

GIUSEPPE AMADORI, *L'anemia del trapiantato di fegato : risultati preliminari di uno studio clinico-sperimentale*, in «Atti della Accademia Roveretana degli Agiati. B, Classe di scienze matematiche, fisiche e naturali» (ISSN: 1124-0350), s. 8 v. 3 (2003), pp. 5-34.

Url: <https://heyjoe.fbk.eu/index.php/atagb>

Questo articolo è stato digitalizzato dal progetto ASTRA - *Archivio della storiografia trentina*, grazie al finanziamento della Fondazione Caritro (Bando Archivi 2021). ASTRA è un progetto della Biblioteca Fondazione Bruno Kessler, in collaborazione con Accademia Roveretana degli Agiati, Fondazione Museo storico del Trentino, FBK-Istituto Storico Italo-Germanico, Museo Storico Italiano della Guerra (Rovereto), e Società di Studi Trentini di Scienze Storiche. ASTRA rende disponibili le versioni elettroniche delle maggiori riviste storiche del Trentino, all'interno del portale [HeyJoe](#) - *History, Religion and Philosophy Journals Online Access*.

This article has been digitised within the project ASTRA - *Archivio della storiografia trentina* through the generous support of Fondazione Caritro (Bando Archivi 2021). ASTRA is a Bruno Kessler Foundation Library project, run jointly with Accademia Roveretana degli Agiati, Fondazione Museo storico del Trentino, FBK-Italian-German Historical Institute, the Italian War History Museum (Rovereto), and Società di Studi Trentini di Scienze Storiche. ASTRA aims to make the most important journals of (and on) the Trentino area available in a free-to-access online space on the [HeyJoe](#) - *History, Religion and Philosophy Journals Online Access* platform.

Nota copyright

Tutto il materiale contenuto nel sito [HeyJoe](#), compreso il presente PDF, è rilasciato sotto licenza [Creative Commons](#) Attribuzione–Non commerciale–Non opere derivate 4.0 Internazionale. Pertanto è possibile liberamente scaricare, stampare, fotocopiare e distribuire questo articolo e gli altri presenti nel sito, purché si attribuisca in maniera corretta la paternità dell’opera, non la si utilizzi per fini commerciali e non la si trasformi o modifichi.

Copyright notice

All materials on the [HeyJoe](#) website, including the present PDF file, are made available under a [Creative Commons](#) Attribution–NonCommercial–NoDerivatives 4.0 International License. You are free to download, print, copy, and share this file and any other on this website, as long as you give appropriate credit. You may not use this material for commercial purposes. If you remix, transform, or build upon the material, you may not distribute the modified material.



GIUSEPPE AMADORI (*)

L'ANEMIA DEL TRAPIANTATO DI FEGATO: RISULTATI PRELIMINARI DI UNO STUDIO CLINICO-SPERIMENTALE

ABSTRACT - AMADORI G., 2003 - Orthotopic Liver Transplantation and Anemia: preliminary report of a clinical experimental study.

Atti Acc. Rov. Agiati, a. 253, 2003, ser. VIII, vol. III, B: 5-34.

Anemia and peripheral cytopenia with dysplastic abnormalities are not rare complications in patients with orthotopic liver transplantation (OLT). Little interest is yet devoted to those abnormalities. In this paper we evaluate 7 patients with OLT and anemia under chronic therapy with Cyclosporin A in comparison with two normal subjects and two patients with primitive myelodysplastic syndrome. We evaluate the bone marrow's cellularity and cytologic morphology (particularly in respect to dysplastic abnormalities), the immunophenotype of bone-marrow and peripheral cells, the bone marrow cell's cultures in standard medium and in medium with increasing concentrations of Cyclosporin A. In patients with OLT lighter dysplastic abnormalities in respect to patients with primary myelodysplasia are observed. In the same patients the immunophenotype shows important reductions of CD4+ lymphocytes and CD4+/CD8+ ratio variably inverted. The bone marrow cell's growth in culture regarding to the BFU-E and CFU-GM shows reduction of the first in normal subjects and in patients with OLT and low bone marrow cellularity, whereas in patients with OLT and with normal bone marrow cellularity the growth is higher. The cases with good growth of erythroid colonies have lower CD4+/CD8+ ratio. The growth of CFU-GM is approximately normal. These results let us suppose as possible causes of cytopenia and dysplastic abnormalities in patients with OLT either a different grade of immunosuppression induced by Cyclosporin A, in particular of CD4+/CD8+ ratio, or subclinical viral infection, probably due to herpetic viruses or to Parvovirus B19.

KEY WORDS - Orthotopic Liver Transplantation, Myelodysplastic Syndromes, Anemia, Immunophenotype, Bone-Marrow's Cell Culture.

RIASSUNTO - AMADORI G., 2003 - L'anemia del trapiantato di fegato: risultati preliminari di uno studio clinico-sperimentale.

(*) Professore Associato di Ematologia dell'Università di Padova.

L'anemia e la citopenia periferica, complicanze non rare del trapianto di fegato e di cuore, hanno ottenuto finora poca attenzione. In questo lavoro sono stati studiati 7 pazienti portatori di trapianto ortotopico di fegato (OLT) e di anemia, in terapia cronica con Ciclosporina A, paragonandoli a due normali e due mielodisplastici primitivi. È stata valutata la cellularità e la morfologia cellulare midollare, l'immunofenotipo periferico e midollare, le culture midollari in terreni di cultura standard, e in presenza di varie concentrazioni di Ciclosporina A. Nei portatori di trapianto sono state notate anomalie displastiche più lievi rispetto a quelle delle mielodisplasie primitive. L'immunofenotipo mostra chiara riduzione dei linfociti CD4+ nei trapiantati con rapporto CD4+/CD8+ variamente invertito. La crescita in cultura delle cellule midollari per quanto riguarda BFU-E e CFU-GM ha dato riduzione delle prime nei normali e nei pazienti con cellularità midollare scarsa, mentre nei trapiantati con midollo normale la crescita è aumentata. Nei casi con buon sviluppo di colonie eritroidi è presente rapporto CD4+/CD8+ più basso. La crescita di CFU-GM non si discosta molto dal normale. Questi risultati lasciano intravedere come possibili cause sia un diverso grado di immunodepressione esercitato dal farmaco, in particolare sul rapporto CD4+/CD8+, che possibili infezioni virali subcliniche, particolarmente da virus erpetici o da Parvovirus B19.

PAROLE CHIAVE - Trapianto di fegato, Mielodisplasie, Anemia, Immunofenotipo, Culture midollari in vitro.

Alcune delle procedure terapeutiche mediche e chirurgiche sviluppate in tempi recenti, pur conseguendo risultati eccezionalmente validi, a volte spettacolari, sono talvolta seguite da conseguenze negative importanti, tanto che si è più volte parlato, forse con esagerato pessimismo, di «Vittorie di Pirro» (Pyrric victory, meglio interpretabile come «Vittoria su Pirro»).

Tra queste è da annoverare innanzitutto il trapianto d'organo, che rappresenta spesso il rimedio definitivo di insufficienze gravi, altrimenti non rimediabili, di funzioni vitali irrimediabilmente lese. L'affinamento delle tecniche chirurgiche, della tecnologia della conservazione d'organo e, soprattutto, la disponibilità di efficaci farmaci immunosoppressori che bloccano la reazione di rigetto, mediato principalmente dai linfociti T, hanno reso possibile il successo del trapianto di rene, cuore, fegato, polmone, pancreas ed intestino. L'efficace immunosoppressione si ottiene principalmente con la Ciclosporina A, il Tacrolimus (o FK506), la Rapamicina e l'immunoglobulina anti CD3 (cioè un anticorpo diretto contro i linfociti T), il cui uso prolungato si associa però a effetti collaterali anche seri, quali l'aumentata incidenza di tossicità specifiche, di infezioni, e di tumori, in questo caso per abolizione del controllo immunologico sulla crescita delle neoplasie (WIESNER e coll.).

Una manifestazione non rara dopo trapianti omologhi è la citopenia ematologia che si manifesta in oltre il 10% dei casi dopo trapianto di

fegato e di cuore (MISRA e coll.). I casi più gravi, vere e proprie anemie aplastiche, insorgono poco dopo l'intervento e sono spesso fatali, quando non sia possibile il trapianto di midollo (PERKINS e coll.). Le forme più lievi, come quelle descritte nel presente lavoro, compaiono dopo alcune settimane o anche mesi e si caratterizzano per riduzione di eritrociti, granulociti e piastrine, più spesso associate, talora singole, alle quali corrispondono alterazioni morfologiche midollari e periferiche del tutto simili alla mielodisplasia primitiva (MDS) ⁽¹⁾. In questi casi non sono presenti né la monoclonalità, né le alterazioni genetiche, né l'aumento midollare e periferico delle cellule blastiche, né quelle anomalie biochimico-funzionali delle mielodisplasie vere. Se tali alterazioni fossero riconosciute come sindromi mielodisplastiche vere, presenterebbero una prognosi sfavorevole, evolvendo queste nel 15-20% dei casi in leucemie acute.

Nell'ambito dei controlli seriatati dei pazienti trapiantati di fegato presso il Policlinico dell'Università di Padova, dal 1995 al 2000 si sono avuti una trentina di casi di citopenia ematologia evidente.

Si trattava di pazienti principalmente anemizzati, o con alterazioni quantitative contemporanee delle altre filiere, senza che vi fosse una evidente causa di ciò (perdita ematica, anamnesi positiva per malattie ematologiche, neoplasie, alterazioni iatrogene), ove si eccettui un possibile ruolo della Ciclosporina A. Tutti sono stati sottoposti ad accurata valutazione morfologica periferica e midollare che ha consentito di apprezzare sempre note simil-displastiche chiare con midollo per lo più normo-ipercellulare e solo in alcuni ipocellularità.

Non sono invece state osservate evoluzioni in senso leucemico come si verifica nelle comuni mielodisplasie idiopatiche o secondarie a radio/chemioterapia antiblastica.

La causa delle condizioni simil-mielodisplastiche che compare dopo trapianto non è nota. Esiguo sono le segnalazioni in letteratura e gli studi sulle caratteristiche funzionali delle cellule ematiche staminali e mature, nonché sulla biologia molecolare, che prendono in considerazione il trapianto ortotopico di fegato (OLT= orthotopic liver transplantation).

⁽¹⁾ Per «Sindromi Mielodisplastiche» si intendono condizioni ematologiche caratterizzate da anomalie morfologiche cellulari discrete interessanti una o più filiere (precursori di globuli rossi, bianchi o piastrine), anemia, leucopenia e piastrinopenia presenti singolarmente o in associazione. Sono alterazioni clonali con possibilità di svariate anomalie cromosomiche acquisite, che possono evolvere in leucemia acuta. Pertanto sono oggi ritenute neoplasie fino dall'inizio.

Si possono avanzare delle ipotesi, tutte da verificare. La prima riguarda la possibile responsabilità della Ciclosporina A attraverso l'azione sui linfociti T. È noto che numerosi fattori di crescita emopoietica sono prodotti da queste cellule e pertanto la loro riduzione, numerica o funzionale, potrebbe accompagnarsi a minore produzione midollare. Questo meccanismo potrebbe stare alla base dei casi con midollo ipocellulare, ma non spiegherebbe gli aspetti displastici, né la normalità dei valori ematologici della maggioranza dei pazienti, che segue la stessa terapia. La fig. 1 illustra il meccanismo di azione di Ciclosporina A e Tacrolimus (JORGENSEN e coll.).

La seconda suppone un'azione tossica midollare da parte di agenti infettivi, in particolare dei virus Parvovirus B19 (implicato recentemente come fattore causale di epatiti fulminanti (EIS-HUBINGER), il virus dell'epatite B (HBV), dell'epatite C (HCV), quello di Epstein-Barr e Citomegalovirus, il virus erpetico 6 (HHV6, DROBYSKI e coll.), o altri sconosciuti (CAINELLI e VENTO). Il primo possiede tossicità diretta su cellule

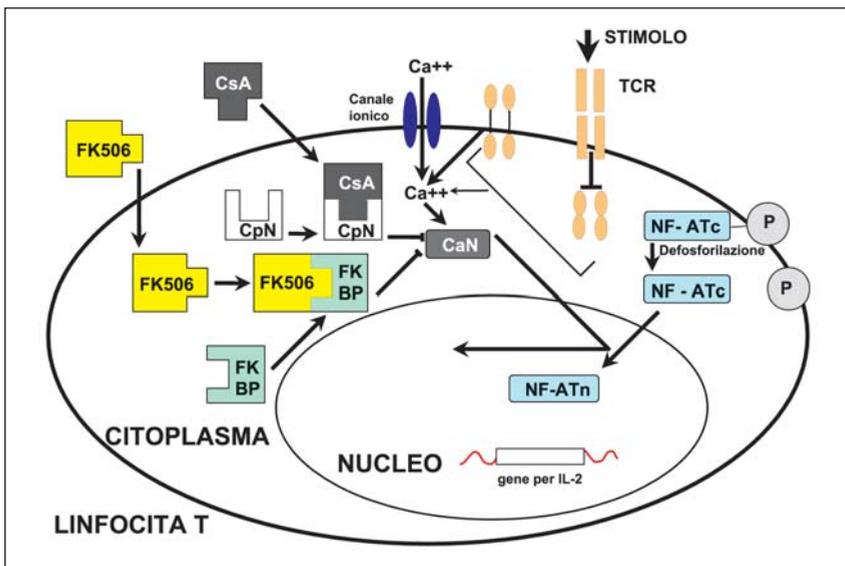


Fig. 1. Meccanismo di azione della Ciclosporina A e del Tacrolimus (FK506). Entrata nel citoplasma, la Ciclosporina A (CsA) si complessa con una proteina, la Ciclofillina (CpN). Nel citoplasma si trova il fattore di trascrizione NF-ATc in forma fosforilata, che in condizioni normali, in seguito a stimoli diversi, viene defosforilato dalla Calcineurina (CaN) ed in questa forma passa nel nucleo, dove promuove la trascrizione di Interleuchina 2 e l'attivazione dei linfociti T. Il complesso CsA-CpN blocca l'enzima Calcineurina (CaN) e pertanto anche la sintesi dell'Interleuchina 2, frenando efficacemente le funzioni dei linfociti T, tra le quali il rigetto di organi trapiantati. Simile è l'azione del Tacrolimus, che blocca egualmente la Calcineurina.

staminali emopoietiche ed è causa della nota citopenia transitoria che compare successivamente all'esantema da esso provocato (V° malattia). Si suppone che in soggetti trapiantati ed immunodepressi siano possibili infezioni e reinfezioni con decorso subclinico prolungato ed effetti ematologici in parte imprevedibili, da verificare. Per quanto riguarda l'HCV ed altri possibili virus ancora non identificati, causa di insufficienza epatica acuta, essi risultano responsabili di una parte delle anemie aplastiche e molto probabilmente sono in rapporto con l'insorgenza di linfomi non-Hodgkin B a basso grado di malignità, soprattutto con quelli che si accompagnano a crioglobulinemia (McLAUGHLIN e coll.). La sua presenza è stata dimostrata anche in blasti di cellule di leucemia acuta.

In questo studio è stato focalizzato l'interesse su alcuni pazienti sottoposti a trapianto ortotopico di fegato in terapia cronica con Ciclosporina A, giunti alla nostra osservazione con citopenia di varia rilevanza, strettamente in numero successivo. La materia è nuova e particolarmente complessa per cui il protocollo di studio è sicuramente perfettibile ed incompleto, ed i risultati presentati hanno valore di dati preliminari.

OBIETTIVI

Nel Centro Trapianti di Fegato dell'Università di Padova a partire dal 1990 sono stati eseguiti oltre 300 trapianti. Le indicazioni comprendono cirrosi post-epatite B e/o C con virus in fase non replicativa, epatiti fulminanti, cirrosi biliare primitiva, colangite sclerosante, sindrome di Budd Chiari, cirrosi alcoliche, epatocarcinoma. Nel follow-up post-operatorio di questi pazienti spesso si sono avuti problemi di tipo anemia e/citopenie delle altre filiere che hanno richiesto valutazioni ematologiche appropriate.

Da tali valutazioni è emerso che una discreta percentuale dei pazienti presentava, dopo le opportune indagini cliniche, ematochimiche e bioetiche, degli aspetti morfologici chiaramente displastici con midollo per lo più ipercellulare e molto più raramente ipocellulare.

L'obiettivo di questo studio consiste nel chiarire:

- il tipo e l'entità delle alterazioni morfologiche di tipo mielodisplastico utilizzando i criteri del French-American-British Cooperative Group (FAB), a livello periferico e midollare (KOUIDES e BENNETT);
- lo squilibrio quantitativo e qualitativo delle cellule midollari più immature attraverso la valutazione dell'immunofenotipo di membrana in citofluorometria;
- il livello maturativo in cui si manifesta il difetto della crescita e diffe-

rennazione emopoietica attraverso lo studio di culture di cellule emopoietiche staminali in vitro;

- il possibile ruolo eziologico della terapia immunosoppressiva con Ciclosporina A e se le alterazioni midollari siano in qualche modo reversibili con la riduzione dei dosaggi o con la sospensione del farmaco (quest'ultima ipotesi verificabile in vitro).

Le implicazioni della nostra ricerca sono:

- la creazione di un protocollo di valutazione pre e post-OLT che permetta di identificare pazienti a rischio per lo sviluppo di alterazioni simil-mielodisplastiche o altre patologie ematologiche;
- l'influenza di questa patologia ematologica nella prognosi *quoad vitam e quoad valetudinem* del paziente trapiantato.

DISEGNO SPERIMENTALE

Consiste nella valutazione dell'efficienza dell'emopoiesi in vitro in questi pazienti in terapia a base di Ciclosporina A, identificati in base a criteri riportati dettagliatamente nel paragrafo Materiale e Metodi.

I pazienti individuati sono stati sottoposti a biopsia e aspirato osteomidollare. Il frustolo della biopsia, fissato e colorato, è stato successivamente esaminato al microscopio ottico; per la ricerca delle alterazioni displastiche sono stati utilizzati i criteri FAB.

Il materiale ottenuto dall'aspirato osteomidollare è stato impiegato:

- per lo studio morfologico al microscopio ottico;
- per l'individuazione in citofluorometria di marcatori cellulari della cellula staminale e di cellule destinate allo sviluppo eritroide utilizzando anche doppie marcature (CD34+/CD38+, CD34+/CD71+, CD34+/Glciforina A+) ⁽²⁾;
- per l'analisi della crescita midollare in vitro utilizzando terreni di cultura semisolidi, che consentono di riconoscere con facilità il vistoso difetto di crescita proprio delle mielodisplasie vere.

Il midollo ottenuto da ciascun paziente e da controlli è stato posto, in triplice, in terreno di cultura a base di metilcellulosa contenente i fattori crescita necessari per la maturazione della linea eritroide e mioide (siero bovino fetale, eritropoietina, IL-3, SCF, GM-CSF ⁽³⁾), se-

⁽²⁾ CD = Cluster di differenziazione. Così, e con un numero che indica la specificità, vengono indicati gli anticorpi monoclonali.

⁽³⁾ IL-3 = Interleuchina 3, fattore di crescita ad ampio spettro; SCF = Stem Cell Factor, fattore di crescita per cellule staminali; GM-CSF = fattore stimolante colonie granulocitarie e monocitarie.

minando 10^5 cellule mononucleate (MNC) per piatto di cultura. Per valutare l'effetto della Ciclosporina A sullo sviluppo e maturazione delle cellule midollari, a piatti di cultura contenenti MNC derivate dal midollo dello stesso paziente seminati in terreni identici ai precedenti sono state aggiunte diluizioni seriate di questo farmaco (50, 300, 1000 ng/ml).

È stato quindi esaminato e quantificato lo sviluppo di BFU-E (Burst Forming Unit Erythroid, colonie rosse) e CFU-GM (Colony Forming Unit Granulocytic and Monocytic) in assenza ed in presenza di dosaggi crescenti di Ciclosporina A nei controlli sani, nei soggetti con MDS primitiva e nei pazienti con alterazioni ematologiche sviluppatasi nel post-OLT.

Dall'analisi delle osservazioni si potrebbe stabilire:

- se esiste un rapporto causa/effetto tra Ciclosporina A e difetto dell'emopoiesi che potrebbe essere riconducibile a tossicità diretta oppure alla ridotta produzione di fattori di crescita (IL-2, IL-3) di origine linfocitaria per la nota azione inibente sulla secrezione di citochine, in particolare IL-2, che modula la produzione di altri fattori di crescita. In questo caso l'alterazione si potrebbe considerare reversibile;
- se tali alterazioni siano reversibili.

Infine il nostro studio potrebbe contribuire a chiarire quali possano essere le cause delle alterazioni di tipo mielodisplastico o dell'ipoplasia che abbiamo osservato dopo OLT, considerando che a nostra conoscenza non esistono segnalazioni in letteratura di studi sulle caratteristiche funzionali delle cellule ematiche staminali.

La citopenia ematologia periferica si manifesta anche dopo trapianto di cuore. Anche in questo caso non sono state fino ad ora descritte alterazioni biochimico-funzionali a carico delle varie filiere ematologiche ed il loro eventuale rapporto evolutivo con la mielodisplasia. La condizione è stata invece ritenuta favorente l'insorgenza di linfomi (CAFORIO *et al.*).

Il nostro studio ha pertanto l'obiettivo di mettere in luce le eventuali relazioni tra citopenia post-trapianto, le alterazioni morfologiche simil-mielodisplastiche riscontrate o comunque i difetti di maturazione midollare, e l'uso cronico di immunosoppressori come la Ciclosporina A in pazienti trapiantati di fegato per patologie diverse all'infezione da virus patitici A, B e C.

MATERIALI E METODI

Criteri di inclusione

Nell'ambito della popolazione sottoposta ad OLT vivente al momento dell'indagine, sono stati individuati i pazienti in numero successivo che avevano alterazioni nel sangue periferico delle tre filiere cellulari ematologiche nei controlli effettuati nei 3-6 mesi precedenti. All'emocromo di routine abbiamo considerato come alterazioni quantitative persistenti delle tre filiere emopoietiche, valori di emoglobina ≤ 11 gr/dl per i maschi e ≤ 10 gr/dl per le femmine, per i leucociti valori $\leq 3.000 / \lambda^3$, per le piastrine valori $\leq 100.000 \lambda^3$ perduranti da almeno tre mesi. Dovevano altresì essere assenti i seguenti

Criteri di esclusione

- Assunzione di terapia immunosoppressiva diversa da Ciclosporina A e glucocorticoidi;
- trapiantati per carcinoma epatocellulare (per il frequente uso di chemioterapici antitumorali nel periodo precedente l'OLT);
- trapiantati per epatiti A, B e C;
- trapiantati per epatiti fulminanti, la cui eziologia quasi sempre non è nota;
- presenza di nota e protratta insufficienza renale cronica e di ridotta produzione di eritropoietina;
- presenza di alterazioni ematologiche riconducibili a:
 - perdite ematiche;
 - deficit di fattori dell'emopoiesi (ferro, folati e vitamina B12), uso cronico di antibiotici o antivirali che abbiano come effetto collaterale noto la mielotossicità;
 - emoglobinopatie;
 - anemie autoimmuni;
 - difetti enzimatici dell'eritrocita;
 - alterazioni mielodisplastiche già presenti prima del trapianto.

Gruppo di studio

Tra i pazienti viventi sottoposti a OLT utilizzando i criteri di inclusione sopra esposti, sono stati individuati 8 pazienti, di cui 7 sono entrati nello studio.

Quattro pazienti erano affetti da esotossicosi etilica (ETOH), 2 da colangite sclerosante primitiva (CSP) e 1 da cirrosi biliare primitiva

(CBP); 3 erano di sesso maschile e 4 di sesso femminile. Come controlli sono stati utilizzati 2 soggetti sani e 2 affetti da mielodisplasia primitiva (anemia refrattaria) (tabella 1).

	OLT1	OLT2	OLT3	OLT4	OLT5	OLT6	OLT7
Sesso	F	M	M	F	F	M	F
Indicazione	ETOH	ETOH	ETOH	ETOH	CSP	CSP	CBP

Tab. 1. Indicazioni al trapianto e sesso dei pazienti.

Nella valutazione iniziale i soggetti entrati nello studio sono stati sottoposti ad un prelievo venoso periferico per l'acquisizione dell'emocromo, compresa la conta reticolocitaria, e per l'analisi dei seguenti parametri sierologici:

VES, dosaggio di Proteina C reattiva, di transferrina, ferritina, aptoglobina, resistenze osmotiche, fibrinogeno, D-dimero, folati, vitamina B12, eritropoietina; valutazione dell'immunofenotipo di membrana, profilo biochimico, ricerca dei marcatori dei virus dell'epatite B e C.

Aspirato e biopsia osteomidollare

L'aspirato midollare e la biopsia sono stati ottenuti nella stessa seduta dalla spina iliaca postero superiore rispettando criteri di sterilità nella fase di preparazione del paziente e nelle successive fasi operatorie.

Esame istopatologico

Il frustolo è stato incubato in liquido di Zenker per la decalcificazione e successivamente incluso in paraffina. Sezioni di 3-4 μ . sono state colorate con Ematossilina-Eosina, con l'impregnazione argenticca per la valutazione delle fibre reticolari e con le reazioni citochimiche della cloroacetato esterasi e del blu di Prussia. All'esame microscopico è stata valutata la cellularità del midollo, il rapporto mielo/eritroide, la distribuzione, il numero e la qualità dei granuli citoplasmatici, la maturazione nucleare rispetto a quella citoplasmatica, l'ipo- o l'ipersegmentazione nucleare. I parametri morfologici per la valutazione della displasia midollare erano anche in questo caso conformi ai criteri stabiliti dal French-American-British Cooperative Group.

Gli strisci degli aspirati midollari sono stati colorati con May-Grünwald-Giemsa ed esaminati rispettando gli stessi criteri sopra indicati.

Citofluorometria

L'aspirato midollare è stato raccolto in provette di polipropilene contenenti eparina come anticoagulante. Il materiale è stato successivamente filtrato per rimuovere le particelle ossee. Prima di procedere è stata valutata la vitalità cellulare utilizzando il test dell'esclusione con il colorante Tripan Blu (che colora le sole cellule morte) ed i valori di vitalità superiori all'85% sono stati accettati per lo studio. È stata quindi prodotta una sospensione di MNC separate su gradiente di densità Leucoprep 1077 (Gibco). L'analisi fenotipica è stata eseguita mediante citofluorometria utilizzando un citofluorimetro (FACS, Becton Dickinson). È stata utilizzata la tecnica della immunofluorescenza diretta per tutti gli anticorpi monoclonali utilizzati. Per ogni marcatura sono stati utilizzati 100 μ l della sospensione di MNC, ottenuta con le modalità prima descritte, e 20 μ l di soluzione di anticorpo. La miscela è stata fatta incubare per 20' a +4°.

Gli anticorpi monoclonali usati sono riportati nella tab. 2.

Anticorpo	Specificità
CD3	Linfociti T (pan-T)
CD4	Linfociti T helper
CD8	Linfociti T suppressor/citotossici
CD11b	Monociti, macrofagi, granulociti (molecola di adesione)
CD13	Monociti, neutrofili
CD14	Monociti, neutrofili
CD15	Granulociti, monociti
CD19	Linfociti B
CD33	Cellule mieloidi (primi stadi differenziativi)
CD34	Cellule staminali emopoietiche
CD36	Piastrine, reticolociti, monociti
CD38	Primi stadi differenziativi mieloidi, plasmacellule, linfociti
CD54	Monociti (molecola di adesione)
CD71	Precursori eritroidi (recettore per transferrina)
HLA-DR (DR)	Antigeni dell'istocompatibilità
GPA	Glicoforina (presente su precursori rossi)

Tab. 2. Anticorpi monoclonali usati per la valutazione fluorocitometrica.

Come si può notare si sono scelti anticorpi con specificità molto diverse, in modo non sempre mirato, per potere dimostrare anche even-

tuali anomalie non previste. La marcatura delle cellule con due anticorpi in contemporanea consente ulteriori precisazioni, come mostrato nella seguente tab. 3.

Anticorpi	Specificità
CD3+/DR+	Linfociti T attivati
CD34+/CD38+	Cellule staminali emopoietiche senza destino differenziativo
CD34+/CD71+	Cellule staminali con destino eritroide
CD34-/CD71+	Precursori eritroidi più maturi
CD36+/GPA+	BFU-E
CD34+/CD71-	Cellule staminali senza destino eritroide
CD11b+/CD34+	Cellula staminale con predestinazione mieloide
CD11b-/CD34+	Cellula staminale senza predestinazione mieloide
CD13+/CD34+	Cellula staminale con predestinazione monocitaria
CD13+/CD34-	Serie monocitaria
CD33+CD34+	Cellula staminale con predestinazione mieloide
CD33+/CD34-	Cellula mieloide molto immatura
CD33-/CD34+	Cellula staminale senza predestinazione mieloide
CD34+/CD54+	Cellula staminale con predestinazione monocitaria

Tab. 3. Combinazione di anticorpi monoclonali usate per lo studio delle cellule midollari e loro specificità.

Cultura cellulare su terreno semisolido

Per ogni paziente è stata seguita la seguente procedura: 1 ml di aspirato midollare è stato trasferito rapidamente in una provetta da cultura tessutale sterile contenente eparina solida dissolta in Iscove's Medium (Gibco). Tutte le operazioni successive di manipolazione, conta cellulare e semina si sono svolte sotto cappa a flusso laminare, in aria sterile.

Un ml. di aspirato è stato diluito in 9 ml di Iscove's Medium + 2% di siero bovino fetale; dai 10 ml di quest'ultima sospensione è stato prelevato un ml di materiale poi diluito in 7 ml di soluzione di Iscove's Medium contenente 3% di acido acetico e qualche goccia di Tripan Blu. Dopo 5' di incubazione a temperatura ambiente sono stati prelevati 10 µL per la conta e per la valutazione della vitalità cellulare in camera di Bqrker. È stata quindi prodotta una sospensione di MNC separate su gradiente di densità Leucoprep 10777; il buffy coat, contenente la frazione di MNC, è stato sottoposto ad una serie di lavaggi e centrifugazioni utilizzando soluzione di Iscove's + 2% SFB.

Successivamente su una diluizione 1:80 è stata eseguita ulteriore valutazione della vitalità e della conta cellulare.

Si è proseguito con la semina in terreno di cultura a base di metilcellulosa contenente: 0,9% di metilcellulosa, 30% di SFB, 1% di albumina sierica bovina, 10^{-4} M/ml. di 2-mercaptoetanolo, 2mM/ml. di L-glutamina, 50 ng/ml di Stem Cell Factor, 10 ng/ml di GM-CSF, 10 ng/ml di IL-3, 3 unità / ml di Eritropoietina, seguendo le istruzioni delle case produttrici. In breve, si è ottenuta una sospensione cellulare di 10^6 /ml; 100 m \bar{d} L (10^5 MNC) di questa sospensione sono stati posti in 1 ml di terreno di cultura (ottenendo 1,1 ml). La sospensione è stata risospesa energicamente con Vortex e successivamente lasciata riposare per 5' a temperatura ambiente. Infine la sospensione è stata seminata in piatto di cultura da 35 mm, in triplice. Sono stati disposti per ciascun paziente 4 serie di piatti di cultura (ciascuno in triplice), denominando Plain la serie senza Ciclosporina A, CyA50, CyA300 e CyA1.000 i piatti contenenti rispettivamente 50 ng/ml, 300 ng/ml e 1.000 ng/ml di Ciclosporina A aggiunti all'aliquota da seminare. Le culture sono state incubate in incubatore a 37° umidificato in atmosfera con il 5% di CO₂. Le BFU-E e le CFU-GM sono state contate il 14° giorno dalla semina utilizzando un microscopio a luce invertita.

RISULTATI

Per quanto riguarda i pazienti trapiantati, alla data del prelievo di sangue periferico, della biopsia e dell'aspirato osteomidollari erano trascorsi da un minimo di 7 ad un massimo di 57 mesi dall'intervento, corrispondenti ad analogo periodo di trattamento continuativo con Ciclosporina A.

Esame emocromocitometrico ed indagini sierologiche

Al momento dell'indagine uno dei 7 trapiantati (OLT1), con anamnesi positiva per anemia seria fino a due mesi prima, presentava emocromo con valori non molto al di sotto del normale, ma mostrava altresì delle alterazioni morfologiche di tipo mielodisplastico non trascurabili. Gli altri 6 avevano valori di Hb che oscillavano tra 11 e 9,2 gr/dl. I valori di creatinina erano superiori alla norma nel 42,8% dei pazienti, compatibilmente con la nota azione nefrotossica esercitata dalla Ciclosporina A. Un solo paziente presentava valori quasi doppi del normale ma con tasso di eritropoietina (ormone prodotto dal rene) ancora nor-

male (7,9 U/L). Negli altri pazienti il range dell'eritropoietina era compreso tra 16 e 37 U/L. I dosaggi nel siero di ferro, folati e vitamina B12 erano normali in tutti i soggetti esaminati. Nessuno dei pazienti presi in esame presentava marcatori dell'epatite B o C positivi. Un riepilogo dei principali parametri ematochimici analizzati nei pazienti sottoposti ad OLT è riportato nella tab. 4.

	OLT1	OLT2	OLT3	OLT4	OLT5	OLT6	OLT7
Mesi di terapia con CyA	57	14	19	30	7	40	41
GB x 10 ³ (4,5-11 x 10 ³ /λ ³)	9.180	6.470	4.310	4.290	8.370	3.230	5.050
GR x 10 ⁶ (4.10-5.30 x 10 ³ /λ ³)	4.180	3.510	3.710	4.250	3.730	3.920	3.500
Hb / dl (12-18 gr/dl.)	13,1	11	10,1	9,4	10,3	9,2	9,3
Plt x 10 ³ (150-350 x 10 ³ /λ ³)	231	150	158	115	291	136	247
Linfociti (720-4800/λ ³)	600	1.500	1.700	1.00	2.000	600	2.000
Reticolociti %			1		13,1	3,1	0,8
Creatinina (53-133 mmol/L)	232	124	144	110	105	145	108
Urea (2,9-8,9 mmol/L)	17,4	13,9	11,1	7	9	16	8,5
Fe (5,4-28,7 μmol/L)	7,8	14,8	11,1	21,6	13,2	11,5	7,6
Ferritina (10-300 ng/ml)	254	111	136	1157	46	359	15
EPO (1-34 U/L)	<7	16	18	37	17	25	24
Folati (7-39,7 nml/L)	3,5	6,3	3,9	5,6		4,8	4,3
Vit. B12 (>184 pmol/L)	809	520	731	817		785	1028
CyA (600-2.200 μg/L)	377	214	216	165	324	177	
CD4 (36-52%)	51	28	23	38	17	32	34
CD8 (20-34)	29	44	58	33	40	42	45

in parentesi l'intervallo di normalità

Tab. 4. Durata del trattamento e valori ematochimici nei pazienti.

Esame microscopico della biopsia osteomidollare

All'esame del preparato bioptico 3 pazienti hanno mostrato ipocellularità del midollo (2, 3, 7), 2 normocellularità (1, 5), 2 iperellularità (4, 6). La serie mieloide presentava difetti di maturazione in un soggetto (2), mentre in un altro risultava diminuita (3); normale per quantità e maturazione negli altri 4. La serie eritroide era diminuita in 4 pazienti (1, 3, 5, 7, con difetti maturativi in 1), in due pazienti era aumentata (2, 4) e in un paziente appariva normale (6). La serie megacariocitaria risultava diminuita in 2 pazienti (3, 4), aumentata in 1 (6) e normale negli

altri. La trama reticolare era aumentata in 4 pazienti (2, 3, 5, 7), non rilevabile in un paziente e normale negli altri. I depositi emosiderinici sono stati riscontrati aumentati in 1 solo paziente. Ai due pazienti con MDS venne confermata la diagnosi di anemia refrattaria con eccesso di blasti, mentre nei due controlli sani il midollo era normale. Nella tabella 5 sono schematizzati i risultati dell'esame bioptico dei pazienti sottoposti ad OLT.

	Cellularità	Serie mieloide	Serie eritroide	Serie megacariocitaria	Reticolina	Emosiderina
OLT1	N	N	↓ Difetti maturativi	N	N	Scarsi
OLT2	↓	Difetti maturativi	↑	N	↑	N
OLT3	↓	↓	↓	↓	↑	N
OLT4	↑	N	↑	↓	Assente	↑
OLT5	N	N	↓	N	↑	N
OLT6	↑	↑	N	↑	N	N
OLT7	↓	N	↓	N	↑	N

Tab. 5. Risultati della biopsia osteomidollare.

Esame microscopico dello striscio da aspirato osteomidollare

L'osservazione degli strisci dell'aspirato midollare al microscopio ottico è stato utilizzato fondamentalmente per la ricerca di note displastiche a carico delle varie filiere.

In tutti i pazienti trapiantati con citopenie ematologiche diverse erano presenti in misura variabile delle note displastiche, sia a carico della filiera eritroide e in misura minore di quella mieloide; non sono state osservate atipie né qualitative né quantitative a carico della linea megacariocitaria. Nella fig. 2 è rappresentato un aspetto midollare con anomalie del nucleo in eritroblasti, che mostra ponti e frammentazione (frecce).

Nella tab. 6 sono riassunte le osservazioni degli strisci degli aspirati midollari dei pazienti sottoposti ad OLT.

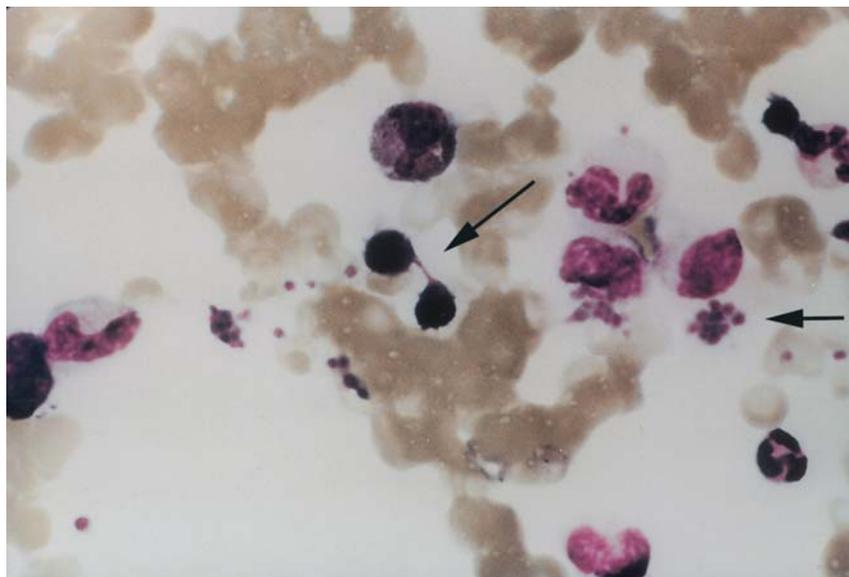


Fig. 2. Aspetto midollare con anomalie del nucleo in eritroblasti, che mostra ponti e frammentazione (frecce).

	OLT1	OLT2	OLT3	OLT4	OLT5	OLT6	OLT7
Cellularità	N	↓	↓	↑	N	↑	↓
Displasia mieloida	+++	++	-/+	+++	+	+++	+
Displasia eritroide	+++	+++	++	+	0	++	+
Displasia megacariocitaria	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 6. Risultati della valutazione microscopica degli strisci midollari.

Citofluorometria su sangue periferico e su midollo osseo

L'aspetto più evidente che risulta dall'analisi citofluorimetrica su periferico è la diminuzione in assoluto dei linfociti CD4+ (linfociti helper), come è da attendersi in seguito alla terapia cronica con Ciclosporina A, mentre il numero dei linfociti CD8+ è normale.

In un caso (OLT1) il rapporto CD4/CD8 e le loro percentuali sono normali, ma il valore assoluto dei linfociti in toto e dei CD4+ è sovrapponibile a quello degli altri pazienti in trattamento cronico con Ciclosporina A. Il dosaggio sierico del farmaco era superiore al range terapeutico (377 mmol/L, a causa della decurtazione funzionale renale secondaria alla prolungata somministrazione del farmaco e della rallenta-

ta escrezione renale. L'emocromo al momento dell'indagine mostrava solo lieve anemia (Hb 13 gr/dl) dopo un periodo protratto di anemia trasfusione dipendente. Il midollo di questo paziente all'esame istologico era normocellulare ed in cultura ha dato origine ad un notevole numero di BFU-E (media 285) nei piatti senza Ciclosporina A, e non ha risentito dell'aggiunta di dosi crescenti di Ciclosporina A negli altri, comportandosi del resto come l'altro paziente normocellulato (OLT5) (tab. 10).

Le indagini citofluorimetriche eseguite sul sangue periferico, riguardanti i linfociti T, le sottopopolazioni T attivate (CD3DR), helper (CD4) e suppressor/citotossico (CD8) sono riassunte nella tab. 7.

Si nota che i valori sono molto dispersi, come avviene normalmente per questi parametri, sia nei soggetti normali, che nei pazienti in studio, che nelle mielodisplasie primitive.

L'indagine citofluorimetrica sul midollo è stata molto estesa; per ragioni tecniche non è stato possibile eseguire l'indagine sul midollo di tutti i pazienti in esame. In particolare l'analisi si è focalizzata sulla cellula staminale e sulle tappe maturative dei compartimenti eritroide, mieloide e monocitoide.

Nella tab. 8 sono riportati i risultati delle indagini citofluorimetriche con doppia marcatura eseguite su alcuni soggetti entrati nello studio, espressi in percentuale su 10^4 MNC.

Le più immature, «non committed», cellule staminali ematopoietiche esprimono la combinazione CD34 e CD38; nei successivi stadi di differenziazione e maturazione lungo le filiere ematologiche i due antigeni vengono perduti.

Nella maturazione della filiera eritrocitaria, due sono gli antigeni che caratterizzano la maturazione dell'eritrocita: il recettore per la transferrina (CD71) e la proteina di membrana Glicoforina A (GPA).

Il CD71 è precoce e mostra alti livelli di densità sugli eritroblasti immaturi ed infine viene perduto allo stadio di reticolocita. La glicoforina A viene espressa a bassa densità allo stadio di maturazione di proeritroblasto, successivamente aumenta di intensità e mantenuta ad alta densità fino alla differenziazione terminale. La fig. 3 rappresenta schematicamente l'espressione di CD34, CD71 e GPA nelle fasi della differenziazione eritrocitaria.

Dall'analisi dei campioni emerge che nel midollo dei soggetti sani era presente una media di 1,6% di cellule staminali (CD34+/CD38+), 0,6% di CD34+/CD71+, 32,5% di CD34-/CD71+ (cellule appartenenti al compartimento eritroblastico) e 32,4% di cellule con Glicoforina A, la maggior parte di esse avviate alla maturazione terminale.

Nel gruppo dei pazienti trapiantati a cui corrisponde un midollo

	N1	N2	OLT1	OLT2	OLT3	OLT4	OLT5	OLT6	OLT7	MDS1	MDS2
CD3/DR	7 (161)	9 (72)	3 (18)	8 (120)	3 (51)	7 (70)	4 (100)	4 (32)	12 (240)	1 (10)	4 (28)
HLA/DR	19 (437)	18 (144)	14 (84)	20 (300)	10 (170)	19 (190)	13 (325)	19 (152)	25 (500)	27 (270)	11 (77)
CD3	84 (1.932)	75 (600)	84 (504)	76 (1.140)	89 (1.513)	74 (740)	63 (1.575)	82 (656)	80 (1.600)	45 (450)	78 (546)
CD4	62 (1.426)	68 (544)	51 (306)	28 (420)	23 (391)	38 (380)	17 (425)	32 (256)	34 (680)	35 (350)	68 (476)
CD8	25 (575)	8 (64)	29 (174)	44 (660)	58 (986)	33 (330)	40 (1.000)	42 (336)	45 (900)	12 (120)	8 (56)
CD4+/CD8+	2,5	8,5	1,8	0,6	0,4	1,2	0,4	0,8	0,8	2,9	8,5
CD19	11 (253)	4 (32)	5 (39)	10 (150)	5 (85)	12 (120)	8 (200)	14 (112)	10 (200)	22 (220)	7 (49)
LINFOCITI	2.300	800	600	1.500	1.700	1.000	2.500	800	2.000	1.000	700

Tab. 7. Risultati delle analisi citofluorimetriche sui linfociti periferici nei trapiantati, nei normali e in MDS (% e numero assoluto)

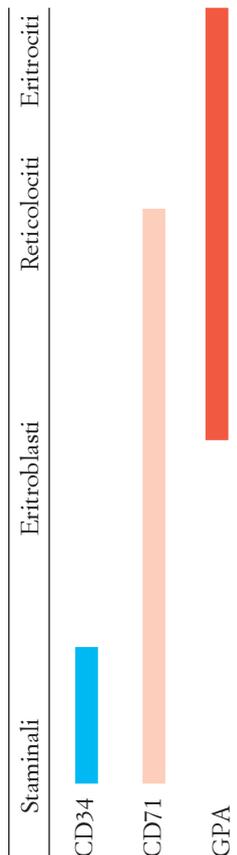


Fig. 3. Rappresentazione schematica della differenziazione eritroide.

	N1	OLT4	OLT5	OLT6	OLT7	MDS1	MDS2
CD34+/CD38+	1,6	2,7	4,2	13,4	3,2	6,3	3,1
CD34+/CD71+	0,6	3	3,7	2	1,7	5,7	3,6
CD34-/CD71+	32,5	89,2	69,4	71,3	15,3	36,5	77,2
CD36+/GPA+	32,4	85,6	72,9	49,4	17	52	58,2
CD34+/CD71-	0,5	0,1	0,2	0,7	1,5	1,2	0,2
CD11b+/CD34+	1,9	3,4	1,5	1,2	2	-	1,2
CD11b+/CD34 -	4,7	0,6	2,4	1,9	3,4	-	3,5
CD11b-/CD34+	0,6	1,5	0,3	4,3	1,2	1,6	1,9
CD13+/CD34+	1,4	2	0,7	13	2,6	5,6	2,9
CD13+/CD34-	0,6	0,8	0,7	5,3	1,7	0,7	1,3
CD33+/CD34+	1,1	0,6	9,3	8,3	3,2	2,2	1,2
CD33+/CD34-	0,1	0	0,2	1,8	0,7	0,1	0,1
CD33-/CD34+	1,1	1,6	0,3	3,1	2,2	5	2,7
CD14+/CD13+	1,3	0	1	13,8	1,5	4,6	2
CD15+/CD13 -	1,6	1,8	1,6	5,3	4,9	0,7	6,7
CD15+/CD13+	1,7	1,2	1,5	15,9	4,6	3,4	1,5
CD15 -/CD13+	0,7	0,9	0,5	2	1	2,9	0,3
CD14+/CD11b+	2,1	0	1,4	10,9	5,3	2,3	3,4
CD14 -/CD11b+	-	0	1,2	1,4	9,2	-	1,1
CD34/CD54	-	0,7		3,7	-	5,6	1,2

Tab. 8. Valutazione citofluorimetrica delle cellule midollari di alcuni pazienti confrontate con un normale e due MDS.

normocellulato (gruppo 1) nell'unico paziente analizzato (OLT5) la percentuale di precursori immaturi CD34+/CD38+ è pari a 4,2%, con CD34+/CD71+ di 3,7%, CD34-/CD71+ del 69,4% e CD36+/GPA+ = 72,9%.

Nel gruppo secondo (midollo ipercellulato) la presenza di CD34+/CD38+ va dal 2,7% (OLT4) al 13,4% (OLT6), le CD34+/CD71+ rispettivamente 3% e 2%, CD34-/CD71+ = 89,2% e 71,3%, ed infine CD36+/GPA+ = 85,6% e 49,4%. Nel primo caso (OLT4) l'ipercellularità del midollo era determinata all'istologia da una spiccata iperplasia eritroide e in citofluorimetria era evidenziata un'espansione del compartimento eritroblastico (CD34-/CD71+ = 89,2%), nel secondo caso (OLT6) da iperplasia mieloide, in citofluorimetria rappresentata da un'espansione del compartimento mielomonocitico (CD11b+/CD34+ = 12%, CD34+/CD13+ = 13%, CD14+/CD13+ = 13,8%, CD15+/CD13+ = 15,9%, CD14+/CD11b+ = 10,9%), con

aspetti di evidente eritropoiesi inefficace ($CD34-/CD71+ > CD36+/GPA+$). Quest'ultimo risultato è simile, del resto, a quanto avviene con mielodisplasia primitiva, ove prevale, a fronte dell'ipercellularità midollare, una eritropoiesi inefficace.

Nel terzo gruppo (midollo ipocellulato) il midollo dell'unico soggetto analizzato (OLT7) presenta una aumentata percentuale di $CD34+/CD38+$ (3,2%), una normale quota di precursori eritroidi immaturi ($CD34+/CD71+ = 1,7\%$) ed una ridotta percentuale di cellule eritroidi proliferanti e maturanti ($CD34-/CD71+ = 15,3\%$ e $CD36+/GPA+ = 17\%$). In questo caso è evidente la conferma del reperto istologico di ipoplasia midollare e della difficoltà in vitro di produrre un numero di BFU-E sufficiente.

Nella fig. 4 sono rappresentati, tramite istogrammi, alcuni dei dati sopra riportati, assieme a quelli di un normale e di un mielodisplatico primitivo, ed in più lo sviluppo di BFU-E in assenza di ciclosporina A.

Come è evidente anche nella fig. 5, che si riferisce agli stessi pazienti, esiste un rapporto direttamente proporzionale tra n. di BFU-E e percentuale di $CD34-/CD71+$, rispecchiando entrambi, in definitiva, la quota eritroblastica maturante del midollo, non certo le fasi termina-

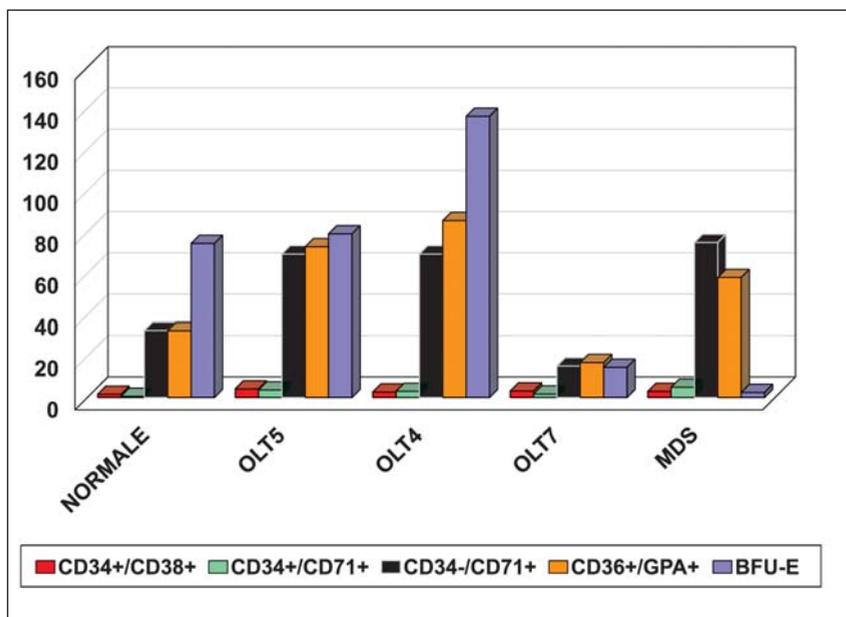


Fig. 4. Maturazione eritropoietica determinata con combinazioni di anticorpi monoclonali in un normale, tre trapiantati con diversa cellularità midollare, in un displastico, e crescita di BFU-E.

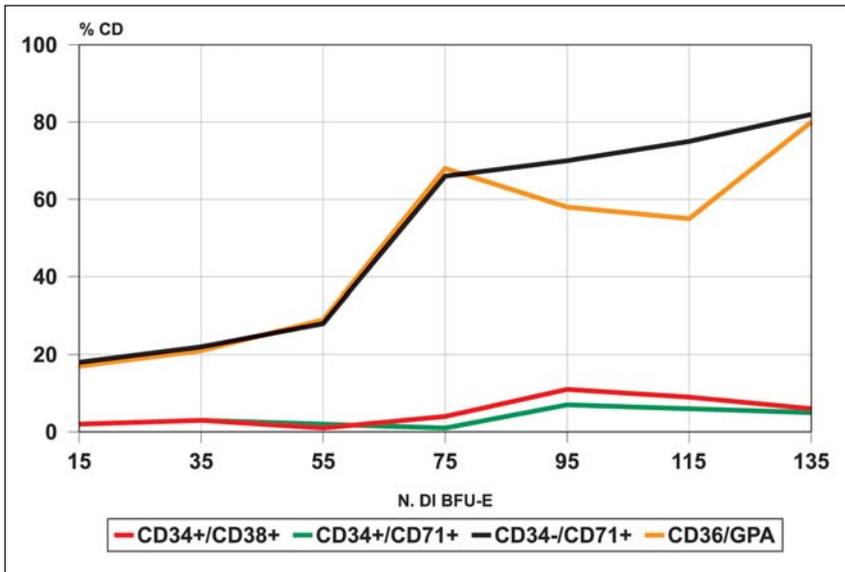


Fig. 5. Rapporto tra numero di BFU-E e CD di maturazione della serie eritroide.

li della maturazione, cioè la quota rappresentata da CD36+/GPA+. Ciò non vale per la mielodisplasie primitiva.

Analisi delle culture

I terreni di cultura sono stati esaminati al microscopio a luce invertita dopo 14 giorni dalla semina, effettuando una conta delle BFU-E e delle CFU-GM separatamente da parte di due operatori.

Le BFU-E identificano una classe di progenitori eritroidi più primitivi di quella delle CFU-E. Si caratterizzano per una maggiore capacità proliferativa che consente di dare origine a colonie eritroidi di maggiori dimensioni e con più clusters. Il termine «burst» è stato coniato per identificare l'improvvisa comparsa di emoglobina in già ampie ma non colorate colonie eritroidi dovuta alla sincrona differenziazione delle colonie stesse.

La loro dimensione va da colonie di tre piccoli clusters (o un grande cluster) contenenti più di 200 eritroblasti a colonie estremamente grandi di soli eritroblasti contenenti 16 o più clusters e 10^4 o più cellule. La fig. 6 che segue rappresenta due cluster di una grossa BFU-E.

Nella fig. 7 e tab. 10 sono riportati i risultati delle osservazioni dei terreni di cultura del midollo osseo dei pazienti entrati nello studio più

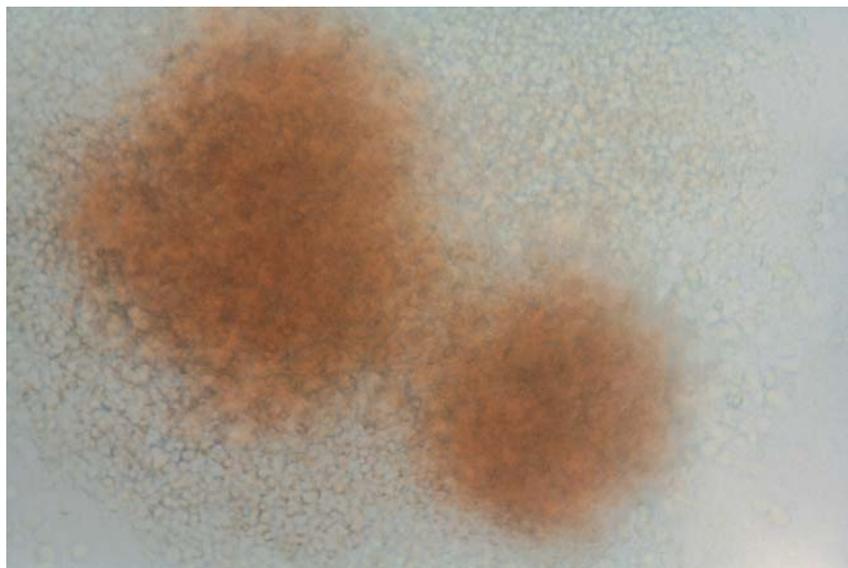


Fig. 6. Aspetto di BFU-E (colonie eritroidi) al microscopio a luce invertita.

due controlli mielodisplastici e due controlli normali, in presenza o meno di varie concentrazioni di ciclosporina (media delle osservazioni \pm DS).

	PLAIN	CyA 50	CyA300	CyA 1.000
OLT1	285 \pm 34,2	348 \pm 55	272,5 \pm 15,7	318,5 \pm 50
OLT2	60,75 \pm 11,7	28,75 \pm 5,1	16,75 \pm 4,8	11,5 \pm 2,4
OLT3	329 \pm 16,6	213,25 \pm 82,2		
OLT4	136,25 \pm 13,8	118 \pm 1,4	105 \pm 14,6	104,5 \pm 0,7
OLT5	78,24 \pm 7,7	98 \pm 8,4	79 \pm 13,3	98,75 \pm 16,7
OLT6	109,75 \pm 9,8	50,5 \pm 5,2	100,5 \pm 24,2	77,25 \pm 18,6
OLT7	14,75 \pm 4,6	14 \pm 2,6	16 \pm 3,8	10,75 \pm 2,6
N1	74,5 \pm 13,4	36 \pm 12	35,75 \pm 4,6	35,5 \pm 5,8
N2	118,75 \pm 50,4	64,75 \pm 15,9	15,25 \pm 12,8	2,5 \pm 1,9
MDS1	24,5 \pm 1,2	25,25 \pm 6,5	21,25 \pm 6,7	18,5 \pm 7,7
MDS2	2,5 \pm 1,2	2,2 \pm 1,5	2 \pm 1,1	1,2 \pm 0,5

Tab. 10. Numero di colonie BFU-E (media delle osservazioni \pm deviazione standard. Semina di 10^5 cellule per piatto).

Le CFU-GM generalmente mostrano una morfologia omogenea, spesso con un addensamento centrale di cellule circondato da un alone meno denso; i neutrofili appaiono come cellule più piccole, i macrofagi

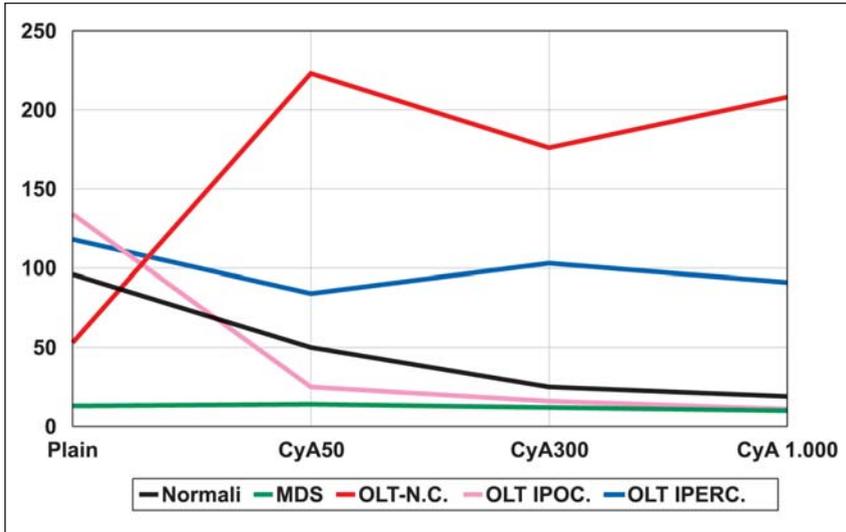


Fig. 7. Sviluppo di BFU-E con varie concentrazioni di CyA e senza.

tendono ad essere più grandi, spesso di notevoli dimensioni. Sono formate da 20 o più granulociti e macrofagi. Le sottostanti figura 8 e tabella 11 evidenziano come la Ciclosporina A influenzi poco il loro sviluppo in cultura.

	PLAIN	CyA 50	CyA 300	CyA 1.000
OLT1	4± 2,9	13,8± 2,3	12,8± 3,4	14,7± 1,2
OLT2	27,4± 9	11,1± 1,6	5,8± 2,2	7,3± 2,1
OLT3	39,7± 13,7	29,5± 1,7		
OLT4	36,3± 5,2	35,8± 4	50,8± 6,4	56,7± 4,7
OLT5	47,9± 5,3	77,4± 10,1	47,5± 8,8	46,8± 8,7
OLT6	85,1± 10,5	49,6± 0,5	84,2± 8,5	60,1± 9,4
OLT7	26,6± 6,4	35,1± 9,5	44± 10,6	37,4± 4,6
N1	28,1± 6,1	22,3± 12,2	32,1± 2,9	28,4± 6,8
N2	13,3± 7,8	13,8± 4,6	31,4± 13,1	32,8± 5
MDS1	51,8± 4,1	37,5± 10,4	33,2± 4,8	31,8± 5
MDS2	47,5± 16,3	68,4± 8,6	67,9± 12,7	55,8± 6,6

Tab. 11. Numero di colonie CFU-GM (media delle osservazioni ±DS. Semina di 10⁵ cellule per piatto).

Come si può osservare i risultati della cultura del midollo dei pazienti sottoposti a trapianto sono spesso in rapporto con l'istologia del

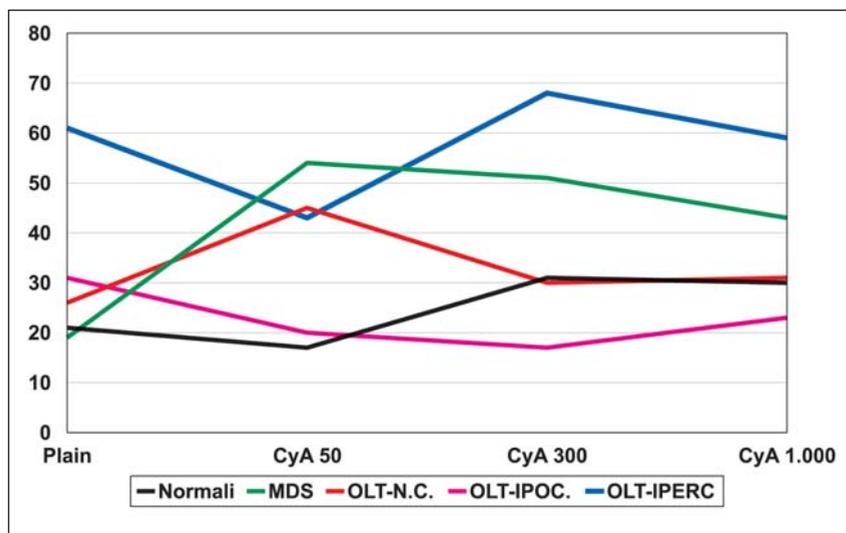


Fig. 8. Sviluppo di CFU-GM con varie concentrazioni di CyA e senza.

midollo stesso. All'analisi delle BFU-E (fig.7 e tab. 10) il midollo con normo- o ipercellularità (OLT1, OLT4, OLT5 e OLT6) rispetto ai controlli normali non presenta difficoltà di crescita nel piatto Plain, anzi, pare esserci una crescita maggiore in alcuni di essi a dispetto del riscontro istologico di una serie rossa diminuita e/o con difetto maturativi (OLT1 e OLT5).

Il midollo con ipocellularità (OLT2 e OLT7) presenta invece un deficit di crescita rispetto ai controlli normali.

Anomalo è il comportamento di OLT3 che è ipocellulare e con deficit quantitativo, senza però alterazioni della maturazione della serie rossa, ed ha un'ottima crescita in vitro senza aggiunta di ciclosporina A.

Nell'ambito della popolazione di pazienti trapiantati da noi analizzata è stato possibile distinguere quindi, in base all'istologia, e al tipo di crescita in cultura nei piatti plain, cioè senza ciclosporina A, 3 sottopopolazioni:

- una prima popolazione di trapiantati con midollo normocellulato, deficit della maturazione eritroide, e con media delle BFU-E di $182,1 \pm 112,3$, superiore in misura significativa ($p < 0,01$) rispetto ai controlli normali ($BFU-E = 96,6 \pm 42$);
- una seconda tipologia di trapiantati con midollo ipercellulare, buona maturazione eritroide, e conta media $BFU-E = 113 \pm 18$, non differente in misura significativa ($p = n.s.$) rispetto ai controlli normali; ed infine

- una categoria con midollo ipocellulato, buona maturazione eritroide, e significativa ($p < 0,01$) riduzione del numero di colonie rispetto ai controlli normali ($BFU-E = 37,7 \pm 26$).

DISCUSSIONE

Dal nostro studio emerge che tutti i soggetti sottoposti ad OLT e con citopenie ematologiche presi in esame, in terapia con Ciclosporina A, presentano alterazioni midollari quantitative e qualitative di grado variabile, che vanno da ipocellularità ad ipercellularità, e presenza più o meno spiccata di note mielodisplastiche. Queste sono anomalie morfologiche non eclatanti la cui percezione richiede buona esperienza nella microscopia clinica, definite con sufficiente precisione da vari comitati internazionali. Nonostante siano stati proposti vari sistemi di «score» per una quantificazione scientifica, il giudizio sulla loro incidenza ed importanza rimane tuttavia in gran parte soggettivo.

Se consideriamo nel loro insieme i risultati dell'esame istologico, della citofluorometria e delle culture, si potrebbe ipotizzare che i pazienti trapiantati del 1 gruppo (midollo normocellulare) abbiano sviluppato dei meccanismi per compensare i difetti di maturazione della serie eritroide riscontrati alla biopsia e alla citofluorometria. Si potrebbe trattare molto semplicemente di ridotta sensibilità alla Ciclosporina A, come dimostrato dal più elevato numero di linfociti CD4+ e dal mancato effetto depressore nelle colonie in vitro. Questi soggetti andrebbero semplicemente monitorati nel tempo.

I pazienti trapiantati del 2 gruppo (midollo ipercellulato) presentano basso numero sia di linfociti CD4+ che CD8+ ed in cultura non mostrano sensibilità all'azione della Ciclosporina A. Potrebbero trarre giovamento dalla somministrazione di Eritropoietina, dal momento che lo sviluppo delle BFU-E è discreto.

I pazienti del 3 gruppo (midollo ipocellulare) potrebbero presentare un deficit quantitativo di cellule staminali oppure un difetto di maturazione intrinseco alla cellula staminale stessa che ne giustifica la scarsa risposta in vitro allo stimolo delle citochine presenti nel terreno. Va però osservato che in questi pazienti vi è la più spiccata inversione del rapporto CD4+/CD8+ e pertanto vi potrebbe essere sia scarsa iniezione di citochine in vivo, che maggiore azione «compressiva»⁽⁴⁾

⁽⁴⁾ Si ritiene da tempo che fisiologicamente i linfociti T citotossici (CD8+) esercitino un'azione di contenimento e selezione sulle cellule staminali emopoietiche.

dei CD8+ sui precursori rossi in vitro. Con quest'ultima ipotesi si accorderebbe il progressivo calo delle BFU-E parallelo all'incremento della concentrazione della Ciclosporina A in vitro.

Per quanto riguarda l'azione della Ciclosporina A sulla sintesi di globuli rossi in vivo e sulla crescita di colonie rosse in cultura i pareri non sono univoci. HASHIMOTO *et al.*, utilizzando come modello sperimentale il topo, hanno dimostrato con culture cellulari *ex vivo* che l'emopoiesi aumenta nell'animale trattato con Ciclosporina A *in vivo* e che l'effetto è verosimilmente legato a cellule di controllo, non notandosi stimolazione di crescita di BFU-E in culture di sole cellule staminali in presenza di Ciclosporina A. Eseguendo culture di cellule midollari deplete o meno di linfociti CD8 notarono maggiore crescita di colonie rosse in presenza di minori quantità di cellule CD8+, ipotizzando in tal modo che l'effetto del farmaco nel topo fosse quello di una sostanziale riduzione di queste cellule. In tutti i casi il farmaco non influenzava lo sviluppo di CFU-GM.

Successivamente l'azione di «compressione» sulle cellule staminali emopoietiche esercitata dalle cellule CD8+ citotossiche murine è stata documentata con certezza da (KOMATSU e coll.).

SOVCIKOVA e coll. hanno poi notato, sempre nel topo, che elevati dosaggi di Ciclosporina A in vivo erano invece seguiti da riduzione degli organi linfatici e dell'ematocrito. Anche Peter e coll. hanno notato discreta anemia in bambini sottoposti a trapianto renale in terapia cronica con questo farmaco.

Pertanto, il diverso effetto della Ciclosporina A sullo sviluppo eritroide deriva da osservazioni eseguite in situazioni sperimentali e cliniche sostanzialmente divergenti: *ex vivo* nell'animale da esperimento (HASHIMOTO e coll, KOMATSU e coll.) ed *in vivo* nell'animale da esperimento (SOVCIKOVA e coll.) e *in vivo* nell'uomo (PETER e coll.).

Le citopenie ematologiche in corso di epatopatie acute e croniche sono frequenti, in conseguenza di ipersplenismo, possibili carenze, alterazioni metaboliche o per effetto di virus epatitici sull'emopoiesi. Talvolta la grave insufficienza epatica acuta da causa sconosciuta è accompagnata da seria aplasia midollare (TUNG).

Quindi non sempre il ripristino completo della funzione epatica successivo al trapianto è accompagnato dal pieno recupero delle funzioni ematologiche, per motivi vari e non del tutto chiari. Indubbiamente la presenza di un fegato omologo ha di per sé conseguenze imprevedibili che per il momento non trovano spiegazioni, quali la possibile emopoiesi eterotopica nell'organo trapiantato (TSAMANDAS e coll., SCHLITT e coll.).

Un aspetto molto interessante che potrebbe spiegare l'anemia è il cosiddetto «microchimerismo» ovvero la presenza, per periodi generalmente brevi, dell'emopoiesi del ricevente assieme ad una quota derivante dal donatore (STARZL e coll.). Si può verificare per il fatto che nel fegato trapiantato sono presenti delle cellule emopoietiche staminali che, in seguito all'immunodepressione indotta nel ricevente per evitare il rigetto del fegato, proliferano e si differenziano in elementi terminali, essendo abitualmente eliminate dopo periodi brevi dall'apparato immunitario del ricevente (CROSBIE e coll.). Per l'attecchimento del fegato è necessaria tra ospite e donatore la sola compatibilità AB0, mentre per il trapianto di midollo si esigono compatibilità assai più complesse che riguardano un enorme numero di antigeni dell'istocompatibilità (HLA). In casi di fortuita compatibilità, sarebbe possibile la permanenza prolungata di doppia emopoiesi con fenomeni di reazione immune in un senso o nell'altro e conseguente citopenia periferica. Ma l'evento è considerato oggi più teorico che realistico. Inoltre le citopenie dei pazienti sottoposti ad OLT sono del tutto simili a quelle che si riscontrano nei trapiantati di cuore che hanno la stessa terapia e non vanno incontro a microchimerismo (COLLINS e coll.).

In tutti i soggetti considerati in questo studio sono costantemente presenti delle alterazioni mielodisplastiche midollari, non sempre correlate con il grado di citopenia periferica. Le nostre osservazioni si accordano con quelle di CLATCH e coll., che hanno descritto emopoiesi displastica in 19 pazienti sottoposti ad OLT con citopenia periferica di vario grado. Si trattava di eritropoiesi megaloblastica, maturazione mieloidi asincrona, ridotto volume dei megacariociti, del tutto simile a quanto si rileva nella nostra casistica, oltre che nei portatori di HIV, ma di grado più lieve rispetto alle mielodisplasie primitive e senza caratteri di progressività.

Le analisi citofluorometriche ci hanno consentito di quantificare il numero delle cellule staminali maturanti lungo ciascuna filiera. La citofluorometria e l'analisi del numero delle colonie mieloidi ed eritroidi indicano che la serie eritroide è la più compromessa. L'aggiunta di Ciclosporina A in vitro determina una riduzione delle colonie eritroidi (in vitro) in 5 su 8 pazienti trapiantati, in 2 su 2 soggetti normali e in 0 su due mielodisplastici.

La compromissione della serie eritroide in alcuni pazienti è reversibile in cultura, in presenza di fattori di crescita; ciò non si osserva in soggetti con gradi più severi di alterazione midollare.

Per quanto riguarda l'insieme delle culture con Ciclosporina A (figg. 7 e 8), si nota che l'effetto depressore sulla formazione di BFU-E è

molto più spiccato nei normali e nei trapiantati del 2 e 3 gruppo. Ciò potrebbe essere dovuto al prevalere della riduzione in termini assoluti dei linfociti CD8+ nei trapiantati, rispetto ad un possibile effetto tossico, in accordo con quanto osservato da Hashimoto e coll. nell'animale. Ed in effetti i casi che danno luogo a maggiore crescita di BFU-E sembrano essere quelli con maggiore rapporto CD4+/CD8+, cioè con minore numero di cellule citotossiche. Un tale meccanismo potrebbe prevalere sull'azione favorente la differenziazione eritroide esercitata dalla Ciclosporina A, finora dimostrata solo in cultura di cellule neoplastiche. (SAWAFUJI e coll.). Il differente effetto del farmaco nei diversi soggetti è verosimilmente conseguenza della variata sensibilità allo stesso.

Il mancato effetto nei mielodisplastici primitivi è conseguenza di gravi alterazioni cellulari, compatibili con la condizione di malattia clonale neoplastica.

L'osservazione che la crescita mieloide (in vitro) è meno compromessa (1 su 7 pazienti) può indicare che il meccanismo patogenetico agisce a livello della cellula staminale già predestinata in senso eritroide o successivamente.

A proposito di quest'ultima osservazione va tenuto presente che l'azione del CFU-CSF presente in cultura consente una crescita delle CFU-GM più che adeguata nella maggioranza dei midolli, compresi controlli sani e mielodisplastici primitivi, che non risente nemmeno delle più elevate concentrazioni del farmaco in cultura. In ogni caso con lo studio attuale non siamo in grado di affermare se la compromissione dell'eritropoiesi sia dovuta all'azione diretta della Ciclosporina A oppure dovuta ad altri meccanismi patogenetici.

Al momento di entrare nello studio i nostri pazienti erano sierologicamente negativi per i virus epatitici B e C, per il Cytomegalovirus ed il Parvovirus B19. La condizione di immunodepressione indotta nei trapiantati lascia però dei dubbi sulla sensibilità di questi test. Infatti la valutazione degli acidi nucleici virali in simili soggetti hanno consentito, ad esempio, la dimostrazione di viremia da Parvovirus B19, in assenza di anticorpi IgM, in circa un terzo dei trapiantati di fegato con anemia discreta (NDIMBIE e coll.).

Non è da escludere comunque la possibilità che in corso di terapia immunosoppressiva agenti virali possano infettare i soggetti e determinare alterazioni ematologiche, per il resto ben note. Nel caso del Parvovirus B19 le problematiche diagnostiche sono notevoli per la difficoltà di avere un riscontro anticorpale adeguato (le IgM spesso danno risultati dubbi) e la identificazione del DNA nativo risulta difficile e ancora non praticabile in tutti i centri.

L'analogia degli aspetti displastici dei portatori di OLT con quella dei pazienti con HIV descritta da Clatch e coll. lascia supporre in entrambi i casi la partecipazione di agenti virali opportunistici, quali virus erpetici, che si accorderebbe oltretutto con il comportamento spesso fluttuante dell'anemia. Il recupero della formazione di BFU-E osservato nelle culture di alcuni pazienti, in presenza di Eritropoietina, suggerisce una possibile azione terapeutica in vivo, che potrà essere rapidamente verificata.

In conclusione il nostro studio non chiarisce la patogenesi delle citopenie dei portatori di trapianto di fegato in terapia cronica con Ciclosporina A. Tuttavia stabilisce una netta demarcazione nei confronti delle mielodisplasie primitive, ribadisce la similitudine con le alterazioni ematologiche dell'HIV, in cui agenti infettivi diversi possono influire sull'emopoiesi. Evidenzia inoltre una possibile correlazione tra grado di depressione nella formazione di BFU-E e numero di linfociti CD8, sui quali l'influenza della Ciclosporina A è diversa da caso a caso. Lo scrupoloso monitoraggio delle sottopopolazioni linfocitarie CD4+ e CD8+ e la ricerca mirata non solo sierologica, ma direttamente della viremia relativa ad alcuni agenti infettivi potrà ulteriormente chiarire la patogenesi delle citopenie nei portatori di trapianto di fegato.

ZUSAMMENSETZUNG - AMADORI G., 2003 - Die Anaemie der Lebertransplantation: preliminaere Ergebnisse einer klinischer-experimentellen Untersuchung.

Die Anämie und die periphere Zytopenie mit dysplastischen Anomalien sind nicht seltene Komplikationen in Patienten mit orthotopischer Lebertransplantation (OLT). Diesen Anomalien ist bisher wenige Interesse ergeben worden. In dieser Arbeit haben wir 7 Patienten mit OLT und Anämie, unter chronischer Therapie mit Cyclosporin A, im Vergleich mit zwei normalen Personen und zwei Patienten mit primärer Myelodysplasie untersucht. Wir haben die Zelldichte und -zusammensetzung der Knochenmarkausstrichen (insbesondere in Hinsicht auf dysplastischen Anomalien), den Immunphenotyp der peripheren und Knochenmarks Zellen, die Kulturen der Knochenmarks Zellen im standard Medium und in Medium mit steigenden Konzentrationen von Cyclosporin A festgesetzt. In Patienten mit OLT werden leichtere dysplastischen Anomalien im Vergleich mit Patienten mit ursprünglichen Myelodysplasie beobachtet. Der Immunphenotyp in denselben Patienten zeigt wichtige Herabsetzung der CD4+ Lymphozyten und eine veränderliche Inversion der CD4+/CD8+ Ratio. Die Wachstumsrate der Knochenmarks Zellen in Kulturen in Hinsicht auf BFU-E und CFU-GM zeigt eine Verkürzung der ersterer in normalen Personen und in Patienten mit OLT und mit wenigen Knochenmarks Zellen, während in Patienten mit OLT und mit normaler Zahl des Knochenmarks Zellen ist die Wachstum höher. Die Fälle mit guter Wachstum der erythroiden Kolonien zeigen eine niedrigere CD4+/CD8+ Ratio. Die Wachstum der CFU-GM ist ungefähr normal. Diese Ergebnisse lassen wir annehmen als mögliche Ursache der Zytopenie und der dysplastischen Anomalien in Patienten mit OLT entweder einen verschiedenen Grad der durch Cyclosporine A induzierter Immunsuppression, insbesondere der CD4+/CD8+ Ra-

tio, oder larvierten Virus-Infektionen, wahrscheinlich von herpetischen Viren oder von Parvovirus B19 verursacht.

SCHLÜSSELWÖRTER: Lebertransplantation, Myelodysplasie, Anaemie, Immunophenotyp, In Vitro Knochenmarkskulturen.

BIBLIOGRAFIA

- CLATCH RJ, KRIGMAN HR, PETERS MG, ZUTTER MM. - Dysplastic haemopoiesis following orthotopic liver transplantation: comparison with similar changes in HIV infection and primary myelodysplasia. *Br J Haematol.* 1994 Dec; 88(4): 685-92
- KOUIDES PA, BENNETT JM. - Morphology and classification of myelodysplastic syndromes. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1992 Jun; 6(3): 485-99
- CAFORIO AL, GAMBINO A, BELLONI FORTINA A, PIASERICO S, SCARPA E, FELTRIN G, TONA F, POMPEI E, TONIN E, AMADORI G, THIENE G, DALLA VOLTA S, PESERICO A, CASAROTTO D. - Monoclonal gammopathy in heart transplantation: risk factor analysis and relevance of immunosuppressive load. *Transplant Proc.* 2001 Feb-Mar; 33(1-2): 1583-4.
- CAINELLI F, VENTO S. - Infections and solid organ transplant rejection: a cause-and-effect relationship? *Lancet Infect Dis.* 2002 Sep; 2(9): 539-49. Review. Erratum in: *Lancet Infect Dis* 2002 Oct; 2(10): 645.
- COLLINS RH JR, ANASTASI J, TERSTAPPEN LW, NIKAEIN A, FENG J, FAY JW, KLINTMALM G, STONE MU. - Brief report: donor-derived long-term multilineage hematopoiesis in a liver-transplant recipient. *N Engl J Med.* 1993 Mar 18; 328(11): 762-5.
- CROSBIE OM, REYNOLDS M, McENTEE G, TRAYNOR O, HEGARTY JE, O'FARRELLY C. - In vitro evidence for the presence of hematopoietic stem cells in the adult human liver. *Hepatology.* 1999 Apr; 29(4): 1193-8.
- DROBYSKI WR, DUNNE WM, BURD EM, KNOX KK, ASH RC, HOROWITZ MM, FLOMENBERG N, CARRIGAN DR. - Human herpesvirus-6 (HHV-6) infection in allogeneic bone marrow transplant recipients: evidence of a marrow-suppressive role for HHV-6 in vivo. *J Infect Dis.* 1993 Mar; 167(3): 735-9.
- EIS-HUBINGER AM, REBER U, ABDUL-NOUR T, GLATZEL U, LAUSCHKE H, PUTZ U. - Evidence for persistence of parvovirus B19 DNA in livers of adults. *J Med Virol.* 2001 Oct; 65(2): 395-401.
- HASHIMOTO F, SUGIURA K, INOUE K, IKEHARA S. - Enhancing effects of cyclosporin A on hematopoietic progenitors: possible role of CD8+ T cells as negative regulators. *Exp Hematol.* 1994 Sep; 22(10): 947-53.
- JORGENSEN KA, KOEFOELD-NIELSEN PB, KARAMPERIS N. - Calcineurin phosphatase activity and immunosuppression. A review on the role of calcineurin phosphatase activity and the immunosuppressive effect of cyclosporin A and tacrolimus. *Scand J Immunol.* 2003 Feb; 57(2): 93-8.
- KOMATSU M, MAMMOLENTI M, JONES M, JURECIC R, SAYERS TJ, LEVY RB. - Antigen-primed CD8+ T cells can mediate resistance, preventing allogeneic marrow engraftment in the simultaneous absence of perforin-, CD95L-, TNFR1-, and TRAIL-dependent killing. *Blood.* 2003 May 15; 101(10): 3991-9.

- McLAUGHLIN K, WAJSTAUB S, MAROTTA P, ADAMS P, GRANT DR, WALL WJ, JEVNIKAR AM, RIZKALLA KS. - Increased risk for posttransplant lymphoproliferative disease in recipients of liver transplants with hepatitis C. *Liver Transpl.* 2000 Sep; 6(5): 570-4.
- MISRA S, MOORE TB, AMENT ME, VARGAS JH, BUSUTILL RW, McDIARMID SV. - Profile of anemia in children after liver transplantation. *Transplantation.* 2000 Nov 27; 70(10): 1459-63.
- NDIMBIE OK, FREZZA E, JORDAN JA, KOCH W, VAN THIEL DH. - Parvovirus B19 in anemic liver transplant recipients. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1996 Nov; 3(6): 756-60.
- PERKINS JL, NEGLIA JP, RAMSAY NK, DAVIES SM.- Successful bone marrow transplantation for severe aplastic anemia following orthotopic liver transplantation: long-term follow-up and outcome. *Bone Marrow Transplant.* 2001 Sep; 28(5): 523-6.
- PETER C, LATTA K, GRAF D, BRODEHL J.- Does tacrolimus cause more severe anemia than cyclosporine A in children after renal transplantation? *Transpl Int.* 1998; 11 Suppl 1: S328-30.
- SAWAFUJI K, MIYAKAWA Y, KIZAKI M, IKEDA Y.- Cyclosporin A induces erythroid differentiation of K562 cells through p38 MAPK and ERK pathways. *Am J Hematol.* 2003 Jan; 72(1): 67-9.
- SCHLITT HJ, SCHAFERS S, DEIWICK A, ECKARDT KU, PIETSCH T, EBELL W, NASHAN B, RINGE B, WONICJET K, PICHLMAYR R.- Extramedullary erythropoiesis in human liver grafts. *Hepatology.* 1995 Mar; 21(3): 689-96.
- SOVCIKOVA A, TULINSKA J, KUBOVA J, LISKOVA A, SYROVA D, HORAKOVA K.- Effect of cyclosporin A in Lewis rats in vivo and HeLa cells in vitro. *J Appl Toxicol.* 2002 May-Jun; 22(3): 153-60.
- STARZL TE, DEMETRIS AJ, MURASE N, JLDSTAD S, RICORDI C, TRUCCO M.- Cell migration, chimerism, and graft acceptance. *Lancet.* 1992 Jun 27; 339(8809): 1579-82.
- TSAMANDAS AC, JAIN AB, RAIKOW RB, DEMETRIS AJ, NALESNIK MA, RANDHAWA PS.- Extramedullary hematopoiesis in the allograft liver. *Mod Pathol.* 1995 Aug; 8(6): 671-4.
- TUNG J, HADZIC N, LAYTON M, BAKER AJ, DHAWAN A, RELA M, HEATON ND, MIELI-VERGANI G.- Bone marrow failure in children with acute liver failure. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000 Nov; 31(5): 557-6.
- WIESNER RH, RAKELA J, ISHTANI MB, MULLIGAN DC, SPIVEY JR, STEERS JL, KROM RA.- Recent advances in liver transplantation. *Mayo Clin Proc.* 2003 Feb; 78(2): 197-210.

Indirizzo dell'autore:

Prof. Giuseppe Amadori, Via Monaco Padovano, 12 - I-35128 Padova, Italia
