



CENTRO DI BIOTECNOLOGIE PER LA RICERCA MEDICA APPLICATA

RELAZIONE ATTIVITA' ANNO SOLARE 2010

Il Centro BRMA è una struttura scientifica dell'Università del Piemonte Orientale □“Avogadro” finalizzata alla ricerca ed alla sperimentazione in campo biomedico.

I Ricercatori afferenti al BRMA svolgono la loro attività in diversi settori delle bioscienze di base e delle biotecnologie applicate alla cura delle malattie ed alla salute dell'uomo.

Nel BRMA è operativa una piattaforma scientifico-tecnologica dedicata allo studio ed all'analisi dell'espressione e della funzione genica in condizioni normali e patologiche in tessuti e sistemi cellulari isolati ed allo studio di sistemi proteici complessi con approccio di proteomica funzionale.

Sono Organi del Centro:

Il Direttore: Prof. Fabiola SINIGAGLIA

Il Comitato Tecnico Scientifico (C.T.S.) composto da:

Fabiola Sinigaglia (direttore)

Ciro Isidoro (segretario)

Andrea Graziani

Gianluca Gaidano

Piero Stratta

Sono componenti del Centro i Dottori Professori:

Gianluca AIMARETTI

Barbara AZZIMONTI

Alessandra BERTONI

Chiarella BOZZO

Rita CARINI

Sandra D'ALFONSO

Giuseppe DE LUCA

Nicoletta FILIGHEDDU

Atonia FOLLENZI

Gianluca GAIDANO

Marisa GARIGLIO

Mara GIORDANO

Andrea GRAZIANI

Elena GROSSINI

Ciro ISIDORO

Marco KRENGLI

Claudio MOLINARI

Mario PIRISI
Maria PRAT
Lia RIMONDINI
Daniele SBLATTERO
Fabiola SINIGAGLIA
Piero STRATTA
Nicola SURICO

L'attività di ricerca del Centro di Biotecnologie per la Ricerca Medica Applicata è prevalentemente dedicata allo studio dei meccanismi molecolari responsabili delle funzioni cellulari e delle condizioni patologiche mediante strategie sperimentali interdisciplinari innovative, quali l'analisi genomica, genomica funzionale e proteomica, l'analisi di sistemi biologici complessi e lo sviluppo di piattaforme bio-informatiche adeguate. L'attività di ricerca del BRMA si sviluppa in diverse aree tematiche, tutte riconducibili alla tutela della salute umana.

Il Centro svolge inoltre un ruolo di coordinamento delle attività di formazione che si svolgono al suo interno, in cooperazione con i Dipartimenti ed i Corsi di Laurea, curando in particolare gli aspetti didattici correlati e coerenti con gli obiettivi istituzionali del centro stesso: lo sviluppo della ricerca biotecnologica finalizzata alla cura delle malattie ed alla tutela della salute dell'uomo.

Nel corso del 2010 il centro ha svolto attività di promozione della conoscenza in campo Biotecnologico a livello divulgativo.

Nell'ambito della notte dei ricercatori il BRMA ha proposto ai visitatori dei Dipartimenti Medici in Novara un percorso scientifico-didattico con dimostrazioni pratiche di alcune applicazioni di tecnologie avanzate allo studio di malattie genetiche, virali e vascolari.

Il Centro e' inoltre stato promotore dell'organizzazione di alcuni Seminari rivolti agli studenti dei Dottorati dei due Dipartimenti medici.

I principali risultati del lavoro dei membri del Centro, così come le collaborazioni scientifiche in atto hanno portato, nel 2010, alla pubblicazione di 129 lavori scientifici, per la maggior parte su riviste internazionali indicizzate. Informazioni dettagliate al riguardo sono riportate negli allegati alla presente relazione.

Il Direttore

Prof Fabiola Sinigaglia



Allegato 1

Fabiola SINIGAGLIA

Principali risultati dell'attività di ricerca

- **Effetti dell'8-prenilnaringerina sulla funzionalità piastrinica**

I fitoestrogeni sono composti polifenolici in grado di mimare dal punto di vista strutturale e funzionale gli estrogeni endogeni, che portano ad un ridotto rischio di patologie cardiovascolari. Abbiamo focalizzato la nostra attenzione sull'8-prenilnaringerina (8-PN), un potente fitoestrogeno contenuto nel fiore del luppolo con un'affinità di legame per i recettori degli estrogeni molto maggiore rispetto a quella di altri fitoestrogeni. In questo contesto abbiamo pensato di studiare come l'8-prenilnaringerina intervenga sulla funzionalità piastrinica con lo scopo di caratterizzare le vie di trasduzione del segnale modulate dall'8-PN in piastrine umane.

I nostri dati hanno dimostrato che l'8-PN è un nuovo potente inibitore dell'aggregazione indotta da diversi agonisti forti e dell'adesione piastrinica a matrici di collagene indipendentemente dal legame al recettore degli estrogeni. Esso agisce inibendo la fosforilazione di proteine essenziali per l'attivazione piastrinica e la successiva secrezione del contenuto dei granuli densi e il rilascio di calcio dal sistema tubulare denso.

- **Effetti del deidroepiandrosterone sulla funzionalità piastrinica**

Il deidroepiandrosterone (DHEA) e la sua forma solfata (DHEA-S) sono due importanti precursori degli ormoni steroidei. Diversi studi clinici e di popolazione suggeriscono che tali steroidi possono giocare un ruolo importante nella prevenzione di patologie cardiovascolari e dell'aterosclerosi. È stato riportato che il DHEA è in grado di stimolare il rilascio di ossido nitrico dalle cellule endoteliali, diminuendo quindi la risposta piastrinica a diversi agonisti. In questo contesto siamo andati ad indagare quale sia l'effetto diretto di tali molecole su piastrine umane.

I nostri dati hanno dimostrato che il DHEA-S, ma non il DHEA, è in grado di inibire l'aggregazione piastrinica indotta da diversi agonisti forti, agendo sinergicamente con l'ossido nitrico. Inoltre il DHEA-S è in grado di inibire la fosforilazione di proteine essenziali per l'attivazione piastrinica e la successiva secrezione del contenuto dei granuli.

- **Ruolo della metabolizzazione del 2-arachidonoilglicerolo nell'aggregazione piastrinica**

Il 2-arachidonoilglicerolo è un endocannabinoide in grado di indurre aggregazione piastrinica dipendente dalla produzione di trombossano A₂ ed indipendentemente dal legame ai recettori degli endocannabinoidi. È stato infatti dimostrato che il 2-AG è metabolizzato dalla monoacilglicerololipasi, dall'idrolasi degli acidi grassi e dalla ciclossigenasi-2 ad acido arachidonico che è poi convertito in trombossano A₂ nelle piastrine. In questo contesto abbiamo valutato il ruolo degli enzimi coinvolti nella metabolizzazione del 2-AG sull'aggregazione piastrinica.

I nostri dati hanno mostrato che bloccando tali enzimi l'aggregazione indotta dal 2-AG è solo ritardata ma non inibita. In letteratura è inoltre riportato che il 2-AG può isomerizzare a 1-AG, che a sua volta viene metabolizzato dagli stessi enzimi responsabili della metabolizzazione del 2-AG. I nostri risultati hanno dimostrato che anche l'1-AG può indurre aggregazione piastrinica trombossano A₂-dipendente. Bloccando gli enzimi coinvolti nella degradazione dell'1-AG i nostri dati hanno mostrato un'inibizione dell'aggregazione 1-AG dipendente.

- **Ruolo degli endocannabinoidi nel differenziamento megacariocitario**

Recenti evidenze scientifiche suggeriscono che gli endocannabinoidi, una nuova classe di mediatori lipidici, giocano un ruolo importante nel modulare il differenziamento cellulare. Tuttavia nessuno studio è andato a valutare il ruolo degli endocannabinoidi nel differenziamento

megacariocitario. A tale scopo cellule staminali ematopoietiche isolate dal midollo osseo di tibia e femore murini sono state indotte a differenziare verso la linea megacariocitaria.

I dati ottenuti hanno dimostrato che l'espressione del CB1, uno dei recettori degli endocannabinoidi, aumenta in modo progressivo e significativo durante la megacariocitopoiesi. Il successivo trattamento metanandamide, un agonista del CB1, è in grado di aumentare il numero di cellule mature.

- **Ruolo delle diacilglicerolo chinasi nella megacariocitopoiesi e nella funzionalità piastrinica**

Le diacilglicerolo chinasi (DGKs) fosforilano il diacilglicerolo (DG), con la formazione di acido fosfatidico (PA), regolando quindi i livelli e la segnalazione mediata da DG e PA. Nessuno studio tuttavia è andato a valutare come avvenga la regolazione dell'espressione delle isoforme di DGK durante il differenziamento megacariocitario, a partire da cellule staminali ematopoietiche, nelle piastrine.

In questo contesto per valutare il ruolo di DGK-alpha nella megacariocitopoiesi abbiamo confrontato il potenziale differenziativo di cellule staminali ematopoietiche isolate da topi wild-type e knock-out per DGK-alpha. I nostri dati hanno mostrato che le cellule staminali ematopoietiche KO per DGK-alpha sono in grado di generare un maggior numero di megacariociti mature, con un livello di ploidia e di espressione del CD41 maggiore rispetto alle cellule WT. Inoltre i nostri risultati hanno dimostrato che la formazione delle piastrine, dopo trombocitopenia immuno-indotta, è più rapida nei topi KO rispetto ai topi WT e che le piastrine dei topi KO sono più responsive all'aggregazione indotta da agonisti forti.

- **Ruolo degli estrogeni nel differenziamento megacariocitario**

Un numero sempre crescente di evidenze indicano che gli ormoni sessuali possono giocare un ruolo importante durante la megacariocitopoiesi. Infatti è stato dimostrato che l'estrogeno può essere sintetizzato durante il differenziamento megacariocitario, portando ad un aumento del numero di propiastri formate. Inoltre è stato riportato che l'espressione dei recettori classi degli estrogeni, ER α e ER β , è modulata durante il differenziamento megacariocitario. In letteratura è riportato che gli estrogeni possono indurre effetti rapidi non genomici grazie al legame ad un nuovo recettore per gli estrogeni a 7 domini transmembrana, il GPER. In questo contesto siamo andati a valutare l'espressione di tale recettore durante il differenziamento megacariocitario a partire da cellule staminali ematopoietiche estratte da sangue di cordone ombelicale.

I nostri dati hanno mostrato che l'espressione del GPER diminuisce drasticamente durante il differenziamento megacariocitario e non è più rilevabile nei megacariociti maturi.

Collaborazioni in atto

- Avigliano L. Department of Experimental Medicine and Biochemical Sciences, University of Rome Tor Vergata, Rome, Italy
- Balduini A. Department of Biochemistry, University of Pavia - IRCCS Policlinico San Matteo Foundation, Pavia, Italy
- Maccarrone M. Department of Biomedical Sciences, University of Teramo, Teramo, Italy
- O'Donnell V.B. Department of Medical Biochemistry and Immunology, School of Medicine, Cardiff University, Cardiff CF14 4XN, U.K.
- Torti M. Department of Biochemistry, University of Pavia, via Bassi 21, 27100 Pavia, Italy
- Zhong X Division of Pediatric Allergy & Immunology, Duke University Medical Center, Durham, NC 27710

Principali risultati dell'attività di ricerca

- **Ruolo degli estrogeni nella Malattia di Alzheimer**

Il peptide beta-amiloide (betaAP) induce apoptosi e la down-regulation dell'integrina $\alpha 1/\beta 1$ in cellule neuronali, indicando una relationship tra la neurotossicità indotta da betaAP e la modulazione dell'espressione delle integrine. Un inadeguato controllo del ciclo cellulare può contribuire alla morte neuronale in AD. BetaAP stimola le cellule neuronali ad entrare nel ciclo cellulare, che resta però incompleto e non termina con la mitosi. I dati ottenuti "in vitro" suggeriscono che gli estrogeni proteggono le cellule neuronali dalla neurotossicità causata dal betaAP ristabilendo il controllo dell'espressione dell'integrina $\alpha 1/\beta 1$ e del ciclo cellulare. La fosfatidilinositolo 3-kinasi sembra essere il principale bersaglio effettore dell'azione protettiva degli estrogeni.

- **Studi del meccanismo d'azione del mycolactone, una tossina prodotta dal Mycobacterium ulcerans**

La patogenicità del Mycobacterium ulcerans, l'agente della patologia tropicale "Ulcera del Buruli" (BU), è causata all'effetto citotossico della sua esotossina, il mycolactone. Poiché l'epidermide rappresenta una barriera nei confronti di agenti infettivi presenti nell'ambiente e un'apoptosi bilanciata ha un ruolo fondamentale nell'omeostasi epidermica, abbiamo studiato l'azione apoptotica del mycolactone A/B su due popolazioni di cheratinociti umani, cellule staminali (KSC) e "transit amplifying cells" (TAC) e su una linea di cheratinociti umani, HaCaT. I risultati suggeriscono che i cheratinociti sono selettivamente suscettibili all'apoptosi indotta dal mycolactone e questo danno contribuisce all'insorgenza delle lesioni tipiche riscontrate in BU.

- **Il rilascio selettivo di citochine, chemochine e fattori di crescita da parte di frammenti di cute ("minced skin") coltivati in vitro spiega l'efficacia della tecnica del "minced micrografts" nella terapia delle ulcere cutanee**

Recentemente è stata utilizzata una nuova tecnica per curare le ulcere croniche, chiamata "minced micrografts" che si è rivelata efficace e poco invasiva. In questo studio, abbiamo valutato "in vitro" il rilascio di citochine chemochine e fattori di crescita sia da parte di frammenti di cute prelevati con biopsia da un donatore sano, che sono stati finemente frammentati ("minced sample") che da parte di un campione di cute non frammentata, prelevato dallo stesso donatore ("entire sample"). Il "minced samples", che può essere paragonato al "minced micrografts" utilizzato "in vivo", produce e rilascia concentrazioni maggiori di TNF- α , IL-1 α , PDGF e bFGF, ma livelli più bassi di IL-6, VEGF, MCP-1 and GRO- α dell'"entire samples". In conclusione, la frammentazione "mincing" di cute sana sembra favorire la corretta regolazione della fase infiammatoria ed indurre la sovraespressione di alcuni fattori di crescita che sono coinvolti nella riparazione delle ulcere.

Collaborazioni in atto

- Pamela L.C. Small (Department of Microbiology, University of Tennessee, Knoxville, Tennessee 37996-0845, USA)

Gianluca GAIDANO

Principali risultati dell'attività di ricerca

- Costruzione di un algoritmo clinico-molecolare per la gestione clinica e prognostica della sindrome di Richter
- Identificazione di predittori farmacogenetici per i linfomi aggressivi
- Identificazione di marcatori molecolari predittivi di trasformazione da leucemia linfatica cronica a linfoma aggressivo
- Identificazione di alterazioni molecolari di NFkB come pathway patogenetico predominante nel linfoma marginale splenico

Collaborazioni in atto

- Institute of Cancer Genetics, Columbia University, New York, USA
- Department of Pathology, University of Wisconsin, USA
- IOSI, Bellinzona, CH
- University of Thessaloniki, Greece
- Ematologia, Università degli Studi di Siena
- Ematologia, Università La Sapienza, Roma
- Ematologia, INRCCS-CRO, Aviano
- Ematopatologia, Università degli Studi di Bologna
- HUGEF, Università di Torino

Ciro ISIDORO

Argomenti di ricerca

- Biogenesi e funzione dei Lisosomi e degli organuli lisosoma-simili.
- Biogenesi delle catepsine lisosomiche: meccanismi molecolari di indirizzamento (targeting), trasduzione del segnale e traffico interorganellare, trasporto recettore-dipendente e recettore-indipendente.
- Ruolo dei lisosomi nelle morti cellulari programmate.
- Regolazione e ruolo del turnover macromolecolare autofagia-mediato nel cancro (chemioresistenza e citotossicità dei farmaci anti-tumorali) e nelle malattie neurodegenerative (es. Sclerosi Laterale Amiotrofica, Diabete Insipido NeuroIpofisiario, Malattia di Parkinson).
- Approccio genomico e proteomico-funzionale per l'identificazione di molecole regolatrici la funzione autofagico-lisosomica e per l'identificazione dei substrati della catepsina D.
- Nanobiotecnologie e imaging cellulare e molecolare in patologie umane.

Principali risultati della ricerca

La proteasi lisosomica Catepsina D (CD) è implicata nel controllo dell'omeostasi cellulare e tissutale in quanto coinvolta nei processi proteolitici associati ad autofagia e apoptosi.

La CD svolge molteplici attività all'interno della cellula (nei lisosomi, e in particolari circostanze anche nel citoplasma), ma anche nello spazio extracellulare. Queste attività includono la parziale proteolisi e conseguente attivazione di proteine segnale (enzimi, pro-fattori di crescita, pro-ormoni, etc), la estensiva degradazione di proteine (e quindi inattivazione di proteine segnale), la degradazione di proteine della matrice extracellulare con liberazione di fattori di crescita. La CD quindi può essere implicata in numerose patologie incluse il cancro e le malattie neurodegenerative.

- **Autofagia e proteolisi Catepsina D-mediata nei tumori**

La relazione tra CD e patogenesi e progressione dei tumori è stata discussa nell'articolo-rassegna pubblicato sulla rivista "Cancer Biomarkers" [Nicotra et al., 2010].

Nell'articolo pubblicato sulla rivista "Disease Markers" [Nicotra et al., 2010] si sottolinea il valore diagnostico e prognostico dell'espressione di CD nella patogenesi e progressione dei Linfomi non-Hodgkin (NHLs). I dati ottenuti dalla ricerca pubblicata su "Disease Markers" [Nicotra et al., 2010] indicano che la presenza di un'elevata percentuale di positività per CD (implicata nell'omeostasi del tessuto linfatico) nelle cellule tumorali si riflette negativamente sulla progressione dei NHLs e quindi nel decorso clinico della malattia.

Abbiamo inoltre studiato la regolazione dell'autofagia nella progressione e nella risposta alla chemioterapia in biopsie di pazienti portatori di NHLs. Abbiamo studiato l'espressione funzionale dell'oncosoppressore Beclin-1 nella progressione e nella risposta ai trattamenti terapeutici nei NHLs. Beclin-1, attraverso l'interazione con Bcl-2 o PI3K-III, regola l'apoptosi e l'autofagia, due processi cruciali per l'omeostasi del tessuto linfatico. L'espressione di Beclin-1 è stata dimostrata essere evolutivamente regolata nei linfociti T e B. Abbiamo analizzato la potenziale correlazione tra l'autofagia Beclin-1-mediata e l'evoluzione dei linfomi maligni in risposta alla terapia mediante curve di sopravvivenza Kaplan-Meier. Inoltre, abbiamo analizzato a livello molecolare le interazioni tra beclin-1 e bcl-2 e verificato la effettiva presenza di autofagia nelle cellule tumorali.

I dati pubblicati su “Modern Pathology” [Nicotra et al., 2010] indicano che i NHLs con autofagia up-regolata sono più sensibili alla chemioterapia e che, quindi, l'espressione di beclin-1 essere può rappresentare un prezioso fattore prognostico indipendente in questo gruppo eterogeneo di tumori.

In collaborazione con il gruppo di ricerca della Prof.ssa T. Lah (Slovenia) abbiamo studiato il ruolo delle catepsine lisosomiche L e B (CL, CB) e dell'autofagia in cellule di glioblastoma umano trattate con il chemioterapico As₂O₃ (triossido di arsenico). Nell'articolo pubblicato sulla rivista “Biol Chem” [Pucer et al., 2010] si dimostra che la tossicità dell'As₂O₃ è l'effetto di una complessa interazione tra autofagia e apoptosi (nelle fasi finali sono coinvolte esclusivamente le caspasi) ed è associata ad inibizione della CB, e che questa tossicità è altamente aggravata dalla contemporanea inibizione di CL. Questa sinergia potrebbe essere utilizzata nel trattamento clinico di glioblastomi al fine di abbassare la dose terapeutica, evitando così gli effetti collaterali tossici di As₂O₃.

- **Stress ossidativo, Autofagia e Apoptosi** L'autofagia è un processo di degradazione lisosomica di macroaggregati molecolari, di membrane biologiche e di interi organelli (es. mitocondri) danneggiati dallo stress ossidativo, e pertanto svolge un importante ruolo di 'clearance' (pulizia) nella cellula. Il ruolo protettivo o letale dell'autofagia, innescata dallo stress ossidativo è stato analizzato in due modelli sperimentali.

Cellule dopaminergiche di neuroblastoma umano trattate con perossido di idrogeno (H₂O₂), una specie radicalica estremamente reattiva e prodotta normalmente in seguito all'attività mitocondriale ma anche in condizioni di stress metabolico.

Nell'articolo pubblicato sulla rivista “Toxicological Sciences” [Castino et al., 2010] si dimostra il ruolo centrale dell'autofagia nella morte cellulare indotta da H₂O₂ in cellule dopaminergiche di neuroblastoma.

In collaborazione con il gruppo di ricerca della Prof.ssa Prat, abbiamo studiato in dettaglio l'apoptosi in cellule di muscolo cardiaco e la protezione da stress ossidativo di anticorpi anti-HGF (Hepatocyte growth factor), [Pietronave et al., 2010].

Tutte le risposte biologiche di HGF sono mediate dal recettore tirosin-kinasi Met/HGF-R. Obiettivo dello studio era verificare se un anticorpo monoclonale (MAb) che mimasse l'attività agonista del recettore potesse proteggere cellule del muscolo cardiaco dall'apoptosi indotta da perossido di idrogeno (H₂O₂).

Il MAb inibisce efficacemente il restringimento delle cellule, la frammentazione del DNA, la positività annessina V, la traslocazione mitocondriale di Bax, e l'attivazione delle caspasi indotti da H₂O₂. Questo MAb può quindi essere un valido sostituto di HGF, essendo più facilmente disponibile in una forma biologicamente attiva, altamente stabile, e purificato.

Collaborazioni in atto

- Bonnie F. Sloane, Department of Pharmacology della Wayne State University di Detroit (USA).
- David Murphy, Henry Wellcome Laboratories for Integrative Neuroscience and Endocrinology, University of Bristol (UK)
- Andrej Hasilik, Institute fuer Physiologische Chemie, Klinikum der Philipps-Universitaet Marburg (D).
- Michelle Ollivier, INRA Unité Génomique et Physiologie de la Lactation, Jouy-en-Josas, CEDEX (F).
- Douglas Feinstein, UIC, University of Illinois in Chicago (USA).
- Duncan Smith, Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University, Thailandia.
- Guido Kroemer, INSERM di Villejuif, Università Parigi IX, (F) (mitophagy and mitochondriogenesis)
- Eugenia Dogliotti, Istituto Superiore di Sanità, Roma (autophagy in DNA damage and repair)

- Vincenzo Mollace, Università di Catanzaro “Magna Graecia”, (autophagy and cardiovascular damage)
- Salvatore Coluccia, Dipartimento di Chimica, Università di Torino (functionalization of mesoporous nanoparticles for diagnostic and therapeutic)
- Emanuele Albano – Rita Carini, Dipartimento di Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale di Novara (role of lysosomes in cell death and ischemic preconditioning of hepatocytes)
- Guido Valente, Laboratorio di Anatomia Patologica, Università del Piemonte Orientale di Novara (new molecular prognostic markers in cancer)
- Tamara Lah, National Institute of Biology, Ljubljana, Slovenia, (environmental toxic and carcinogenesis)
- Paul Saftig, Unit of Molecular Cell Biology and Transgenic Research, Institute of Biochemistry, Medical Faculty, University of Kiel, (D) (autophagy and myopathies)
- Lukas Mach Department of Applied Genetics and Cell Biology, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Muthgasse 18, Vienna, Austria. (biogenesis and function of cathepsin)

Lia RIMONDINI

Principali risultati della ricerca

- Sviluppo e caratterizzazione di superfici di materiali impiantabili biomimetiche della matrice extracellulare
- Sviluppo di sistemi nano tecnologici di drug delivering di chemioterapici

Collaborazioni in atto

- Università di Milano – Dipartimento di Morfologia Umana e Scienze Biomediche
- Università di Milano – Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria – S. Paolo
- Politecnico di Milano – Dipartimento di Bioingegneria
- Politecnico di Milano - Dipartimento di Chimica, Materiali e Ingegneria Chimica “G. Natta”
- Politecnico di Torino – Dipartimento di Scienza dei Materiali e Ingegneria Chimica
- Istituti Ortopedici Rizzoli (Bologna) – Laboratorio di Studi Pre-clinici e chirurgici
- Musashino University Tokyo – institute of Pharmaceutical Sciences

Piero STRATTA

Principali risultati della ricerca

- **Diagnostica precoce del rigetto in corso di trapianto di rene: ruolo diagnostico dei depositi della frazione C4D del complemento nell'organo trapiantato**

Tra i 738 pazienti trapiantati di rene, 243 (33%) sono stati sottoposti a biopsia renale sul rene trapiantato almeno una volta : 58 (24%) sono risultati positivi per una patologia immuno-mediata acuta 185 pazienti (76%) presentavano altre alterazioni morfologiche Una positività per il prodotto di degradazione del complemento C4d è stata osservata in 21 casi sui 56 campioni testati (37,5%). Di rilievo il riscontro della associazione tra positività del C4d e maggiore durata della dialisi (8,0 anni) rispetto ai pazienti C4d negativi (4,4 anni; p 0.0116) e più elevato titolo di PRA max . Una positività per il C4d è stata riscontrata in percentuale variabile intorno al 30-40% in tutti i tipi di categorie istologiche diagnosticate alle biopsie dei reni trapiantati (p 0.6627), senza differenza tra rigetto acuto e glomerulopatia acuta da sola o associata al rigetto.

- **Aspetti istopatologici e quadri clinici delle patologie da deposito renale delle immunoglobuline monoclonali nei pazienti con mieloma**

L'andamento del rene ed il ruolo del quadro patologico renale sono stati studiati in quasi 300 pazienti con mieloma multiplo e gammopatia monoclonale: il coinvolgimento renale era il solo fattore significativo di rischio di morte per il paziente, mentre fattori significati di peggioramento del rene erano l'associazione di malattia diabetica(HR3.65, 95% CI:2.08-6.41), la proteinuria a catene leggere (HR 2.18; 95%CI:1.10-4.32) e il tipo di componente monoclonale (p0.0019) . Il quadro patologico renale ha documentato una MIDD in 12/30 casi (40%): 6 λ -amiloidosi ,2 LC disease, 1 heavy chain disease and tre cast nephropathy, ed inoltre 4 glomerulonefriti ,8 arteriolosclerosi and 6 reni normali. La principale conclusione è che il diabete , mescolando il suo quadro con il danno da catene leggere è il più importante fattore di rischio di progressione della malattia renale, accanto all'entità della proteinuria a ncatene leggere

- **Think of variation in the gene encoding hepatocyte nuclear factor (HNF)-1 β in children with renal microcysts lacking nephrocystin mutation and adults mimivking uromodulin mutation**

Programma di ricerca in corso con Genetica dell'Università di Torino e dell'Università del Piemonte Orientale.

- **Analisi biochimica e spettrofotometrica su tessuto renale nelle biopsie renale del rene trapiantato e nativo**

Programma di rivalutazione istopatologica con indagini particolari delle caratteristiche biochimiche dei cristalli di difficile identificazione nelle biopsie renali studiate con metodiche tradizionali.

In collaborazione con Policlinico di Milano. Nefrologia Dialisi e Trapianto e col Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, , Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

Collaborazioni nazionali ed internazionali in atto

- Istituto di Genetica dell'Università di Torino
- Immunologia dei Trapianti dell'Università di Padova
- Immunology Transplantation Center Baltimora
- Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, , Université Pierre et Marie Curie, Paris, France
- Policlinico di Milano. Nefrologia Dialisi e Trapianto

Giovanni VACCA
Claudio MOLINARI
Elena GROSSINI

Principali risultati della ricerca

Vengono sotto riportati gli argomenti principali di studio condotti anche in collaborazione con il reparto di Cardiocirurgia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità di Novara, con l'Institute for Cardiovascular Research, University of Leeds (UK) e col Department of Cardiothoracic Surgery, King's College Hospital, London.

- **Effetti cardioprotettivi della somministrazione intracoronarica di levosimendan contro i danni da ischemia-riperfusione. Ruolo dei canali KATP e del monossido d'azoto.**

Il levosimendan, capostipite dei calcio-sensitizzanti, è un farmaco ampiamente utilizzato per il trattamento dello scompenso cardiaco. Dati precedenti ottenuti nel maiale anestetizzato avevano evidenziato un effetto coronarodilatatore indotto dalla somministrazione intracoronarica del levosimendan correlato all'aumentato rilascio di monossido d'azoto (NO). Gli studi condotti su cellule endoteliali coronariche di maiale hanno, inoltre, evidenziato il coinvolgimento dei canali KATP e delle chinasi intracellulari (ERK, Akt, p38) nell'attivazione della eNOS. Lo scopo del presente progetto di ricerca è stato quello di esaminare gli effetti protettivi della somministrazione intracoronarica di dosi crescenti di levosimendan contro i danni da ischemia/riperfusione nel maiale anestetizzato. In ogni animale sono stati esaminati i parametri emodinamici, quali la pressione arteriosa, la frequenza cardiaca, il flusso ematico coronarico e gli indici di funzionalità miocardica globale e regionale. In alcuni animali la somministrazione di levosimendan è stata effettuata dopo il blocco dei canali KATP ottenuto con la somministrazione di glibenclamide o dopo il blocco della nitrossido sintetasi tramite L-NAME. Inoltre, sono stati effettuati prelievi biotici prima dell'ischemia, al termine dell'ischemia, alla fine della somministrazione di levosimendan e alla fine della riperfusione per esaminare l'espressione dei geni apoptotici, quali Bax, citocromo C, caspasi 3, 8, 9, dei geni anti-apoptotici come Bcl-2 e dei geni autofagici come LC3 e Beclin1. Inoltre è stata valutata l'espressione di ERK e Akt. I risultati ottenuti hanno evidenziato come la somministrazione di levosimendan determini un aumento dose-dipendente del flusso ematico coronarico e dei parametri di funzionalità miocardica. Inoltre, è stato evidenziato un effetto dose-dipendente anti-apoptotico accompagnato da un effetto pro-autofagico. Le risposte osservate, infine, sono risultate abolite dalla somministrazione di glibenclamide e fortemente ridotte dal L-NAME. Sulla base dei suddetti risultati è possibile ipotizzare un effetto cardio-protettivo del levosimendan mediato dai canali KATP e dall'NO volto a ostacolare la morte cellulare per apoptosi.

- **Effetto del levosimendan sull'apoptosi e l'autofagia in cardiomiociti**

Il levosimendan, agente inotropo e vasodilatante utilizzato per il trattamento dello scompenso cardiaco, esercita effetti cardioprotettivi contro i danni da ischemia/riperfusione attraverso l'apertura di canali dei canali KATP e il rilascio di monossido d'azoto (NO). Le azioni benefiche del levosimendan contro i danni ischemici conseguono anche alle sue azioni di modulazione dei processi implicati nel rimodellamento cardiaco, risposta patologica ad un insulto miocardico caratterizzata, oltre che dall'ipertrofia e dalle alterazioni dell'ambiente interstiziale, anche da fenomeni di apoptosi, necrosi e di autofagia. Nei miociti isolati il levosimendan si è dimostrato in grado di prevenire il danno apoptotico attraverso l'apertura dei canali KATP mitocondriali. In pazienti affetti da scompenso cardiaco la somministrazione di levosimendan ha indotto sia una significativa riduzione del rilascio di citochine come l'interleuchina-6 e il fattore di necrosi tumorale, che sono bene in grado di deprimere la capacità funzionale cardiaca e promuovere l'apoptosi, sia di ostacolare l'espressione del sistema Fas/Fas ligando. Gli studi precedenti condotti nel maiale anestetizzato avevano evidenziato come la somministrazione intracoronarica

di di levosimendan nel modello animale di ischemia/riperfusion fosse in grado di ridurre l'espressione di geni antiapoptotici quali Bax e citocromo C e aumentare l'espressione di geni antiapoptotici e proautofagici quali Bcl2, Beclin1 ed LC3II. Tali effetti protettivi erano risultati correlati all'apertura dei canali KATP e al rilascio di NO. Lo scopo del presente progetto di ricerca è stato, pertanto, quello di esaminare in vitro gli effetti del levosimendan sull'apoptosi e l'autofagia analizzando più nel dettaglio il ruolo dei canali KATP e dell'NO. E' stato, inoltre, valutato l'effetto del levosimendan sull'attivazione di ERK1/2 e Akt, fattori implicati nelle vie di sopravvivenza cellulare. Nei miocardiociti H9C2 sottoposti a danno ischemico indotto da H₂O₂ (200 µM per 20 min) sono stati esaminati gli effetti del levosimendan (10 µM) sull'espressione di Bax, del citocromo C, di Beclin 1, di ERK1/2 e di Akt. E' stata inoltre valutata l'attivazione della caspasi 3. Esperimenti analoghi sono stati ripetuti in presenza di agonisti e antagonisti dei canali KATP (non selettivi e selettivi per i canali mitocondriali) e dell'NO. I risultati ottenuti dimostrano come il levosimendan riduca fortemente l'espressione dei geni apoptotici e aumenti l'attivazione di quelli autofagici e delle vie di sopravvivenza cellulare attraverso l'apertura dei canali KATP, in particolare mitocondriali, ed il rilascio di NO.

- **Effetti cardiovascolari della somministrazione intracoronarica di gastrina 17 nel maiale anestetizzato. Ruolo del sistema nervoso autonomo, del monossido d'azoto e dei recettori CCK.**

E' noto dalla letteratura come gli ormoni gastrointestinali intervengano nel controllo dell'apparato cardiovascolare. I risultati della presente ricerca hanno ampliato le informazioni riguardanti l'effetto della gastrina 17, ormone fortemente rilasciato dalle cellule G gastriche in risposta all'introduzione di cibo nello stomaco, sulla funzione e perfusione cardiaca. La gastrina 17 è stata somministrata per via intracoronarica in 40 maiali anestetizzati, alle dosi corrispondenti a quelle rilasciate in circolo durante un pasto. I suoi effetti sul flusso coronarico e sulla forza di contrazione miocardica sono stati valutati prevenendo le variazioni della frequenza cardiaca e della pressione arteriosa. Gli effetti della gastrina 17 sono, inoltre, stati paragonati a quelli degli agonisti dei recettori CCK1 e CCK2, rispettivamente, CCK33 e pentagastrina. In 5 dei suddetti animali è stato anche condotto uno studio dose-risposta, infondendo dosi crescenti dell'ormone in esame. In 35 dei 40 maiali il meccanismo d'azione della gastrina 17 è stato esaminato ripetendo la somministrazione dell'ormone dopo blocco dei recettori colinergici (n=5), alfa-adrenergici (n=5), beta1 adrenergici (n=5), beta2-adrenergici (n=5), dei recettori CCK1 (n=5), dei recettori CCK2 (n=5) e della nitrossido sintetasi (n=5). La somministrazione intracoronarica di gastrina 17 ha aumentato, in modo dose-dipendente, il flusso ematico coronarico e la forza di contrazione cardiaca. Gli effetti sul flusso coronarico erano simili a quelli causati dalla pentagastrina, mentre il CCK33 non determinava variazioni significative della funzionalità cardiaca e aumentava il flusso ematico coronarico in misura minore rispetto a quanto osservato con la gastrina 17. Gli effetti della gastrina 17 erano, inoltre, aboliti dal blocco dei recettori beta adrenergici, dei recettori CCK1/CCK2 e della nitrossido sintetasi. In conclusione, i risultati di questa ricerca hanno evidenziato come la gastrina 17 aumenti il flusso ematico coronarico e la funzione cardiaca attraverso il coinvolgimento sia del sistema nervoso autonomo, che dei recettori specifici CCK, che del monossido d'azoto.

- **Effetti cardiovascolari della somministrazione intracoronarica di melatonina nel maiale anestetizzato**

La melatonina, ormone secreto dalla ghiandola pineale con un andamento circadiano influenzato dall'alternanza buio-luce, è implicata nel controllo di molte funzioni fisiologiche incluse quelle relative all'apparato cardiovascolare. E' stato, ad esempio, dimostrato che la melatonina induce ipotensione e ha effetti variabili sulla frequenza cardiaca e la contrattilità miocardica. Bassi livelli di melatonina sono stati riscontrati in diverse condizioni patologiche tra cui ipertensione, scompenso cardiaco grave e malattia ischemica cardiaca o infarto del miocardio. Tali effetti cardiovascolari sono stati variamente imputati ad un'interazione della melatonina col sistema nervoso centrale o autonomo, al miglioramento della risposta baroriflessa, all'interazione della melatonina coi recettori specifici MT1 e/o MT2 e alla preservazione della funzione endoteliale.

A questo proposito i dati riguardanti il ruolo del monossido d'azoto (NO) nella genesi delle risposte emodinamiche sono piuttosto discordanti. Pur essendo presenti informazioni in letteratura circa gli effetti cardiovascolari della melatonina, i dati riguardanti il circolo coronarico e la funzione cardiaca sono tuttavia scarsi e, come sopra ricordato, non univoci. Per questo motivo in questo studio abbiamo voluto indagare gli effetti diretti della melatonina sul flusso ematico coronarico e la contrattilità miocardica conducendo esperimenti a pressione arteriosa e frequenza cardiaca costanti. È ben noto, infatti, come variazioni dei suddetti parametri emodinamici influenzino la perfusione miocardica e la forza di contrazione cardiaca attraverso meccanismi nervosi riflessi, fisici ed umorali. Inoltre, abbiamo voluto analizzare il ruolo del sistema nervoso autonomo, dei recettori MT1/MT2 e dell'NO. In 35 maiali posti in anestesia generale la melatonina infusa nella coronaria discendente anteriore alla dose di 70 pg per ml/min di flusso ematico coronarico ha aumentato il flusso coronarico stesso, il dP/dtmax (indice di contrattilità miocardica), la percentuale di accorciamento segmentale del ventricolo (%SS) e la gittata cardiaca di circa il 12%, il 14%, l'8% e il 23% dei rispettivi valori di controllo ($P < 0.05$). Tali effetti erano accompagnati da un aumento del rilascio dell'NO, dosato dal sangue del seno venoso coronarico, di circa il 46% del valore basale. In altri 5 maiali è stato, inoltre, possibile ottenere un effetto dose-risposta su tutti i parametri analizzati, infondendo la melatonina a dosi comprese tra 6.56 e 320.2 pg per ml/min di flusso coronarico. Mentre il blocco dei recettori colinergici ($n=5$) e dei recettori alfa-adrenergici ($n=5$) non ha abolito le risposte osservate, dopo blocco dei recettori beta1-adrenergici ($n=5$) la melatonina non ha più indotto variazioni della forza di contrazione miocardica, rimanendo invece inalterato l'aumento del flusso ematico coronarico. Il blocco dei recettori beta2-adrenergici ($n=5$) e della NO sintetasi ($n=5$) ha, invece, abolito la risposta coronarica alla melatonina e l'aumento del rilascio di NO. Infine, tutti gli effetti cardiovascolari causati dall'ormone sono risultati prevenuti dal blocco dei recettori MT1 e MT2 ($n=10$). In conclusione, la melatonina aumenta primariamente il flusso ematico coronarico e la funzione cardiaca attraverso il coinvolgimento dei recettori MT1/MT2, dei recettori beta-adrenergici e dell'NO.

- **Utilizzo di un doppio patch per la riparazione del difetto settale di origine ischemica inserito attraverso una singola ventri colotomia**

Lo sviluppo del difetto del setto interventricolare (VSD) è una complicazione piuttosto frequente dell'infarto miocardico acuto ed è responsabile del 5% circa dei decessi delle fasi precoci dell'infarto. Molte tecniche chirurgiche sono state sviluppate nel corso degli anni per porre rimedio a tale catastrofica complicità. Tuttavia molte di esse non sono risultate sceve da problematiche relative, ad esempio, alla fragilità del tessuto necrotico miocardico sottoposto a sutura. Inoltre, la maggior parte delle suddette tecniche si avvaleva di una ventricolotomia bilaterale o utilizzava patch pericardici. In questo studio è stata esaminata l'efficacia di una nuova tecnica di riparazione del VSD, riproducibile, bisettale, con doppio patch sintetico posizionato tramite singola ventricolotomia sinistra. È stato dimostrato come la riparazione chirurgica condotta con questa tecnica prevenga le recidive della VSD riducendo la tensione sulle suture e prevenendo le infiltrazioni di sangue lungo le linee di sutura. Questa tecnica si avvale, inoltre, della colla GFR per ottenere una migliore emostasi senza rischi aggiunti di embolizzazione. Inoltre, si è osservato un blocco della citolisi nel tessuto miocardico perischemico, con ulteriore stabilizzazione del tessuto stesso e miglioramento delle sue proprietà meccaniche. Infine, l'utilizzo di un doppio patch bilaterale ha ridotto la discinesia settale sinistra grazie ad un miglior bilanciamento e distribuzione delle forze di tensione tra i due ventricoli. Va ancora ricordato come tra i vantaggi di questa tecnica vi sia la riduzione dei tempi operatori con miglioramento della funzione cardiaca.

- **Trattamento dello scompenso cardiaco acuto tramite somministrazione intracoronarica di levosimendan in pazienti affetti da shock cardiogeno sottoposti a interventi di cardiocirurgia**

L'effetto benefico del levosimendan, agente calcio-sensitizzante utilizzato nello scompenso cardiaco, può essere limitato dall'ipotensione che si osserva a seguito della sua somministrazione

per via endovenosa. In questo studio abbiamo, quindi, voluto valutare l'efficacia del levosimendan, somministrato attraverso una via alternativa a quella sistemica, in pazienti affetti da shock cardiogeno refrattario ai comuni inotropi e sottoposti a intervento di cardiocirurgia. La nostra ipotesi era quella secondo cui l'infusione locale, intracoronarica, di levosimendan, avrebbe esercitato minori effetti a livello sistemico, pur mantenendo inalterata la sua azione a livello cardiaco. I 33 pazienti reclutati nello studio avevano indice cardiaco inferiore a 2.1 nonostante il trattamento con adrenalina e/o posizionamento del contropulsatore. Sono stati misurati i seguenti parametri: flusso ematico nei graft vascolari, pressione arteriosa sistodiastolica, frequenza cardiaca, pressione arteriosa e di incuneamento polmonare, pressione atriale, indice cardiaco, frazione di eiezione, rapporto E/A e resistenze vascolari sistemiche. Tramite eco trans-esofageo è stato esaminato il movimento del ventricolo sinistro e i valori ottenuti sono stati utilizzati per costruire uno score di funzione (WMSI; punteggio 1 = movimento normale; punteggio 2 = ventricolo ipocinetico; punteggio 3 = ventricolo acinetico; punteggio 4 = ventricolo discinetico). Sono, inoltre, stati misurati il pH, la PO₂, la PCO₂, la saturazione di ossigeno, il glucosio, il calcio e il lattato sia nel sangue cardiaco venoso che arterioso. È stato calcolato il contenuto di ossigeno nel sangue cardiaco venoso e arterioso utilizzando la formula $(1.39 \times \text{emoglobina}) \times \text{saturazione di ossigeno} + (0.0031 \times \text{tensione di ossigeno})$. I valori ottenuti sono stati utilizzati per ricavare l'estrazione miocardica di ossigeno. Infine, la produzione di acidi da parte del miocardio è stata calcolata dalla misurazione della concentrazione di ioni H⁺ nel sangue arterioso e venoso cardiaco. Il levosimendan è stato somministrato in bolo nei graft o nell'aorta clampata, al termine del bypass cardiopolmonare alla dose corrispondente a 24 microg/kg e calcolata in relazione alla massa cardiaca del paziente. La somministrazione di levosimendan ha determinato un aumento significativo del flusso ematico nei graft vascolari, della pressione arteriosa sistolica e una riduzione delle pressioni di incuneamento polmonare e arteriosa polmonare (P < 0.05). A tali effetti emodinamici si accompagnava un miglioramento del rapporto E/A, della frazione di eiezione, dell'indice cardiaco e dello score WMSI (P < 0.05). Si osservava, infine, un miglioramento del metabolismo cardiaco, come dimostrato dalla riduzione della produzione di lattati e dal contemporaneo aumento dell'estrazione miocardica di ossigeno e di glucosio. In conclusione la somministrazione intracoronarica di levosimendan in pazienti affetti da scompenso cardiaco acuto è un metodo valido ed efficace per ottenere un miglioramento della funzione cardiaca in assenza di ipotensione. Sulla base di tali osservazioni, la somministrazione intracoronarica di levosimendan potrebbe, pertanto, entrare nell'uso routinario in sala operatoria e/o nei laboratori di emodinamica.

Collaborazioni in atto

- Dott. Philippe Caimmi, dirigente medico di primo livello in servizio presso il reparto di Cardiocirurgia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità di Novara.
- Dott. David Mary, Institute for Cardiovascular Research, University of Leeds (UK)
- Dott. Emmanouil Kapetanakis, Department of Cardiothoracic Surgery, King's College Hospital, London

Allegato 2

N	Titolo articolo	Nome rivista	Autori	Impact Factor (su ISI 2009)	Vol.	pagine o DOI
1	Peritoneal psammocarcinoma diagnosed by a Papanicolaou smear: a case report	ACTA CYTOL	Riboni F, Giana M, Piantanida P, Vigone A, Surico N, Boldorini R.	0,690	54 (3)	311-313
2	Effectiveness and safety of drug-eluting stents in vein grafts: a meta-analysis.	AM HEART J	Navarese EP, Buffon A, De Luca G, De Servi S.	4,357	160 (2)	e9
3	Evaluation and management of special subgroups after primary percutaneous coronary intervention.	AM HEART J	De Luca L, Tomai F, Verdoia M, De Luca G.	4,357	160 (S6)	S22-S27
4	Meta-analysis of ablation of atrial flutter and supraventricular tachycardia.	AM J CARDIOL	Navarese EP, Lupi A, Buffon A, De Luca G.	3,575	105 (5)	758
5	Analysis of the REL, BCL11A, and MYCN proto-oncogenes belonging to the 2p amplicon in chronic lymphocytic leukemia.	AM J HEMATOL	Deambrogi C, De Paoli L, Fangazio M, Cresta S, Rasi S, Spina V, Gattei V, Gaidano G, Rossi D.	2,610	85 (7)	541-544
6	Low CD49d expression and long telomere identify a chronic lymphocytic leukemia subset with highly favourable outcome.	AM J HEMATOL	Rossi D, Bodoni CL, Zucchetto A, Rasi S, De Paoli L, Fangazio M, Rossi FM, Ladetto M, Gattei V, Gaidano G.	2,610	85 (8)	619-622
7	Safe and effective use of plerixafor plus G-CSF in dialysis-dependent renal failure.	AM J HEMATOL	Pinto V, Castelli A, Gaidano G, Conconi A.	2,610	85 (6)	461-462
8	Decreased kidney function and crystal deposition in the tubules after kidney transplant.	AM J KIDNEY DIS	Stratta P, Fogazzi GB, Canavese C, Airolidi A, Fenoglio R, Bozzola C, Ceballos-Picot I, Bollée G, Daudon M.	5,152	56 (3)	585-590
9	Pregnancy and progression of IgA nephropathy: results of an Italian multicenter study.	AM J KIDNEY DIS	Limardo M, Imbasciati E, Ravani P, Surian M, Torres D, Gregorini G, Magistroni R, Casellato D, Gammaro L, Pozzi C; Rene e Gravidanza Collaborative Group of the Italian Society of Nephrology.	5,152	56 (3)	506-512
10	Agonist monoclonal antibodies against HGF receptor protect cardiac muscle cells from apoptosis.	AM J PHYSIOL HEART CIRC PHYSIOL	Pietronave S, Forte G, Locarno D, Merlin S, Zamperone A, Nicotia G, Isidoro C, Nardo PD, Prat M.	3,712	298 (4)	H1155-1165
11	Hepcidin and Hfe in iron overload in beta-thalassemia.	ANN NY ACAD SCI	Gardenghi S, Ramos P, Follenzi A, Rao N, Rachmilewitz EA, Giardina PJ, Grady RW, Rivella S.	2,670	1202	221-225
12	Subcutaneous 'lipoma-like' B-cell lymphoma associated with HCV infection: a new presentation of primary extranodal marginal zone B-cell lymphoma of MALT.	ANN ONCOL	Paulli M, Arcaini L, Lucioni M, Boveri E, Capello D, Passamonti F, Merli M, Rattotti S, Rossi D, Riboni R, Berti E, Magrini U, Bruno R, Gaidano G, Lazzarino M.	5,647	21 (6)	1189-1195
13	Double patch repair through a single ventriculotomy for ischemic ventricular septal defects.	ANN THORAC SURG	Caimmi PP, Grossini E, Kapetanakis EI, Boido R, Coppo C, Scappellato F, Vacca G, Teodori G.	3,644	89 (5)	1679-1681
14	Minilaparotomy in spinal anaesthesia: a surgical choice in treatment of benign gynaecologic disease.	ARCH GYNECOL OBSTET	Surico D, Mencaglia L, Riboni F, Vigone A, Leo L, Surico N.	0,912	281 (3)	461-465
15	Role of HPV testing in the follow-up of women treated for cervical dysplasia	ARCH GYNECOL OBSTET	Ribaldone R, Boldorini R, Capuano A, Arrigoni S, Di Oto A, Surico N	0,912	282 (2)	193-197
16	Reliability and reproducibility of the edmondson grading of hepatocellular carcinoma using paired core biopsy and surgical resection specimens.	ARCH PATHOL LAB MED	Pirisi M, Leutner M, Pinato DJ, Avellini C, Carsana L, Toniutto P, Fabris C, Boldorini R.	2,558	134 (12)	1818-1822
17	Relative survival of patients with lupus nephritis significantly improved over time in an Italian region.	ARTHRITIS CARE RES (HOBOKEN)	Stratta P, Canavese C, Ciccone G, Rosso S.	PubMed-indexed, not ISI	62 (12)	1812-1813
18	A 3'-untranslated region variant is associated with impaired expression of CD226 in T and natural killer T cells and is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus.	ARTHRITIS RHEUM	Löfgren SE, Delgado-Vega AM, Gallant CJ, Sánchez E, Frostegård J, Truedson L, de Ramón Garrido E, Sabio JM, González-Escribano MF, Pons-Estel BA, D'Alfonso S, Witte T, Lauwerys BR, Endreffy E, Kovács L, Vasconcelos C, Martins da Silva B, Martín J, Alarcón-Riquelme ME, Kozyrev SV.	7,332	62 (11)	3404-3414
19	Cytokines release inhibition from activated monocytes, and reduction of in-stent neointimal growth in humans.	ATHEROSCLEROSIS	Pesařini G, Amoruso A, Ferrero V, Bardelli C, Fresu LG, Perobelli L, Scappini P, De Luca G, Brunelleschi S, Vassanelli C, Ribichini F, De Luca G, Malek LA, Maciejewski P, Wasek W, Niewada M, Kamiński B, Drze wiecki J,	4,522	211 (1)	242-248
20	Impact of diabetes on survival in patients with ST-segment elevation myocardial infarction treated by primary angioplasty: insights from the POLISH STEMI registry.	ATHEROSCLEROSIS	Kořmider M, Kubica J, Ruzyllo W, Peruga JZ, Dudek D, Opolski G, Dobrzycki S, Gil RJ, Witkowski A	4,552	210 (2)	516-520
21	The interferon-inducible HIN-200 gene family in apoptosis and inflammation: implication for autoimmunity.	AUTOIMMUNITY	Mondini M, Costa S, Sponza S, Gugliesi F, Gariglio M, Landolfo S.	2,813	43 (3)	226-231
22	Celiac anti-tissue transglutaminase antibodies interfere with the uptake of alpha gliadin peptide 31-43 but not of peptide 57-68 by epithelial cells.	BBA-MOL BASIS DIS	Caputo I, Barone MV, Lepretti M, Martucciello S, Nista I, Troncone R, Auricchio S, Sblattero D, Esposito C.	4,139	1802	717-727
23	Differential role of cathepsins B and L in autophagy-associated cell death induced by arsenic trioxide in U87 human glioblastoma cells.	BIOL CHEM	Pucer A, Castino R, Mirković B, Falnoga I, Slejkovec Z, Isidoro C, Lah TT.	2,732	391 (5)	519-531