Effetti di una nuova membrana dialitica sui recettori piastrinici GPIb e GPIIb/IIIa

M. Golato[a], G. Ciancaglini[a], F. Di Luca[a], F. Indino[a], I. Foschini[a], M. Liani[b], E. Trabassi[b]

[a] *Patologia Clinica, P.O. Renzetti, Lanciano (CH)*
[b] *Servizio Nefrologia e Dialisi, P.O. San Massimo, Penne (PE)*

Riassunto

***Premessa*: nei pazienti con insufficienza renale cronica, la terapia emodialitica, effettuata attraverso il circuito extracorporeo, può indurre fenomeni di alterata biocompatibilità il cui grado è routinariamente valutato mediante l'aggregazione piastrinica che subisce riduzioni col progredire della malattia. Con l'emodialisi si può intervenire per migliorare il quadro, ma certo non per ripristinare la fisiologica aggregazione e adesività piastrinica; pertanto i pazienti uremici presentanno uno stato protrombotico la cui patogenesi è da ricondurre ad un'alterata espressività dei recettori piastrinici di superficie (RPS) GPIb e GPIIb/IIIa.**

***Metodi*: lo studio si prefigge di valutare gli effetti che una nuova membrana dialitica in polisulfonato (PSN) induce sui recettori piastrinici di superficie. A tale scopo sono stati impiegati anticorpi monoclonali (CD41a e CD42b) specifici per i recettori piastrinici e per la lettura è stato utilizzato il citofluorimetro Facscalibur (BD).**

***Risultati e conclusioni*: i risultati ottenuti 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 particolare la membrana dialitica PSN induce una riduzione dell'espressività del RPS GPIIb/IIIa, comparabile con gli effetti della peritoneodialisi sugli stessi recettori.**

Summary

Effect of a new membrane for haemodialysis on platelet receptors GPIb and GPIIb/IIIa.

Background: In patients with chronic renal insufficiency, the therapy with haemodialysis effected through the extracorporeal circuit can induce phenomena of abnormal biocompatibility, whose level is routinely measured through aggregation of the platelets; the aggregation self reduces as the illness progresses. Haemodialysis may improve the clinical condition, but it is not possible to renew the physiological aggregation and adhesion of the platelets. Therefore, patients with chronic renal insufficiency develop a condition of pro-thrombosis, whose pathogenesis is caused by an abnormal expression of the superficial platelet receptors (SPR) GPIb and GPIIb/IIIa. The objective of this study was to evaluate the effects of a new polysulfonate (PSN) membrane for dialysis on the SPR.

Methods: The monoclonal antibodies CD41a and CD41b were used to measure the expression of SPR on platelets after dialysis with conventional and PSN membranes. The results were read by means of Fascalibur (BD) flow cytometry.

Results and conclusions: the results show that different techniques and membranes for dialysis can produce different effects on the expression of the platelet receptors depending on the characteristics of the bio-compatibility. In particular, the membrane for dialysis in PSN induces a reduction in the expression of RPS GPIIb/IIIa, comparable with the effects of peritoneal dialysis on the same receptors.

Key words: Platelets, flow cytometry, haemodialysis, superficial platelet receptors.

Introduzione

E' noto che il paziente uremico in dialisi presenta una chiara diatesi emorragica e la contemporanea presenza di uno stato protrombotico.

La singolare contemporaneità della tendenza allo stato emorragico e procoagulante è solo in apparenza contradditoria, in quanto numerosi studi [1-5], hanno evidenziato che il punto cardine del meccanismo patogenetico della alterata bilancia emostatica nel paziente uremico è da ricondursi ad anomalie recettoriali di superficie delle piastrine: il GPIb, recettore per il fattore di von Willebrand responsabile dell'adesione piastrinica alle pareti vascolari e il GPIIb/IIIa, recettore per il fibrinogeno responsabile dell'aggregazione piastrinica tramite legame diretto fibrinogeno-molecola recettoriale [6-8]. Nei pazienti con insufficienza renale cronica, accanto ad un evidente difetto

Corrispondenza a: Dr.ssa Maria Golato, Dipartimento di Patologia Clinica, P.O. "F. Renzetti", ASL Lanciano-Vasto, Via del Mare n.1, 66034 Lanciano (CH), tel. 0872-706373 – 706456, fax 0872-706373, e-mail: barfabr@libero.it

di adesione piastrinica con conseguenti problemi emorragici [9], dovuto ad una riduzione del GPIb, vi è un'esaltata aggregabilità piastrinica per contemporaneo incremento del recettore GPIIb/IIIa cui può essere attribuito lo stato protrombotico[10].
Numerosi riscontri clinici e sperimentali forniscono chiare indicazioni sul coinvolgimento dei recettori piastrinici di superficie nella progressione della vasculopatia aterosclerotica e delle trombostruzioni [11-9] per cui possono essere ritenuti buoni markers di danno vascolare [10].
La terapia dialitica, pur non correggendo del tutto i difetti piastrinici, induce nell'uremico un equilibrio emostatico clinicamente accettabile e la scomparsa, nella quasi totalità dei casi, di manifestazioni emorragiche, ma non risulta efficace nel prevenire le trombosi e la progressione delle vasculopatie croniche.
In corso di emodialisi il sangue entra in contatto con molteplici componenti del circuito extracorporeo: la membrana dialitica, le linee ematiche e le sostanze chimiche usate per il reprocessing che possono indurre alterazioni della biocompatibilità.
Scopo del nostro studio è valutare in un gruppo di emodializzati l'impatto che la membrana in polisulfonato (PSN), recentemente introdotta sul mercato italiano, induce sull'espressione dei recettori piastrinici di superficie, estremamente importanti sia nella patogenesi della sindrome emorragica (nel caso di una riduzione) che in una sindrome trombotica (in caso di aumento di espressione). Questo per verificarne la biocompatibilità e ottenere eventuali indicazioni specifiche soprattutto per l'aspetto terapeutico, nel rimodulare il dosaggio di eparina.

Materiali e metodi

Lo studio è stato condotto in due periodi. In una prima fase sono stati presi in esame 18 adulti sani, 6 soggetti sani in età pediatrica, 14 adulti in emodialisi, 10 adulti in peritoneodialisi, 6 bambini in emodialisi e 10 bambini in peritoneodialisi, con l'esclusione dallo studio di tutti i pazienti dializzati che avevano assunto farmaci da meno di un mese, con la sola eccezione dell'eritropoietina umana ricombinante (rHu-EPO) o che erano affetti da malattie dell'emostasi. Successivamente, solo 6 pazienti, tra i precedenti dializzati, sono stati sottoposti a dialisi con membrana in PSN. A tutti è stato prelevato un campione di 4 ml di sangue venoso, utilizzando provette Vacutainer contenenti 0.5 ml di sodio citrato, per la determinazione dei recettori piastrinici GPIb e GPIIb/IIIa, prima della terapia dialitica. A quelli trattati con filtro in PSN i prelievi ematici sono stati ripetuti, prima della seduta emodialitica, dopo 15 giorni e 30 giorni dall'inizio e dopo 30 e 60 giorni dalla fine dello studio, quando i pazienti hanno ripreso ad effettuare la dialisi con utilizzo di membrana classica (HD), per una durata complessiva dell'osservazione di tre mesi.
Dai campioni così raccolti sono state prelevate due aliquote di sangue di 100 ml e poi ad ognuna di esse sono stati aggiunti rispettivamente 10 ml di anticorpo monoclonale 42b specifico per il recettore GPIb e 10 ml di anticorpo monoclonale 41a specifico per il recettore GPIIb/IIIa, marcati con isiotiocianato di fluorescina e ad entrambe 10 ml di anticorpo monoclonale CD 61 perCP per il gating immunologico (Diaclone, Besançon, Francia). In tutte le provette sono stati aggiunti 90 ml di soluzione PBS e, dopo incubazione al buio per 30 minuti a temperatura ambiente, altri 500 ml della stessa soluzione. Nei campioni preparati sono stati valutati i valori di fluorescenza media, procedendo alla lettura in scala logaritmica, con apparecchio citofluorimetrico a flusso Facscalibur (Becton Dickinson, Franckil-Lakes, NJ) acquisendo 10000 eventi per antigene piastrinico. L'analisi statistica è stata eseguita valutando la differenza tra le medie dei gruppi utilizzando il t di Student.

Risultati

I risultati dello studio sono rappresentati nelle Figure 1-2-3a/1-2-3b, ed evidenziano che non c'è differenza statisticamente significativa tra la fluorescenza media delle piastrine per il recettore di superficie GPIb in nefropatici pediatrici e adulti in emodialisi con membrana classica rispetto ai controlli (Figure 1a e 2a)[12].
Emerge invece un aumento statisticamente significativo della fluorescenza media per il recettore GPIIb/IIIa nei pazienti in emodialisi con membrana classica in pediatrici e adulti se posti a confronto con quelli sani (Figure 1b e 2b).
La peritoneodialisi dimostra una migliore tollerabilità e un impatto diverso rispetto all'emodialisi, non determinando una differenza statisticamente importante per entrambi i recettori sulle due popolazioni.
Come si può osservare dai risultati, la membrana PSN induce variazioni sull'immunofluorescenza piastrinica media, determinando un incremento statisticamente significativo del recettore GPIb e una riduzione del recettore GPIIb/IIIa (Figure 3a e 3b).

Discussione

L'emodialisi e la peritoneodialisi hanno un impatto diverso sull'espressione dei recettori piastrinici, come documentato anche dai risultati ottenuti da recenti studi eseguiti in nefropazienti trattati con entrambe le tecniche[12,13]. In particolare nel caso della peritoneodialisi si verifica la normalizzazione dell'espressività del recettore piastrinico di superficie GPIIb/IIIa, mentre nel caso dell'emodialisi tali valori rimangono elevati sia negli uremici adulti ($P<0.01$) che nei pediatrici ($P<0.01$)[14].
L'alterazione dei recettori, in particolare del GPIIb/IIIa, specifico per il fibrinogeno, provoca effetti clinici rilevanti. Questa molecola, punto cardine del meccanismo dell'aggregazione piastrinica, può comportare, come risulta anche da studi più recenti, una minore o maggiore tendenza trombofilica e aterogenica [15].
I nostri dati confermano l'ipotesi che l'emodialisi influenza diversamente meccanismi biologici chiave dell'emostasi. In particolare è evidente come la membrana in PSN, oggetto della nostra indagine, risulti essere più efficace rispetto alle membrane classiche, in quanto ripristina una espressività fisiologicamente migliore dei recettori piastrinici, con risultati clinici assimilabili alla peritoneodialisi. L'uso di tale membrana si rivela perciò molto indicato in pazienti dializzati sia in età adulta che pediatrica e consente inoltre un miglior approccio alla terapia eparinica.
La produzione di materiali utilizzati per la dialisi, con effetti assimilabili il più possibile a quelli biologici, costituisce

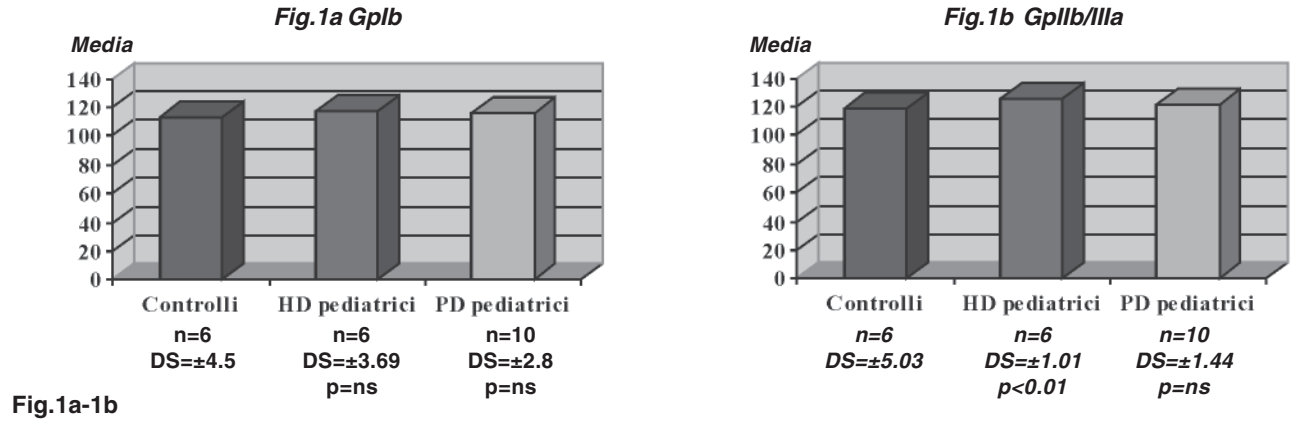

Fig.1a-1b
Variazioni dei valori della fluorescenza media delle glicoproteine di membrana GPIb e GPIIb/IIIa nei pazienti in età pediatrica sottoposti ad emodialisi con membrana classica (HD n.6) e peritoneodialisi (PD n.10) raffrontati a bambini sani (controlli n.6).

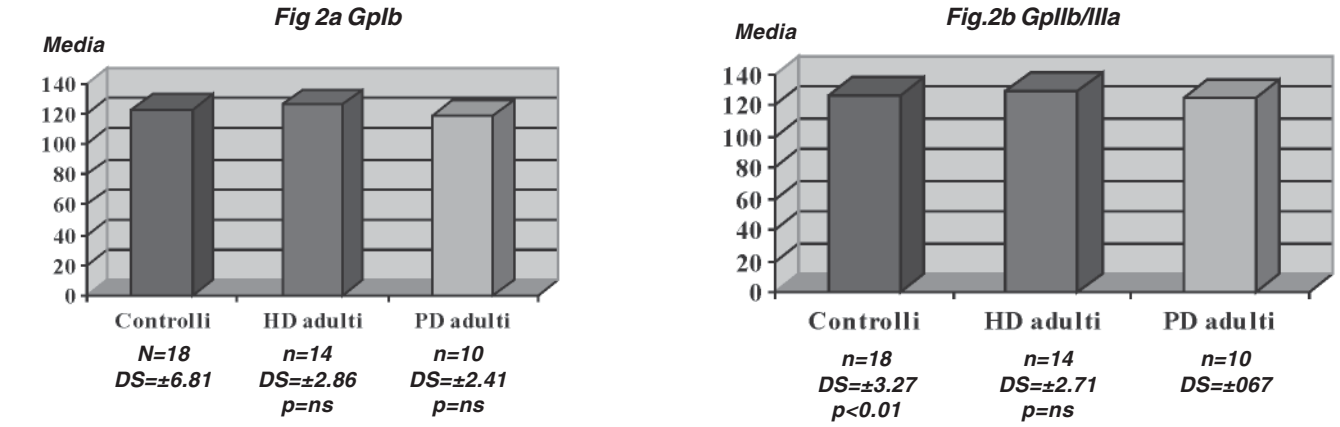

Fig.2a-2b
Variazioni dei valori della fluorescenza media delle glicoproteine di membrana GPIb e GPIIb/IIIa nei pazienti adulti sottoposti a emodialisi con membrana classica (HD n.14) e peritoneodialisi (PD n.10) raffrontati a soggetti adulti sani (controlli n.18).

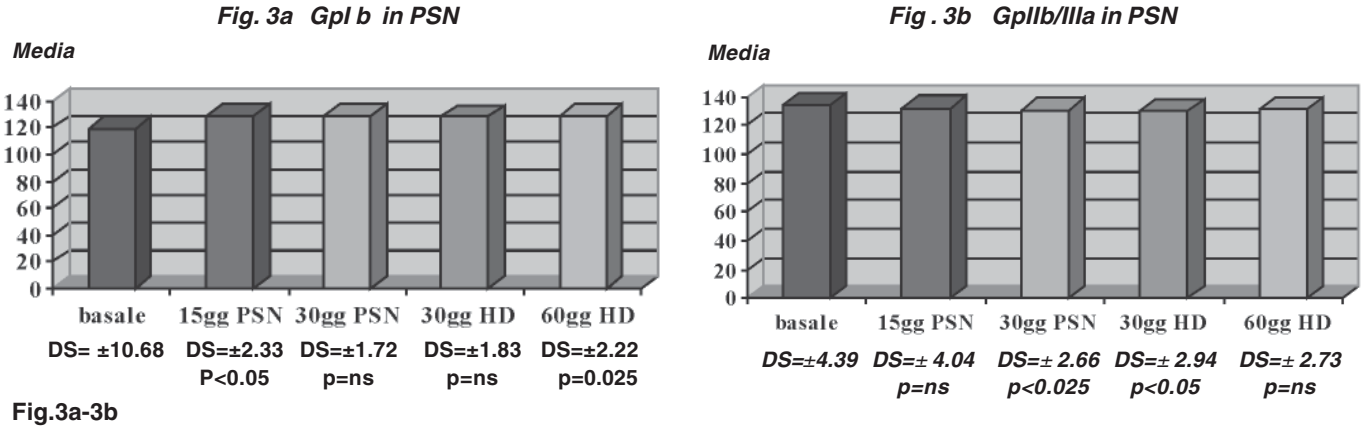

Fig.3a-3b
Variazioni dei valori della fluorescenza media delle glicoproteine di membrana GPIb e GPIIb/IIIa in sei pazienti in emodialisi con membrana in PSN dopo 15 e 30 giorni di trattamento e a 30 e 60 giorni dopo reintroduzione di membrana classica (HD), rispetto ai valori basali degli stessi.

inoltre un importante progresso nella riduzione delle complicanze cliniche della terapia dialitica.

Bibliografia

1. Pereira BJG, Cheung AK. Biocompatibilty of hemodialysis membranes. In: Owen WF, Pereira BJG, Sayeg MH, (eds). Dialysis and Transplantation. Philadelphia: W.B. Saunders Co. 2000. pp 32-56.
2. Valderrabano F, Jones EHP. Report on management of renal failure in Europe, XXIV, 1993. Nephr Dial Transpl 1995; 10(Suppl. 5):1-25.
3. Levin RD, Kwaan HC, Ivanovich P. Changes in platelet function during hemodialysis. J Lab Clin Med 1978; 92:779-85.
4. Parise P. Valutazione dell'attivazione piastrinica mediante citometria a flusso ed anticorpi monoclonali. Progr Med Lab 1992; 6:497-507.
5. Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of

activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. Blood 1987; 70:307-15.

6. Konstantopoulos K, Grotta JC, Sills C, Wu KK. Shear-induced platelet aggregation in normal subjects and stroke patients. Thromb Haemost 1995; 74:1329-1334.
7. Liani M, Salvati F, Golato M, Tresca E. Platelet glycoproteins GPIb and GPIIb/IIIa abnormalities in uremia. Nephron 1996; 72:716.
8. Rinder HM, Bonan JL, Rinder CS, Ault KA, Smith BR. Dynamics of leukocyte- platelet adhesion in whole blood. Blood 1991; 78:1730-37.
9. Liani M, Salvati F, Tresca E, Di Paolo G, Vitacolonna L, Golato M, et al. Arteriovenous fistula obstruction and expression of platelet receptors for von Willebrand factor and for fibrinogen (glycoproteins GPIb and GPIIb/IIIa) in hemodialysis patients. Int J Artif Organs 1996;19:451-4.
10. Topol EJ, Califf RM, Wiesman HF, Ellis SG, Tcheng JE, Worley S, et al, on behalf of the study EPIC investigors. Randomised trial of coronary intervention with antibody against platelet IIb/IIIa integrin for reduction of clnical restenosis: results at six months. Lancet 1994; 343:881-6.
11. Liani M, Salvati F, Tresca E, Vitacolonna L, Di Paolo G, Golato M. Abnormalities of platelet surface glycoproteins GPIb (von Willebrand Factor-vWF) and GP IIb/IIIa (Fibrinogen): the most imprtant factor in the pathogenesis of bleeding diathesis in uremia? Nephr Dial Transpl 1995; 10:986.
12. Liani M, Salvati F, Tresca E, Cahen R, Golato M, et al. Bleeding diathesis in uremic patients treated with peritoneal dialysis: Role of platelet glycoproteins GPIb and GPIIb/IIIa abnormalities. Nephron, in press.
13. Liani M, Salvati F, Tresca E, Rubino L, De Meo F, Di Giovanni V. Effetti differenti della emodialisi e della dialisi peritoneale sulla alterazione piastrinica indotta dall'uremia: ruolo dei recettori piastrinici di superficie. Atti del VIII Congresso Nazionale di Dialisi Peritoneale. Montesilvano Lido (PE), 28-30 settembre 1995. pp 357-60.
14. 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.
15. Liani M, Salvati F, Tresca E, Golato M, Capasso A. Increased expression of GPIb and GPIIb/IIIa platelet surface glycoproteins in renal transplant patient. Nephron 1996; 73:360.