

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE CARDIO NEFRO TORACICHE**

Ciclo XXXII

**Settore Concorsuale: 06/D2 - ENDOCRINOLOGIA, NEFROLOGIA E SCIENZE
DELL'ALIMENTAZIONE E DEL BENESSERE**

Settore Scientifico Disciplinare: MED/14 - NEFROLOGIA

**AZIONE IMMUNOMODULATORIA DEL TRATTAMENTO
EXTRACORPOREO EMODIALITICO E STUDIO COMPARATIVO DI
DIVERSE MEMBRANE HIGH FLUX**

Presentata da: Anna Laura Croci Chiocchini

Coordinatore Dottorato

Supervisore

Prof. Gaetano Domenico Gargiulo

Prof. Gaetano La Manna

Esame finale anno 2020

Sommario

1. BACKGROUND.....	3
Infiammazione e disregolazione immunitaria nei pazienti con malattia renale cronica terminale	3
Sottopopolazioni Linfocitarie e Malattia Renale Cronica.....	8
Le Membrane di Dialisi.....	16
Membrane di dialisi e PBMCs	25
2. SCOPO DELLO STUDIO	29
3. MATERIALI E METODI	30
Disegno dello studio.....	30
Cellule mononucleate umane	32
Analisi citofluorimetrica	32
Proliferazione cellulare con CFSE	33
Saggio dell'Annessina V	34
Analisi Statistica.....	34
4. RISULTATI	36
4.1 PBMC nei pazienti affetti da malattia renale terminale in trattamento emodialitico, confronto con i volontari sani	36
4.2 PBMC nei pazienti affetti da malattia renale terminale in corso di seduta emodialitica	48
4.3 Tipizzazione linfocitaria nei pazienti affetti da malattia renale terminale in trattamento emodialitico, confronto tra diverse membrane <i>high flux</i>	61
5. DISCUSSIONE.....	65
6. CONCLUSIONI.....	77
7. BIBLIOGRAFIA.....	78

1. BACKGROUND

Infiammazione e disregolazione immunitaria nei pazienti con malattia renale cronica terminale

Secondo l'*Australian National Health and Medical Research Council* circa 2.6 milioni di persone nel mondo sono affette da malattia renale cronica allo stadio terminale (ESRD, *End Stage Renal Disease*) (1). Sebbene il trapianto renale rappresenti la migliore opzione terapeutica, a causa della scarsità di organi disponibili, la maggior parte di questi pazienti è dipendente dal trattamento dialitico. Nonostante gli importanti progressi nella cura del paziente con malattia renale cronica (CKD, *Chronic Kidney Disease*) tale malattia è gravata da un elevato rischio cardiovascolare e di mortalità, dipendente sia da fattori di rischio tradizionali (ipertensione, dislipidemia, diabete mellito e obesità) che fattori di rischio non tradizionali (infiammazione cronica, disfunzione endoteliale, stress ossidativo e disfunzione immunitaria) (2, 3). Tra tali fattori di rischio l'infiammazione sistemica e la disfunzione immunitaria sono i fenomeni presi in oggetto dal progetto di ricerca.

Nel paziente uremico con CKD in trattamento conservativo e, in misura maggiore, nel paziente in emodialisi è documentato un aumento della concentrazione plasmatica di tossine uremiche circolanti, citochine pro-infiammatorie e anti-infiammatorie e, più in generale, di mediatori dell'infiammazione da 1.5 fino a 200 volte rispetto al soggetto normale (4) causato sia da una ridotta clearance renale dei mediatori dell'infiammazione sia dall'aumentata produzione tissutale di tali molecole con un bilancio complessivo a favore della componente pro-infiammatoria (5). Solo un numero limitato di tossine uremiche ha un ruolo noto e solo pochi composti sono conformi alla definizione di tossine uremiche secondo Massry e Koch (6). Tuttavia, ciò non esclude un loro potenziale ruolo nella sindrome uremica, nella microinfiammazione e nella disfunzione immunologica che caratterizza il paziente in trattamento emodialitico. Le tossine uremiche possono essere suddivise in tre gruppi principali in base alle loro caratteristiche chimiche e fisiche (7) (Tabella 1):

- Piccoli composti idrosolubili a basso peso molecolare (PM<0,5 kDa), come l'urea
- Composti legati alle proteine (PM<0,5 kDa), come il solfato indoxile e p-cresolo
- Medie molecole (PM≥ 0.5 kDa), come la beta2-microglobulina (β2M)

BASSO P.M.	PM (daltons)	PROTEIN BOUND	PM (daltons)	MEDIE MOLECOLE	PM (daltons)
ADMA mg/L	202	CMPF mg/L	240	Peptide natriuretico atriale ng/L	3.080
Acido β guanidino propionico mg/L	131	Fruttoselina mg/L	308	β2 microglobulina mg/L	11.818
Creatinina mg/L	113	Gliossalato μg/L	58	Cistatina C mg/L	13.300
Acido γ guanidino butirrico μg/L	145	Omocisteina ng/L	145	Interleuchina-1 βng/L	32.000
Ipxantina mg/L	136	Indossil solfato mg/L	241	Interleuchina-6 ng/L	24.500
Mioinositolo mg/L	180	Leptina mg/L	16.000	Catene leggere k mg/L	25.000
Acido orotico mg/L	174	P-Cresolo mg/L	108	Catene leggere λmg/L	45.000
Ossalato mg/L	90	Pentosidina μg/L	342	Leptina μg/L	16.000
Urea g/L	60	Fenolo mg/L	94	Paratormone μg/L	9.225
Acido urico mg/L	168	Acido ippurico mg/L	195	Fattore D Complemento mg/L	23.750
Timina mg/L	126	Retinol binding protein mg/L	21.200	Retinol binding protein mg/L	21.200
Xantina mg/L	152	Spermidina μg/L	145	Tumor necrosis factor-αng/L	26.000

Tabella 1. Tossine uremiche (4).

Mentre le piccole molecole idrosolubili attraversano facilmente, per diffusione, la membrana con tecnica emodialitica standard, le medie molecole, le molecole di grandi dimensioni e le molecole legate a proteine permangono in circolo (4). Sono stati identificati più di 20 composti conformi alla definizione di medie molecole (8), diversamente rimovibili mediante trattamento extracorporeo a seconda del loro peso molecolare. All'interno di questa categoria rientrano la beta-2 microglobulina, considerata il principale marcatore di adeguatezza depurativa nei confronti delle medie molecole, citochine pro e anti infiammatorie, le chemochine e i fattori del complemento. Nel paziente emodializzato risultano aumentati i livelli di citochine pro-infiammatorie (IL-6, IL-1β, IL-18, IL-2), dell'interleuchina anti-infiammatoria IL-10, il TNF (*Tumor Necrosis Factor*), i recettori solubili per il TNF (sTNFR-1

e sTNFR-2) e la proteina PTX3 (penetraxin-3) (4). In studi osservazionali, la rimozione di queste molecole durante il trattamento emodialitico correla con una minore morbilità e mortalità (9-13).

L'eziologia dello stato infiammatorio cronico nel paziente in emodialisi è multifattoriale e i principali fattori causativi possono essere distinti in dipendenti e indipendenti dal trattamento dialitico stesso.

Tra fattori indipendenti dal trattamento dialitico rientrano le comorbidity (la vasculopatia polidistrettuale, il diabete mellito, la cardiopatia ischemica, la malattia coronarica e le patologie autoimmuni), lo stato di malnutrizione (14) e la sindrome uremica con ritenzione di tossine uremiche. Altri fattori coinvolti potrebbero essere la traslocazione batterica attraverso la parete intestinale edematosa a causa della ritenzione idrica, e la maggiore suscettibilità alle infezioni, acute e croniche, in parte dovuta all'età avanzata e alle comorbidity (15).

I fattori connessi al trattamento emodialitico sono invece rappresentati dal grado di biocompatibilità della membrana di dialisi, dal livello di sterilità del bagno dialisi e del liquido di reinfusione, con conseguente possibile esposizione alle endotossine, da eventuali disfunzioni/infezioni a carico dell'accesso vascolare, dall'utilizzo di catetere venoso centrale o fistola arterovenosa nativa o protesica e dall'adeguatezza dialitica che ne consegue.

Il termine biocompatibilità si riferisce alla capacità di un materiale o di una soluzione di entrare a contatto con il corpo umano senza causare un'inappropriata risposta nell'ospite (16). Nel paziente in emodialisi la membrana dialitica innesca una risposta infiammatoria complessa, e tuttora non chiarita, che coinvolge i leucociti, i mediatori dell'infiammazione, le piastrine, il sistema del complemento e i fattori della coagulazione portando a flogosi, fibrosi, incremento del rischio trombotico e disfunzione della risposta immunitaria (17;18).

Infine in emodialisi l'adeguatezza dialitica è responsabile della capacità depurativa e di rimozione di tossine uremiche e citochine pro-infiammatorie (5); un aumento generalizzato della risposta infiammatoria in pazienti con una ridotta funzionalità renale può essere associato alla riduzione della clearance di tali citochine e tossine con livelli sierici di

fattori come Proteina C Reattiva (PCR) e IL-6 inversamente correlati alla clearance della creatinina (19;20).

La persistenza dello stato infiammatorio cronico nel paziente in emodialisi ha un ruolo riconosciuto nella patogenesi dell'aterosclerosi (21) e ha conseguenze importanti su numerosi *outcome* clinici quali l'aumento del rischio di eventi cardiovascolari e della mortalità per tutte le cause (22), l'incremento del rischio di sviluppo di calcificazioni vascolari, di incidenza di *protein energy wasting syndrome* (PEW), di disturbo depressivo e di disordini endocrinologici (ipotiroidismo secondario e deficit di testosterone) (18) da qui l'importanza clinica di contrastare lo stato infiammatorio tipico di questi pazienti.

Inoltre la progressione della CKD è associata ad uno squilibrio tra immunostimolazione e immunosoppressione (23). Da un lato l'uremia determina l'attivazione del sistema immunitario (24), d'altro canto, paradossalmente, i pazienti con CKD e ESRD presentano segni di disfunzione della risposta immunitaria quali un'aumentata suscettibilità alle neoplasie e alle infezioni e una ridotta risposta alle vaccinazioni, come nel caso del vaccino per l'epatite B (25). Il fatto che le infezioni siano la principale causa di ospedalizzazione e la seconda causa di morte nei pazienti con malattia renale allo stadio terminale (8) testimonia la rilevanza clinica dell'alterato funzionamento del sistema immunitario.

La risposta immunitaria, ovvero la resistenza alle malattie, si suddivide in immunità innata aspecifica e immunità adattativa o specifica, di cui sono responsabili le PBMCs ovvero *peripheral blood mononuclear cell* costituite da linfociti e monociti, cooperando tra di loro al fine di difendere l'organismo.

Più dettagliatamente l'**immunità innata** è rappresentata da quei meccanismi preesistenti al contatto con i microrganismi e che vengono attivati tempestivamente in presenza di agenti patogeni prima che l'organismo sia in grado di sviluppare una risposta immunitaria specifica verso di essi, ed è costituita da 1) barriere fisico/chimiche dell'organismo come le cellule epiteliali; 2) cellule ad attività fagocita (polimorfonucleati neutrofili, macrofagi) e cellule ad attività citotossica (Linfociti Natural Killer detti NK); 3) il sistema del complemento, o altri

mediatori infiammatori; 4) citochine. A questo gruppo appartengono i monociti, che producono mediatori infiammatori, hanno capacità fagocitaria e vengono reclutati rapidamente nel sito d'infezione o in caso di danno tissutale per differenziarsi in macrofagi.

L' **immunità adattativa** è costituita dall'insieme delle risposte di tipo specifico attivate dal sistema immunitario verso i microrganismi patogeni ed è composta da due bracci, uno cellulare (linfociti T) e uno anticorpale o umorale (linfociti B e anticorpi).

La disfunzione immunitaria legata all'insufficienza renale terminale è costituita da una complessa relazione tra disregolazione dell'immunità innata e dell'immunità adattativa, i cui meccanismi fisiopatologici alla base non sono tuttora chiariti. Per quanto concerne l'immunità innata, i pazienti affetti da ESRD presentano un'aumentata attivazione basale dei *Toll-like receptors* (TLR), del sistema del complemento, un'incrementata espressione di molecole di adesione all'endotelio (integrine) e un'iperattivazione dei polimorfonucleati neutrofili e dei monociti. Tale "iperattività" si accompagna, tuttavia, a un'alterata capacità fagocitica con secondario deficit di immunocompetenza e maggior rischio infettivo (26). L'uremia porta inoltre ad alterazioni numeriche e funzionali delle cellule mononucleate del sangue periferico con difetti dell'immunità cellulo-mediata e umorale (27;28) mediata da linfociti T e B, forse secondariamente alla persistenza di uno stato infiammatorio e all'alterata escrezione di mediatori dell'infiammazione e di citochine (8;29). È noto che i pazienti con insufficienza renale cronica presentano linfopenia del sangue periferico, a causa di un aumento dei processi di apoptosi e diminuzione dell'attività proliferativa dei linfociti a seguito di stimolazione antigenica (8). Infine è documentata in letteratura una correlazione tra l'aumentata attivazione dei linfociti T e dei monociti circolanti e il processo aterosclerotico nel paziente in emodialisi (30).

Sottopopolazioni Linfocitarie e Malattia Renale Cronica

La malattia renale cronica determina, oltre che una disfunzione dell'immunità innata, anche una disregolazione dell'immunità adattativa sia per quanto riguarda il braccio cellulare che quello anticorpale.

I linfociti sono le cellule specializzate del sistema immunitario, aventi un ruolo principale nell'immunità adattativa; originano nel midollo osseo a partire da cellule staminali ematopoietiche. Sono suddivisi in linfociti B e T.

I linfociti B maturano dapprima nel midollo osseo e, a seguito dell'incontro con l'antigene nel torrente circolatorio, si differenziano in plasmacellule. Sono caratterizzati dall'espressione di molecole di superficie CD3/CD19.

I linfociti T presentano quale marker di superficie la proteina CD3 (*cluster of differentiation 3*), identica in tutti i linfociti T. Vengono definiti *naïve* finché non incontrano l'antigene e si trovano inizialmente nel timo, organo in cui avviene la loro maturazione. In seguito all'incontro con l'antigene, si differenziano poi all'interno degli organi linfoidi secondari in cellule effettrici.

I linfociti T, a loro volta, possono essere suddivisi in differenti classi:

- linfociti T CD4+ *helper* (Th), in grado di coordinare ed aiutare la risposta immunitaria, andando a produrre citochine che favoriscono proliferazione e differenziazione dei linfociti T stessi, linfociti B, macrofagi e leucociti
- linfociti T CD8+ citotossici (CTLs), responsabili dell'eliminazione di cellule infettate da virus, tumorali e trapiantate, cioè presentanti antigeni estranei (non-self), all'interno del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), al *T-cell receptor* (TCR), espresso sulla superficie del linfocita.

Le molecole MHC nell'uomo prendono il nome di *Human Leukocyte Antigen* (HLA) e sono suddivise in due classi, in grado di riconoscere e distinguere diversi tipi di proteine antigeniche; molecole di classe I presentano gli antigeni ai linfociti T citotossici (CD8) mentre quelle di classe II ai Linfociti T helper (CD4).

La presenza di antigeni induce le cellule T CD4 a differenziarsi in cellule T helper effettrici. La differenziazione dovuta alla produzione autocrina di citochine, in particolare di IL-2 con funzione proliferativa ed induttiva, porta le cellule Th a dividersi in **Th1**, **Th2**, **Th17** e **T regolatorie (Treg)** in base alle citochine che rilasciano dopo l'incontro con l'antigene (Figura 1), stimolando l'instaurarsi di una risposta umorale o cellulare (31). Ognuna di queste sottoclassi è coinvolta nella lotta contro specifici microrganismi.

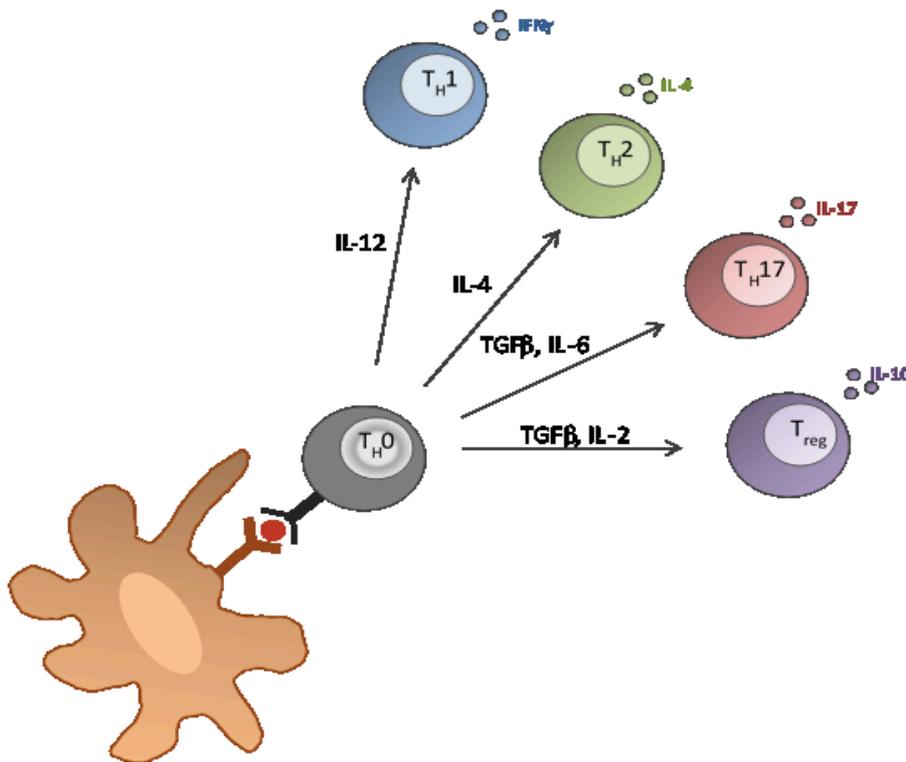


Figura 1: Differenziazione dei linfociti CD4+ dopo contatto con l'antigene.

Le cellule Th1 hanno un ruolo fondamentale nel contrastare le infezioni da microrganismi sia intracellulari che extracellulari. Derivano dalla differenziazione delle cellule T CD4+ *naïve* (Th0) in risposta all'IL-12 e interferone gamma (IFN- γ) prodotti dalle *antigen presenting cells* (APC, come le cellule dendritiche, i monociti/macrofagi e i linfociti B). La funzione principale dei linfociti Th1 è l'attivazione macrofagica che si esplica attraverso la secrezione di IFN- γ e l'interazione fra CD40 e CD40 Ligando (CD40L) linfocitario.

La funzione principale delle cellule Th2 è invece quella di sopprimere la reazione infiammatoria mediante la secrezione di citochine capaci di inibire l'attivazione macrofagica. Tali cellule si comportano dunque come regolatorie e spesso la polarizzazione della risposta immunitaria in senso Th2 caratterizza le fasi tardive della risposta infiammatoria. La loro funzione è mediata dalla produzione di IL-4 e IL-13, antagonisti dell'IFN- γ , e di IL-10 che esplica azione inibitoria sull'attivazione macrofagica (32).

Le cellule Th17 rappresentano una sottopopolazione linfocitaria caratterizzata dalla produzione di interleuchina 17 (IL-17). Si sviluppano a seguito di un processo di induzione, da parte di *tumor growth factor* (TGF)- β e IL-6, coadiuvato dall'azione di IL-23, e inibito da IL-4 e IFN- γ . Oltre all'interleuchina pro infiammatoria 17, le Th17 sono responsabili della produzione di IL-22, IL-6 e TNF- α , e presentano un caratteristico fattore di trascrizione, ROR (*retinoic acid-related orphan receptor*) (33). La loro principale attività riguarda la difesa dell'organismo da patogeni extracellulari e funghi, con un ruolo nella determinazione del danno tissutale infiammatorio e nell'autoimmunità.

Le cellule T regolatorie (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) dette Treg, hanno un ruolo anti-infiammatorio e sono coinvolte nella regolazione della risposta immunitaria, nel controllo della risposta antitumorale e dell'autoimmunità mantenendo l'omeostasi e la tolleranza nei confronti degli antigeni self attraverso molteplici meccanismi tra cui la produzione di IL-10 e TGF- β , il contatto cellula-cellula con inibizione della produzione di IL-2 e IFN- γ sulle cellule bersaglio e la proliferazione dei linfociti T. È stato ipotizzato che la loro azione abbia un ruolo anche nelle fasi successive al trapianto renale, promuovendone la tolleranza e limitandone i casi di rigetto (34). Sebbene esistano diversi sottogruppi di Treg, quelli più potenti e ben differenziati sono quelli esprimenti il marker FoxP3 CD4⁺.

È ancora sconosciuto il ruolo del rapporto tra Treg e Th17. Lo shift differenziativo nell'una o nell'altra linea cellulare dipende fortemente dall'ambiente citochinico tissutale. In presenza di TGF- β e di un'elevata concentrazione di citochine pro-infiammatorie, quali IL-6, IL-21, IL-1- β

e TNF- α favoriscono la differenziazione in senso Th17, invece, la presenza di IL-2 e una concentrazione di citochine pro-infiammatorie relativamente bassa, induce la differenziazione dei linfociti CD4+ *naïve* in senso T regolatorio (35).

Esistono inoltre i linfociti T di memoria che possono sopravvivere in uno stato di quiescenza o replicarsi molto lentamente anche per molti anni dopo l'eliminazione dell'antigene.

Infine esistono i linfociti NK che appartengono al comparto dell'immunità innata. Derivano da un progenitore comune ai linfociti T e sono implicati nella difesa dalle cellule infette da virus e cellule neoplastiche. Rappresentano una sottopopolazione T linfocitaria che esprime marcatori di superficie propri sia dei linfociti T che delle NK (CD56 e CD16). Le cellule NK possiedono un fenotipo di attivazione o memoria caratterizzato dall'espressione di CD44, CD69 e CD122 e sono presenti nella maggior parte dei tessuti in cui si trovano le cellule T, in particolare fegato, midollo osseo, milza e timo. A differenza dei linfociti T le NKT non riconoscono antigeni, ma glicosfingolipidi presentati dalla proteina CD1d (espressa sulle APC). Agiscono mediante il rilascio di citochine infiammatorie tra cui IFN- γ , TNF- α , IL-10 e GM-CSF, nonché varie chemochine e hanno attività citolitica immediata, entro 90 minuti, senza necessità di precedente attivazione (36; 37).

Tra le citochine infiammatorie è importante ricordare il ruolo dell'IFN- γ , implicato sia nell'immunità innata che adattativa, prodotto da linfociti NK, CD4+ e CD8+. È responsabile dell'attivazione dei macrofagi e della loro attività microbica, dell'aumentato riconoscimento dei patogeni mediante incremento della presentazione dell'antigene da parte delle APC, dell'attività antivirale e della secrezione di molecole co-stimolatorie con stimolazione dei linfociti e promozione della differenziazione dei linfociti Th1CD4+ intensificando la sorveglianza immunitaria in corso di l'infezione. Negli ultimi anni gli studi su IFN γ si sono concentrati sulla sua azione antifibrotica, immunomodulatoria e antiproliferativa con effetti sull'apoptosi. Così come le altre citochine anti fibrotiche anche l'IFN- γ è ridotto nei pazienti affetti da CKD e ESRD (38) e ciò provoca un incremento dello stato pro-infiammatorio.

Vari studi si sono concentrati sull'espressione e la proliferazione di particolari sottopopolazioni linfocitarie in condizioni di malattia renale cronica. In particolare è stata riscontrata una riduzione dei linfociti T e B circolanti nei pazienti con insufficienza renale cronica tuttavia i dati di letteratura rimangono controversi e la maggior parte delle evidenze disponibili riguarda il paziente in emodialisi (39-41).

Xiang F et al. hanno recentemente osservato, su 472 pazienti con vario grado di malattia renale cronica, una riduzione della conta linfocitaria proporzionale al calo della velocità di filtrazione glomerulare stimata (eGFR) e una prevalenza di cellule NK rispetto alle cellule B nei pazienti con stadio più avanzato di insufficienza renale cronica anche dopo correzione del dato per età, sesso e comorbidità. Il dato era ancor più evidente nel sottogruppo di pazienti in trattamento emodialitico (26).

Litjens et al hanno dimostrato una correlazione fra la perdita della funzione renale e la riduzione del numero di cellule T CD4+ *naïve*, T CD8+ *naïve* e dei linfociti T di memoria. Gli stessi autori inoltre evidenziavano un'aumentata espressione di marcatori di attivazione T cellulare (CD25 e CD27) (25).

Benché la letteratura sia concorde nel definire iperattivo e paradossalmente disfunzionale il sistema immunitario di questi pazienti, non sussiste univocità sull'interpretazione del profilo delle sottopopolazioni T linfocitarie nel paziente in emodialisi. Le ipotesi patogenetiche riguardo la disfunzionalità T cellulare nel paziente con CKD/ESRD sono molteplici e nessuna vanta dati sperimentali conclusivi a suo conforto. Le principali teorie riguardano un'anomala presentazione dell'antigene, il ruolo dello stato di infiammazione cronica, l'alterazione del profilo citochinico, la disfunzione dei linfociti T e l'esposizione al trattamento emodialitico stesso (42).

Molti studi mostrano che il numero di cellule CD3+, CD4+ e CD8+ diminuisce nei pazienti in trattamento emodialitico e numerosi Autori sostengono che la stessa procedura emodialitica induca apoptosi dei linfociti T (43), in particolare Borges et al hanno dimostrato, in 12 pazienti sottoposti a emodialisi, una riduzione dei linfociti CD3+

circolanti (soprattutto CD4+) tra inizio e fine dialisi. Secondo gli Autori tale riduzione potrebbe essere conseguenza dell'elevata concentrazione di linfociti CD3+ e CD4+ apoptotici riscontrati al termine del trattamento emodialitico (44).

Analogamente, in uno studio più recente Lisowska et al. hanno descritto un aumento del rapporto CD4/CD8 dopo una singola seduta emodialitica come conseguenza di una riduzione dei linfociti CD8+ e non un aumento dei CD4+(45).

Katarzyna et al, invece, hanno dimostrato che la seduta di emodialisi ripetuta influenza il fenotipo e la proliferazione dei linfociti T CD4+. I linfociti T CD4+ dei pazienti in emodialisi hanno mostrato un'espressione significativamente ridotta della molecola CD28 dopo stimolazione *in vitro* con anticorpi anti-CD3, rispetto ai pazienti con malattia renale cronica in fase pre-dialitica e ai controlli sani. Sono stati rilevati anche una diminuzione della percentuale di linfociti CD4+ CD28+ proliferanti *in vitro*, un numero ridotto di divisioni cellulari dopo 72 ore di stimolazione *in vitro* e un tempo G0 → G1 prolungato rispetto ai controlli sani (46).

Numerosi studi suggeriscono che la CKD e il trattamento emodialitico favoriscano una stimolazione cronica delle cellule T e possano scatenare un ridotto rilascio da parte del timo di linfociti T *naïve* e un blocco della loro replicazione, nonostante mantengano ancora la capacità di secernere citochine. Questa condizione è definita senescenza prematura indotta da stress (47) ed è stato riscontrato sia nelle cellule T CD4+ che nelle CD8+ (25). Dal punto di vista fenotipico questa condizione è caratterizzata dalla presenza sulla superficie cellulare dell'antigene CD57, un marker di invecchiamento replicativo, in particolare i linfociti T CD57+ *in vitro* non proliferano dopo stimolazione antigenica e sono altamente sensibili all'apoptosi a seguito dell'attivazione (48, 49). Per tali ragioni, questa molecola è entrata a far parte del pool di marcatori che individuano una disfunzione immune, associata a numerose malattie infiammatorie (50-54). Un fattore che influenza tale processo di invecchiamento è l'età del paziente e l'emodialisi è associata ad un moderato invecchiamento delle cellule T della memoria nei pazienti di età superiore ai 50 anni (55).

D'atro canto Rama, Llaudó et al hanno osservato una sovra-regolazione dei marcatori di maturazione e di citochine pro-infiammatorie (IL-6, IL-1, IL-8, IL-10 e TNF- α) nei pazienti a seguito di trattamento emodialitico convenzionale che ha indotto una proliferazione di cellule T due volte maggiore rispetto al trattamento di emodiafiltrazione *on line* (56). Inoltre la terapia emodialitica altera la componente linfocitaria, con il riscontro a fine seduta di un aumento delle cellule generalmente considerate responsabili del rigetto del trapianto (cellule T CD4 +, cellule T CD4 + HLA-DR +, cellule T CD3 + CD25 +, cellule effettrici CD8 + e cellule T CD8 + CCR5 +) ma anche un leggero aumento nelle cellule che potrebbero indurre tolleranza (Treg, HLA-DR + Treg) (57).

Alcuni studi hanno evidenziato un profilo T linfocitario orientato verso i Th1 nei pazienti in emodialisi mentre altri hanno registrato uno sbilanciamento verso la risposta Th2 mediata (58-60).

Secondo Alvarez-Lara et al. i linfociti Th1 dei pazienti in emodialisi presentano una diminuita espressione della molecola anti-apoptotica Bcl-2, che li rende più suscettibili all'apoptosi, indipendentemente dall'esposizione alla membrana dialitica (61) I meccanismi alla base di questi risultati non sono noti e si suggerisce che le tossine uremiche possano agire direttamente sui linfociti.

Mansouri et al hanno confrontato le cellule CD4+ isolate da PBMC di 10 pazienti in emodialisi con quelle isolate da 10 controlli sani rilevando una sostanziale stabilità del numero di Th1 e una riduzione significativa dei Th2 e dei Treg. Dopo stimolazione delle cellule in coltura con enterotossina stafilococcica A gli Autori evidenziavano, nel surnatante dei pazienti in emodialisi, un'aumentata presenza di IFN- γ e una riduzione dell'IL-4, dimostrando una risposta cellulo-mediata orientata verso i Th1 anche dopo minimizzazione dei fattori confondenti derivanti dalle interazioni fra le PBMC (42).

Controversi sono il ruolo e la variazione numerica dei Treg nell'insufficienza renale cronica e nel paziente in dialisi (30,62,63).

Recentemente le cellule Treg e le cellule Th17 sono state descritte come due popolazioni cellulari aventi effetti opposti *in vivo* (64) ed è stato ipotizzato uno squilibrio a favore delle Th17 nel paziente in emodialisi

cronica quale possibile fattore contribuente allo stato infiammatorio cronico e all'elevato rischio cardiovascolare presenti in questa categoria di pazienti.

Zhang et al. hanno dimostrato che pazienti in emodialisi presentavano, rispetto a soggetti sani, un aumentato numero di Th17 e di citochine correlate ai Th17 e, al contempo, un ridotto numero di Treg e di citochine ad esse relate. Tale rilievo era maggiormente evidente nei pazienti a più elevato rischio cardiovascolare (30). La correlazione fra polarizzazione in senso Th17 e rischio cardiovascolare è documentata in letteratura. È stata evidenziata, infatti, un'aumentata espressione dei recettori per IL-17 nelle cellule della parete vascolare durante il processo di formazione della placca aterosclerotica (65) ed è noto che IL-17 agisce sinergicamente al TNF- α nella determinazione del microambiente infiammatorio favorendo il danno endoteliale e l'aterosclerosi (66). A contribuire allo sviluppo di un ambiente microinfiammatorio con conseguente potenziale aumento del rischio cardiovascolare concorre un incremento della PCR e dell'IL-6 con conseguente polarizzazione della risposta immunitaria in senso Th1, come evidenziato sempre dallo studio di Zhang (30).

Al contrario le cellule Treg giocano un ruolo protettivo nei confronti dello sviluppo dell'aterosclerosi (67) Tuttavia questa popolazione sembra ridursi in condizioni di malattia renale cronica; infatti una recente metanalisi ha documentato che nei pazienti con CKD stadio 5, rispetto ai controlli sani, il rapporto Treg/CD4+ risultava ridotto e che ciò non sussisteva quando il confronto era effettuato fra pazienti con CKD stadio 5 e pazienti in emodialisi ponendo il sospetto che la riduzione delle Treg potesse essere secondaria all'uremia di per sé e non conseguenza del trattamento extracorporeo (68). Anche Hendrikx et al hanno osservato un ridotto numero e una disfunzione delle Treg in pazienti in emodialisi rispetto ai controlli sani (63). Libetta et al invece in uno studio su sette pazienti in emodialisi trisettimanale con membrana in Cuprophane *low-flux* hanno evidenziato un maggior numero di Treg rispetto ai controlli sani e ciò rimaneva valido anche al termine di un periodo di osservazione di 6 mesi. Gli autori sottolineavano che il diverso effetto del trattamento

dialitico sulle Treg potrebbe essere spiegato, almeno in parte, dalle diverse membrane utilizzate e dal loro grado di biocompatibilità (69), si specifica che il tipo di membrana non era riportato nello studio di Hendrikx.

Infine i linfociti NK CD 56+ sono responsabili di un potenziamento del danno infiammatorio a carico delle cellule renali, mediante la produzione di IFN- γ in corso di condizioni quali CKD e ESRD (70, come dimostrato nel modello murino.

Le Membrane di Dialisi

Come precedentemente espresso l'eziologia dello stato infiammatorio cronico nel paziente in emodialisi è multifattoriale e i principali fattori causativi possono essere distinti in dipendenti e indipendenti dal trattamento dialitico stesso. Tra i fattori connessi al trattamento emodialitico sono rappresentati tutti i componenti del circuito dialisi, in particolare la sterilità del bagno dialisi e del liquido di reinfusione, eventuali disfunzioni/infezioni a carico dell'accesso vascolare, la tipologia di accesso vascolare come catetere venoso centrale, fistola arterovenosa nativa o protesica ed infine la membrana di dialisi.

Appare pertanto evidente come la membrana di dialisi rappresenti un elemento cruciale nell'eziologia dello stato infiammatorio cronico nel paziente con ESRD, a seguito di numerose sue caratteristiche, in particolare per la sua biocompatibilità e per la sua permeabilità, ovvero la sua capacità di provvedere alla escrezione di medie molecole, e quindi di mediatori dell'infiammazione, implicati nella genesi del rischio cardiovascolare e nella disfunzione immunitaria.

Si definisce biocompatibilità la capacità di causare la minore reazione infiammatoria possibile nel sangue che viene a contatto con i materiali artificiali del circuito extracorporeo (71). La biocompatibilità rappresenta una caratteristica fondamentale per un dispositivo preposto ad effettuare una depurazione extracorporea in situazioni di cronicità e ripetitività continua come le membrane di dialisi. Tuttavia, a più largo spettro, tutti gli aspetti del circuito dialitico influenzano la biocompatibilità,

includendo la composizione del dialisato e del reinfusato, il tipo di clearance (diffusa o convettiva), le procedure di sterilizzazione iniziale e successive per il riutilizzo, materiali residui dal processo di fabbricazione, il materiale e la permeabilità/porosità della membrana dialitica, responsabile della cosiddetta *backfiltration* o *back-diffusion*. Questo fenomeno, generato dai sistemi di controllo dell'ultrafiltrazione, è dovuto ad una inversione del gradiente di pressione nel filtro che da luogo al passaggio di ultrafiltrato dal lato dializzato al lato sangue. Nella parte iniziale del filtro la pressione transmembrana (TMP) risulta positiva e di conseguenza si ha rimozione convettiva e diffusiva dei soluti, ma quando si raggiunge la parte distale dello stesso, il valore della TMP diminuisce a tal punto da diventare negativa con *back transport* del liquido di dialisi in entrata, con movimento di impurità, come endotossine, nel flusso sanguigno durante la dialisi, da qui la necessità che ne venga garantita la qualità e la purezza.

Infine alcune membrane contengono il Bisfenolo A (BPA), una tossina che durante il trattamento può venire rilasciata e assorbita nel sangue con conseguente accumulo, essa può causare aterosclerosi, diabete, sindrome metabolica, insulino-resistenza, obesità e malattie cardiovascolari (72).

Le membrane costituiscono i filtri dializzatori. Trattasi di masse spugnose con pori di varia grandezza, il cui ruolo è quello di separare il compartimento sangue dal dialisato e di trasportare soluti di diverse dimensioni in maniera selettiva mediante processi di scambio diffusivi e/o convettivi. Esse sono caratterizzate da alcuni parametri funzionali che ne determinano le proprietà e gli usi:

- *Area di scambio A*: la superficie effettiva che entra in contatto con il sangue e ne permette la depurazione
- *Diametro interno delle fibre*: è compreso tra i 100 μm e i 300 μm , aumentando il suo valore, aumenta anche l'area di scambio
- *Spessore delle fibre*: determinante nel passaggio dei soluti per diffusione secondo la legge di Fick
- *Dimensioni e morfologia dei pori*: ovvero gli "spazi" attraverso cui passano i soluti; tali variabili dipendono dal materiale a cui appartengono le membrane; le membrane cellulosiche hanno

un'alta dispersione della dimensione media dei pori a differenza di quanto avviene nelle membrane sintetiche. Infine, a seconda della loro struttura, possono essere classificate come microporose (simmetriche) o asimmetriche; le membrane microporose sono poi ulteriormente suddivise in isotrope, che presentano pori di dimensioni uniformi in tutta la membrana, o anisotrope, in cui, invece, le dimensioni dei pori cambiano passando da una superficie all'altra (lato sangue-lato dializzato)

- *Coefficiente di Sieving SC*: il rapporto tra la concentrazione di un soluto nell'ultrafiltrato in uscita dal filtro e la concentrazione dello stesso nell'acqua plasmatica in ingresso del filtro; è determinato dalle caratteristiche del soluto (il peso molecolare) e dalle caratteristiche fisiche della membrana, come per esempio la dimensione e la morfologia dei pori (che a loro volta dipendono dal materiale)
- *Coefficiente di ultrafiltrazione Kuf*: ovvero la permeabilità idraulica definita come il flusso d'acqua per unità di area della membrana per il gradiente di pressione (ml/min/cm²/mmHg), capace di determinare la rimozione di medie molecole per convezione. Il Kuf dipende in gran parte dal tipo di materiale utilizzato per la membrana e dalla dimensione dei pori. La necessità di ottenere un trattamento sostitutivo artificiale della funzione renale efficace nella rimozione delle medie molecole ha portato allo sviluppo di membrane di filtri dializzatori a sempre maggiore permeabilità idraulica. Le membrane attualmente utilizzate sono classificate in due gruppi principali: membrane *low-flux* (LF) o a basso flusso con basso coefficiente di permeabilità idraulica (Kuf < 20 ml/h/mmHg di pressione transmembrana), e membrane *high-flux* (HF) o ad alto flusso con aumentata permeabilità idraulica (Kuf > 20 ml/h/mmHg) in grado di rimuovere tossine a medio peso molecolare. Le membrane *high flux* comportano una riduzione della mortalità cardiovascolare del 15% (73), tuttavia presentano un maggior rischio di *backfiltration* e di eliminare, insieme ai soluti tossici anche sostanze utili come

l'albumina. La soglia del rischio è rappresentata dal “muro dell'albumina”: il peso e la dimensione di tale proteina possono essere ritenuti un limite di sicurezza non oltrepassabile dal *cut-off* della membrana. L'ipoalbuminemia è un forte perditore di morte cardiovascolare e un decremento nei primi 6 mesi dopo l'inizio del trattamento emodialitico è risultata associata a un aumentato rischio di morte per tutte le cause (74)

- *Coefficiente di permeabilità diffusiva KoA*: coefficiente di trasferimento di massa, è la capacità intrinseca del dializzatore di rimuovere un particolare soluto, inversamente proporzionale alla resistenza totale dei tre “compartimenti” che si oppongono al movimento diffusivo: il lato sangue con le proprietà dei soluti, la membrana e le sue proprietà come lo spessore e il comparto dializzato. Misurata in ml/min, viene espresso come KoA dell'urea. Vengono distinti due tipi di membrane, KoA < 500 ml/min membrane a bassa efficienza, KoA > 600 ml/min membrane ad alta efficienza
- *Cut off*: ovvero il limite di separazione, la massima permeabilità di una membrana ad un soluto, definito come il valore del peso molecolare al quale corrisponde un *Sieving coefficient* di 0.1 (10%). Il *Cut Off* può variare da membrana a membrana, generalmente è pari a circa 50000 Da, peso molecolare leggermente inferiore a quello dell'albumina (60000-65000 Da). Ad oggi sono state sviluppate membrane ad elevato *cut off* (HCO *high cut off*) e a medio *cut off* (MCO) di cui tratteremo in seguito.

In merito al materiale di cui sono composte le membrane possono essere classificate in due grandi famiglie, cellulosiche e sintetiche (ulteriormente distinte in idrofiliche e idrofobiche), ma questi concetti, con il progresso biotecnologico, tendono ad assumere contorni sempre più sfumati in presenza di ibridazioni mirate allo sviluppo di caratteristiche specifiche. Oggi esiste in effetti la possibilità di rendere le membrane più o meno idrofiliche con l'aggiunta di polimeri idrofili come il polivinilpirrolidone (PVP) all'interno della struttura.

Le membrane celluloseiche sono costituite da cellulosa, ovvero un polimero naturale insolubile semicristallino derivato dalla ripetizione di unità di cellobiosio. Queste membrane sono le prime ad essere entrate in commercio e sono in grado di attivare il sistema del complemento e l'immunità cellulare leucocitaria inducendo una reazione infiammatoria, il che le rende scarsamente biocompatibili (75). Tale caratteristica è data dalla presenza di gruppi idrossilici. Per la preparazione di queste membrane vengono utilizzati derivati ottenuti per acetilazione (acetato, diacetato e triacetato) o per formazione di complessi amminici con il rame (cuprammonio), successivamente sciolti in solventi, ottenendo materiale idrofilo e con porosità tale che conferisce loro una elevata KoA per i soluti a basso peso molecolare, mentre il trasporto di quelli a peso medio-alto viene generalmente penalizzato. Le capacità di adsorbimento proteico sono ridotte, caratteristica che deriva dalla scarsa emocompatibilità ma che, d'altro canto, garantisce una buona costanza di prestazioni durante il trattamento. Le principali membrane di questa categoria sono le membrane celluloseiche non modificate come il cuprofano (Cuprophan®), l'acetato di cellulosa e il diacetato di cellulosa. Il cuprofano è considerato come la madre di tutte le membrane, può essere impiegata in emodialisi standard non essendone proponibile l'impiego in trattamenti in cui sia presente la convezione a causa del modesto Kuf e dati i notevoli problemi per quanto riguarda l'emocompatibilità, per tali motivi sta cadendo in disuso nonostante il basso costo. Esistono poi membrane celluloseiche modificate come l'Hemophan® e il triacetato di cellulosa. La prima è una membrana idrofobica *low flux*, ottenuta introducendo gruppi amminici terziari in sostituzione dei gruppi idrossilici al fine di migliorarne l'emocompatibilità. La seconda invece (Solacea™ di Nipro), dal punto di vista depurativo, sembra costituire il punto di incontro fra le membrane celluloseiche (alto KoA per i soluti a piccolo peso) e le membrane sintetiche (buon KoA per i soluti a medio-alto peso), l'elevato Kuf la rende adatta alla dialisi *high-flux* (76).

Le membrane sintetiche invece sono quelle più utilizzate in ambito dialitico perché sono maggiormente biocompatibili, in quanto i gruppi

idrossilici vengono mascherati (77), e garantiscono miglior efficacia convettiva con eliminazione di sostanze a più alto peso molecolare (ad es. la β 2 microglobulina) grazie alla presenza di pori di dimensione media e concentrazione decisamente superiori rispetto alle membrane cellulose. Ad eccezione del copolimero etilvinilalcol (EVAL), le membrane sintetiche sono tutte idrofobiche, tale caratteristica è responsabile del fenomeno della *backfiltration*, presente in piccola parte durante l'emodialisi (HD) standard, mentre è rilevante nell'*high flux* HD ed ancora di più nell'emodiafiltrazione (HDF). Per questo si è cercato di aumentare le caratteristiche idrofiliche attraverso l'utilizzo di additivi e copolimeri. L'idrofobicità tuttavia è responsabile anche del caratteristico adsorbimento che rappresenta un metodo alternativo per la rimozione di sostanze medio peso molecolare come la β -2-microglobulina e di altre proteine come l'albumina e il fibrinogeno. Esempi di membrane con capacità adsorbitive sono il polimetilmetacrilato (PMMA), il poliacrilonitrile AN69 e, in forma inferiore, polisulfone.

La prima membrana per dialisi sintetica ad alta permeabilità prodotta è il poliacrilonitrile (PAN), disegnata per venire incontro alle complicanze relate al trattamento emodialitico come la vasculopatia periferica e la malnutrizione (78). Si tratta di membrane *high flux*, adatte sia per l'emodiafiltrazione che per l'emofiltrazione. Ne esistono varie versioni, PAN AN69® (Baxter), PAN Asahi, AN69ST (Baxter) in cui il PAN viene coperto da uno strato di polietilenimina (PEI) e HeparAN (*heparin-grafted* AN 69 ST ovvero Evodial).

Le membrane in polimetilmetacrilato (PMMA), prodotte dalla Toray (serie B2, B3, BG), sono membrane sintetiche asimmetriche e idrofobe, costituite da un idrogel ad elevato contenuto in acqua. Il PMMA viene utilizzato sia in emodialisi standard in trattamenti *high-flux* che in emodiafiltrazione. Le sue caratteristiche di emocompatibilità sono buone ed è in grado di rimuovere molecole a medio peso molecolare come la β 2 microglobulina e le catene leggere delle immunoglobuline (56.000 Da) quasi esclusivamente per adsorbimento (la componente diffusivo-convettiva è praticamente trascurabile). Può essere usato per ridurre l'infiammazione nei pazienti durante HD rimuovendo composti cationici

e citochine. Contribuisce anche alla conservazione della massa muscolare negli anziani (probabilmente dovuta ad una ridotta perdita di aminoacidi) e una riduzione del prurito (79).

Le membrane sintetiche in polisulfone e in poli(aril)etersulfone sono quelle con più versatilità e che hanno avuto il più grande successo sul mercato. La grande versatilità e resistenza di questo materiale ha permesso, negli anni, diverse modifiche in ambito industriale con una conseguente copertura di tutti i tipi di trattamento emodialitico. Si tratta di membrane asimmetriche idrofobiche ad alta permeabilità con buone caratteristiche di emocompatibilità, disponibili in versioni a diverso Kuf (*high-flux*, *middle-flux* e *low-flux*) e KoA e si prestano bene ad un impiego anche in terapie convettive. Tra i marchi più importanti per le membrane in polisulfone si ricordino Helixone® di Fresenius (serie FX), Toraysulfone® della Toray (disponibile solo per trattamenti *high flux*), mentre per quelle in polietersulfone si sottolineano il PEPA® (Polyester Polymer Alloy) della Nikkiso, con maggior capacità di assorbimento di proteine rispetto a tutti gli altri polisulfoni (in particolare assorbimento di β -2-microglobulina); Arylane® (poliariletersulfone + PVP) meno idrofobo e Polyamix™ della Baxter, con piccola aggiunta di poliammide. Infine il copolimero etilenvinilalcol (EVAL®) è una membrana sintetica simmetrica relativamente idrofilica, simile nella struttura e nella morfologia al Cuprophan e alle altre membrane cellulosiche, ma con buone caratteristiche di emocompatibilità, che si manifestano con una ridotta stimolazione dei processi della coagulazione rendendola adatta per trattamenti senza eparina. È classificabile come membrana a basso flusso e il suo campo di applicazione è limitato a trattamenti di tipo esclusivamente diffusivo. Si associa a minor grado di infiammazione e ridotta progressione dell'aterosclerosi, che si traduce in una riduzione degli eventi cardiovascolari nei pazienti in HD (80).

La membrana di dialisi rappresenta quindi un elemento cruciale nell'eziologia dello stato infiammatorio cronico nel paziente con ESRD a seguito di numerose sue caratteristiche, in particolare per la sua biocompatibilità e per la sua permeabilità idraulica e diffusiva. Pertanto la necessità di ottenere un trattamento sostitutivo artificiale della funzione

renale efficace in termini di rimozione delle medie molecole, implicate nell'incremento del rischio cardiovascolare e nella disfunzione immunitaria, ha portato allo sviluppo di membrane di filtri dializzatori a sempre maggiore permeabilità idraulica.

Lo sviluppo di tecniche dialitiche miste in grado di associare la componente convettiva a quella diffusiva (HDF) con membrane *high-flux*, permette di ampliare la gamma di molecole uremiche rimovibili durante il trattamento extracorporeo e in particolare ha permesso di incrementare la clearance delle medie molecole (4). Ciò è stato reso possibile dall'impiego di HDF con liquido di reinfusione *on-line* ultrapuro che consente di massimizzare il flusso convettivo durante la singola seduta dialitica a valori superiori a 20 litri per seduta mostrando benefici in termini di rimozione di medie molecole rispetto all'HD, tuttavia il dibattito sull'efficacia dell'HDF sugli *hard clinical end-point* è tuttora aperto (21, 81). I dati aggregati di quattro studi hanno confermato la superiorità dell'HDF *on line* con alti volumi convettivi (> 23 L) in termini di ridotta mortalità complessiva e in termini di mortalità cardiovascolare. Ciò tuttavia non valeva per il rischio di morte improvvisa e di morte per cause infettive (82). I pazienti con maggiore tasso di comorbidità, tuttavia, però, avevano minore probabilità di raggiungere il volume convettivo richiesto (83).

I recenti studi MPO, CONTRAST e ESHOL supportano il concetto di ampia rimozione di molecole quale fattore di miglioramento della sopravvivenza, grazie all'impiego di membrane con elevata porosità. Queste recentissime evidenze hanno portato ad una modifica delle *European Best Practice Guide* (EBPG) che indicano nell'uso delle membrane ad alto flusso la migliore sopravvivenza dei pazienti in trattamento sostitutivo cronico (81; 84,85).

L'impiego delle membrane ad alto *cut-off* (*High Cut Off*, HCO), in grado di eliminare soluti ad alto peso molecolare compresi tra 20 kDa e 50 kDa grazie all'aumento del diametro medio dei pori, ha invece trovato indicazione solo in specifiche condizioni cliniche come la nefropatia da mieloma per la rimozione delle catene leggere libere, la rabdomiolisi per la rimozione della mioglobina in pazienti con traumi e la sepsi per la

rimozione di molecole infiammatorie. Ciò è dovuto alle elevate perdite di albumina (86) che ne limitano l'uso nella dialisi in cronico.

Recentemente sono state sviluppate membrane a medio *cut-off* (*Medium Cut Off*, MCO), impiegate nella cosiddetta emodialisi *expanded*, ovvero in emodialisi standard ma con membrane *high-flux* (KUF 48 ml/h/mmHg) con *cut-off* pari a 25 KDa che presentano una gaussiana di distribuzione della dimensione dei pori stretta e allo stesso tempo vicina al limite di perdita dell'albumina senza tuttavia superarlo, che consente un'efficace rimozione delle medie molecole riducendo le perdite di albumina (4). Fa parte di questo gruppo di membrane il Theranova progettato da Baxter. L'utilizzo di tali membrane ha reso l'emodialisi standard con membrane MCO paragonabile o superiore, in termini di depurazione delle medie molecole, all'emodiafiltrazione in post-diluizione con filtri *high flux* (4,87).

In particolare Kirsch et al. hanno dimostrato che la clearance delle medie molecole è generalmente maggiore con una membrana a MCO rispetto alla HD con filtri ad alto flusso, e simile o maggiore alla clearance con HDF. La perdita di albumina risultava moderata con i filtri a MCO, ma superiore a quella con HD e HDF ad alto flusso (88).

In un recente trial randomizzato cross-over su 48 pazienti in emodialisi standard Zickler et al. hanno riscontrato un beneficio dall'impiego di una membrana a medio *cut off* rispetto alla membrana *high flux* in pazienti in emodialisi standard in termini di riduzione dell'mRNA di TNF e IL-6 in monociti circolanti e di riduzione dei livelli plasmatici di recettore solubile del TNF (sTNFR) (89).

L'emodiafiltrazione con reinfusione endogena (HFR, *Hemo Filtrate Reinfusion*) è una tecnica dialitica di ultima generazione che consente la separazione dei processi diffusivi da quelli convettivi in due diversi filtri con la simultanea produzione di un ultrafiltrato endogeno utilizzato come liquido di reinfusione. In particolare l'ultrafiltrato viene depurato mediante il passaggio attraverso una resina stirenica adsorbitiva in grado di trattenere medie molecole tra cui diverse citochine e chemochine. L'HFR non determina adsorbimento e perdita di aminoacidi da parte della cartuccia che vengono completamente reinfusi (90). È stata dimostrata

inoltre una maggiore rimozione di tossine a medio peso molecolare come leptina e beta 2 microglobulina con HFR rispetto all'emodialisi *low-flux* (91) nei pazienti in trattamento emodialitico cronico e affetti da infiammazione cronica idiopatica, il passaggio dal trattamento con bicarbonato dialisi all'HFR è associato al miglioramento dell'infiammazione (92). Il confronto con emodiafiltrazione *on-line* (OL-HDF in relazione alla capacità depurativa nei confronti dei mediatori dell'infiammazione ha tuttavia riportato risultati contrastanti (93,94).

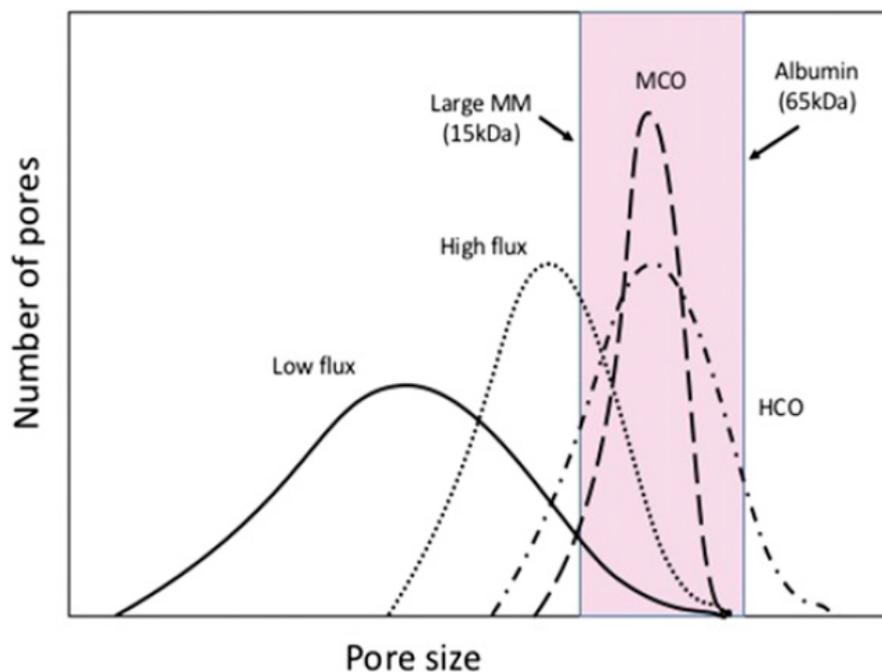


Figura 2. Misura e distribuzione dei pori membrane *low flux*, *high flux*, *medium cut off* MCO e *high cut off* HCO (4)

Membrane di dialisi e PBMCs

Come si evince da quanto esposto sino ad ora un elemento chiave dello stato infiammatorio cronico nel paziente in emodialisi è il contatto fra il sangue e membrana di dialisi (14). Tale contatto suscita una complessa risposta infiammatoria legata alla bio(in)compatibilità che coinvolge leucociti, mediatori dell'infiammazione, piastrine, sistema del complemento e fattori della coagulazione portando a flogosi, fibrosi, incremento del rischio trombotico e disfunzione della risposta immunitaria (17,71). Le interazioni membrana-sangue possono attivare

le cellule del sangue come linfociti, piastrine e globuli rossi direttamente o indirettamente attraverso il sistema del complemento o i fattori della coagulazione. Inoltre, le cellule ematiche si regolano vicendevolmente: le piastrine attivate dall'esposizione a una membrana dialitica aderiscono alla membrana e formano coaguli; legano i leucociti, attivandoli, i leucociti attivati rilasciano specie reattive dell'ossigeno attivando a loro volta le piastrine (95-97).

Carracedo et al hanno investigato l'influenza di due diversi filtri dializzatori (Cuprophane e AN69) su PBMCs rilevando una percentuale maggiore di cellule che andavano incontro a apoptosi con il filtro in cuprofano a minore biocompatibilità (98).

Uno studio crossover su 4 pazienti in emodialisi trattati con filtro con membrana semi-sintetica (Hemophan GFS plus 16) e filtro con membrana sintetica (Hemoflow FX80 Fresenius Medical Care) ha mostrato un'incrementata espressione di geni codificanti per proteine coinvolte nell'infiammazione dopo trattamento con membrana semi-sintetica. I principali geni implicati risultavano essere quelli per recettori di chemochine (*chemokine C-C motif receptor 1, formyl peptide receptor 1 e integrin beta 1 receptor*), e per proteine regolatrici (*G protein signalling 1 e 18, suppressor of cytokine signalling 3*) (99), oltre a molecole di trasduzione del segnale e a geni associati all'apoptosi suggerendo un incrementato rischio di apoptosi delle PBMCs dopo il contatto con la membrana di dialisi (4).

Rama, Llaudó et al. hanno preso in considerazione le cellule dendritiche circolanti in pazienti trattati con HD standard per 4 mesi e successivamente con HDF *on line* per ulteriori 4 mesi. Gli autori hanno riscontrato una riduzione sia del numero delle cellule dendritiche mature che della capacità di tali cellule di determinare proliferazione dei linfociti T dopo adeguata stimolazione *in vitro*. Tale riscontro rafforza la teoria che l'HDF possa giocare un ruolo immunoregolatorio rispetto all'HD standard, possibilmente mediante una più efficiente clearance dei mediatori dell'infiammazione. Inoltre in questo studio veniva valutato il profilo citochinico espresso dai linfociti T attivati, il quale risultava essere polarizzato in senso Th1 per i pazienti trattati con emodialisi

standard e polarizzato Th2 per i pazienti in emodiafiltrazione testimoniando il minore impatto di quest'ultima sulla risposta infiammatoria (56).

Libetta et al, ipotizzando un ruolo della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) dopo contatto sangue-membrana nel determinare disregolazione dell'attività macrofagica e conseguente alterazione dell'attivazione linfocitaria, hanno studiato 10 pazienti in emodialisi trattati prima con membrana cellulosa e successivamente, per 12 mesi, con membrana rivestita con vitamina E (Excebrane, Terumo, Italy). Gli autori hanno dimostrato che l'impiego della membrana rivestita con vitamina E determinava una riduzione della produzione di IL-12 e IL-18 da parte delle PBMCs e una riduzione della secrezione di IL4 e IL 10 da parte dei T CD4+ portando a un ripristino della polarizzazione in senso Th1. Inoltre nei pazienti trattati con tale membrana la produzione di IFN- γ da parte delle cellule T CD4+ stimulate era aumentata rispetto a quelli trattati con membrana cellulosa testimoniando un ripristino dell'efficacia della risposta cellulo-mediata (100).

Come riscontrato da diversi Autori (44,98) il contatto del sangue con la membrana dialitica può indurre l'apoptosi delle PBMCs con riduzione dei linfociti T CD3+ e CD4+.

Xing L., invece, ha mostrato che i T CD4+ e il rapporto T CD4+/CD8+ aumentano al termine della dialisi rispetto ai valori di inizio dialisi, sia con HDF che con HD con filtro *high flux*, per tornare progressivamente ai valori basali a distanza di 48 ore. Nessuna variazione veniva riscontrata nelle concentrazioni di CD8+. L'Autore interpretava i risultati nell'ottica di un miglioramento temporaneo della funzione immunitaria cellulare attraverso la rimozione delle tossine uremiche con il trattamento emodialitico, che tornava tuttavia a essere compromessa a 48 ore con il progressivo nuovo accumulo di tossine (101).

In conclusione profonde alterazioni quantitative e qualitative a carico delle sottopopolazioni T linfocitarie sembrerebbero associarsi al trattamento emodialitico. Tuttavia il ruolo del trattamento emodialitico stesso nella patogenesi di tale processo non è chiarito così come l'influenza dei diversi filtri dializzatori e delle diverse tecniche dialitiche.

Inoltre pochi studi in letteratura si sono concentrati sulla modifica numerica e in termini di attivazione cellulare delle sottopopolazioni linfocitarie prima e dopo la seduta emodialitica.

Oltre alle membrane dialitiche, l'accesso vascolare può svolgere un ruolo critico nella modulazione del processo infiammatorio, in particolare accessi protesici e cateteri venosi tunnellizzati costituiti da materiale sintetico. È noto come pazienti in terapia sostitutiva dialitica con tali accessi presentino, rispetto a controlli sani, ridotti livelli di albumina, livelli più elevati di proteine infiammatorie, una conta assoluta di monociti inferiore ma una maggiore espressione di marker CD14 di attivazione sulla loro superficie e, se confrontati con pazienti con fistola nativa, anche un aumento relativo del numero di monociti con fenotipo senescente (CD14+CD32+) (102). Questi risultati riflettono probabilmente una prolungata e continua esposizione a materiali sintetici che costituiscono tali accessi vascolari alternativi, capaci di determinare essi stessi una maggiore adesione e attivazione dei monociti oppure sono il frutto di una infezione subclinica (103). Tuttavia eccetto alcune esperienze isolate, non esistono studi esaustivi che descrivano il ruolo dell'accesso vascolare in corso di dialisi i leucociti.

2. SCOPO DELLO STUDIO

I pazienti affetti da malattia renale terminale in trattamento emodialitico sostitutivo sono caratterizzati da uno stato infiammatorio cronico, alla cui base sussiste una disregolazione immunitaria, con importanti conseguenze su numerosi *outcome* clinici quali l'aumento del rischio di eventi cardiovascolari e della mortalità.

L'analisi delle sottopopolazioni linfocitarie, dei monociti e delle cellule Natural Killer nei pazienti in emodialisi potrebbe contribuire alla comprensione dell'azione immunomodulatoria del trattamento emodialitico extracorporeo e allo sviluppo di strategie preventive e terapeutiche.

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'effetto della singola seduta di trattamento emodialitico e l'impatto tre diverse membrane sulla modulazione dell'immunità cellulare e innata dei pazienti in trattamento emodialitico cronico.

3. MATERIALI E METODI

Disegno dello studio

Per lo studio sono stati selezionati 35 pazienti in trattamento emodialitico cronico presso l'Unità di Nefrologia, Dialisi e Trapianto del Policlinico S. Orsola di Bologna, e 10 soggetti sani.

I pazienti selezionati hanno soddisfatto dei criteri di inclusione, ovvero un'età maggiore di 18 anni, assenza di diuresi residua, età dialitica superiore ad 1 anno, ritmo dialitico trisettimanale e fistola venosa o catetere venoso centrale con flusso sanguigno >250 ml/min.

Sono stati analizzati 3 gruppi in base al filtro utilizzato durante il trattamento terapeutico

Le caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti sono riassunte nella seguente tabella (Tabella 2). Tra pazienti sani ed emodializzati non sussistono differenze statisticamente significative per quanto riguarda l'età e il sesso. I pazienti in emodialisi sono simili per quanto concerne le comorbidità espresse come Charlson Comorbidity Score.

	Gruppo THERANOVA (tot 12)	Gruppo HFR17 (tot 11)	Gruppo Filtryzer BGU 1.6 (tot 12)	Gruppo CONTROLLI SANI (tot 10)
Età	77±16.8	71±16	71±17.3	53±5.5
Sesso (M/F)	4/8	6/5	8/4	4/6
Età dialitica (mesi)	75,45±93.6	48±46.7	57.75±87.4	
CVC/FAV	7/5	3/8	6/6	
Charlson Comorbidity Index (CCI)	7.0±3.0	7.4±3.3	7.5±3.3	
Precedente trattamento emodialitico	7 HD/5 HDFOL	6 HD/ 5 HDFOL	8 HD/ 4 HDFOL	

Tabella 2. Caratteristiche cliniche di base di tre gruppi di pazienti arruolati (n=35 pazienti con ESRD e 10 controlli sani), i valori sono espressi come media±deviazione standard

Ciascun gruppo è stato sottoposto a un trattamento della durata di 2 settimane.

In particolare il Gruppo A è stato sottoposto a emodialisi bicarbonato ad alto flusso con filtro Filtryzer BGU 1.6, il Gruppo B è stato trattato con tecnica HFR e filtro HFR17, il Gruppo C con emodialisi bicarbonato con filtro a medio *cut-off* THERANOVA.

Le caratteristiche dei filtri impiegati sono le seguenti:

- i) HFR17 (Bellco, Mirandola, Italia), un filtro a doppia camera utilizzato per l'HFR *on line*. La prima parte del filtro è costituita da un emofiltro *high flux* di polifenilene con un Kuf di 28 ml/h/mmHg, una superficie di 0,7 m² e un valore di *cut-off* della membrana di 35.000 dalton. L'ultrafiltrato passa poi a una resina stirenica neutra di 40 g che consente un'area adsorbente di 28.000 m². Dopo adsorbimento, l'ultrafiltrato viene aggiunto al sangue intero che, a sua volta, passa nel secondo filtro HFR17, a basso flusso, di polifenilene (Kuf 13 ml/h/mmHg, superficie 1,7 m²) dove avvengono la perdita di acqua libera corporea e la depurazione per diffusione.
- ii) Filtryzer BGU 1.6 (Toray, Tokyo, Giappone) membrana di polimetilmetacrilato o PMMA, *high flux* (Kuf di 26 ml/h/mmHg) con una superficie di 1.6 m² e *cut-off* di 20.000 dalton.
- iii) THERANOVA (Baxter, Heichingen, Germania) membrana di poliariletersulfone and polivinilpirrolidone, *high flux* e *MCO* con una superficie di 1,7 m², sterilizzazione a vapore, un valore di *cut-off* della membrana di 25000 daltons e un Kuf di 48 ml/h/mmHg.

Le prime 4 sedute sono state considerate come periodo di wash-out tra il consueto trattamento emodialitico dei pazienti arruolati e l'inizio dello studio. La sessione di dialisi di controllo è stata la quinta seduta (seconda seduta della seconda settimana). I prelievi ematici per la valutazione delle sottopopolazioni linfocitarie circolanti sono stati eseguiti all'inizio della dialisi (T0), alla fine della dialisi (T1) e all'inizio della seduta dialitica successiva (T2). Lo schema dello studio è riassunto nella Figura 3.

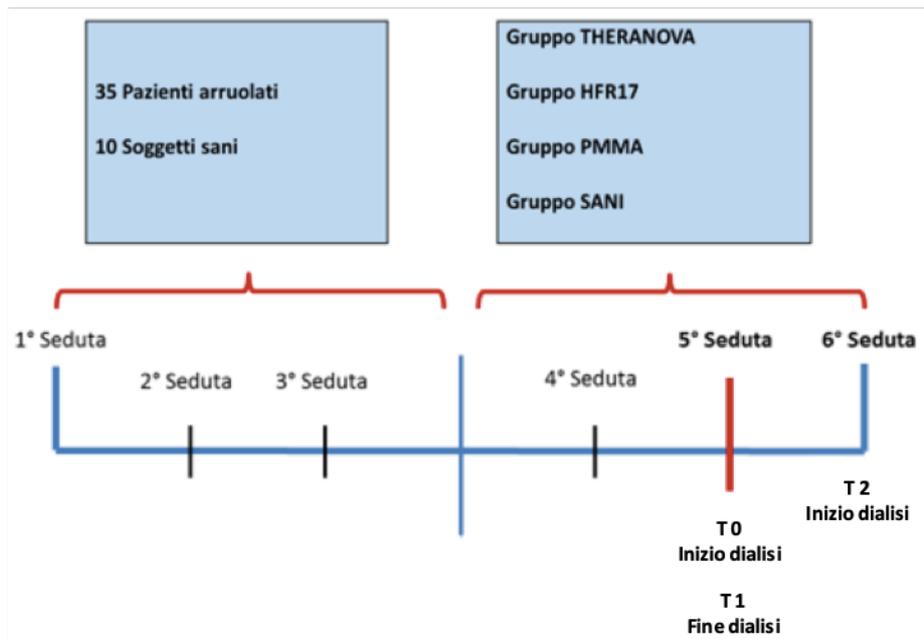


Figura 3. Schema dello studio.

Tutte le sessioni di dialisi sono durate quattro ore. La portata media del sangue era di 278 ± 25 ml/min, la velocità media di ultrafiltrazione era di 590 ± 194 ml/h. Il flusso del dialisato era di 500 ml/min.

L'eparinizzazione del circuito e del filtro è stata ottenuta mediante la somministrazione di un bolo singolo all'inizio della dialisi di eparina a basso peso molecolare enoxaparina (Clexane®, Sanofi, Milano Italia) in una dose scelta in base al peso corporeo (2000 UI per i pazienti di peso corporeo <50 kg, 4000 UI tra 50 e 90 kg, o 6000 UI > 90 kg).

Cellule mononucleate umane

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) sono state arricchite, partendo da sangue periferico, tramite il gradiente di centrifugazione su gradiente di densità in Ficoll Paque (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). Il prelievo ematico di partenza era costituito da circa 20 ml di sangue periferico raccolto in provette Vacutainer contenenti EDTA.

Analisi citofluorimetrica

L'analisi citofluorimetrica è stata utilizzata per definire e quantificare le varie sottopopolazioni linfocitarie e il potere proliferativo. La

caratterizzazione fenotipica è stata determinata mediante marker di superficie (CD4, CD8, CD3, CD45, CD16, CD 25, CD56, CD16 e CD57). Per la quantificazione delle citochine intracellulari IL17, IFN- γ , il fattore di trascrizione FoxP3 e la proteina nucleare Ki67, le PBMC ottenute sono state fissate e permeabilizzate utilizzando Inside Stain Kit (Milteny Biotech).

Le cellule, per la marcatura di superficie, sono state incubate per 30 minuti in ghiaccio con i seguenti anticorpi: CD4-APC (Biolegend, Cat 300514), CD8-PerCP (BD, 345774), CD25 FITC (Biolegend, Cat 302604), multitest: CD3-FITC/CD16-PE+CD56-PE/CD45PerCP/CD19-APC (BD, Cat 340500), simultest: CD57-FITC/CD8-PE (BD, Cat 333191).

Per la quantificazione di citochine intracellulari una frazione di cellule mononucleate isolate è stata coltivata in piastre da 96 pozzetti in terreno di coltura completo. Sono stati aggiunti per 4 ore prima dell'inizio dello staining una miscela di PMA (1nM), ionomicina (3mg/ml) e Golgi Plug (1ul/ml), ed incubata a 37 °C al 5% di CO₂.

La marcatura intracellulare è stata eseguita, dopo fissazione e permeabilizzazione, per 30 minuti in ghiaccio con anticorpi: IFN- γ - PECy7 (Biolegend, Cat 502528), IL17A-PE (Biolegend, Cat 512306), FoxP3-PE (Biolegend, Cat 320108) e Ki67 FITC (BD, Cat 556026).

Cellule marcate con controlli isotipici e privi di anticorpi sono state usate come controlli negativi di fluorescenza.

Sono stati acquisiti 100.000 eventi per provetta utilizzando un citofluorimetro Cytotflex S (Beckman Coulter). L'analisi dei dati è stata effettuata tramite il software dedicato, Cytobank, Inc.

Proliferaazione cellulare con CFSE

La proliferazione di PBMC, nei vari tempi analizzati è stata misurata tramite la valutazione della diminuzione dell'intensità di fluorescenza del CFSE ovvero *Carboxyfluorescein Succinimidyl ester* (BD, Cat 51-9010817). Il CFSE si intercala a livello del DNA. In particolare, formando un legame tra il gruppo succinimidico del CFSE e i residui amminici del DNA, in particolare di lisina.

Le PBMCs sono state scongelate e risospese in 5 ml di PBS 1X (Phosphate-buffered saline), ed incubate con 1 µl di CFSE per 5 minuti a 37°. Terminata e bloccata la reazione di marcatura, le cellule sono state risospese in terreno di cultura RPMI 1640 integrato con 2 mM L-glutamina (EuroClone, Cat ECB3000D), 1% di siero umano AB (EuroClone, Cat ECS0219D), 100 U/ml di penicillina-streptomicina (Aurogene, Cat AU-L0022-100), 0,1% di b-Mercaptoetanololo (Gibco, Cat 31350-010), 1% di sodio piruvato (Aurogene, Cat AU-L0642-500), 1% di amminoacidi non essenziali (Aurogene, AU-X0557-100). Le cellule sono state attivate tramite anticorpi CD3 (Invitrogen, Cat 16-0039-85) e CD28 (Invitrogen, Cat 16-0289-85), e incubate per 3 giorni in piastre da 96 pozzetti a 37° al 5% di CO₂. Dopo l'incubazione per verificare la proliferazione di CD4 e CD8 le cellule sono state raccolte, marcate con anticorpi specifici, e preparate per l'analisi citofluorimetrica.

Saggio dell'Annessina V

Il saggio consente di rilevare lo stadio precoce e tardivo di apoptosi e di distinguere l'apoptosi dalla necrosi in citofluorimetria. Le PBMCs dei pazienti, sono state risospese in 100 µl di buffer specifico, presente nel kit annessina V, e marcate con 2 µl di annessina V coniugata PE (Biolegend, Cat 640908) e 7AAD+ (Biolegend, Cat 79993) e incubati per 15 minuti a temperatura ambiente. In questo modo le cellule positive solo all'annessina vengono classificate in cellule in apoptosi precoce. Quelle positive al 7AAD+ vengono distinte come cellule in necrosi, e quelle positive ad entrambi in cellule in apoptosi tardiva. Dopo l'incubazione la reazione è stata bloccata con 400 µl di buffer e i risultati acquisiti tramite citofluorimetro Cytotflex S (Beckman Coulter). L'analisi dei dati è stata effettuata tramite il software dedicato, Cytobank, Inc.

Analisi Statistica

L'analisi dei dati ottenuti è stata effettuata tramite il software GraphPad Prism (versione 5 per Windows; GraphPad Software, Inc.). La comparazione tra differenti gruppi studio e la componente sana volontaria, è stata effettuata tramite t-test. Le differenze tra i parametri

presi in considerazione sono state ritenute statisticamente significative con $p < 0,05$. I risultati sono espressi come media \pm errore standard.

4. RISULTATI

4.1 PBMC nei pazienti affetti da malattia renale terminale in trattamento emodialitico, confronto con i volontari sani

La tipizzazione linfocitaria è stata effettuata in pazienti affetti da malattie renale allo stadio terminale, isolando PBMC al T0 ovvero all'inizio della quinta sessione dialitica presa dello studio. La caratterizzazione citofluorimetrica ha permesso di evidenziare le differenze e il potere proliferativo delle PBMC e delle sottopopolazioni linfocitarie provenienti da tutti e tre i differenti gruppi trattati con diversi filtri, a confronto con un gruppo di volontari sani.

La prima analisi era volta a valutare la quantità dei linfociti T, attraverso caratterizzazione del CD3+, e la loro sopravvivenza attraverso marcatura con AnessinaV, confrontando il gruppo in dialisi al T0 con i volontari sani. (Figura 4A e 4B). I dati mostrano che i linfociti T CD3+ nei pazienti in dialisi risultano significativamente diminuiti rispetto al gruppo dei volontari sani (Figura 5A). Per studiare l'effetto sulla sopravvivenza cellulare, i PBMC sono stati marcati con Annessina V e 7AAD+ (Fig. 5B), mostrando un aumento significativo dell'apoptosi dei pazienti sottoposti a trattamento emodialitico. L'analisi è stata eseguita su un campione ristretto di 11 pazienti per motivi tecnici.

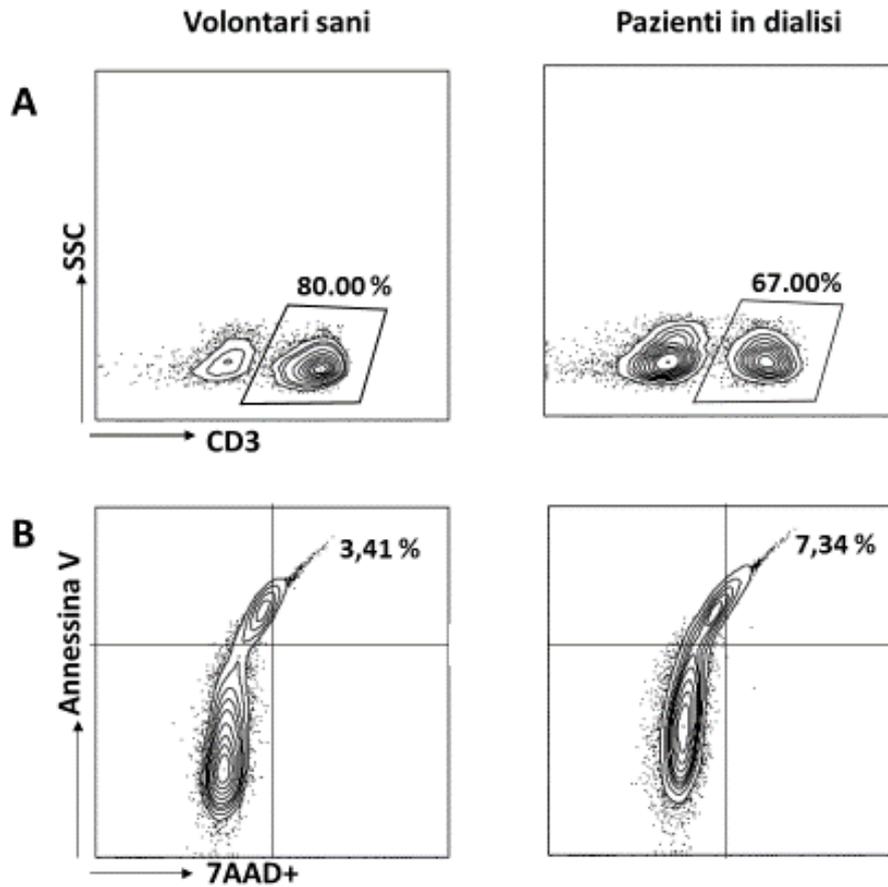


Figura 4. Figura esemplificativa plot citofluorimetrici di popolazione linfocitaria T CD3+ in volontari sani e pazienti in dialisi (A). Plot citofluorimetrici dei linfociti T CD3+ apoptotici (AnnexinV+/7AAD+) in volontari sani e pazienti in dialisi (B).

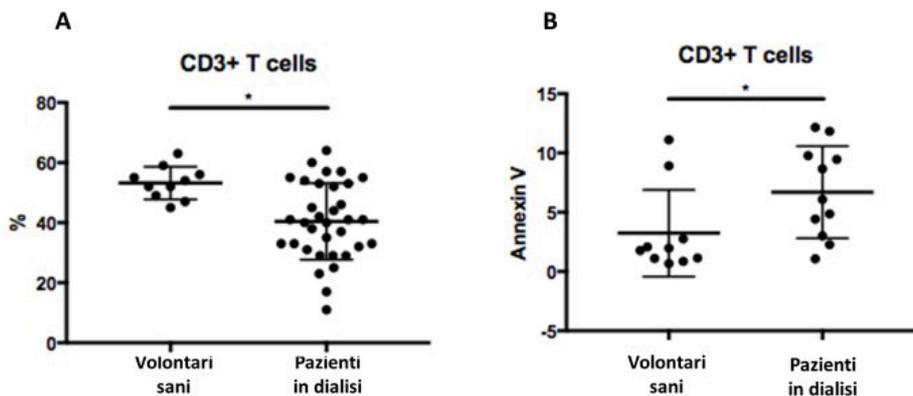


Figura 5. Rappresentazione grafica della popolazione linfocitaria T CD3+ in volontari sani e pazienti in dialisi (A). Rappresentazione grafica del processo apoptotico dei linfociti T CD3+ in volontari sani e in pazienti in dialisi (B).

Al tempo T0 sono stati quantificati i linfociti T CD4+ tramite citofluorimetria sui PBMC e su questa stessa popolazione è stata valutata

l'attività secretoria di IFN- γ . L'immagine (Figura 6) mostra il confronto con il gruppo dei volontari sani. La Figura 7A mostra come non sia presente una differenza significativa tra il numero dei linfociti T CD4+ dei pazienti in dialisi e il gruppo sano in assenza di una differenza significativa anche nell'attività secretoria di IFN- γ nei pazienti in dialisi rispetto ai volontari sani (Figura 7B).

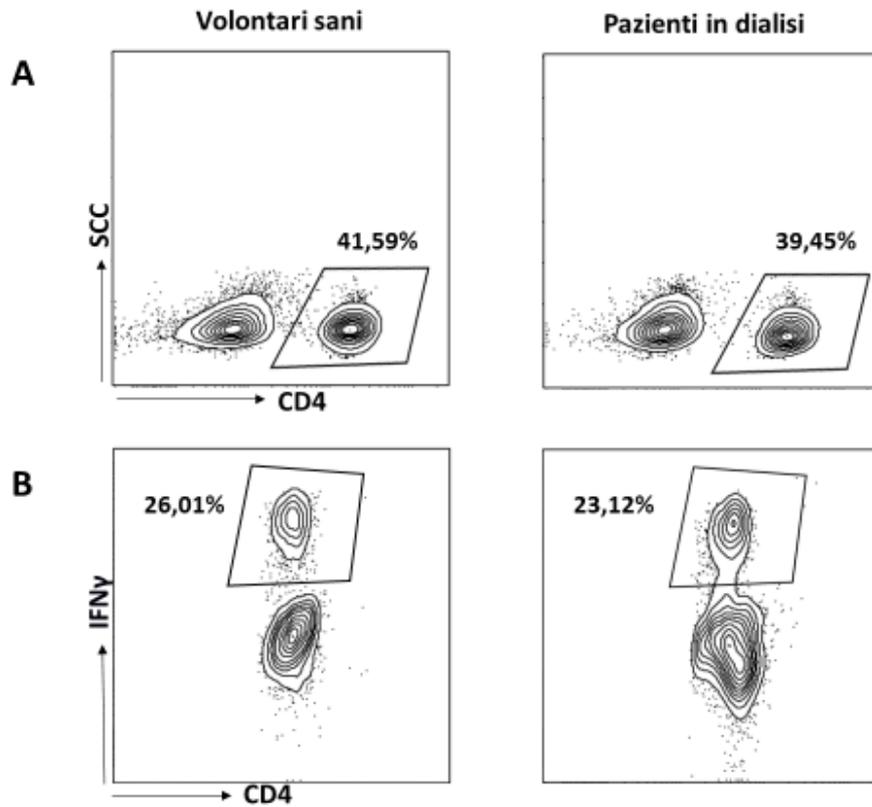


Figura 6. Figura esemplificativa di plot citofluorimetrici di popolazione linfocitaria T CD4+ in volontari sani e pazienti in dialisi (A). Plot citofluorimetrici della produzione di IFN- γ dei linfociti T CD4+ in volontari sani e pazienti in dialisi (B).

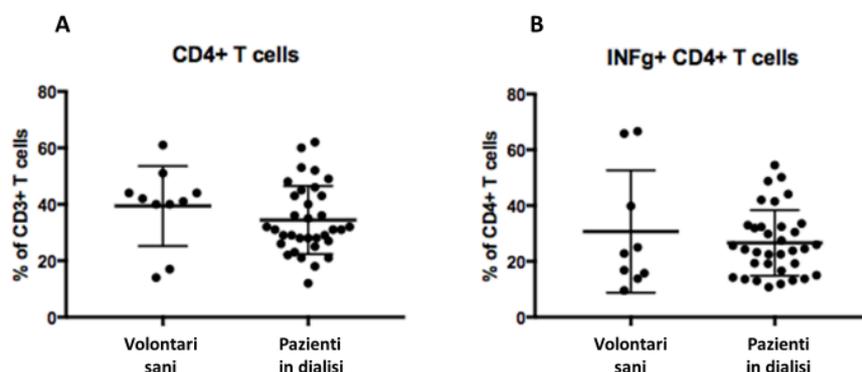


Figura 7: Rappresentazione grafica della popolazione linfocitaria T CD4+ in volontari sani e pazienti in dialisi (A). Rappresentazione grafica della produzione di IFN- γ dei linfociti T CD4+ in volontari sani e pazienti in dialisi (B).

Sono state poi analizzate, con saggio citofluorimetrico, le linee cellulari Treg (CD4+, CD25+ e FoxP3+) e Th17 (CD4+ e IL-17+) (Figura 8).

La Figura 9 mostra come tra i pazienti in dialisi e il gruppo di volontari sani non esista una differenza statisticamente significativa nella percentuale di linfociti Treg (A) mentre il trattamento dialitico comporta un aumento significativo di Th17 rispetto al gruppo sano (B). Pertanto il rapporto Treg e Th17 (Figura 10) si riduce in maniera significativa nei pazienti in dialisi rispetto al gruppo dei sani a causa dell'aumento delle Th17 a fronte di una mancata differenza nelle Treg.

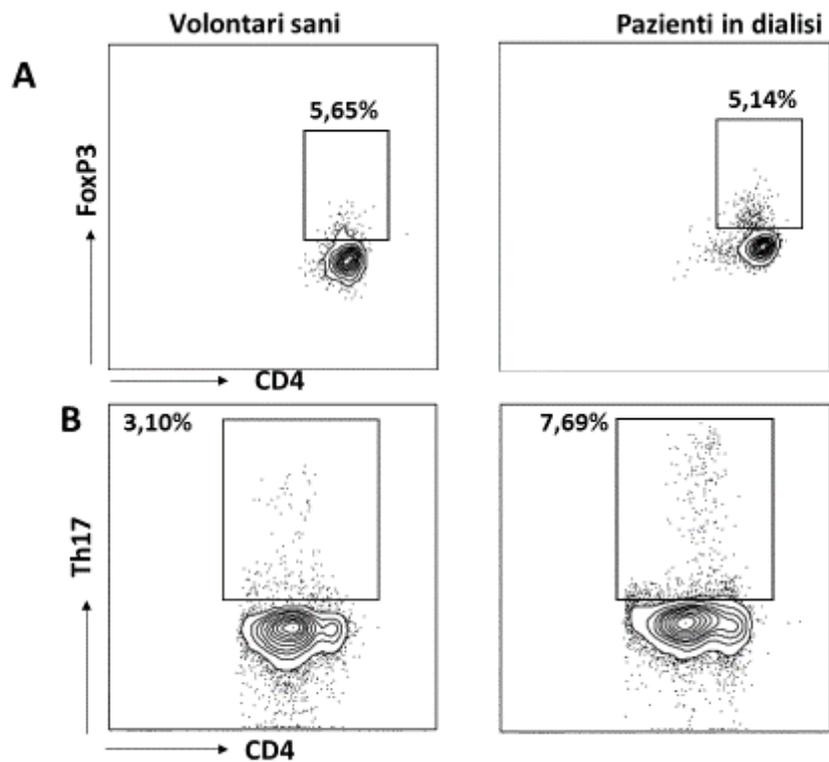


Figura 8. Figura esemplificativa di plot citofluorimetrici di popolazione linfocitaria Treg in volontari sani e pazienti in dialisi (A). Plot citofluorimetrici di popolazione linfocitaria Th17 in volontari sani e pazienti in dialisi (B).

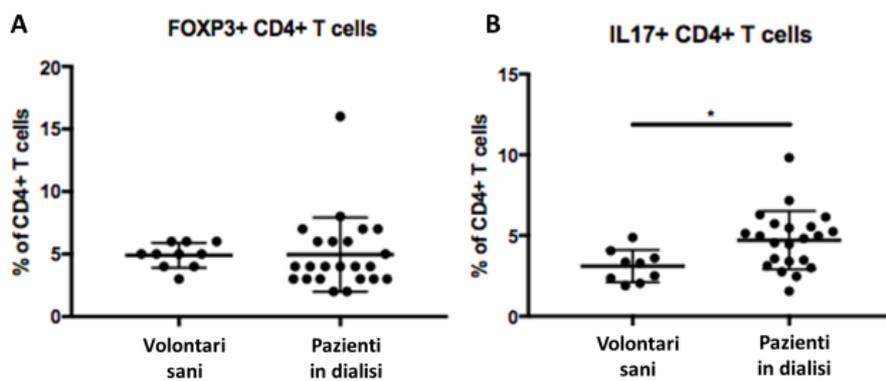


Figura 9. Rappresentazione grafica di popolazione linfocitaria Treg in volontari sani e pazienti in dialisi (A). Rappresentazione di popolazione linfocitaria Th17 in volontari sani e pazienti in dialisi (B).

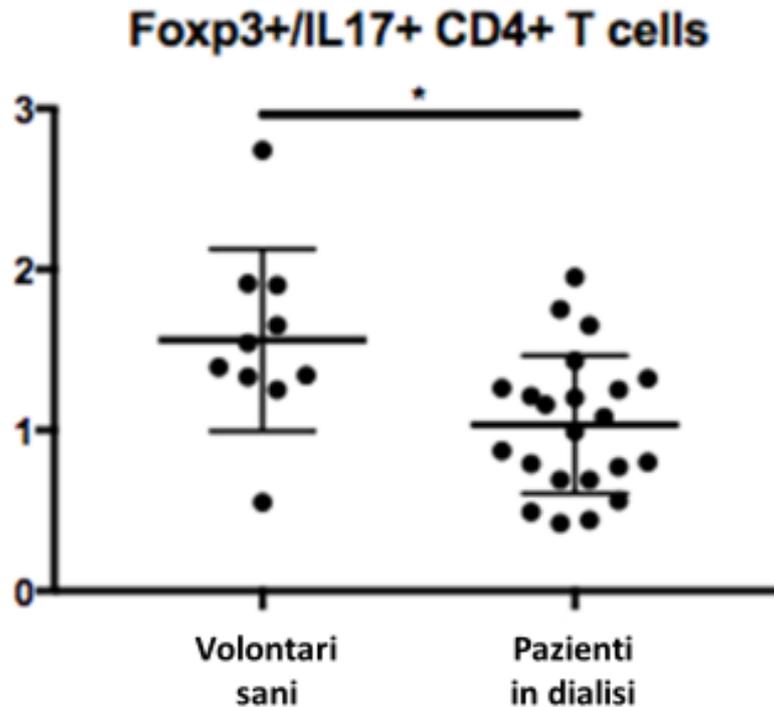


Figura 10. Rappresentazione grafica del rapporto tra la popolazione linfocitaria Treg e Th17 in volontari sani e pazienti in dialisi.

Analogamente a quanto eseguito sui linfociti CD4+, la valutazione quantitativa dei linfociti T CD8+ è stata effettuata nei pazienti in dialisi tramite citofluorimetria su PBMC al tempo T0 e al gruppo controllo sano e ne è stata valutata l'attività secretoria per l'IFN- γ (Figura 11). I dati mostrano che non è presente una differenza significativa nella percentuale di linfociti T CD8+ presenti nei pazienti in dialisi rispetto al gruppo di controllo dei volontari sani (Figura 12A) e anche la capacità secretoria dei linfociti CD8+ non muta significativamente tra i pazienti in dialisi e il gruppo controllo (Figura 12 B).

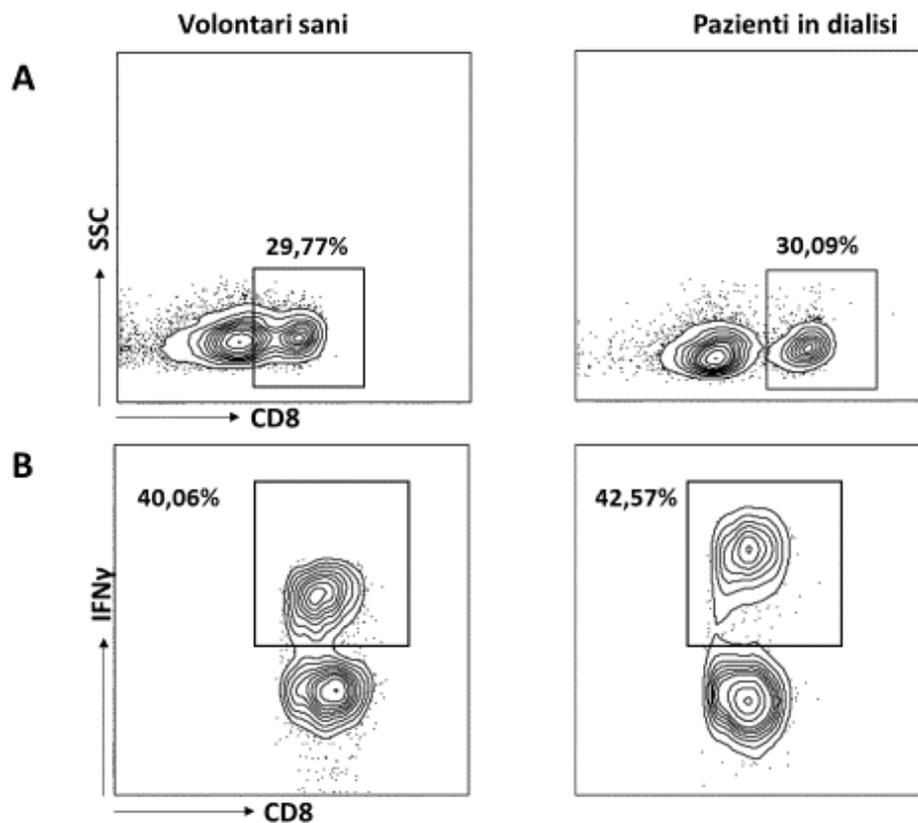


Figura 11. Figura esemplificativa di plot citofluorimetrici di popolazione linfocitaria T CD8+ in volontari sani e pazienti in dialisi (A). Plot citofluorimetrici della produzione di IFN- γ dei linfociti T CD8+ in volontari sani e pazienti in dialisi (B).

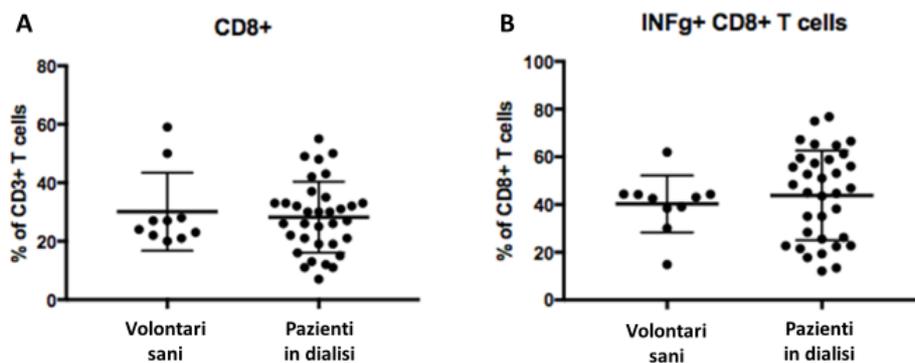


Figura 12. Rappresentazione grafica della popolazione linfocitaria T CD8+ in volontari sani e pazienti in dialisi (A). Rappresentazione grafica della produzione di IFN- γ dei linfociti T CD8+ in volontari sani e pazienti in dialisi (B).

Sulla base delle analisi effettuate per le popolazioni linfocitarie T CD4+ e CD8+ nei pazienti in dialisi e nel gruppo di volontari sani è stato effettuato il rapporto tra queste due popolazioni (Figura 13) che non ha mostrato differenze.

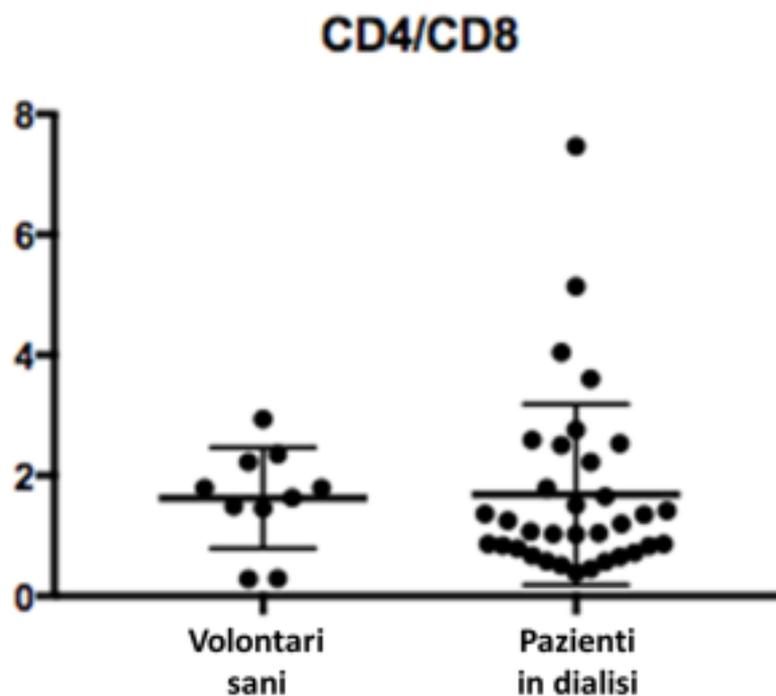


Figura 13. Rappresentazione grafica del rapporto tra la popolazione linfocitaria T CD4+ e CD8+ in volontari sani e pazienti in dialisi.

Per valutare la capacità proliferativa dei linfociti CD4+ e CD8+ in pazienti in dialisi al T0 e nel gruppo controllo, è stato effettuato il saggio di proliferazione cellulare con CFSE (Figura 14) che mostra come il trattamento emodialitico non alteri in maniera significativa la capacità proliferativa dei linfociti T CD4+ (Figura 15A) e CD8+ (Figura 15B) rispetto al gruppo di controllo sano.

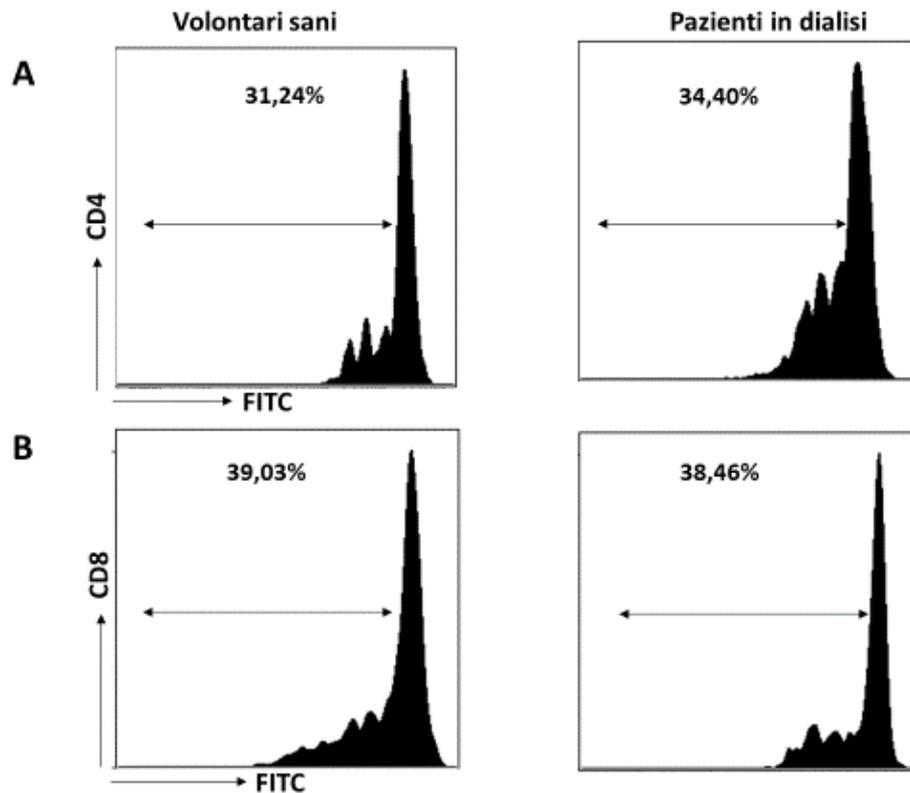


Figura 14. Figura esemplificativa di plot citofluorimetrici della proliferazione di popolazione linfocitaria T CD4+ (A) e CD8+(B) in volontari sani e pazienti in dialisi.

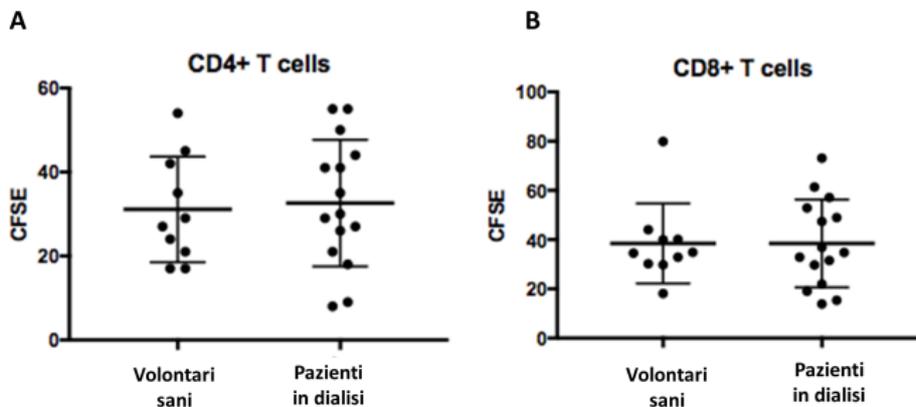


Figura 15. Rappresentazione grafica della proliferazione di popolazione linfocitaria T CD4+ (A) e CD8+ (B) in volontari sani e pazienti in dialisi.

Inoltre è stata caratterizzata mediante citofluorimetria la popolazione linfocitaria T CD8+ esprimente il marker di senescenza CD57+ (Figura 16), tipico dei linfociti cronicamente stimolati con riduzione del potere replicativo. I dati mostrano che la dialisi aumenta significativamente la popolazione CD8+ esprimente il marker CD57+ rispetto ai volontari sani (Figura 17A), in assenza di una alterata secrezione di IFN- γ rispetto alla

produzione citochinica linfocitaria riscontrata nelle stesse cellule proveniente dai volontari sani (Figura 17B).

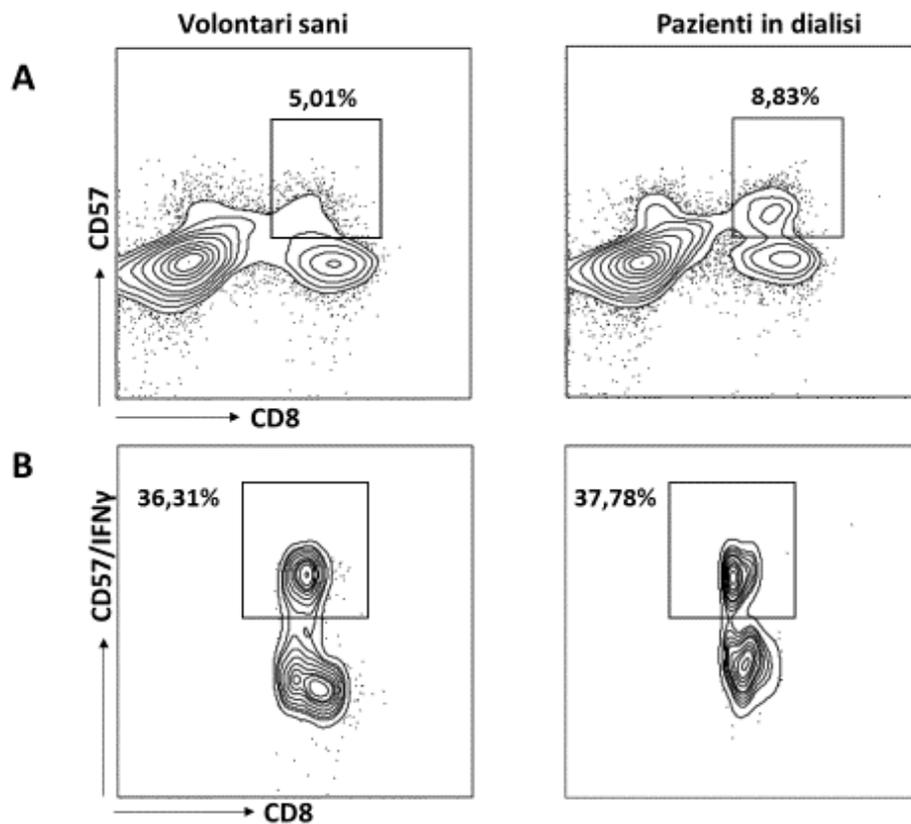


Figura 16. Figura esemplificativa di plot citofluorimetrici di popolazione linfocitaria T CD8+CD57+ in volontari sani e pazienti in dialisi (A). Plot citofluorimetrici della produzione di IFN- γ dei linfociti T CD8+CD57+ in volontari sani e pazienti in dialisi (B).

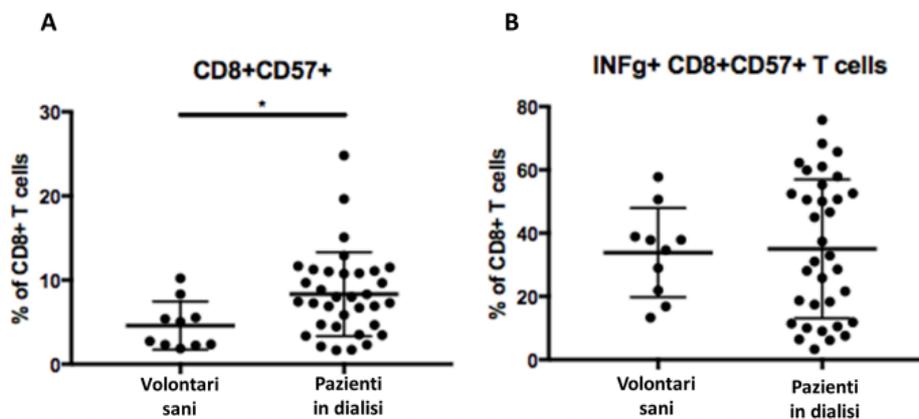


Figura 17. Rappresentazione grafica di popolazione linfocitaria T CD8+/CD57+ in volontari sani e pazienti in dialisi (A). Rappresentazione grafica della produzione di IFN- γ dei linfociti T CD8+/CD57+ in volontari sani e pazienti in dialisi (B).

Oltre ai linfociti T sono stati analizzati i linfociti B e i Natural Killer. Al tempo T0 dello studio sono stati analizzati tramite citofluorimetria i PBMC dei soggetti in esame (Figura 18) e nei pazienti in dialisi c'è una significativa riduzione dei linfociti B rispetto ai volontari sani (Figura 19A), mentre le cellule Natural Killer (Figura 19B) aumentano significativamente nei pazienti in dialisi rispetto al gruppo dei sani.

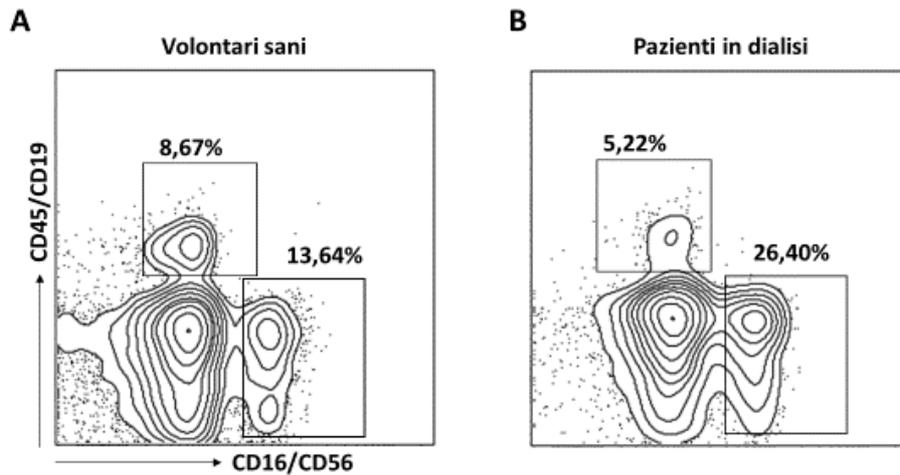


Figura 18. Figura esemplificativa di plot citofluorimetrici di popolazione linfocitaria B e Natural Killer T in volontari sani e pazienti in dialisi.

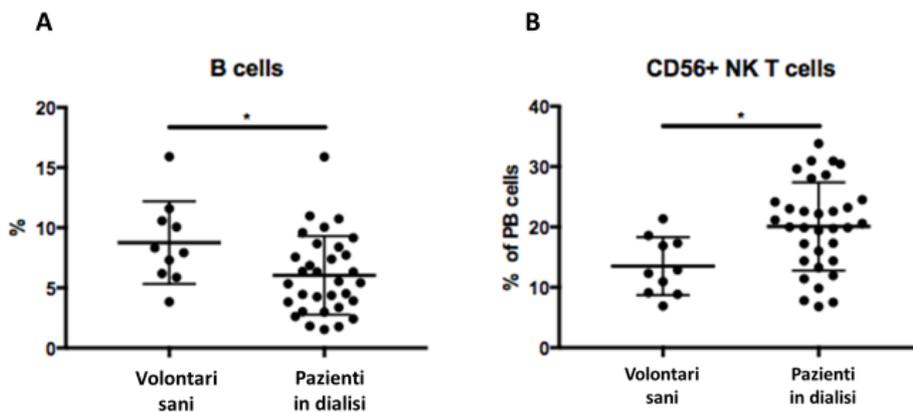


Figura 19. Rappresentazione grafica di popolazione linfocitaria B (A) e Natural Killer T (B) in volontari sani e pazienti in dialisi.

Nel pool dei PBMC, i monociti possono mostrare differenze morfologiche per ciò che concerne: dimensioni, granulosità, caratteristiche nucleari e espressione dei marker di membrana CD14 e CD16. Partendo dai PBMC totali e tramite saggio citofluorimetrico sfruttandone le caratteristiche fisiche, sono stati caratterizzati i monociti,

in pazienti in dialisi al T0 e nel gruppo controllo (Figura 20), nella Figura 21 sono mostrate le percentuali di monociti nei volontari sani e nei pazienti in dialisi e queste non presentano alcuna differenza significativa.

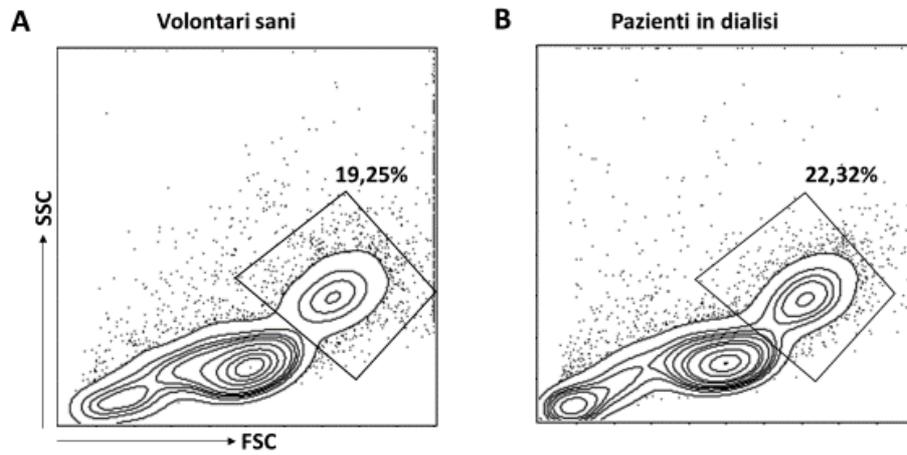


Figura 20. Figura esemplificativa di plot citofluorimetrici di popolazione monocitaria in volontari sani e pazienti in dialisi.

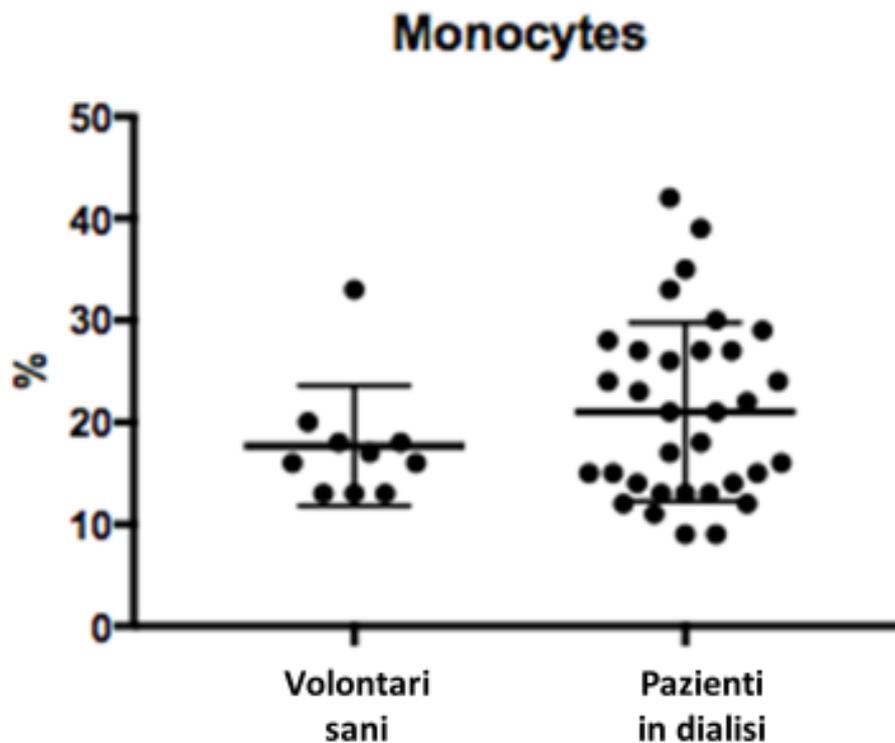


Figura 21. Rappresentazione grafica di popolazione monocitaria in volontari sani e pazienti in dialisi.

4.2 PBMC nei pazienti affetti da malattia renale terminale in corso di seduta emodialitica

I pazienti inclusi nello studio sono stati 35 e tutti hanno portato a termine il periodo di osservazione. La tipizzazione linfocitaria è stata effettuata in pazienti affetti da ESRD isolando PBMC ai tempi: T0 equivalente all'inizio della quinta seduta dialitica; T1 corrispondente al prelievo a fine della seduta e T2 prelievo prima dell'inizio della seduta successiva ovvero la sesta. Le analisi sono state eseguite sui PBMC provenienti dai 3 differenti gruppi trattati con i diversi filtri.

Per prima cosa è stata valutata la quantità dei linfociti T, attraverso caratterizzazione del CD3+, e la loro sopravvivenza attraverso marcatura con AnessinaV, durante il singolo trattamento emodialitico al tempo T0, T1 e T2 (Figura 22 e 23). La Figura 24A evidenzia come al T1, ovvero a fine della seduta dialitica, la percentuale dei linfociti CD3+ subisca un calo significativo, rispetto ai linfociti T presenti prima dell'inizio della dialisi, aumentando, anche se non significativamente al T2. Parallelamente (Figura 24B), anche se non in maniera significativa, vi è sempre al T1 un aumento dei livelli di apoptosi dei linfociti CD3+, rispetto al T0. Questi recuperano al T2, con un calo dell'apoptosi.

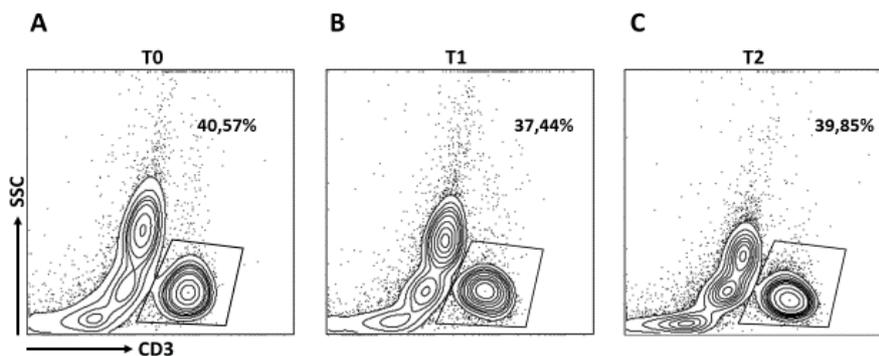


Figura 22. Figura esemplificativa di plot citofluorimetrici di popolazione linfocitaria T CD3+ in pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta (A); T1 fine quinta seduta (B); e T2 inizio sesta seduta (C).

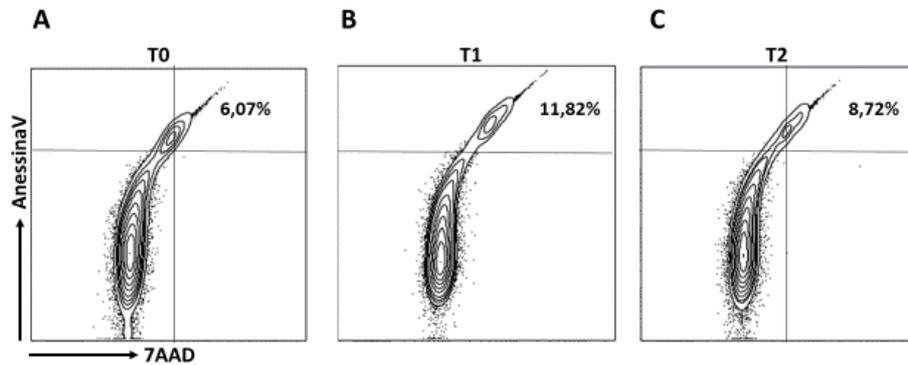


Figura 23. Figura esemplificativa di plot citofluorimetrici di popolazione linfocitaria T CD3+apoptotiche in pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta (A); T1 fine quinta seduta (B); e T2 inizio sesta seduta (C).

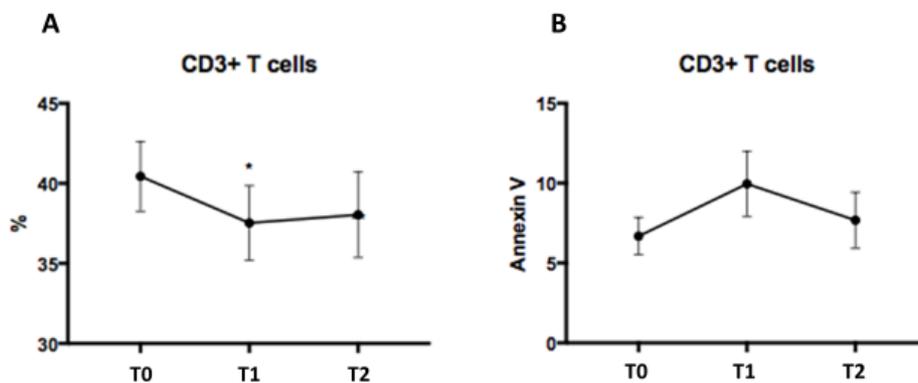


Figura 24. Rappresentazione grafica di popolazione linfocitaria T CD3+ (A) e di cellule CD3+apoptotiche(B) in pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta; T1 fine quinta seduta; e T2 inizio sesta seduta.

Successivamente sono stati quantificati i linfociti T CD4+ (Figura 25) e il loro potere proliferativo (Figura. 26), ai tempi T0, T1 e T2. Su questa stessa popolazione è stata valutata l'attività secretoria di IFN- γ (Figura 27). I dati mostrano che nel post dialisi, ovvero al T1 è presente un significativo aumento dei linfociti T CD4+ (Fig. 28A) rispetto al T0. In parallelo aumentano significativamente i livelli di proliferazione di linfociti T CD4+ (Fig. 28B). L'analisi della produzione di IFN- γ da parte dei linfociti T CD4+ ha rilevato una diminuzione dei valori di IFN- γ al T2, ma il dato non ha significatività (Fig. 28C).

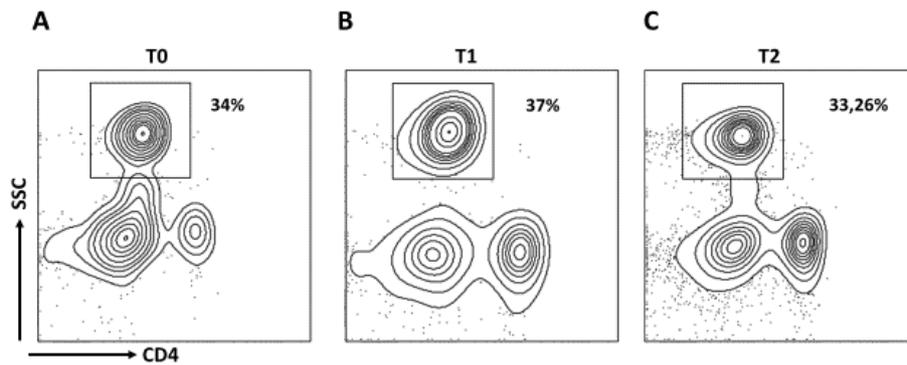


Figura 25. Figura esemplificativa di plot citofluorimetrici di popolazione linfocitaria T CD4+ in pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta (A); T1 fine quinta seduta (B); e T2 inizio sesta seduta (C).

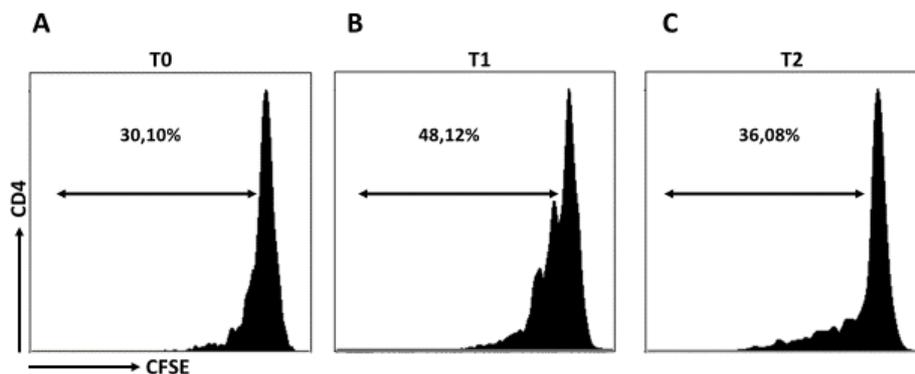


Figura 26. Figura esemplificativa di plot citofluorimetrici della proliferazione di popolazione linfocitaria T CD4+ in pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta (A); T1 fine quinta seduta (B); e T2 inizio sesta seduta (C).

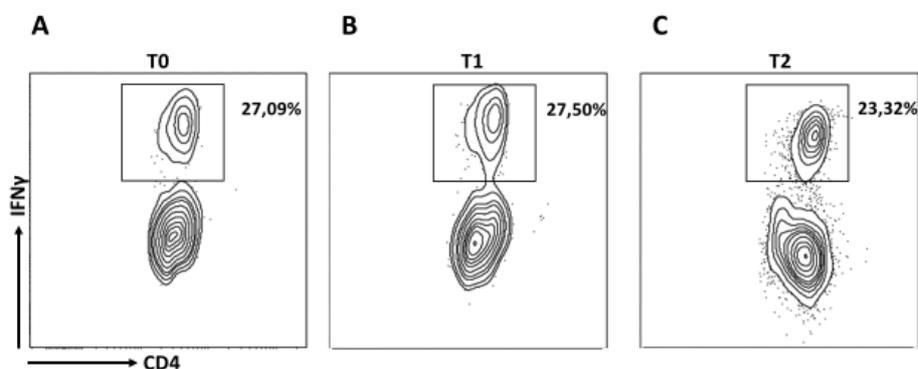


Figura 27. Figura esemplificativa di plot citofluorimetrici della produzione di IFN- γ da parte della popolazione linfocitaria T CD4+i n pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta (A); T1 fine quinta seduta (B); e T2 inizio sesta seduta (C).

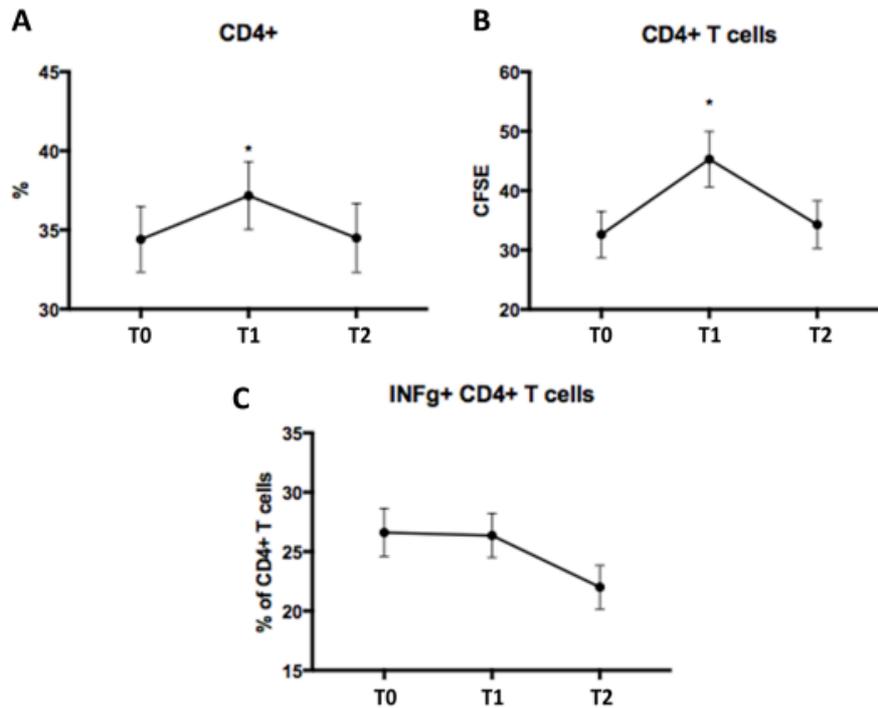


Figura 28. Rappresentazione grafica di popolazione linfocitaria T CD4+ (A), della proliferazione delle cellule T CD4+ (B), e della produzione di IFN- γ da parte dei linfociti CD4+ (C) in pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta; T1 fine quinta seduta; e T2 inizio sesta seduta.

Sono state poi valutate con analisi citofluorimetrica le Treg (CD4+, CD25+ e FoxP3+) (Figura 29) e le Th17 (CD4+ e Il-17) (Figura 30) ai tre tempi, con riscontro di una significativa diminuzione della percentuale dei linfociti Treg al T2, ovvero all'inizio della sesta seduta dialitica (Figura 31A). Le Th17 tendono a diminuire progressivamente dal T0 al T2, ma non in modo significativo (Figura 31B).

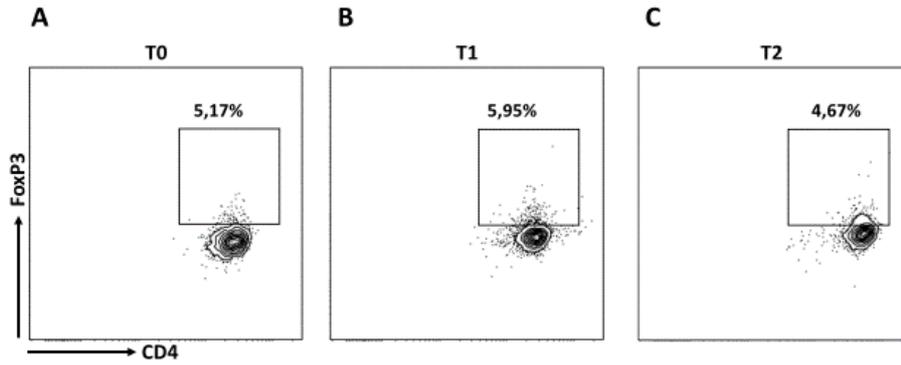


Figura 29. Figura esemplificativa di plot citofluorimetrici di popolazione linfocitaria Treg in pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta (A); T1 fine quinta seduta (B); e T2 inizio sesta seduta (C).

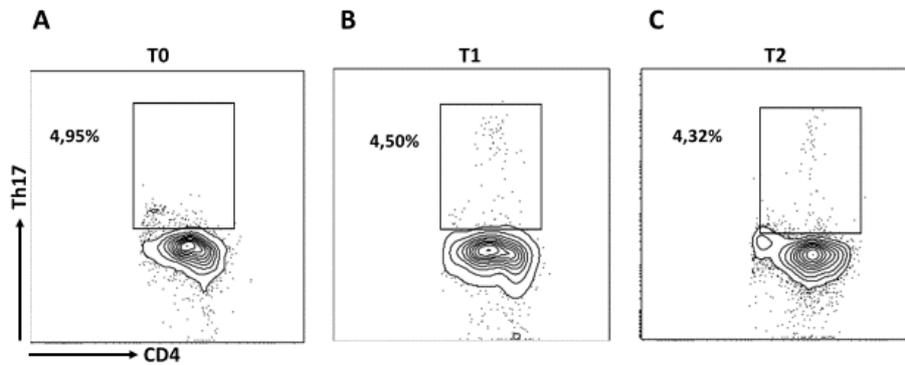


Figura 30. Figura esemplificativa di plot citofluorimetrici di popolazione linfocitaria Th17 in pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta (A); T1 fine quinta seduta (B); e T2 inizio sesta seduta (C).

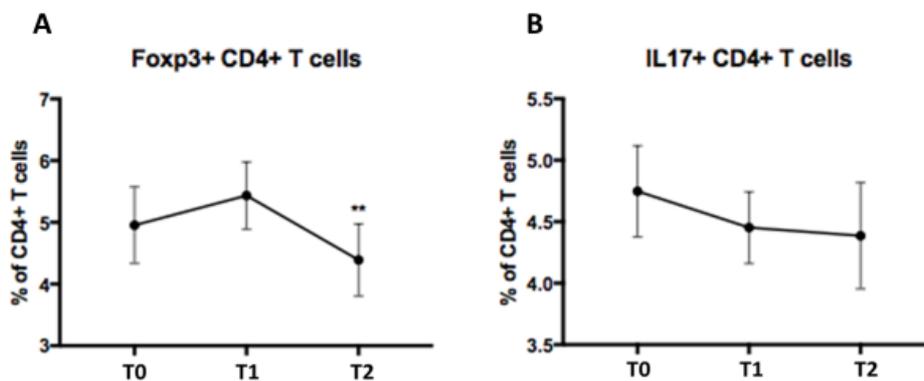


Figura 31. Rappresentazione grafica di popolazione linfocitaria Treg (A) e Th17 (B) in pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta; T1 fine quinta seduta; e T2 inizio sesta seduta.

Per quanto concerne il rapporto Treg/Th17 si può riscontrare un aumento significativo del rapporto al T1 rispetto al T0, con successivo calo al T2 che tuttavia non appare significativo rispetto al T1 (Figura 32).

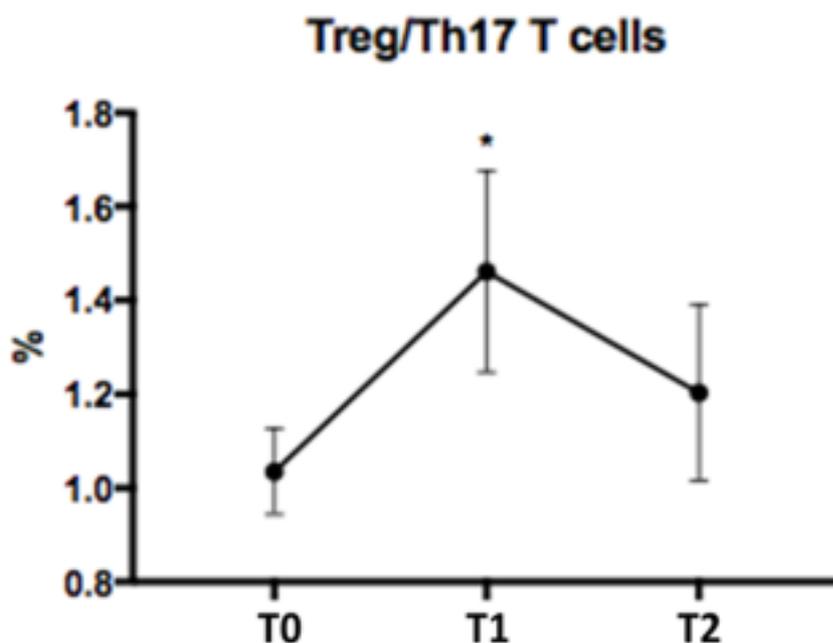


Figura 32. Rappresentazione grafica del rapporto tra le popolazioni linfocitarie Treg e Th17 in pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta; T1 fine quinta seduta; e T2 inizio sesta seduta.

Sono stati poi quantificati i linfociti T CD8⁺ (Figura 33) e il loro potere proliferativo (Figura. 34), ai tempi T0, T1 e T2. Su questa stessa popolazione è stata valutata l'attività secretoria di IFN- γ (Figura 35). Nella Figura 36A si osserva una diminuzione significativa della percentuale dei linfociti T CD8⁺ nei pazienti in dialisi al tempo T1, il post dialisi, e T2, l'inizio della sesta seduta dialitica. A quest'ultimo tempo risulta anche un calo significativo della produzione di IFN- γ da parte dei linfociti T CD8⁺ (Figura 36C). Si riscontra anche un aumento proliferativo dei linfociti T CD8⁺ al T1, con un successivo calo proliferativo al T2 (Figura 36B), questi dati tuttavia non raggiungono la significatività.

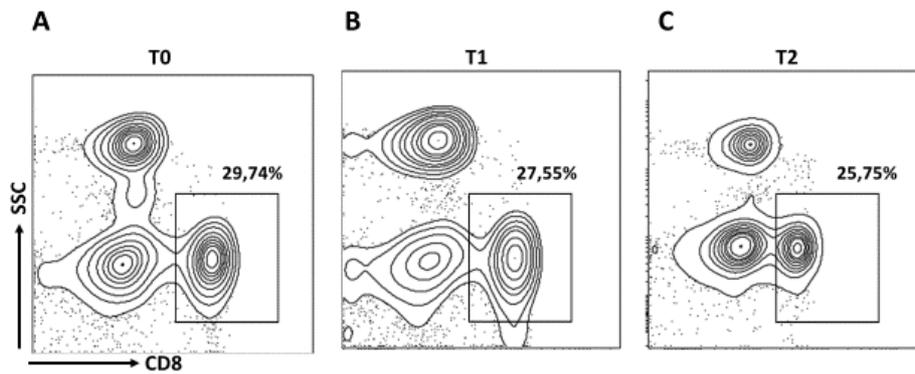


Figura 33. Figura esemplificativa di plot citofluorimetrici di popolazione linfocitaria T CD8+ in pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta (A); T1 fine quinta seduta (B); e T2 inizio sesta seduta (C).

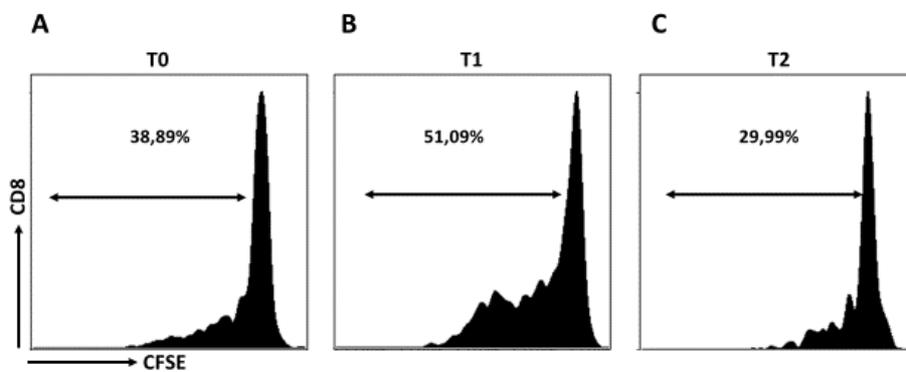


Figura 34. Figura esemplificativa di plot citofluorimetrici della proliferazione di popolazione linfocitaria T CD8+ in pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta (A); T1 fine quinta seduta (B); e T2 inizio sesta seduta (C).

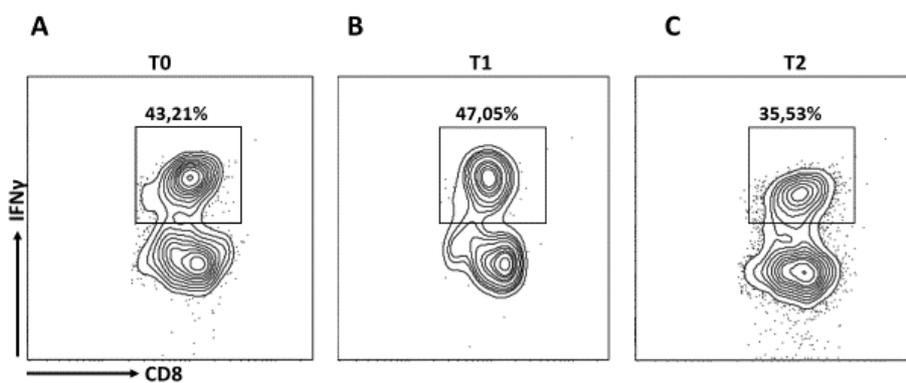


Figura 35. Figura esemplificativa di plot citofluorimetrici della produzione di IFN- γ da parte della popolazione linfocitaria T CD8+ in pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta (A); T1 fine quinta seduta (B); e T2 inizio sesta seduta (C).

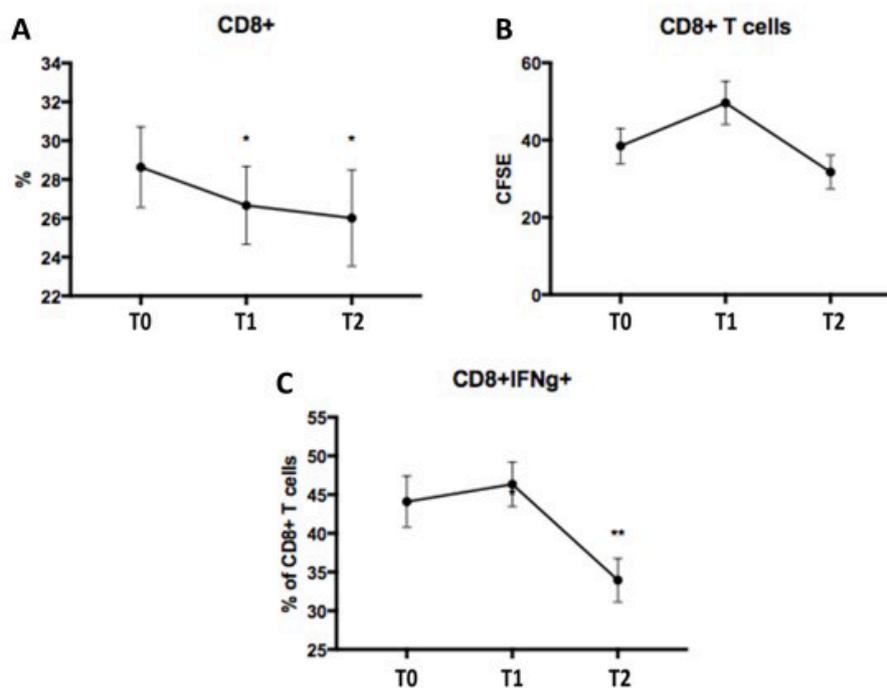


Figura 36. Rappresentazione grafica di popolazione linfocitaria T CD8+ (A), della proliferazione delle cellule T CD8+ (B), e della produzione di IFN- γ da parte dei linfociti CD8+(C) in pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta; T1 fine quinta seduta; e T2 inizio sesta seduta.

Sulla base delle analisi effettuate per le popolazioni linfocitarie T CD4+ e CD8+ è stato effettuato il rapporto tra queste due popolazioni ai 3 tempi, con riscontro di un aumento significativo di tale rapporto al T1, ovvero nel post dialisi (Figura 37).

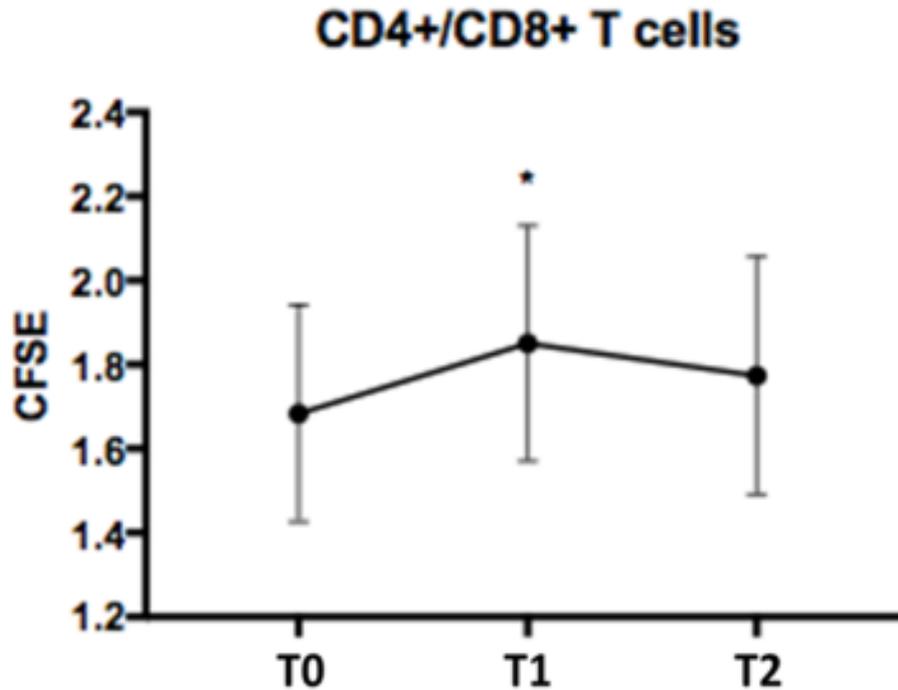


Figura 37. Rappresentazione grafica del rapporto tra le popolazioni linfocitarie T CD4+ e CD8+ in pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta; T1 fine quinta seduta; e T2 inizio sesta seduta.

Inoltre è stata caratterizzata mediante citofluorimetria la popolazione linfocitaria T CD8+ esprimente il marker di senescenza CD57+ (Figura 38) e la loro produzione di IFN- γ (Figura 39). La Figura 40A evidenzia come il trattamento dialitico abbassi significativamente al T1 il numero di linfociti T CD8+CD57+ e come questo calo persista anche prima dell'inizio della sesta seduta dialitica. A quest'ultimo tempo vi è anche un calo significativo della produzione di IFN- γ da parte dei linfociti T CD8+CD57+ rispetto al T1 (Figura 40B).

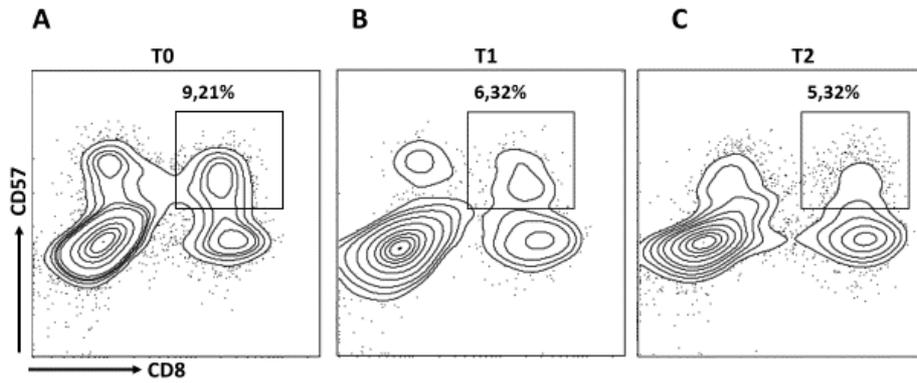


Figura 38. Figura esemplificativa di plot citofluorimetrici di popolazione linfocitaria T CD8+CD57+ in pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta (A); T1 fine quinta seduta (B); e T2 inizio sesta seduta (C).

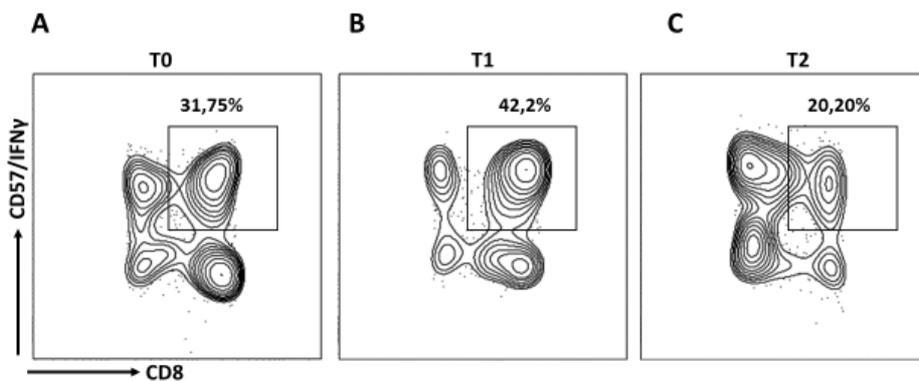


Figura 39. Figura esemplificativa di plot citofluorimetrici della produzione di IFN- γ da parte della popolazione linfocitaria T CD8+CD57+i n pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta (A); T1 fine quinta seduta (B); e T2 inizio sesta seduta (C).

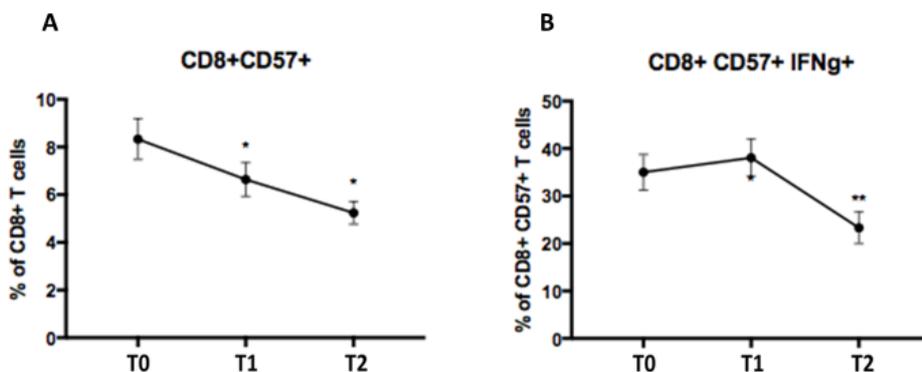


Figura 40. Rappresentazione grafica di popolazione linfocitaria T CD8+CD57+ (A), e della produzione di IFN- γ da parte dei linfociti CD8+CD57+(B) in pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta; T1 fine quinta seduta; e T2 inizio sesta seduta.

Per quanto concerne l'analisi citofluorimetrica dei linfociti NK (CD3-, CD45+, CD16+, CD56+ e CD19-) (Figura 41) in corso di dialisi si osserva un significativo calo da T0 a T1 e un successivo aumento significativo, rispetto al T1, all'inizio della sesta seduta dialitica (T2) (Figura 42).

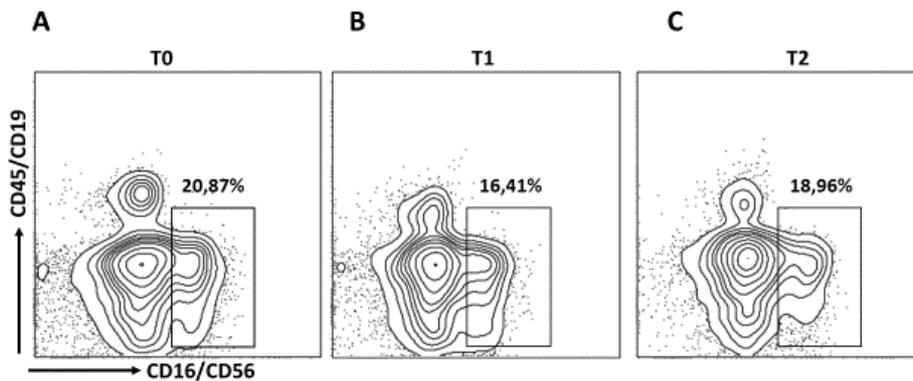


Figura 41. Figura esemplificativa di plot citofluorimetrici di popolazione linfocitaria T Natural Killer in pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta (A); T1 fine quinta seduta (B); e T2 inizio sesta seduta (C).

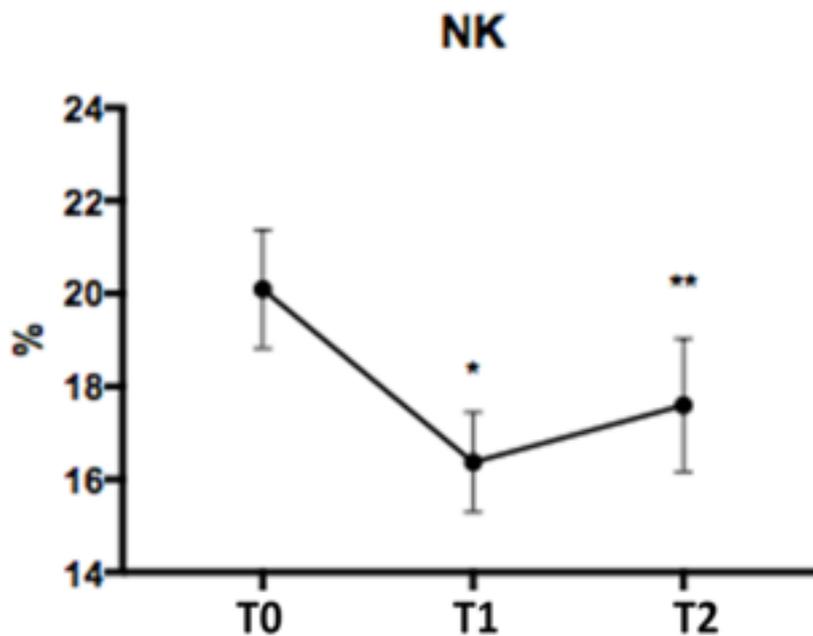


Figura 42. Rappresentazione grafica di popolazione Natural Killer in pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta; T1 fine quinta seduta; e T2 inizio sesta seduta.

L'analisi citofluorimetrica dei linfociti B (CD3-, CD45+, CD16-, CD56- e CD19+) eseguita ai tre tempi (Figura 43) ha permesso di identificare un lieve

aumento percentuale ai 3 tempi di studio. Questa variazione non raggiunge la significatività statistica (Figura 44).

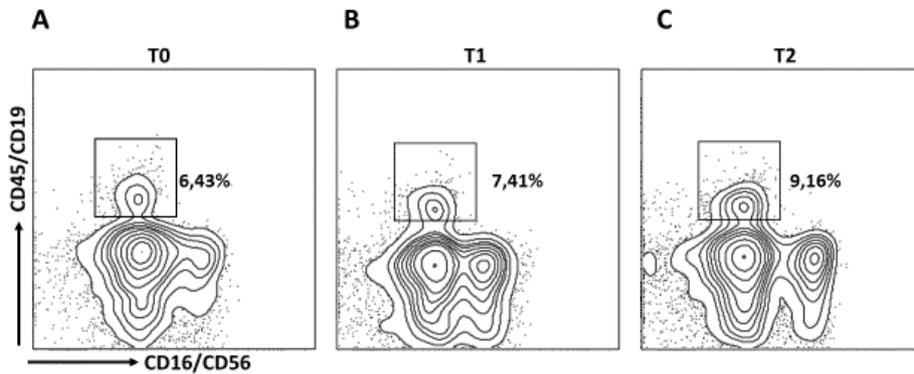


Figura 43. Figura esemplificativa di plot citofluorimetrici di popolazione linfocitaria B in pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta (A); T1 fine quinta seduta (B); e T2 inizio sesta seduta (C).

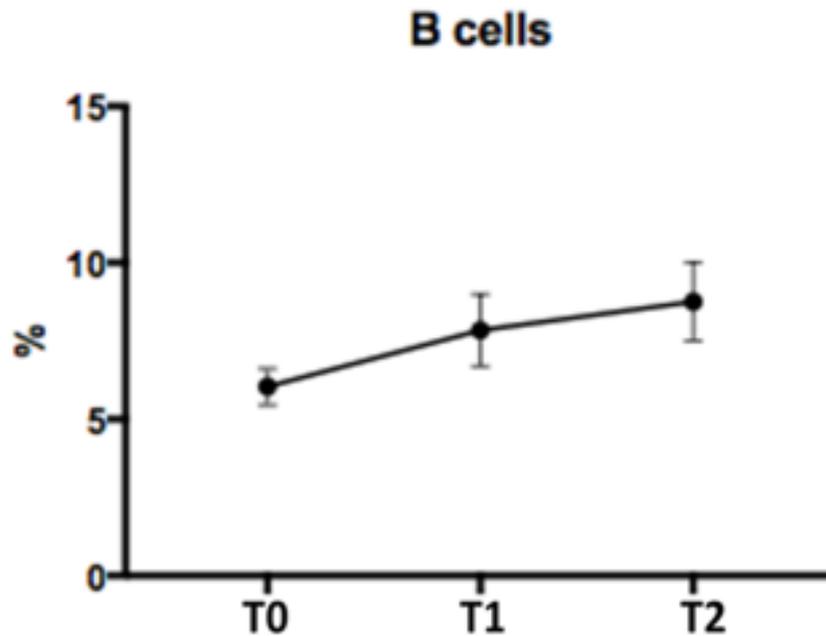


Figura 44. Rappresentazione grafica di popolazione linfocitaria B in pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta; T1 fine quinta seduta; e T2 inizio sesta seduta.

Infine è stato eseguito saggio citofluorimetrico sulle PBMC al fine di caratterizzare i monociti al tempo T0, T1 e T2 (Figura 45) con riscontro di una riduzione significativa della percentuale di monociti al T1, post

dialisi, rispetto al T0, seguito, da un successivo aumento significativo al T2, inizio della sesta seduta dialitica, rispetto al T1 (Figura 45).

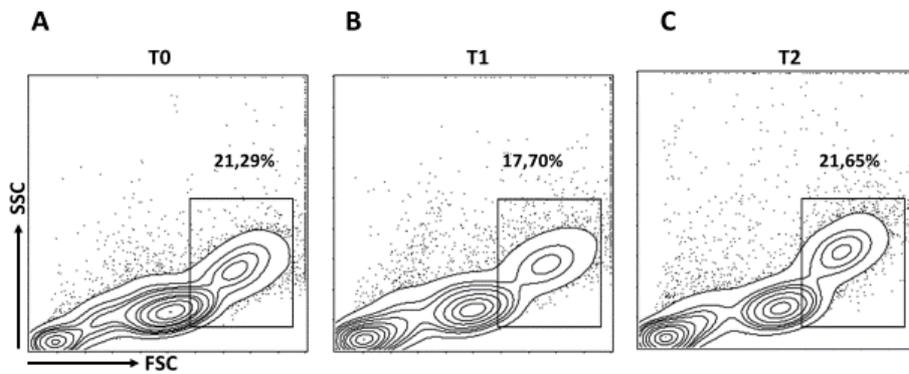


Figura 45. Figura esemplificativa di plot citofluorimetrici di popolazione monocitaria in pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta (A); T1 fine quinta seduta (B); e T2 inizio sesta seduta (C).

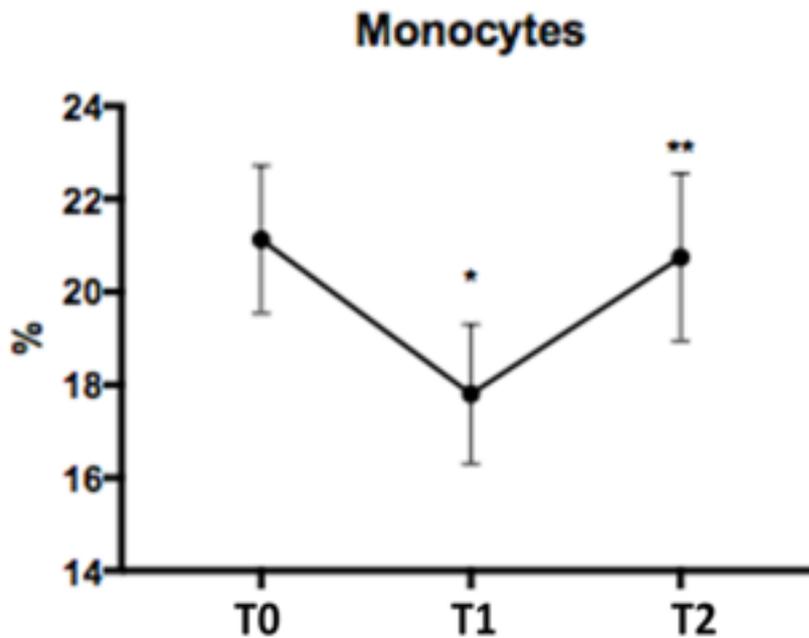


Figura 46. Rappresentazione grafica di popolazione monocitaria in pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta; T1 fine quinta seduta; e T2 inizio sesta seduta.

4.3 Tipizzazione linfocitaria nei pazienti affetti da malattia renale terminale in trattamento emodialitico, confronto tra diverse membrane *high flux*

Nei 35 pazienti che hanno portato a termine il periodo di osservazione è stata eseguita la determinazione dei valori delle PBMC e delle varie sottopopolazioni linfocitarie ai tre tempi del trattamento extracorporeo, confrontando i tre gruppi di pazienti (A, B e C) sottoposti a trattamento extracorporeo con tre diverse membrane di dialisi *high flux*. Non sono state registrate variazioni statisticamente significative.

Per prima cosa è stata valutata la quantità dei linfociti T CD3+, la figura 47 mostra come non esistano differenze nei valori percentuali di tale sottopopolazione confrontando le tre membrane e come non sussistano differenze significative nell'andamento in corso di trattamento.

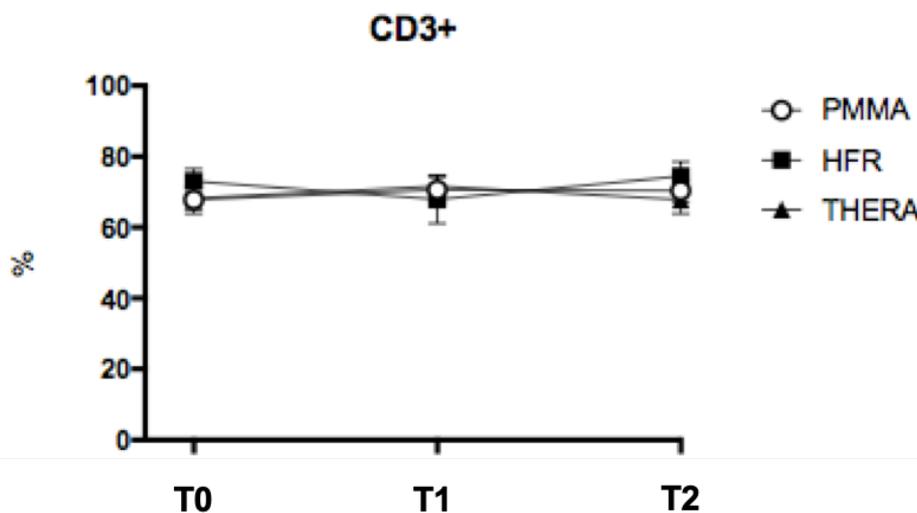


Figura 47. Rappresentazione grafica di popolazione di popolazione linfocitaria T CD3+ in pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta; T1 fine quinta seduta; e T2 inizio sesta seduta.

Ai tempi T0, T1 e T2 sono stati quantificati i linfociti T CD4+ (Figura 48A) e i linfociti T CD8+ (Figura 48B). I dati dimostrano come i CD4+ tendano ad aumentare al T1, mentre i CD8+ rimangono stabili, tuttavia queste modifiche non raggiungono la significatività. Analogamente il

rapporto CD4+/CD8+ non presenta differenze nei tre diversi gruppi (Figura 49).

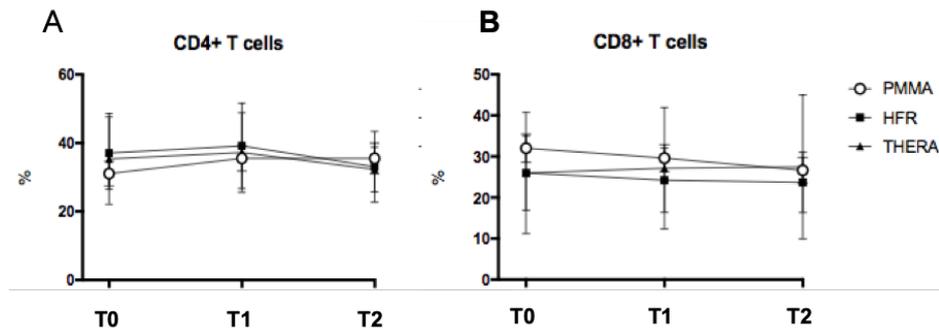


Figura 48. Rappresentazione grafica di popolazione linfocitaria T CD4+ (A), della proliferazione delle cellule T CD8+ (B), in pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta; T1 fine quinta seduta; e T2 inizio sesta seduta.

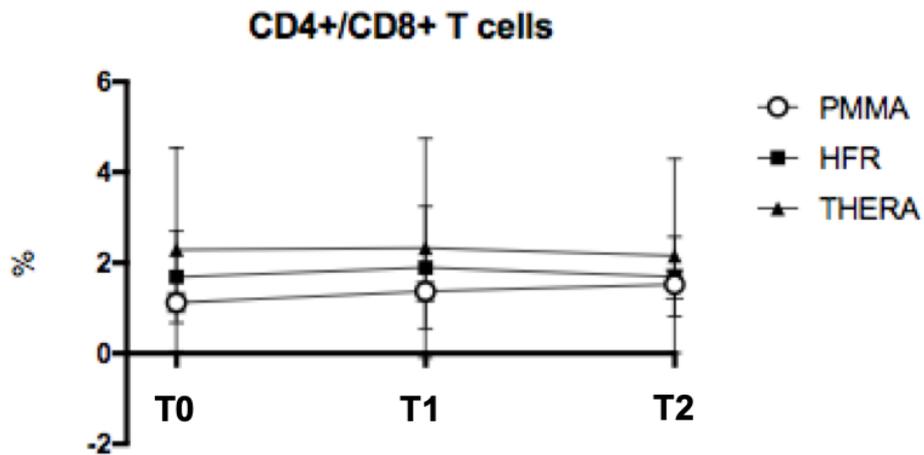


Figura 49. Rappresentazione grafica del rapporto tra le popolazioni linfocitarie T CD4+ e CD8+ in pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta; T1 fine quinta seduta; e T2 inizio sesta seduta.

L'attività secretoria di IFN- γ dei linfociti CD4+ tende a ridursi in occasione del T2 con i filtri Filtryzer e TheraNova ma tale variazione non raggiunge la significatività (Figura 50).

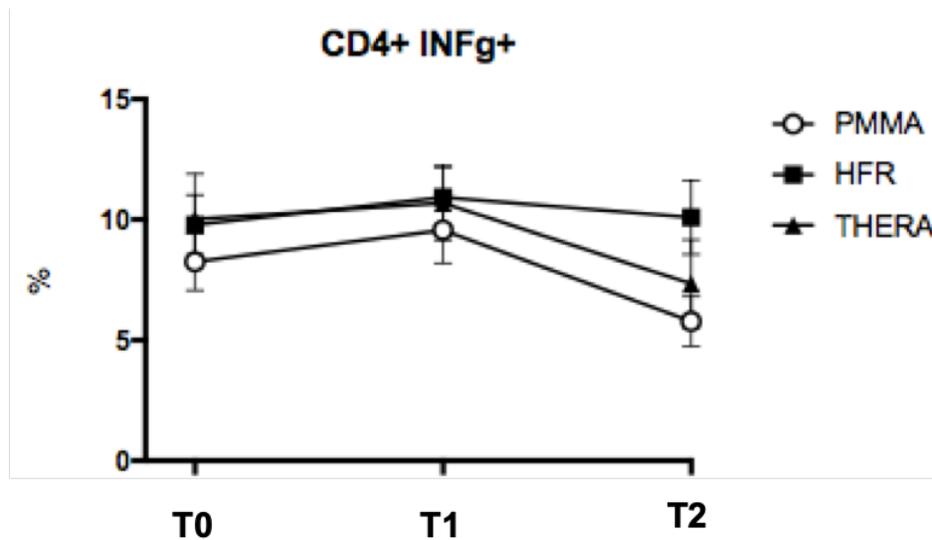


Figura 50. Rappresentazione grafica del rapporto tra le popolazioni linfocitarie Th17 e Treg in pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta; T1 fine quinta seduta; e T2 inizio sesta seduta.

Sono state poi valutate le Th17 (CD4+ e Il-17) (Figura 51A) e le Treg (Figura 51B), e il rapporto Treg/Th17 (Figura 52) e anche in questo caso non si è assistito a variazioni significative nei tre gruppi ai diversi tempi dello studio.

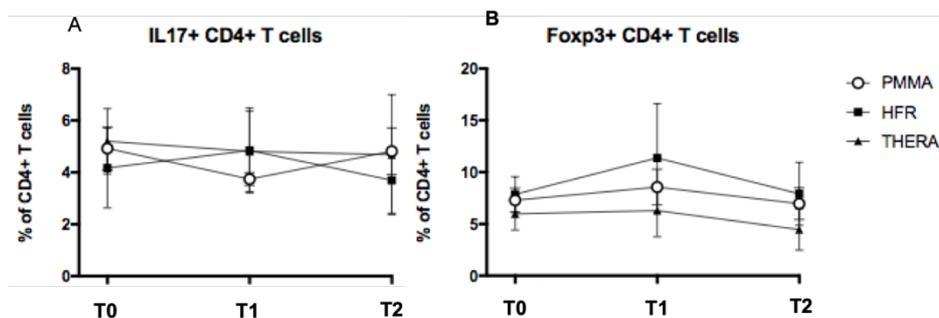


Figura 51. Rappresentazione grafica delle popolazioni linfocitarie Th17 (A) e Treg (B) in pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta; T1 fine quinta seduta; e T2 inizio sesta seduta.

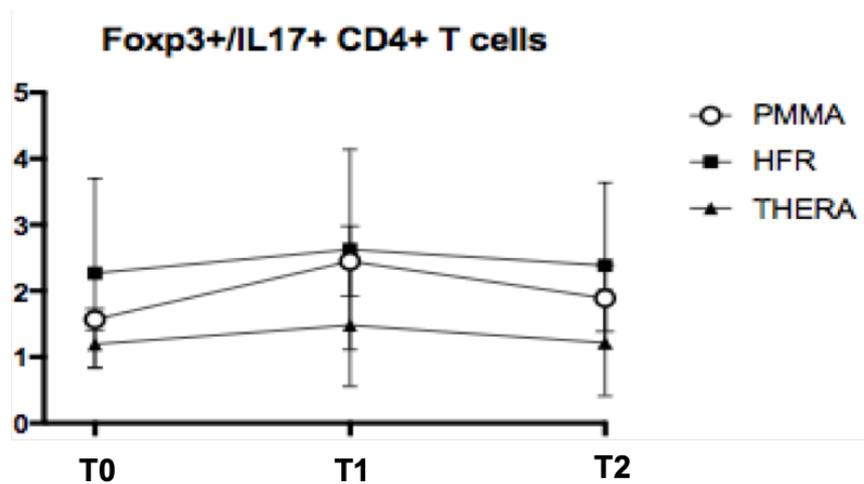


Figura 52. Rappresentazione grafica del rapporto tra le popolazioni linfocitarie Th17 e Treg in pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta; T1 fine quinta seduta; e T2 inizio sesta seduta.

Infine non si ravvisano differenze nei linfociti T CD8+ senescenti (CD57+) nei tre diversi gruppi (Figura 53).

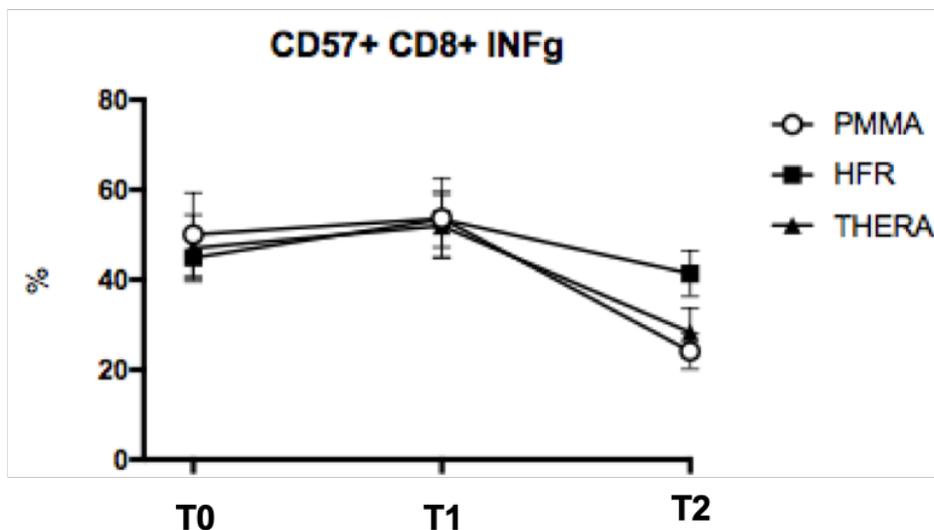


Figura 53. Rappresentazione grafica del rapporto tra le popolazioni linfocitarie Th17 e Treg in pazienti in dialisi nei 3 tempi dello studio. T0 inizio della quinta seduta; T1 fine quinta seduta; e T2 inizio sesta seduta.

5. DISCUSSIONE

L'importanza dello studio delle alterazioni del sistema immunitario nel paziente affetto da malattia renale cronica in trattamento emodialitico è dimostrata dai tassi di mortalità e morbilità rilevati in questi soggetti.

Lo stato infiammatorio e di attivazione immunitaria cronica, caratteristico delle CKD e ESRD, è associato all'incidenza di aterosclerosi e di mortalità cardiovascolare (21), d'altro canto la disfunzione della risposta immunitaria determina una aumentata suscettibilità alle infezioni tale da rappresentare la seconda causa di morte e la principale causa di ospedalizzazione nel paziente con ESRD (8). Pertanto il sistema immunitario del paziente con CKD e ESRD risulta iperattivato e paradossalmente disfunzionale, le cause che sottendono tale disfunzionalità sono da ricercarsi oltre che nelle comorbidity intrinseche del paziente, in condizioni dipendenti dal trattamento dialitico stesso come il contatto fra sangue e membrana di dialisi e la ritenzione di tossine uremiche, in particolare quelle a medio peso molecolare, di cui fanno parte i mediatori dell'infiammazione (14).

Tuttavia il ruolo delle sottopopolazioni T linfocitarie nei pazienti in emodialisi e, in particolare, in corso di seduta dialitica, non è chiarito, così come il comportamento di tali cellule con l'impiego di differenti filtri di dialisi. I meccanismi alla base devono ancora essere chiariti e possono essere spiegati, solo in parte, come la conseguenza di elevati livelli di citochine pro infiammatorie.

Con lo scopo di approfondire come l'azione immunomodulatoria della terapia emodialitica sulle sottopopolazioni T, B, NK e monociti, sia in termini numerici che di funzionalità, sono stati arruolati 35 pazienti affetti da ESRD soggetti al trattamento emodialitico cronico con ritmo trisettimanale presso l'Unità Operativa del Policlinico S. Orsola, di Bologna, suddivisi in tre gruppi a seconda delle membrane high flux impiegate nel trattamento: Gruppo A HD con Filtryzer BGU 1.6, Gruppo B HFR con filtro HFR17 e Gruppo C a HD con filtro MCO THERANOVA. Da ogni paziente sono stati prelevati campioni di sangue prima del trattamento emodialitico (T0) e al termine (T1), in occasione della quinta seduta, e prima del trattamento in occasione della sesta seduta

(T2). Inoltre tali sottopopolazioni sono state confrontate con quelle di volontari sani analoghi per sesso ed età.

La popolazione in trattamento sostitutivo presentava una diminuita percentuale di linfociti CD3+, T e B, rispetto ai controlli sani con incremento del tasso di apoptosi, tale dato è già stato descritto da Mansouri nel 2017 (42), nello specifico gli Autori dimostravano una riduzione delle cellule Th2 e delle Treg in pazienti sottoposti a terapia emodialitica cronica, rispetto a un gruppo di soggetti sani. I dati dello studio condotto evidenziano inoltre come tale riduzione sia significativa in corso di dialisi, anche se il tasso di apoptosi non raggiunge la significatività, concordando con lo studio di Borges del 2011 che riporta come l'emodialisi contribuisca allo sviluppo di una linfopenia a seguito, almeno in parte, della induzione della morte cellulare per apoptosi (44). Tuttavia le ipotesi patogenetiche non sono definitive e necessitano di ulteriori dati sperimentali. È stato recentemente dimostrato un effetto immunologico non precedentemente riconosciuto dell'eritropoietina (EPO), nel contrastare la proliferazione delle cellule T, pertanto anche la terapia con eritropoietina umana ricombinante (rhEPO) può svolgere un ruolo importante nella modulazione del sistema immunitario in questi pazienti (104,105).

Lo studio condotto non ha evidenziato nessuna alterazione statisticamente significativa nell'analisi delle sottopopolazioni linfocitarie T CD4+ e CD8+ nel confronto tra i pazienti in dialisi e il gruppo dei sani. Pertanto non è presente una differenza statisticamente significativa nel rapporto tra i linfociti T CD4+/CD8+ tra le due popolazioni esaminate, a differenza di quanto riportato in un recente studio da Lisowska et al. che ha descritto un aumento nel rapporto tra linfociti T CD4+/CD8+ dovuto piuttosto ad un calo del numero dei linfociti T CD8+ che non all'incremento dei CD4+ (45). Diverse sono le modifiche in corso di dialisi, le analisi hanno rilevato che nei pazienti in dialisi è presente un significativo aumento dei linfociti T CD4+ al termine del trattamento emodialitico (T1), che rientra poi ai valori iniziali all'inizio della seduta successiva (T2). Questa variazione potrebbe essere spiegata dal rilevamento di un aumento significativo della funzione

proliferativa nei linfociti T CD4+, anch'esso evidenziato al T1. Al contrario nei linfociti T CD8+ è stato evidenziato un significativo calo numerico della popolazione al T1, con un ulteriore abbassamento significativo al T2. Queste alterazioni dei linfociti T CD4+ e CD8+ hanno modificato pertanto il rapporto, che mostra un significativo aumento al T1, per ritornare a valori più bassi dopo 48 ore (T2), diversamente l'analisi effettuata fra gruppi trattati con differenti filtri di dialisi non mostrava differenze significative di queste sottopopolazioni, anche se i linfociti T CD8+ tendono a ridursi maggiormente con il filtro PMMA. Questo risultato è in linea con quanto riportato da Xing et al e potrebbe essere compatibile con un transitorio aumento dell'attività immunologica sul versante T linfocitario indotta dalla seduta emodialitica (101).

Dato altamente rilevante del nostro studio è l'aumento in corso di dialisi dei valori della proliferazione delle sottopopolazioni linfocitarie CD4+ e CD8+ al T1, anche se solo i primi raggiungono la significatività statistica. Dati relativi alla produzione di IFN- γ da parte dei linfociti T CD4+ e CD8+ non hanno rilevato differenze significative tra i pazienti in dialisi e il gruppo di controllo. La produzione di INF- γ dei linfociti CD4+ si riduce nell'intervallo interdialitico maggiormente con i filtri PMMA e Theranova. Unica alterazione significativa è stata evidenziata nel calo drastico di produzione di IFN- γ da parte dei linfociti T CD8+ al T2, probabilmente legato ad una riduzione dell'attività immunitaria allontanandosi dall'evento dialisi.

Le continue modifiche dell'assetto linfocitario durante le varie sessioni emodialitiche comportano un esaurimento della capacità di attivazione linfocitaria, definita come senescenza precoce indotta da stress (47). In particolare, studi condotti da Litjens et al. hanno mostrato una diminuzione di linfociti T *naïve* correlata a una diminuzione della produzione timica nei pazienti sottoposti a trattamento emodialitico associata ad una ridotta proliferazione e una alterata omeostasi nel sangue periferico, e inoltre, è stato dimostrato come esista una correlazione tra la degenerazione delle funzioni renali e il processo di senescenza prematuro dei linfociti sia CD4+ e CD8+ (25). Le cellule T CD8+ hanno un ruolo fondamentale nel riconoscimento e nell'eliminazione delle cellule

infettate da patogeni così come nella risposta antitumorale. L'attivazione e la differenziazione di tali cellule in linfociti T citotossici avvengono tramite il legame tra TCR e il peptide antigenico associato a HLA di classe I sulle APC; è richiesto inoltre un processo di costimolazione in cui i principali attori sono il CD28, espresso sulla superficie del linfocita T e il CD86 e CD80 espresso dalle APC. In caso di persistente stimolazione, l'espressione del CD28 sulle cellule T CD8+ va incontro a *down regulation* mentre incrementa l'espressione di CD57 (106). L'espressione di CD57 a discapito di CD28 è documentata anche in cellule T CD4+ durante l'attivazione immunitaria cronica sebbene questo tipo cellulare si rilevi in quantità minore in circolo (107).

Numerosi studi hanno evidenziato che l'espressione del CD28 e del CD57 sia mutualmente esclusiva sulle cellule T CD8+ e che tale processo è associato all'invecchiamento del sistema immunitario e/o alla stimolazione cronica dello stesso in caso di infezioni croniche e patologie autoimmuni. Le cellule T CD8+CD57+ sono definite come antigene-specifiche, oligoclonali, altamente differenziate e mostrano un'importante riduzione dell'attività della telomerasi e una bassa espressione dei geni per il ciclo cellulare, vengono pertanto definite senescenti in quanto hanno una limitata capacità proliferativa. Alcuni studi hanno tuttavia dimostrato che le CD8+CD57+ sono in grado di proliferare, ma solo sotto l'azione di un microambiente specifico o di citochine specifiche come l'IL-2 o l'IL-15 (108). Secondo alcuni autori le cellule CD8+CD57+ possono essere divise in due sottotipi: le cellule CD8+CD57+CD27+, che presentano capacità proliferativa conservata, e le cellule CD8+CD57+CD27- che invece hanno raggiunto la fase terminale della differenziazione (109). Dal punto di vista funzionale le cellule CD8+CD57+ sono descritte come ad alto potenziale citotossico in grado di produrre elevate quantità di perforina, granzimi e granulisina. Inoltre producono elevate quantità di IFN γ e TNF- α ; tuttavia sono descritti alcuni sottotipi con attività immunoregolatoria (CD8+CD57+Foxp3+ e IL10-*secreting* CD8+CD57+) (108). I dati sulla suscettibilità di queste cellule all'apoptosi sono contrastanti. Alcuni studi hanno mostrato elevata suscettibilità all'apoptosi per incrementata

espressione di Fas, caspasi-3 e riduzione dell'espressione di fattori anti-apoptotici mentre altri lavori hanno mostrato accumulo progressivo con l'età per elevata resistenza all'apoptosi (108). Wood et al. hanno studiato pazienti con HIV rilevando che le T CD8+CD57+ avevano un'elevata suscettibilità all'apoptosi indotta dall'attivazione cellulare nelle fasi iniziali dell'infezione mentre negli stadi avanzati acquisivano resistenza all'apoptosi (110). È stato ipotizzato che le cellule CD8+CD57+CD27+ possano rappresentare un tipo cellulare ad alto potenziale citotossico, potenziale proliferativo conservato e elevata suscettibilità all'apoptosi indotta dalla stimolazione antigenica, mentre le CD27-, aventi reale senescenza immunitaria, potrebbero presentare resistenza all'apoptosi (110).

Oltre all'invecchiamento numerose condizioni patologiche sono associate a un prematuro accumulo di queste cellule come l'infiammazione da esercizio fisico strenuo, i tumori sia solidi che ematologici, le infezioni virali croniche (HIV, CMV, EBV parvovirus B19), le infezioni batteriche croniche (tubercolosi), l'asma e le patologie autoimmuni (diabete mellito di tipo 1, morbo di Graves, spondilite anchilosante, dermatomiosite, polimiosite). Esistono specifiche evidenze relative alla relazione fra le cellule CD8+CD57+ e l'ateromasia carotidea nei pazienti con HIV e fra esse e la sindrome coronarica acuta (108). Yu et al. hanno dimostrato una correlazione fra CD8+CD57+ circolanti e mortalità a breve termine in pazienti con diagnosi di infarto miocardico acuto. Alcuni studi hanno documentato l'accumulo di CD4+CD57+ nella placca aterosclerotica con induzione di instabilità della placca stessa (111).

Pochi studi hanno valutato il comportamento di queste cellule nel paziente con CKD o in trattamento emodialitico e non sono presenti lavori in letteratura riguardo l'influenza di diverse membrane di dialisi. In un recente studio Crèpin et al. hanno dimostrato che le CD8+CD28-CD57+ circolanti risultavano aumentate in pazienti con CKD stadio 4 e in misura maggiore in pazienti in emodialisi rispetto a controlli sani e che tali differenze si accentuavano in pazienti CMV positivi (112) rafforzando quanto già esposto da Litjens et al. nel 2006 (25). Inoltre

Meijers et al. rilevavano una maggiore percentuale di CD8+CD57+ circolanti in pazienti giovani (sotto i 50 anni) in dialisi rispetto a pazienti di età comparabile con CKD in fase conservativa (39).

Analogamente a quanto riportato in letteratura, l'analisi dei dati dello studio ha evidenziato un aumento significativo della popolazione linfocitaria T CD8+CD57+ nei pazienti in dialisi rispetto al gruppo di controllo dei sani. Questo dato non è accompagnato però da un aumento della produzione di IFN- γ da parte di questa sottopopolazione. In corso di dialisi invece si è assistito ad una diminuzione statisticamente significativa del numero di linfociti T CD8+CD57+ al termine della seduta, con un'ulteriore diminuzione statisticamente significativa all'inizio della seduta successiva. I meccanismi che sottendono tale modifica non sono noti, tuttavia è ipotizzabile un'eventuale deplezione cellulare per apoptosi indotta da attivazione antigenica, la perdita di una quota di cellule in seguito a interazione con il circuito di dialisi e l'attivazione cellulare con adesione endoteliale e "sequestro" dal circolo sistemico, e forse tale condizione necessita di più di 48 ore per rientrare a livelli basali, spiegando la persistenza di bassi livelli di CD8+CD57+ anche al T2.

Su questa popolazione linfocitaria è stata esaminata la produzione di IFN- γ , che ha mostrato un lieve aumento, ma non significativo, alla fine della quinta seduta, con un drastico e significativo calo all'inizio della sesta seduta. È ipotizzabile che questo sottogruppo di cellule, che esprime l'attivazione di una quota di cellule CD8+CD57+ che assumono ancor più elevata attività infiammatoria, siano incrementate in risposta all'interfaccia fra sangue e membrana di dialisi. Non sussistono differenze con diverse membrane di dialisi né dal punto di vista numerico che funzionale per questa popolazione linfocitaria, anche se la produzione di INF- γ tende a ridursi maggiormente con i filtri PMMA e Theranova.

Altra analisi di rilievo dello studio è il rapporto Treg e Th17. Le cellule Treg e le cellule Th17 sono state descritte come due popolazioni cellulari aventi effetti opposti in vivo (64) con uno squilibrio a favore delle Th17 nel paziente in emodialisi cronica quale possibile fattore contribuente allo

stato infiammatorio cronico e all'elevato rischio cardiovascolare presenti in questa categoria di pazienti (30; 65,66). I dati dello studio sono concordi nell'evidenziare uno squilibrio a favore delle Th17 legato ad un significativo aumento di questa popolazione in dialisi rispetto ai controlli sani, tuttavia in assenza di modifiche della popolazione FOXP3+ CD4+ rappresentante le Treg, modifica che invece è stata riportata in letteratura. In particolare Hendrikx et al (63), Mansouri et al. (42) e Ren et al (114) nelle proprie ricerche evidenziano un calo delle Treg nei pazienti uremici sottoposti a terapia emodialitica. Se analizziamo il rapporto Treg/Th17 questo pertanto risulta significativamente ridotto nella popolazione in trattamento sostitutivo rispetto ai controlli sani, tale dato concorda con quanto riportato da Zhu et al, ovvero che lo stadio della malattia renale cronica influenza tale rapporto a favore delle Th17 (114).

Ad oggi la letteratura non si è concentrata sull'analisi specifica del comportamento di queste due sottopopolazioni linfocitarie in corso di trattamento extracorporeo, ma nel corso dello studio, in dialisi, è stato rilevato un calo significativo della popolazione Treg al T2, le Th17 mostrano un lieve calo dopo la quinta seduta dialitica e successivamente all'inizio della sesta seduta dialitica, questi dati però non riportano alcuna significatività. Dato l'aumento delle Treg in corso di dialisi, il rapporto Treg/Th17 presenta un aumento significativo al T1 per poi ridursi a 48 ore. Il confronto tra i gruppi di pazienti trattati con diverse membrane di dialisi non ha mostrato differenze nel rapporto Treg/Th17 in corso di dialisi anche se le Th17 hanno una riduzione non statisticamente significativa con il filtro PMMA.

Nello studio condotto sono stati esaminati i linfociti NK nel paziente in trattamento emodialitico e i dati mostrano come le NK vadano incontro ad un aumento significativo di questa sottopopolazione rispetto ai controlli sani e, in corso di dialisi, si assiste ad una riduzione statisticamente significativa al T1 con successivo rialzo al T2. Gli studi che si concentrano sulle alterazioni delle NK durante il trattamento emodialitico sono pochi. Lo studio più rilevante, condotto da Vacher-Coponat et al. si dissocia dai nostri risultati, in quanto ha dimostrato che il numero di cellule NK è ridotto nei pazienti in dialisi rispetto a un

gruppo di controllo di sani come conseguenza della nota linfopenia indotta dall'uremia e uno dei fattori più significativi potrebbe essere la prolungata età dialitica (115). Anche Baron et al. in uno studio su 35 pazienti in emodialisi hanno evidenziato una riduzione significativa della percentuale NKT rispetto a controlli sani mentre essa non differiva rispetto a soggetti con trapianto renale (116).

Tuttavia è importante ricordare la nota relazione fra attività delle NK e il rischio cardiovascolare, tale sottopopolazione linfocitaria è presente nella placca aterosclerotica sebbene in misura minore rispetto alle CD3+ ed è stata dimostrata un'associazione fra i livelli dei NK e il rischio di sviluppo di aterosclerosi e di instabilità della placca (117). È possibile ipotizzare che nei pazienti in emodialisi soggetti ad un maggiore stimolo infiammatorio e con elevato profilo di rischio cardiovascolare le NK siano presenti a livelli maggiori. Non sono invece disponibili in letteratura studi riguardanti gli effetti dell'esposizione a differenti membrane dialitiche, fatta eccezione per un recente studio di Peraldi et al. (118) che ha dimostrato su 55 pazienti in emodialisi un ridotto numero di cellule NK positive per il recettore NKG2D rispetto a controlli sani. La riduzione percentuale di NKG2D-*positive* NK era maggiore con il filtro Nephral rispetto agli altri (BK-F, Helixone-FX). Gli Autori concludevano che l'espressione di NKG2D era maggiormente conservata con le membrane più biocompatibili garantendo una maggiore funzionalità delle NK e quindi una maggiore immunocompetenza. Comunque il confronto fra i diversi filtri dializzatori presi in esame nel nostro studio non ha mostrato differenze statisticamente significative.

L'analisi dei linfociti B e delle sue alterazioni è un argomento poco trattato dalla letteratura scientifica. Lo studio condotto ha mostrato che nel confronto con il gruppo dei sani le cellule B subiscono una diminuzione statisticamente significativa nei pazienti sottoposti al trattamento dialitico. È noto come il trattamento extracorporeo sia associato ad una diffusa riduzione delle sottopopolazioni B (119), probabilmente come conseguenza di una incrementata apoptosi legata verosimilmente ad una ridotta espressione di Bcl-2 (40) e una ridotta espressione del fattore attivante le cellule B (B-cell activating factor

BAFF) (120). Tuttavia nonostante il ridotto numero di linfociti B, questi nei pazienti in emodialisi presentano una spiccata attività di rilascio di citochine come TNF- α and IL-6 (121).

Diversamente sono scarsi i dati scientifici disponibili sugli effetti di una singola seduta sui linfociti B, nello studio condotto è stato registrato un lieve aumento non significativo in corso di dialisi tra i vari tempi del trattamento. Ancora una volta non sono disponibili in letteratura studi riguardanti gli effetti dell'esposizione a differenti membrane dialitiche, il confronto fra i diversi filtri dializzatori presi in esame nel nostro studio non ha mostrato differenze statisticamente significative.

Infine l'analisi sulla popolazione dei monociti circolanti in corso di seduta dialitica ha mostrato una significativa riduzione della subito dopo la seduta dialitica, con valori che ritornano nella norma all'inizio della dialisi successiva. La popolazione affetta da ESRD in trattamento sostitutivo presenta valori percentuale di monociti lievemente maggiori rispetto alla popolazione sana, in assenza di differenze significative.

I monociti sono cellule chiave per l'immunità innata e giocano un ruolo fondamentale nella risposta infiammatoria. Al contatto sangue membrana dialitica si scatena una reazione nei confronti di un corpo estraneo legata principalmente dal reclutamento di monociti e neutrofilii con rilascio di citochine pro infiammatorie come IL-1, IL-6 e TNF- α (121, 122). Pertanto, la misurazione dei monociti attivati fornisce preziose informazioni sulla biocompatibilità delle membrane (98).

Ramirez et al. hanno dimostrato che monociti a fenotipo infiammatorio CD14+CD16+ derivati da pazienti affetti da CKD presentano una elevata capacità di adesione alle cellule endoteliali (123) e pazienti in emodialisi hanno un aumento dei livelli di monociti CD14+CD16+, se comparati con pazienti in dialisi peritoneale (124). Studi *in vitro* hanno esplorato l'effetto delle citochine infiammatorie rilasciate da monociti attivati sulle cellule endoteliali. Sono stati posti in coltura monociti CD14+CD16+ con cellule endoteliali derivate dalla vena ombelicale umana (*human umbilical vein endothelial cells* HuVECs) con riscontro di un incremento del tasso di apoptosi e dell'attività di specie radicali dell'ossigeno (ROS)

nelle HuVECs (125); confermando l'ipotesi che lo stress ossidativo indotto dalla microinfiammazione conduce ad un danno endoteliale.

Dai dati di letteratura è noto come nelle prime fasi della seduta emodialitica (primi 10 - 20 minuti) i monociti circolanti si riducano drasticamente per poi rientrare verso i livelli basali al termine della seduta stessa. Tale fenomeno è dovuto ad un "sequestro" di monociti a livello del microcircolo polmonare determinato dall'attivazione di tali cellule in seguito all'esposizione al circuito extracorporeo con conseguente adesione endoteliale. Ma in corso di seduta è documentata anche una progressiva perdita della capacità di adesione leucocitaria all'endotelio legata ad una riduzione dell'espressione di molecole di adesione con ripristino dei livelli circolanti di monociti. Il fenomeno del "sequestro" è più marcato per cellule ad elevato potenziale infiammatorio e quindi con maggiore capacità di espressione di molecole di adesione (126). È possibile che la riduzione della percentuale di monociti post-dialisi osservata nel nostro studio possa essere secondaria a tale fenomeno per poi rientrare ai valori basali dopo 48 ore. Lo studio condotto da Sester e il suo gruppo di ricerca dimostra inoltre che il fenomeno del sequestro non era valido su modello di seduta dialitica simulata *in vitro* e non era influenzato, *in vivo*, dall'impiego di membrane biocompatibili (126).

Dati sperimentali di diversi studi che indagano sull'impatto di diverse membrane di dialisi riportano risultati discordanti sull'efficacia dei filtri di ridurre i marker dell'infiammazione e di attivazione monocitaria. Una singola seduta di emodialisi con membrane a basso flusso cellulosiche e di polisulfone non ha mostrato differenze nel modificare la concentrazione di TNF- α , IL-6, P-selectina e fattori della coagulazione (127). In uno studio osservazionale prospettivo su 30 pazienti in emodialisi, Martinez-Miguel *et al.* (128) hanno valutato se membrane maggiormente biocompatibili siano in grado di ridurre l'attivazione monocitaria e la capacità *in vitro* di indurre danno endoteliale, testando polimeri *high flux* di polisulfone e polietersulfone. Quando comparate con due settimane di dialisi con polisulfone, il polietersulfone ha mostrato una ridotta adesione dei monociti alle cellule endoteliali, una ridotta tossicità cellulare indotta dai monociti ed una ridotta espressione

dell'*endothelin-converting enzyme-1* (ECE-1), una proteina coinvolta nella sintesi dell'endotelina. Questi effetti non sono riportati dopo una singola seduta suggerendo come possa sussistere in questo meccanismo un effetto cumulativo, legato all'uso continuo di filtri di elevate qualità. Nello studio condotto non sono state registrate differenze significative nel confronto fra pazienti trattati con PMMA, HFR17 o membrana MCO, probabilmente in quanto sono tutte membrane altamente biocompatibili. Dall'analisi dei risultati di questo studio è possibile ipotizzare delle tesi su come il trattamento emodialitico modifichi le sottopopolazioni linfocitarie e i leucociti. In generale i linfociti circolanti sono in percentuale più bassa rispetto alla popolazione sana a seguito di un aumentato indice di apoptosi e in corso di dialisi si assiste ad una riduzione degli stessi. Questo dato associato all'aumento percentuale delle CD4+, secondario ad un'aumentata proliferazione, ad un aumento rapporto Treg/Th17 e la riduzione di tipi cellulari a carattere infiammatorio potrebbero fare ipotizzare un ruolo antiinfiammatorio della seduta, possibilmente dovuto alla rimozione di mediatori dell'infiammazione con progressivo ripristino delle condizioni basali una volta allontanatisi dalla seduta.

D'altro canto è possibile che la seduta emodialitica rappresenti un trigger infiammatorio acuto nel contesto di un sistema immunitario già iperattivo e disfunzionale come testimoniato dall'incremento di varie sottopopolazioni linfocitarie ad elevato potenziale citotossico ed infiammatorio nella popolazione in trattamento sostitutivo rispetto alla popolazione sana come NK e Th17 con ridotto rapporto Treg/Th17 e l'incremento di CD8+CD57+ senescenti tipiche di condizioni di stress infiammatorio. Pertanto la riduzione linfocitaria a cui si assiste in corso di seduta potrebbe essere giustificata da un'incrementata apoptosi indotta dall'attivazione cellulare o da un'attivazione cellulare con massiccia adesione all'endotelio. In questo studio tuttavia non sono stati valutati gli indici di apoptosi di ogni singola sottopopolazione linfocitaria e dei leucociti né i livelli dei mediatori dell'infiammazione circolanti. Questi elementi potrebbero essere oggetto di prosecuzione del lavoro di ricerca,

assieme con il ruolo del sistema del complemento in corso di emodialisi e dell'accesso vascolare nella modulazione dello stato infiammatorio.

Il confronto fra gruppi di pazienti trattati con membrane di dialisi differenti tra loro per struttura, superficie e capacità adsorbente non ha prodotto differenze statisticamente significative. A tal proposito va specificato che i filtri dializzatori impiegati erano tutti a elevata biocompatibilità. Ciò, unito al numero limitato di pazienti studiati, potrebbe aver reso meno evidenti eventuali differenze.

I limiti di questo lavoro sono la ridotta coorte di pazienti arruolati e la natura single-center, che tuttavia ne ha assicurato procedure uniformi durante tutto il periodo di studio, ma che può aver determinato un *bias* legato a processi di sterilizzazione delle acque di dialisi.

6. CONCLUSIONI

Questo studio dimostra come il trattamento emodialitico influenzi in maniera profonda lo stato di attivazione e la funzionalità del sistema immunitario, in particolare contribuisce all'immunodeficienza normalmente presente in corso di ESRD, ma d'altro canto sembra stimolare l'attivazione linfocitaria, probabilmente a seguito dell'effetto sull'immunità innata, come documentato dalle variazioni che i leucociti e le sottopopolazioni linfocitarie subiscono in seguito all'esposizione al circuito extracorporeo.

La peculiarità del progetto di ricerca è stata la valutazione degli effetti della singola seduta emodialitica sulle sottopopolazioni linfocitarie, condizione che non è stata descritta prima in letteratura.

Ulteriori studi e analisi sulla popolazione in esame sono necessari al fine di caratterizzare questa interazione.

Sebbene la biocompatibilità della membrana e della tecnica dialitica siano elementi riconosciuti quali fondamentali per ridurre lo stato infiammatorio nei pazienti in trattamento sostitutivo, lo studio non ha evidenziato differenze statisticamente significative confrontando diversi filtri dializzatori. Sono necessari studi ulteriori, multicentrici e con un numero maggiore di soggetti al fine di valutare la reale entità dell'impatto delle membrane a diversa biocompatibilità in termini quantitativi e qualitativi sulla modulazione del sistema immunitario.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Liyanage T, Ninomiya T, Jha V, et al. Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: a systematic review. *Lancet* 2015; 385:1975-1982
2. Ekdahl KN, Soveri I, Hilborn J, et al. Cardiovascular disease in haemodialysis: role of the intravascular innate immune system. *Nat Rev Nephrol* 2017; 13(5):285-296
3. Den Hoedt CH, Bots ML, Grooteman PC et al. Online hemodiafiltration reduces systemic inflammation compared to low-flux hemodialysis. *Kidney Int* 2014; 86:423-432.
4. Wolley M, Jardine M, Hutchison CA. Exploring the Clinical Relevance of Providing Increased Removal of Large Middle Molecules. *Clin J Am Soc Nephrol* 2018; 7;13(5):805-814
5. Carrero JJ, Yilmaz MI, Lindholm B, et al. Cytokine dysregulation in chronic kidney disease: how can we treat it? *Blood Purif* 2008; 26:291–299
6. Massry SG: Is parathyroid hormone a uremic toxin? *Nephron* 1977; 19:125-130
7. Vanholder R, Pletinck A, Schepers E, et al. Biochemical and Clinical Impact of Organic Uremic Retention Solutes: A Comprehensive Update. *Toxins (Basel)* 2018; 10(1):33
8. Vanholder R, De Smet R, Glorieux G. Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int.* 2003; 63:1934–1943
9. Hornberger JC, Chernew M, Petersen J, et al. A multivariate analysis of mortality and hospital admissions with high-flux dialysis. *J Am Soc Nephrol* 1992; 3:1227-37
10. Chandran PK, Liggett R, Kirkpatrick B. Patient survival on PAN/AN69 membrane hemodialysis: a ten year analysis. *Kidney Int Suppl* 1993; 4:S287-90
11. Koda Y, Nishi S, Miyazaki S, et al. Switch from conventional to high-flux membrane reduces the risk of carpal tunnel syndrome and mortality of hemodialysis patients. *Kidney Int* 1997; 52:1096-101

12. Leypoldt JK, Cheung AK, Carroll CE, et al. Effect of dialysis membranes and middle molecule removal on chronic hemodialysis patient survival. *Am J Kidney Dis* 1999; 33:349-55
13. Port FK, Wolfe RA, Hulbert-Shearon TE, et al. Mortality risk by hemodialyzer reuse practice and dialyzer membrane characteristics: results from the USRDS dialysis morbidity and mortality study. *Am J Kidney Dis* 2001; 37:276-86
14. Jofre' R, Rodriguez-Benitez P, Lopez-Gomez JM, et al. Inflammatory Syndrome in Patients on Hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: S274–S280
15. Sarnak MJ, Jaber BL. Mortality caused by sepsis in patients with end-stage renal disease compared with the general population. *Kidney Int* 2000; 58:1758-64
16. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 2008; 29: 2941–53
17. Poppelaars F, Faria B, Gaya da Costa M, et al. The Complement System in Dialysis: A Forgotten Story? *Front Immunol.* 2018; 25:9:71
18. Carrero JJ, Stenvinkel P. Inflammation in End-Stage Renal Disease—What Have We Learned in 10 Years? *Semin Dial* 2010; 23(5):498-509
19. Panichi V, Migliori M, De Pietro S, et al. C reactive protein in patients with chronic renal diseases. *Ren Fail* 2001; 23:551-62
20. Stenvinkel P, Heimbürger O, Wang T, et al. High serum hyaluronan indicates poor survival in renal replacement therapy. *Am J Kidney Dis* 1999; 34:1083-8
21. Ok E, Asci G, Toz H et al. Mortality and cardiovascular events in online haemodiafiltration (OL-HDF) compared with high-flux dialysis: results from the Turkish OL-HDF Study. *Nephrol Dial Transplant* 2013; 28:192–202
22. Den Hoedt CH, Mazairac AH, van den Dorpel MA, et al. Effect of hemodiafiltration on mortality, inflammation and quality of life. *Contrib Nephrol.* 2011; 168:39-52

23. Hauser AB, Stinghen AE, Kato S, et al. Characteristics and causes of immune dysfunction related to uremia and dialysis. *Perit Dial Int* 2008; 28(S3):S183-S187
24. Deschamps-Latscha B, Herbelin A, Nguyen AT et al. Balance between IL-1 beta, TNF-alpha and their specific inhibitors in chronic renal failure and maintenance dialysis. Relationships with activation markers of T cells, B cells, and monocytes. *J Immunol* 1995; 154:882-892
25. Litjens NHR, Van Druningen CJ, Betjes MGH. Progressive loss of renal function is associated with activation and depletion of naïve T lymphocytes. *Clinical Immunology* 2006; 118:83-91
26. Xiang F, Zhu J, Cao X et al. Lymphocyte depletion and subsets alteration correlate to renal function in chronic kidney disease patients. *Ren Fail* 2016; 38(1):7-14
27. Moran J. Immunodeficiencies in chronic renal failure. *Contrib Nephrol Basel Karger* 1990
28. Kurz P, Kohler S, Meuer S et al. Impaired cellular immune response in chronic renal failure: evidence for a T cell defect. *Kidney Int* 1986; 29:1209-1214.
29. Amore A, Coppo R. Immunological basis of inflammation in dialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2002; 17:16-24
30. Zhang J, Hua G, Zhang X, et al. Regulatory T cells/T-helper cell 17 functional imbalance in uraemic patients on maintenance haemodialysis: a pivotal link between microinflammation and adverse cardiovascular events. *Nephrology (Carlton)* 2010; 15(1):33-41
31. Abbas, Lichtman-Pober. *Cellular and Molecular Immunology*. ELSEVIER 7th ed.
32. Abbas-Lichtman-Pober. *Immunologia Cellulare e molecolare*. PICCIN IV ed.
33. Iwakura, Y. and H. Ishigame. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 2006; 116(5):1218-22
34. Wood KJ. Regulatory T cells in transplantation. *Transplant Proc*. 2011; 43(6):2135–2136

35. Fasching, P, Stradner M, Graninger W et al. Therapeutic Potential of Targeting the Th17/Treg Axis in Autoimmune Disorders. *Molecules*, 2017 14;22(1): 134
36. Birkholz AM, Kronenberg M. Antigen specificity of invariant natural killer T-cells. *Biomed J* 2015; 38:470-483
37. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance. *Nature Immunol* 2001; 2:293–299
38. Lv W, Booz GW, Wang Y, et al. Inflammation and renal fibrosis: Recent developments on key signaling molecules as potential therapeutic targets. *Eur J Pharmacol*. 2018; 820:65–76
39. Meijers RW, Betjes MG, Baan CC et al. T cell ageing in end-stage renal disease patients: assessment and clinical relevance. *World J Nephrol* 2014; 3:268-276
40. Fernandez-Fresnedo G, Ramos MA, Gonzales Pardo MC et al. B lymphopenia in uremia is related to an accelerated in vitro apoptosis and dysregulation of BCL-2. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15:502-510
41. Kim Kw, Chung BH, Jeon EJ et al. B cell-associated immune profiles in patients with end-stage renal disease (ESRD). *Exp Mol Med*. 2012; 44:465-472
42. Mansouri L, Nopp A, Jacobson SH et al. Hemodialysis patients display a declined proportion of Th2 and regulatory T cells in parallel with a high interferon- γ profile. *Nephron* 2017: 136(3):254-260
43. Chida Y, Sakurai S, Yoshiyama N. The effect of hemodialysis on lymphocytes subset during dialysis. *Clin Nephrol*. 1986; 25:159–64
44. Borges A, Borges M, Fernandes J et al. Apoptosis of peripheral CD4(+) T-lymphocytes in end-stage renal disease patients under hemodialysis and rhEPO therapies. *Ren Fail*. 2011; 33:138–43
45. Lisowska, K. A., Pindel M, Pietruczuk K, et al. The influence of a single hemodialysis procedure on human T lymphocytes. *Sci Rep*, 2019 25;9(1):5041
46. Katarzyna A. Lisowska et al. Hemodialysis Affects Phenotype and Proliferation of CD4-Positive T Lymphocytes - *J Clin Immunol* (2012) 32:189–200

47. Litjens NH, de Wit EA, Betjes MG. Differential effects of age, cytomegalovirus-seropositivity and end-stage renal disease (ESRD) on circulating T lymphocyte subsets. *Immun Ageing* 2011, 8(1):2
48. Innes A, Farrell AM, Burden RP et al. Complement activation by cellulosic dialysis membranes. *J Clin Pathol* 1994, 47(2):155-158
49. Rosenkranz AR, Kormoczi GF, Thalhammer F et al. Novel C5-dependent mechanism of neutrophil stimulation by bioincompatible dialyzer membranes. *J Am Soc Nephrol* 1999, 10(1):128-135
50. Mares J, Richtrova P, Hricinova A, et al. Proteomic profiling of blood-dialyzer interactome reveals involvement of lectin complement pathway in hemodialysis-induced inflammatory response. *Proteomics Clin Appl* 2010, 4(10-11):829-838.
51. Mares J, Thongboonkerd V, Tuma Z et al. Specific adsorption of some complement activation proteins to polysulfone dialysis membranes during hemodialysis. *Kidney Int* 2009, 76(4):404-413
52. Matsushita M, Endo Y, Fujita T. Cutting edge: complement-activating complex of ficolin and mannose-binding lectin-associated serine protease. *J Immunol* 2000, 164(5):2281-2284
53. Poppelaars F, Gaya da Costa M, Berger SP et al. Strong predictive value of mannose-binding lectin levels for cardiovascular risk of hemodialysis patients. *J Transl Med* 2016, 14(1):236
54. Poppelaars F, Gaya da Costa M, Faria B et al. Intradialytic Complement Activation Precedes the Development of Cardiovascular Events in Hemodialysis Patients. *Front Immunol* 2018, 9:2070
55. Meijers RW, Litjens NH, de Wit EA et al. Uremia causes premature ageing of the T cell compartment in end-stage renal disease patients. *Immun Ageing* 2012, 9(1):19
56. Rama, I., Llaudó I, Fontova P et al. Online Haemodiafiltration Improves Inflammatory State in Dialysis Patients: A Longitudinal Study. *PLoS One*, 2016 26;11(10): e0164969
57. Mai, K., Boldt A, Hau HM et al. Immunological Alterations due to Hemodialysis Might Interfere with Early Complications in Renal Transplantation. *Anal Cell Pathol (Amst)*, 2019, 25:8389765

58. Nitta K, Akiba T, Kawashima A et al. Characterization of TH1/TH2 profile in uremic patients. *Nephron* 2002; 92:492-495
59. Sester U, Sester M, Hauk M et al. T-cell activation follows Th1 rather than Th2 pattern in hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15:1217-1223
60. Costa E, Lima M, Alves JM et al. Inflammation, T-cell phenotype and inflammatory cytokines in chronic kidney disease patients under hemodialysis and its relationship to resistance to recombinant human erythropoietin therapy. *J Clin Immunol* 2008; 28:268-275.
61. Alvarez-Lara MA, Carracedo J, Ramirez R, et al. The imbalance in the ratio of Th1 and Th2 helper lymphocytes in uremia is mediated by an increased apoptosis of Th1 subset. *Nephrol Dial Transplant*. 2004; 19:3084-90
62. Libetta C, Rampino T, Dal Canton A. Polarization of T-helper lymphocytes toward the Th2 phenotype in uremic patients. *Am J Kidney Dis* 2001;38:286-295
63. Hendriks TK, van Gurp EA, Mol WM et al. End-stage renal failure and regulatory activities of CD4+CD25-bright+FoxP3+ T-cells. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24:1969-1978
64. Mucida D, Park Y, Kim G et al. Reciprocal Th17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 2007; 317:256-260
65. Chen S, Crother TR, Arditi M. Emerging Role of IL-17 in Atherosclerosis. *J Innate Immun*. 2010; 2(4):325-33
66. Csizsar A, Ungvari Z. Synergistic effects of vascular IL-17 and TNF- α may promote coronary artery disease. *Med. Hypotheses* 2004; 63: 696-698
67. Mallaat Z, Ait-Oufella H, Tedgui A. Regulatory T cell immunity in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2007; 17:113-118
68. Caprara C, Kinsey GR, Corradi V et al. The influence of hemodialysis on T regulatory cells: a meta-analysis and systematic review. *Blood Purification* 2016; 42:307-313
69. Libetta C, Esposito P, Sepe V et al. Dialysis treatment and regulatory T cells. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25:1723-1727

70. Uchida, T., Nakashima H Ito S, et al. Activated natural killer T cells in mice induce acute kidney injury with hematuria through possibly common mechanisms shared by human CD56. *Am J Physiol Renal Physiol*, 201; 315(3):F618-F627
71. Hakim RM. Clinical implications of hemodialysis membrane biocompatibility. *Kidney Int* 1993; 44:484
72. Mas S, Bosch-Panadero E, Abaigar P et al. Influence of dialysis membrane composition on plasma bisphenol A levels during online hemodiafiltration. *PLoS One*. 2018; 13(3)
73. Palmer SC, Rabindranath KS, Craig JC, et al. High-flux versus low-flux membranes for end-stage kidney disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012; 12(9):CD005016
74. Kalantar-Zadeh K, Kilpatrick RD, Kuwae N, et al. Revisiting mortality predictability of serum albumin in the dialysis population: time dependency, longitudinal changes and population-attributable fraction. *Nephrol Dial Transplant*. 2005 Sep;20(9):1880-8
75. Craddock PR, Fehr J, Dalmaso AP et al. Hemodialysis leukopenia. Pulmonary vascular leukostasis resulting from complement activation by dialyzer cellophanemembranes. *J Clin Invest* 1977; 59:879–888
76. Sunohara T, Masuda, T. Fundamental characteristics of the newly developed ATA membrane dialyzer. *Contrib Nephrol*. 2017; 189:215–221
77. Hoenich NA, Woffindin C, Mathews JN et al. Biocompatibility of membranes used in the treatment of renal failure. *Biomaterials* 1995; 16: 587–592
78. Nakada H, Kashiwagi T, Iino Y et al. Therapeutic effects of the long-term use of PAN membrane dialyzer in hemodialysis patients: Efficacy in old dialysis patients with mild PAD. *J Nippon Med Sch*. 2014; 81(4):221–235
79. Aucella F, Vigilante M, Gesuete A. Review: The effect of polymethylmethacrylate dialysis membranes on uraemic pruritus. *NDT Plus*. 2010;3(Suppl 1):i8–i11

80. Nakano A. Ethylene vinyl alcohol co-polymer as a high-performance membrane: An EVOH membrane with excellent biocompatibility. *Contrib Nephrol*. 2011; 173:164–171
81. Maduell F, Moreso F, Pons M et al. ESHOL Study Group. High-efficiency postdilution online hemodiafiltration reduces all-cause mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2013; 24(3):487-97
82. Peters SA, Bots ML, Canaud B et al. HDF Pooling Project Investigators. Haemodiafiltration and mortality in end-stage kidney disease patients: a pooled individual participant data analysis from four randomized controlled trials. *Nephrol Dial Transplant*. 2016; 31(6):978-84
83. Davenport A. Dialysis and Patient Factors Which Determine Convective Volume Exchange in Patients Treated by Postdilution Online Hemodiafiltration. *Artif Organs*. 2016; 40(12):1121-1127
84. Locatelli F, Martin-Malo A, Hannedouche T et al. Membrane Permeability Outcome (MPO) Study Group: Effect of membrane permeability on survival of hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20:645–654
85. Penne EL, Blankestijn PJ, Bots ML et al. Effect of increased convective clearance by on-line hemodiafiltration on all cause and cardiovascular mortality in chronic hemodialysis patients - the Dutch CONvective TRANsport STudy (CONTRAST): rationale and design of a randomised controlled trial [ISRCTN38365125]. *Curr Controlled Trials Cardiovasc Med* 2005 May 20;6(1):8
86. Gondouin B, Hutchison CA. High cut-off dialysis membranes: Current uses and future potential. *Adv Chronic Kidney Dis* 2011; 18:180–187
87. Boschetti-de-Fierro A, Beck W, Hildwein H et al. Membrane innovation in dialysis. *Contrib Nephrol* 2017; 191:100–114
88. Kirsch AH, Lyko R, Nilsson LG et al. Performance of hemodialysis with novel medium cut-off dialyzers. *Nephrol Dial Transplant* 2017; 32:165

89. Zickler D, Schindler R, Willy K et al. Medium Cut-off (MCO) Membranes Reduce Inflammation in Chronic Dialysis Patients-A Randomized Controlled Clinical Trial. *PLoS One* 2017; 13;12(1):e0169024
90. Borrelli S, Minutolo R, De Nicola L et al. Intradialytic changes of plasma amino acid levels: effect of hemodiafiltration with endogenous reinfusion versus acetate-free biofiltration. *Blood Purif.* 2010; 30(3):166-71
91. Kim S, Oh KH, Chin HJ et al. Effective removal of leptin via hemodiafiltration with on-line endogenous reinfusion therapy. *Clin Nephrol.* 2009 Dec;72(6):442-8
92. Borrelli S, Minutolo R, De Nicola L et al. Effect of hemodiafiltration with endogenous reinfusion on overt idiopathic chronic inflammation in maintenance hemodialysis patients: a multicenter longitudinal study. *Hemodial Int.* 2014 Oct; 18(4):758-66
93. Panichi V, Manca-Rizza G, Paoletti S et al. Effects on inflammatory and nutritional markers of haemodiafiltration with online regeneration of ultrafiltrate (HFR) vs online haemodiafiltration: a cross-over randomized multicenter trial. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21:756-762
94. Esquivias-Motta E, Matin-Malo A, Buendia P et al. Hemodiafiltration with endogenous reinfusion improved microinflammation and endothelial damage compared with online-hemodiafiltration: a hypothesis generating study. *Artif Organs* 2017; 41:8-98
95. Bonomini M, Stuard S, Carreno MP et al. Neutrophil reactive oxygen species production during hemodialysis: role of activated platelet adhesion to neutrophils through P-selectin. *Nephron* 1997; 75:402-411
96. Itoh S, Susuki C, Tsuji T. Platelet activation through interaction with hemodialysis membranes induces neutrophils to produce reactive oxygen species. *J Biomed Mater Res A* 2006; 77:294-303
97. Salvemini D, de Nucci G, Sneddon JM et al. Superoxide anions enhance platelet adhesion and aggregation. *Br J Pharmacol* 1989; 97: 1145-1150.

98. Carracedo J, Ramirez R, Martin-Malo A et al. Nonbiocompatible hemodialysis membranes induce apoptosis in mononuclear cells: the role of G-proteins. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9:46-53
99. Wilflingseder J, Perco P, Kainz A et al. Biocompatibility of haemodialysis membranes determined by gene expression of human leucocytes: a crossover study. *Eur J Clin Invest* 2008; 38(12):918-924
100. Libetta C, Zucchi M, Gori E et al. Vitamin E-loaded dialyzer resets PBMC-operated cytokine network in dialysis patients. *Kidney Int* 2004; 65:1474-1481
101. Xing L. Effect of Different Dialysis Methods on Cellular Immunity Function of Maintenance Haemodialysis Patients. *West Indian Med J*. 2015; 64(5):499-505
102. Coli L, Donati G, Cappuccilli ML et al. Role of the hemodialysis vascular access type in inflammation status and monocyte activation. *Int J Artif Organs* 2011, 34(6):481-488
103. Oliver MJ, Mendelsohn DC, Quinn RR et al. Catheter patency and function after catheter sheath disruption: a pilot study. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007, 2(6):1201-1206
104. Donadei C, Angeletti A, Cantarelli C et al. Erythropoietin inhibits SGK1-dependent TH17 induction and TH17-dependent kidney disease. *JCI Insight* 2019, 23,5
105. Cantarelli C, Angeletti A, Cravedi P. Erythropoietin, a multifaceted protein with innate and adaptive immune modulatory activity. *Am J Transplant* 2019; 19(9):2407-2414
106. Vallejo AN. CD28 extinction in human T cells: altered function and the program of T-cell senescence. *Immunol Rev* 2005; 205:158-69
107. Valenzuela HF, Effros RB. Divergent telomerase and CD28 expression patterns in human CD4 and CD8 T cells following repeated encounters with the same antigenic stimulus. *Clin Immunol* 2002,105:117-125
108. Strioga M, Pasukoniene V, Characiejus D. CD8+ and CD28-CD57+ T cells and their role in health and disease. *Immunology* 2011; 134:17-32

109. Plunkett FJ, Franzese O, Finney HM et al. The loss of telomerase activity in highly differentiated CD8+CD28-CD27- T cells is associated with decreased Akt (Ser473) phosphorylation. *J Immunol* 2007; 178:7710-7719
110. Wood KL, Knox KS, Wang Y et al. Apoptosis of CD57+ and CD57- lymphocytes in the lung and blood of HIV infected subjects. *Clin Immunol* 2005; 117:294-301
111. Yu HT, Youn JC, Lee J et al. Characterization of CD8+CD57+ T cells in patients with acute myocardial infarction. *Cell Mol Immunol*. 2015; 12(4):466-73
112. Crèpin T, Legendre M, Carron C et al. Uraemia-induced immune senescence and clinical outcomes in chronic kidney disease patients. *Nephrol Dial Transplant* 2018; 6:1-9
113. Ren T, Xiong J, Liu G, et al. Imbalance of Th22/Treg cells causes microinflammation in uremic patients undergoing hemodialysis. *Biosci Rep*, 2019
114. Zhu X, Li S, Zhang Q et al. Correlation of increased Th17/Treg cell ratio with endoplasmic reticulum stress in chronic kidney disease. *Medicine (Baltimore)*. 2018; 97(20):e10748
115. Vacher-Coponat, H, Brunet C, Lyonnet L et al. Natural killer cell alterations correlate with loss of renal function and dialysis duration in uraemic patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2008; 23(4):1406-14
116. Baron M, Belo R, Cathelin D et al. Innate-Like and Conventional T Cell Populations from Hemodialyzed and Kidney Transplanted Patients Are Equally Compromised. *PLoS One* 2014 21; 9(8):e105422
117. Kiaw T, Tipping P, Toh BH et al. Killer cells in atherosclerosis. *Eur J Pharmacol* 2017; 816:67-75
118. Peraldi MN, Berrou J, Métiver F et al. Natural Killer Cell Dysfunction in uremia: the role of oxidative stress and the effects of dialysis. *Blood Purif* 2013;35(suppl 2):14-19
119. Raskova J, Ghobrial I, Czerwinski DK et al. B-cell activation and immunoregulation in end-stage renal disease patients receiving hemodialysis. *Arch Intern Med* 1987, 147(1):89-93

120. Pahl MV, Gollapudi S, Sepassi Let al. Effect of end-stage renal disease on B-lymphocyte subpopulations, IL-7, BAFF and BAFF receptor expression. *Nephrol Dial Transplant* 2010, 25(1):205-212
121. Pereira BJ. Cytokine production in patients on dialysis. *Blood Purif* 1995, 13(3-4):135-146
122. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT et al. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol* 2008, 20(2):86-100
123. Ramirez R, Carracedo J, Merino A et al. CD14+CD16+ monocytes from chronic kidney disease patients exhibit increased adhesion ability to endothelial cells. *Contrib Nephrol* 2011, 171:57-61
124. Merino A, Portoles J, Selgas R et al. Effect of different dialysis modalities on microinflammatory status and endothelial damage. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010, 5(2):227-234
125. Merino A, Nogueras S, Buendia P et al. Microinflammation and endothelial damage in hemodialysis. *Contrib Nephrol* 2008, 161:83-88
126. Sester U, Sester M, Heine G et al. Strong depletion of CD14+CD16+monocytes during haemodialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16:1402-1408
127. de Sa HM, Freitas LA, Alves VC et al. Leukocyte, platelet and endothelial activation in patients with acute renal failure treated by intermittent hemodialysis. *Am J Nephrol* 2001, 21(4):264-273
128. Martinez-Miguel P, de Sequera P, Molina A et al. Influence of polysulphone-derived dialysis membranes on the interaction of circulating mononuclear cells with the endothelium. *Int J Artif Organs* 2014, 37(6):455-465