

V SESSIONE COMUNICAZIONI – EMODIALISI I
SALA CABIRIA
Giovedì, 9 Ottobre 2008 – ore 15.20-16.30

VALUTAZIONE MEDIANTE PROTEOMICA DELLA CAPACITÀ DI ADSORBIMENTO PROTEICO DI MEMBRANE PER EMODIALISI

Di Cesare M¹, Sirolli V¹, Pavone B², Lupisella S², Urbani A², Bonomini M¹
¹Istituto di Clinica Nefrologica, Dipartimento di Medicina, Università "G.d'Annunzio" di Chieti-Pescara; ²Centro Studi sull'Invecchiamento (Ce.S.I.), Fondazione "G.d'Annunzio", Chieti

Introduzione. La capacità di adsorbire proteine è un'importante proprietà delle membrane utilizzate nel trattamento emodialitico. L'adsorbimento proteico è difatti di fondamentale importanza per la biocompatibilità ed influenza l'efficienza delle membrane. L'analisi dettagliata dell'adsorbimento proteico da parte delle membrane dialitiche è stata fortemente limitata dall'assenza di un'adeguata tecnica di separazione ed identificazione proteica. Le nuove tecniche di proteomica permettono la contemporanea separazione, identificazione e caratterizzazione di singole proteine presenti anche in una miscela proteica complessa.

Scopi. Lo scopo del presente studio è stato quello di valutare mediante proteomica la biocompatibilità delle membrane in termini di adsorbimento proteico, correlando lo spettro delle proteine adsorbite con le proprietà chimico-fisiche delle membrane.

Materiali e metodi. È stato valutato l'adsorbimento proteico su 2 differenti membrane dialitiche, testate simultaneamente mediante 2 sistemi a circuito chiuso, posti in parallelo. In ciascun esperimento, attraverso i due dializzatori è stato fatto circolare sangue intero dello stesso donatore sano.

Le membrane testate sono state:

- Triacetato di cellulosa (Sureflux 50L – superficie effettiva 0.5 m²; Nipro Corporation, Japan)
- Helixone Polisulfone (FX 40 – superficie effettiva 0.4 m²; Fresenius Medical Care, Germany)

Prima della esposizione al sangue umano, i dializzatori sono stati lavati con 1000 ml di soluzione fisiologica allo 0.9% contenente EDTA 5 mM mediante pompa peristaltica a 50 ml/min. Successivamente 150 mL di sangue intero sono stati fatti circolare in ciascun circuito chiuso mediante una pompa peristaltica, alla velocità di 26 ml/min, per 30 minuti. Infine, le proteine adsorbite su ciascuna membrana sono state risolubilizzate mediante l'uso di soluzione denaturante tamponata, quantizzate (saggio all'acido bicinoninico) ed analizzate mediante elettroforesi bidimensionale e spettrometria di massa MALDI-TOF.

Risultati. Il totale di proteine adsorbite, normalizzato per una superficie di 0.5 m², non era significativamente differente tra le due membrane. La membrana di Polisulfone adsorbiva in media 179 proteine, mentre il Triacetato di Cellulosa adsorbiva in media 239 proteine. È di interesse la capacità del Triacetato di legare albumina ed apolipoproteine. Infatti differenti spot proteici appartenenti al gene trascrivente l'albumina sono risultati presenti nella mappa proteomica del Triacetato. Al contrario, l'Helixone lega solo una piccola porzione di albumina, mentre è particolarmente attivo nel trattenere proteine associate alla cascata

(segue)

ACCURATEZZA DEI VALORI DI PROCALCITONINA E PROTEINA C-REATTIVA NELLA DIAGNOSI DIFFERENZIALE DI INFEZIONE NEI PAZIENTI EMODIALIZZATI

Movilli E, Viola Battista F, Gaggia P, Camerini R, Zubani R, Mazzola G, Cancarini G
 Divisione di Nefrologia, Spedali Civili e Sezione di Nefrologia, Università di Brescia, Brescia

Introduzione. La accurata distinzione tra infezioni batteriche e stato infiammatorio cronico nei pazienti in emodialisi (HD) rimane un compito difficile. Comuni parametri di laboratorio come la conta leucocitaria (WBC), la VES e i livelli di Proteina C-reattiva (hsCRP) possono essere influenzati dallo stato uremico e dall'HD stessa. I livelli sierici di Procalcitonina (PCT) possono essere utili per la determinazione delle infezioni sistemiche nei pazienti uremici in HD. Tuttavia, in questa condizione sono state rilevate concentrazioni di PCT elevate anche in pazienti senza segni di infezione.

Scopo. Lo scopo di questo studio è stato valutare l'accuratezza dei valori di PCT e hsCRP nella diagnosi differenziale di infezione acuta nei pazienti emodializzati.

Pazienti e metodi. Tutti i 100 pazienti in trattamento HD presso il nostro Centro (62 maschi, 38 femmine; età 68±14 anni) sono stati valutati per la presenza (Inf-si) o assenza (Inf-no) di segni di infezione acuta. Il sospetto di infezione acuta era clinico, basato sulla presenza di febbre ≥ 38°C, nelle 48 ore precedenti la dialisi, e/o tosse, espettorato purulento, presenza di essudato eritema o flogosi in sede di accesso vascolare, traumi o ferite. Sono state valutate in pre HD nell'intervallo lungo PCT, hsCRP, emoglobina (Hb), WBC, piastrine (PLT), protidemia totale (TP), albumina (sAlb), sideremia (Sid), transferrina (T), ferritina (F), Temperatura corporea (TC) pre HD. Sono stati valutati anche i seguenti fattori di rischio: diabete, malattia vascolare periferica (VP), malattia cardiovascolare (CV), tipo di accesso vascolare (AV) (FAV, Protesi, cateteri a permanenza). La diagnosi di infezione era formulata in modo cieco rispetto ai risultati degli esami praticati. I dati sono stati valutati con il test ANOVA. La specificità e sensibilità di PCT e hsCRP a prevedere l'infezione ed i valori di cut-off sono stati valutati con le curve R.O.C.

Risultati. 23 pz sono stati giudicati Inf-si. Nell'intero gruppo di pz 38 presentavano VP, 43 CV, 23 Diabete. I valori erano: PCT 1.31±0.72 ng/ml; hsCRP 9.1±7.5 mg/L; WBC 6414±2044 mm³; Hb 11.7±1.1 g/dl, PLT 208000±76000 mm³; TP 6.3±1.4 g/dl; sAlb 3.8±0.4 g/dl; Sid 56±22 µg/dl; T 150±31 mg/dl; F 557±374 ng/ml; TC 36.2±0.6 °C. La Inf-si si correlava significativamente con: PCT; p<0.0001, hsCRP; p<0.0001, WBC; p<0.004, AV; p<0.005. La specificità e sensibilità di PCT e hsCRP a prevedere l'infezione, valutati con le curve R.O.C., hanno evidenziato: PCT: Sensibilità 95.7%, Specificità 74%, AUC 0.90; hsCRP: Sensibilità 65.2%, Specificità 75.3%, AUC 0.72. Il paragone tra le due curve ROC mostrava una differenza significativa tra PCT e hsCRP (p<0.009). Il valore di Cut-off per PCT era 1.1 ng/ml.

Conclusioni. PCT è più sensibile e specifica di hsCRP nel cogliere la presenza di infezioni acute nei pazienti in HD. In questa popolazione, i valori di Cut-off predittivi di infezione (>1.1 ng/ml) sono sensibilmente più elevati rispetto ai valori riportati per la popolazione normale (>0.5 ng/ml).

2

coagulativa, come alcune isoforme del fibrinogeno.

Conclusioni. I nostri risultati suggeriscono che le membrane per emodialisi possono adsorbire proteine in modo quantitativamente sovrapponibile, ma qualitativamente differente, in base alle proprie caratteristiche fisico-chimiche. I dati da noi ottenuti possono inoltre offrire una base molecolare per l'interpretazione dell'efficacia e della sicurezza delle membrane di dialisi e del trattamento anticoagulante durante la terapia sostitutiva renale.

1

EFFICACIA E TOLLERABILITÀ DI UN IDROGEL CELLULOSICO COME CHELANTE DELL'ACQUA NEI PAZIENTI EMODIALIZZATI. DATI PRELIMINARI

Buongiorno E¹, De Pascalis A¹, Sannino A², Alfonso L¹, Carbonara MC¹, Patrino P¹, Proia A¹, Russo F¹, Valletta AR¹, Vitale O¹

¹U.O. Nefrologia Dialisi e Trapianto, Ospedale "V. Fazzi", Lecce; ²Dipartimento di Ingegneria dell'Innovazione, Università di Lecce, Lecce

La rapida ultrafiltrazione intradialitica resta uno dei fattori principali che contribuiscono allo sviluppo di ipotensione sintomatica, soprattutto in quei pazienti che acquisiscono abitualmente un elevato incremento ponderale interdialitico. La necessità di ridurre tale incremento ponderale ha stimolato l'idea di utilizzare un agente potenzialmente in grado di chelare l'acqua introdotta con la dieta.

A tale scopo è stato messo a punto, in collaborazione con il Dipartimento di Ingegneria dell'Innovazione dell'Università di Lecce, un idrogel cellulosico, sul modello di quanto già studiato per le diete dimagranti. Tale idrogel, polimero a base di derivati della cellulosa, è stato formulato in compresse gastroresistenti (di 0.5 grammi cadauna) allo scopo di essere introdotto oralmente, legare l'acqua intestinale ed essere eliminato con le feci. Preliminarmente è stata valutata la sua capacità di assorbimento in acqua distillata: 1 grammo di idrogel lega circa 1000 ml di acqua libera *in vitro* e 100 ml *in vivo*, e la sua biocompatibilità sia *in vitro* che *in vivo*.

Successivamente abbiamo testato l'idrogel per 4 settimane su 5 pazienti in emodialisi, affetti da episodi ricorrenti di ipotensione intradialitica (PA<100/60 mmHg), con il risultato di un minor incremento ponderale interdialitico rispetto alla loro media abituale dell'ultimo mese: - 1.1 ± 0.3 Kg e di una riduzione del numero di episodi ipotensivi per seduta dialitica (-35%). In 2 pazienti il trattamento è stato sospeso dopo una settimana per la comparsa di stipsi; non sono stati riportati altri effetti collaterali. In conclusione l'idrogel cellulosico testato appare efficace nel legare l'acqua alimentare e quindi nel ridurre l'incremento ponderale interdialitico; studi su casistiche più ampie sono necessari per verificarne l'efficacia e la tollerabilità.

3

LA CARBONILAZIONE PROTEICA NEI PAZIENTI IN EMODIALISI

Di Cesare M¹, Pavone B², Forli F², Sirolli V¹, Giardinelli A³, De Sanctis L¹, Cardillo A¹, Gentile P¹, Muscianese P¹, Pandolfi A³, Urbani A², Bonomini M¹

¹Clinica Nefrologica, Dipartimento di Medicina, Università "G. d'Annunzio" di Chieti-Pescara; ²Centro di Proteomica, CeSI, Fondazione "Gabriele d'Annunzio" Chieti-Pescara; ³Dipartimento di Scienze Biomediche, CeSI, Fondazione "Gabriele d'Annunzio", Chieti-Pescara

Introduzione. La carbonilazione proteica è un processo patologico caratterizzato da una modificazione non enzimatica e irreversibile delle proteine, che può provocarne la perdita di funzione. La carbonilazione è indotta dall'introduzione nelle proteine di gruppi carbonilici per meccanismi direttamente o indirettamente legati allo stress ossidativo. Diverse patologie umane sono caratterizzate da elevati livelli di proteine carbonilate che possono correlarsi alla progressione o severità della malattia. È stato osservato, ad esempio, che i composti carbonilici hanno effetti tossici sull'endotelio e possono in tal modo essere coinvolti nello sviluppo del processo aterosclerotico. In quest'ultimo, un evento precoce di critica importanza è rappresentato dall'aumentata espressione endoteliale delle molecole di adesione vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 e intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, indicativo di un fenotipo endoteliale pro-infiammatorio aterogeno.

Scopi. L'uremia cronica è una patologia contraddistinta da danno alle proteine e aumentato stress ossidativo, con aterosclerosi accelerata. Nel presente studio abbiamo valutato la carbonilazione proteica in pazienti in emodialisi (HD) periodica e, in un modello di cellule endoteliali umane, l'effetto dell'albumina carbonilata sull'espressione delle molecole VCAM-1 e ICAM-1.

Pazienti e metodi. La presenza di proteine carbonilate è stata determinata nel plasma di 6 pazienti in HD trattati con membrane in Hemophan e Helixone. Tali proteine sono poi state quantitativamente misurate mediante densitometria su lastre sviluppate in western blot dopo derivatizzazione con dinitro-fenil-idrazina. L'indagine è stata completata dall'identificazione mediante spettrometria di massa e massa/massa delle proteine oggetto di carbonilazione. In cellule endoteliali umane (HUVEC) è stata valutata l'espressione delle molecole ICAM-1 e VCAM-1 dopo incubazione con albumina fresca, con albumina conservata per 60 giorni in assenza di stimolazione, o con albumina incubata per 60 giorni con glucosio per ottenerne la carbonilazione (confermata da analisi in western blotting e spettrometria di massa).

Risultati. La presenza di proteine carbonilate è stata riscontrata nel plasma dei pazienti uremici cronici. I livelli di carbonilazione proteica sono risultati aumentati dopo dialisi con Hemophan a differenza dell'Helixone. Il principale bersaglio di questa alterazione chimica a livello plasmatico è rappresentato dall'albumina. Inoltre, in cellule endoteliali incubate con albumina carbonilata è stato osservato un significativo aumento ($p < 0.05$) dell'e-

(segue)

spressione di ICAM-1 e VCAM-1.

Conclusioni. I nostri risultati, pur con i limiti della casistica, indicano che la carbonilazione delle proteine è un'alterazione riscontrabile nei pazienti in emodialisi, potenzialmente modulabile dal tipo di membrana impiegata. Tali modificazioni chimiche potrebbero essere coinvolte nello sviluppo dell'aterogenesi.