



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOINGEGNERIA

**INTERAZIONE TRA BIOMATERIALE ADSORBENTE E
ANTIBIOTICO LINEZOLID PER IL TRATTAMENTO DELLA SEPSI:
CARATTERIZZAZIONE DEL PROCESSO DI ADSORBIMENTO
NELLA TERAPIA EXTRACORPOREA DI EMOPERFUSIONE**

**Relatore
Prof. Andrea Bagno**

**Correlatrice
Ing. Anna Lorenzin**

**Laureanda
Natascha Perin
2021073**

ANNO ACCADEMICO 2021 – 2022

15 Dicembre 2022

Indice

| | |
|---|-----------|
| Abstract | pagina 1 |
| Introduzione | pagina 3 |
| Capitolo 1: la sepsi | pagina 5 |
| 1.1 Definizione e riconoscimento | pagina 5 |
| 1.2 Immunopatogenesi della sepsi | pagina 9 |
| 1.3 Sindrome da disfunzione multiorgano | pagina 12 |
| 1.4 Diagnosi | pagina 13 |
| 1.5 Gestione della sepsi | pagina 14 |
| 1.5.1 Trattamenti renali sostitutivi | pagina 15 |
| Capitolo 2: le terapie di depurazione extracorporea | pagina 17 |
| 2.1 Macchina per la terapia extracorporea | pagina 17 |
| 2.1.1 Attuatori | pagina 18 |
| 2.1.2 Sensori | pagina 20 |
| 2.1.3 Preparazione della macchina | pagina 22 |
| 2.1.4 Anticoagulazione | pagina 23 |
| 2.2 Circuito extracorporeo | pagina 24 |
| 2.2.1 Le linee del circuito | pagina 25 |
| 2.2.2 I dispositivi di depurazione extracorporea | pagina 25 |
| 2.3 Meccanismi di trasporto di fluidi e soluti attraverso una membrana semipermeabile | pagina 26 |
| 2.3.1 Ultrafiltrazione | pagina 26 |
| 2.3.2 Convezione | pagina 26 |
| 2.3.3 Diffusione | pagina 27 |
| 2.3.4 Adsorbimento | pagina 28 |
| 2.4 Il filtro dializzatore | pagina 30 |
| 2.4.1 Struttura chimico-fisica della membrana semipermeabile | pagina 31 |
| 2.4.2 Parametri geometrici del filtro | pagina 32 |
| 2.4.3 Parametri di prestazione del filtro | pagina 32 |
| 2.5 La cartuccia adsorbente | pagina 34 |
| 2.5.1 Struttura chimico-fisica | pagina 35 |
| 2.5.2 Biocompatibilità | pagina 36 |
| 2.6 Trattamenti sostitutivi renali continui | pagina 36 |

| | |
|--|-----------|
| 2.6.1 Ultrafiltrazione | pagina 36 |
| 2.6.2 Emofiltrazione | pagina 37 |
| 2.6.3 Emodialisi | pagina 37 |
| 2.6.4 Emodiafiltrazione | pagina 38 |
| 2.6.5 Emoperfusione o plasma perfusione | pagina 38 |
| 2.6.6 Plasmaferesi | pagina 40 |
| 2.7 I trattamenti CRRT nella sepsi | pagina 40 |
| 2.8 Device per la cura della sepsi | pagina 42 |
| 2.8.1 Cytosorb | pagina 42 |
| 2.8.2 Cartucce Jafron | pagina 44 |
| 2.8.3 Toraymyxin | pagina 47 |
| 2.8.4 oXiris | pagina 48 |
| 2.8.5 Seraph 100 | pagina 50 |
| Capitolo 3: l'antibiotico Linezolid | pagina 51 |
| 3.1 Farmacocinetica | pagina 51 |
| 3.1.1 Assorbimento | pagina 52 |
| 3.1.2 Distribuzione | pagina 52 |
| 3.1.3 Metabolismo | pagina 52 |
| 3.1.4 Eliminazione | pagina 53 |
| 3.2 Farmacodinamica | pagina 54 |
| 3.3 Impiego clinico del Linezolid | pagina 54 |
| Capitolo 4: materiali e metodi | pagina 57 |
| 4.1 Materiali | pagina 57 |
| 4.2 Metodi | pagina 59 |
| 4.2.1 Esperimento con soluzione non in circolazione | pagina 60 |
| 4.2.2 Esperimento con soluzione in circolazione | pagina 62 |
| 4.2.3 Esperimento con l'impiego di sangue | pagina 67 |
| 4.2.4 Esperimento con il filtro oXiris | pagina 70 |
| 4.3 Quantificazione delle concentrazioni di Linezolid nei campioni | pagina 71 |
| 4.4 Analisi dei risultati | pagina 72 |
| 4.4.1 Isotherme di adsorbimento | pagina 73 |
| Capitolo 5: risultati e discussione | pagina 75 |
| 5.1 Risultati | pagina 75 |
| 5.2 Andamento della concentrazione di Linezolid nel reservoir | pagina 81 |

| | |
|---|-----------|
| 5.3 Tasso di rimozione e massa adsorbita | pagina 84 |
| 5.3.1 Relazione tra massa adsorbita e massa nel reservoir | pagina 87 |
| 5.4 Velocità di adsorbimento | pagina 89 |
| 5.5 Isotherme di adsorbimento | pagina 91 |
| 5.3 Discussione | pagina 92 |
| Conclusioni | pagina 97 |
| Bibliografia e sitografia | pagina 99 |

Abstract

La sepsi è una disfunzione d'organo provocata da una reazione immunitaria sistemica molto forte in risposta ad uno stato di infezione generalizzata. Questa sindrome, nonostante i progressi in ambito clinico, è una delle principali cause di morbilità e mortalità nei pazienti critici. Nella sepsi la risposta immunitaria disregolata ha un ruolo cruciale: un ampio spettro di mediatori pro ed anti-infiammatori intervengono ed inducono nel paziente settico lo stato di immunoparalisi.

Il corretto dosaggio di antibiotico è essenziale per ridurre il tasso di mortalità in un paziente settico. Oltre agli antibiotici, per il trattamento della sepsi, si può ricorrere all'uso delle terapie extracorporee. In aggiunta al mantenimento della funzionalità renale, i trattamenti extracorporei permettono la rimozione dei mediatori responsabili della risposta immunitaria. Grazie all'adsorbimento aspecifico, però, le terapie extracorporee possono influire negativamente sulla terapia antibiotica somministrata al paziente e rendere il processo di guarigione ostico. La possibile rimozione di un antibiotico tramite adsorbimento ne riduce la concentrazione plasmatica e può portare al fallimento della cura.

L'evidenza suggerisce che la corretta somministrazione di antibiotici nella giusta dose e al momento giusto può ridurre il tasso di mortalità nei pazienti settici: questo studio si pone l'obiettivo di fornire degli spunti per un migliore impiego dell'antibiotico Linezolid.

Al fine di comprendere come modulare la somministrazione del farmaco, in questo lavoro di tesi si è valutato l'adsorbimento dell'antibiotico Linezolid operato dalla cartuccia Jafron HA380, simulando un trattamento di emoperfusione *in vitro*. Lo scopo di questo studio è indagare le interazioni esistenti tra le beads e l'antibiotico, la quantità di farmaco adsorbito e la capacità adsorbente della cartuccia Jafron HA380.

Da questo lavoro è emerso che la cartuccia HA380 opera una forte riduzione dell'antibiotico con un Removal Ratio superiore al 99%. L'interazione osservata tra il materiale adsorbente e il Linezolid è dunque molto forte.

Di conseguenza, saranno necessari degli studi per comprendere in maniera esaustiva la reale interazione tra il Linezolid e il materiale adsorbente e per chiarire l'eventuale necessità di rimodulazione della terapia antibiotica in un paziente affetto da sepsi sottoposto ad un trattamento extracorporeo renale.

Introduzione

La sepsi è una grave condizione clinica associata alla risposta infiammatoria di tipo sistemico grave o allo shock settico. Ciò che caratterizza la sepsi è una risposta abnorme e incontrollata del sistema immunitario, che può sfociare in una sindrome da disfunzione d'organo multipla, compromettendo il funzionamento di diversi organi fino a condurre alla morte, se non viene riconosciuta e trattata nel minor tempo possibile.

La sepsi è un'emergenza sanitaria a livello mondiale e la sua incidenza sul sistema sanitario è destinata ad aumentare negli anni, anche come conseguenza dell'invecchiamento della popolazione e della sempre più diffusa resistenza antibiotica. I dati evidenziano un'incidenza della sepsi nell'Unione Europea di circa 90 casi per 100.000 abitanti/anno, con una stima di 1,4 milioni di casi di sepsi l'anno e con un tasso di mortalità che oscilla, a seconda delle aree interessate, tra il 20 e il 40% [1].

La sepsi è la causa più comune di ricovero d'urgenza nell'unità di terapia intensiva (ICU) e una delle principali cause di morte tra i pazienti ricoverati in ICU [2]. Nonostante gli innegabili progressi clinici raggiunti, la mortalità a breve e a lungo termine rimane elevata. Frequenti sono le complicanze a lungo termine sviluppate dai pazienti sopravvissuti alla sepsi. Il totale recupero richiede tempo e più del 50% dei pazienti guariti presenta la cosiddetta sindrome post-sepsi, caratterizzata da deficit fisici e cognitivi, alterazioni cardiovascolari e re-infezioni [3].

La sepsi può rappresentare l'ultima tappa del progresso di una malattia infettiva. I pazienti affetti da Covid-19, tra le varie complicanze, sviluppano anche sepsi o disfunzione d'organo multipla.

In particolar modo nello scenario pandemico attuale, la sepsi rappresenta una grave minaccia per la sanità a livello mondiale. Il trattamento della sepsi costituisce un costo non irrisorio per il sistema sanitario: il costo medio della sua cura a livello ospedaliero è stato stimato in oltre 32.000 dollari per paziente [2].

La gestione della sepsi risulta molto complicata e la terapia non dovrebbe essere solo antibiotica per fermare l'infezione, ma si dovrebbe prevedere un trattamento capace di rimodulare il sistema immunitario. In quest'ottica, al fine di ridurre la possibilità di danno agli organi, si possono applicare varie terapie di purificazione extracorporea del sangue. La tecnica di emoperfusione, attraverso l'uso di cartucce adsorbenti, permette di eliminare le molecole anti-infiammatorie e pro-infiammatorie responsabili dell'azione incontrollata del sistema immunitario. Inoltre, spesso la sepsi può delinarsi come causa di danno renale acuto

(Acute Kidney Injury, AKI) e quindi condurre alla necessità di trattare il paziente con terapia renale sostitutiva (Renal Replacement Therapy, RRT).

I pazienti interessati da sepsi sono anche inclini a infezioni da microrganismi multiresistenti (Multi Drug Resistant, MDR), come lo Stafilococco aureo meticillino-resistente (Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus, MRSA) e gli stafilococchi coagulasi-negativi meticillino-resistenti (Methicillin-Resistant Coagulase Negative Staphylococci, MR-CoNS). L'antibiotico Linezolid è tra gli antibiotici utilizzati contro queste infezioni, soprattutto in terapia intensiva. Il dosaggio standard di 600 mg/12 h fornisce generalmente un'esposizione plasmatica adeguata [4]. Tuttavia, la terapia sostitutiva renale continua (Continuous Renal Replacement Therapy, CRRT), a cui i pazienti settici possono essere sottoposti, può potenzialmente indurre l'eliminazione dell'antibiotico a causa delle sue proprietà fisico-chimiche.

Questo lavoro di tesi analizza le tecniche di depurazione extracorporea renale, con particolare riguardo all'emoperfusione tramite cartucce adsorbenti impiegate nel trattamento della sepsi. L'obiettivo è definire se esiste un'interazione tra una cartuccia sorbente (HA380, Jafron, Cina) e l'antibiotico Linezolid. Ci si è avvalsi di un circuito sperimentale e di mini-moduli contenenti il materiale sorbente per caratterizzare la possibile interazione attraverso simulazioni *in vitro*.

I risultati ottenuti possono avere rilevanza clinica per quanto riguarda la cinetica di adsorbimento del Linezolid durante il trattamento di emoperfusione al fine di mantenere un livello plasmatico efficace nei pazienti critici sottoposti a terapie extracorporee.

Capitolo 1: la sepsi

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), nel corso della 70° World Health Assembly (2017), ha dichiarato la sepsi una reale emergenza sanitaria. È la causa maggiore di mortalità e morbilità nel mondo: uccide quattro volte più del tumore al colon, cinque volte di più dell'ictus e dieci volte di più delle malattie ischemiche cardiache. Tra i Paesi dell'Unione Europea, il 30% delle morti per sepsi avviene in Italia, ove si registra un incremento progressivo costante (da 18'668 decessi per sepsi nel 2003 a 49'301 nel 2016) [5].

1.1 Definizione e riconoscimento

Per decenni, la sepsi è stata considerata una diffusione sistemica di un'infezione che porta a manifestazioni cliniche che compromettono diversi organi e sistemi. La comprensione che le manifestazioni sistemiche dell'infezione potrebbero verificarsi attraverso mediatori dell'infiammazione ha portato alla definizione attuale di sepsi. La comunità accademica internazionale ha rivisto e aggiornato la definizione di sepsi tre volte per rendere quanto più facile possibile il riconoscimento del paziente settico.

Nel IV secolo a.C., Ippocrate propose per la prima volta il termine " σ η ψις" (sepsi), identificando la sepsi come un processo di decadimento o decomposizione della materia organica [6].

Nel 1991 si definì la sepsi, "Sepsis-1", come una risposta infiammatoria sistemica (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS) causata da un'infezione, e si classificava la sepsi in base alla gravità, ovvero sepsi, sepsi grave e shock settico [7]. Era diagnosticata con la presenza di almeno due dei seguenti criteri, detti criteri SIRS:

- temperatura $> 38^{\circ}\text{C}$ (ipertermia) o $< 36^{\circ}\text{C}$ (ipotermia)
- frequenza cardiaca > 90 bpm
- tachipnea con frequenza respiratoria > 20 atti/min
- globuli bianchi $> 12000/\text{ml}$ (leucocitosi) o $< 4000/\text{ml}$ (leucopenia).

In questa definizione non si indicava la disfunzione d'organo.

La definizione è stata successivamente rivista nel 2001, "Sepsis-2", e il termine "sepsi grave" è diventato "sepsi complicata da disfunzione d'organo". Con questa definizione è stato suggerito l'utilizzo di sistemi di punteggio (ad esempio, Sequential Organ Failure Assessment, SOFA) per definire la disfunzione d'organo [7].

I progressi nella comprensione dei meccanismi patogeni della sepsi e la preoccupazione che il concetto fosse privo di specificità, hanno portato alla revisione del concetto di sepsi nel 2016,

“Sepsis-3”. La sepsi è una *"disfunzione d'organo pericolosa per la vita causata da una risposta disregolata dell'ospite all'infezione"*, dove la disfunzione d'organo è identificata con un punteggio SOFA superiore a due [8]. Ora la sepsi è considerata una condizione clinica diversa dalla SIRS (Figura 1.1).

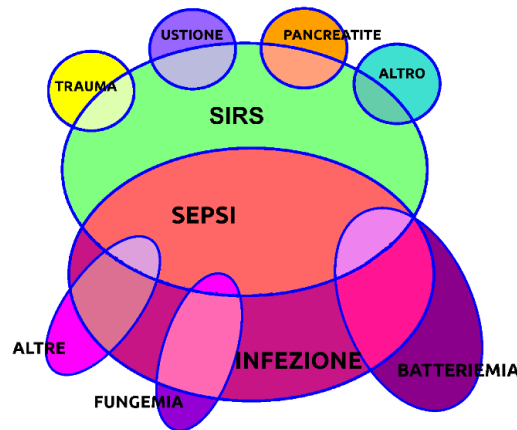


Figura 1.1: Rappresentazione grafica della distinzione tra le definizioni SIRS e SEPSI.

La definizione “Sepsis-3” sottolinea i) la presenza di una risposta non omeostatica dell'ospite all'infezione, ii) la potenziale letalità che è notevolmente superiore a quella di una semplice infezione, e iii) la necessità di un riconoscimento urgente. A tale scopo è stato sviluppato un nuovo punteggio di valutazione per i pazienti, q-SOFA (Quick SOFA) per facilitare l'identificazione dei pazienti potenzialmente a rischio di sepsi [7]. Il punteggio qSOFA è una versione modificata del SOFA. Il punteggio qSOFA è facile da calcolare poiché ha solo tre componenti: alterazione dello stato di coscienza, frequenza respiratoria e pressione arteriosa (Tabella 1.1). Il riconoscimento di un'alterazione di questi valori porta all'assegnazione di un punto. Un punteggio ≥ 2 è associato a possibile presenza di sepsi.

La diagnosi definitiva viene poi effettuata applicando il SOFA score, che risulta più complesso. I criteri che vengono presi in considerazione riflettono la funzione dei diversi organi, per cui viene posta l'attenzione sulla funzionalità respiratoria, cardiovascolare, renale, neurologica, epatologica ed ematologica. Si assegna un punteggio da 0 a 4 in base alla disfunzionalità dell'organo in esame, così come riportato in Tabella 1.2. Con un punteggio SOFA ≥ 2 accompagnato da infezione si ha la diagnosi di sepsi. I componenti del SOFA (come il livello di creatinina o di bilirubina) richiedono esami di laboratorio e quindi potrebbero non cogliere tempestivamente le disfunzioni dei singoli organi e ritardare la diagnosi di sepsi (Figura 1.2).

| Parametri qSOFA | Punteggio |
|---|-----------|
| Alterazione dello stato di coscienza | 1 |
| Pressione sanguigna sistolica ≤ 100 mmHg | 1 |
| Frequenza respiratoria ≥ 22 | 1 |

Tabella 1.1: Parametri del punteggio q-SOFA.

| SOFA | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
|--|----------------------------------|-------------------------------|--|---|---|
| Sistema nervoso centrale (Glasgow Coma Scale, GCS) | 15 | 13-14 | 10-12 | 6-9 | < 6 |
| Sistema cardio-circolatorio (pressione arteriosa media, MAP) | ≥ 70 mmHg | < 70 mmHg | Dopamina < 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per min per almeno 1 h o qualsiasi dose di Dobutamina | Dopamina 5.1-15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per min per almeno 1 h Adrenalina ≤ 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per min Noradrenalina ≤ 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per min | Dopamina >15 ≤ 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per min per almeno 1 h Adrenalina > 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per min Noradrenalina > 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per min |
| Sistema respiratorio (rapporto tra pressione parziale arteriosa e frazione inspirata di ossigeno, PO_2/FiO_2) | ≥ 400 mmHg | < 400 mmHg | < 300 mmHg | < 200 mmHg con supporto (ventilazione meccanica) | < 100 mmHg con supporto (ventilazione meccanica) |
| Sistema epatico (bilirubina) | 1.2 mg/dL | 1.2-1.9 mg/dL | 2.0-5.9 mg/dL | 6.0-11.9 mg/dL | > 12.0 mg/dL |
| Sistema renale (creatinina o diuresi) | ≤ 1.2 mg/dL | 1.2-1.9 mg/dL | 2.0-3.4 mg/dL | 3.5-4.9 mg/dL Diuresi < 500 mL/die | ≥ 5.0 mg/dL Diuresi < 200 mL/die |
| Coagulazione (conta piastrinica) | $\geq 150 \times 10^3/\text{mL}$ | < 150 $\times 10^3/\text{mL}$ | < 100 $\times 10^3/\text{mL}$ | < 50 $\times 10^3/\text{mL}$ | < 20 $\times 10^3/\text{mL}$ |

Tabella 1.2: Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)-Score e rispettivi valori di riferimento per la determinazione del punteggio della disfunzionalità di ogni sistema.

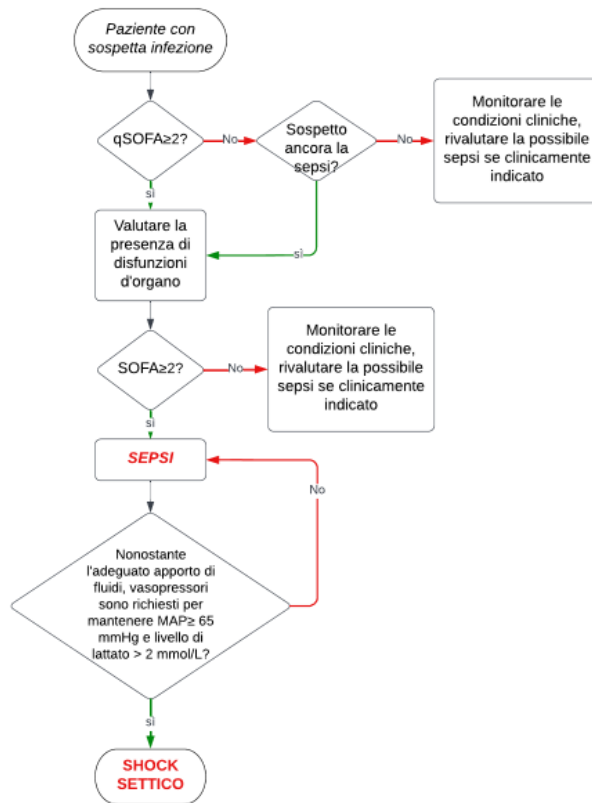


Figura 1.2: Applicazione dei criteri clinici per identificare i pazienti con sepsi e shock settico.

La sepsi è vista come una reazione grave, fuori controllo, all'infezione e la si distingue dallo shock settico (Figura 1.3), definito dalla compresenza di sepsi, disfunzione d'organo, infezione e un'ipotensione persistente che richiede la somministrazione di vasopressori per mantenere una pressione arteriosa media (MAP) superiore a 65 mmHg o un livello di lattato superiore a 2 mmol/l. Questo sottogruppo di pazienti è particolarmente a rischio: la loro mortalità ospedaliera è superiore al 40% [8].

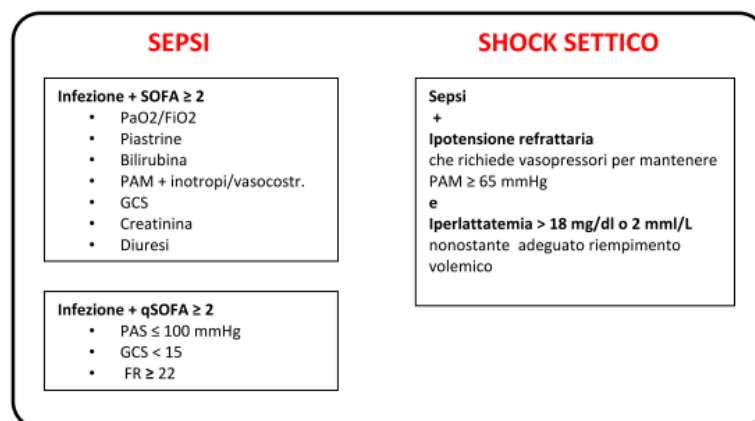


Figura 1.3: Criteri di diagnosi di sepsi e shock settico.

Si riassumono in Tabella 1.3 i criteri diagnostici di sepsi, sepsi grave, shock settico, sindrome da disfunzione multiorgano (Multiple Organ Dysfunction Syndrome, MODS) e sindrome da distress respiratorio acuto (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) [8].

| | |
|----------------------|---|
| Sepsi | <ul style="list-style-type: none"> - temperatura corporea $\geq 38.3^{\circ}$ o $\leq 36^{\circ}$ - tachipnea (> 24 atti/minuto) o $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg - tachicardia (> 90 battiti/minuto) - globuli bianchi > 12000 o $< 4000/\mu\text{L}$ o forme immature $> 10\%$ - PCR (proteina C reattiva) > 2 SD (standard deviation) di valori normali, procalcitonina plasmatica > 2 SD di valori normali - ipossiemia arteriosa: $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ (pressione/frazione) < 300 - oliguria acuta (0.5 mL/kg/ora o 45 mL/ora per almeno 2 ore) - aumento creatinina > 0.5 mg/dl o > 44.2 $\mu\text{mol/L}$ - lattato > 1 mmol/L - iperbilirubinemia > 2 mg/dL (> 34 $\mu\text{mol/L}$) |
| Sepsi grave | <ul style="list-style-type: none"> - alterazione dello stato mentale - ipotensione arteriosa responsiva ai liquidi (PA (pressione arteriosa) sistolica < 90 mmHg, PA media < 70 mmHg, riduzione > 40 mmHg di pressione) - lattato > 2 mmol/L - ipossiemia arteriosa $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 250$ (< 200 in presenza di polmonite) - oliguria acuta (< 0.5 mL/kg/h per almeno 2 ore nonostante adeguata reidratazione) - creatininemia > 2 mg/dL (176.8 $\mu\text{mol/L}$) - iperbilirubinemia > 4 mg/dL (> 68 $\mu\text{mol/L}$) - conta piastrinica $< 100000/\mu\text{L}$, INR (International Normalized Ratio) > 1.5 o aPTT (tempo di tromboplastina parziale attivata) > 60 sec) |
| Shock settico | ipotensione arteriosa persistente nonostante infusione di 30 mL/kg di cristalloidi e necessit  dell'uso di farmaci vasopressori |
| MODS | si riferisce a disfunzione progressiva di pi  organi; non ci sono criteri universali per le disfunzioni dei singoli organi. Di solito vengono utilizzati i parametri organo-specifici segnalati per la sepsi grave |
| ARDS | <ul style="list-style-type: none"> - esordio acuto - ipossiemia arteriosa: $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 200$ - infiltrati polmonari bilaterali - Wedge Pulmonary Pressure < 18 mmHg o non evidenza di ipertensione atriale sinistra |

Tabella 1.3: Caratteristiche cliniche di sepsi, sepsi grave, shock settico, MODS e ARDS.

1.2 Immunopatogenesi della sepsi

Pi  di cento anni fa, William Osler, medico canadese, osserv  che "il paziente sembra morire pi  per la risposta del corpo a un'infezione piuttosto che per l'infezione stessa" [9].

Come illustrato in Figura 1.4, a livello cellulare e molecolare, la patogenesi della sepsi   estremamente complessa e coinvolge molteplici aspetti dell'interazione tra i microrganismi infettanti e l'ospite [9]. Il riconoscimento dei patogeni e la conseguente attivazione cellulare sono fondamentali per il controllo dell'infezione.

L'interazione di componenti strutturali e di tossine batteriche (endotossine di batteri gram-negativi o lipopolisaccaride LPS e acidi teicoici di gram-positivi) con l'ospite avviene o tramite l'ingresso nel torrente circolatorio del patogeno o per diffusione in circolo di mediatori infiammatori liberati.

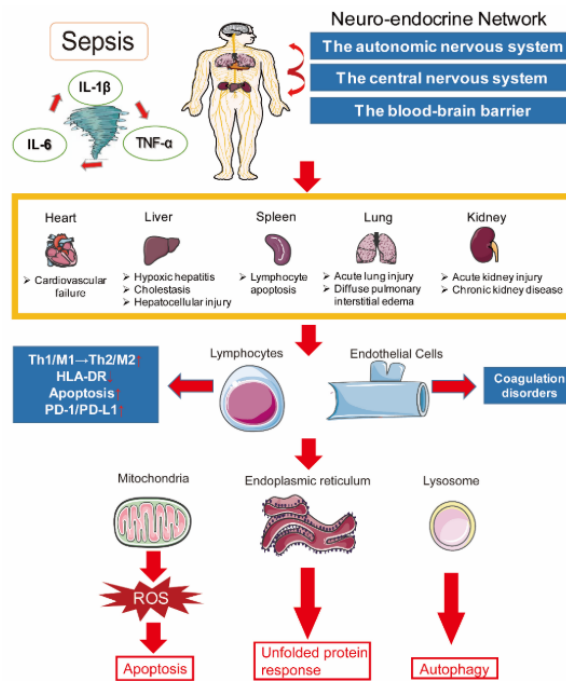


Figura 1.4: La complessa patogenesi della sepsi.

Lo squilibrio infiammatorio è la base della patogenesi della sepsi. L'equilibrio tra i mediatori pro-infiammatori e antinfiammatori regola i processi infiammatori, tra cui l'adesione, la chemiotassi, la fagocitosi dei batteri invasori, l'uccisione dei batteri e la fagocitosi dei detriti dal tessuto leso. Se i mediatori sono bilanciati, l'infiammazione viene superata e l'omeostasi viene ripristinata. Il risultato finale è la riparazione e la guarigione dei tessuti.

La sepsi si verifica quando il rilascio di mediatori pro-infiammatori in risposta a un'infezione supera i limiti dell'ambiente locale, portando ad una risposta generalizzata (Figura 1.5).

Tra i mediatori pro-infiammatori si possono riconoscere importanti citochine pro-infiammatorie come il fattore di necrosi tumorale (TNF- α) e le interleuchine (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10). I mediatori antinfiammatori includono le citochine antinfiammatorie in grado di inibire la produzione di TNF α e IL-1. Tali mediatori antinfiammatori sopprimono il sistema immunitario inibendo la produzione di citochine da parte delle cellule mononucleari e delle cellule T-helper.

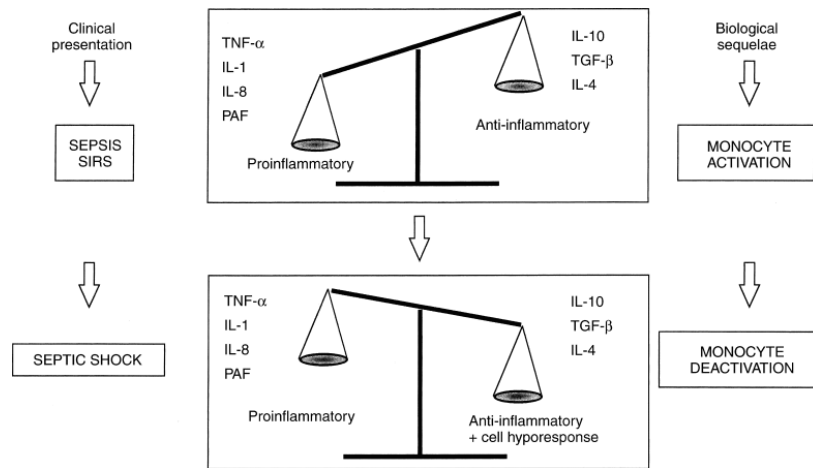


Figura 1.5: Rappresentazione della risposta infiammatoria che si verifica nelle fasi pro- e antinfiammatorie della sepsi.

Il sistema del complemento è un insieme di proteine che aiuta ad eliminare gli agenti patogeni da un organismo. È dimostrato che l'attivazione del sistema del complemento svolge un ruolo importante nella sepsi [6].

La risposta acuta iniziale dell'ospite ai patogeni fa sì che i macrofagi “inghiottano” i patogeni e producano una gamma di citochine pro-infiammatorie. Questo può innescare una tempesta di citochine e attivare il sistema immunitario innato. Per “tempesta citochinica” si intende un’ampia produzione di citochine, oltre i livelli normali, da parte dell’organismo in risposta alla presenza di un microrganismo esterno percepito come fortemente patogeno. Le citochine, la cui funzione è segnalare alle cellule immunitarie il sito dove intervenire, se prodotte in elevato numero, richiamano nel sito d’infezione troppe cellule T e macrofagi, provocando gravi danni a tessuti e organi.

L’infiammazione acuta è indotta in primo luogo dal sistema immunitario innato, che a sua volta contribuisce all’attivazione dell’immunità acquisita. L’immunità innata si avvale delle cellule epiteliali, le cellule endoteliali, i macrofagi e i fibroblasti. Tali cellule presentano sulla propria superficie i recettori dell’immunità innata (Pattern Recognition Receptors, PRR) la cui funzione è quella di rilevare la presenza di microrganismi. Ciascun organismo patogeno espone sulla propria superficie dei pattern molecolari associati ai patogeni chiamati PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns). Il riconoscimento del PAMP dal PRR innesca la risposta infiammatoria, la quale è orchestrata da citochine pro-infiammatorie, ad esempio il TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-12.

I recettori dell’immunità innata sono anche attivati dalle proteine nucleari, mitocondriali e citosoliche dell'ospite, note come modelli molecolari associati al danno, DAMP (Damage-Associated Molecular Patterns), che vengono rilasciati dalle cellule durante la sepsi in seguito

all'attivazione dell'inflammasoma o dopo la morte cellulare (necrosi o apoptosi). Il ruolo dei DAMP consiste nella promozione di alcuni processi infiammatori.

I monociti svolgono un ruolo importante nella fisiopatologia della sepsi. Con il progredire della sepsi, si assiste ad un progressivo deterioramento funzionale delle cellule adibite alla difesa dell'organismo, che si traduce in un deterioramento delle funzioni immunitarie innate. Sebbene una gran parte dei pazienti con sepsi possa morire durante la tempesta iniziale di citochine, i pazienti che sopravvivono a questo stadio possono sviluppare immunosoppressione, che induce la mancata eliminazione delle infezioni primarie, lo sviluppo di infezioni secondarie e la riattivazione di potenziali virus [9].

1.3 Sindrome da disfunzione multiorgano

Il danno cellulare, accompagnato dal rilascio di mediatori pro-infiammatori e antinfiammatori, spesso progredisce fino alla disfunzione d'organo (Figura 1.6). Nessun sistema d'organo è protetto dalle conseguenze della sepsi:

- sistema circolatorio: l'ipotensione dovuta alla vasodilatazione diffusa è una conseguenza involontaria del rilascio di mediatori vasoattivi, come la prostaciclina e ossido nitrico (NO), prodotti dalle cellule endoteliali [9]. L'ipotensione può anche essere dovuta alla redistribuzione del liquido intravascolare;
- sistema respiratorio: la lesione endoteliale nei vasi polmonari durante la sepsi disturba il flusso sanguigno capillare e aumenta la permeabilità microvascolare, con conseguente edema polmonare interstiziale e alveolare [9];
- sistema epatico: il sistema reticoloendoteliale del fegato agisce normalmente come prima linea di difesa per eliminare i batteri. La disfunzione epatica può impedire l'eliminazione dell'endotossina e dei prodotti batterici, precludendo l'appropriata risposta citochinica locale e consentendo la diffusione diretta di questi prodotti potenzialmente dannosi nella circolazione sistemica;
- sistema renale: la sepsi è spesso accompagnata da insufficienza renale acuta (AKI). L'AKI si manifesta in circa il 19% dei pazienti con sepsi, nel 23% dei casi di sepsi severa, fino ad arrivare al 50% dei casi di pazienti affetti da shock settico [10]. La risoluzione del paziente settico è molto legata alla risoluzione del danno renale. I mediatori infiammatori PAMPs (molecole rilasciate dai patogeni, endotossine) e DAMPs (molecole liberate dalle cellule danneggiate) vanno in circolo e possono provocare danno a livello del rene. Queste molecole possono essere liberamente filtrate dal glomerulo e possono alterare il microcircolo e danneggiare l'epitelio

tubulare renale. Le linee guida suggeriscono di iniziare la terapia extracorporea nelle seguenti condizioni: ristagno di fluidi, alterazione dell'equilibrio acido-base e scompenso elettrolitico. In aggiunta, con le terapie extracorporee mirate al paziente settico è possibile modulare la concentrazione dei mediatori infiammatori;

- sistema nervoso: complicanze legate al sistema nervoso centrale si verificano frequentemente nei pazienti settici, spesso prima dell'insufficienza di altri organi [9];
- coagulazione: l'interazione tra infiammazione e coagulazione è ampiamente riconosciuta. La risposta pro-infiammatoria nelle sepsi attiva il processo coagulativo e inibisce i meccanismi anticoagulanti e fibrinolitici [10].

La disfunzione di organi e apparati MODS non può essere considerata un evento unico, ma un continuum di un processo progressivo di sofferenza dei singoli organi.

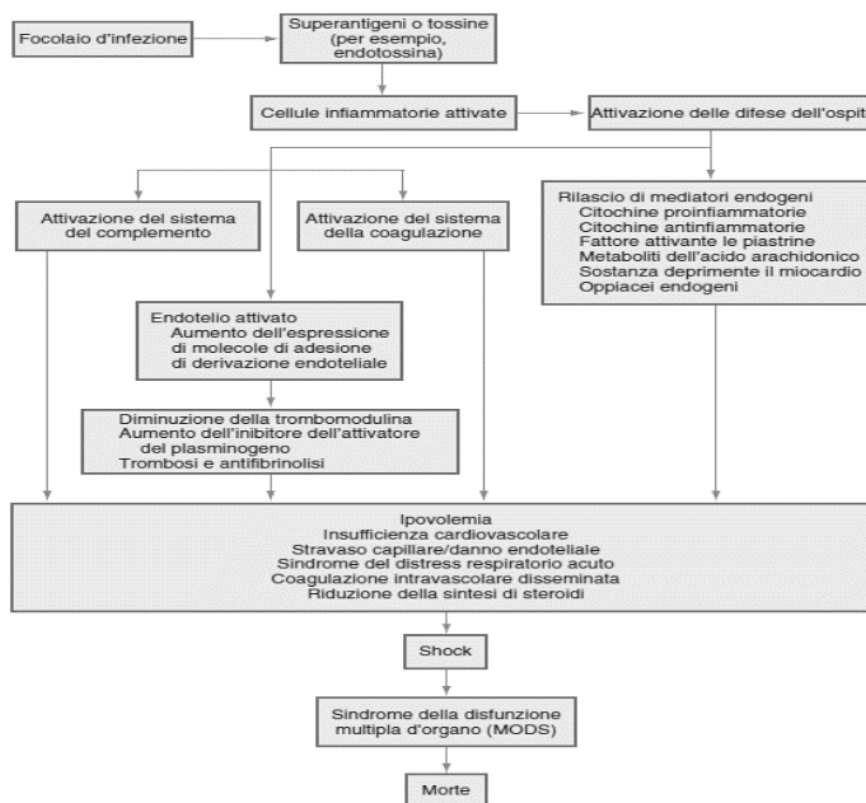


Figura 1.6: Fisiopatologia di un processo settico.

1.4 Diagnosi

La diagnosi risulta difficile ed è essenziale essere precoci se si considera la tempo-dipendenza della patologia: il tasso di mortalità aumenta dell'8% per ogni ora di ritardo del trattamento.

Un limite per la diagnosi tempestiva di sepsi e shock settico è l'esigua quantità di dati clinici che richiedono esami di laboratorio.

Per una corretta diagnosi è necessario isolare l'agente patogeno dal sangue effettuando un'emocoltura. In pazienti non in terapia antibiotica, tre prelievi successivi di emocolture consentono di individuare l'agente responsabile con il 99% di probabilità [6].

Due biomarcatori possono aiutare nell'individuazione di un'infezione: la proteina C-reattiva (PCR) e la procalcitonina (PCT) [9].

1.5 Gestione della sepsi

Sono state studiate o sono in corso di valutazione numerose terapie per il trattamento della sepsi. Il trattamento della sepsi deve essere iniziato il prima possibile, entro la prima ora dall'identificazione del paziente potenzialmente settico.

La priorità terapeutica è costituita dalla somministrazione di liquidi, per correggere alterazioni quali l'ipossiemia e l'ipotensione, e di antibiotici, per eliminare l'agente infettivo.

La somministrazione di liquidi si avvale di soluzioni colloidali (plasma, albumina al 5%) o soluzioni cristalloidi: in caso di ematocrito < 30% è necessario eseguire trasfusioni di sangue [6].

L'antibioticoterapia deve essere intrapresa non appena effettuati i prelievi microbiologici. La scelta iniziale sarà necessariamente su base empirica e si prediligono antibiotici ad ampio spettro, per avere un'azione mirata sia contro i batteri gram-positivi che gram-negativi. [6]. Poiché è noto che ceppi di *Stafilococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) sono responsabili di molte infezioni, è opportuno scegliere un glicopeptide (Vancomicina o Teicoplanina) o in alternativa Daptomicina, Linezolid o Ceftarolina [9]. Per quanto riguarda l'attività nei confronti dei batteri gram-negativi, possono essere associate in alternativa cefalosporine di terza o quarta generazione, Carbapenemi e Monobattamici [9].

L'efficacia degli antibiotici dipende dalla concentrazione ematica del farmaco e da quanto tempo il livello ematico rimane al di sopra della concentrazione minima inibitoria per l'agente patogeno. Il quantitativo di farmaco somministrato dovrebbe essere scelto sulla base della sua clearance per evitare sotto- o sovra- dosaggi.

Il supporto vasopressore è raccomandato al fine di mantenere una pressione arteriosa media di 65 mmHg. In caso di ipotensione persistente nonostante la somministrazione di liquidi, è opportuno procedere con farmaci ionotropi positivi quali dopamina o dobutamina, o vasopressori, quali norepinefrina o noradrenalina [9].

1.5.1 Trattamenti renali sostitutivi

Un altro possibile approccio terapeutico consiste nella rimozione aspecifica di mediatori infiammatori e di citochine, generalmente prodotti a picchi durante la sepsi e responsabili della risposta incontrollata del sistema immunitario [12]. Molti mediatori della sepsi sono idrosolubili e sono molecole di medie dimensioni (5-50 kDa), che teoricamente possono essere rimossi mediante le terapie extracorporee renali (RRT) tramite convezione, diffusione o adsorbimento (Figura 1.7). L'obiettivo è il ripristino dell'immuno-omeostasi del paziente.

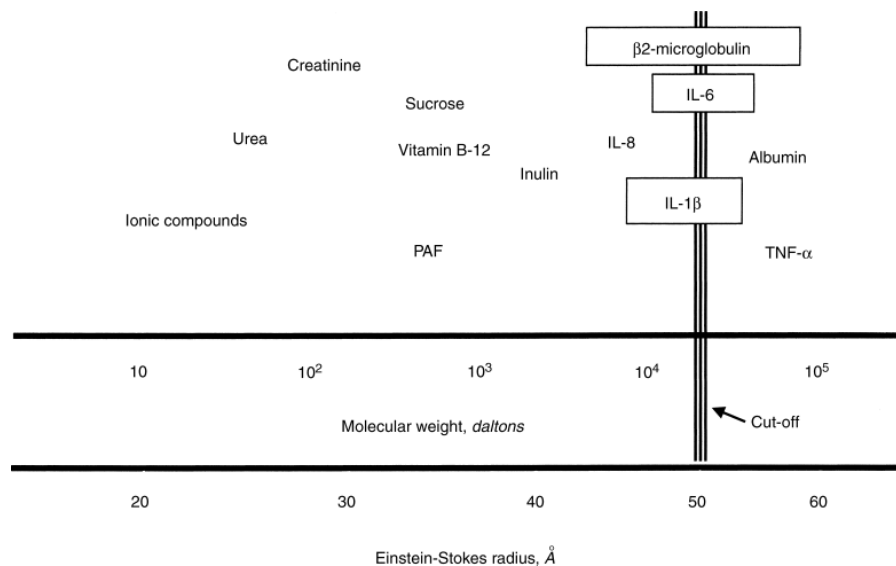


Figura 1.7: Pesì molecolari dei composti di interesse per AKI associata a sepsi rispetto al cut-off delle membrane.

Sono state sviluppate diverse teorie per spiegare i possibili effetti di questi approcci (Figura 1.8). Innanzitutto, si può operare una rimozione aspecifica delle citochine portandole al di sotto della soglia ritenuta “tossica” limitando gli esiti negativi locali dovuti ad un eccesso di citochine (“peak concentration hypothesis”) [11]. Alcuni autori hanno suggerito l’idea per cui, grazie al gradiente di concentrazione ripristinato, la diminuzione delle concentrazioni delle citochine potrebbe promuovere la chemiotassi dei leucociti verso i tessuti infetti dove le concentrazioni di citochine rimangono più elevate [11]. Attraverso la purificazione del sangue si può inibire l’innescò della cascata immuno-infiammatoria, rimuovendo gli agenti patogeni o i PAMPs, come le endotossine, prima che arrivino ai leucociti (“cytokinetic theory”) [11]. Inoltre, si può modulare il processo immunitario agendo direttamente sui leucociti, rimuovendoli o riprogrammando le cellule immunitarie (modulazione dell’espressione dei marcatori di superficie, miglioramento della capacità di presentazione dell’antigene o regolazione dell’apoptosi) [11].

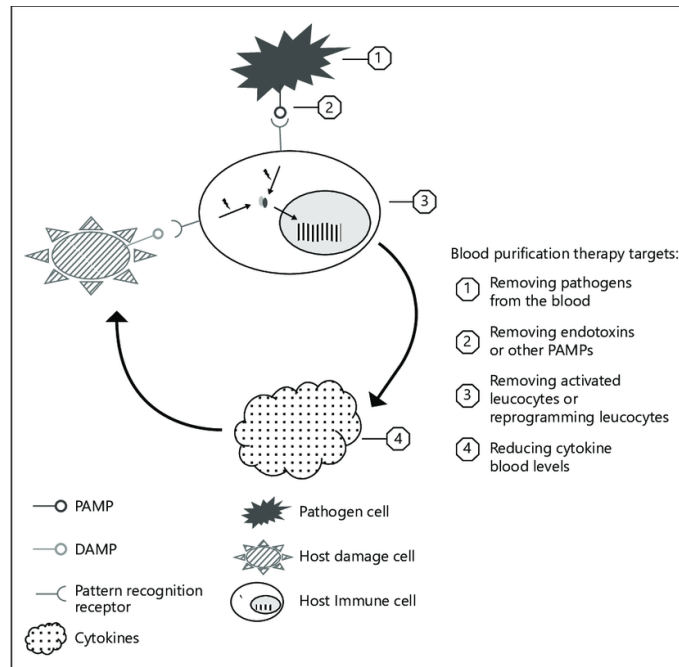


Figura 1.8: Cascata immuno-infiammatoria e obiettivi della purificazione extracorporea del sangue.

Notevoli progressi si sono raggiunti nella comprensione del legame sepsi-AKI, così come nell'esecuzione delle terapie di sostituzione renale. Tuttavia, quale terapia effettuare (emofiltrazione, emoperfusione, trattamenti del plasma oppure utilizzo di membrane ad alto cut-off), quando e come applicarla è ancora oggetto di discussione [13].

Quando si somministra un antibiotico in pazienti affetti da insufficienza renale indotta da sepsi (S-AKI) trattati con RRT si dovrebbero prendere in considerazione diversi fattori come la farmacocinetica, la farmacodinamica, il peso del paziente, la funzionalità renale residua, la funzionalità epatica e la modalità di RRT. Per tale ragione un approccio più personalizzato dovrebbe guidare le decisioni cliniche.

Capitolo 2: le terapie renali di depurazione extracorporea

Ogni qualvolta si renda necessario vicariare la funzione renale, la scelta della metodica dialitica più idonea al singolo paziente è molto complessa. Il paziente può beneficiare di uno o dell'altro trattamento allo scopo di ottenere i migliori risultati possibili in termini di qualità di vita e di sopravvivenza.

In questo capitolo si analizzano le diverse terapie di sostituzione renale continue (Continuous Renal Replacement Therapies, CRRT) comunemente utilizzate nel trattamento dei pazienti con danno renale acuto, con particolare riguardo all'applicazione in caso di sepsi.

Per poter eseguire un trattamento di CRRT gli elementi necessari sono due: la macchina e il circuito extracorporeo (Figura 2.1).



Figura 2.1: Esempio di sistema per la terapia di purificazione extracorporea: PrismaX (Baxter).

2.1 Macchina per la terapia extracorporea renale

Una macchina per il trattamento extracorporeo renale è un dispositivo biomedicale che consente la rimozione di liquidi e sostanze in eccesso dal sangue. Si illustrano in Figura 2.2 le componenti di una macchina, che verranno di seguito descritte nel testo. Il trattamento si definisce extracorporeo, poiché il sangue viene prelevato dal paziente e fatto poi circolare all'interno di un circuito posto all'esterno del corpo.

L'interfaccia con l'operatore avviene attraverso il monitor (a), tramite il quale si può gestire il trattamento, verificarne il corretto svolgimento e visualizzare i parametri di trattamento.

La macchina si compone di una serie di attuatori di diverso genere, responsabili del movimento di fluidi e sangue nel circuito, e di sensori che esercitano una funzione di protezione e controllo.

Sono presenti indicatori luminosi e sonori (b) con lo scopo di aiutare il personale ospedaliero a verificare che il trattamento si stia svolgendo nel modo corretto.

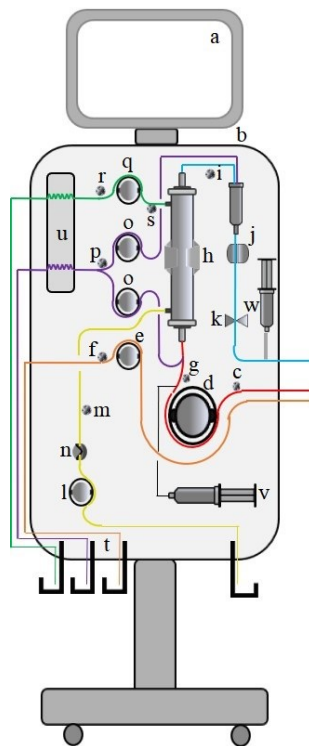


Figura 2.2: Macchina per terapie sostitutive renali continue. Le diverse componenti in figura sono dettagliate nel testo.

2.1.1 Attuatori

Gli attuatori presenti in una macchina per CRRT sono le pompe, la clamp automatica di sicurezza e il riscaldatore. Gli attuatori sono i componenti che effettivamente permettono di eseguire tutti i trattamenti.

Le pompe sono principalmente peristaltiche (pompa per il sangue, dialisato, effluente, liquido di sostituzione). Tale tipologia di pompa evita il contatto diretto tra il sangue e gli organi meccanici. Sono di tipo volumetrico, quindi caratterizzate da un flusso pulsatile: lo spezzone pompa, con un diametro ed elasticità diversa dal resto del circuito, è compresso dai rulli e viene fatto avanzare un volume di sangue esattamente pari a quello contenuto tra un rullo e l'altro, in questo modo viene garantita anche l'unidirezionalità del flusso. Inoltre, sono presenti delle pompe a siringa, utilizzate per somministrare l'eparina o il calcio.

Le pompe sono [14]:

- pompa sangue (d): controlla il flusso di sangue nel circuito extracorporeo. Il sangue viene fatto circolare con un flusso che può variare tra 100 ml/min e 250 ml/min. È fondamentale che la pompa sangue non induca emolisi, soprattutto nel punto in cui il rullo comprime lo spezzone pompa;
- pompa pre-sangue (e): controlla la portata delle soluzioni, principalmente anticoagulanti regionali (ad esempio, citrato), nella linea di ingresso prima della pompa del sangue;
- pompa effluente/ultrafiltrato (l): impone la velocità di rimozione totale del fluido dal filtro;
- pompa liquido di sostituzione (o): controlla la velocità di infusione del liquido di sostituzione nella linea di ingresso (pre-diluizione, di solito tra la pompa del sangue e il filtro) e/o nella linea di uscita (post-diluizione, di solito nella camera di uscita del sangue);
- pompa dialisato (q): regola il flusso del dialisato in ingresso al filtro;
- pompa anticoagulante (v): infonde gli anticoagulanti nel circuito sanguigno. A seconda della modalità di anticoagulazione scelta, questa pompa può essere un'unità singola (anticoagulazione sistemica, ad esempio pompa a siringa per eparina) o far parte di un sistema di infusione più complesso con più pompe. Infatti, nei casi di anticoagulazione regionale (eparina-protamina o citrato-calcio) è necessaria una seconda pompa (w) per infondere l'antagonista dell'anticoagulante selezionato nella linea di rientro del sangue.

Nella linea di rientro è posto un gocciolatore, nel quale un piccolo quantitativo di sangue viene raccolto in modo che l'eventuale presenza di aria possa spontaneamente separarsi dal sangue. Di seguito, sempre applicato alla linea di rientro, è posto il rilevatore di bolle d'aria (j): qualora ne rilevasse la presenza, va ad innescare l'elettropinza (k) che si trova più a valle e va a bloccare il flusso del sangue al paziente (evitando quindi il rischio di emboli gassosi). La presenza di aria nel circuito può essere dovuta ad un priming inadeguato, un volume delle sacche non corretto, una mancata miscelazione delle sacche bicompartimentali, una sconnessione accidentale delle linee e/o del catetere venoso centrale (Central Venous Catheter, CVC), una fessurazione delle linee e/o CVC oppure a degli incidenti durante il prelievo dal circuito. Il riscaldatore (u) scalda i vari liquidi utilizzati o il sangue prima di restituirlo al paziente per evitare ipotermie indesiderate.

2.1.2 Sensori

I sensori permettono di monitorare il trattamento, di prevenire ed evitare il verificarsi di situazioni di pericolo o di danno al paziente. I sensori di pressione forniscono importanti informazioni sulla fluidodinamica, sul flusso all'interno del circuito extracorporeo. I sensori presenti sono [14]:

- sensore di pressione di ingresso (c): si trova a monte della pompa sangue e monitora la pressione negativa nella linea di ingresso; si trova tra l'accesso vascolare del paziente e la pompa del sangue. Un valore prossimo allo zero suggerisce il possibile distacco del lume del catetere dalla linea di accesso, un valore particolarmente negativo indica difficoltà della pompa sangue all'aspirazione (catetere mal funzionante, coagulo ecc.);
- sensore di pressione della pompa pre-sangue (f): monitora la pressione prima della pompa pre-sangue;
- sensore di pressione pre-filtro (g): è situato tra la pompa sangue ed il filtro, monitora la pressione positiva e consente il calcolo della pressione transmembrana (Transmembrane pressure, TMP) e della caduta di pressione (Drop pressure, P_{DROP}) nel filtro;
- sensore di pressione in uscita (i): monitora la pressione positiva tra il filtro e l'accesso vascolare del paziente nella linea di rientro. Questo sensore viene utilizzato per calcolare la TMP e P_{DROP} . È l'unico sensore nel lato venoso. Si dovrebbe avere un valore inferiore al sensore di pressione pre-filtro in quanto nel passaggio del sangue all'interno del filtro si ha una perdita di carico e di volume. Un valore eccessivamente piccolo suggerisce la possibile presenza di coaguli all'interno del filtro o la possibile disconnessione del catetere. Un valore molto elevato indica la possibile coagulazione a valle del sensore (nel pozzetto o nella linea) oppure il malfunzionamento o l'oclusione del catetere;
- sensore di pressione dell'effluente/ultrafiltrato (m): monitora la pressione nel comparto dell'effluente. È posizionato prima della pompa effluente e consente il calcolo della TMP. Il valore della pressione effluente/ultrafiltrato indica la probabile presenza all'interno del filtro di fibre ostruite da coaguli oppure un problema a livello di pori ostruiti a causa delle proteine che si depositano;
- sensore di pressione della pompa di sostituzione (p): monitora la pressione negativa prima della pompa di infusione, dà informazioni circa la quantità di liquido presente nelle sacche;

- sensore di pressione della pompa pre-dialisato (r): monitora la pressione negativa prima della pompa del dialisato, dà informazioni circa la quantità di liquido presente nella sacca;
- sensore di pressione della pompa post-dialisato (s): monitora la pressione nella linea del dialisato prima del collegamento con il filtro. Consente una migliore stima della pressione trans-membrana.

Il rilevatore di bolle d'aria (j) è un trasduttore piezoelettrico ad ultrasuoni in grado di identificare la presenza di bolle d'aria nella linea di ritorno del sangue al paziente.

Il rilevatore di perdite di sangue (Blood Leak Detector, BLD) si trova lungo la linea dell'effluente (n) ed identifica la presenza di sangue nell'effluente, dovuta alla rottura di alcune fibre nel filtro.

Nel monitor della macchina vengono riportati due valori essenziali: la stima della TMP (non tiene in considerazione il valore della pressione oncotica) e la caduta di pressione. La TMP è la differenza di pressione a cavallo della membrana, cioè la differenza di pressione tra il compartimento ematico (interno alle fibre) ed il compartimento dialisato/effluente (esterno alle fibre). Il valore della TMP fa capire come avviene lo scambio tra l'interno e l'esterno della fibra, se si sta eseguendo un trattamento efficiente e le condizioni del filtro. La caduta di pressione (P_{DROP}) è la differenza di pressione pre- e post-filtro, dice se il sangue fluisce correttamente all'interno delle fibre. Per esempio, il valore P_{DROP} aumenta se si hanno dei coaguli all'interno delle fibre.

È fondamentale la gestione del volume e del bilancio dei fluidi (Tabella 2.1) nei pazienti critici. A questo scopo, la macchina per le terapie extracorporee è dotata di una serie di bilance (t): esse sono necessarie per il monitoraggio dei fluidi scambiati durante il trattamento, avvisano se c'è bisogno di effettuare il cambio di una qualche sacca e altre problematiche tecniche.

La gestione dei fluidi durante la CRRT deve tenere conto del volume e dello stato emodinamico del paziente.

| Portata | Simbolo | Unità di misura | Definizione e commenti |
|---|---|-----------------|--|
| Portata di sangue | Q_B | ml/min | Dipende da: - modalità - accesso vascolare - stabilità emodinamica del paziente |
| Portata di plasma | Q_P | ml/min | Approssimabile come: $Q_P = (1 - HCT) \times Q_B$ dove HCT=ematocrito |
| Portata di ultrafiltrazione | Q_{UF} | ml/h | Volume totale di fluido rimosso in un filtro grazie ad una TMP positiva per unità di tempo: $Q_{UF} = Q_{UF}^{NET} + Q_R$ Dipende da: - portata del flusso sanguigno - design del filtro e della membrana - pressione transmembrana TMP - coefficiente di ultrafiltrazione ed area superficiale del filtro |
| Portata di ultrafiltrazione netta (Δ portata ponderale) (portata della perdita di peso) | Q_{UF}^{NET} | ml/h | Volume netto di fluidi rimossi dal paziente dalla macchina per unità di tempo |
| Portata di plasma di ultrafiltrazione | Q_{P-UF} | ml/h | Volume totale di plasma rimosso dal filtro per TMP per unità di tempo |
| Portata del liquido di sostituzione | Q_R^{PRE} Q_R^{POST} $Q_R^{PRE/POST}$ | ml/h | La sostituzione del fluido sterile può essere: - a monte del filtro (pre-sostituzione, pre-infusione o pre-diluzione): riduzione dell'efficienza depurativa ma migliore durata del filtro - a valle del filtro (post-sostituzione, post-infusione o post-diluzione): maggiore efficienza depurativa ma minore durata del filtro - sia a monte che a valle del filtro (pre-post sostituzione, pre-post infusione o pre-post diluizione): compromesso tra le due modalità |
| Portata del plasma di sostituzione | Q_{P-R} | ml/h | Sostituzione del plasma a valle del filtro |
| Portata di dialisato | Q_D | ml/h | Volume del liquido di dialisi che scorre nel circuito per unità di tempo |
| Portata di effluente | Q_{EFF} | ml/h | Liquido di scarto per unità di tempo proveniente dalla porta di uscita del comparto dialisato/ ultrafiltrato del filtro: $Q_{EFF} = Q_{UF} + Q_D = Q_{UF}^{NET} + Q_R + Q_D$ |

Tabella 2.2: Riassunto dei possibili flussi durante le terapie sostitutive renali continue CRRT.

2.1.3 Preparazione della macchina

L'esecuzione corretta di un trattamento CRRT richiede di eseguire le seguenti operazioni [14]:

- fase di prescrizione: il personale sanitario deve inserire i flussi e i parametri della seduta dialitica nella macchina seguendo la prescrizione medica. A seconda del tipo di trattamento sarà richiesto di inserire parametri diversi, per esempio la durata, il flusso

del sangue, di reinfusione, del dialisato, la quota di ultrafiltrazione, il flusso del plasma, l'anticoagulante utilizzato;

- fase di preparazione: prelievo, controllo, caricamento e collegamento del kit (device di depurazione, linee del circuito) e delle sacche;
- fase di priming: la soluzione di priming (normalmente si utilizza la soluzione fisiologica) viene infusa nel circuito extracorporeo per rimuovere l'aria e le impurità rimaste dopo la sterilizzazione del set. Quando si utilizza l'anticoagulazione con eparina, questa viene solitamente aggiunta alla soluzione di priming. Durante il priming, la macchina effettua un controllo generale di tutte le componenti e dei sensori per verificare che tutto sia correttamente pronto;
- collegamento del paziente alla macchina: dopo aver preparato l'accesso vascolare del paziente, si collegano la linea di ingresso e di rientro del sangue all'accesso vascolare del paziente;
- fase di trattamento: inizio della terapia, si procede con la purificazione del sangue. È fondamentale il continuo monitoraggio dei parametri vitali del paziente;
- procedure speciali: durante il trattamento, le procedure speciali possono includere il cambio delle sacche, il cambio delle siringhe di eparina o di calcio, il riposizionamento dell'accesso vascolare e/o la disconnessione temporanea, il ricircolo e/o la sostituzione del filtro e del kit;
- restituzione del sangue, scollegamento e scarico: si deve restituire il sangue presente nel circuito extracorporeo al paziente. Si effettua collegando una sacca di soluzione fisiologica alla linea di ingresso (al posto dell'accesso vascolare del paziente) e azionando la pompa sangue. Alla fine del trattamento il kit utilizzato deve essere rimosso dalla macchina e gettato.

2.1.4 Anticoagulazione

Il rischio di formazione di coaguli all'interno del circuito deve essere tenuto in considerazione, dato che rappresenta una delle cause di downtime con conseguenze negative sull'efficacia del trattamento. L'eventuale formazione di coaguli determina un'ostruzione meccanica nelle linee e nel filtro e può compromettere il trattamento. Inoltre, i coaguli possono giungere al paziente e metterlo in serio pericolo con concreta possibilità di infarto miocardico, ictus o embolia polmonare. L'equilibrio tra la necessità di evitare i coaguli nel circuito extracorporeo ed emorragie nel paziente è difficile da mantenere. È essenziale, perciò, scegliere la corretta tipologia e posologia di anticoagulante.

Esistono principalmente due tipologie di anticoagulazione: anticoagulazione sistemica con eparina e anticoagulazione loco-regionale con il sistema del citrato-calcio. L'eparina, legandosi all'antitrombina (AT), aumenta l'attività dell'antitrombina sui fattori Xa, IIa, IXa, XIa e XIIIa della coagulazione. Il sistema citrato-calcio sfrutta le capacità chelanti del citrato verso lo ione calcio. Somministrando il citrato all'interno del circuito vicino all'accesso vascolare, questo va a chelare lo ione calcio all'interno del circuito extracorporeo e nel filtro, sottraendolo così alla cascata coagulativa. Lo ione calcio rappresenta un cofattore essenziale della cascata coagulativa e gioca un ruolo importante nella conversione della protrombina in trombina, innescando tutti i successivi passaggi della coagulazione. È importante tenere presente la necessità di infondere calcio nel sangue all'interno del circuito prima che questo venga reinfuso al paziente. Questa tipologia di anticoagulazione viene definita loco-regionale in quanto la cascata coagulativa viene alterata soltanto nel sangue all'interno del circuito. Occorre precisare che una piccola parte di citrato legato al calcio viene reinfuso necessariamente nel paziente e viene metabolizzato nel fegato; quindi, il citrato prolunga sicuramente la vita del filtro però la gestione del trattamento risulta più complessa. Il citrato inoltre sembra avere un supposto effetto antiinfiammatorio intrinseco.

2.2 Circuito extracorporeo

Il circuito extracorporeo (Figura 2.3) è un componente monouso del sistema per CRRT, è costituito dalle linee e dal dispositivo (filtro o cartuccia (h)) che permette la depurazione del sangue ed è specifico per ogni macchina. Si possono avere differenti circuiti extracorporei a seconda del tipo di trattamento che si effettua.

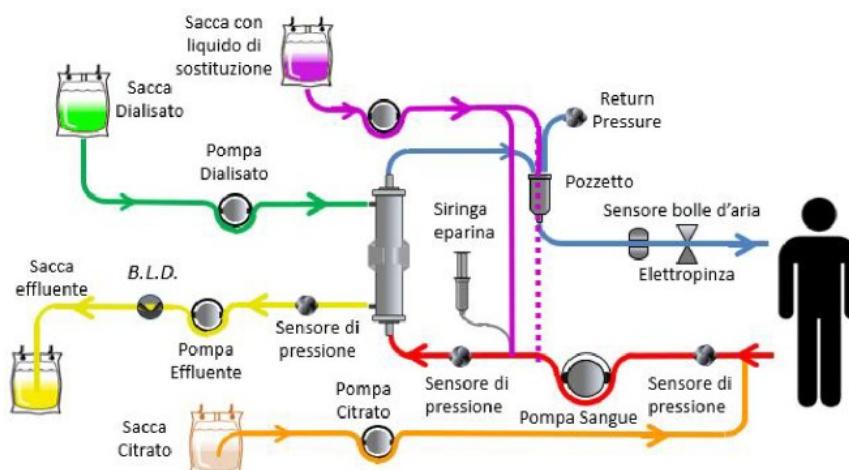


Figura 2.3: Schema di un circuito extracorporeo: filtro e linee.

2.2.1 Le linee del circuito

Il circuito di base è costituito dalla linea rossa e dalla linea blu (Figura 2.3). La linea rossa è la linea di accesso tramite cui si preleva il sangue dal paziente e lo si porta al dispositivo di depurazione. La linea blu è la linea di rientro con cui il sangue, dopo essere stato trattato dal filtro o cartuccia, viene restituito al paziente.

Le altre linee sono accessorie e permettono di poter effettuare i diversi trattamenti:

- linea verde per il dialisato che viene fatto entrare nel filtro controcorrente rispetto al sangue;
- linea gialla per l'effluente, raccoglie ciò che viene rimosso dal filtro;
- linea viola serve per il liquido di re-infusione, che può essere somministrato prima del filtro (pre-infusione) o dopo (post-infusione);
- linea arancione per l'anticoagulazione regionale, ossia il citrato;
- linea bianca per l'anticoagulazione sistemica, l'eparina;
- linea grigia per la re-infusione del calcio nel caso di utilizzo di citrato per l'anticoagulazione loco-regionale.

2.2.2 I dispositivi di depurazione extracorporea

I dispositivi biomedicali di depurazione utilizzati per svolgere un trattamento di sostituzione renale possono essere di due tipi: il filtro dializzatore e la cartuccia adsorbente. La distinzione principale tra i due dispositivi sta nell'utilizzo di diversi meccanismi di trasporto di soluti e di fluidi, che verranno analizzati successivamente.

Il filtro dializzatore sfrutta i fenomeni di ultrafiltrazione, convezione, diffusione ed in parte di adsorbimento. La cartuccia si avvale solo del meccanismo di adsorbimento. Inoltre, il filtro ha quattro aperture (ingresso e uscita per il sangue, ingresso di dialisato, uscita di effluente) mentre la cartuccia ha solo l'ingresso e l'uscita per il sangue.

Sia filtro che cartuccia devono essere biocompatibili, ossia non devono innescare una reazione avversa nell'ambiente biologico, in quanto sono a contatto diretto con il sangue [15]. La normativa che disciplina la valutazione della biocompatibilità in questo tipo di dispositivi biomedicali è la ISO 10993-4: prevede test riguardanti trombosi, coagulazione, funzionalità delle piastrine, parametri ematologici e immunologici in condizioni sia statiche che dinamiche.

2.3 Meccanismi di trasporto di fluidi e soluti attraverso una membrana semipermeabile

Alla base della dialisi vi è fondamentalmente un processo di separazione mediante una barriera, che è rappresentata dalla membrana semipermeabile posta tra il sangue e la soluzione dializzante. L'obiettivo è quello di rimuovere specifiche molecole e componenti presenti nell'acqua plasmatica e talvolta anche la stessa acqua.

Il trasporto di fluidi attraverso la membrana semipermeabile è guidato dall'ultrafiltrazione mentre il trasporto di soluti avviene principalmente attraverso convezione, diffusione e adsorbimento.

2.3.1 Ultrafiltrazione

L'ultrafiltrazione è il trasporto di acqua plasmatica (priva di cellule e colloidi) attraverso una membrana semipermeabile, guidato da un gradiente di pressione tra il sangue e i compartimenti dializzato/ultrafiltrato. È influenzata dalle proprietà intrinseche del filtro, come il coefficiente di ultrafiltrazione proprio del filtro DK_{UF} $\left[\frac{ml/h}{mmHg} \right]$ o coefficiente di permeabilità idraulica della membrana K_{UF} e dai parametri operativi (ad esempio, TMP) [16]. Quantitativamente, l'ultrafiltrazione è definita dalla velocità di ultrafiltrazione (Q_{UF}):

$$Q_{UF} = DK_{UF} \times TMP \quad \left[\frac{ml}{min} \right]$$

Si distinguono i termini ultrafiltrazione totale (UF = volume complessivo di ultrafiltrazione prodotto durante il trattamento) e ultrafiltrazione netta (UF_{NET} = volume netto di ultrafiltrato rimosso dal paziente, è la differenza tra l'ultrafiltrazione totale e la quantità di liquido di sostituzione infuso).

2.3.2 Convezione

La convezione è il processo attraverso il quale i soluti passano attraverso i pori della membrana, trascinati dal movimento del fluido (ultrafiltrazione) causato dal gradiente di pressione transmembrana idrostatica e/o osmotica. Il flusso convettivo J_c di un soluto dipende dalla velocità di ultrafiltrazione Q_{UF} , dall'area superficiale della membrana (A), dalla concentrazione del soluto nel plasma (C_{Pi}) e dal suo coefficiente di Sieving (SC):

$$J_c = \frac{Q_{UF}}{A} \times C_{Pi} \times SC \quad \left[\frac{ml}{hm^2} \times mmHg \right]$$

Rispetto al trasporto diffusivo, il trasporto convettivo consente la rimozione di soluti di peso molecolare più elevato ed a una velocità maggiore [16].

Nei filtri a fibre cave, la TMP è il gradiente di pressione attraverso la membrana. I termini che definiscono questo gradiente sono la pressione idrostatica nel compartimento del sangue (P_B), la pressione idrostatica nel compartimento del dialisato/ultrafiltrato (P_D) e la pressione oncologica del sangue (π_B). Il valore della TMP varia lungo la lunghezza del filtro (l):

$$TMP(l) = P_B(l) - P_D(l) - \pi_B(l)$$

In genere, la TMP viene espressa con una formula semplificata:

$$TMP^* = \frac{P_{Bi} - P_{Bo}}{2} - \frac{P_{Di} - P_{Do}}{2} - \frac{\pi_{Bi} - \pi_{Bo}}{2}$$

dove P_{Bi} è la pressione di ingresso del sangue, P_{Bo} la pressione di uscita del sangue, P_{Di} la pressione di ingresso del dialisato/ultrafiltrato, P_{Do} la pressione di uscita del dialisato/ultrafiltrato, π_{Bi} la pressione oncologica del sangue in ingresso e π_{Bo} la pressione oncologica del sangue in uscita. Va sottolineato che la TMP^* è un valore positivo, mediato lungo la lunghezza del filtro, e non riflette il vero profilo di pressione locale nel filtro. In altre parole, una TMP^* positiva non implica una $TMP(l)$ positiva in ogni punto del filtro. Inoltre, le macchine per CRRT di solito non misurano direttamente la P_{Di} o la pressione oncologica; quindi, la TMP viene stimata utilizzando una formula ancora più semplice:

$$TMP^* = \frac{P_{PRE} + P_{OUT}}{2} - P_{EFF}$$

dove P_{PRE} è la pressione del sangue pre-filtro, P_{OUT} la pressione del sangue post-filtro e P_{EFF} la pressione misurata nella linea dell'effluente (tutte e tre misurate dalla macchina).

2.3.3 Diffusione

La diffusione è un processo in cui le molecole si muovono in modo casuale attraverso una membrana semipermeabile. Il trasporto del soluto avviene da un'area più concentrata a una meno concentrata, finché non si raggiunge un equilibrio tra i due compartimenti. Il gradiente di concentrazione ($C_1 - C_2 = dc$) è la forza motrice. Il flusso diffusivo unidirezionale del soluto (J_D) attraverso una membrana semipermeabile segue la legge di Fick sulla diffusione. È direttamente proporzionale al coefficiente di diffusione del soluto (D) e inversamente proporzionale alla distanza tra i compartimenti (dx):

$$J_D = -D \times \left(\frac{dc}{dx} \right) \quad \left[\frac{mol}{m^2s} \right]$$

Il coefficiente di diffusività D può essere approssimato utilizzando l'equazione di Stokes-Einstein:

$$D = \frac{K_B \times T}{6 \times \pi \times \mu \times R} \left[\frac{m^2}{s} \right]$$

dove K_B è la costante di Boltzmann, T la temperatura assoluta, μ la viscosità del mezzo e R il raggio effettivo delle molecole. Assumendo che la maggior parte delle molecole siano globulari e che il loro raggio effettivo sia proporzionale alla radice cubica del loro peso molecolare, D è più alto per i soluti di peso molecolare minore [16].

I soluti di peso molecolare medio-alto come l'interleuchina-6 (IL-6) o la β -2 microglobulina vengono rimossi scarsamente per diffusione a causa sia del loro peso che dell'ingombro sterico elevato; quindi, tendono ad essere rimossi principalmente per convezione.

2.3.4 Adsorbimento

L'adsorbimento è un processo extracorporeo in cui le molecole disciolte nel plasma o nel sangue (in particolare, peptidi e proteine) si legano alla struttura della membrana. Le caratteristiche che influenzano l'interazione molecola-membrana sono tipiche di ogni molecola (dimensione, carica e struttura) e di ogni particolare membrana (porosità, composizione, idrofobicità, carica superficiale). Le cartucce adsorbenti devono essere valutate in termini di capacità di adsorbimento del dispositivo (DAC) e di selettività [16]. La DAC rappresenta la quantità totale di una specifica molecola che il dispositivo è in grado di adsorbire. La selettività è un parametro di sicurezza: definisce ciò che il dispositivo non adsorbe. Il legame soluto-membrana può essere di diverso tipo: forze di van der Waals, legami ionici e legami idrofobici. Nel processo di adsorbimento si possono individuare tre fasi diverse come illustrato in Figura 2.4 [17]:

1. inter-fase: consiste nel trasferimento di massa del soluto per convezione e diffusione attraverso lo strato esterno del granulo adsorbente, comporta la creazione delle prime interazioni tra sorbente e soluto;
2. intra-fase: comprende il trasferimento di massa del soluto per convezione all'interno della struttura porosa;
3. adsorbimento: creazione di interazioni che comportano la cattura dei soluti da parte del materiale [17].

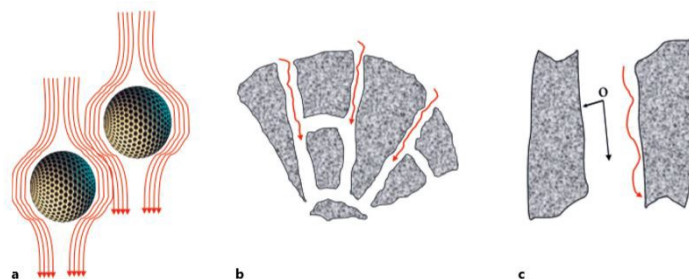


Figura 2.4: Schematizzazione delle tre fasi di adsorbimento a) inter-fase b) intra-fase c) adsorbimento.

In alcuni casi il processo può essere reversibile, per cui si parla di desorbimento: le molecole di soluto possono essere così rilasciate in soluzione.

Generalmente l'adsorbimento è descritto all'equilibrio: ad una specifica temperatura, dopo un certo intervallo di tempo di contatto tra il soluto ed il sorbente, il primo non viene più adsorbito per saturazione dei siti di legame disponibili sulla superficie del sorbente (ovvero tutti i siti di legame sono già occupati da una molecola di soluto). In generale, un'isoterma di adsorbimento è una curva che descrive il fenomeno di adsorbimento a temperatura e pH costanti [18].

L'equilibrio di adsorbimento è definito come uno stato di equilibrio dinamico, in cui le velocità di adsorbimento e desorbimento sono uguali.

Nel corso degli anni, è stata formulata un'ampia varietà di modelli di isoterme (Langmuir, Freundlich, Brunauer-Emmett-Teller, Redlich-Peterson, Dubinin-Radushkevich, Temkin, Toth, Koble-Corrigan, Sips, Khan, Hill, Flory-Huggins e Radke-Prausnitz).

È possibile descrivere il processo di adsorbimento tramite l'isoterma di Langmuir: una curva, determinabile solo sperimentalmente e i cui parametri non sono perciò identificabili a priori, definita ad una specifica temperatura, che dà indicazioni sulla relazione tra frazione adsorbita di soluto e concentrazione di quest'ultimo in soluzione all'equilibrio [19]. Dopo una prima fase di pseudo linearità, si assiste gradualmente al raggiungimento di un plateau, in cui pur aumentando la quantità di soluto presente in soluzione, il sorbente non è più in grado di agire (saturazione). Questa isoterma è ottenuta assumendo che ciascun sito possa adsorbire al massimo una molecola di soluto e che l'adsorbimento di quest'ultimo sia equiprobabile. I modelli di Langmuir non lineare e lineare sono determinati come segue [19]:

$$q_e = \frac{q_m \times K_L \times C_e}{1 + K_L \times C_e}$$

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{C_e}{q_m} + \frac{1}{K_L \times q_m}$$

dove K_L ($L \cdot mg^{-1}$) è il rapporto tra la velocità di adsorbimento e quella di desorbimento, q_m ($mg \cdot g^{-1}$) è la massima capacità di adsorbimento stimata dal modello di Langmuir, q_e ($mg \cdot g^{-1}$) e C_e ($mg \cdot L^{-1}$) sono la quantità adsorbita e la concentrazione di adsorbato all'equilibrio.

Di particolare nota è lo studio delle conseguenze dell'adsorbimento sull'andamento della concentrazione plasmatica e sull'efficacia di antibiotici e farmaci. Infatti, se anche un farmaco, oltre al soluto d'interesse, venisse adsorbito e quindi rimosso dal flusso ematico, verrebbe compromessa la terapia farmacologica assunta dal paziente, con importanti conseguenze sul suo stato di salute.

2.4 Il filtro dializzatore

Il filtro contiene un fascio di fibre cave che separano la cavità in due compartimenti distinti: il compartimento sangue, internamente alle fibre, e il compartimento dialisato/effluente, tra le intercapedini delle fibre. La membrana di cui sono composte le fibre è semipermeabile e permette la comunicazione tra i due compartimenti, e quindi gli scambi di fluidi e soluti, attraverso i micropori presenti su tutta la lunghezza delle fibre. Il sangue scorre all'interno delle fibre, dalle quali esce depurato, mentre il liquido di dialisi scorre negli spazi tra fibra e fibra, in controcorrente rispetto al flusso del sangue, per massimizzare tra i due compartimenti lo scambio per diffusione permesso dai pori delle fibre (Figura 2.5).

Il filtro a fibre cave è un "rene artificiale" concepito per garantire la rimozione controllata di soluti e acqua plasmatica attraverso la membrana semipermeabile, tenendo separati il compartimento sangue (all'interno delle fibre) e dialisato (all'esterno delle fibre). La comunicazione tra i due compartimenti avviene solamente attraverso la membrana semipermeabile.

I filtri dializzatori hanno geometria cilindrica, il guscio esterno è in policarbonato. Il fascio di fibre è fissato agli estremi con guarnizioni in poliuretano e attraverso un anello in silicone. Agli estremi del guscio vi sono le quattro aperture: le porte di ingresso e uscita di sangue e di dialisato/effluente.

Con il filtro si può rimuovere sia l'acqua plasmatica che i soluti a seconda delle proprietà della membrana.

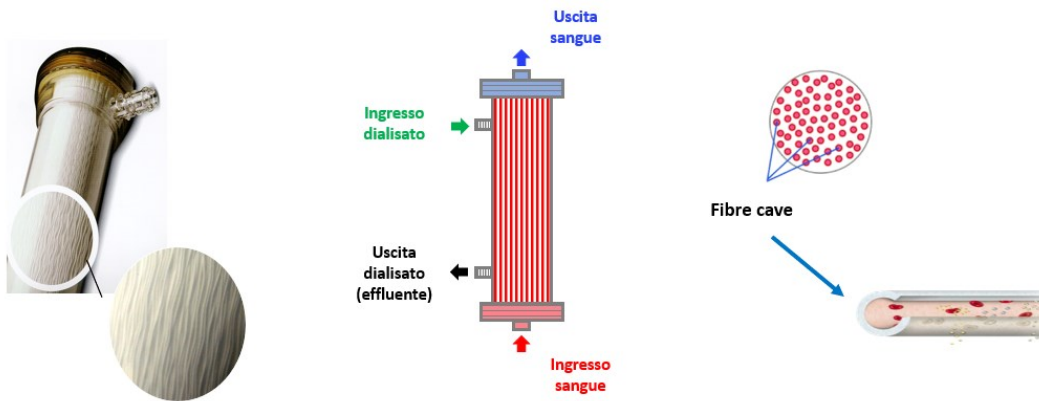


Figura 2.5: Il filtro dializzatore.

2.4.1 Struttura chimico-fisica della membrana semipermeabile

La composizione della membrana influisce sulla funzionalità, sulla biocompatibilità e sulle prestazioni [17]. In passato, la principale distinzione era tra membrane cellulosiche e non cellulosiche, ora si distinguono le membrane in cellulosa dalle membrane sintetiche. Al primo gruppo appartengono le membrane a base di Cuprammonium-Rayon (Cuprophan) e membrane a base di diacetato di cellulosa, triacetato di cellulosa, note come membrane cellulosiche modificate. Al secondo gruppo appartengono diverse membrane sintetiche che derivano da poliammide (PA), polisulfone (PS), poliacrilonitrile (PAN) e polimetilmetacrilato (PMMA).

In generale, le membrane sintetiche dimostrano un'eccellente biocompatibilità, una maggiore permeabilità all'acqua e migliori caratteristiche di rimozione di ampio spettro di soluti [20]. Le membrane sintetiche in genere hanno una componente fortemente idrofobica (Figura 2.6).

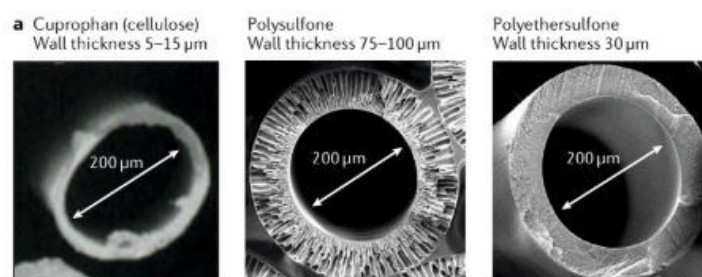


Figura 2.6: Esempio di materiali per le membrane (da sinistra): Cuprophan (cellulosica), Polisulfone (sintetica), Polietersulfone (sintetica).

Le caratteristiche della superficie interna della membrana, a contatto con il sangue, sono un importante fattore determinante per le prestazioni complessive della membrana, in quanto potenzialmente in grado di mediare fenomeni superficiali indesiderati, tra cui l'attivazione della cascata di coagulazione e il deposito di proteine (fouling). A questo proposito, nel corso

degli anni si sono registrati miglioramenti sostanziali nella riduzione della rugosità superficiale delle membrane e un miglioramento generale dell'emocompatibilità.

Più recentemente, nuovi processi biochimici e fisici hanno permesso di modificare la superficie delle fibre cave, migliorando la selettività, la biocompatibilità e la permeabilità. Per esempio, si hanno membrane funzionalizzate con eparina o agenti antiossidanti.

La membrana, inoltre, può presentare in superficie una carica elettrica: questo influenza potenzialmente le interazioni con le diverse molecole e può interferire con la capacità di adsorbimento di sostanze specifiche. L'elettronegatività della superficie può influenzare la biocompatibilità della membrana.

2.4.2 Parametri geometrici del filtro

I parametri geometrici influenzano i parametri di performance del filtro, le proprietà idrauliche e diffusive. Le caratteristiche geometriche più rilevanti sono: la lunghezza della fibra (L), il raggio interno (r_i), lo spessore di membrana, il numero di pori (N_p), il numero di fibre (N_f) e il raggio medio dei pori (r_p). Con questi parametri si possono facilmente calcolare:

- area superficiale: $A = 2 \times N_f \times L \times \pi \times r_i$ ($\approx 0.8-1.5 \text{ m}^2$);
- porosità: $\rho = N_p \times \pi \times r_p^2$;
- volume di priming: il volume di sangue a contatto con il filtro $V_b = N_f \times L \times \pi \times r_i^2$.

2.4.3 Parametri di prestazione del filtro

Diversi parametri identificano la performance del filtro:

- il coefficiente di ultrafiltrazione della membrana K_{UF} rappresenta la permeabilità idraulica della membrana per unità di pressione e superficie.

È definito empiricamente come:

$$K_{UF} = \frac{Q_{UF}}{TMP} \times \frac{1}{A}$$

dove Q_{UF} è la portata di ultrafiltrazione, TMP è la pressione transmembrana e A è l'area superficiale della membrana. L'unità di misura è ml/h/mmHg/m².

Il coefficiente di ultrafiltrazione del filtro DK_{UF} è definito come:

$$DK_{UF} = K_{UF} \times A.$$

L'unità di misura è ml/h/mmHg. DK_{UF} dipende dall'area superficiale e può essere empiricamente misurato come il rapporto tra Q_{UF} e TMP. La relazione non è costante durante il trattamento, poiché vi è un progressivo deposito di proteine plasmatiche, il

“protein-layer” all'interfaccia sangue-membrana, con conseguente diminuzione della permeabilità effettiva dovuta al blocco dei pori [19].

Il coefficiente di ultrafiltrazione della membrana K_{UF} viene utilizzato per classificare le membrane in: i) membrane a basso flusso ($K_{UF} < 10$), ii) membrane a medio flusso ($10 < K_{UF} < 25$) e iii) membrane ad alto flusso ($K_{UF} > 25$) [16];

- il coefficiente superficiale di trasporto di massa K_oA indica la resistenza complessiva esercitata dalla membrana al trasferimento diffusivo di massa di un soluto. La sua unità di misura è ml/min. Il K_oA di una membrana per dialisi dipende dalla densità dei pori, dalla distribuzione delle dimensioni dei pori e dallo spessore. Corrisponde alla capacità di una membrana di rimuovere in modo diffusivo un soluto;
- il coefficiente di Sieving SC o coefficiente di setacciamento è definito per uno specifico soluto. È il rapporto tra la concentrazione di uno specifico soluto nell'ultrafiltrato (quindi rimosso unicamente tramite convezione), e la media delle sue concentrazioni misurate nel plasma all'ingresso e all'uscita del filtro, in assenza di un gradiente di diffusione: $SC = \frac{C_{UF}}{(C_{pi} + C_{po})/2}$ [$0 \leq SC \leq 1$] ove C_{UF} è la concentrazione di soluto nell'ultrafiltrato, C_{pi} e C_{po} la concentrazione di plasma rispettivamente in ingresso e in uscita dal filtro.

Un soluto con coefficiente di Sieving pari a 1 viene eliminato totalmente, un soluto con coefficiente di Sieving pari a 0 viene trattenuto all'interno della membrana. La curva di Sieving dipende principalmente dalla distribuzione delle dimensioni dei pori e viene determinata empiricamente [19]. Il coefficiente di Sieving effettivo, tuttavia, è diverso dal valore ideale a causa dell'interferenza di cellule e proteine nel compartimento ematico e della polarizzazione della concentrazione all'interfaccia sangue-membrana;

- la distribuzione delle dimensioni dei pori definisce il valore di cut-off della membrana (Molecular Weight Cut-Off, MWCO). Per una specifica membrana, il cut-off rappresenta il peso molecolare del più piccolo soluto trattenuto dalla membrana. Tenendo conto della distribuzione normale della dimensione dei pori della membrana, il valore statistico di cut-off è identificato come il peso molecolare di un soluto con un SC pari a 0,1 [16]. Clinicamente, l'espressione "membrana ad alto cut-off" descrive membrane con un valore di cut-off superiore al peso molecolare dell'albumina;
- il retention onset (Molecular Weight Retention Onset, MWRO) corrisponde al peso molecolare del soluto che ha valore del coefficiente di Sieving pari a 0,9. È il peso

molecolare del più grande soluto che viene eliminato totalmente dalla membrana. La combinazione tra MWCO e MWRO caratterizza una membrana in termini di permeabilità ai soluti (Figura 2.7) [17]. Una membrana con dimensioni dei pori molto simili tra loro avrà una curva di Sieving molto ripida, mentre una membrana con una distribuzione ampia delle dimensioni dei pori avrà una curva di Sieving più larga. Il filtro ideale può essere rappresentato da un filtro passa-basso in cui passano completamente i soluti fino ad un certo peso molecolare (soglia), soluti di dimensioni superiori a questa soglia vengono trattenuti all'interno della membrana. Ogni membrana può essere definita dalla propria curva di Sieving (Figura 2.7) che viene costruita in base ai valori di Sieving di diverse molecole per quella stessa membrana. Tale curva permette di caratterizzare il comportamento della membrana nei confronti di soluti con diverso peso molecolare.

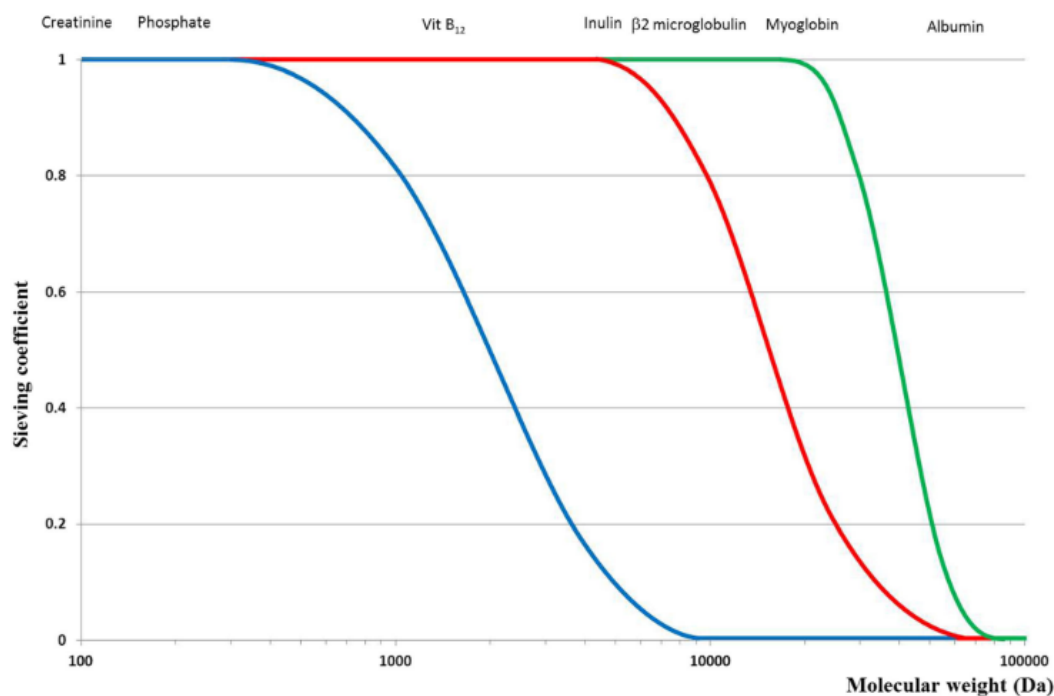


Figura 2.7: Rappresentazione dei valori del coefficiente di Sieving per membrane a basso flusso (blu), ad alto flusso (rosso) e ad alto cut-off (verde) in relazione al peso molecolare dei soluti (rappresentato in scala logaritmica).

2.5 La cartuccia adsorbente

La cartuccia adsorbente contiene un materiale in grado di adsorbire sulla sua superficie dei soluti presenti in una fase fluida (sangue o plasma), grazie a interazioni fisiche e chimiche. Nella pratica clinica, i sorbenti possono essere impiegati per eliminare batteri, tossine,

proteine come le citochine. Negli ultimi anni sono stati proposti e applicati diversi nuovi sorbenti progettati specificamente per l'adsorbimento di particolari molecole target.

2.5.1 Struttura chimico-fisica

I materiali sorbenti possono essere suddivisi in due grandi categorie: naturali e sintetici. I sorbenti naturali come le zeoliti (silicati di alluminio) sono polimeri inorganici porosi con porosità derivante dalla loro struttura cristallina (oggi possono essere modificati sinteticamente per controllare la struttura dei pori interni) [17]. Altri sorbenti tipici, come i carboni porosi, sono polimeri organici derivati dalla cellulosa e preparati mediante ossidazione termica controllata [17]. I sorbenti sintetici sono costituiti da diversi polimeri stirenici ottenuti dal cross-linking di monomeri con un agente, per esempio il divinilbenzene. Quasi tutti i monomeri polimerizzabili possono essere trasformati in grandi molecole attraverso reazioni diverse. Successivamente possono essere ricoperti di polisulfone per renderli più biocompatibili.

I sorbenti possono presentarsi sotto forme diverse: grani, sfere, fibre, fiocchi, polveri o lamine (Figura 2.8) ed esibire diversi livelli di porosità: macroporosità (diametro dei pori > 50 nm), mesoporosità (diametro pori = 2-50 nm) e microporosità (diametro pori < 2 nm) [17].



Figura 2.8: Esempio di sorbenti in fiocchi, in granuli, in fibre e in sfere.

L'estensione della superficie del materiale adsorbente è il fattore decisivo dell'entità dell'adsorbimento. Nei sorbenti il rapporto tra l'area superficiale e il volume è molto elevato, con un'area che generalmente varia da 300 a 1200 m²/g, ottenendo così per ogni particella una notevole capacità di adsorbimento [17].

Definendo il coefficiente di porosità delle particelle (ϵ_p) e la densità particellare (ρ_p), è possibile calcolare l'area superficiale per unità di massa come: $S_g = \frac{4 \times \epsilon_p}{\rho_p \times d_p}$.

È importante, inoltre, che il flusso sanguigno sia distribuito uniformemente all'interno della cartuccia, evitando la formazione di flussi preferenziali che potrebbero portare anticipatamente alla saturazione della cartuccia: tutto il materiale adsorbente infatti dev'essere

sfruttato [17]. Per questo motivo si presta molta attenzione al design della cartuccia e alla densità ottimale di sorbente che deve contenere, valutata attorno al 60% circa rispetto al volume totale della cartuccia [17].

2.5.2 Biocompatibilità

Indipendentemente dalla specifica molecola da adsorbire, la caratteristica essenziale che un sorbente deve rispettare è la biocompatibilità, dato il contatto diretto tra materiale adsorbente e sangue. Il sorbente non deve rilasciare sostanze nocive nel sangue e non deve indurre citotossicità. Il contatto del materiale sorbente con il sangue o il plasma non deve indurre alcuna attivazione del sistema immunitario (in particolare la cascata del complemento) e del sistema di coagulazione, non deve indurre emolisi, leucopenia e trombocitopenia. Inoltre, non si deve verificare l'adsorbimento di molecole indesiderate, come l'albumina.

2.6 Trattamenti sostitutivi renali continui

I diversi meccanismi di trasporto e rimozione di soluti e solventi (convezione, diffusione, adsorbimento, ultrafiltrazione) possono essere utilizzati in combinazione e configurare i diversi trattamenti.

I diversi trattamenti possono avere durata diversa: 3-4 ore se si tratta di dialisi intermittente oppure può essere continua per 24 ore se si tratta di terapie continue CRRT.

2.6.1 Ultrafiltrazione

L'ultrafiltrazione lenta continua (Slow continuous ultrafiltration, SCUF), basata solo sulla rimozione lenta dell'acqua plasmatica, viene utilizzata per i pazienti con sovraccarico di liquidi, con o senza disfunzione renale. L'obiettivo principale dell'ultrafiltrazione è quello di rimuovere il fluido utilizzando membrane semipermeabili senza sostituzione del volume, ottenendo così un controllo del volume ma non dei soluti nel paziente [19]. Per convenzione insieme all'acqua plasmatica verranno rimossi inevitabilmente alcuni soluti.

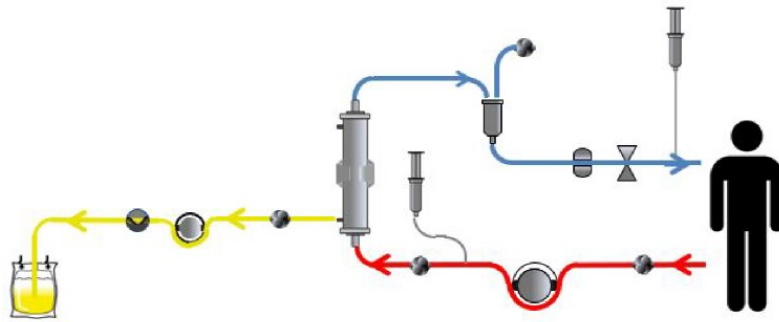


Figura 2.9: SCUF: ultrafiltrazione lenta continua.

2.6.2 Emofiltrazione

L'emofiltrazione veno-venosa continua (Continuous veno-venous hemofiltration, CVVH) utilizza la convezione, con l'ultrafiltrato che viene sostituito in parte o completamente con dei fluidi sostitutivi appropriati, per ottenere la clearance dei soluti e il controllo del volume. Il fluido di sostituzione può essere infuso prima (prediluizione) e/o dopo (postdiluizione) l'emofiltro (Figura 2.10).

Con l'emofiltrazione avviene la rimozione di soluti per convezione, la riduzione della concentrazione grazie al volume di sostituzione e la rimozione di fluidi per ultrafiltrazione.

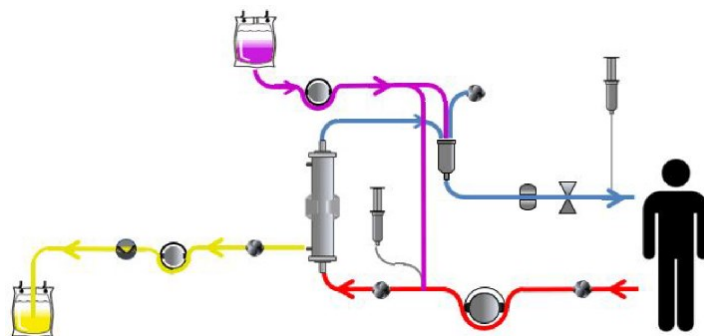


Figura 2.10: CVVH: emofiltrazione veno-venosa continua.

2.6.3 Emodialisi

L'emodialisi veno-venosa continua (Continuous veno-venous hemodialysis, CVVHD) è caratterizzata da un flusso di dialisato in controcorrente o co-corrente nel compartimento del dialisato dell'emodializzatore (Figura 2.11). Una configurazione in controcorrente è preferibile perché il gradiente medio di concentrazione è mantenuto alto per tutta la lunghezza del dializzatore. Al contrario, una configurazione in co-corrente garantisce una migliore stabilità e controllo delle condizioni idrodinamiche e una migliore rimozione dell'aria durante la fase di priming.

Il principale meccanismo di rimozione dei soluti durante l'emodialisi è la diffusione, che è principalmente efficace nella rimozione di piccoli soluti. Con l'emodialisi si ottiene una riduzione della concentrazione di molecole piccole e la rimozione di fluidi grazie all'ultrafiltrazione netta.

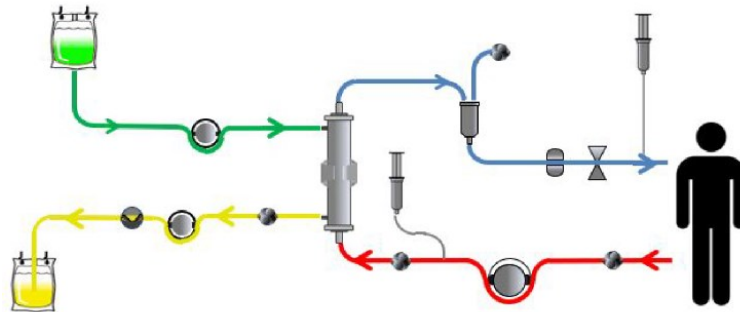


Figura 2.11: CVVHD: emodialisi veno-venosa continua.

2.6.4 Emodiafiltrazione

L'emodiafiltrazione veno-venosa continua (Continuous veno-venous hemodialysis, CVVHDF) combina le modalità di emodialisi ed emofiltrazione. Il trattamento combina la convezione (ultrafiltrato sostituito in parte o completamente dal fluido di sostituzione) con la diffusione (il dialisato scorre in contro-corrente nel filtro). Perciò, si ottiene la rimozione di soluti per convezione e diffusione, la riduzione della concentrazione grazie al volume di sostituzione, la rimozione di fluidi sulla base dell'ultrafiltrazione netta.

2.6.5 Emoperfusione o plasmaperfusione

Nell'emoperfusione o nella plasmaperfusione (Hemoperfusion, HP), il sangue o il plasma circolano attraverso una colonna contenente sorbenti specifici, con l'adsorbimento come unico meccanismo di rimozione di soluti (Figura 2.12). Solitamente combinate con altre modalità, l'emoperfusione e la plasmaperfusione sono utilizzate per rimuovere specifiche sostanze idrofobiche (solubili nei lipidi), tossine o veleni [18].

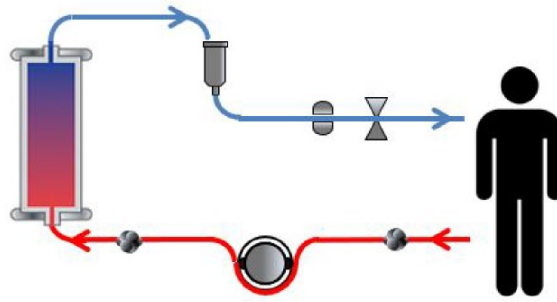


Figura 2.12: HP: emoperfusione.

Sulla base della natura delle cartucce adsorbenti utilizzate e della tecnica di esecuzione è possibile suddividere l'emoperfusione in:

- emoperfusione diretta (HP): il sangue entra direttamente a contatto con le beads adsorbenti costituenti la cartuccia (Figura 2.13);

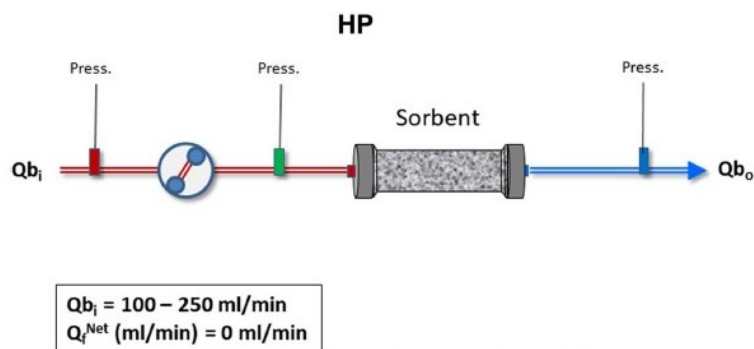


Figura 2.13: Rappresentazione dell'emoperfusione semplice.

- emoperfusione combinata con CRRT (HP-HD, HP-CRRT): il sangue attraversa il sorbente e successivamente la membrana di dialisi (Figura 2.14);

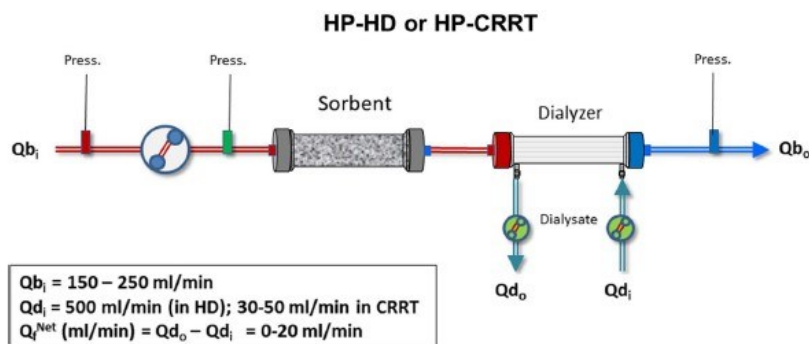


Figura 2.14: Rappresentazione dell'emoperfusione combinata con HD o CRRT.

- plasmafiltrazione-adsorbimento (CPFA): il plasma è separato dal sangue, fatto circolare attraverso il sorbente e reinfuso nel circuito;

- emoperfusione in combinazione con ECMO: in pazienti sottoposti a trattamento venovenoso o veno-arterioso con membrana di ossigenazione extracorporea (VV-ECMO o VA-ECMO) si collega il sorbente per l'emoperfusione al circuito ECMO (Figura 2.15).

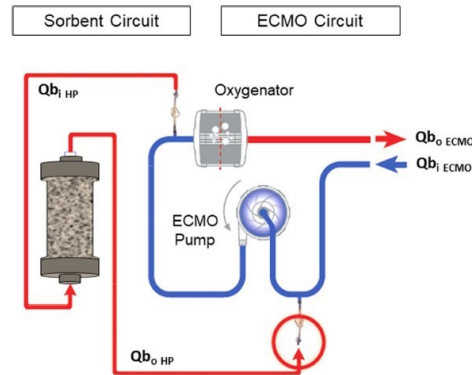


Figura 2.15: Rappresentazione dell'emoperfusione accoppiata alla tecnica di ossigenazione extracorporea (ECMO).

2.6.6 Plasmaferesi

La plasmaferesi (Plasma Exchange, PE) filtra il plasma attraverso filtri plasmatici e lo sostituisce con prodotti derivati dal plasma, come plasma fresco congelato, albumina o altri fluidi. In alternativa, il plasma può essere estratto gravimetricamente dal sangue intero utilizzando una pompa centrifuga. La plasmaferesi viene utilizzata per rimuovere sostanze patogene idrofiliche e lipofiliche ad alto peso molecolare [14].

2.7 I trattamenti CRRT nella sepsi

Nei pazienti con iper-infiammazione o sepsi, le terapie di depurazione extracorporea del sangue hanno il potenziale di modulare la risposta infiammatoria dell'ospite attraverso la rimozione dei mediatori infiammatori e/o delle tossine batteriche (Figura 2.16) [21]. L'uso della terapia sostitutiva renale (RRT) nei pazienti affetti da insufficienza renale indotta da sepsi (SI-AKI) è indicato allo scopo di garantire un supporto renale e l'immunomodulazione grazie alla purificazione del sangue da citochine, tossine uremiche e al controllo dell'equilibrio idro-elettrolitico.

| Cytokine/chemokine | Molecular weight, kDa |
|----------------------------|-----------------------|
| Interleukins | |
| IL-1 | 17 |
| IL-1ra | 25 |
| IL-2 | 15 |
| Soluble IL-2r | 55 |
| IL-4 | 15 |
| IL-6 | 26 |
| IL-8 | 11 |
| IL-10 | 18 |
| IL-18 | 24 |
| Tumor necrosis factors | |
| TNF- α | 17.2 |
| TNFR1 | 55 |
| TNFR2 | 75 |
| Transforming growth factor | |
| TGF- β | 12.7 |
| Adhesion molecules | |
| Soluble ICAM-1 | 95 |
| sE-selectin | 107-115 |
| sL-selectin | 62-100 |
| Endothelin-1 | 4.3 |
| sVCAM | 95-110 |
| Miscellaneous | |
| Adrenomedullin | 6 |
| PAF | 45 |
| MCP-1 | 8-10 |
| CRP | 11.4 |
| Granulocyte elastase | 25 |
| Procalcitonin | 13 |

Figura 2.16: Peso molecolare di citochine e altre molecole implicate nella sepsi.

Attraverso la tecnica diffusiva si ha il vantaggio di eliminare le molecole di piccole dimensioni, i piccoli soluti, come urea, creatinina ed elettroliti; con le membrane ad alto cut-off si riesce ad eliminare i mediatori infiammatori a più alto peso molecolare, per esempio 30-40 kDa.

Le terapie extracorporee che possono essere impiegate nel trattamento di un paziente settico sono [21]:

- emofiltrazione ad alto volume (High Volume Hemofiltration, HVHF): sebbene non sia definita in modo univoco nella letteratura medica, l'emofiltrazione ad alto volume è identificata come un trattamento continuo con una dose target convettiva (prescritta) superiore a 35 ml/kg/h [21]. I trattamenti continui con una dose superiore a 45 ml/kg/h identificano le modalità di emofiltrazione ad altissimo volume (Very High Volume Hemofiltration, VHVHF). Diversi studi hanno evidenziato il vantaggio dell'emofiltrazione rispetto all'emodialisi riguardo alla rimozione delle molecole infiammatorie, essendo queste di medio peso molecolare. Tuttavia, non vi sono prove cliniche che l'HVHF, se confrontata con l'emofiltrazione standard (CVVH), porti a una riduzione della mortalità [21];
- plasmafiltrazione continua accoppiata ad adsorbimento (Coupled Plasma Filtration Adsorption, CPFA): è una terapia che combina i vantaggi della CRRT con quelli della

plasmafiltrazione continua senza richiedere grandi quantità di plasma sostitutivo. Nella prima fase della CPFA, un filtro per plasma separa il plasma dalla componente cellulare del sangue e il filtrato del plasma viene pompato attraverso un sorbente. Il plasma purificato viene quindi reimpresso nel circuito principale, dove il sangue viene ricostituito e trattato con una modalità standard di CRRT. Non ci sono prove che la CPFA riduca la mortalità nei pazienti con shock settico [21];

- emoperfusione: prevede il posizionamento di una cartuccia di sorbente in serie con il filtro per rimuovere le tossine non rimosibili con la CRRT classica.

Il tipo di trattamento, la dose ed i tempi di avvio della RRT hanno un'importanza strategica nel recupero dell'AKI nei pazienti con sepsi.

2.8 Device per la cura della sepsi

In questo capitolo saranno illustrati i vari device di depurazione extracorporea (Tabella 2.2), attualmente sul mercato, fabbricati per la rimozione di endotossine e citochine, potenzialmente applicabili per il trattamento della sepsi.

| Dispositivo | Produttore | Composizione | Meccanismo | Sostanza eliminata |
|---------------------|----------------------------|---|---------------------------------------|--------------------------|
| Toraymyxin | Toray Industries, Giappone | Polimixina B legata covalentemente a fibre di polipropilene-polistirene | Adsorbimento | Endotossina |
| LPS adsorber | Alleco Medical, Svezia | Poli-peptide sintetico legato a dischi porosi di polietilene | Adsorbimento | Endotossina |
| oXiris | Gambro-Hospal, Francia | Membrana a base di AN69, trattato con polietileneimina (PEI) innestato con eparina | Adsorbimento | Endotossina Citochina |
| MATISSE | Fresenius SE, Germania | Albumina sierica umana immobilizzata su beads di polimetacrilato | Adsorbimento | Endotossina |
| CPFA | Bellco, Italia | Filtro al plasma di politerosulfone con cartuccia di resina idrofobica non selettiva, emofiltro di polietersulfone ad alta permeabilità per emofiltrazione continua | Adsorbimento Filtrazione al plasma | Citochina |
| Cytosorb | Cytosorbents, USA | Copolimero polistirene-divinilbenzene con rivestimento biocompatibile di polivinilpirrolidone | Adsorbimento | Citochina |
| HA330/HA380 | Jafron, Cina | Copolimero di polistirene-divinilbenzene | Adsorbimento | Citochina |

Tabella 2.2: Esempio di dispositivi utilizzati per la rimozione di endotossine e citochine.

2.8.1 Cytosorb

Cytosorb (CytoSorbents Corporation; Monmouth Junction [NJ], US) è una cartuccia adsorbente approvata in Europa nel 2011, risultata particolarmente adatta per la rimozione

non selettiva delle citochine (Figura 2.17). Cytosorb è inoltre in grado di adsorbire molecole con peso molecolare inferiore ai 50 kDa ma non proteine grandi come albumina (70 kDa) o fibrinogeno (340 kDa).



Figura 2.17: Cartuccia Cytosorb.

Il sorbente è costituito da piccole sfere di materiale polimerico poroso, lo stirene-divinilbenzene, ricoperte dal polivinilpirrolidone (Figura 2.18). Ciascuna microsfera ha una dimensione compresa tra 300 e 800 μm e ha una rete di pori e canali che le conferiscono un'ampia superficie disponibile per l'adsorbimento di molecole idrofobiche con peso compreso tra 5-60 kDa [10].

All'interno della struttura delle citochine, vi è il gruppo $-\text{NH}_3^+$, che dimostra una propensione a scambiare anioni. Lo stirene-divinilbenzene contiene il gruppo $-\text{SO}_3^-$, in grado di scambiare cationi. Si crea, perciò, un legame ionico tra il gruppo amminico delle citochine e il gruppo solfato del materiale sorbente permettendo l'adsorbimento e conseguentemente l'eliminazione di citochine dal flusso sanguigno.

Cytosorb è in grado di formare legami anche con gli antibiotici liposolubili. Il rivestimento di polivinilpirrolidone garantisce un'ottima emocompatibilità consentendo l'aumento della durata della terapia. Infatti, la singola cartuccia può essere utilizzata fino a 24 ore consecutive.

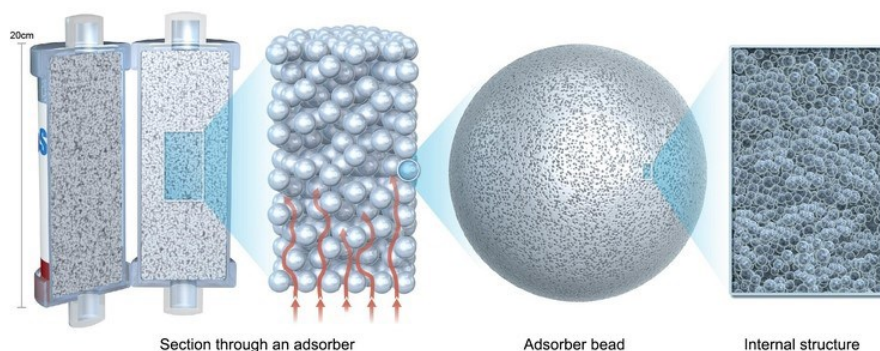


Figura 2.18: Struttura porosa del Cytosorb.

Le due principali indicazioni cliniche di impiego di CytoSorb sono lo shock settico e la sindrome da risposta infiammatoria sistemica da bypass post-cardiopulmonare.

Uno studio multicentrico su 198 pazienti con AKI nel 2017 ha dimostrato come i livelli sierici di IL-6 dopo la terapia con CytoSorb erano significativamente diminuiti e la mortalità era risultata del 65%, rispetto al 78% previsto dal loro punteggio SOFA [10].

2.8.2 Cartucce Jafron

Una serie di sorbenti (HA130, HA230, HA330/HA380) per le terapie di depurazione extracorporea del sangue è prodotta dall'azienda Jafron (Cina). Le diverse cartucce differiscono per la loro struttura, in particolare per la grandezza dei pori adsorbenti presenti sulla superficie delle beads, con conseguenti diverse applicazioni cliniche. Esse sono composte da microsferiche di stirene-divinilbenzene (beads) (Figura 2.19). Questo materiale è una resina a scambio cationico, in grado di legarsi al gruppo amminico delle citochine, rimuovendole dal torrente circolatorio. Il diametro medio delle microsferiche di resina è di 0,8 mm e varia da 0,60 a 1,18 mm. Le dimensioni dei pori delle beads sono 500 Da-40 kDa in HA130, 200 Da-10 kDa in HA230 e 500 Da-60 kDa in HA330. Questa proprietà le rende capaci di adsorbire molecole di diverso peso molecolare, motivo per cui hanno indicazioni cliniche differenti (Tabella 2.3). L'HA130 è utilizzata principalmente nel trattamento di condizioni croniche, l'HA230 nelle intossicazioni e l'HA330 nelle condizioni infiammatorie acute. Comune a tutte e tre le cartucce è la durata del trattamento consigliata di 2-2,5 ore, ma la durata del trattamento può essere prolungata a seconda dell'impiego di altre terapie ibride [21].

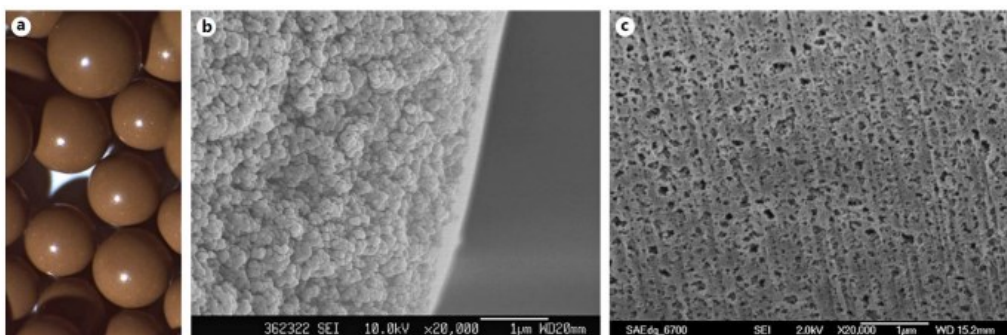


Figura 2.19: Beads adsorbenti in resina neutro-macroporosa realizzate in copolimero stirene-divinilbenzene (a). In (b, c), immagini al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) della superficie dei granuli e della sezione con il poro.

| | HA130 | HA230 | HA330/380 |
|---|---|--|--|
| Indicazione | Complicanze di dialisi a lungo termine: prurito, ipertensione, microinfiammazione, osteodistrofia renale, malnutrizione | Intossicazione da avvelenamento di erbicidi, rodenticidi, pesticidi, sovradosaggio di farmaci per biotossine | I pazienti critici hanno sofferto di una tempesta di citochine, cioè sepsi, pancreatite, trauma, chirurgia cardiaca, infiammazione grave |
| Rimozione di tossine | Tossine uremiche medie, tossine uremiche legate alle proteine | Sostanze esogene idrofobiche o legate alle proteine | Citochine, sistema del complemento, emoglobina |
| Range molecolare principale di rimozione | 5-30 kDa | 500 Da-10 kDa | 10-60 kDa |
| Distribuzione della dimensione dei pori della resina | 500 Da-40 kDa | 200 Da-10 kDa | 500 Da-60 kDa |
| Specifiche | | | |
| Capacità di carico della resina (mL) | 130 | 230 | 330/380 |
| Volume di sangue (mL) | 110 | 145 | 170/185 |
| Materiale del sorbente | | Copolimero stirene divinilbenzene | |
| Materiale dell'involucro | | PC | |
| Filtro parziale | | Si | |
| Metodo di sterilizzazione | | Sterilizzazione per irraggiamento | |

Tabella 2.3: Caratteristiche delle diverse cartucce Jafron.

Lo studio del gruppo Montin et [15] ha analizzato *in vitro* i potenziali effetti citotossici delle tre cartucce sorbenti, HA130, HA230 e HA330, sui monociti. La linea cellulare monocitica permette di testare *in vitro* gli effetti dei biomateriali sulla prima linea di difesa del sistema immunitario: le modifiche o le alterazioni delle funzioni di queste cellule permettono di prevedere l'interazione tra il sistema immunitario e gli stessi materiali in vivo. In particolare, è stata valutata l'induzione di apoptosi e necrosi nelle linee cellulari di monociti dovuta al contatto indiretto con i sorbenti. I risultati suggeriscono che il materiale adsorbente delle cartucce Jafron non è associato a citotossicità [15].

Lo studio di Huang et al. (riassunto in Tabella 2.4) ha valutato l'efficacia della cartuccia HA330 in 44 pazienti settici con edema polmonare (Acute Lung Injury, ALI). L'HP in aggiunta alla terapia standard ha portato a un miglioramento del livello delle citochine infiammatorie [22]. Inoltre, ha portato a un miglioramento dell'emodinamica dei pazienti, ad una riduzione della durata della degenza nell'unità di terapia intensiva, alla riduzione della mortalità in ICU (12,5% nel gruppo HP contro 45% nel gruppo di controllo), ma non alla riduzione della mortalità in ospedale a 28 giorni [22].

| | |
|-----------------------------------|---|
| Tipologia di studio | Studio randomizzato controllato (Randomized controlled trial, RCT) |
| Popolazione di studio, n | 44 pazienti con sepsi o shock settico |
| Dose prescritta | HP per 2 h per tre giorni |
| Sopravvivenza | - mortalità in ICU 12.5% in HA vs 45% nel controllo - mortalità in ospedale 37.5% in HA vs 50% nel controllo - mortalità a 28 giorni 45.8% in HA vs 55% nel controllo |
| Permanenza in ICU (giorni) | 12.4 ± 3.1 in HA vs 19.5 ± 4.0 nel controllo |
| Emodinamica | Significativa riduzione nella dose di vasopressori nel gruppo trattato con HA vs incremento nel gruppo di controllo |
| Altri risultati | Significativa differenza nei livelli di IL-6 e IL-8 tra i due gruppi al terzo giorno |
| Sicurezza | - un paziente con febbre nel gruppo HA - transiente riduzione nella conta piastrinica nel gruppo HA |

Tabella 2.4: Risultati dello studio di Huang et al. nell'uso di cartucce HA nella sepsi.

Spazi morti, fenomeni di canalizzazione o irregolarità possono portare a una quantità non ottimale di soluti adsorbiti, a un rischio maggiore di coagulazione e alla mancanza di saturazione.

Lo studio di Lorenzin et al. mira alla caratterizzazione fluidodinamica delle cartucce di HA [23]. La fluidodinamica è stata analizzata tramite tomografia computerizzata, evidenziando solo minime differenze nella distribuzione del flusso tra la regione centrale e quella periferica nelle diverse cartucce Jaftron. Si è osservato come le cartucce non presentano fenomeni di canalizzazione.

La legge di Darcy permette la descrizione del flusso attraverso le microsferi impaccate e afferma che la velocità del flusso è proporzionale al gradiente di pressione e inversamente proporzionale alla distanza tra le estremità considerate e alla densità di impaccamento delle microsferi [23]. L'esperimento *in vitro* di Lorenzin et al. dimostra che il gradiente di pressione e la resistenza al flusso sanguigno nelle tre cartucce aumenta proporzionalmente alla loro densità di impaccamento e lunghezza [23]. Inoltre, in questo studio si è sottolineato come la procedura di priming, anche se eseguita con precisione, non consente una completa eliminazione dell'aria a causa del design del contenitore, probabilmente a causa delle griglie poste all'ingresso e all'uscita per trattenere le beads all'interno della cartuccia [22]. Questo fenomeno è più evidente in HA130 e HA230 [22].

2.8.3 Toraymyxin

Approvato in Giappone nel 1994 e, successivamente, qualificato con la marcatura CE nel 1998, Toraymyxin (Toray Industries, Tokyo, Japan) è indicato per il trattamento di pazienti aventi sepsi o shock settico causato da un'infezione di batteri Gram-Negativi (Figura 2.20) [10]. La cartuccia è costituita da un involucro in policarbonato contenente un tessuto in fibra composita a base di polistirene su cui è immobilizzata, con legame covalente, la Polimixina B, che è un farmaco antibiotico [10]. Toraymyxin è una cartuccia adsorbente che tuttavia, a differenza delle altre cartucce presentate precedentemente, non è composta da microsferi ma da fibre. La Polimixina B (PMX-B) non può essere somministrata per via sistemica, essendo nefrotossica e neurotossica. La struttura molecolare della PMX-B è in grado di legare le molecole di lipopolisaccaride dei batteri Gram-negativi (LPS) e neutralizzarne l'azione tossica. L'interazione tra LPS e PMX-B è guidata dalla formazione di un legame ionico tra PMX-B (carica positiva) e LPS (carica negativa).

È stato dimostrato che il flusso di sangue all'interno di Toraymyxin è omogeneo con un utilizzo efficiente della superficie di adsorbimento [13]. Il trattamento previsto è al massimo di 2 ore al giorno ripetuto per due giorni consecutivi.



Figura 2.20: Cartuccia Toraymyxin.

Uno studio multicentrico condotto in Italia ha coinvolto 64 pazienti con sepsi grave/shock settico da infezioni intra-addominali da batteri Gram-negativi e ha riportato come l'emoperfusione con Toraymyxin abbia migliorato significativamente l'emodinamica e la disfunzione d'organo e ridotto la mortalità a 28 giorni [21]. Il recente studio EUPHRATES, condotto in Nord America, ha arruolato 450 pazienti con shock settico e un livello di attività endotossinica elevato per ricevere il trattamento con PMX-B oppure la terapia standard. Si è osservato come l'impiego di Toraymyxin non sia stato associato a una differenza significativa nella mortalità a 28 giorni [21].

2.8.4 oXiris

Il filtro oXiris (Gambro Hospal, Stoccolma, Svezia) è stato approvato in Europa nel 2009. È indicato per la purificazione del sangue in presenza di una dose elevata di citochine e endotossine, includendo anche la terapia di supporto delle funzioni renali (Figura 2.21).



Figura 2.21: Il filtro oXiris.

oXiris è un filtro dializzatore le cui fibre sono composte da un copolimero di acrilonitrile e metilsulfonato di sodio. A causa del gruppo sulfonato, la membrana presenta una forte carica negativa che consente la formazione di un legame ionico con il gruppo amminico delle citochine. Viene utilizzato un particolare trattamento che prevede di legare al copolimero una molecola di polietereimmide (PEI). Questa molecola presenta una carica fortemente positiva che porta ad una diminuzione del potenziale della membrana, senza limitare la capacità di rimuovere citochine. Inoltre, è stato possibile legare allo strato di PEI delle molecole di eparina: dato che quest'ultime sono fortemente negative vengono attratte dalle cariche fortemente positive del PEI, formando un legame di natura elettrostatica. Si ottiene una struttura a tre strati in grado di avere sia capacità di adsorbimento che emocompatibilità (Figura 2.22). Le endotossine presentano una carica negativa che forma un legame di natura elettrostatica con le molecole di PEI, permettendo l'adsorbimento della molecola sulla superficie del materiale sorbente. Queste caratteristiche rendono oXiris un prodotto molto interessante, in particolar modo per trattare la sepsi, dato che riesce ad unire adsorbimento di citochine e endotossine alla rimozione di soluti e fluidi per diffusione e convezione. Tuttavia, oXiris presenta la capacità di rimuovere antibiotici idrofilici. Il trattamento continuo può durare fino a 72 ore.

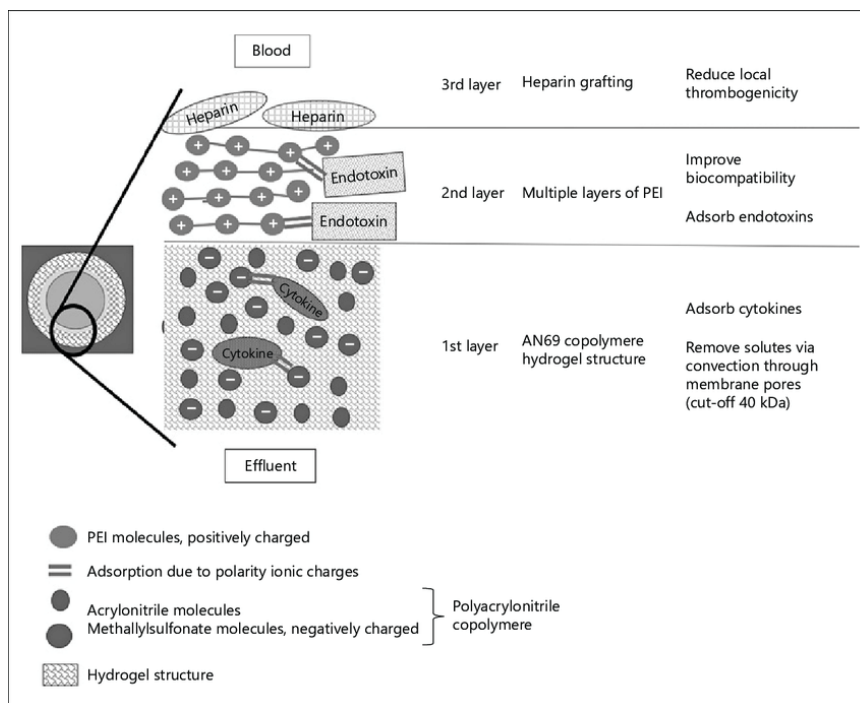


Figura 2.20: I tre strati della membrana oXiris®.

De Vriese et al. hanno riportato una diminuzione dei livelli di citochine nel sangue e un miglioramento dei parametri emodinamici nei pazienti con SI-AKI trattati in emofiltrazione [10]. Tuttavia, nello studio si è resa necessaria una sostituzione frequente dell'emofiltro, per saturazione della membrana [10].

In un recente studio del gruppo di Kellum [10] è stata eseguita un'emoperfusione *in vitro* usando oXiris, CytoSorb e Toraymyxin. Il plasma umano eparinizzato di volontari sani è stato pre-incubato con quantità patologiche di mediatori dell'infiammazione e filtrato in un circuito ad anello chiuso per due ore. Per ogni dispositivo, la rimozione di 27 mediatori dell'infiammazione è stata misurata nel tempo. Si è dimostrato come i tre dispositivi sorbenti più ampiamente disponibili abbiano spettri di rimozione dei soluti molto diversi. Mentre Toraymyxin è efficace nella rimozione delle endotossine, non rimuove efficacemente i mediatori dell'infiammazione. Al contrario, Cytosorb rimuove una vasta gamma di mediatori infiammatori, ma non rimuove endotossine. oXiris, invece, ha caratteristiche adsorbenti simili a Toraymyxin per le endotossine e a Cytosorb per la maggior parte dei mediatori dell'infiammazione, ma è limitato nella capacità (quantità di soluti in grado di rimuovere) [10].

2.8.5 Seraph 100

Seraph 100 Microbind Affinity Blood Filter (ExThera Medical, Martinez, CA, USA) è un trattamento di aferesi (consiste nel prelievo di sangue intero da un paziente e nella successiva separazione del sangue nelle sue componenti cellulari) per affinità che utilizza colonne di eparina. È l'unico dispositivo in grado di adsorbire i patogeni. È costituito da colonne di microsferi di polietilene sulle quali l'eparina è stata preventivamente immobilizzata in modo covalente (Figura 2.23) [13]. Studi preclinici hanno confermato che il Seraph è in grado di legare vari agenti patogeni come virus, batteri Gram-negativi e Gram-positivi, batteri resistenti ai farmaci, ma anche citochine, quindi potenzialmente impiegabile nella sepsi [13].



Figura 2.23: Seraph 100

Le portate ematiche da utilizzare variano da 150 a 350 ml/min e il tempo di trattamento può essere esteso fino a 24 ore. Seraph 100 trova maggior applicazione nei pazienti settici e più recentemente è stato utilizzato nelle infezioni complicate da COVID-19. Il razionale dell'utilizzo di tale cartuccia consisterebbe dunque nella rimozione delle citochine dal flusso sanguigno e allo stesso tempo dell'agente patogeno, di DAMPs e PAMPs.

Capitolo 3: l'antibiotico Linezolid

Il Linezolid (LZD) è un antibiotico appartenente alla classe degli oxazolidinoni. È stato introdotto nel 1996 dopo attente verifiche ed approvato dalla Food and Drug Administration nel 2000. Negli ultimi 40 anni, gli oxazolidinoni sono stati considerati una vera e propria nuova classe di antibiotici, utilizzati ampiamente in clinica [24]. Il LZD è una molecola di piccole dimensioni (massa molare 337,346 g/mol), la cui struttura chimica è caratterizzata da un composto organofluorurato costituito da 1,3-oxazolidin-2-one recante un gruppo N-3-fluoro-4-(morfolin-4-il)fenile e un gruppo acetamidometil in posizione 5 [25] (Figura 3.1). Gli studi sulla relazione tra struttura e attività degli oxazolidinoni hanno rivelato che il gruppo N-arilico e la configurazione 5-S sono essenziali per l'attività. Il gruppo 5-acilaminometile è il responsabile dell'attività.

Il LZD è stato il primo membro disponibile di questa nuova classe di agenti antibatterici sintetici ed agisce inibendo l'inizio della sintesi proteica batterica. Ha un ampio spettro di attività contro i patogeni Gram-positivi, tra cui Enterococchi, Stafilococchi come Stafilococco aureo resistente alla meticillina (MRSA), Streptococchi, Stafilococchi resistenti all'oxacillina ed Enterococchi resistenti alla Vancomicina [25].

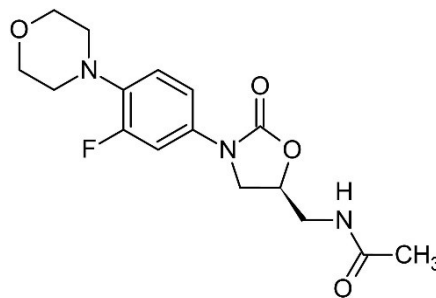


Figura 3.1: Struttura chimica del Linezolid.

3.1 Farmacocinetica

La farmacocinetica studia l'interazione dei processi dell'organismo con il farmaco. Il destino del farmaco all'interno dell'organismo è descritto da quattro fenomeni:

- assorbimento;
- distribuzione;
- biotrasformazione (o "metabolismo");
- eliminazione.

3.1.1 Assorbimento

Da diversi studi emerge come il LZD si distingua per il buon assorbimento e biodisponibilità. È molto ben assorbito per via orale con una biodisponibilità del 100% [24].

La presenza di cibo non influisce sul suo assorbimento. Pertanto, la via di somministrazione dell'antibiotico può essere cambiata da endovenosa a orale in pazienti clinicamente stabili senza problematiche [24].

3.1.2 Distribuzione

Il legame proteico del LZD è relativamente basso: si lega per il 31% alle proteine plasmatiche, in particolar modo all'albumina sierica [26]. È stato accertato che solo la concentrazione libera del LZD, dunque non legato alle proteine plasmatiche, sia responsabile dell'attività del farmaco. Perciò, dato il suo scarso legame proteico, la misurazione delle concentrazioni plasmatiche totali è appropriata per calcolare i parametri farmacocinetici dell'antibiotico [26].

Si è osservato come il picco plasmatico venga raggiunto entro la seconda ora dopo la somministrazione orale di LZD.

Il volume di distribuzione è simile al contenuto di acqua corporea (volume di distribuzione allo stato stazionario circa 40-50 L nell'adulto) [25].

3.1.3 Metabolismo

Il LZD viene principalmente metabolizzato mediante l'ossidazione dell'anello morfolinico con la formazione prevalentemente di due derivati inattivi dell'acido carbossilico ad anello aperto: il metabolita acido-amino etossiacetico (PNU-142300) e l'idrossietilglicina (PNU-142586) (Figura 3.2) [27]. Il primo è meno abbondante del secondo.

Nei soggetti sani, il 50-70% di LZD viene metabolizzato dal fegato nei due metaboliti principali, che vengono poi escreti sia dal fegato che dai reni [27].

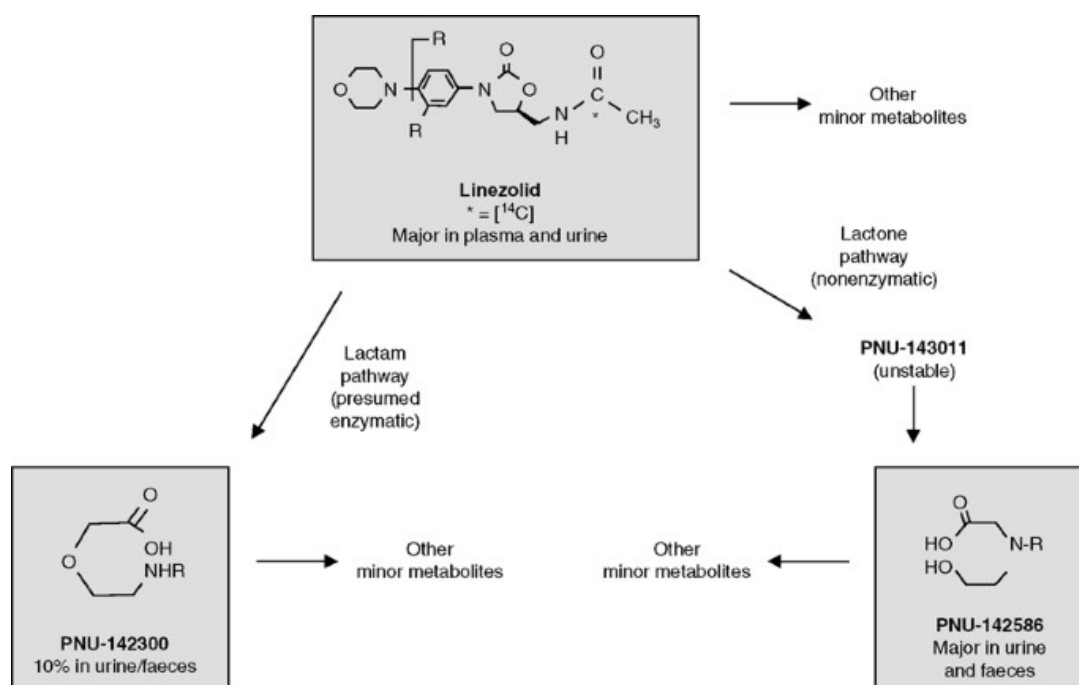


Figura 3.2: Schema del metabolismo del Linezolid.

3.1.4 Eliminazione

In un paziente sano, il LZD viene escreto nelle urine come PNU-142586 (40%), nella forma invariata (30%) e PNU-142300 (10%) [26]. L'emivita di eliminazione plasmatica è di 3,4–7,4 ore [24].

Il dosaggio ottimale degli antibiotici è un elemento essenziale per una terapia efficace nei pazienti, per esempio con infezioni gravi o shock settico. I pazienti in condizioni critiche sviluppano cambiamenti fisiopatologici significativi che influenzano la farmacocinetica dei farmaci, come l'aumento della permeabilità capillare, la ritenzione di liquidi o l'ipoalbuminemia, che possono portare a un aumento del volume di distribuzione di alcuni farmaci e quindi a una diminuzione delle loro concentrazioni ematiche [28]. Tuttavia, in caso di insufficienza epatica, l'eliminazione epatica del LZD sembra esser compromessa. Allo stesso modo nella popolazione anziana non si è riscontrata alcuna variazione della clearance del farmaco, per cui non è previsto un aggiustamento del dosaggio del farmaco [26].

Il LZD è un farmaco dializzabile: si è riscontrato che una quantità significativa di farmaco viene eliminata durante quattro ore di emodialisi [25]. La quantità rimossa dipende dalla vicinanza tra la seduta di dialisi e la somministrazione dell'antibiotico. Pertanto, una delle due dosi giornaliere previste deve essere somministrata dopo il trattamento di dialisi [29]. I livelli sierici di LZD possono ridursi notevolmente nei pazienti sottoposti a terapia sostitutiva renale continua (24 ore al giorno), con conseguenti concentrazioni sieriche sotto-terapeutiche e fallimento del trattamento [26].

3.2 Farmacodinamica

La farmacodinamica studia i meccanismi d'azione del farmaco stesso o di un suo metabolita attivo con il sito di azione, che a sua volta attiva la risposta biologica.

Il LZD ha un'azione prevalentemente batteriostatica nel tempo. È un antibiotico sintetico la cui azione consiste nell'impedire la sintesi di proteine batteriche attraverso il legame con entrambe le subunità dell'rRNA, prevenendo la formazione del complesso di iniziazione, che è alla base del processo di traslazione (Figura 3.3) [24].

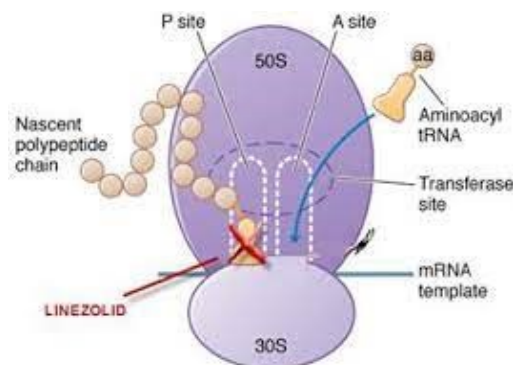


Figura 3.3: Legame del Linezolid al sito di RNA per impedire la sintesi proteica batterica.

3.3 Impiego clinico del Linezolid

Il LZD è commercializzato sotto forma di compresse e soluzione endovenosa, rispettivamente al dosaggio di 400 e 600 mg e di 2gr/ml in 300 ml di soluzione fisiologica.

Dato l'utilizzo come antibiotico ad ampio spettro, il LZD viene comunemente confrontato con la Vancomicina. La Vancomicina, dato il minor costo e la maggiore diffusione, viene spesso utilizzata come prima scelta, ma gli effetti collaterali sulla funzionalità epatica e renale portano a limitazioni nel suo utilizzo. Il LZD risulta più efficace della Vancomicina per le infezioni della cute e dei tessuti molli e per le infezioni da MRSA nosocomiali [24].

Citochine come $TNF\alpha$, IL-1 β , IL-6 e IL-10, come già affermato, hanno un ruolo cruciale nella risposta infiammatoria durante la sepsi. Lo studio di Bode et al. ha permesso di confrontare il potenziale effetto dei 3 diversi antibiotici (Linezolid, Vancomicina, Daptomicina) sull'espressione delle citochine associate alla sepsi [30]. Gli antibiotici hanno modulato in modo differente l'espressione genica delle citochine studiate. Mentre Linezolid e Vancomicina hanno aumentato l'espressione di tutti i recettori Toll-like (TLR1, 2, 4, 6, 7 e 9), Daptomicina ha ridotto i livelli di mRNA di TLR1, TLR2 e TLR6, che riconoscono i pattern molecolari associati ai patogeni dei batteri Gram-positivi [30]. Inoltre, il LZD ha inibito, mentre la Vancomicina ha promosso l'attività fagocitica dei monociti [30]. La Vancomicina aumenta l'espressione genica di IL-10 mentre il LZD induce una maggiore produzione di IL-

1 β [30]. I risultati affermano come la Vancomicina diminuisce la produzione di TNF α e il LZD riduce la produzione di alcune citochine pro-infiammatorie [30].

Bisogna sottolineare che l'assunzione dell'antibiotico Linezolid ha una buona tollerabilità in generale, ma si possono osservare effetti collaterali ematologici come trombocitopenia e anemia [31]. La trombocitopenia è una reazione avversa comunemente osservata con tassi di insorgenza di circa il 30%, maggiormente dopo un trattamento prolungato (> 14 giorni) e nei pazienti con insufficienza renale [31].

Capitolo 4: materiali e metodi

I trattamenti extracorporei possono comportare una diminuzione dell'efficacia della terapia antibiotica a causa dell'adsorbimento del farmaco e pertanto è importante conoscere il suo grado di rimozione. A tale scopo, si è deciso di studiare la possibile interazione tra l'antibiotico LZD e la cartuccia Jafron HA380. Si sono svolte delle prove *in vitro* nel Centro di Ricerca IRRIV (International Renal Research Institute of Vicenza) presso l'U.O. di Nefrologia Dialisi e Trapianto dell'Ospedale San Bortolo di Vicenza.

4.1 Materiali

Per svolgere le prove sperimentali ci si è avvalsi di:

- mini-modulo: è una cartuccia personalizzata di dimensioni ridotte rispetto alla cartuccia Jafron HA380 (Figura 4.1). È riempita con 75 gr di beads umide, pari al 25% della quantità di materiale adsorbente realmente presente in una cartuccia HA380 (Figura 4.2). Nella fase sperimentale si è deciso di utilizzare un down-scaling della cartuccia, per evitare un dispendio eccessivo di materiale sorbente ed antibiotico;



Figura 4.1: Aspetto del mini-modulo vuoto, da riempire con 75 gr di beads.



Figura 4.2: A sinistra, cartuccia Jafron HA380; a destra, mini-modulo riempito con 75 gr di beads.

- antibiotico Linezolid: nei vari esperimenti si utilizza l'antibiotico LZD nella formulazione endovenosa preconstituita in 300 ml di soluzione fisiologica. Ogni sacca di LZD ha un dosaggio di 600 mg/300 ml (Figura 4.3).

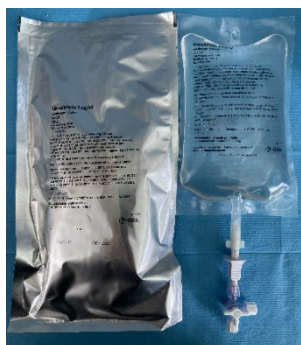


Figura 4.3: Sacca di antibiotico Linezolid nella formulazione per somministrazione endovenosa utilizzata nei vari esperimenti.

- Galileo: è la piattaforma da laboratorio utilizzata per condurre i test *in vitro* (Figura 4.4). È costituita da attuatori e sensori, che permettono la simulazione in laboratorio del funzionamento di una macchina per CRRT. Non si utilizza una reale macchina da CRRT per evitare problemi legati ad allarmi o al blocco delle pompe, per esempio a causa della presenza di bolle d'aria nel circuito *in vitro*. Per la gestione della piattaforma si utilizza un'applicazione sviluppata in LabView, tramite la quale si riesce da computer ad impostare la velocità di flusso delle pompe, la durata dell'esperimento e si possono attivare tutte le varie componenti che servono per condurre il test (Figura 4.5).



Figura 4.4: La piattaforma sperimentale Galileo impiegata per simulare una macchina per CRRT. Nella parte inferiore della piattaforma si possono osservare le pompe peristaltiche utilizzate durante i vari esperimenti.

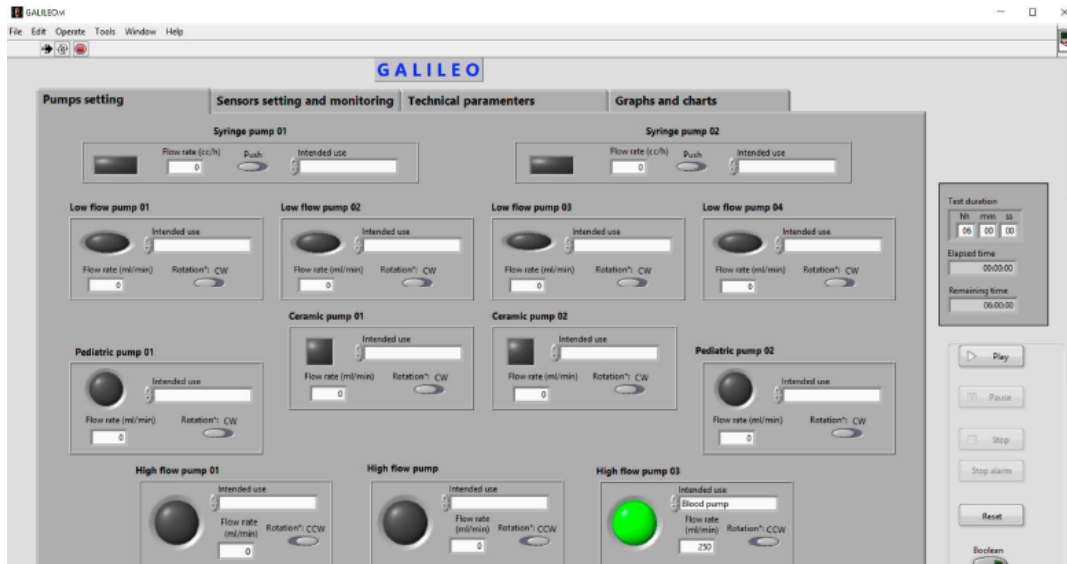


Figura 4.5: Interfaccia del programma con il quale è possibile gestire le variabili di ogni esperimento per settare la piattaforma Galileo. Il pallino verde indica che è attiva quella pompa durante il test con un flow -rate di 250 ml/min.

- Termoagitatore: un agitatore magnetico riscaldante è stato utilizzato per riscaldare e mantenere costante la temperatura della soluzione a 37°C per tutta la durata degli esperimenti (Figura 4.6). Il processo di adsorbimento è temperatura-dipendente, perciò è essenziale mantenere la temperatura costante durante gli esperimenti.



Figura 4.6: Termoagitatore per riscaldare la soluzione impiegata.

4.2 Metodi

Per caratterizzare il processo di adsorbimento del LZD operato dalla cartuccia Jafron HA380 sono stati condotti diversi test in vitro. Lo scopo principale delle prove sperimentali è l'analisi dell'adsorbimento di LZD in funzione della diversa concentrazione di farmaco in soluzione. Successivamente si è posto l'antibiotico LZD a contatto con il sangue umano, per verificare se la presenza delle proteine del sangue provocasse dei cambiamenti nel meccanismo di adsorbimento. Un'ultima prova è stata effettuata utilizzando, al posto della cartuccia Jafron

HA380, il filtro oXiris. L'obiettivo è l'analisi della capacità del materiale del filtro di adsorbire l'antibiotico.

4.2.1 Esperimento con soluzione non in circolazione

Nella prima prova sperimentale si sono poste le beads prelevate dalla cartuccia direttamente a contatto con l'antibiotico all'interno di una boccia di vetro. Non si è utilizzato il mini-modulo, quindi la soluzione non è stata posta in circolazione. Nell'esecuzione dell'esperimento si sono seguiti i seguenti passaggi:

1. dopo aver svuotato dalla soluzione di riempimento (acqua sterile) la cartuccia Jafron HA380, si sono prelevati 75 gr di materiale adsorbente (Figura 4.7) e si sono posti all'interno di una boccia di vetro (reservoir) (Figura 4.8). La cartuccia HA380 contiene delle beads di resina adsorbente macroporosa in copolimero stirene-divinilbenzene. Il diametro medio delle microsferi di resina è di 0,80 mm e varia da 0,60 a 1,18 mm. La distribuzione dei pori della resina è di 500 Da-60 kDa;



Figura 4.7: Dettaglio delle beads umide presenti all'interno di una cartuccia Jafron HA380.



Figura 4.8: All'interno del reservoir sono stati posti 75 gr di beads.

2. all'interno del reservoir è stata aggiunta una sacca di soluzione preconstituita di LZD (600 mg/300 ml) (Figura 4.9). Un ml di soluzione antibiotica è stato prelevato direttamente dalla sacca e posto in una provetta per testare la concentrazione iniziale di LZD (prelievo T0);

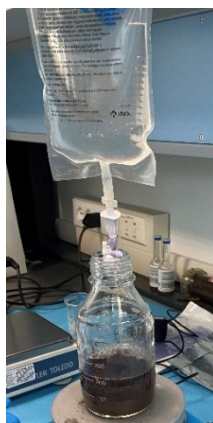


Figura 4.9: La soluzione di Linezolid è stata posta all'interno del reservoir.

3. si è posto il reservoir sul termoagitatore allo scopo di riscaldare la soluzione e mantenerla a 37°C durante tutto lo svolgimento della prova (Figura 4.10). Per controllare la temperatura, un termometro è stato posto all'interno della boccia. Da questo istante, si sono coneggiate due ore, che sono il tempo minimo raccomandato per un trattamento con cartuccia Jafron HA380 (Figura 4.11). Attraverso l'introduzione di una pastiglia magnetica nel reservoir, il termoagitatore ha permesso la continua agitazione della soluzione;



Figura 4.10: Rappresentazione dello svolgimento dell'esperimento.



Figura 4.11: Dettaglio del moto delle beads durante la prova sperimentale.

4. si sono effettuati prelievi consecutivi ciascuno di un ml di soluzione dal reservoir utilizzando una siringa e un three-stop. I prelievi sono stati denominati T5, T10, T15, T20, T30, T40, T50, T60, T70, T80, T90, T100, T110, T120 dove il numero rappresenta il tempo (in minuti) del prelievo (Figura 4.12).



Figura 4.12: Siringa collegata a three-stop per effettuare il prelievo di un ml di soluzione dal reservoir.

4.2.2 Esperimento con soluzione in circolazione

Per questo esperimento, è stato utilizzato un circuito extracorporeo personalizzato, applicato alla piattaforma Galileo, allo scopo di simulare *in vitro* un trattamento di emoperfusione. Si sono eseguiti diversi test con l'obiettivo di analizzare l'andamento della quantità di antibiotico adsorbita in relazione alla sua concentrazione all'interno del reservoir. Il procedimento dei test è il seguente:

1. si sono prelevati e posti all'interno di un mini-modulo 75 gr di beads (Figura 4.13, Figura 4.14);

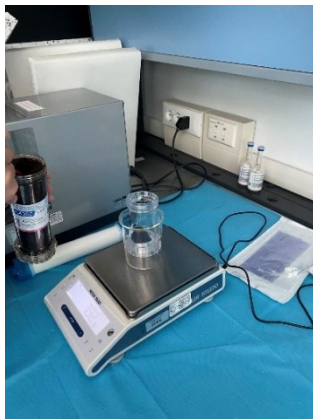


Figura 4.13: Riempimento del mini-modulo con le beads prelevate da una cartuccia Jafron HA380.



Figura 4.14: 75 gr di materiale sorbente posto all'interno del mini-modulo.

2. si è costruito il circuito: da un lato del mini-modulo si è collegato lo spezzone pompa con la linea di inflow (Figura 4.15); dall'altro lato la linea di outflow. La linea di inflow pesca la soluzione dal reservoir. La linea di outflow riporta la soluzione all'interno della boccia dopo il passaggio attraverso il mini-modulo. Il circuito così costituito (Figura 4.16) viene montato sulla piattaforma Galileo, inserendo lo spezzone pompa all'interno dell'alloggiamento della pompa peristaltica scelta per la prova sperimentale;



Figura 4.15: Spezzone pompa (a) collegato alla linea di inflow (b) e alla linea di collegamento con la cartuccia (c).



Figura 4.16: Circuito completo collegato al mini-modulo.

3. si esegue il priming del circuito per eliminare eventuali residui sulla superficie delle beads del materiale utilizzato per la sterilizzazione e le bolle d'aria presenti all'interno del mini-modulo e nelle linee. Il priming è eseguito collegando la linea di inflow ad una sacca di soluzione fisiologica e la linea di outflow ad una sacca vuota di scarto (Figura 4.17). La soluzione viene fatta circolare all'inizio con un flow-rate di 100 ml/min, che viene successivamente aumentato. Mentre la soluzione penetra tra le beads, il mini-modulo deve essere agitato e, servendosi di un martelletto, si devono eliminare tutte le bolle d'aria residue (Figura 4.18). L'operazione si conclude quando non c'è più aria all'interno del circuito;



Figura 4.17: Preparazione del materiale utilizzato per effettuare il priming del circuito. A destra si osserva la sacca di fisiologica da cui prelevare la soluzione e a sinistra la sacca di scarico.

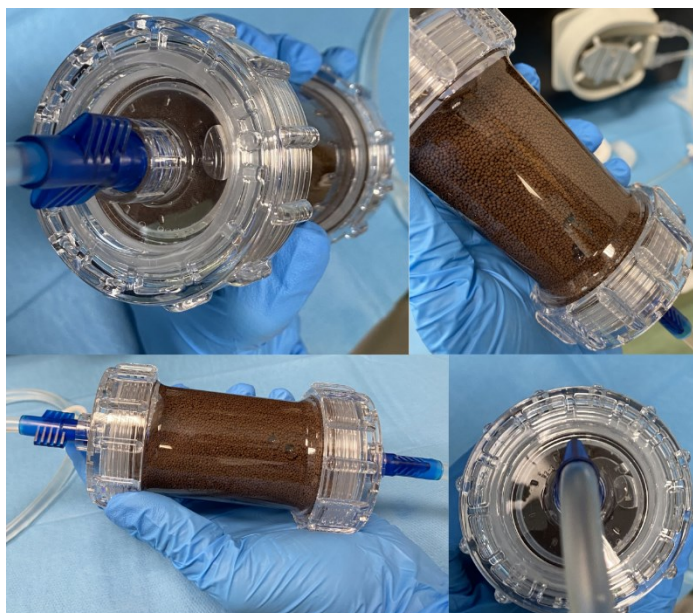


Figura 4.18: Bolle d'aria intrappolate all'interno del mini-modulo che devono essere rimosse durante il priming.

4. si prosegue preparando la soluzione da utilizzare durante l'emoperfusione *in vitro*. Quattro soluzioni sono state preparate con diverse concentrazioni iniziali di antibiotico:

- 100 ml di Linezolid e 200 ml di soluzione fisiologica per ottenere una concentrazione ideale di antibiotico di 200 mg/300 ml;
- 200 ml di Linezolid e 100 ml di soluzione fisiologica per ottenere una concentrazione di farmaco ipotetica di 400 mg/300 ml;
- 300 ml di Linezolid per ottenere una concentrazione ideale di 600 mg/300 ml. In questo caso, si versa una sacca completa di LZD all'interno del reservoir. Il test è stato eseguito due volte mediando poi i risultati;
- 600 ml di Linezolid (due sacche), per aumentare la massa totale di antibiotico circolante. Non è possibile aumentare la concentrazione di antibiotico oltre i 2 mg/ml, dato che la soluzione di LZD risulta essere già preconstituita per uso endovenoso. Si è cercato di ovviare a tale problema raddoppiando la massa di LZD all'interno del reservoir. Dato che il volume è raddoppiato e si vogliono degli esperimenti con delle tempistiche comparabili, si è raddoppiata anche la durata della prova.

La soluzione è stata posta in una boccia di vetro con all'interno una pastiglia magnetica necessaria per ottenere l'agitazione del liquido (Figura 4.19). Il reservoir successivamente è stato posto sul termoagitatore per ottenere e mantenere la soluzione ad una temperatura costante di 37°C (Figura 4.20);



Figura 4.19: Sacche di soluzione antibiotica preconstituita e boccia di vetro con all'interno la pastiglia magnetica.



Figura 4.20: Riscaldamento della soluzione sul termoagitatore.

- quando la soluzione raggiunge la temperatura desiderata, si pone la linea di inflow all'interno della boccia, mentre la linea di outflow rimane attaccata alla sacca di scarto. Si procede con lo scarico della soluzione fisiologica del priming contenuta all'interno delle linee e del mini-modulo azionando la pompa con un flow-rate di 150 ml/min per 34 secondi. Una volta sostituita la soluzione fisiologica con la soluzione antibiotica, si stacca la linea di outflow dalla sacca di scarto e la si pone all'interno di una nuova boccia (Figura 4.21). Si esegue il Single-Pass, ossia si fa passare tutta la soluzione una volta attraverso il mini-modulo, per analizzare quanto il materiale adsorbente è in grado di interagire con il LZD in un singolo passaggio (Figura 4.22). In questa fase la portata della pompa è impostata a 250 ml/min;

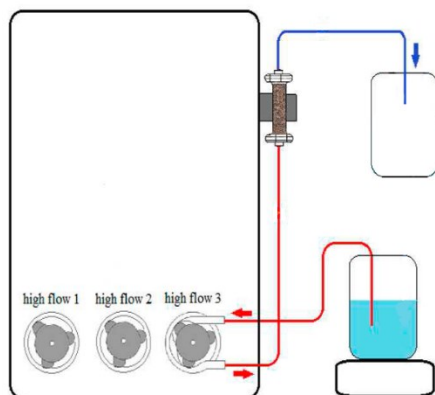


Figura 4.21: Schema del circuito nell'esecuzione del Single-Pass.



Figura 4.22: Primo passaggio della soluzione antibiotica attraverso il mini-modulo. Si esegue il Single-Pass.

- finito il Single-Pass, si pone la boccia appena riempita sul termoagitatore. La linea di inflow ed outflow vengono inserite entrambe all'interno del reservoir (Figura 4.23). Si

inizia il trattamento simulato di emoperfusione azionando la pompa a 250 ml/min (Figura 4.24). La prova sperimentale dura 2 ore, ad eccezione del test a doppia dose di LZD (1200 mg/600 ml) per il quale si è continuato l'esperimento per 4 ore;

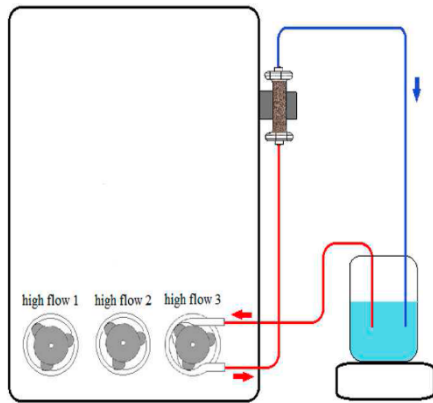


Figura 4.23: Schema del circuito utilizzato durante la prova sperimentale.



Figura 4.24: Rappresentazione del set-up sperimentale utilizzato durante gli esperimenti in circolazione.

7. allo scopo di analizzare l'andamento della concentrazione di LZD durante le varie prove sperimentali, si sono effettuati diversi prelievi di 1 ml di soluzione (Figura 4.25). Negli esperimenti con durata di due ore si sono effettuati i prelievi a T0, T5, T10, T15, T20, T30, T40, T50, T60, T70, T80, T90, T100, T110, T120. Nell'esperimento con durata quattro ore si sono eseguiti dei prelievi aggiuntivi a T150, T180, T210, T240. Il prelievo si esegue con una siringa collegata ad un three-stop e ponendo la soluzione in una provetta Litio-Eparina (Figura 4.26). Inoltre, è stato eseguito un prelievo in seguito al Single-Pass (TSingle-Pass) e uno alla fine del trattamento, dopo aver fatto passare tutta la soluzione attraverso il mini-modulo e raccogliendola su un'altra boccia (TBoccia) (Figura 4.27). Il campione viene analizzato come verrà successivamente precisato.



Figura 4.25: Preparazione per il prelievo di 1 ml di soluzione destinato alla successiva analisi della concentrazione.

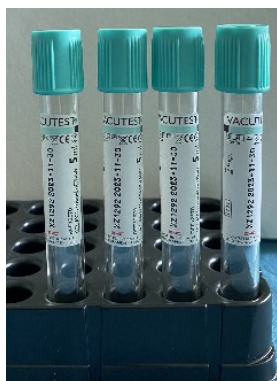


Figura 4.26: Provette Litio-Eparina utilizzate per l'analisi della concentrazione di Linezolid nella soluzione.

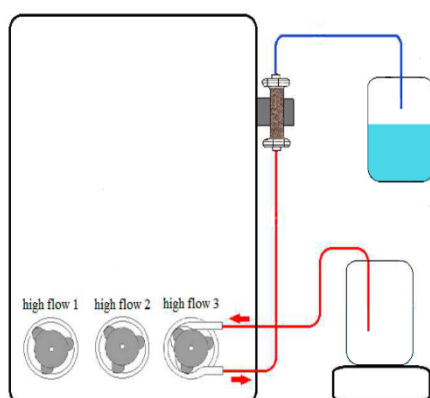


Figura 4.27: Schema del circuito per effettuare il prelievo TBoccia; si pone la linea di outflow su una boccia vuota, si fa passare tutta la soluzione del reservoir attraverso il mini-modulo e la si raccoglie nell'altra boccia.

4.2.3 Esperimento con l'impiego di sangue

È stato eseguito un esperimento utilizzando sangue umano. Si sono impiegate sacche di emazie concentrate e di plasma umano (Figura 4.28). Si è effettuato un prelievo dalla sacca di emazie concentrate per analizzare l'ematocrito che si attestava a 0.30 g/L. Allo scopo di

evitare la formazione di coaguli si è posto 1 ml di Eparina (EPSOCLAR 25.000 ui/5 ml) all'interno delle due bocce successivamente usate per la prova *in vitro*.



Figura 4.28: Sacca di plasma (a sinistra) e di emazie concentrate (a destra) utilizzate per la prova sperimentale.

All'interno del primo reservoir si sono posti 300 ml di plasma, 300 ml di emazie concentrate, 300 ml di LZD (600 mg/300 ml) e la pastiglia magnetica (Figura 4.29). Si è effettuato un prelievo per valutare l'ematokrito della soluzione così costituita che è sceso a 0.18 g/L e si è posta la boccia sopra il termoaggitatore per raggiungere la temperatura di 37°C e poter iniziare la prova sperimentale.



Figura 4.29: 300 ml di plasma e 300 ml di emazie concentrate.

Il mini-modulo è stato preparato eseguendo la stessa procedura presentata per l'esperimento precedente, così come il circuito. Raggiunta la temperatura corretta si è eseguito il primo prelievo di 1 ml della soluzione (T₀), si è proceduto con lo svuotamento del circuito dalla soluzione fisiologica (pompa a 150 ml/min per 35 secondi) e si è effettuato il Single-Pass, come precedentemente descritto (Figura 4.30).



Figura 4.30: Esecuzione del Single-Pass. Tutta la soluzione viene fatta passare una volta attraverso il mini-modulo.

Finito il Single-Pass, si sono poste sia la linea di inflow che di outflow all'interno della boccia appena riempita e si è iniziata la circolazione, impostando la pompa con un flow-rate di 250 ml/min per 300 minuti di durata del trattamento di emoperfusione *in vitro* (Figura 4.31).

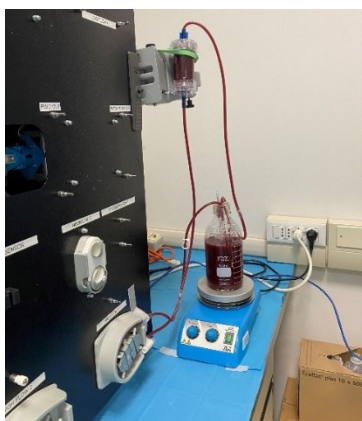


Figura 4.31: Prova sperimentale con sangue in circolo.

Per analizzare l'andamento della concentrazione di antibiotico LZD all'interno del reservoir, si sono eseguiti i prelievi come precedentemente spiegato con le stesse tempistiche fino alle due ore. Successivamente si è effettuato un prelievo ogni ora fino al raggiungimento delle cinque ore totali di esperimento (Figura 4.32).



Figura 4.32: Preparazione per il prelievo di 1 ml di soluzione per l'analisi della concentrazione di antibiotico all'interno del reservoir.

4.2.4 Esperimento con il filtro oXiris

Il test è stato ripetuto utilizzando il filtro oXiris al posto della cartuccia Jafron HA380 per analizzare la possibile interazione tra la membrana semipermeabile del filtro e l'antibiotico LZD (Figura 4.33). oXiris è un emofiltro con membrana dializzante modificata ricoperta con eparina per la terapia di depurazione extracorporea continua, con possibile impiego durante il trattamento della sepsi in quanto in grado di rimuovere per adsorbimento citochine ed endotossine dal torrente circolatorio.

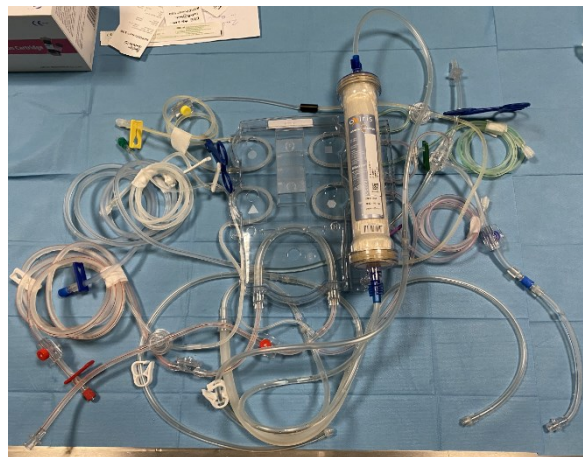


Figura 4.33: Kit del filtro oXiris: linea rossa per il prelievo del sangue dal paziente, linea gialla per effluente, linea viola per il liquido di sostituzione, linea verde per il dialisato, linea blu per la restituzione del sangue al paziente.

Procedimento del test:

1. si è caricato il kit del filtro oXiris alla macchina Prisma ed è stato eseguito il priming del circuito tramite la procedura automatica della macchina;
2. successivamente, il kit è stato rimosso dalla macchina e si è clampata la linea del dialisato e la linea dell'effluente. Ciò ci ha permesso di isolare il compartimento

sangue dal compartimento dialisato ed effluente del filtro per simulare solamente un semplice trattamento di emoperfusione *in vitro*. Si vogliono osservare esclusivamente le interazioni tra il materiale della membrana e il farmaco;

3. il filtro oXiris è stato scollegato dalle linee di inflow e outflow del kit e collegato al circuito assemblato per la piattaforma Galileo, utilizzata per l'esecuzione dell'esperimento;
4. si è preparata la soluzione da utilizzare versando una sacca precostituita di LZD (600 mg/300 ml) all'interno di una boccia, posta poi a riscaldare sul termoaggitatore per mantenerla a 37°C;
5. la linea di inflow e outflow, dopo essere state svuotate dalla soluzione fisiologica del priming, sono state poste all'interno della boccia contenente la soluzione antibiotica;
6. la pompa è stata avviata con una portata di 120 ml/min e la durata della prova è di due ore (Figura 4.34);
7. con la stessa procedura dei precedenti esperimenti si sono eseguiti i prelievi dei campioni da 1 ml a T0, T5, T10, T20, T30, T60, T90, T120. Al termine dell'esperimento è stato eseguito un ulteriore prelievo: dalla linea dell'effluente è stato prelevato un volume pari a 10 ml di soluzione allo scopo di valutare l'eventuale presenza di LZD diffuso nel compartimento dell'effluente (TEffluente).



Figura 4.34: Set-up sperimentale della prova con il filtro oXiris. Si osserva come la linea di inflow e outflow del filtro sono state poste all'interno del reservoir, mentre lo spezzone pompa all'interno dell'alloggiamento della piattaforma.

4.3 Quantificazione delle concentrazioni di Linezolid nei campioni

I campioni prelevati dal reservoir, di 1 ml circa, sono stati stoccati in provette Litio-Eparina con tappo verde. La concentrazione di LZD presente nel campione viene misurata con la piattaforma ILab 650 (WERFEN, Milano, Italia) mediante saggio immunoturbimetrico con il

kit ARK Linezolid Assay (ARK Diagnostics, USA) (Figura 4.35). ARK Linezolid Assay è un immunodosaggio enzimatico omogeneo previsto per la determinazione quantitativa di LZD in campioni di siero umano con analizzatori di chimica clinica automatizzati. È richiesta la procedura di calibrazione e di controllo qualità prima dell'inizio della quantificazione. I campioni con un quantitativo di LZD elevato, prima di poter essere analizzati, sono stati diluiti, con un rapporto 1:100, per rimanere nel range di lavoro previsto dallo strumento. Il principio della tecnica consiste nella concorrenza per il legame con il reagente anticorpale tra il farmaco presente nel campione e il LZD marcato con l'enzima ricombinante glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PDH). Quando il LZD marcato si lega al reagente anticorpale, l'attività enzimatica diminuisce. In presenza di farmaco nel campione, l'attività enzimatica aumenta ed è direttamente correlata alla concentrazione del farmaco.



Figura 4.34: Piattaforma ILab 650 utilizzata per analizzare la concentrazione di antibiotico nei campioni.

4.4 Analisi dei risultati

Si è calcolato, per ogni intervallo temporale considerato, il tasso di rimozione di LZD (Removal Ratio, RR). Il Removal Ratio rappresenta la quantità in percentuale del farmaco antibiotico adsorbito dalla cartuccia in un determinato intervallo di tempo. Lo si calcola come segue:

$$RR = \frac{C(t_0) - C(t_i)}{C(t_0)} \times 100 \text{ [%]}$$

dove $C(t_0)$ rappresenta la concentrazione di LZD all'inizio della prova all'interno del reservoir e $C(t_i)$ la concentrazione all'istante temporale t_i .

Successivamente si è calcolata la quantità di massa di antibiotico rimanente all'interno del reservoir nei vari intervalli di tempo considerati, utilizzando la seguente formula:

$$M_r(t_i) = C(t_i) \times V(t_i) \text{ [mg]}$$

ove con $V(t_i)$ si indica il volume della soluzione effettivo all'interno del reservoir, tenendo conto dei prelievi effettuati precedentemente.

Allo scopo di caratterizzare il processo di adsorbimento effettuato dal materiale sorbente, si è calcolata la massa effettivamente adsorbita dalle beads. La massa di LZD adsorbito dalle beads all'istante t non è direttamente misurabile, ma è possibile determinarla considerando la concentrazione di farmaco nel reservoir. La massa adsorbita puntuale si riferisce al quantitativo di antibiotico adsorbito dalla cartuccia nell'intervallo di tempo considerato e si calcola come segue:

$$M_{ap}(t_i) = M_r(t_i) - M_r(t_{i-1}) \quad [mg]$$

dove con $M_r(t_i)$ e $M_r(t_{i-1})$ si indica la massa residua all'interno del reservoir nell'istante temporale t_i e t_{i-1} , precedentemente calcolate.

La massa adsorbita cumulativa è la quantità di LZD adsorbita complessiva dalle beads dall'inizio della prova sperimentale fino al momento analizzato, ottenuta come:

$$M_{ac}(t_i) = \frac{RR(t_i) \times M_r(t_0)}{100} \quad [mg]$$

dove $RR(t_i)$ rappresenta il tasso di rimozione di LZD all'istante t_i e $M_r(t_0)$ è la massa iniziale di LZD.

4.4.1 Isotherme di adsorbimento

Un'isoterma di adsorbimento è una curva che permette la descrizione della mobilità di una sostanza in un mezzo acquoso o in fase solida a temperatura costante e/o pH costante. La condizione di equilibrio di adsorbimento (rapporto tra la quantità adsorbita e la quantità rimanente nella soluzione) si raggiunge quando, per un tempo sufficiente, la concentrazione di sostanza nella soluzione è in equilibrio dinamico con la sua concentrazione all'interfaccia.

L'isoterma di Langmuir, originariamente utilizzata per descrivere l'adsorbimento di gas in fase solida sul carbone attivo, permette di caratterizzare l'adsorbimento anche di diversi biosorbenti. Nella sua formulazione il modello presuppone la presenza di un monostato adsorbente. In esso l'adsorbimento può verificarsi solamente in un numero fisso di siti localizzati, identici tra di loro. L'adsorbimento avviene senza interazione laterale e senza ingombro sterico tra le molecole adsorbite.

L'espressione matematica del modello isotermico di Langmuir è la seguente:

$$q_e = \frac{Q_0 \times b \times C_e}{1 + b \times C_e}$$

dove Q_0 è la capacità massima costante del monostrato (mg/g), b è la costante di Langmuir (dm^3/mg), C_e è la concentrazione all'equilibrio della sostanza (mg/L) e q_e è la quantità di adsorbato nel substrato all'equilibrio (mg/g) [18].

Graficamente, la curva è caratterizzata da un plateau che rappresenta la condizione di equilibrio: ogni molecola occupa un sito di legame e non può avvenire ulteriore adsorbimento sul substrato (Figura 4.35).

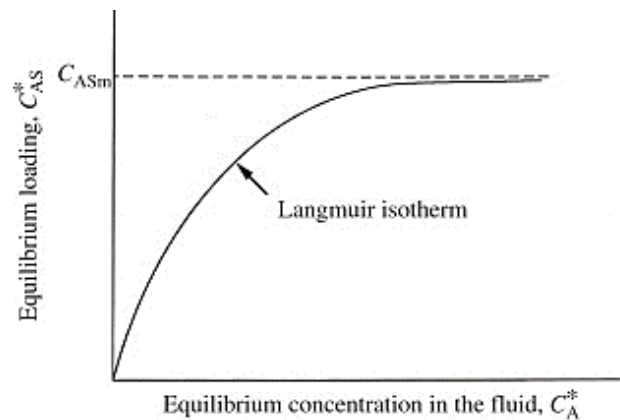


Figura 4.35: Esempio di isoterma di adsorbimento di Langmuir.

Riferendosi all'adsorbimento di LZD su un letto di beads intrappolate in una cartuccia, l'equazione di Langmuir precedentemente descritta può essere modificata come segue:

$$\eta_{eq} = \frac{Q_0 \times b \times m_0}{1 + b \times m_0}$$

dove Q_0 e b sono sempre delle costanti, m_0 rappresenta la massa iniziale di LZD nel reservoir (mg), η_{eq} è il carico all'equilibrio di LZD adsorbito sul letto di beads ($\frac{\text{mg}}{\text{g}}$).

Utilizzando tale formulazione, si è calcolata l'isoterma per la serie di esperimenti con la soluzione in circolazione.

Capitolo 5: risultati e discussione

In questo capitolo si descrivono e si discutono i risultati delle prove sperimentali condotte al fine di valutare le interazioni esistenti tra le beads della cartuccia Jafron HA 380 ed il farmaco Linezolid.

5.1 Risultati

Di seguito sono riportate le tabelle riassuntive dei dati della concentrazione di LZD dei campioni prelevati durante le varie prove *in vitro*, per i diversi time-point (Tabelle 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7). Per ciascun valore si sono calcolati il Removal Ratio, la massa residua all'interno del reservoir, la massa adsorbita puntuale e la massa adsorbita cumulativa come precedentemente presentato.

| | Conc ($\mu\text{g/ml}$) | RR (%) | Massa nel reservoir (mg) | Massa adsorbita puntuale (mg) | Massa adsorbita cumulativa (mg) |
|-----------------|---------------------------|--------|--------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| LNZ T0 | 2013,00 | | 603,90 | | |
| LNZ T5 | 87,80 | 95,64 | 26,25 | 577,65 | 577,56 |
| LNZ T10 | 37,00 | 98,16 | 11,03 | 15,23 | 592,80 |
| LNZ T15 | 17,60 | 99,13 | 5,23 | 5,80 | 598,62 |
| LNZ T20 | 10,86 | 99,46 | 3,21 | 2,01 | 600,64 |
| LNZ T30 | 6,77 | 99,66 | 2,00 | 1,22 | 601,87 |
| LNZ T40 | 5,27 | 99,74 | 1,55 | 0,45 | 602,32 |
| LNZ T50 | 4,18 | 99,79 | 1,22 | 0,32 | 602,65 |
| LNZ T60 | 3,08 | 99,85 | 0,90 | 0,33 | 602,98 |
| LNZ T70 | 2,53 | 99,87 | 0,74 | 0,16 | 603,14 |
| LNZ T80 | 2,28 | 99,89 | 0,66 | 0,08 | 603,22 |
| LNZ T90 | 1,98 | 99,90 | 0,57 | 0,09 | 603,31 |
| LNZ T100 | 1,45 | 99,93 | 0,42 | 0,15 | 603,47 |
| LNZ T110 | 1,36 | 99,93 | 0,39 | 0,03 | 603,49 |
| LNZ T120 | 1,28 | 99,94 | 0,37 | 0,02 | 603,52 |
| TOTALE | | | | 603,53 | 603,52 |

Tabella 5.1: Dati ottenuti durante l'esperimento senza circolazione di soluzione a 600 mg/300 ml.

| | Conc (µg/ml) | RR (%) | Massa nel reservoir (mg) | Massa adsorbita puntuale (mg) | Massa adsorbita cumulativa (mg) |
|-----------------|--------------|--------|--------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| LNZ T0 | 537,00 | | 161,10 | | |
| SP | 94,00 | 82,50 | 28,11 | 132,99 | 132,90 |
| LNZ T5 | 3,82 | 99,29 | 1,14 | 26,97 | 159,95 |
| LNZ T10 | 1,10 | 99,80 | 0,33 | 0,81 | 160,77 |
| LNZ T15 | 0,83 | 99,85 | 0,25 | 0,08 | 160,85 |
| LNZ T20 | 0,75 | 99,86 | 0,22 | 0,02 | 160,88 |
| LNZ T30 | 0,63 | 99,88 | 0,19 | 0,04 | 160,91 |
| LNZ T40 | 0,53 | 99,90 | 0,16 | 0,03 | 160,94 |
| LNZ T50 | 0,58 | 99,89 | 0,17 | -0,01 | 160,93 |
| LNZ T60 | 0,57 | 99,89 | 0,17 | 0,00 | 160,93 |
| LNZ T70 | 0,55 | 99,90 | 0,16 | 0,01 | 160,94 |
| LNZ T80 | 0,66 | 99,88 | 0,19 | -0,03 | 160,90 |
| LNZ T90 | 0,59 | 99,89 | 0,17 | 0,02 | 160,92 |
| LNZ T100 | 0,53 | 99,90 | 0,15 | 0,02 | 160,94 |
| LNZ T110 | 0,51 | 99,91 | 0,15 | 0,01 | 160,95 |
| LNZ T120 | 0,46 | 99,91 | 0,13 | 0,01 | 160,96 |
| BOCCIA | 0,43 | 99,92 | 0,12 | 0,01 | 160,97 |
| TOTALE | | | | 160,98 | 160,97 |

Tabella 5.2: Dati ottenuti durante l'esperimento in circolazione con la soluzione a 200 mg/300 ml.

| | Conc (µg/ml) | RR (%) | Massa nel reservoir (mg) | Massa adsorbita puntuale (mg) | Massa adsorbita cumulativa (mg) |
|-----------------|--------------|--------|--------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| LNZ T0 | 1126,00 | | 337,80 | | |
| SP | 410,00 | 63,59 | 122,59 | 215,21 | 214,80 |
| LNZ T5 | 48,37 | 95,70 | 14,41 | 108,18 | 323,29 |
| LNZ T10 | 8,63 | 99,23 | 2,56 | 11,85 | 335,21 |
| LNZ T15 | 5,08 | 99,55 | 1,50 | 1,06 | 336,28 |
| LNZ T20 | 3,71 | 99,67 | 1,09 | 0,41 | 336,69 |
| LNZ T30 | 2,41 | 99,79 | 0,71 | 0,39 | 337,08 |
| LNZ T40 | 1,87 | 99,83 | 0,55 | 0,16 | 337,24 |
| LNZ T50 | 1,65 | 99,85 | 0,48 | 0,07 | 337,31 |
| LNZ T60 | 1,39 | 99,88 | 0,40 | 0,08 | 337,38 |
| LNZ T70 | 1,28 | 99,89 | 0,37 | 0,03 | 337,42 |
| LNZ T80 | 1,32 | 99,88 | 0,38 | -0,01 | 337,40 |
| LNZ T90 | 1,06 | 99,91 | 0,31 | 0,08 | 337,48 |
| LNZ T100 | 0,95 | 99,92 | 0,27 | 0,03 | 337,52 |
| LNZ T110 | 0,89 | 99,92 | 0,25 | 0,02 | 337,53 |
| LNZ T120 | 0,85 | 99,92 | 0,24 | 0,01 | 337,55 |
| BOCCIA | 0,77 | 99,93 | 0,22 | 0,02 | 337,57 |
| TOTALE | | | | 337,58 | 337,57 |

Tabella 5.3: Dati ottenuti dall'esperimento in circolazione con soluzione a 400 mg/300 ml.

| | Conc (µg/ml) | RR (%) | Massa nel reservoir (mg) | Massa adsorbita puntuale (mg) | Massa adsorbita cumulativa (mg) |
|-----------------|--------------|--------|--------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| LNZ T0 | 2128,50 | | 638,55 | | |
| SP | 246,50 | 88,42 | 73,70 | 564,85 | 564,60 |
| LNZ T5 | 29,43 | 98,62 | 8,77 | 64,93 | 629,72 |
| LNZ T10 | 10,46 | 99,51 | 3,11 | 5,66 | 635,41 |
| LNZ T15 | 6,62 | 99,69 | 1,96 | 1,15 | 636,57 |
| LNZ T20 | 5,25 | 99,75 | 1,55 | 0,41 | 636,98 |
| LNZ T30 | 3,90 | 99,82 | 1,15 | 0,40 | 637,38 |
| LNZ T40 | 2,89 | 99,86 | 0,85 | 0,30 | 637,68 |
| LNZ T50 | 2,68 | 99,87 | 0,78 | 0,06 | 637,75 |
| LNZ T60 | 2,12 | 99,90 | 0,62 | 0,17 | 637,91 |
| LNZ T70 | 1,82 | 99,91 | 0,53 | 0,09 | 638,01 |
| LNZ T80 | 1,50 | 99,93 | 0,43 | 0,09 | 638,10 |
| LNZ T90 | 1,33 | 99,94 | 0,38 | 0,05 | 638,15 |
| LNZ T100 | 1,24 | 99,94 | 0,36 | 0,03 | 638,18 |
| LNZ T110 | 1,29 | 99,94 | 0,37 | -0,01 | 638,16 |
| LNZ T120 | 1,14 | 99,95 | 0,32 | 0,04 | 638,21 |
| BOCCIA | 1,22 | 99,94 | 0,35 | -0,02 | 638,18 |
| TOTALE | | | | 638,20 | 638,18 |

Tabella 5.4: Dati calcolati come media dei valori rilevati nei due esperimenti in circolazione con la soluzione a 600 mg/ 300 ml.

| | Conc (µg/ml) | RR (%) | Massa nel reservoir (mg) | Massa adsorbita puntuale (mg) | Massa adsorbita cumulativa (mg) |
|-----------------|--------------|--------|--------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| LNZ T0 | 1838,00 | | 1102,80 | | |
| SP | 493,00 | 73,18 | 295,31 | 807,49 | 807,00 |
| LNZ T5 | 129,41 | 92,96 | 77,39 | 217,92 | 1025,15 |
| LNZ T10 | 101,44 | 94,48 | 60,56 | 16,83 | 1041,94 |
| LNZ T15 | 59,17 | 96,78 | 35,27 | 25,29 | 1067,30 |
| LNZ T20 | 45,16 | 97,54 | 26,87 | 8,40 | 1075,70 |
| LNZ T30 | 22,48 | 98,78 | 13,35 | 13,52 | 1089,31 |
| LNZ T40 | 13,45 | 99,27 | 7,98 | 5,38 | 1094,73 |
| LNZ T50 | 11,50 | 99,37 | 6,81 | 1,17 | 1095,90 |
| LNZ T60 | 9,18 | 99,50 | 5,43 | 1,38 | 1097,29 |
| LNZ T70 | 7,29 | 99,60 | 4,30 | 1,12 | 1098,43 |
| LNZ T80 | 6,40 | 99,65 | 3,77 | 0,53 | 1098,96 |
| LNZ T90 | 6,13 | 99,67 | 3,60 | 0,17 | 1099,12 |
| LNZ T100 | 6,16 | 99,66 | 3,62 | -0,01 | 1099,10 |
| LNZ T110 | 5,55 | 99,70 | 3,25 | 0,36 | 1099,47 |
| LNZ T120 | 4,62 | 99,75 | 2,70 | 0,55 | 1100,03 |
| LNZ T150 | 3,69 | 99,80 | 2,15 | 0,55 | 1100,59 |
| LNZ T180 | 2,93 | 99,84 | 1,71 | 0,45 | 1101,04 |
| LNZ T210 | 2,19 | 99,88 | 1,27 | 0,43 | 1101,49 |
| LNZ T240 | 2,49 | 99,86 | 1,45 | -0,17 | 1101,31 |
| BOCCIA | 1,98 | 99,89 | 1,15 | 0,30 | 1101,61 |
| TOTALE | | | | 1101,65 | 1101,61 |

Tabella 5.5: Dati ottenuti nell'esperimento in circolazione con soluzione a 1200 mg/600 ml.

| | Conc µg/ml | RR (%) | Massa nel reservoir (mg) | Massa adsorbita puntuale (mg) | Massa adsorbita cumulativa (mg) |
|-----------------|------------|--------|--------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| LNZ T0 | 749,00 | | 674,10 | | |
| SP | 113,50 | 84,85 | 102,04 | 572,06 | 571,95 |
| LNZ T5 | 78,04 | 89,58 | 70,08 | 31,96 | 603,86 |
| LNZ T10 | 60,90 | 91,87 | 54,63 | 15,45 | 619,29 |
| LNZ T15 | 36,81 | 95,09 | 32,98 | 21,65 | 640,97 |
| LNZ T20 | 22,00 | 97,06 | 19,69 | 13,29 | 654,30 |
| LNZ T30 | 11,98 | 98,40 | 10,71 | 8,98 | 663,32 |
| LNZ T40 | 8,27 | 98,90 | 7,39 | 3,33 | 666,66 |
| LNZ T50 | 7,05 | 99,06 | 6,29 | 1,10 | 667,76 |
| LNZ T60 | 5,55 | 99,26 | 4,95 | 1,34 | 669,11 |
| LNZ T70 | 5,23 | 99,30 | 4,65 | 0,29 | 669,39 |
| LNZ T80 | 4,75 | 99,37 | 4,22 | 0,43 | 669,83 |
| LNZ T90 | 4,23 | 99,44 | 3,76 | 0,47 | 670,29 |
| LNZ T100 | 3,98 | 99,47 | 3,53 | 0,23 | 670,52 |
| LNZ T110 | 3,61 | 99,52 | 3,20 | 0,33 | 670,85 |
| LNZ T120 | 3,64 | 99,51 | 3,22 | -0,02 | 670,82 |
| LNZ T180 | 3,19 | 99,57 | 2,82 | 0,40 | 671,23 |
| LNZ T240 | 2,33 | 99,69 | 2,06 | 0,76 | 672,00 |
| LNZ T300 | 2,37 | 99,68 | 2,09 | -0,03 | 671,97 |
| TOTALE | | | | 672,01 | 671,97 |

Tabella 5.6: Dati ottenuti durante esperimento con l'impiego di sangue.

| | Conc (µg/ml) | RR (%) | Massa nel reservoir (mg) | Massa adsorbita puntuale (mg) | Massa adsorbita cumulativa (mg) |
|------------------|--------------|--------|--------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| LNZ T0 | 924,00 | | 554,40 | | |
| LNZ T5 | 590,00 | 36,15 | 352,82 | 201,58 | 200,40 |
| LNZ T10 | 576,00 | 37,66 | 343,87 | 8,95 | 208,80 |
| LNZ T15 | 578,00 | 37,45 | 344,49 | -0,62 | 207,60 |
| LNZ T20 | 574,00 | 37,88 | 341,53 | 2,96 | 210,00 |
| LNZ T30 | 577,00 | 37,55 | 342,74 | -1,21 | 208,20 |
| LNZ T60 | 604,00 | 34,63 | 356,96 | -14,23 | 192,00 |
| LNZ T90 | 532,00 | 42,42 | 312,82 | 44,15 | 235,20 |
| LNZ T120 | 640,00 | 30,74 | 374,40 | -61,58 | 170,40 |
| EFFLUENTE | 400,00 | 56,71 | 232,40 | 142,00 | 314,40 |
| BOCCIA | 429,00 | 53,57 | 248,82 | -16,42 | 297,00 |
| TOTALE | | | | 305,58 | 297,00 |

Tabella 5.7: Dati relativi all'esperimento con il filtro oXiris.

5.2 Andamento della concentrazione di Linezolid nel reservoir

La variazione di concentrazione di antibiotico LZD nel tempo nei diversi esperimenti fornisce un'indicazione sulla presenza di un'interazione tra le beads e il farmaco.

Si può osservare dai diversi grafici che in tutte le diverse condizioni sperimentali il materiale sorbente presente all'interno della cartuccia Jafron HA380 è in grado di adsorbire il LZD. Infatti, la concentrazione di antibiotico nelle varie prove sperimentali subisce un decadimento esponenziale. Invece, nel test in cui si è impiegato il filtro oXiris, la concentrazione non ha dimostrato un forte decremento, rivelando un'interazione completamente diversa tra l'antibiotico e il materiale costituente la membrana semipermeabile del filtro.

La Figura 5.1 è rappresentativa del risultato dell'esperimento senza circolazione della soluzione, in cui le beads di Jafron HA380 sono state poste all'interno del reservoir a contatto con la soluzione di LZD 600mg/300ml. Il grafico dimostra come la riduzione della concentrazione del farmaco segua l'andamento di una curva esponenziale negativa. Il maggior decremento si verifica già nei primi cinque minuti della prova.

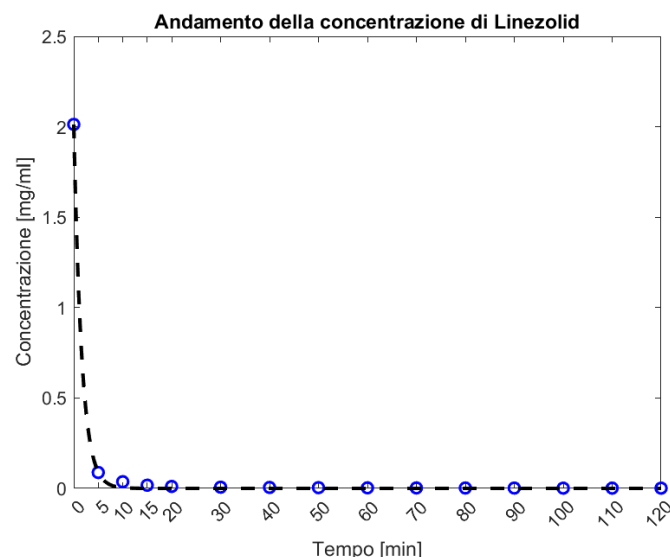


Figura 5.1: Andamento della concentrazione di Linezolid osservato durante l'esperimento senza circolazione di soluzione (pallini blu). I dati seguono l'andamento della curva esponenziale decrescente $2,013e^{-0,6195 \times t}$ (linea nera tratteggiata).

La Figura 5.2 mostra l'andamento temporale della concentrazione del LZD durante gli esperimenti in cui la soluzione è stata fatta circolare attraverso il circuito e il mini-modulo ed è stata posta in circolazione. Si può osservare come il valore iniziale di concentrazione sia diverso nei test e che la concentrazione si riduca fortemente già durante il Single-Pass e i primi cinque minuti della prova. Si può osservare che nell'esperimento con il maggior quantitativo di LZD, il Single-Pass riduce considerevolmente la concentrazione ma è

necessario un tempo maggiore per ottenere la quasi completa riduzione della concentrazione, dato il quantitativo maggiore di farmaco.

La condizione di equilibrio (steady-state) nel processo di adsorbimento operato dalle beads non si raggiunge con le attuali condizioni sperimentali in quanto la curva raggiunge il plateau in corrispondenza di una quantità residua di LZD irrisoria (concentrazione ≈ 0.001 mg/ml). Con ciò non si può affermare che il materiale adsorbente abbia raggiunto la capacità massima di antibiotico che è in grado di adsorbire.

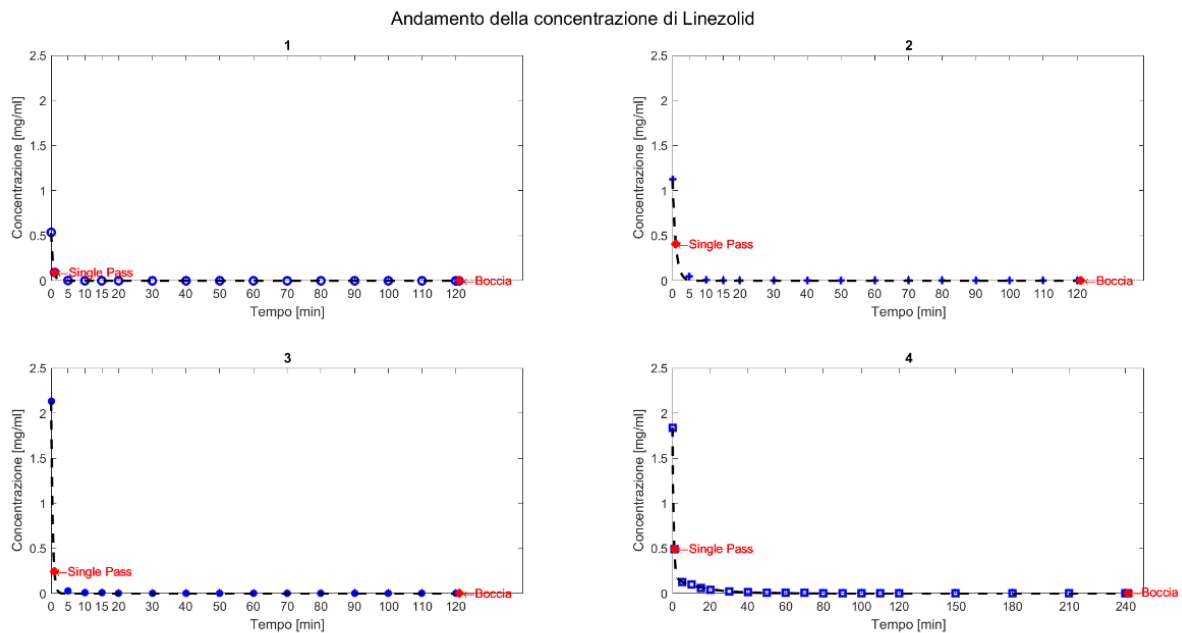


Figura 5.2: Confronto dell'andamento della concentrazione nei diversi esperimenti. 1) Linezolid 200 mg/300 ml, fit con $0,537e^{(-1,743 \times t)}$, 2) Linezolid 400 mg/300 ml, fit con $1,125e^{(-t)}$, 3) Linezolid 600 mg/300 ml, fit con $2,128e^{(-2,156 \times t)}$, 4) Linezolid 1200 mg/600 ml, fit con $1,656e^{(-1,635 \times t)} + 0,1819e^{(-0,06682 \times t)}$. I puntini blu rappresentano i dati sperimentali e la linea nera tratteggiata la curva esponenziale decrescente che fitta al meglio i dati.

Il grafico in Figura 5.3 rappresenta l'andamento temporale della concentrazione di LZD in soluzione con emazie emoconcentrate e plasma: la curva segue un decadimento esponenziale, come discusso pocanzi.

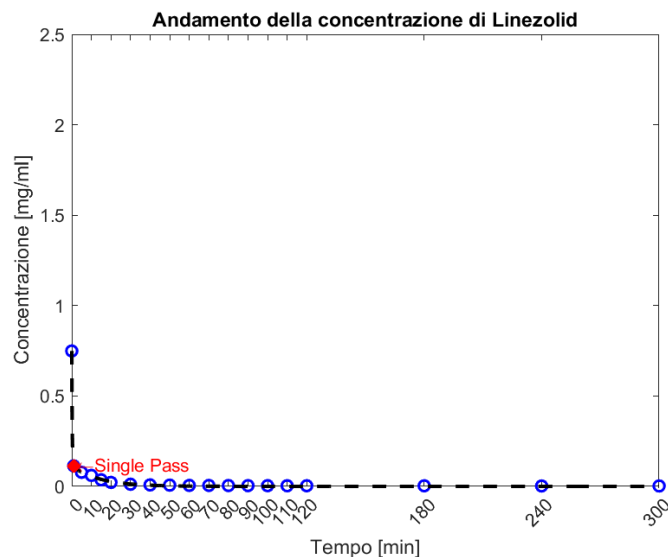


Figura 5.3: Andamento della concentrazione di Linezolid 600 mg/300 ml durante la prova con l'impiego di sangue. I puntini blu rappresentano i valori della concentrazione ottenuti durante l'esperienza, la linea nera tratteggiata è la curva esponenziale $0,6355e^{-4,394 \times t} + 0,1135e^{-0,07158 \times t}$ che fitta correttamente i dati.

L'andamento temporale della soluzione di LZD 600 mg/300 ml in un circuito con il filtro oXiris (Figura 5.4) è molto diverso da quello rilevato nelle prove sperimentali con il mini-modulo. La riduzione complessiva del farmaco ottenuta ad opera della membrana del filtro è molto contenuta. Si assiste ad un rapido decremento nei primi cinque minuti ma di entità minore, rispetto ai precedenti. Successivamente si osserva come la concentrazione si assesti a 0.4 mg/ml.

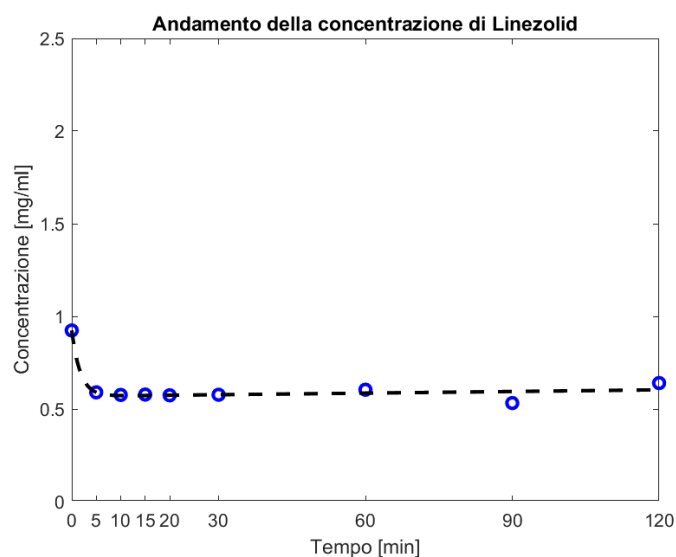


Figura 5.4: Andamento della concentrazione di Linezolid ottenuta nell'esperienza con il filtro oXiris. I pallini blu sono i valori rilevati, la linea nera è la curva esponenziale $(0,3554e^{-0,5709 \times t} + 0,5686e^{0,000496 \times t})$.

5.3 Tasso di rimozione e massa adsorbita

Si indaga di seguito il tasso di rimozione di LZD e la conseguente variazione di massa adsorbita dalla cartuccia nei vari esperimenti. È conveniente parlare in termini di massa in quanto con il LZD non è stato sempre possibile variare la concentrazione della soluzione.

Come si può osservare dalle figure (Figure 5.5, 5.6, 5.7) relative ai vari esperimenti con l'utilizzo del mini-modulo, il Removal Ratio presenta un andamento temporale sovrapponibile nelle diverse prove, nonostante le molteplici condizioni sperimentali. Si può notare come l'aumento del quantitativo di massa dell'antibiotico all'interno del reservoir, così come la presenza di sangue, non comporti una grossa variazione nel tempo necessario per ottenere la rimozione quasi completa del farmaco. Al termine di ciascun esperimento si raggiunge un tasso di rimozione dell'antibiotico molto vicino al 100%.

In Figura 5.5, si può vedere come già nei primi cinque minuti il tasso di rimozione sia molto elevato, con le beads che arrivano ad adsorbire ben il 95% del farmaco anche senza la circolazione della soluzione.

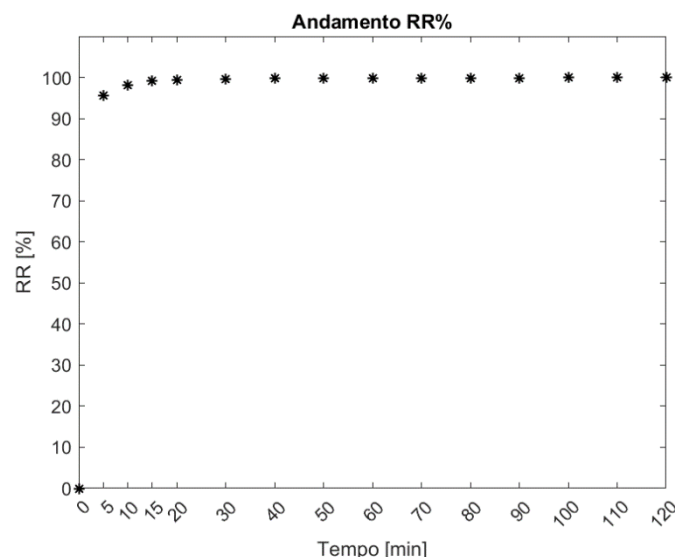


Figura 5.5: Andamento del tasso di rimozione osservato ponendo le beads direttamente a contatto con la soluzione di Linezolid 600 mg/300 ml all'interno della boccia.

Nell'asse delle ascisse di Figura 5.6 si riporta il numero di cicli che la soluzione antibiotica effettua attraverso la cartuccia, anziché il tempo. Così facendo si uniformano i risultati, in quanto gli esperimenti hanno durata diversa. Con il Single-Pass il materiale adsorbente riesce a rimuovere una buona parte dell'antibiotico, raggiungendo tassi superiori all'80%. Infatti, si può osservare che dopo soli cinque passaggi attraverso il mini-modulo il Removal Ratio sia sempre superiore al 90%.

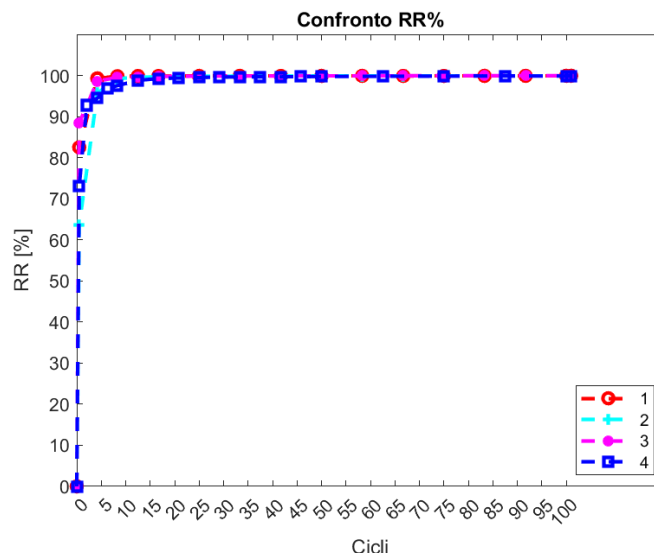


Figura 5.6: Andamento del Removal Ratio nei diversi esperimenti con la soluzione in circolazione. Sull'asse delle ascisse si riporta il numero di passaggi che la soluzione compie attraverso il mini-modulo. La linea rossa si riferisce all'esperimento con la soluzione di Linezolid 200 mg/300 ml, la linea azzurra a quello con 400 mg/300 ml, la linea rosa a 600 mg/300 ml e quella blu all'esperimento con Linezolid 1200 mg/600 ml

In Figura 5.7 si vede come, anche nell'esperimento con il sangue, il Removal Ratio raggiunga valori oltre il 90% già dopo i primi minuti dell'esperimento.

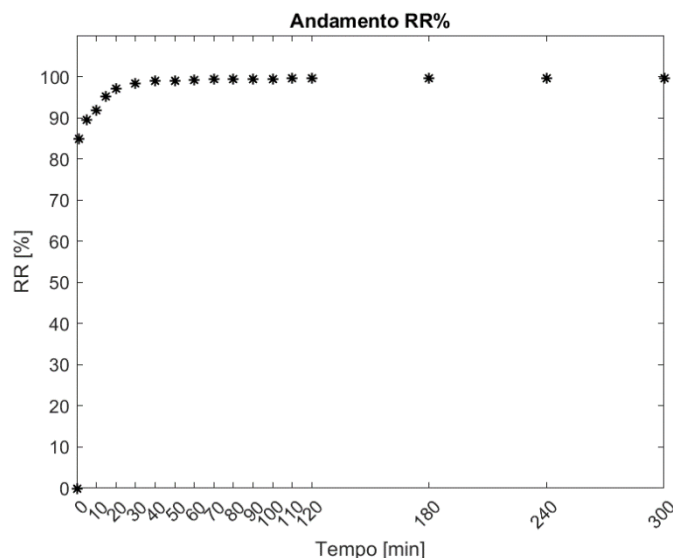


Figura 5.7: Raffigurazione della variazione del tasso di rimozione durante l'esperimento con il sangue.

I dati ottenuti dalla prova sperimentale con il filtro oXiris si discostano molto da quanto visto per la cartuccia. Il tasso di rimozione operato dal filtro è inferiore a quanto operato dalle beads. Solamente nei primi cinque minuti si assiste ad un adsorbimento di LZD sostanziale; infatti, il Removal Ratio si assesta intorno al 35% ma poi per tutta la durata dell'esperimento non si assiste ad una grande variazione del tasso (Figura 5.8).

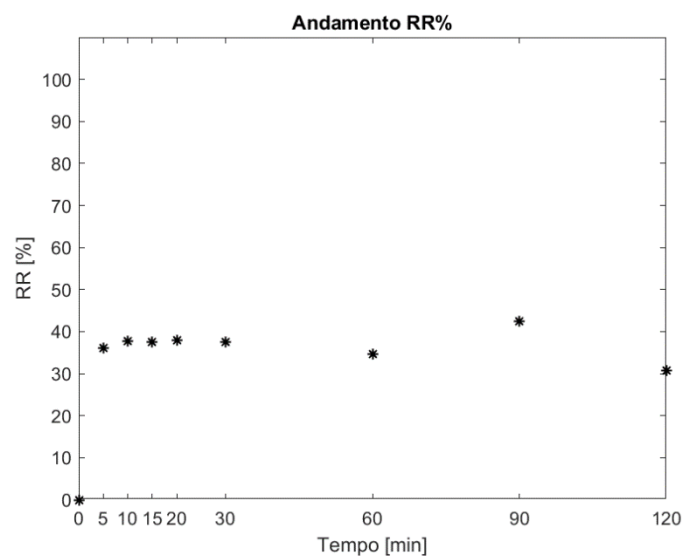


Figura 5.8: Andamento del Removal Ratio osservato durante l'esperimento con il filtro oXiris.

La variazione di massa di LZD adsorbito dalla cartuccia si può dedurre dai dati del Removal Ratio. Perciò quanto osservato per il tasso di rimozione è valido anche per l'andamento della massa adsorbita. Le curve sono ripide nella loro parte iniziale. Nonostante il diverso quantitativo di massa presente nel reservoir, le curve hanno un andamento assolutamente simile. In altre parole, anche per quantità maggiori di antibiotico il processo adsorbitivo è molto veloce, adsorbendo più del 90% di LZD iniziale nei primi minuti delle prove sperimentali.

La Figura 5.9 rappresenta il confronto fra le masse adsorbite del farmaco LZD nei diversi esperimenti in circolazione. Come visto in precedenza, dopo soli cinque passaggi attraverso la cartuccia in quasi tutti gli esperimenti le beads della cartuccia Jafron HA 380 adsorbono la maggior parte del LZD presente in soluzione.

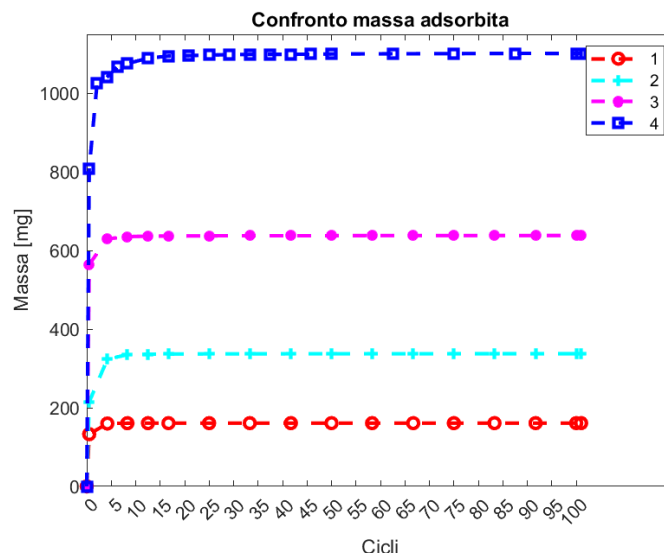


Figura 5.9: Confronto tra la quantità di massa adsorbita nei quattro esperimenti in circolazione in funzione dei cicli effettuati dalla soluzione attraverso la cartuccia. La linea rossa si riferisce all'esperimento con Linezolid 200 mg/300 ml, la linea azzurra a quello con 400 mg/300 ml, la linea rosa a 600 mg/300 ml e quella blu all'esperimento con Linezolid 1200 mg/600 ml.

5.3.1 Relazione tra massa adsorbita e massa nel reservoir

Si indaga la relazione esistente tra la massa di LZD rimanente all'interno del reservoir e la massa di antibiotico adsorbito dalle beads nel mini-modulo (Figure 5.10, 5.11, 5.12). La massa di LZD legatasi alle beads, e quindi adsorbita, aumenta repentinamente nei primi minuti della prova per poi esaurirsi lentamente all'interno del reservoir. Si può notare come la relazione tra la massa nel reservoir e la massa adsorbita rilevate nei diversi esperimenti presenti la stessa evoluzione.

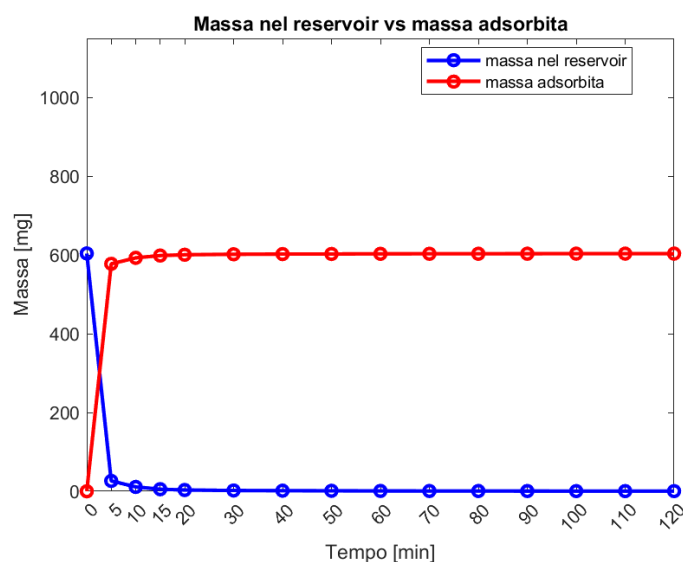


Figura 5.10: Relazione tra la quantità di massa residua nel reservoir (curva blu) e la massa adsorbita dalle beads (curva rossa) osservata durante l'esperimento senza circolazione della soluzione.

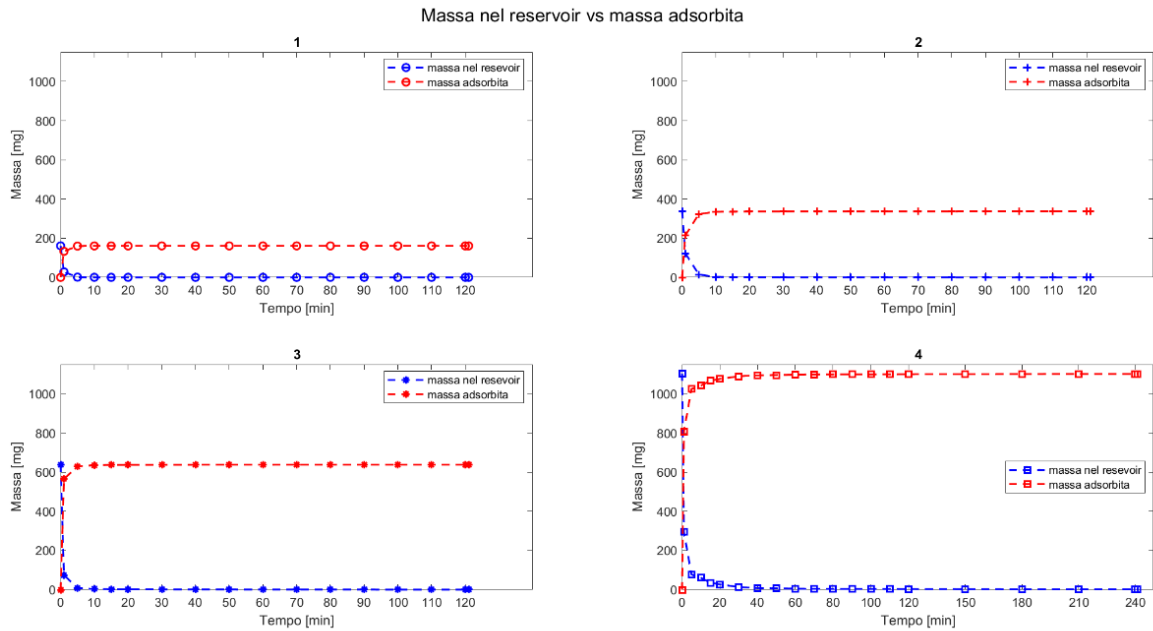


Figura 5.11: Confronto tra massa adsorbita (linea rossa) e residua (linea blu) nei quattro esperimenti in circolazione con le diverse concentrazioni. 1) Linezolid 200 mg/300 ml, 2) Linezolid 400 mg/300 ml, 3) Linezolid 600 mg/300 ml, 4) Linezolid 1200 mg/600 ml.

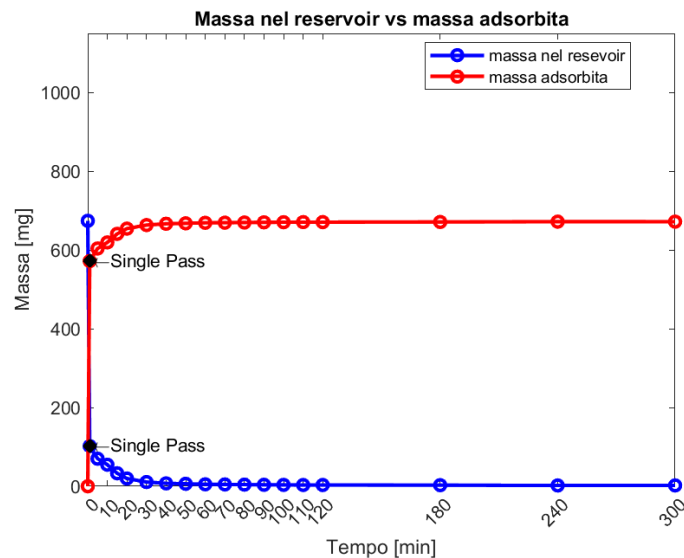


Figura 5.12: Andamento della massa rimanente all'interno del reservoir (linea blu) e la massa adsorbita dalle beads all'interno del mini-modulo (linea rossa) durante l'esperimento con il sangue.

La membrana semipermeabile del filtro oXiris determina una cinetica di adsorbimento molto diversa da quella che si osserva con le beads della cartuccia Jafron HA380. Come si osserva in Figura 5.13, la massa adsorbita dal materiale presenta un picco nei primi minuti per poi assestarsi al 30% del valore di massa iniziale contenuto nel reservoir. La percentuale di massa adsorbita dal filtro oXiris è di molto inferiore rispetto alla cartuccia Jafron HA380.

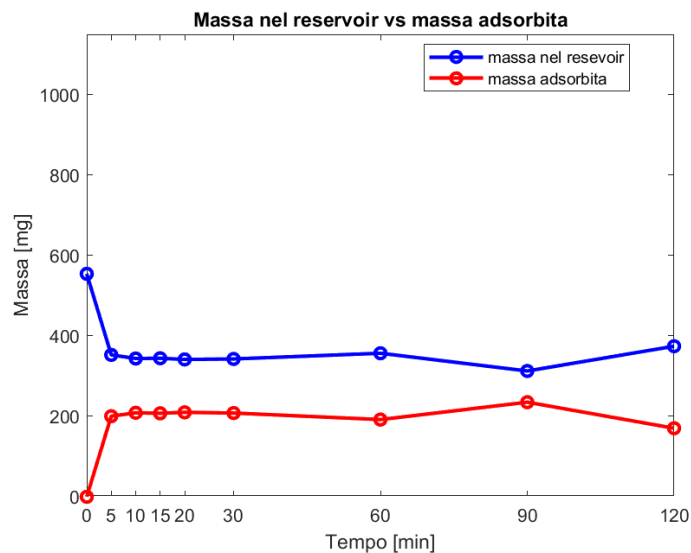


Figura 5.13: Andamento della massa residua nel reservoir (linea blu) e la massa adsorbita dalla membrana del filtro oXiris.

5.4 Velocità di adsorbimento

In Figura 5.14 viene riportata la velocità d'adsorbimento (mg/min) dei test a diversa concentrazione di LZD. Le curve ottenute presentano un andamento molto simile. In tutte le curve la velocità d'adsorbimento subisce un brusco calo nei primi cinque passaggi della soluzione antibiotica attraverso il mini-modulo. La pendenza del tratto è tanto maggiore quanto maggiore è la massa iniziale di LZD nella soluzione. Il processo adsorbitivo risulta essere molto efficiente anche per quantitativi più elevati di LZD.

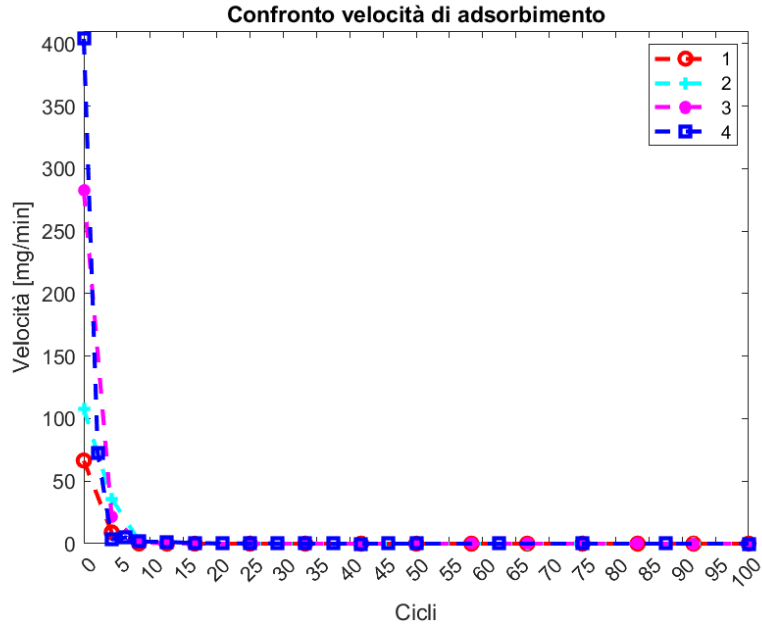


Figura 5.14: Confronto tra la velocità di adsorbimento dell'antibiotico Linezolid osservato durante gli esperimenti a diversa concentrazione in funzione dei cicli effettuati dalla soluzione attraverso la cartuccia. La linea rossa si riferisce all'esperimento con Linezolid 200 mg/300 ml, la linea azzurra a quello con 400 mg/300 ml, la linea rosa a 600 mg/300 ml e quella blu all'esperimento con Linezolid 1200 mg/600 ml. Nell'asse delle ascisse si riporta il numero di cicli effettuati dalla soluzione attraverso la cartuccia.

Dalla Figura 5.15 si può osservare l'andamento della velocità di adsorbimento, riscontrato durante l'esperimento con il filtro oXiris. La velocità assume valori di molto inferiori a quelli riscontrabili con le beads, a riprova di una minore efficienza del processo adsorbitivo ad opera della membrana. La velocità subisce un calo drastico durante i primi cinque minuti, per poi assestarsi attorno a valori molto vicini allo zero per il resto della durata dell'esperimento. Si deve tenere in considerazione che il valore massimo della velocità osservata è molto minore rispetto ai valori osservati nel caso precedente.

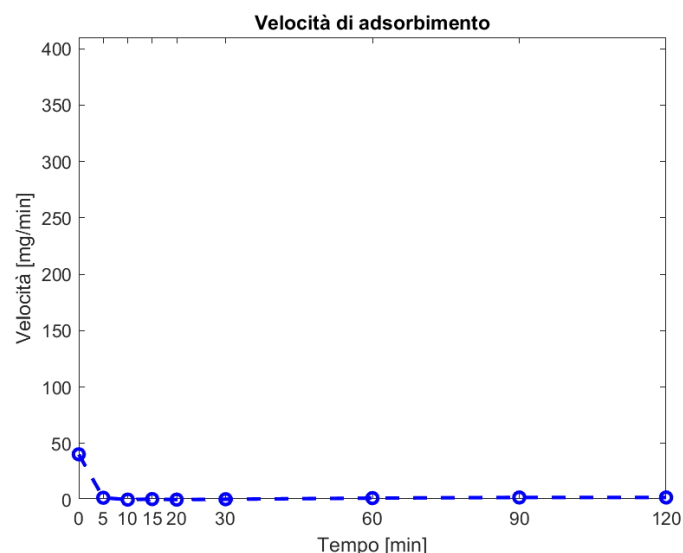


Figura 5.15: Andamento della velocità di adsorbimento del Linezolid osservato durante la prova sperimentale con il filtro oXiris.

5.5 Isotherme di adsorbimento

In Tabella 5.8 sono riportati i dati sperimentali raccolti dagli esperimenti in circolazione necessari per la costruzione dell'isoterma di Langmuir per caratterizzare il processo di adsorbimento dell'antibiotico. L'isoterma ottenuta è rappresentata in Figura 5.16.

| Massa nel reservoir (mg) | Massa adsorbita (mg) | Volume (ml) | Minuti circolazione (min) | Volume circolazione (ml) | Concentrazione (mg/L) | Carico all'equilibrio (mg/g) |
|--------------------------|----------------------|-------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------|------------------------------|
| 161,100 | 160,971 | 300 | 120 | 30000 | 5,3700 | 6,43884 |
| 337,800 | 337,569 | 300 | 120 | 30000 | 11,26 | 13,50276 |
| 638,55 | 638,184 | 300 | 120 | 30000 | 21,285 | 25,52736 |
| 1102,8 | 1102 | 600 | 240 | 60000 | 18,38 | 44,06448 |

Tabella 5.8: Dati ottenuti con gli esperimenti sull'adsorbimento del Linezolid utilizzati per la costruzione dell'isoterma secondo il modello di Langmuir.

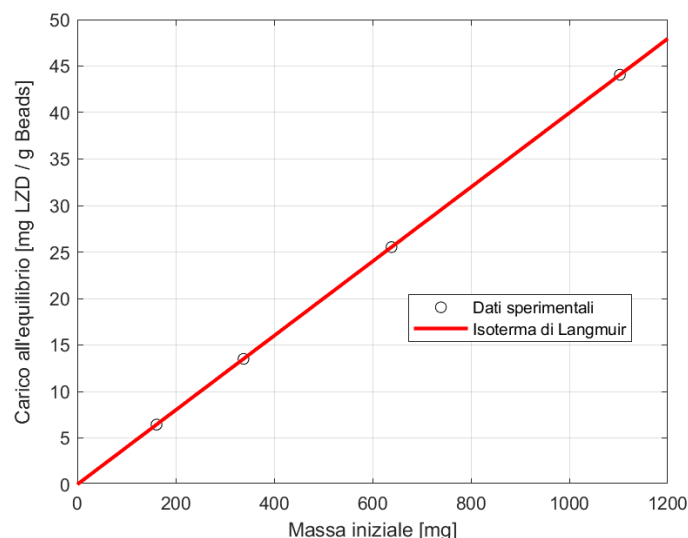


Figure 5.16 Dati sperimentali sull'adsorbimento di Linezolid ad opera delle beads (pallini) e isoterma di Langmuir che meglio interseca i dati (linea rossa). Nell'asse delle ascisse si riporta la massa iniziale di Linezolid presente nel reservoir, nell'asse delle ordinate il carico all'equilibrio, ossia il rapporto tra la massa adsorbita di Linezolid e i grammi di beads utilizzati.

Per fittare i dati con l'isoterma di Langmuir si sono utilizzati i seguenti parametri:

$$Q_0 \left[\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right] = 5,450\text{e}+04; b \left[\frac{1}{\text{mg}} \right] = 7,337\text{e}-07.$$

Il parametro Q_0 esprime fisicamente il carico massimo di equilibrio di massa del LZD, che in questo caso è molto elevato. A tale proposito, l'isoterma ottenuta presenta un andamento lineare, ben lontana dal raggiungimento del caratteristico plateau. In una isoterma la pendenza del tratto iniziale rappresenta la variazione del numero di siti attivi disponibili per l'adsorbimento all'aumentare della quantità di soluto adsorbito. In questo caso, si osserva che il numero di siti attivi rimane costante all'aumentare del grado di riempimento. Con la dose di LZD utilizzata negli esperimenti non si osserva il raggiungimento della condizione di equilibrio, ossia le beads possiedono ancora dei siti attivi disponibili per l'adsorbimento dell'antibiotico.

5.6 Discussione

Con questo studio si è valutata *in vitro* la capacità di adsorbimento della cartuccia HA380 nei confronti dell'antibiotico Linezolid. Dalle analisi condotte e dai dati raccolti, è possibile perciò provare che:

- il materiale sorbente della cartuccia Jafron HA380 dimostra una forte interazione con l'antibiotico LZD;
- la cartuccia esibisce un rapido e significativo tasso di rimozione del farmaco superiore al 99% in tutti gli esperimenti, anche quando si è utilizzato sangue;

- la cinetica di adsorbimento non manifesta grandi variazioni in presenza di un diverso quantitativo di LZD; anche quando si è raddoppiata la massa di antibiotico, la concentrazione ha subito, fin dall'inizio, un brusco calo;
- il Single-Pass di ciascun esperimento riduce fortemente la concentrazione di LZD all'interno del reservoir, dimostrando una forte capacità di adsorbimento delle beads fin dal primo contatto con la soluzione;
- la concentrazione del farmaco subisce un decadimento esponenziale nel tempo, assestandosi sempre su valori molto vicini allo zero dopo i primi venti minuti di ciascuna prova;
- la massa adsorbita di LZD risulta essere già oltre il 90% nei primi cinque minuti di ogni test, sia a concentrazioni molto basse di farmaco sia a concentrazioni più elevate;
- la velocità di adsorbimento osservata risulta essere paragonabile tra i diversi esperimenti, con una velocità tendente a zero dopo i primi minuti delle prove in conseguenza del fatto che la massa già dopo i primi minuti è notevolmente ridotta.

Il fenomeno dell'adsorbimento viene generalmente descritto in uno stato di equilibrio: ad una specifica temperatura, dopo un certo intervallo di tempo di contatto tra il soluto ed il sorbente, si osserva che quest'ultimo non è più in grado di adsorbire a causa della saturazione dei siti di legame disponibili sulla superficie. Per questa ragione, lo studio dell'isoterma permette di valutare la capacità adsorbente di HA380 in relazione al LZD. Si è osservato che l'isoterma ottenuta presenta un andamento lineare, evidenziando una relazione di proporzionalità diretta tra il numero di siti attivi nelle beads e la quantità di farmaco introdotta. In altre parole, anche aumentando la massa di LZD, il materiale dimostra una capacità costante di adsorbimento, senza evidenziare segni di saturazione. Ciò può essere dovuto alle quantità di LZD utilizzate durante gli esperimenti, evidentemente non sufficienti per saturare il quantitativo di materiale sorbente utilizzato. Nel reservoir le concentrazioni continuano a diminuire nel tempo, in virtù del fatto che la cartuccia conserva ancora capacità adsorbente. Per osservare la saturazione sono necessarie, in futuro, ulteriori prove con soluzioni con una massa iniziale più elevata di LZD.

Studi simili sono stati precedentemente eseguiti utilizzando la cartuccia Jafron HA380 dal gruppo Godi et al. [32] e dal gruppo Lorenzin et al. [33] che hanno valutato l'adsorbimento della Vancomicina, uno degli antibiotici tradizionalmente somministrati nelle terapie intensive per le infezioni da *Staphylococcus aureus*, in alternativa al LZD. Gli studi hanno rilevato come la Vancomicina venga rimossa dalla circolazione durante il trattamento dialitico

con la cartuccia, similmente a quanto riscontrato con il LZD. La cinetica dell'adsorbimento della Vancomicina è caratterizzata da una rapida riduzione esponenziale della concentrazione nel reservoir nelle prime fasi dell'esperimento, per poi raggiungere un plateau, diversamente dal caso in esame. Con concentrazioni elevate di Vancomicina aumenta il tempo necessario per osservare un RR elevato [33], diversamente da quanto rilevato ad oggi con il LZD. Inoltre, all'aumentare della concentrazione di Vancomicina utilizzata, diminuisce la percentuale di antibiotico che la cartuccia HA380 è in grado di adsorbire. In altre parole, in corrispondenza di valori elevati di Vancomicina, le beads non sono in grado di adsorbire oltre un certo valore di antibiotico in quanto si è raggiunta la saturazione [33]. A differenza dell'esperimento descritto in questa tesi, era stato possibile aumentare notevolmente la concentrazione di Vancomicina. Con il LZD questo non è stato possibile e ciò rappresenta un limite importante nella caratterizzazione dell'interazione dell'antibiotico con la cartuccia.

Un altro aspetto molto interessante è il rapporto tra la massa di farmaco adsorbito e la massa di materiale adsorbente. Alla fine dell'esperimento con il quantitativo maggiore di antibiotico utilizzato (1102.8 mg di LZD) sono stati adsorbiti ben 1101.612 mg utilizzando 75 g di beads umide. Perciò 1 g di beads è in grado di adsorbire almeno 14.69 mg di farmaco, dai dati rilevati. Sulla base di ciò si può risalire alla capacità adsorbente della cartuccia HA380.

$massa_{beads-HA380} : massa_{beads-minimodulo} = massa_{LZD-HA380} : massa_{LZD-minimodulo}$
dove con $massa_{beads-HA380}$ si fa riferimento ai g di beads presenti in una cartuccia (285 g) e rispettivamente con $massa_{beads-minimodulo}$ ai 75 g di beads all'interno di un mini-modulo. Il termine $massa_{LZD-HA380}$ indica la quantità di LZD che la cartuccia è in grado di adsorbire e $massa_{LZD-minimodulo}$ la quantità adsorbita dal mini-modulo durante la prova sperimentale svolta. Si ottiene che la cartuccia, in linea teorica, è in grado di adsorbire almeno 4186.13 mg di LZD. Tuttavia, non si può affermare che questa sia la quantità massima adsorbibile dato che non si è raggiunta la saturazione del materiale adsorbente. Pertanto, la capacità di HA380 è probabilmente superiore. Ciononostante, questo valore è superiore al LZD somministrabile quotidianamente ad un adulto: 600 mg ogni 12 ore.

La valutazione dell'interazione farmaco-cartuccia è da considerarsi preliminare rispetto a ulteriori studi riguardanti l'utilizzo della tecnica di emoperfusione in pazienti in stato critico, come in pazienti affetti da sepsi. Infatti, sebbene questa tecnica depurativa sia impiegata da più anni, è solo negli ultimi anni che si è assistito allo sviluppo di nuovi materiali adsorbenti e nuove ricerche per indagare e caratterizzare sempre più tali materiali.

Nel caso specifico, si è osservato che la cartuccia Jafron HA380 esibisce un'importante affinità per il farmaco LZD quando si trova in presenza della sola soluzione fisiologica. È

necessario precisare che il meccanismo di adsorbimento è un fenomeno dipendente da molti fattori. Esso dipende sicuramente dall'interazione che si crea tra la molecola e la superficie del materiale adsorbente, ossia dalle proprietà chimico-fisiche della molecola, nonché dalla natura e dalle caratteristiche geometriche della superficie [33]. Le proprietà di un farmaco che possono influenzare il suo adsorbimento includono sicuramente il peso molecolare, la carica molecolare, il legame proteico che si può creare, la concentrazione, la dimensione e l'ingombro sterico. Ci si è posti il quesito se esistesse allora un'interazione tra l'antibiotico LZD e le proteine del sangue, che potesse interferire con la capacità di adsorbimento delle beads. Si è quindi eseguito un esperimento utilizzando sangue umano: il LZD è stato posto in una soluzione di plasma ed emazie emoconcentrate per indagare, seppur in maniera molto semplificata, la possibile interazione. Si è riscontrato un decadimento esponenziale della concentrazione di LZD nei primi minuti della prova ed un quantitativo di massa del farmaco adsorbita superiore al 99%, similmente a quanto osservato negli esperimenti con la sola soluzione fisiologica. Si può concludere che esiste un'interazione indipendente dalle proteine tra il LZD e la cartuccia.

Sono necessari ulteriori studi per comprendere più a fondo l'interazione tra le proteine presenti nel sangue e il farmaco e quanto il legame proteico del farmaco influisca sulla sua interazione con la cartuccia.

In aggiunta, si è scelto di testare il filtro oXiris per analizzare se la sua membrana semipermeabile, con caratteristiche adsorbitive, evidenziasse un'interazione con l'antibiotico. La membrana è composta da un primo strato a carica negativa in grado di legare le citochine, un successivo strato carico positivamente che adsorbe le endotossine e un ultimo strato di eparina. Ci si è chiesti se tale struttura articolata potesse favorire o meno l'adsorbimento anche dell'antibiotico LZD. Si è osservata una rimozione dell'antibiotico solo nei primi minuti della prova. Il tasso di rimozione si assesta attorno al 40% per tutta la durata dell'esperimento. Il filtro oXiris, perciò, ha dato riscontro di una rapida diminuzione della concentrazione dell'antibiotico solo nei primi minuti, sebbene di entità contenuta rispetto alle beads della cartuccia, per poi raggiungere la condizione di steady state. Ciò potrebbe essere spiegato da una repentina saturazione delle fibre del filtro, data la minore superficie disponibile per l'adsorbimento rispetto a quella offerta dalla cartuccia Jafron HA380. Così come potrebbe essere dovuto ad un fenomeno di diffusione instauratosi nei primi minuti dell'esperimento: la presenza della soluzione fisiologica nel compartimento dialisato/effluente, dovuta al priming, potrebbe aver favorito il passaggio diffusivo del LZD attraverso la membrana verso il compartimento con minore concentrazione di antibiotico.

Quindi la riduzione di concentrazione di LZD osservata nel reservoir potrebbe non essere dovuta all'adsorbimento del farmaco sulla membrana, ma piuttosto ad un trasporto diffusivo nella parte del dialisato ed effluente. Tale ipotesi potrebbe essere avvalorata dal riscontro di una concentrazione relativamente elevata di LZD nel compartimento dell'effluente (0.4 mg/ml), analizzata a fine esperimento.

In conclusione, è stata osservata una differente interazione dell'antibiotico LZD con il materiale sorbente della cartuccia Jafron HA380 e del filtro oXiris. Infatti, si è riscontrata una cinetica di rimozione del farmaco molto diversa nelle due diverse condizioni.

I risultati ottenuti possono essere d'aiuto nella comprensione della cinetica di adsorbimento del Linezolid che può verificarsi durante un trattamento di emoperfusione e possono fornire degli spunti sulle operazioni da compiere per mantenere un livello plasmatico di antibiotico adeguato nei pazienti critici sottoposti a terapie extracorporee.

Lo studio suggerisce che la modulazione della terapia antibiotica dovrebbe essere eseguita sulla base della tecnica di depurazione extracorporea impiegata e sulla base della cartuccia o della membrana utilizzata.

Conclusioni

Lo studio dell'adsorbimento dell'antibiotico Linezolid, condotto in questa tesi, pone le basi per una corretta comprensione dell'interazione tra il biomateriale adsorbente presente all'interno della cartuccia Jafron HA380 e l'antibiotico stesso. Dato l'impatto terapeutico dell'emoperfusione e la prospettiva di modulare le tempistiche della tecnica sulla base delle necessità del paziente, lo studio dei farmaci e della loro specifica interazione con i diversi biomateriali adsorbenti rappresenterebbe una svolta importante per l'ottimizzazione della terapia in caso di sepsi.

I risultati ottenuti nel corso del presente studio dimostrano una forte capacità della cartuccia Jafron HA380 di rimuovere l'antibiotico Linezolid già dopo pochi minuti di utilizzo. Peraltro, occorre precisare che lo studio mostra alcuni limiti, per cui i risultati ottenuti potrebbero non essere rappresentativi del contesto clinico. Non si sono considerate tutte le diverse variabili che possono influenzare il processo di adsorbimento in un paziente critico. Ad esempio, nell'esperimento realizzato si è impiegato un volume massimo di 600 ml di soluzione. Ciò implica che durante i 120 minuti di emoperfusione, questo volume predefinito circoli ripetutamente con una sovraesposizione alla cartuccia favorendo l'adsorbimento dell'antibiotico. Inoltre, non è stato possibile valutare la saturazione del dispositivo. Non si può escludere la possibilità di una competizione tra il Linezolid e altre molecole presenti nel sangue per l'occupazione dei siti di legame nel materiale adsorbente, dato che è stata aggiunta solo la molecola di antibiotico nel reservoir. L'utilizzo della soluzione fisiologica piuttosto che del sangue rappresenta un ulteriore limite. Infatti, pur avendo dimostrato con l'esperimento eseguito con il sangue come la presenza di proteine non abbia influenzato il tasso di rimozione del Linezolid, occorre approfondire l'interazione esistente tra l'antibiotico e le proteine e l'eventuale occupazione di siti di legame disponibili sulle beads da parte delle proteine stesse.

Sono necessari ulteriori studi per comprendere il timing corretto per la somministrazione delle terapie nei pazienti critici e quale dispositivo adsorbente possa dare i migliori risultati nel trattamento della sepsi.

Saranno da eseguire degli approfondimenti per comprendere in maniera esaustiva la reale interazione tra il Linezolid e il materiale adsorbente.

I risultati ottenuti chiariscono la necessità di un'eventuale rimodulazione della terapia antibiotica in un paziente affetto da sepsi sottoposto a trattamento sostitutivo renale.

Data l'attuale tendenza verso una medicina sempre più personalizzata, è fondamentale aver chiaro il quadro clinico del singolo paziente e scegliere la terapia antibiotica e il trattamento sostitutivo renale, se necessario, più adeguati.

Bibliografia e sitografia

- [1] Bassetti M., Calci M., Cappello D., Cattani G., Crapis M., Cugini F., Luzzati R., Onorato P., Pea F., Pontoni E., Russo S., Sbrojavacca R., Venturini S., (2017). La sepsi: riconoscimento precoce in Pronto Soccorso e gestione della fase iniziale nell'adulto
- [2] World Health Organization, (2017). Global report on the epidemiology and burden of sepsis
- [3] Ministero della Salute, (2022). <https://www.salute.gov.it/>, 13 settembre 2022, Giornata Mondiale Per lotta Alla Sepsis
- [4] Dou L., Meng D., Dong Y., Chen L., Han X., Fan D., Dong H., (2020). Dosage regimen and toxicity risk assessment of linezolid in sepsis patients. *International Journal of Infectious Diseases*, 105–111
- [5] <http://www.siaarti.it>
- [6] Huang M., Cai S., Su J., (2019). The Pathogenesis of Sepsis and Potential Therapeutic Targets. *International Journal of Molecular Sciences*
- [7] Singer M., Deutschman C., Seymour C.W., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M., Bellomo R., Bernard G.R., Chiche J.D., Coopersmith C.M., Hotchkiss R., Levy M.M., Marshall J.D., Martin G.S., Opal S.M., Rubinfeld G.D., Van der Poll T., Vincent J.L., Angus D.C., (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315(8), 801–810.
- [8] Antinori, S. (2015). *Manuale di Malattie infettive*, 205-213
- [9] Calci M., (2017). La Sepsis: nuova definizione ed evoluzione nei criteri di gestione. *Italian Journal of Emergency Medicine*, 2532-1285.
- [10] Pozzato M., Livigni S., Roccatello D., (2019). La terapia extracorporea nella sepsi. *Giornale Italiano di Nefrologia*. Corso educativo AKI del 59° Congresso SIN 2018
- [11] Honore P. M., Hoste E., Molnár Z., Jacobs R., Joannes-Boyau O., Malbrain M. L. N. G., Forni L. G., (2019). Cytokine removal in human septic shock: Where are we and where are we going? *Intensive Care*, 9-56
- [12] Nalesso F., Brendolan A., Zanella M., Ronco C., (2012). Trattamento extracorporeo dell'insufficienza renale acuta (AKI) durante la sepsi. *Giornale Italiano di Nefrologia*, 29(S56), S35-S40
- [13] Monard C., Rimmelé T., Ronco C., (2019). Extracorporeal Blood Purification Therapies for Sepsis. *Blood Purification*, 1-14

- [14] Villa G., Neri M., Bellomo R., Cerda J., De Guadio A.R., De Rosa S., Garzotto F., Honore P. M., Kellum J., Lorenzin A., Payen D., Ricci Z., Samoni S., Vincent J. L., Wendon J., Zaccaria M., Ronco C. and on behalf of the Nomenclature Standardization Initiative (NSI) Alliance, (2016). Nomenclature for renal replacement therapy and blood purification techniques in critically ill patients: practical applications. *Critical Care*, 20-283
- [15] Pomarè Montin D., Ankawia G., Lorenzin A., Neri M., Caprara C., Ronco C., (2018). Biocompatibility and Cytotoxic Evaluation of New Sorbent Cartridges for Blood Hemoperfusion. *Blood Purification*, 187–195
- [16] Neri M., Villa G., Garzotto F., Bagshaw S., Bellomo R., Cerda J., Ferrari F., Guggia S., Joannidis M., Kellum J., Kim J. C., Mehta R. L., Ricci Z., Trevisani A., Marafon S., Clark W. R., Vincent J. L., Ronco C. and on behalf of the Nomenclature Standardization Initiative (NSI) alliance, (2016). Nomenclature for renal replacement therapy in acute kidney injury: basic principles. *Critical Care*, 20-318
- [17] Ronco C., Bordoni V., Levin N. W., (2002). Adsorbents: From Basic Structure to Clinical Application. *Hemodialysis Technology*, 158–164
- [18] Foo K. Y., Hameed B. H., (2010). Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. *Chemical Engineering Journal*, 2–10
- [19] Wang J., Guo X., (2020). Adsorption isotherm models: Classification, physical meaning, application and solving method. *Chemosphere*, 258
- [20] Ronco C., Neri M., Garzotto F., Lorenzin A., Clark W. R., (2017). Multidimensional Classification of Dialysis Membranes. *Expanded Hemodialysis – Innovative Clinical Approach in Dialysis*, 115–126
- [21] Jörres A., (2018). Blood purification in sepsis. *Critical care*, 22-357
- [22] Ankawi G., Fana W., Pomarè Montin D., Lorenzin A., Neri M., Caprara C., de Cal M., Ronco C., (2018). New Series of Sorbent Devices for Multiple Clinical Purposes: Current Evidence and Future Directions. *Blood Purification*
- [23] Lorenzin A., Neri M., de Cal M., Pajarinc G., Mansi Montenegro G., Savastano S., Alghisi A., Ronco C., (2019). Fluid Dynamics Analysis by CT Imaging Technique of New Sorbent Cartridges for Extracorporeal Therapies. *Blood Purification*, 18-24
- [24] Hashemian S. M., Farhadi T., Ganjparvar M., (2018). Linezolid: a review of its properties, function, and use in critical care. *Drug Design, Development and Therapy*, 1759–1767

- [25] Meyer B., Kornek G. V., Nikfardjam M., Delle Karth G., Heinz G., Locker G. J., Jaeger W., Thalhammer F., (2005). Multiple-dose pharmacokinetics of linezolid during continuous venovenous haemofiltration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 172–179
- [26] Stalker D. J., Jungbluth G. L., (2003). Clinical Pharmacokinetics of Linezolid, a Novel Oxazolidinone Antibacterial. *Clin Pharmacokinet*, 1129-1140
- [27] Yamashina T., Tsuruyama M., Odawara M., Tsuruta M., Miyata H., Kozono A., Tsuji Y., Miyoshi T., Kawamata Y., Hiraki Y., (2017). Pharmacokinetics of linezolid during continuous hemodiafiltration: A case report. *J Infect Chemother*, 709-712
- [28] Onichimowski D., Nosek K., Ziółkowski H., Jaroszewski J., Pawlos A., Czuczwar M., (2021). Adsorption of vancomycin, gentamycin, ciprofloxacin and tygecycline on the filters in continuous renal replacement therapy circuits: in full blood in vitro study. *Journal of Artificial Organs*, 65–73
- [29] Kraft M. D., Pasko D. A., DePestel D. D., Ellis J. J., Peloquin C. A., Mueller B. A., (2003). Linezolid Clearance During Continuous Venovenous Hemodiafiltration: A Case Report. *Pharmacotherapy*, 1071–1075
- [30] Bode C., Muenster S., Diedrich B., Jahnert S., Weisheit C., Steinhagen F., Boehm O., Hoefl A., Meyer R., Baumgarten G., (2015). Linezolid, vancomycin and daptomycin modulate cytokine production, Toll-like receptors and phagocytosis in a human in vitro model of sepsis. *The Journal of Antibiotics*, 485–490
- [31] Kiliç E. K., Bulut C., Sönmezer M. Ç., Öze Ö., Hatipoğlu Ç. A., Ertem G. T., Tülek N., Kinikli S., (2019). Risk factors for linezolid-associated thrombocytopenia and negative effect of carbapenem combination. *Infect Dev Ctries*, 886-891
- [32] Godi I., Lorenzin A., De Rosa S., Golino G., Knust M., Gaspar A., Sandini A., Fiorin F., de Cal M., Navalesi P., Ronco C., (2021). Vancomycin Adsorption During in vitro Model of Hemoperfusion with HA380 Cartridge. *Nephron*, 145:157–163
- [33] Lorenzin A., de Cal M., Marcello M., Sorbo D., Copelli S., Ronco C., De Rosa S., Zanella M., (2022). Vancomycin Adsorption during in vitro Model of Hemoperfusion with Mini-Module of HA380 Cartridge. *Blood Purification*