

Le tecniche di plasmaferesi

Ghil Busnach

Divisione di Nefrologia e Dialisi, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano

La plasmaferesi (PE) è una tecnica di circolazione extracorporea che consente di rimuovere plasma dal sangue intero. Questa tecnica ha trovato, dopo entusiasmi iniziali e successivi ridimensionamenti, una sua collocazione nella terapia di supporto e sintomatica, raramente eziologica, di malattie in cui è necessario ridurre la concentrazione del pool circolante di una determinata sostanza non estraibile con altre metodiche. Le indicazioni alla plasmaferesi, per quanto numerose ed estranee a questo particolare contesto, possono essere fondamentalmente ricondotte al trattamento di due grandi gruppi di malattie, quelle immunologiche e quelle tossico-metaboliche, da "tossici" sia endogeni che esogeni.

Lo sviluppo di tecnologie atte ad ottenere una separazione efficace di plasma ha reso le procedure di aferesi una pratica routinaria in molti centri, con possibili personalizzazioni delle sedute a seconda delle malattie da trattare.

Gli aspetti tecnici di una plasmaferesi terapeutica possono essere ricondotti alla seguente suddivisione:

- 1) separazione del plasma dal sangue intero;
- 2) sostituzione del plasma rimosso e composizione delle soluzioni di reinfusione;
- 3) frazionamento del plasma, o rimozione selettiva dal plasma delle sole sostanze anomale, tossiche o in eccesso.

Separazione del plasma dal sangue intero

Può essere attuata mediante due metodiche completamente diverse, la *centrifugazione* e la *separazione*. In entrambi i casi è necessario prevenire la coagulazione del circuito extracorporeo mediante l'aggiunta di anticoagulante: a meno di indicazioni specifiche, può essere indifferentemente utilizzato il citrato che inibisce la coagulazione chelando gli ioni Ca^{++} , o l'eparina che agisce a più livelli per inibizione dei fattori attivati della coagulazione.

Centrifugazione

Dei metodi di separazione del sangue il primo, storicamente e quantitativamente, è la *centrifugazione*, sinteticamente definita da un ricer-

catore sovietico come "chirurgia gravitazionale del sangue", poiché la separazione tra plasma ed elementi figurati avviene in virtù dei diversi coefficienti di sedimentazione. Le centrifughe, che hanno trovato largo impiego clinico quando è stato messo a punto un circuito con camera di separazione rotante "disposable", possono essere a flusso discontinuo e a flusso continuo, e sono le più diffuse, specialmente nei Centri Trasfusionali, poiché possono essere utilizzate sia per la plasmaferesi terapeutica che per la citoferesi, con raccolte frazionate di globuli bianchi e/o di piastrine.

Nei separatori a flusso discontinuo o intermittente, un recipiente di materiale plastico sterile e disposable ("bowl" o campana), collegato al paziente con normali vie ematiche, viene appoggiato su un piatto rotante (Fig. 1). La bowl, disponibile in misure di varia capacità, è a sua volta costituita da due parti concentriche, una rotante ed una fissa. Il sangue del paziente spinto da una pompa peristaltica entra dall'apice e fluisce verso il basso, venendo spinto alla periferia dalla forza centrifuga. La sepa-

razione delle fasi cellulare e plasmatica avviene in virtù della densità dei singoli componenti. Gli eritrociti, più densi, si ritrovano all'esterno della campana, mentre il plasma, più leggero, viene spinto verso il centro, da cui tracima, venendo raccolto in una sacca attraverso una via non rotante. Piastrine e globuli bianchi si ritrovano in posizione intermedia tra eritrociti e plasma, e con opportuni accorgimenti possono essere raccolti e frazionati. L'apparecchiatura e la tecnica, di grande versatilità, consentono di raccogliere plasma e di reinfondere la fase corpuscolata dopo averla diluita con appropriate soluzioni di reinfusione. La procedura tuttavia risulta lunga e ripetitiva, poiché va interrotta tutte le volte che la bowl si è riempita di globuli rossi concentrati che vanno reinfusi al paziente: ogni seduta di aferesi è perciò costituita da

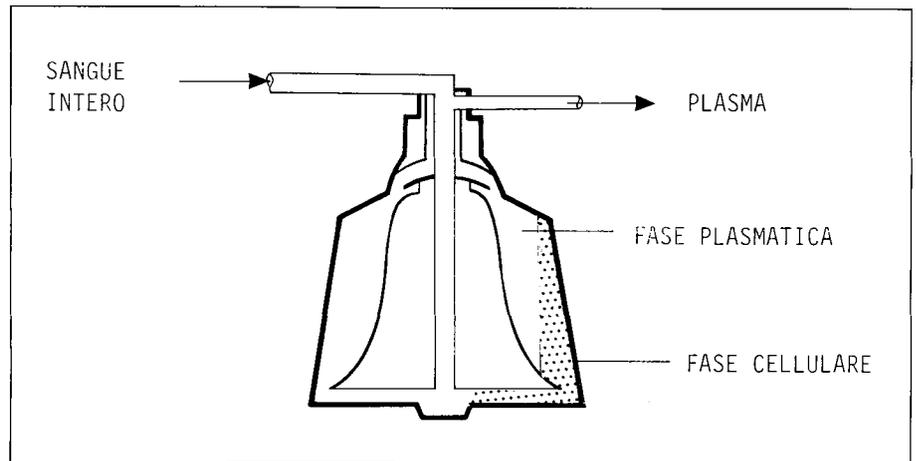


Fig. 1 - Separatore cellulare a flusso discontinuo. Schema della "bowl" appoggiata sul piatto rotante della centrifuga.

un numero di cicli di riempimento della bowl, che dipendono sia dalla capacità della bowl stessa, che dal valore di ematocrito del paziente: il volume di sangue nel circuito extracorporeo è elevato, e ciò spesso provoca ipotensioni sin-

tomatiche.

Nei separatori centrifughi a flusso continuo, la qualità e la velocità della separazione sono migliorati dal disegno dell'apparecchiatura, che prevede l'uso, al posto della bowl, di un canale di separazione rotante a sezione circolare ("cintura"), inserito ad anello in un piatto rotante, e collegato alle sue estremità con particolari giunti ad un nucleo centrale, non rotante, contenente dei tubi per l'ingresso di sangue intero e per l'uscita di plasma e di cellule ematiche concentrate (Fig. 2). In questo caso, le fasi cellulare e plasmatica vengono costantemente drenate dalla cintura ed avviate alla reinfusione al paziente la prima, ed allo scarto la seconda, mediante pompe peristaltiche a regolazione micrometrica, per consentire anche separazioni all'interfaccia plasma/cellule di popolazioni cellulari distinte (linfociti, piastrine).

La separazione del plasma mediante centrifughe risulta agevole praticamente in tutti i casi, ed ha il grosso vantaggio di essere utilizzabile anche con flussi di sangue minimi da accessi vascolari insufficienti. È però necessaria una appa-

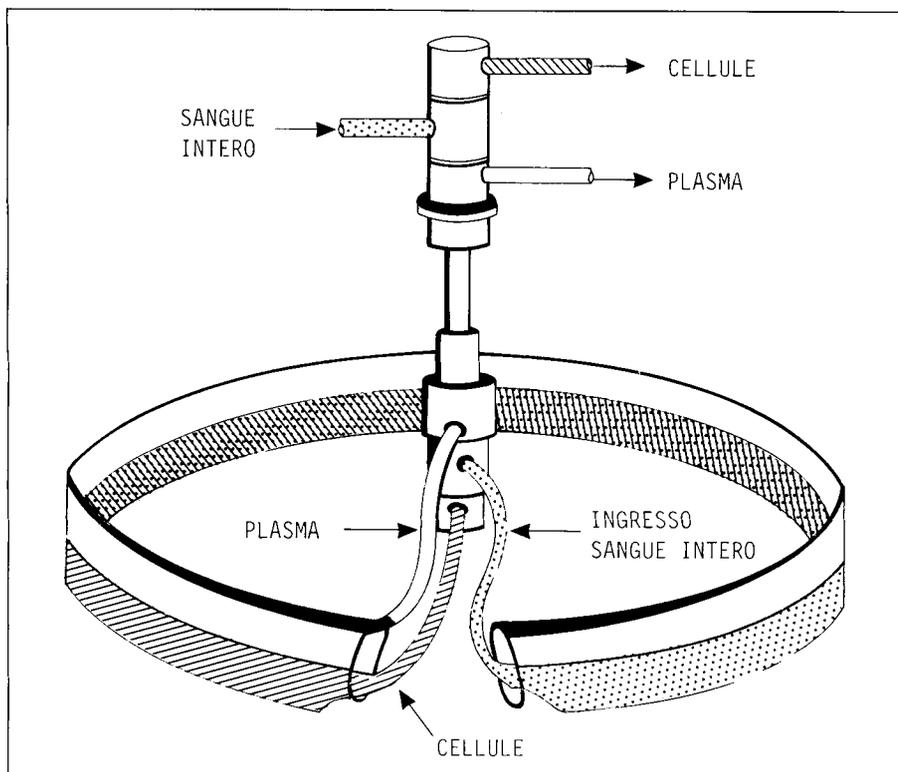


Fig. 2 - Separatore cellulare a flusso continuo. Schema della camera di separazione ("cintura").

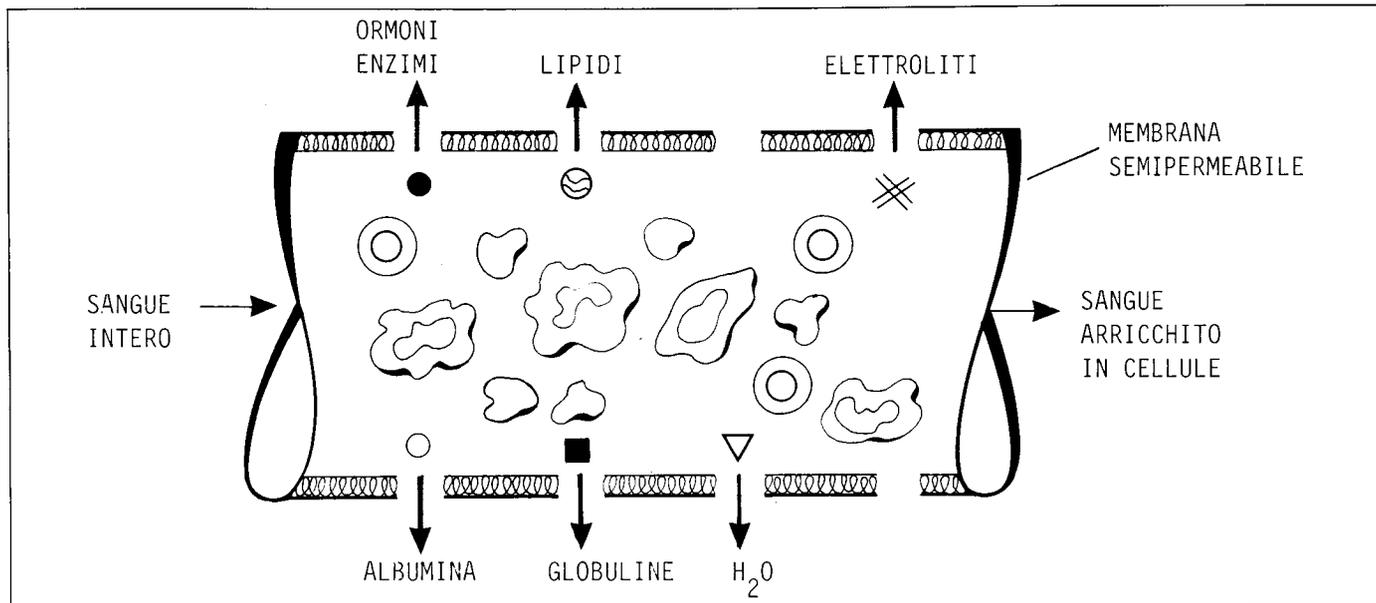


Fig. 3 - Principio della plasmaseparazione su membrane. Fibra capillare in sezione longitudinale: il sangue intero fluisce longitudinalmente all'interno della fibra, i componenti plasmatici attraversano i pori della parete in funzione delle loro dimensioni e del "cut-off" della membrana.

recchiatura (hardware) di relativa complessità e l'inconveniente maggiore resta una non completa separazione plasma/cellule, con possibili deplezioni cellulari, specie di piastrine, per procedure ripetute e ravvicinate.

Filtrazione

La plasmafiltrazione consente di separare una certa quantità di plasma dalla fase corpuscolata del sangue mediante l'applicazione di pressioni idrostatiche a membrane semipermeabili con determinate caratteristiche di porosità (Fig. 3). Un plasma virtualmente acellulare può essere ottenuto, senza costoso hardware, mediante separatori plasmatici, nella classica configurazione di filtri a membrane o a fibre capillari. La plasmafiltrazione, che offre anche il vantaggio di un ridotto volume ematico extracorporeo, ha tuttavia dei limiti operativi legati alle geometrie dei filtri ed al rispetto di determinate con-

dizioni d'impiego. Per consentire una efficace plasmafesi è pertanto necessario approfondire: **a)** le proprietà specifiche delle membrane e dei moduli; **b)** le caratteristiche reologiche del sangue; **c)** le condizioni operative.

a) Proprietà specifiche delle membrane e geometrie dei moduli

Le dimensioni dei pori di una membrana di plasmafiltrazione sono tali da consentire il passaggio di molecole con p.m. fino a 2.000.000 daltons circa, proprietà quindi di gran lunga superiori a quelle della membrana basale del glomerulo renale o delle membrane semipermeabili abitualmente in uso in emodialisi ed in emofiltrazione. Una membrana con porosità nominale di 0.2-0.6 μm soddisfa i criteri richiesti per una plasmafiltrazione e cioè in primo luogo di garantire il passaggio di oltre 95% delle proteine plasmatiche.

Le caratteristiche di filtrazione di una membrana per un determinato soluto sono determinate dal "sie-

ving coefficient" cioè dal coefficiente di setacciamento per quel soluto, definito come:

$$s = 2C_f/C_a + C_v$$

in cui C_a e C_v sono rispettivamente le concentrazioni del soluto all'ingresso e all'uscita del filtro, e C_f è la concentrazione del soluto nel filtrato. Nella pratica, s è essenzialmente il rapporto tra C_f e C_a . Per $s=1$ la membrana è totalmente permeabile, e per $s=0$ totalmente impermeabile (Fig. 4).

In un sistema di plasmafiltrazione, in cui il plasma attraversa la membrana semipermeabile per filtrazione e non per ultrafiltrazione, il rendimento ottimale sarà legato al mantenimento di una bassa pressione di transmembrana (TMP): in caso contrario si osserverà una progressiva riduzione tanto della resa di plasma che dei suoi coefficienti di sieving, per formazione di uno strato, alla superficie interna della fibra, formato da elementi cellulari ematici, in prevalenza piastrine, e la comparsa di emolisi

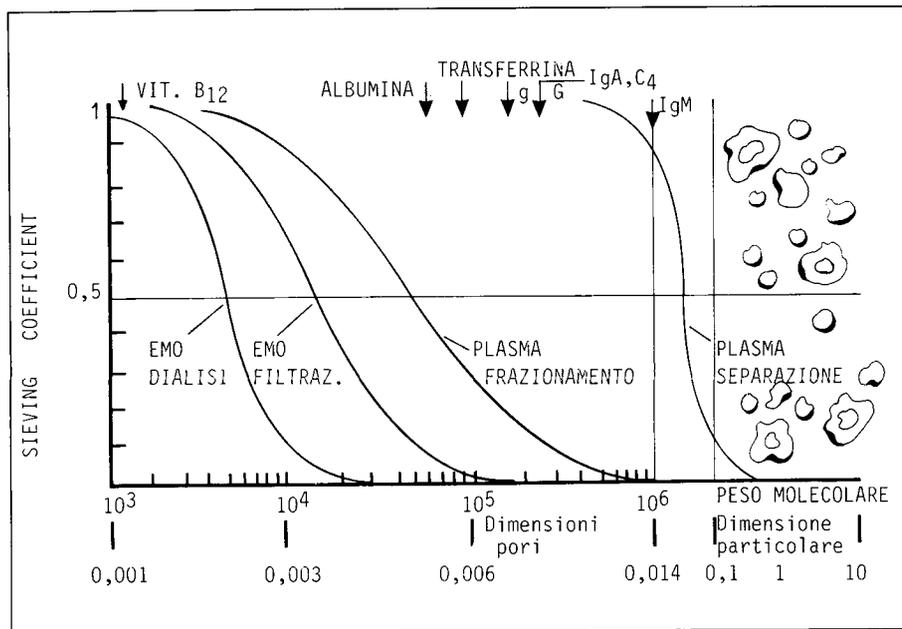


Fig. 4 - Proprietà fisiche di alcune membrane semipermeabili usate in emodialisi, emofiltrazione e plasmaferesi. Per quest'ultima sono rappresentate le caratteristiche delle membrane di separazione del plasma dalla fase cellulare del sangue e di frazionamento del plasma stesso.

per trauma meccanico delle emazie.

Durante la produzione di plasmafiltrato, infatti, le cellule ematiche tenderanno a seguire il flusso di plasma verso l'esterno della membrana, formando uno strato in accumulo. Questo fenomeno sarà controbilanciato dalle forze di trascinarsi sulle pareti del capillare del plasma filtrato, e cioè dello "shear rate". Più alto sarà lo shear rate e minore sarà la formazione dello strato che si oppone alla plasmafiltrazione. In pratica, l'aumento dello shear rate può essere ottenuto sia aumentando la velocità del flusso ematico che riducendo il raggio del capillare. Tuttavia, sia l'aumento del flusso ematico che la riduzione del calibro delle fibre capillari hanno come inevitabile conseguenza l'incremento della TMP, e ne consegue un'aumentata incidenza di emolisi, per trauma meccanico delle emazie.

Quasi tutte le membrane di plasmafiltrazione sono oggi configurate in filtri a fibre cave, ottenute dalla lavorazione di numerosi materiali quali acetato di cellulosa, polipropilene, polivinilalcol, polimetilmetacrilato, polisulfone, ecc. La superficie di questi filtri, che dipende dal numero di fibre cave assemblate in un modulo, varia tra i 0,2 e i 0,6 mq, con spessori di fibra da 90 a 150-200 µm e diametro interno tra 320 e 400 µm. Le condizioni ottimali di filtrazione si hanno per TMP ≤ 50 mmHg.

Requisiti indispensabili per una membrana di plasmafiltrazione sono l'idrofilia del materiale, la dimensione dei pori che consenta il passaggio di macromolecole ma non di cellule, la biocompatibilità che garantisca l'assenza di danno ai componenti ematici e la resistenza a diverse condizioni operative in modo da consentire una separazione di plasma sufficiente-

mente stabile per tutta la durata di una seduta e la possibilità di impiego con un ampio range di flussi ematici.

b) Proprietà del sangue

Il flusso massimale di plasma filtrato è correlato alla viscosità del sangue intero. A sua volta questo dipende dalla viscosità del plasma, che può aumentare anche enormemente in presenza di paraproteine e di crioglobuline, e dal valore di ematocrito. Poiché la viscosità del sangue aumenta marcatamente quando l'ematocrito supera 60%, la separazione del plasma sarà inadeguata in presenza di emocoagulazione. Quest'ultima condizione inoltre è "fisiologicamente" presente nella porzione terminale della fibra capillare, e limita perciò l'efficacia della filtrazione.

c) Condizioni operative

Per eseguire la plasmafiltrazione, vi sono delle apparecchiature semiautomatiche con pompe peristaltiche che consentono la reinfusione al paziente con volumi pari o inferiori a quelli plasmatici rimossi, a seconda delle necessità cliniche. La velocità delle pompe può essere proporzionata in modo da mantenere una TMP adeguata, ed evitare pertanto i problemi di emolisi. La metodica tuttavia può essere agevolmente eseguita utilizzando delle normali pompe per emodialisi. In questo caso, una pompa viene utilizzata per il prelievo di sangue *in toto*, che viene avviato al filtro: mentre il plasma separato viene raccolto per caduta in un recipiente graduato, la soluzione di reinfusione viene spinta nella quantità desiderata da una seconda pompa peristaltica nel pozzetto a valle del filtro, dove si miscela alla fase cellulare, e ritorna al paziente. È anche possibile, purché non venga creata una pres-

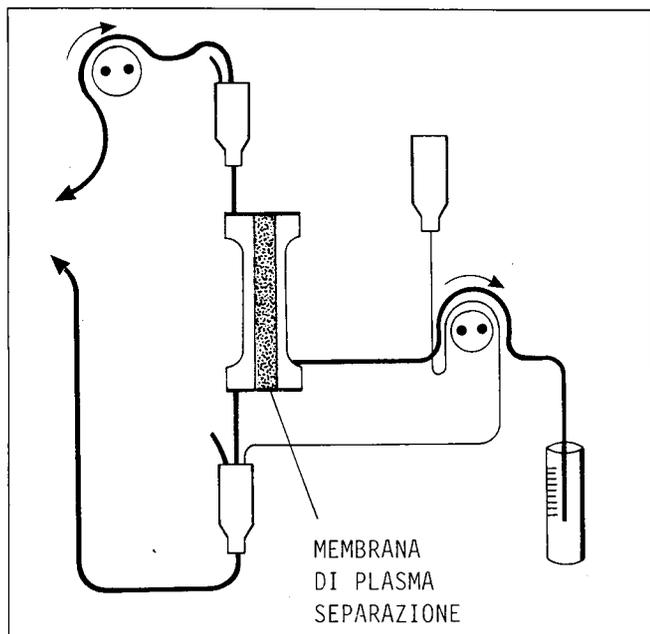


Fig. 5 - Schema di plasmafiltrazione. Nel disegno, le vie di prelievo del filtrato e di reinfusione del liquido di sostituzione sono montate sulla medesima pompa per garantire uno scambio isovolemico.

sione negativa nel compartimento plasmatico, inserire nella stessa pompa sia la via del prelievo di plasma che quella della reinfusione, in modo da mantenere un volume di scambio rigorosamente uguale (Fig. 5). Aggiungendo alle vie di prelievo e di reinfusione al paziente delle sacche che fungano da serbatoi, l'uso di una doppia pompa consente di superare il problema dell'accesso vascolare singolo. Vantaggio certo della plasmafiltrazione è rappresentato dal ridotto volume di sangue nel circuito extracorporeo, dalla facilità di impiego e dalla resa di plasma senza cellule; il sistema è però penalizzato in caso di accesso vascolare precario che rende la procedura un poco più faticosa, alla ricerca di un equilibrio tra flussi e TMP idonee.

Sostituzione del plasma rimosso e composizione delle soluzioni di reinfusione

Nella maggior parte delle indica-

zioni alla plasmaferesi, l'obiettivo perseguito è la rimozione di un patogeno immunologico, di una proteina cioè che rappresenta meno dell'1% del pool proteico circolante. Le paraproteinemie rappresentano l'eccezione, in cui le proteine patologiche possono costituire fino al 25% del totale rimosso. Per eliminare perciò una quantità modesta o minima di agente patogeno, si rende necessario scartare inutilmente una grande quantità di proteine plasmatiche normali, che devono essere rimpiazzate da un sostituto o da un derivato plasmatico. La reinfusione deve generalmente essere isovolemica, cioè pari al volume di plasma scartato, e nei casi in cui il flusso plasmatico durante la procedura sia elevato, diventa di particolare importanza l'impiego di soluzioni di reinfusione il più possibile "compatibili". Per quanto "fisiologica" sia la composizione della soluzione di reinfusione, saranno inevitabili modificazioni elettrolitiche e deplezioni proteiche. I requisiti di una reinfusione ideale dovrebbero

essere i seguenti:

- distribuirsi adeguatamente nel compartimento intravascolare ed avere emivita sufficiente;
 - non portare a deplezione proteica;
 - non essere tossica;
 - essere facile da usare, prontamente disponibile e mantenere un efficace rapporto costo/beneficio.
- La scelta della reinfusione dipende inoltre dal tipo di malattia che si intende trattare, dalla tolleranza individuale, dalla frequenza e volume di scambio previsto e dalla valutazione del controllo volumico. Vengono generalmente impiegate soluzioni di cristalloidi (non proteici) e di colloidi. Le più usate sono:

1) Soluzioni elettrolitiche: soluzione fisiologica, Ringer. Non hanno proprietà oncotiche, e vengono rapidamente eliminate dal circolo. Sono spesso usate per diluire derivati plasmatici e raramente sono impiegate da sole.

2) Plasma expanders: destrani a basso peso molecolare, gelatine, amido idrossietilico. Producono una pressione osmotica pari o superiore a quella del plasma; vanno perciò usati con cautela in caso di insufficienza cardiopolmonare o renale. Sono inoltre potenzialmente immunogeni.

3) Frazioni proteiche purificate: albumina, soluzioni di plasmaproteine purificate (PPF), immunoglobuline per uso endovenoso. La prima è di gran lunga la più usata, in diluizioni che vanno dal 2,5 al 5%. Per quanto rari, non sono da trascurare gli effetti collaterali, per possibili contaminanti (attivatori della callicreina) presenti in tracce, osservabili tuttavia alle dosi impiegate durante una procedura di PE, in cui oltre 80g di albumina vengono somministrati in due-tre

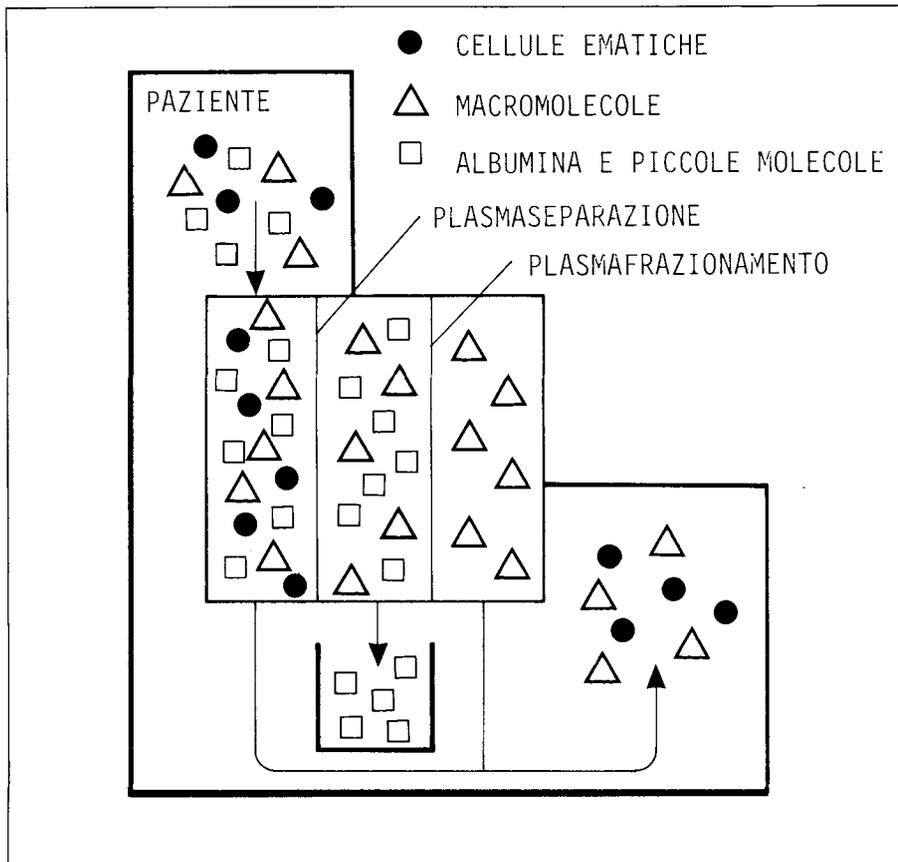


Fig. 6 - Schema illustrante il principio della filtrazione a cascata.

ore. Il metodo di preparazione commerciale dell'albumina annulla i rischi di trasmissione di virus. Le soluzioni di PPF non vengono praticamente più impiegate, anche a causa della elevata incidenza di effetti collaterali precoci (da contaminanti) o tardivi (virus epatitici). L'uso di immunoglobuline endovena ha senso in PE solo in caso di comprovata necessità come sostituzione specifica, non certo per mantenere un equilibrio volumico e oncotico.

4) Plasma fresco congelato (PFC). È costituito da plasma intero ottenuto da un solo donatore e addizionato di citrato come anticoagulante (ACD). L'impiego di grandi quantità durante una PE richiede necessariamente il rigoroso rispet-

to della compatibilità ABO per evitare emolisi; la sua contaminazione con cellule spiega la possibilità di alloimmunizzazione, particolarmente per il sistema Rh. Contiene tutti i fattori della coagulazione, compresi quelli labili, ma anche i principali mediatori della flogosi. Può essere contaminato dai virus epatitici, da CMV e da HIV. Il citrato, infuso durante la procedura, riducendo i livelli sierici di calcio ionizzato, può provocare delle ipocalcemie sintomatiche.

Frazionamento del plasma

La difficoltà ad avere una reinfusione "ideale", per tutti i motivi precedentemente ricordati, e lo sviluppo tecnologico hanno en-

trambi portato ad utilizzare tecniche di modificazione del plasma, con le quali il plasma stesso del paziente, opportunamente trattato, potesse essere riutilizzato nel paziente medesimo e nel corso della procedura.

Dopo la *separazione* del plasma, si è quindi sviluppato il *frazionamento* del plasma con tecniche di 1) filtrazione a cascata e di 2) plasmaperfusione *in vivo*.

Filtrazione a cascata (CF)

Nella configurazione originale di "doppia filtrazione", due plasmafiltri con differenti caratteristiche di porosità vengono posti in serie in un circuito extracorporeo (Fig. 6). Il primo filtro separa la fase cellulare da quella plasmatica, e quest'ultima viene avviata in un secondo filtro (filtro secondario o di frazionamento) dotato di pori di dimensioni ridotte. Il plasma filtrato dal filtro di frazionamento, ricco di elettroliti, sostanze di piccolo peso molecolare e di albumina, viene reinfuso al paziente dopo essere stato miscelato alla fase cellulare ottenuto dal primo filtro, mentre il plasma non filtrato, ricco di macromolecole, (il "retentato") viene scartato dal circuito. La tecnica della filtrazione a cascata, che può essere altrettanto bene eseguita utilizzando un separatore cellulare centrifugo come primo elemento del circuito extracorporeo, è in grado perciò di concentrare sostanze di grosso peso molecolare e di scartarle dal plasma intero in maniera discretamente selettiva. I pori delle membrane di frazionamento sono tali da consentire la separazione di sostanze con pesi molecolari superiori all'albumina, come le IgM, gli immunocomplessi e le grosse betalipoproteine, vettrici delle frazioni aterogene del

colesterolo.

Le caratteristiche delle membrane e le geometrie dei filtri attualmente disponibili costituiscono un importante limite alla esecuzione di procedure di rimozione altamente selettiva, dato che il frazionamento del plasma è basato sul cut-off delle membrane e quindi sulle loro proprietà fisiche. Il frazionamento del plasma, oltre che dalla porosità della membrana dipende anche dalla temperatura, essendo più efficace per temperature vicine a quella del sangue. Vi sono tuttavia delle macromolecole patogene, le *crioglobuline*, che formano un gel alle basse temperature e che possono perciò venire rimosse efficacemente processando il plasma tra i 4 e gli 8 °C mediante *criofiltrazione*.

La CF può essere eseguita con diverse modalità operative, modificando opportunamente il circuito e/o i flussi di frazionamento, allo scopo di ottimizzarne la resa. Le diverse velocità di flusso, infatti, modificano la dinamica dei fluidi da frazionare, condizionando diverse rese e grado di purezza delle piccole molecole e dell'albumina da reinfondere.

1) *CF con ricircolo ed elevato flusso di plasma* (Fig. 7). Il plasma non permeabile alla membrana secondaria (retentato) viene ricircolato dopo essere stato miscelato al plasma ottenuto dal modulo di separazione dal sangue intero: vengono mantenuti in questo modo delle velocità di flusso 4-5 volte superiori al flusso di plasma separato. Si ottiene in pratica un disaccoppiamento tra flussi di plasma separato e frazionato, ottimizzando i valori di shear rate, minimizzando l'accumulo di proteine sulle pareti interne delle fibre capillari: ne risulta un ridotto spessore della

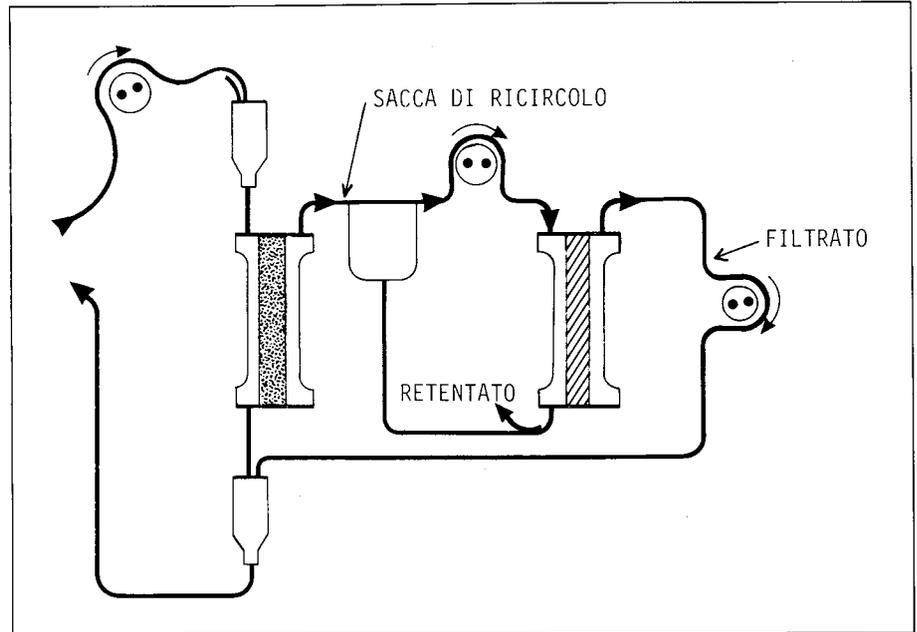


Fig. 7 - Schema di filtrazione a cascata con modalità operativa a ricircolo ed elevato flusso di plasma (fresco + retentato) nel circuito di frazionamento.

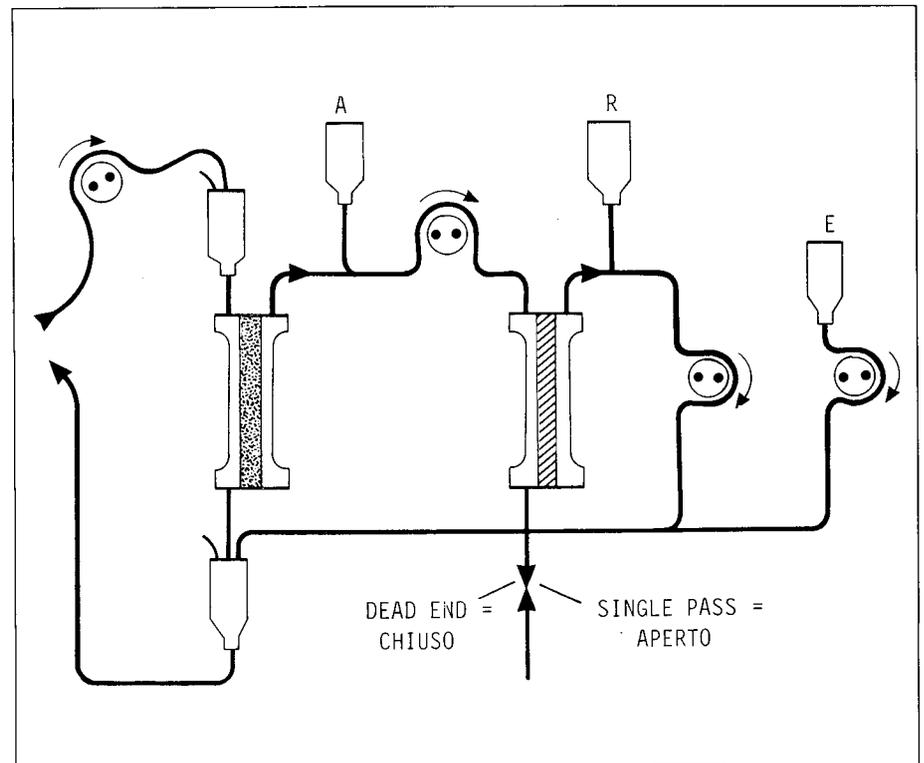


Fig. 8 - Schema di filtrazione a cascata con modalità operativa a "dead-end" (via di efflusso del filtro secondario chiusa) ed a "single-pass" (via di efflusso aperta o semiaperta). Nella modalità a single-pass è indispensabile una soluzione di reinfusione esogena (E) (a destra nel disegno). Il lavaggio del circuito di frazionamento ("rigenerazione" del circuito) avviene sia per via anterograda (A) seguendo il flusso del plasma, che per via retrograda (R), dal compartimento plasmatico verso l'interno delle fibre. Durante la rigenerazione, la via di efflusso è aperta.

membrana di frazionamento. Il ricircolo di plasma “fresco” e di retentato porta ad un rapido aumento di concentrazione proteica, da una parte riducendo i volumi di materiale scartato, ma dall'altra penalizzando i coefficienti di sieving, che variano continuamente con le condizioni di flusso e la composizione del plasma stesso.

2) CF a “dead-end”: in questa modalità operativa la via di efflusso del retentato è chiusa (Fig. 8). Il flusso di plasma filtrato è pari a quello prodotto dal modulo di separazione, in genere attorno ai 25-30 ml/min.

La resa di albumina e di piccole molecole è generalmente elevata, ma strettamente dipendente dal volume di plasma trattato. La TMP tende ad elevarsi precocemente, e quando la pressione di ingresso nel filtro supera i 300 mmHg, si rendono necessari dei lavaggi del circuito di frazionamento per liberare i pori della membrana dagli aggregati proteici. Questi lavaggi, generalmente con soluzione fisiologica, possono essere eseguiti sia per via anterograda (A), seguendo la direzione del flusso di plasma, che per via retrograda (R) dal compartimento del plasma verso l'interno delle fibre. In entrambi i casi la via di efflusso del filtro va mantenuta temporaneamente aperta. Il retentato viene in questo modo scartato, e può essere raccolto per dosare la quantità e la qualità di sostanze rimosse. Resta indeterminabile, nella pratica clinica, la quantizzazione della quota proteica rimasta intrappolata nella membrana.

3) CF a “single-pass”: il circuito e le modalità operative sono simili alla precedente, ma la via di efflusso dal filtro secondario viene la-

sciata parzialmente o totalmente aperta, permettendo lo scarto di una frazione costante di retentato (Fig. 8). La resa e la qualità di filtrato si mantengono costanti per tutta la durata del trattamento, indipendenti perciò dal volume di plasma trattato, a differenza della modalità a dead-end, ma si rende indispensabile reinfondere un supplemento esogeno.

L'efficacia della procedura di CF, oltre che con il calcolo dei coefficienti di sieving, può essere valutata anche con il calcolo del “recovery” di una data sostanza, ossia dalla quantità di soluto che si ritrova in circolo dopo la procedura. Una CF sarà tanto più efficace quanto maggiore sarà il divario tra recovery di albumina (elevato) e quello di macromolecole (basso). I migliori risultati si ottengono generalmente con procedure di CF a dead-end, purché sia adeguata la quantità di plasma frazionato reinfuso.

Per ottenere una procedura efficace ed in tempo ragionevole, i filtri secondari hanno in genere superfici comprese tra 1 e 1,5 m²; in queste condizioni sono presumibili flussi di plasma filtrato attorno ai 30 ml/min. Una riduzione di superficie comporta un aumento della TMP, come risultato dell'intrappolamento di proteine nella membrana. In genere il volume di plasma da trattare è compreso tra i 2 e i 3 litri, considerando efficace il trattamento di un volume plasmatico corporeo per procedura, pari a circa 40-50 ml di plasma per kg di peso.

Plasmaperfusione

La perfusione è una tecnica mediante la quale componenti plasmatici indesiderati (tossici, in eccesso o anomali) vengono rimossi

dal circolo attraverso sostanze adsorbenti con le quali viene messo a contatto il plasma.

L'adsorbimento può essere di tipo immunologico e/o di tipo selettivo.

Per *immunoadsorbimento* si intende, in presenza di anticorpi o di antigeni da rimuovere, la perfusione di plasma in una colonna (bioreattore) contenente una fase solida, a cui sono covalentemente legati rispettivamente antigeni o anticorpi specifici. La formazione di un legame strettamente specifico tra antigene ed anticorpo nel bioreattore in cui il ligando è a sua volta non staccabile dalla fase solida su cui poggia, determina la riduzione o la scomparsa anche con un solo passaggio della sostanza plasmatica indesiderata nel plasma effluente, che così depurato può essere reinfuso al paziente.

L'*adsorbimento selettivo* consiste invece nella rimozione di componenti plasmatici a mezzo di ligandi diversi, che non interagiscono con legami di tipo immunologico.

La tecnica di plasmaperfusione, in un primo tempo attuata con bioreattori contenenti microparticelle di carbone attivato e perciò altamente aspecifica, si è progressivamente perfezionata con la messa a punto di ligandi specifici. Il limite di questa tecnica è la *saturazione* del bioreattore, giunti alla quale non è ulteriormente possibile rimuovere dal plasma la sostanza indesiderata. La saturazione della colonna dipende naturalmente sia dalla concentrazione plasmatica della sostanza da trattare che dalla capacità di legame e dal volume di ligando utilizzato. Vi è però la possibilità di rigenerare la colonna, “distaccando” con apposite soluzioni la sostanza adsorbita e scaricandola, riutilizzando perciò teoricamente all'infinito il medesimo

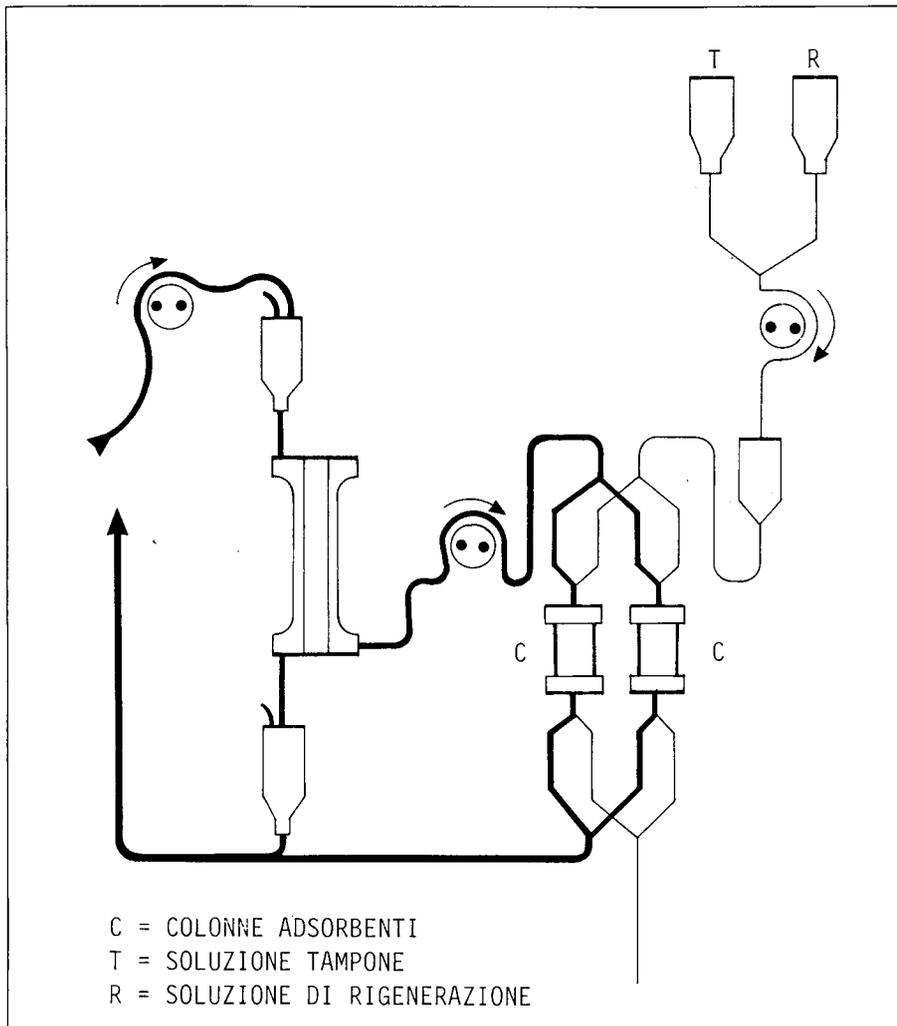


Fig. 9 - Schema di plasmaperfusione sia per immunoadsorbimento che per adsorbimento selettivo con coppia di colonne adsorbenti in parallelo, delle quali alternativamente una è perfusa con plasma e l'altra rigenerata con soluzioni di rigenerazione (R) e soluzioni tampone (T).

bioreattore. Esistono oggi dei sistemi di plasmaperfusione che prevedono l'impiego, con circolazione crociata, di due bioreattori in parallelo: una serie di valvole, regolate da un microprocessore, consente l'adsorbimento di plasma su una colonna e la contemporanea rigenerazione della seconda, in modo da trattare on-line quantità in teoria illimitate di plasma, su colonne sempre avida di legame (Fig. 9).

A titolo di esempio, si ricordano i

sistemi di plasmaperfusione su colonne contenenti proteina A, per l'immunoadsorbimento di IgG, e l'adsorbimento selettivo di LDL-colesterolo su colonne di destrano solfato (LDL-afesi).

Nel primo caso, la proteina A, costituente della parete cellulare di alcuni ceppi di *Staphylococcus aureus*, è in grado di legare in maniera altamente selettiva delle IgG di classe 1, 2 e 4 nonché immunocomplessi contenenti IgG. La proteina A è stata pertanto estratta e

purificata, o riprodotta con tecniche di ingegneria genetica, legata covalentemente ad una matrice inerte ed immobilizzata in una colonna per procedure di immunoadsorbimento *in vivo*.

Il legame della proteina A agli anticorpi è in grado di attivare la via classica del complemento, portando a citolisi e generazione di anafilotossine. È possibile prevenire l'attivazione della cascata complementare utilizzando come anticoagulante il citrato, per la sua capacità di chelare Ca^{++} e Mg^{++} .

Nella LDL-afesi con destrano solfato viene invece sfruttata la capacità di legarsi a sostanze polianioniche delle lipoproteine a bassa densità (LDL), vettrici della quota maggiore di colesterolo aterogeno. Vengono in questo modo risparmiate le quote di HDL-colesterolo, ad attività antiaterogena. La possibilità di rigenerazione dei bioreattori permette di rimuovere grandi quantità di LDL mantenendo un piccolo volume extracorporeo.

Le modalità operative di plasmaperfusione sono simili a quelle della filtrazione a cascata a "dead-end": il plasma ottenuto da un primo modulo di separazione viene spinto con bassi flussi su una colonna di adsorbimento. Il plasma effluente, in questo caso non "filtrato" ma "adsorbito", viene riunito alla fase cellulare e reinfuso al paziente.

A seconda del tipo di bioreattore utilizzato esistono nei diversi monitors disponibili dei sistemi di controllo che impediscono l'infusione al paziente di liquidi diversi dal plasma depurato, quali soluzioni di lavaggio o di rigenerazione.

Bibliografia

1. Nosè Y, Malchesky PS, Smith JW, Krakauer RS (Eds.) Plasmapheresis. Therapeutic applications and new techniques. Raven Press, New York 1983.
2. Lysaght MJ, Gurland HJ (Eds.) Plasma separation and plasma fractionation. Karger, Basel 1983.
3. Mineshima M, Agishi T, Kaneko I, Hasuo Y, Era K, Ota K. Performance evaluation of conventional and modified double filtration plasmapheresis (DFPP). *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1984; 30:665-70.
4. Larsson L-Å, Freiburghaus C, Nilsson IM, et al. Plasmaregeneration system for extensive immunoadsorption. In: Nosè Y, Kjellstrand C, Ivanovich P, eds. *Progress in Artificial Organs* 1985; ISAO Press, Cleveland 1986; 902-4.
5. Freiburghaus C, Larsson L-Å, Sundqvist S-B, Nilsson IM, Thyssell H, Lindholm T. A summary of five years' clinical experience with extensive removal of immunoglobulins. *Plasma Ther Transfus Technol* 1986; 7:545-50.
6. Yokoyama S, Hayashi R, Kikawa T, et al. Specific sorbent of apolipoprotein B-containing lipoproteins for plasmapheresis. *Arteriosclerosis* 1984; 4:276-82.
7. Mabuchi H, Michisita I, Takeda M, et al. A new low density lipoprotein apheresis system using two dextran sulfate cellulose columns in an automated columns regenerating unit (LDL continuous apheresis). *Atherosclerosis* 1987; 68:19.