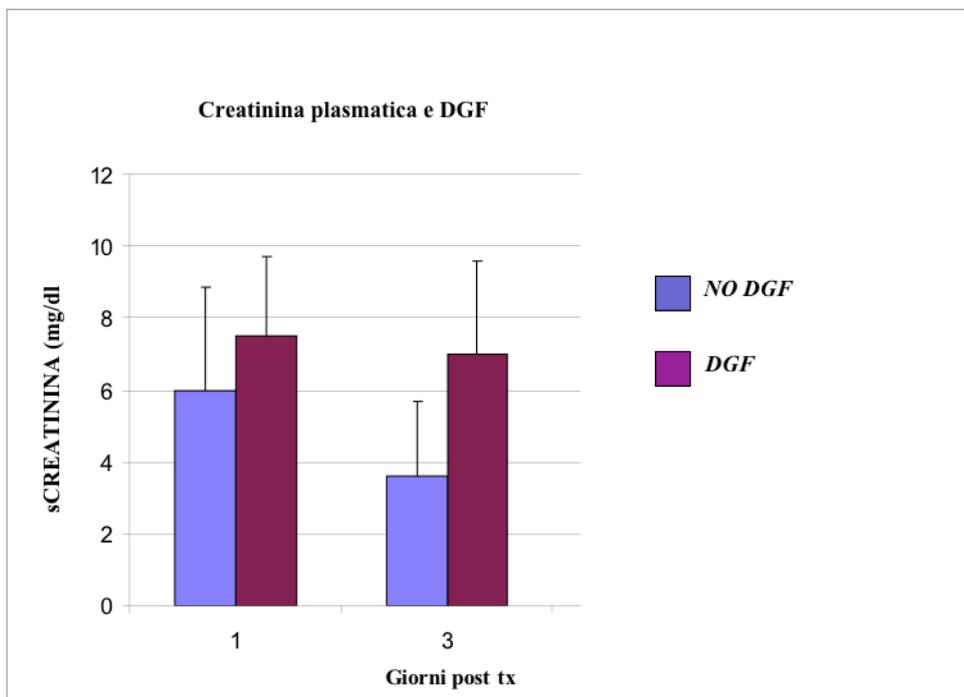


Grafico 5 Andamento di Creatinina nei pazienti che sviluppano DGF vs pazienti con IGF

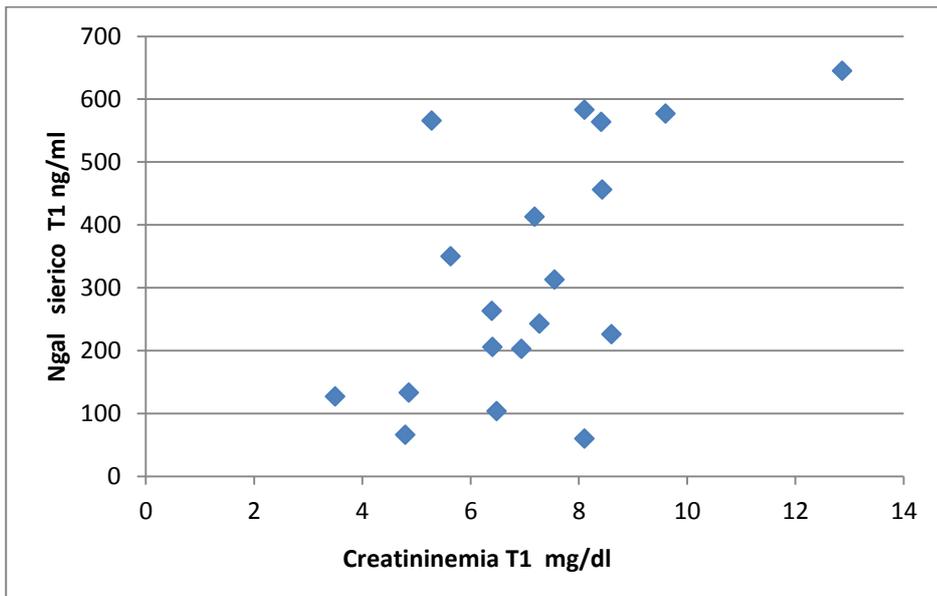


Grafico6. Grafico a dispersione relativo al grado di correlazione Ngal e Creatinina (T1)

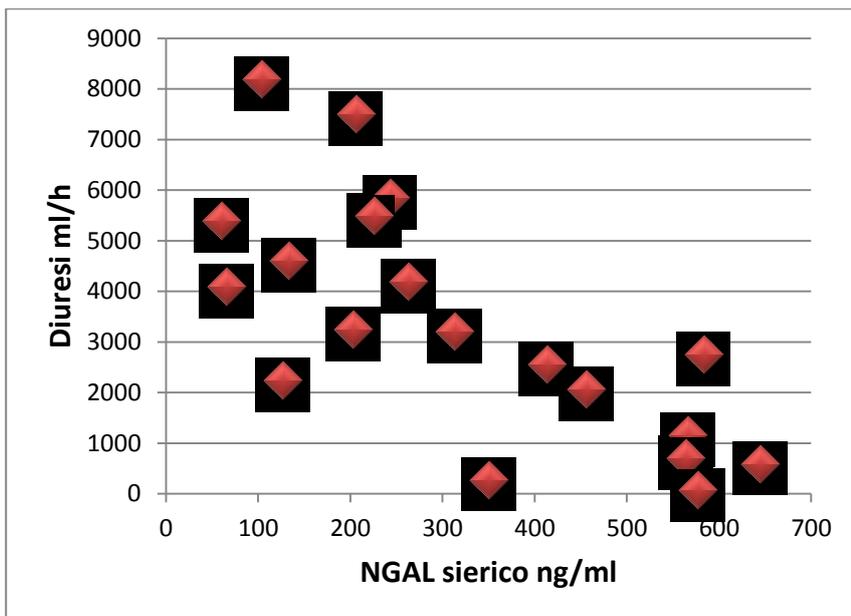


Grafico 7. Grafico a dispersione relativo al grado di correlazione Ngal e Diuresi (T1)

I dati analizzati riguardo la determinazione dei livelli plasmatici di HO1 nell'immediato posttrapianto indicano un incremento della concentrazione plasmatica statisticamente significativo in prima giornata post trapianto ($p < 0,05$)

Altri indicatori quali l'età ed il sesso del ricevente presi in esame sono invece risultati non incidenti o omogenei nell'ambito della popolazione esaminata e non statisticamente significativi.

DISCUSSIONE

Un'entità clinica che ad oggi costituisce uno tra i principali fattori in grado di influire negativamente sull'outcome del trapianto è la *delayed graft function* (DGF), ossia la ritardata ripresa funzionale del graft: nella nostra casistica tale condizione si è verificata in 7 pazienti su 19.

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

Il nostro studio fa emergere che l'andamento di NGAL nella prima settimana dopo trapianto renale presenta specifiche correlazioni con l'andamento della funzione renale.

NGAL si è dimostrato in grado di predire la ritardata ripresa funzionale del graft.

Dal primo al 3 giorno post trapianto NGAL si è dimostrato in grado di predire la ritardata ripresa funzionale del rene trapiantato

Ngal è un efficace predittore di DGF intesa come necessità di dialisi nella prima settimana post trapianto, come livelli di creatinina plasmatica persistenti ovvero mancata ripresa della diuresi .

In particolare, confrontato con la creatinina plasmatica, NGAL rappresenta un marcatore più precoce poiché si eleva già dalla prima giornata post trapianto a differenza della creatinina plasmatica i cui livelli risultano significativamente più elevati solo a partire dalla terza giornata e di elevata sensibilità risultando aumentato più precocemente rispetto al calo della creatinina

Questo dato è in linea con quanto riportato in letteratura: un recente studio sottolinea la sensibilità e specificità nell'identificare la DGF con notevole anticipo rispetto agli strumenti diagnostici in uso(64).

Dal nostro studio è emersa inoltre una correlazione tra i livelli di NGAL e la diuresi nella prima giornata post-trapianto : dall'analisi dei dati è risultato che i pazienti oligoanurici in prima giornata post operatoria hanno livelli sierici di NGAL maggiori; tale differenza risulta statisticamente significativa in terza giornata ($p= 0,01$) dal trapianto.

Nel campione studiato NGAL sierico si è rivelato quindi un buon marker surrogato della ripresa della diuresi, in quanto bassi livelli di NGAL sierico si riscontrano nei pazienti con maggiore output urinario.

Le determinazioni dei livelli di NGAL sierico effettuate in 1 e 3 giornata post operatoria sono risultate correlate con l'andamento della funzione renale nei soggetti esaminati

Altri indicatori quali l'età ed il sesso del ricevente presi in esame sono invece risultati non incidenti o omogenei nell'ambito della popolazione esaminata e non statisticamente significativi.

L'età del donatore, in particolare per donatori oltre i 60 anni, è uno dei principali fattori che aumentano l'incidenza di DGF. Tuttavia a causa della scarsa disponibilità di organi, sempre più frequentemente vengono usati donatori anziani. Nel nostro studio i livelli di NGAL non sembrano influenzati a priori dall'età del donatore, visto che non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra i pazienti che hanno ricevuto il graft da donatori di età inferiore o superiore a 60 anni. Ngal non sembra essere influenzato dall'età del donatore.

La valutazione specifica dei risultati del nostro studio ha messo in evidenza che NGAL può essere considerato un indicatore affidabile nel periodo perioperatorio nel predire la ritardata ripresa funzionale del rene trapiantato poiché è un efficace predittore di DGF

NGAL rappresenta un marcatore precoce poiché si eleva già dalla prima giornata post trapianto a differenza degli altri markers attualmente in uso.

NGAL sierico si è dimostrato altamente predittivo di DGF e vantaggioso in campo diagnostico poiché il prelievo di campioni urinari non è praticabile in pazienti oligoanurici nelle prime giornate posttrapianto.

Limitatamente all'esiguità del campione da noi esaminato, i dati analizzati riguardo la determinazione dei livelli plasmatici di HO1 nell'immediato posttrapianto indicano un incremento della concentrazione plasmatica in prima ed in terza giornata post trapianto. Questo dato è in linea con quanto riportato in letteratura e suggerisce il potenziale utilizzo di HO1 plasmatico quale marker di danno renale da ischemia riperfusione . (60)

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Il trapianto renale costituisce oggi un'opportunità terapeutica il cui limite ad oggi è la durata in termini di efficacia funzionale del Graft, con ampie oscillazioni .

La necessità di individuare precocemente una condizione di danno renale a seguito del trapianto è fondamentale per prevenire la perdita del graft. La maggiore difficoltà è rappresentata dal non avere a disposizione strumenti diagnostici della funzione renale precoci, sensibili e specifici.

L'identificazione precoce della DGF e la diagnosi differenziale con altre condizioni aventi un'analogia presentazione clinica consentirebbe enormi passi avanti nella gestione dei pazienti trapiantati al fine di instaurare precocemente la terapia più appropriata e migliorarne l'outcome. Incoraggianti studi su animali da laboratorio asseriscono che un danno renale da ischemia può essere prevenuto e trattato intervenendo precocemente, nelle fasi immediatamente successive all'insulto ischemico (65).

La capacità di NGAL di prevedere precocemente l'insorgenza di danno renale acuto è vantaggiosa nel campo del trapianto renale: NGAL infatti si è rivelato capace di predire la ripresa funzionale del graft e l'eventuale insorgenza di DGF (*delayed graft function*), ed inoltre permette di stratificare il rischio e possiede valore prognostico.

La valutazione specifica dei risultati del nostro studio, nonostante l'esiguità del campione in esame che rappresenta una limitazione, ha messo in evidenza NGAL come indicatore affidabile nel periodo perioperatorio della funzionalità renale posttrapianto.

NGAL è risultato un biomarcatore con elevata efficacia anche nel monitorare l'andamento della funzionalità renale nelle prime fasi post trapianto.

Grazie a queste caratteristiche l'uso del biomarker Ngal consentirebbe l'identificazione precoce dei pazienti a rischio di danno renale acuto e l'attuazione di strategie terapeutiche preventive o comunque tese a contenere la lesione ed evitare o ridurre al minimo le conseguenze.

Limiti. I livelli di Ngal, sia sierici che urinari, appaiono incrementati in concomitanza di molte condizioni incidendo sulla sensibilità e la specificità di questo marcatore, specialmente in determinate categorie di pazienti (66,67).

Per questi motivi e per la complessità del fenomeno, un solo marcatore, seppur promettente come NGAL, non può essere sufficiente: sarà necessario ricorrere a più marcatori per aumentare l'accuratezza della diagnosi.

Prospettive. Allo stato attuale in caso di DGF la diagnosi differenziale tra rigetto acuto e nefrotossicità da inibitori della calcineurina è ancora piuttosto difficoltosa, è chiaro quanto sia importante poter contare su un marker precoce di DGF come NGAL per poter impostare precocemente la terapia mirata.

Hall et al. suggeriscono che il dosaggio di biomarker come NGAL e IL-18 nella prima giornata post-operatoria può servire, non solo per quantificare la severità del danno che il graft ha subito durante le varie fasi del trapianto e stimare il tempo necessario per la sua ripresa, ma anche per indirizzare i clinici verso la scelta del regime immunosoppressivo fino al recupero funzionale del rene. (42,43). NGAL, dunque, come indicatore nella scelta terapeutica nell'immediato post-trapianto.

Ad oggi uno dei limiti del trapianto renale è rappresentato dalla carenza di organi, a questo proposito un potenziale utilizzo di Ngal quale strumento utile a valutare la limitazione/prevenzione della DGF, porterebbe ad un possibile ampliamento del "pool dei donatori".

Sarebbe auspicabile l'utilizzo di NGAL nella fase di stabilizzazione funzionale del graft quale strumento in grado di predire il grado di recupero funzionale del graft.

Vantaggiosa è la metodica di determinazione di Ngal in quanto non è invasiva e attuabile in poche ore grazie alla presenza in commercio di kit capaci di compiere questa procedura, e poco costosa. NGAL sierico si è dimostrato particolarmente vantaggioso in quei pazienti oligo-anurici, nel quale il prelievo di campioni urinari non può essere eseguito nelle prime giornate posttrapianto.

Ulteriori studi saranno utili in futuro per comprenderne maggiormente le funzioni e per validare questo nuovo marcatore ed il suo utilizzo nella pratica clinica per la gestione del paziente trapiantato. (68)

E' chiaro che la possibilità di ripristinare l'equilibrio tra fattori ossidanti ed antiossidanti , alteratosi durante la riperfusione post-ischemica, rappresenta un importante approccio terapeutico per prevenire o ridurre l'insorgenza di danno renale e conseguente disfunzione nei trapianti d'organo.

L'effetto protettivo esercitato dall'iperespressione dell'HO1 in condizioni di riperfusione postischemica renale ha rilevanti implicazioni terapeutiche, la capacità di alcune molecole di indurre l'espressione di HO1 potrebbe rappresentare un nuovo approccio per la prevenzione dei danni da riperfusione postischemica; inoltre il potenziale utilizzo del dosaggio di HO1 plasmatico il cui valore riflette lo stato di HO1 intrarenale quale biomarker di danno renale acuto sembra promettente e meritevole di ulteriori approfondimenti clinici.

Bibliografia

- 1) (Shoskes DA, Cecka JM. Deleterious effects of delayed graft function in cadaveric renal transplant recipients independent of acute rejection. *Transplantation*. 1998 Dec 27; 66(12): 1697-701)
- 2) (Yarlagadda SG, Coca SG et al. Association between delayed graft function and allograft and patients survival: a systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant*. (2009) 24: 1039-1047)
- 3) (Ronco C. N-GAL: Diagnosing AKI as soon as possible. *Crit Care* 2007; 11 (6): 173)
- 4) (Halawa A. The early diagnosis of acute renal graft dysfunction: a challenge we face. The role of novel biomarkers. *Ann Transplant* 2011 23;16(1): 90-8)
- 5) (Oberbauer R. Biomarkers- a potential route for improved diagnosis and management of ongoing renal damage. *Transplant. Proc.* 2008 Dec; 40 (10 Suppl.): S44-7)
- 6) (Prasad Devarajan. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a promising biomarker for human acute kidney injury. *Biomark Med* 2010 4(2):265-280)
- 7) (Ronco C. NGAL: an emerging biomarker of acute kidney injury. *Int J Artif Organs* 2008 Mar; 31(3): 199-200)
- 8) (Haase M, Bellomo R, Devarajan P et al. Accuracy of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 2009; 54(6): 1012-24)
- 9) (Haimovici H. An evaluation of special problems in arterial embolism. *Arch Surg* 1960; 80:1-11)
- 10) (Boros P, Bromberg JS. New cellular and molecular immune pathways in ischemia/reperfusion injury. *Am J Transplant* 2006, 6:652-8)

- 11) (Baan C, Peeters A, Lemos F et al. Fundamental role for HO-1 in the selfprotection of renal allografts. *Am J Transplant* 2004, 4:811-8.)
- 12) (Kobayashi T, Sato Y, Yamamoto S et al. Augmentation of heme oxygenase-1 expression in the graft immediately after implantation in adult living-donor liver transplantation. *Transplantation* 2005, 79:977- 80).
- 13) (Haugen E, Nath KA. The involvement of oxidative stress in the progression of renal injury. *Blood Purif* 1999, 17:58–65.)
- 14) (Ernster L. Biochemistry of reoxygenation injury. *Crit Care Med* 1988; 16(10):947-953)
- 15) (Castaneda PM, Swiatecka-Urban A, Mitsnefers MM, et al. Activation of mitochondrial apoptotic pathways in human, renal allografts after ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 2003, 76:50–54.)
- 16) (Woodson BW, Wang L, Mandava S, Lee BR. [Urinary Cystatin C and NGAL as Early Biomarkers for Assessment of Renal Ischemia-Reperfusion Injury: A Serum Marker to Replace Creatinine?](#) *J Endourol.* 2013 Nov 22)
- 17) Zeraati A.A., Naghibi M., Kianoosh S. et al. Impact of slow and delayed graft function on kidney graft survival between various subgroups among renal transplant patients. *Transpl Proc.* (2009) 41, 2777-2780)
- 18) (Hollmen M, Kyllonen L, Inkinen K et al. Deceased donor neutrophil gelatinase-associated lipocalin and delayed graft function after kidney transplantation: a prospective study. *Critical Care* 2011, 15:R121)
- 19) (USRDS 2010 Annual Data Report)
- 20) (Shoskes DA, Halloran PF. Delayed graft function in renal transplantation: etiology, management and long-term significance. *J Urol* 1996, 155:1831–40.)

- 21) (Senel FM, Karakayali H, Moray G, Haberal M. Delayed graft function: predictive factors and impact on outcome in living related kidney transplantations. *Ren Fail* 1998, 20:589–95)
- 22) (The Organ Procurement and Transplantation Network <http://www.OPTN.org>)-
- 23) (Zeraati A.A., Naghibi M., Kianoosh S. et al. Impact of slow and delayed graft function on kidney graft survival between various subgroups among renal transplant patients. *Transpl Proc.* (2009) 41, 2777-2780).
- 24) (Halloran PF, Hunsicker LG. Delayed graft function: state of the art. *Am J Transplant* 2001, 1:115–20.)
- 25) (Irish WD, McCollum DA, Tesi RJ et al. Nomogram for predicting the likelihood of delayed graft function in adult cadaveric renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Nov; 14(11): 2967-74)
- 26) (Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, et al. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 2004, 364:1814-27)
- 27) (L. Kjeldsen, A. Johnsen, H. Sengelov et al., 1993, *Isolation and Primary Structure of NGAL, a Novel Protein Associated with Human Neutrophil Gelatinase*, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol 268, n 14, pp. 10425-10432)
- 28) (Strong RK, Bratt T, Cowland JB et al. Expression, purification, crystallization and crystallographic characterization of dimeric and monomeric human neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 1998 Jan 1; 54 (Pt1): 93-5
- 29) (L.R. Devireddy, C. Gazin, X. Zhu et al. 2005 Cell surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake, *Cell* 123: 1293-1305)
- 30) (V. Hvidberg, C. Jacobsen, R.K. Strong, et al. 2005 The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS let* 579:773-777)

- 31) (Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N et al. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Molec Cell*. 10: 1033-1043, 2002)
- 32) (Flo TH, Smith KD, Sato S et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 432: 917-921, 2004)
- 33) (Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY et al. Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Feb; 18 (2): 407-13)
- 34) (Bolignano D, Donato V, Coppolino G et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (N-GAL) as a marker of kidney damage. *Am J Kidney Dis*. 2008; 52:595-605)
- 35) (Mori K, Lee HT, Rapoport D et al. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest*. 2005 Mar; 115(3): 610-21)
- 36) (Mishra J, Mori K, Ma Q et al. Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Dec; 15(12): 3073-8)
- 37) [K.Mori, K.Nakao, 2007, Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. *Kidney INT*].
- 38) Hirsch R, Dent C, Pfriem H et al. NGAL is an early predictive biomarker of contrast-induced nephropathy in children. *Pediatr Nephrol*. 2007; 22:2089-95)
- 39) (Supakevin S, Zhang W, Kucherlapati R et al. Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion. *Kidney Int*. 2003; 63:1714-24)
- 40) (Zappitelli M, Washburn KM, Arikan AA et al. Urine NGAL is an early biomarker of acute kidney injury in critically ill children. *Crit Care* 2007;11:R84)

- 41) (E. Moore, R. Bellomo, A. Nichol, 2010, *Biomarkers of acute kidney injury in anesthesia, intensive care and major surgery: from the bench to clinical research to clinical practice*, *Minerva Anesthesiologica*, 76(6):425-40)
- 42) (I.E. Hall, S. G. Coca, Z. Wang et al., 2012, IL-18 and Ngal predict dialysis after kidney transplantation, *JASN*, sept, 21(1):189-97)
- 43) (I. E. Hall, S. G. Coca, C. R. Parikh et al, 2010, IL-18 and urinary NGAL predict dialysis and graft recovery after kidney transplantation, *J Am Soc Nephrol*, 21(1):189-97)
- 44) Fonseca I, Oliveira JC, Almeida M, et al. [Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in Kidney Transplantation Is an Early Marker of Graft Dysfunction and Is Associated with One-Year Renal Function.](#) *J Transplant*. 2013;2013:650123.
- 45) (Mishra J, Ma Q, Kelly C et al. Kidney NGAL is a novel early marker of acute injury following transplantation. *Pediatr Nephrol*. (2006) 21: 856-863)
- 46) (Parikh CR, Jani A, Mishra J et al. Urine NGAL and IL-18 are predictive biomarkers for delayed graft function following kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2006 Jul; 6(7): 1639-45)
- 47) (Lebkowska U, Malyszko J et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and Cystatin C could predict renal outcome in patients undergoing kidney allograft transplantation: a prospective study. *Transplant Proc*. 2009 Jan-Feb; 41(1): 154-7)
- 48) (Kusaka M, Kuroyanagy Y, Mori T et al. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a predictor of organ recovery from delayed graft function after kidney transplantation from donors after cardiac death. *Cell Transplant*. 2008; 17(1-2): 129-34)
- 49) (Malyszko J, Malyszko JS et al. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin correlates with kidney function in renal allograft recipients. *Clin Transplant* 2009; 23: 681-686)

- 50) (Malyszko J, Malyszko JS et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a new and sensitive marker of kidney function in chronic kidney disease patients and renal allograft recipients. *Transplant Proc.* 2009; 41:158-61)
- 51) (Wasilewska A, Zoch-Zwier W, et al Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a new biomarker of cyclosporine nephrotoxicity? *Pediatr Nephrol.* 2010; 25:889-897)
- 52) Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. Microsomal Heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 1969; 244(23):6388-6394
- 53) Maines MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanism and clinical applications. *FASEB. J.* 1988, 2:2557-68.
- 54) Matsumoto H, Ishikawa K, Itabe H, Maruyama Y. Carbon monoxide and bilirubin from heme oxygenase-1 suppresses reactive oxygen species generation and plasminogen activator inhibitor-1 induction. *Mol Cell Biochem* 2006, 291:21-8.
- 55) Lee SS, Gao W, Mazzola S, Thomas MN, Csizmadia E, Otterbein LE, et al. Heme oxygenase-1, carbon monoxide, and bilirubin induce tolerance in recipients toward islet allografts by modulating T regulatory cells. *FASEB J* 2007, 21:3450-7.
- 56) Li Volti G., Sorrenti V, Murabito P et al. Pharmacological induction of heme oxygenase-1 inhibits iNos and oxidative stress in renal ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 2007; 39(10):2986-2991.
- 57) Lin Q, Weis S, Yang G et al. Heme oxygenase 1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *J Biol Chem* 2007; 282(28): 20621-20633
- 58) Tracz MJ, Nath KA. Physiology and pathophysiology of heme: implications for Kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18(2): 414-420
- 59) Nath KA. Heme oxygenase-1 and acute kidney injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2013 Nov 22

- 60) Zager RA, Johnson AC, Becker K. Plasma and urinary Heme oxygenase-1 in AKI. *J Am Soc Nephrol* 2012 ; 23 (6):1048-1057.
- 61) Öllinger R, Kogler P, Biebl M, Sieb M, Sucher R, Troppmair J, Mark W, Weiss H, Margreiter R. Protein levels of heme oxygenase-1 during reperfusion in human kidney transplants with delayed graft function. *Clin Transplant* 2008, 22:418–23.)
- 62) Öllinger R, Kogler P, Biebl M, Sieb M, Sucher R, Troppmair J, Mark W, Weiss H, Margreiter R. Protein levels of heme oxygenase-1 during reperfusion in human kidney transplants with delayed graft function. *Clin Transplant* 2008, 22:418–23.
- 63) Li L, Zhang L, Peng L et al. Heme oxygenase-1 is the candidate targeting for organ transplantation. *Chin Med J* 2010; 123(15):2128-2134
- 64) (Kusaka M, Kuroyanagy Y, Mori T et al. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a predictor of organ recovery from delayed graft function after kidney transplantation from donors after cardiac death. *Cell Transplant*. 2008; 17(1-2): 129-34)
- 65) (Mishra J, Dent C, Tarabishi R et al. Neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* 2005; 365: 1231-38)
- 66) (Nguyen MT, Devajaran P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Pediatr Nephrol*. 2008;23: 2152-2157)
- 67) (Nejat M, Pickering J, Devarajan et al. Some biomarkers of acute kidney injury are increased in prerenal acute injury. *International Society of Nephrology* 10.138/ki.2012.23)
- 68) (Schiffil H. Update on biomarkers of acute kidney injury : moving closer to clinical impact? 2012. *Molecular diagnosis and therapy*)