

# SINDROME CARDIORENALE DI TIPO 1: POSSIBILI MECCANISMI PATOFISIOLOGICI ALLA BASE DI QUESTA SINDROME

Grazia Maria Virzi<sup>1,2</sup>, Massimo de Cal<sup>1,2</sup>, Dinna N. Cruz<sup>1,2</sup>, Chiara Bolin<sup>3</sup>, Giorgio Vescovo<sup>3</sup>, Claudio Ronco<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Nefrologia, Dialisi e Trapianto Renale, Ospedale "San Bortolo", Vicenza

<sup>2</sup>IRRV - International Renal Research Institute, Vicenza

<sup>3</sup>Medicina Interna, Ospedale "San Bortolo", Vicenza

## Type 1 cardiorenal syndrome and its possible pathophysiological mechanisms

Cardiorenal syndrome (CRS) type 1, consisting of acute cardiac events leading to acute kidney injury (AKI), is characterized by multiple factors and its pathophysiology is very complex. Given the circulating nature of many inflammatory mediators, it is tempting to examine the immune-mediated mechanism as a mediator of organ crosstalk. In this pilot study, we examined the possible role of immune-mediated mechanisms in the pathogenesis of this syndrome.

We enrolled 12 patients with acute heart failure (AHF), 7 patients with type 1 CRS, and 5 healthy volunteers. EDTA plasma samples from the 3 groups were incubated with a monocyte cell line (U937) and cell apoptosis was subsequently evaluated by different methods. In addition, quantitative determination of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-18 production in the supernatants was performed by ELISA.

In U937 cells treated with type 1 CRS plasma, the results showed DNA ladder formation with different molecular weight fractions, suggesting the presence of apoptotic events. In fact, quantitative analysis of apoptosis and caspase-3 levels showed significantly higher apoptosis rates in cells incubated with plasma from patients with type 1 CRS ( $p < 0.05$ ). TNF- $\alpha$  levels in the supernatants were significantly elevated in both the AHF and type 1 CRS groups compared with control subjects ( $p < 0.05$ ). Furthermore, in patients with type 1 CRS the levels of the proinflammatory cytokines IL-6 and IL-18 were significantly higher than in AHF patients and the control group ( $p < 0.05$ ).

This pilot study explores the premise of an immune-mediated process in the pathophysiology of type 1 CRS. These preliminary findings suggest the presence of defective regulation of apoptosis in patients with this syndrome and the involvement of an immune-mediated mechanism in its pathogenesis. Furthermore, inflammatory pathways seem to play a central role in organ crosstalk and may be fundamental to distant organ damage.

Conflict of interest: None

Financial support: The study was supported by Ricerca Sanitaria Finanziata of the Veneto region (RSF No. 303/09).

Approval for the study was obtained from the ethics committee of Azienda Ulss 6 (San Bortolo Hospital), Vicenza.

## KEY WORDS:

Apoptosis,  
Cytokines,  
Inflammation,  
Acute heart  
failure,  
Cardiorenal  
syndrome

## PAROLE CHIAVE:

Apoptosi,  
Citochine,  
Infiammazione,  
Scompenso  
cardiaco,  
Sindrome  
cardiorenale

## Indirizzo degli Autori:

Dr.ssa Grazia Maria Virzi  
Dipartimento Nefrologia, Dialisi e  
Trapianto Renale  
IRRV - International Renal Research  
Institute  
Ospedale San Bortolo  
Via Rodolfi 37  
36100 Vicenza  
e-mail: grazia.virzi@gmail.com

## INTRODUZIONE

L'interazione bidirezionale e di multipli segnali tra cuore e rene sono importanti fattori coinvolti nella progressione dei diversi stati di malattia per entrambi

gli organi. Infatti, cuore e reni sono organi coinvolti in processi fisiologici comuni come la regolazione emodinamica e quella neuro-ormonale e dovrebbero essere considerati come un dipolo con interconnessioni multiple di tipo fisico, chimico e biologico, piuttosto

che come due organi distinti e indipendenti. Questo è il principio che sta alla base del concetto di "sindrome cardiorenale" (CRS) (1). L'esistenza di questa stretta e duplice relazione tra questi due organi presuppone che una patologia primitiva acuta o cronica a carico di uno di questi due organi spesso causa il coinvolgimento secondario dell'altro apparato danneggiandolo o alterandone i meccanismi fisiologici (1); inoltre, l'incremento di questo circolo vizioso può determinare un danno progressivo fino alla disfunzione d'organo (2). Recentemente, per enfatizzare la natura combinata e biunivoca della relazione cuore-rene e per includere tutti i possibili eventi patofisiologici, la sindrome cardiorenale è stata dettagliatamente classificata in cinque sottotipi, in modo da chiarire la nosografia della sindrome (1). Le recenti ricerche scientifiche stanno indagando ed esplicitando le varie interazioni coinvolte nel *crosstalk* tra questi organi.

La CRS di Tipo 1 è caratterizzata da un rapido peggioramento della funzione cardiaca che porta a un danno renale acuto (*Acute Kidney Injury, AKI*). Soltanto negli Stati Uniti, più di un milione di pazienti è ricoverato in ospedale ogni anno per scompenso cardiaco acuto (*Acute Heart Failure, AHF*) de novo sia per scompenso cardiaco acuto che cronico (3). Tra questi pazienti, la pregressa presenza di una disfunzione renale cronica è piuttosto comune ed è un fattore predisponente l'AKI (3, 4). Approssimativamente un terzo dei pazienti con AHF sviluppa AKI, definito come un incremento del valore della creatinina sierica di  $\geq 0.3$  mg/dL rispetto al valore base registrato (5). Lo studio ESCAPE dimostra che il 40% dei pazienti con scompenso cardiaco acuto sviluppa un peggioramento della funzionalità renale durante il ricovero con peggioramento dell'*outcome* (6). Inoltre, i pazienti che sviluppano AKI in seguito a un evento cardiaco acuto hanno un aumentato rischio di morte, in maniera indipendente da altri fattori (7).

I meccanismi patologici che provocano AKI secondariamente all'insorgenza di scompenso cardiaco acuto sono molteplici e molto complessi; comprendono la morte delle cellule endoteliali ed epiteliali renali e processi immunologici e infiammatori. Recenti studi hanno dimostrato un ruolo patogenetico dell'apoptosi nello sviluppo del danno renale acuto (8).

Per quanto riguarda la CRS di Tipo 1, la sua patofisiologia non è ancora completamente nota, poiché coinvolge molteplici e articolati processi interconnessi tra loro. Nello specifico, è stato ipotizzato che la disregolazione del Sistema Immunitario con alterazioni della risposta immunitaria e l'attivazione di uno stato di infiammazione cellulare e il conseguente rilascio di citochine siano i potenziali meccanismi patogenetici coinvolti in questa sindrome e nel *crosstalk* tra cuore e rene.

Numerosi processi fisici, chimici e biologici potreb-

bero avere un ruolo chiave nella patogenesi della sindrome; in particolare, l'attivazione della risposta immunitaria, l'infiammazione e l'attivazione di *pathway* apoptotici potrebbero essere attivamente coinvolti nel processo patologico. Di conseguenza, il danno d'organo immuno-mediato, l'alterazione nella risposta immunitaria con aumentata apoptosi e rilascio di citochine e il cambiamento funzionale delle cellule del Sistema Immunitario potrebbero essere potenziali meccanismi d'azione coinvolti nella patogenesi della sindrome (1).

Recenti studi hanno evidenziato che nel danno cardiaco vi è un coinvolgimento del Sistema Immunitario con specifica funzione di immuno-modulazione della risposta immunitaria e l'attivazione di citochine infiammatorie a livello del miocardio, l'apoptosi dei miociti e l'attivazione di metalloproteasi della matrice (9). Altri studi sperimentali hanno, inoltre, messo in luce il contributo fondamentale del Sistema Immunitario alla patogenesi del danno renale acuto e il ruolo principe dell'infiammazione nella progressione dell'AKI (10, 11). Lee et al. hanno evidenziato l'importante ruolo delle citochine nella patofisiologia dell'AKI (12). Infatti, un livello elevato di citochine pro-infiammatorie è stato riscontrato sia nei topi sia negli uomini con danno renale acuto (13). Per avvalorare questo concetto, è stato dimostrato che molte citochine sono rilasciate dai leucociti e dalle cellule tubulari renali nel rene danneggiato; infatti, esse risultano essere importanti componenti sia durante l'instaurarsi che per la progressione dell'infiammazione dell'AKI (12).

Questo studio pilota si è proposto l'obiettivo di esaminare il possibile ruolo di un meccanismo immuno-mediato nella patogenesi della CRS di Tipo 1. L'obiettivo principale è stato dimostrare *in vitro* che il plasma proveniente da pazienti con CRS di Tipo 1 è in grado di scatenare un'anomala risposta cellulare, risultante in apoptosi e rilascio di citochine nel surnatante cellulare.

## MATERIALI E METODI

### Popolazione analizzata

Lo studio ha previsto l'arruolamento di sette pazienti con CRS di Tipo 1, definita in accordo con il sistema di classificazione attuale (1), di dodici pazienti con scompenso cardiaco acuto (AHF) ma senza conseguente sviluppo di AKI e di cinque soggetti sani. Tutti i pazienti presentanti AKI prima dell'episodio di AHF o con altre potenziali cause di AKI sono stati esclusi dallo studio. In entrambi i gruppi sono stati arruolati solo pazienti con eGRF  $>60$  mL/min/1.73 m<sup>2</sup> stimato con l'equazione MDRD (*Modification of Diet in Renal Disease*).

In questo studio pilota, abbiamo incluso anche pa-

zienti con AHF e senza conseguente sviluppo di AKI per analizzare nel miglior modo possibile il contributo del solo scompenso cardiaco all'apoptosi dei monociti. L'AKI è stato definito basandosi sui criteri AKIN (*Acute Kidney Injury Network*) (14).

Per ogni paziente arruolato, al ricovero, sono stati raccolti i dati clinici come le informazioni demografiche, le informazioni inerenti alla precedente storia cardiaca e renale, l'eventuale terapia farmacologica utilizzata, le co-morbidità e il motivo del ricovero in ospedale. Inoltre, sono stati eseguiti gli esami previsti di routine per i pazienti ricoverati come le misurazioni emodinamiche (pressione arteriosa sistolica/diastolica), i dati di laboratorio (emocromo, urea, creatinina, albumina, esame delle urine, emoglobina, globuli bianchi) e lo screening bioumorale standard (p. es., *Brain Natriuretic Peptide*, BNP).

### Campioni biologici

I campioni di sangue sono stati raccolti dai pazienti reclutati al primo giorno di ricovero nel Reparto di Medicina Interna dell'Ospedale San Bortolo di Vicenza. In aggiunta, è stato raccolto un campione di sangue entro 24 ore dall'insorgenza di AKI per i pazienti con CRS di Tipo 1. Il sangue è stato raccolto in tubi contenenti EDTA come anticoagulante e conseguentemente centrifugati. Il plasma è stato immediatamente aliquotato e stoccato a -80°C fino al momento dell'uso.

Il protocollo sperimentale e il modulo del consenso informato sono stati visionati e approvati dal Comitato Etico dell'Ospedale San Bortolo. Tutti i pazienti arruolati sono stati adeguatamente informati sul protocollo sperimentale e sugli scopi dello stesso prima di firmare il consenso informato e di procedere con il prelievo ematico. I campioni provenienti dai pazienti e dai controlli sani sono stati processati in maniera analoga.

### Modello cellulare: U937

Le cellule U937 sono una linea cellulare di precursori di monociti derivati da cellule maligne dell'effusione pleurale di un maschio caucasico con un linfoma istiocitico diffuso.

La modalità di crescita di questa linea cellulare è in sospensione.

Le cellule U937 sono state coltivate in terreno RPMI 1640 (*International PBI Milano, Italia*) integrato con il 10% di siero fetale bovino (*Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA*), precedentemente inattivato al calore (30 minuti a 56 °C) e completato con 2 mM L-glutamina, 100 IU/mL penicillina e 100 µg/mL streptomina (*Sigma Chemical Co., St. Louis, MO,*

*USA*). Le U937 sono state mantenute in un incubatore a 37 °C in atmosfera controllata con aria umidificata al 5% di CO<sub>2</sub> e passate ogni due-tre giorni. La vitalità cellulare è stata saggiata con il Trypan Blue (*Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA*) ed è risultata del 99%. La conta per il saggio di vitalità è stata realizzata sulla media di 9 quadranti della cameretta di Burker.

### Induzione dell'apoptosi

La concentrazione cellulare finale utilizzata per l'esperimento è stata di 1x10<sup>5</sup> cellule per pozzetto in una piastra da 96 pozzetti; le U937 sono state incubate con il 50% di RPMI 1640 completato con 2 mM L-glutamina, 100 IU/mL penicillina e 100 mg/mL streptomina e con il 50% di plasma anti-coagulato con EDTA proveniente dai pazienti con CRS di Tipo 1, con AHF e dai Controlli sani (37 °C in 5% CO<sub>2</sub>) per 24 ore (15, 16). Le cellule utilizzate come controllo negativo hanno ricevuto solo RPMI 1640 completo. Prima di essere utilizzate per l'esperimento, le cellule sono state lavate due volte con Dulbecco PBS (senza Calcio e Magnesio), a pH 7.4.

### Valutazione dell'apoptosi

#### - Valutazione della frammentazione del DNA

La frammentazione del DNA è stata valutata usando *Apoptotic DNA Ladder Extraction KIT* (*BioVision, Mountain View, CA, USA*), seguendo le indicazioni e il protocollo forniti dalla ditta produttrice.

La frammentazione tipica a ladder è stata rilevata e valutata attraverso separazione con elettroforesi su gel di agarosio all'1.2% colorato con *Syber Safe* (*In-vitrogen Grand Island, NY, USA*); le bande elettroforetiche sono state visualizzate con la luce ultravioletta e immediatamente fotografate.

#### - Analisi dei cambiamenti morfologici del DNA

La metodica della colorazione nucleare con *Hoechst 33342* è stata usata per valutare la morfologia nucleare, tipicamente alterata in caso di apoptosi; nello specifico i nuclei delle cellule in apoptosi possono essere caratterizzati da condensazione della cromatina (picnosi), frammentazione del nucleo o riduzione delle dimensioni nucleari.

Al termine delle 24 ore di incubazione, le cellule sono state colorate con 10 µM/mL *Hoechst 33342* (*Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA*) (incubate per 15 minuti a 37 °C), in accordo con le procedure fornite dal produttore. L'analisi quantitativa dell'apoptosi è stata realizzata contando al microscopio a fluorescenza il numero di cellule con i segni morfologici caratteristici dall'apoptosi.

Il livello di apoptosi è stato valutato dopo un'incuba-

zione di 24 ore ed è stato espresso come percentuale della popolazione cellulare totale. Sono state contate almeno 300 cellule in 6 differenti campi selezionati a caso a un ingrandimento 100X. Ogni esperimento è stato ripetuto in triplicato per verificare le riproducibilità del dato.

#### - Determinazione dell'attività della Caspasi-3

In seguito allo stimolo pro-apoptotico, le cellule U937 sono state saggiate per valutare l'attività della Caspasi-3, caspasi effettrice necessaria per la cascata apoptotica. La concentrazione della Caspasi-3 è stata misurata attraverso un saggio colorimetrico con *Human Caspase-3 Instant ELISA Kit* (eBioscience, San Diego, CA, USA). Lo sviluppo del colore è proporzionale al livello di Caspasi-3 e, quindi, all'apoptosi ed è misurato spettrofotometricamente.

Le cellule, incubate per 24 ore con il plasma di interesse proveniente dalle diverse popolazioni, sono state processate seguendo le istruzioni del fornitore e il livello di Caspasi-3 è stato misurato nel lisato cellulare. Per la lettura del livello di Caspasi-3 si è usato *VICTOR3 Multilabel Plate Reader* (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, USA) impostato a 450 nm. Ogni esperimento è stato realizzato in triplicato].

#### Saggi ELISA e quantificazione di citochine

La quantità di TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-18 prodotti dalle cellule e rilasciati nel surnatante cellulare è stata valutata mediante *Human Instant enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) kit* (eBioscience, San Diego, CA, USA). La quantificazione ELISA delle citochine è stata realizzata seguendo il protocollo e le istruzioni fornite dalla ditta fornitrice. Per la lettura della densità ottica si è usato *VICTOR3 Multilabel Plate Reader* (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, USA) impostato a 450 nm. In accordo con le istruzioni fornite nel protocollo sperimentale, le quantità di TNF- $\alpha$  (pg/mL), di IL-6 (pg/mL) e di IL-18 (pg/mL) sono state calcolate basandosi sulla curva *standard* di taratura. Tutti i saggi sono stati ripetuti in triplicato.

#### Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata con l'utilizzo della versione 15 del software SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Le variabili non continue sono state espresse come mediana e intervallo interquartile (*interquartile range*, IQR). L'età è stata espressa come *media*±*deviazione standard*. Il test *U Mann-Whitney* è stato usato per la valutazione e la comparazione dei dati tra due gruppi. Il test di *Kruskall-Wallis*, invece, è stato applicato per la comparazione multipla dei dati tra i tre gruppi differenti. Un *p-value* inferiore a 0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

## RISULTATI

### Caratteristiche dei soggetti al ricovero

L'età media dei 12 pazienti con AHF è risultata di 73.5±12.9 anni e il 75% dei soggetti arruolati era di sesso maschile. Nel gruppo AHF, il valore mediano della creatinina al ricovero era di 0.87 mg/dL (IQR, 0.82-0.96) (Tab. 1).

L'età media dei 7 pazienti con CRS di Tipo 1 è risultata di 75.8±10.8 anni con il 43% di soggetti maschi. All'ingresso in ospedale, il valore mediano della creatinina in questo gruppo era di 0.93 mg/dL (IQR, 0.89-0.99) (Tab. 1).

Nessun paziente è stato sottoposto a manovre richiedenti il mezzo di contrasto nelle 72 ore precedenti l'AKI.

Il livello di urea, creatinine e di BNP (*Brain Natriuretic Peptide*) non è risultato significativamente differente al ricovero tra i pazienti AHF e i pazienti CRS di Tipo 1; inoltre, la dose di diuretici somministrati è risultata simile nei due gruppi.

### Effetto del plasma proveniente dai pazienti con CRS di Tipo 1 su U937: apoptosi

Le U937 trattate per 24 ore con il plasma proveniente dal gruppo CRS di Tipo 1 hanno evidenziato, all'analisi con *DNA Apoptotic Ladder KIT*, una spiccata formazione di DNA *ladder* con frammenti di acidi nucleici di vari pesi molecolari. Ciò suggerisce la presenza di un evento apoptotico e, quindi, la presenza di sostanze pro-apoptotiche nel plasma di questi pazienti (Fig. 1).

L'analisi quantitativa del grado di apoptosi nelle tre differenti popolazioni in studio ha mostrato un significativo innalzamento dell'apoptosi nei monociti U937 incubati con il plasma proveniente dal gruppo CRS di Tipo 1 rispetto al gruppo AHF e al gruppo di controllo ( $p<0.05$ ). Il livello di apoptosi rilevato, dopo le 24 ore di incubazione, è stato del 30.5% (IQR, 24.0-29.9%) per il gruppo CRS di Tipo 1, dell'8.0% (IQR, 6.75-9.5%) nel gruppo AHF e del 5.0% (IQR, 4.5-5.7%) nel gruppo Controllo (Fig. 2).

In accordo con il dato relativo al livello di apoptosi, le U937 incubate con il plasma proveniente dai pazienti con CRS di Tipo 1 hanno mostrato una concentrazione di Caspasi-3 significativamente maggiore rispetto agli altri due gruppi (CRS di Tipo 1: 1.21 ng/mL (IQR, 1.15-2.09) versus 0.78 ng/mL (IQR, 0.62-0.97) per AHF e 0.16 ng/mL (IQR, 0.14-0.20) per il gruppo Controllo; tutti  $p<0.05$ ] (Fig. 2).

**TABELLA I - CARATTERISTICHE EPIDEMIOLOGICHE E PARAMETRI CLINICI RENALI, CARDIOLOGICI E INFIAMMATORI DEI PAZIENTI AL MOMENTO DEL RICOVERO**

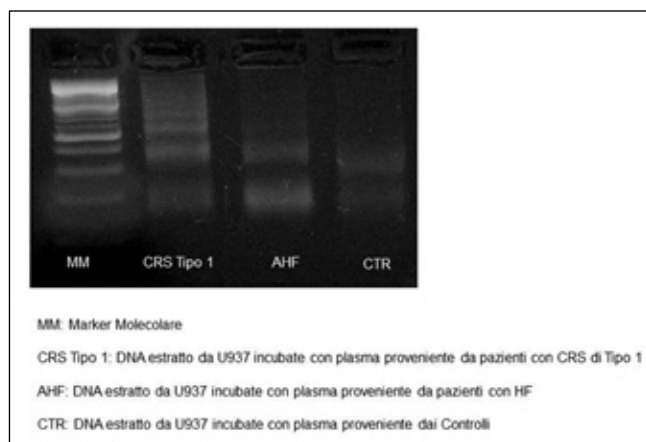
Pazienti	AHF	CRS di Tipo 1
Età	73.5±12.9	75.0±10.8
Genere (Maschi)	75%	43%
Creatinina (mg/dL)	0.87 (0.82-0.96)	0.93 (0.89-0.99)
Urea (mg/dL)	42.5 (34.5-45.5)	43.0 (33.8-46.5)
eGFR (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )		
Diabete Mellitus	50%	25%
Dislipidemia	25%	66%
Iipertensione	83%	71%
MAP (mmHg)	107 (94-117)	110 (94-147)
BNP (pg/mL)	757 (524-1038)	739 (539-1517)
Tropinina I (ng/mL)	0.10 (0.04-0.26)	0.15 (0.08-0.24)
Emoglobina (g/dL)	13.4 (12.7-14.0)	13.0 (12.8-13.8)
WBC (X 10 <sup>9</sup> /L)	9.0 (6.1-12.6)	6.4 (5.9-13.8)
Neutrofili %	70.7 (66.7-74.2)	80.6 (77.6-85.2)
PCR (mg/dL)	2.9 (1.1-7.8)	3.0 (1.14-7.79)

**Valutazione delle citochine nel surnatante cellulare dei monociti**

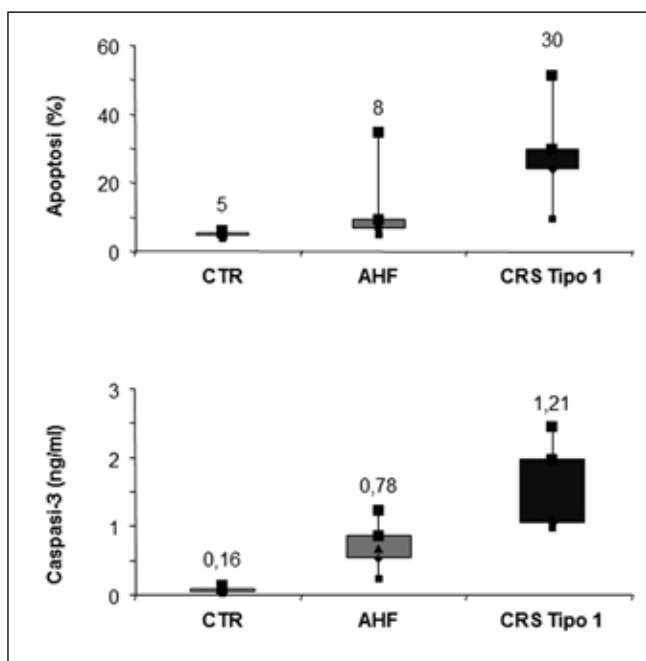
Per esaminare alcuni potenziali mediatori coinvolti nel danno immuno-mediato nella CRS di Tipo 1, sono stati misurati i livelli di TNF-α, IL-6 e IL-18 nel surnatante dei monociti dopo l'incubazione di 24 ore (Tab. II). Il livello di TNF-α è risultato significativamente incrementato sia nei soggetti AHF sia in quelli CRS di Tipo 1 rispetto al gruppo controllo [2.39 pg/mL (IQR, 1.47-4.10)] (p<0.05). Al contrario, confrontando i valori di TNF-α nei pazienti AHF [28.18 pg/mL (IQR, 20.7-32.8)] e nei soggetti CRS di Tipo 1 [28.45 pg/mL (IQR, 22.4-29.6)] non si è riscontrata una differenza significativa della concentrazione di questa citochina (Fig. 3).

Inoltre, nei pazienti con CRS di Tipo 1, la citochina pro-infiammatoria IL-6 [46.10 pg/mL (IQR, 24.4-70.0)] è risultata significativamente elevata se paragonata con i pazienti con AHF [21.25 pg/mL (IQR, 18.4-36.5)] e con il gruppo Controllo [2.44 pg/mL (IQR, 1.8-3.4)] (p<0.05). Nello specifico, il valore mediano dell'IL-6 nel gruppo CRS di Tipo 1 risulta più del doppio rispetto al valore rilevato per il gruppo AHF (Fig. 4).

In maniera analoga, nel surnatante ottenuto dalle cellule incubate con plasma dei pazienti con CRS di



**Fig. 1 -** A livello qualitativo, l'apoptosi delle U937 trattate per 24 ore con il plasma proveniente dai diversi gruppi in esame è stato analizzato mediante DNA Apoptotic Ladder KIT e successivo gel di agarosio. Il pozzetto corrispondente al gruppo CRS di Tipo 1 ha evidenziato una spiccata formazione di DNA ladder con frammenti di acidi nucleici di vari pesi molecolari. MM: Marker Molecolare; CRS di Tipo 1: DNA estratto da U937 incubate con plasma proveniente da pazienti con CRS di Tipo 1; AHF: DNA estratto da U937 incubate con plasma proveniente da pazienti con HF; CTR: DNA estratto da U937 incubate con plasma proveniente dai Controlli.

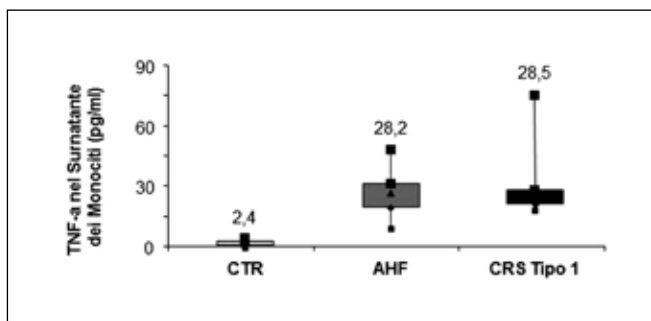
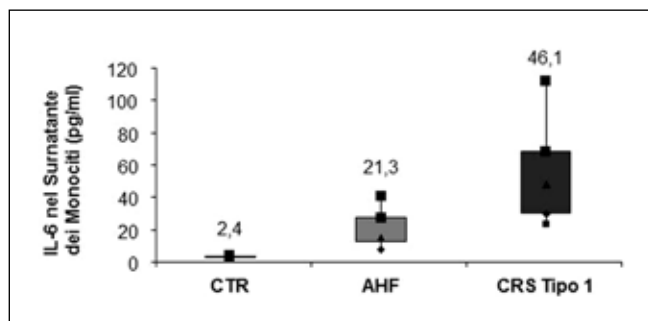


**Fig. 2 -** Livelli di apoptosi rilevati a livello delle U937 dopo 24 ore di incubazione con il plasma delle differenti popolazioni in analisi (p>0.005).

Tipo 1, il livello di IL-18 [92 pg/mL (IQR, 81.37-108.3)] è risultato significativamente aumentato rispetto ai pazienti con AHF [17.9 pg/mL (IQR, 14.79-21.2)] e al gruppo Controllo [3.05 pg/mL (IQR, 3.03-5.92)] (p<0.05). Nello specifico, il valore mediano dell'IL-18 nel gruppo CRS di Tipo 1 risulta aumentato di almeno cinque volte rispetto al valore rilevato per il gruppo AHF (Fig. 5).

TABELLA II - CONCENTRAZIONI DELLE CITOCHINE RILASCIATE NEL SURNATANTE CELLULARE

Citochine	Controlli	AHF	CRS Tipo 1
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	2,39 (IQR, 1,47-4,1)	28,18 (IQR, 20,7-32,8)	28,45 (IQR, 22,4-29,6)
IL-6 (pg/mL)	2,44 (IQR, 1,8-3,4)	21,25 (IQR, 18,4-36,5)	46,10 (IQR, 24,4-70,0)
IL-18 (pg/mL)	3,05 (IQR, 3,03-5,92)	17,9 (14,79-21,2)	92 (81,3-108,3)

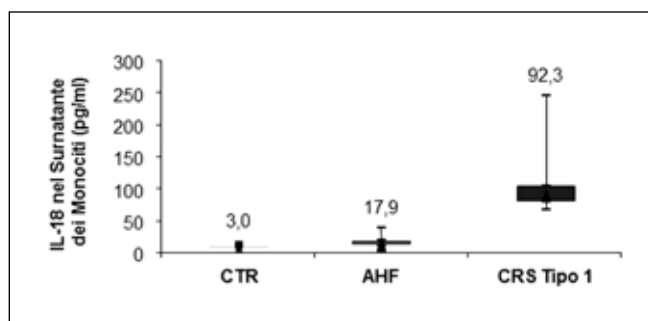
Fig. 3 - Livelli di TNF- $\alpha$  rilevati nel surnatante delle U937 durante le 24 ore di incubazione.Fig. 4 - Livelli di IL-6 rilevati nel surnatante delle U937 durante le 24 ore di incubazione ( $p < 0.005$ ).

## DISCUSSIONE

Ci sono diversi approcci sperimentali per studiare le alterazioni della risposta immunologica; uno di questi prevede l'analisi del comportamento delle cellule del sistema immunitario (per esempio l'apoptosi) quando esposte ai fattori tossici che provocano malattia/danno. Infatti, l'apoptosi è un processo finemente regolato e massivamente coinvolto nell'immunità cellulo-mediata e nella difesa immunitaria del nostro organismo; inoltre, questo meccanismo è fondamentale per l'omeostasi cellulare e per l'eliminazione delle cellule danneggiate (17).

Sebbene l'apoptosi sia un meccanismo fisiologico necessario per l'equilibrio del nostro organismo, un'eccessiva o una scarsa apoptosi sono causa di vari stati patologici e di differenti malattie. In questo studio pilota, abbiamo esaminato il possibile ruolo di un meccanismo immuno-mediato nella patogenesi della CRS di Tipo 1, valutando la risposta in vitro dei monociti incubati per 24 ore con il plasma di pazienti con CRS di Tipo 1.

La scelta delle tempistiche di incubazione e delle dose di plasma sono state messe a punto durante una fase preliminare di settaggio del protocollo sperimentale sulla base di quanto riportato in letteratura (15, 16). In particolar modo, l'elevata percentuale di plasma adoperata per l'indurre l'apoptosi può essere spiegata dalla peculiare resistenza agli insulti di questa linea cellulare, soprattutto se in confronto con linee cellulari più delicate non implicate nella risposta

Fig. 5 - Livelli di IL-18 rilevati nel surnatante delle U937 durante l'incubazione di 24 ore ( $p < 0.005$ ).

immunitaria. Si è scelto, inoltre, di analizzare l'apoptosi a 24 ore per evitare l'iniziale differenziamento dei monociti a macrofagi indotto da una prolungata coltura in vitro e accentuato da possibili fattori tossici presenti nel plasma di incubazione.

L'esposizione delle cellule monocitarie al plasma di pazienti con CRS di Tipo 1 ha provocato una massiva apoptosi e un incremento nel rilascio di citochine nel surnatante cellulare. In generale, i monociti, precursori dei macrofagi tissutali, hanno un'azione chiave nello sviluppo e nel mantenimento del Sistema Immunitario (18) e le citochine sono molecole fondamentali nella mediazione dell'interazione fra le cellule del sistema immunitario e fra queste cellule e altre cellule dell'organismo.

L'apoptosi ha sicuramente un ruolo patogenico importante nell'AKI e ciò è stato evidenziato sia nell'uomo

sia negli animali (8). Per esempio, è stata dimostrata la presenza di apoptosi in modelli animali di *ischemia-refusion*, di infiammazione e di AKI dovuta a sepsi. È stato, inoltre, notato che le cellule epiteliali del tubulo renale prossimale sono maggiormente suscettibili all'apoptosi e il danno cellulare a questo livello contribuisce notevolmente al danno d'organo (8).

Durante lo scompenso cardiaco, i molteplici fattori coinvolti nello sviluppo di AKI riguardano *pathway* cellulari multipli e molto complessi. A tal proposito, Goh et al. hanno, recentemente, evidenziato il coinvolgimento di *pathway* infiammatori e di *pathway* del segnale umorale come meccanismi d'azione per spiegare il danno d'organo, in particolare per il danno renale nello scompenso cardiaco acuto (19).

Nel nostro studio, abbiamo osservato una marcata attività apoptotica nei monociti trattati con il plasma proveniente dai soggetti con CRS di Tipo 1, evidenziata da un livello di apoptosi significativamente maggiore nei monociti incubati *in vitro* con il plasma di questi pazienti rispetto al gruppo AHF e ai Controlli. Ciò fa dedurre la presenza di fattori pro-apoptotici e di molecole infiammatorie nel plasma dei pazienti con CRS di Tipo 1.

Per valutare meglio l'apoptosi, abbiamo analizzato l'attività della Caspasi-3, caspasi effettrice con ruolo centrale nella cascata apoptotica e nella progressione del processo apoptotico; infatti, questa caspasi è responsabile del taglio proteolitico a livello delle proteine necessarie per la sopravvivenza cellulare (20). La Caspasi-3 amplifica il segnale apoptotico iniziato da Caspasi-8 e Caspasi-9 e favorisce il disassemblaggio della cellula in frammenti tipici dell'apoptosi (21). Ovviamente, un'aumentata attività di Caspasi-3 è associata a un maggior livello di apoptosi. Nel nostro studio pilota, abbiamo osservato un'attività raddoppiata della Caspasi-3 estratta dalle cellule incubate con il plasma dei pazienti con CRS di Tipo 1. Queste stesse cellule, infatti, mostravano un grado di apoptosi maggiore sia ai test qualitativi che a quelli quantitativi.

È possibile che le U937 mostrino questa aumentata apoptosi a causa della presenza di fattori pro-apoptotici nel plasma dei pazienti con CRS di Tipo 1. Studi futuri, infatti, prevederanno l'analisi quantitativa del livello di alcune citochine selezionate nel plasma dei pazienti con sindrome cardiorenale di Tipo 1; in questo modo sarà possibile individuare in maniera precisa quali mediatori siano coinvolti nel meccanismo patofisiologico di questa sindrome. Ciò suggerisce che un pattern infiammatorio dovuto a vari mediatori che inducono un'apoptosi sregolata potrebbe essere coinvolto nella patogenesi della CRS di Tipo 1. Un meccanismo analogo è stato evidenziato da Mariano et al., che hanno esaminato l'effetto del plasma di pazienti settici ustionati su cellule tubulari renali e podociti. Questo gruppo ha dimostrato come il plasma

di questi pazienti, ricco di fattori apoptotici, induca un effetto apoptotico che, nello specifico, correla con la proteinuria e potrebbe contribuire allo sviluppo di danno renale (22).

La risposta infiammatoria è mediata da differenti citochine e gioca un ruolo chiave nella difesa del nostro organismo, ma, come dimostrato da diverse evidenze scientifiche, un eccessivo livello di infiammazione può essere dannoso o, addirittura, letale. Come è noto, le citochine sono molecole pleiotropiche che possono indirizzare la loro azione verso molti tipi cellulari diversi, ma possono anche svolgere azioni diverse sullo stesso stipite cellulare; hanno azione autocrina, paracrina ed endocrina e la loro produzione è finemente regolata mediante trascrizione *de novo* dei relativi geni con neosintesi di RNA e proteina stessa (23, 24).

In aggiunta, alcuni mediatori pro-infiammatori, come TNF- $\alpha$  e IL-6, regolano molti processi nella risposta immune, nel ciclo cellulare e nell'apoptosi.

IL-6, inoltre, è un componente critico della risposta infiammatoria di fase acuta, dal momento che stimola la produzione di proteine come proteina C reattiva, amiloide A nel siero, fibrinogeno, complemento e  $\alpha$ 2-antitripsina. IL-6 induce, anche, la proliferazione e la maturazione delle cellule del Sistema Immunitario come i linfociti B, i linfociti T e le cellule Natural Killer (25). In aggiunta, IL-6 influenza l'endotelio modulando l'espressione di ICAM-1, VCAM-1 e selectina E e potenziando l'adesione dei leucociti all'endotelio stesso e influenzando altre cellule infiammatorie attraverso la chemiotassi (26, 27).

L'IL-18 sembra giocare un ruolo centrale nella cascata infiammatoria e nei processi dell'immunità naturale e acquisita grazie alla sua capacità di indurre mediante attivazione di linfociti T e di cellule *Natural Killer* la produzione di INF- $\gamma$ . Inoltre, IL-18 ha effetti sinergici con IL-12 e promuove la produzione di altre molecole come TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , *Fas ligand*, IL-6, metalloproteasi e molecole di adesione (28, 29).

Nel nostro lavoro, abbiamo evidenziato un livello di IL-6 doppio nei soggetti con CRS di Tipo 1 rispetto ai soggetti con solo AHF, ma una simile concentrazione di TNF- $\alpha$  in questi due gruppi. In ugual modo, il livello di IL-18 è risultato cinque volte maggiore nelle cellule incubate con il plasma proveniente dai pazienti con CRS di Tipo 1 rispetto a quelle incubate con il plasma dei pazienti solo con AHF. Mallat et al. hanno ipotizzato un ruolo fisiopatologico per IL-18 nell'ipertrofia cardiaca e nello scompenso cardiaco; inoltre, le concentrazioni più elevate di IL-18 sembrano associate a una maggiore mortalità (30, 31). Questo dato concorda con i nostri dati che sottolineano la presenza di livelli di IL-18 aumentati sia nei pazienti con solo scompenso cardiaco sia negli scompensati che in seguito hanno sviluppato AKI.

Alla luce di questi risultati, ipotizziamo che nella CRS di Tipo 1 siano coinvolti un meccanismo immuno-mediato e uno sbilanciamento del normale equilibrio del Sistema Immunitario.

Vari fattori, come infiammazione e stress ossidativo, potrebbero essere coinvolti nell'immuno-disregolazione che induce l'apoptosi nei monociti e che sfocia nel danno tissutale e d'organo. È anche verosimile che i monociti producano citochine pro-infiammatorie come segnale per mediare l'apoptosi in altre cellule; queste citochine potrebbero, quindi, rappresentare un "effetto" causato da sostanze presenti nel plasma dei pazienti con CRS di Tipo 1, capaci di indurre una risposta infiammatoria e un danno tissutale e d'organo con azione paracrina ed endocrina.

Concludendo, abbiamo osservato che il plasma proveniente da pazienti con CRS di Tipo 1 induce apoptosi aumentando l'attività della Caspasi-3 nelle cellule U937 e stimola la produzione di citochine pro-infiammatorie da parte delle stesse con conseguente rilascio delle stesse nel surnatante. Ciò suggerisce la presenza di sostanze pro-infiammatorie e di fattori pro-apoptotici che provocano un difetto nella regolazione dell'apoptosi dei monociti in questi pazienti, gettando, quindi, le premesse per lo studio di un processo immuno-mediato nella patofisiologia della CRS di Tipo 1. Nonostante ciò, riconosciamo che il piccolo campione analizzato è una limitazione per il nostro studio e che risulterebbe molto interessante analizzare apoptosi e rilascio di citochine anche a time point più precoci. Ulteriori esperimenti e ulteriori studi saranno necessari per indagare ulteriormente il ruolo del segnale paracrina e dello stress ossidativo nella sindrome cardiorenale e per determinare altri fattori e altre citochine coinvolti nel processo.

Questi risultati preliminari suggeriscono anche che i *pathway* infiammatori abbiano un ruolo centrale nella CRS di Tipo 1 e che siano anche coinvolti nel danno ad altri organi (dal cuore al rene). In conclusione, questo studio aggiunge nuove conoscenze sul meccanismo d'azione della sindrome cardiorenale di Tipo 1 e apre la strada a nuove ipotesi e a futuri filoni di studio che permetteranno di definire meglio il meccanismo patofisiologico alla base di questa sindrome.

## RIASSUNTO

*La patofisiologia della Sindrome Cardiorenale di Tipo 1 risulta molto complessa e non è ancora completamente nota. Si è ipotizzato che la disregolazione del Sistema Immunitario con alterazioni nella risposta immunitaria, risultante da un'umentata apoptosi, e l'attivazione di uno stato di infiammazione cellulare con rilascio di citochine possano essere i potenziali*

*meccanismi patofisiologici coinvolti in questa sindrome. Questo studio pilota ha lo scopo di esaminare il possibile ruolo di un meccanismo immuno-mediato nella patogenesi della sindrome.*

*Lo studio ha previsto l'arruolamento di 7 pazienti con CRS di Tipo 1 (CRS Type 1), di 12 pazienti con scompenso cardiaco acuto (AHF) e di 5 soggetti sani. Il plasma ottenuto dai diversi gruppi di soggetti arruolati è stato incubato con una linea monocitaria U937. Dopo 24 ore di incubazione, l'apoptosi cellulare è stata determinata mediante valutazione al microscopio a fluorescenza e attraverso DNA Apoptotic Ladder KIT; in aggiunta, è stato anche determinato il livello di Caspasi-3 nel lisato cellulare. Inoltre, si è valutata la concentrazione di citochine nel surnatante cellulare.*

*Le U937 trattate con il plasma di pazienti con CRS di Tipo 1 hanno manifestato un'elevata formazione di frammenti apoptotici di DNA e sia la valutazione quantitativa del livello di apoptosi al microscopio a fluorescenza sia la concentrazione di Caspasi-3 sono risultate significativamente aumentate in questo gruppo di pazienti ( $p < 0.05$ ). Il livello di TNF- nel surnatante cellulare è risultato significativamente elevato sia nel gruppo AHF sia nel gruppo CRS di Tipo 1 in confronto al gruppo di controllo ( $p < 0.05$ ). Nel gruppo di pazienti con CRS di Tipo 1 si è evidenziato anche un livello incrementato delle citochine pro-infiammatorie IL-6 e IL-18 ( $p < 0.05$ ).*

*I risultati preliminari ottenuti sono promettenti e suggeriscono una disregolazione del Sistema Immunitario risultante dall'apoptosi dei monociti trattati con il plasma di pazienti con CRS di Tipo 1, suggerendo la presenza di un meccanismo immuno-mediato. Questi dati suggeriscono anche che i pathway infiammatori potrebbero avere un ruolo centrale nel danno d'organo a distanza.*

## DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

## CONTRIBUTI ECONOMICI AGLI AUTORI

Lo studio è stato supportato dalla Ricerca Sanitaria Finanziata dalla Regione Veneto (RSF N. 303/09).

## STUDI SPERIMENTALI SU ESSERI UMANI

Approvazione ottenuta dal Comitato Etico dell'Azienda Ulss 6 Vicenza, Ospedale San Bortolo.

## FIGURE O TABELLE SOGGETTE AD AUTORIZZAZIONE

Nessuna.



## BIBLIOGRAFIA

1. Ronco C, Haapio M, House AA, Anavekar N, Bellomo R. Cardiorenal syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52 (19): 1527-39.
2. Palazzuoli A, Nuti R. Heart failure: pathophysiology and clinical picture. *Contrib Nephrol* 2010; 164: 1-10.
3. Haldeman GA, Croft JB, Giles WH, Rashidee A. Hospitalization of patients with heart failure: National Hospital Discharge Survey, 1985 to 1995. *Am Heart J* 1999; 137 (2): 352-60.
4. Adams KF Jr, Fonarow GC, Emerman CL, et al. Characteristics and outcomes of patients hospitalized for heart failure in the United States: rationale, design, and preliminary observations from the first 100,000 cases in the Acute Decompensated Heart Failure National Registry (ADHERE). *Am Heart J* 2005; 149 (2): 209-16.
5. McCullough PA. Cardiorenal syndromes: pathophysiology to prevention. *Int J Nephrol* 2010; 2011: 762590.
6. Binanay C, Califf RM, Hasselblad V, et al. Evaluation study of congestive heart failure and pulmonary artery catheterization effectiveness: the ESCAPE trial. *JAMA* 2005; 294 (13): 1625-33.
7. Goldberg A., Hammerman H, Petcherski S, et al. In-hospital and 1-year mortality of patients who develop worsening renal function following acute ST-elevation myocardial infarction. *Am Heart J* 2005; 150 (2): 330-7.
8. Havasi A, Borkan SC. Apoptosis and acute kidney injury. *Kidney Int* 2011; 80 (1): 29-40.
9. Satoh M, Minami Y, Takahashi Y, Nakamura M. Immune modulation: role of the inflammatory cytokine cascade in the failing human heart. *Curr Heart Fail Rep* 2008; 5 (2): 69-74.
10. Rabb H. Immune modulation of acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17 (3): 604-6.
11. Burne-Taney MJ, Rabb H. The role of adhesion molecules and T cells in ischemic renal injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003; 12 (1): 85-90.
12. Lee DW, Faubel S, Edelstein CL. Cytokines in acute kidney injury (AKI). *Clin Nephrol* 2011; 76 (3): 165-73.
13. Liu KD, Altmann C, Smits G, et al. Serum interleukin-6 and interleukin-8 are early biomarkers of acute kidney injury and predict prolonged mechanical ventilation in children undergoing cardiac surgery: a case-control study. *Crit Care* 2009; 13 (4): R104.
14. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* 2007; 11 (2): R31.
15. de Cal M, Cruz DN, Corradi V, et al. HLA-DR expression and apoptosis: a cross-sectional controlled study in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. *Blood Purif* 2008; 26 (3): 249-54.
16. Bordoni V, Piroddi M, Galli F, et al. Oxidant and carbonyl stress-related apoptosis in end-stage kidney disease: impact of membrane flux. *Blood Purif* 2006; 24 (1): 149-56.
17. Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 267-93.
18. Janeway CA Jr., Bottomly K. Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell* 1994; 76 (2): 275-85.
19. Goh CY, Vizzi G, De Cal M, Ronco C. Cardiorenal syndrome: a complex series of combined heart/kidney disorders. *Contrib Nephrol* 2011; 174: 33-45.
20. Marzo I, Pérez-Galán P, Giraldo P, Rubio-Félix D, Anel A, Naval J. Cladribine induces apoptosis in human leukaemia cells by caspase-dependent and -independent pathways acting on mitochondria. *Biochem J* 2001; 359 (Pt. 3): 537-46.
21. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326 (Pt. 1): 1-16.
22. Mariano F, Cantaluppi V, Stella M, et al. Circulating plasma factors induce tubular and glomerular alterations in septic burns patients. *Crit Care* 2008; 12 (2): R42.
23. Abbas AK, Janeway CA Jr. Immunology: improving on nature in the twenty-first century. *Cell* 2000; 100 (1): 129-38.
24. Kishimoto T, Taga T, Akira S. Cytokine signal transduction. *Cell* 1994; 76 (2): 253-62.
25. Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000; 85 (1): 9-18; quiz 18, 21.
26. Dendorfer U. Molecular biology of cytokines. *Artif Organs* 1996; 20 (5): 437-44.
27. Hirano T. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol* 1998; 16 (3-4): 249-84.
28. Dinarello CA. Interleukin-18, a proinflammatory cytokine. *Eur Cytokine Netw* 2000; 11 (3): 483-6.
29. Okamura H, Tsutsui H, Kashiwamura S, Yoshimoto T, Nakanishi K. Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity. *Adv Immunol* 1998; 70: 281-312.
30. Mallat Z, Heymes C, Corbaz A, et al. Evidence for altered interleukin 18 (IL)-18 pathway in human heart failure. *FASEB J* 2004; 18 (14): 1752-4.
31. Chandrasekar B, Mummidi S, Claycomb WC, Mestral R, Nemer M. Interleukin-18 is a pro-hypertrophic cytokine that acts through a phosphatidylinositol 3-kinase-phosphoinositide-dependent kinase-1-Akt-GATA4 signaling pathway in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2005; 280 (6): 4553-67.