

Possibilità di valutazione "on-line" dell'ultrafiltrato

C. Tetta¹, A. Santoro²

¹ Direzione Medica e Laboratori Belco, Belco SpA, Mirandola (Modena)

² Divisione di Nefrologia e Dialisi, Policlinico S. Orsola-Malpighi-USL 23, Bologna

Da sempre l'emodialisi ha rappresentato un ampio campo di ricerca clinica, biologica e tecnologica che ha visto l'occasione di un connubio necessario ed indispensabile fra gli operatori sanitari e l'industria. Laddove infatti vi è stata la condivisione di obiettivi, le idee originali si sono concretizzate in prodotti e/o applicazioni innovative. In questi anni, molto si è fatto per ottimizzare la fisiologicità della dialisi grazie all'introduzione di tecniche alternative all'emodialisi tradizionale, ad una più soddisfacente correzione dell'acidosi uremica, alla migliore qualità dei liquidi della dialisi e ad un continuo miglioramento complessivo della biocompatibilità del trattamento. Tuttavia, in questi ultimi anni, è aumentata la criticità della popolazione dialitica. Accanto ad un progressivo invecchiamento, come osservato dalle statistiche europee EDTA e statunitensi, i problemi clinici derivati dalla patologia cardiovascolare e dal diabete mellito hanno notevolmente complicato la gestione di questi pazienti. È aumentata pertanto la richiesta di una dialisi capace di assicurare l'adeguatezza, la stabilità cardiovascolare, la correzione ottimale dell'equilibrio acido-base e del bilancio di massa degli elettroliti. Ne è derivato lo sforzo da più parti tendente alla monitorizzazione dei parametri diversi ma di estremo interesse per una corretta gestione dialitica. Modelli

previsionali intradialitici così come la pronta realizzazione di scollamenti nei parametri esaminati nel corso della dialisi rispetto alle dialisi precedenti sono stati alcuni fra i sistemi di controllo della gestione dialitica e del follow-up del paziente in dialisi.

In questo editoriale, si cercherà di fornire al lettore le attualità e le prospettive del monitoraggio continuo del paziente in dialisi secondo l'approccio da noi da tempo perseguito della valutazione on-

line degli indici biochimici effettuato sull'ultrafiltrato.

Il monitoraggio continuo in dialisi: prospettive attuali e future

Gli sforzi per assicurare il monitoraggio continuo in dialisi si sono concentrati

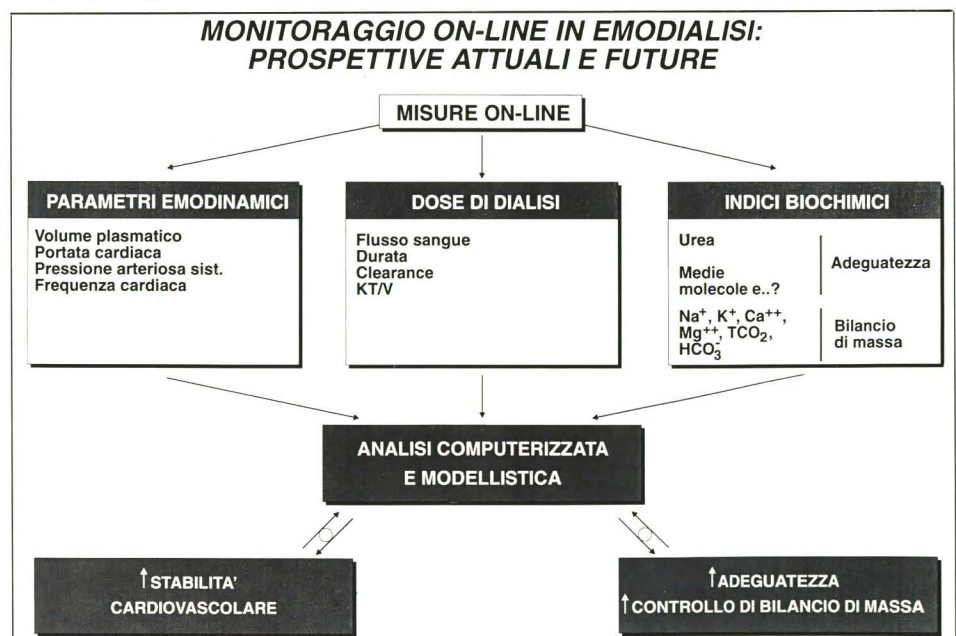


Fig. 1

principalmente su tre categorie di parametri (Fig. 1): parametri emodinamici, parametri per la verifica della "quantità" di dialisi somministrata ed infine gli indici biochimici. Ciascuno di questi parametri preso singolarmente ed in combinazione è stato spesso acquisito ed analizzato al fine di orientare verso modelli previsionali finalizzati o alla semplice segnalazione (visiva o sonora) o alla modificazione automatica di determinati parametri - macchina (biofeedback). Quest'ultimo peraltro può rappresentare un indebito superamento della valutazione clinica di quanto venutosi a creare. Inoltre, la chiusura del biofeedback presuppone l'essere in assoluto a completa conoscenza della fisiopatologia del sistema che si vuole controllare, argomento questo a tutt'oggi ancora di ricerca.

Accanto al monitoraggio di parametri emodinamici o più strettamente dialitici, si sono spesso create vie diverse per lo studio "on-line" degli indici biochimici. Si tratta di un argomento certo non nuovo nel campo della ricerca biochimica e biotecnologica dell'emodialisi che per molto tempo è rimasto vincolato alle limitazioni imposte dalle metodiche e condizioni di misura. In questo campo la biochimica e la clinica analitica hanno in questo ultimo decennio sviluppato un crescente numero di innovazioni tecnologiche tese a fornire misure precise con tecnologie selettive. Un aspetto molto rilevante è stato giocato dalla messa a punto di sistemi di microdialisi ormai ben sviluppati in campo farmacologico per il monitoraggio delle concentrazioni biologicamente attive nei sistemi di drug delivery ed in campo analitico. La microdialisi sfrutta il principio della convezione e utilizza l'acqua plasmatica così ottenuta per effettuare le misure volute.

Monitoraggio continuo in dialisi: l'ultrafiltrato come fonte privilegiata per la biosensoristica

Il termine biosensore nella sua accezione più generale indica un oggetto che posto in ambiente biologico "sente" le variazioni di concentrazione di un determina-

Fig. 2

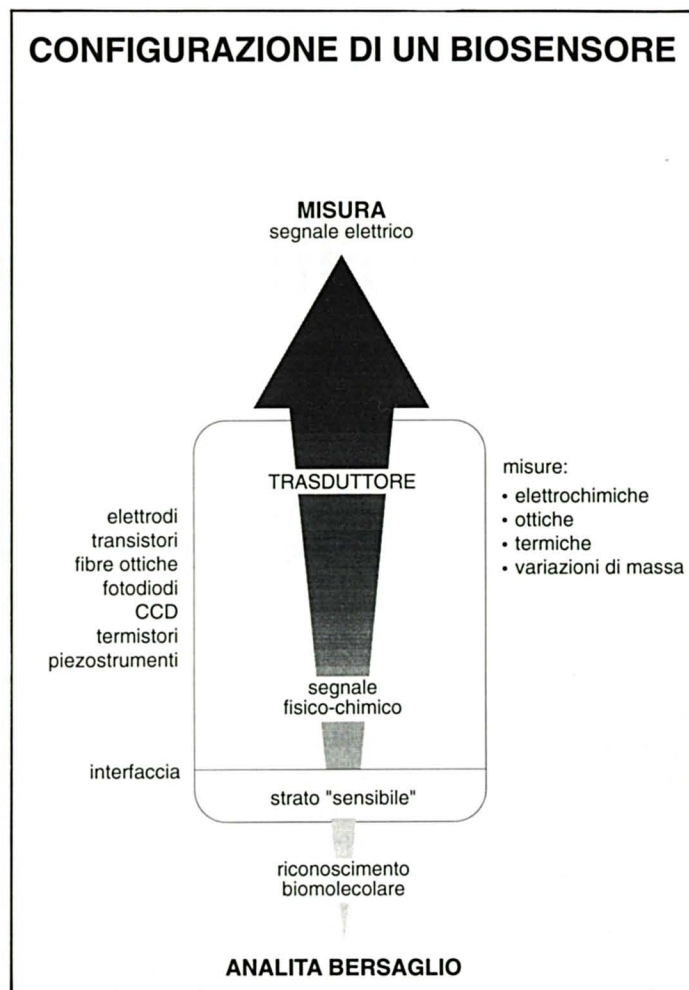
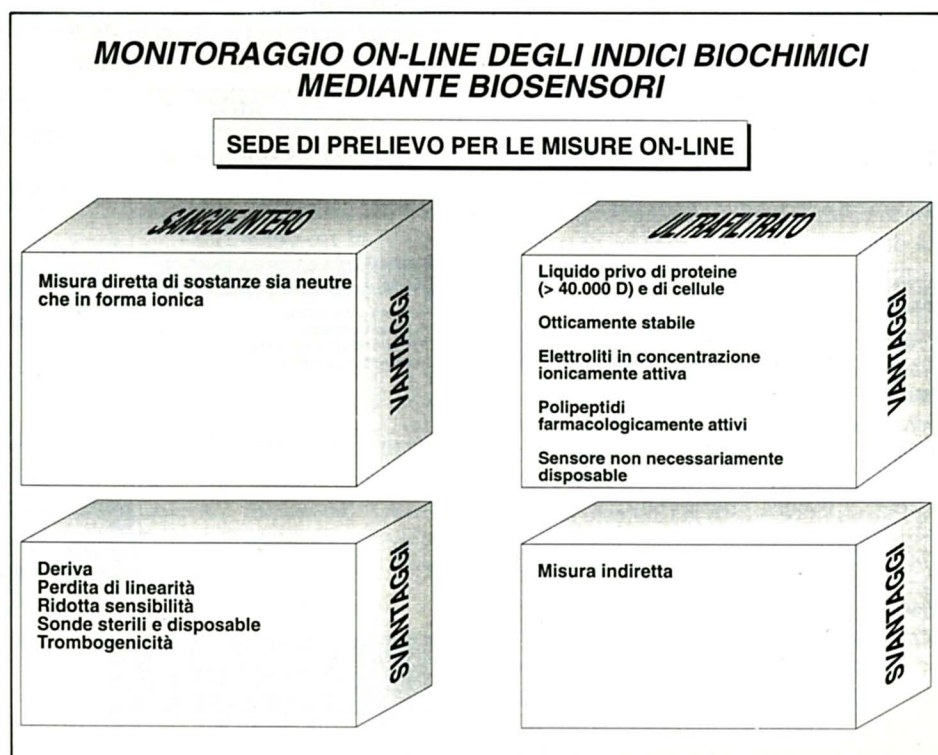


Fig. 3



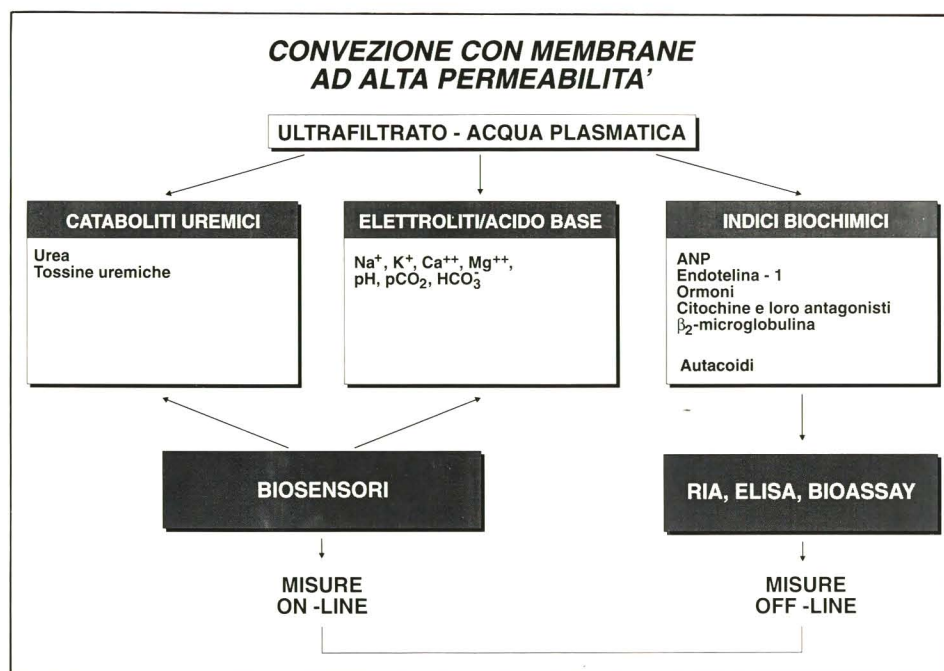


Fig. 4

to soluto. Esistono oggi moltissimi sensori (amperometrici, potenziometrici, conduttimetrici, fibroptici, ecc.). Per tutti (Fig. 2), tuttavia, la configurazione è la stessa. Al fine di ottenere un segnale di uscita, vi deve essere un segnale dell'avvenuto riconoscimento della molecola bersaglio, che è generalmente di tipo elettrico secondo una modalità di transduzione elettrochimica, termica, ottica o basata su variazioni di massa. Un problema di non facile soluzione è il grado di specificità nonché di sensibilità del segnale dell'avvenuto riconoscimento. Mentre la specificità è tanto maggiore quanto più selettivo è il riconoscimento molecolare della molecola bersaglio (che può essere acquisito mediante immobilizzazione di enzimi specifici per un dato substrato, di anticorpi o di acidi nucleici per sequenze complementari), la sensibilità è spesso legata al tipo di microambiente biologico in cui il biosensore viene posto. Nel campo dell'emodialisi, la determinazione di indici biochimici come urea, Na, K nel sangue intero non ha fornito misure affidabili. Le ragioni di questi insuccessi sono legate all'interazione di superficie fra il biosensore e le componenti cellulari e proteiche plasmatiche. Interazioni molecolari e fattori reologici rappresentano fattori significativi per

l'aderenza (= passivazione) delle superfici di contatto e l'innescio di fenomeni microcoagulativi. Tali fenomeni incidono marcatamente sulla sensibilità a breve termine della misura con comparsa di derive elettriche e perdita di linearità. Gli sforzi della biosensoristica si sono pertanto rivolti alla possibilità di utilizzare approcci alternativi al sangue intero. Esistono sostanzialmente due possibilità percorribili: la prima è l'utilizzazione del liquido di dialisi effluente dal filtro, la seconda è l'ultrafiltrato (Fig. 3). La scelta del primo approccio (= liquido di dialisi) offre la possibilità della determinazione dello studio dei bilanci di massa in tempo reale. Per quanto concerne il secondo approccio le uniche metodiche che permettono di ottenere ultrafiltrato puro non miscelato con il liquido di dialisi sono l'emofiltrazione e l'emodiafiltrazione a camere separate, la cosiddetta paired filtration dialysis = PFD. Tuttavia, in emofiltrazione per l'utilizzazione di biosensori nell'ultrafiltrato si pongono il problema degli alti flussi, la conseguente necessità di sistemi spilling e la brusca caduta delle concentrazioni di alcuni metaboliti come nel caso dell'urea (B. Canaud, comunicazione personale). In PFD il flusso di ultrafiltrato puro fra 45-60 ml/min è compatibile con una let-

tura on-line con l'attuale disponibilità tecnologica dei biosensori. In generale, le caratteristiche dell'ultrafiltrato dal punto di vista della composizione dei diversi soluti (elettroliti, metaboliti, farmaci, ormoni, mediatori infiammatori, e polipeptidi) sono condizionate dall'effetto della membrana utilizzata in convezione per la produzione dell'ultrafiltrato (Fig. 4).

Da un punto di vista fisico, è importante sottolineare come l'ultrafiltrato sia un liquido a densità ottica molto stabile. D'altra parte, le concentrazioni di diversi soluti possono essere variate nell'ultrafiltrato rispetto al plasma per effetto di fenomeni di tipo diverso (fattore di Donnan per il Na⁺, glicosilazione per le proteine, sieving coefficient quando < 1, adsorbimento al polimero nel caso di eritropoietina, β₂ - microglobulina).

Prospettive di monitorizzazione degli indici biochimici

UREA

Una corretta prescrizione dialitica è una delle maggiori aspirazioni dei nefrologi. Per una corretta prescrizione occorre innanzitutto, identificare l'oggetto o l'agente, suscettibile di trattamento terapeutico e responsabile della patologia, conoscerne i rapporti con la patologia stessa e quindi definirne la rimozione. Nel caso della sindrome uremica, ognuno di questi punti ha dei suoi lati ancora oscuri e mal definiti. Basti pensare che non abbiamo ancora un marker certo dell'uremia che possa essere correlato in termini quali-quantitativi con gli aspetti clinici e con la gravità della insufficienza renale.

In attesa di definirne uno ideale (o meglio in attesa ancora di scoprirlo secondo i più pessimisti tra noi), le nostre scelte si sono indirizzate verso l'urea. L'urea presenta alcuni indubbi vantaggi, è presente in grande quantità ed elevata concentrazione, è chimicamente neutra e quindi utilizzabile per la caratterizzazione dei bilanci di massa e l'efficienza del filtro e, soprattutto, è facilmente dosabile. Non esiste però, a tutt'oggi, una concreta dimostrazione della tossicità diretta dell'urea anche se, come

chiaramente ci ha dimostrato il National Cooperative Dialysis Study, i suoi livelli possono essere correlati alla morbilità e alla mortalità dei pazienti in trattamento emodialitico. Le conclusioni pratiche di questo studio erano che i pazienti con BUN elevato (TAC urea > 100 mg/dl) presentavano un maggior numero di complicanze di carattere clinico o maggiori probabilità di uscire dallo studio rispetto a quelli con BUN più basso. In realtà queste conclusioni si sono rivelate in seguito un po' semplicistiche in quanto finalizzate a dialisi con membrane cellulose e soprattutto, erroneamente svincolate dagli aspetti nutrizionali del paziente. Non si può infatti disgiungere, nella valutazione dell'efficacia della terapia dialitica, la depurazione, espressa dall'indice Kt/V, dalla nutrizione e quindi dal Protein Catabolic Rate (PCR). Ma, fatte salve queste considerazioni, la cinetica dell'urea è senz'altro un mezzo pratico ed efficace nell'individualizzazione e personalizzazione della terapia dialitica.

La cinetica tradizionale proposta da Gotch e Sargent ha però dei limiti di ordine sia teorico che pratico. A seconda, infatti, dell'efficienza del trattamento e dei tempi di trattamento occorre variare la modellistica, passando da modelli monocompartimentali a volume fisso per i trattamenti a lunga durata e bassa efficienza, a modelli a più compartimenti, e con volumi variabili, per trattamenti di breve durata ed alta efficienza. Inoltre per determinare una esatta clearance del dializzatore, intesa come clearance effettiva corretta per un eventuale ricircolo

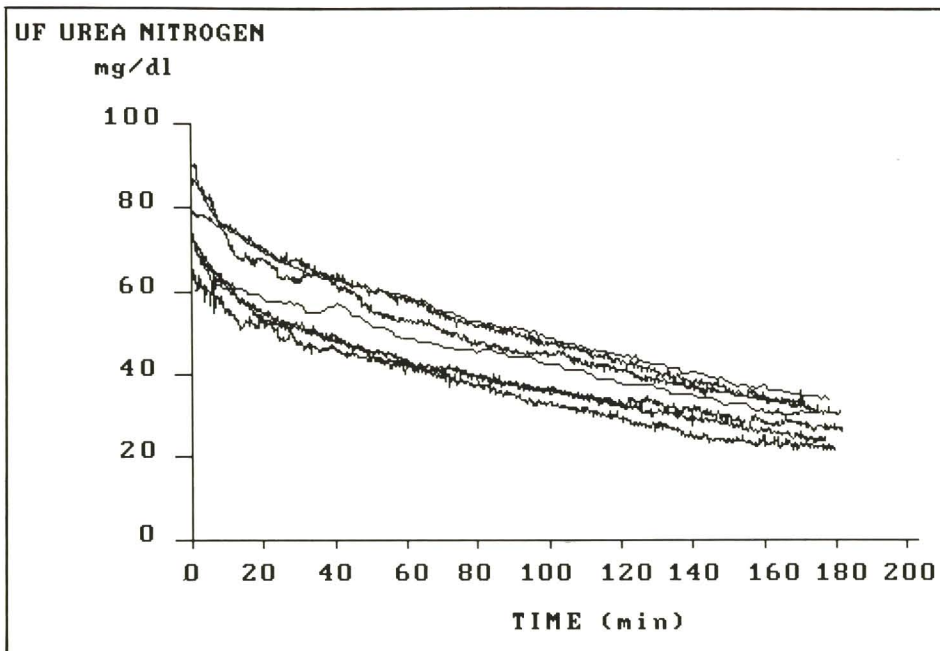


Fig. 5 - Andamenti della concentrazione di urea in pazienti diversi nel corso di PFD ottenuti mediante monitoraggio continuo on-line con il Belco urea sensor.

dell'accesso, sono necessari numerosi prelievi ematici per monitorizzare una sola seduta dialitica. Lo studio infine è sempre di tipo retrospettivo ed effettuato su un'unica seduta dialitica, che non necessariamente è rappresentativa della effettiva dose dialitica nel lungo periodo. Infatti, per numerose ragioni di ordine pratico, che possono facilmente sovrappiungere in una singola seduta di dialisi, la terapia prescritta può non coincidere con quella realmente somministrata (Tab. I). D'altronde l'efficienza di un trattamento è condizionata da una

serie di fattori quali i flussi ematici e del bagno di dialisi, i tempi di trattamento, il ricircolo, ecc. suscettibili di modifiche nel corso del trattamento. Le variazioni intradialitiche di questi parametri possono essere non facilmente valutabili ed apprezzate, ma influenzare ugualmente la clearance corporea totale di quella seduta compromettendone l'efficienza. L'unica risposta concreta alla variabilità della clearance è il monitoraggio diretto dell'urea o nel bagno dialisi in uscita o nel sangue.

La disponibilità di un biosensore rende sinceramente fattibile la misura sul bagno di dialisi. Possono esservi però alcuni problemi di dosaggio derivanti dalle basse concentrazioni da misurare e dagli alti flussi di uscita. Nel sangue la situazione si complica per una serie di problematiche riguardanti la sterilità, la biocompatibilità e la trombogenicità del sensore stesso (Fig. 3). La PFD offre però, in questo senso, una opportunità unica. In PFD infatti, la presenza di un ultrafiltrato con composizione in urea pressoché identica a quella dell'acqua plasmatica facilita enormemente le cose. La misura in continuo nell'ultrafiltrato è perfettamente sovrapponibile a quella in acqua plasmatica e permette di seguire in maniera dinamica gli andamenti dell'urea nel corso della seduta dialitica

TAB. I - FATTORI RESPONSABILI DI DISCREPANZE TRA DOSE DIALITICA PRESCRITTA E REALMENTE SOMMINISTRATA AL PAZIENTE

Fattori legati al paziente	- flusso ematico insufficiente - ricircolo dell'accesso vascolare - riduzione temporanea del flusso ematico (ipotensione, riposizionamento aghi fistola, ecc.)
Fattori legati al personale	- errori nella programmazione dei tempi di dialisi o nell'impostazione dei parametri macchina (flussi, infusione, ecc.)
Fattori dipendenti dalla macchina	- cattiva calibrazione - malfunzionamento clock macchina
Fattori legati al dializzatore	- coagulazione - riuso inadeguato

(Fig. 5). Si osservano in genere delle curve biesponenziali con rapidi declini della concentrazione nella prima parte della seduta per rapida sottrazione dell'urea dallo spazio extra-cellulare, seguiti da una fase di riduzione più lenta, espressione di un continuo trasferimento di urea dal compartimento cellulare a quello extracellulare e da questo al dializzatore. L'analisi di questi dati permette facilmente di ricavare "on-line" misure cinetiche quali la TAC urea, il Kt/V ed il PCR, ma, soprattutto, è una continua garanzia dell'efficacia depurativa del trattamento. Il sensore realizzato dalla Bellco ha inoltre il vantaggio di una estrema praticità (Fig. 6). È infatti perfettamente integrato nel corpo macchina ed è costituito da una cartuccia, con ureasi immobilizzata su un supporto inerte, che si trova lungo la linea dell'ultrafiltrato. L'ultrafiltrato prima di giungere alla cartuccia passa attraverso un conducimetro che ne determina la conducibilità di base e successivamente attraversa il supporto contenente l'ureasi. Al passaggio attraverso la cartuccia, l'ureasi idrolizza l'urea contenuta nell'ultrafiltrato producendo ioni NH_4 che modificano la conducibilità di base. Un secondo conducimetro misura questo gradiente di conducibilità e gli incrementi di conducibilità sono direttamente proporzionali alle concentrazioni di urea. Il passo successivo e finale è l'analisi computerizzata di questo segnale che viene integrato con gli altri dati della seduta per dare, oltre ad una misura in tempo reale, una serie di indici cinetici e di efficienza dialitica (Fig. 5).

Le prospettive di questo sistema sono veramente notevoli, non solo dal punto di vista strettamente pratico, ma anche sotto il profilo scientifico potendosi rivelare un potentissimo strumento nella definizione dei modelli cinetici.

SODIO

La rimozione di sodio durante la seduta emodialitica è determinata sia dal gradiente del Na fra bagno dialisi e sangue (diffusione) sia dall'ultrafiltrazione (convezione). Il Na nel plasma, data la presenza di lipidi e proteine che occupano un certo volume del plasma totale, si distribuisce nell'acqua plasmatica. Qui è presente in forma ionica libera (disponibile ai processi diffusivi

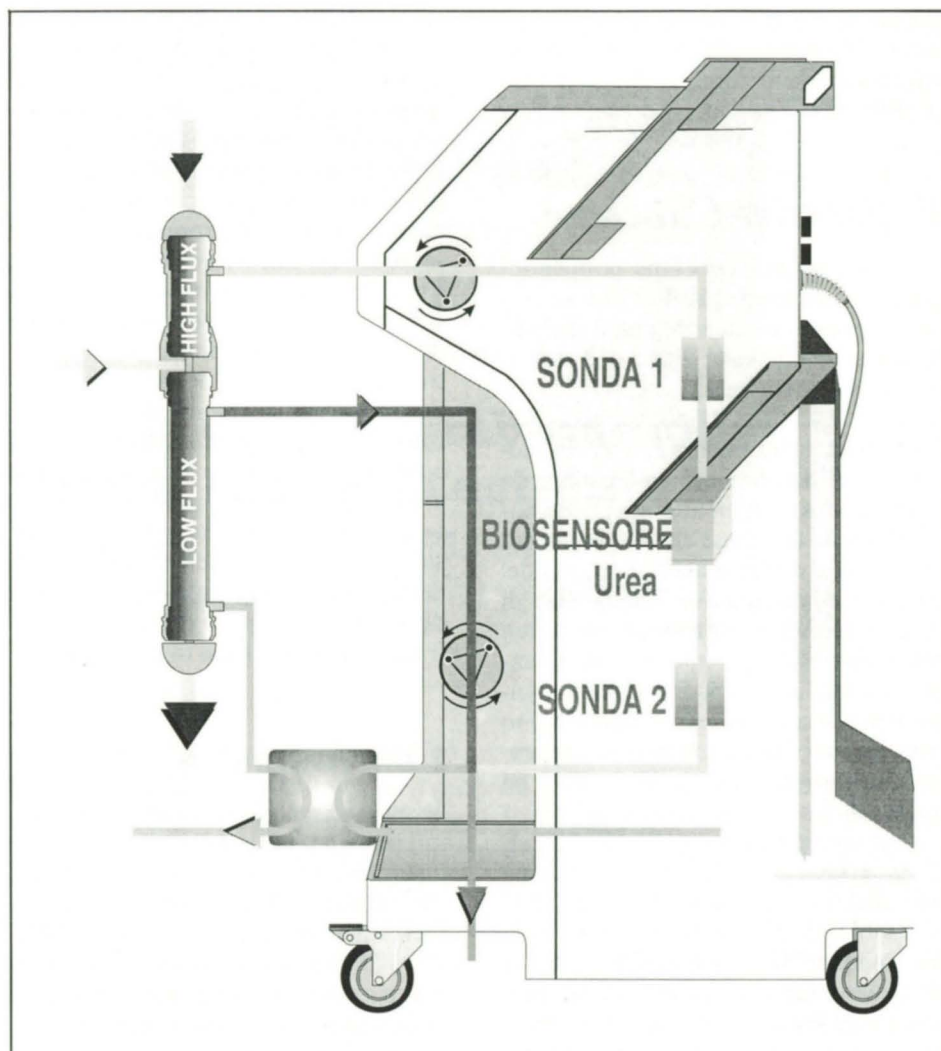


Fig. 6 - Multimat urea sensor in PFD della Bellco.

e convettivi) o in forma complessata (legato agli anioni del plasma).

La concentrazione di sodio che si ritrova nell'ultrafiltrato dovrebbe essere uguale a quella dell'acqua plasmatica in forma ionica. In realtà per l'effetto Donnan essa è sempre inferiore a quest'ultima. Una certa quota di cationi è infatti trattenuta nel versante ematico per equilibrare la carica negativa degli anioni non in grado di attraversare la membrana. Da un punto di vista della misura delle concentrazioni di Na esistono due approcci, il primo specifico per il Na, l'altro indiretto (conducimetria). Nel primo caso sono compresi metodologie quali la fotometria a fiamme (che misura le concentrazioni di Na in un volume non diluito comprendente

proteine e lipidi) ed elettrodi iono-selettivi.

Il nostro approccio è attualmente di tipo conducimetrico molto più semplice e pratico. L'intento è quello di effettuare un bilancio di massa del sodio in tempo reale in corso di PFD. Per questo è necessario porre tre celle conducimetriche fra loro allineate sulla linea dell'ultrafiltrato e sulla linea in-out del liquido di dialisi.

Attinente allo studio della cinetica del Na in PFD, saranno in futuro proponibili modelli matematici in single pool a volume variabile basati sulle leggi di Fick e di bilancio di massa. Mediante tali modelli, sarà possibile fornire il profilo orario del Na nel bagno dialisi al fine di ottenere la sodiemia post-PFD desi-



derata, la sottrazione oraria di Na costante, il bilancio del Na nella singola seduta ed il mantenimento del pool sodico post-PFD costante.

Polipeptidi-Citochine

Si intendono per citochine polipeptidi prodotti da diversi tipi cellulari coinvolti nella risposta immunologica e infiammatoria nonché nella difesa dell'ospite. Appartengono a questo gruppo le interleukine (IL) 1-12, il tumor-necrosis factor (TNF), il transforming growth factor β . Nel paziente uremico è stata da tempo dimostrata un'alterata produzione di queste citochine che è stata messa in relazione a effetti acuti e cronici del paziente emodializzato. Condizioni di biocompatibilità del trattamento quali interazioni sangue-superficie di membrana di dialisi o back-filtration di liquido di dialisi contaminato rappresentano situazioni di studio efficace all'aumentata produzione di IL-1, IL-8, TNF ed altresì di loro antagonisti quali l'IL-1 antagonista recettoriale (IL-1Ra). IL-1, IL-8, TNF e IL-1Ra sono detectabili nell'ultrafiltrato. Da un punto di vista metodologico vale la pena ricordare come solo per l'IL-1 i comuni Kit ELISA non sono utilizzabili come tali dal momento che le curve di riferimento vengono normalmente costruite con analiti plasmatici di controllo a varie concentrazioni di IL-1 ricombinante. Sarà pertanto necessario nel caso del dosaggio di IL-1 nell'ultrafiltrato utilizzare analiti sierici di controllo con IL-1 = 0 disponibili su richiesta nel commercio. Lo studio dei livelli delle citochine nell'UF che riflette almeno in parte la concentrazione plasmatica non è sufficiente da solo al fine di uno studio completo di biocompatibilità. Abbiamo recentemente proposto la messa a punto di una valutazione parallela di IL-1-ra nell'UF e nelle cellule monocitarie. I livelli intramonocitari di IL-1Ra sono studiabili con una metodica di isolamento rapida e di facile esecuzione messa a punto nei nostri laboratori. L'IL-1Ra è nella nostra esperienza un parametro sensibile e specifico delle microstimolazioni intradialitiche da back-diffusion di prodotti batterici citochine-inducibili. Argomento di grande interesse e rappresentato dallo studio dell'UF nel paziente settico. In

corso di sepsi la produzione delle citochine ed in particolare di TNF, IL-1Ra, IL-1, IL-6 raggiungono livelli altissimi mai osservabili nel paziente uremico in trattamento cronico. Scopo dell'analisi dell'ultrafiltrato nello shock settico, per quanto riguarda gli aspetti sperimentali *in vitro* e quelli più propriamente clinici in corso di shock settico, è nella prospettiva di spiegare meglio da un lato i meccanismi di rimozione dei mediatori mediante le tecniche convettive e, dall'altro, di fornire indici di rimozione avvenuta o incompleta di utilità al clinico. In futuro sarà possibile un monitoraggio continuo con immunosensori secondo la tecnica dei plasmoni. Si tratta di una tecnologia attualmente in fase di espansione che consiste nel riconoscimento del legame antigene anticorpo sulla base di una modificazione dell'angolo di rifrangenza di un fascio di luce incidente.

Conclusione

Numerose sono le prospettive di monitoraggio sull'ultrafiltrato mentre del tutto aperti sono i campi della nostra conoscenza sull'adeguatezza dialitica e sul bilancio dei mediatori pressori. Nuovi studi dovranno apportare, ce lo auguriamo, una più completa conoscenza della fisiopatologia del paziente uremico e un affinamento delle tecnologie biosensoristiche per una migliore lettura di quanto avviene, non tanto a livello "plasmatico", ma quanto più vicino ai delicati meccanismi di equilibrio fra i diversi compartimenti con particolare attenzione a quello intracellulare.

È nostra convinzione che la dialisi "intelligente" dovrà, nel domani, poter garantire la rimozione di quanto in eccesso, impedendo però il depauperamento di quanto necessario ed indispensabile ad un efficiente controllo del milieu interno, con particolare riguardo all'ambiente e al metabolismo cellulare.

BIBLIOGRAFIA

1. Santoro A, Spongano M, Mancini E et al. L'instabilità cardiovascolare intradialitica ed il monitoraggio emodinamico. In: Atti del XXII Corso di Aggiornamento in Nefrologia e Metodiche Dialitiche dell'ospedale S. Carlo Borromeo di Milano. Milano: Wichtig Editore, 1990; 31-43.
2. Gotch FA. Dialysis of the future. *Kidney Int* 1988; 33 (Suppl 24): S100-4.
3. Santoro A, Spongano M, Zucchelli P. Il paziente a rischio di instabilità cardio-vascolare intradialitica. In: L'emodiafiltrazione ad latissimi flussi. Milano: Wichtig Editore, 1989; 235-298.
4. Zucchelli P, Santoro A. Dialysis induced hypotension: a fresh look at pathophysiology. *Blood Purif* 1993; 11: 85-92.
5. Biosensors: principles and applications (a cura di LJ Blum, PR Coulet, M Dekker) Inc 1991.
6. Tetta C, Bellesia M, Navino C, Ruva C, Verzetti G. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) production in hemodialysis. *JASN* 1993; 4: 391.
7. Tetta C, Cioni A, Camussi G. Biocompatibility still a challenge. *J Nephrol* 1992.
8. Arese M, Bussolino F, Navino C, Ruva C, Verzetti G, Bosia A. Removal of constitutive and inducible nitric oxide (NO)-blocking compounds during hemodialysis. *JASN* 1993; 4: 331.