



Effetti delle modalità di sterilizzazione sulla biocompatibilità dei filtri per emodialisi

F. Aucella, M. Vigilante, C. Stallone

*Divisione di Nefrologia e Dialisi,
Ospedale "Casa Sollievo della Sofferenza" IRCCS - San Giovanni Rotondo (FG)*

Nella pratica clinica quotidiana l'uso dei biomateriali ha avuto nell'ultimo decennio un incremento esponenziale. Esso peraltro è sicuramente gravato da carenti o quantomeno incomplete conoscenze sulle interazioni tra i biomateriali stessi e l'organismo umano (1). Gli effetti collaterali dovuti a tali interazioni non hanno evidenza clinica immediata, ma ne esistono di potenzialmente fatali (2). Negli ultimi 10 anni, dopo la formulazione della "interleukin hypothesis" (3), si è giunti ad una migliore comprensione degli effetti biologici delle citochine proinfiammatorie nonché al riconoscimento della stretta somiglianza tra gli effetti biologici di tali citochine e la patologia correlata alla dialisi, sottolineando quindi la possibilità che tali molecole siano coinvolte direttamente nella genesi dei sintomi dialisi indotti (3). Numerosi studi hanno consentito di individuare svariati fattori implicati nella produzione intradialitica di citochine. In questo ambito sono noti i vantaggi della dialisi condotta con dialisato sterile o ultrapuro (4) e si preferiscono membrane che determinano una minore attivazione del complemento, ovvero quelle sintetiche. Gli agenti sterilizzanti possono

essere anch'essi coinvolti nel manifestarsi di reazioni avverse sia in via diretta, tramite la persistenza di residui, anche in traccia, che in via indiretta, tramite l'induzione di modificazioni chimico-fisiche dei biomateriali. Ampia letteratura è disponibile sulle reazioni avverse causate dall'ossido di etilene (ETO) (5), e sul beneficio indotto dall'uso di filtri sterilizzati a vapore o a raggi gamma (6).

Invece, a tutt'oggi non è noto se differenti modalità di sterilizzazione possano definire differenti profili di biocompatibilità delle membrane per emodialisi, cosa che potrebbe provocare anche una differente produzione di citochine. In due recenti studi (7, 8) il nostro gruppo ha valutato questi aspetti e qui ne illustriamo i risultati più interessanti nella pratica clinica quotidiana.

Materiali e metodi

Studio A

Sono stati arruolati nello studio sei soggetti uremici in trattamento emodialitico periodico con età anagrafica media di 54 ± 12 anni, ed età dialitica di 28 ± 36 mesi. Essi risultavano esen-

ti da patologia neoplastica, immunologica o sistemica, e non presentavano anamnesi positiva per recenti episodi infettivi. La patologia di base dei pazienti arruolati era: pielonefrite cronica (n.2), amiloidosi, reni policistici, glomerulonefrite cronica (n. 2). I pazienti risultavano già in trattamento con polisulfone low-flux (F6 Fresenius AG) da almeno tre mesi. Dopo una valutazione basale (A1), essi venivano trasferiti al trattamento con la medesima membrana, ma sterilizzata a vapore.

Una nuova valutazione veniva eseguita dopo uno (B1) e due (B2) mesi. Infine, un'ulteriore valutazione si eseguiva dopo un mese dal ritorno al trattamento con F6 (A2).

Lo schema dello studio era pertanto del tipo A-B-A.

Tutti i parametri della seduta emodialitica, nonché il bagno dialisi ed il monitor in uso, rimanevano inalterati. Veniva eseguita in tutti i casi dialisi con bicarbonato della durata di 4 ore in ritmo trisettimanale. In ogni fase dello studio venivano eseguiti:

- a) LAL-test su liquido di dialisi all'attacco e allo stacco dialisi, al fine di documentare eventuali inquinamenti del liquido di dialisi;
- b) valutazione del rilascio di IL- 1 β

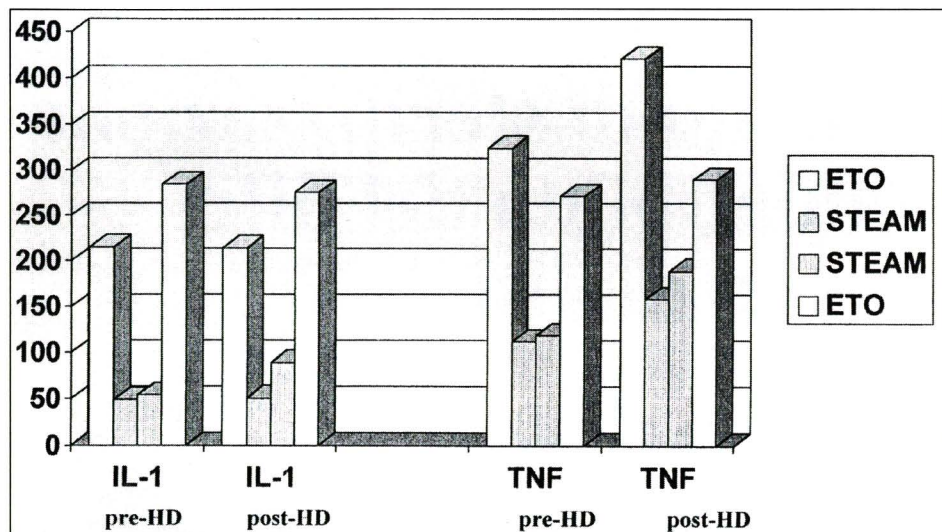


Fig. 1 - Rilascio di citochine da mononucleati in coltura con membrana in polisulfone low-flux sterilizzata con ossido di etilene o vapore (F6 e F6HPS, Fresenius AG).

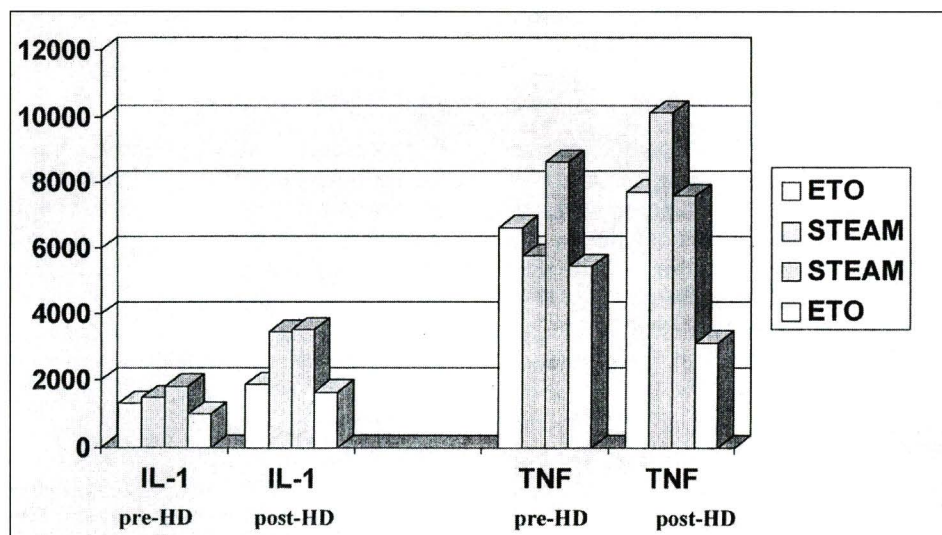


Fig. 2 - Rilascio di citochine da mononucleati in coltura con membrana in cuprophan sterilizzata con ossido di etilene o vapore (filtri E3 e E3S, Fresenius AG).

e TNF α da colture di mononucleati (MN) sia pre che post-dialisi, dopo incubazione di 24h, al fine di documentare l'attivazione delle cellule circolanti;

c) livelli delle anafilotossine C3a e C5a ai tempi 0', 5', 15' e 60' della seduta (metodica RIA, test Amersham, Arlington Heights, IL, USA);

d) nelle fasi A1, B2 e A2 prelievo per IgEantiETO.

Tutti i rilievi venivano effettuati nella seduta emodialitica di metà settimana; i campioni ematici erano prelevati dall'ago arterioso.

Studio B

Erano arruolati 8 soggetti uremici in TEP con età anagrafica di 67 ± 15 anni e anzianità dialitica di 96 ± 115 mesi. La patologia di base era rappresentata da: glomerulonefrite (n.3), pielonefrite (n.2), malattia policistica renale (n. 1) ed ipertensione arteriosa (n. 2). Tutti erano esenti da neoplasie, sindromi allergiche o connettiviti, ed erano già in trattamento con membrana in cuprophan sterilizzata con ETO da almeno due mesi (C-ETO, E3 Fresenius AG). Secondo lo schema dello studio A, i pazienti ese-

guivano il test basale, indi erano passati al trattamento con membrana in cuprophan trattata al vapore (C-Steam E3S Fresenius AG) ove eseguivano test di controllo dopo 1 e 2 mesi; infine l'ultima valutazione si eseguiva dopo un mese dal ritorno alla membrana C-ETO.

Preparazione dei MN

Da un campione di sangue di 10 ml raccolto in sodio citrato 3.8% (1:10) si isolavano dapprima i MN mediante centrifugazione su Ficoll/Hypaque (9). Conte differenziate mostravano una purezza >96%. I MN venivano risospesi alla concentrazione di 5×10^6 cellule /ml in RPMI contenente 2% di FCS supplementato +1% di PenStrep e 1% di glutammina ed incubati per 24 ore in piastre di Petri. Trascorso tale periodo il surnatante veniva prelevato, centrifugato a 19.000 g per 5' allo scopo di eliminare ogni residuo cellulare e conservato a -80°C fino al momento in cui si eseguiva il dosaggio delle citochine. IL-1 β e TNF α sono state dosate con metodica ELISA (Bouty, Milano, Italia). I valori sono espressi in pg/ml/milione di cellule.

LAL Test

La quantità di endotossina presente nel dialisato è stata valutata mediante LAL-test cromogenico quantitativo (QCL-1000, Bio-Whittaker).

IgE ETO specifiche

Il dosaggio era effettuato con kit radioimmunologico e i risultati espressi in ku/L.

Statistica

I dati sono espressi come media \pm DS, tranne dove diversamente specificato. La significatività statistica era fissata a <0.05 , essa veniva analizzata con test non parametrico di Wilcoxon con un comune programma statistico su PC.

Risultati

LAL-test

I risultati del LAL-test mostravano una buona qualità del dialisato in tut-

te le fasi dello Studio A e B.

Nello Studio A, 4 pazienti mostravano che tutti i valori risultavano inferiori a 0.5 EU/ml; nei rimanenti due si verificavano tre modesti episodi di inquinamento. Nello Studio B, 6 soggetti avevano sempre valori inferiori a 0,5 EU/ml, altri due singoli episodi di minimo inquinamento. In ogni caso non si riscontrava alcuna correlazione tra livelli di endotossina e produzione monocitaria di citochine ($p=0.71$ per lo Studio A e $p=0.86$ per lo Studio B).

Citochine

I risultati sono riportati nelle Figure 1 (Studio A) e 2 (Studio B).

Nello Studio A, riguardante la membrana in polisulfone low-flux, risulta evidente, nonché significativo per l'IL-1, il calo della produzione monocitaria di citochine nel passaggio da A1 a B1 ($p<0.01$); tale riduzione si confermava in B2 ($p<0.01$), mentre vi era un brusco rebound nel ritorno al filtro F6 in A2 ($p<0.01$). Questo andamento era caratterizzato di ogni singolo paziente e non risultava solo dall'analisi delle medie. Esso inoltre riguardava sia i valori pre che quelli post-dialitici. Nelle varie fasi dello studio, infine, non vi era differenza significativa tra i livelli pre e post-dialitici di IL-1 β , tranne che in B2, ove si aveva un aumento post dialitico ai limiti della significatività statistica ($p<0.05$). Il TNF- α mostrava lo stesso andamento.

Nello Studio B, in cui si valutava la membrana in cuprophan, il rilascio di citochine da MN circolanti mostrava significative variazioni, con un incremento nel secondo test, ovvero dopo un mese di trattamento con membrana steam, sia dell'IL-1 β ($p<0.03$ in pre-dialisi e $p<0.01$ in post-dialisi) che del TNF- α (n.s. in pre-dialisi e $p<0.02$ in post-dialisi). Tale andamento si confermava dopo due mesi di membrana steam, mentre una riduzione significativa si aveva dopo un mese dal ritorno alla membrana ETO (Fig. 2). Questo andamento era più marcato in post-dialisi.

IgEantiETO

Tutti i pazienti, sia nello Studio A che

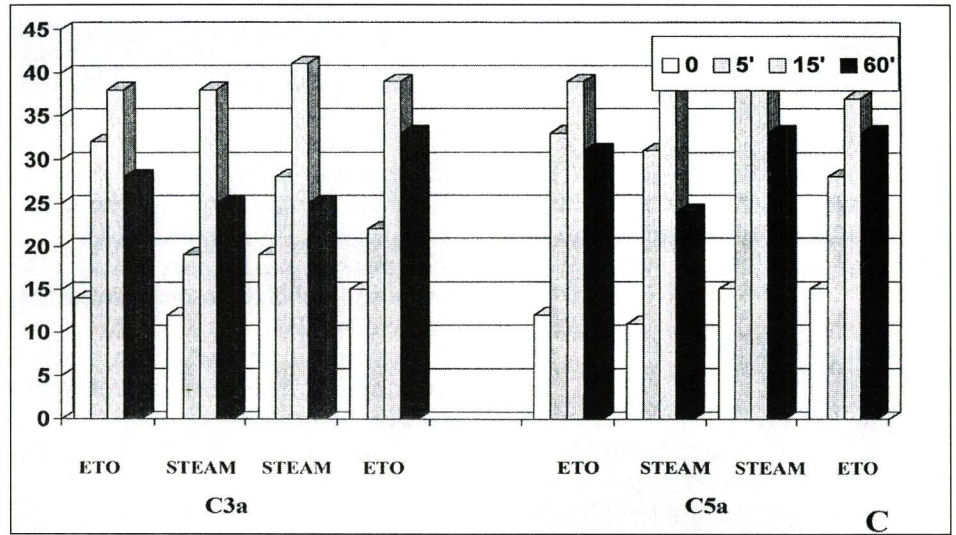


Fig. 3 - Attivazione complementare con membrana in polisulfone low-flux sterilizzata con ossido di etilene o vapore (filtri E3 e E3S, Fresenius AG).

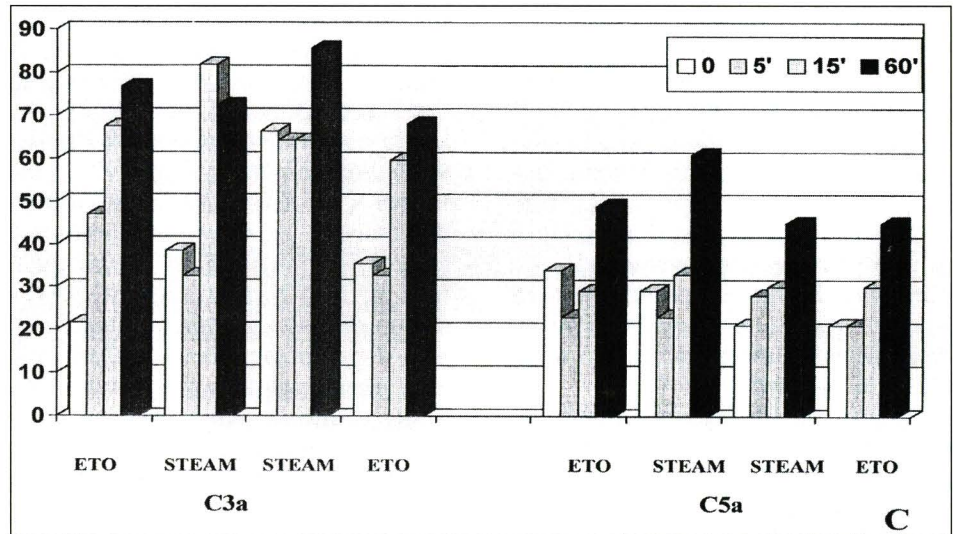


Fig. 4 - Attivazione complementare con membrana in cuprophan sterilizzata con ossido di etilene o vapore (filtri E3 e E3S, Fresenius AG).

in quello B, in tutte le fasi dello studio, mostravano valori di IgEantiETO di classe 0, ovvero inferiori a 0.35 ku/L.

Complemento

L'attivazione della cascata complementare attraverso la via alterna, tipica della seduta emodialitica, in particolare se condotta con membrane cellulose, è responsabile della stimolazione monocitaria per la trascrizione dell'mRNA per le citochine. A tale stimolazione monocitaria partecipano i frammenti C3a e C5a nonché il complesso terminale C5b-9.

Nello studio A la generazione intradialitica di anafilotossine C3a e C5a, rilevata ai tempi 0', 5', 15' e 60', non mostrava alcuna differenza significativa nei vari periodi (Fig. 3). L'incremento rispetto ai valori basali risultava modesto e pressoché sovrapponibile tra F6 ed F6-HPS. Espresso come percentuale rispetto al basale, la massima attività si aveva a 15' con valori di +26% in A1, +24% in B1, +27% in B2, +29% in A2. Pertanto la stimolazione del sistema complementare risultava modesta e costante in tutte le fasi dello studio.

Egualemente nello Studio B l'attivazione complementare non mostrava variazioni significative nei quattro test effettuati. Peraltro, come tipico delle membrane in cuprophane, si notava una notevole attivazione complementare a 15' e 60', con incrementi rispetto al basale anche del 70% (Fig. 4).

Discussione

In medicina l'uso di agenti sterilizzanti è, per ovvie ragioni, diffusissimo. Ciò nonostante vi è spesso scarsa consapevolezza dei possibili effetti collaterali di tali agenti. Nell'ambito nefrologico sarà opportuno ricordare che queste sostanze comportano rischi sia per il personale che le adopera che per i pazienti. Queste evenienze sono più evidenti in quei centri, come quelli statunitensi, ove si pratica il riutilizzo dei filtri, e dove la formaldeide, la glutaraldeide, l'acido peracetico e l'ipoclorito di sodio trovano ampio utilizzo. Per ciò che concerne i pazienti, va tenuto presente il tempo di risciacquo necessario per eliminare del tutto la presenza di tali sostanze dal circuito nonché la possibilità di un rilascio successivo delle stesse al paziente (10).

Le possibili alterazioni indotte da differenti procedure di sterilizzazione sulle caratteristiche delle membrane per emodialisi sono generalmente trascurate. Esse peraltro possono influenzare sia la struttura sia la permeabilità delle membrane stesse (11) nonché le performance depurative; sono teoricamente possibili, quindi, anche variazioni del profilo di biocompatibilità. La sterilizzazione a vapore ha teoricamente numerosi vantaggi, ma ne sono stati segnalati effetti degradanti sulle superfici di alcuni biomateriali, probabilmente attraverso la deposizione di contaminanti organici idrofobi o salini igroscopici sulle superfici dei materiali stessi, ovvero in conseguenza dei processi di dilatazione e contrazione (12).

Per quanto concerne il polisulfone low-flux (Fresenius-AG) noi stessi, nell'ambito di un ampio studio multi-

centrico (13), abbiamo documentato performance depurative esattamente sovrapponibili tra il filtro sterilizzato a vapore e quello trattato con ETO. L'ETO tuttavia è notoriamente causa di reazioni anafilattiche dovute al formarsi di anticorpi IgE contro il complesso ETO-albumina (14).

Per questo già Ritz nel 1987 (15) propose l'abbandono della sterilizzazione con ETO.

Per quanto a noi noto, non esiste a tutt'oggi in letteratura un confronto tra diverse modalità di sterilizzazione delle membrane emodialitiche per ciò che riguarda la stimolazione monocitaria alla produzione di citochine. Per valutare l'effetto diretto della membrana emodialitica sulla produzione monocitaria di citochine bisogna innanzitutto escludere significativi inquinamenti del dialisato da parte di endotossina. A tal fine il LAL-test mostrava una buona qualità del liquido di dialisi: nello Studio A, in pre-dialisi in 4/6 pazienti si ottenevano durante tutto lo studio valori inferiori a 1.5 EU/ml, mentre gli altri due avevano un valore massimo di 4 (paz. n. 1 in A1) e 5.35 EU/ml (paz. n. 2 in A2) rispettivamente. Allo stacco dialisi, egualmente i pazienti n. 3-4-5-6 presentavano valori ottimali, mentre gli altri mostravano modesti episodi di inquinamento. Nello Studio B egualmente 6/8 pazienti mostravano sempre valori ottimali e negli altri 2 si documentavano minimi episodi di inquinamento. In ogni caso, sia nello Studio A che nel B non si evidenziava alcuna relazione tra livelli di endotossina e rilascio di citochine, a nostro parere proprio per i bassi livelli di contaminazione.

La generazione intradialitica di prodotti attivati del complemento è causa nota di stimolazione monocitaria per la trascrizione di mRNA per citochine. Già Santoro et al (13) avevano mostrato un egual grado di attivazione complementare tra polisulfone low-flux sterilizzato a vapore e con ETO. Nello Studio A questo dato veniva confermato; si otteneva infatti nel corso della seduta, un incremento della generazione di C3a e C5a di modesta entità, come caratteristico delle membrane sintetiche, con picco

a 15'; gli incrementi risultavano pressoché sovrapponibili, con valori di +26% in A1 +24% in B1 +27% in B2 e +29% in A2 (Fig. 3). Il grado di attivazione risultava pertanto modesto, nettamente inferiore a quello che si otteneva nello Studio B con membrana in cuprophane (Fig. 4), ove peraltro non vi erano egualmente differenze tra le varie fasi dello studio. Poiché quindi in entrambi gli studi non si riscontravano differenze significative nell'attivazione complementare, tale fattore non poteva essere quindi responsabile del differente grado di attivazione dei MN.

Nello Studio A (polisulfone low-flux) abbiamo documentato una differente produzione di citochine, rilasciate da MN in coltura, tra F6 e F6-HPS. Sia i livelli pre-HD che quelli post-HD mostravano infatti una netta riduzione del rilascio di IL-1 β e TNF- α quando si adoperava la membrana "steam". Il fatto che tale andamento non fosse casuale era altresì documentato dal rebound, anch'esso presente in tutti i pazienti, del rilascio di citochine nella fase A2, ovvero dopo un mese dal ritorno alla membrana ETO.

Nello Studio B (cuprophane) invece, le differenze riscontrate erano di segno opposto, ovvero il rilascio di citochine era maggiore quando si adoperava la membrana sterilizzata a vapore (Fig. 2). In entrambi i casi, Studio A e B, poiché tutti gli altri parametri della seduta emodialitica erano lasciati inalterati, e poiché non si riscontravano significativi episodi di inquinamento del bagno dialisi, così come documentato dal LAL-test, l'unico fattore che poteva spiegare tale diverso comportamento era la differente sterilizzazione della membrana emodialitica. Dei tre possibili fattori scatenanti la produzione di citochine nel corso della seduta HD (16) erano stati quindi esclusi sia la contaminazione batterica del dialisato sia una differente attivazione complementare; pertanto l'unica differenza rimaneva nel contatto diretto tra MN e membrana. In accordo con Janh et al (17) ciò conferma che il diretto contatto delle cellule con il biomateriale estraneo sia sufficiente a fornire un

segnale per l'attivazione cellulare. Il nostro studio non consente di identificare il meccanismo responsabile di tale differente comportamento. Possiamo ipotizzare che la differente sterilizzazione sia in grado di modificare la struttura chimica della membrana, ovvero la presenza o la densità di cariche. È stato anche dimostrato che alcune membrane hanno la capacità di attivare direttamente un recettore linfocitario (17), verosimilmente composto di carboidrati così come altri recettori monocitari. Non si può escludere, pertanto, che la modificazione chimica della membrana possa aver fatto perdere, o abbia alterato, tale capacità. In alternativa può altresì ipotizzarsi una azione diretta di piccoli residui di ETO sui MN. Ciò che peraltro riteniamo di dover maggiormente sottolineare è la specificità dell'interazione agente sterilizzante-membrana: non a caso riscontriamo effetti opposti tra polisulfone low-flux e cuprophan.

In conclusione, risulta evidente dal presente studio che la membrana in polisulfone low-flux, se sterilizzata a vapore, presenta una ridotta attivazione dei MN per il rilascio di IL-1 β e TNF α .

Il cuprophan sembra invece avere un comportamento opposto. Avendo escluso tutti gli altri fattori che possono teoricamente interferire su tale rilascio, tale differenza va ascritta alla differente sterilizzazione; si può ipotizzare o un residuo di ETO nelle testate di poliuretano dei filtri (18) oppure un effetto diretto del vapore sulle caratteristiche chimico-fisiche della membrana. Risulta evidente che all'industria si dovrà richiedere di testare di volta in volta anche le procedure di sterilizzazione per quanto concerne il grado di attivazione monocitaria eventualmente indotta. I risultati degli studi presentati sottolineano ancora una volta la complessità delle interazioni dei biomateriali con l'organismo e confermano la necessità di valutare la biocompatibilità di un trattamento come l'effetto globale di una procedura.

BIBLIOGRAFIA

1. Klinkmann H, Falkenhagen D, Stefoni S, Bonomini V. Biocompatibility: the need for a system approach *Contrib Nephrol* 1989; 70: 213-26.
2. Daugirdas JT, Ing TS. First use reactions during hemodialysis: a definition of subtypes. *Kidney Int* 1988; 33 (S-24): 37-43.
3. Henderson LW, Koch KM, Dinarello CA, Shaldom S. Hemodialysis hypotension: the interleukin-1 hypothesis. *Blood Purif* 1983; 1: 3-8.
4. Fidelio T, Licata C, Sancipriano CP, et al. Comportamento del TNF e della beta 2 microglobulina in HDF e PFD: modificazioni indotte dall'uso di liquido ultrapuro. In: I liquidi della dialisi, Ghedini Editore 1992, 139-41.
5. Poothullil J, Shimizu A, Day RP, Dolovich J. Anaphylaxis from the product(s) of ethylene oxide gas. *Ann Intern Med* 1975; 82: 58-60.
6. Caruana RJ, Hamilton RW, Pearson FC. Dialyzer hypersensitivity syndrome: possible role of allergy to ethylene oxide. *Am J Nephrol* 1985; 5: 271-4.
7. Aucella F, Vigilante M, Grandone E, et al. Reduction of mononuclear cytokine production in hemodialysis patients treated with steam-sterilized low-flux polysulphone membranes. *Int J Artif Organs* 1998; 21: 210-5.
8. Aucella F, Vigilante M, Piemontese M, et al. Sterilizzazione del cuprophan con vapore ed ossido di etilene: relazione con la produzione linfomonocitaria di citochine. *Giorn It di Nefrol* 1998; 15: 249-54.
9. Boyum A. Isolation of mononuclear cells from human blood: isolation of mononuclear cell by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 21(Suppl 97): 77-89.
10. Stragier A. Dialyzer recycling and the environment? *EDTNA-ERCA* 1995.
11. Takesawa S, Ohmi S, Konn Y, et al. Varying methods of sterilisation and their effects on the structure and permeability of dialysis membranes. *Nephrol Dial Transplant* 1987; 1: 254-7.
12. Baier RE, Meyer AE, Akers CK, et al. Degradative effects of conventional steam sterilization on biomaterials surfaces. *Biomaterials* 1982; 3: 241-5.
13. Santoro A, Francioso A, et al. Polisulfone low-flux sterilizzato a vapore: risultati di uno studio multicentrico. In: *Evolution in Dialysis '94*, 87-97, Dakar 1994.
14. Daugirdas JT, Ing TS. First use reactions during hemodialysis: a definition of subtypes. *Kidney Int* 1988; 33 (S-24): S37 S43.
15. Bommer J, Ritz E. Ethylene oxide (ETO) as a major cause of anaphylactoid reactions in dialysis (review) *Artif Organs* 1987; 11 (2): 111-7.
16. Schindler R, Lonnemann G, Shaldom S, Koch KM, et al. Transcription, not synthesis, of interleukin-1 and tumor necrosis factor by complement. *Kidney Int* 1990; 37: 85-93.
17. Janh B, Betz M, Deppish R, et al. Stimulation of beta 2-microglobulin synthesis in lymphocytes after exposure to Cuprophan dialyzers membranes. *Kidney Int* 1991; 40: 285-90.
18. Henne W, Dietrich W, Pelger M, Von Sengbusch G. Residual ethylene oxide in hollow fiber dialyzers. *Artif Organs* 1984; 8 (3): 306-9.