

Valutazione della biocompatibilità delle tecniche emodialitiche

R. Palla, V. Panichi, A. M. Bianchi, C. Cirami, M. Parrini,
V. Finato, B. Andreini

Istituto di Clinica Medica II, Università di Pisa, Pisa

Ogni tecnica depurativa extracorporea necessita del contatto del sangue del paziente con una complessa struttura artificiale (il filtro e le linee ematiche) al fine di effettuare, secondo due principi fisici, la diffusione e la convezione, l'allontanamento di metaboliti ritenuti a causa dell'insufficienza renale ed il recupero di ioni e basi dal bagno di dialisi. Tale contatto determina una serie di complesse reazioni umorali e cellulari definite globalmente con il termine "biocompatibilità". In realtà il termine biocompatibilità è usato impropriamente in quanto ciò che noi osserviamo sono le reazioni determinate dalla non completa inerzia del contatto tra sangue e materiali di dialisi. Pertanto, in realtà, valutiamo la biocompatibilità del sistema.

Quando caratterizziamo un filtro dobbiamo tener conto di vari parametri: il disegno geometrico, il volume che esso contiene, la qualità del materiale di supporto, la natura chimica della membrana che

lo costituisce, la superficie di questa ed infine il metodo di sterilizzazione. Questi parametri interagiscono l'uno l'altro nel determinare le caratteristiche operative (la performance) di tale filtro.

I parametri esaminati concorrono, inoltre, a indurre la qualità e quantità delle reazioni da contatto con il sangue e quindi la bio-

compatibilità (Fig 1).

Oltre ai problemi inerenti al contatto tra sangue e filtro bisogna ricordare che anche il bagno di dialisi può contribuire alle reazioni di biocompatibilità in quanto, pur non contenendo batteri vitali, vi possono essere presenti prodotti derivanti dalla lisi batterica e genericamente denominati endotossine.

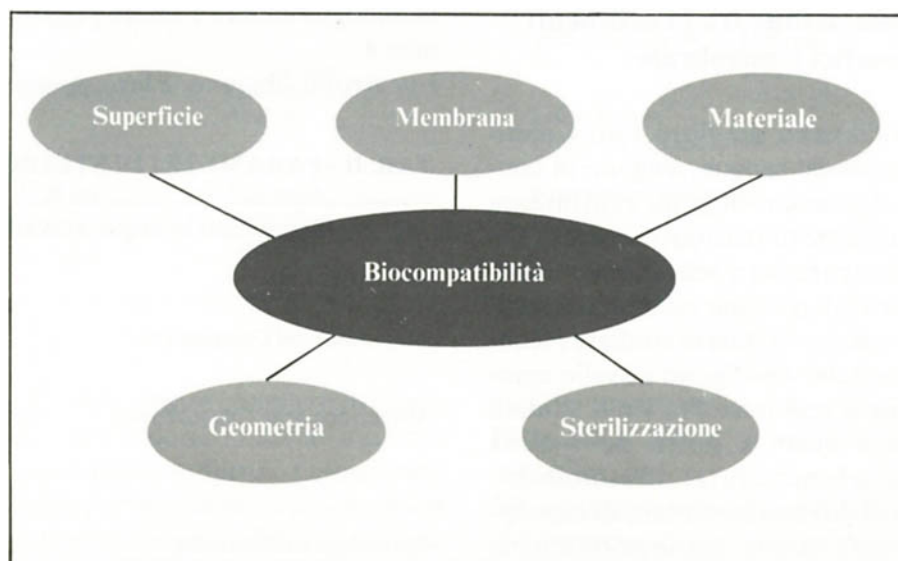


Fig. 1 - I diversi aspetti della "Biocompatibilità".

TAB. I - MEMBRANE DI USO CORRENTE E LORO SPESSORE

CELLULOSICHE	SINTETICHE
Spessore in μM	Spessore in μM
Cuprophan 7-12	Ethylene-Vinylalcol 32
Cuprophan ADF 8-20	Polymethylmetacrylato 25-40
Cellulosa rigenerata 8-13	Polycarbonato 20-60
Cellulosa rigenerata modif.26	Polyacrilonitrile 20-55
Estere di cellulosa saponificata 18-30	Polysulphone 40-70
Cellulosa acetato 15-16	Polyamide 50
Cellulosa triacetato 85	

Le membrane di dialisi

Tutte le membrane impiegate per la dialisi sono chimicamente costituite da "polimeri". Con tale termine si intende una struttura chimica in cui si trovano ripetute periodicamente certe sequenze caratteristiche. I polimeri possono essere "naturali", quali la cellulosa ed i suoi derivati, o prodotti per sintesi industriale (membrane polimeriche sintetiche).

Queste ultime hanno grandi differenze strutturali tra di loro e sono definite spesso "copolimeri" (Tab. I).

Interazione tra i costituenti ematici e membrane

All'interno del filtro tutti i costituenti del sangue vengono in contatto con le membrane e ciò innesca una serie di reazioni a cascata. Diversi parametri ben definiti e caratterizzati possono essere attualmente valutati al fine di studiare i fenomeni che si svolgono a livello umorale e cellulare. Tra i più studiati sono quelli a carico del sistema complementare (1): all'esordio della dialisi con membrane di cuprophan fu notata una importante ma transitoria leucopenia attribuita alla sequestrazione dei neutrofili

nel letto capillare polmonare. Tale fenomeno è stato attribuito alla aggregazione in ammassi dei neutrofili per la presenza sulla loro superficie di recettori per frazioni del complemento attivato per via alterna. Con le membrane sintetiche questa leucopenia non si manifesta e si osserva un minore incremento delle frazioni del complemento attivato.

Accanto a questi eventi, sono ben noti quelli legati alla attivazione degli elementi figurati del sangue: piastrine e neutrofili. Le piastrine liberano il contenuto dei loro α granuli per cui si osserva un incremento delle concentrazioni di beta-tromboglobulina e Fattore Piastrinico 4.

I neutrofili liberano il loro conte-

nuto lisosomiale e citoplasmatico per cui si possono misurare le variazioni della concentrazione del complesso formato dalla alfa-1-Elastasi con i suoi inibitori (2), della lactoferrina e della mieloperossidasi. Inoltre la stimolazione diretta dei neutrofili da parte delle membrane o indiretta attraverso i frammenti del complemento attivato, induce la sintesi di Platelet Activating Factor (PAF). Il PAF possiede molteplici funzioni biologiche importanti nella modulazione della risposta immunitaria e logistica.

Nella Tabella II sono riportati i parametri di studio della biocompatibilità più recenti e diffusamente impiegati.

I meccanismi microbici

La lisi batterica libera diversi componenti della parete cellulare quali le endotossine, proteine (porine) e proteoglicani. Le endotossine, contrariamente a quanto può far pensare la denominazione, sono contenute nella membrana esterna dei batteri Gram -. Esse possiedono una complessa struttura chimica che comprende un polisaccaride ed una molecola lipidica, il lipide A. Correntemente, le endotossine sono quindi denominate anche Lipo-

TAB. II - PARAMETRI DI STUDIO DELLA BIOCAMPATIBILITÀ

Meccanismi biologici attivati dal contatto Sangue-Membrane	
EFFETTO	METODO DI STUDIO
Attivazione del Complemento	Dosaggio Frazioni C3a-C5a DES Dosaggio del Complesso C5b-C9
Attivazione della Coagulazione	Dosaggio Fattore Hageman Dosaggio Fattori Piastrinici: - Beta-Tromboglobulina - BTB - Fattore Piastrinico 4-FP4
Attivazione dei neutrofili	Dosaggio Complesso Elastasi-Inibitore α 1-PI Dosaggio Lattoferrina e Mieloperossidasi

polisaccaride ed indicate con la sigla LPS.

Il LPS esercita importanti meccanismi biologici quali l'attivazione del complemento e del sistema della coagulazione attraverso l'attivazione del Fattore Hageman ed infine induce la produzione da parte delle cellule endoteliali ed immunocompetenti di varie citochine (Tab. III).

Le citochine sono implicate nella moltiplicazione clonale e nella differenziazione delle cellule immunitarie, nella regolazione dei processi dell'infiammazione e dell'eritropoiesi. Da un punto di vista clinico sono implicate nella patogenesi della febbre, cefalea, ipercatabolismo e cachessia dei pazienti emodializzati (Tab. IV).

Sterilizzazione

Tutti i componenti della dialisi che giungono a contatto con il sangue devono essere sterili. I metodi di sterilizzazione attualmente disponibili sono diversi e la scelta dipende dalle proprietà del materiale che deve essere sterilizzato.

La sterilizzazione a vapore d'acqua, assai interessante ma di costo elevato, è attualmente impiegata solo da alcuni fabbricanti.

L'impiego di raggi gamma, X o UV è attualmente diffuso ma può determinare l'alterazione di alcune proprietà chimiche delle membrane: durante il processo di sterilizzazione si possono creare radicali reattivi che potrebbero rimanere intrappolati e giungere quindi in contatto con il sangue.

L'agente sterilizzante più diffusamente impiegato attualmente è l'Ossido di Etilene, un gas che permea le strutture dei filtri e delle linee della dialisi. Al momento dell'impiego rimane disagiata il suo

TAB. III - INTERAZIONI ENDOTOSSINA-MACROFAGO

LPS Proteine	MACROFAGO Radicali Liberi	Lipidi
TNF	Ossigeno	PGE ₂
IL-1	H ₂ O ₂	TXA ₂
IL-6	NO	PAF
Conseguenze: febbre-ipotensione-CID-shock		

TNF: Fattore di Necrosi Tumorale-IL-1: Interleukina 1-IL-6: Interleukina 6-PGE₂: Prostaglandine E₂-TXA₂: Tromboxano A₂-PAF: fattore di attivazione piastrinica-NO: Ossido Nitroso-CID: Coagulazione Intravascolare Disseminata

TAB. IV - PRINCIPALI CITOCHINE PROINFIAMMATORIE

Interleukine	Origine	Effetti
IL-1	Macrofagi Linfociti T e B	Attivazione specifica Proliferazione aspecifica
IL-2	Linfociti T-Helper	Proliferazione T linfociti Produzione Linfokine
IL-5	Linfociti T-Helper	Proliferazione B linfociti Produzione IgA-IgE
IL-6	Macrofagi Fibroblasti Endotelio	Fase Acuta della Flogosi Proliferazione B linfociti Produzione IgG
IL-8	Linfociti T Monociti Endotelio	Produzione Adesine Chemiotassi Degranulazione Neutrofili
TNF (Tumor Necrosis Factor)	Macrofagi Linfociti	Attivazione Neutrofili Produzione IL-1 Blocco Lipoproteinlipasi: Cachessia Proliferazione B e T Linfociti
Perforine	Linfociti Attivati	Lisi cellulare Frammentazione DNA
IFN α - γ	Neutrofili Macrofagi Endotelio Linfociti B-T	Attivazione Macrofagi Produzione IL-2 Produzione TNF

allontanamento completo in quanto si diffonde nei materiali usati per assemblare il filtro. È implicato nella patogenesi di quel complesso sintomatologico definito "reazione da primo uso". Il suo uso è destinato a scomparire per motivi "ecolo-

gici" in quanto esso si disperde nell'atmosfera senza possibilità di controllo.

Da quanto esposto si comprende chiaramente come la biocompatibilità di ciascuna tecnica emodialitica derivi dall'interazione di nu-

merosi fattori quali la composizione chimica della membrana, la superficie di questa, il volume del filtro, la metodica impiegata nella sterilizzazione dei materiali e la reattività del soggetto.

Emodialisi convenzionale (HD)

Distinguendo i fattori correlati alla membrana da quelli correlati alla tecnica tratteremo prima i problemi connessi alla biocompatibilità della membrana.

Abbiamo studiato in 15 pazienti l'attivazione del complemento durante la dialisi con filtro in cuprophane (CU), hemophan (HE), polisulfone (PS), poliacrilonitrile (PAN), polimetilmetacrilato (PMMA), sottoponendoli alternativamente alle varie membrane.

Nella Figura 1 sono riportate le concentrazioni di C3a e C5a dopo 20 minuti dall'inizio della dialisi.

L'aumento delle due anafilotossine appare significativamente maggiore con il cuprophane rispetto all'hemophan, PMMA, PS e PAN in ordine decrescente. L'analisi dei dati deve tener conto, inoltre, della superficie della membrana impiegata e dell'effetto dell'emoconcentrazione. Nella Tabella V sono riportati gli incrementi percentuali del C3a e del C5a dopo 20 minuti dall'inizio della dialisi corretti per questi due fattori.

L'attivazione dei neutrofili, valutata mediante la misura dell'incremento della concentrazione del complesso di α -1-Elastasi Inibitori, ha confermato la ben nota minore biocompatibilità di cuprophane ed hemofan rispetto alle membrane sintetiche. L'analisi dei dati è riportata nella Tabella VI.

Abbiamo studiato anche l'attivazione delle piastrine misurando

TAB. V - Δ % DI C3a E C5a CORRETTA PER SUPERFICIE ED EMOCONCENTRAZIONE

	CU	HE	PMMA	PS	PAN
C3a					
Hc%	850	400	250	100	120
1 mq	850	350	150	110	90
C5a					
Hc%	700	450	300	150	200
1 mq	700	380	200	180	160

TAB. VI - GENERAZIONE DEL COMPLESSO α -1-ELASTASI-INIBITORI (α -1-E-PI)

	CU	HE	PMMA	PS	PAN
α -1-E-PI mcg/L					
Basale	41	76	42	36	22
60 min	233	218	93	67	45

TAB. VII - VARIAZIONE DELLA B2-m E QUANTITÀ MISURATA NEL DIALISATO

	CU	HE	PMMA	PS	PAN
B2-m mg/L					
Basale	42	48	29	40	36
FD	67	65	18	18	21
FDcorr.	56	55	15	15	18
Dialisato mg/ trattamento	7	12	4	144	24

FD: Fine dialisi - FDcorr: Valori di fine dialisi corretti per l'emoconcentrazione

l'incremento della concentrazione di B-tromboglobulina. Si osservano modesti incrementi con il cuprophane e con il PMMA; le altre membrane non determinano significative variazioni di tale parametro.

Considerando ora la tecnica nel suo complesso, valutiamo gli aspetti relativi alla generazione e rimozione della B2-microglobulina (B2-m). La B2-m è un polipeptide del peso molecolare di 11.800 D che costituisce la catena leggera degli antigeni di istocompatibilità di Classe I. Tale peptide si trova depositato negli ammassi di sostanza amiloide presenti nell'osso e nelle

articolazioni dei pazienti cronicamente dializzati.

L'emodialisi, tecnica prevalentemente diffusiva per quanto riguarda la depurazione del sangue, è sicuramente meno efficace delle tecniche in cui prevale o è esclusiva la convezione.

Accanto alle capacità depurative bisogna considerare anche la possibile generazione intradialitica di B2-m, indotta dalla stimolazione del sistema immunitario e quindi espressione della biocompatibilità in generale. Nella Tabella VII sono riportati i risultati relativi alle variazioni della concentrazione di B2-m durante il trattamento diali-

TAB. VIII - ATTIVAZIONE DEL COMPLEMENTO E DEI NEUTROFILI IN HF

	Basale	20min Art.	20min Vena	UF
C3a ng/ml	247	323	1315	225
C5a ng/ml	21	27	39	22
	Basale	60 min		
α -1E-PI mcg/L	12	60		

20min Art-20min Vena :valori misurati all'ingresso ed all'uscita del filtro dopo 20 min dall'inizio dell'emofiltrazione-UF: valori misurati contemporaneamente nell'ultrafiltrato. Si noti come l'alta permeabilità della membrana permetta un elevato trasporto delle anafilossine

tico accanto alla quantità misurata nel volume totale di dialisato raccolto. I valori a fine dialisi sono stati inoltre corretti per l'emoconcentrazione con la formula proposta da Bergström (3).

Secondo i nostri dati, le membrane cellulosiche inducono un modesto ma significativo aumento della concentrazione di B2-m durante la dialisi, pur tenendo conto della emococoncentrazione, accanto ad una irrilevante rimozione. Al contrario, le membrane sintetiche garantiscono un'ottima rimozione anche se non è possibile affermare quale sia il loro ruolo nell'attivazione della produzione intradialitica. Il PMMA ed il PAN adsorbono grandi quantità di B2-m per cui pur essendo esigue le quantità repertate nel dialisato, la concentrazione durante la dialisi si riduce significativamente.

Emofiltrazione -HF

Questa tecnica depurativa sfrutta esclusivamente la convezione al fine della rimozione di soluti. Le membrane impiegate (quali la poliamide-PA) devono possedere particolari doti di permeabilità e quindi permettono il passaggio di molecole di dimensioni relativa-

mente grandi, incluse la B2-m e le anafilossine. Questo, unitamente alla scarsa attivazione del complemento per la buona biocompatibilità della PA ed alla totale sterilità del reinfusato, impone questa metodica come altamente biocompatibile. Nella Tabella VIII sono riportati i dati dell'attivazione del complemento e dei neutrofili e nella Tabella IX i dati relativi alla rimozione della B2-m in 17 pazienti trattati cronicamente con HF.

Emodiafiltrazione-HDF

L'emodiafiltrazione associa alla diffusione più o meno elevati flussi convettivi, impiegando membrane sintetiche di diversa superficie ma

comunque di elevata permeabilità. Tali membrane hanno la medesima natura chimica di quelle usate in emodialisi per cui, per quanto riguarda la loro biocompatibilità, si rimanda a quanto sopra esposto a proposito dell'emodialisi.

La tecnica in sé, al contrario, merita di esser discussa a parte. Infatti la presenza della membrana ad alta permeabilità, pur consentendo una elevata rimozione di soluti, nel contempo può determinare un passaggio retrogrado (back filtration) (4) dal bagno di dialisi al sangue. Il bagno di dialisi, pur essendo sterile, nel senso che non contiene batteri vitali, può contenere loro prodotti di lisi (endotossina) e determinare l'attivazione dei sistemi biologici precedentemente illustrati.

Paired Filtration Dialysis (PFD)

È una tecnica di più recente introduzione (5) nella quale la convezione e la diffusione vengono effettuate contemporaneamente ma separatamente nelle due camere del filtro. Tale metodica consente una discreta clearance convettiva, elimina l'interferenza prodotta dalla contemporanea convezione e diffusione ma soprattutto annulla il ri-

TAB. IX - ATTIVAZIONE DEL COMPLEMENTO E DEI NEUTROFILI IN PFD

	Basale	20 min Art.	20 min Vena
C3a ng/ml	482	1455	1905
C5a	60	125	163
	Basale	60 min	
α -1E-PI mcg/L	26	71	

20min Art-20min Vena: valori misurati all'ingresso ed all'uscita del filtro dopo 20 min dall'inizio del trattamento

TAB. X - RIMOZIONE DELLA B2-m IN PFD

	Basale	60min	120min	FD	UF
B2-m mg/L	33	28	23	19	108

60min, 120min, FD: valori misurati dopo 60-120 minuti di dialisi ed al termine della stessa, corretti per l'emoconcentrazione - UF: quantità assoluta misurata nell'ultrafiltrato

schio di back filtration.

Sono stati studiati 25 pazienti trattati con PFD per un anno con un filtro costituito da una camera in hemophan (componente diffusiva) ed una camera in polisulfone (componente convettiva); abbiamo valutato l'attivazione del complemento, la liberazione di α -1-EPI e la rimozione di B2-m con tale tecnica. I dati riportati nelle Tabelle IX e X dimostrano una modesta attivazione del complemento e dei neutrofili accanto ad una buona rimozione della B2-m. È interessante notare come la PFD, pur impiegando una membrana cellulosa, dimostri una biocompatibilità sovrapponibile completamente a quella delle tecniche che utilizzano membrane sintetiche.

CONCLUSIONI

In conclusione, l'emofiltrazione

appare la tecnica dialitica più biocompatibile; l'emodialisi convenzionale, quando le membrane usate non sono ad alta permeabilità, (e quindi non vi è la possibilità di back filtration) appare anch'essa relativamente biocompatibile (ma insufficiente per quanto riguarda la rimozione di B2-m); l'emodiafiltrazione, infine, appare la tecnica più a rischio per quanto riguarda l'attivazione dei sistemi biologici di risposta flogistica, anche se la rimozione di B2-m appare elevata, insieme ad una scarsa generazione di anafilotossine ed una abbondante rimozione di queste per adsorbimento sulla membrana stessa (a seconda della sua natura chimica) o per convezione. La PFD si propone, infine, come una valida evoluzione del concetto di emodiafiltrazione.

Bibliografia

1. Chenoweth DE, Cheung AK, Henderson LW. Anaphylotoxin formation during hemodialysis: effect of different dialyzer membranes. *Kidney Int* 1983; 24: 764-9.
2. Horl WH, Jochum M, Heiland A, Fritz H. Release of granulocyte proteinases during hemodialysis. *Am J Nephrol* 1983; 3: 213-7.
3. Bergström J, Wehle B. No change in corrected B2-m concentration after cuprophane hemodialysis. *Lancet* 1987; i: 628-31.
4. Ronco C. Back filtration: a controversial issue in modern dialysis. *Int J Artif Organs* 1988; 2: 69-74.
5. Ghezzi PM, Frigato G, Fantini GF. Theoretical model and first clinical results of the Paired Filtration Dialysis (PFD). *Life Support System* 1983; S1: 271-4.