

Rassegne

La malattia coronarica del cuore trapiantato: interazione fisiopatologica tra sistema immunitario, infezioni e sindrome metabolica

Luciano Potena¹, Rossella Ferrara², Edward S. Mocarski³, David B. Lewis⁴, John P. Cooke², Francesco Grigioni¹, Fabio Coccolo¹, Gaia Magnani¹, Francesco Fallani¹, Carlo Magelli¹, Hannah A. Valentine², Angelo Branzi¹

¹Istituto di Malattie dell'Apparato Cardiovascolare, Università degli Studi, Bologna, ²Department of Cardiovascular Medicine, ³Department of Immunology and Microbiology, ⁴Department of Pediatrics, Stanford University, Stanford, California, USA

Key words:

Atherosclerosis;
Cytomegalovirus;
Endothelium;
Heart transplantation;
Metabolic syndrome;
Rejection.

Cardiac allograft vasculopathy is still the main cause of long-term graft loss after heart transplantation. Indeed, recent advances in immunosuppression management led to a significant improvement in short-term survival, while long-term death rate did not change significantly in the last 20 years. In this paper, we will review the latest advances in the understanding of this peculiar form of atherosclerosis, focusing on the mechanisms that can be potentially targeted by specific therapeutic interventions.

(G Ital Cardiol 2007; 8 (2): 73-82)

© 2007 AIM Publishing Srl

Ricevuto il 15 giugno 2006; nuova stesura il 4 ottobre 2006; accettato il 5 ottobre 2006.

Per la corrispondenza:

Dr. Luciano Potena

Istituto di Malattie
dell'Apparato
Cardiovascolare
Università degli Studi
Policlinico S. Orsola-
Malpighi
Via Massarenti, 9
40138 Bologna
E-mail:
luciano.potena2@unibo.it

Il trapianto di cuore è ad oggi l'opzione terapeutica in grado di modificare nel modo più radicale la prognosi dei pazienti affetti da scompenso cardiaco terminale^{1,2}. Il successo dei programmi di trapianto dipende da un'accurata selezione del candidato, un'abile gestione chirurgica e un attento controllo delle complicanze post-trapianto.

Negli ultimi anni i dati del registro internazionale², così come quelli di singoli centri italiani³ (Figura 1), mostrano un progressivo miglioramento della sopravvivenza post-trapianto, legata ad una ridotta mortalità nei primi mesi postoperatori, a fronte di una mortalità a medio e lungo termine che non è variata in modo significativo. I progressi della gestione rianimatoria, immunologica e infettivologica che hanno portato all'abbattimento della mortalità precoce, non sembrano quindi aver influito in modo significativo sulle complicanze croniche del paziente trapiantato, principalmente rappresentate dall'incidenza di neoplasie e di vasculopatia coronarica del graft. La patogenesi di questa peculiare forma di vasculopatia, che interessa in modo rapido e diffuso l'intero albero vascolare (arterioso e venoso) dell'organo trapiantato, è caratterizzata da una complessa interazione tra fattori di rischio immunitari e metabolici, che riconoscono come meccanismo di azione finale l'alterazione dell'omeostasi endoteliale^{4,5}. In questa rassegna

verranno discussi i contributi più rilevanti degli ultimi anni alla definizione degli aspetti diagnostici, fisiopatologici e terapeutici della vasculopatia del graft.

Aspetti anatomico-patologici e imaging diagnostico

La vasculopatia coronarica del cuore trapiantato (CAV) presenta caratteristiche anatomico-patologiche tipiche che la differenziano significativamente dall'aterosclerosi coronarica che colpisce la popolazione generale⁶, ma che la accomunano alle lesioni rilevabili nel rigetto cronico che colpisce gli altri organi trapiantati⁷. In primo luogo è una *vasculopatia*: si estende sia all'albero arterioso che venoso dell'organo trapiantato, interessando talora anche l'emergenza delle grandi arterie, fino alla linea di sutura con i vasi nativi. Le lesioni tipiche della CAV, quindi, hanno una distribuzione diffusa, che interessa inizialmente il microcircolo, per poi divenire evidente anche nei vasi epicardici^{8,9}. Inoltre, mentre la morfologia tipica della lesione aterosclerotica è costituita da una localizzazione focale, una componente lipidica subendoteliale, un infiltrato infiammatorio perilesionale con interruzione della lamina elastica interna e un assottigliamento della tonaca media, la CAV è caratterizzata da una dif-

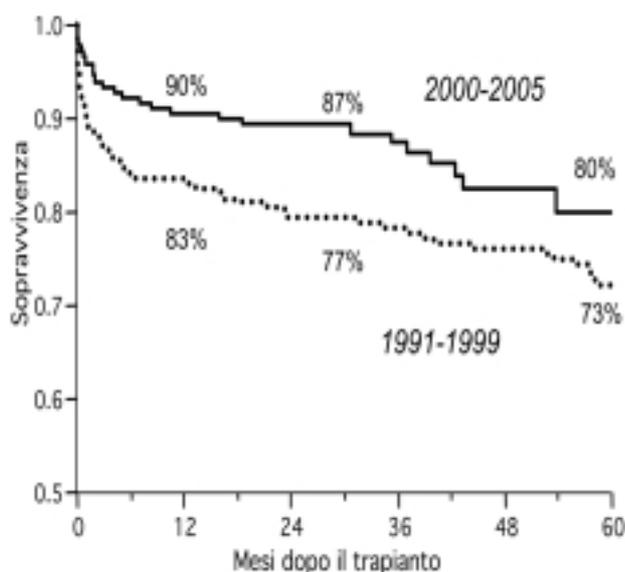


Figura 1. Sopravvivenza dei primi 400 pazienti sottoposti a trapianto di cuore a Bologna. Si nota un importante incremento della sopravvivenza ottenuto nel periodo più recente. Tuttavia, così come nei dati del registro internazionale, il miglioramento è legato quasi esclusivamente ad una riduzione della mortalità precoce, mentre la mortalità tardiva è rimasta pressoché invariata.

fusa iperplasia miointimale, la lamina elastica interna è spesso integra e l'infiltrato infiammatorio è periavventiziale⁸. A queste caratteristiche istologiche corrisponde un peculiare aspetto angiografico, in cui il lume coronarico appare di calibro progressivamente ridotto procedendo dai rami principali verso quelli distali, oppure con brusche riduzioni della pervietà del lume con rami periferici filiformi e con scarso flusso (aspetto "ad albero potato") o ancora con diffuse irregolarità parietali associate ad assenza dei rami coronarici distali¹⁰. Tali caratteristiche rendono scarsamente efficaci i tentativi di rivascularizzazione classica mediante angioplastica o bypass e influenzano negativamente la prognosi, pur in assenza di stenosi "emodinamicamente significative"^{10,11}. Gli aspetti angiografici sono tuttavia difficilmente standardizzabili e quantificabili in modo oggettivo e l'ecografia intravascolare (IVUS) ha messo in evidenza una ridotta sensibilità della coronarografia nell'identificare la presenza di iperplasia intimale prognosticamente rilevante¹². In particolare, un incremento di spessore intimale > 0.5 mm nel corso del primo anno dopo il trapianto, pur in assenza di lesioni angiografiche, rappresenta un indice importante di prognosi negativa a distanza^{13,14}. I risultati di questi studi hanno posto in primo piano l'importanza dell'IVUS come *gold standard* nella diagnosi di CAV, identificando l'incremento di spessore intimale come rilevante endpoint utile per la stima della prognosi a distanza e come *target* per valutare l'efficacia di nuove strategie terapeutiche.

Accanto a questi aspetti, l'analisi IVUS ha contribuito a identificare nel meccanismo del rimodellamento vascolare un importante determinante dinamico del-

la perdita di calibro del lume coronarico¹⁵. Molti dati osservazionali mostrano infatti che, a parità di incremento di iperplasia intimale, la parete coronarica può espandere il calibro vascolare (rimodellamento positivo) oppure ridurre il calibro che porta ad una perdita finale di lume vascolare (rimodellamento negativo)¹⁵⁻¹⁸. Benché non siano ancora chiari i meccanismi fisiopatologici alla base dei diversi comportamenti geometrici dell'albero coronarico del cuore trapiantato, è possibile ipotizzare che fattori metabolici contribuiscano in modo prevalente all'incremento dell'iperplasia intimale¹⁹, mentre fattori infettivi-infiammatori contribuiscano al rimodellamento negativo^{17,20}. Rimane tuttavia da chiarire il significato prognostico del rimodellamento coronarico rispetto all'incremento di spessore intimale.

L'utilità diagnostica delle metodiche non invasive nella CAV è piuttosto limitata¹. Va, tuttavia, segnalato che l'ecocardiogramma con stress farmacologico, pur se non sensibile nell'identificare la presenza di lesioni coronariche del graft, è in grado di fornire soddisfacenti informazioni prognostiche²¹. In quest'ambito, è di particolare interesse lo studio della funzione endoteliale coronarica attraverso ecocardiogramma transtoracico: l'alterato flusso coronarico durante somministrazione di adenosina appare in grado di identificare con una buona accuratezza diagnostica i pazienti con CAV significativa²². Tuttavia, in considerazione delle limitate risorse terapeutiche ad oggi disponibili nei pazienti con CAV, l'utilizzo di metodiche invasive e non invasive per la diagnosi di CAV non è chiaramente standardizzato nei diversi centri e risente spesso degli approcci di ricerca clinica, piuttosto che di strategie assistenziali definite.

Fattori di rischio immuno-mediati: rigetto acuto e (in)efficacia della terapia immunosoppressiva

Fin dai primi studi sulla CAV è apparso evidente che l'attivazione immunitaria specifica verso gli antigeni dell'organo trapiantato sia un elemento necessario per la progressione delle lesioni vascolari²³. In modelli animali di trapianto di cuore, la CAV si sviluppa solo in trapianti allogenici, ma non in trapianti singenici e osservazioni anatomico-patologiche nell'uomo evidenziano che le lesioni tipiche della CAV si interrompono bruscamente a livello delle linee di sutura dell'organo con i grandi vasi, senza segno di malattia nel tessuto autologo⁸. L'impatto dell'attivazione immunitaria è stato ulteriormente definito da numerosi studi sperimentali, che hanno identificato nello sviluppo di cellule T-memoria un potenziale fattore di persistenza dell'attivazione immunitaria nei confronti del graft, e quindi di rigetto cronico (che nel cuore si esprime come CAV)²⁴. Ciononostante, la rilevanza clinica del rigetto acuto come fattore di rischio per la CAV è stata a lungo dibattuta²⁵⁻²⁸. Solo recentemente un'accurata analisi dello sco-

re cumulativo degli episodi di rigetto acuto ha permesso di rilevare chiaramente anche in ambito clinico l'importanza dell'attivazione immunitaria sulla progressione della CAV²⁹. In particolare, l'attivazione immunitaria nel corso del primo anno predice l'insorgenza di CAV, indipendentemente dalla terapia immunosoppressiva, mentre i fattori metabolici sono coinvolti nel determinare la progressione successiva. È da sottolineare come un simile dualismo fisiopatologico sia stato descritto anche nell'ambito della nefropatia vascolare cronica, in cui le lesioni iniziali dipendono dall'attivazione immunitaria e le lesioni tardive da fattori farmaco-metabolici⁷.

Il meccanismo fisiopatologico che mette in relazione l'attivazione immunitaria responsabile del rigetto acuto con il successivo sviluppo di CAV va ricercato sia nei processi infiammatori locali che nell'espressione di fattori capaci di indurre fibrosi interstiziale^{30,31}. Tra i molti possibili meccanismi implicati nello sviluppo di fibrosi, particolare interesse riveste il ruolo del recettore per la vitronectina, un importante fattore di co-stimolazione dei linfociti T nel processo di attivazione della risposta immunitaria cellulo-mediata³². Questa molecola di adesione della famiglia delle integrine, espressa da endotelio, cellule muscolari lisce, monociti e linfociti, è stata rilevata con particolare abbondanza nelle biopsie con rigetto cellulare e in biopsie di pazienti con CAV. L'attività del recettore per la vitronectina, inoltre, regola in modo attivo i segnali per il rimodellamento della matrice extracellulare favorendo la migrazione di cellule muscolari lisce, e, potenzialmente, la progressione della CAV³³.

Malgrado la terapia immunosoppressiva cronica consenta un efficace controllo del rigetto acuto, è difficile verificarne un effetto protettivo diretto sulla CAV^{34,35}. Allo stesso modo, i vantaggi nella prevenzione del rigetto acuto ottenuti da farmaci più moderni come tacrolimus e micofenolato paragonati a ciclosporina e azatioprina, rispettivamente, non si traduce in un evidente prevenzione della CAV^{36,37}. È infatti possibile che i benefici precoci ottenuti per la riduzione di incidenza del rigetto acuto non si traducano in un chiaro effetto farmaco-specifico di protezione coronarica, sia per l'aspecificità dell'effetto immunosoppressivo che per l'impatto nel lungo termine dagli effetti collaterali di tipo metabolico^{35,38} (Tabella 1). Una nuova opzione terapeutica, nell'armamentario dei farmaci immunosoppressori, è rappresentata dai derivati della rapamicina, sirolimus ed everolimus, quest'ultimo registrato in Italia per la terapia nel trapianto di cuore³⁹. Questa classe di farmaci, utilizzata anche come rivestimento degli stent coronarici medicati, inibisce i segnali di proliferazione cellulare regolati dal sistema mTOR (*mammalian target of rapamycin*), un fattore di regolazione del ciclo cellulare attivato dall'interleuchina-2, il principale attivatore della risposta proliferativa linfocitaria³⁹. La particolarità dell'azione di questi farmaci risiede non solo nella loro attività immunosoppressiva ma anche nel-

Tabella 1. Eventi avversi metabolici dei principali farmaci per l'immunosoppressione cronica.

	Steroidi	CSA	TAC	AZA	MMF	mTOR
Ipertensione	2	4	3			
Diabete	3	1-2	2-3			
Dislipidemia	2	3	3			4
Obesità	2					
Insufficienza renale		3	3			*
Osteoporosi	3	1-2	1-2			
Ritardo cicatrizzazione	2					2
Anemia				2	3	3

AZA = azatioprina; CSA = ciclosporina; MMF = micofenolato mofetile; mTOR = sirolimus ed everolimus; TAC = tacrolimus. 1 = effetto collaterale raro (< 5% della popolazione trattata); 2 = comune (nel 5-15%); 3 = molto comune; 4 = presente nella maggior parte dei pazienti. * sia il sirolimus che l'everolimus non sono di per sé nefrotossici, ma interagiscono con la ciclosporina aumentandone la nefrotossicità alle dosi terapeutiche standard.

l'effetto antiproliferativo aspecifico che sembra ridurre sensibilmente sia la progressione dell'iperplasia miointimale caratteristica della CAV⁴⁰⁻⁴² che l'incidenza di alcuni tipi di neoplasie maligne post-trapianto⁴³. Nonostante questa classe di farmaci rappresenti una concreta speranza di ridurre le complicanze a lungo termine post-trapianto⁴⁴, il bilancio netto tra gli effetti positivi e gli effetti collaterali più importanti (alterazioni del metabolismo lipidico, aumentata nefrotossicità nell'interazione con la ciclosporina e ritardo nella cicatrizzazione delle ferite chirurgiche)^{41,45-47} sulla sopravvivenza a medio e lungo termine non è ancora noto.

Fattori di rischio metabolici: lipidi e sindrome metabolica

I pazienti con trapianto di cuore sono particolarmente esposti al rischio di sviluppare alterazioni del metabolismo, con incremento del peso corporeo e peggioramento della dislipidemia, dell'intolleranza glucidica e della regolazione della pressione arteriosa, la quale tende ad aumentare e a perdere il suo ritmo circadiano¹. La coesistenza di queste molteplici anomalie si vuole oggi riunita nel concetto di "sindrome metabolica", ipotizzando non solo un'associazione statistica tra i diversi fattori di rischio, ma una comune origine fisiopatologica⁴⁸. Nella popolazione generale non è ancora stato dimostrato se la sindrome metabolica di per sé sia in grado di fornire informazioni sul rischio cardiovascolare che siano indipendenti dal contributo dei fattori di rischio presi singolarmente. Nel contesto del trapianto di cuore, invece, dati sperimentali suggeriscono che le alterazioni del metabolismo glucidico e lipidico abbiano un effetto sinergico nel favorire la progressione della CAV, in aggiunta all'attivazione immunitaria nei con-

fronti del graft paziente trapiantato⁴⁹. Nell'esperienza clinica, inoltre, la coesistenza di ipertensione, sovrappeso, intolleranza glucidica e dislipidemia costituisce un riscontro estremamente frequente e ha in gran parte una causa ben identificabile negli effetti collaterali della terapia immunosoppressiva³⁸ (Tabella 1). Pertanto, pur se gli studi clinici a nostra disposizione pongono in primo piano solo il ruolo dei singoli fattori di rischio metabolici nella fisiopatologia della CAV^{19,50}, piuttosto che il loro effetto sinergico, il concetto di sindrome metabolica nel paziente trapiantato riveste un ruolo fondamentale in un approccio terapeutico integrato.

L'impatto negativo dell'ipercolesterolemia e l'effetto protettivo della terapia con statine sulla progressione della CAV è stato dimostrato da numerosi studi osservazionali e da trial clinici^{19,51-56}. In particolare, l'effetto protettivo delle statine non si limita a ridurre la progressione strumentale della malattia ma sembra avere un ruolo immunomodulatorio diretto^{52,56}, migliorando sensibilmente la prognosi, a fronte di un'incidenza di effetti collaterali relativamente controllabile, come mostrato da due recenti studi di registro^{55,56}. Entrambi gli studi concordano su un importante beneficio di sopravvivenza legato alla terapia con statine, pari ad una riduzione del 70% del rischio relativo di morte a 5 anni dal trapianto⁵⁶. La durata del trattamento, inoltre, ha un effetto indipendente sulla riduzione del rischio sia di morte che di CAV, stimabile nel 3% per mese di trattamento, al prezzo di un'incidenza annua di rhabdomiolisi e miosite dello 0.37 e 0.74%, rispettivamente, simile a quanto rilevato nei trial sulle statine nella popolazione generale^{55,57}. A fronte di questi risultati, è ormai generalmente accettata la raccomandazione di trattare con statine tutti i pazienti con trapianto di cuore, a meno di effetti collaterali. Tuttavia, è ancora oggetto di discussione il grado di aggressività terapeutica da adottare in questi pazienti. Infatti, se da un lato l'impatto negativo del colesterolo legato alle proteine a bassa densità (LDL) sulla progressione della CAV rimane evidente anche in pazienti trattati con statine e colesterolemia media relativamente bassa⁵¹, dall'altro il potenziale rischio di alte dosi di statine in questi pazienti resta concreto⁵⁸. In mancanza di studi che testino in modo specifico il rapporto rischio-beneficio di statine ad alte dosi con LDL, verso statine a basse dosi con LDL non ottimali, uno stretto monitoraggio clinico-laboratoristico rimane l'unica arma per garantire la sicurezza e la prognosi in questi pazienti^{1,55}.

La terapia immunosoppressiva, cortisonici e inibitori delle calcineurine in particolare, favorisce l'insorgenza di diabete mellito dopo trapianto di cuore nel 30% dei pazienti e contribuisce al peggioramento del compenso glicemico nei pazienti già diabetici prima del trapianto^{2,59}. Anche se questa condizione patologica rappresenta un importante fattore di rischio vascolare nel post-trapianto^{2,60}, spesso non viene controllata in modo ottimale, sia per carenza diagnostica sia per la mancanza di studi che forniscano evidenza di un bene-

ficio prognostico diretto legato ad una specifica terapia ipoglicemizzante nei pazienti con trapianto di cuore⁵⁹. Tuttavia, dati osservazionali dimostrano che la presenza di diabete mellito a 1 anno dal trapianto rappresenta un fattore di rischio indipendente nel predire la mortalità a 5 anni², mentre un aumento dell'emoglobina glicata, un marcatore sensibile di inefficace controllo glicemico⁵⁹, è associata ad un'aumentata prevalenza di CAV, indipendentemente dalla presenza di diabete mellito franco⁶¹. L'impatto del metabolismo glucidico, e quindi dell'insulino-resistenza, sullo sviluppo di CAV è ulteriormente sottolineato dal fatto che pazienti non diabetici, ma con un'alterata risposta al test da carico di glucosio, dopo il trapianto manifestano un aumentato rischio di CAV e di mortalità cardiovascolare globale⁶².

L'utilizzo di test metabolici, che siano in grado di identificare i pazienti che sviluppano insulino-resistenza, non sempre è facilmente applicabile in un contesto di routine clinica quotidiana. È tuttavia possibile utilizzare un marker surrogato di insulino-resistenza per identificare i pazienti ad aumentato rischio di CAV, rappresentato dal rapporto tra la concentrazione dei trigliceridi e del colesterolo legato alle proteine ad alta densità^{63,64}. I pazienti con un valore di rapporto > 3 presentano un'aumentata prevalenza di CAV e un aumento di concentrazione di proteina C-reattiva, a sua volta marker prognostico negativo in questi pazienti⁶⁵.

La durata e la qualità della vita nel post-trapianto è quindi significativamente influenzata dalle alterazioni del metabolismo identificate dalla sindrome metabolica. L'approccio terapeutico non deve limitarsi al controllo dei valori di laboratorio ma dovrebbe considerare una strategia globale rivolta sia alla minimizzazione della terapia immunosoppressiva che ad un aggressivo trattamento farmacologico e comportamentale.

Fattori di rischio infettivi: il citomegalovirus

Il citomegalovirus (CMV) è un betaherpesvirus che infetta in modo oligo-asintomatico il 50-70% della popolazione generale immunocompetente⁶⁶. A seguito dell'infezione primaria, il virus entra in latenza in cellule endoteliali e della linea monocito-macrofagica e in cellule stromali del midollo osseo^{67,68}. Fin dal contatto iniziale tra le glicoproteine dell'*envelope* virale e la membrana cellulare, il CMV è capace di modulare il profilo di espressione genica delle cellule infettate⁶⁹, instaurando un'interazione complessa con l'ospite, bilanciando l'aumento della risposta infiammatoria cellulare con strategie di mimetismo degli antigeni virali e di soppressione della risposta immunitaria^{68,70}. In questo modo il CMV è in grado di convivere con il soggetto immunocompetente, in cui persiste indefinitamente in modo latente replicandosi a basso grado in continuo equilibrio con il sistema immunitario che ne impedisce la diffusione sistemica⁶⁸. Nei pazienti con trapianto di organo, l'infiammazione sistemica e la concomitante

ridotta funzione immunitaria favoriscono la riattivazione della replicazione sistemica del CMV, che non solo può portare a pericolose sindromi organo-specifiche (polmonite, gastroenterite, retinite da CMV), ma anche a effetti indiretti sulla funzione del graft^{66,71,72}.

Numerosi studi clinici⁷³⁻⁷⁵ e sperimentali⁷⁶⁻⁷⁹ supportano l'ipotesi di un effetto patogenetico del CMV sulla CAV e sulla disfunzione cronica del graft. In particolare, gli studi sperimentali, evidenziando la permissività delle strutture vascolari all'infezione virale^{76,80,81}, hanno suggerito diversi meccanismi potenzialmente implicati nello sviluppo della CAV in seguito all'infezione da CMV, tra cui l'effetto proinfiammatorio locale^{80,82,83}, l'aumento della capacità aterogena del colesterolo LDL⁷⁸ e un aumento dell'adesività delle piastrine e dei monociti alla superficie delle cellule endoteliali^{84,85}. Nonostante la potenziale rilevanza clinica di questi meccanismi sia stata indirettamente confermata dal rilievo che l'aspirina e le statine risultano capaci di ridurre la progressione dell'infezione *in vitro*^{86,87}, prove dirette dell'effetto patogeno del virus sulle coronarie del graft *in vivo* sono ancora controverse^{88,89}. In parte questi risultati contrastanti sono riconducibili alle diverse modalità di diagnosi di infezione e di prevenzione della malattia sintomatica, non uniformemente standardizzati nei vari centri. Il virus infatti si replica spesso in modo asintomatico e, quindi, per rilevarne le conseguenze, il livello di attivazione virale va monitorato in modo longitudinale con metodiche sufficientemente sensibili, quali ad esempio l'antigenemia pp65 e la reazione polimerasica a catena in tempo reale su polimorfonucleati neutrofili o su sangue intero^{90,91}. In questo modo è possibile differenziare l'infezione subclinica da CMV dalla sindrome clinica da CMV, caratterizzata da un quadro clinico di malessere con febbre e leucopenia, accompagnate o meno da sintomatologia organo-specifica⁶⁶. Grazie al monitoraggio longitudinale dei livelli di attivazione virale è possibile osservare, sia in pazienti seguiti con strategia pre-emptiva¹⁷ che in pazienti trattati con profilassi, un effetto indipendente dell'infezione virale sulla progressione della CAV²⁰. In particolare, in pazienti asintomatici per malattia da CMV ma monitorati per l'infezione virale con la determinazione dell'antigenemia pp65, l'infezione sistemica predice in modo indipendente il rimodellamento coronarico negativo¹⁷.

L'effetto dell'infezione subclinica da CMV sulle modalità di rimodellamento coronarico è stato confermato da un secondo studio prospettico che confrontava pazienti trattati con due schemi di profilassi antivirale²⁰. In questo lavoro, non solo si è osservata una ridotta incidenza di infezione subclinica in pazienti trattati con profilassi aggressiva, ma anche di rigetto acuto e un rimodellamento coronarico più favorevole. L'effetto protettivo legato al controllo dell'infezione da CMV non è legato solo al ricorso alla terapia antivirale, ma anche alla capacità del ricevente di sviluppare un'efficace risposta immunitaria nei confronti del virus. In

particolare, un'elevata e precoce risposta immunitaria CD4-mediata verso gli antigeni del CMV è in grado di limitare non solo l'incidenza dell'infezione virale, ma anche dal rigetto miocardico e dalla progressione della CAV⁹². In base a questi risultati clinici, l'ipotesi di un effetto patogeno del CMV non legato a effetti citotossici diretti, ma a meccanismi per i quali è sufficiente la replicazione subclinica e a basso grado del virus, trova solide basi sperimentali (Figura 2). Su questa linea, recenti dati sperimentali del gruppo di Maastricht suggeriscono che il CMV non abbia un'azione specifica diretta sulla parete vascolare, bensì interagisca con il sistema dell'immunità innata attraverso il riconoscimento di strutture dell'*envelope* virale da parte dei *toll-like receptors* (TLR)⁹³⁻⁹⁵. L'attivazione dei TLR mette in moto la sintesi di citochine proinfiammatorie e modula la trascrizione di geni implicati nella regolazione del trasporto del colesterolo: due fenomeni in grado di dare inizio al processo vasculitico locale che precede la formazione della lesione aterosclerotica^{96,97}. In particolare, sembra che il CMV sia capace di aumentare l'espressione dei TLR sulla superficie cellulare, incrementandone quindi l'attività e la conseguente risposta infiammatoria locale⁹⁵. Questi fenomeni sarebbero particolarmente amplificati in un contesto concomitante l'attivazione dell'immunità cellulo-mediata verso gli alloantigeni tissutali, come nel caso del cuore trapiantato⁹⁸.

Nel complesso, in questi ultimi anni sono emerse molteplici linee di evidenza che puntualizzano il ruolo dell'infezione da CMV subclinica nel favorire la pro-

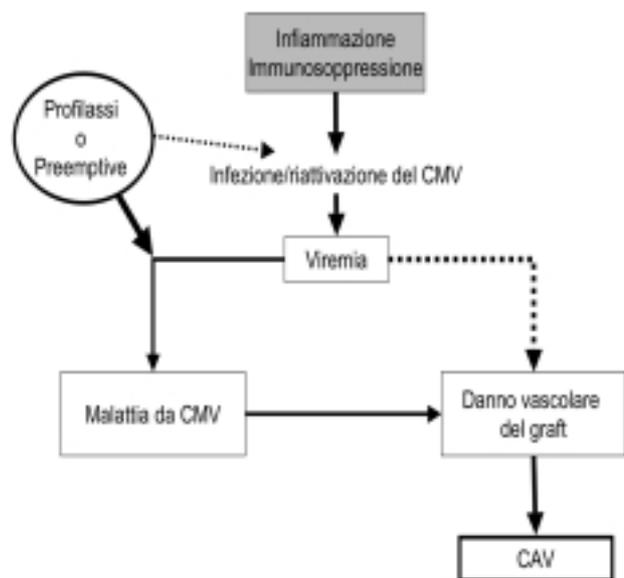


Figura 2. Le strategie di prevenzione della malattia da citomegalovirus (CMV), attualmente in uso nella pratica clinica, limitano solo parzialmente l'attivazione della replicazione asintomatica del CMV. Accanto a numerose evidenze del coinvolgimento della malattia da CMV, nel consentire la progressione della vasculopatia coronarica del cuore trapiantato (CAV), sussistono dati iniziali che suggeriscono come anche una riattivazione asintomatica del virus, interagendo con il sistema immunitario e i tessuti del graft, sia in grado di favorire l'insorgenza della CAV.

gressione della CAV attraverso meccanismi che non coinvolgono un effetto citotossico diretto del virus, ma la risposta immunitaria sia cellulo-mediata che innata verso il graft. Inoltre si fa strada l'ipotesi che interventi mirati a ridurre al minimo la capacità replicativa del virus, sia in modo farmacologico che aumentando la risposta immunitaria cellulo-mediata nei confronti del CMV, potrebbero avere effetti benefici significativi sull'outcome a lungo termine dei pazienti con trapianto di cuore. Questo concetto ribadisce ulteriormente la necessità di sviluppare strategie complesse di immunomodulazione nei pazienti con trapianto di organo solido, tali da consentire il superamento degli attuali schemi terapeutici basati su una immunosoppressione spesso eccessiva e aspecifica, sfruttando in modo più adeguato gli effetti di risposte tollerogeniche e protettive dell'attivazione immunitaria.

Ipotesi unificante: funzione endoteliale e dimetil-arginina asimmetrica

L'alterazione dell'omeostasi endoteliale, che risulta in una ridotta sintesi di ossido nitrico (NO) da parte dell'ossido nitrico-sintasi endoteliale (eNOS), è uno dei meccanismi fisiopatologici principali attraverso cui tutti i fattori di rischio fin qui analizzati, immunologici, metabolici o iatrogeni, favoriscono la progressione della CAV^{4,5,99,100} (Figura 3). Esiste, infatti, una consolidata evidenza che la ridotta sintesi di NO costituisca un fattore determinante per lo sviluppo della CAV, sia in studi sperimentali^{101,102} che clinici. Tuttavia, i molteplici

meccanismi attraverso cui i fattori di rischio siano capaci di alterare la sintesi di NO sono poco valutabili nella pratica clinica. Importanti progressi, nell'applicabilità clinica del concetto fisiopatologico della disfunzione endoteliale, sono stati apportati di recente da studi che identificano in aumentate concentrazioni di dimetil-arginina asimmetrica (ADMA) un indicatore della ridotta produzione di NO da parte dell'endotelio¹⁰³. L'ADMA è un aminoacido non proteico, prodotto intermedio del catabolismo delle proteine metilate, che è in grado di inibire il sito catalitico dell'eNOS per competizione con la L-arginina, il substrato necessario per la sintesi di NO¹⁰³.

La clearance dell'ADMA è in gran parte regolata dall'attività della dimetil-arginina dimetil-aminoidrolasi (DDAH), un enzima particolarmente sensibile alla presenza di radicali liberi dell'ossigeno¹⁰⁴ e in parte minore dall'escrezione diretta per via renale¹⁰⁵. Numerosi studi nella popolazione generale hanno dimostrato che intolleranza glucidica, ipercolesterolemia e iperomocisteinemia sono associati ad aumentate concentrazioni di ADMA attraverso l'inibizione dell'attività del DDAH^{104,106-108}. L'aumento di ADMA può quindi essere un possibile meccanismo attraverso cui i fattori di rischio cardiovascolare sono in grado di alterare la funzione endoteliale con significativi effetti sulla prognosi a distanza¹⁰⁹. Nell'ambito del trapianto di cuore, la potenziale rilevanza dell'ADMA sullo sviluppo della CAV è stata dimostrata in un modello murino di trapianto di cuore, in cui animali transgenici con una aumentata attività di DDAH, e quindi una bassa concentrazione di ADMA, presentavano una ridotta progressione di CAV rispetto agli animali *wild-type*¹¹⁰. In ambito clinico, lo stesso gruppo di ricerca ha osservato che non solo i pazienti con trapianto di cuore presentano concentrazioni di ADMA più elevate rispetto quelle di soggetti sani di controllo, ma che l'infezione da CMV e le alterazioni del metabolismo glucidico favoriscono un incremento delle concentrazioni di ADMA, aumentando significativamente il rischio di progressione della CAV^{111,112}. Nonostante una più estesa validazione clinica sia necessaria, l'ADMA potrebbe quindi rappresentare sia un marker di danno endoteliale aspecifico, facilmente dosabile, del potenziale ossidativo sistemico che raggruppa l'effetto nocivo dei multipli fattori di rischio per la CAV, sia un possibile nuovo obiettivo terapeutico, in quanto esso stesso marker di disfunzione endoteliale attraverso l'inibizione diretta dell'eNOS.

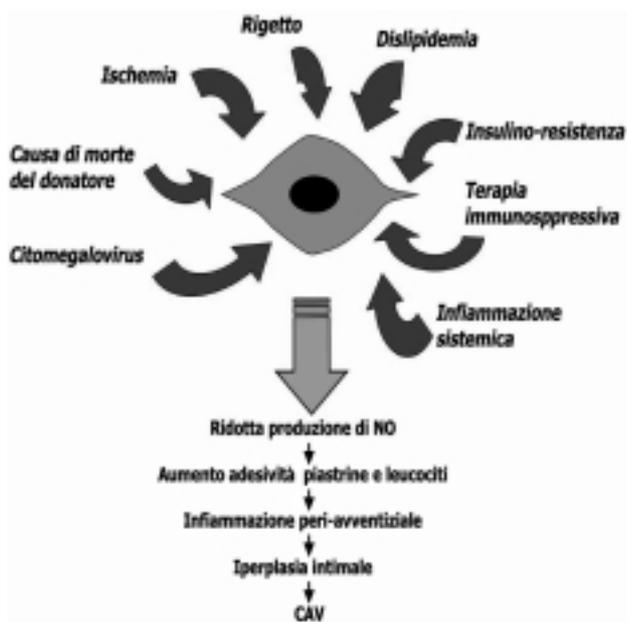


Figura 3. Fattori immunologici, infettivi, iatrogeni e metabolici interagiscono nell'alterare l'omeostasi endoteliale, favorendo l'attivazione di processi infiammatori locali che, in ultima analisi, stimolano la proliferazione muscolare liscia e lo sviluppo delle lesioni tipiche della vasculopatia coronarica del cuore trapiantato (CAV). NO = ossido nitrico.

Conclusioni

L'albero vascolare del cuore trapiantato è sottoposto a numerosi insulti da parte di fattori immuno-mediati, metabolici e iatrogeni che ne condizionano negativamente la funzione, favorendo lo sviluppo della CAV. In questi ultimi anni sono emerse evidenze convincenti sul ruolo dell'interazione fra rigetto acuto, sindrome meta-

bolica e infezione da CMV come modello paradigmatico di interazione complessa tra fattori di rischio di origine diversa ma che confluiscono su una comune azione fisiopatologica, incentrata sull'alterazione dell'omeostasi endoteliale. La difficoltà di effettuare trial clinici rigorosi in questa popolazione di pazienti e la mancanza di un trattamento specifico della CAV consentono al momento attuale di implementare strategie di prevenzione basate unicamente sul controllo aggressivo dei fattori di rischio e su un oculato carico di terapia immunosoppressiva¹³.

In questo scenario terapeutico non particolarmente rassicurante, il sirolimus e l'everolimus rappresentano una nuova concreta arma in grado di cambiare l'impatto della CAV sulla sopravvivenza dopo trapianto di cuore. La promettente efficacia di questi farmaci necessita tuttavia di ulteriori conferme di tollerabilità e sicurezza a lungo termine.

Riassunto

La vasculopatia coronarica è la causa principale di perdita del graft nel lungo termine in pazienti con trapianto di cuore. Nonostante i progressi della gestione chirurgica e rianimatoria, associati all'efficacia delle nuove terapie antirigetto, abbiano consentito un sensibile miglioramento della sopravvivenza a breve termine, la mortalità nel medio e lungo termine non è variata in modo significativo negli ultimi 20 anni. In questa rassegna verranno discussi i contributi degli ultimi anni più rilevanti alla definizione degli aspetti diagnostici, fisiopatologici e terapeutici della vasculopatia del graft.

Parole chiave: Aterosclerosi; Citomegalovirus; Endotelio; Rigetto; Sindrome metabolica; Trapianto di cuore.

Ringraziamenti

Questo lavoro è stato reso possibile grazie ai finanziamenti ottenuti dai seguenti enti:

- Borsa di Studio SIC 2002 assegnata al Dr. Luciano Potena
- National Institute of Health, grant #1 PO1 A150153-01
- Fondazione Luisa Fanti Melloni
- Fondazione Banca del Monte di Bologna e Ravenna

Bibliografia

1. Magelli C, Magnani G, Grigioni F, et al. I problemi clinici del cardiopatico trapiantato. *Ital Heart J Suppl* 2003; 4: 277-98.
2. Taylor DO, Edwards LB, Boucek MM, et al. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-second official adult heart transplant report – 2005. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24: 945-55.
3. Centro Nazionale Trapianti. La qualità nel trapianto di cuore. <http://www.trapianti.ministerosalute.it>
4. Weis M, Cooke JP. Cardiac allograft vasculopathy and dysregulation of the NO synthase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 567-75.
5. Valantine HA. Cardiac allograft vasculopathy: central role of endothelial injury leading to transplant "atheroma". *Transplantation* 2003; 76: 891-9.
6. Weis M, Scheidt W. Cardiac allograft vasculopathy: a review. *Circulation* 1997; 96: 2069-77.
7. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003; 349: 2326-33.
8. Billingham M. Histopathology of graft coronary disease. *J Heart Lung Transplant* 1992; 11 (Pt 2): S38- S44.
9. Johnson D, Alderman E, Schroeder J, et al. Transplant coronary artery disease: histopathologic correlations with angiographic morphology. *J Am Coll Cardiol* 1991; 17: 449-57.
10. Gao S, Alderman L, Schroeder J, Silverman J, Hunt S. Accelerated coronary vascular disease in the heart transplant patient: coronary arteriographic findings. *J Am Coll Cardiol* 1988; 12: 334-40.
11. Costanzo MR, Naftel DC, Pritzker M, et al. Heart transplant coronary artery disease detected by coronary angiography: a multiinstitutional study of preoperative donor and recipient risk factor. *Cardiac Transplant Research Database. J Heart Lung Transplant* 1998; 17: 744-53.
12. St Goar FG, Pinto FJ, Alderman E, et al. Intracoronary ultrasound in cardiac transplant recipients. In vivo evidence of "angiographically silent" intimal thickening. *Circulation* 1992; 85: 979-87.
13. Tuzcu EM, Kapadia SR, Sachar R, et al. Intravascular ultrasound evidence of angiographically silent progression in coronary atherosclerosis predicts long-term morbidity and mortality after cardiac transplantation. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 1538-42.
14. Kobashigawa JA, Tobis JM, Starling RC, et al. Multicenter intravascular ultrasound validation study among heart transplant recipients: outcomes after five years. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 1532-7.
15. Gibbons G. The pathogenesis of graft vascular disease: implications of vascular remodeling. *J Heart Lung Transplant* 1995; 14 (Pt 2): S149- S158.
16. Pethig K, Heublein B, Meliss R, Haverich A. Volumetric remodeling of the proximal left coronary artery: early versus late after heart transplantation. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 197-203.
17. Potena L, Grigioni F, Ortolani P, et al. Relevance of cytomegalovirus infection and coronary-artery remodeling in the first year after heart transplantation: a prospective three-dimensional intravascular ultrasound study. *Transplantation* 2003; 75: 839-43.
18. Tsutsui H, Ziada KM, Schoenhagen P, et al. Lumen loss in transplant coronary artery disease is a biphasic process involving early intimal thickening and late constrictive remodeling: results from a 5-year serial intravascular ultrasound study. *Circulation* 2001; 104: 653-7.
19. Kapadia S, Nissen S, Ziada K, et al. Impact of lipid abnormalities in development and progression of transplant coronary disease: a serial intravascular ultrasound study. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 206-13.
20. Potena L, Holweg CT, Chin C, et al. Acute rejection and cardiac allograft vascular disease is reduced by suppression of subclinical cytomegalovirus infection. *Transplantation* 2006; 82: 398-405.
21. Bacal F, Moreira L, Souza G, et al. Dobutamine stress echocardiography predicts cardiac events or death in asymptomatic patients long-term after heart transplantation: 4-year prospective evaluation. *J Heart Lung Transplant* 2004; 23: 1238-44.
22. Tona F, Caforio A, Montisci R, et al. Coronary flow reserve by contrast-enhanced echocardiography: a new noninvasive diagnostic tool for cardiac allograft vasculopathy. *Am J Transplant* 2006; 6 (Pt 1): 998-1003.
23. Salomon RN, Hughes CC, Schoen FJ, Payne DD, Pober JS,

- Libby P. Human coronary transplantation-associated arteriosclerosis. Evidence for a chronic immune reaction to activated graft endothelial cells. *Am J Pathol* 1991; 138: 791-8.
24. Brook MO, Wood KJ, Jones ND. The impact of memory T cells on rejection and the induction of tolerance. *Transplantation* 2006; 82: 1-9.
 25. Gao SZ, Schroeder JS, Hunt SA, Valantine HA, Hill IR, Stinson EB. Influence of graft rejection on incidence of accelerated graft coronary artery disease: a new approach to analysis. *J Heart Lung Transplant* 1993; 12: 1029-35.
 26. Stovin PG, Sharples LD, Schofield PM, et al. Lack of association between endomyocardial evidence of rejection in the first six months and the later development of transplant-related coronary artery disease. *J Heart Lung Transplant* 1993; 12: 110-6.
 27. Mehra MR, Ventura HO, Chambers RB, Ramireddy K, Smart FW, Stapleton DD. The prognostic impact of immunosuppression and cellular rejection on cardiac allograft vasculopathy: time for a reappraisal. *J Heart Lung Transplant* 1997; 16: 743-51.
 28. Rickenbacher PR, Kemna MS, Pinto FJ, et al. Coronary artery intimal thickening in the transplanted heart. An in vivo intracoronary ultrasound study of immunologic and metabolic risk factors. *Transplantation* 1996; 61: 46-53.
 29. Caforio AL, Tona F, Fortina AB, et al. Immune and nonimmune predictors of cardiac allograft vasculopathy onset and severity: multivariate risk factor analysis and role of immunosuppression. *Am J Transplant* 2004; 4: 962-70.
 30. Yamani MH, Starling RC, Young JB, et al. Acute vascular rejection is associated with up-regulation of vitronectin receptor (alpha β 3), increased expression of tissue factor, and activation of the extracellular matrix metalloproteinase induction system. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21: 983-9.
 31. Yamani MH, Yousufuddin M, Starling RC, et al. Does acute cellular rejection correlate with cardiac allograft vasculopathy? *J Heart Lung Transplant* 2004; 23: 272-6.
 32. Sturmhofel K, Brando C, Martinon F, Shevach EM, Coligan JE. Antigen-independent, integrin-mediated T cell activation. *J Immunol* 1995; 154: 2104-11.
 33. Yamani MH, Masri CS, Ratliff NB, et al. The role of vitronectin receptor (alpha β 3) and tissue factor in the pathogenesis of transplant coronary vasculopathy. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 804-10.
 34. Patel JK, Kobashigawa JA. Cardiac transplant experience with cyclosporine. *Transplant Proc* 2004; 36 (Suppl 2): S323-S330.
 35. Moien-Afshari F, McManus B, Laher I. Immunosuppression and transplant vascular disease: benefits and adverse effects. *Pharmacol Ther* 2003; 100: 141-56.
 36. Kobashigawa J, Miller L, Renlund D, et al. A randomized active-controlled trial of mycophenolate mofetil in heart transplant recipients. *Mycophenolate Mofetil Investigators. Transplantation* 1998; 66: 507-15.
 37. Kobashigawa J, Tobis J, Mentzer R, et al. Mycophenolate mofetil reduces intimal thickness by intravascular ultrasound after heart transplant: reanalysis of the multicenter trial. *Am J Transplant* 2006; 6: 993-7.
 38. Lindenfeld J, Miller G, Shakar S, et al. Drug therapy in the heart transplant recipient. Part II. Immunosuppressive drugs. *Circulation* 2004; 110: 3858-65.
 39. Ponticelli C. The pleiotropic effects of mTor inhibitors. *J Nephrol* 2004; 17: 762-8.
 40. Mancini D, Pinney S, Burkhoff D, et al. Use of rapamycin slows progression of cardiac transplantation vasculopathy. *Circulation* 2003; 108: 48-53.
 41. Keogh A, Richardson M, Ruygrok P, et al. Sirolimus in de novo heart transplant recipients reduces acute rejection and prevents coronary artery disease at 2 years: a randomized clinical trial. *Circulation* 2004; 110: 2694-700.
 42. Eisen HJ, Tuzcu EM, Dorent R, et al, for the RAD B253 Study Group. Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients. *N Engl J Med* 2003; 349: 847-58.
 43. Andrassy J, Graeb C, Rentsch M, Jauch KW, Guba M. mTOR inhibition and its effect on cancer in transplantation. *Transplantation* 2005; 80 (Suppl 1): S171-S174.
 44. Valantine H, Zuckermann A. From clinical trials to clinical practice: an overview of Certican (everolimus) in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24 (Suppl 4): S185-S190.
 45. Kovarik JM, Eisen H, Dorent R, et al. Everolimus in de novo cardiac transplantation: pharmacokinetics, therapeutic range, and influence on cyclosporine exposure. *J Heart Lung Transplant* 2003; 22: 1117-25.
 46. Lehmkuhl H, Ross H, Eisen H, Valantine H. Everolimus (certican) in heart transplantation: optimizing renal function through minimizing cyclosporine exposure. *Transplant Proc* 2005; 37: 4145-9.
 47. Kuppahally S, Al-Khaldi A, Weisshaar D, et al. Wound healing complications with de novo sirolimus versus mycophenolate mofetil-based regimen in cardiac transplant recipients. *Am J Transplant* 2006; 6: 986-92.
 48. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005; 365: 1415-28.
 49. Hoang K, Chen Y-DI, Reaven G, et al. Diabetes and dyslipidemia: a new model for transplant coronary artery disease. *Circulation* 1998; 97: 2160-8.
 50. Pethig K, Klauss V, Heublein B, et al. Progression of cardiac allograft vascular disease as assessed by serial intravascular ultrasound: correlation to immunological and non-immunological risk factors. *Heart* 2000; 84: 494-8.
 51. Potena L, Grigioni F, Magnani G, et al. Homocysteine-lowering therapy and early progression of transplant vasculopathy: a prospective, randomized, IVUS-based study. *Am J Transplant* 2005; 5: 2258-64.
 52. Kobashigawa JA, Katznelson S, Laks H, et al. Effect of pravastatin on outcomes after cardiac transplantation. *N Engl J Med* 1995; 333: 621-7.
 53. Magnani G, Carinci V, Magelli C, Potena L, Reggiani LB, Branzi A. Role of statins in the management of dyslipidemia after cardiac transplant: randomized controlled trial comparing the efficacy and the safety of atorvastatin with pravastatin. *J Heart Lung Transplant* 2000; 19: 710-5.
 54. Wenke K, Meiser B, Thiery J, et al. Simvastatin initiated early after heart transplantation: 8-year prospective experience. *Circulation* 2003; 107: 93-7.
 55. Grigioni F, Carigi S, Potena L, et al. Long-term safety and effectiveness of statins for heart transplant recipients in routine clinical practice. *Transplant Proc* 2006, in press.
 56. Wu AH, Ballantyne CM, Short BC, et al. Statin use and risks of death or fatal rejection in the heart transplant lipid registry. *Am J Cardiol* 2005; 95: 367-72.
 57. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20 536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 7-22.
 58. Ballantyne C. Statins after cardiac transplantation: which statin, what dose, and how low should we go? *J Heart Lung Transplant* 2000; 19: 515-7.
 59. Davidson J, Wilkinson A, Dantal J, et al. New-onset diabetes after transplantation: 2003 International consensus guidelines. Proceedings of an international expert panel meeting, Barcelona, Spain, 19 February 2003. *Transplantation* 2003; 75 (Suppl 10): S3-S24.
 60. Revanur V, Jardine A, Kingsmore D, Jaques B, Hamilton D, Jindal R. Influence of diabetes mellitus on patient and graft

- survival in recipients of kidney transplantation. *Clin Transplant* 2001; 15: 89-94.
61. Kato T, Chan M, Gao S, et al. Glucose intolerance, as reflected by hemoglobin A1c level, is associated with the incidence and severity of transplant coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 1034-41.
 62. Valantine H, Rickenbacker P, Kemna M, et al. Metabolic abnormalities characteristic of dysmetabolic syndrome predict the development of transplant coronary artery disease: a prospective study. *Circulation* 2001; 103: 2144-52.
 63. McLaughlin T, Abbasi F, Cheal K, Chu J, Lamendola C, Reaven G. Use of metabolic markers to identify overweight individuals who are insulin resistant. *Ann Intern Med* 2003; 139: 802-9.
 64. Yip J, Facchini F, Reaven G. Resistance to insulin-mediated glucose disposal as a predictor of cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2773-6.
 65. Eisenberg MS, Chen HJ, Warshofsky MK, et al. Elevated levels of plasma C-reactive protein are associated with decreased graft survival in cardiac transplant recipients. *Circulation* 2000; 102: 2100-4.
 66. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 1094-97.
 67. Riegler S, Hebart H, Einsele H, Brossart P, Jahn G, Sinzger C. Monocyte-derived dendritic cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 2000; 81 (Pt 2): 393-9.
 68. Mocarski ES Jr. Immune escape and exploitation strategies of cytomegaloviruses: impact on and imitation of the major histocompatibility system. *Cell Microbiol* 2004; 6: 707-17.
 69. Boehme KW, Singh J, Perry ST, Compton T. Human cytomegalovirus elicits a coordinated cellular antiviral response via envelope glycoprotein B. *J Virol* 2004; 78: 1202-11.
 70. Abate DA, Watanabe S, Mocarski ES Jr. Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response. *J Virol* 2004; 78: 10995-1006.
 71. Lautenschlager I. Cytomegalovirus and solid organ transplantation: an update. *Curr Opin Organ Transpl* 2003; 8: 269-75.
 72. Cytomegalovirus. *Am J Transplant* 2004; 4 (Suppl 10): 51-8.
 73. Grattan MT, Moreno-Cabral CE, Starnes VA, Oyer PE, Stinson EB, Shumway NE. Cytomegalovirus infection is associated with cardiac allograft rejection and atherosclerosis. *JAMA* 1989; 261: 3561-6.
 74. Mc Donald K, Rector S, Braunlin E, Kubo S, Olivari M. Association of coronary artery disease in cardiac transplant recipients with cytomegalovirus infection. *Am J Cardiol* 1989; 64: 359-62.
 75. Koskinen P, Nieminen M, Krogerus L, et al. Cytomegalovirus infection and accelerated cardiac allograft vasculopathy in human cardiac allografts. *J Heart Lung Transplant* 1993; 12: 724-9.
 76. Koskinen P, Lemstrom K, Bruggeman C, Lautenschlager I, Hayry P. Acute cytomegalovirus infection induces a subendothelial inflammation (endothelialitis) in the allograft vascular wall. A possible linkage with enhanced allograft arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1994; 144: 41-50.
 77. Lemstrom K, Koskinen P, Krogerus L, Daemen M, Bruggeman C, Hayry P. Cytomegalovirus antigen expression, endothelial cell proliferation, and intimal thickening in rat cardiac allografts after cytomegalovirus infection. *Circulation* 1995; 92: 2594-604.
 78. Zhou YF, Guetta E, ZX Y, Finkel T, Epstein SE. Human cytomegalovirus increases modified low density lipoproteins uptake and scavenger receptor mRNA expression in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1996; 98: 2129-38.
 79. Borchers A, Perez R, Kaysen G, Ansari AA, Gershwin ME. Role of cytomegalovirus infection in allograft rejection: a review of possible mechanisms. *Transpl Immunol* 1999; 7: 75-82.
 80. Arkonac B, Mauck KA, Chou S, Hosenpud JD. Low multiplicity cytomegalovirus infection of human aortic smooth muscle cells increases levels of major histocompatibility complex class I antigens and induces a proinflammatory cytokine milieu in the absence of cytopathology. *J Heart Lung Transplant* 1997; 16: 1034-45.
 81. Kahl M, Siegel-Axel D, Stenglein S, Jahn G, Sinzger C. Efficient lytic infection of human arterial endothelial cells by human cytomegalovirus strains. *J Virol* 2000; 74: 7628-35.
 82. Kowalik TF, Wing B, Haskill JS, Azizkhan J, Baldwin AS Jr, Huang ES. Multiple mechanisms are implicated in the regulation of NF-kappa B activity during human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1107-11.
 83. Speir E, Shibutani T, Yu ZX, Ferrans V, Epstein S. Role of reactive oxygen intermediates in cytomegalovirus gene expression and in the response of human smooth muscle cells to viral infection. *Circ Res* 1996; 79: 1143-52.
 84. Vercellotti GM. Effects of viral activation of the vessel wall on inflammation and thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; 9 (Suppl 2): S3-S6.
 85. Rahbar A, Soderberg-Naucler C. Human cytomegalovirus infection of endothelial cells triggers platelet adhesion and aggregation. *J Virol* 2005; 79: 2211-20.
 86. Speir E, Yu ZX, Ferrans VJ, Huang ES, Epstein SE. Aspirin attenuates cytomegalovirus infectivity and gene expression mediated by cyclooxygenase-2 in coronary artery smooth muscle cells. *Circ Res* 1998; 83: 210-6.
 87. Potena L, Frascaroli G, Grigioni F, et al. Hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibition limits cytomegalovirus infection in human endothelial cells. *Circulation* 2004; 109: 532-6.
 88. Gulizia JM, Kandolf R, Kendall TJ, et al. Infrequency of cytomegalovirus genome in coronary arteriopathy of human heart allografts. *Am J Pathol* 1995; 147: 461-75.
 89. Luckraz H, Charman SC, Wreghitt T, Wallwork J, Parameshwar J, Large SR. Does cytomegalovirus status influence acute and chronic rejection in heart transplantation during the ganciclovir prophylaxis era? *J Heart Lung Transplant* 2003; 22: 1023-7.
 90. Piipariinen H, Hockerstedt K, Gronhagen-Riska C, Lautenschlager I. Comparison of two quantitative CMV PCR tests, Cobas Amplicor CMV Monitor and TaqMan assay, and pp65-antigenemia assay in the determination of viral loads from peripheral blood of organ transplant patients. *J Clin Virol* 2004; 30: 258-63.
 91. Boeckh M, Huang M, Ferrenberg J, et al. Optimization of quantitative detection of cytomegalovirus DNA in plasma by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1142-8.
 92. Tu W, Potena L, Stepick-Biek P, et al. T-cell immunity to subclinical cytomegalovirus infection reduces cardiac allograft disease. *Circulation* 2006; 114: 1608-15.
 93. Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, et al. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol* 2003; 77: 4588-96.
 94. Tabeta K, Georgel P, Janssen E, et al. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 3516-21.
 95. Stassen FR, Vega-Cordova X, Vliegen I, Bruggeman CA. Immune activation following cytomegalovirus infection:

- more important than direct viral effects in cardiovascular disease? *J Clin Virol* 2006; 35: 349-53.
96. Vink A, Schoneveld AH, van der Meer JJ, et al. In vivo evidence for a role of toll-like receptor 4 in the development of intimal lesions. *Circulation* 2002; 106: 1985-90.
 97. Castrillo A, Joseph SB, Vaidya SA, et al. Crosstalk between LXR and toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. *Mol Cell* 2003; 12: 805-16.
 98. Andrade CF, Waddell TK, Keshavjee S, Liu M. Innate immunity and organ transplantation: the potential role of toll-like receptors. *Am J Transplant* 2005; 5: 969-75.
 99. Hollenberg SM, Klein LW, Parrillo JE, et al. Coronary endothelial dysfunction after heart transplantation predicts allograft vasculopathy and cardiac death. *Circulation* 2001; 104: 3091-6.
 100. Trapp A, Weis M. The impact of immunosuppression on endothelial function. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 45: 81-7.
 101. Lee PC, Wang ZL, Qian S, et al. Endothelial nitric oxide synthase protects aortic allografts from the development of transplant arteriosclerosis. *Transplantation* 2000; 69: 1186-92.
 102. Iwata A, Sai S, Nitta Y, et al. Liposome-mediated gene transfection of endothelial nitric oxide synthase reduces endothelial activation and leukocyte infiltration in transplanted hearts. *Circulation* 2001; 103: 2753-9.
 103. Vallance P, Leiper J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1023-30.
 104. Sydow K, Schwedhelm E, Arakawa N, et al. ADMA and oxidative stress are responsible for endothelial dysfunction in hyperhomocyst(e)inemia: effects of L-arginine and B vitamins. *Cardiovasc Res* 2003; 57: 244-52.
 105. Dayoub H, Achan V, Adimoolam S, et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. *Circulation* 2003; 108: 3042-7.
 106. Lenzen H, Tsikas D, Boger RH. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and the risk for coronary heart disease: the multicenter CARDIAC study. *Eur J Clin Pharmacol* 2006; 62 (Suppl 13): S45-S49.
 107. Stuhlinger MC, Abbasi F, Chu JW, et al. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *JAMA* 2002; 287: 1420-6.
 108. Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; 98: 1842-7.
 109. Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, et al. Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene Study. *Circ Res* 2005; 97: e53-e59.
 110. Tanaka M, Sydow K, Gunawan F, et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase overexpression suppresses graft coronary artery disease. *Circulation* 2005; 112: 1549-56.
 111. Weis M, Kledal TN, Lin KY, et al. Cytomegalovirus infection impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine in transplant arteriosclerosis. *Circulation* 2004; 109: 500-5.
 112. Potena L, Fearon L, Sydow K, et al. Inhibition of cardiac allograft vasculopathy by sirolimus and mycophenolate: asymmetric dimethyl arginine as a potential therapeutic target. (abstr) *J Heart Lung Transplant* 2006; 25 (Suppl 1): S100.
 113. Mehra M. Contemporary concepts in prevention and treatment of cardiac allograft vasculopathy. *Am J Transplant* 2006; 6: 1248-56.