

ricordo di  
Alessandro Bertoluzza



© 2003 by CLUEB Bologna  
Cooperativa Libreria Universitaria Editrice Bologna

Pubblicato a cura del Dipartimento di Biochimica "G. Moruzzi"  
dell'Università degli Studi di 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.

Ricordo di Alessandro Bertoluzza. – Bologna : CLUEB, 2003  
416 p.; 24 cm  
ISBN 88-491-2112-1

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

Finito di stampare nel mese di giugno 2003  
da Legoprint - Lavis (TN)

## Attivazione piastrinica intra- e post-dialitica e rilascio di PDGF-AB

S. Stefoni, G. Cianciolo, G. Donati, F. D'Addio, L. Cofi

**Riassunto.** Durante la seduta emodialitica il contatto sangue-membrana artificiale causa l'attivazione piastrinica e il rilascio del contenuto dei granuli piastrinici, che comprende: platelet derived growth factor-AB (PDGF-AB), fattore piastrinico 4 (PF4), beta tromboglobulina ( $\beta$ TG). In particolare il PDGF-AB interviene nella patogenesi dell'aterosclerosi nei pazienti non uremici. Scopo dello studio è stata l'osservazione intra- e post-dialitica del grado di attivazione piastrinica, dei livelli sierici di PDGF-AB, PF4,  $\beta$ TG e l'osservazione della variazione del volume piastrinico medio (VPM) durante sedute emodialitiche con membrane di Hemophan e Polisulfone. I livelli ematici dei parametri considerati sono stati determinati nel sangue di 30 pazienti ciascuno dei quali è stato sottoposto a 7 sessioni emodialitiche: 3 con membrana di Hemophan (HE) e 3 con membrana di Polisulfone (PS), separate da una seduta con PS. I prelievi ematici sono stati eseguiti ai tempi 0, 15, 30, 120, 180, 240 minuti durante la dialisi e dopo 1, 4 e 20 ore dopo il termine della seduta. Sono stati riscontrati valori di PDGF-AB elevati inizialmente durante la seduta e, eccetto una riduzione a 120 minuti, tali valori elevati si sono mantenuti costantemente alti durante la dialisi, ritornando ai valori di base solo dopo 20 ore dal termine della seduta. PF4,  $\beta$ TG e MPV hanno mostrato un comportamento simile al PDGF-AB. Non è emersa alcuna differenza statisticamente significativa fra le due membrane sperimentate. Si può ipotizzare che il rilascio ciclico e ripetuto di PDGF-AB durante la seduta emodialitica e il suo lento ritorno ai valori basali possa partecipare all'aterosclerosi accelerata dei pazienti uremici in trattamento emodialitico periodico.

### Introduzione

La patologia cardiovascolare rappresenta la causa più frequente di morbilità e di mortalità nei pazienti in trattamento dialitico. In questi pazienti la mortalità per malattia cardiovascolare è risultata circa 20 volte superiore rispetto alla normale popolazione europea sovrapponibile per età, sesso e razza [1].

Non è ancora chiaro nei pazienti uremici se la maggiore frequenza e gra-

vità della malattia aterosclerotica sia attribuibile alla sola azione dei comuni fattori di rischio cardiovascolare o se non concorrano anche fattori legati al trattamento sostitutivo artificiale [2, 3].

L'attivazione coagulativa, l'attivazione e l'aggregazione piastrinica sono i principali e precoci eventi di bioincompatibilità che si verificano a seguito del contatto sangue-membrana artificiale nel circuito ematico extracorporeo.

La popolazione piastrinica circolante è normalmente composta da piastrine di volume e morfologia normale e piastrine con differenti modificazioni funzionali, ovvero piastrine parzialmente o completamente degranulate. Queste ultime presentano un volume piastrinico medio (VPM) inferiore. Durante la terapia dialitica extracorporea, le piastrine vengono continuamente rimosse e reimmesse nel sangue circolante, ne risulta una popolazione piastrinica eterogenea con nuove piastrine di dimensioni maggiori e piastrine più vecchie di dimensioni ridotte. La determinazione del VPM sembra quindi importante per determinare la risposta piastrinica al contatto con la membrana artificiale [4, 5].

Come è noto, durante la sessione dialitica, il contatto sangue-materiali artificiali provoca la degranolazione dei granuli densi piastrinici, contenenti adenosina difosfato e serotonina, e degli  $\alpha$ -granuli, che contengono il Fattore Piastrinico 4 (PF4, 358.000 Daltons), la  $\beta$ -Tromboglobulina ( $\beta$ TG, 35.800 Da) e il PDGF-AB. Per quanto riguarda la "release reaction", esiste un consenso generale nel considerare PF4 e  $\beta$ TG indici attendibili di attivazione piastrinica intradialitica [6]. Anche la somministrazione intradialitica di eparina nel circuito extracorporeo può presumibilmente svolgere un ruolo favorente l'aggregazione piastrinica. La patogenesi di tale effetto proaggregante non è ben nota e può essere mediata da: 1) l'inibizione dell'adenilatociclastasi piastrinica; 2) la modificazione del metabolismo delle prostaglandine [7-10]. Il PDGF è uno dei più importanti fattori di crescita in grado di agire su tutte le cellule di derivazione mesenchimale. Il suo peso molecolare è compreso in un range variabile fra i 28.000 e i 35.000 Da, con una vita media inferiore ai 2 minuti e viene sintetizzato dai fibroblasti, dalle cellule endoteliali, dai macrofagi e dalle piastrine. Il PDGF è costituito da due differenti catene glicoproteiche (A e B), interconnesse da legami covalenti. Le due catene sono codificate da geni differenti, che sono espressi indipendentemente consentendo pertanto alle cellule di sintetizzare tre molecole isoforme: PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB. L'isoforma AB è depositata principalmente all'interno degli  $\alpha$ -granuli piastrinici [11]. La concentrazione sierica del PDGF-AB nella popolazione normale è di circa  $29,7 \pm 14$  ng/ml. Il PDGF, e principalmente la isoforma AB, causa la proliferazione dei fibroblasti, delle cellule muscolari lisce e di tutti i tipi di cellule di derivazione mesenchimale, ciascuna delle quali a sua volta è in grado di sintetizzare PDGF. Il PDGF stimola la sintesi di matrice extracellulare, induce la migrazione delle cellule muscolari lisce e agisce come un potente stimolo per la loro contrazione [12-14].

Considerando le lesioni nelle lesioni valutarie la crescita della piastrinica e

Nel pre-dialitico, i VPM, conflitti in polimerizzazione sinteticamente valutare se sostituzione e nicci terziarie è già st

Pazienti e

Pazienti

Trentino non siati in diabete, n con farax Le et

Tabella 1 -

Modalità

Cia ve, con lizzazione guite da 1,6 m<sup>2</sup> e

Considerando gli importanti effetti biologici del PDGF-AB ed il suo ruolo nelle lesioni vascolari aterosclerotiche [15, 16], potrebbe risultare interessante valutare le eventuali modificazioni nei livelli sierici di questo fattore di crescita durante e dopo la sessione emodialitica in relazione all'attivazione piastrinica causata dal contatto sangue-materiale artificiale [17-18].

Nel presente studio abbiamo pertanto valutato, durante e dopo le sedute dialitiche, i livelli sierici di PDGF-AB, i livelli plasmatici di  $\beta$ TG, PF4 [19] e VPM, confrontando, mediante tali parametri, una membrana dializzante sintetica in polisulfone (PS) e una membrana di derivazione cellulosa modificata sinteticamente quale l'hemophan (HE). Il nostro studio è stato condotto per valutare se il grado di modificazione sintetica dell'HE ottenuto mediante sostituzione della porzione carbossi-terminale della cellulosa con gruppi amminici terziari, possa essere in grado di ridurre l'attivazione piastrinica, così come è già stato dimostrato per il PS [20].

### Pazienti e Metodi

#### Pazienti

Trenta pazienti, in trattamento dialitico periodico da almeno 12 mesi, sono stati inclusi nello studio. Sono stati esclusi dallo studio i pazienti affetti da diabete, malattie mieloproliferative o alterazioni coagulative, ed in trattamento con farmaci anticoagulanti/antiaggreganti.

Le caratteristiche dei pazienti sono riportate nella Tabella 1.

Tabella 1 - Caratteristiche dei pazienti selezionati.

Pazienti (n)	30
Età (anni)	58,5 $\pm$ 11
Sesso (M/F)	18/12
Età di Dialisi (mesi)	53,7 $\pm$ 43,9
Kt/V	1,4 $\pm$ 0,2
Ricircolo (%)	7,0 $\pm$ 3,0
Ematocrito (%)	31,0 $\pm$ 4,0
Piastrine (1000/mm <sup>3</sup> )	174,1 $\pm$ 23,5
PT (%)	98,0 $\pm$ 7,0
aPTT (s)	38,0 $\pm$ 4,0

#### Modalità dialitiche

Ciascun paziente è stato sottoposto a tre sedute emodialitiche consecutive, con una membrana di HE (Bellco NT1665H, filtro a fibre capillari, sterilizzazione con raggi gamma, 1,6 m<sup>2</sup> di superficie, Kuf 4,6 ml/h/mmHg), seguite da altre 3 sedute con un filtro in PS (Fresenius F7 HPS, fibre capillari, 1,6 m<sup>2</sup> di superficie, Kuf 9,8 ml/h/mmHg). Tutte le sedute di dialisi sono sta-

te eseguite con la seguente modalità: dialisi convenzionale con bagno bicarbonato (concentrazione di calcio 3,5 mEq/l), durata di 4 ore, monitor di controllo dell'ultrafiltrazione, calo ponderale orario pari a  $750 \pm 50$  ml/h, flusso sangue  $310 \pm 30$  ml/min, flusso dialisato 500 ml/min.

Come seduta di "wash-out" fra le sedute dialitiche con HE e quelle con PS, è stata utilizzata una seduta emodialitica con PS.

In ogni seduta sono state impiegate le stesse procedure di eparinizzazione: nel lavaggio iniziale, 2 litri di soluzione fisiologica con 20.000 UI di eparina standard (Eparina Sodica Vister, Parke-Davis). Durante la procedura di connessione risultavano pertanto somministrate al paziente 500 UI di eparina standard, seguite da  $3.500 \pm 500$  UI in infusione intradialitica continua.

#### Laboratorio

Per valutare le variazioni intra e postdialitiche delle molecole studiate, il PDGF-AB è stato dosato su siero, mentre il PF4 e la  $\beta$ TG sono stati determinati su plasma.

I campioni di sangue sono stati prelevati a 0, 15, 30, 120, 180 e 240 minuti durante la seduta emodialitica nel sangue periferico. Il sangue periferico è stato prelevato dal braccio controlaterale alla fistola. Un minuto prima della fase di prelievo dei campioni il flusso di sangue è stato ridotto a circa 100 ml/min e la velocità di ultrafiltrazione è stata ridotta a 0. Nel periodo post-dialitico i campionamenti sono stati effettuati ad 1, 4 e 20 ore dal termine di ogni seduta. La conta piastrinica e la determinazione del MPV, è stata determinata nel sangue periferico agli stessi intervalli di tempo sia nel periodo intra-dialitico che nel periodo dopo la dialisi.

Per ottenere i campioni di siero necessari per il dosaggio di PDGF-AB abbiamo utilizzato provette per la separazione del siero e abbiamo lasciato coagulare il campione per almeno 30 minuti a temperatura ambiente. I campioni sono stati quindi centrifugati per 10 minuti a 1000 g circa. Tale procedura è stata ripetuta fino ad ottenere un siero privo di elementi corpuscolati. Il siero è stato quindi raccolto in una seconda provetta e conservato a  $-20^\circ\text{C}$  fino all'esecuzione del test.

Per quanto riguarda il dosaggio di PF4 e  $\beta$ TG, il sangue è stato raccolto in DIATUBES contenenti citrato, adenosina, teofillina e dipiridamoio. Dopo la puntura della vena il primo ml di sangue è stato scartato e i successivi 4,5 millilitri sono stati raccolti e aggiunti a 0,5 ml di soluzione anticoagulante. Le provette sono state poste in ghiaccio liquido e centrifugate dopo 15 minuti a 2000 g per 30 minuti. Un terzo del plasma è stato raccolto nella regione intermedia del supernatante, quantificato e congelato immediatamente a  $-80^\circ\text{C}$ . I tests quantitativi sono stati eseguiti entro 2 settimane.

Il PDGF-AB è stato determinato mediante ELISA utilizzando dei kits commerciali (Quantikine, R&D System).

$\beta$ TG e PF4 sono stati determinati su plasma mediante ELISA, usando kits commerciali (Stago, Boehringer Mannheim).

Le variazioni di volume cellulare sono state misurate nel sangue periferico usando la citometria a flusso (Bayer-Advia) per determinare il VPM (fl).

#### Analisi statistica

In considerazione dell'ampia variabilità individuale dei valori basali di PDGF-AB, PF4 e  $\beta$ TG, abbiamo deciso di stabilire la percentuale di variazione di ogni determinazione rispetto al livello T0, sia nella valutazione intradialitica che in quella postdialitica. Al contrario il VPM e l'aPTT sono stati riportati come valori assoluti. I dati sono presentati come deviazioni standard medie e sono stati confrontati sia verso il tempo 0 (T0) sia fra le due membrane studiate. La valutazione statistica è stata eseguita mediante il programma statistico Statview 4.01 per Macintosh. One-way ANOVA è stata impiegata per determinare la significatività statistica; il *t*-test di Student per dati appaiati è stato impiegato per confermare i dati ottenuti con l'one-way ANOVA. È stata eseguita una regressione lineare per correlare aPTT con PF4,  $\beta$ TG e PDGF-AB e individuare eventuali corrispondenze fra l'effetto dell'eparina e la degranolazione piastrinica. Sono stati considerati statisticamente significativi i valori con  $p < 0,05$ .

#### Risultati

##### PDGF-AB

Nella popolazione dialitica studiata, i livelli sierici di PDGF-AB erano  $28,7 \pm 10,7$  ng/ml al tempo T0 per le sessioni dialitiche eseguite con HE e  $28,1 \pm 9,0$  ng/ml per quelle eseguite con PS. Con HE i livelli sierici di PDGF-AB, hanno mostrato un incremento del  $+26,1 \pm 6\%$  dopo 30 minuti ( $p < 0,001$  verso T0), con un successivo lento decremento ( $-21,8 \pm 7,2\%$ ,  $p < 0,001$  verso T0) a 120' (Figura 1). Durante la seconda metà della seduta di dialisi abbiamo riscontrato un secondo progressivo aumento nei livelli sierici di PDGF-AB. A 240' l'incremento percentuale di crescita era pari al  $+40,0 \pm 7,6\%$  rispetto al valore T0 ( $p < 0,001$ ). I dati relativi al periodo post-dialitico mostrano una progressiva riduzione ai livelli basali entro 20 ore dal termine della seduta.

L'andamento dei valori di PDGF-AB con il PS era quasi lo stesso, con un incremento di  $+24,8 \pm 5,2\%$  dopo 30' ( $p < 0,001$  verso T0) e una riduzione ( $-25,4 \pm 7,3\%$ ,  $p < 0,001$ ) a 120 minuti.

Durante la seconda parte della seduta emodialitica si verificava un secondo picco nei valori di PDGF-AB (a 240',  $+43,6 \pm 6,4\%$  verso T0,  $p < 0,001$ ). Nella fase post-dialitica abbiamo poi osservato un ritorno progressivo ai valori pre-dialitici entro venti ore dal termine della seduta.

Il confronto fra le membrane testate non ha evidenziato alcuna differenza negli intervalli di tempo considerati ( $p = ns$ ).

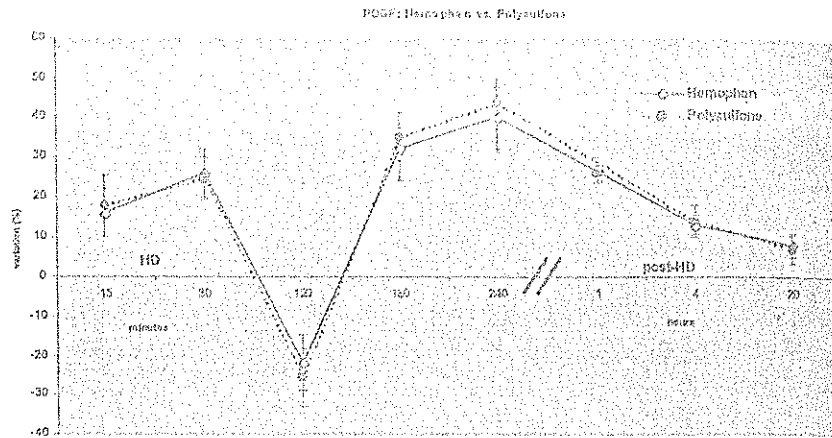


Figura 1 - PDGF-AB ematico intra e post-dialitica eseguita con membrana di Hemofan vs Polisulfone (P=ns). I dati sono presentati come variazione percentuale rispetto ai valori basali (media±SD); la valutazione statistica è stata eseguita mediante ANOVA.

*βTG*

I livelli plasmatici intra-dialitici di βTG sono risultati più elevati rispetto ai valori basali durante tutte le sedute testate (Figura 2). In particolare la variazione percentuale ha mostrato due picchi di concentrazione dopo 30' (+27,1±5,4% p < 0,001 verso T0 per HE e +25,3±6,0% p < 0,001 per PS) e a 180' (22,0±6,8% p < 0,001 verso T0 per HE e +23,5±6,6%, p < 0,001 verso T0 per PS; Figura 2).

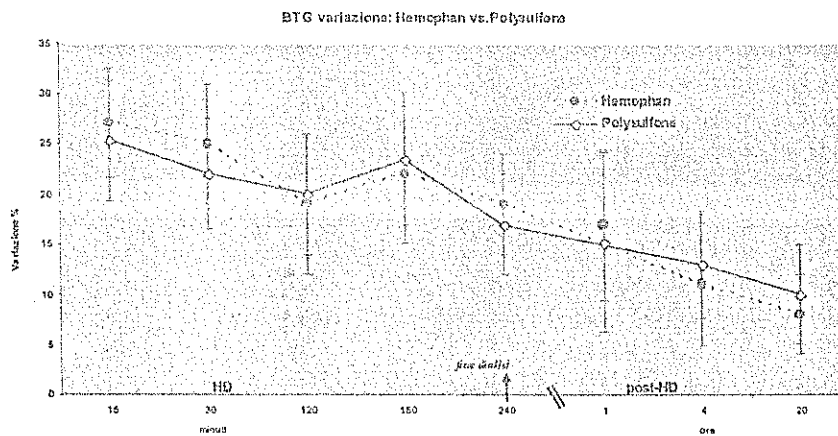


Figura 2 - βTG ematica intra e post-dialitica con membrana di Hemofan vs Polisulfone (P=ns). I dati sono presentati come variazione percentuale rispetto ai valori basali (media±SD); la valutazione statistica è stata eseguita mediante ANOVA.

PF4

Figura Polisulf...  
spetto ai...  
luti risp...  
diante A

Ne...  
smatic...  
+15,2±...  
ne, e u...  
Il...  
negli i

PF4

I l...  
ti pers...  
ne per...  
mo più...  
per PS...  
< 0,00...  
N...  
livelli...  
termini

Cont...  
I...  
transi...  
durar



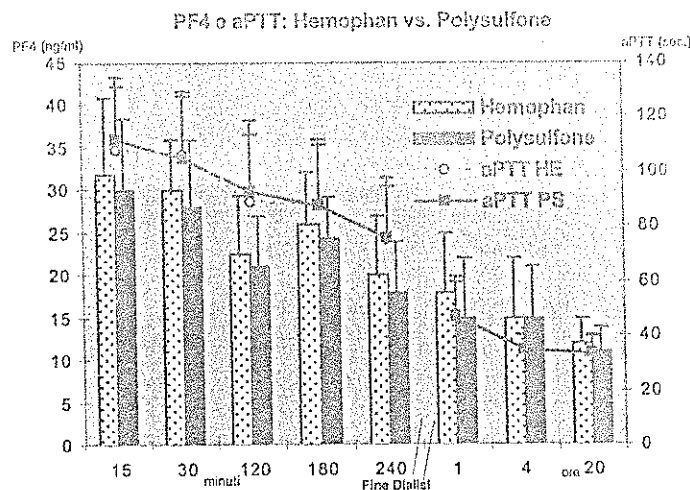


Figura 3 - PF4 ematico intra e post-dialitico con membrana di Hemophan vs Polysulfone ( $P=ns$ ). I dati per il PF4 sono presentati come variazione percentuale rispetto ai valori basali (media $\pm$ SD); i dati per aPTT sono presentati come valori assoluti rispetto ai valori basali (media $\pm$ SD); la valutazione statistica è stata eseguita mediante ANOVA.

Nel periodo post-dialitico abbiamo rilevato una riduzione dei livelli plasmatici periferici del  $\beta$ TG:  $+17,0\pm 7,5\%$  per HE ( $p < 0,001$  verso T0) e  $+15,2\pm 9,0\%$  per il PS ( $p < 0,001$  verso T0) 1 ora dopo il termine della sessione, e un ritorno ai valori basali solo dopo 20 ore.

Il confronto fra le membrane testate non ha evidenziato alcuna differenza negli intervalli di tempo considerati ( $p=ns$ ). (Figura 2).

#### PF4

I livelli plasmatici intra-dialitici di PF4 nel sangue periferico sono risultati persistentemente più elevati rispetto ai valori di base (Figura 3). La variazione percentuale ha mostrato in particolare due picchi di concentrazione. Il primo picco a 30 minuti:  $+30,0\pm 6,0\%$  per HE ( $p < 0,001$  verso T0),  $+28,0\pm 8,0\%$  per PS ( $p < 0,001$  verso T0); il secondo picco a 180':  $+26,0\pm 6,1\%$  per HE ( $p < 0,001$  verso T0), e  $+24,5\pm 5,0\%$  per PS ( $p < 0,001$  verso T0).

Nel periodo post-dialitico abbiamo rilevato una progressiva riduzione dei livelli plasmatici di PF4, che ritornavano ai valori basali solo dopo 20 ore dal termine della sessione.

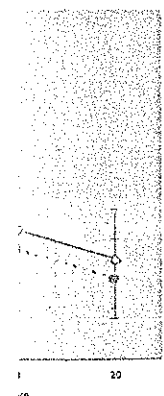
#### Conta piastrinica e volume piastrinico medio

Nella fase intradialitica, la conta piastrinica ha mostrato una riduzione transitoria di circa il 15% dopo 30 minuti, con valori successivamente stabili durante l'intera sessione e nel successivo periodo post-dialitico.



on membrana di  
zione percentuale  
eseguita mediante

l'elevati rispetto  
picolare la varia-  
zione dopo 30'  
,001 per PS) e a  
< 0,001 verso T0



di Hemophan vs  
le rispetto ai valo-  
rne ANOVA.

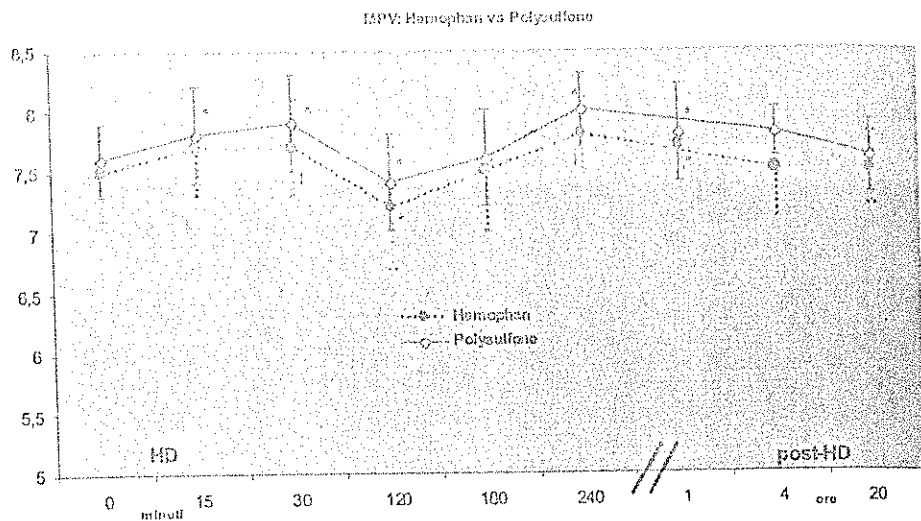


Figura 4 - VPM ematico intra e post-dialitico con membrana di Hemophan vs Polisulfone ( $P=ns$ ). I dati sono presentati come variazione percentuale rispetto ai valori basali (media $\pm$ SD); la valutazione statistica è stata eseguita mediante ANOVA.  $P=ns$  fra le due membrane testate; verso il valore T0; \* $p<0,05$ , ° $p<0,01$ ; ^  $p<0,001$ .

Con entrambe le membrane testate i valori di VPM (Figura 4) nella fase intradialitica hanno rilevato, verso T0, una crescita a 15' con HE  $7,7\pm 0,4$  fl ( $p=ns$ ) e con PS  $7,8\pm 0,4$  fl ( $p=ns$ ). Quindi, a 120' il VPM si è ridotto transitoriamente con entrambe le membrane: con HE  $7,4\pm 0,4$  fl,  $p<0,05$  verso T0, con PS  $7,2\pm 0,5$  fl  $p<0,05$  verso T0. Nella seconda parte della sessione il VPM è aumentato progressivamente fino a 240' ( $p<0,01$  con HE e  $p<0,001$  con PS verso T0), quindi i valori di VPM sono ritornati ai valori basali entro 20 ore dal termine della sessione.

#### aPTT

I valori di aPTT sono stati monitorizzati durante le sessioni dialitiche per ciascuna delle due membrane testate e sono risultati: a T0  $37\pm 8$  secondi per HE e  $41\pm 13$  secondi per PS (Figura 3). A 15' si è riscontrato un picco nei valori di aPTT dovuto all'effetto dell'eparina della soluzione di lavaggio, i valori di aPTT erano  $108\pm 24$  secondi per HE e  $112\pm 23$  secondi per PS. Nei successivi intervalli testati abbiamo osservato valori di aPTT sostanzialmente stabili nel range terapeutico senza alcuna differenza significativa fra le due membrane. Un'ora dopo il termine della sessione dialitica aPTT era  $48\pm 14$  secondi per HE e  $47\pm 13$  secondi per PS. A 4 e 20 ore dal termine della sessione nessuna variazione significativa nei valori di aPTT è stata riscontrata per ciascuna membrana considerata. L'analisi mediante regressione lineare non ha dimostrato una correlazione ben definita fra i valori di aPTT e i markers di degranulazione piastrinica in nessuno degli intervalli di tempo considerati (Tabelle 2 e 3).

Tabella 2 – Regressione Lineare fra aPTT e indici di attivazione piastrinica, dialisi con HE.

	PF4	$\beta$ TG	PDGF-AB
15'	0.11	0.21	0.2
30'	0.10	0.12	0.2
120'	ns	0.1	0.1
180'	ns	ns	0.1
240'	ns	ns	ns
1 h	ns	ns	ns
4 h	ns	ns	ns
20 h	ns	ns	ns

Tabella 3 – Regressione Lineare fra aPTT e indici di attivazione piastrinica, dialisi con PS.

	PF4	$\beta$ TG	PDGF-AB
15'	ns	ns	0.12
30'	ns	ns	ns
120'	ns	ns	ns
180'	ns	ns	ns
240'	ns	ns	ns
1 h	ns	ns	ns
4 h	ns	ns	ns
20 h	ns	ns	ns

### Discussione

L'attivazione e l'aggregazione piastrinica, e l'attivazione del sistema coagulativo sono i più precoci e i più importanti fenomeni che fanno seguito al contatto fra il sangue e la membrana artificiale [17, 18, 21, 22].

Il nostro studio conferma un'apprezzabile attivazione piastrinica: il PDGF-AB, il  $\beta$ TG, ed il PF4 sono cospicuamente rilasciati nel sangue nei primi minuti della sessione dialitica, senza una apprezzabile differenza fra HE e PS.

I livelli periferici di PDGF-AB risultavano aumentati con entrambe le membrane già dopo 15 e 30 minuti. Tale incremento iniziale è correlato principalmente al contatto fra sangue e materiale artificiale del circuito extracorporeo ed in particolare con la membrana di dialisi.

L'effettivo release di PDGF-AB può presumibilmente essere sottostimato, qualora si consideri la ridotta emivita (<2 minuti) di questa molecola, che esiste in una sua rapida rimozione dal circolo ematico.

La riduzione dei valori di PDGF-AB al di sotto dei valori basali, osserva-



a di Hemophan vs  
ale rispetto ai valo-  
ante ANOVA. P=ns  
; ^ p<0,001.

igura 4) nella fase  
con HE  $7,7 \pm 0,4$  fl  
i è ridotto transito-  
0,05 verso T0, con  
sessione il VPM è  
e p<0,001 con PS  
basali entro 20 ore

ssioni dialitiche per  
 $37 \pm 8$  secondi per  
un picco nei valori  
lavaggio, i valori di  
PS. Nei successivi  
zialmente stabili nel  
le due membrane.  
 $\pm 14$  secondi per HE  
sione nessuna varia-  
ciascuna membrana  
dimostrato una cor-  
granulazione piastrini-  
e 2 e 3).

to a 120' con entrambe le membrane studiate, potrebbe essere l'espressione di una ridotta reattività piastrinica allo stimolo attivatore rappresentato dal circuito extracorporeo qualora prevalgano nel sangue piastrine già degranulate e quindi poco attivabili. La presenza di piastrine degranulate sembra confermata a 120' dal VPM inferiore rispetto ai valori di base. L'ulteriore riduzione dei valori di PDGF-AB è probabilmente un processo multifattoriale e può essere correlato a: 1) la rimozione di tale fattore di crescita che può conseguire ad una iperespressione di recettori specifici sulle cellule bersaglio; 2) un effetto feed-back negativo sulle piastrine.

Il successivo incremento del PDGF-AB nella seconda parte della sessione dialitica potrebbe essere correlato ad una ulteriore attivazione piastrinica probabilmente dovuta a: 1) aumento progressivo del contenuto in fibrinogeno all'interno del "protein layer" sulla superficie della membrana; 2) emocoagulazione intradialitica con un aumento relativo della concentrazione dei fattori attivati della coagulazione; 3) comparsa progressiva nel sangue circolante di piastrine giovani e con VPM più grande, più reattive verso i fattori proaggreganti (trombina, trombassano A2) [23]. Le piastrine più giovani e con VPM maggiore sono anche più reattive al contatto con la superficie dei materiali artificiali rispetto alle piastrine più vecchie con un VPM inferiore. Il nadir in termini di VPM si verifica in genere a 120' durante la seduta dialitica: il VPM aumenta generalmente dopo la seconda ora con l'arrivo di nuove piastrine nel sangue circolante. Questo fenomeno sembra dimostrato dall'aumento progressivo nel VPM osservato nella seconda metà di una sessione dialitica [24, 25].

La valutazione post-dialitica ha mostrato una progressiva riduzione dei livelli periferici di PDGF-AB, che peraltro ritornavano ai valori basali solo dopo 20 ore dal termine della sessione. Questo andamento post-dialitico sembra riflettere: a) una persistente attivazione piastrinica che supera il termine della seduta dialitica, b) l'induzione (meccanismo a cascata) nelle cellule bersaglio endoteliali di una ulteriore produzione di PDGF-AB.

Per quanto riguarda le altre molecole studiate, i livelli periferici di  $\beta$ TG e PF4 presentavano un andamento analogo a quello del PDGF-AB: un aumento nella prima fase della seduta, ed un nuovo e successivo picco al termine di essa. Per quanto riguarda il PF4, il picco iniziale osservato a 15' può essere presumibilmente correlato al release di PF4, mediato dall'eparina dai siti di legame dell'eparin solfato presenti sulle cellule endoteliali [9]. Il minor aumento intra-dialitico di  $\beta$ TG e PF4 se paragonato al PDGF-AB, può essere indotto dal consumo di tali molecole nella neutralizzazione del potere anticoagulante dell'eparina; difatti, è ben noto che queste due molecole (ed in particolare il PF4) sono in grado di legare l'eparina.

Nel periodo post-dialitico i livelli plasmatici di  $\beta$ TG e PF4 si riducono più lentamente, rispetto al PDGF-AB, nelle 20 ore successive al termine della seduta. Questo diverso andamento può essere correlato sia alla loro maggiore emivita (100 e 13 minuti rispettivamente) sia alla persistente attivazione pia-

strini  
niot  
vasco  
] per c  
AB,  
zioni  
vato  
pazi  
nizie  
P-se  
simi  
 $\beta$ TC  
di 6

mul  
del  
infl  
dell  
elet  
con  
zior  
altr  
pro

dov  
ma

PD  
[3C  
las  
raz  
me  
la  
sia

va  
di  
tre  
at  
si:  
m  
q

strinica. Per quanto riguarda il PF4 è inoltre di estremo interesse l'azione chemiotattica su neutrofili e monociti con un ulteriore danno a livello della parete vascolare.

Dal presente studio non sono emerse differenze significative fra HE e PS per quanto riguarda l'attivazione piastrinica e il rilascio in circolo di PDGF-AB,  $\beta$ TG e PF4. I nostri dati sembrano confermare precedenti studi di attivazione piastrinica durante la dialisi [17, 18]. Inoltre Cases e coll. hanno osservato un comportamento simile fra HE e PS in uno studio randomizzato su 9 pazienti, le valutazioni tuttavia sono state eseguite solo a 0 e 15 minuti dall'inizio della dialisi e sono state limitate alla conta piastrinica e al dosaggio della P-selectina [26]. Verbeelen e coll. hanno dimostrato un'attivazione piastrinica simile fra HE e PS in 10 pazienti: sono stati valutati la conta piastrinica e la  $\beta$ TG a 0, 15 e 45 minuti di dialisi, in uno studio randomizzato per il confronto di 6 diverse membrane [27].

L'attivazione e l'aggregazione piastrinica rimangono comunque processi multifattoriali influenzati principalmente dalle caratteristiche fisico-chimiche del biomateriale. Inoltre anche la carica elettrica delle superfici biologiche può influenzare la biocompatibilità dei materiali: tutte le cellule e la maggior parte delle proteine a pH fisiologico subiscono una negativizzazione della carica elettrica superficiale. Queste cellule caricate negativamente possono interagire con i cationi delle superfici artificiali e diventare attivate [28]. Infine l'attivazione piastrinica può essere influenzata dallo "shear stress" [29], così come da altri fattori biologici stimolati dal contatto sangue-membrana: adsorbimento proteico, complemento, attivazione leucocitarie e coagulativa.

Se la presenza di un rilascio intra-dialitico del PDGF-AB, principalmente dovuto all'interazione fra sangue e materiale artificiale, sembra evidente, rimangono tutte da precisare le possibili implicazioni cliniche.

Numerosi studi sperimentali hanno recentemente confermato come il PDGF possa rivestire un ruolo chiave nello sviluppo di lesioni aterosclerotiche [30]. Recentemente Caplice e coll. [31] hanno riscontrato che il PDGF-AB rilasciato nella circolazione coronarica dopo angioplastica promuove la proliferazione di cellule muscolari lisce in vitro. L'inibizione del recettore del PDGF mediante la CGP 53716 (un inibitore specifico della tirosina chinasi) previene la migrazione delle cellule muscolari lisce e la loro proliferazione sia in vitro sia in misura minore dopo angioplastica [32].

Il cospicuo release intradialitico del PDGF-AB e il suo graduale ritorno a valori basali, sembra qualificarlo come uno dei possibili fattori di rischio cardiovascolare nei pazienti uremici. Il release intra-dialitico di PDGF-AB potrebbe essere correlato, nel tempo e consensualmente ad altri fattori di rischio aterosclerotico, con il progressivo peggioramento delle lesioni aterosclerotiche sia attraverso una azione diretta sulle cellule bersaglio (cellule muscolari lisce, macrofagi, cellule endoteliali) sia inducendo la produzione di PDGF-AB in queste stesse cellule. Questa ipotesi può essere di particolare interesse se si

considera la durata e la ciclicità del trattamento dialitico e il rilascio ciclico di PDGF-AB. [16]

Sono sicuramente necessarie ulteriori valutazioni del rilascio del PDGF-AB mediante studi prospettici sia utilizzando altri tipi di membrane artificiali sia altre tecniche dialitiche sia diverse metodiche di anticoagulazione. Infine un'esatta definizione del ruolo del PDGF nella patologia aterosclerotica non potrà prescindere da un approfondimento delle complesse interazioni con altri fattori di crescita sia ad azione aterogena che antiaterogena. [17] [18] [19] [20]

#### Bibliografia

- [1] USRDS 1999 Annual data report: Am. J. Kidney Dis. 1999; 34 (suppl 1): S87-S94. [21]
- [2] Stefoni S, La Manna G, De Sanctis LB et al. Clinical biology of artificial organ substitution. Nephrol Dial Transplant 1998; 13(7): S51-54. [22]
- [3] London GM, Parfrey PS. Cardiac disease in chronic uremia: Pathogenesis. Adv Ren Replace Therapy 1997; 4: 194-211. [23]
- [4] Rossi E, Casali B, Regolisti G, et al. Increased plasma levels of platelet derived growth factor (PDGF BB + PDGF AB) in patients with never treated mild essential hypertension. Am J Hypertens 1998; 11: 1239-43. [24]
- [5] Mohr R, Golan M, Martinovitz U, Rosner E, Goor DA, Ramot B. Effect of cardiac operation on platelets. J. Thoracic Cardiovascular Surg. 1986; 92 (3pt1): 434-441. [25]
- [6] Kaplan KL, Owen J. Plasma levels of beta thromboglobulin and platelet factor 4 as indexes of platelet activation in vivo. Blood 1981; 57: 199. [26]
- [7] Feedman MD. Pharmacodynamics, clinical indications and adverse effects of heparin. J. Clin. Pharmacol. 1992; 32: 584-96. [27]
- [8] Mohammad SF; Anderson WH, Smith JB, Chuang HY, Mason RG. Effects of heparin on platelet aggregation, release reaction and thromboxane A2 production. Am. J. Pathol. 1981; 104: 132-41. [28]
- [9] Andrassy K, Ritz E, Bommer J. Effects of hemodialysis on platelets. Contrib Nephrol 1987; 59: 26-34. [29]
- [10] Lindsay RM, Mason RG, Kim SW, Andrade JD, Hakim RM. Panel conference. Blood surface interactions. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs 1980; 26: 603-10. [30]
- [11] Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of platelet derived growth factor. Cell 1986; 46: 155-69. [31]
- [12] Berk B, Alexander RW, Brock TA, Gimbrone MA, Webb RC. Vasoconstriction: a new activity for platelet derived growth factor. Science 1986; 232: 87-90. [32]
- [13] Nelson PR, Yamamura S, Kent KC. Platelet derived growth factor and extracellular matrix proteins provide a synergistic stimulus for human vascular smooth muscle cell migration. J. Vasc. Surg. 1997; 26: 104-12. [33]
- [14] Edmunds LH. Blood surface interactions during cardiopulmonary bypass. J Card Surg 1993; 8: 404-10. [34]
- [15] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis, a perspective for the 1990s. Nature 1993, 362: 801-809. [35]

- o e il rilascio ciclico di  
 del rilascio del PDGF  
 di membrane artificiali  
 anticoagulazione. Infiammazione  
 aterosclerotica non  
 se interazioni con altri  
 ena.
- 1999; 34 (suppl 1): S87.
- biology of artificial organ  
 ia.  
 emia: Pathogenesis. Adv  
 levels of platelet derived  
 never treated mild essen-
- Ramot B. Effect of car-  
 r Surg. 1986; 92 (3pt1).
- ulin and platelet factor 4  
 199.  
 and adverse effects of he-
- Mason RG. Effects of he-  
 miboxane A2 production.  
 sis on platelets. Contrib  
 n RM. Panel conference.  
 Organs 1980; 26: 603-10.  
 telet derived growth fac-
- o RC. Vasoconstriction: a  
 1986; 232: 87-90.  
 vth factor and extracellu-  
 nan vascular smooth mu-  
 ulmonary bypass. J Card  
 ive for the 1990s. Nature
- [16] Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet derived growth factor. *Physiol. Rev.* 1999; 79: 1283-316.
- [17] Cianciolo G, Stefoni S, Zanchelli F, et al. PDGF-AB release during and after haemodialysis procedure. *Nephrol. Dial. Transplant* 1999; 14: 2413-9.
- [18] Cianciolo G, Stefoni S, Donati G, et al. Intra- and post-dialytic platelet activation and PDGF-AB release: cellulose acetate vs. polysulfone membranes. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2001; 16: 1222-9.
- [19] Lindhout T. Biocompatibility of extracorporeal blood treatment. Selection of haemostatic parameters. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1994; 9 (suppl 2): S83-9.
- [20] Clark WR, Hamburger RJ, Lysaght MJ. Effect of membrane composition and structure on solute removal and biocompatibility in hemodialysis. *Kidney Int.* 1999; 56: 2005-15.
- [21] De Sanctis LB, Stefoni S, Cianciolo G, et al. Effect of different dialysis membranes on platelet function. A tool for biocompatibility evaluation. *Int. J. Artif. Organs* 1996; 19: 404-10.
- [22] Vienken J, Gretz N, Bowey S. Interaction of heparin with positively charged dialysis membranes allows heparin-free dialysis. (Abstract). *ASAIO J* 1994; 23:78.
- [23] Notohamprodjo M, Andrassy K, Bommer J, Ritz E. Dialysis membranes and coagulation system. *Blood purify* 1986; 4:130-41.
- [24] Boldt J, Zickmann B, Benson M, Dapper F, Hempelmann G, Schindler E: Does platelet size correlate with function in patients undergoing cardiac surgery? *Intensive Care Medicine* 1993; 19: 44-7.
- [25] Oliver WC, Nuttal GA. The effect of cardiopulmonary by-pass on platelet function. *Thromb. haemost.* 1997; 78: 59-81.
- [26] Cases A, Reverter JC, Escolar G, Sanz C, Sorribes J. in vivo evaluation of platelet activation by different cellulosic membranes. *Artif. Organs* 1997; 21: 330-4.
- [27] Verbeelen D, Jochmans K, Herman AG, Van der Niepern P, Sennesael J, De Waele M. Evaluation of platelets and hemostasis during hemodialysis with six different membranes. *Nephron.* 1991; 59: 567-72.
- [28] Matsuda T: Biological responses at non-physiological interfaces and molecular design of biocompatible surfaces. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1989; 4 (suppl 3): S60-6.
- [29] Yoshida E, Fujimura Y, Ikeda Y, et al. Impaired high-shear-stress induced platelet aggregation in patients with chronic renal failure undergoing haemodialysis. *Br. J. Haematol.* 1995; 89: 861-7.
- [30] Wallace JM, Freeburn JC, Gilmore WS, Sinnamon DG, Craig BM, McNally RJ, et al. The assessment of platelet derived growth factor concentration in post myocardial infarction and stable angina patients. *Ann. Clin. Biochem.* 1998; 35 (pt 2): 236-41.
- [31] Caplice NM, Aroney CN, Bett JH, et al. Growth factors release into the coronary circulation after vascular injury promote proliferation of human vascular smooth muscle cells in culture. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1997; 29 (7): 1536-1541.
- [32] Myllarniemi M, Calderoni L, Lemstrom K, Buchdunger E, Hayry P. Inhibition of platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase inhibits vascular smooth muscle cells migration and proliferation. *FASEB J* 1997; 11(13): 1119-26.