

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE CARDIO NEFRO TORACICHE

Ciclo 34

Settore Concorsuale: 06/D2 - ENDOCRINOLOGIA, NEFROLOGIA E SCIENZE DELLA
ALIMENTAZIONE E DEL BENESSERE

Settore Scientifico Disciplinare: MED/14 - NEFROLOGIA

EFFETTO ANTINFIAMMATORIO DEL TRATTAMENTO EMODIALITICO IN
PAZIENTI CON MALATTIA RENALE CRONICA ALLO STADIO TERMINALE E
COVID-19: CONFRONTO FRA DUE FILTRI DIALIZZATORI (ATA VS PMMA)

Presentata da: Lorenzo Gasperoni

Coordinatore Dottorato

Gaetano Domenico Gargiulo

Supervisore

Gaetano La Manna

Esame finale anno 2022

Indice

ABSTRACT	2
INTRODUZIONE	5
COVID-19 e End Stage Renal Disease	5
COVID-19 e filtri dializzatori (ATA e PMMA)	8
Interleuchina-6 e COVID-19	16
SCOPO	18
METODI	19
Pazienti e disegno dello studio	19
Prescrizione della seduta emodialitica	20
<i>Endpoints</i>	21
Analisi statistica	21
RISULTATI	22
DISCUSSIONE	26
CONSLUSIONI	32
BIBLIOGRAFIA	33

ABSTRACT

Background

I pazienti in emodialisi cronica presentano un rischio di morte elevato per infezione da Sars-CoV-2. I filtri dializzatori che hanno un ruolo nella rimozione delle medie molecole potrebbero mitigare la “tempesta citochinica” che caratterizza la malattia. Tuttavia il loro effetto antinfiammatorio non è stato validato. Lo scopo di questo studio è valutare l’effetto di due filtri dializzatori ad elevata biocompatibilità come il triacetato asimmetrico di cellulosa (ATA) e il polimetilmetacrilato (PMMA) sull’interleuchina-6 (IL-6) e sui marcatori di infiammazione nei pazienti in trattamento emodialitico cronico affetti da infezione da SARS-CoV-2.

Metodi

Si tratta di uno studio prospettico osservazionale su pazienti in trattamento emodialitico cronico (età ≥ 18) affetti da COVID-19. I pazienti sono stati arruolati da marzo 2020 a Maggio 2021 e il trattamento emodialitico è stato effettuato presso l’Ospedale S.Orsola di Bologna nell’unità di dialisi dedicata ai pazienti con COVID-19. Criteri di esclusione sono stati il danno renale acuto, il trapianto renale e la ventilazione meccanica alla diagnosi. Le variabili cliniche, la conta leucocitaria, la IL-6, la proteina C-reattiva (PCR), la procalcitonina (PCT) e la ferritina sono state determinate al basale. I valori ematici di PCR, PCT, e IL-6 sono stati determinati pre e post-dialisi per ogni seduta effettuata (i valori ottenuti sono stati corretti per l’emoconcentrazione).

Tutti pazienti sono stati trattati con emodiafiltrazione online con un filtro ad alto flusso in PMMA (Filtrizer BG-U™, Toray, Tokyo, Japan, superficie 2.1 m², cut-off 20,000 daltons, KUF 43 ml/h/mmHg) o con un filtro ad alto flusso in ATA (Solacea™, Nipro, superficie 2.1 m², cut-off 45,000 daltons, KUF 72 ml/h/mmHg).

L'*end-point* primario è stato valutare l'effetto dei due filtri di dialisi sulle molecole infiammatorie, in particolare sulla reduction ratio (RR) della IL-6.

Risultati

Dei 74 pazienti arruolati, 48 sono stati trattati con filtro ATA e 26 con filtro PMMA (420 vs 191 sedute dialitiche). La RR percentuale mediana della IL-6 è risultata maggiore nel gruppo ATA (17,08% IQR -9,0 - 40.0 vs 2,95% IQR -34,63 – 27,32). Anche le RR percentuali di PCR e PCT sono state maggiori nel gruppo ATA. La regressione logistica multipla avente come variabile dipendente l'ottenimento di una IL-6RR maggiore del 25%, ha mostrato che l'impiego del filtro ATA determinava una maggiore probabilità di raggiungere l'outcome dopo correzione per i parametri infiammatori pre-dialisi (OR 1,721 95% CI 1,176 – 2,538 p=0,0056). Al contrario una PCR elevata riduceva la probabilità di ottenere una IL-6RR significativa (OR 0,9101 95% CI 0,868 – 0,949, p<0.0001).

Conclusioni

Nella nostra popolazione di pazienti in trattamento emodialitico cronico affetti da COVID-19 e trattati con emodiafiltrazione online il filtro ATA

ha mostrato un migliore profilo antiinfiammatorio, in particolare riguardo alla IL-6 RR.

INTRODUZIONE

COVID-19 e End Stage Renal Disease

Circa 2.6 milioni di persone nel mondo sono affette da malattia renale cronica allo stadio terminale (ESRD, End Stage Renal Disease)¹. Nonostante i passi in avanti nella cura del paziente con malattia renale cronica (Chronic Kidney Disease, CKD) e del paziente in emodialisi questi soggetti presentano un rischio cardiovascolare e tassi di morbilità e mortalità elevati. I fattori di rischio sono sia tradizionali (ipertensione, dislipidemia, diabete mellito e obesità) che “non tradizionali” (infiammazione cronica, disfunzione endoteliale, stress ossidativo, disfunzione immunitaria, bio-incompatibilità del filtro e del circuito di dialisi)².

In dicembre 2019, nella città di Wuhan, in Cina, sono emersi i primi casi di polmonite interstiziale causata da un nuovo coronavirus denominato severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). La patologia determinata dal virus SARS-CoV-2 è stata denominata coronavirus disease 2019 (COVID-19) dall'organizzazione mondiale della sanità (OMS) che ha dichiarato il virus pandemico nel marzo del 2020³.

I dati di letteratura hanno dimostrato un'elevata prevalenza e elevati tassi di mortalità correlata a COVID-19 nei pazienti con malattia renale cronica e in dialisi rispetto alla popolazione generale indipendentemente dai fattori di rischio classici (obesità, cardiopatia ischemica e patologia polmonare cronica)⁴.

La prevalenza media a livello globale di COVID-19 nel paziente dializzato, di difficile interpretazione a causa dell'eterogeneità dei dati

pubblicati, è stata stimata da una revisione sistematica della letteratura in circa il 15% in periodo pre-vaccinazione, ma con elevata variabilità (0 - 47%)⁵.

Lo studio Open SAFELY, uno studio di registro inglese, ha analizzato i fattori associati a morte per COVID-19 su 17 milioni di pazienti adulti. Dopo l'aggiustamento per i fattori confondenti l'analisi ha evidenziato che il rischio di morte risultava aumentato di 2.5 volte per i pazienti con malattia renale cronica (Chronic Kidney disease, CKD) agli stadi 4 e 5, di 3.5 volte per i pazienti con trapianto renale e di 3,7 volte per i pazienti in dialisi cronica⁴.

I tassi di mortalità presentano variabilità a seconda delle aree geografiche a causa delle differenti politiche sanitarie e della capacità diagnostica⁶. Il tasso di mortalità per infezione da Sars-CoV2 nella popolazione generale si è attestato, prima dell'inizio della vaccinazione per COVID-19, dal 1.4% all' 8% mentre nei pazienti in trattamento emodialitico cronico è stato stimato dal 25 al 41%⁷⁻⁹.

Nel registro realizzato dalla società europea di nefrologia denominato European Renal Association COVID-19 Database (ERACODA), che ha incluso 4298 pazienti con malattia renale cronica allo stadio terminale in trattamento dialitico, la mortalità a 28 giorni era del 20.0% nei 3285 pazienti in dialisi e 19.9% nei 1013 pazienti con trapianto renale⁹.

I pazienti in dialisi cronica presentano fattori di rischio specifici. Mentre la popolazione generale ha potuto adottare efficaci misure di distanziamento sociale, fino al *lockdown*, i pazienti in trattamento emodialitico cronico necessitano di frequenti accessi in ospedale, sia per effettuare il trattamento emodialitico, sia a causa di problematiche

cliniche intercorrenti con aumento del rischio di esposizione al contagio. Oltre ad avere un elevato rischio di mortalità rispetto alla popolazione generale, la pandemia ha richiesto una riorganizzazione specifica delle unità di dialisi al fine di poter garantire l'esecuzione delle sedute in sicurezza sia per pazienti in fase acuta sia per i soggetti clinicamente guariti, ma con positività prolungata a tampone naso-faringeo.

Inoltre è noto che l'uremia e lo stato di dialisi cronica inducono una disfunzione del sistema immunitario che teoricamente può ridurre la risposta all'infezione da Sars COV2¹⁰.

La disfunzione immunitaria legata all'insufficienza renale terminale coinvolge l'immunità innata e adattativa¹¹ e la letteratura è concorde nel definire il sistema immunitario del paziente in emodialisi come iperattivato, ma paradossalmente disfunzionale. I pazienti con ESRD presentano un'aumentata attività dei Toll-like receptors, un'incrementata espressione di molecole di adesione all'endotelio (integrine) e un'iperattivazione dei polimorfonucleati neutrofili e dei monociti. Nonostante la "iperattività" dell'immunità innata essa è disfunzionale come testimoniato dall'alterata capacità fagocitica con secondario deficit di immunocompetenza e maggior rischio infettivo¹¹.

L'immunità adattativa risulta disfunzionale sia nel braccio cellulare che in quello anticorpale.

Nei pazienti con ESRD è dimostrata una riduzione dei linfociti T e B circolanti^{12,13} con bassi livelli di cellule CD3+, CD4+ e CD8+ con possibile induzione dell'apoptosi linfocitaria dei linfociti T da parte della stessa seduta emodilutiva¹⁴.

Litjen et al hanno dimostrato una correlazione fra la perdita della funzione renale e la riduzione del numero di cellule T CD4+ naive, T CD8+ naive e dei linfociti T di memoria¹⁵.

E' stata dimostrata anche una ridotta espressione della molecola anti-apoptotica Bcl-2 dei linfociti Th1 con maggiore suscettibilità all'apoptosi¹⁶.

Le basi patogenetiche alla base della disfunzione dei linfociti T in questi pazienti non sono chiarite. Le principali teorie riguardano un'anomala presentazione dell'antigene, un ruolo dello stato di infiammazione cronica, un'alterazione del profilo citochinico, una disfunzione dei linfociti T e l'esposizione al trattamento emodialitico stesso¹⁷.

I pazienti in dialisi inoltre vanno spesso incontro a malnutrizione con conseguente disfunzione immunitaria¹⁸.

Un altro fattore che può contribuire all'elevato rischio di mortalità in questi pazienti è il danno endoteliale indotto da Sars-CoV2 che risulta accentuato in soggetti che già presentano una nota disfunzione endoteliale¹⁹.

COVID-19 e filtri dializzatori (ATA e PMMA)

Le tossine uremiche possono essere classificate in piccole molecole idrosolubili (< 0.5 kDa), medie molecole (0.5 – 60 kDa) e soluti legati a proteine. Mentre le piccole molecole idrosolubili attraversano facilmente, per diffusione, la membrana con tecnica dialitica standard le medie molecole, e le molecole legate a proteine permangono in circolo²⁰.

La maggior parte dei mediatori dell'infiammazione, in particolare le citochine pro-infiammatorie e anti-infiammatorie, le chemochine e i

fattori del complemento rientra in tale categoria²¹. I filtri di dialisi attualmente utilizzati sono classificati in due gruppi principali: membrane a basso flusso (low-flux, LF) con basso coefficiente di permeabilità idraulica ($KUF < 20 \text{ ml/h/mmHg}$), e membrane ad alto flusso (high-flux, HF) con aumentata permeabilità idraulica ($KUF > 20 \text{ ml/h/mmHg}$) in grado di rimuovere tossine a medio peso molecolare. Le membrane HF comportano, tuttavia, un maggior rischio 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 membrana²².

L'utilizzo dell'emodiafiltrazione on line (On Line Hemodiafiltration, OLHDF) che associa la depurazione per diffusione a quella per convezione con membrane high-flux, ha permesso di incrementare la clearance delle medie molecole²⁰.

L'impiego dell'emodiafiltrazione in post-diluizione determina maggiore rimozione di medie molecole rispetto all'emodialisi standard, tuttavia l'efficacia sugli *hard clinical end-points* incerta.

L'evidenza emersa dai trial clinici effettuati è un possibile vantaggio in termini di mortalità per volumi convettivi elevati, al disopra dei 20 L per seduta²³⁻²⁶. Tuttavia i dati dello studio osservazionale DOPPS sembrano non supportare tale conclusione²⁷.

In condizioni basali, nel paziente in emodialisi è documentato un aumento della concentrazione plasmatica di citochine pro-infiammatorie e anti-infiammatorie e, più in generale, di mediatori dell'infiammazione da 1.5 fino a 200 volte rispetto al soggetto normale²⁰. Tale stato

infiammatorio cronico non è spiegato dai soli fattori rischio classici (ipertensione, cardiopatia ischemica, sindrome metabolica, stato di malnutrizione), ma probabilmente sono responsabili fattori connessi al trattamento emodialitico quali il grado di biocompatibilità della membrana di dialisi, la qualità del bagno dialisi e del liquido di reinfusione, eventuali disfunzioni/infezioni a carico dell'accesso vascolare, e l'adeguatezza dialitica²⁸.

Nel paziente in emodialisi il contatto fra sangue e membrana provoca 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 immunitaria²⁹.

Le membrane dialitiche a elevata biocompatibilità possono essere una risorsa anche nel paziente con COVID-19 al fine di migliorare la rimozione di tossine uremiche a medio peso molecolare (e quindi di citochine infiammatorie) e di minimizzare l'infiammazione prodotta dalla seduta emodialitica stessa, nel tentativo di contrastare la "tempesta citochinica" che caratterizza tale patologia.

In questo lavoro di tesi saranno presi in esame due filtri di dialisi ad elevata biocompatibilità: il triacetato asimmetrico di cellulosa (*Asymmetric Cellulose Triacetate*, ATA) e il polimetilmetacrilato (*Polymethylmethacrylate*, PMMA).

ATA (*asymmetric cellulose triacetate*)

Proprietà del materiale e struttura della membrana

Il triacetato di cellulosa (*cellulose triacetate*, CTA) è un polimero con proprietà idrofiliche utilizzato per la realizzazione di membrane di dialisi da lungo tempo ed è ottenuto dalla cellulosa grazie alla conversione di gruppi idrossilici liberi con gruppi acetili³⁰. L'assenza di gruppi idrossilici liberi determina una maggiore biocompatibilità rispetto alle membrane cellulosiche utilizzate precedentemente con ridotti livelli di attivazione del complemento e minime variazioni nella conta leucocitaria^{31,32}.

A differenza del polisulfone, non necessita dell'aggiunta di agenti che favoriscano una maggiore idrofilia come il polivinilpirrolidone a cui sono state attribuite reazioni da ipersensibilità³³. Il CTA presenta una ridotta capacità di adsorbimento proteico che potrebbe rendere ragione delle sue proprietà antitrombotiche. I fattori alla base di tale caratteristica risiedono nelle proprietà elettrostatiche del CTA e nella ridotta irregolarità della membrana³⁴. È riportato in letteratura che la riduzione della conta piastrinica indotta dal polisulfone è reversibile dopo l'impiego del CTA³⁵ e che l'espressione della glicoproteina IIb/IIIa sulla superficie delle piastrine è ridotta con CTA³⁶. Inoltre studi di con analisi proteomica hanno mostrato che la proporzione di albumina adsorbita dal CTA è maggiore rispetto a quella adsorbita dal polisulfone su cui veniva rilevata una quantità più elevata di fibrinogeno e ficolina-2 con maggior rischio di attivazione piastrinica^{37,38}.

La membrana di dialisi in triacetato asimmetrico di cellulosa (*asymmetric cellulose triacetate*, ATA) è stata recentemente commercializzata come Solacea® (Nipro) con una KUF di 72 ml/mmHg/h/m² e progettata

per effettuare trattamenti di emodiafiltrazione on line (*online hemodiafiltration*, OLHDF)³³.

Oltre a non contenere polivinilpirrolidone ATA è una membrana priva di bisfenolo A, molecola con nota attività interferente endocrino (BPA-free).

La struttura della membrana in ATA è differente da quella in CTA. In termini di sezione trasversale infatti la membrana in CTA risulta omogenea e con una densità uniforme mentre la membrana in ATA presenta una struttura asimmetrica con una porzione densa a contatto con il sangue (con pori di dimensioni minori rispetto al CTA) e un supporto esterno con pori larghi (Figura 1).

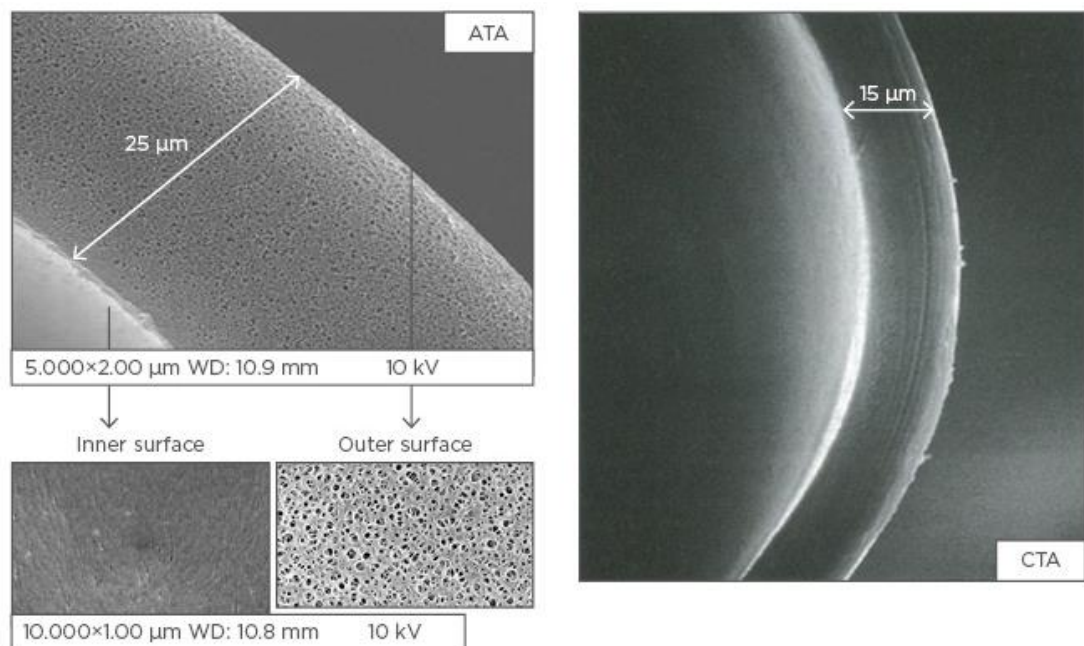


Figura 1. CTA a destra, ATA a sinistra.

Tale struttura asimmetrica consente il raggiungimento di un'elevata permeabilità idraulica e risolve il limite principale della membrana in

CTA (la scarsa permeabilità idraulica con KUF ridotta) e quindi ne consente l'impiego in emodiafiltrazione.

Dal punto di vista dell'efficienza diffusiva la membrana in ATA è più spessa di quella in CTA (15 vs 25 μm) ma comunque meno spessa delle membrane in polisulfone (30-45 μm)³³. Dal momento che lo spessore della membrana influisce sulla diffusione, ATA conserva una buona capacità diffusiva^{33,39}. La capacità di raggiungere adeguati livelli di urea Kt/v , buone *reduction ratios* (RR) per le principali piccole e medie molecole e la elevata biocompatibilità sono state documentate. La tabella 1 riassume le caratteristiche del filtro ATA³⁹.

Membrane	ATA [®]	
Sterilisation	Gamma rays	
Bisphenol A	No	
KUF (ml/h/mmHg)	72	
Effective surface area (m ²)	1.9	
Volume (ml)	108	
Thickness of membrane (μ)	25	
Length (mm)	245	
Internal diameter (μ)	200	
Maximum TMP (mmHg)	500	
Pressure drop (mmHg)	Qb/Qd (ml/min)	200/500
	Blood/fluid	47/16
KUF: ultrafiltration coefficient; Qb: blood flow; Qd: dialysis flow; TMP: transmembrane pressure.		

ATA e COVID-19

Data la buona performance sulla rimozione delle medie molecole e quindi in virtù della sua efficacia teorica nella rimozione dei mediatori dell'infiammazione, il filtro ATA è stato impiegato, in OLHDF, in

pazienti in emodialisi cronica affetti da COVID-19 non necessitanti di ricovero in terapia intensiva.

L'unico lavoro presente in letteratura a riguardo stato pubblicato da De la Flor et al. Gli autori hanno descritto 10 pazienti in emodialisi cronica affetti da COVID-19 che erano stati sottoposti a OLHDF in pos-diluizione con filtro ATA. Lo studio non ha evidenziato variazioni significative nella concentrazione plasmatica di IL-6 a distanza di 14 giorni dal basale mentre nei venivano rilevati maggiori livelli di IL-6 e degli altri parametri considerati (rapporto neutrofililinfociti, rapporto piastrine/linfociti, rapporto fra linfociti e proteina C reattiva e IL-6)⁴⁰

PMMA e adsorbimento

Le membrane di dialisi sintetiche comunemente utilizzate (es. polisulfone) presentano una struttura asimmetrica. Ciò significa che su uno spessore massimo della fibra cava di 30 micron, soltanto 1 micron di spessore è responsabile del processo di filtrazione mentre i restanti 29 micron costituiscono la struttura di supporto. Tali membrane non presentano capacità di adsorbimento e pertanto il trasporto dei soluti per diffusione e convezione.

Il PMMA invece è caratterizzato da una struttura simmetrica e omogenea con pori di lunghezza maggiore che si approfondano nello spessore della fibra⁴¹. Tale struttura rende ragione della capacità di adsorbimento del filtro. Inoltre la superficie a contatto con il sangue presenta carica anionica facilitando il processo di adsorbimento.

Successivamente alla scoperta della $\beta 2$ microglobulina come componente preponderante delle fibrille di amiloide nel tunnel carpale

del paziente in emodialisi cronica, la tecnologia si è evoluta per migliorare la rimozione di tale molecola. Con il suo peso molecolare di 11.8 kDa la β_2 microglobulina è rimossa difficilmente per diffusione. Uno studio multicentrico con followup prolungato ha dimostrato che il filtro in PMMA mantiene bassi i livelli di β_2 microglobulina e porta a una riduzione del dolore articolare nei pazienti in dialisi cronica rispetto alle membrane cellulose⁴². Inoltre i dializzatori in PMMA della serie BG, contenenti gruppi funzionali anionici hanno dimostrato una riduzione del prurito uremico in questi pazienti, i componenti inducenti l'istamina del peso molecolare di 160 kDa erano rimossi per adsorbimento⁴².

La capacità di adsorbimento del PMMA è stata dimostrata in vitro e in vivo. Campistol e colleghi hanno dimostrato, mediante l'utilizzo di β_2 -microglobulina marcata, che il PMMA rimuove la β_2 -microglobulina per adsorbimento mentre il filtro in polisulfone ad alto flusso rimuove la medesima molecola per convezione⁴³.

L'impiego di membrane tradizionali ha portato a risultati incerti nell'ambito della depurazione extracorporea in corso di sepsi a causa della difficoltà nella rimozione delle medie molecole, range di peso molecolare all'interno del quale è compresa la maggior parte dei mediatori dell'infiammazione, compresa IL-6. Ciò ha condotto all'impiego delle membrane con capacità adsorbitiva anche in tale contesto) sia con tecniche di emodiafiltrazione (AN69, oXiris) che di emoperfusione (Cytosorb, Toraymyxin) che di adsorbimento selettivo su plasma (Coupled Plasmaphiltration ad adsorption, CPFA).

La maggior parte delle evidenze riguarda l'impiego del PMMA in CRRT in pazienti con shock settico ricoverati in terapia intensiva,

Gli studi di Nakada e colleghi hanno mostrato che le citochine infiammatorie venivano rimosse in maniera efficace e continua in pazienti con shock settico impiegando la membrana in PMMA in CVVHDF e che la rimozione avveniva per adsorbimento⁴⁴⁻⁴⁷.

Matsuda et al. hanno analizzato retrospettivamente 51 pazienti con ARDS complicata da AKI (Acute Kidney Injury) suddivisi in soggetti trattati con CVVHDF con PMMA oppure con CVVH o SLED con filtro diverso. La riduzione della concentrazione citochinica plasmatica era maggiore per il gruppo trattato con PMMA così come la sopravvivenza a 28 giorni⁴⁸.

Tuttavia un aspetto negativo dell'adsorbimento è la riduzione dell'efficienza convettiva e diffusiva che consegue all'ingombro sterico delle molecole adsorbite⁴⁹.

Interleuchina-6 e COVID-19

Interleuchina-6 (IL-6): struttura e funzione biologica

L'interleuchina-6 (IL-6) è una proteina di 26 KDa costituita da un omodimero di catene dotate di un dominio globulare a 4 α -eliche. Il recettore per IL-6 è costituito da una porzione deputata al legame con le citochine e da una catena destinata alla trasduzione del segnale che attiva una via JAK/STAT⁵⁰.

IL-6 riveste un ruolo sia nell'immunità innata che in quella specifica. Viene prodotta dai fagociti mononucleati, dalle cellule endoteliali, dai fibroblasti e dai linfociti T attivati in risposta agli agenti patogeni o ad

altre citochine, principalmente la interleuchina 1 (IL-1) e in tumor necrosis factor (TNF)⁵⁰. La sintesi e la secrezione IL-6 sono processi dinamici, e transitori che avvengono in risposta allo stimolo infettivo o a lesioni tissutali. In condizioni normali la sintesi di IL-6 è strettamente controllata da meccanismi trascrizionali e post- trascrizionali.

IL-6 è inizialmente sintetizzata e secreta in una lesione locale, successivamente compie una funzione endocrina a livello epatico determinando la sintesi di proteine di fase acuta come la proteina C-reattiva (CRP), la siero amiloide A (SAA), il fibrinogeno, l'aptoglobina e l' α 1-antichimotripsina⁵¹.

IL-6 inoltre agisce sul midollo osseo facilitando la maturazione dei megacariociti e l'immissione in circolo di piastrine⁵².

Inoltre, IL-6 promuove la differenziazione delle cellule T CD4+ naive, e ha un ruolo fondamentale per la differenziazione delle cellule Th17 dalle cellule T CD4+ naive. Al tempo stesso inibisce la differenziazione dei linfociti T regolatori. IL-6 induce anche la differenziazione delle cellule T CD8 + in cellule T citotolitiche⁵³.

Nei pazienti con malattia renale cronica, in particolar modo in quelli in emodialisi i livelli sierici di IL-6 risultano cronicamente elevati²⁰.

Ruolo della IL-6 nell'infezione da Sars CoV-2

Il meccanismo di entrata del virus Sars-Cov2 nella cellula è simile a quello degli altri coronavirus comparsi in precedenza come il virus responsabile della SARS nel 2003 ⁵⁴. La proteina spike interagisce con il protease angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) che funge da recettore. Inoltre è necessaria un co-recettore che è rappresentato dalla serine

protease2 (TMPRSS2) o da altre proteasi⁵⁵. L'espressione contemporanea di ACE2 e TMPRSS2 è necessaria per il completamento del processo di infezione della cellula. Una volta entrato nella cellula le particelle virali rilasciano il proprio RNA che viene tradotto in proteine strutturali con successiva secrezione del virus assemblato, per esocitosi⁵⁶. Il virus ha un tropismo per il tratto respiratorio data l'espressione di ACE-2 a livello delle vie aeree e delle cellule alveolari di tipo 2 nel parenchima polmonare. L'apoptosi che è determinata dall'infezione cellulare porta a infiammazione locale, con edema interstiziale infiammatorio che determinano polmonite interstiziale⁵⁷.

L'infezione da Sars-COV2 induce uno stato di iperinfiammazione, che può portare a ARDS (*Acute Respiratory Distress Syndrome*) e insufficienza multiorgano. La disregolazione della risposta immunitaria indotta dal virus innesca una cytokine release syndrome (CRS) determinata dalla attivazione abnorme della risposta immunitaria innata nel contesto di una deplezione delle cellule T che caratterizza COVID-19⁵⁸. L'IL-6 è una delle molecole maggiormente coinvolte in tale processo.

SCOPO

Lo scopo di questo studio è stato valutare gli effetti antinfiammatori di due differenti filtri dializzatori ad alta biocompatibilità in pazienti in trattamento emodialitico cronico affetti da COVID-19.

Obiettivo secondario è stato valutare l'influenza dei due filtri dializzatori sugli *outcomes* clinici

METODI

Pazienti e disegno dello studio

Si tratta di uno studio prospettico, osservazionale su pazienti in trattamento emodialitico cronico (>18 anni) affetti da COVID-19. L'infezione da Sars-CoV-2 è stata confermata mediante tampone nasofaringeo molecolare. I pazienti che hanno necessitato di ricovero ospedaliero sono stati ricoverati presso l'Unità Operativa di Nefrologia, Dialisi e Trapianto dell'Ospedale S. Orsola di Bologna oppure nelle altre degenze COVID dell'ospedale. L'arruolamento è cominciato il 15 marzo del 2020 e si è concluso il 30 maggio 2021. Nel periodo considerato l'Unità di Dialisi dedicata ai pazienti COVID-19 ha provveduto al trattamento dialitico di tutti i pazienti affetti da Sars-CoV-2 della provincia di Bologna con un bacino d'utenza di circa 800.000 abitanti.

Il trattamento emodialitico cronico con ritmo trisettimanale è stato l'unico criterio di inclusione. Criteri di esclusione sono stati il danno renale acuto, il trapianto renale e pazienti che richiedevano ventilazione invasiva in terapia intensiva alla diagnosi. Fino a marzo 2020 i pazienti sono stati trattati con idrossiclorochina e azitromicina fino a dimostrazione della non utilità di tale terapia⁵⁹. Successivamente è stato effettuato un trattamento standard con desametasone e tocilizumab, quando indicato, secondo le vigenti linee guida. L'eparina a basso peso molecolare è stata somministrata nei giorni di non dialisi dato il rischio trombotico dell'infezione da Sars-CoV-2.

I dati demografici e le caratteristiche cliniche dei soggetti arruolati sono stati registrati al momento dell'arruolamento cioè alla diagnosi. I parametri clinici (temperatura corporea, pressione arteriosa, frequenza cardiaca, saturazione dell'emoglobina, frequenza respiratoria) sono stati registrati alla diagnosi, prima e dopo ogni seduta emodialitica.

Gli esami laboratoristici eseguiti al momento dell'arruolamento (baseline) sono stati: emocromo completo con formula leucocitaria, IL-6, ferritina, proteina C reattiva (PCR) e procalcitonina (PCT).

Prima e dopo ogni seduta emodialitica è stata effettuata la determinazione di PCR, PCT, e IL-6.

I valori ematici misurati sono stati corretti per l'emoconcentrazione dovuta alla sottrazione idrica secondo la formula di Bergström and Wehle⁶⁰:

$$Tx\text{-corr} = Tx / \{ 1 + (\Delta BW / (0.2 * BW_{\text{post}})) \}$$

dove Tx è la concentrazione del soluto nel sangue e Tx-corr è la concentrazione del soluto corretto per l'emoconcentrazione, ΔBW (body weight) è il decremento ponderale interdialitico, e BW_{post} è il peso di fine dialisi.

Prescrizione della seduta dialitica

Tutti i pazienti arruolati erano in trattamento emodialitico con ritmo trisettimanale mediante emodiafiltrazione. Abbiamo messo a confronto due filtri dializzatori ad alta biocompatibilità e dalle potenziali proprietà immunomodulanti.

Il primo è un filtro in PMMA ad alto flusso (Filtrizer BG-U™, Toray, Tokyo, Japan) con una superficie di 2.1 m², un cut-off di 20,000 daltons e un coefficiente di ultrafiltrazione (KUF) di 43 ml/h/mmHg. Il secondo è un filtro in ATA (Solacea™, Nipro, con una superficie di 2.1 m², un cut off di 45,000 daltons and a KUF of 72 ml/h/mmHg.

L'ultrafiltrazione veniva stabilita in base alle necessità del paziente. La velocità del bagno di dialisi era 500 ml/min. Per l'anticoagulazione in corso di seduta è stata utilizzata eparina a basso peso molecolare (enoxaparin sodium Inhixa™, Techdow Pharma, Milan, Italy) La dose era 2,000 IU per i soggetti < 50 Kg di peso corporeo, 4,000 IU per I soggetti fra 50 and 90 Kg e 6,000 IU per i soggetti con peso >90 kg. L'enoxaparina veniva somministrata in bolo singolo all'inizio della seduta nella linea venosa.

Endpoints

L'*endpoint* primario è stato valutare gli effetti dei due filtri dializzatori sulle concentrazioni plasmatiche delle molecole infiammatorie analizzate, in particolare della IL-6.

L'*endpoint* secondario è stato valutare l'effetto dei due filtri dializzatori su outcomes clinici quali l'insorgenza di insufficienza respiratoria, l'ingresso in terapia intensiva, la mortalità e la durata del ricovero.

Analisi statistica

I risultati riferiti alle variabili continue con distribuzione normale sono stati riportati come media e deviazione standard (*standard deviation* SD).

I risultati riferiti alle variabili continue con distribuzione non normale

sono stati riportati come mediana e intervallo interquartile (*Interquartile range*, IQR). Il confronto fra i gruppi è stato effettuato mediante t test per le variabili continue con distribuzione normale. I test di Mann-Whitney e di Wilcoxon sono stati impiegati per le variabili continue a distribuzione non normale e il test di Fisher per le variabili categoriche.

L'analisi multivariata è stata condotta mediante regressione logistica multipla. Un *p value* < 0.05 è stato considerato significativo.

I calcoli sono stati effettuati mediante GraphPad Prism™ (version 8 for Windows, GraphPad Software Inc., CA, USA).

RISULTATI

Sono stati arruolati 74 pazienti in trattamento emodialitico cronico con COVID-19. L'età media era 68,30 anni (SD 15,71), 50 (71%) erano di sesso maschile, l'età dialitica mediana era 43,50 mesi (IQR 14,25 – 88,00) and il Charlson Comorbidity Index mediano era 4,50 (IQR 3,00 – 6,00). Riguardo le comorbidità, 61 soggetti (82%) presentavano patologia cardiovascolare, 28 (37%) diabete mellito, 9 (12%) patologia neoplastica e 10 (14%) obesità. Quarantanove pazienti (66%) sono andati incontro a polmonite interstiziale, 37 (50%) hanno sviluppato insufficienza respiratoria e 13 (18%) sono deceduti. Sessantuno soggetti (82%) sono stati ricoverati mentre i restanti sono stati gestiti come pazienti ambulatoriali.

Tra i pazienti ospedalizzati 7 (9%) hanno necessitato di ricovero in rianimazione e la durata mediana del ricovero complessivo è stata di 14 giorni (IQR 5,00 – 25,00).

Quarantotto pazienti sono stati trattati mediante OLHDF con filtro in ATA e 26 mediante OLHDF con filtro in PMMA. Sono state effettuate 612 sedute dialitiche in totale (420 con ATA e 191 con PMMA).

Le caratteristiche cliniche e laboratoristiche così come il confronto fra i due gruppi sono riassunte nella Tabella 1.

Non sussistevano differenze significative nelle caratteristiche cliniche e demografiche fra i due gruppi.

Non vi era differenza nei livelli ematici di IL6 e di PCR al basale fra i due gruppi mentre la PCT risultava più elevata nei pazienti trattati con ATA (1,60 pg/mL, IQR 0,72-2,77 vs 0.95 pg/mL IQR 0,53 – 1,48).

La IL-6 mediana pre-dialisi non differiva in maniera significativa nei pazienti trattati con ATA o PMMA (14,50 pg/mL, IQR 5,75 – 41,43 vs 13,90 pg/mL, IQR 5,80 – 34,10, p=0,6386). Nemmeno la IL-6 pre dialisi mediana suddivisa per seduta dialitica (dalla prima alla sesta dopo la diagnosi) differiva fra ATA e PMMA (Tabella 2).

Per quanto riguarda l'*end-point* primario, la IL-6RR% mediana è risultata significativamente più elevata nel gruppo ATA in confronto al gruppo PMMA (17.08%, IQR -9,0 – 40,0 vs 2,95%, IQR -34,63 – 27,32) (Figura 1). Suddividendo le popolazioni dei due gruppi in terzili sulla base della IL-6 pre-dialisi, l'impiego del filtro ATA ha mostrato IL-6RR% più elevate in tutti i terzili paragonato a PMMA (Tabella 1).

Per nessuno dei due filtri si sono verificate differenze in termini di IL-6RR% confrontando i terzili all'interno dello stesso gruppo (Tabella 1 e Figura 2).

Variables	Total (74)	ATA (48)	PMMA (26)	P
Età, anni, media (SD)	68.30 (15.71)	67.67 (15.48)	69.46 (16.37)	0.6421
Maschi, n (%)	51 (70)	34 (71)	17 (66)	0.7930
Età dialitica, mesi, mediana (IQR)	43.50 (14.25 – 88.00)	47.00 (13.75 – 89.75)	27.50 (14.25 – 71.50)	0.3653
Charlson Comorbidity Index, mediana (IQR)	4.50 (3.00 – 6.00)	4.00 (3.00-5.00)	5 (3.00-7.25)	0.2549
Vascular access				
Fistola arterovenosa, n (%)	53 (72)	39 (81)	14 (54)	0.0166
Catetere venoso centrale, n (%)	21 (28)	9 (9)	12 (46)	
Comorbidità				
Patologia CV, n (%)	61 (82)	39 (81)	22 (84)	>0,9999
DM, n (%)	28 (37)	15 (31)	13 (50)	0.1364
Neoplasia, n (%)	9 (12)	5 (10)	4 (15)	0.7113
BMI >30	10 (14)	4 (8)	6 (23)	0.1583
Sedute dialitiche n.	611	420	191	NA
Deceduti n (%)	13 (18)	8 (17)	5 (19)	0.7604
Insufficienza respiratoria, n (%)	37 (50)	22 (46)	15 (58)	0.8108
Polmonite interstiziale, (n%)	49 (66)	29 (60)	20 (77)	0.2008
IL-6 RR%, mediana (IQR)	14.55 (-15.13 – 36.71)	17.08 (-9.0 - 40.0)	2.95 (-34.63 – 27.32)	<0.001
Pre-HD IL-6 pg/mL, mediana (IQR)	14.30 (5.80 – 39.00)	14.50 (5.75 – 41.43)	13.90 (5.80 – 34.10)	0.6386
IL-6 RR% in base a IL-6 pre-HD				
1 st terzile, mediana (IQR)	17.21 (-21.93 – 39.59)	23.55 (-8.96-47.40)	3.72 (-51.66 – 30.08)	0.0013
2 nd terzile mediana (IQR)	13.13 (-14.40 – 34.91)	16.69 (-9.79–39.39)	2.18 (-24.03 – 25.95)	0.0405
3 rd terzile, mediana (IQR)	12.10 (-14.63 – 34.76)	12.99 (-8.73-35.75)	1.14 (-34.70 – 31.33)	0.0501
PCR RR%, mediana (IQR)	7.20 (0.15 – 13.04)	7.77 (2.47 – 13.77)	4.80 (-2.65 – 11.38)	0.0017
PCT RR%, mediana (IQR)	72.75 (58.86 – 80.18)	77.38 (70.92-82.97)	54.59 (42.62 – 63.16)	<0.0001
Laboratorio alla diagnosi				
Hb g/dL, mediana (IQR)	10.90 (9.6 – 11.90)	11.00 (9.70 – 12.10)	10.30 (9.17 – 11.60)	0.5985
PLT 10 ⁹ /L, mediana (IQR)	186 (140 – 217)	178 (144 – 221)	191 (131 – 216)	0.9363
WBC 10 ⁹ /L, mediana (IQR)	5.17 (3.99 – 7.11)	5.00 (3.90 – 6.57)	6.50 (4.13 – 7.92)	0.0974
Linfociti 10 ⁹ /L, mediana (IQR)	0.65 (0.50 – 0.99)	0.64 (0.48 – 0.90)	0.75 (0.59 – 1.38)	0.2064
Eosinofili 10 ⁹ /L, mediana (IQR)	0.10 (0.03 – 0.33)	0.09 (0.03 – 0-19)	0.17 (0.04 – 0.60)	0.3934
IL6 pg/mL, mediana (IQR)	21.25 (9.22 – 56.48)	20.30 (9.10 – 62.10)	22.60 (9.80 – 56.35)	0.8763
PCR mg/dL, mediana (IQR)	3.30 (0.54 – 12.68)	3.88 (0.77-143.70)	3.30 (0.33 – 9.98)	0.4134
PCT pg/mL, mediana (IQR)	1.40 (0.63 – 2.58)	1.60 (0.72-2.77)	0.95 (0.53 - 1.48)	0.0388
Albumina g/dL, mediana (IQR)	32.20 (22.10 – 36.60)	32.60 (28.70-37.40)	32.00 (29.65 – 34.55)	0.7105
Ricovero, n (%)	61 (82)	39 (81)	22 (84)	
Giorni di ricovero, mediana (IQR)	14.00 (5.00 – 25.00)	13.50 (5.00 – 23.75)	14.00 (5.00 – 30.00)	0.5518
Terapia intensiva, n (%)	7 (9)	5 (10)	2 (7)	>0.9999

Tabella 1. Caratteristiche cliniche e *outcomes* dell'intera popolazione e del gruppo ATA Vs PMMA. Abbreviazioni: CV (cardiovascolare); DM (diabete mellito); BMI (body mass index).

Sedute OLHDF	ATA	PMMA	P
1	19.70 (9.00 – 58.25)	22.60 (11.20 – 56.35)	0.6974
2	24.70 (10.05 – 69.00)	24.10 (7.20 – 51.60)	0.4888
3	25.25 (6.10 -70.45)	10.90 (5.50 – 36.40)	0.3094
4	22.90 (5.10 – 55.00)	20.80 (5.60 -99.10)	0.6809
5	15.30 (4.67 – 65-15)	16.20 (8.23 – 37.58)	0.8557
6	22.90 (5.10 – 55.00)	20.80 (5.60 – 99.10)	0.6809

Tabella 2. IL-6 pre-dialisi dalla prima alla sesta seduta emodialitica dopo la diagnosi. Risultati espresso come mediana (IQR).

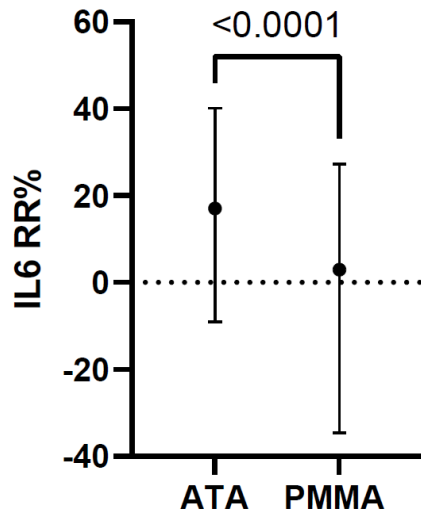


Figura 1. IL-6RR% nel Gruppo ATA vs PMMA. Risultati espressi come mediana (IQR)

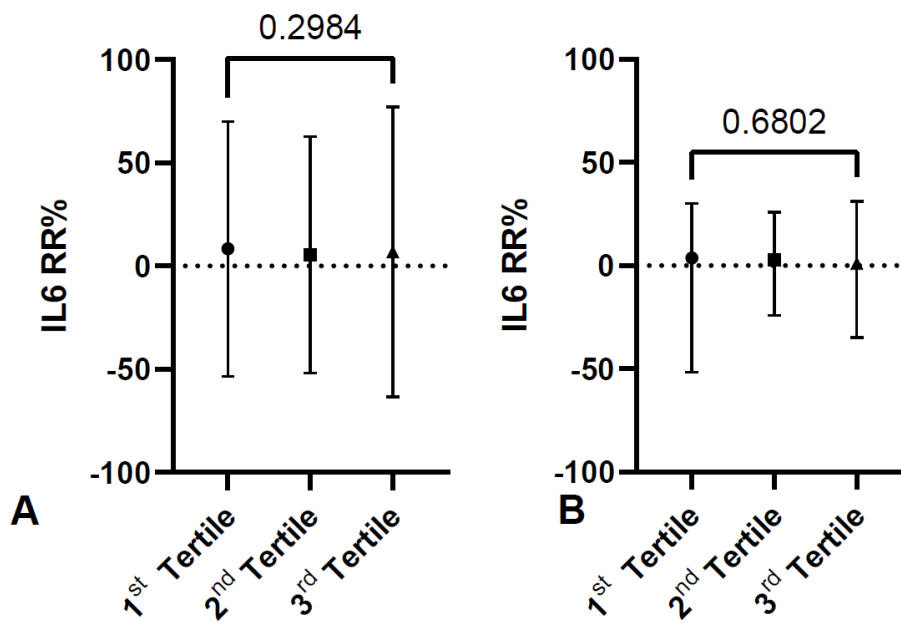


Figura 2. IL-6RR% nei vari terzili in base a IL-6 pre-dialisi nel gruppo ATA (A) e PMMA (B). Risultati espresso come mediana (IQR)

Oltre alla IL-6 sia la PCR che la PCT hanno mostrato una RR% mediana superiore nei soggetti trattati con ATA (Tabella 1).

Inoltre abbiamo realizzato una regressione logistica multipla considerando come variabile dipendente il raggiungimento di una IL6% >25% nella singola seduta e come variabili indipendenti il filtro di dialisi

impiegato e valori pre-dialitici di IL-6, PCR, PCT e ferritina. In questa analisi il filtro ATA ha determinato una maggiore probabilità di raggiungimento dell'*outcome* (OR 1.891 95% CI 1.273 - 2.840, p=0.0056) mentre elevati valori di PCR ne riducevano la probabilità (Tabella 3).

Variabile	OR	95% CI	P
ATA	1.891	1.273 - 2.840	0.0018
IL-6 pre-HD	1.003	1.001 - 1.007	0.0123
PCR pre-HD	0.9101	0.8682 - 0.9496	<0.0001
PCT pre-HD	0.9528	0.8644 - 1.008	0.2270
Ferritina	1.000	0.9998 - 1.000	0.7697

Tabella 3. Regressione logistica multipla con IL-6RR% >25% come variabile dipendente.

Nessuna differenza è stata registrata fra il gruppo trattato con ATA e quello trattato con PMMA in termini di mortalità (17% vs 20%, p =0,7604), di insorgenza di insufficienza respiratoria (46% vs 58%, p =0,8108), di giorni di ospedalizzazione (13,50; IQR 5,00 – 23,75 vs 14,00; IQR 5,00 – 30,00 p=0,5518) e di ricovero in terapia intensiva (7% vs 10% p= >0,9999).

DISCUSSIONE

È stato condotto uno studio prospettico osservazionale che ha avuto come obiettivo quello di valutare gli effetti di due differenti filtri dializzatori, ATA e PMMA, sulla rimozione della IL-6 e sugli *outcomes* clinici in pazienti in trattamento emodialitico cronico affetti da COVID-19.

Data l'elevata mortalità correlata all'infezione da Sars-CoV2 in questi pazienti è necessario tentare di ottimizzare il trattamento emodialitico al fine di contrastare la “tempesta citochinica” che caratterizza la malattia e che può portare a ARDS e insufficienza multiorgano^{61,62}.

Dei 72 pazienti arruolati, 48 sono stati trattati con OLHDF con filtro ATA e 26 con OLHDF con filtro PMMA e i gruppi sono risultati comparabili in termini clinici e demografici così come in termini di stato infiammatorio basale (Tabella 1).

Il 18% dei pazienti arruolati è deceduto confermato l'elevato tasso di mortalità in questi soggetti. La mortalità rilevata è leggermente inferiore rispetto al 20% descritto dallo *European Renal Association SARS-CoV-2 Database* (ERACODA), tuttavia, va tenuto presente che la nostra popolazione è in gran parte appartenente alla cosiddetta "seconda ondata" in cui i pazienti sono stati gestiti con protocolli diagnostici e terapeutici più standardizzati⁹.

Nel nostro studio l'utilizzo del filtro ATA o PMMA non ha influenzato gli *outcomes* clinici considerati cioè mortalità, insorgenza di insufficienza respiratoria, ricovero in terapia intensiva e durata dell'ospedalizzazione. In considerazione del ruolo della IL-6 quale elemento principale della "tempesta citochinica" nei pazienti con SARS-CoV-2 ci siamo concentrati su questa molecola per valutare gli effetti antinfiammatori dei due filtri di dialisi esaminati.

Dal momento che la IL-6 fa parte delle medie molecole (peso molecolare 26,5 KDa) abbiamo scelto di trattare i pazienti con OLHDF e con due filtri dializzatori con KUF elevate e con elevata biocompatibilità con lo scopo di massimizzare la *clearance* delle medie molecole e di minimizzare lo stimolo infiammatorio generato dal contatto sangue-filtro di dialisi. Abbiamo volute confrontare un filtro a documentata capacità adsorbitiva (PMMA) con uno a più elevata permeabilità idraulica e maggiore *molecular weight cut-off* (ATA)^{33,41}.

Abbiamo analizzato un numero elevato di sedute dialitiche (420 per ATA e 191 per PMMA) riscontrando una IL6RR% mediana maggiore nel gruppo ATA (Figura 1). Tali risultati sono stati confermati anche dopo aver suddiviso la popolazione in terzili sulla base della IL-6 pre-dialisi. Inoltre, elevati livelli di IL-6 pre-dialisi non influenzavano l'entità della IL-6RR% per nessuno dei due filtri.

Nei pazienti affetti da Sars-CoV2, come accade nella sepsi, le terapie di depurazione ematica extracorporea potrebbero avere un ruolo nel ripristinare la "omeostasi immunitaria" sebbene l'indicazione non-renale alla dialisi non sia validata^{63,64}. Il ruolo della depurazione extracorporea nella sepsi infatti è controverso e non sono stati dimostrati risultati univoci sugli *outcomes* clinici⁶⁵.

Inoltre, la maggioranza dei dati disponibili riguarda quadri di AKI con impiego di *continuous replacement therapy* (CRRT) in terapia intensiva e mancano dati rilevanti sugli effetti di differenti tecniche dialitiche intermittenti in pazienti in trattamento emodialitico cronico al di fuori del *setting* intensivo.

All'inizio della pandemia l'emodialisi bicarbonato con filtro a medio cut-off (MCO) è stata proposta come tecnica di scelta in virtù della sua teorica capacità di rimuovere le medie molecole e quindi i mediatori dell'infiammazione. Tuttavia tale raccomandazione non è supportata da dati sufficienti⁶⁶. Esposito et al. hanno randomizzato 29 pazienti in emodialisi cronica affetti da Sars-CoV-2 a emodialisi bicarbonato con filtro MCO o PMMA senza rilevare differenze significative in termini di mortalità. Va tenuto presente che lo studio non era disegnato per valutare la mortalità bensì l'effetto immunomodulante dei due filtri⁶⁷.

Yalin et al non hanno riscontrato differenza in termini di mortalità in uno studio retrospettivo che ha valutato 60 pazienti in emodialisi cronica affetti da SARS-CoV-2 trattati con filtro MCO o con un filtro a basso flusso⁶⁸.

Sebbene in CRRT la riduzione dei livelli di IL-6 sia dimostrata per PMMA^{48,69} e, in misura minore, per il polisulfone⁷⁰, i dati sulla rimozione della IL-6 mediante emodialisi intermittente sono scarsi.

Tarakcioğlu et al. hanno analizzato la rimozione delle citochine in 21 pazienti in emodialisi cronica trattati con filtro low-flux senza riscontrare differenze significative fra le concentrazioni pre e post-dialisi di IL-1 β , IL-6, TNF- α , and sIL-2R⁷¹.

Camoglu et al hanno osservato una migliore IL6RR con filtro MCO rispetto a un filtro standard ad alto flusso in 38 pazienti con AKI in corso di sepsi sebbene sia stata considerata solo una seduta dialitica per ogni paziente⁷².

Vi sono pochi dati disponibili riguardo la rimozione delle citochine per pazienti in emodialisi cronica affetti da SARS-CoV-2.

Nello studio sopracitato, Esposito et al hanno determinato i valori di IL-6 pre e post-dialisi in occasione della prima seduta dopo la diagnosi senza riscontrare variazioni significative⁶⁷.

De la Flor et al. hanno descritto 10 pazienti in emodialisi cronica affetti da SARS-CoV-2 che sono stati sottoposti a OLHDF con ATA. Gli autori hanno rilevato un decremento della IL-6 dopo 14 giorni nei sopravvissuti, e non nei deceduti, ma la IL6RR non veniva determinata e non era presente un gruppo di controllo⁴⁰. In uno studio prospettico Quiroga et al. hanno valutato 16 pazienti in emodialisi cronica affetti da SARS-CoV-

2 trattati con bicarbonato dialisi con PMMA riscontrando una IL6 RR% mediana del 23% determinata in occasione della prima seduta dialitica dopo la diagnosi. Inoltre un bilancio di IL-6 plasmatica positivo nella prima seduta dopo la diagnosi era associato a mortalità, tuttavia non era possibile valutare adeguatamente tale parametro data l'esiguità del campione⁷³.

Nel nostro studio abbiamo ottenuto una minore IL6RR% con PMMA, ma vanno tenute in considerazione alcune differenze metodologiche. In primo luogo, abbiamo analizzato tutte le sedute di dialisi lungo il corso della patologia, in secondo luogo, abbiamo utilizzato OLHDF invece della bicarbonato dialisi. Infine abbiamo impiegato un diverso filtro in PMMA. Il filtro PMMA NF utilizzato da Quiroga et al presenta una Kuf di 55 ml/h/mmHg, dunque maggiore di quella caratteristica del filtro BG-U (Kuf 43 ml/h/mmHg).

Inoltre la letteratura non è concorde riguardo all'efficacia della combinazione di adsorbimento e emodiafiltrazione⁴⁹.

Nakamura et al. hanno dimostrato una maggiore riduzione dei livelli di IL-6 dopo 72 ore nei pazienti con sepsi trattati con CRRT con PMMA che presentavano concentrazioni basali più elevate suggerendo che l'entità della rimozione fosse proporzionale alla concentrazione iniziale della citochina⁶⁹. Ciò non è stato riscontrato nella nostra popolazione, ma sussistono differenze fra la causa della CRS (SARS-CoV-2 vs sepsi batterica), in merito al grado di gravità dei pazienti. Inoltre, mentre Nakamura et al hanno preso in considerazione la variazione di IL-6 in un lasso di tempo di giorni, nel nostro studio abbiamo valutato l'effetto acuto di una seduta emodialitica di 4 ore sui livelli plasmatici della citochina e

ipotizziamo quindi una minore influenza del *trend* dinamico della produzione endogena della citochina sui risultati ottenuti.

Per approfondire l'analisi sulla RR della IL-6 abbiamo verificato che i livelli pre-dialisi fossero simili fra il gruppo ATA e PMMA lungo il decorso dell'infezione (Tabella 2).

Infine, la regressione logistica multipla ha mostrato che la probabilità di ottenere una IL6 RR% superiore al 25% risultava maggiore con l'impiego del filtro ATA dopo aggiustamento per i marcatori infiammatori determinati prima della seduta dialitica e che maggiori livelli di PCR pre-dialisi riducevano la probabilità di ottenere una IL-6 RR significativa suggerendo un ruolo della produzione endogena della IL-6 durante il trattamento dialitico stesso.

È ipotizzabile che tale produzione endogena della citochina sia causata sia dall'attività di malattia che dallo stimolo infiammatorio prodotto dal contatto fra il sangue e il circuito extracorporeo.

È difficile stabilire se la riduzione della concentrazione della citochina sia determinata solo dalla terapia extracorporea o se sia espressione, almeno in parte, della natura dinamica della CRS, del miglioramento della malattia sottostante o della risposta al trattamento.

Inoltre, è interessante notare come durante alcune sedute dialitiche i livelli plasmatici di IL-6 siano risultati aumentati come riscontrato anche da Quiroga et al⁷³. È possibile ipotizzare che tale fenomeno non sia dovuto a una mancata rimozione da parte della dialisi, ma a un grosso eccesso di produzione dovuto all'attività della malattia o al rilascio intradialitico di citochine in seguito all'attivazione monocitaria^{29,74,75}.

Oltre alla IL-6, abbiamo osservato una RR elevata per la PCT nell'intera popolazione, ma in misura maggiormente significativa nel gruppo ATA. Livelli elevati di PCT nei pazienti con COVID-19 sono associati a prognosi peggiore⁷⁶ e sono risultati essere un marcatore affidabile per la diagnosi di sovrainfezione batterica⁷⁷.

È noto che la PCT (14 KDa) non è solo un marcatore di infezione ma esercita un ruolo immunomodulatorio complesso nella sepsi che consiste in un effetto pro-infiammatorio (attivazione dei neutrofili e dei linfociti, stimolazione della produzione citochinica) e in un effetto che contribuisce alla "immunoparalisi" (inibizione dell'attività fagocitica nei neutrofili e dell'attivazione delle cellule T)^{78,79}.

Il nostro studio presenta diversi limiti: la sua natura osservazionale, il numero limitato di parametri infiammatori considerati e la numerosità ridotta della popolazione che non consente di trarre conclusioni sulla mortalità o sugli altri *outcomes* clinici. Inoltre non è stata determinata direttamente la rimozione della citochina dal sangue, ma solo sua *reduction ratio* dal momento che non è stata misurata nel dialisato.

Ad ogni modo, per quanto abbiamo potuto accertare, si tratta dei primi dati disponibili riguardo al confronto fra ATA e PMMA in pazienti in emodialisi cronica affetti da SARS-CoV-2 e un punto di forza di questo studio è l'elevato numero di sedute dialitiche analizzate.

CONCLUSIONI

Nella nostra popolazione di pazienti in emodialisi cronica affetti da COVID-19, trattati con OLHDF, il filtro ATA ha mostrato un miglior profilo anti-infiammatorio rispetto al filtro PMMA. Studi ulteriori e su un

un numero maggiore di soggetti sono tuttavia necessari per confermare questi risultati e poter valutare gli effetti sugli *outcomes* clinici.

BIBLIOGRAFIA

1. Robinson, B. M. *et al.* Factors affecting outcomes in patients reaching end-stage kidney disease worldwide: differences in access to renal replacement therapy, modality use, and haemodialysis practices. *The Lancet* **388**, 294–306 (2016).
2. Ekdahl, K. N., Soveri, I., Hilborn, J., Fellström, B. & Nilsson, B. Cardiovascular disease in haemodialysis: role of the intravascular innate immune system. *Nat. Rev. Nephrol.* **13**, 285–296 (2017).
3. Guan, W. *et al.* Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* **382**, 1708–1720 (2020).
4. Williamson, E. J. *et al.* Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. *Nature* **584**, 430–436 (2020).
5. Alfano, G. *et al.* The frail world of haemodialysis patients in the COVID-19 pandemic era: a systematic scoping review. *J. Nephrol.* **34**, 1387–1403 (2021).
6. Wu, Z. & McGoogan, J. M. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA* **323**, 1239 (2020).
7. Alberici, F. *et al.* A report from the Brescia Renal COVID Task Force on the clinical characteristics and short-term outcome of hemodialysis patients with SARS-CoV-2 infection. *Kidney Int.* **98**, 20–26 (2020).

8. Goicoechea, M. *et al.* COVID-19: clinical course and outcomes of 36 hemodialysis patients in Spain. *Kidney Int.* **98**, 27–34 (2020).
9. Goffin, E. *et al.* COVID-19-related mortality in kidney transplant and haemodialysis patients: a comparative, prospective registry-based study. *Nephrol. Dial. Transplant.* **36**, 2094–2105 (2021).
10. Combe, C. *et al.* At least 156 reasons to prioritize COVID-19 vaccination in patients receiving in-centre haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **36**, 571–574 (2021).
11. Xiang, F. *et al.* Lymphocyte depletion and subset alteration correlate to renal function in chronic kidney disease patients. *Ren. Fail.* **38**, 7–14 (2016).
12. Fernández-Fresnedo, G. *et al.* B lymphopenia in uraemia is related to an accelerated in vitro apoptosis and dysregulation of Bcl-2. *Nephrol. Dial. Transplant.* **15**, 502–510 (2000).
13. Meijers, R. W. T-cell ageing in end-stage renal disease patients: Assessment and clinical relevance. *World J. Nephrol.* **3**, 268 (2014).
14. Borges, A. *et al.* Apoptosis of Peripheral CD4⁺ T-Lymphocytes in End-Stage Renal Disease Patients Under Hemodialysis and rhEPO Therapies. *Ren. Fail.* **33**, 138–143 (2011).
15. Litjens, N. H. R., van Druningen, C. J. & Betjes, M. G. H. Progressive loss of renal function is associated with activation and depletion of naive T lymphocytes. *Clin. Immunol.* **118**, 83–91 (2006).
16. Alvarez-Lara, M. A. *et al.* The imbalance in the ratio of Th1 and Th2 helper lymphocytes in uraemia is mediated by an increased apoptosis of Th1 subset. *Nephrol. Dial. Transplant.* **19**, 3084–3090 (2004).

17. Mansouri, L., Nopp, A., Jacobson, S. H., Hylander, B. & Lundahl, J. Hemodialysis Patients Display a Declined Proportion of Th2 and Regulatory T Cells in Parallel with a High Interferon- γ Profile. *Nephron* **136**, 254–260 (2017).
18. Bencivenga, L., Rengo, G. & Varricchi, G. Elderly at time of COroNaVirus disease 2019 (COVID-19): possible role of immunosenescence and malnutrition. *GeroScience* **42**, 1089–1092 (2020).
19. Akhmerov, A. & Marbán, E. COVID-19 and the Heart. *Circ. Res.* **126**, 1443–1455 (2020).
20. Wolley, M., Jardine, M. & Hutchison, C. A. Exploring the Clinical Relevance of Providing Increased Removal of Large Middle Molecules. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **13**, 805–814 (2018).
21. Belmouaz, M. *et al.* Comparison of the removal of uraemic toxins with medium cut-off and high-flux dialysers: a randomized clinical trial. *Nephrol. Dial. Transplant.* gfz189 (2019)
doi:10.1093/ndt/gfz189.
22. Aucella, F. [Hemodiafiltration with endogenous reinfusion]. *G. Ital. Nefrol. Organo Uff. Della Soc. Ital. Nefrol.* **29 Suppl 55**, S72-82 (2012).
23. Grooteman, M. P. C. *et al.* Effect of Online Hemodiafiltration on All-Cause Mortality and Cardiovascular Outcomes. *J. Am. Soc. Nephrol.* **23**, 1087–1096 (2012).
24. Ok, E. *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.* **28**, 192–202 (2013).

25. Morena, M. *et al.* Treatment tolerance and patient-reported outcomes favor online hemodiafiltration compared to high-flux hemodialysis in the elderly. *Kidney Int.* **91**, 1495–1509 (2017).

26. Maduell, F. *et al.* High-Efficiency Postdilution Online Hemodiafiltration Reduces All-Cause Mortality in Hemodialysis Patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**, 487–497 (2013).

27. Locatelli, F. *et al.* Mortality risk in patients on hemodiafiltration versus hemodialysis: a ‘real-world’ comparison from the DOPPS. *Nephrol. Dial. Transplant.* **33**, 683–689 (2018).

28. Carrero, J. J., Yilmaz, M. I., Lindholm, B. & Stenvinkel, P. Cytokine Dysregulation in Chronic Kidney Disease: How Can We Treat It? *Blood Purif.* **26**, 291–299 (2008).

29. Poppelaars, F. *et al.* The Complement System in Dialysis: A Forgotten Story? *Front. Immunol.* **9**, 71 (2018).

30. Sunohara, T. & Masuda, T. Cellulose Triacetate as a High-Performance Membrane. in *Contributions to Nephrology* (eds. Saito, A., Kawanishi, H., Yamashita, A. C. & Mineshima, M.) vol. 173 156–163 (KARGER, 2011).

31. Kim, T. R., Hadidi, M., Motevalian, S. P., Sunohara, T. & Zydney, A. L. Effects of Plasma Proteins on the Transport and Surface Characteristics of Polysulfone/Polyethersulfone and Asymmetric Cellulose Triacetate High Flux Dialyzers: PROTEIN EFFECTS ON DIALYZER TRANSPORT AND SURFACE CHARACTERISTICS. *Artif. Organs* **42**, 1070–1077 (2018).

32. Huang, Z., Gao, D., Letteri, J. J. & Clark, W. R. Blood–Membrane Interactions During Dialysis. *Semin. Dial.* **22**, 623–628 (2009).
33. Sunohara, T. & Masuda, T. Fundamental Characteristics of the Newly Developed ATA™ Membrane Dialyzer. in *Contributions to Nephrology* (eds. Kawanishi, H. & Takemoto, Y.) vol. 189 215–221 (S. Karger AG, 2017).
34. Chanard, J. New insights in dialysis membrane biocompatibility: relevance of adsorption properties and heparin binding. *Nephrol. Dial. Transplant.* **18**, 252–257 (2003).
35. Kiaii, M. *et al.* Use of Electron-Beam Sterilized Hemodialysis Membranes and Risk of Thrombocytopenia. *JAMA* **306**, 1679 (2011).
36. Kuragano, T. *et al.* Comparison of the Effects of Cellulose Triacetate and Polysulfone Membrane on GPIIb/IIIa and Platelet Activation. *Blood Purif.* **21**, 176–182 (2003).
37. Urbani, A. *et al.* Proteomic analysis of protein adsorption capacity of different haemodialysis membranes. *Mol. Biosyst.* **8**, 1029 (2012).
38. Pieroni, L. *et al.* Biocompatibility assessment of haemodialysis membrane materials by proteomic investigations. *Mol. Biosyst.* **11**, 1633–1643 (2015).
39. Albalade Ramón, M. *et al.* El triacetato de celulosa asimétrico es una alternativa segura y eficaz para la hemodiafiltración en línea. *Nefrología* **38**, 315–320 (2018).
40. De La Flor, J. C. *et al.* Targeting Cytokine Storm in COVID-19: A Role of Online Hemodiafiltration with Asymmetric Cellulose

Triacetate in Maintenance Hemodialysis Patients—A Report of 10 Cases. *Case Rep. Nephrol.* **2021**, 1–7 (2021).

41. Santoro, A. & Guadagni, G. Dialysis membrane: from convection to adsorption. *Clin. Kidney J.* **3**, i36–i39 (2010).
42. Aoike, I. Clinical significance of protein adsorbable membranes—Long-term clinical effects and analysis using a proteomic technique. *Nephrol. Dial. Transplant.* **22**, v13–v19 (2007).
43. Campistol, J. M., Torregrosa, J. V., Ponz, E. & Fenollosa, B. β_2 -Microglobulin Removal by Hemodialysis with Polymethylmethacrylate Membranes. in *Contributions to Nephrology* (ed. Ronco, C.) vol. 125 76–85 (KARGER, 1998).
44. Oda, S. *et al.* Continuous Hemofiltration/Hemodiafiltration in Critical Care. *Ther. Apher. Dial.* **6**, 193–198 (2002).
45. Matsuda, K., Hirasawa, H., Oda, S., Shiga, H. & Nakanishi, K. Current Topics on Cytokine Removal Technologies. *Ther. Apher. Dial.* **5**, 306–314 (2001).
46. Nakada, T., Hirasawa, H., Oda, S., Shiga, H. & Matsuda, K. Blood purification for hypercytokinemia. *Transfus. Apher. Sci.* **35**, 253–264 (2006).
47. Hirasawa, H., Oda, S. & Matsuda, K. Continuous Hemodiafiltration with Cytokine-Adsorbing Hemofilter in the Treatment of Severe Sepsis and Septic Shock. in *Contributions to Nephrology* (eds. Ronco, C., Bellomo, R. & Kellum, J. A.) 365–370 (KARGER, 2007). doi:10.1159/000102127.
48. Matsuda, K., Moriguchi, T., Oda, S. & Hirasawa, H. Efficacy of Continuous Hemodiafiltration with a Cytokine-Adsorbing Hemofilter in

- the Treatment of Acute Respiratory Distress Syndrome. in *Contributions to Nephrology* (eds. Suzuki, H. & Hirasawa, H.) vol. 166 83–92 (KARGER, 2010).
49. Maduell, F. Is There an ‘Optimal Dose’ of Hemodiafiltration? *Blood Purif.* **40**, 17–23 (2015).
50. Hunter, C. A. & Jones, S. A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat. Immunol.* **16**, 448–457 (2015).
51. Heinrich, P. C., Castell, J. V. & Andus, T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem. J.* **265**, 621–636 (1990).
52. Ishibashi, T. *et al.* Human interleukin 6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 5953–5957 (1989).
53. Bettelli, E. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235–238 (2006).
54. Lan, J. *et al.* Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* **581**, 215–220 (2020).
55. Hoffmann, M. *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* **181**, 271-280.e8 (2020).
56. Zumla, A., Chan, J. F. W., Azhar, E. I., Hui, D. S. C. & Yuen, K.-Y. Coronaviruses — drug discovery and therapeutic options. *Nat. Rev. Drug Discov.* **15**, 327–347 (2016).
57. Cao, W. & Li, T. COVID-19: towards understanding of pathogenesis. *Cell Res.* **30**, 367–369 (2020).

58. Mehta, P. *et al.* COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *The Lancet* **395**, 1033–1034 (2020).
59. Singh, A. & Sonpar, A. In adults exposed to COVID-19, hydroxychloroquine did not reduce confirmed or probable COVID-19; trial stopped for futility. *Ann. Intern. Med.* **173**, JC41 (2020).
60. Bergström, J. & Wehle, B. NO CHANGE IN CORRECTED β 2-MICROGLOBULIN CONCENTRATION AFTER CUPROPHANE HAEMODIALYSIS. *The Lancet* **329**, 628–629 (1987).
61. Wan, S. *et al.* Relationships among lymphocyte subsets, cytokines, and the pulmonary inflammation index in coronavirus (COVID-19) infected patients. *Br. J. Haematol.* **189**, 428–437 (2020).
62. Zeng, Z. *et al.* Longitudinal changes of inflammatory parameters and their correlation with disease severity and outcomes in patients with COVID-19 from Wuhan, China. *Crit. Care* **24**, 525 (2020).
63. Sepsis — Theory and Therapies. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1600–1602 (2003).
64. Ankawi, G. *et al.* Extracorporeal techniques for the treatment of critically ill patients with sepsis beyond conventional blood purification therapy: the promises and the pitfalls. *Crit. Care* **22**, 262 (2018).
65. Ronco, C. *et al.* Extracorporeal Blood Purification and Organ Support in the Critically Ill Patient during COVID-19 Pandemic: Expert Review and Recommendation. *Blood Purif.* **50**, 17–27 (2021).
66. Ronco, C., Reis, T. & Cozzolino, M. Rationale for Medium Cutoff Membranes in COVID-19 Patients Requiring Renal Replacement Therapy. *Nephron* **144**, 550–554 (2020).

67. Esposito, P. *et al.* Effects of Different Dialysis Strategies on Inflammatory Cytokine Profile in Maintenance Hemodialysis Patients with COVID-19: A Randomized Trial. *J. Clin. Med.* **10**, 1383 (2021).
68. Yalin, S. F. *et al.* Medium Cut-Off Dialysis Membranes: Can They Have Impact on Outcome of COVID-19 Hemodialysis Patients? *Blood Purif.* **50**, 921–924 (2021).
69. Nakamura, M. *et al.* Treatment of Severe Sepsis and Septic Shock by CHDF Using a PMMA Membrane Hemofilter as a Cytokine Modulator. in *Contributions to Nephrology* (eds. Suzuki, H. & Hirasawa, H.) vol. 166 73–82 (KARGER, 2010).
70. Lumlertgul, N., Hall, A., Camporota, L., Crichton, S. & Ostermann, M. Clearance of inflammatory cytokines in patients with septic acute kidney injury during renal replacement therapy using the EMiC2 filter (Clic-AKI study). *Crit. Care* **25**, 39 (2021).
71. Tarakçioğlu, M., Erbağci, A. B., Usalan, C., Deveci, R. & Kocabaş, R. Acute effect of hemodialysis on serum levels of the proinflammatory cytokines. *Mediators Inflamm.* **12**, 15–19 (2003).
72. Comoglu, M. *et al.* Effects of Medium Cutoff Membranes on Pro-Inflammatory Cytokine and Oxidative Marker Levels in Patients with Sepsis Who Developed Acute Kidney Injury. *Blood Purif.* 1–8 (2021) doi:10.1159/000519881.
73. Quiroga, B. *et al.* Dynamic assessment of interleukin-6 during hemodialysis and mortality in coronavirus disease-19. *Ther. Apher. Dial.* **25**, 908–916 (2021).
74. Girndt, M., Heisel, O. & Kohler, H. Influence of dialysis with polyamide vs haemophan haemodialysis on monokines and complement

activation during a 4-month long-term study. *Nephrol. Dial. Transplant.* **14**, 676–682 (1999).

75. Gu, Y., Ding, F., Qin, H., Zhao, H. & Lin, S. Synergetic effect of dialyzer membrane and lipopolysaccharide on peripheral blood mononuclear cell cytokine production in uremic patients. *Chin. Med. J. (Engl.)* **113**, 315–319 (2000).

76. Zheng, Z. *et al.* Risk factors of critical & mortal COVID-19 cases: A systematic literature review and meta-analysis. *J. Infect.* **81**, e16–e25 (2020).

77. Houghton, R. *et al.* C-reactive protein-guided use of procalcitonin in COVID-19. *JAC-Antimicrob. Resist.* **3**, dlab180 (2021).

78. Alves-Filho, J. C., de Freitas, A., Spiller, F., Souto, F. O. & Cunha, F. Q. THE ROLE OF NEUTROPHILS IN SEVERE SEPSIS. *Shock* **30**, 3–9 (2008).

79. Wei, J. X., Verity, A., Garle, M., Mahajan, R. & Wilson, V. Examination of the effect of procalcitonin on human leucocytes and the porcine isolated coronary artery. *Br. J. Anaesth.* **100**, 612–621 (2008).

RELAZIONE SULLE ATTIVITÀ SVOLTE NEL CORSO DEL DOTTORATO E PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE

Nel corso del dottorato il candidato ha realizzato il presente progetto di tesi seguendo personalmente i pazienti in emodialisi cronica affetti da COVID-19 presso l'unità di dialisi dedicata.

Il candidato infatti, nel corso del dottorato, ha prestato servizio presso la U.O. Nefrologia, Dialisi e Trapianto diretta dal Prof. La Manna.

Il candidato ha inoltre collaborato alla realizzazione delle seguenti pubblicazioni scientifiche edite a stampa seguendo i progetti di ricerca ed esse associati:

Fusaro M, Tripepi G, Plebani M, Politi C, Aghi A, Taddei F, Schileo E, Zaninotto M, La Manna G, Cianciolo G, Gallieni M, Cosmai L, Messa P, Ravera M, Nickolas TL, Ferrari S, Ketteler M, Iervasi G, Mereu MC, Vettor R, Giannini S, **Gasperoni L**, Sella S, Brandi ML, Cianferotti L, De Caterina R. The Vessels-Bone Axis: Iliac Artery Calcifications, Vertebral Fractures and Vitamin K from VIKI Study. *Nutrients*. 2021 Oct 12;13(10):3567. doi: 10.3390/nu13103567. PMID: 34684568; PMCID: PMC8539275.

Fusaro M, Cianciolo G, Tripepi G, Plebani M, Aghi A, Politi C, Zaninotto M, Nickolas TL, Ferrari S, Ketteler M, La Manna G, **Gasperoni L**, Messa P, Ravera M, Gallieni M, Cosmai L, Locatelli F, Iervasi G, Vettor R, Mereu MC, Sella S, Arcidiacono G, Giannini S. Oral Calcitriol Use, Vertebral Fractures, and Vitamin K in Hemodialysis Patients: A Cross-Sectional Study. *J Bone Miner Res*. 2021 Dec;36(12):2361-2370. doi: 10.1002/jbmr.4440. Epub 2021 Oct 8. PMID: 34622481.

Cianciolo G, Cappuccilli M, Tondolo F, **Gasperoni L**, Zappulo F, Barbuto S, Iacovella F, Conte D, Capelli I, La Manna G.

Vitamin D Effects on Bone Homeostasis and Cardiovascular System in Patients with Chronic Kidney Disease and Renal Transplant Recipients.

Nutrients. 2021 Apr 25;13(5):1453. doi: 10.3390/nu13051453.

Donati G, Cappuccilli M, Donadei C, Righini M, Scrivo A, **Gasperoni L**, Zappulo F, La Manna G. Toxin Removal and Inflammatory State Modulation during Online Hemodiafiltration Using Two Different Dialyzers (TRIAD2 Study).

Methods Protoc. 2021 Apr 22;4(2):26. doi: 10.3390/mps4020026.

Fusaro M, Cianciolo G, Brandi ML, Ferrari S, Nickolas TL, Tripepi G, Plebani M, Zaninotto M, Iervasi G, La Manna G, Gallieni M, Vettor R, Aghi A, **Gasperoni L**, Giannini S, Sella

S, M Cheung A. Vitamin K and Osteoporosis. *Nutrients*. 2020 Nov 25;12(12):3625. doi: 10.3390/nu12123625.

Cianciolo G, La Manna G, Capelli I, **Gasparoni L**, Galassi A, Ciceri P, Cozzolino M. The role of activin: the other side of chronic kidney disease-mineral bone disorder? *Nephrol Dial Transplant* . 2020 Sep 17;gfaa203. doi: 10.1093/ndt/gfaa203

Donati G, Angeletti A, **Gasparoni L**, Piscaglia F, Croci Chiocchini AL, Scrivo A, Natali T, Ullo I, Guglielmo C, Simoni P, Mancini R, Bolondi L, La Manna G. Detoxification of bilirubin and bile acids with intermittent coupled plasmafiltration and adsorption in liver failure (HERCOLE study). *J Nephrol* . 2020 Jul 24. doi: 10.1007/s40620-020-00799-w.

Cianciolo G, De Pascalis A, **Gasparoni L**, Tondolo F, Zappulo F, Capelli I, Cappuccilli M, La Manna G. The Off-Target Effects, Electrolyte and Mineral Disorders of SGLT2i. *Molecules*. 2020 Jun 15;25(12):2757. doi: 10.3390/molecules25122757.

Capelli I, Aiello V, **Gasparoni L**, Comai G, Corradetti V, Ravaioli M, Biagini E, Graziano C, La Manna G. Kidney Transplant in Fabry Disease: A Revision of the Literature. *Medicina (Kaunas)*. 2020 Jun 10;56(6):284. doi: 10.3390/medicina56060284.

Cozzolino M, Cianciolo G, Podestà MA, Ciceri P, Galassi A, **Gasparoni L**, Manna G. Current Therapy in CKD Patients Can Affect Vitamin K Status. *Nutrients*. 2020 May 30;12(6):1609. doi: 10.3390/nu12061609.

Irene Capelli, Fabio Pizza, Marco Ruggeri, **Lorenzo Gasparoni**, Elisa Carretta, Gabriele Donati, Giuseppe Cianciolo, Giuseppe Plazzi, Gaetano La Manna. Time evolution of restless legs syndrome in haemodialysis patients. *Clinical Kidney Journal*, 2019, 1–7. doi: 10.1093/ckj/sfz148

Mario Cozzolino, Maria Fusaro, Paola Ciceri, **Lorenzo Gasparoni**, and Giuseppe Cianciolo. The Role of Vitamin K in Vascular Calcification. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2019 Nov;26(6):437-444. doi: 10.1053/j.ackd.2019.10.005. Review.

Capelli I, Cianciolo G, **Gasparoni L**, Galassi A, Ciceri P, Cozzolino M. Nutritional vitamin D in CKD: Should we measure? Should we treat? *Clin Chim Acta*. 2020 Feb;501:186-197. doi: 10.1016/j.cca.2019.11.010. Epub 2019 Nov 23.

Giuseppe Cianciolo, Antonio De Pascalis, Irene Capelli, **Lorenzo Gasparoni**, Luca Di Lullo, Antonio Bellasi, and Gaetano La Manna. Mineral and Electrolyte Disorders With SGLT2i Therapy. *JBMR Plus*. 2019 Nov 4;3(11):e10242. doi: 10.1002/jbm4.10242. eCollection 2019 Nov. Review.

Gibertoni D, Mandreoli M, De Amicis S, Cantarelli C, Corradini M, Caruso F, Testa F, **Gasparoni L**, Orrico C, Brancaleoni F, Martelli D, Angelini ML, Ferri B, Flachi M, Iommi M, Santoro A

The accuracy of hospital discharge records and their use in identifying and staging chronic kidney disease. *G Ital Nefrol.* 2019 Sep 24;36(5). pii: 2019-vol5. Italian.

Capelli I, **Gasparoni L**, Ruggeri M, Donati G, Baraldi O, Sorrenti G, Caletti MT, Aiello V, Cianciolo G, La Manna G. New mineralocorticoid receptor antagonists: update on their use in chronic kidney disease and heart failure. *J Nephrol.* 2019 Apr 15. doi: 10.1007/s40620-019-00600-7

Capelli I, Cianciolo G, **Gasparoni L**, Zappulo F, Tondolo F, Cappuccilli M, La Manna G. Folic acid and vitamin B12 administration in CKD, why not? *Nutrients.* 2019 Feb 13; 11, 383; doi: 10.3390/nu11020383.

Baraldi O, Comai G, Cuna V, Palmerini E, **Gasparoni L**, Croce Chiocchini AL, Malvi D, Fabbriozzi B, Ferrari D, La Manna G.. Ifosfamide-induced karyomegalic interstitial nephritis in Ewing's sarcoma and Osteosarcoma: report of two cases. *Gazz Med Ital.* 2018 Nov;177(11):651-7; doi: 10.23736/S0393-3660.17.03602-6.

Inoltre il candidato ha gestito i seguenti trial clinici randomizzati e controllati multicentrici in qualità di *Investigator*:

Protocolli di fase 3:

-“*FInerenone in reducinG cArdiovascular moRtality and mOrbidity in Diabetic Kidney Disease*” (FIGARO), Bayer.

-“*FInerenone in reducing kiDnEy faiLure and disease prOgression in Diabetic Kidney Disease*” (FIDELIO), Bayer.

Protocolli di fase 2:

-A randomized, double-blind, placebo-controlled, multi-center study to assess the safety and efficacy of individually titrated oral doses of runcaciguat in subjects with clinical diagnosis of chronic kidney disease with diabetes and/or hypertension and at least one cardiovascular comorbidity (CONCORD), Bayer

-A randomized, double-blind, parallel group, placebo-controlled, multi-center study to assess the safety and tolerability of monthly subcutaneous administrations of a low and high dose cohort of osocimab to ESRD patients on regular hemodialysis (CONVERT), Bayer

-A randomized, double-blind, multicenter study to assess the efficacy and safety of a 6 month oral treatment with the chymase inhibitor BAY 1142524 at a dose of 25 mg BID in comparison to placebo on top of standard of care in patients with type II diabetes and a clinical diagnosis of diabetic kidney disease (CADA DIA), Bayer

Inoltre il candidato ha collaborato alla realizzazione dello studio VAMPIRE (Vessel wall MRI and Histology in Polycystic Renal patients aneurysms), tuttora in corso.

Infine il candidato ha effettuato attività di tutoraggio nella realizzazione di tesi e lavori scientifici nei confronti dei Medici in Formazione Specialistica.