

Alterazioni ematologiche nelle nefropatie

M. Golato^a, B. Biasioli^b, D. D'Alonzo^c, M. Liani^d, A. Pedrotta^a, P. Staffolani^e

^aDipartimento di Patologia Clinica, Ospedale "F. Renzetti" Lanciano, ASL 02, Chieti

^bDipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliero-Universitaria "Ospedali Riuniti", Trieste

^cIstituto Mario Negri Sud, Santa Maria Imbaro (CH)

^dU.O. Nefrologia e Dialisi, Ospedale "S. Massimo", ASL di Pescara

^eU.O. Patologia Clinica, Ospedale Mazzoni, Ascoli Piceno

Riassunto

L'anemia, le anomalie anatomiche e funzionali dei globuli bianchi responsabili dell'aumentata suscettibilità alle infezioni e la diatesi emorragica conseguente alle disfunzioni piastriniche, sono le alterazioni ematologiche di più frequente riscontro nei pazienti nefropatici. Nell'eziologia multifattoriale dei disordini, sono coinvolti sia l'ambiente uremico sia il processo dialitico cui sono necessariamente sottoposti i pazienti. L'insorgenza dell'anemia è principalmente dovuta alla ridotta produzione di eritropoietina (EPO), ormone responsabile della maturazione dei precursori eritroidi in eritrociti maturi. L'ipoplasia eritroide è complicata dall'aumento della concentrazione di alcune citochine, tra le quali interleuchina-1 (IL-1) e interleuchina-6 (IL-6) che inibiscono la proliferazione e la maturazione dei precursori eritroidi e stimolano una maggiore produzione di epcidina responsabile della riduzione dell'assorbimento di ferro. L'introduzione della terapia con eritropoietina ricombinante umana (rHuEPO) ha permesso di correggere l'anemia evitando ai pazienti le continue trasfusioni; tra gli effetti indesiderati vi è l'aumento del rischio trombotico e, in rari casi, lo sviluppo di autoanticorpi contro l'eritropoietina con conseguente aplasia dei precursori della serie rossa. L'aumentata

attività eritropoietica determinata dal trattamento con rHuEPO, può condurre a un esaurimento delle riserve di ferro mentre l'infiammazione cronica, causa e processo di accompagnamento della nefropatia, può causarne una ridotta mobilitazione dai depositi, motivo per il quale diventa necessario somministrare ferro ai pazienti in terapia e monitorarne il turn-over mediante markers biochimici diretti (contenuto reticolocitario di emoglobina e percentuale di reticolociti ipocromici) e indiretti (ferritina sierica, saturazione percentuale della transferrina). La diatesi emorragica e la tendenza al verificarsi di fenomeni trombotici, la riduzione della chemiotassi con aumento della suscettibilità alle infezioni vede coinvolte le anomalie funzionali nelle glicoproteine piastriniche di membrana GPIIb/IIIa e leucocitarie MAC-1 e LAM-1. Le tossine uremiche, l'infiammazione, l'utilizzo delle membrane dialitiche comportano alterazioni funzionali e attivazione anche dei monociti con conseguente aumento della concentrazione plasmatica di IL-1 e del fattore di necrosi tumorale (TNF). I trattamenti dialitici possono poi determinare alterazione della funzionalità delle cellule del sangue con variabilità correlata alle caratteristiche del paziente e all'interazione con la membrana dialitica.

Summary

Hematologic abnormalities in kidney disease

Anaemia, white blood cell anomalies and platelet dysfunctions are the haematological anomalies more common found in patients with chronic kidney diseases. Both the uraemic environment and the dialysis process, to which the patients are necessarily subjected, are involved in the multifactorial aetiology of the disorders. The onset of anaemia is mainly due to the reduced production of erythropoietin (EPO), the hormone responsible for the blo-

od cell maturation from red blood cell precursors. Red cell hypoplasia is complicated by the increased concentration of several cytokines such as interleukin 1 (IL-1) and interleukin 6 (IL-6), which inhibit the immature precursors maturation and stimulate a larger hepcidin production responsible for the reduced iron absorption. Recombinant Human Erythropoietin (rHuEPO) introduction has allowed the correction of anaemia avoiding to the patients the continuous blood transfusion; increased thrombotic risk is one of the adverse effects and the development of auto-anti-

body against erythropoietin and red cell aplasia (PRCA) is another unusual adverse effect. The increased erythropoietic activity, produced by rHuEPO treatment, may lead to iron stores depletion whereas the chronic inflammation, cause and accompanying process of kidney disease, may cause a reduced iron mobilization from the deposits, hence it is necessary to give iron supplement to patients during the treatment and it is necessary to evaluate the iron status throughout direct hematologic markers (haemoglobin content of reticulocytes, percent hypochromic reticulocytes) and indirect biochemical markers (serum ferritin, transferrin saturation ratio). Haemorrhagic diathesis and the tendency of the thrombotic phenomenons to happens, reduced chemotaxis with a greater infections suscep-

tibility has implicated functional anomalies in the platelets membrane glycoproteins GPIb and GPIIb/IIIa and MAC-1 and LAM-1 of white blood cells. The uremic toxins, inflammation, the utilization of dialysis membranes involve monocytes functional alteration and activation followed by increased plasmic levels of IL-1 and Tumor Necrosis Factor (TNF). Afterwards the dialysis treatments may produce an altered blood cells functionality with a variability linked to the characteristic of the patient with chronic kidney disease and to interaction with the dialysis membrane.

Key-words: Kidney Disease, Erythropoietin, Dialysis, Ferritin, Glycoprotein Ib (GpIb), Glycoprotein IIb/IIIa (GpIIbIIIa), Chemotaxis.

Introduzione

L'anemia, alterazione ematologica di più frequente riscontro nei pazienti con nefropatie, è associata a patologia cardiovascolare, con aumentata prevalenza di mortalità e morbilità; caratteristiche dei pazienti con insufficienza renale sono anche la maggiore suscettibilità alle infezioni per anomalie anatomiche e funzionali dei globuli bianchi e la diatesi emorragica da disfunzioni piastriniche e deficit coagulativi.

Lo stato anemico è definito da una riduzione del 20% della concentrazione media normale di emoglobina (Hb) per età e sesso, o da valori di Hb <11 g/dl nei due sessi, prima della pubertà e nelle donne in età fertile e da valori di Hb <12 g/dl nei maschi adulti e nelle donne in menopausa^{1,2}.

L'anemia è tipicamente normocromica e normocitica, è presente fin dalle prime fasi dell'insufficienza renale e si presenta con una severità correlata alla gravità della nefropatia.

In presenza di deficit di ferro, accumulo di alluminio, emoglobinopatie può manifestarsi anche una microcitosi. Una macrocitosi, all'esame emocromocitometrico può indicare, invece, deficit di folati o di vitamina B12, eccesso di ferro, e immissione in circolo di globuli rossi a maggior volume in pazienti trattati con rHuEPO^{2,3}. Una conta reticolocitaria elevata può rivelare un'attività emolitica in atto (sindrome emolitica uremica).

Differenti studi^{4,5}, condotti su pazienti affetti da disfunzione renale di diverso grado, hanno dimostrato proporzionalità diretta tra gravità del danno glomerulare e diminuzione dell'ematocrito.

Concorrono alla gravità dell'anemia, attraverso la riduzione della vita media degli eritrociti, le frequenti procedure chirurgiche, la ritenzione di sangue nel circuito dialitico, le complicanze emorragiche dagli accessi vascolari della dialisi, le emorragie gastrointestinali da aumentata fragilità capillare, l'emodiluizione nei pazienti con scarsa compliance alla terapia diuretica e il deficit di acido folico secondario alla malnutrizione. Inoltre nei pazienti in trattamento dialitico, la rimozione o la diffusione di sostanze nel circolo ematico, secondo la tipologia di tecnica applicata, condizionano positivamente o negativamente il quadro clinico.

Le tossine uremiche e la perossidazione lipidica delle membrane cellulari acuitizzata dalla carenza di antiossidanti, sono alla base delle alterazioni morfologiche degli eritrociti con formazione di echinociti che possono contribuire alla distruzione anticipata delle cellule da parte del sistema reticolo-istiocitario, particolarmente durante il passaggio nella milza⁶.

L'eziologia dell'anemia è quindi multifattoriale anche se il ruolo principale è da attribuire alla ridotta produzione di EPO con conseguente stimolazione midollare inefficace e diminuita risposta nella produzione eritropoietica.

L'eritropoietina: funzioni e meccanismo d'azione

L'eritropoietina, identificata per la prima volta nel 1977, da Miyake⁷ è l'ormone che svolge un ruolo basilare nello sviluppo, produzione e differenziazione degli eritrociti.

Le Unità eritroidi formanti Burst denominate BFU-E, sono i primissimi tipi cellulari indirizzati verso la maturazione eritrocitaria⁸, contengono solo una piccola quantità di GATA-1, fattore di trascrizione della linea eritroide. La progressione di BFU-E, mediata da interferone-1 (IF-1) e interleuchina 3 (IL-3), in Unità Formanti le Colonie Eritroidi (CFU-E), a più alta concentrazione di GATA, avviene con perdita di recettori per le citochine menzionate e acquisizione sia di un maggior numero di recettori per EPO che di marker fenotipici caratteristici di eritrociti maturi (gruppi sanguigni e antigeni Rh)⁹. Il processo consiste in un gradiente continuo di maturazione con espressione progressiva di marker immunologici fenotipici fino alla formazione di reticolociti ed eritrociti che non presentano più i recettori per EPO.

Durante la vita fetale l'EPO è prodotta principalmente nel fegato e dopo la nascita nelle cellule endoteliali peritubulari prossimali del rene. In condizioni fisiologiche la produzione dell'EPO è regolata dalla concentrazione di Hb e dall'ossigenazione cellulare tramite il fattore 1 dell'ipossia (HIF-1), complesso formato dall'eterodimero $\alpha\beta$ che, in presenza di bassa concentrazione ematica di O₂, stimola l'attivazione dei geni dell'EPO con successiva trascrizione e traduzione del RNA. L'EPO esplica la sua attività legandosi a un recettore specifico, una proteina transmembrana di 55-kd che appartiene alla superfamiglia dei recettori di

citochine espressa sui precursori eritroidi^{10,11}.

Il punto chiave per la produzione degli eritrociti è il legame tra EPO ed il recettore delle membrane delle cellule CFU-E. Il legame comporta una modifica conformazionale che attiva una cascata di segnali di trasduzione coinvolgente Janus-chinasi 2 (JAK2) con la fosforilazione di STAT 5, mediatore di segnali intracellulari, e la trascrizione dei geni inducenti la mitosi, differenziazione e sopravvivenza dei precursori eritroidi, in particolare di CFU-E.

Nei pazienti con nefropatie, alla carenza di EPO fa seguito una ridotta attività eritropoietica midollare e rapida apoptosi dei precursori eritroidi con conseguente insufficienza della risposta midollare, peggiorata dalla fibrosi correlata all'innalzamento del Paratormone (PTH) e al sovraccarico di alluminio dovuto ai trattamenti dialitici.

L'infiammazione cronica, inducendo ipoplasia eritroide, peggiora il quadro dell'anemia. Gli incrementi di IL1, IL-6, Tumor Necrosis Factor (TNF), Interferone- γ (IFN- γ) riducono, infatti, produzione, proliferazione, maturazione e differenziazione dei precursori eritroidi BFU-E. In particolare il TNF- α e la IL-1 inibiscono la sintesi di EPO e IFN- γ riduce l'espressione del recettore per l'EPO sulle cellule progenitrici eritroidi (CFU-E)¹². Le citochine inoltre inibiscono l'attività proliferativa midollare sia direttamente che tramite la formazione di radicali liberi¹³.

L'aumento delle IL-1 e IL-6, incrementa la sintesi epatica di epcidina che concorre, tramite un'inibizione dell'assorbimento del ferro, alla riduzione della risposta midollare.

L'epcidina, uno dei principali regolatori dell'omeostasi del metabolismo del ferro, ne inibisce l'assorbimento intestinale da parte degli enterociti e il rilascio da parte dei macrofagi. La sovraespressione di epcidina, la cui sintesi è regolata sia dalla flogosi che dalle riserve di ferro determina lo sviluppo di anemia per blocco dell'esportazione del ferro nella circolazione¹⁴.

L'eritropoietina ricombinante e la carenza di ferro

Una problematica rilevante nei pazienti nefropatici è il trattamento dell'anemia. Prima degli anni '80 il presidio terapeutico d'elezione era costituito dalle trasfusioni, con i connessi rischi di trasmissione di infezioni, sovraccarico di ferro, sensibilizzazione nei confronti degli antigeni di incompatibilità.

Nel 1986, la clonazione del gene e la possibilità di sintesi dell'EPO tramite ricombinazione genica di agenti eritropoietici, hanno permesso la produzione di rHuEPO che si è rivelata un importante presidio farmacologico dell'anemia.

Le aspettative legate alla terapia con rHuEPO sono state in parte disattese, poiché prolungati trattamenti hanno evidenziato effetti collaterali quali l'incremento del rischio trombotico e tumorale ed hanno reso indispensabile la rivalutazione dei dosaggi terapeutici.

Inoltre l'osservazione di maggior incidenza di eventi cardiovascolari conseguenti alla terapia e correlati all'aumento dell'Hb, ha orientato diversi studi all'individuazione dei valori ottimali di Hb atti a evitare le complicanze¹⁵⁻¹⁸. Nel corso degli anni, sono state sviluppate più linee guida per indicare i valori target di Hb; la più recente, l'European Best

Practice Guidelines (ERBP 2009), individua la concentrazione ottimale di 11-12 g/dL e raccomanda di non superare intenzionalmente i 13 g/dL¹⁹.

Nella valutazione dell'outcome clinico e della qualità di vita dei pazienti è importante considerare, oltre al target di Hb, il rischio di una ridotta risposta alla terapia con rHuEPO di cui l'eritropoiesi ferro-carente è la causa più frequente, infatti, si riscontra nel 60-80% dei pazienti in trattamento. L'utilizzo di rHu-EPO, induce spiccato aumento dell'attività eritropoietica e conseguente maggior richiesta di ferro da parte del midollo osseo; indispensabile per una risposta efficace è l'integrazione della terapia rHu-EPO con trattamento marziale per evitare il rischio di carenza di ferro che può essere funzionale, se è assente nelle sedi di utilizzo per ridotta mobilizzazione dai depositi, o assoluta, se la deplezione riguarda tutti i distretti e sono diminuite anche le riserve.

Anche il trattamento dialitico e l'infiammazione contribuiscono alla riduzione della transferrina circolante e del rilascio del ferro da parte del sistema reticolo-endoteliale con ulteriore inibizione dell'attività midollare. È fondamentale monitorare gli indici ematologici del ferro al fine di evitare il rischio di sovraccarico, possibile complicanza della terapia marziale per via endovenosa, che acuisce i danni dell'uremia e della dialisi provocando formazione di radicali liberi, perossidazione delle membrane lipidiche, e ulteriore compromissione sistemica. L'accurata identificazione di possibili beneficiari della integrazione marziale ha implicazioni cliniche ed economiche poiché consente una migliore risposta midollare allo stimolo dell'EPO ed evita i rischi a breve ed a lungo termine, associati agli eccessi di terapia.

La valutazione del Laboratorio

Il test ancora oggi considerato il gold standard di riferimento per la valutazione delle riserve di ferro, è l'esame dell'aspirato midollare con colorazione di Perls, che tuttavia presenta il limite di essere un test invasivo e doloroso e quindi va effettuato solo in casi selezionati. Le ultime linee guida europee (EBPG) ed americane KDOQI (Kidney Disease Outcome Quality Initiative) indicano, per la valutazione della carenza e del sovraccarico di ferro, nei pazienti nefropatici in emodialisi, l'utilizzo sia dei parametri biochimici indiretti, sia di indici ematologici diretti^{20,21}. Sono inclusi tra i primi, il dosaggio della ferritina sierica e la percentuale di saturazione della transferrina (TSAT⁰); tra quelli ematologici diretti, il valore di Hb <11 o 12 g/dl (in riferimento a sesso ed età), il contenuto emoglobinico medio reticolocitario (CHR) e la percentuale di eritrociti ipocromici con concentrazione cellulare emoglobinica inferiore a 280 g/L (%HYPO). Le linee guida americane discordano, rispetto alle europee, sull'inclusione di quest'ultimo parametro, che, se pur sensibile per predire la carenza di ferro, è inficiato dal tempo trascorso tra prelievo ematico e analisi con variabilità dei valori misurati: incremento del volume globulare e riduzione di concentrazione di Hb e dei valori di %HYPO, non dipendenti dalla patologia. I criteri per la diagnosi di carenza di ferro nei nefropatici sono diversi da quelli utilizzati nei soggetti con funzionalità renale fisiologica. La probabilità di un deficit di ferro è considerata sufficientemente elevata se TSAT \leq 20%, ferritina

≤ 100 ng/mL, %HYPO $> 10\%$ (valori fisiologici $< 2.5\%$ delle cellule circolanti) ed i valori CHR ≤ 29 pg. Le linee guida concordano sui valori del parametro di TSAT%, in cui iniziare il trattamento per una risposta midollare efficace. Le KDOQI differiscono dalle EBPG, per i valori della ferritina, raccomandando per la carenza di ferro, misure ≤ 200 ng/mL, piuttosto che ≤ 100 ng/mL. Un'altra discordanza è sui valori soglia di ferritina in cui cessare o non integrare la terapia marziale, per evitare il rischio di sovraccarico di ferro²¹⁻²⁴. Si considera comunque che non vi sia indicazione alla terapia marziale solo se la ferritina è ≥ 800 ng/mL e TSAT $\geq 50\%$ mentre è probabile un deficit funzionale di ferro in pazienti che richiedono, per il trattamento dell'anemia, dosi elevate di rHuEPO, nonostante valori di TSAT $\geq 20\%$ ²¹. I limiti delle informazioni deducibili dal dosaggio della ferritina sono legati al fatto che i livelli sierici non sono solo correlati alle riserve di ferro ma anche alla presenza di processi infiammatori²¹⁻²³. La ferritina è, infatti, anche una proteina della fase acuta e la sua sintesi è stimolata dalle citochine infiammatorie, aumentate nell'insufficienza renale sia per la malattia di base che per le complicanze ad essa associate; ne consegue che valori elevati possono non essere indicativi solo del sovraccarico di ferro, ma devono essere valutati insieme ad altri indicatori ed alla fase della malattia. Valori bassi, ≤ 100 ng/mL di ferritina, hanno una più alta specificità nell'indicare la carenza assoluta. La TSAT% presenta una migliore sensibilità rispetto alla ferritina come indicatore di deficit di ferro: il limite è rappresentato dal fatto che la valutazione della capacità totale di legare il ferro, su cui si basa il calcolo di TSAT%, può essere inficiata da una riduzione per malnutrizione e/o infiammazione. Tra gli indici ematologici diretti, secondo studi^{23,24} più recenti, valori di HYPO $> 6\%$, presentano efficienza diagnostica maggiore nell'identificazione dei pazienti che, se trattati con terapia marziale per via endovenosa, rispondono in modo ottimale. Inoltre, la combinazione di HYPO $> 6\%$ con CHR ≤ 29 pg è più efficace nel rilevare la carenza di ferro, con netto miglioramento nella sensibilità rispetto al solo %HYPO: ciò suggerisce che i due test, eseguiti simultaneamente, possono essere considerati complementari. Il parametro %HYPO consente una valutazione della qualità dell'eritropoiesi midollare a lungo termine ed è un utile indicatore del fabbisogno cronico di ferro, mentre il parametro CHR riflette in tempo reale la qualità dell'eritropoiesi midollare²² permettendo una valutazione precoce sia della risposta alla terapia marziale sia del deficit funzionale di ferro. È possibile valutare %HYPO e CHR con i sistemi analitici ADVIA 120 o 2120 (Siemens) e, recentemente, con XE-5000 (Sysmex) in cui il contenuto di reticolociti è rilevato dal parametro RET-He (equivalente emoglobinico reticolocitario) e la percentuale di eritrociti ipocromici, dal parametro Hypo-He, (emazie con contenuto emoglobinico cellulare inferiore a 17 pg). I test eseguiti con entrambe le tecnologie sono sovrapponibili come significato diagnostico^{15,23,24}. Recenti studi hanno valutato il dosaggio dell'epcidina, in pazienti in emodialisi trattati con rHuEPO, come un nuovo biomarcatore dell'eritropoiesi ferro-carente ma limitato nel predire la risposta alla terapia marziale endovenosa^{25,26}. Sebbene nessun test sia un perfetto indicatore dello stato del ferro, la TSAT%, la ferritina, %HYPO, CHR, Ret-He e

Hypo-He sono ritenuti i test attualmente più efficaci. Altra causa da considerare, nei casi di una inefficiente risposta midollare al trattamento con rHuEPO è l'aplasia delle cellule della serie rossa (PRCA). È una forma rara e grave di anemia trasfusione-dipendente che si sviluppa in alcuni individui sotto terapia con rHuEPO per comparsa di anticorpi anti EPO. La PRCA, secondo le linee guida europee, può essere sospettata se, in pazienti trattati da più di 4 settimane con rHuEPO, si ha una rapida diminuzione di Hb, di circa 1 gr/dl a settimana, o che, per mantenere il livello di Hb, necessitano di trasfusioni di 1-2 unità di globuli rossi per settimana. La PRCA, inoltre, è accompagnata anche da riduzione di reticolociti²⁷; lo studio del midollo, tramite agoaspirato, è utile per evidenziare, in una cellularità fisiologica, una ridotta percentuale di eritroblasti, con valori inferiori al 5%; anche i dosaggi dei livelli di EPO sierica sono elevati e può essere rilevata la presenza di anticorpi anti EPO²⁸.

Le piastrine e l'uremia

È noto che il paziente uremico in dialisi presenta diatesi emorragica e contemporanea presenza di uno stato protrombotico.

Le più frequenti manifestazioni emorragiche comprendono le ecchimosi e l'epistassi che riconoscono una patogenesi multifattoriale in cui sono coinvolte l'attivazione piastrinica, le interazioni piastrine-pareti vasali e le interazioni inter-piastriniche. Le diverse cause comprendono le terapie farmacologiche in atto, in particolare il trattamento con rHuEPO, e le tecniche dialitiche utilizzate. L'attivazione piastrinica con l'alterata funzionalità sono alla base delle complicanze che si verificano durante i trattamenti utilizzati nei pazienti uremici.

Il ruolo patogenetico principale dell'alterata bilancia emostatica è da ricondursi ad una disfunzione delle glicoproteine piastriniche GPIb e GPIIb/IIIa, fondamentali nella riparazione della lesione vasale: GPIb, recettore per il fattore di von Willebrand responsabile dell'adesione piastrinica alle pareti vascolari; GPIIb/IIIa, recettore per il fibrinogeno, responsabile dell'aggregazione piastrinica tramite formazione di ponti tra piastrine adiacenti con legame diretto fibrinogeno-molecola recettoriale²⁹⁻³³.

Nelle piastrine non attivate l'espressione di GPIb è ridotta ed è correlata al grado di gravità dell'insufficienza renale. I meccanismi patogenetici sono molteplici: dal difetto della sintesi proteica con conseguente riduzione del numero di recettori GPIb espressi sulla membrana, alla perdita di recettori di membrana per proteolisi da plasmina e da trombina ed evidenziabile dall'aumento sierico della Glicocalicina solubile; concorrono l'aumento di piastrine senescenti, con alterazioni strutturali e perdita di membrana e di granuli alfa, e la presenza di tossine uremiche.

Nelle piastrine attivate, invece, GPIb è iperespressa in quanto, nei pazienti in emodialisi, le disfunzioni del citoscheletro bloccano la traslocazione nel sistema canalicolare. Per contro, nei nefropatici che non effettuano terapie dialitiche o nei soggetti sani, la corretta funzionalità del citoscheletro delle piastrine consente la stimolazione e la traslocazione del recettore nel sistema canalicolare con conseguente riduzione sulla superficie della membrana.

Anche il recettore GPIIb/IIIa presenta alterata funzio-

nalità soprattutto nelle piastrine attivate in cui si rileva riduzione dell'espressione causata sia da difetto funzionale dei granuli alfa che da occupazione del recettore da parte di frammenti di fibrinogeno e/o tossine uremiche; la dialisi migliora la funzionalità piastrinica anche attraverso la rimozione di tali sostanze. Nei pazienti con insufficienza renale cronica o in emodialisi e con piastrine non attivate non si evidenziano variazioni.

L'effetto pro-trombotico del trattamento con rHuE-PO è determinato da disfunzioni recettoriali con iperfunzionalità di GPIIb/IIIa, in particolare negli accessi vascolari, iperfunzionalità dimostrabile anche in vitro con un incremento dell'aggregabilità piastrinica^{29,30}. La maggiore aggregazione piastrinica è associata ad aumentata sintesi di ossido nitrico (NO), per l'effetto di citochine quali il TNF- α e IL- β ³¹⁻³⁴; è invece ridotto il contenuto dei granuli densi con diminuzione di ADP piastrinico e di serotonina.

Nelle piastrine uremiche, anche in presenza di contenuto aumentato, è alterata la mobilitazione del Calcio in risposta agli stimoli³²⁻³⁵. Per ripristinare tale mobilitazione è somministrata aspirina che, però, rappresenta un ulteriore fattore di rischio emorragico nei pazienti uremici mentre i trattamenti dialitici, che invece attivano le piastrine, aumentano il rischio trombotico.

L'alterazione della funzionalità è evidenziabile in vitro attraverso lo studio dell'aggregabilità, dell'adesività piastrinica. I markers fenotipici di superficie possono essere evidenziati con tecniche citofluorimetriche tramite l'utilizzo di anticorpi monoclonali marcati con isotiocianato di fluoresceina o ficoeritrina, in particolare il 42b per lo studio del recettore GPIIb e l'anticorpo monoclonale 41a per il recettore GPIIb/IIIa, mentre l'anticorpo monoclonale CD 61 è usato per il gating immunologico³⁶.

L'esame emocromocitometrico rileva un numero di piastrine spesso nei limiti fisiologici nei pazienti non dializzati; durante la dialisi, invece, i conteggi piastrinici sono alterati.

I globuli bianchi e l'uremia

L'uremia è associata ad immunodeficienza acquisita (umorale e cellulare) e ad aumentata suscettibilità alle infezioni; in particolare, le numerose infezioni batteriche che peggiorano la fase finale dell'insufficienza renale sono da attribuire soprattutto alla disfunzione dei polimorfonucleati (PMN). La patogenesi della ridotta funzionalità dei Globuli bianchi è multifattoriale: concorrono la malnutrizione, il sovraccarico di ferro, le tossine uremiche, elevati livelli di calcio intracellulare e la carenza di zinco. Nei pazienti uremici si ha accumulo di tossine ematiche con riduzione della chemiotassi leucocitaria³⁷; riduzione correlata alla diminuzione del rapporto intracellulare GMPciclico/AMPciclico e al blocco dei recettori di membrana dei granulociti. Si è osservato che i polimorfonucleati incubati per 24 ore con plasma proveniente da pazienti uremici sono indirizzati verso l'apoptosi in correlazione diretta con la riduzione della funzionalità citoscheletrica, della degranolazione, del burst respiratorio. La fagocitosi con produzione di radicali liberi dà l'avvio all'apoptosi dei PNM; se ne osserva un incremento nei pazienti in predialisi. L'emodialisi e la dialisi peritoneale correggono la disfunzione dei neutrofilii riducendo la tendenza indotta dalle tossine uremiche verso la morte programmata. L'emodialisi ha un profondo ef-

fetto sulla cinetica dei granulociti: durante le prime due ore di emodialisi si rileva, all'esame emocromocitometrico, neutropenia periferica dovuta sia all'attivazione del complemento sulla membrana di dialisi che al sequestro di granulociti nel polmone; nella fase successiva si ha una neutrofilia di rimbalzo dovuta al rilascio dei PMN dalle riserve midollari e al recupero dai siti di sequestro, mentre l'attività chemiotattica dei granulociti diminuisce ulteriormente.

Le diverse tecniche dialitiche influenzano in modo differente le glicoproteine recettoriali trans-membrana dei neutrofilii, glicoproteine fondamentali per la diapedesi che avviene tramite ligandi sulle cellule endoteliali. I recettori maggiormente coinvolti sono MAC-1, un integrina espressa principalmente sui granulociti e sui macrofagi, recettore per C3b1 coinvolto nell'adesione dei globuli bianchi alle membrane di dialisi³⁸; un'altra integrina è LAM-1 che si libera durante l'attivazione leucocitaria da fattori chemiotattici.

Le tossine uremiche, l'infiammazione e le tecniche dialitiche coinvolgono anche la funzionalità dei monociti attraverso l'attivazione del complemento. Una delle conseguenze della disfunzione dei monociti è l'incapacità di inviare i segnali ai linfociti T necessari per la sintesi di IL-2 provocando, nei pazienti uremici, una forma acquisita di immunodeficienza caratterizzata da anomala proliferazione di linfociti T in risposta all'attivazione antigenica³⁷.

Le membrane dialitiche

I trattamenti dialitici possono determinare alterazione della funzionalità delle cellule del sangue con variabilità correlata alle caratteristiche del paziente ed all'interazione con la membrana dialitica. Fattori capaci di influenzare il grado di attivazione delle piastrine, dei fattori della coagulazione, del complemento e dei granulociti sono le tecniche dialitiche utilizzate, la biocompatibilità della membrana e, soprattutto, la velocità di flusso attraverso la membrana artificiale e la superficie della stessa.

Come documentato anche da risultati ottenuti da recenti studi eseguiti in nefropazienti trattati con entrambe le tecniche, l'emodialisi e la peritoneodialisi hanno un impatto differente sull'espressione dei recettori piastrinici; in particolare, nel caso della peritoneodialisi si verifica la normalizzazione dell'espressività del recettore piastrinico di superficie GPIIb/IIIa, mentre nel caso dell'emodialisi l'espressività rimane elevata sia negli uremici adulti ($P < 0.01$) che nei pediatrici ($P < 0.01$)³⁰. L'alterazione dei recettori, in particolare del GPIIb/IIIa specifico per il fibrinogeno, provoca effetti clinici rilevanti; GPIIb/IIIa, punto cardine nel meccanismo dell'aggregazione piastrinica, può comportare una minore o maggiore tendenza trombofilica e aterogena³⁰.

La membrana dialitica provoca aumentata adesione delle piastrine immature reticolate (IPF) a più alto contenuto in RNA, perché biologicamente più attive; consegue, nel sangue circolante prevalenza delle piastrine più mature a volume ridotto (MPV, PDW). Anche l'attività megacariocitopoietica è diminuita durante il ciclo dialitico³⁸.

Studi recenti³³ evidenziano che tecniche e membrane dialitiche differenti determinano effetti diversi in virtù dell'impatto prodotto sull'espressività dei recettori piastrinici, secondo le caratteristiche di biocompatibilità; in particola-

re la membrana dialitica polisulfone (PSN) induce una riduzione dell'espressività del recettore GPIIb/IIIa. Le dialisi con membrane di cellulosa inducono, con diversi meccanismi patogenetici, alterazioni anche carico dei globuli bianchi. Durante l'emodialisi con cuprophane, si verifica una grave granulocitopenia con incremento dell'espressione di superficie di Mac-1, espressione che rimane elevata anche quando il numero dei granulociti neutrofili torna a valori fisiologici. Per contro l'utilizzo di membrane in emofane o in polisulfone riduce l'espressione di Mac-1. All'inizio della dialisi con membrane di cellulosa, l'attivazione del complemento stimola Mac-1 con maggiore liberazione di LAM-1 e incremento dell'adesione cellulare, sequestro e perdita della capacità dei leucociti di trasmigrare ai siti d'infezione. L'aumentata suscettibilità alle infezioni nei pazienti dializzati presenta maggior incidenza nei pazienti trattati con cuprophane rispetto a quelli trattati con polisulfone³⁹. I monociti subiscono un'importante attivazione, che si ripercuote sull'outcome clinico, ad opera delle tecniche dialitiche: fondamentali risultano alcuni componenti del tampone di dialisi come l'acetato, le contaminazioni batteriche e da endotossine, il contatto diretto tra monociti e membrane da dialisi⁴⁰. Infatti, i livelli plasmatici di IL-1 e del TNF subiscono, durante l'emodialisi, un aumento transitorio dovuto ad interazione dei monociti con le membrane di dialisi. Di conseguenza IL-1 e TNF stimolano il metabolismo cellulare con aumento dell'espressione di geni codificanti proteine biologicamente attive, aumentata suscettibilità alle infezioni, immuno-disfunzione e arteriosclerosi⁴²⁻⁴⁴.

Bibliografia

- Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens J, Lukens JN. Appendix A. In: Wintrobe's Clinical Hematology, 9th ed, Philadelphia, PA: Lea & Febiger; 1993. p. 2303.
- Brancaccio D, Canavese C, Carozzi S, Cianciaruso B, Panzetta G, Piccoli A. Linee Guida per il trattamento dell'anemia nell'insufficienza renale. *Giornale Italiano di Nefrologia* 2003; 20(Suppl):S61-S82.
- Schaefer RM, Schaefer L. The hypochromic red cell: a new parameter for monitoring of iron supplementation during rHE-PO therapy. *J Perinat Med* 1995; 23:83-8.
- Obrador GT, Ruthazer R, Arora P, Kausz AT, Pereira BJ. Prevalence of and factors associated with suboptimal care before initiation of dialysis in the United States. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:1793-800.
- Kausz AT, Khan SS, Abichandani R, Kazmi WH, Obrador GT, Ruthazer R, et al. Management of patients with chronic renal insufficiency in the Northeastern United States. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:1501-7.
- Cavdar C, Camsari T, Semin I, Gönenc S, Acikgöz O. Lipid peroxidation and antioxidant activity in chronic haemodialysis patients treated with recombinant human erythropoietin. *Scand J Urol Nephrol* 1997; 31:371-5.
- Miyake T, Kung CK, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 1977; 252:5558-64.
- Suzuki N, Suwabe N, Ohneda O, Obara N, Imagawa S, Pan X, et al. Identification and characterization of 2 types of erythroid progenitors that express GATA-1 at distinct levels. *Blood* 2003; 102:3575-83.
- Broudy VC, Lin N, Brice M, Nakamoto B, Papayannopoulou T. Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. *Blood* 1991; 77:2583-90.
- Loeffler M, Herkenrath P, Wichmann HE, Lord BI, Murphy MJ Jr. The kinetics of hematopoietic stem cells during and after hypoxia. *Blut* 1984; 49:427-39.
- Caro J, Schuster S, Besarab A. Renal Biogenesis of erythropoietin. In: Rich IN, ed. *Molecular and cellular Aspects of Erythropoietin and Erythropoiesis*. NATO ASI Series vol H8. Heidelberg Germany: Springer-Verlag; 1987. p.329.
- Spivak JL. The blood in systemic disorders. *Lancet* 2000; 355:1707-12.
- Samouliou EC, Grapsa EJ, Kakavas I, Lagouranis A, Agriannidis B. Oxidative stress markers and C-reactive protein in end-stage renal failure patients on dialysis. *Int Urol Nephrol* 2003; 35:393-7. Erratum in: *Int Urol Nephrol* 2007; 39: 1323-4.
- Andrews NC. Anemia of inflammation: the cytokine-hepcidin link. *J Clin Invest* 2004; 113:1251-3.
- Tessitore N, Girelli D, Campostri N, Bedogna V, Pietro Solero G, Castagna A, et al. Heparin is not useful as a biomarker for iron needs in haemodialysis patients on maintenance erythropoiesis-stimulating agents. *Nephrol Dial Transplant* 2010;1-7. Epub ahead of print.
- Singh AK, Szczech L, Tang KL, Barnhart H, Sapp S, Wolfson M, et al.; CHOIR Investigators. Correction of anemia with epoetin alfa in chronic kidney disease. *N Engl J Med* 2006; 355:2085-98.
- Drüeke TB, Locatelli F, Clyne N, Eckardt KU, Macdougall IC, Tsakiris D, et al.; CREATE Investigators. Normalization of hemoglobin level in patients with chronic kidney disease and anemia. *N Engl J Med* 2006; 355:2071-84.
- Strippoli GF, Craig JC, Manno C, Schena FP. Hemoglobin targets for the anemia of chronic kidney disease: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:3154-65.
- Strippoli GF, Tognoni G, Navaneethan SD, Nicolucci A, Craig JC. Haemoglobin targets: we were wrong, time to move on. *Lancet* 2007; 369:346-50.
- Del Vecchio L. Anemia: Linee Guida a confronto. *Giornale Italiano di Nefrologia* 2009; 26:686-94.
- Fitzsimons EJ, Brock JH. The anaemia of chronic disease. *BMJ* 2001; 322:811-2.
- Schaefer RM, Schaefer L. Hypochromic red blood cells and reticulocytes. *Kidney Int Suppl* 1999; 69(Suppl):S44-8.
- Tessitore N, Solero GP, Lippi G, Bassi A, Faccini GB, Bedogna V, et al. The role of iron status markers in predicting response to intravenous iron in haemodialysis patients on maintenance erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1416-23.
- Buttarelli M, Pajola R, Novello E, Rebeschini M, Cantaro S, Oliosi F, et al. Diagnosis of iron Deficiency in Patients Undergoing hemodialysis. *Am J Clin Pathol* 2010; 133:949-54.
- Swinkels DW, Wetzels JF. Heparin: a new tool in the management of anaemia in patients with chronic kidney disease? *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23:2450-3.
- Young B, Zaritsky J. Heparin for clinicians. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4:1384-7.
- Kim JM, Ihm CH, Kim HJ. Evaluation of reticulocyte haemoglobin content as marker of iron deficiency and predictor of response to intravenous iron in haemodialysis patients. *Int J Lab Hematol* 2008; 30:46-52.
- Pollock C, Johnson DW, Hörl WH, Rossert J, Casadevall N, Schellekens H, et al. Pure red cell aplasia induced by erythropoiesis-stimulating agents. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3: 193-9.
- Konstantopoulos K, Grotta JC, Sills C, Wu KK, Hellums JD. Shear-induced platelet aggregation in normal subjects and stroke patients. *Thromb Haemost* 1995; 74:1329-34.
- Liani M, Salvati F, Golato M, Tresca E. Platelet glycoproteins

- GPIb and GPIIb/IIIa abnormalities in uremia. *Nephron* 1996; 72:716.
31. Rinder HM, Bonan JL, Rinder CS, Ault KA, Smith BR. (1991) Dynamics of leukocyte-platelet adhesion in whole blood. *Blood* 1991; 78:1730-7.
 32. Moal V, Brunet P, Dou L, Morange S, Sampol J, Berland Y. Impaired expression of glycoproteins on resting and stimulated platelets in uraemic patients. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18:1834-41.
 33. Liani M, Salvati F, Nubile G, Tresca E, Velussi C, Midrio M. Von Willebrand factor and rise in ristocetin-co-factor with erythropoietin. *Lancet* 1993; 341:1221.
 34. Noris M, Benigni A, Boccardo P, Aiello S, Gaspari F, Todeschini M, et al. Enhanced nitric oxide synthesis in uremia: implication for platelet dysfunction and dialysis hypotension. *Kidney Int* 1993; 44:445-50.
 35. Gura V, Creter D, Levi J. Elevated thrombocyte calcium content in uremia and its correction by alpha (OH) vitamin D treatment. *Nephron* 1982; 30:237-9.
 36. Golato A, Ciancaglini G, Di Luca F, Indino F, Foschini I, Liani M, et al. Effetti di una nuova membrana dialitica sui recettori piastrinici GPIb e GPIIb/IIIaM. *RIMeL / IJLaM* 2005; 1: 192-5.
 37. Lahera V, Goicoechea M, de Vinuesa SG, Oubiña P, Cachofeiro V, Gómez-Campderá F, et al. Oxidative stress in uremia: the role of anemia correction. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(Suppl 3):S174-7.
 38. Schoorl M, Schoorl M, Bartels PC. Changes in platelet volume, morphology and RNA content in subjects treated with haemodialysis. *Scand J Clin Lab Invest* 2008; 68:335-42.
 39. Hernandez MR, Palomo M, Fuste B, Carbó C, Collado S, Cases A. Effect of two different dialysis membranes on leukocyte adhesion and aggregation. *Nephron Clin Pract* 2007; 106:c1-8.
 40. Sester U, Sester M, Heine G, Kaul H, Girndt M, Köhler H. Strong depletion of CD14(+)CD16(+) monocytes during haemodialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16:1402-8.
 41. Hirahashi J, Hishikawa K, Kaname S, Tsuboi N, Wang Y, Simon DI, et al. Mac-1 (CD11b/CD18) links inflammation and thrombosis after glomerular injury. *Circulation* 2009; 120:1255-65.
 42. Pereira BJ, Dinarello CA. Production of cytokines and cytokine inhibitory proteins in patients on dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9(Suppl 2):60-71.
 43. Engelberts I, Francot GJ, Leunissen KM, Haenen B, Ceska M, van der Linden CJ, et al. Effect of hemodialysis on peripheral blood monocyte tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and interleukin-8 secretion in vitro. *Nephron* 1994; 66: 396-403.
 44. Rysz J, Banach M, Cialkowska-Rysz A, Stolarek R, Barylski M, Drozd J, et al. Blood serum levels of IL-2, IL-6, IL-8, TNF-alpha and IL-1beta in patients on maintenance hemodialysis. *Cell Mol Immunol* 2006; 3:151-4.