



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Medicina Clinica e Scienze del Comportamento

Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica (Di.Bi.M.I.S)

Settore Scientifico Disciplinare: Medicina Interna (MED/09)

**FREQUENZA PERIFERICA DELLE CELLULE CD28^{NULL} E
TIPIZZAZIONE DEGLI ALOTIPI KIR E DEGLI ALLELI HLA
IN SOGGETTI CON ICTUS ISCHEMICO ACUTO**

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA DI:

Dott.ssa Rosaria Pecoraro

IL COORDINATORE

Chia.mo Prof. Antonio Pinto

IL TUTOR

Prof. Antonino Tuttolomondo

DOTTORATO DI RICERCA XXIX CICLO

ANNO 2016-2017

INDICE

INTRODUZIONE	pag.	1
Definizione di ictus.....	“	3
Classificazione dell'ictus ischemico.....	“	3
Infiammazione citochinica e cellulare nell'ictus ischemico acuto.....	“	5
Genetica dei recettori KIR.....	“	11
Ruolo dei recettori KIR nelle malattie infiammatorie e degenerative.....	“	38
Cellule CD28 ^{null} , recettori KIR e malattie cardiovascolari.....	“	39
Cellule CD28 ^{null} , recettori KIR e placca aterosclerotica.....	“	59

FREQUENZA PERIFERICA DELLE CELLULE CD28^{NULL} E TIPIZZAZIONE DEGLI APLOTIPI KIR E DEGLI ALLELI HLA E IN SOGGETTI CON ICTUS ISCHEMICO ACUTO

Background dello studio.....	“	66
Obiettivi dello studio.....	“	69
Materiali e metodi.....	“	70
Analisi statistica.....	“	77
Risultati.....	“	78
Discussione.....	“	82
Conclusioni.....	“	99

BIBLIOGRAFIA	“	110
---------------------------	---	-----

Frequenza periferica delle cellule CD28^{null} e tipizzazione degli aplotipi KIR e degli alleli HLA e in soggetti con ictus ischemico acuto

INTRODUZIONE

“La nostra conoscenza dei disturbi circolatori dell’encefalo e delle loro manifestazioni cliniche è deficitaria in tutti gli aspetti”.

Questa considerazione apre il capitolo dedicato alle malattie cerebrovascolari in un famoso trattato degli inizi del ventesimo secolo ad opera di Oppenheim [1a].

Novanta anni dopo tale affermazione mantiene in buona parte la sua veridicità, che assume toni addirittura beffardi se si pensa agli enormi progressi compiuti in altri settori della medicina rispetto al campo delle malattie cerebrovascolari sorte, questa, condivisa almeno in parte con altre malattie neurologiche.

Tutto ciò si traduce nella ancora attuale impossibilità di ricostruire, se non in rare occasioni, la dinamica dell’evento ictus ed in particolar modo dell’ictus ischemico rispetto a quello emorragico che, pur nella sua

complessità clinica, appare, almeno dal punto di vista tassonomico, di più agevole schematizzazione.

L'ictus ischemico rappresenta a tutt'oggi una entità clinica non sempre riconosciuta e spesso non ben classificata. L'impostazione puramente meccanicistica ed anatomica del passato ha configurato l'ictus ischemico come un'unica categoria sottovalutando la varietà di condizioni che possono rientrare nella definizione di ictus ischemico. Negli anni si sono succedute diverse classificazioni che, basandosi su criteri di tipo anatomico-topografico relativi al distretto vascolare interessato, hanno condotto a definizioni come quella di sindrome del circolo anteriore o posteriore (rispettivamente parziale e totale) che si sono dimostrate di limitata utilità clinica a favore di nuove classificazioni che, pur tenendo conto del dato anatomico, hanno sottolineato l'importanza del reperto di imaging strumentale (TC ed RM), della sintomatologia ed infine, più recentemente, del momento fisiopatologico.

E' infatti proprio la fisiopatologia dell'ictus ischemico ad aver dato luogo alle ultime e più recenti classificazioni che hanno rappresentato l'incipit di un processo di stratificazione della popolazione affetta da ictus ischemico in categorie di rischio di recidiva, di outcome, prognosi e destino terapeutico

DEFINIZIONE DI ICTUS

L'Organizzazione Mondiale della Sanità così definisce l'ictus cerebrale:

“Deficit neurologico focale (o globale), che si instaura rapidamente e che non riconosce altra verosimile origine se non un danno vascolare, i cui sintomi permangono per più di 24 ore o portano a morte” [1b].

CLASSIFICAZIONE DELL'ICTUS ISCHEMICO

La categorizzazione dell'ictus ischemico è stata oggetto di una notevole mole di studi, ma l'applicazione clinica delle diverse classificazioni che si sono succedute nell'arco degli anni è risultata in pratica difficile e dai risultati molto incerti. Risultava pertanto necessaria una standardizzazione tassonomica dell'ictus ischemico, attraverso cui, in base ai diversi requisiti epidemiologici, fisiopatologici e morfo-strumentali, si potessero enucleare quadri clinici peculiari, tali da configurarne sottotipi ben differenziati e caratterizzati.

Una tale classificazione doveva basarsi principalmente sulla valutazione delle manifestazioni cliniche di ischemia cerebrale, ma era anche evidente la necessità di avere una conferma dalle moderne indagini strumentali (TC-encefalo e RM-encefalo).

Nel 1993 nell'ambito del Trial Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) [1c] è stata sviluppata una classificazione dell'ictus ischemico

che attualmente rappresenta la modalità tassonomica maggiormente validata ed utilizzata sia negli studi epidemiologici che nella pratica clinica.

Questa classificazione considera i seguenti sottogruppi:

LAAS (Large Artery Atherosclerosis Stroke): Pazienti con reperto strumentale di occlusione o stenosi (>50%) su base aterosclerotica di un'arteria cerebrale maggiore o di un'arteria epicranica. I segni clinici sono relativi ad un deficit corticale (afasia, deficit motorio) o cerebellare. Si considera che lesioni cerebellari o corticali od infarti subcorticali emisferici dal diametro maggiore di 1.5 cm alla TC o RMN possano originare da aterosclerosi delle grandi arterie.

CEI (Cardioembolic): Questa categoria comprende i pazienti con occlusione arteriosa cerebrale presumibilmente dovuta ad un embolo ad origine cardiaca. Per l'attribuzione diagnostica al gruppo CEI è necessaria la presenza di almeno una cardiopatia emboligena.

LACUNARE: Questo sottotipo include pazienti con la classica sindrome lacunare (ictus motorio puro, sensorimotorio puro, sensoriale puro, emiparesi atassica o “sindrome della mano goffa-disartria”). I pazienti dovrebbero avere un normale reperto TC od RMN encefalo od un reperto di lesione emisferica corticale o subcorticale di diametro inferiore ad 1.5

cm, contrariamente quindi al sottotipo LAAS che è caratterizzato da lesioni cerebrali di diametro superiore.

ODE (Other determined etiology): Include soggetti con cause rare di ictus come ad esempio le vasculopatie su base non aterosclerotica, diatesi trombofiliche od emopatie.

UDE (Undetermined etiology): Si definiscono così i casi in cui l'etiologia dell'ictus non può essere accertata.

INFIAMMAZIONE CITOCHINICA E CELLULARE NELL'ICTUS ISCHEMICO ACUTO

A seguito di un evento ischemico cerebrale si sviluppano alterazioni flogistiche evidenziabili sia a livello periferico sia a livello del SNC.

A seguito dell'occlusione vasale si verificano modificazioni cellulari che coinvolgono astrociti, microglia, endotelio, neuroni, cellule dendritiche e cellule granulocitarie. Le cellule del core ischemico andando incontro a necrosi rilasciano peptidi captati dai TLR delle cellule astrocitarie e dalla microglia che attivate dagli stessi iniziano la secrezione di citochine come TNF- α , IL-2, IL-6, IL-1, TGF- β , chemochine, PAF e IL-8 capaci di indurre modificazioni a livello locale responsabili secondo diversi studi di un ingrandimento dell'area infartuata per alterazioni fisiopatologiche nella penombra ischemica le quali coinvolgono modificazioni in senso pro-

flogistico e microtrombosi a livello vascolare indotta dall'attivazione delle piastrine.

Immediatamente dopo l'evento ischemico si denota un aumento dei livelli di TNF- α , IL-2, IL-1 e IL-6 (quest'ultimo in relazione alla sede dell'ictus e al diametro dell'area infartuata) le quali svolgono un ruolo nell'indurre l'espressione di molecole di adesione sulle cellule endoteliali come P ed E-selectina, VCAM, ICAM responsabili di un' aumentata captazione di neutrofili (con inizio nelle prime 24 h e picco a 48-72 h). Nel sangue periferico si riscontrerà una attivazione prima delle cellule granulocitarie successivamente di quelle linfocitarie. A livello dell'infiltrato nel SNC ciò è legato ad uno switch nella popolazione predominante nella zona colpita con aumento dei linfociti sia B che T (in particolare TCD4 positivi).

Le cellule Natural killer sono importanti regolatori della risposta immune. Esse rappresentano una potente componente della risposta immunitaria innata all'infezione o trasformazione neoplastica, costituendo anche un *bridge* per l'attivazione della risposta immunitaria adattativa. La loro funzione effettrice rappresenta un'importante risposta di prima linea dell'immunità innata nei confronti di infezioni virali, batteriche e parassitarie. Le interazioni con le cellule dendritiche, i macrofagi, le cellule del trofoblasto fetale possono regolare l'attività delle cellule NK

influenzando la produzione di citochine, la loro citotossicità, la stimolazione delle risposte T helper 1.

La stimolazione delle cellule NK può essere utile durante le infezioni virali, e in gravidanza, risultando invece dannosa nel contesto dell'autoimmunità e della trasformazione neoplastica. Quest'ultimo aspetto può essere correlato all'infiammazione cronica che è un noto fattore di rischio per lo sviluppo del cancro durante infezioni persistenti. Per esempio nel caso di infezione da HPV, questo virus stabilisce una latenza prevenendo la lisi delle cellule infette mediata dalle cellule NK. Sarebbe interessante valutare se l'infezione da HPV induca una risposta citochinica proinfiammatoria da parte delle cellule NK in assenza di induzione di attività citotossicità favorendo pertanto la neoplasia. [1]

Le cellule NK condividono con le cellule T $CD8\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ un *modus operandum* che dipende dal riconoscimento delle molecole MHC I classe. Negli esseri umani un ruolo rilevante nel processo di riconoscimento dei targets da parte delle cellule NK si fonda sulla sorveglianza immunitaria degli antigeni HLA (human leucocyte antigen) di prima classe da parte dei recettori KIR (killer immunoglobulin like receptor).

Il controllo dell'attivazione delle cellule NK e della loro funzione di *killing* appare un sistema altamente complesso di differenti interazioni recettore-ligando di tipo inibenti e attivanti.

La regolazione delle risposte NK dipende da diverse variabili: KIR genotype, HLA genotype, eterozigosi *versus* omozigosi per questi genotipi, dall'esistenza di un possibile riconoscimento analogo tra HLA e KIR prodotti da una variazione individuale, da una variazione clonale tra le cellule NK nell'espressione KIR, dalla modulazione specifica dell'espressione HLA indotta dall'infezione, trasformazione o legame di peptide.

Le famiglie principali di recettori espressi sulle cellule NK sono i recettori killer Ig-like (KIRs), i recettori Ly49 e i recettori CD94/NKG2.

Nei primati la maggiore funzione di riconoscimento da parte delle cellule NK risulta dall'espressione dei geni KIR.

Nell'ambito dell'immunità cellulo-mediata particolare interesse ha destato negli ultimi anni il ruolo di un particolare subset T cellulare CD4 + che sono prive del CD28 e denominate per questo CD28^{null}.

Le cellule CD28^{null} sono oligoclonali e mostrano una ristretta varietà di TCR. Questa proprietà implica che le cellule T CD4+CD28^{null} siano ripetutamente stimulate dagli stessi antigeni, formando così una popolazione di cellule T oligoclonali di memoria che ha perso la loro attività T helper durante la differenziazione nell'ambito della risposta ad una cronica stimolazione infiammatoria. In atto i fattori trigger di attivazione delle cellule non sono stati ancora pienamente chiariti.

Numerosi studi suggeriscono come le cellule T CD4CD28^{null} T possano inoltre essere cellule T autoreattive [22, 23, 24].

Le cellule T CD4CD28^{null} mostrano infine numerose caratteristiche delle cellule con ruolo patogenetico e sono meno suscettibili alla regolazione da parte delle cellule Treg CD4CD25^{high} [25, 26]. Le cellule T CD4⁺CD28^{null} rappresentano quindi un subset di linfociti a lunga sopravvivenza direttamente citotossici, raramente riscontrate in soggetti sani, lievemente espanse nei pazienti anziani e sono state implicate nella patogenesi di varie patologie infiammatorie.

Studi sulle caratteristiche funzionali delle cellule CD4⁺CD28^{null} hanno mostrato come queste cellule abbiano caratteristiche uniche e come una volta attivate producano un grande quantitativo di Interferone- γ e TNF- α divenendo così altamente pro-infiammatorie [22]. Esse esprimono inoltre molecole citotossiche come la perforina ed il granzyme B che le rendono in grado di danneggiare target cellulari come le cellule endoteliali e le cellule muscolari lisce [23].

La capacità di queste cellule di produrre grandi quantitativi di citochine infiammatorie ed il fatto che esse possano essere isolate a partire dagli ateromi erosi indicano come queste cellule possano svolgere un ruolo negli eventi che conducono alla destabilizzazione di placca ed alle sindromi coronariche acute [24].

Le cellule T CD4⁺-CD28^{null} hanno quindi proprietà pro-aterogeniche e destabilizzanti la placca. Alcuni studi hanno mostrato come nelle sindromi coronariche acute (ACS) queste cellule sono incrementate a livello del sangue periferico [30, 38, 39] e sembra che inoltre infiltrino le placche coronariche instabili a livello delle quali vanno incontro ad una espansione oligoclonale [30] probabilmente stimulate da specifici antigeni [38,39]. Sempre il gruppo della Liuzzo ha mostrato come la frequenza di cellule CD4⁺CD28^{null} nel sangue periferico sia significativamente associata a ricorrenti episodi di angina instabile. I risultati ottenuti soprattutto dal gruppo della Liuzzo in ambito cardiovascolare nei soggetti con angina instabile, la relazione esistente tra attivazione T linfocitaria e danno neuronale su base ischemica ed il possibile parallelismo epidemiologico, patogenetico e clinico tra sindromi coronariche acute e manifestazioni acute della malattia cerebrovascolare come l'ictus ischemico acuto rendono plausibile un possibile ruolo della componente cellulare T CD4⁺CD28^{null} anche nell' ischemia cerebrale acuta.

Numerosi studi hanno descritto e caratterizzato l'attivazione immunoinfiammatoria della fase acuta dell'ictus ischemico caratterizzata da una vera e propria cascata citochinica che rappresenta il primo passo del progressivo "*cellular recruitment*" che porta le cellule infiammatorie in sede di lesione ischemica cerebrale, attraverso il danneggiamento della

barriera ematoencefalica, ad essere direttamente coinvolte nel determinismo del danno neuronale su base ischemica

GENETICA DEI RECETTORI KIR

I geni KIR sono membri di una superfamiglia immunoglobulinica localizzati nel complesso dei recettori leucocitari sul cromosoma 19. I ligandi dei recettori KIR includono gli allotipi dell'HLA-C e alcuni allotipi dell'HLA-A e B e nel caso di KIR2DL4, l'HLA-G.

Il cluster dei geni KIR sul cromosoma 19 contiene fino a 17 geni KIR o pseudogeni. Questi 17 geni mostrano vari gradi di polimorfismo. I KIR possono essere costituiti da due o tre domini Ig extracellulari, come indicato dalla nomenclatura 2D (2 dimensional) o 3D. Al momento della trascrizione, ogni gene KIR ha tra 4 e 19 alleli. Con l'eccezione di esempi limitati, l'impatto di specifici polimorfismi sulla funzione KIR non è stata comunque ampiamente indagata. Per quanto riguarda le code citoplasmatiche dei KIRs, esse possono essere sia lunghe (L, long), e contenenti motivi di immunorecettore inibizione tirosine-based (ITIMS), o corte (S, short), mancanti dei motivi ITIMS e principalmente attivanti. I recettori *short-tailed* hanno un residuo di lisina transmembrana necessario per l'accoppiamento con l'adattatore con il motivo di immunorecettore di attivazione (ITAM), DAP12.

KIR2DL4 è un'eccezione in cui il segnale è dipendente dall'associazione con una proteina accessoria, FcεRI-γ, che conferisce un segnale attivante attraverso il suo ITAM. I ligandi HLA di prima classe corrispondenti per KIRs specifici sono noti in molti casi, tranne per KIR2DL5 tra i recettori inibitori o per KIR2DS1, 2, 3, 4, 5 e 3DS1 tra i recettori attivanti. I geni dell'HLA di prima classe mappano sul cromosoma 6, diversamente dai geni KIR che mappano sul cromosoma 19; pertanto l'eredità e l'espressione dei geni che codificano i recettori e i loro ligandi sono fisicamente indipendenti l'uno dall'altro, è quindi possibile che un dato KIR, il suo ligando, o entrambi possono essere assenti in un dato individuo, ognuno dei quali risulta in una situazione funzionalmente nulla. I KIR esibiscono anche un'espressione variegata sulle cellule NK (per esempio un dato gene KIR è espresso su alcuni ma non su tutti i cloni NK di un individuo), aggiungendo un'altro elemento alla variabilità e complessità del sistema. Una volta acquisito il pattern di espressione dei geni KIR ereditati rimane stabile sui cloni NK sotto varie condizioni di colture cellulari e stimoli di attivazione. L'espressione dei KIR è controllata a un livello trascrizionale da cambiamenti epigenetici, principalmente dalla metilazione delle isole CpG che circondano il sito trascrizionale di start. È ormai sempre più evidente che la forza dell'interazione HLA-KIR ha un significato funzionale e può influenzare la suscettibilità di malattia. Questo è esemplificato dalle interazioni tra HLA-C e il recettore inibitorio KIR2D dove

KIR2DL1/HLA-C2 (e probabilmente KIR 2DL2/HLA-C1) appare conferire risposte inibitorie più forti che l'interazione KIR2DL3/HLA-C1. Le variazioni alleliche giocano anche un ruolo nel determinare la forza dell'interazione. Le interazioni tra KIR e i loro ligandi coniugati HLA possono anche essere influenzati dai peptidi presenti nel solco di legame delle molecole HLA particolarmente i residui in posizione 7 e 8. Il legame di KIR3DL1 con alcuni allotipi HLA A e HLA B contenenti il motivo Bw4 è stato mostrato essere dipendente dal peptide di legame. Mentre il contributo dei ligandi HLA di prima classe sull'espressione dei geni KIR non è perfettamente chiara, esistono evidenze sul fatto che il ligando HLA espresso sembra infatti modulare la frequenza delle cellule NK che esprimono il recettore inibitorio corrispondente e il suo livello di espressione. I ligandi HLA espressi sono noti anche essere cruciali per la tolleranza e l'educazione delle cellule NK. L'inibizione durante la maturazione delle cellule NK è un requisito critico affinché le cellule NK acquisiscano un potenziale citotossico. Non è comunque perfettamente chiaro se l'attività delle cellule NK nell'uomo sia regolata in modo simile, anche se recenti dati supportano questa ipotesi. [2]

I KIRs sono generalmente considerati funzionare come proteine di membrana, recettori cellulari. Alcune sequenze di cDNAs studiate, tuttavia, esprimono codoni di stop precoci, suggerendo il rilascio dei KIRs come proteine secrete quindi solubili. Esempi di questi sono stati riportati per

KIR2DS4 e KIR2DL4. L'impatto funzionale di queste proteine secrete non è stato ancora ben caratterizzato. Le combinazioni di KIRs possono condurre ad un differente equilibrio tra inibizione e attivazione [3].

Gli aplotipi KIR sono stati distinti in due gruppi in base al contenuto genico. Il gruppo A contiene due geni KIR attivanti, KIR2DL4 e KIR2DS4, e 5 geni KIR inibitori, KIR2DL1, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3.

Gli aplotipi del gruppo B hanno un numero variabile di geni KIR, la maggior parte con funzione attivante. Ad oggi sono stati caratterizzati più di 20 differenti aplotipi B.

Un altro aspetto da considerare è inoltre il contributo funzionale del polimorfismo allelico su ciascun locus. Diversi studi tra cui quelli mediante cristallografia con raggi X sono stati condotti per caratterizzare le interazioni KIR/HLA. Il contributo del peptide di legame dell'HLA è stato tuttavia difficile da definire. Dagli studi sembrerebbe che il legame è influenzato sia, come ci si aspetterebbe, dai polimorfismi HLA di I classe, ma anche dall'identità del peptide di legame. Alcuni allotipi KIR3DL1 possono legare un ampio range di alleli Bw4 associati con un range di peptidi derivati da virus come HIV e CMV, mentre altri presentano un pattern di riconoscimento più ristretto.

L'evidenza da questi studi di cristallografia dei complessi HLA-C/KIR e di allineamento (*alignment*) delle sequenze dei ligandi KIR mostra l'importanza nel legame del dimorfismo amminoacidico al residuo 80

dell'elica $\alpha 1$ negli alleli HLA-C e alla posizione 44 nel dominio D1 dei KIRs. Sulla scorta di questi dati, gli alleli HLA-C possono essere distinti in due gruppi. Il gruppo 1 include i ligandi di 2DL2, 2DL3, 2DS2: Z01, C03, C07, C08.

Nel gruppo 2 sono inclusi i ligandi di 2DL1 e 2DS1: C02, C04, C05, C06.

È un principio basilare che le variazioni nel riconoscimento svolto dalle cellule NK dipendano dall'eredità sia dei genotipi KIR che HLA e soprattutto dal risultato del bilanciamento di segnali attivanti e inibenti.

Poiché i ligandi HLA e i loro recettori KIR sono codificati su diversi cromosomi, è possibile che si realizzi l'espressione di un recettore KIR con una espressione non corrispondente di un dato ligando HLA I classe.

Shilling e colleghi hanno analizzato la relazione tra genotipo HLA, genotipo KIR, e l'espressione dei KIR riportando che il genotipo KIR è di maggiore importanza rispetto all'HLA nel determinismo del repertorio di espressione delle cellule NK.

Cloni individuali di cellule NK da un qualsiasi individuo possono mostrare differenti pattern di espressione recettoriale. Un'analisi esaustiva su 104 donatori giapponesi in cui è stata studiata la relazione tra polimorfismi HLA e KIR e l'omozigosi in relazione alla frequenza e al livello di espressione sulle cellule NK, ha mostrato che la presenza di un dato ligando HLA per un dato KIR si associava ad un aumento della frequenza di cellule NK che esprimevano quel recettore KIR e ad una ridotta frequenza di cellule NK

che esprimevano altri KIR inibitori. Il riconoscimento ligando-recettore può quindi variare a livelli multipli: aplotipo KIR, polimorfismo allelico KIR, polimorfismi HLA B e C e differenze nei pattern di espressione clonale.

Un aspetto affascinante della biologia di evoluzione delle interazioni HLA/KIR è l'imponente differenza nella frequenza degli aplotipi tra le popolazioni indicando differenze regionali nella selezione guidata dai patogeni.

Carrington e colleghi hanno proposto un modello per le combinazioni KIR/HLA al fine di predire la predisposizione inibente o attivante del programma delle cellule NK. Ad un estremo di questo spettro vi sono gli aplotipi AA con tendenza all'inibizione, dall'altro lato gli aplotipi BB con tendenza all'attivazione. I genotipi che esprimono i recettori inibenti ma che mancano dell'espressione dei corrispondenti ligandi HLA, sarebbero suscettibili a mostrare un'attivazione amplificata con pochi cloni di cellule NK sotto controllo inibitorio. Esistono comunque pochi dati funzionali che confermano l'esistenza di questo spettro.

Gli studi sulla variazione individuale e clonale dell'espressione e distribuzione dei KIR sulle cellule NK sottolineano che risulta dipendente dal genotipo, dalle combinazioni KIR/HLA, dallo stato di omo o eterozigosi, dal peptide di legame che colma questi *gaps*; rappresenta quindi una sfida conoscere e definire queste complesse e articolate

interazioni e il modello diventerà più complesso nel prendere in considerazione i dati funzionali.

Infatti ogni tentativo di studiare l'impatto funzionale dei genotipi KIR/HLA, dovrà considerare che quegli individui che esprimono varianti tronche di 2DS4 e 2DL4 sugli aplotipi A e che esprimeranno KIR non attivanti sulla superficie delle cellule NK, sembrano avere un'immunità innata normale [3].

Differenti KIR possono trasmettere segnali attivanti o inibenti alla cellula, la cui funzione effettrice è quindi considerata il risultato dell'equilibrio di questi segnali coo-partecipanti.

È noto che le cellule NK giocano un ruolo importante in un ampio range di condizioni patologiche e molti studi già hanno indagato la relazione tra genotipi KIR e suscettibilità a malattie in particolare infezioni virali, malattie autoimmuni, condizioni infammatorie, immunità tumorale, pre-eclampsia e aborto spontaneo ricorrente [3].

I vari genotipi HLA/KIR possono determinare differenti soglie di attivazione del repertorio NK e queste variazioni conferiscono, da quanto suggerito da studi di associazione con malattie, un rischio di numerose malattie e alterata risposta a trattamenti, tra queste è stata indagata la suscettibilità all'infezione da HIV e alla sua progressione, l'eliminazione di HCV, bronchiectasie idiopatiche, autoimmunità, cancro. Una semplice interpretazione delle correlazioni genetiche osservate sembra suggerire per

esempio che KIR3DS1 stimoli la produzione citochinica da parte delle cellule NK che contribuisce all'infiammazione.

Pochi aspetti chiave della biologia delle cellule NK vanno considerati quando si interpretano i risultati di queste analisi genetiche.

Comprendere le basi delle associazioni genetiche osservate è complicato da un vasto repertorio di recettori utilizzati dalle cellule NK per interpretare l'ambiente circostante. Esiste un ampio polimorfismo tra gli allotipi KIR che differiscono non solo nella sequenza nucleotidica ma anche nel contenuto genico.

Ciascuna cellula NK esprime il proprio repertorio di recettori KIR. Gli individui con diversi geni KIR attivanti hanno semplicemente una maggiore probabilità di esprimere KIR attivanti su una data cellula NK rispetto agli individui che hanno pochi KIR attivanti. Pertanto una data associazione tra una patologia e una combinazione KIR/HLA, per esempio un KIR attivante e il suo ligando HLA, non può essere soltanto interpretata come un potenziamento globale nei segnali di attivazione delle cellule NK.

È stata ipotizzata l'esistenza di un processo di selezione, il cui meccanismo non è noto, che sembra predisposto ad assicurare che ogni cellula NK abbia almeno un recettore inibitorio specifico per una molecola self HLA di prima classe. Se una cellula NK ad esempio manca della maggior parte dei KIR inibitori essa esprimerà il recettore inibitorio eterodimerico CD94-NKG2A che lega un HLA non classico, HLA-E. Recentemente è stata individuata

sulle cellule NK murine una nuova combinazione inibitoria ligando-recettore che è indipendente dall'MHC di prima classe: il legame dei recettori NKR-P1 al ligando *C type lectin Clr-b* inibisce l'attivazione delle cellule NK. Una simile regolazione HLA indipendente potrebbe essere anche presente nelle cellule NK umane. Pertanto non è chiaro se gli aplotipi KIR che esprimono diversi KIR attivanti si accompagnano alla presenza di cellule NK più facilmente attivate, dal momento che l'espressione dei KIR attivanti dovrebbe essere compensata dall'espressione dei KIR inibenti [1]. I recettori inibitori per le molecole MHC di prima classe aumentano la soglia di attivazione dei linfociti.

I componenti attivanti della famiglia KIR hanno ligandi e funzioni poco definiti. Nonostante la loro omologia ai KIR inibitori leganti l'HLA I classe, pochi studi sono riusciti a documentare il legame dei KIRs attivatori alle molecole HLA di prima classe. KIR3DS1, uno stretto omologo del KIR2DL1, sembra promuovere la citotossicità NK in modo HLA dipendente.

Il legame diretto di KIR2DS1 agli allotipi HLA C di gruppo 2 è stato dimostrato ma la debolezza di questo legame confrontato con quello del KIR2DL1 mette in dubbio la rilevanza fisiologica di questa interazione. A causa del legame molto debole, e verosimilmente qualche volta non esistente, dei recettori KIR attivatori con le molecole MHC I classe,

considerate le diverse funzioni che sembrano avere i KIR attivatori, è verosimile che siano coinvolti sia ligandi MHC e non MHC.

Come tali, i KIR attivatori potrebbero riconoscere forme alternative del tradizionale HLA I classe, differendo dalla loro controparte normale per un ripiegamento alternativo o per i peptidi presentati. È possibile che per la funzione dei KIR attivatori sia richiesto un elevato livello di espressione quale si verifica in condizioni di aumentata produzione di INF- γ associata all'infezione. È stato anche ipotizzato che KIR attivatori riconoscano molecole non HLA espresse su cellule self "stressate" o codificate dai patogeni. Alcuni esempi supportano ruoli dei KIR-S coinvolgenti ligandi alternativi MHC o non MHC. Katz ha descritto un ligando non MHC per una molecola KIR-S sulle cellule del melanom [4].

Stewart e colleghi hanno utilizzato dei reagenti di tetrameri KIR attivatori come indagine per indentificare i loro ligandi. Nei saggi basati sull'utilizzo di questi tetrameri e di misuri dirette di affinità, questa interazione con l'MHC di prima classe appariva facilitata da un ampio spettro di peptidi. KIR2DS1 e il suo omologo inibitorio, KIR2DL1 condividevano una simile sensibilità alle alterazioni della sequenza peptidica in posizione 7 e 8. Questi autori hanno riportato la prima dettagliata caratterizzazione dell'interazione tra i KIR2DS1 attivatori e i suoi ligandi, gli allotipi di gruppo 2 dell' HLA-C.

Da alcuni herpesvirus umani testati, è stato messo in evidenza che l'infezione da EBV induceva un'aumentata regolazione dei ligandi KIR attivatori e inibitori. Questa aumentata espressione si correlava con quella dell'MHC I classe da parte delle cellule infette. Questo studio ha mostrato che il legame di tetrameri KIR2DS1 seguiva le regole di specificità allelica HLA C del suo corrispondente KIR inibitorio, KIR2DL1. L'analisi di specificità peptidica di questa interazione ha indicato che il requisito per il legame KIR2DS1 all'HLA Cw4 era molto simile a quello richiesto per il legame con KIR2DL1. Infine è stato mostrato che KIR2DS1 induceva un'attivazione funzionale in risposta all'HLA C in alcune, ma non in tutte le circostanze. I ruoli e le funzioni dei recettori KIR attivatori rendono ancor più complessa la comprensione delle cellule NK. Variazioni nel contenuto genico del locus KIR sono principalmente legate alla presenza o assenza dei KIR-S (attivatori) piuttosto che dei geni KIR-L (inibitori).

Gli studi di associazione con malattie hanno implicato i KIR-S nel controllo delle infezioni virali e tumori, nella suscettibilità all'autoimmunità, e nel successo riproduttivo. In alcuni di questi studi, l'associazione è stata trovata sia con i geni KIR-S e gli alleli HLA che codificano per i ligandi dei corrispondenti KIR inibitori. Si ribadisce comunque che precedenti ricerche che avevano riportato che i KIR attivatori legavano le stesse molecole degli omologhi KIR inibitori, hanno individuato solo un legame di basso livello di KIR2DS1 e KIR2DS4 con HLA C2 [5].

Gli autori confermando questi dati precedenti sul legame KIR2DS1 con le molecole HLA C di gruppo 2, hanno caratterizzato questa interazione in dettaglio. Non è stata trovata alcun dato a supporto dell'ipotesi che catene pesanti libere/*misfolded* di HLA-C siano coinvolte nel riconoscimento KIR2DS1 da parte delle cellule NK.

Un'altra ipotesi per la funzione di KIR2DS1 sostiene che aumentati livelli di HLA di prima classe, indotti per esempio dall'interferone- γ durante le infezioni, possano essere richiesti per la funzione dei KIR-S. Contrariamente a questa ipotesi gli autori hanno mostrato che più bassi livelli di espressione di HLA-C2 sono efficaci induttori della funzione KIR2DS1. Sul ruolo del peptide di legame dell'HLA C nel legame dei KIR, i dati dello studio confermano quelli precedentemente riportati relativi alla selettività del peptide KIR2DL1 in posizione 7 e 8 ed estende questi al recettore attivante KIR2DS1. I risultati di questo studio sono in linea con il trend suggerito per le interazioni a più bassa affinità dei recettori di HLA-C1 (KIR2DL2, KIR2DL3), rispetto ai recettori per HLA-C2 (KIR2DL1) [5].

Abi Rached e collaboratori hanno recentemente mostrato che i membri attivatori delle famiglie KIR e Ly49 derivano dai loro omologhi inibitori e che i loro geni sono relativamente giovani suggerendo che pressioni evolvuzionistiche sia negative che oppostive abbiano agito su di loro [6]. Una possibilità è che gli antigeni HLA-C2 forniscano l'unico ligando su cui

KIR2DS1 è stato selezionato. Un meccanismo potenziale per la selezione positiva delle interazioni che coinvolgono KIR-S e le molecole HLA I classe potrebbe essere l'aumentato stato di attivazione della popolazione NK. Questo aumentato stato di attivazione delle cellule NK è stato suggerito come possibile spiegazione per l'associazione genetica del debole KIR inibitorio, KIR2DL3, e l'HLA C1, con una migliore risoluzione dell'infezione da virus C, e per l'associazione di altre combinazioni di KIR materni e HLA-C fetali con un ridotto rischio di pre-eclampsia durante la gravidanza. Questi risultati sulla debolezza del legame di KIR2DS1 ad indurre risposte NK supportano il ruolo di modulazione di questa interazione, perchè suggeriscono la necessità di segnali aggiuntivi attivatori o di ridotti segnali inibitori per l'attivazione più forte mediata da KIR2DS1 e che è stata osservata contro i targets C1R (una linea cellulare B HLA-A negativa, HLA-Cw4 positiva, HLA-B debole).

I più intensi stati di attivazione basale NK dovute a legami di molecole KIR-S possono anche spiegare altre associazioni genetiche che coinvolgono sia i ligandi KIR-S che HLA. Tra queste sono state descritte una rallentata progressione verso la condizione di AIDS associata con la combinazione di KIR3DS1 e gli alleli HLA Bw4 contenenti Ile80; il rischio di diabete mellito tipo1 associato con KIR2DS2 combinato con HLA C1; della psoriasi vulgaris con KIR2DS1 e HLA Cw06. Diversi studi genetici sulle infezioni virali hanno rivelato un'influenza delle interazioni KIR HLA

sull'outcome di malattia. Un'interazione tra KIR3DS1 e un subset di alleli HLABw4, quelli con Ile in posizione 80, è stata associata con una progressione ritardata ad AIDS tra gli individui HIV positivi. Nel caso dell'infezione da HCV, l'omozigosi di HLA-C1 e KIR2DL3 è associata con la risoluzione dell'infezione. Un'ipotesi proposta per spiegare questo risultato è che KIR 2DL3 lega l'HLA C con minore affinità rispetto a KIR2DL1 e KIR2DL2, riducendo pertanto l'inibizione delle cellule NK, e favorendo la risoluzione dell'infezione. Nonostante misure dirette dell'affinità non abbiano rivelato una differenza tra il legame di KIR2DL ai suoi rispettivi ligandi HLA C. Combinazioni di certi genotipi HLA-KIR sono stati anche correlati con la suscettibilità alle malattie autoimmuni. Sembrerebbe che le combinazioni HLA-KIR che favoriscono l'attivazione delle cellule NK o delle cellule T siano state selezionate per migliorare la resistenza a virus e a neoplasie, nonostante un rischio associato di sviluppare malattie autoimmuni [1].

Le interazioni selettive delle coppie ligando-recettore possono anche essere influenzate dalla loro diversa affinità. Un'altra possibilità è che le preferenze peptidiche delle interazioni KIR-S e HLA, come quelle descritte per KIR2DS1, possano definire quali interazioni sono importanti in particolari tessuti. In alternativa KIR attivatori possono svolgere un ruolo addizionale quando espressi da subsets di cellule T. Il vasto numero di recettori KIR attivatori, il loro elevato grado di polimorfismo, la loro

associazione con stato di salute e malattia, le particolarità della loro attivazione dimostrano la complessità e plasticità delle cellule NK come effettori della risposta immune innata [5].

Poichè aplotipi KIR mancanti dei geni funzionali 2DS e 3DS sono comuni, alcuni autori hanno proposto che i KIR attivatori siano superflui. È noto inoltre che tutti gli individui hanno un subset di cellule NK che sono completamente sprovvisti di KIR attivatori.

Alla luce dell'espressione non coordinata dei KIR attivatori e inibitori, è improbabile che i KIR attivatori contribuiscano alla funzione dei KIR inibitori. La specificità del ligando dei KIR attivatori non è ancora del tutto nota. KIR2DS1 e KIR2DS2 possono legare HLA-C con una minore affinità dei KIR inibitori strettamente correlati, ma è anche possibile che esistano dei ligandi alternativi come il ligando non HLA per il recettore KIR2DS4 sulle cellule del melanoma.

Nel topo la famiglia di recettori Ly49 è strutturalmente distinta ma funzionalmente equivalente al KIR umano: il recettore attivante Ly49H e inibitorio Ly49I legano la proteina m157 del cytomegalovirus suggerendo che i KIR possono legare proteine virali. È essenziale determinare la specificità di legame dei KIR attivatori al fine di interpretare le correlazioni genetiche con le malattie. È anche verosimile che i KIR attivatori abbiano delle funzioni ligando-indipendenti. L'espressione di KIR attivatori su alcuni subsets di cellule T potrebbe contribuire ad alcune associazioni viste

negli studi genetici. È ipotizzabile inoltre che i KIR attivatori possano agire in sinergia con i segnali mediati dai TCR per causare un'attivazione immune aberrante e reazioni autoimmuni. Anche se le cellule T mancano di DAP12, l'espressione di KIR2DS2 rappresentava un co-stimolo per i segnali TCR che, benchè subottimali, risultavano nella secrezione di citochine [1].

Le catene laterali che si estendono oltre il sito di legame peptidico delle molecole HLA-B e HLA-C possono interferire con il legame dei KIR inibitori.

Sebbene il riconoscimento del peptide specifico da parte dei KIR attivatori è stato proposto come potenziale meccanismo per attivare le cellule NK durante le infezioni, è estremamente poco probabile che la discriminazione self/non self sia realizzata dai KIR principalmente perché ciascun KIR lega differenti molecole HLA-B o HLA-C, ognuno dei quali ha le proprie regole per il legame peptidico. Il riconoscimento da parte dei KIR sembra quindi realizzarsi soltanto se il peptide non contribuisce alla specificità. L' esteso polimorfismo dell'HLA di prima classe e il repertorio molto limitato dei recettori KIR non sono compatibili con il legame peptide-specifico dell'HLA di prima classe nel contesto di malattie e infezioni.

Al contrario il legame CD94 all' HLA-E non polimorfico è governato dalla specificità del peptide. L'HLA-E normalmente lega un peptide derivato da sequenze di segnale di altre molecole HLA di prima classe e il riconoscimento del CD94 viene meno quando l'HLA E invece lega un

peptide derivato dalla sequenza di segnale delle heat shock protein 60. Questa condizione di “*modified self*” potrebbe indurre l'uccisione di cellule sottoposte a risposte da stress da parte delle cellule NK che sono normalmente inibite dall'HLA E.

Molti studi genetici hanno suggerito un modello per cui l'inibizione delle cellule NK da parte di combinazioni KIR/HLA è più forte di altre. In questo modello l'inibizione di KIR2DL1-HLA-C2 è più intensa seguita da KIR2DL2-HLA-C1, e infine alla combinazione KIR2DL3-HLA-C1. In accordo con questo modello le più deboli interazioni inibitorie risultano in una maggiore attivazione NK e una migliore protezione dall'infezione virale, o maggiore suscettibilità a condizioni autoimmuni. Carrington supporta la connessione tra la forza dell'inibizione KIR-mediata e l'outcome della malattia. La differenza nella forza inibitoria tra i KIR2DLs potrebbe essere correlata ai segnali nel citosol piuttosto che al legame HLA-C. Un interessante caratteristica di KIR2DLs è il requisito di Zn^{2+} per la loro funzione inibitoria. Misure cinetiche del legame di KIR2DL con l'HLA C hanno mostrato una minore presenza di Zn^{2+} particolarmente nel caso di KIR2DL1. Pertanto è possibile che differenze nel coinvolgimento sostenuto di KIR dovuto a Zn^{2+} potrebbe tradursi in differenze nella forza di inibizione [1, 7].

I motivi che spiegano la diversità dei KIR e il contributo di specifici KIRs ai meccanismi di segnale all'interno delle cellule NK e cellule T non sono

pienamente compresi ma la loro importanza è sottolineata dagli studi genetici recenti che mostrano la relazione tra combinazioni di KIR e geni HLA con l'outcome di varie malattie. Alcuni risultati suggeriscono che la patologia può essere modificata da specifiche interazioni KIR-ligando piuttosto che dalla reattività globale delle cellule NK e cellule T [1].

Esiste un'ampia variazione nella frequenza dei KIR attivatori tra le diverse etnie ma la frequenza allelica è piuttosto limitata se confrontata con quella dei recettori inibitori. Le frequenze fenotipiche dei KIR attivatori e dei loro ligandi (o presunti ligandi) mostrano forti correlazioni negative tra le popolazioni in contrasto alle deboli correlazioni positive tra vari geni KIR inibitori e i loro ligandi [2].

Gli studi sulle frequenze dei geni e degli aplotipi KIR in differenti popolazioni mostrano una significativa variabilità tra le diverse etnie, possibilmente dovuta ad una pressione di selezione conferita dai patogeni. Kitpoka e collaboratori hanno studiato le diversità dei geni KIR e dei loro ligandi in 500 donatori di thailandesi, studiando anche negli stessi individui la coesistenza di KIR inibitori, di KIR attivatori, dei loro ligandi. Complessivamente sono stati identificati 36 genotipi KIR. Il più comune era il genotipo AA1. Tutti gli individui erano portatori di almeno una coppia KIR inibitorio-HLA, mentre il 18% dei soggetti non esprimeva combinazioni KIR attivatorio-HLA. Il profilo di combinazioni KIR-HLA più frequentemente osservato era costituito dalla presenza di tre coppie KIR

inibitorio-HLA con una coppia KIR attivante-HLA. Il rapporto aplotipo A/B in questa popolazione era più alto rispetto a quello osservato in altre popolazioni come negli arabi (Arabia Saudita), caucasici UK, US, e invece era più basso rispetto a quello osservato nelle popolazioni coreane, giapponese, cinese Han [8, 9, 10,11, 12]. Questo studio, che offre un'analisi comprensiva dei profili KIR-HLA nei donatori di sangue thailandesi in relazione ai genotipi KIR, ai ligandi HLA, alle combinazioni KIR-HLA, rappresenta un'utile informazione di base per ulteriori futuri studi di associazione tra i geni KIR e le malattie [13].

Rea e collaboratori hanno recentemente ipotizzato che cambiamenti nella frequenza genica degli aplotipi KIR A e B si correli con l'aumentata espressione di alcuni profili citochinici e di compartimenti NK già riportati negli ottantenni e novantenni dello studio BELFAST, che hanno mostrato un invecchiamento “sano”, dove era stato già riportato un aumentato numero di cellule NK e di subset correlati alle NK in associazione ai livelli sierici di sIL-2R.

Nello studio BELFAST, il 24% degli otta/novantenni era portatore dell'aplotipo A e il 76% portatore dell'aplotipo B con nessuna differenza per la frequenza dell'aplogruppo KIR A o B tra soggetti di sesso maschile o femminile. I soggetti portatori dell'aplotipo A mostravano un aumento del numero assoluto e/o percentuale delle cellule NK in confronto ai soggetti portatori dell'aplotipo B. Non sono stati evidenziati cambiamenti correlati

all'aplotipo KIR dei subset di cellule CD57+CD8. Dall'analisi di regressione logistica si evince che l'aplotipo B era predittivo di più alti livelli di citochine IL-12 in confronto ai portatori dell'aplotipo A e di più alti livelli di TGF- β , citochina con ruolo antiinfiammatorio. In questo studio i soggetti portatori dell'aplotipo A presentavano un maggior numero di cellule NK rispetto ai portatori dell'aplotipo B. Questi ultimi invece che sono per lo più portatori di geni che codificano per i KIR attivatori mostravano livelli tendenzialmente più alti di citochine pro-infiammatorie rispetto ai portatori dell'aplotipo KIR A. Questi risultati stimolano un dibattito sui profili immunologici di quei soggetti che appaiono invecchiare lentamente e che rappresentano un modello per una sopravvivenza di buona qualità. Gli autori hanno indagato se le frequenze degli aplotipi KIR A e B erano cambiate nella coorte di ottantenni e novantenni dello studio BELFAST e se un eventuale cambiamento possa spiegare gli aumenti di subsets delle cellule NK e dei profili citochinici precedentemente osservati nella coorte di anziani del BELFAST. La regressione semplice è stata usata per valutare l'associazione tra citochine pro infiammatorie e anti-infiammatorie e il numero assoluto o percentuale di subset NK che poteva suggerire una relazione causale. È emersa una debole relazione positiva tra livelli crescenti di citochine pro infiammatorie sIL-2R, IFN- γ , IL-12 con un numero di NK in incremento tra il 3 e il 14%. Dall'altro lato le citochine anti infiammatorie come TGF- β mostravano un trend per un'associazione

negativa con il numero di NK con nessuna variazione per IL 10. Gli autori hanno dimostrato che i soggetti portatori dell'aplotipo A hanno numero e percentuale significativamente elevato di cellule NK come percentuale della conta linfocitaria totale rispetto ai soggetti portatori dell'aplotipo B; gli ottantenni/novantenni con aplotipo A presentavano un numero di cellule NK 60% più alto dei portatori dell'aplotipo B ma con una simile ampiezza di distribuzione. Su questi risultati ci si chiede se l'aumento delle cellule NK e dei subsets NK associati trovati in anziani apparentemente sani rappresenti l'evidenza di un robusto stato di salute e di una solida sorveglianza immunologica e costituiscano la risposta ad una malattia cronica misconosciuta. A supporto della prima ipotesi, quindi di una sorveglianza immunologica potenziata, l'evidenza clinica e sperimentale su modelli animali ha dimostrato che un numero e un'attività aumentata di cellule NK si correla con un'immunità migliorata. Nell'uomo invece esiste una minore evidenza che correla col numero di cellule NK; un'importante indagine epidemiologica con 11 anni di follow-up ha mostrato un'associazione tra una ridotta attività di cellule NK e un aumentato rischio di cancro e ha chiarito l'importanza dell'attività NK nel ridurre il rischio di tumori nell'adulto. Esiste inoltre un'evidenza crescente dell'efficacia di un aumento del compartimento delle cellule NK nel trattamento delle recidive di leucemia; invece, l'assenza o un ridotto numero di cellule NK si associano con infezioni soprattutto da virus. Altri autori hanno

precedentemente riportato che l'incremento NK e delle cellule NK associate, come osservato nella popolazione di anziani del BELFAST, si associavano con infezioni croniche o malattie non note [14, 15, 16].

Virus come CMV, EBV che hanno sviluppato un rapporto per lo più commensale con l'uomo, bloccano le molecole di rilevamento dei KIR interferendo con l'espressione dell'MHC di I classe, così che la loro presenza rimane inosservata e incontrastata, e molti hanno adottato questa strategia alla perfezione. Similmente una *down-regulation* dell'espressione dell' MHC di prima classe è un fenomeno frequentemente osservato in corso di tumorigenesi. Se l'aumento delle cellule NK si correla a viremia cronica come CMV, sorge la questione sulla possibilità di opportunità terapeutiche per migliorare la salute nei gruppi di età avanzata. Le percentuali di alplotipi KIR osservati in questa popolazione di anziani suggerisce l'esistenza di uno shift immunologico poco reattivo e guidato da patogeni e ed età correlato, verso l'aplotipo più polimorfico e poligenico B. La distribuzione di alplotipi A e B varia enormemente tra distinti gruppi etnici. La frequenza di alplotipi A e B è relativamente costante nella popolazione caucasica, comunque nel mondo esiste un ampio spettro di alplotipi A e B, l'aplotipo A domina in korea, giappone e popoalzione cinese Han con una frequenza di circa il 75 % se confrontata con la popolazione australiana aborigena dove l'aplotipo KIR A è di circa il 13 % con uno shift alle più alte frequenze di alplotipo KIR B. Queste differenze possono

riflettere sia effetto fondatore e sia selezione patogeno-indotta e appare verosimile giustificare alcune variazioni nella suscettibilità di malattia. La differente distribuzione degli aplotipi A e B suggerisce che l'aplotipo B è stato soggetto a una più rapida diversificazione come risultato di una selezione patogeno mediata per i geni KIR B che sono più rappresentati in numero e più polimorfici se confrontati al limitato set genico nel contesto dell'aplotipo KIR A.

Il complesso di geni KIR A contenenti per la gran parte geni KIR inibitori tende a essere associato con un più basso rischio di malattie autoimmuni ma mostra un maggiore rischio di infezioni virali se confrontato con l'aplotipo KIR B. Per esempio KIR2DS1 e/o KIR2DS2 in assenza di HLA C2 e HLA-C1 rispettivamente sono associati con artrite psoriasica a causa del ridotto potenziale per un associato fenotipo inibitorio. Al contrario i soggetti omozigoti per HLA-C2 mancano del ligando per KIR2DL1 e sono associati con KIR2DS2 e diabete. L'associazione con le malattie autoimmuni può correlarsi al carattere sconosciuto delle interazioni ligando KIR B, i controlli e i modulatori dell'attività KIR B e gli effetti sulle cellule NK. Frequenze simili di aplotipi inibitori KIR A come trovato nella popolazione BELFAST di 80/90enni e per gruppi di età più giovane similmente supportano il concetto di un peso relativamente lieve della malattia cronica correlata all'infiammazione e questo è anche supportato

dalle caratteristiche fenotipiche degli 80-90 anni che mostravano una scarsa evidenza di compromissione renale e o diabetica.

Recentemente è stata descritta un'associazione tra il gene KIR2DS5 e protezione da alcune malattie umane età correlate. Questo risultato è interessante nel contesto di un invecchiamento di buona qualità e longevità, dal momento che i geni KIR mostrano un trend non significativo per più alte frequenze per i novantenni confrontati con i gruppi più giovani. [17, 14].

Le citochine sono prodotte dalle cellule NK e da subset NK correlati e guidano le stesse nelle loro attività citotossica stimolatoria e inibitoria. IL2 è stata la prima citochina che si è notato che accentua l'attività delle cellule NK, ed è stato recentemente mostrata un'associazione tra cellule NK e sottogruppi NK-correlati e livelli sierici sIL2. Questa analisi tende a mostrare accentuati profili di citochine suggerendo che i portatori dell'aplotipo B tendono a produrre maggiori quantità di citochine pro infiammatorie che potrebbero servire ad accrescere e preparare la risposta immune. Le cellule normali sembrano esprimere pochi ligandi per recettori KIR attivatori rendendo poco probabile che la soglia per l'attivazione delle cellule NK sia raggiunta in circostanze normali. Un processo di *educazione* NK è stato suggerito per fornire una diversa popolazione di cellule NK con differenti soglie effettrici. I fattori intrinseci ed estrinseci che condizionano la diversità delle cellule NK umane rimangono non completamente

caratterizzati. Tre fattori appaiono comunque influenzare la struttura e funzione del repertorio KIR, la diversità dei geni KIR specialmente B, ligandi HLA- di prima classe A, B, C, e un programma di acquisizione sequenziale di recettori durante lo sviluppo delle cellule NK che stabilisce le soglie di attivazione NK e potrebbe essere correlata all'ambiente di cellule NK. Gli autori hanno anche recentemente dimostrato che la coorte di anziani di BELFAST mostravano una metilazione globale mantenuta supportando il concetto di un sistema immune competente e sembra verosimile che ipometilazione/ipermetilazione di geni promotori individuali fornisca un altro pathway attraverso cui stile di vita, nutrizione, stress, modula e cambia i pattern di attivazione/inibizione dei geni KIR e potrebbe segnare il profilo immune dell'invecchiamento. [18, 14].

Le popolazione di cellule NK, i loro complessi recettoriali KIR, i profili citochinici associati che generano e guidano la loro reattività, sono collaboratori altamente efficaci nel controllare, pattugliare, proteggere, il nostro ambiente immunologico per tutta la vita. I loro ruoli e interazioni sono interdipendenti e i loro profili sono di interesse dal momento che sembrerebbero importanti nel mantenere l'integrità immunologica nelle persone che vivono con successo fino ai 90 anni. Le cellule NK non distruggono cellule che esprimono normali livelli di MHC prima classe perchè predominano i segnali inibitori mentre le cellule le cui molecole di

superficie MHC sono danneggiate da virus o tumori sono predisposte all'attacco attraverso segnali KIR attivatori. [14]

Attraverso i recettori KIR le cellule NK riconoscono e tollerano gli antigeni self HLA o incrementano la risposta citotossica nei confronti di cellule con alterata espressione di antigeni self HLA, danneggiati da virus o tumori.

Il valore dell'aplotipo B rispetto all'aplotipo A è stato mostrato nel successo del trapianto di cellule staminali emopoietiche. Diversi studi hanno mostrato che l'outcome clinico era migliore quando i donatori avevano uno o due aplotipi KIR B rispetto ai donatori che avevano due aplotipi A [19,20]. La maggiore frequenza dell'aplotipo di gruppo A nella popolazione si traduceva in una minore possibilità di trovare donatori con aplotipi B/x. Quasi tutta la popolazione di donatori thailandesi studiati da Kitpoka e colleghi, risultava portatrice di combinazioni KIRinibitorio -HLA che la pressione selettiva con l'evoluzione ha cercato di mantenere, cioè genotipi con più KIR inibitori che attivanti. Questo risultato in linea con evidenze simili da studi precedenti sottolinea l'importanza dei geni KIR inibitori per l'educazione delle cellule NK a divenire pienamente funzionali. [13]

Il modello di “*licensing*” è stato proposto per spiegare la tolleranza funzionale delle cellule NK nell'ambiente normale e illustrare l'importanza dei KIR inibitori nel processo di educazione delle cellule NK. Durante questi sviluppi le cellule NK esprimono almeno un recettore inibitorio che lega un ligando HLA self al fine di maturare e diventare funzionalmente

competente o “*licensed*”. L'interazione tra KIR attivatori e i propri ligandi HLA in assenza dei corrispondenti omologhi KIR inibitori potrebbe potenzialmente condurre all'autoreattività.

In considerazione della presenza di cellule NK che esprimono KIR attivatori che legano HLA self in assenza di KIR inibitori self-specifici dimostrata in donatori sani, potrebbe esistere un sistema potenziale per la tolleranza NK da parte di KIR attivatori che legano HLA self.

È stato ipotizzato che le cellule NK esprimenti KIR attivatori non sono eliminate ma sono rese iporesponsive se il ligando è presente nell'ospite.

Infatti nei donatori omozigoti per HLA-C2 le cellule NK che esprimono KIR2DS1 in assenza di KIR per HLA self erano iporesponsive alla stimolazione delle cellule target. Dall'altro lato nessuna iporeattività è stata osservata nei donatori omozigoti HLA-C1. Questi risultati indicano che la reattività delle cellule NK KIR2DS1+ risulta soppressa nei donatori omozigoti per HLA-C2. I meccanismi di educazione delle cellule NK attraverso KIR attivatori non sono stati ancora del tutto caratterizzati.

Questo risultato sottolinea il requisito critico di inibizione delle cellule NK durante la loro maturazione affinché le cellule NK diventino funzionalmente competenti [13].

È sempre più evidente che la forza delle interazioni KIR-HLA ha un significato funzionale e che può influenzare l'outcome di infezioni, malattie autoimmuni. È stato infatti mostrato che la combinazione KIR2DL3-HLA

C1 è associata con la risoluzione dell'infezione da epatite C, e la combinazione KIR3DL1/S1-HLA Bw4-0801 è implicata nel rallentare la progressione da infezione HIV.

RUOLO DEI RECETTORI KIR NELLE MALATTIE INFIAMMATORIE E DEGENERATIVE

La conoscenza delle combinazioni dei geni KIR con i ligandi HLA nella popolazione generale potrebbe contribuire alla comprensione delle malattie autoimmuni, di modelli di infezione, alterazioni riproduttive e tumori.

E' stato infine suggerito che i KIRs contribuiscano ad una considerevole parte degli effetti che ha l'attività fisica nell'uomo. Sembrerebbe infatti che l'esercizio fisico si associ ad una variazione dell'espressione dei geni KIR. È noto che l'esercizio induce una mobilitazione dei leucociti. Questo incremento correlato all'attività fisica delle cellule circolanti del sistema immunitario può verificarsi più volte nel corso della giornata. La sensibilità delle cellule NK allo stress indotto da esercizio fisico fornisce un notevole supporto che queste cellule possano essere implicate nel potenziale legame tra attività fisica regolare e stato di salute.

Recentemente Radom Aizik e colleghi hanno riportato che quattro geni KIR che codificano per recettori inibitori KIR2DL3, KIR3DL1, KIR3DL2 e un recettore attivante KIR2DL4 presentavano una maggiore espressione dopo

l'esercizio. Altri studi hanno riportato risultati diversi e spesso discordanti, questo potrebbe essere spiegato da differenze di genere, di intensità di esercizio o durata. È verosimile che l'esercizio induca la trascrizione sia di geni attivatori che inibitori. Poiché i KIR rappresentano i principali recettori che regolano la funzione delle cellule NK, è plausibile poter pensare che la modulazione dell'espressione dei geni KIR indotta dall'esercizio possa influenzare potenzialmente lo stato di attività delle cellule NK in entrambe le direzioni, attivazione o inibizione. Molte ricerche sono necessarie ancora per chiarire gli esatti cambiamenti dei patterns di espressione genica dei KIR in risposta all'attività fisica e per determinare quali condizioni possono influenzare questi cambiamenti (intensità di esercizio, durata, sesso, pubertà, età) [72].

CELLULE CD28^{null}, RECETTORI KIR E MALATTIE CARDIOVASCOLARI

Diverse condizioni inerenti il danno vascolare e l'infiammazione hanno mostrato un'associazione con il recettore attivatorio KIR2DS2. È stato riportato che le cellule CD4⁺CD28^{null}Td, che sono espanse nell'artrite reumatoide e causano danno endoteliale, esprimono KIR2DS2 in assenza del recettore inibitorio KIR2DL2 in questa condizione. Inoltre, la frequenza di KIR2DS2 è risultata aumentata nei pazienti affetti da artrite reumatoide

con vasculite in confronto ai controlli normali e pazienti con artrite reumatoide senza vasculite. HLA-Cw*03, un allotipo HLA-C1, quindi un presunto ligando per KIR2DS2, risulta anche aumentato in pazienti con vasculite, benchè questo non fosse stato riportato per altri alleli C1. Pertanto è possibile che KIR2DS2 riconosca uno specifico complesso peptide-HLA-Cw03 generato nei soggetti con complicanze vasculitiche in corso di artrite reumatoide. I ricercatori hanno identificato per la prima volta le cellule $CD4^+CD28^-$ in pazienti con artrite reumatoide seguita successivamente da un ampio range di malattie immuno mediate come spondilite anchilosante, polimiosite e dermatomiosite, LES, polimialgia reumatica, arterite a cellule giganti, sclerosi multipla, malattia di crohn, sindrome coronarica acuta, sclerosi multipla, e perfino malattie infettive come CMV, HIV, epatite cronica [21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34]. In sintesi la prevalenza delle cellule $CD4^+CD28^{null}$ è aumentata nelle malattie infiammatorie croniche, nella immunodeficienza e in alcune malattie infettive specifiche. Similmente le cellule T $CD4^+CD28^{null}$ sono presenti anche nell'infiltrato infiammatorio delle placche aterosclerotiche nella sindrome coronarica acuta ed esprimono KIR2DS2.

Le sindromi coronariche acute sono principalmente causate dall'erosione o rottura della placca aterosclerotica che dà origine a trombosi sovrapposta. Il difetto tissutale sulla superficie della placca è strettamente associato alla presenza di infiltrato infiammatorio; dati emergenti mostrano che le cellule

immunitarie sono coinvolte nel mediare il danno tissutale. I meccanismi di insulto tissutale che danneggiano la superficie della placca non sono noti in dettaglio, ma sembrerebbe che il rilascio di metalloproteinasi digestive costituisca un pathway primario. Oltre la secrezione locale di metalloproteinasi, il sistema immunitario è dotato di vie che conducono alla distruzione di cellule e matrice che involontariamente possono condurre al danno tissutale. I linfociti T e i macrofagi sono componenti fondamentali della placca vulnerabile. È stato dimostrato che i linfociti T che infiltrano la placca includono un subset di cellule T CD4 funzionalmente distinto che manca dell'espressione di CD 28. I clonotipi CD4⁺CD28^{null} possono essere isolati dalle lesioni “incriminate” e non dalla placca stabile. Queste cellule T sono in grado di rilasciare grandi quantità di IFN- γ e costituiscono la popolazione dominante di cellule che producono IFN- γ nel sangue periferico di pazienti con angina instabile [35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42]. Le cellule T CD4⁺CD28^{null} potrebbero essere coinvolte nella rottura della placca attraverso il rilascio di IFN- γ , controllando pertanto i macrofagi che infiltrano la placca, ma sono distinte dalle cellule T helper classiche in diversi aspetti aggiuntivi. Le cellule CD4⁺CD28^{null} non possono formare il complesso di iniziazione trascrizionale che controlla l'espressione della molecola costimolatoria CD28; hanno comunque acquisito l'espressione di altre famiglie di recettori, inclusi i KIR. Nakajima e collaboratori hanno mostrato che le cellule CD4⁺CD28^{null} dei pazienti con angina instabile

hanno funzioni di cellule killer e possono causare la morte di cellule target attraverso il rilascio di perforine. Per identificare i geni specificatamente attivati nelle cellule $CD4^+CD28^{null}$ gli autori hanno confrontato il profilo genetico dei cloni di cellule $CD28^+$ e delle cellule T $CD28^{null}$. $CD161$, perforina, e KIR erano differentemente espressi nelle varianti $CD28$ negative.

I pazienti con instabilità di placca hanno una significativa popolazione di cellule T $CD4$ con la capacità di danneggiare direttamente le cellule target. Gli autori hanno mostrato che le cellule $CD4$ che si accumulano nella placca instabile sono dotate di un macchinario citolitico, e in risposta allo stimolo dei loro recettori antigenici o di KIRs espressi in modo aberrante, uccidono le cellule endoteliali. Il danno della membrana cellulare mediato dalle perforine rappresenta un meccanismo critico nell'insulto tissutale che porta alla rottura di placca. Le cellule che esprimono la perforina (circa il 30% di tutte le cellule $CD4$ dei pazienti con angina instabile) o hanno completamente perso la molecola $CD28$ o la sua espressione in superficie risultava ridotta di circa 10 volte.

La frequenza delle cellule T $CD4^+CD28^{null}$ nel sangue periferico sembra costituire un marcatore biologico per instabilità di placca. Gli autori hanno identificato diverse caratteristiche delle cellule T $CD4^+CD28^{null}$ che supportano marcatamente il loro diretto coinvolgimento nell'instabilità di placca. Esse rilasciano $IFN-\gamma$ e la loro presenza nel sangue si correla con

l'attivazione indotta dal IFN- γ dei monociti circolanti. Granuli di perforina non sono ristretti alle cellule T CD4⁺CD28^{null} ma sono anche tipici delle cellule CD4 che presentano un'espressione ridotta di CD28 in superficie.

Le cellule CD4⁺CD28^{low} perforin⁺ erano presenti nei pazienti con angina stabile. I test funzionali hanno comunque documentato che queste cellule T mancano della capacità citolitica. Una possibile spiegazione è che i loro livelli di perforina sono troppo bassi per ottenere un'efficace distruzione della membrana target. È anche possibile che le cellule T killer CD4⁺CD28^{null} e le cellule T non killer CD4⁺CD28^{low} possiedano differenze aggiuntive. Il riconoscimento dell'antigene può non essere sufficiente a mobilitare il macchinario citolitico ma ci sono segnali additivi ricevuti dalla cellula citotossica. Gli autori hanno descritto che le cellule T CD4⁺CD28^{null} esprimono in modo aberrante i KIR usualmente espressi sulle cellule NK [43, 44]. I KIR riconoscendo siti polimorfici sulle molecole MHC I classe distinguono le cellule sane dalle cellule trasformate o infette. Infatti, l'innescò del recettore stimolatorio KIR2DS2 sulle cellule T CD4⁺CD28^{null} dei pazienti con angina instabile induceva un'attività citotossica potendo perfino superare la richiesta dello stimolo antigenico da parte dei recettori TCR.

Le cellule non citolitiche CD4⁺CD28^{low}perforin⁺ erano presenti nei pazienti con angina instabile e sono state trovate anche nei soggetti con angina stabile. Da qui sorge la questione se l'angina stabile e instabile condividono

alcune anomalie immunologiche, fattori addizionali comunque accelerano la progressione nei pazienti con angina instabile. La notevole correlazione tra la capacità citolitica e l'instabilità di placca supporta il concetto di un contributo diretto della citotossicità alla rottura di placca. Questi dati suggeriscono l'esistenza di una gerarchia di anomalie immunologiche, con una soglia raggiunta in pazienti che sviluppano lesioni su placca e aterotrombosi. Alcuni eventi possono quindi accelerare la comparsa e l'attivazione delle cellule T $CD4^+CD28^{\text{null}}$ causando eventualmente un'instabilità di placca. Ricerche future si focalizzeranno sulla caratterizzazione di segnali che suscitano la citotossicità delle cellule T. Gli antigeni rilevanti per malattie, probabilmente derivati dai microrganismi potrebbero essere presentati sulla superficie delle cellule endoteliali, avviando il macchinario citolitico delle cellule T con i corrispondenti recettori antigenici. In alternativa le cellule T $CD4^+CD28^{\text{null}}$ hanno acquisito un meccanismo di attivazione antigene indipendente. La stimolazione dei recettori KIR da parte delle appropriate molecole sulla cellula endoteliale potrebbe innescare la citotossicità in vivo perfino in assenza di antigene. Gli autori hanno proposto che l'insulto alla cellula endoteliale mediato dalle cellule T costituisce un nuovo pathway di danno tissutale che contribuisce a destabilizzare la placca. L'effetto sensibilizzante della proteina C reattiva suggeriva la presenza di una sinergia tra una

disregolazione della funzione delle cellule T e le proteine di fase acuta nelle sindromi coronariche acute [35].

Normalmente sia le cellule $CD4^+CD28^+$ e le cellule $CD8^+CD28^{\text{null}}$ sono presenti nel sangue periferico, ma le cellule $CD4^+CD28^-$ sono presenti meno frequentemente della loro controparte $CD28^+$. Nei soggetti sani di età superiore ai 65 anni le cellule $CD4^+CD28^-$ raggiungono fino al 50% del totale dei linfociti $CD4^+$, mentre i soggetti sani giovani hanno poche cellule $CD4^+CD28^-$ rappresentando circa dallo 0.1 allo 2,5% di tutte le cellule $CD4^+$. Il significativo aumento delle cellule $CD4^+CD28^-$ con l'età indica un coinvolgimento del sistema immunitario nell'invecchiamento e rappresenta il CD28 come un marker dell'invecchiamento delle cellule T. [45] La presenza delle cellule $CD4^+CD28^-$ è stata proposta come biomarker non solo per il normale invecchiamento ma anche per il precoce invecchiamento del sistema immunitario in condizioni patologiche. Le caratteristiche di queste cellule possono comunque variare dipendentemente dalla malattia sottostante, attività di malattia, trattamenti concomitanti e non sono state riportate alla stessa maniera in tutte le malattie menzionate. È interessante notare che le cellule $CD4^+CD28^-$ mostrano una limitata diversità TCR nel sangue periferico e costituiscono popolazioni oligoclonali, verosimilmente come risultato di un'esposizione ripetuta allo stesso antigene [46, 47]. La permanente attivazione risultante in oligoclonalità potrebbe essere determinata sia da antigeni endogeni che esogeni inclusi antigeni virali

espressi durante infezioni virali croniche. Uno dei virus analizzati in questi contesti, il CMV, è ancora discusso come candidato per la stimolazione continua del sistema immunitario. Un argomento valido sul coinvolgimento di CMV è il dato che le cellule $CD4^+CD28^-$ rispondono 30 volte di più al CMV rispetto alla loro controparte $CD28^+$. La stimolazione e la produzione di citochine da parte delle cellule $CD4^+CD28^-$ sono indotte dalla stimolazione da parte di CMV ma non dalla stimolazione da parte di altri antigeni come tetano tossina o VZV [48, 49].

È stato inoltre messo in evidenza che più del 50% di cellule $CD4^+CD28^-$ in coltura di pazienti affetti da sindrome coronarica acuta riconoscono la proteina heat shock umana di 60kD, una proteina chaperone intracellulare ubiquitariamente espressa. Comunque la proteina hHSP 60 potrebbe essere solo riconosciuta dalle cellule $CD4^+CD28^-$ di pazienti con malattia coronarica durante la fase acuta e non da pazienti con angina stabile cronica durante la fase stabile o in individui sani. Le proteine heat shock protein possono essere espresse da tutte le cellule in specifiche condizioni di stress, incluse ipertermia, un ambiente infiammatorio o stress ossidativo. L'individuazione di cellule HSP reattive suggerisce che queste proteine rappresentano antigeni self che innescano pathways immunoregolatori nelle malattie infiammatorie. La produzione di $IFN-\gamma$ e di perforina dopo l'attivazione delle cellule $CD4^+CD28^-$ con hHSP 60 conferma la sua caratteristica stimolatoria e indica, specialmente per la sua espressione

ubiquitaria che hHSP60 è un fattore responsabile per la attivazione permanente T cellulare portando all'oligoclonalità nella sindrome coronarica acuta [50, 51]. L'interazione hHSP60-TCR da sola non può indurre il fenotipo citotossico di queste cellule T speciali in contrasto all'interazione con KIR2DS2 suggerendo un'attivazione T cellulare attraverso i recettori NK. Attualmente ci sono solo dati disponibili riguardo il ruolo di hHSP 60 nell'attivazione delle cellule CD4⁺CD28⁻ nei pazienti con sindrome coronarica acuta. Sarebbe interessante se questa interazione hHSP60-KIR2DS2 si osservi anche in altre malattie con KIR2DS2 che esprimono le cellule CD4⁺CD28⁻ [52]. Oltre la mancanza di espressione di CD28 queste cellule T CD4⁺ proinfiammatorie mostrano fenotipi più caratteristici rispetto alla controparte CD28⁺, almeno parzialmente con il potenziale di una costimolazione alternativa delle cellule CD28. Per esempio l'espressione di CD7 e CD40L è ridotta e il recettore CX3CR1, i recettori NK NKG2D, CD11b, CD57, KIR2DS2, CD161, TLR2 e TLR4 maggiormente rappresentati sulle cellule T CD4⁺CD28⁻ [34]. Le cellule CD4⁺CD28⁻ esprimono recettori delle cellule NK come CD11b, CD57, ma mancano della loro molecola specifica CD16. Un sottotipo della famiglia di recettori KIR, KIR2DS2, è stata individuato sulla superficie delle cellule CD4⁺CD28⁻ dei pazienti con artrite reumatoide e sindrome coronarica acuta. È stato confermato che questo recettore ha funzioni attive di costimolazione ed è considerato essere un fattore di rischio per lo sviluppo

di vasculite ma non di sinovite. È stato ipotizzato che i recettori KIR2DS2 espressi sulle cellule $CD4^+CD28^-$ riconoscono le molecole HLA-C e la proteina hHSP 60 sulle molecole MHC di prima classe inducendo l'espressione di perforine. Inoltre è stato riportato che l'espressione citochinica di IFN- γ era indipendente dal KIR2DS2 indicando distinti percorsi per le funzioni proinfiammatorie e citotossiche. [53, 54]

Nakajima e collaboratori hanno studiato la regolazione della funzione citolitica di queste cellule $CD4^+CD28^+$ nella sindrome coronarica acuta. Quest'ultima include l'angina instabile, la morte cardiaca improvvisa, l'infarto del miocardio, che rappresentano complicanze improvvise dell'aterosclerosi coronarica. Lo sviluppo di un difetto tissutale sulla superficie dell'ateroma che porta ad una trombosi sovrapposta e improvvisa occlusione di un'arteria, precipita questi eventi acuti. La rottura della placca è multifattoriale. Gli studi istologici hanno confermato che le cellule T attivate e i macrofagi spesso si accumulano a livello della “spalla” (shoulder) della placca, il punto di minore resistenza nella lesione. I mediatori derivati dai macrofagi sono stati implicati nella rottura della capsula fibrosa, e le cellule T che infiltrano la capsula contribuiscono potenzialmente al danno tissutale [55]. I pazienti con ACS possono essere distinti dai controlli sani di pari età e dai pazienti con angina stabile dall'aumentata frequenza delle cellule $CD4^+CD28^{null}$ che presentano un'espansione oligoclonale nel sangue periferico e che hanno perso

l'espressione della molecola costimolatoria CD28. Vi sono dati limitati sulla relazione tra le cellule T infiltranti la placca e le cellule T CD4⁺ CD28^{null}. Dall'analisi fenotipica e della sequenza dei recettori delle cellule T emerge che queste cellule si accumulano nelle lesioni instabili e non in quelle stabili [56]. Oltre la capacità di rilasciare grandi quantità di IFN- γ , le cellule CD4⁺CD28^{null} esprimono perforina e granzyme B, con l'innescamento del recettore delle cellule T, esse lisano le cellule target, incluse le cellule endoteliali. È possibile pertanto che queste cellule direttamente contribuiscono all'instabilità di placca. Le cellule T CD4⁺ CD28^{null} esprimono in modo variabile i recettori della famiglia KIR. Gli autori hanno riportato che le cellule T CD4⁺ dei pazienti con ACS esprimono multipli KIR inibitori e attivanti mentre la trascrizione dei geni KIR non è frequente nelle cellule T CD4⁺ CD28^{null} dei soggetti sani. Appare invece rilevante che le cellule T CD4⁺ CD28^{null} dei soggetti con ACS frequentemente coesprimono KIR attivanti con la molecola DAP12. Anche DAP12 è codificato nel complesso LCR, suggerendo un ruolo unico di questo complesso genico nelle cellule T CD4⁺CD28^{null}. Le cellule T CD4⁺ che coesprimono KIR2DS2 e DAP12 accedono a pathways di attivazione cellulare e aggirano la necessità di segnale tramite recettore T cellulare. Questo studio riporta che le cellule T CD4⁺ nei pazienti con ACS si caratterizzano per profondi cambiamenti nell'espressione genica e funzione. In particolare avviano un programma di espressione successiva

de novo di geni codificati in LCR sul cromosoma 19, l'acquisizione di KIR2DS2 e della sua proteina di segnale DAP12 dota le cellule CD4⁺ di capacità citolitica. Le cellule CD158j⁺DAP12⁺CD4⁺ T sono state esclusivamente trovate in pazienti con ACS sottolineando l'associazione tra queste cellule specializzate e l'instabilità di placca. Dati preliminari sulle linee cellulari T su campioni tissutali estratti durante angioplastica indicano che le cellule DAP12⁺CD4⁺ si accumulano nelle lesioni instabili. L'attivazione di CD158j oltrepassa la necessità di segnale attraverso recettore cellulare T per intraprendere la lisi delle cellule tumorali. Gli autori suggeriscono che l'espressione aberrante dei geni codificati in LCR sulle cellule T CD4⁺ può rompere la tolleranza immunologica, un meccanismo che possibilmente contribuisce al danno mediato dalle cellule T della placca aterosclerotica. Diversi meccanismi sono stati proposti come responsabili e partecipanti alla rottura di placca, inclusi shear stress, danno della capsula, collasso di lesione stenotica, danno dei vasa vasorum, distruzione enzimatica mediata dai macrofagi. La visione prevalente supporta i macrofagi come cellula effettrice ultima nel processo di assottigliamento della capsula e erosione. Questo modello è supportato da evidenze istologiche di placche prossime alla rottura con cellule T e macrofagi nelle lesioni ad alto rischio. È nota la produzione di metalloproteinasi nel contesto della placca ma non è chiaro quali segnali inneschino le attività di distruzione tissutale dei macrofagi infiltranti la

placca. Un ruolo delle cellule T è suggerito dall'osservazione di aumentate frequenze di cellule T $CD4^+CD28^{null}$ nei pazienti con ACS. Questo studio dimostra che nelle ACS tali cellule non richiedono l'attivazione del segnale attraverso il TCR ma presentano mezzi alternativi di stimolo. Attraverso l'acquisizione di KIRs stimolatori e della molecola adattatrice DAP12, le cellule $CD4^+CD28^{null}$ perdono la loro dipendenza dall'antigene esogeno e acquisiscono la reattività a segnali endogeni nel loro microambiente; l'espressione aberrante di KIRs attivanti pone ovviamente una minaccia alla tolleranza del self. Questa famiglia di recettori riconosce molecole in assenza di antigeni esterni non self, e pertanto può rispondere a classiche strutture self. La frequenza dei cloni cellulari T $CD4^+$ che esprimono $CD158j$ era marcatamente alta in ACS, ma i cloni spesso coesprimono i recettori inibitori KIR2DL2 ($CD158b1$ e $CD158b2$). Nelle cellule NK, l'espressione combinata di $CD158j$ con le varianti inibitorie non è infrequente. Il significato biologico di questa coespressione è in atto poco chiaro ma dati recenti suggeriscono che il modello di segnali inibitori che controbilanciano quelli stimolatori è troppo semplificato. I KIR attivatori e inibitori possono legare ligandi distinti. A supporto di questa ipotesi i geni di suscettibilità al citomegalovirus murino sono stati mappati sulla regione Ly49, un cluster genico funzionalmente simile ai KIRs. La molecola attivante Ly49H ma non l'omologo inibitorio, riconosce una molecola simile all'MHC codificata dal CMV. Inoltre, i KIR inibitori sulle cellule T

CD4⁺ non sempre sopprimono l'attivazione T cellulare da parte dei KIR stimolatori. In questo studio è stato messo in evidenza preliminarmente che la coattivazione di CD158b2 inibitorio e CD158j stimolatorio sulle cellule CD4⁺CD28^{null} induceva ancora attività citotossica.

L'espressione de novo di KIRs sulle cellule T CD4⁺ è stata descritta per la prima volta nei pazienti con artrite reumatoide in cui le cellule CD4⁺CD28^{null} contribuiscono all'infiltrato infiammatorio sinoviale. Le cellule KIR⁺CD4⁺ nell'artrite reumatoide e nella sindrome coronarica acuta hanno simili caratteristiche fenotipiche e funzionali, ma non sono identiche; nell'artrite reumatoide le cellule CD158j⁺ CD4⁺ non mostrano citotossicità dopo la stimolazione CD158j e in linea con i dati presentati nel lavoro di Nakajima mancano dell'espressione del gene DAP12. La molecola CD158j rimane funzionalmente attiva ma invece di indurre la degranolazione dei granuli citolitici, CD158j attraverso un legame costimola il segnale del recettore T cellulare e amplifica la produzione di IFN- γ . Nelle cellule DAP12⁻ CD4⁺, CD158j utilizza pathways di segnale che selettivamente si indirizzano al pathway JNK ma non può conferire indipendenza dalla stimolazione del recettore T. Nella sindrome coronarica acuta, le cellule CD4⁺CD28^{null} non solo esprimono i KIRs ma trascrivono anche DAP12, rendendole completamente indipendenti dalla stimolazione del recettore T. L'espressione di CD158j e DAP12 non sono correlate nei cloni individuali T cellulari, suggerendo che ogni gene è indipendentemente regolato.

Comunque entrambi sono codificate nel LCR, aumentando la possibilità di una regione genica specifica di attivazione nelle cellule $CD4^+CD28^{\text{null}}$. [57, 58]. Se questi dati venissero confermati, i fenotipi funzionali delle cellule $CD4^+CD28^{\text{null}}$ negli individui sani, pazienti con SCA, e pazienti con artrite reumatoide potrebbero rappresentare stadi diversi in un programma di differenziazione, variando dall'espressione occasionale dei KIR negli individui sani, espressione frequente dei KIR nei soggetti con artrite reumatoide, e coespressione DAP12/KIR in SCA. L'espansione delle cellule $CD4^+CD28^{\text{null}}$ nell'artrite reumatoide è stata attribuita ad un invecchiamento prematuro del sistema immunitario. Non è chiaro se l'omeostasi delle cellule T risulti anche alterata nei pazienti con SCA come si è visto nell'artrite reumatoide. I dati epidemiologici suggeriscono che gli eventi coronarici acuti sono preceduti da una decade di aumentata attività del sistema immunitario innato [59, 60]. Poiché l'attivazione dei sistemi immunitari innato e adattivo vanno di pari passo, ci si aspetta che i pazienti con SCA presentino anche una stimolazione cronica delle cellule T. Gli autori suggeriscono che i pazienti con SCA accumulano cellule T differenziate che sono andate incontro a profondi cambiamenti nell'espressione genica e nella funzione. La frequenza di queste cellule sembra essere indipendente da altri fattori di rischio per coronaropatia ma possono essere correlati all'attivazione del sistema immunitario innato come indicato dagli elevati livelli di proteina C reattiva. Una delle

caratteristiche di queste cellule è l'induzione di recettori che riconoscono l'MHC di I classe, come CD158j che sono funzionanti in presenza dell'appropriata molecola di trasduzione del segnale, DAP12. Il ligando naturale di CD158j nella placca aterosclerotica rimane da determinare. I potenziali candidati includono MHC I classe sulle cellule stressate o danneggiate che devono essere rimosse così come patterns molecolari che derivano da agenti infettivi [55].

Altre associazioni KIR/HLA con distinte manifestazioni cliniche di artrite reumatoide includono il genotipo $KIR2DL3^+/2DS3^-$, presente in soggetti che sono stati diagnosticati precocemente, e $KIR2DS1$ e $KIR3DS1$, maggiormente espressi in pazienti con erosioni ossee; $KIR2DL2/2DS2$ risultano significativamente aumentati in pazienti con manifestazioni extraarticolari, inclusi la vasculite come precedentemente riportato.

$KIR2DS2$ in assenza di $KIR2DL2$ è stato dimostrato anche essere aumentato tra i soggetti con sclerodermia. Gli aplotipi B attivatori di KIR e $KIR2DS1$ singolarmente o in combinazione con HLA-Cw6 (un ligando C2 per $KIR2DS1$) sono stati riportati associati con la psoriasi. Nelson e collaboratori hanno proposto un modello in cui un gradiente formato da combinazioni genotipiche più attivanti a interazioni più inibenti i KIR2D e HLA-C appare influenzare la suscettibilità all'artrite psoriasica. I genotipi che conferiscono la più rilevante attivazione ($KIR2DS1$ e/o $KIR2DS2$ con omozigosi per HLA-C1 o C2) associati con una più rilevante suscettibilità

mentre i genotipi che conferiscono la massima inibizione (assenza di recettori attivanti KIR2DS1 e KIR2DS2 e presenza di entrambi i ligandi inibitori HLA C1 e C2) risultano protettivi [2, 61].

I profili genetici dei KIR attivanti sono stati anche associati con altre condizioni infiammatorie come l'endometriosi, corioretinopatia Birdshot, bronchiectasie idiopatiche, colangite sclerosante primitiva, diabete mellito tipo 1. Sicuramente la lista continuerà a crescere, con le più affidabili conclusioni basate su precisi dati clinici e campioni numerosi. Come in tutti gli studi epidemiologici genetici, l'evidenza funzionale per l'interazione tra i KIR con catena corta e il presunto ligando è necessario per supportare i vari modelli genetici di predisposizione alle condizioni autoimmuni.

In generale i genotipi che teoricamente conducono ad un minor grado di inibizione e ad una maggior attivazione appaiono avere effetti benefici nelle infezioni virali come HIV, HCV, mentre i genotipi attivanti costituiscono un rischio per la suscettibilità all'autoimmunità e forse ai tumori che hanno una componente infiammatoria nella patogenesi della malattia [2].

Dati funzionali emergenti supportano un meccanismo basato su un continuum dall'inibizione all'attivazione attraverso varie combinazioni di genotipi HLA/KIR nelle malattie.

Gli aplotipi KIR sono stati studiati in associazione al Diabete Mellito tipo 1. Traherne e collaboratori hanno testato l'associazione degli aplotipi KIR con diabete tipo 1 in un campione di famiglie europee americane per le

quali era già noto il genotipo HLA. Poiché le molecole HLA di prima classe sono ligandi dei KIR si è indagato sul possibile ruolo dei KIR nella suscettibilità al diabete mellito tipo 1. I pazienti sono stati raggruppati in due gruppi: il primo comprendente i soggetti portatori di genotipo HLA ad alto rischio noto come DR3/4' (DRB1*03:01-DQB1*04:01/02/04/05/08-DQA1*03:01-DQB1*03:02/04 o 02:01) e il secondo quelli che esprimevano altri genotipi HLA non 3/4'. L'associazione positiva dell'aplotipo KIR A1 con il diabete tipo 1 è stata osservata nel gruppo non 3 /4' in cui il rischio attribuibile all'HLA di seconda classe era basso. Per testare l'ipotesi che KIR3DL1 si associava alla predisposizione al diabete tipo 1 osservato per la componente telomerica dell' aplotipo KIR A01 i dati sono stati stratificati in base alla presenza assenza di HLA-Bw4, ligando di KIR3DL1. Gli autori hanno mostrato che l'effetto predisponente dell'aplotipo tA01 era più evidente nel sottogruppo di soggetti diabetici tipo 1 che non erano portatori del genotipo HLA a più alto rischio DR3/DR4. Questo risultato era in linea con precedenti studi sui loci associati al rischio di diabete tipo 1 diversi dall'HLADR-e DQ, includenti TCF7, IL-4 R, PTPN22, dove l'effetto dell'allele a rischio era maggiore nei soggetti non DR 3/4 rispetto al gruppo DR 3/4.

Alcuni studi su modelli animali supportano questi dati: è stato infatti osservato che l'espressione del recettore inibitore KIR3DL1 predispone i

topi NOD al diabete attraverso una *downregulation* della funzione delle cellule T regolatorie [62].

Nonostante la mancanza di conclusioni definitive sull'effetto di KIR3DL1 sul diabete tipo 1, la combinazione delle evidenze ottenute da modelli genetici e animali giustifica ulteriori studi su questo locus. Una spiegazione alternativa dell'associazione dell'aplotipo A01 potrebbe correlarsi alla presenza del gene KIR2DS4v che codifica una forma solubile e potenzialmente secreta della proteina. Questo potrebbe essere biologicamente rilevante se antagonizza gli effetti di altri KIRs. Questi studi sugli aplotipi suggeriscono che i geni KIR hanno un ruolo sulla suscettibilità al diabete tipo 1. Questa ricerca è spinta dal presupposto che gli effetti degli aplotipi KIR possano essere simili a quelli dell'HLA di prima classe; l'effetto della diversità dei KIR sulla suscettibilità al DM di tipo 1 appare comunque modesta. Ciò non esclude la possibilità che loci o aplotipi KIR individuali possano avere un effetto sostanziale su un sottogruppo di pazienti. I dati emersi sottolineano il ruolo di KIR nel rischio di DM tipo 1 con insorgenza in età tardiva. Il fatto che l'aplotipo A2 sia più strettamente associato con un'età più avanzata di insorgenza rispetto all'aplotipo A1 suggerisce che il recettore di superficie KIR2DS4 possa avere un ruolo. I pazienti che hanno almeno una copia di KIR2DS4 appaiono ugualmente avere almeno un ligando per quel recettore (C01:02, *02:02, *04:01, *05:01, *14:02 o *16:0) nel gruppo ad insorgenza prima di

14 anni in confronto al gruppo con età di insorgenza dopo i 14 anni. È richiesto un più ampio set di dati per testare ogni ligando indipendentemente. I risultati di questo report supportano il concetto che gli aplotipi KIR A che contengono per la maggior parte geni KIR inibitori sono predisposti al diabete tipo 1 mentre gli aplotipi B KIR che contengono più loci per geni KIR attivatori sono protettivi.

I KIR attivatori potrebbero agire stimolando le cellule T regolatorie per il controllo della malattia o influenzando l'attività di killing NK delle cellule T effettrici. Dall'altro lato i KIR inibitori potrebbero limitare l'azione delle cellule T regolatorie DM tipo 1-specifiche o fallire nel controllo delle cellule T citotossiche, favorendo la progressione della malattia. In contrasto col diabete autoimmune dei bambini dove predominano gli HLA la genetica del diabete autoimmune degli adulti non è ben compresa, nonostante la sua prevalenza relativamente alta. I risultati di questo studio possono essere potenzialmente utili per meglio caratterizzare i pazienti in futuro e per provare l'influenza dei KIR sulle cellule NK/T e sulle cellule T regolatorie autoantigene specifiche. Considerata la complessità dei loci genetici HLA e KIR e l'estrema variabilità di entrambi tra le popolazioni, una comprensione accurata del ruolo dei geni KIR e degli aplotipi KIR nel diabete mellito tipo 1 richiederà un campione più vasto dove sottogruppi individuali sono abbastanza grandi da svelare risultati potenzialmente altamente significativi [62].

CELLULE CD28^{null}, RECETTORI KIR E PLACCA ATEROSCLEROTICA

L'infiltrato infiammatorio nella placca aterosclerotica è composto da cellule T e macrofagi. Le cellule CD4⁺CD28^{null} sono reclutate preferenzialmente nel contesto delle lesioni instabili.

Le ricerche sull'aterosclerosi hanno portato all'individuazione di alcuni patogeni come il CMV umano nello sviluppo e nella progressione dell'aterosclerosi. Il cytomegalovirus promuove in alcuni individui una rimodulazione marcata del compartimento delle cellule NK, che si caratterizza per una persistente espansione del subset delle cellule NK circolanti che esprimono il recettore NK CD94/NKG2C. Martinez-Rodriguez e collaboratori hanno valutato se la riconfigurazione del compartimento di cellule NK associato a CMV si correlava all'instabilità di placca.

Le placche aterosclerotiche delle arterie carotidi sono un importante predittore di ictus e malattia cardiovascolare.

Alcune placche aterosclerotiche sono stabili ed è inverosimile che producano sintomi, mentre in altri soggetti possono condurre all'aumentata incidenza di trombosi e stenosi, risultando così ad alto rischio. La definizione di biomarkers associati con placche aterosclerotiche carotidee potrebbe diventare utile per stabilire procedure terapeutiche prima dello

sviluppo di eventi clinici, identificando candidati per endoarteriectomia precoce. Le infezioni sono considerate un potenziale trigger dei meccanismi immuni che portano allo sviluppo e all'accelerazione di aterosclerosi e lo sviluppo di complicanze cerebrovascolari [63, 64].

Nessun patogeno singolo è inequivocabilmente identificato come causa diretta di aterosclerosi ma l'evidenza è stata ottenuta supportando che l'impatto globale delle infezioni pregresse e croniche possa contribuire al processo infiammatorio sulla placca aterosclerotica e aumentare il rischio di complicanze vascolari.

In questo contesto gli herpesvirus sembrano avere un effetto sostanziale sulla progressione dell'aterosclerosi e il rischio cardiovascolare. Tra questi virus, il CMV si ritiene essere coinvolto nello sviluppo dell'aterosclerosi come riportato in studi clinici epidemiologici e sperimentali ed è stato proposto contribuire alla progressione della placca carotidea e del grado di stenosi [65, 66].

Negli individui sani il CMV rimane latente, stabilendo un'infezione persistente e in alcuni casi eventualmente producendo riattivazioni subcliniche. Una frazione significativa del compartimento delle cellule CD8+ può essere diretta contro CMV, un fenomeno che è stato associato con l'immunosenescenza, portando in alcuni individui sani anziani a una riduzione del rapporto CD4+/CD8+. Inoltre, è stato descritto che CMV sembra promuovere una persistente espansione del sottogruppo di cellule

NK circolanti esprimenti elevati livelli di recettore CD94/NKG2C+lectin-like, individuabili in vario grado nei soggetti sani. Gli autori hanno ipotizzato che il contributo dell'infezione di CMV all'aterosclerosi possa dipendere dalle caratteristiche della relazione ospite patogeno non indicata dal semplice stato sierologico.

In questo studio la relazione tra CMV e la rimodulazione del compartimento delle cellule NK con l'instabilità di placca è stato studiato, riportando che un sottogruppo di pazienti ad alto rischio con aterosclerosi carotidea mostrava aumentati livelli di cellule NK NKG2C+ e cambiamenti correlati nel compartimento delle cellule CD8+ circolanti che erano associati con risultati biochimici e patologici suggestivi di infiammazione subclinica. Questi ricercatori hanno riportato che un sottogruppo di pazienti con positività per CMV con placche carotidee considerate ad alto rischio, in relazione al grado di stenosi e alla presenza di sintomi neurologici nei mesi precedenti, mostravano un notevole incremento delle cellule NK NKG2C+. In aggiunta alle caratteristiche immunologiche e patologiche osservate in questi pazienti, i dati suggeriscono che un incremento dell'espressione di NKG2C associata con l'infezione da CMV umano potrebbe assumere un valore potenziale predittivo delle placche ad alto rischio. Nonostante la più alta proporzione di cellule NK NKG2C+ fosse prevalentemente ritrovata in un subset di CAP (placche aterosclerotiche carotidee) ad alto rischio, questa caratteristica fenotipica è stata anche

osservata anche in alcuni paziente con ictus non aterosclerotico e in controlli sani, in accordo con precedenti lavori [67]. Questi risultati andrebbero interpretati nel contesto dell'attuale ipotesi sempre più supportata relativa alla partecipazione degli agenti infettivi nella patogenesi dell'aterosclerosi. Diversi lavori hanno suggerito che il carico infettivo contribuisce quale fattore di rischio indipendente alle lesioni vascolari, che risultano dall'impatto cumulativo proinfiammatorio sulla parete arteriosa di differenti infezioni croniche/ricorrenti. Tuttavia gli studi basati sull'outcome clinico dell'aterosclerosi possono non discriminare a quale grado l'insulto infettivo contribuisca allo sviluppo delle lesioni vascolari o promuova l'instabilità di placca, che poteva essere stata innescata anche da altri fattori di rischio. In questo contesto, HCMV è un sospetto frequente, e diversi meccanismi ipotetici sono stati proposti per spiegare il suo contributo alla patogenesi dell'aterosclerosi, per esempio induzione di danno endoteliale, la presenza latente su monociti infetti, infezione diretta di differenti tipi di cellule sulla parete del vaso e innesco di risposte antivirali immunitarie. Presumibilmente l'impatto di HCMV sullo sviluppo dell'aterosclerosi può essere particolarmente rilevante quando l'infezione latente non è sufficientemente controllata, come osservato nei pazienti immunodepressi. A tal riguardo, le cellule NK sono coinvolte nella difesa immunitaria contro HCMV insieme ai linfociti T. Il recettore NK inibitorio, CD94/NKG2C, specifico per l'HLA-E, contribuisce a controllare

l'espressione HLA-I insieme con i KIR; in contrasto, la funzione biologica del recettore NK attivatorio, che riconosce anche HLA-E, rimane poco chiara. Sorprendentemente, una persistente espansione delle cellule NK NKG2C⁺ è stata riportata in individui sani CMV⁺, nei soggetti immunodepressi sottoposti a trapianto renale, e nel trapianto di cellule emopoietiche dopo riattivazione di HCMV [68, 69, 70, 45].

Un aumentato numero di cellule NK NKG2C⁺ è stato riscontrato nel corso di altre infezioni (HIV, HCV, HBV) che sono state sistematicamente associate con la coinfezione da CMV. Da questo studio non è possibile accertare se i cambiamenti immunofenotipici associati alle placche carotidee ad alto rischio, precedano lo sviluppo di un episodio acuto. Questi risultati non supportano comunque i cambiamenti nell'espressione NKG2C correlata alla fase acuta dell'ictus. L'aumentata percentuale di cellule NKG2C e la corrispondente riduzione di cellule NKG2A⁺, riscontrato nel gruppo di pazienti con CAP ad alto rischio, era in linea con la riconfigurazione CMV mediata del compartimento delle cellule NK, che inoltre sembrava essere associata con parametri di infiammazione sistemica ed intraplaacca. Al riguardo, i più alti livelli di hs-PCR, un marcatore correlato all'infiammazione sistemica, rischio cardiovascolare, carico infettivo, sono stati rilevati nei pazienti con CAP ad alto rischio mostrando aumentati livelli di cellule NK NKG2C⁺. Le lesioni aterosclerotiche con una maggiore infiltrazione intraplaacca di cellule T corrispondevano ai casi

con più bassa percentuale di cellule NK NKG2A+ e più alta di cellule periferiche CD8+. I pazienti con aumentata proporzione di cellule NKG2C+ presentavano anche una maggiore infiltrazione di cellule T benchè questo risultato non raggiunga una significatività statistica, possibilmente a causa del limitato campione.

Un ruolo diretto delle cellule NKG2C+ nell'instabilità di placca può essere escluso dato che le cellule NK erano poco rappresentate nell'infiltrato, come riportato da precedenti lavori [71].

Al contrario quei pazienti con CAP ad alto rischio mostravano più alti livelli di cellule CD8+ correlata all'espressione NKG2C da parte delle cellule NK e la presenza di CD3+ nel contesto della placca, suggerendo che i linfociti T potevano essere coinvolti nell'instabilità di placca [45].

Lo studio della specificità antigenica delle cellule T nelle placche carotidee dei pazienti che mostrano alti livelli di cellule circolanti NKG2C+ sarebbe necessario per stabilire formalmente un legame con infezione CMV+. In conclusione questo studio di Martinez-Rodriguez riporta che i cambiamenti correlati all'infezione da CMV nel compartimento delle cellule NK in pazienti con CAP (placche aterosclerotiche carotidee) ad alto rischio sembrano essere correlati all'incremento delle cellule CD8 circolanti e all'infiammazione subclinica sistemica e locale intrapacca. L'espansione delle cellule NKG2C in pazienti con CAP può essere associato con aumentato rischio di destabilizzazione della placca in alcuni pazienti con

infezione cronica da CMV. Ulteriori studi sono richiesti per stabilire se questi risultati possono essere utili per l'identificazione di pazienti con placche aterosclerotiche vulnerabili [45].

***Frequenza periferica delle cellule CD28^{null} e
tipizzazione degli aplotipi KIR e degli alleli HLA in
soggetti con ictus ischemico acuto***

BACKGROUND DELLO STUDIO

Numerose e controverse sono le ipotesi formulate nel tentativo di identificare i meccanismi responsabili di comparsa e progressione della malattia aterosclerotica.

Molte delle manifestazioni acute della aterosclerosi come l'angina pectoris, la morte cardiaca improvvisa, l'infarto del miocardio, l'ictus ischemico su base aterotrombotica rappresentano complicazioni della aterosclerosi a livello delle possibili sedi vascolari interessate (arterie coronarie, arterie epicraniche ed intracerebrali [73]).

Lo sviluppo di un difetto tessutale sulla superficie dell'ateroma è un evento che conduce alla formazione di una trombosi ed alla improvvisa occlusione della arterie interessate e quindi all'evento acuto. La rottura della placca aterosclerotica è un processo multifattoriale [73-75].

Studi istologici hanno confermato la presenza di cellule T attivate spesso accumulate nella regione superficiale della placca, il punto di minore

resistenza della lesione [74].

Anche nelle manifestazioni cerebrovascolari dell'aterosclerosi come l'ictus ischemico il ruolo della infiammazione sembra rilevante. Numerosi studi hanno riportato come nell'ictus ischemico acuto vi sia una attivazione della microglia, una attivazione endoteliale, ripartizione del sangue attraverso la barriera cerebrale ed il reclutamento dei leucociti nel sito di lesione anche se ancora poco studiata è la caratterizzazione a livello periferico di quelle cellule effettrici infiammatorie che a livello cerebrale sono ritenute mediare il danno neuronale su base ischemica.

Le cellule Natural killer (NK) e le sottopopolazioni di linfociti T (CD8+ memory phenotype) o T-cell-receptors $\gamma\delta$ esprimono recettori inibitori e attivatori detti KIR.

Le cellule T CD4+CD28null sono funzionalmente distinte dalle classiche cellule CD4 T helper. Le cellule T CD4+CD28null accanto alla loro funzione di rilascio di grandi quantità di IFN- γ esprimono anche perforine e granzime B. Nella stimolazione del recettore delle cellule T esse lisano le cellule target, incluse le cellule endoteliali. È inoltre possibile che queste cellule T possano direttamente contribuire ai meccanismi di instabilità di placca. Le cellule T CD4+CD28null esprimono in maniera variabile recettori della famiglia KIR, che appartengono ad una famiglia multigenica costituita da 13 geni codificati all'interno del cosiddetto "Leukocyte

receptor complex (LRC)” sul cromosoma 19q13 e vengono espresse sulle cellule NK e infrequentemente sulle cellule CD8 [1, 8-10].

Il modello al momento più accettato per l’attivazione delle cellule NK prevede che la reattività di queste cellule sia controllata dal bilancio tra segnali inibitori e attivatori. Pertanto l’attivazione delle cellule LK deriverebbe dalla riduzione di segnali inibitori o dall’aumento di legami di ligandi ai recettori attivatori.

Nakajima et al ha riportato come le cellule T CD4+ dal sangue periferico di pazienti con sindrome coronarica acuta esprimano recettori KIR sia di tipo inibitorio che di tipo stimolatorio mentre la trascrizione dei geni KIR risulta infrequente nelle cellule T CD4+CD28null ottenute da soggetti sani di controllo [76]. Lo stesso gruppo ha mostrato inoltre come le cellule T CD4+CD28null coesprimano recettori KIR stimolatori con la molecola adattatore DAP12 che viene codificata nel locus LRC, suggerendo un unico ruolo per questo complesso genico a livello delle cellule T CD4+CD28null [77].

Alcuni studi hanno indicato come i pazienti con sindrome coronarica acuta (ACS) [73-75] possano venire distinti dai soggetti di controllo sani e dai pazienti con angina stabile in relazione alla incrementata frequenza di subset di CD4+ espansi su base oligoclonale nel sangue periferico e che abbiano perso la espressione della molecola costimolatoria CD28. È stata inoltre riportata nei soggetti con sindrome coronarica acuta un’espressione

preferenziale dei recettori attivanti KIR2DS2 ed una pressochè assenza dei loro omologhi inibitori KIR2DL2 e KIR2DL3 [76, 77].

Uno studio condotto dal nostro gruppo ha mostrato un incremento della frequenza periferica delle cellule CD28null nei soggetti con ictus ischemico ed una significativa relazione tra l'incremento della frequenza periferica delle cellule CD28 null ed il sottotipo cardioembolico dell'ictus ischemico [81].

OBIETTIVI DELLO STUDIO

Nessuno studio ha invece finora valutato il ruolo delle cellule dei recettori KIR e dei loro aplotipi nelle complicanze cerebrali della aterosclerosi.

Per tale motivo abbiamo disegnato uno studio con i seguenti obiettivi:

- *Analisi della frequenza dei diversi aplotipi dei recettori KIR (Killer Immunoglobulin-like Receptors);*
- *Analisi della frequenza degli alleli HLA (Human Leukocyte Antigen) nei soggetti con ictus ischemico acuto;*
- *Analisi delle relazioni tra frequenza periferica delle cellule CD28null e gli aplotipi KIR nei soggetti con ictus ischemico acuto;*
- *Analisi della relazione tra sottotipo di ictus ischemico secondo la classificazione TOAST e gli aplotipi KIR;*

- *Analisi della relazione tra sottotipo di ictus ischemico secondo la classificazione TOAST e gli alleli HLA;*

MATERIALI E METODI

Sono stati arruolati soggetti consecutivi ricoverati con una diagnosi di ictus ischemico acuto presso i centri di arruolamento (*U. O. C. Medicina Interna con Stroke Care del Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica dell'AOUP "P. Giaccone di Palermo, U.O. MCAU Giuseppe Giglio di Cefalù*) nel periodo compreso tra gennaio 2013 e aprile 2016.

Per tutti i pazienti arruolati è stata eseguita una valutazione anamnestica generale e neurologica, la routine ematochimica ed una valutazione strumentale (*ECG, ECG-holter delle 24 h, ecocardiografia mono- e bi-dimensionale transtoracica ed in casi selezionati transesofagea, ecocolorDoppler TSA, TC-encefalo in condizioni di base e TC encefalo di controllo dopo 48-72 h e/o RMN encefalo*).

Allo scopo di confrontare i pazienti con ictus ischemico acuto ed i soggetti di controllo anche in relazione al rischio cardiovascolare e alla pregressa morbilità cardiovascolare, i controlli arruolati sono stati inclusi se portatori di fattori di rischio vascolare o di una anamnesi positiva per infarto miocardico, malattia cerebrovascolare o vasculopatia periferica, ma esclusi se affetti da malattia cerebrovascolare in atto o recente (fino a sei

mesi) o da uno dei seguenti criteri di esclusione: *malattie reumatologiche, malattie infiammatorie croniche, infezioni sistemiche acute, recente trombosi venosa profonda (<1 mese), infarto del miocardio recente (<3 mesi), ictus ischemico recente (meno di tre mesi), ictus emorragico recente (< 1 mese).*

I fattori di rischio cardiovascolari sono stati analizzati sia per i casi che per i controlli sulla base dei criteri di seguito esposti.

L'ictus è stato definito come un quadro clinico caratterizzato dalla presenza di segni o sintomi neurologici focali ritenuti di origine vascolare che persistevano per >24 ore confermati da TC cerebrale e/o RM in basale e TC cerebrale eseguita con mezzo di contrasto dopo 48-72 ore.

L'ipercolesterolemia è stata definita come la presenza di livelli di colesterolo sierico totale ≥ 200 mg/dL.

L'ipertensione arteriosa è stata considerata presente se precedentemente diagnosticata ai soggetti in accordo con le linee guida della ESH/ESC 2003 e se questi erano abitualmente trattati con terapia antipertensiva.

I pazienti sono stati definiti come diabetici di tipo 2 se con diabete noto trattato con la dieta, farmaci ipoglicemizzanti orali o insulina prima dell'ictus.

La presenza di una pregressa coronaropatia è stata determinata sulla base di una anamnesi positiva per angina diagnosticata clinicamente, infarto del miocardio, o qualche pregressa procedura di rivascularizzazione rilevata

tramite questionario.

L'anamnestica presenza di malattia cerebrovascolare (TIA/ictus ischemico) è stata valutata tramite l'analisi della storia clinica, da esami neurologici specifici eseguiti da uno specialista e da documentazione ospedaliera o radiologica (TC o RM cerebrale) relativa a pregressi eventi ischemici cerebrali.

I soggetti sono stati classificati come affetti da pregressa arteriopatia periferica (PAD) quando presenti a livello anamnestico un ABI < 0.9 e/o una claudicatio intermittens o una ischemia critica degli arti inferiori o un intervento di bypass arterioso periferico o un intervento di amputazione. Il protocollo dello studio è stato approvato dalla commissione etica locale, e tutti i partecipanti hanno fornito il loro consenso informato.

Il protocollo dello studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'AOUP "P. Giaccone" e dal Comitato Etico dell'Ospedale G. Giglio di Cefalù e tutti i partecipanti hanno fornito il loro consenso informato.

Raccolta dei campioni ematici

Campioni ematici sono stati raccolti all'ingresso in reparto e comunque entro 72 ore dalla comparsa dei sintomi.

Citometria di flusso

A partire da campioni ematici di 3 ml di sangue venoso periferico in provette addizionate con EDTA è stata valutata la componente cellulare bianca totale e differenziale mediante Hematology analyzer Bayer H3 (Bayer Diagnostic Division, Tarrytown, New York) usando la metodica delle citochimica di flusso automatizzata. I campioni di sangue eparinizzato sono stati cimentati con anticorpi umani monoclonali anti CD4 coniugati con fluoresceina isotiocianato e con anticorpi umani monoclonali anti CD28 coniugati con phycoeritrina. Anticorpi murini IgG1 coniugati con isotiocianato marcato con fluoresceina ed IgG2 coniugati con phycoeritrina (Becton Dickinson) sono stati usati come controlli negativi. I campioni sono stati incubati per sessanta minuti in ambiente privo di luce a temperatura ambiente e quindi sottoposti a lavaggio con soluzione salina al 5% e quindi centrifugati a 5000 giri/min per 5 minuti. La espressione del recettore CD4 e del recettore CD28 sulle cellule linfocitarie è stata analizzata mediante citometria di flusso (FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson e mediante software WinMDI). La popolazione CD4+ è stata espressa come percentuale sul totale delle cellule linfocitarie mentre la popolazione CD4+CD28- è stata espressa in valore percentuale rispetto alla popolazione cellulare CD4+ (CD4+CD28- e CD4CD28+).

Analisi genotipica

La genotipizzazione KIR e dei ligandi HLA è stata effettuata utilizzando Kit a bassa risoluzione *KIR TYPE* ed *Epitop-Type*. Le piastre *KIR TYPE* e le striscie *Epitop-Type* contenevano reagenti prealiquotati e liofilizzati con primer allele specifici, i primer del controllo interno (specifici per sequenza nel cromosoma 1) e i nucleotidi. La prima mix di reazione era marcata sia per i *KIR TYPE* che per gli *Epitop-Type*. Nel primo caso conteneva anche il controllo di contaminazione/controllo negativo con primer di controllo interno e primer specifici per l'amplificato mentre la mix 22 includeva il controllo positivo (solo primer di controllo interno). Nel secondo caso l'ultima mix includeva il controllo di contaminazione/negativo. L'*Epitop-Type* rilevava gli alleli HLA con specificità HLA-Cw Asn⁸⁰, HLA-Cw Lys⁸⁰, HLA-B Bw4^{threo}, HLA-B Bw4^{Iso} e HLA-A Bw4. La rilevazione dei singoli recettori Kir/ligandi HLA è stata eseguita con il metodo *Sequence Specific Primer (SSS PCR)* nel quale la riuscita della PCR dipende dall'esatto match di entrambi i primer in particolare alla estremità 3'. Pertanto la amplificazione avviene solo se i primer sono complementari alla sequenza target ed è poi evidenziata alla elettroforesi del gel di agarosio. I primer specifici sono stati selezionati in maniera da rilevare i singoli KIR/geni HLA ligandi.

Tutti i campioni ematici sono stati raccolti entro 72 ore dall'ingresso in reparto.

Sottotipi di ictus ischemico

I soggetti con ictus ischemico sono stati suddivisi in sottotipi diagnostici sulla base della classificazione TOAST che comprende 5 diversi sottotipi: LAAS, CEI, LACunare, ODE ed UDE.

LAAS (Large artery atherosclerosis stroke): comprende la categoria di pazienti con reperto strumentale di occlusione o stenosi (>50 per cento) su base aterosclerotica di un'arteria cerebrale maggiore o di un'arteria epicranica. I segni clinici sono relativi a un deficit corticale (afasia, deficit motorio) o cerebellare. Si considera che lesioni cerebellari o corticali o infarti subcorticali emisferici dal diametro maggiore di 1,5 cm alla Tc o RMN possano originare da aterosclerosi delle grandi arterie;

Cardioembolici (CEI): è una categoria che comprende i pazienti con occlusione arteriosa cerebrale presumibilmente dovuta a un embolo a origine cardiaca. Per l'attribuzione diagnostica al gruppo CEI è necessaria la presenza di almeno una cardiopatia emboligena.

Lacunare (LAC): il sottotipo LAC include pazienti con la classica sindrome lacunare (ictus motorio puro, sensorimotorio puro, sensoriale puro, emiparesi atassica o "sindrome della mano goffa disartria"). I pazienti dovrebbero avere un normale reperto TC o RMN

encefalo o un reperto di lesione emisferica corticale o subcorticale di diametro inferiore a 1,5 cm, contrariamente quindi al sottotipo LAAS che è caratterizzato da lesioni cerebrali di diametro superiore.

ODE (other determined etiology): include soggetti con cause rare di ictus come per esempio le vasculopatie su base non aterosclerotica, diatesi trombofiliche o emopatie. Infine, vengono definiti come Ude (*undetermined etiology*) i casi in cui l'etiologia dell'ictus non può essere accertata.

Valutazione funzionale

La National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) e la Scandinavian Stroke Scale (SSS) sono state impiegate per la valutazione del deficit neurologico a 24 h dall'ingresso in reparto in tutti i pazienti .

La NIHSS valuta 15 items; ciascun item può avere da 3 a 5 gradi con un punteggio compreso tra 0 e 42 (42 punti totali: NIHSS=0 esame normale; NIHSS 1-7 deficit neurologici lievi; NIHSS 8-14 deficit moderati; NIHSS ≥ 15 deficit gravi) La SSS valuta 6 diversi items ottenendo uno score compreso tra 0 e 58 punti (*0 punti: deficit gravissimo; 58 punti : nessun deficit*).

Il grado di disabilità è stato valutato alla dimissione ed al follow-up di 1,3 e 6 mesi mediante modified rankin score.

Il modified Rankin (mRankin) Score, che comprende 6 classi a crescente gravità (da I: nessun deficit a VI: exitus), è stato utilizzato allo scopo di valutare il grado di invalidità come indice di outcome funzionale.

NIHSS, SSS, modified Rankin score e la frequenza di exitus sono stati utilizzati come indicatori prognostici.

ANALISI STATISTICA

La analisi statistica dei dati qualitativi e quantitativi, inclusa la statistica descrittiva è stata eseguita per tutti gli “items” previsti dallo studio. I dati continui sono stati espressi come $media \pm SD$. Le differenze tra i gruppi “in baseline” sono state valutate mediante il test “chi-square” (χ^2) o mediante il test esatto di Fisher qualora necessario per le variabili categoriche e mediante il test T-Student per le variabili continue. L’analisi univariata della varianza (ANOVA) è stata condotta per le variabili parametriche mentre la analisi post-hoc di Bonferroni è stata condotta per determinare eventuali differenze nei dati appaiati. L’analisi di regressione lineare ha valutato la correlazione il valore predittivo dei diversi aplotipi KIR e degli alleli HLA per quel che riguarda la diagnosi di ictus ischemico e di sottotipo diagnostico TOAST I dati sono stati analizzati mediante Epi Info software (*version 6.0, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA*) ed SPSS Software (*version 14.0, SPSS Inc, Chicago, IL, USA*). Tutti

i valori delle p erano “two-sided” e valori della p-values < 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi.

RISULTATI

Sono stati arruolati 116 soggetti con ictus ischemico acuto e 66 controlli.

Le variabili demografiche, cliniche e di laboratorio dei soggetti con ictus ischemico e dei controlli sono elencate in tabella n.1.

L'età media dei pazienti con ictus ischemico non era significativamente diversa da quella dei controlli (75.5±11.6anni vs 73.7±10.7; p=0.28); analogamente non sono state osservate significative differenze tra casi e controlli per quel che riguarda la prevalenza di diabete (41.37 % vs 45.4 %; p=0.62), ipercolesterolemia (35.4 % vs 40.9%; p= 0.51), ipertensione arteriosa (87.9% vs 80%; p=0.12), mentre i pazienti con ictus ischemico mostravano una maggiore prevalenza di pregresso ictus rispetto ai controlli (48.27 % vs 18.18 %; p<0.0001) .

Non significative differenze sono state osservate per quel che riguarda i livelli sierici di colesterolo totale, colesterolo LDL e trigliceridi. I pazienti con ictus ischemico mostravano altresì, livelli significativamente maggiori di pressione arteriosa sistolica (151.4±27.4mm/Hg vs 132.1±11.4.5 mm/Hg; p=0.0001), glicemia (143.9±59.02 mg/dl vs 108,90±34.59; p=0.0001), globuli bianchi (9448.7±4978.17 vs 7208.7±2141.6; p=0.001), PCR

(3.84 ± 5.56 mg/dl vs 1.7 ± 1.6 mg/dl, $p=0.004$).

Per quel che riguarda la prevalenza dei diversi sottotipi TOAST nei soggetti con ictus ischemico, 45 (38.79%) sono stati classificati come LAAS, 27 (23.37%) come Lacunari e 40 (34.48%) come cardioembolici.

I soggetti con ictus ischemico mostravano in confronto con i soggetti di controllo una frequenza periferica significativamente maggiore di cellule CD4+ ($50.21 \pm 8.31\%$ vs $34.12 \pm 6.81\%$; $p=0.0001$) ed una frequenza periferica significativamente aumentata di cellule CD4+CD28^{null} ($5.70 \pm 2.33\%$ vs $2.78 \pm 0.93\%$; $p=0.0001$).

I soggetti con ictus ischemico mostravano inoltre rispetto ai controlli livelli sierici significativamente maggiori di TNF- α (18.7 ± 3.28 pg/ml vs 12.34 ± 4.54 pg/ml; $p=0.035$) e IL-6 (22.10 ± 12.21 pg/m vs 4.22 ± 1.44 ; $p<0.0001$).

Per quanto riguarda la frequenza degli aplotipi KIR i soggetti con ictus ischemico acuto rispetto ai soggetti di controllo mostravano una maggiore prevalenza degli aplotipi KIR, 2DL3 (74.1% vs 42.4%; $p<0.0001$), 2DL5B (33.6% vs 18,8%; $p=0.027$), 2DS2 (37.9% vs 16.6%), 2DS4 (41.3% vs 16.6%; $p=0.0001$).

Per quel che riguarda la prevalenza degli alleli HLA nessuna significativa differenza è stata osservata tra i soggetti con ictus ischemico ed i soggetti di controllo ad eccezione di una prevalenza significativamente minore

dell'allele HLA-B-Bw4^I (8.6 % vs 65.1%; p=0.0001); invece per quel che riguarda la prevalenza delle combinazioni tra aplotipi KIR ed alleli HLA nei soggetti con ictus ischemico in confronto con i soggetti di controllo abbiamo osservato una maggiore prevalenza della combinazione 2DS2-HLA-C2 (25% vs 6.06 %; p=0.001).

All'analisi di regressione logistica delle variabili predittive dell'ictus ischemico per quel che riguarda gli aplotipi KIR, gli alleli HLA e le combinazioni HLA-KIR è risultata significativamente predittiva in senso negativo (*protective*) la presenza dell'aplotipo KIR HLA-B-Bw4^I (Beta=3,64; p<0.0001) e della combinazione HLA-KIR 2DL2-HLA-C1 (Beta= -1,90; p=0.004); mentre invece la presenza delle combinazioni 2DS2-HLA-C2 (Beta= 2,68; p=0.004) e 2DL2-HLAC1_A (Beta= 1,84; p=0.014) sono risultate significativamente predittive in senso positivo (*detrimental*) della presenza di ictus.

Per quel che riguarda la frequenza dei diversi aplotipi KIR ed alleli HLA in relazione ai diversi sottotipi TOAST nei soggetti arruolati con ictus ischemico rispetto ai controlli abbiamo osservato una maggiore prevalenza rispettivamente nel sottotipo LAAS rispetto al sottotipo lacunare e cardioembolico degli aplotipi KIR 2DL3 (86.6% vs 62.9% vs 72.5%; p=0.033), 2DL4 (88.8% vs 59.25% vs 65%; p=0.010), 3 DL2 (82,2% vs 51,8% vs 62,5%; p= 0.016), 3DL3 (80% vs 48.14% vs 55%; p=0.015) e dell'aplotipo 3DP1*003 nel sottotipo LAAS rispetto al lacunare e nel

cardioembolico (80% vs 48% vs 57.5%; $p=0.012$).

Per quel che riguarda le interazioni HLA-KIR la interazione 2DL1-HLA-C1 è risultata significativamente più frequente (22.5% vs 4.4% vs 14.8%) nel sottotipo cardioembolico rispetto a LAAS e lacunare.

All'analisi di regressione logistica delle variabili predittive del sottotipo di ictus ischemico (vedi tabella n.6) per quel che riguarda gli alplotipi KIR sono risultati significativamente predittivi in senso positivo (*detrimental*) del sottotipo cardioembolico (CEI) la presenza degli alplotipi KIR 3DL1 (Beta= 2,17; $p=0,02$) e 2DL5A (Beta= 2,81; $p= 0.03$). Per quel che riguarda il sottotipo lacunare soltanto una associazione che rasentava la significatività è stata osservata per gli alplotipi KIR 2DL5A (Beta= 2,3; $p=0.06$) (*detrimental*) e 3DL1 (Beta= -1,51; $p= 0.05$) (*protective*).

Per il sottotipo LAAS analogamente a quanto osservato per il lacunare è stata evidenziata solo un'associazione che rasentava la significatività per l'alplotipo 2DL4 (Beta= 2,22; $p=0,05$).

Alla analisi multivariata per quanto riguarda gli alleli HLA e le interazioni KIR-HLA (vedi tabella 7) solo l'allele HLA-C2 (Beta= 2,36; $p= 0,004$) è risultato significativamente associato al sottotipo CEI (cardioembolico).

Un'associazione che invece rasentava solo la significatività statistica è emersa per l'allele HLA-A-Bw4 (Beta = -1,32; $p= 0,05$) e il sottotipo LAAS e l'associazione 2DL2-HLA-C2 con il medesimo sottotipo (Beta= - 1,35; $p= 0,05$); entrambe le associazioni sono risultate predittive in senso

negativo per tale sottotipo TOAST (*protective*).

DISCUSSIONE

I risultati di questo studio hanno confermato quanto già riportato da un nostro lavoro precedente e che, nell'ambito della linea di ricerca inerente la attivazione immunoinfiammatoria caratteristica della fase acuta dell'ictus ischemico, aveva sottolineato un ruolo, finora non chiaramente riportato, anche della componente cellulo-mediata, analogamente a quanto già descritto per la angina instabile (82-84). Il nostro gruppo ha mostrato, in precedenti studi, come la fase acuta dell'ictus sia caratterizzata da una attivazione immuno-infiammatoria acuta caratterizzata da un incremento dei livelli di alcune citochine sieriche e di alcune molecole di adesione e selectine mostrando successivamente in altri due studi come questa attivazione immunoinfiammatoria sia maggiore nei soggetti con ictus cardioembolico rispetto ai soggetti con ictus lacunari.

Pertanto i nostri risultati permettono di estendere quanto già riportato dal nostro gruppo [92,93,94], e da numerosi altri gruppi di ricerca, per quel che riguarda la attivazione immunoinfiammatoria in termini di citochine infiammatorie, selectine e molecole di adesione, caratteristico della fase acuta dell'ictus ischemico, anche alla componente cellulare della infiammazione e quindi alle subpopolazioni cellulari CD4+ ed in

particolare CD28^{null} [109]; ciò rappresenta quindi una naturale estensione e prosecuzione dei nostri studi che dopo aver valutato la componente umorale della cascata neuroinfiammatoria sistemica conseguente ad ischemia cerebrale, hanno esteso il loro interesse alla caratterizzazione del ruolo svolto dalla componente cellulare linfocitaria nell'ambito di quel complesso "trafficking" cellulare che vede in azione granulociti, cellule del sistema monocito-macrofagico ed appunto cellule linfocitarie.

I nostri risultati hanno infatti prima di tutto mostrato una maggiore frequenza percentuale nel sangue periferico di soggetti con ictus ischemico acuto dei "subset" linfocitari CD4⁺ ed in particolare modo della componente cellulare CD28^{null}.

Nell'ictus ischemico acuto, si realizza infatti una complessa attivazione della componente cellulare microgliale, una attivazione endoteliale ed un danno a carico della barriera ematoencefalica con progressivo reclutamento di leucociti dalla periferia fino al sito di lesione ischemica [85-87] e numerosi lavori anche sperimentali su modelli murini di ictus ischemico hanno mostrato come a livello della sede di lesione ischemica le cellule reclutate comprendano oltre ai neutrofili anche cellule linfocitarie T e come queste cellule linfocitarie siano presenti nella lesione ischemica a partire dal primo giorno dopo l'insulto ischemico fino al settimo giorno [88]. Numerose evidenze tendono quindi ad operare una traslazione della cascata neuroinfiammatoria sia in termini di citochine infiammatorie che di

“*trafficking cellulare*” dal modello sperimentale all’uomo, e pertanto appare verosimile attendersi un incremento periferico percentuale di vari subset cellulari della popolazione T linfocitaria entro le 72 ore dopo l’evento ischemico cerebrale.

Infatti poiché le cellule T, attivate nel compartimento immune periferico, al realizzarsi del processo di reclutamento mediato da alcune citochine e da altri fattori di pertinenza tessutale, fanno il loro ingresso a livello cerebrale attraverso la barriera ematoencefalica è molto verosimile attendersi una maggiore presenza di queste a livello del sangue periferico [89] in parallelo al loro percorso di afflusso intracerebrale.

Tra i subset T cellulari, i linfociti CD4+CD28^{null} hanno proprietà citotossiche nei confronti delle cellule endoteliali, producono IFN- γ ed hanno un ruolo nella destabilizzazione della placca aterosclerotica cosicché la loro presenza nel sangue periferico potrebbe essere un marker di instabilità di placca tanto che un incremento della loro frequenza periferica è stata precedentemente mostrata in soggetti con angina instabile.

I nostri risultati inerenti una maggiore frequenza periferica di cellule CD4+CD28^{null} nei soggetti con ictus ischemico acuto confermano i risultati di due studi precedenti condotti da Novik et al [90] e Nadareishvili et al [91] che hanno rispettivamente riportato come le cellule CD4+CD28^{null} siano implicate nei meccanismi alla base del rischio di ictus ischemico e

come la espansione di questo subset T cellulare rappresenti un biomarker verosimilmente capace di contribuire ai meccanismi patogenetici alla base della ricorrenza dell'ictus.

Nessuno studio, prima dei nostri risultati, aveva però focalizzato il ruolo della componente cellulare CD4+CD28^{null} come marker della attivazione immunoinfiammatoria della fase acuta dell'ictus ischemico ed originali appaiono inoltre i risultati relativi alla valutazione della associazione di questa componente T cellulare con i marker di prognosi e con i sottotipi diagnostici di ictus ischemico classificati secondo la classificazione TOAST.

I nostri risultati relativi alla frequenza dei subset T cellulari in relazione al sottotipo TOAST mostrano una maggiore frequenza percentuale di cellule CD4+ e delle cellule CD28^{null} nei soggetti con sottotipo cardioembolico e LAAS rispetto ai soggetti con ictus lacunare.

Questi dati, originali in quanto finora nessuno studio aveva analizzato la frequenza periferica dei subset T cellulari in relazione alla tipologia di ictus ischemico, si mantengono in linea con i risultati di altri studi condotti dal nostro gruppo che avevano mostrato come i soggetti con sottotipo cardioembolico siano caratterizzati dai maggiori livelli di TNF- α , IL1 β ed IL-6 rispetto al sottotipo LAAS e soprattutto rispetto al sottotipo lacunare [92-93].

È quindi verosimile ipotizzare che l'incremento della percentuale periferica della componente cellulare CD4⁺ ed in particolar modo della componente CD28^{null} possa rappresentare l'equivalente cellulare della attivazione citochinica caratteristica della fase acuta dell'ictus e la relazione significativa con il sottotipo cardioembolico e con il sottotipo LAAS sottolinea il ruolo del “*recruitment*” e “*trafficking*” della componente cellulare T nell'ambito della migrazione verso l'area di lesione ischemica ipotizzato da alcuni autori e dimostrato nell'ambito di alcuni modelli sperimentali di ischemia cerebrale, oltre al ruolo di marker di instabilità di placca aterosclerotica attribuito a questi subset T cellulari. È comunque verosimilmente da non trascurare un possibile ruolo di una componente che potremmo definire “di parete vascolare” o genericamente di “parete” e che potrebbe spiegare una parte dell'incremento della componente CD28^{null} periferica in corso di ictus ischemico acuto con l'associazione, già chiaramente dimostrata per altri distretti vascolari come quello coronarico dal gruppo della Liuzzo.

È inoltre suggestivo che la frequenza periferica delle cellule CD4⁺CD28^{null} sia risultata maggiore in quei sottotipi diagnostici come il LAAS ed il CEI che in studi condotti dal nostro gruppo si sono dimostrati come caratterizzati dal maggiore grado di attivazione immuno-infiammatoria della fase acuta in termini di livelli plasmatici di citochine infiammatorie, selectine e molecole di adesione e di cui la frequenza periferica di alcuni

subset T cellulari rappresenta la diretta conseguenza.

I risultati dei nostri studi inerenti il possibile ruolo della immunità cellulo-mediata nella fase acuta dell'ictus offrono possibilità di riflessione riguardo il possibile ruolo che la regolazione su base genetica della risposta immunitaria possa esprimere per quel che riguarda il grado e tipo di attivazione immunitaria di tipo cellulare che alla luce dei risultati dei nostri studi sembra anche caratterizzare la fase acuta dell'ictus ischemico.

Se infatti il ruolo della risposta immune di tipo cellulare riveste un ruolo determinante nel controllo e nella evoluzione clinica delle malattie infettive su base virale, ancora controverso, seppur suggestivo, appare il ruolo che la regolazione della risposta immune potrebbe avere nella aterosclerosi e nelle complicanze d'organo di questa malattia degenerativa a spiccato carattere infiammatorio. Gli alleli HLA sono molecole coinvolte nei processi di riconoscimento e comunicazione immunologica e che condizionano, "restringendola", la risposta immune. Il Sistema HLA (Human Leucocyte Antigens) comprende un complesso di antigeni ematici e tissutali, codificati da una serie di geni localizzati sul braccio corto del cromosoma 6. L'importanza del sistema è determinata dall'osservazione sperimentale che tali antigeni sono responsabili di quella serie di reazioni umorali e cellulari che si realizzano anche nello sviluppo di molte delle lesioni aterosclerotiche. I diversi alleli HLA vengono codificati da geni strettamente associati tra loro a formare un "cluster" che viene trasmesso in

blocco alla prole, salvo i casi di ricombinazione. Si distinguono tre classi di antigeni HLA: gli antigeni delle prime due classi sono antigeni "tissutali", e, più precisamente, quelli di I classe, codificati dai loci HLA-A, B e C sono presenti su tutte le cellule nucleate dell'organismo; quelli di II classe, codificati dai loci HLA-D, DR, DP e DQ sono presenti sui linfociti B, sui linfociti T attivati, sulle cellule endoteliali, sui macrofagi e sugli spermatozoi. Gli antigeni di III classe, rappresentati dalle frazioni complementari C2, C4 e dal Bf, sono i determinanti "sierici". Nel nostro studio abbiamo considerato loci HLA-A, -B e -C ed inoltre abbiamo analizzato i geni codificanti per i recettori *KIR* attivatori ed inibitori. Questi loci sono caratterizzati da una elevata variabilità allelica nella popolazione (polimorfismo). Sono state identificate, in varie popolazioni, oltre 650 alleli per l'HLA-A, 1000 per l'HLA-B e 360 per l'HLA-C. Ogni allele codifica per una catena pesante (catena α) che si associa in maniera non covalente ad una catena leggera non polimorfica, la β_2 -Microglobulina, codificata da un gene sul cromosoma 15. Il riconoscimento di queste molecole da parte delle cellule *Natural Killer (NK)*, che svolgono un ruolo determinante nella risposta immune innata, è mediato da tre famiglie di recettori: i *KIR (Killer Immunoglobulin-like Receptors)*, i *LIR (Leukocyte Ig-like receptor)*, la famiglia dei CD94/NKG2. In particolare, l'interazione KIR-HLA, mediando la attivazione delle cellule NK e di altre cellule coinvolte nella immunità cellulare come anche le cellule CD28^{null} potrebbe risultare d

interesse nella analisi dei processi infiammatori caratteristici di alcune malattie cardiovascolari acute come le sindromi coronariche acute e l'ictus ischemico acuto. Un aspetto particolarmente intrigante della biologia evolutiva dei sistemi HLA/KIR è la differenza molto evidente tra le diverse popolazioni umane per quel che riguarda le frequenze dei diversi alplotipi, espressione questa, si presume, di differenze regionali tra le diverse popolazioni nella risposta ai patogeni e nella espressione dei processi infiammatori alla base di molte malattie degenerative e delle malattie cardio e cerebrovascolari [94]. Ad esempio l'aplotipo AA è stato osservato nel 56% dei soggetti giapponesi e nel 15 % degli aborigeni australiani, mentre nella popolazione italiana questo aplotipo ha una prevalenza di circa il 20-25%. Carrington e collaboratori in tal senso hanno proposto un modello classificativo delle interazioni/combinazioni KIR/HLA in relazione all'effetto prevalente rispettivamente di tipo inibitorio o attivatorio del programma del sistema delle cellule NK (95-98). Ad un estremo di questo spettro vi sono alplotipi AA, con una tendenza intrinseca alla inibizione, all'altra estremità, l'aplotipo BB con una tendenza intrinseca all'attivazione. Nel setting clinico dell'aterosclerosi il ruolo della interazione tra elementi T cellulari e alplotipi KIR appare ancora poco studiato ed i pochi dati ad oggi disponibili sono originati da pochi studi condotti in soggetti con sindromi coronariche acute (SCA), tra cui l'angina instabile, la morte cardiaca improvvisa e l'infarto del miocardio (MI) che rappresentano

complicanze acute della aterosclerosi coronarica. Lo sviluppo di un difetto del tessuto sulla superficie dell'ateroma, che porta alla trombosi sovrapposta e improvvisa occlusione dell'arteria, rappresenta il principale evento patogenetico coinvolto in queste complicanze e la rottura della placca aterosclerotica, da studi istologici, appare su base multifattoriale [99-101]. Il ruolo delle cellule infiammatorie in tal senso appare confermato da studi che hanno confermato una attivazione di cellule T e dei macrofagi che spesso si accumulano nella regione di "spalla" (*shoulder*) della placca, il punto di minor resistenza.

Macrofagi, metalloproteinasi, e cellule T infiltranti la placca sono stati implicati nella rottura del cappuccio fibroso [102-106].

Uno studio recente [107] ha dimostrato come nei soggetti con angina instabile vi sia una espansione oligoclonale delle cellule T CD4+ con profondi cambiamenti nella espressione genica di queste ed espressione preferenziale dell'aplotipo KIR 2DS2 e 2DS4. Un ulteriore recente studio [108] ha indirettamente infine confermato il ruolo della componente cellulare di tipo NK a livello di ateroma nel determinismo della instabilità di placca a livello delle placche aterosclerotiche ad elevato rischio di eventi, mostrando come, l'espansione delle cellule NKG2C+, un subset di cellule NK periferiche che esprimono elevati livelli del CD94/NKG2C+ *lectin-like receptor* nei pazienti con aterosclerosi carotidea, sembra essere associata ad un incrementato rischio di destabilizzazione della placca. Negli

stessi soggetti la maggiore espressione dei subset oligoclonali di cellule NKG2C+, si accompagnava ad una maggiore espressione di aplotipi KIR di tipo eccitatorio.

Il ruolo degli aplotipi KIR e degli alleli HLA nei soggetti con ictus ischemico acuto non è stato finora indagato quindi i nostri risultati appaiono originali.

I nostri risultati hanno mostrato una maggiore prevalenza nei pazienti con ictus ischemico acuto rispetto ai soggetti di controllo degli aplotipi KIR, 2DL3, 2DL5B, 2DS2, 2DS4.

Per quel che riguarda la maggiore prevalenza dell'aplotipo 2DS4 a carattere eccitatorio i nostri risultati appaiono quindi in accordo con quei pochi lavori che nei soggetti con sindrome coronarica acuta avevano mostrato una maggiore frequenza di questo stesso aplotipo che quindi sembrerebbe essere un determinante genetico di una risposta infiammatoria sia sistemica che locale (placche aterosclerotiche dei vasi epicranici ed intracranici) più spiccata, ma ancora non sufficienti dati sono in nostro possesso per confermare quanto da noi ipotizzabile sulla base della semplice analisi delle frequenze dei diversi aplotipi.

Noi abbiamo riportato nei soggetti con ictus ischemico acuto una maggiore prevalenza degli aplotipi KIR 2DL3, 2DL5B, 2DS2, 2DS4.

KIR2DS2 è un recettore attivante a due domini (D₁-D₂). Questo recettore attivante svolge la sua funzione attivatrice delle “*component cellular NK*”

mediante una molecola adattatrice (del tipo ITAM –bearing) chiamata DAP 12.

Anche KIR2DS4 è un recettore attivante a due domini (D₁-D₂) ed anch'esso svolge la sua azione attivatrice mediante una associazione non covalente con la molecola del tipo ITAM –bearing DAP 12.

KIR2DL3 è un membro della sottofamiglia 1 (D1-D2) 2DL dei recettori inibitori.

KIR3DL1 è invece un recettore inibitorio del tipo “ three-immunoglobulin-domain”; 3DL1 interagisce con le molecole HLA di classe B che contengono il motivo “ Bw⁴ motif” (HLA-A-BW4 ed HLA_B-Bw4).

KIR2DL5B è un membro della sottofamiglia 1 (D1-D2) 2DL dei recettori eccitatori.

Quindi nei nostri soggetti con ictus ischemico acuto rispetto ai controlli abbiamo osservato una maggiore prevalenza di alcuni aplotipi attivatori (2DS2 e 2DS4 2DL5B) in linea con quanto già osservato nei pochi studi che avevano avuto lo stesso obiettivo nei soggetti con sindrome coronarica acuta e nella placche aterosclerotiche instabili.

Possiamo quindi considerare la prevalente espressione KIR nel soggetto con ictus ischemico acuto come prevalentemente di tipo eccitatorio, analogamente a quanto già osservato nei soggetti con sindrome coronarica acuta, mentre l'espressione di tipo inibitorio potrebbe rappresentare una semplice risposta di tipo modulatorio al carattere prevalentemente

eccitatorio del controllo genetico della risposta cellulare di tipo immune come sarebbe verosimile attendersi se anche la espressione KIR fosse in linea con quanto già riportato dal nostro gruppo e da altri in relazione alla attivazione immunoinfiammatoria di tipo sia citochinico [92,93] che cellulare [109] caratteristico della fase acuta dell'ictus ischemico acuto.

La maggiore espressione delle cellule CD28^{null} nel sangue periferico dei soggetti con ictus ischemico potrebbe essere infatti dovuta alla maggiore prevalenza di aplotipi KIR attivatori come 2DS2 e 2DS4 e 2DL5B.

La maggiore espressione nei soggetti di controllo senza ictus ischemico dell'allele HLA -B con "Bw⁴ motif" (HLA_B-Bw⁴) che normalmente interagisce con i recettori inibitori del tipo 3DL1 e 3DL3 potrebbe rappresentare una ulteriore conferma del genotipo "proinflammatory" caratteristico invece dei soggetti con ictus ischemico; questo potrebbe rappresentare uno dei background patogenetici oltre che della eventuale instabilità di placca aterosclerotica responsabile dell'evento aterotromboembolico alla base dell'evento cerebrovascolare ischemico acuto anche della eventuale gravità dell'ictus ischemico in relazione alle maggiori dimensioni dell'area infartuale dovuto ad un maggiore "recruitment" di cellule infiammatorie di tipo NK verso l'area infartuale.

Il nostro studio rappresenta quindi il primo tentativo di ricondurre, nell'ambito di una visione di insieme di tipo "immunoinfiammatorio" che vede alla base del danno infiammatorio su base citochinica e cellulo

mediata la patogenesi dell'ictus ischemico e del danno neuronale su base ischemico, un background di tipo genetico inerente l'interazione recettori KIR-alleli HLA; ciò potrebbe comportare il maggiore o minore grado di coinvolgimento cellulo mediato (cellule NK e cellule CD4+ ed in particolare CD28^{null}) con differenti effetti sul determinismo e sulla espressione clinica dell'evento ischemico cerebrale.

Ulteriori studi ad opera del nostro gruppo saranno necessari e sono in atto in corso per valutare eventuali differenze nella incidenza di eventi ischemici cerebrali ed eventuali effetti sulla prognosi a medio e lungo termine dei diversi aplotipi KIR ed alleli HLA nei soggetti con ictus ischemico.

Per quel che riguarda eventuali differenze nella frequenza dei diversi aplotipi KIR nei soggetti con ictus ischemico in relazione al diverso sottotipo diagnostico TOAST, i nostri dati mostrano una maggiore frequenza degli aplotipi 2DL3, 2DL4, 3DL2, 3DL3 e 3DP1*003 nei soggetti con sottotipo LAAS rispetto ai sottotipi lacunare e cardioembolico; nessuna significativa differenza invece è stata osservata per quel che riguarda i sottotipi lacunare e cardiembolico.

L'analisi di regressione logistica ha mostrato inoltre un ruolo predittivo nei confronti dell'ictus cardioembolico degli aplotipi KIR 2DL5A e 3DL1 mentre per quel che riguarda il sottotipo LAAS e lacunare è stata mostrata solo un'associazione negativa che rasentava la significatività statistica tra aplotipo 2DL4 e sottotipo aterosclerotico e aplotipi 2DL5A e 3DL1 e

sottotipo lacunare.

Infine per quel che riguarda gli alleli HLA e le interazioni HLA-KIR non è stata osservata alcuna significativa differenza nella frequenza degli alleli HLA tra i diversi sottotipi ed invece abbiamo riportato una maggiore frequenza dell'interazione 2DL1-HLA-C1 nel sottotipo cardioembolico rispetto ai sottotipi LAAS e lacunare.

L'analisi di regressione logistica per quell che riguarda gli alleli HLA e le interazioni HLA-KIR ha mostrato un'associazione significativa tra allele HLA-C2 e sottotipo cardioembolico, mentre per quel che riguarda il sottotipo LAAS solo un'associazione negativa che rasentava la significatività con l'allele HLA-Bw4 e con la interazione 2DL2-HLAC2; nulla di significativo per quel che riguarda il sottotipo lacunare.

Questi risultati, seppur relativi ad una casistica meritevole di ulteriore ampliamento, allo scopo di permettere un eventuale approfondimento dell'analisi per sottotipi, sembrano comunque mostrare un pathway di espressione KIR ed HLA di tipo eccitatorio nei soggetti con sottotipo LAAS rispetto ad un pathway relativamente inibitorio nei soggetti con ictus cardioembolico. Questo dato potrebbe trovare una iniziale spiegazione nelle recenti evidenze sperimentali secondo cui la migrazione delle cellule infiammatorie fino alla parete vascolare potrebbe essere strettamente in relazione con le dinamiche infiammatorie vascolari che portano allo sviluppo dell'aterosclerosi ed al realizzarsi di infiltrati cellulari all'interno

delle parete vascolare delle arterie umane [110, 111].

Inoltre è stato riportato come la presenza di cellule infiammatorie a livello dei vasi cerebrali rappresenti nei soggetti con malattia cerebrovascolare l'espressione di una risposta infiammatoria generale ai fattori di rischio come ipertensione arteriosa, diabete mellito e fumo (111, 112, 113).

Il ruolo delle cellule infiammatorie nella patogenesi dell'ictus per molto tempo trascurato solo recentemente è stato oggetto di alcuni studi che ne hanno sottolineato l'importanza, ma il ruolo del sistema KIR-HLA nel regolare la migrazione e la risposta delle cellule infiammatorie come cellule NK ed i vari "subset" T cellulari nello sviluppo di una trombosi cerebrale rispettivamente dovuta a meccanismi di tipo aterosclerotico piuttosto che cardioembolico rimane in atto ancora sconosciuto.

Considerato che certe combinazioni KIR-HLA possono mediare segnali di tipo inibitorio o eccitatorio per quanto riguarda la regolazione della funzione delle cellule NK e delle cellule T differenti pathway rispettivamente "prevalentemente" inibitori o eccitatori potrebbero caratterizzare le diverse tipologie di ictus ischemico e la relativa fisiopatologica trombotica.

I nostri risultati inerenti una maggiore prevalenza dell'interazione 2DL1-HLA-C1 nei soggetti con sottotipo cardioembolico e la predittività dell'allele HLA-C2 per il medesimo sottotipo alla analisi multivariate potrebbero sottolineare il prevalente ruolo dei meccanismi inibitori della

regolazione delle NK e delle cellule T nella patogenesi del tipo cardioembolico rispetto ad un pathway prevalentemente eccitatorio (*associazione negativa che rasentava la significatività con il KIR inibitorio 2DL4*) maggiormente associate ai meccanismi di tipo aterosclerotico.

In realtà però la questione relativa alla presenza di pathway prevalentemente eccitatori o inibitori “*sic et simpliciter*” sembrerebbe non così lineare e ben più complessa alla luce di recenti evidenze secondo cui la interazione dei recettori KIR di tipo inibitorio con i loro ligandi HLA non soltanto inibirebbe la attivazione delle cellule NK e T ma potrebbe in alcuni casi risultare in una attivazione cellulare “paradosa” in “*absence of self*” [114]. Questo perchè, almeno nel contesto delle infezioni, la interazione dei recettori KIR di tipo inibitorio con i loro ligandi HLA potrebbe dar luogo ad un fenomeno di recente descrizione denominato “licensing” delle cellule NK , dando luogo così a cellule *NK licensed* con recettori MHC self-specifici che risulterebbero più rapidamente attivati in confronto alle cellule infiammatorie (NK e T) “*non licensed*” e prive di recettori MHC specifici per il self [114]. Proprio il fenomeno del *licensing* successivo alla interazione dei recettori KIR con il loro ligando HLA potrebbe essere responsabile del determinismo della eterogeneità delle funzioni T cellulari ed NK nei diversi soggetti [115] e potrebbe anche spiegare le eventuali differenze nei pathway di regolazione cellulare infiammatorie nelle diverse tipologie di ictus ischemico nei diversi soggetti (maggiore o minore

predisposizione ad un determinate sottotipo TOAST) anche se solo futuri studi con questo obiettivo specifico e su campioni di soggetti ben più ampi potranno dare ulteriori informazioni per quel che riguarda questi aspetti particolari.

Ulteriore supporto infine al differente coinvolgimento cellulare nelle diverse tipologie di ictus è inoltre offerto da quei pochi studi (solo tre finora) che hanno analizzato la differente composizione cellulare dei trombi vascolari cerebrali [116, 117] e che hanno mostrato un maggiore coinvolgimento T cellulare solo nei trombi su lesioni aterosclerotiche carotidee vulnerabili e su lesioni aterosclerotiche di vasi intracerebrali. Anche questa maggiore partecipazione T cellulare dal punto di vista anatomopatologico a livello dei trombi sul lesioni aterosclerotiche instabili epicraniche e intracerebrali potrebbe rendere conto del maggiore grado di espressione dei meccanismi di regolazione cellulare infiammatoria di tipo eccitatorio nei soggetti con ictus di tipo aterosclerotico

Mentre invece la associazione da noi osservata tra sottotipo cardioembolico e aplotipo KIR 3DL1 e 2DL5A potrebbe essere espressione di un prevalente pathway di tipo inibitorio oppure di un meccanismo prevalente di “*licensing*” con attivazione paradossa delle cellule infiammatorie.

Ulteriori conferme potranno derivare sicuramente dalla estensione della nostra casistica e dagli eventuali risultati ottenuti dalla analisi di tipo longitudinale degli eventi al follow-up (già in corso) oltre che da futuri dati

prossimamente disponibili ad opera di quei gruppi che stanno analizzando, in studi in fase di svolgimento, le caratteristiche differenziali nella componente cellulare dei trombi su base cardioembolica o aterotromboembolica ottenuti in corso di trombolisi meccanica (mechanical retrieval).

CONCLUSIONI

I risultati del nostro studio hanno mostrato rispettivamente:

- *Una maggiore frequenza periferica di cellule CD4+ nei soggetti con ictus ischemico rispetto ai controlli confrontati per età e per prevalenza dei principali fattori di rischio cardiovascolare;*
- *Una maggiore frequenza percentuale di cellule CD28^{null} nei soggetti con ictus ischemico rispetto ai controlli;*
- *Una maggiore prevalenze nei soggetti con ictus ischemico acuto rispetto ai soggetti di controllo degli aplotipi KIR, 2DL3, 2DL5B, 2DS2, 2DS4;*
- *Prevalenza significativamente minore dell'allele HLA-B-Bw4^I nei soggetti con ictus ischemico;*
- *Maggiore prevalenza della combinazione 2DS2-HLAC2 nei soggetti con ictus ischemico acuto in confronto con i soggetti di controllo (25% vs 6.06%; p=0.001).*
- *All'analisi di regressione logistica delle variabili significativamente*

predittive della diagnosi di ictus ischemico la presenza dell'aplotipo KIR HLAB-B-w4^l e della combinazione 2DL2-HLAC1 risulta associata in senso negativo alla presenza di ictus (protective); le combinazioni invece 2DS2-HLAC2 e 2DL2-HLAC1_A sono risultate significativamente associate in senso positivo alla presenza di ictus (detrimental).

- *Alla analisi di regressione logistica associazione significativa tra aplotipo KIR DL5A e 3DL1 e ictus cardioembolico e dell'allele HLAC2 e sottotipo cardioembolico.*

Tabella 1: variabili generali, demografiche e cliniche nei soggetti con ictus ischemico acuto e nei soggetti di controllo

Variabili	Soggetti con ictus ischemico acuto (n: 116)	Controlli (n: 66)	p
Sesso (M/F) (n)	59/57	29/37	0.43
Età (years) (mean±ds)	75.5±11.6	73.7±10.7	0.28
Diabete (n/%)	48 (41.37)	30 (45.4)	0.62
Iperensione (%/n)	103 (87.9)	53 (80%)	0.12
Ipercolesterolemia (%/n)	41 (35,34)	27 (40,90)	0.51
Ipertrigliceridemia (%/n)	26 (22.41)	19 (28.78)	0.32
Fibrillazione atriale (%/n)	53 (45.68)	28 (42.46)	0.67
Pregressi eventi cardiovascolari	42 (36,20)	29 (43,93)	0,72
Pregresso ictus	56 (48.27)	12 (18.18)	0.0001
Glicemia (mg/dl)	143.9±59.02	108.9±34.5	0.0001
PAS (mm/Hg) (mean±ds)	151.4±27.4	132.1±11.4	0.0001
PAD (mm/Hg) (mean±ds)	82.05±14.43	78.8±6.6	0.094
GB (mean±ds) (mean±ds)	9448.7±4978.17	7208.7±2141.6	0.0001
Neutrofili (%) (mean±ds)	72.3±10.7	61.87±9.5	0.32
VES (mm/h) (mean±ds)	29.07±17.5	14.7±9.16	0.0001
PCR (mg/dL) (mean±ds)	3.84±5.56	1.7±1.6	0.004
TOAST subtype			
LAAS	45 (38.79)		
Lacunar	27 (23.27)		
CEI	40 (34.48)		
ODE	4 (3.48)		
NIHSS (mean ±sd)	15±1,9		
SSSS (mean ±sd)	29±4,1		
CD4+ cells (%)	50.21±8.31	34.12±6.81	0.0001
CD4+CD28null (%)	5.70±2.33	2.78±0.93	0.0001
TNF-α (pg/ml)	18.7 ±3.28	12.34±4.54	0.035
IL-6 (pg/ml)	22.10±12.21	4.22±1.44	0.0001

Tabella 2: frequenza degli aplotipi KIR e degli alleli HLA in soggetti con ictus ischemico acuto e nei soggetti di controllo

Aplotipo KIR	Soggetti con ictus ischemico acuto (n: 116)	Controlli	p
2DL1 (n/%)	64 (55.17)	43 (65.16)	0,21
2DL2 (n/%)	41 (35.34)	26 (39.3)	0,63
2DL3 (n/%)	86 (74.1)	28 (42.4)	0,0001
2DL4 (n/%)	84 (72.4)	66 (100)	0,0001
2DL5A (n/%)	14 (12.06)	12 (18.8)	0,27
2DL5B(n/%)	39 (33.6)	12 (18,8)	0,03
2DS1 (n/%)	24 (20.6)	18 (27.2)	0,36
2DS2 (n/%)	44 (37.9)	11 (16.6)	0,003
2DS3 (n/%)	31 (26.7)	17 (25.7)	1
2DS4 (n/%)	48 (41.3)	11 (16.6)	0,0001
2DS5 (n/%)	17 (14.6)	34 (51.5)	0,0001
3DL1 (n/%)	78 (67.2)	59 (89.3)	0,0001
3DL2 (n/%)	78 (67.2)	66 (100)	0,0001
3DL3 (n/%)	73 (62.9)	66 (100)	0,0001
3DS1 (n/%)	60 (51.7)	37 (56.06)	0,64
2DP1 (n/%)	90 (77.5)	66 (100)	0,0001
3DP1 (n/%)	17 (14.6)	0	0,0001
3DP1*003 (n/%)	73 (62.9)	66 (100)	0,0001
Alleli HLA			
HLA- A (n/%)	52 (44.8)	30 (45.4)	0,75
HLA- A+B (n/%)	62 (53.4)	37 (56.0)	0,42
HLA-Bw4 ^T (n/%)	31 (26.7)	13 (19.6)	0,36
HLA.A - Bw ⁴	31 (26.7)	16 (24.2)	0,85
HLA-B-Bw4 ^I	10 (8.6)	43 (65.1)	0,0001
HLA- C1 (n/%)	38 (32.7)	26 (39.3)	0,01
HLA- C2 (n/%)	36 (31.03)	19 (28.7)	0,86

Tabella 3: frequenza delle combinazioni KIR –HLA nei soggetti con ictus ischemico acuto e nei soggetti di controllo

<i>Combinazione degli aplotipi KIR ed HLA</i>	<i>Soggetti con ictus ischemico</i>	<i>Controlli</i>	<i>p</i>
2DL 2 HLA C1 (n/%)	25 (21.55)	27 (40.9)	0.007
2DL 3 HLA C1 (n/%)	38 (32.75)	22 (33.3)	0.93
2DS2 HLA C1 (n/%)	37 (31.8)	23 (34.48)	0.94
2DS2 -HLAC2 (n/%)	29 (25)	4 (6.06)	0.001
2DL2 HLAC2 (n/%)	26 (22.41)	11 (16.67)	0.34
2DS1HLAC2 (n/%)	15 (12.93)	5 (7.57)	0.42
2DL1HLAC1 (n/%)	16 (13.79)	7 (10.6)	0.52
2DL1 HLAC2 (n/%)	17 (14.65)	13 (13.79)	0.95

Tabella 4: modello di regressione logistica delle variabili predittive dell'ictus ischemico

Variable	Beta	Exp (β)	95% Confidence Interval for Exp(B)	p value
HLAABw4	0.168	1.18	0.42-3.26	0.745
Aplotipo HLA-A	0.175	1.19	0.48-2.9	0.702
HLAC1	0.092	1.09	0.35-3.4	0.874
HLAC2	0.553	1.73	0.53-5.69	0.361
HLAB-Bw4 ^T	0.303	1.35	0.44-4.11	0.593
HLAB-Bw4 ^I	-3.649	0.02	0.008-0.08	<0.0001
2DL2HLAC1	-1.901	0.149	0.041-0.55	0.004
2DL3HLAC1	0.321	1.37	0.50-3.75	0.529
2DS2HLAC1	0.682	1.97	0.67-5.83	0.216
2DS2HLAC2	2.687	14.68	2.33-92.4	0.004
2DL2HLAC2	0.137	1.14	0.34-3.84	0.825
2DS1HLAC2	-0.278	0.75	0.21-2.64	0.667
2DL1HLAC1	0.375	1.45	0.34-6.07	0.607
2DL2HLAC1_A	1.847	6.33	1.46-27.47	0.014
2DL1HLAC2	0.037	1.03	0.30-3.59	0.953

Tabella 5: variabili generali, cliniche e di laboratorio nei soggetti con ictus ischemico acuto in relazione al sottotipo diagnostico TOAST

Variables	LAAS (n: 45)	Lacunar (27)	Cardioembolic (40)	p
Maschi (n/%)	29 (64.4)	12 (44.4)	15 (37.5)	0.057
Iperensione (n/%)	39(86.6)	24(88.8)	36 (90)	0.85
Diabete (n/%)	20 (44.4)	13 (48.14)	15 (37.5)	0.40
Ipercolesterolemia (n/%)	24 (53.3)	6 (22.22)	10 (25)	0.011
Ipertrigliceridemia (n/%)	12(26.66)	5 (18.51)	9 (22.5)	0.84
Fibrillazione atriale	8 (17.77)	8 (29.62)	35 (87.5)	<0.0001
Progresso ictus (n/%)	21(46.66)	13 (48.14)	21 (52.5)	0.90
2DL1 (n/%)	27 (60)	13 (48.14)	22 (55)	0.75
2DL2 (n/%)	20 (44.4)	7 (25.92)	12 (30)	0.20
2DL3 (n/%)	39 (86.6)	17 (62.96)	29 (72.5)	0.033
2DL4 (n/%)	40 (88.8)	16(59.25)	26 (65)	0.010
2DL5A (n/%)	6 (13.33)	1 (3.73)	7 (17.5)	0.37
2DL5B (n/%)	13 (28.8)	11 (40.7)	14 (35)	0.76
2DS1 (n/%)	7 (15.5)	7 (25.9)	9 (22.5)	0.52
2DS2 (n/%)	14 (31.1)	12 (44.4)	17 (42.5)	0.61
2DS3 (n/%)	13 (28.8)	6 (22.2)	10 (25)	0.92
2DS4 (n/%)	20 (44.4)	10 (37.03)	16 (40)	0.90
2DS5 (n/%)	5 (11.11)	4 (14.81)	8 (20)	0.73
3DL1 (n/%)	34 (75.55)	13 (48.14)	28 (70)	0.073
3DL2 (n/%)	37(82.22)	14 (51.85)	25 (62.5)	0.016
3DL3 (n%)	36 (80)	13 (48.14)	22 (55)	0.015
3DS1 (n%)	23 (51.1)	14 (51.85)	23 (57.5)	0.35
2DP1 (n%)	39 (86.6)	19 (70.37)	30 (75)	0.26
3DP1 (n%)	3 (6.66)	4 (14.81)	10 (25)	0.11
3DP1*003 (n%)	36 (80)	13(48.1)	23 (57.5)	0.012
HLA-A-Bw ⁴ (n%)	8 (17.77)	9 (33.3)	12 (30)	0.33
HLA-A aploype (n%)	18 (40)	12 (44.4)	20 (50)	0.68
A+B aploype (n%)	26 (57.7)	15 (55,5)	20 (50)	0.78
HLA-C1 aploype(n%)	13 (28.88)	5 (18.51)	19 (47.5)	0.069
HLA-C2 aploype (n%)	12 (26.66)	9 (33.3)	14 (35)	0.83
HLA-B-Bw4 ^{-T} (n%)	14 (31.11)	4 (14.81)	12 (30)	0.37
HLA-B-Bw4 ¹ (n%)	3 (6.66)	1 (3.7)	6 (15)	0.42
2DL 2 HLA C1 (n%)	7 (15.5)	4 (14.81)	12 (30)	0.24
2DL 3 HLA C1 (n%)	15 (33.3)	8 (29.62)	13 (32.5)	0.67
2DS2 HLA C1 (n%)	13 (28.87)	11 (40.74)	14 (35)	0.54
2DS2 -HLAC2 (n%)	8 (17.77)	9 (33.3)	11 (27.5)	0.40
2DL2 HLAC2 (n%)	8 (17.77)	7 (25.92)	9 (22.5)	0.24
2DS1HLAC2 (n%)	5 (11.11)	2 (7.40)	7 (17.5)	0.67
2DL1HLAC1 (n%)	2 (4.4)	4 (14.81)	9 (22.5)	0.047
2DL2 HLAC1 (n%)	7 (15.5)	4 (14.81)	12 (30)	0.24
2DL1 HLA C2 (n%)	7 (15.5)	3 (11.11)	7 (17.5)	0.88

Tabella 6: modello di regressione logistica degli aplotipi KIR predittivi del sottotipo TOAST dell'ictus ischemico

Variable	Beta	Exp (β)	95% Confidence Interval for Exp(B)	p value
LAAS subtype				
2DL1	-0.24	0,78	0,17-3,46	0,75
2DL2	1.066	2,9	0,79-10,54	0,1
2DL3	0.91	2,48	0,32-18,39	0,37
2DL4	2.22	9,21	0,96-87,79	0,05
2DL5A	2.05	7,78	0,56-106,83	0,12
2DL5B	-0.50	0,6	0,13-2,70	0,51
2DS1	-0.68	0,5	0,90-2,8	0,43
2DS2	-1.07	0,34	0,91-1,27	0,1
2DS3	1.24	3,46	0,79-15,19	0,1
2DS4	0.43	1,55	0,43-5,50	0,5
2DS5	-1.16	0,31	0,48-2,03	0,22
3DL1	0.88	2,41	0,38-15,33	0,34
3DL2	-1.031	0,35	0,02-4,45	0,42
3DL3	-0.829	0,43	0,02-7,33	0,56
3DS1	-0.244	0,78	0,19-3,09	0,72
2DP1	-0.053	0,94	0,09-9,06	0,96
3DP1	0.771	2,16	0,20-22,48	0,51
3DP1003	1.096	2,99	0,243,26	0,42
CEI subtype				
2DL1	-0.226	0,79	0,18-3,4	0,76
2DL2	0.144	1,15	0,31-4,28	0,83
2DL3	0.844	2,2	0,43-12,54	0,32
2DL4	0.801	2,22	0,35-14,04	0,39
2DL5A	2.81	16,67	1,23-225,4	0,34
2DL5B	0.657	1,92	0,45-8,21	0,37
2DS1	0.723	2,06	0,39-10,77	0,39
2DS2	-0.264	0,7	0,20-2,83	0,69
2DS3	-0.169	0,84	0,19-3,63	0,82
2DS4	0.058	1,06	0,30-3,65	0,92
2DS5	0.379	1,461	0,30-6,97	0,63
3DL1	2.17	8,79	1,41-54,59	0,02
3DL2	-0.92	0,39	0,043-3,61	0,41
3DL3	-0.88	0,41	0,042-4,06	0,44

3DS1	0.010	1,01	0,26-3,90	0,98
2DP1	0.75	2,11	0,30-14,59	0,44
3DP1	1.667	5,29	0,76-36,71	0,09
3DP1003	0.001	1,00	0,08-11,32	0,99
Lacunar subtype				
2DL1	0.176	1,193	0.32-4.4	0.79
2DL2	-0.740	0,477	0.15-1.48	0.20
2DL3	-0.588	0.555	0.12-2.52	0.44
2DL4	-1.399	0.247	0.046-1.31	0.10
2DL5A	-2.361	0.094	0.008-1.121	0.06
2DL5B	-0.155	0.856	0.23-3.15	0.81
2DS1	-0.035	0.965	0.21-4.25	0.96
2DS2	0.737	2.089	0.65-6.70	0.21
2DS3	-0.477	0.620	0.17-2.16	0.45
2DS4	-0.255	0.775	0.25-2.32	0.65
2DS5	0.273	1.314	0.30-5.58	0.71
3DL1	-1.517	0.219	0.046-1.03	0.05
3DL2	0.913	2.491	0.34-18.27	0.36
3DL3	0.493	1.637	0.22-11.98	0.62
3DS1	0.105	1.110	0.33-3.70	0.86
2DP1	-0.353	0.702	0.12-3.84	0.68
3DP1	-1.022	0.360	0.063-2.07	0.25
3DP1003	-0.123	0.884	0.10-7.21	0.90

Tabella 7: modello di regressione logistica degli alleli HLA e delle interazioni HLA-KIR del sottotipo TOAST dell'ictus ischemico

Variable	Beta	Exp (β)	95% Confidence Interval for Exp (β)	p Value
LAAS subtype				
HLAABw4	-1.322	0,26	0,07-1,01	0,05
AB aplotype	-0.13	0,87	0,27-2,8	0,82
HLAC1	0.31	1,37	0,29-6,36	0,68
HLAC2	-0.46	0,62	0,14-2,66	0,52
HLABBw4T	1.006	2,73	0,59-12,53	0,19
HLABBw4I	0.87	2,4	0,19-30,19	0,49
2DL2HLAC1	0.10	1,1	0,26-4,66	0,89
2DL3HLAC1	0.48	1,63	0,47-5,60	0,43
2DS2HLAC1	-0.89	0,4	0,12-1,33	0,13
2DS2HLAC2	-1.35	2,58	0,06-1,03	0,06
2DL2HLAC2	-0.12	0,88	0,22-3,41	0,85
2DS1HLAC2	0.79	2,2	0,31-15,67	0,43
2DL1HLAC1	-1.46	0,23	0,03-1,64	0,14
2DL1HLAC2	-0.01	0,98	0,19-5,03	0,98
CEI subtype				
HLAABw4	-0.48	0,61	0,15-2,40	0,48
AB aplotype	-1.18	0,3	0,08-1,15	.0,08
HLAC1	2.36	10,63	2,10-53,78	0
HLAC2	1.24	3,48	0,71-17,07	0,12
HLABBw4T	0.96	2,63	0,51-13,38	0,24
HLABBw4I	2.135	8,45	0,71-100,69	0,09
2DL2HLAC1	0.64	1,91	0,43-8,33	0,38
2DL3HLAC1	0.67	1,96	0,52-7,29	0,31
2DS2HLAC1	0.26	1,3	0,37-4,56	0,67
2DS2HLAC2	-0.05	0,95	0,21-4,14	0,94
2DL2HLAC2	-0.29	0,74	0,18-3,05	0,68
2DS1HLAC2	0.68	1,97	0,27-14,06	0,49
2DL1HLAC1	0.60	1,82	0,40-8,31	0,43
2DL1HLAC2	0.78	2,19	0,39-12,19	.0,36

Lacunar subtype				
HLAABw4	1.04	2.853	0.86-9.39	0.08
HLAC1	-1.24	0.28	0.07-1.15	0.07
HLAC2	-0.29	0.74	0.21-2.61	0.65
HLABBw4T	-0.82	0.43	0.11-1.73	0.23
HLABBw4I	-1.132	0.32	0.03-3.15	0.33
2DL2HLAC1	-0.50	0.60	0.16-2.19	0.44
2DL3HLAC1	-0.64	0.52	0.17-1.57	0.25
2DS2HLAC1	0.49	1.647	0.59-4.57	0.33
2DS2HLAC2	0.76	2.156	0.67-6.85	0.19
2DL2HLAC2	0.06	1.063	0.31-3.56	0.92
2DS1HLAC2	-0.73	0.48	0.08-2.86	0.42
2DL1HLAC1	0.18	1.197	0.28-4.96	0.80
2DL1HLAC2	-0.24	0.78	0.17-3.49	0.75
aplotipoHLAA	-0.38	0.68	0.25-1.79	0.44

Bibliografia

- 1a. Oppenheim H. Lehrbruch der Nervenkrankheiten für Ärzte und Studierende; 1913, S. Karger, Berlin estratto da “ Stroke a practical Guide to Management” 2000.
- 1b. Hatano S. Experience from a multicentre stroke register: a preliminary report. Bull WHO 1976; 54; 541-553.
- 1c. Adams HP, Bendixen BH, Kappelle J, Biller J et al. TOAST Investigators. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Stroke 1993; 24: 35-41
1. Sumati Rajagopalan and Eric O. Long. Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease. JEM Vol. 201, No. 7, April 4, 2005 1025–1029.
 2. Smita Kulkarnia, Maureen P. Martinb, and Mary Carringtonb,* . The Ying and Yang of *HLA* and *KIR* in Human Disease. Semin Immunol. 2008 December; 20(6): 343–352.
 3. R. J. Boyton*† and D. M. Altmann. Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptors and human leucocyte antigen class I in disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 10.1111/j.1365-2249.2007.03424.
 4. Katz, G., Gazit, R., Arnon, T. I., Gonen-Gross, T., Tarcic, G., Markel, G., Gruda, R., Achdout, H., Drize, O., Merims, S., et al. (2004) *J. Immunol.* 173, 1819– 1825.
 5. C. Andrew Stewart^{a,b,c}, Fanny Laugier-Anfossia^b, Frédéric Ve'lya^d, Xavier Saulquina^e, Jenifer Riedmuller et al. Recognition of peptide–MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. PNAS 13224–13229 September 13, 2005 vol. 102 no.
 6. Abi-Rached, L. & Parham, P. (2005) *J. Exp. Med.* 201, 1319–1332.
 7. Carrington, M., S. Wang, M.P. Martin, X. Gao, M. Schiffman, J. Cheng, R. Herrero, A.C. Rodriguez, R. Kurman, R. Mortel, et al. 2005. Hierarchy of resistance to cervical

- neoplasia mediated by combinations of KIR and HLA loci. *J. Exp. Med.* 201;1069–1075.
8. S.I. Khakoo, C.L. Thio, M.P. Martin, C.R. Brooks, X. Gao, J. Astemborski, et al., HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection, *Science* 305 (2004) 872.
 9. J. Zhen, D. Wang, L. He, H. Zou, Y. Xu, S. Gao, et al., Genetic profile of KIR and HLA in southern Chinese Han population, *Hum. Immunol.* 75 (2014) 59
 10. A. Gaafar, A. Sheereen, A. Iqneibi, G. Mohamed, A. Al Sulaiman, H. Turpeinen, et al., Killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity in the Saudi population, *Mol. Biol. Rep.* 38 (2011) 2603.
 11. D.H. Whang, H. Park, J.A. Yoon, M.H. Park, Haplotype analysis of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in 77 Korean families, *Hum. Immunol.* 66 (2005) 146.
 12. M. Yawata, N. Yawata, K.L. McQueen, N.W. Cheng, L.A. Guethlein, R. Rajalingam, et al., Predominance of group A KIR haplotypes in Japanese associated with diverse NK cell repertoires of KIR expression, *Immunogenetics* 54 (2002) 543.
 13. Pimpun Kitpoka a, Chutima Tammakorn a, Suwit Chaisri et al. Genetic profiles of killer-cell immunoglobulin-like receptors and HLA ligands in Thai blood donors. *Human Immunology* 77 (2016) 470–475.
 14. Irene Maeve Rea^{1*}, Lynn D Maxwell², Susan E McNerlan³, H Denis Alexander⁴, Martin D Curran⁵, Derek Middleton⁶ and Owen A Ross. Killer Immunoglobulin-like Receptors (KIR) haplogroups A and B track with Natural Killer Cells and Cytokine Profile in Aged Subjects: Observations from Octo/Nonagenarians in the Belfast Elderly Longitudinal Free-living Aging Study (BELFAST). *Immunity & Ageing* 2013, 10:35.
 15. Moretta A, Bottino C, Pende D, Tripodi G, Tambussi G, Viale O, Orengo A, Barbaresi M, Merli A, Ciccone E: Identification of four subsets of human CD3–CD16+ NK cells

- by the expression of clonally distributed functional surface molecules. Correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. *J Exp Med* 1990, 172:1589–1598.
16. Tamura H, Ogata K: Natural killer cells and human longevity, chapter 27. In *Handbook on immunosenescence: basic understanding and clinical applications*. Edited by Fulop T, Franceschi C, Hirokawa K, Pawelec G. Netherlands: Springer; 2009:545–561.
 17. Nowak I, Majorczyk E, Wisniewski A, Pawlik A, Magott-Procelewska M, Passowicz-Muszynska E, Malejczyk J, Płoski R, Giebel S, Barcz E, Zoń-Giebel A, Malinowski A, Tchórzewski H, Chlebicki A, Łuszczek W, Kurpisz M, Gryboś M, Wilczyński J, Wiland P, Senitzer D, Sun JY, Jankowska R, Klinger M, Kuśnierczyk P: Does the KIR2DS5 gene protect from some human diseases? *PLoS One* 2010, 5(8):e12381.
 18. Schönberg K, Fischer JC, Kögler G, Uhrberg M: Neonatal NK-cell repertoires are functionally, but not structurally, biased toward recognition of self HLA class I. *Blood* 2011, 117:5152–5156. doi:10.1182/blood-2011-02-334441.
 19. S. Cooley, E. Trachtenberg, T.L. Bergemann, K. Saeteurn, J. Klein, C.T. Le, et al., Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia, *Blood* 113 (2009) 726.
 20. H. Zhou, X. Bao, X. Wu, X. Tang, M. Wang, D. Wu, et al., Donor selection for killer immunoglobulin-like receptors B haplotype of the centromeric motifs can improve the outcome after HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation, *Biol. Blood Marrow Transplant* 20 (2014) 98.
 21. C. Dejaco, C. Duftner, A. Klauser, and M. Schirmer, “Altered T-cell subtypes in spondyloarthritis, rheumatoid arthritis and polymyalgia rheumatica,” *Rheumatology International*, vol. 30, no. 3, pp. 297–303, 2010.

22. M. Schirmer, A. N. Vallejo, C. M. Weyand, and J. J. Goronzy, "Resistance to apoptosis and elevated expression of bcl-2 in clonally expanded CD4+CD28-T cells from rheumatoid arthritis patients," *Journal of Immunology*, vol. 161, no. 2, pp. 1018–1025, 1998.
23. C. Duftner, C. Goldberger, A. Falkenbach et al., "Prevalence, clinical relevance and characterization of circulating cytotoxic CD4+CD28-T cells in ankylosing spondylitis," *Arthritis Research & Therapy*, vol. 5, no. 5, pp. R292–R300, 2003.
24. A. E. R. Fasth, M. Dastmalchi, A. Rahbar et al., "T cell infiltrates in the muscles of patients with dermatomyositis and polymyositis are dominated by CD28null T cells," *The Journal of Immunology*, vol. 183, no. 7, pp. 4792–4799, 2009.
25. C. Dejaco, C. Duftner, J. Al-Massad et al., "NKG2D stimulated T-cell autoreactivity in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica," *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 72, no. 11, pp. 1852–1859, 2013.
26. I. E. Dumitriu, E. T. Araguas, C. Baboonian, and J. C. Kaski, "CD4+CD28null T cells in coronary artery disease: when helpers become killers," *Cardiovascular Research*, vol. 81, no. 1, pp. 11–19, 2009.
27. P. Lamprecht, F. Moosig, E. Csernok et al., "CD28 negative T cells are enriched in granulomatous lesions of the respiratory tract in Wegener's granulomatosis," *Thorax*, vol. 56, no. 10, pp. 751–757, 2001.
28. M. J. Pinto-Medel, J. A. Garc'ia-Leon, B. Oliver-Martos et al., "The CD4+ T-cell subset lacking expression of the CD28 costimulatory molecule is expanded and shows a higher activation state in multiple sclerosis," *Journal of Neuroimmunology*, vol. 243, no. 1-2, pp. 1–11, 2012.
29. J. Garc'ia de Tena, L. Manzano, J. C. Leal, E. San Antonio, V. Sualdea, and M. Alvarez-Mon, "Active Crohn's disease patients show a distinctive expansion of circulating

- memory CD4⁺CD45RO⁺CD28^{null} T cells,” *Journal of Clinical Immunology*, vol. 24, no. 2, pp. 185–196, 2004.
30. G. Liuzzo, S. L. Kopecky, R. L. Frye et al., “Perturbation of the T-cell repertoire in patients with unstable angina,” *Circulation*, vol. 100, no. 21, pp. 2135–2139, 1999.
31. E. M. M. van Leeuwen, E. B. M. Remmerswaal, M. T. M. Vossen et al., “Emergence of a CD4⁺CD28⁻ granzyme B⁺, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection,” *Journal of Immunology*, vol. 173, no. 3, pp. 1834–1841, 2004.
32. J. van Bergen, E. M. C. Kooy-Winkelaar, H. van Dongen et al., “Functional killer Ig-like receptors on human memory CD4⁺ T cells specific for cytomegalovirus,” *The Journal of Immunology*, vol. 182, no. 7, pp. 4175–4182, 2009.
33. O. K. Haffar, M. D. Smithgall, J. G. P. Wong, J. Bradshaw, and P. S. Linsley, “Human immunodeficiency virus type 1 infection of CD4⁺ T cells down-regulates the expression of CD28: effect on T cell activation and cytokine production,” *Clinical Immunology and Immunopathology*, vol. 77, no. 3, pp. 262–270, 1995.
34. Kathrin Maly and Michael Schirmer .The Story of CD4⁺CD28⁻ T Cells Revisited: Solved or Still Ongoing? *Journal of Immunology Research* Volume 2015, Article ID 348746, 11 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/348746>
35. Takako Nakajima, DDS; Stephanie Schulte; Kenneth J. Warrington, MD et al.T-Cell–Mediated Lysis of Endothelial Cells in Acute Coronary Syndromes. *Circulation*. 2002;105:570-575.
36. Park W, Weyand CM, Schmidt D, et al. Co-stimulatory pathways controlling activation and peripheral tolerance of human CD4⁺CD28⁺ T cells. *Eur J Immunol*. 1997;27:1082–1090.
37. Yen JH, Moore BE, Nakajima T, et al. MHC class I-recognizing receptors are disease

- risk genes in rheumatoid arthritis. *J Exp Med*. 2001;193: 1159–1167.
38. Liuzzo G, Kopecky SL, Frye RL, et al. Perturbation of the T-cell repertoire in patients with unstable angina. *Circulation*. 1999;100: 2135–2139.
39. Liuzzo G, Vallejo AN, Kopecky SL, et al. Molecular fingerprint of interferon-gamma signaling in unstable angina. *Circulation*. 2001;103: 1509–1514.
40. Weyand CM, Goronzy JJ, Liuzzo G, et al. T-cell immunity in acute coronary syndromes. *Mayo Clin Proc*. 2001;76:1011–1020.
41. Goronzy JJ, Weyand CM. Thymic function and peripheral T-cell homeostasis in rheumatoid arthritis. *Trends Immunol*. 2001;22:251–255.
42. Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ. Functional disruption of the CD28 gene transcriptional initiator in senescent T cells. *J Biol Chem*. 2001;276: 2565–2570.
43. . Namekawa T, Snyder MR, Yen JH, et al. Killer cell activating receptors function as costimulatory molecules on CD4CD28null T cells clonally expanded in rheumatoid arthritis. *J Immunol*. 2000;165:1138–1145.
44. Warrington KJ, Takemura S, Goronzy JJ, et al. CD4+,CD28- T cells in rheumatoid arthritis patients combine features of the innate and adaptive immune systems. *Arthritis Rheum*. 2001 Jan;44(1):13-20.
45. Jose Enrique Martínez-Rodríguez, Jessica Munné-Collado, Raquel Rasal, Elisa Cuadrado, Luis Roig, Angel Ois, Aura Muntasell, Teresa Baro, Francesc Alameda, Jaume Roquer, Miguel López-Botet .Expansion of the NKG2C+ Natural Killer-Cell Subset Is Associated With High-Risk Carotid Atherosclerotic Plaques in Seropositive Patients for Human Cytomegalovirus .(*Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:2653-2659.)
46. D. Schmidt, J. J. Goronzy, and C. M. Weyand, “CD4+ CD7- CD28- T cells are expanded in rheumatoid arthritis and are characterized by autoreactivity,” *The Journal of Clinical*

- Investigation, vol. 97, no. 9, pp. 2027–2037, 1996.
47. D. Schmidt, P. B. Martens, C. M. Weyand, and J. J. Goronzy, “The repertoire of CD4+ CD28-T cells in rheumatoid arthritis,” *Molecular Medicine*, vol. 2, no. 5, pp. 608–618, 1996.
 48. E. M. M. van Leeuwen, E. B. M. Remmerswaal, M. T. M. Vossen et al., “Emergence of a CD4+CD28– granzyme B+, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection,” *Journal of Immunology*, vol. 173, no. 3, pp. 1834–1841, 2004.
 49. J. van Bergen, E. M. C. Kooy-Winkelaar, H. van Dongen et al., “Functional killer Ig-like receptors on human memory CD4+ T cells specific for cytomegalovirus,” *The Journal of Immunology*, vol. 182, no. 7, pp. 4175–4182, 2009.
 50. B. Zal, J. C. Kaski, G. Arno et al., “Heat-shock protein 60- reactive CD4+CD28null T cells in patients with acute coronary syndromes,” *Circulation*, vol. 109, no. 10, pp. 1230–1235, 2004.
 51. W. van Eden, R. van der Zee, and B. Prakken, “Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 5, no. 4, pp. 318–330, 2005
 52. H. Yen, B. E. Moore, T. Nakajima et al., “Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis,” *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 193, no. 10, pp. 1159–1167, 2001.
 53. G. David, Z. Djaoud, C. Willem et al., “Large spectrum of HLA-C recognition by killer Ig-like receptor (KIR)2DL2 and KIR2DL3 and restricted C1 specificity of KIR2DS2: dominant impact of KIR2DL2/KIR2DS2 on KIR2D NK cell repertoire formation,” *Journal of Immunology*, vol. 191, no. 9, pp. 4778–4788, 2013.

54. B. Zal, N. Chitalia, Y. S. Ng et al., "Killer cell immunoglobulin receptor profile on CD4+ CD28- T cells and their pathogenic role in nondialysis and dialysis dependent chronic kidney disease patients," *Immunology*, 2014.
55. Takako Nakajima, Ömer Goek, Xiaoyu Zhang, Stephen L .s De Novo Expression of Killer Immunoglobulin-Like Receptors and Signaling Proteins Regulates the Cytotoxic Function of CD4 T Cells in Acute Coronary syndromes. *Circ. Res.* 2003;93;106-113;
56. Liuzzo G, Goronzy JJ, Yang H, Kopecky SL, Holmes DR, Frye RL, Weyand CM. Monoclonal T-cell proliferation and plaque instability in acute coronary syndromes. *Circulation.* 2000;101:2883-2888.
57. . Namekawa T, Wagner UG, Goronzy JJ, Weyand CM. Functional subsets of CD4 T cells in rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum.* 1998;41: 2108 -2116.
58. Snyder MR, Lucas M, Vivier E, Weyand CM, Goronzy JJ. Selective activation of the c-Jun NH2-terminal protein kinase signaling pathway by stimulatory KIR in the absence of KARAP/DAP12 in CD4 T cells. *J Exp Med.* 2003;197:437- 449.
59. Lagrand WK, Visser CA, Hermens WT, Niessen HW, Verheugt FW, Wolbink GJ, Hack CE. C-reactive protein as a cardiovascular risk factor: more than an epiphenomenon? *Circulation.* 1999;100:96 -102.
60. Kinlay S, Selwyn AP, Libby P, Ganz P. Inflammation, the endothelium, and the acute coronary syndromes. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998; 32(suppl 3):S62-S66.
61. Nelson GW, Martin MP, Gladman D, Wade J, Trowsdale J, Carrington M. Cutting edge: heterozygote advantage in autoimmune disease: hierarchy of protection/susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in psoriatic arthritis. *J Immunol.* 2004; 173(7):4273-6.

62. JA Traherne^{1,2,6}, W Jiang^{2,6}, AM Valdes³, JA Hollenbach⁴, J Jayaraman², JA Lane⁵, C Johnson², J Trowsdale^{1,2} and JA Noble. KIR haplotypes are associated with late-onset type 1 diabetes in European–American families. *Genes and Immunity* (2016) 17, 8–12
63. Epstein SE, Zhu J, Burnett MS, Zhou YF, Vercellotti G, Hajjar D. Infection and atherosclerosis: potential roles of pathogen burden and molecular mimicry. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1417–1420.
64. Roquer J, Cuadrado-Godia E, Giralt-Steinhauer E, Jimena S, Jiménez-Conde J, Martínez-Rodríguez JE, Ois A, Rodríguez-Campello A. Previous infection and stroke: a prospective study. *Cerebrovasc Dis.* 2012;33:310–315.
65. Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Blankenberg S, Bickel C, Kopp H, Victor A, Hafner G, Prellwitz W, Schlumberger W, Meyer J. Impact of infectious burden on progression of carotid atherosclerosis. *Stroke.* 2002;33:2581–2586.
66. Hsue PY, Hunt PW, Sinclair E, Brecht B, Franklin A, Killian M, Hoh R, Martin JN, McCune JM, Waters DD, Deeks SG. Increased carotid intima-media thickness in HIV patients is associated with increased cytomegalovirus-specific T-cell responses. *AIDS.* 2006;20:2275–2283.
67. Muntasell A, Vilches C, Angulo A, López-Botet M. Adaptive reconfiguration of the human NK-cell compartment in response to cytomegalovirus: a different perspective of the host-pathogen interaction. *Eur J Immunol.* 2013;43:1133–1141.
68. Björkström NK, Riese P, Heuts F, Andersson S, Fauriat C, Ivarsson MA, Björklund AT, Flodström-Tullberg M, Michaëlsson J, Rottenberg ME, Guzmán CA, Ljunggren HG, Malmberg KJ. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56^{dim} NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood.* 2010;116:3853–3864.

69. Lopez-Vergès S, Milush JM, Schwartz BS, Pando MJ, Jarjoura J, York VA, Houchins JP, Miller S, Kang SM, Norris PJ, Nixon DF, Lanier LL. Expansion of a unique CD57+ NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:14725–14732.
70. Foley B, Cooley S, Verneris MR, Curtsinger J, Luo X, Waller EK, Anasetti C, Weisdorf D, Miller JS. Human cytomegalovirus (CMV)-induced memory-like NKG2C(+) NK cells are transplantable and expand in vivo in response to recipient CMV antigen. *J Immunol*. 2012;189:5082–5088.
71. Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). *Annu Rev Immunol*. 2009;27:165–197 .
72. Diana V. Maltseva¹, Dmitry A. Sakharov¹, Evgeny A. Tonevitsky¹, Hinnak Northoff² and Alexander G. Tonevitsky. Killer cell immunoglobulin-like receptors and exercise. *EIR* 17 2011
73. Shah PK. Plaque disruption and thrombosis: potential role of inflammation and infection. *Cardiol. Rev*. 2000; 8:31-39.
74. Arroyo LH; et al- Mechanisms of plaque rupture: mechanical and biologic interactions. *Cardiol. Rev*. 1999.; 41:369-375.
75. Farb A. et al- Sudden coronary death: frequency of active coronary lesions, inactive coronary lesions, and myocardial infarction. *Circulation*. 1995; 92:1701-1709.
76. Takako Nakajima et al.-Cytotoxic CD4 T cells in acute coronary syndrome. *Circulation* 2002; 105; 570-575.
77. Nakajima T, Goek O, Zhang X, Kopecky SL, Frye RL, Goronzy JJ, Weyand CM. De novo expression of killer immunoglobulin-like receptors and signaling proteins regulates the cytotoxic function of CD4 T cells in acute coronary syndromes. *Circ Res*. 2003 Jul 25;93(2):106-13.

78. Offner et al 2006a. Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system. *J. Cereb Blood Flow Metab*,26, 654-665.
79. Offner et al 2006b. Splenic atrophy in experimental stroke is accompanied by increase regulatory T cells and circulating macrophages. *J. Immunol.* 176, 6523-6531.
80. Jun Y et al et al 2008- Immune activation in the peripheral blood of patients with acute ischemic stroke. *Journal Neuroimmunology* 206(2009) 112-117.
81. Tuttolomondo A, Pecoraro R, Casuccio A, Di Raimondo D, Buttà C, Clemente G, Della Corte V, Guggino G, Arnao V, Maida C, Simonetta I, Maugeri R, Squatrito R, Pinto A. Peripheral frequency of CD4+ CD28- cells in acute ischemic stroke: relationship with stroke subtype and severity markers. *Medicine (Baltimore)*. 2015 May;94(20):e813,
82. Liuzzo G, Biasucci LM, Trotta G, Brugaletta S, Pinnelli M, Digianuario G, Rizzello V, Rebuzzi AG, Rumi C, Maseri A, Crea F. Unusual CD4+CD28null T lymphocytes and recurrence of acute coronary events. *J Am Coll Cardiol.* 2007 Oct 9;50(15):1450.
83. -8 Liuzzo G, Goronzy JJ, Yang H, Kopecky SL, Holmes DR, Frye RL, Weyand CM. Monoclonal T-cell proliferation and plaque instability in acute coronary syndromes. *Circulation.* 2000 Jun 27;101(25):2883-8.
84. Liuzzo G, Kopecky SL, Frye RL, O'Fallon WM, Maseri A, Goronzy JJ, Weyand CM. Perturbation of the T-cell repertoire in patients with unstable angina. *Circulation.* 1999 Nov 23;100(21):2135-9.
85. Arumugam, T.V., Granger, D.N., Mattson, M.P. Stroke and T-cells. *Neuromolecular Med.* 20057, 229–242.
86. Huang, J., Upadhyay, U.M., Tamargo, R.J. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg. Neurol.* 2006; 86: 232–245.
87. Nilupul, P.M., Ma, H.K., Arakawa, S., Howells, D.W., Markus, R., Rowe, C.C., Donnan, G.A., Inflammation following stroke. *J. Clin. Neurosci.* 200613, 1–8.

88. Schroeter, M., Jander, S., Witte, O.W., Stoll, G., Local immune responses in the rat cerebral cortex after middle cerebral artery occlusion. *J. Neuroimmunol* 1994. 55, 195–203.
89. Offner, H., Subramanian, S., Parker, S.M., Afentoulis, M.E., Vandenberg, A.A., Hurn, P.D., 2006a. Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 26, 654–665.
90. Nowik M, Nowacki P, Grabarek J, Drechsler H, Białecka M, Widecka K, Stankiewicz J, Safranow K. Can we talk about CD4+CD28- lymphocytes as a risk factor for ischemic stroke? *Eur Neurol.* 2007;58(1):26-33 .
91. Nadareishvili ZG, Li H, Wright V, Maric D, Warach S, Hallenbeck JM, Dambrosia J, Barker JL, Baird AE. Elevated pro-inflammatory CD4+CD28- lymphocytes and stroke recurrence and death. *Neurology.* 2004 Oct 26;63(8):1446-51.
92. Licata G, Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Corrao S, Di Sciacca R, Pinto A. Immuno-inflammatory activation in acute cardio-embolic strokes in comparison with other subtypes of ischaemic stroke. *Thromb Haemost.* 2009 May;101(5):929-37;
93. Tuttolomondo A, Di Sciacca R, Di Raimondo D, Serio A, D'Aguzzo G, La Placa S, Pecoraro R, Arnao V, Marino L, Monaco S, Natalè E, Licata G, Pinto A. Plasma levels of inflammatory and thrombotic/fibrinolytic markers in acute ischemic strokes: relationship with TOAST subtype, outcome and infarct site. *J Neuroimmunol.* 2009 Oct 30;215(1-2):84-89.
94. Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nature Rev Immunol* 2005; 5:201–462.
95. Williams AP, Bateman AR, Khakoo SI. Hanging in the balance: KIR and their role in disease. *Mol Interv* 2005; 5:226–40.

96. Rajagopalan S, Long EO. Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease. *J Exp Med* 2005; 201:1025–9.
97. Shilling HG, Young N, Guethlein LA et al. Genetic control of human NK cell repertoire. *J Immunol* 2002; 169:239.
98. Nelson GW, Martin MP, Galdman D et al. Cutting edge: heterozygote advantage in automimmune disease: hierarchy of protection/ susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in psoriatic arthritis. *J Immunol* 2004; 173:4273–6.
99. Arroyo LH, Lee RT. Mechanisms of plaque rupture: mechanical and biologic interactions. *Cardiovasc Res.* 1999;41:369–375.
100. Shah PK. New insights into the pathogenesis and prevention of acute coronary syndromes. *Am J Cardiol.* 1997;79:17–23.
101. Libby P. Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis, and stabilization. *Am J Cardiol.* 2000;86: 3J–8J.
102. Galis ZS, Sukhova GK, Kranzhofer R, Clark S, Libby P. Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrixdegrading proteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:402–406.
103. Shah PK, Falk E, Badimon JJ, Fernandez-Ortiz A, Mailhac A, Villareal-Levy G, Fallon JT, Regnstrom J, Fuster V. Human monocytederived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques: potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation.* 1995;92: 1565–1569.
104. Liuzzo G, Goronzy JJ, Yang H, Kopecky SL, Holmes DR, Frye RL, Weyand CM. Monoclonal T-cell proliferation and plaque instability in acute coronary syndromes. *Circulation.* 2000;101:2883–2888.

105. Hansson GK, Zhou X, Tornquist E, Paulsson G. The role of adaptive immunity in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;902:53–62.
106. Nakajima T, Schulte S, Warrington KJ, Kopecky SL, Frye RL, Goronzy JJ, Weyand CM. T-cell-mediated lysis of endothelial cells in acute coronary syndromes. *Circulation.* 2002;105:570–575.
107. Nakajima T, Goek O, Zhang X, Kopecky SL, Frye RL, Goronzy JJ, Weyand CM. De novo expression of killer immunoglobulin-like receptors and signaling proteins regulates the cytotoxic function of CD4 T cells in acute coronary syndromes. *Circ Res.* 2003 Jul 25;93(2):106-13.
108. Martínez-Rodríguez JE, Munné-Collado J, Rasal R, Cuadrado E, Roig L, Ois A, Muntasell A, Baro T, Alameda F, Roquer J, López-Botet M. Expansion of the NKG2C+ natural killer-cell subset is associated with high-risk carotid atherosclerotic plaques in seropositive patients for human cytomegalovirus. Martínez-Rodríguez JE. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013 Nov;33(11):2653-9
109. Tuttolomondo A, Pecoraro R, Casuccio A, Di Raimondo D, Buttà C, Clemente G, Della Corte V, Guggino G, Arnao V, Maida C, Simonetta I, Maugeri R, Squadrito R, Pinto A. Peripheral Frequency of CD4+ CD28- Cells in Acute Ischemic Stroke: Relationship With Stroke Subtype and Severity Markers. *Medicine (Baltimore).* 2015 May;94(20):e81.
110. Rohde LE, Hennekens CH, Ridker PM. Cross-sectional study of soluble intercellular adhesion molecule-1 and cardiovascular risk factors in apparently healthy men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19: 1595–1599.
111. Hackman A, Abe Y, Insull W Jr, Pownall H, Smith L, Dunn K, Gotto AM Jr, Ballantyne CM. Levels of soluble adhesion molecules in patients with dyslipidemia. *Circulation.* 1996;93:1334–1338.

112. Ferri C, Desideri G, Valenti M, Bellini C, Pasin M, Santucci A, De Mattia G. Early upregulation of endothelial adhesion molecules in obese hypertensive men. *Hypertension*. 1999;34:568–573.
113. Kawamura T, Umemura T, Kanai A, Uno T, Matsumae H, Sano T, Sakamoto N, Sakakibara T, Nakamura J, Hotta N. The incidence and characteristics of silent cerebral infarction in elderly diabetic patients: association with serum-soluble adhesion molecules. *Diabetologia*. 1998; 41:911–917.
114. Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Lybarger L, Song YJ, Yang L, French AR, Sunwoo JB, Lemieux S, Hansen TH, Yokoyama WM. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 2005;436:709–713.
115. Kim S, Sunwoo JB, Yang L, Choi T, Song YJ, French AR, Vlahiotis A, Piccirillo JF, Cella M, Colonna M, Mohanakumar T, Hsu KC, Dupont B, Yokoyama WM. HLA alleles determine differences in human natural killer cell responsiveness and potency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:3053– 3058.
116. Hashimoto T, Hayakawa M, Funatsu N, Yamagami H, Satow T, Takahashi JC, Nagatsuka K, Ishibashi-Ueda H, Kira JI, Toyoda K Histopathologic Analysis of Retrieved Thrombi Associated With Successful Reperfusion After Acute Stroke Thrombectomy..*Stroke*. 2016 Dec;47(12):3035-3037
117. Boeckh-Behrens T, Schubert M, Förschler A, Prothmann S, Kreiser K, Zimmer C, Riegger J, Bauer J, Neff F, Kehl V, Pelisek J, Schirmer L, Mehr M, Poppert H. The Impact of Histological Clot Composition in Embolic Stroke. *Clin Neuroradiol*. 2016 Jun; 26(2):189-97.