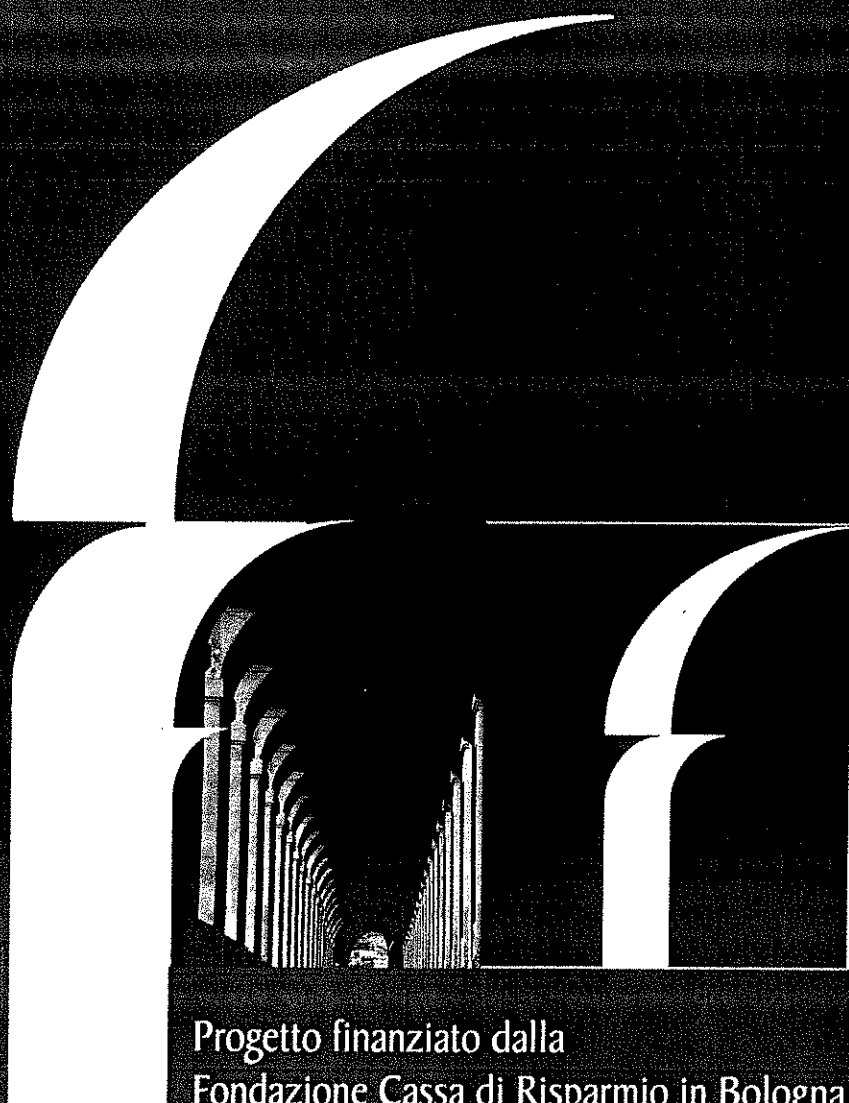


Clinica e biologia  
delle gravi  
insufficienze d'organo



Progetto finanziato dalla  
Fondazione Cassa di Risparmio in Bologna

© 2002 by CLUEB  
Cooperativa Libreria Universitaria Editrice Bologna

Fotocopie per uso personale del lettore possono essere effettuate nei limiti del 15% di ciascun volume dietro pagamento alla SIAE del compenso previsto dall'art. 68, comma 4, della legge 22 aprile 1941 n. 633 ovvero dall'accordo stipulato tra SIAE, AIE, SNS e CNA, CONFARTIGIANATO, CASA, CLAAI, CONFCOMMERCIO, CONFESERCENTI il 18 dicembre 2000.

Le riproduzioni per uso differente da quello personale potranno avvenire solo a seguito di specifica autorizzazione rilasciata dall'editore.

Clinica e biologia delle gravi insufficienze d'organo – Bologna : CLUEB, 2002  
223 p. ; 27 cm.  
ISBN 88-491-1938-0  
CB 3198



Cooperativa Libreria Universitaria Editrice Bologna  
40126 Bologna - Via Marsala 31  
Tel. 051 220736 - Fax 237758  
[www.clueb.com](http://www.clueb.com)

Finito di stampare nel mese di luglio 2002  
da Studio Rabbi, Bologna

## Indice

Presentazione .....	7
Prof. Roversi Monaco .....	
Lista referenti .....	9
Introduzione .....	11
Prof. Vittorio Bonomini .....	
Stato attuale della sostituzione d'organo nella Regione Emilia-Romagna .....	17
Dott.ssa Lorenza Ridolfi .....	
Insufficienza renale cronica e la sua sostituzione con metodiche artificiali (dialisi) e/o naturali (trapianto) .....	19
S. Stefoni et al .....	
Analisi di sequenza e di espressione del gene della beta-2 microglobulina in pazienti dializzati .....	35
P. Carinci et al .....	
Mortalità, morbilità e fattori di rischio di malattia cardio vascolare nel trapianto renale .....	45
A. Faenza et al .....	
Qualità di vita ed integrazione sociale delle persone sottoposte a trapianto dell'organo salvavita: fegato .....	61
L. Ridolfi et al .....	
Studio del metabolismo cerebrale pre-trapianto di fegato con la spettroscopia di risonanza magnetica .....	81
B. Barbiroli et al .....	
Impatto del trattamento antivirale sulla storia naturale della malattia e sui risultati del trapianto di fegato .....	101
M. Bernardi et al .....	
Valutazione della funzionalità epatica con il test alla Lidocaina .....	113
A. Mazziotti, A. Cavallari et al .....	
La malattia coronarica cronica del cuore trapiantato .....	121
A. Branzi et al .....	

*Insufficienza renale cronica e la sua sostituzione  
con metodiche artificiali (dialisi) e/o naturali (trapianto).  
Integrazione tra clinica, biologia, tecnologia e biotecnologia*

S. Stefoni, M.P. Scolari, C. Campieri, L. Coli, G. Feliciangeli, G. Liviano D'Arcangelo,  
G. Cianciolo, G. La Manna, G. Mosconi, A. Buscaroli, G. Donati, S. Iannelli

Cattedra di Nefrologia, Dipartimento di Medicina Clinica e Biotecnologia Applicata "D. Campanacci"  
Università degli Studi di Bologna

**Q**uesto contributo conferma, ove ve ne fosse bisogno, la "superiorità" dell'esperienza renale rispetto a tutti gli altri organi nel campo della sostituzione d'organo. Questo sia perché l'epoca dei trapianti d'organo è iniziata secondo "protocolli renali" proposti negli anni '50; perché il rene è organo duplice, il che consente anche trapianti da donatore vivente; ed infine perché l'insufficienza renale cronica può avvalersi anche della dialisi (nessun altro organo ha analogo sostituzione artificiale), il che permette tempi di sopravvivenza anche spettacolari e, pertanto, anche lunghi tempi di permanenza in lista di attesa per il successivo trapianto.

Nella prima fase dell'era "sostituzione d'organo", l'immunologia ha proposto (o imposto) alla clinica le linee direttive della immunomodulazione farmacologica per il trapianto. Poi è stata la clinica a chiedere alla biologia un adeguato supporto per meglio interpretare i risultati clinici. Una serie complessa di alterazioni biologiche, infatti, sono oggi dimostrate non solo nel trapiantato, ma anche nel dializzato, tali da fare riflettere sulle prospettive future della terapia sostitutiva. Questo studio riporta in modo estremamente chiaro il profilo di certe alterazioni biologiche (alterazioni di citochine, polimorfismo genico, fattori di crescita, <fattori di rischio cardiovascolare, ecc.) non ancora sufficientemente apprezzato. È una realtà imprevista nel passato, ed è la base per il futuro della terapia d'organo sostitutiva. (V. B.)

### *Introduzione*

L'insufficienza renale cronica è una forma morbosa caratterizzata dalla perdita permanente e definitiva della funzione renale. Tale malattia colpisce ogni anno, in un Paese come l'Italia, oltre 5000 individui. Fi-

no a non molti anni fa, i pazienti con insufficienza renale erano destinati a morte certa. Oggi invece riescono a vivere, grazie a terapie che consentono di sostituire validamente l'abolita funzione dei loro reni, tramite metodiche artificiali (dialisi-rene artificiale) oppure naturali (trapianto). Tuttavia queste meto-

diche di sostituzione, pur permettendo di raggiungere risultati di grande rilievo (sopravvivenza per decenni), hanno dei limiti legati alla necessità di impiegare materiali artificiali o terapie farmacologiche immunosoppressive. I pazienti sopravvivono ma non raggiungono una riabilitazione ottimale, andando anzi incontro, nel lungo termine, a manifestazioni patologiche che derivano proprio dal trattamento che li tiene in vita.

In termini concreti, la vita del paziente in dialisi o trapiantato di rene è il risultato dell'azione, e della interazione, sul suo organismo di quattro componenti: la Clinica, la Biologia, la Tecnologia, la Biotecnologia. Ancora oggi l'impatto sul paziente di queste quattro componenti è disarmonico e contrastante. Scopo delle nostre ricerche è stato quello di identificare, valutare, e dove possibile applicare, una loro concreta integrazione scientifica, armonizzandone l'azione e coordinandone gli effetti. L'argomento, visto da questa angolatura, è ancora carente in letteratura.

### *Clinica, Biologia, Tecnologia e Biotecnologia*

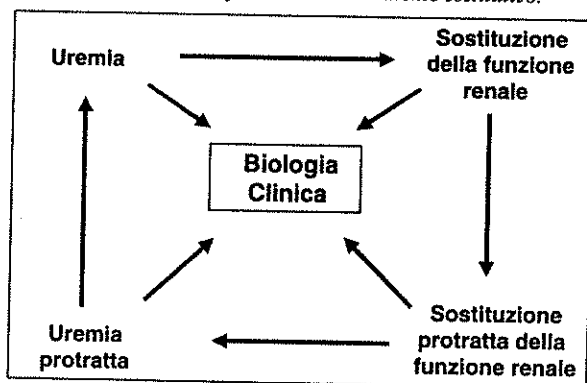
La Clinica è la scienza delle malattie. La esclusiva osservazione del paziente non è in realtà, oggi, uno strumento sufficiente per individuare le manifestazioni morbose ed i loro effetti. L'ampio numero di strumenti diagnostici (e terapeutici) oggi disponibili consente di fatto una "nuova lettura" dei fenomeni

patologici e delle alterazioni biologiche ad essi sottostanti.

La Biologia è la scienza della vita. Il termine biologia è generalmente associato ad immagini statiche, legate ad esempio alla classificazione di fossili, piante e specie animali. In realtà la biologia è una scienza dinamica, che prende in analisi l'intera gamma delle manifestazioni di vita. Lo strumento ed il modo in cui i fenomeni biologici possono essere studiati varia a seconda del periodo storico, della metodica di ricerca e della tecnologia effettivamente disponibile. Nel paziente in trattamento sostitutivo per l'insufficienza renale la clinica e la biologia del paziente vengono a fondersi in uno stretto binomio, tanto che si può parlare di Biologia Clinica (Fig. 1).

La Tecnologia è la scienza della tecnica; la Biotecnologia è la scienza delle tecniche della vita. Lo studio, tradizionalmente osservazionale e descrittivo, dei fenomeni vitali e patologici si è arricchito, nel corso del XX secolo, di possibilità di intervento e manipolazioni organismiche, anche attraverso mezzi artificiali realizzati grazie alle acquisizioni tecnologiche e biotecnologiche. L'emodialisi costituisce l'esempio paradigmatico, per cronologia, impatto vitale e diffusione assistenziale, di una tecnologia salvavita. Thomas Graham, Professore di Chimica a Londra, svolse nel 1861 i primi esperimenti sulla dialisi. Nel 1913 Abel, Rowntree e Turner, del Laboratorio di Farmacologia della Johns Hopkins Medical School, assemblarono ciò che viene correntemente considerato il primo Rene Artificiale. Willelm Kolff allestì il rene a tamburo che permise la sopravvivenza di una paziente già nel 1944. Tale "rene artificiale" non riusciva a sottrarre liquidi in quanto l'ultrafiltrazione poteva esercitarsi solo se le membrane erano fissate su di un supporto fisso. Nils Alwall (anni '50) provvide a realizzare questa modifica, mentre l'allestimento dello shunt di Scribner-Quinton (anni '60) permise un più facile accesso ai vasi ematici del paziente, e quindi la possibilità di vedere la diffusione della dialisi su vasta scala. Gli anni '80 videro una importante acquisizione biotecnologica, l'eritropoietina, la cui somministrazione consente ai pazienti uremici una normale emopoiesi e la risoluzione "biologica" del problema anemia. Nella sintesi della storia della dialisi identifichiamo le vie non cliniche uti-

Figura 1. Interrelazioni fra uremia e trattamento sostitutivo.



lizzate per la soluzione di un problema clinico come l'insufficienza renale cronica: la fase biologica e fisica, la fase tecnologica e la fase biotecnologica.

### Principali linee di ricerca

Le linee di ricerca sviluppate dalla Cattedra di Nefrologia dell'Università di Bologna, relativamente al progetto CARISBO "Clinica e Biologia delle gravi insufficienze d'organo", si sono sviluppate nell'ambito delle due vie di sostituzione dell'abolita funzione renale: la Dialisi con Rene Artificiale ed il Trapianto di Rene.

#### Linee di Ricerca "Dialisi con Rene Artificiale"

- A1. La Dialisi Personalizzata (Profilata)
- A2. Biotecnologia delle membrane per dialisi: Spettroscopia a Scansione di Forza
- A3. Biologia dell'anticoagulazione in dialisi: Eparina a basso peso molecolare
- A4. Tecnologia e Clinica per l'accesso vascolare: il sistema Dialock®
- A5. Incidenza e patogenesi dell'amiloidosi da  $\beta_2$ -Microglobulina
- A6. Fattori emergenti di rischio cardiovascolare: Omocisteina e Fattori di Crescita
- A7. Polimorfismo Genico dei Fattori di Crescita e dell'enzima Metilentetraidrofolato reductasi

#### Linee di Ricerca "Trapianto di Rene"

- B1. Trapianto: Biotecnologia e Clinica della terapia immunosoppressiva
- B2. La Lamivudina nel trattamento della Epatite B dopo Trapianto di Rene
- B3. Ruolo predittivo del polimorfismo genico delle citochine nel Trapianto
- B4. Tecnologia e Biotecnologia nel Trapianto di Rene: l'impiego della Spettroscopia  $^1\text{H}$  NMR

### A. Linee di Ricerca "Dialisi con Rene Artificiale"

#### A1. La Dialisi Personalizzata (Profilata)

L'ipotensione intradialitica (collasso cardiocircola-

torio), legata alle variazioni della osmolarità plasmatica, è una frequente e grave complicanza, specie nei soggetti anziani.

La Dialisi Personalizzata (detta anche Profilata) è una tecnologia innovativa, ideata nell'ambito della Cattedra di Nefrologia dell'Università di Bologna, basata sulla modulazione della concentrazione del sodio nel bagno dialisi. Essa consente di stabilizzare il volume ematico durante la circolazione extracorporea, riducendo in tal modo l'incidenza di ipotensione. La Dialisi Personalizzata si basa sull'impiego di profili individualizzati, elaborati usando modelli matematici, monocompartimentali per il sodio e bicompartimentali per l'urea. Tali modelli permettono di stabilire il profilo ideale di sodio nel dialisato, per ogni paziente, mediante una simulazione a priori della cinetica intradialitica e degli shift intra/extracellulari dei liquidi.

Caratteristica peculiare di questo tipo di dialisi è la personalizzazione ed individualizzazione del trattamento in base alle specifiche caratteristiche del paziente.

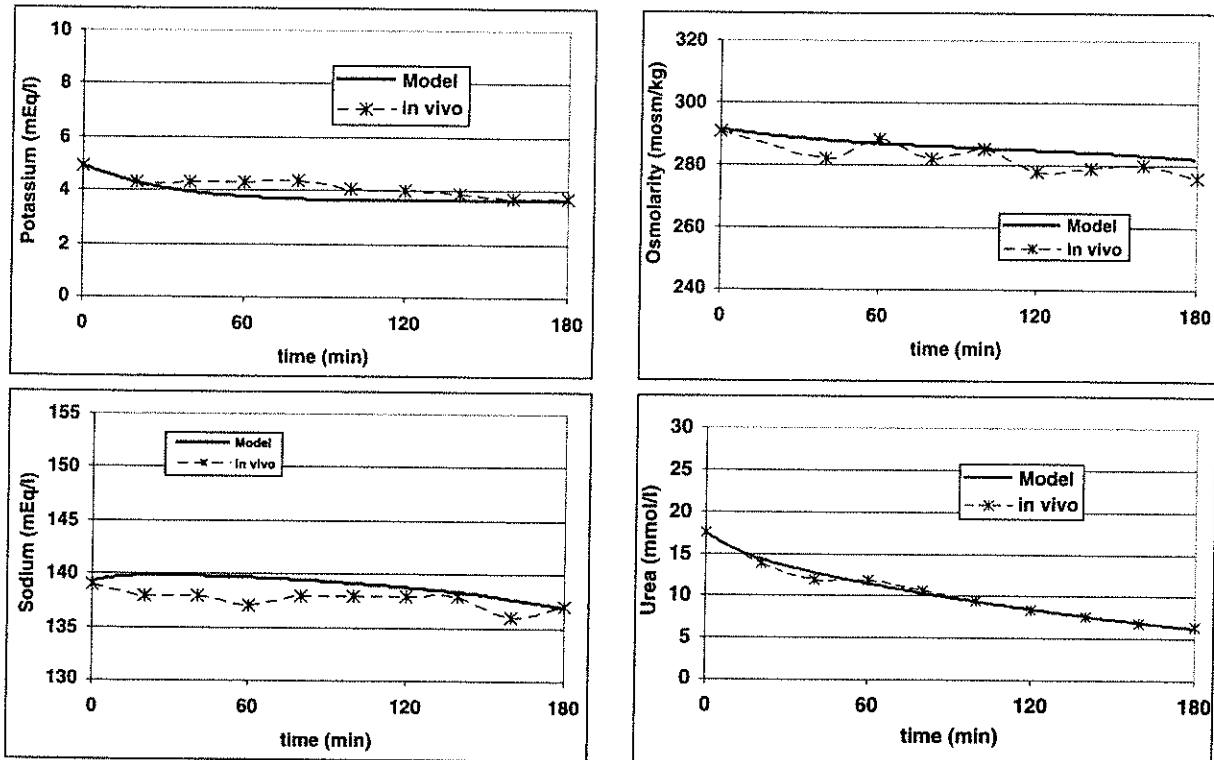
#### Risultati

Nella Fig. 2 si evidenzia la corrispondenza tra il profilo del sodio elaborato dal computer prima della seduta dialitica ed il reale andamento dello stesso parametro nel plasma durante la seduta. L'andamento tra la predizione del modello (linea continua) ed il dato ottenuto *in vivo* (linea tratteggiata ed asterischi nel punto di verifica laboratoristica) è del tutto sovrapponibile.

Il dato della corrispondenza tra profilo atteso e andamento della seduta dialitica è validato anche dal punto di vista clinico, considerando parametri di *compliance* vascolare e cardiaca quali la frequenza cardiaca, la pressione arteriosa, la portata e la gettata cardiaca intradialitici e l'andamento del volume plasmatico circolante mediante crit-line.

La Dialisi Personalizzata è stata utilizzata in 44 pazienti per un follow-up di sei mesi, per un totale di 3080 sedute emodialitiche. Gli episodi di ipotensione sono diminuiti di oltre il 60%. Inoltre la pressione arteriosa media si è portata da valori di  $76 \pm 12$  mmHg a valori di  $95 \pm 12$  mmHg. La qualità di vita dei pazienti, grazie alla maggiore stabi-

Figura 2. Dialisi Profilata. Andamento sovrapponibile fra Potassio, Osmolarità, Sodio, Urea espressi dal modello matematico (linea continua) e Potassio, Osmolarità, Sodio, Urea in vivo (asterischi).



lità cardiovascolare, è risultata nettamente migliorata.

#### A2. Biotecnologia delle membrane per dialisi: Spettroscopia a Scansione di Forza

Nei primi minuti della circolazione extracorporea della Emodialisi, il contatto sangue/membrana determina la formazione di un film proteico, che ricopre la membrana di dialisi variandone le caratteristiche di permeabilità. La formazione di tale film proteico (Protein Layer), e la sua composizione variano da membrana a membrana e dipendono da molteplici fattori quali la composizione chimica e la carica elettrica delle membrane.

La possibilità di studiare fino a dimensioni nanometriche le caratteristiche di adesione su di un materiale consente studi molecolari sulla formazione del Protein Layer. È stato effettuato uno studio meccanico-chimico dei processi di adesione di proteine plasmatiche sulla superficie delle membrane di dialisi con Microscopia a Scansione di Forza. Mediante

questo nuovo approccio sono state misurate le forze in grado di produrre una de-adesione. Sono state fissate con legame covalente, sulla sonda del microscopio, proteine plasmatiche quali fibronectina, fibrinogeno ed albumina. È stata quindi misurata la forza di adesione tra le proteine sieriche studiate e la membrana per dialisi. Gli studi sono stati effettuati utilizzando membrane sia di tipo celluloso che di tipo sintetico.

#### Risultati

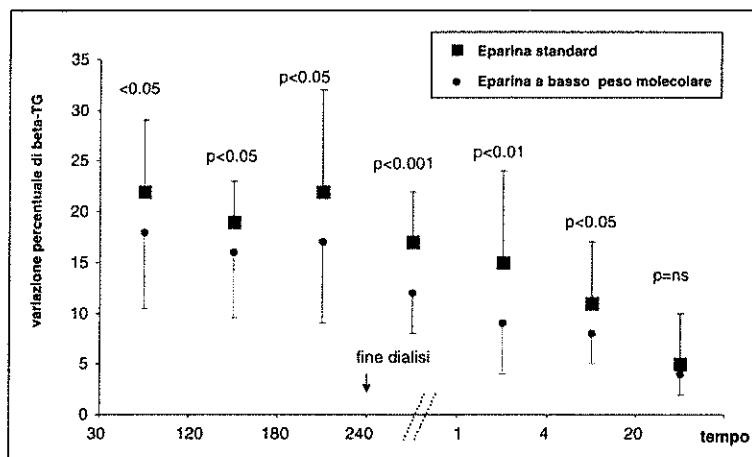
I risultati suggeriscono una analogia di comportamento tra le membrane per dialisi e le superfici vitree piane, con le stesse caratterizzazioni dominanti idrofiliche delle membrane per dialisi. Alcune zone delle membrane sono peraltro risultate simili ad una superficie di polistirene, che è idrofobica; in tale situazione per una de-adesione è necessario un aumento della applicazione di forza dell'ordine di almeno una magnitudo. L'approccio meccanico-chimico di studio dell'interazione di proteine plasmatiche con le

membrane di dialisi simula l'adsorbimento dinamico ed i processi di de-adsorbimento che si realizzano in condizioni di alterato equilibrio, riscontrabili quando si verifica un processo di ultrafiltrazione ematica.

I risultati ottenuti rivelano come l'adsorbimento delle proteine plasmatiche in dialisi sia aumentato da una caratterizzazione di idrofobicità locale della superficie della membrana e dalla rugosità della superficie su scala nanometrica. Sono state riscontrate delle vere e proprie aree idrofobiche anche nell'ambito di membrane tendenzialmente idrofiliche. Sono, dunque, tratti di membrana con caratterizzazione idrofobica presenti sulla superficie dovuti ad una non omogenea composizione chimica che potrebbe essere drasticamente incrementata dalle forze coinvolte nei processi di adesione. Il ruolo della rugosità di membrana potrebbe consistere nel determinare una discriminazione nei processi di adesione, determinando una diversità nel tipo di adesione proteica variabile da zona a zona in relazione a fenomeni di stress di membrana legati all'adsorbimento.

I risultati delle nostre ricerche suggeriscono che un ruolo chiave nei processi di adesione è legato alla topografia della membrana in scala nanometrica, sia in

Figura 4. Eparina a basso peso molecolare ed Eparina standard: ridotta attivazione piastrinica.



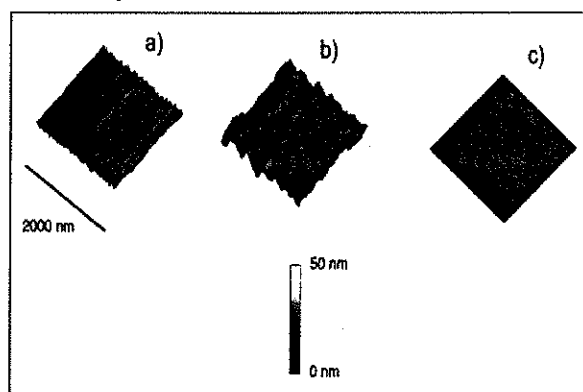
relazione alla rugosità di membrana che alle variazioni di idrofilia/idrofobicità (Fig. 3). In termini clinici si prospetta la possibilità che agendo sulla rugosità della membrana si possa migliorare la biocompatibilità della stessa, sia a breve che a lungo termine.

### A3. Biologia dell'anticoagulazione in dialisi: Eparina a basso peso molecolare

Nonostante i progressi conseguiti dalla ricerca in termini di biocompatibilità, a tutt'oggi nessuna membrana per dialisi possiede le proprietà antitrombotiche delle cellule endoteliali umane. L'impiego di eparina standard, che rappresenta una condizione necessaria per inibire la trombogenesi all'interno del circuito extracorporeo, espone il paziente al rischio di complicanze emorragiche, attivazione piastrinica, piastrinopenia e dislipidemia. Queste ultime rivestono particolare importanza per la loro implicazione nel processo di aterosclerosi accelerata.

Sono state proposte varie metodiche di anticoagulazione alternative alla eparina standard: prostaciclina, eparinizzazione della superficie di membrana, eparinizzazione regionale, bioreattori. Tali metodiche, allo stato attuale, sono lontane da una applicazione pratica per i costi del trattamento e per la possibile insorgenza di rilevanti effetti collaterali. L'Eparina a basso peso molecolare, ottenuta dalla eparina standard attraverso un processo di clivaggio fisico-chimico, presenta il vantaggio di ridurre sensibilmen-

Figura 3. Aspetti morfologici su scala nanometrica della superficie di diversi tipi di membrane per dialisi: a) Cuprophane; b) AN69; c) superficie vitrea.





te il rischio emorragico nel paziente uremico, con al contempo minori effetti sul metabolismo lipidico e sulla funzionalità piastrinica. Le nostre ricerche sono state finalizzate ad una valutazione comparativa tra Eparina standard ed Eparina a basso peso molecolare, in termini di efficacia, sicurezza, alterazioni lipidiche e test di attivazione piastrinica (volume piastrinico medio, Fattore piastrinico 4, Beta-Tromboglobulina).

### Risultati

I risultati ottenuti possono essere così sintetizzati: a) L'Eparina a basso peso molecolare nel trattamento dialitico ha evidenziato una efficacia paragonabile, se non superiore rispetto all'Eparina standard, ed una migliore maneggevolezza; b) L'attivazione piastrinica è risultata inferiore dopo impiego di Eparina a basso peso molecolare, senza rapporto con il tipo di membrana utilizzato (Fig. 4); c) Dopo 18 mesi di impiego di Eparina a basso peso molecolare si ha un significativo miglioramento della ipertrigliceridemia; d) Non si sono verificati effetti collaterali di tipo trombotico o emorragico.

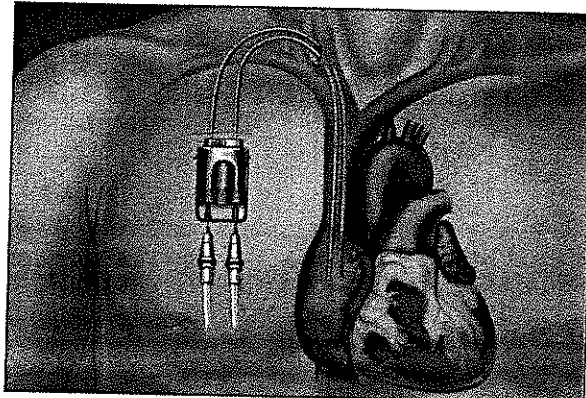
Le nostre ricerche hanno dimostrato che la Eparina a basso peso molecolare è una metodica di anti-coagulazione biologica ed efficace per il trattamento sostitutivo del paziente in dialisi cronica, in grado di determinare un minore effetto attivante sulle piastrine ed un sensibile miglioramento della ipertrigliceridemia.

#### A4. Tecnologia e Clinica per l'accesso vascolare: il sistema Dialock®

L'età media dei pazienti in dialisi cronica sta aumentando: attualmente, a Bologna, è intorno ai 70 anni. Nei pazienti anziani, ancora più che per gli altri, è necessario disporre di adeguati accessi vascolari, dotati di caratteristiche di efficacia, durata e ad elevata biocompatibilità.

Il sistema Dialock, costituito da un supporto metallico connesso a tubi gemelli di silastic, presenta le sopraelencate caratteristiche. La porzione metallica viene impiantata nel sottocute, al di sotto della clavicola, mentre i tubi gemelli raggiungono l'atrio destro attraverso la vena giugulare interna (Fig. 5). Si accede al port con una puntura diretta attraverso il

Figura 5. Rappresentazione della corretta collocazione del dispositivo Dialock in rapporto ai punti somatici di repere.



sottocutaneo. Una volta inserito e messo in condizioni di funzionare il Dialock assicura un flusso ematico di 300-450 ml/min ed una ridotta incidenza di fenomeni trombotici o di infezioni. Al tempo stesso lo standard igienico ed estetico del paziente è migliorato, e la qualità della vita dei pazienti ne trae un consistente vantaggio. È un esempio di attenzione alle esigenze del paziente, ottenuta con l'impiego di una realizzazione tecnologica di avanguardia.

Nell'ambito delle nostre ricerche il sistema Dialock è stato impiantato in 3 pazienti, con buoni risultati in termini di efficacia e di tollerabilità. Tutti i sistemi impiantati sono attualmente ben funzionanti (6 mesi).

#### A5. Incidenza e patogenesi dell'amiloidosi da $\beta_2$ -Microglobulina

L'amiloidosi da  $\beta_2$ -Microglobulina è una forma di amiloidosi sistemica, con una spiccata predilezione per le sinovie e per il tessuto osseo, che si manifesta con un'elevata frequenza in pazienti sottoposti a trattamento dialitico periodico. La  $\beta_2$ -Microglobulina, isolata per la prima volta nel siero, nelle urine e nel liquido spinale umano, è una proteina formata da una singola catena polipeptidica di circa 100 aminoacidi con un peso molecolare di 11.600, il cui gene è disposto sul cromosoma 15. Il ruolo della  $\beta_2$ -Microglobulina non è ancora ben chiaro; in via ipotetica sembra essere correlato alla stabilizzazione del legame di membrana del complesso HLA.

Il meccanismo di costituzione del deposito amilo-

deo da  $\beta$ 2-M non presenta univoche argomentazioni. Gli elementi di certezza sono limitati: una elevata concentrazione di  $\beta$ 2-M circolante in determinate condizioni tende ad aggregarsi in deposizioni fibrillari presentando un elevato tropismo per taluni tessuti (interstizio peri-articolare e tessuto osseo). L'ipotesi, dimostrata "in vitro", di una spontanea deposizione non trova conferme "in vivo" per due ragioni: a) il tempo di comparsa dei depositi amiloidei è fortemente variabile (esistono casi di deposizione precoce anche < 3 anni); b) la sede di deposizione è fortemente specifica e non sembra correlata ad una tendenza intrinseca della proteina alla aggregazione fibrillare.

Dopo 10 anni di dialisi la quasi totalità dei pazienti presenta quadri clinici correlati alla deposizione di Amiloidosi da  $\beta$ 2-Microglobulina. Le manifestazioni cliniche sono prevalentemente a carico del sistema osteoarticolare: sindrome del tunnel carpale, artropatie distruttive, cisti ossee periarticolari, periartriti, deposizione di  $\beta$ 2-Microglobulina in altri tessuti quali cuore, tessuto vascolare periferico, mucosa intestinale e cute.

Attualmente la prevenzione ed il trattamento della Amiloidosi da  $\beta$ 2-Microglobulina prevedono: 1) l'utilizzo di membrane in grado di migliorare la clearance della  $\beta$ 2-Microglobulina (sintetiche high flux) o con intrinseche capacità di assorbimento; 2) l'utilizzo di membrane ad elevata biocompatibilità (PS, PAN, ecc.), in grado di attivare meno il complemento e il sistema immunitario.

Questi approcci appaiono oggi alquanto discutibili per diverse ragioni: a) la dialisi peritoneale non sembra presentare una diversa evoluzione nella deposizione fibrillare di  $\beta$ 2-amiloide, b) la maggiore eliminazione di  $\beta$ 2-Microglobulina ottenibile con alcune membrane non sembra essere correlata ad una minore concentrazione ematica media di  $\beta$ 2-Microglobulina; c) la concentrazione media, inoltre, non sembra avere rapporto con una migliore o peggiore evoluzione del quadro patologico.

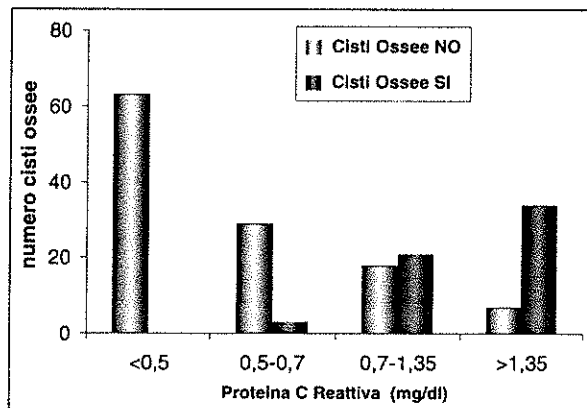
Il nostro studio è stato finalizzato a valutare l'incidenza, la modalità di presentazione clinica e l'etiopatogenesi della amiloidosi da  $\beta$ 2-Microglobulina in una popolazione di pazienti in dialisi altamente omogenea.

### Risultati

Sono stati selezionati 173 pazienti affetti da insufficienza renale cronica terminale e sottoposti a trattamento emodialitico trisettimanale presso l'Istituto di Nefrologia, Dialisi e Trapianto renale del Policlinico Universitario S.Orsola di Bologna. I pazienti, sottoposti a trattamento emodialitico da non meno di 6 e da non più di 10 anni, sono stati suddivisi in quattro gruppi, in base al tipo di membrana impiegata. Nel gruppo A (membrane cellulose a basso flusso) 50 pazienti su 81 (28,9%, sottogruppo A1) sono stati trattati con membrana di Cuprophan, mentre i rimanenti 31 pazienti (17,9%, sottogruppo A2) sono stati trattati con membrane di cellulosa sostituita (Hemophan, SMC). Nel gruppo B, 92 pazienti sono stati trattati con membrane sintetiche. Trentasei pazienti su 92 sono stati trattati con membrane sintetiche a basso flusso (sottogruppo B1, Polisulfone low flux 20,8%), mentre 56 pazienti erano stati trattati con Polisulfone ad alto flusso (sottogruppo B2, 32,4%). La sterilizzazione dei filtri è stata ottenuta con Ossido di Etilene (ETO) e raggi  $\gamma$ , nel 65% e 35% per il gruppo A, 42% e 58% per il gruppo B. La durata della seduta è stata paragonabile fra tutti i gruppi considerati: sottogruppo A1  $241,2 \pm 22,5$  minuti, sottogruppo A2  $231,2 \pm 20,5$  minuti, sottogruppo B1  $238,1 \pm 20,4$  minuti e sottogruppo B2  $237,3 \pm 21,0$  minuti. La determinazione microbiologica del liquido di dialisi impiegato è stata condotta secondo le linee guida dell' American Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI): nessuna contaminazione batterica del liquido di dialisi è stata riscontrata.

Uno degli obiettivi dello studio è stato quello di valutare la possibile correlazione fra le manifestazioni cliniche e radiologiche della amiloidosi da  $\beta$ 2-Microglobulina e i fattori di rischio più importanti. In particolare, fra i fattori di rischio, abbiamo considerato l'età all'inizio della dialisi, l'inizio precoce o tardivo del trattamento emodialitico rispetto al riscontro di insufficienza renale cronica terminale, il diabete, lo stato di infiammazione sistemica e l'adeguatezza dialitica. I pazienti selezionati sono stati seguiti per 5 anni (dal 6° al 10° anno di dialisi). L'incidenza di cisti ossee da amiloidosi da  $\beta$ 2-Microglobulina nel sottogruppo A1 è risultata notevolmente superiore a

Figura 6. Correlazione tra Cisti Ossee di  $\beta$ 2-Microglobulina e Proteina C reattiva.



quella di tutti gli altri gruppi: già dopo sei anni di dialisi la presenza di cisti ossee nel sottogruppo A1 era pari al 37% dei pazienti, nel sottogruppo A2 era pari al 19,5%, nel sottogruppo B1 si verificava nel 14% dei pazienti, nel sottogruppo B2 nel 13,9%. Abbiamo riscontrato una maggiore incidenza di cisti ossee dopo 10 anni di dialisi nel sottogruppo A1 (44,8%), rispetto ai sottogruppi A2 (26%), B1 (21,4%) e B2 (20,7%).

L'analisi statistica dei fattori di rischio mediante regressione logistica secondo Cox ha dimostrato che vi è un aumentato rischio di patologia amiloidea da cisti ossee nei pazienti che iniziano la dialisi ad una età più avanzata ( $p < 0.05$ ) e nei pazienti che iniziano il trattamento emodialitico con un filtrato glomerulare inferiore a 5 ml/min ( $p < 0.001$ ). Inoltre la presenza di uno stato di infiammazione con un elevata proteina C reattiva (PCR) sembra correlarsi positivamente con la manifestazione clinica di cisti ossee ( $p < 0.001$ ). La suddivisione dei pazienti per quartili, in base al valore di PCR, ha permesso di evidenziare come aumentando tali valori aumenta l'entità della patologia cistica da  $\beta$ 2-Microglobulina (Fig. 6).

Infine non è risultato predittivo lo stato diabetico, mentre il tipo di membrana impiegata e l'ipoalbuminemia sono risultate vicine alla significatività statistica ( $p=0.29$  e  $p=0.06$  rispettivamente).

## Conclusioni

La patologia della Amiloidosi da  $\beta$ 2-Microglobulina, manifestazione morbosa che inficia grandemente la qualità di vita del paziente, è sicuramente ad etiologia multifattoriale; se alcuni fattori di rischio, come l'età all'inizio della dialisi, sembrano ormai confermati, tuttavia altri e nuovi fattori sembrano emergere. In particolare, sembra importante il ruolo dello stato infiammatorio sistemico del paziente e del grado di funzione renale residua con il quale il paziente inizia la dialisi; la composizione delle membrane di dialisi (cellulosiche modificate o sintetiche) può giocare un certo ruolo, anche se non sembra sussistano differenze significative.

### A6. Fattori emergenti di rischio cardiovascolare: Omocisteina e Fattori di Crescita

La patologia cardiovascolare rappresenta la principale causa di morbilità e mortalità nel paziente uremico in dialisi o trapiantato. Accanto a quelli tradizionali, si segnalano emergenti fattori di rischio, meno noti ed in parte specificamente correlabili allo stato uremico. Tra tali fattori rivestono particolare importanza l'Omocisteina ed i Fattori di Crescita.

#### Omocisteina

La maggior parte degli studi condotti nei pazienti uremici ha mostrato la presenza di iperomocisteinemia in oltre il 90% dei soggetti.

L'omocisteina è un prodotto intermedio del metabolismo dell'aminoacido metionina, da cui si forma nel corso del normale metabolismo per un processo di demetilazione. La patogenesi della iperomocisteinemia nel paziente uremico non è ancora completamente definita, ma risiede verosimilmente nella reciproca interazione di fattori acquisiti e congeniti. I fattori acquisiti comprendono: a) ridotta clearance renale, b) ridotto assorbimento intestinale di folati, c) alterato trasporto transmembrana di folati. I fattori congeniti comprendono il deficit della cistationina  $\beta$  sintetasi e principalmente il polimorfismo genico dell'enzima 5 Metilentetraidrofolato reduttasi (MTHFR). La MTHFR è l'enzima chiave nella regolazione del metabolismo dell'acido folico specifica-

mente preposto alla formazione del 5-metiltetraidrofolato (5-MTHF) che rappresenta la forma metabolicamente attiva dell'acido folico. Sono state descritte numerose varianti genetiche della MTHFR, ma quelle più frequentemente associate ad iperomocisteinemia riguardano il polimorfismo dei loci 677 C→T e 1298 A→C sul cromosoma 1. La risultante della interazione di fattori acquisiti e congeniti è comunque rappresentata dalla ridotta formazione di 5-MTHF, che funge da donatore di metile nella reazione di conversione della omocisteina in metionina; in questo processo di transmetilazione svolge un ruolo di cofattore la vitamina B12.

I meccanismi fisiopatologici alla base della angiotossicità della omocisteina sono molteplici e reciprocamente autopotenziandosi. L'omocisteina è in grado di compromettere la normale funzionalità dell'endotelio per: a) ridotta produzione endoteliale di ossido nitrico, b) alterazione dei processi ossidativi, c) aumento delle attività protrombotiche (fattori XII e V della cascata coagulativa), d) riduzione delle proprietà antitrombotiche endoteliali (Proteina C, Trombomodulina, Eparansolfato). Inoltre l'omocisteina sembra svolgere un effetto di potenziamento del legame tra Lipoprotein(a) e fibrina e sembra indurre una ridotta attività del sistema fibrinolitico.

In considerazione della ridotta disponibilità nell'uremico di 5-MTHF ne abbiamo considerato e realizzato l'impiego nel trattamento della iperomocisteinemia in sostituzione dei preparati tradizionali a base di acido folico, dimostratisi scarsamente efficaci.

### Risultati

I nostri studi, condotti su 169 pazienti affetti da insufficienza renale cronica in trattamento emodialitico periodico presso l'Unità Operativa di Nefrologia Dialisi e Trapianto renale del Policlinico S.Orsola, confermano la presenza di elevati livelli di omocisteina, con una prevalenza pari al 95%. In particolare l'omocisteina presenta livelli sierici mediamente triplicati nel paziente in dialisi rispetto al soggetto normale (rispettivamente 51,3 micromoli/L vs 16,8 micromoli/L). La rimozione intradialitica non è in grado di ripristinare valori di normalità.

Il nostro studio ha anche confermato, attraverso una analisi retrospettiva, la presenza di una correla-

zione tra il grado di iperomocisteinemia e il numero di eventi cardiovascolari. Infatti elevati valori di omocisteina sembrano correlarsi con una alta incidenza di cardiopatia ischemica, cerebrovasculopatia e vasculopatia periferica.

In termini clinici e sulla base dei presupposti fisiopatologici prima esposti, abbiamo valutato comparativamente gli effetti sulla iperomocisteinemia del 5-MTHF somministrato in sostituzione dell'acido folico, ed abbiamo dimostrato la maggiore efficacia della terapia con 5-MTHF. Questo sia in termini di percentuale di riduzione (50% vs 30%) sia in termini di percentuale di normalizzazione (30% vs 15%) dei valori ematici di omocisteina.

### Fattori di Crescita

Recenti osservazioni sperimentali e cliniche hanno messo in evidenza il ruolo chiave nella comparsa delle lesioni aterosclerotiche (con particolare riguardo al distretto coronarico) dei fattori di crescita, ed in particolare del Platelet Derived Growth Factor, del Transforming Growth Factor beta e del Macrophage Colony Stimulating Factor.

*Platelet Derived Growth Factor.* Questo fattore di crescita è contenuto in molte cellule di derivazione mesenchimale: monociti, macrofagi, cellule endoteliali e soprattutto all'interno dei granuli piastrinici da cui viene liberato nel corso del processo di attivazione e aggregazione piastrinica. Il Platelet Derived Growth Factor è in grado di stimolare la proliferazione e la migrazione di fibroblasti e di cellule muscolari lisce e di inibirne la naturale apoptosi. Il ruolo aterogeno di questo fattore di crescita è stato dimostrato da studi clinici e sperimentali nella popolazione normale. Negli emodializzati il Platelet Derived Growth Factor, rilasciato in circolo in seguito alla aggregazione piastrinica che ha luogo durante la dialisi, potrebbe avere un ruolo chiave nella progressione delle lesioni aterosclerotiche.

*Transforming Growth Factor Beta.* È un fattore di crescita pleiotropico prodotto da numerose popolazioni cellulari in una forma latente che viene quindi attivata dalla plasmina a sua volta prodotta a seguito dell'attivazione del plasminogeno. Questo fattore di crescita svolge un ruolo chiave nel prevenire la comparsa e la progressione delle lesioni aterosclerotiche.

Il Transforming Growth Factor-beta inibisce infatti la proliferazione e la migrazione delle cellule muscolari lisce a sua volta stimolata da vari mitogeni (Platelet Derived Growth Factor in particolare), induce una downregulation degli effetti delle citochine infiammatorie, riduce l'adesione all'endotelio di cellule infiammatorie, induce l'apoptosi nelle cellule presenti nel contesto delle lesioni aterosclerotiche. Una ridotta attivazione del Transforming Growth Factor-beta potrebbe essere secondaria ad una inibizione diretta nella produzione di plasmina dal plasminogeno, mediato dall'inibitore dell'Attivatore Tissutale del Plasminogeno o con un meccanismo di tipo competitivo da parte della Lipoprotein(a). Questa lipoproteina patologica nella sua parte glicoproteica presenta una struttura biochimica simile a quella del plasminogeno. Recentemente osservazioni sperimentali e cliniche hanno mostrato che la concentrazione sierica di Transforming Growth Factor beta è ridotta nei pazienti portatori di una severa compromissione del circolo coronario.

### Risultati

I nostri studi hanno evidenziato livelli di Platelet Derived Growth Factor persistentemente aumentati durante e dopo dialisi, associati a segni biochimici di attivazione e degranolazione piastrinica. Il *release* intradialitico di Platelet Derived Growth Factor è risultato significativo, sovrapponibile qualitativamente e quantitativamente sia con membrane cellulose modificate (Hemophan) che con membrane sintetiche (Polisulfone). Maggiore è risultato il *release* intradialitico di Platelet Derived Growth Factor con le membrane in Cuprophan ed Acetato di cellulosa. Dopo la fine della dialisi, il Platelet Derived Growth Factor rimane alterato anche se con valori decrescenti fino a oltre 4 ore dalla fine del trattamento dialitico.

Il volume piastrinico medio, che esprime lo stato di avvenuta degranolazione, evidenzia che durante la dialisi sia per le membrane cellulose modificate che per le membrane sintetiche il punto inferiore in termini di degranolazione ed esaurimento funzionale è riscontrabile al termine della seconda ora di trattamento dialitico. Inoltre il volume tende a crescere, anche oltre i valori di norma, nella seconda parte

Figura 7. Valori basali di Transforming growth factor beta: pazienti in dialisi, con (A) e senza (B) malattia cardiovascolare, verso i controlli (C).

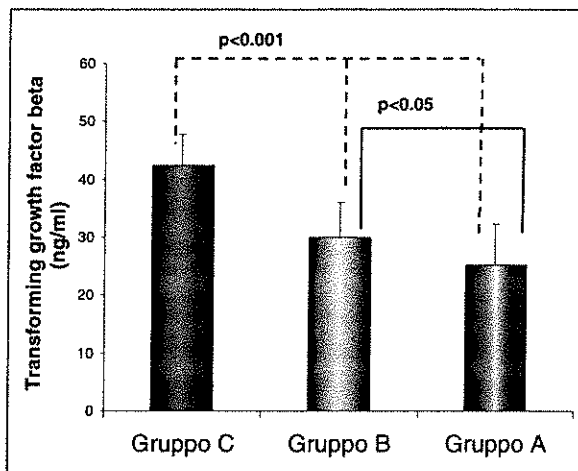
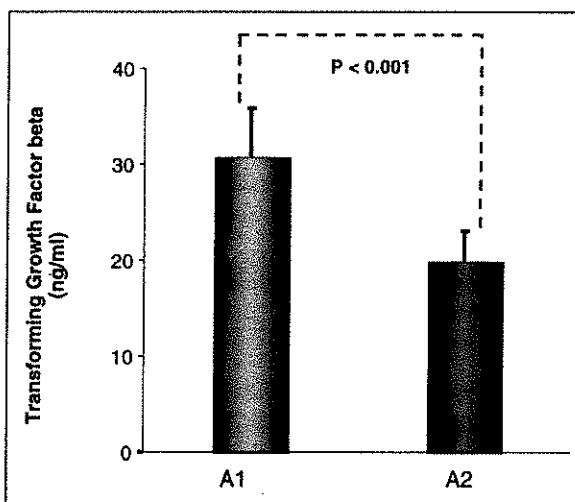


Figura 8. Transforming Growth Factor-beta in pazienti con malattia cardiovascolare in dialisi: pazienti senza (A1) vs pazienti con (A2) malattia dei tre vasi.



della seduta, verosimilmente per la reimmissione in circolo di nuove piastrine. Tali dati sono confermati anche dall'andamento sierico intradialitico e post-dialitico di altre due molecole, la Beta-Tromboglobulina ed il Fattore Piastrinico 4, anch'esse espressione di degranolazione piastrinica.

Per quanto riguarda il Transforming Growth Factor-beta, il nostro studio ha dimostrato la presenza nei pazienti in trattamento emodialitico di ridotti li-

velli sierici, fornendo una originale chiave di lettura del processo aterosclerotico. Questo tipo di pazienti rappresenterebbe una popolazione a rischio aterogeno elevato in quanto sarebbe assente il ruolo protettivo di tale fattore di crescita nei confronti degli altri fattori di rischio (Fig. 7).

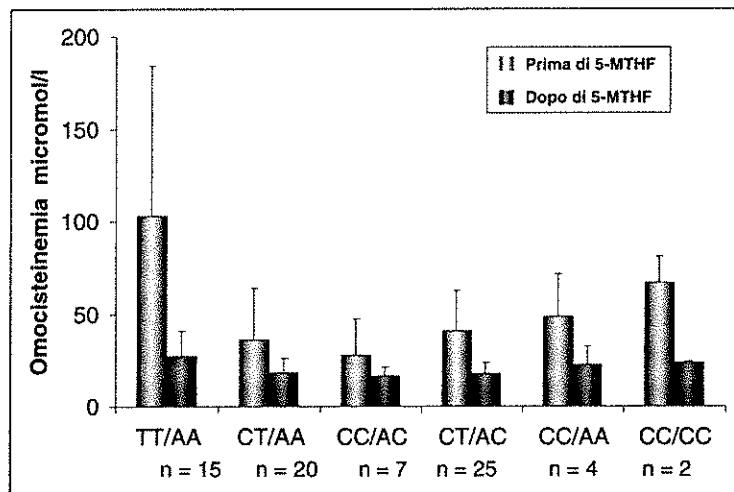
I livelli sierici di Transforming Growth Factor-beta sono risultati inversamente correlati con la severità di compromissione del circolo coronario e con il numero di distretti vascolari interessati (Fig. 8).

Le cause della ridotta concentrazione di Transforming Growth Factor-beta risiederebbero negli elevati livelli di Lipoprotein(a) e Inibitore dell'Attivatore Tissutale del Plasminogeno riscontrati nella popolazione uremica. Una possibile concausa della ridotta concentrazione sierica di Transforming Growth Factor-beta è l'eparina, come attesterebbe l'andamento intradialitico.

#### A7. Polimorfismo Genico dei fattori di crescita e dell'enzima Metilentetraidrofolato reductasi (MTHFR)

Sono state descritte variazioni alleliche in praticamente tutti i loci genici delle citochine. Molti di questi polimorfismi sono localizzati nelle regioni regolatrici e sono associati ad alta o bassa produzione di citochine. Un importante polimorfismo è localizzato nella regione promoter per l'Interleuchina-10 e per il Tumor Necrosis Factor-alfa, il primo introne del gene per Interferone-gamma, e nella sequenza del gene per il Transforming Growth Factor-beta. La metodologia adottata per tipizzare il polimorfismo di questi 4 loci è SSP-Polimerase chain reac-

Figura 9. Valutazione dei livelli plasmatici di omocisteina e della risposta alla terapia con 5-MTHF in gruppi di pazienti in dialisi suddivisi in base al polimorfismo genico dell'enzima MTHFR.



tion. Questa metodologia è basata sul principio che solo primers specifici per una determinata sequenza genica sono in grado di amplificarla in presenza di Taq-polimerasi ricombinante. È descritta la presenza, come illustrato in altra sezione, di polimorfismi genici relativamente alla Metilentetraidrofolato reductasi, enzima coinvolto nel metabolismo della omocisteina. In particolare è stato studiato il polimorfismo dei loci 677 C→T e 1298 A→C sul cromosoma 1.

#### Risultati

Per il Transforming Growth Factor-beta il nostro studio non ha evidenziato la presenza di correlazioni tra livelli sierici di tale citochina e lo stato di producer del paziente (Tab. 1).

Nel caso della omocisteina abbiamo confermato che la variante omozigote 677TT della Metilentetraidrofolato reductasi influenza i livelli di omocisteina,

Tabella 1: Genotipi e livelli ematici di Transforming Growth Factor-beta (TGFβ1) in 155 pazienti dializzati

Produttore	Alto		Intermedio		Basso	
	T/C	T/T	C/C	T/C	C/C	C/C
Codon 10	T/C	T/T	C/C	T/C	C/C	C/C
Codon 25	G/G	G/G	G/G	G/C	C/C	G/C
TGFβ1 (ng/ml)	26.5 ± 8.2	27.9 ± 9.5	19.8 ± 10	30.5 ± 11.5	28.4 ± 8.7	24.5 ± 9.5
Frequenza (%)	28	55	6	5	3	2

riduce i livelli di folati e condiziona la risposta alla terapia con acido folico o 5-MTHFR (Fig. 9).

## B. Linee di Ricerca "Trapianto di Rene"

### B1. Trapianto: Biotecnologia e clinica della terapia immunosoppressiva

Negli ultimi due decenni si è assistito ad un notevole progresso, a livello scientifico e clinico-applicativo, delle conoscenze nel campo dei trapianti, soprattutto nel settore della terapia immunosoppressiva.

La Ciclosporina, disponibile dal 1984, ha praticamente rivoluzionato l'attività di trapianto, inibendo l'attività enzimatica dei linfociti T, che svolgono un ruolo chiave nel rigetto. L'uso della ciclosporina in associazione agli steroidi ha portato la sopravvivenza del graft, ad 1 anno, dal 50 all'80%, diminuendo nel contempo gli eventi infettivi. I principali effetti collaterali della ciclosporina sono l'ipertensione, l'irsutismo e, soprattutto degna di attenzione, l'induzione di fenomeni di nefrotossicità. Oggi la ciclosporina è disponibile in una formulazione che ne determina un assorbimento maggiore e più regolare.

Il Prograf (FK 506), che, con meccanismo analogo alla ciclosporina, agisce inibendo la calcineurina, presenta una efficacia antirigetto in sostanza sovrapponibile a quella della ciclosporina. Presenta uguale grado di nefrotossicità, con minor incidenza di ipertensione ed irsutismo. L'incidenza di diabete ad insorgenza post-trapianto sembra essere maggiore, come pure la incidenza di dolore addominale.

Il Mycophenolate Mofetil (Cellcept) è disponibile dal 1995 e presenta un meccanismo peculiare di inibizione enzimatica che impedisce la piena attivazione linfocitaria. Da studi multicentrici, risulta anche la capacità di ridurre del 50% l'incidenza di rigetto, se usato in associazione a ciclosporina e prednisone rispetto alla semplice associazione tra prednisone e ciclosporina. Questo risultato di rilievo non sembra essere

seguito da un'umentata sopravvivenza a lungo termine. Gli effetti collaterali sono una elevata incidenza di episodi infettivi e di dolore addominale.

Zenapax e Simulect sono costituiti da anticorpi contro un recettore (IL-2 specifico) dei linfociti, tali da prevenire l'attivazione linfocitaria (IL-2 è uno dei principali mediatori dell'attivazione linfocitaria). I risultati della loro somministrazione, a breve, evidenziano una significativa riduzione degli episodi di rigetto, senza apprezzabili segni di tossicità.

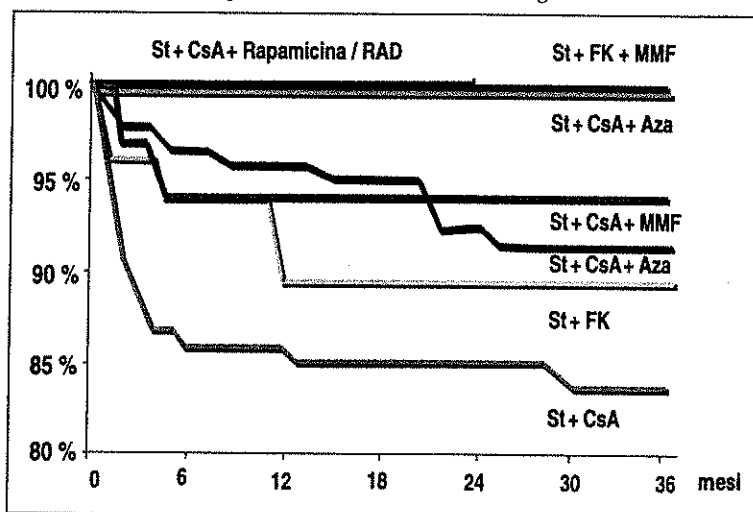
La Rapamicina viene attualmente valutata su ampia scala. In associazione a ciclosporina riduce apprezzabilmente l'incidenza del rigetto acuto e sembra in grado di consentire una sostanziale riduzione degli steroidi, fino alle sospensioni. Come effetti collaterali va segnalata l'azione iperlipemizzante ed il possibile decremento della conta piastrinica.

### Risultati

Nei pazienti sottoposti a trapianto renale da donatore cadavere, e nell'ambito delle nostre ricerche clinico applicative, sono stati utilizzati vari protocolli terapeutici basati sulla variabile associazione tra i farmaci sopraelencati, tutti disponibili presso la Cattedra di Nefrologia.

Motivo conduttore nella ideazione e applicazione di tali protocolli è stato quello di rispettare la biologia del paziente, riducendo in primis gli steroidi gra-

Figura 10. Sopravvivenza del Trapianto e Terapia Immunosoppressiva. Cattedra di Nefrologia, Centro Trapianto di Rene Università di Bologna



zie alla disponibilità di nuovi farmaci immunosoppressori.

I risultati, sintetizzati nella Fig. 10, sono stati di assoluto rilievo internazionale, consentendo di portare fino al 100% la percentuale di successo del trapianto a 3 anni.

### *B2. La Lamivudina nel trattamento della Epatite B dopo Trapianto renale*

Le epatiti virali sono una patologia di significativa rilevanza clinica nei pazienti con trapianto renale; lo stato di immunosoppressione indotto dalla terapia favorisce la replicazione virale, con conseguente elevazione degli indici di citonecrosi.

Nei pazienti HbsAg positivi, in particolare, è stata descritta un'aumentata morbilità, con possibilità di evoluzione in epatopatia cronica nel 40-80% dei casi. Fino ad oggi l'impiego di terapie in grado di contrastare efficacemente la riacutizzazione e l'evoluzione dell'epatopatia è stato condizionato soprattutto da effetti collaterali sulla tolleranza immunologica dell'organo trapiantato.

Nel trattamento dell'infezione HBV sono stati segnalati anche recentemente buoni risultati con l'impiego di una nuova sostanza prodotta dalla biotecnologia farmaceutica: la Lamivudina. Sono stati inseriti nel nostro studio quattro pazienti portatori di trapianto renale (3 maschi e 1 femmina, età media  $33 \pm 17$  anni), trattati continuativamente con Lamivudina per un periodo di 23-38 mesi in seguito a una riacutizzazione di epatite B.

#### *Risultati*

Il trattamento con Lamivudina ha comportato una rapida ed efficace inibizione della replicazione virale. Già dopo il primo mese di terapia in tutti i 4 pazienti l'HBV-DNA è risultato non dosabile, rispetto a valori medi pre-trattamento di  $341 \pm 230$  pg/ml. L'HBV-DNA è risultato sempre non dosabile nel corso di tutto il successivo periodo di osservazione. La negativizzazione della viremia si è associata ad una significativa riduzione degli indici di citonecrosi.

### *B3. Ruolo predittivo del polimorfismo genico delle citochine nel Trapianto*

Al fine di stabilire se la variabilità individuale della

risposta immunitaria nel trapianto di rene sia influenzata geneticamente dal polimorfismo dei geni che codificano la produzione di citochine, in 156 pazienti sottoposti a trapianto di rene, presso l'Unità Operativa di Nefrologia Dialisi e Trapianto renale del Policlinico S.Orsola di Bologna, è stato studiato il polimorfismo genico delle citochine Tumor Necrosis Factor-alfa, Transforming Growth Factor-beta, Interferone-gamma, Interleuchina-10 e Interleuchina-6 suddividendo i soggetti in produttori alti, medi e bassi. Sono stati valutati, in un follow-up da 6 a 36 mesi: sensibilizzazione pre-trapianto, mismatch HLA, sopravvivenza del trapianto, creatininemia a 6 mesi, rigetti a 3 mesi, episodi infettivi batterici e virali a 3 mesi, episodi infettivi batterici e virali a 3 mesi, ischemia fredda e ripresa funzionale, terapia immunosoppressiva.

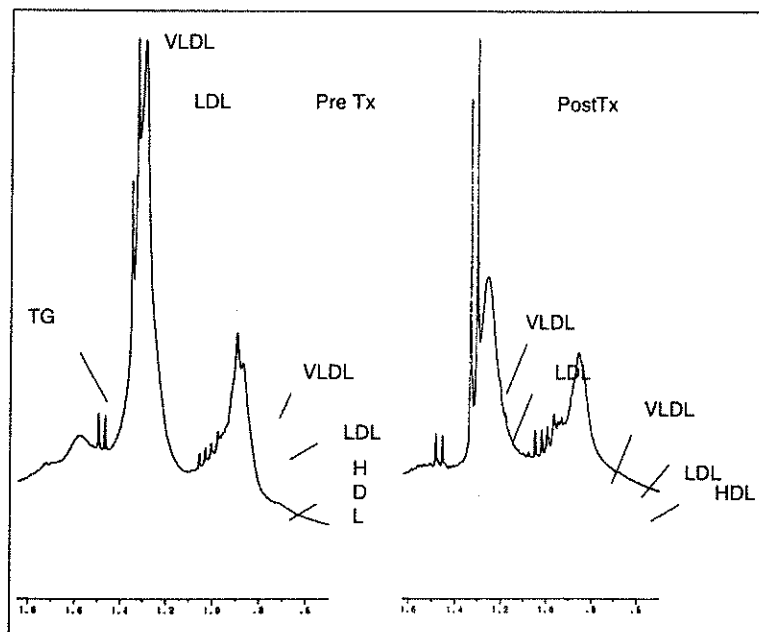
Le citochine implicate nella risposta dei Linfociti T helper 1 (Tumor Necrosis Factor-alfa, Interferone-gamma, non mostrano correlazioni né con la sopravvivenza a distanza né con la reattività immunologica a breve. Fra le citochine coinvolte nella risposta dei Linfociti T helper 2, l'Interleuchina-10 mostra per gli alti produttori (37 pazienti) peggiore sopravvivenza a 3 anni (88% vs 91% e 98%,  $p < 0.05$ ), maggior numero di rigetti ( $0,4 \pm 0,5$  negli alti produttori vs  $0,2 \pm 0,3$  nei produttori intermedi  $p < 0,05$ ; e vs  $0,1 \pm 0,4$  nei bassi produttori,  $p < 0,01$ ) e creatininemia a sei mesi più elevata ( $1,7 \pm 0,8$  mg/dl vs  $1,5 \pm 0,3$  mg/dl,  $p < 0,05$  e  $1,5 \pm 0,3$ ,  $p < 0,05$ ). Per quanto riguarda il Transforming Growth Factor-beta i bassi produttori (23 pazienti) mostrano una elevata sopravvivenza a distanza (100% a 3 anni vs 93%,  $p < 0,01$ ) e nessun rigetto vascolare irreversibile (0 vs 4%) o cronico (0 vs 6%) rispetto agli alti produttori (92 pazienti). Tutti i gruppi esaminati erano sovrapponibili in termini di caratteristiche immunologiche (sensibilizzazione pre-trapianto e mismatch HLA).

#### *Risultati*

I nostri dati suggeriscono che il polimorfismo genico delle citochine è correlato con l'esito del trapianto; pertanto la loro determinazione pre-trapianto può avere un ruolo predittivo sia in fase di allocazione dell'organo (maggior compatibilità nei soggetti alti produttori) che in fase di attribuzione del proto-



Figura 11. Picchi pre- e post-trapianto di rene di alcuni fattori di rischio cardiovascolare con spettroscopia a risonanza magnetica nucleare con protone  $^1\text{H}$ .



collo terapeutico (maggiore o minore carico immunosoppressivo).

#### B4. Tecnologia e Biotecnologia nel Trapianto di Rene: l'impiego della Spettroscopia $^1\text{H}$ NMR

La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare fornisce una completa analisi strutturale di un gran numero di molecole organiche, definendone la quantità.

Lo spettro di risonanza magnetica nucleare nasce dall'assorbimento e successiva emissione di energia di radio frequenza da parte di alcune molecole quando vengono poste in un forte campo magnetico. Le frequenze di emissione dipendono dall'esatto ambiente chimico dei nuclei e sono quindi usate per l'identificazione delle molecole. Il più comune e più sensibile nucleo NMR-attivo è il nucleo dell'atomo d'idrogeno o protone ( $^1\text{H}$ ).

#### Applicazioni cliniche

La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare mediante protone  $^1\text{H}$  può essere impiegata, a fini clinici, su campioni di urine e di plasma.

Lo studio delle urine presenta il peculiare vantaggio di poter studiare i metaboliti a basso peso molecolare di cui le urine stesse sono ricche. Lo studio

contemporaneo del plasma permette di ottenere informazioni indirette sui metaboliti che sono liberamente filtrati dal glomerulo. Con un campione di 0,5 ml di urine non trattate gli spettri sono ottenibili in meno di 10 minuti. La frequenza di acquisizione di 800 MHz garantisce la massima sensibilità. In questo modo è possibile identificare fino a 100 componenti urinari a basso peso molecolare la maggior parte dei quali non è a tutt'oggi compiutamente caratterizzato. Una rilevante applicazione della spettroscopia di risonanza magnetica nucleare mediante protone  $^1\text{H}$  ad alta risoluzione è l'identificazione di alterazioni precoci della funzione del rene trapiantato. Mentre alcune molecole come la trimetilamina-N-ossidasi o la dimetilamina si riducono,

altre possono aumentare come l'acetone e il glicerolo. Si osservano inoltre variazioni nelle lipoproteine e aumenti di VLDL e LDL (Fig. 11).

Nel plasma la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare mediante protone  $^1\text{H}$  potrebbe permettere di identificare sia fattori di rischio cardiovascolare noti, sia eventuali fattori di rischio non ancora identificati, attraverso il controllo comparativo. Una volta 'sottratti' dallo spettro i picchi relativi agli elementi già noti e studiati, rimangono quelli relativi alle sostanze di cui non sono ancora stati studiati gli effetti. In prima istanza si possono isolare, all'interno delle aree rappresentative dei fattori di rischio noti (ad es. nei picchi relativi ai ROS o alle frazioni lipidiche), gruppi di sostanze scelti sulla base di analogie molecolari.

Per quanto riguarda i fattori di rischio cardiovascolare nel plasma, mostriamo il risultato esemplificativo dello spettro pre-trapianto e di quello post-trapianto ottenuti dallo stesso paziente: nei picchi relativi rispettivamente ai ppm 0,6-1,4 è possibile identificare le VLDL, le LDL con i loro gruppi etilici (VLDL<sub>1</sub> e LDL<sub>1</sub>) e CH<sub>2</sub> (VLDL<sub>2</sub> e LDL<sub>2</sub>). Nell'area sottesa dagli stessi picchi, si trovano anche i trigliceridi. Di rilievo la massiva riduzione delle lipoproteine dopo trapianto renale.

## Considerazioni Conclusive

Le varie Linee di Ricerca, realizzate nell'ambito del Progetto affidato alla Cattedra di Nefrologia dell'Università di Bologna, si sono svolte in accordo alla tematica di fondo del Progetto stesso: l'integrazione e l'armonizzazione tra Clinica, Biologia, Tecnologia e Biotecnologia nel trattamento di pazienti affetti da insufficienza renale con mezzi artificiali, quali la Dialisi, o naturali, quali il Trapianto di Rene.

Gli studi hanno riguardato la Clinica (nuove modalità anticoagulative, trattamento dell'epatite, fattori emergenti di rischio cardiovascolare), la Biologia (citochine, fattori di crescita, amiloidosi da  $\beta$ 2-Microglobulina), la Tecnologia (dialisi personalizzata, sistema Dialock), la Biotecnologia (nuovi farmaci antirigetto, nuovi protocolli immunosoppressori, membrane per dialisi modificate, predittività delle caratteristiche genetiche di enzimi e fattori di crescita).

I risultati ottenuti possono essere considerati di sicuro rilievo scientifico e clinico, e riguardati come un concreto progresso per il passaggio dei pazienti da condizioni di "sopravvivenza" a più accettabili condizioni di "vita". Questo grazie alla dialisi senza collassi, alla anticoagulazione senza dislipidemia né emorragie, agli accessi vascolari biocompatibili e perenni anche per gli anziani, alle membrane che riducono il rischio cardiovascolare, alla limitata invasione degli organi interni da parte di tessuti neoformati, alle ottimali strategie immunosoppressive nel trapianto di rene: risultati ottenuti dalle nostre linee di ricerca nell'ambito del Progetto CARISBO "Clinica e Biologia delle gravi insufficienze d'organo".

## Bibliografia

Bonomini V, Coli L, Scolari MP, Stefoni S, Vangelista A. Kidney, patient and new millennium nephrology. *Nephron* 2000; 86(1): 84-88.

Bonomini V. Future prospects: is there a better way? *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10 (10S): 57-59.

Bonomini V, Stefoni S, Giardino R, Pallotti G. Bionic Arti-

ficial Kidney. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 1996; 24 (1): 1-10.

Bonomini V, Scolari MP, Buscaroli A, Liviano d'Arcangelo G, Stefoni S. Immunosuppression in renal transplantation. *Int J Artif Organs* 1997 ; 20 (2) : 73-75.

Grainger DJ, Kemp PR, Metcalfe JC. The serum concentration of active transforming growth factor  $\beta$  is severely depressed in advanced atherosclerosis. *Nat Med* 1995; 1(1): 74-79.

Halloran PF. Rethinking chronic allograft nephropathy: the concept of accelerated senescence. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:167.

Solez K, Racusen LC, Billingham ME. Solid Organ Transplantation Rejection, *Marcel Dekker, Inc.* 1996.

Stefoni S, La Manna G, De Sanctis LB, Dalmastris V, Perna C, Pace G, Donati G, De Pascalis A, Bertuzzi V, Stefoni V, Zanchelli F. Clinical biology of artificial organ substitution. *Nephrol Dial Transpl* 1998; 13 (Suppl 7) 70: 51-54.

Stefoni S, Azzena G, Pinna A, Cambi V. "Frontiere dell'innovazione nel campo dei Trapianti". *Progetto di Eccellenza 2001; Regione Emilia Romagna.*

USRDS Annual Data Report. *Am J Kidney Dis* 1999; 34 (2 Suppl 1): S87-S94.

## Riassunto

Le linee di ricerca della Cattedra di Nefrologia dell'Università di Bologna si sono sviluppate nell'ambito delle due modalità di sostituzione dell'abolita funzione renale: la dialisi con rene artificiale ed il trapianto renale. Per entrambe le modalità terapeutiche sono stati valutati aspetti di Clinica, Biologia, Tecnologia e Biotecnologia, visti nell'ottica della loro integrazione ed armonizzazione. Per la *Clinica*, gli studi hanno riguardato l'identificazione e l'impiego di nuove e più biologiche modalità anticoagulative, il trattamento dell'epatite B dopo trapianto renale mediante Lamivudina e lo studio del ruolo che emergenti fattori di rischio giocano nel determinismo della patologia cardiovascolare. In questo campo sono state trovate correlazioni tra elevati valori di omocisteina ed alta incidenza di cardiopatia ischemica, cerebrovasculopatia e vasculopatia periferica. Per quanto attiene la *Biologia* sono state studiate i fattori di crescita e le citochine, in maniera comparativa nel dializzato e nel trapiantato, e l'amiloidosi da  $\beta 2$ -Microglobulina. Nell'ambito della *Tecnologia*, è stato realizzato un avanzamento della originale metodica della dialisi personalizzata, basata sull'impiego in clinica di modelli matematici; sono stati studiati ed impiegati innovativi cateteri a permanenza, costituiti da un supporto metallico connesso a tubi gemelli di silastic, di elevata compatibilità, efficacia e tollerabilità. Nel settore della *Biotecnologia*, sono state configurate ed applicate innovative strategie antirigetto utilizzando i nuovi farmaci immunosoppressori, con risultati positivi anche nel 100% dei pazienti; è stata valutata la applicabilità in clinica di membrane per dialisi modificate, analizzate con Spettroscopia a Scansione di Forza e si è studiata la predittività, sulla qualità dei risultati clinici nel trapianto di rene, delle caratteristiche genetiche di alcuni enzimi e citochine. Nell'insieme i risultati ottenuti si configurano come un concreto progresso per il passaggio dei pazienti affetti da insufficienza renale da condizioni di "sopravvivenza" a più accettabili condizioni di "vita", e come una stimolante e solida base per futuri studi sulla dialisi e sul trapianto renale.

## Summary

*Research of the Department of Nephrology of the University of Bologna has developed along the lines of the two methods of remediating kidney failure: dialysis with artificial kidney and kidney transplantation. For both methods of therapy, the Clinical, Biological, Technological and Biotechnological aspects were evaluated, with a view to integrating and standardising them. As regards the Clinical aspects, studies concerned identification and use of new and more biological anticoagulating methods, treatment of hepatitis B after kidney transplant using Lamivudine and the study of the role that emerging risk factors play in determining cardiovascular pathology. In this field correlations have been found between high values of homocysteine and a high incidence of ischaemic cardiopathy, cerebral vasculopathy and peripheral vasculopathy. As regards the Biological aspects, growth factors and cytokines were studied comparatively in the dialysis patient and in the transplanted subject, and the amyloidosis from  $\beta 2$ -Microglobulin. As regards Technology, an advancement of the original method of personalised dialysis was performed, based on the use in the clinic of mathematical models; innovative permanent catheters were designed and used, consisting of a metal support connected to twin tubes of Silastic, highly compatible, effective and tolerable. In the Biotechnology sector, innovative antirejection strategies were configured and applied making use of new immunosuppressor drugs, with positive results in no less than 100% of patients; the possibility of application in the clinic was evaluated of modified dialysis membranes, analysed by means of Force Spectroscopy and a study was made of the predictiveness, on the quality of the clinical results in kidney transplantation, of the genetic characteristics of certain enzymes and cytokines. Altogether, the results obtained represent concrete progress for the passage of patients with kidney failure from "survival" conditions to more acceptable "life" conditions, and as a stimulating and solid basis for future studies on dialysis and kidney transplantation.*