

Studio del pattern lipidico e lipoproteico nel paziente in emodialisi

G. Sanna¹, G.M. Cherchi²

¹ Servizio Nefrologia e Dialisi, USL n. 5, Ozieri (Sassari)

² Istituto di Biologia Applicata, Università di Sassari, Sassari

L'aterosclerosi e le malattie ad essa correlate rappresentano una delle principali cause di morte nei pazienti sottoposti ad emodialisi (HD). L'instaurarsi del processo aterosclerotico è accelerato dall'insorgere di modificazioni del quadro lipoproteico caratterizzate, frequentemente, da un aumento della concentrazione plasmatica dei trigliceridi (TG) e da una riduzione dei livelli di colesterolo-HDL. L'accumulo di lipoproteine a densità molto bassa (VLDL) e dei remnant di queste particelle (IDL) può essere, almeno in parte, dovuto ad una riduzione dell'attività della lipoproteinlipasi (LPL), frequentemente descritta nei pazienti HD, che potrebbe anche spiegare i bassi valori di colesterolo-HDL riscontrati. Inoltre, l'analisi delle apolipoproteine ha evidenziato una riduzione dei livelli di apo-AI (apoproteina principale delle HDL) e di apo-E. Quest'ultima apoproteina è normalmente presente nelle lipoproteine ricche in trigliceridi e nei loro remnants, ed è responsabile della clearance di queste particelle a livello epatico. Una riduzione dei livelli plasmatici di apo-E si può accompagnare, perciò, ad un incremento della triglicidemia.

Il catabolismo delle lipoproteine ricche in trigliceridi è inoltre regolato dal trasferimento e dallo scambio di apo CII ed apo-CIII dalle HDL alle VLDL e ai chilomicroni, e dai chilomicroni e le VLDL alle HDL prima e durante la lipolisi operata dalla LPL. Poiché apo-CII è considerato un attivatore della LPL mentre apo-CIII ne inibisce l'azione, un'alterazione della concentrazione plasmatica di queste apoproteine o una modificazione dei rapporti relativi fra le stesse, può influenzare la clearance delle lipoproteine ricche in trigliceridi.

Un ulteriore fattore di rischio per l'aterosclerosi nel paziente HD potrebbe essere rappresentato dalla presenza di concentrazioni elevate di lipoproteina (a) (Lp(a)). La Lp(a) è considerata un importante ed indipendente fattore di rischio per l'aterosclerosi e per le malattie del sistema circolatorio. Questa particella lipoproteica è strutturalmente molto simile ad una LDL, ma contiene una glicoproteina addizionale (apo(a)) legata ad apo-B attraverso un ponte disolfuro. Apo(a) ha un peso molecolare variabile fra 300.000 e 900.000 D e presenta una notevole analogia strutturale con il plasminogeno, si lega ai suoi recettori cellulari ed al sistema fibrinogeno-fibrina, inibendo il

processo di fibrinolisi e favorendo, quindi, la formazione di trombi. È stato, ad esempio, dimostrato che quando la concentrazione plasmatica di Lp(a) supera i 25 mg/dl risultano occupati circa il 20% dei recettori cellulari per il plasminogeno.

La Lp(a) come la LDL interagisce, inoltre, con alcuni componenti della parete vascolare (proteoglicani e glicosaminoglicani) favorendo l'accumulo di esteri di colesterolo nel connettivo sottoendoteliale dei vasi e determinando la formazione di cellule schiumose. L'instaurarsi di tali interazioni potrebbe rappresentare un momento cruciale nella formazione dell'ateroma.

Per le considerazioni sopraesposte appare evidente che per una corretta valutazione del pattern lipidico e lipoproteico del paziente HD sono richieste alcune determinazioni che non sempre vengono eseguite nella routine. Fra queste, l'ultracentrifugazione in gradiente di densità (single-spin) può fornire indicazioni che possono essere utili non solo per evidenziare eventuali modificazioni composizionali delle singole classi lipoproteiche che portano ad alterazioni della densità della lipoproteina, ma anche per dimostrare la presenza di molecole di natura polipeptidica di peso molecolare

inferiore a 10.000-12.000 D che si accumulano nel plasma di questi pazienti e di cui poco si conosce attualmente. Sarebbe perciò opportuno dializzare *in vitro* il campione prima di sottoporlo ad alcuni tipi di indagine in cui la presenza delle medie molecole potrebbe in qualche modo alterare il risultato finale, come, ad esempio, nel caso del profilo lipoproteico ottenuto dopo ultracentrifugazione in gradiente di densità (Fig. 1) o interferire con sistemi di determinazione che prevedono l'uso di anticorpi per il dosaggio delle apoproteine.

Modalità per la determinazione del profilo lipoproteico mediante single-spin

Il prelievo di sangue va eseguito preferibilmente al mattino dopo un digiuno di almeno 12 h. Il sangue prelevato viene posto in una provetta contenente EDTA (1 mg/ml di sangue) e NaN_3 (0.2 mg/ml). Si centrifuga per 10' a $1.200 \times g$ e se nel plasma ottenuto sono presenti dei chilomicroni si ricentrifuga per 20' a $35.000 \times g$. Per l'ultracentrifugazione si utilizzano preferibilmente provette da 13 ml di nitrato di cellulosa sulle quali si stratificano soluzioni di NaBr e NaCl di differente densità. Il campione (0.5 ml di plasma + 0.5 ml di soluzione fisiologica) viene caricato in provetta e si centrifuga per 52 h a $190.000 \times g$ utilizzando un rotore oscillante (Bekman SW) e termostatando a 15°C .

L'apparecchio separatore (Fig. 2) è essenzialmente costituito da quattro parti:

1) una pompa lineare contenente una soluzione inerte a densità 1.850 g/ml che, attraverso una siringa, viene spinta in un tubicino che collega la pompa alla provetta conte-

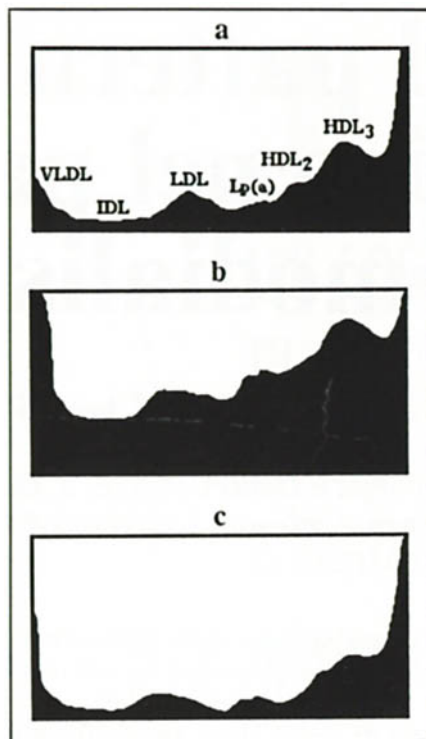


Fig. 1 - Profilo lipoproteico ottenuto dopo ultracentrifugazione in gradiente di densità. In ascissa è riportata l'assorbanza a 280 nm, in ordinata la densità in g/ml.

I tracciati si riferiscono:

- a) campione ottenuto da un soggetto normale normolipemico;
- b) campione ottenuto da un paziente in emodialisi;
- c) stesso campione dopo dialisi *in vitro*.

nente il campione ultracentrifugato. La soluzione inerte passa attraverso un ago che viene fatto penetrare meccanicamente nel fondo della provetta e spinge in alto il contenuto della provetta stessa;

2) la provetta è collegata con un apparecchio di lettura, costituito da una cella spettrofotometrica che consente la lettura a 280 nm;

3) un registratore collegato alla cella consente la monitorizzazione della distribuzione delle diverse classi lipoproteiche lungo il gradiente di densità;

4) un raccoglitore di frazioni può essere utilizzato nel caso in cui si dovesse rendere necessario separare e conservare le varie frazioni per ulteriori indagini.

Mediante l'apparecchio di registrazione si ottengono dei tracciati su carta che indicano l'assorbimento a 280 nm delle frazioni a diversa densità. In condizioni normali vengono lette prima (parte sinistra del tracciato) le VLDL. Procedendo verso destra, segue l'area corrispondente alle LDL (possono essere presenti diversi picchi corrispondenti alle varie subclassi delle

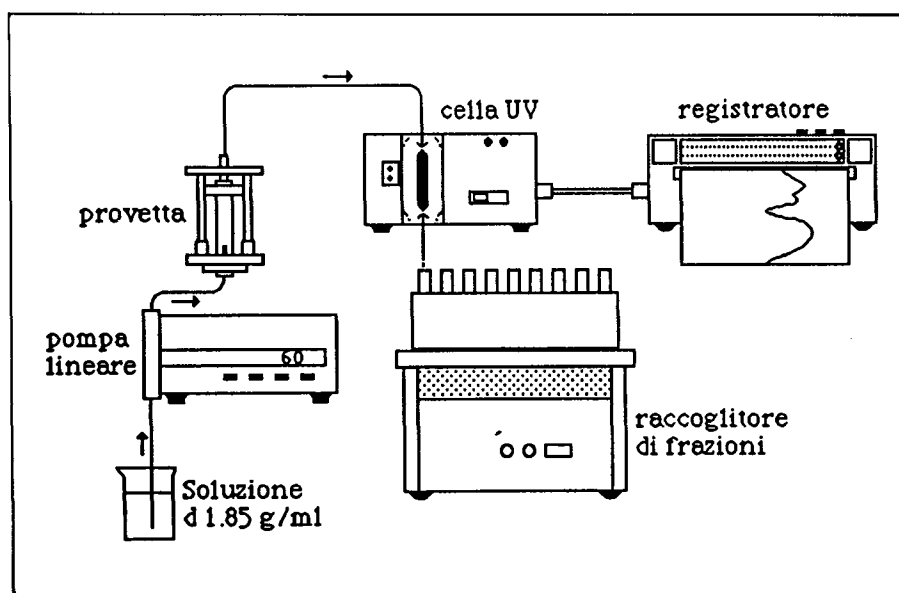


Fig. 2 - Separatore di gradienti.

LDL). Tra le due aree, in casi rari, possono essere evidenziate le IDL. Dopo le LDL può, quando è presente in concentrazione superiore a circa 5-10 mg/dl, essere letta la Lp (a). Seguono quindi due aree corrispondenti alle HDL₂ e alle HDL₃ ed infine, ad una densità superiore a 1.210 g/ml vengono separate tutte le proteine plasmatiche presenti nel fondo del gradiente.

Questa metodica è essenzialmente qualitativa, ma è possibile determinare l'area compresa tra la linea di base e la curva di ciascun picco e risalire quindi alla concentrazione di ciascuna classe lipoproteica sulla base della sua assorbanza a 280 nm. Il metodo può essere considerato particolarmente utile in quanto consente di avere informazioni sul quadro lipoproteico totale, di evidenziare l'eventuale presenza di lipoproteine anomale, di verificare che ciascuna classe lipoproteica sia presente nel suo range di densità (uno spostamento della densità può indicare una modificazione compositiva della particella) ed infine, permettendo la separazione delle singole lipoproteine consente, qualora si renda necessario, una analisi più approfondita su ciascuna frazione lipoproteica. In quest'ultimo caso è opportuno sottolineare che la separazione delle singole classi di lipoproteine è ottenuta mediante una singola tappa di centrifugazione mentre, seguendo il metodo tradizionale è necessario sottoporre ad ultracentrifugazione il campione almeno quattro volte. Ricordiamo brevemente che durante l'ultracentrifugazione si verificano modificazioni strutturali delle particelle lipoproteiche che portano, ad esempio, alla parziale perdita di componenti di superficie quali le apoproteine ed è perciò consigliabile ridurre, quando è possibile, i tempi di centrifugazione.

Nel caso del paziente in emodialisi è inoltre opportuno procedere alla determinazione delle isoforme di alcune apoproteine che possono avere un ruolo nelle dislipidemie; l'isolamento delle VLDL consente l'ottenimento di un campione che, sottoposto ad isoelettrofocalizzazione, fornisce informazioni sulle principali isoforme di apo-E e di apo-C, mentre separando la Lp(a) è possibile, in seguito, evidenziare isoforme di apo(a) che possono essere diversamente correlate con l'aterosclerosi.

CONCLUSIONI

L'assetto lipidico dei pazienti in emodialisi mostra delle variazioni modeste, per quanto significative, rispetto ai soggetti di controllo; questa constatazione ha prodotto sino ad anni recenti una generalizzata sottovalutazione dello stato dismetabolico di questi pazienti, nei quali tuttavia una aterosclerosi accelerata era spesso diagnosticabile.

La determinazione dei livelli di apolipoproteine, ed in particolare di apo A1, consente di monitorare con efficacia lo stato funzionale delle HDL grazie al fatto che l'allontanarsi dal rapporto normale apo A1/colesterolo-HDL è indice di inefficacia del trasporto del colesterolo dai tessuti periferici al fegato. Una analisi compositiva conferma che all'aumentare di questo rapporto si accompagna la presenza di sempre maggiori percentuali di trigliceridi nel core delle HDL, le quali appaiono strutturalmente mature (come suggerito dal profilo in gradiente di densità), ma probabilmente non efficienti nel trasporto degli esteri del colesterolo.

Il profilo in gradiente di densità consente, d'altro canto, di rilevare

a volte la presenza di concentrazioni non trascurabili di IDL, che tendono ad accumularsi nel plasma per via della diminuita attività della lipoproteinlipasi, e la loro presenza in varia misura è confermata dalla analisi compositiva: essendo le IDL, infatti, delle particelle intermedie tra le VLDL e le LDL, il loro aumento provoca un assottigliarsi delle differenze compositive delle due classi principali. Le VLDL dei pazienti risultano così più ricche percentualmente di colesterolo rispetto a quelle di controllo e le LDL più ricche di trigliceridi. In quest'ultimo caso la LDL viene captata dal suo recettore fisiologico con minore affinità, resta in circolo per un tempo maggiore e può essere quindi più facilmente ossidata e riconosciuta dal recettore scavenger; il meccanismo di captazione attraverso tale recettore non sottoposto a controllo omeostatico per i livelli intracellulari di colesterolo, può favorire la formazione di cellule schiumose e contribuire, perciò, all'instaurarsi di un processo di aterosclerosi precoce.

Da non trascurare, infine, il fatto che nel paziente sottoposto ad emodialisi, la determinazione dei livelli di Lp(a) ha evidenziato un incremento significativo della concentrazione di questa lipoproteina (da tre a quattro volte maggiore rispetto ai controlli) della quale è ormai accertato il ruolo sia aterogeno che trombogeno.

Riteniamo, quindi, consigliabile l'esecuzione dei dosaggi di apo-A1, apo-B e di Lp(a) come parte integrante del profilo lipidico di questi pazienti e suggeriamo di approfondire il profilo lipoproteico complessivo e l'analisi delle singole classi lipoproteiche qualora il quadro si presentasse grossolanamente alterato.