

UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI PADOVA



**FACOLTÁ DI INGEGNERIA**

Tesi di Laurea Magistrale in Ingegneria dei Materiali

**EFFETTI DI OSCILLAZIONI MECCANICHE  
NELLA RIMOZIONE DI SOLUTI IN MEMBRANE  
PER TERAPIE DIALITICHE**

Relatore: Prof.ssa **Monica Dettin**

Correlatore: Prof. **Claudio Ronco**

Ing. **Francesco Garzotto**

Laureando: **Mauro Neri**

Anno accademico 2011 – 2012







# Indice

<b>INTRODUZIONE E STATO DELL'ARTE .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Il rene e la funzionalità renale .....</b>	<b>1</b>
1.1 Struttura e funzione del rene .....	1
1.2 Funzionalità renale .....	4
1.3 Insufficienza renale .....	6
1.3.1 Insufficienza renale acuta.....	6
1.3.2 Insufficienza renale cronica.....	7
<b>2. La dialisi come terapia sostitutiva.....</b>	<b>9</b>
2.1 Dialisi extracorporea .....	9
2.1.1 Circuito sangue .....	11
2.1.2 Circuito dializzato.....	17
2.2 Dialisi peritoneale.....	21
2.3 Trapianto .....	22
<b>3. Il filtro dializzatore .....</b>	<b>23</b>
3.1 Struttura e geometria .....	24
3.2 Membrane di dialisi.....	26
3.3 Materiali per membrane .....	30
3.3.1 Membrane cellulosiche .....	31
3.3.2 Membrane sintetiche.....	36
3.3 Sterilizzazione .....	45
<b>4. I meccanismi di trasporto e i trattamenti in terapia dialitica.....</b>	<b>49</b>
4.1 Meccanismi di trasporto .....	49
4.1.1 Diffusione .....	49
4.1.2 Filtrazione e convezione .....	50
4.1.3 Osmosi .....	51
4.1.4 Adsorbimento .....	52
4.2 Trattamenti in terapia dialitica .....	52
4.2.1 Emodialisi standard (HD) .....	53
4.2.2 Emodialisi <i>high flux</i> .....	56
4.2.3 Emofiltrazione (HF).....	57

4.2.4 Emodiafiltrazione HDF .....	58
4.3 Metodi di valutazione del trattamento.....	60
4.4 Fattori che influenzano il trasporto .....	63
4.4.1 Flusso sangue $Q_B$ .....	64
4.4.2 Flusso dializzato $Q_D$ .....	65
4.4.3 Flusso di ultrafiltrazione $Q_{UF}$ .....	65
4.4.4 Ematocrito, contenuto d'acqua nel sangue, e volume di distribuzione dei soluti.....	66
4.4.5 Area superficiale del dializzatore .....	67
4.4.6 Adsorbimento di soluti .....	67
<b>5. La membrana secondaria e la vibrazione meccanica .....</b>	<b>71</b>
5.1 Fluidodinamica del sangue.....	74
5.2 Applicazione di una vibrazione meccanica .....	76
<b>6. Scopo della tesi .....</b>	<b>79</b>
<b>MATERIALI E METODI.....</b>	<b>81</b>
<b>1. Materiali.....</b>	<b>81</b>
1.1 Soluti .....	81
1.2 Filtri dializzatori .....	81
1.3 Macchine di dialisi .....	82
1.4 Liquidi per soluzioni .....	83
1.5 Macchina per oscillazioni meccaniche.....	83
<b>2. Metodi .....</b>	<b>85</b>
2.1 Preparazione della soluzione concentrata in $\beta$ -2-microglobulina .....	85
2.2 Preparazione della soluzione concentrata in $\beta$ -2-microglobulina con latte.....	87
2.3 Preparazione della soluzione concentrata in $\beta$ -2-microglobulina con sangue bovino .....	87
2.4 Test in vitro .....	89
2.5 Analisi delle concentrazioni di $\beta$ -2-microglobulina e urea .....	94
<b>RISULTATI.....</b>	<b>95</b>
1. Risultati della prima fase.....	95
2. Risultati della seconda fase .....	98
3. Risultati della terza fase .....	100
<b>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI .....</b>	<b>105</b>

**BIBLIOGRAFIA.....107**

**RINGRAZIAMENTI.....109**





# INTRODUZIONE E STATO DELL'ARTE

## 1. Il rene e la funzionalità renale

### 1.1 Struttura e funzione del rene

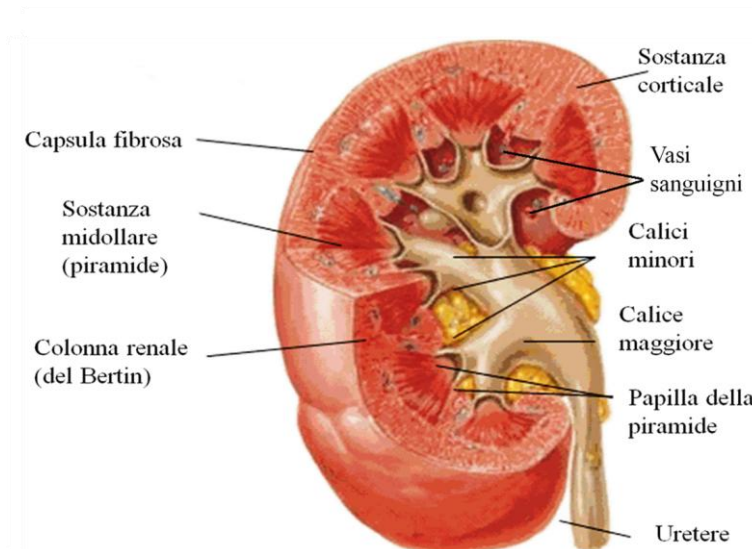
*“Le ossa possono spezzarsi, i muscoli possono atrofizzarsi, le ghiandole possono oziare, persino il cervello può andare a dormire senza danno immediato per la sopravvivenza. Ma se i reni dovessero perdere la loro funzione, neppure le ossa, i muscoli, le ghiandole od il cervello potrebbero funzionare”.*

*DR HOMER W. SMITH*

I reni svolgono funzioni cruciali per il corretto funzionamento di tutto l'organismo grazie a complesse operazioni che mantengono la restante parte dell'organismo in equilibrio e quando dovessero venir danneggiati, gli altri organi ne risentirebbero in uguale misura.

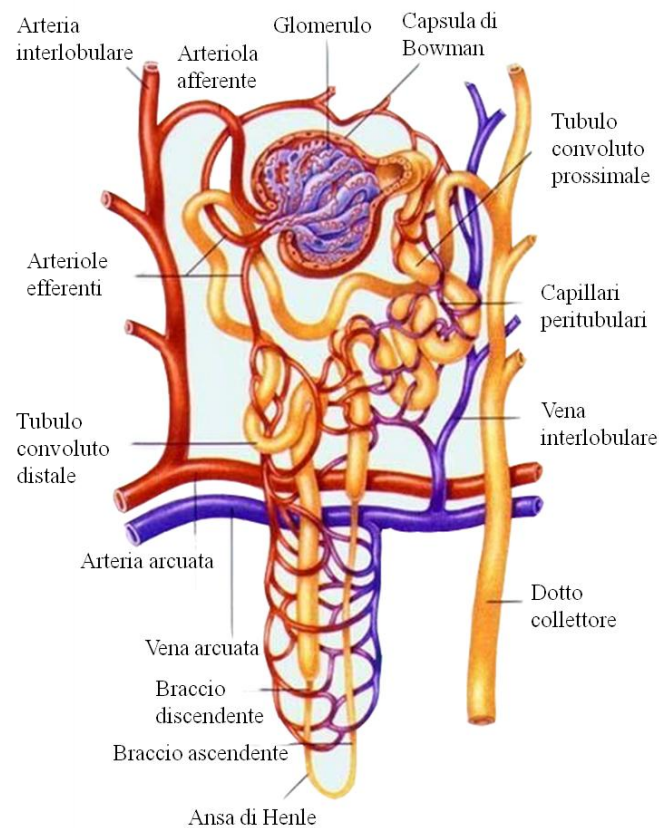
Organi pari e simmetrici, si trovano in posizione retroperitoneale, all'altezza compresa tra l'undicesima vertebra toracica e la terza vertebra lombare. Hanno forma di fagiolo e in un soggetto adulto pesano in media 150 g, con dimensioni di circa 12cm × 6.5cm × 3cm (Figura 1).

Ciascun rene è irrorato dall'arteria renale, ramo collaterale dell'aorta addominale. Essa si divide in una serie di rami con calibro via via inferiore, fino a capillarizzarsi formando un ammasso vascolare, i glomeruli renali, che sono il sistema di filtrazione del rene. Circa il 20% del sangue della gittata cardiaca fluisce attraverso questi organi; da ciò risulta che nei reni circolano in media 1200 ml di sangue al minuto. Questo è il motivo per cui il rene è coinvolto nelle malattie che interessano i vasi sanguigni[1].



**Figura 1** *Struttura macroscopica del rene*

Il nefrone è l'unità funzionale del rene. Se ne contano circa 1 milione per rene e ad essi è associata la funzione uropoietica. Esso è formato da 2 strutture principali: il corpuscolo renale e il tubulo renale (Figura 2).



**Figura 2** *Struttura del nefrone*

Il corpuscolo renale è costituito a sua volta dal glomerulo avvolto da una struttura denominata capsula di Bowman ed è responsabile dell'ultrafiltrazione del plasma sanguigno. Quando il sangue entra nei glomeruli, viene filtrato e il fluido che ne residua (urina primaria o ultrafiltrato glomerulare) passa nei tubuli renali, dove acqua e sostanze varie vengono secrete o assorbite a seconda delle necessità dell'organismo: ciò che si ottiene è l'urina (urina definitiva) che poi verrà condotta tramite l'uretere alla vescica[1].

Nel sistema di filtraggio partecipano l'endotelio capillare, la membrana basale glomerulare e lo strato dei podociti, cellule che formano lo strato viscerale della capsula di Bowman.

L'endotelio capillare presenta delle irregolarità e delle fenestrature di dimensioni di circa 50 nm, attraverso le quali avviene subito un processo di selezione nei confronti di molecole con peso troppo elevato. Al di sotto dell'endotelio, è presente la membrana basale glomerulare, formata da due strati di composizione diversa: una *lamina rara*, composta da glicoproteine, la cui carica negativa forma una barriera chimica verso le molecole cationiche dell'ultrafiltrato, e una *lamina densa*, la quale, oltre che proteoglicani e glicoproteine, è formata anche da fibre di collagene. Esso rappresenta una vera e propria barriera meccanica al passaggio delle molecole di dimensioni maggiori. Risulta infine di fondamentale importanza lo spazio che si viene a creare a livello dei podociti. Tra i podociti si creano degli spazi di dimensioni di pochi nm, e solo le molecole che riescono a passare tra di essi giungono nello spazio di Bowman, e quindi possono procedere verso il tubulo prossimale.

Il processo di filtrazione è reso possibile dall'elevata pressione idrostatica (50 mmHg) del sangue all'interno dei capillari glomerulari; a tale pressione si oppone quella presente nello spazio capsulare (10 mmHg) e la pressione oncotica esercitata dalle proteine plasmatiche (30 mmHg). Ne consegue che la pressione netta utile di filtrazione si aggira sui 10 mmHg, determinante per formare l'ultrafiltrato glomerulare.

I reni filtrano circa 200 litri di acqua ogni giorno e di questi solo 2 litri vengono rimossi dall'organismo sotto forma di urina mentre la restante parte viene riassorbita, recuperando quindi anche tutte le sostanze utili (disciolte nel liquido) che non devono invece essere perdute. Le urine che vengono eliminate restano in vescica da una a otto ore.

I reni svolgono importanti funzioni:

- Escrezione dei prodotti di rifiuto del metabolismo (scorie azotate) e delle sostanze chimiche estranee (farmaci)
- Regolazione del bilancio idrico e degli elettroliti

- Regolazione dell'osmolarità dei liquidi corporei e della concentrazione degli elettroliti dell'organismo
- Regolazione dell'equilibrio acido-base
- Secrezione, metabolismo ed escrezione di ormoni quali l'eritropoietina (che stimola la formazione di globuli rossi da parte del midollo osseo), la renina e le prostaglandine (che regolano la pressione arteriosa)
- Produzione della forma attiva della vitamina D, fondamentale per l'assorbimento intestinale di calcio e per la calcificazione delle ossa
- Regolazione della pressione arteriosa mantenendola su valori normali attraverso l'eliminazione di eccessi di sale (sodio) e la produzione di vari ormoni.

## 1.2 Funzionalità renale

È stato visto come la principale funzione dei reni sia quella di rimuovere i prodotti di scarto del metabolismo e l'eccesso di fluidi grazie alla produzione di urina, che avviene tramite complessi processi di escrezione e riassorbimento in ognuno del milione di nefroni costituenti un singolo rene. La capacità filtrante globale del rene (o "capacità di escrezione" del rene) viene misurata dalla velocità di filtrazione glomerulare o GFR (dall'inglese *Glomerular Filtration Rate*), definita come la velocità di flusso (o più semplicemente flusso) del liquido che viene filtrato attraverso il rene (ovvero la quantità di filtrato glomerulare prodotta nell'unità di tempo).

Come per gli altri capillari del corpo umano, il GFR nei capillari glomerulari è determinato dall'equilibrio tra le forze idrostatiche e colloidale-osmotiche che agiscono a cavallo della membrana capillare e dal coefficiente di filtrazione capillare ( $K_f$ ), cioè il prodotto della permeabilità per l'area della superficie filtrante dei capillari<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> La GFR può essere espressa matematicamente anche come:  $GFR = K_f \times \text{Pressione netta di filtrazione}$ , dove la pressione netta di filtrazione rappresenta la somma delle forze idrostatiche e colloidale-osmotiche che possono favorire od opporsi alla filtrazione attraverso la membrana glomerulare. Di conseguenza, la formula precedente può essere riscritta come:

$GFR = K_f \times (P_g - P_b - \pi_G + \pi_B)$ , dove  $P_g$  = pressione idrostatica all'interno dei capillari glomerulari,  $P_b$  = pressione idrostatica nella capsula di Bowman all'esterno dei capillari,  $\pi_G$  = pressione colloidale-osmotica delle proteine plasmatiche dei capillari glomerulari,  $\pi_B$  = pressione colloidale-osmotica delle proteine nella capsula di Bowman.

Tutte le componenti con segno positivo favoriscono la filtrazione, quelle con segno negativo si oppongono alla stessa.

La velocità con cui il plasma viene depurato da diverse sostanze fornisce un utile metodo per quantificare il GFR.

Si definisce *clearance renale* di una sostanza il volume virtuale di plasma che i reni sono in grado di depurare da essa nell'unità di tempo. Si usa il termine *virtuale* per indicare il fatto che non esiste un singolo volume di plasma che sia stato completamente privato di una sostanza.

Di conseguenza il termine *clearance* si riferisce al volume di plasma che dovrebbe essere necessario per fornire la quantità di sostanza che viene escreta nell'urina per unità di tempo. In termini matematici:

$$CL_x \times C_p = C_u \times V$$

dove  $CL_x$  è la *clearance* della sostanza x,  $C_p$  è la concentrazione plasmatica della sostanza,  $C_u$  è la concentrazione nelle urine e  $V$  è il flusso urinario.

Da questa equazione si può ottenere banalmente il valore della *clearance* della sostanza x:

$$CL_x = \frac{C_u \times V}{C_p}.$$

Se una sostanza è filtrata liberamente e non viene né riassorbita né secreta dai tubuli renali, allora la velocità a cui la sostanza viene escreta con le urine ( $C_u \times V$ ) è uguale alla velocità di filtrazione della sostanza da parte dei reni, cioè ( $GFR \times C_p$ ). Da ciò si può calcolare il GFR come *clearance* della sostanza:

$$GFR = \frac{C_u \times V}{C_p}.$$

Una sostanza che soddisfa questi requisiti è l'inulina, un polimero glucidico che però non viene prodotta dall'organismo (si trova nelle radici di alcune piante) e di conseguenza deve essere somministrata per via endovenosa al paziente.

In realtà, nella pratica clinica, il marker biochimico più utilizzato per stimare il GFR (tanto che si definisce *eGFR*, con la "e" che deriva dall'inglese estimated), e quindi la funzionalità renale, è la creatinina, un sottoprodotto del metabolismo del muscolo (quindi già presente nell'organismo) che viene quasi completamente eliminato dai liquidi corporei per filtrazione glomerulare. In questo caso, come detto, il GFR viene stimato e non misurato precisamente, poiché una piccola quantità di creatinina viene secreta dai tubuli, così che la quantità di creatinina escreta supera di poco la quantità filtrata. Nonostante questo, la misurazione della *clearance* della creatinina risulta di facile ottenimento e offre un buona approssimazione del GFR del paziente.

Matematicamente quindi si può scrivere:

$$\text{GFR} \cong \frac{C_{u,\text{Cr}} \times V}{C_{p,\text{Cr}}},$$

dove si può notare che il GFR e la concentrazione plasmatica di creatinina ( $C_{p,\text{Cr}}$ ) sono inversamente proporzionali (tanto che molto spesso per monitorare il GFR del paziente basta prelevare solo un campione di plasma del paziente).

In un soggetto adulto di peso normale, il GFR è pari a circa 125 ml/min (cioè 180 L/giorno).

### **1.3 Insufficienza renale**

Le patologie dei reni sono tra le più importanti cause di decesso e di invalidità in molti paesi di tutto il mondo. Basti pensare che negli Stati Uniti, nel 2004, è stato stimato che più di 20 milioni di adulti sono affetti da patologie renali croniche.

L'insufficienza renale è una condizione in cui i reni non riescono ad assicurare la normale eliminazione di scorie (aumento dell'azotemia) e la normalità della composizione dei liquidi corporei.

Le patologie renali gravi possono essere suddivise in due categorie principali:

- Insufficienza renale acuta, in cui i reni smettono improvvisamente di funzionare in modo completo o quasi completo, ma possono riprendere la normale funzionalità.
- Insufficienza renale cronica, in cui c'è una progressiva perdita di funzionalità di un numero sempre maggiore di nefroni che gradualmente diminuiscono la funzionalità generale renale.

All'interno delle due categorie principali, ci sono molte patologie renali specifiche che possono colpire i vasi sanguigni renali, i glomeruli, i tubuli, l'interstizio renale e parte del tratto urinario al di fuori dei reni, compresi gli ureteri e la vescica.

#### **1.3.1 Insufficienza renale acuta**

L'insufficienza renale acuta (IRA), a differenza dell'insufficienza renale cronica che si instaura progressivamente, è un complesso quadro clinico caratterizzato da una rapida riduzione della

diuresi, che porta ad uno scompenso d'organo e ad una potenziale capacità di regressione, determinando un aumento della azotemia, di altri metaboliti escreti dal rene, ritenzione idrica ed alterazioni elettrolitiche. La perdita della funzionalità renale è evidenziabile con la misurazione della creatinina nel siero che consente di stimare il GFR.

Le cause dell'insufficienza renale acuta possono essere suddivise nelle seguenti tre categorie principali.

1. Insufficienza renale acuta che risulta da insufficiente apporto sanguigno ai reni; è una condizione generalmente definita *insufficienza renale acuta prerenale* per indicare il fatto che le anomalie sono presenti in un sistema posto prima dei reni. Può essere dovuta a un'insufficienza cardiaca (cuore e reni sono due organi fortemente collegati, tanto che si può definire sindrome cardio-renale) con ridotta gittata e bassa pressione sanguigna o a condizioni associate a diminuito volume ematico e bassa pressione sanguigna, come una grave emorragia.
2. *Insufficienza renale acuta postrenale* che risulta da anomalie all'interno dello stesso rene, che possono interessare i vasi sanguigni, i glomeruli o i tubuli.
3. *Insufficienza renale acuta postrenale*, che risulta dall'ostruzione del sistema collettore urinario in un punto qualsiasi compreso tra i calici e l'uscita dalla vescica. La causa più comune di ostruzione del tratto urinario esternamente al rene sono i calcoli renali causati dalla precipitazione di calcio, urato o cistina.

### **1.3.2 Insufficienza renale cronica**

L'insufficienza renale cronica (IRC) deriva dalla perdita progressiva e irreversibile di un grosso numero di nefroni funzionanti. Di solito non compaiono gravi sintomi clinici finché il numero di nefroni funzionanti non scende al di sotto del 70-75% del valore normale. Infatti, può ancora essere mantenuta una normale concentrazione plasmatica degli elettroliti e il volume di liquido corporeo può rimanere normale finché il numero di nefroni funzionanti non scende al di sotto del 20-25% del normale.

Esistono vari stadi per indicare la gravità della malattia in funzione del GFR. Essi sono descritti nella seguente tabella secondo le linee guida K-DOQI (Kidney Disease Outcome Quality Initiative):

STADIO	DESCRIZIONE	GFR (ml/min per 1,73m <sup>2</sup> )
1	Segni di danno renale con GFR normale o aumentato	≥ 90
2	IRC lieve	60-89
3	IRC moderata	30-59
4	IRC severa	15-29
5	Uremia	≤ 15

**Tabella 1** Stadi dell'IRC secondo le linee guida K-DOQI

La funzione renale diminuisce lentamente nell'arco di un tempo piuttosto lungo, da mesi ad anni, e la velocità della progressione dipende dalla malattia che ha provocato l'insufficienza renale, anche se si osserva una grande variabilità individuale.

Le cause maggiori sono:

- Diabete e ipertensione: sono le due principali cause in quanto responsabili per più dei due terzi dei casi. Esse colpiscono inizialmente i vasi sanguigni
- Glomerulonefriti: causano infiammazione e danni ai glomeruli
- Pielonefriti e nefriti interstiziali: coinvolgono i reni nella loro componente tubulare e interstiziale. Possono essere provocate da infezioni ricorrenti, abuso di farmaci o malattie croniche o da patologia ostruttiva del tratto urinario
- Malattie ereditarie (per esempio reni policistici)

Nei casi in cui l'insufficienza renale raggiunga stadi avanzati, risulta necessaria la terapia sostitutiva, rappresentata dalla dialisi o dal trapianto.



## **2. La dialisi come terapia sostitutiva**

Le terapie sostitutive renali sono i trattamenti per l'insufficienza renale grave. Quando i reni non sono più in grado di svolgere la loro funzione e, conseguentemente, si accumulano nel sangue le sostanze di scarto ed i liquidi che il rene non può più eliminare, le terapie sostituiscono la funzione renale rimuovendo le sostanze tossiche (di scarto) e i liquidi accumulati in eccesso.

La terapia sostitutiva renale si rende necessaria quando si perde più del 90% della funzionalità; questo si verifica solitamente, ma non necessariamente, dopo molti mesi o anni dalla prima diagnosi di malattia renale.

Durante le fasi iniziali dell'insufficienza renale cronica si cerca di preservare la funzionalità dell'organo il più a lungo possibile, anche per ritardare la necessità di iniziare la terapia sostitutiva.

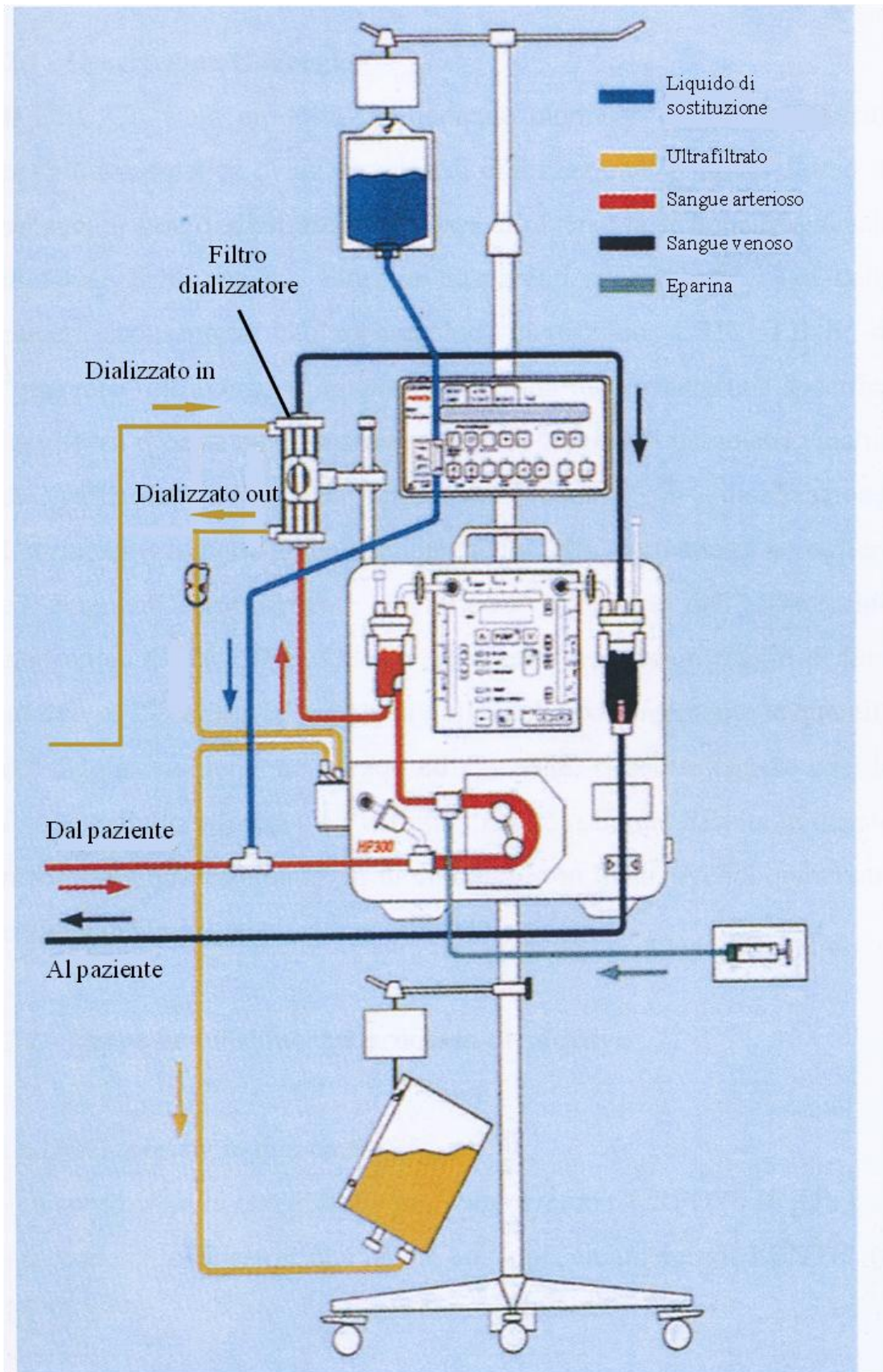
Le terapie sostitutive possono essere divise in: dialisi extracorporea, dialisi peritoneale e trapianto.

### **2.1 Dialisi extracorporea**

La dialisi consiste in un processo fisico atto a separare molecole in soluzione attraverso l'utilizzo di una membrana semipermeabile. Più semplicemente si può dire che una soluzione contaminata (il sangue carico di "sostanze tossiche" del paziente uremico) viene depurata da una "soluzione di lavaggio" (il dializzato o bagno di dialisi) da cui è separata tramite una membrana semipermeabile. La membrana utilizzata per la dialisi è permeabile solo a determinate sostanze, cioè si comporta come un filtro i cui pori hanno dimensioni molecolari. L'obiettivo è quello di rimuovere l'eccesso di sostanze tossiche o almeno di mantenere la loro concentrazione plasmatica al di sotto dei livelli considerati tossici. Questa metodica viene definita "extracorporea" (CRRT, dall'inglese Continuous Renal Replacement Therapy) perché il sangue viene prelevato dal paziente tramite un accesso vascolare, viene fatto fluire esternamente attraverso un circuito, depurato attraverso un filtro (contenente la membrana) e infine reinfuso.

I pazienti sottoposti a dialisi extracorporea solitamente eseguono il trattamento 3 volte alla settimana e ogni seduta dura circa 4 ore, con turni alla mattina o al pomeriggio.

Prima di passare a esaminare i meccanismi chimico-fisici che permettono la rimozione delle sostanze tossiche attraverso la membrana semipermeabile, è doveroso spiegare come funziona un circuito di dialisi.



**Figura 3** Circuito di dialisi

In generale, la macchina di dialisi permette il pompaggio e la circolazione sia del sangue del paziente sia del liquido di dialisi (Figura 3). Il sistema operativo di un macchinario per dialisi extracorporea rappresenta un complesso insieme di rilevatori, sistemi di controllo, monitor e dispositivi di sicurezza necessari a garantire un totale controllo, momento per momento, delle operazioni da effettuare[2].

Il sistema, controllato da un software interfacciato con un monitor, permette all'operatore (in questo caso un infermiere) di gestire tutte le variabili importanti, come per esempio il flusso sangue, il flusso di ultrafiltrazione, la composizione del dializzato, le pressioni del circuito etc.

Da un punto di vista pratico, risulta utile dividere il processo di dialisi in due parti principali: il circuito sangue e il circuito dializzato.

### 2.1.1 Circuito sangue

Il circuito sangue consiste delle seguenti componenti (Figura 4):

- Accesso vascolare
- Linee sangue (arteriosa e venosa)
- Rilevatore pressione arteriosa
- Rilevatore pressione venosa
- Pompe peristaltiche
- Pompa di eparina
- Filtro dializzatore
- Rilevatore d'aria

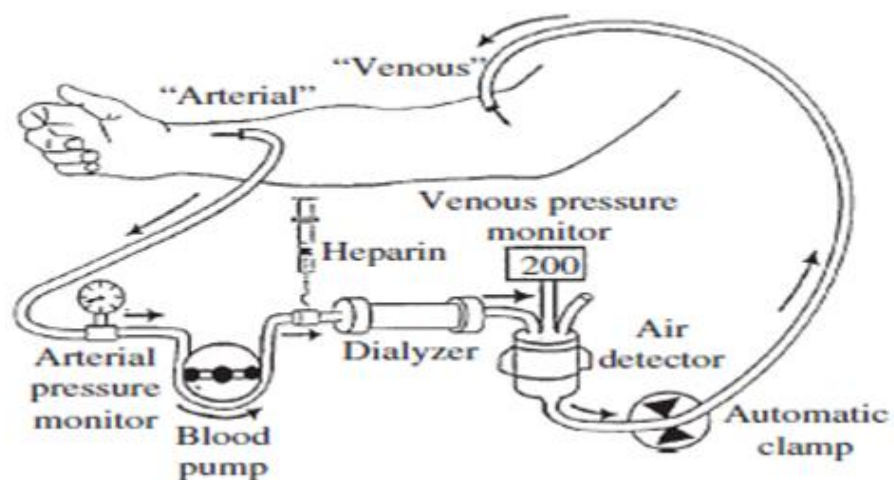
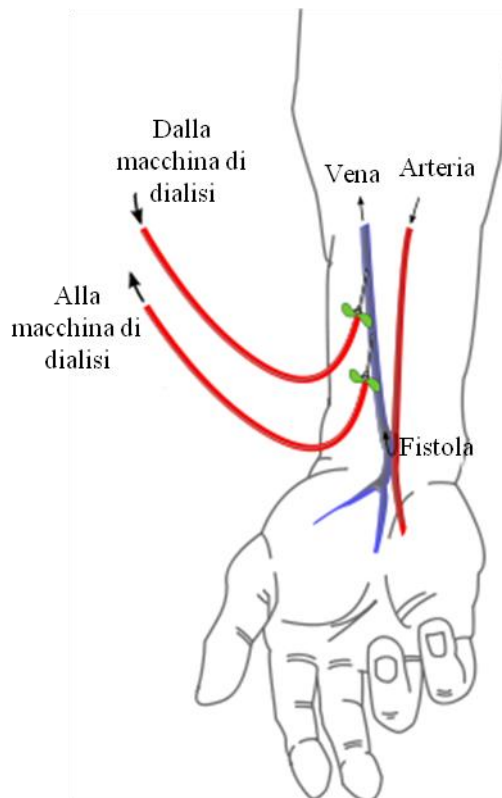


Figura 4 Il circuito sangue

### *Accesso vascolare*

Premessa per l'esecuzione della dialisi è un buon accesso vascolare per il paziente. È importante infatti ottenere un flusso sanguigno sufficiente per evitare coagulazione e complicanze e ciò viene realizzato attraverso un'anastomosi tra un'arteria e una vena (shunt). Nel caso specifico, questa anastomosi viene definita fistola artero-venosa (Figura 5) e nella maggior parte dei casi essa risulta permanente, cioè il dializzato cronico deve convivere anche durante la vita di tutti i giorni, avendone cura.



**Figura 5** Fistola artero-venosa

### *Linee sangue (arteriosa e venosa)*

Durante il trattamento, il sangue viene fatto fluire all'interno di linee che permettono il passaggio dello stesso fino al filtro e quindi, una volta depurato, al paziente. Le linee sangue monouso si dividono in arteriosa e venosa, con i raccordi caratterizzati rispettivamente da colore rosso e blu (Figura 6): la linea sangue arteriosa collega il punto in cui penetra l'ago-cannula arteriosa (prelievo del sangue) con il filtro, mentre la linea sangue venosa collega il filtro con il punto in cui penetra l'ago cannula venosa (restituzione del sangue).



**Figura 6** Linee sangue venosa (a sinistra) e arteriosa ( a destra)

La linea sangue arteriosa viene connessa con l'ago-cannula del paziente attraverso un raccordo di sicurezza Luer (un raccordo standardizzato con innesto a baionetta); ovviamente la connessione deve avvenire in condizioni sterili.

Le linee sangue, sia venosa che arteriosa, sono costituite da materiale biocompatibile e atossico, solitamente polivinilcloruro (PVC). Le parti che vengono inserite nelle pompe peristaltiche sono trattate con silicone per ridurre fenomeni di coagulazione o di clotting e possiedono un calibro superiore rispetto al resto della linea.

La linea arteriosa possiede inoltre le seguenti caratteristiche:

- Un dispositivo d'attacco per l'infusione di soluzione (pre diluizione); anche tale dispositivo possiede un raccordo Luer e, se non utilizzato (dipende dal tipo di trattamento), è chiuso con un tappo a vite.
- Un dispositivo che permette di iniettare farmaci nella circolazione arteriosa. Questo dispositivo è munito di una particolare membrana, la quale è perforabile dall'ago della siringa in cui è presente il farmaco in questione e si richiude su se stessa quando l'ago viene estratto.
- Un tubicino di calibro ridotto rilevatore di pressione che, mediante un raccordo Luer, viene connesso con un dispositivo della macchina che a sua volta protegge un trasduttore di pressione (vedi oltre).
- Un segmento di calibro inferiore che viene connesso con una siringa di eparina che viene iniettata durante il trattamento (vedi oltre).

- Un gocciolatore (pozzetto) che ha il compito di eliminare eventuali bolle d'aria presenti nel sistema arterioso.

La linea sangue venosa, che fa convogliare il sangue depurato dal filtro al paziente, non contiene lo il segmento di linea da inserire nella pompa. Sono presenti invece, al pari della linea sangue arteriosa, un pozzetto per l'eliminazione di eventuali bolle d'aria, un tubicino di calibro ridotto per la misurazione di pressione e un dispositivo d'attacco per l'infusione di soluzioni fisiologiche (post infusione).

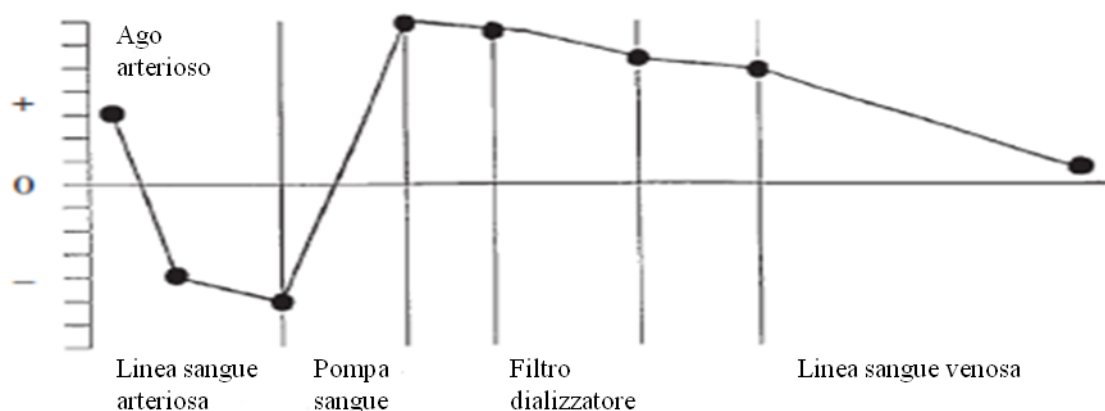
Lungo entrambe le linee sono presenti delle *clamps* che vengono utilizzate per bloccare il circuito in caso di allarmi da parte della macchina.

Oltre alle linee sangue, anche le linee di infusione di liquidi di sostituzione, di soluzioni fisiologiche o di farmaci sono dello stesso tipo di quelle sopra descritte.

### *Rilevatori di pressione*

La pressione all'interno del circuito è un parametro fondamentale durante il monitoraggio di un trattamento dialitico extracorporeo. Nel caso specifico, la componente arteriosa monitora la pressione tra l'accesso vascolare arterioso e la pompa sangue, mentre quella venosa tra il filtro dializzatore e l'accesso vascolare venoso. La pressione risulta negativa nel tratto di linea pre pompa (inizialmente è positiva a causa del pompaggio cardiaco) e aumenta a valori positivi post pompa (figura 7).

#### **Pressione**



**Figura 7** Profilo di pressione nel circuito sangue con fistola arterovenosa come accesso vascolare

La negatività della pressione arteriosa dipende dalla portata di sangue della fistola artero-venosa, dalla posizione e dal calibro degli aghi, dalla lunghezza e dal diametro delle linee sangue in rapporto alla velocità della pompa sangue. La vera e propria misurazione della pressione arteriosa nell'impianto di dialisi viene effettuata mediante uno strumento di misurazione elettronica, collegato con il tubo di misurazione della pressione attraverso l'interposizione di un filtro a membrana (protettore del trasduttore). Il segnale che arriva al trasduttore viene amplificato e convertito in un impulso elettrico.

La pressione arteriosa non deve essere troppo bassa (limite massimo fino a -150 mmHg) sia per evitare il collabimento (collasso) della parete del vaso dello shunt sull'ago arterioso, e quindi il danneggiamento della parete, sia per minimizzare il rischio di un'aspirazione d'aria nelle linee sangue.

La pressione venosa viene misurata tramite un tubicino che solitamente viene connesso al pozzetto venoso. A differenza di quella arteriosa, è una pressione positiva che dipende dalla velocità della pompa sangue e dalla resistenza dello shunt e dell'ago cannula venosa. Possibili problematiche, con conseguenti alterazioni del regime pressorio, possono essere una grave perdita di sangue nella linea venosa (con notevole abbassamento del valore della pressione) oppure un'occlusione della stessa per la presenza di trombi o coaguli.

### *Pompe peristaltiche*

Il sangue viene pompato nel circuito attraverso l'azione peristaltica di una pompa a un flusso che varia tra 200 ml/min a 600 ml/min. La pompa, che si trova tra l'accesso vascolare e il filtro dializzatore, è costituita da due rulli che, ruotando, "strozzano" il tubo e provocano l'avanzamento del sangue. La pompa è adattabile a diverse dimensioni del tubo che comprime. In ogni caso deve essere calibrata per una misurazione corretta del flusso sangue che, a sua volta, dipende dal diametro interno del tubo secondo la seguente relazione:

$$Q_b = \text{rpm} \times (\pi \times r^2 \times l)$$

dove  $Q_b$  è il flusso sangue, misurato in ml/min,  $r$  è il raggio interno dello spezzone pompa e  $l$  è la lunghezza dello stesso che viene compresso tra i 2 rulli.

A causa della limitata rigidità, lo spezzone tra i due rulli si appiattisce con un'elevata pressione negativa e questa formula sovrastima il  $Q_b$ .

Oltre alla pompa sangue, nel macchinario sono presenti altre pompe peristaltiche, utilizzate per infusioni di liquido di sostituzione, soluzioni fisiologiche o farmaci. Gli spezzoni pompa in questi casi sono dello stesso tipo di quelli utilizzati per la linea sangue.

### *Pompa di eparina*

Quando il sangue entra in contatto con superfici di materiali estranei all'organismo, entra in moto la cosiddetta cascata coagulativa, un meccanismo fisiologico che l'organismo stesso attua perché riconosce l'elemento come "no self".

In un circuito di dialisi, il sangue entra in contatto con diversi dispositivi artificiali che nel giro di poco tempo provocherebbero fenomeni di clotting o coagulazione con pericolose conseguenze per la salute del paziente.

Per ovviare a ciò, vengono utilizzati dei farmaci in grado di evitare questo fenomeno.

L'eparina è un farmaco anticoagulante in grado, come tale, di rallentare o interrompere il processo di coagulazione del sangue. Essa si lega naturalmente a un fattore del sangue, l'antitrombina III, un enzima inibitore che a seguito del legame con l'eparina stessa cambia conformazione esponendo il suo sito attivo. È proprio il cambiamento conformazionale dell'antitrombina III che permette di evitare il processo coagulativo.

Durante un trattamento dialitico, la dose di eparina da somministrare varia da paziente a paziente. Solitamente, si somministra una dose iniziale all'interno del circuito durante il cosiddetto priming (è il lavaggio del circuito prima della connessione con il paziente, viene eseguito per rimuovere l'aria dal circuito stesso), in modo tale da depositarne un po' sulle superfici interne di linee sangue e filtro dializzatore.

Successivamente ha luogo la somministrazione continua di una dose di mantenimento durante il trattamento. Il dosaggio iniziale si misura in unità internazionali (U.I.), la dose di mantenimento in U.I./ora. Spesso risulta di più facile gestione la conversione in ml, per cui 1 ml di eparina corrisponde a 5000 U.I.

La somministrazione di eparina durante il priming viene effettuata utilizzando l'apposito dispositivo per l'iniezione dei farmaci, di cui è provvista la linea sangue arteriosa, mentre per la dose di mantenimento si usa una pompa a siringa. L'eparina in questo caso viene infusa nel segmento del circuito con pressione positiva, quindi dopo la pompa sangue e prima del dializzatore. Se venisse infusa prima della pompa sangue, aumenterebbe il rischio di emboli d'aria.



### *Filtro dializzatore*

Il filtro dializzatore è il “cuore” del circuito di dialisi extracorporea. Le sue caratteristiche verranno approfondite nel dettaglio in seguito.

### *Rilevatore d'aria*

La presenza di bolle d'aria all'interno del circuito può essere causa di formazione di emboli e deve essere assolutamente evitata. Per questo motivo vengono utilizzati dei pozzetti lungo le linee sanguine, sia arteriosa che venosa, in modo tale che l'aria, meno densa del sangue, possa essere eliminata dall'alto.

Il rilevatore d'aria è posto sulla macchina come sostegno del pozzetto venoso. Questo dispositivo fa uso di una tecnologia ad ultrasuoni: se la diffusione degli ultrasuoni, i quali attraversano facilmente il sangue, diminuisce al di sotto di una soglia predeterminata a causa della presenza di micro bolle d'aria, scatta l'allarme nella macchina e, contemporaneamente, tramite la chiusura di una clamp automatica, il flusso nella linea venosa si arresta e la pompa sangue si ferma.

## **2.1.2 Circuito dializzato**

Il bagno di dialisi, o dializzato, è la soluzione che permette di depurare, tramite processi diffusivi, il sangue “contaminato” del paziente sottoposto a CRRT. Esso è costituito da tre elementi miscelati direttamente all'interno dell'apparecchiatura emodialitica:

- acqua di rete, sottoposta ad un processo di demineralizzazione mediante il passaggio attraverso resine a scambio ionico ed attraverso un sistema di osmosi inversa;
- sostanze tampone (bicarbonato o acetato) per il controllo del pH;
- elettroliti/sostanze osmoticamente attive (sostanze che il paziente deve assumere dal liquido di dialisi).

### *Trattamento dell'acqua*

Il sistema di trattamento dell'acqua, in un centro dialisi, è un parametro fondamentale per garantire le massime condizioni di sicurezza dei pazienti dializzati. Basti pensare che un paziente entra in contatto con circa 120 litri per ogni seduta dialitica e il fatto di garantire un liquido puro e privo di contaminanti è condizione necessaria e imprescindibile per la buona riuscita del trattamento.

Impianti di questo tipo devono rispondere a precisi requisiti e norme standardizzate secondo quanto prevede la AAMI (Association for the Advancement of Medical Instrumentation).

Il processo di purificazione dell'acqua può essere diviso in tre parti: pre-trattamento, purificazione e distribuzione.

Il processo di pre-trattamento consiste, prima di tutto, in una clorazione dell'acqua di rete: questa operazione permette una prima disinfezione che previene la proliferazione microbica negli steps successivi, l'ossidazione di sostanze organiche e inorganiche inibendo la possibile crescita di microorganismi e una stabilizzazione del pH dell'acqua. Segue la prefiltrazione, realizzata con 2 o più filtri a cartuccia in parallelo da 20-25  $\mu\text{m}$ , atta a eliminare impurità fisiche e sali metallici (ferro, manganese). Si ha poi il processo di addolcimento, il quale varia la composizione ionica dell'acqua. L'addolcimento è basato su uno scambio di ioni: il calcio e il magnesio (ioni "hard") contenuti nell'acqua grezza vengono scambiati con ioni sodio (ioni "soft"), i quali vengono fissati da una resina scambiatrice ed infine eliminati attraverso il successivo processo di osmosi inversa. Le resine presenti all'interno degli addolcitori devono essere rigenerate periodicamente.

La successiva fase della dechlorazione prevede l'utilizzo di filtri assorbenti (filtri a carbone attivo) attraverso i quali è possibile eliminare sostanze organiche quali composti alogenati, pesticidi, solventi industriali, oltre a cloro e clorammine, contaminanti potenzialmente molto pericolosi per i pazienti. I due dechloratori contengono carbone attivo granulare, sono molto costosi e hanno lo svantaggio di una possibile crescita batterica, motivo per il quale necessitano di una costante manutenzione. Come ultima fase, immediatamente prima del processo di purificazione per osmosi inversa, si ha la microfiltrazione, realizzata con due o più filtri a cartuccia, costituiti da fibre intrecciate, che eliminano particelle insolubili di diametro superiore ai 5  $\mu\text{m}$  agendo come un setaccio. Nella maggior parte dei casi, il sistema di pre-trattamento è preceduto da una valvola di miscelazione regolata appositamente per ottenere una temperatura adeguata e da una pompa per il controllo del flusso e della pressione dell'acqua.

Il processo di purificazione viene eseguito attraverso l'uso di una tecnologia a osmosi inversa. La depurazione dell'acqua pre-trattata tramite osmosi inversa permette di ottenere un liquido privo di germi e tossine, con un ottimo grado di purezza. La membrana di osmosi inversa agisce come un filtro con l'incredibile precisione di filtrazione di 0.5 nm, che corrisponde quasi al raggio dei singoli ioni dei sali in soluzione. Il cuore di questo impianto è un modulo a fibre cave o un modulo di avvolgimento a spirale che, similmente a un filtro, produce la de-salificazione e la purificazione biologica dell'acqua. Nel sottilissimo strato attivo del modulo (il cui spessore è compreso tra circa 0.1 e 0.25  $\mu\text{m}$ ) si liberano le molecole d'acqua ma non le sostanze contenute nell'acqua stessa. Per evitare un inquinamento batterico e un blocco dell'intero impianto, i moduli devono essere periodicamente lavati. L'osmosi viene definita come una diffusione ostacolata da una membrana semipermeabile. La diffusione è il fenomeno attraverso il quale soluzione di diversa concentrazione,

separate da una membrana permeabile, raggiungono un equilibrio di concentrazione. Le molecole d'acqua in condizioni di osmosi normale si sposterebbero dal lato della soluzione meno concentrata al lato della soluzione più concentrata, cioè dal lato dell'acqua pura a quello dell'acqua grezza; la forza conduttrice è la pressione osmotica, che dipende dalla differenza di concentrazione. L'osmosi inversa è il fenomeno contrario: infatti l'acqua in arrivo nell'impianto, al contrario di quanto si verifica nell'osmosi, viene spinta ad attraversare una membrana semipermeabile, costituita da un modulo a fibre cave di acetato di cellulosa o di poliammide o di polisulfone, mediante una pompa ad alta pressione, la quale permette di aumentare la pressione dell'acqua a valori che raggiungono i 70 bar; dopo il passaggio attraverso la membrana si ottiene il cosiddetto permeato (acqua pura deionizzata, sterile) e il concentrato rimanente (acqua di scarico) che viene eliminato o riutilizzato per il nuovo trattamento. Il trattamento per osmosi inversa garantisce l'eliminazione di oltre il 99% degli ioni, del 100% delle sostanze organiche con peso molecolare superiore ai 200 Da e la quasi completa rimozione di batteri e pirogeni. L'efficienza continua dell'impianto viene monitorata attraverso la misurazione di conducibilità, la determinazione degli elettroliti e di quella del numero dei germi.

Una volta depurata, l'acqua deve essere smistata alle varie postazioni di dialisi. Il circuito di distribuzione prevede, in linea di massima, una configurazione ad anello (loop), con varianti che ne permettono un miglior adattamento alle esigenze specifiche del centro. Talvolta l'acqua, prima di entrare nel circuito di distribuzione, viene contenuta in una tanica di stoccaggio che deve garantire la conservazione della sua purezza.

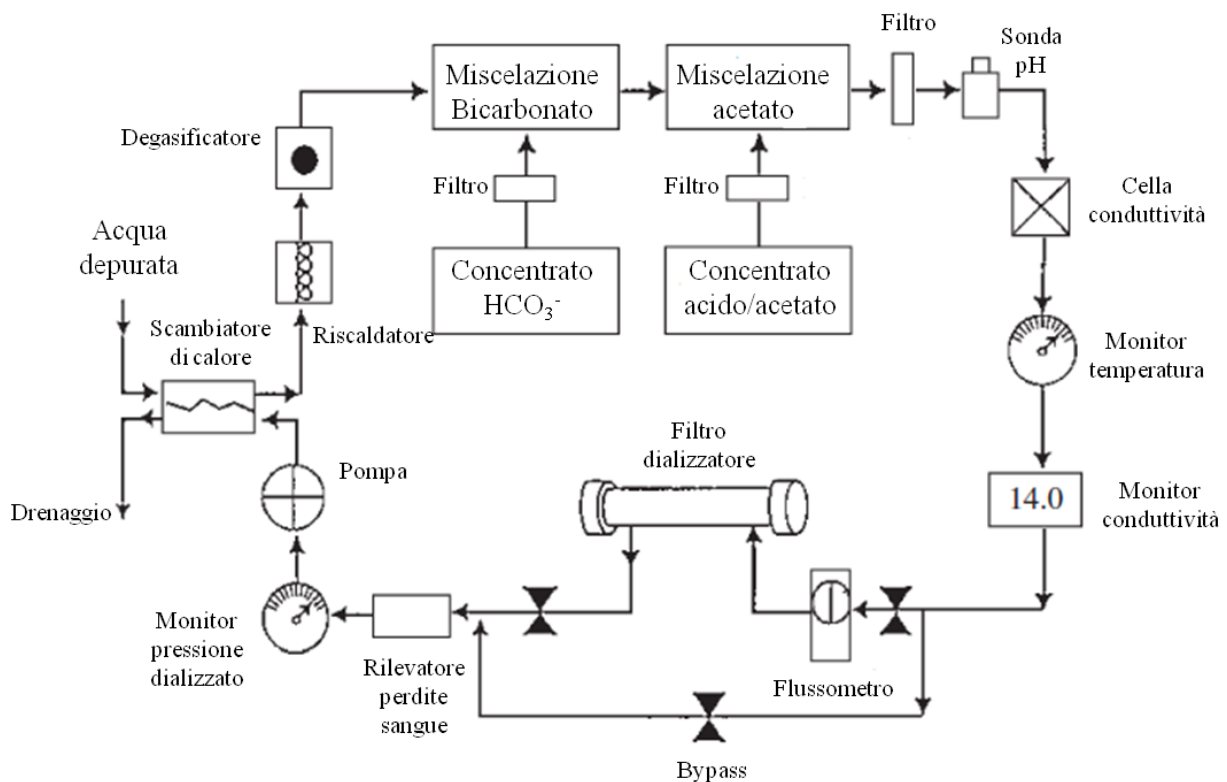
### *Produzione del dializzato*

Come detto prima, la composizione del dializzato prevede la presenza di acqua depurata, una soluzione tampone (bicarbonato o acetato), elettroliti e, eventualmente, glucosio. La preparazione del bagno di dialisi può essere centralizzata o individuale (cioè eseguita direttamente nella macchina), con quest'ultima da preferire per motivi terapeutici e igienici. Infatti essa permette di trattare ciascun paziente individualmente con un dializzato la cui concentrazione risulta ottimale in rapporto alle esigenze del singolo soggetto.

Uno degli scopi fondamentali della dialisi è, oltre all'eliminazione dei soluti e alla rimozione dei liquidi in eccesso, quello di correggere l'acidosi metabolica e, quindi, il pH. Per questo motivo viene aggiunta una sostanza tampone che può essere acetato (acetato dialisi) o bicarbonato (bicarbonato dialisi). Attualmente la seconda è la tecnica più utilizzata, in quanto la metabolizzazione dell'acetato in alcuni pazienti ha luogo insufficientemente o lentamente; ne

conseguono un accumulo di acetato durante la dialisi che provoca disturbi cardiocircolatori, crampi, cefalea, ipotensione e altri sintomi post trattamento dialitico. Per questo motivo, di seguito, verrà esaminato solo il circuito dializzato con il bicarbonato come soluzione tampone.

Le moderne macchine di dialisi prevedono sistemi “single pass” che non riutilizzano il liquido di dialisi dopo che lo stesso è circolato attraverso il filtro dializzatore. Un corretto utilizzo del dializzato prevede una regolazione e un controllo di parametri quali temperatura, concentrazione, flusso e pressione. I componenti chiave del circuito sono evidenziati in figura 8.



**Figura 8** Circuito dializzato

L'acqua che arriva dall'impianto di depurazione subisce prima di tutto un adeguato riscaldamento, in modo tale da evitare perdite di calore o surriscaldamento del corpo del paziente durante la dialisi. I limiti di temperatura vanno dai 33°C ai 39°C.

Il riscaldamento del dializzato libera i gas in soluzione in esso contenuti; poiché le bollicine di gas, depositandosi sulla membrana di dialisi, possono ridurre la superficie di scambio e quindi l'efficacia della dialisi stessa, nell'impianto viene realizzata anche una degasificazione del dializzato.

La miscelazione con il bicarbonato, gli elettroliti e, eventualmente, il glucosio viene effettuata nello stadio successivo. La componente basica (il bicarbonato) e la componente acida (elettroliti) sono

disponibili in forma concentrata e la miscelazione avviene nell'impianto di dialisi per mezzo di pompe dosatrici o proporzionali.

La componente acida ha  $\text{pH}=3$  e contiene elettroliti cationici, di concentrazione simile a quella del liquido plasmatico, come  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^+$ , elettroliti anionici come  $\text{Cl}^-$ , e acido acetico  $\text{CH}_3\text{COOH}$ .

La componente basica ha  $\text{pH}\approx 7$  (può raggiungere anche  $\text{pH}=8$ ) e contiene bicarbonato come sale sodico  $\text{NaHCO}_3$ , cui eventualmente viene aggiunto del cloruro di sodio.

La concentrazione, la temperatura, la conducibilità (pH), la pressione e il flusso sono parametri importanti che vengono costantemente monitorati prima dell'ingresso del dializzato all'interno del dializzatore durante la terapia (vedi figura 8). Nei casi di terapie in cui la diffusione non sia prevista (per esempio ultrafiltrazione semplice), il filtro dializzatore viene "bypassato" dal liquido stesso che dunque finisce direttamente allo scarico. I valori di flusso, gestito tramite una pompa, che vengono solitamente utilizzati sono 300 ml/min, 500 ml/min o 800 ml/min.

## **2.2 Dialisi peritoneale**

La dialisi peritoneale può essere un'alternativa alla dialisi extracorporea. Vi sono diverse metodiche di dialisi peritoneale: la dialisi peritoneale ambulatoriale o CAPD, che comporta scambi manuali, e la dialisi peritoneale automatizzata o APD, dove invece gli scambi sono gestiti automaticamente dalla macchina. Per poter eseguire la dialisi peritoneale è necessario inserire chirurgicamente, in anestesia locale, un piccolo catetere in silicone nella cavità addominale al fine di permettere l'ingresso e l'uscita del liquido dializzante della cavità stessa.

La CAPD è una metodica continua e il trattamento consiste nel riempire l'addome con un liquido dializzante, contenuto in apposite sacche, e vuotarlo dopo una sosta di circa 6 ore. Sono in genere necessari 4 scambi distribuiti equamente durante la giornata. Mentre il liquido è nell'addome si è liberi di dedicarsi alle abituali attività della vita quotidiana.

La metodica APD prevede il collegamento del catetere peritoneale ad una membrana (cycler) che provvede automaticamente a scambiare il liquido nell'addome.

La scelta di una terapia piuttosto di un'altra dipende dal consiglio del medico, dalla gravità della malattia e dalla preferenza espressa dal paziente.

## **2.3 Trapianto**

L'intervento chirurgico e il trapianto renale (da donatore o da cadavere) rappresentano l'ultimo dei possibili trattamenti dell'IRC. Risulta ovviamente un'operazione invasiva e porta con se tutte le problematiche relative a una terapia antirigetto, che in ogni caso non saranno trattati in questa sede.

### 3. Il filtro dializzatore

Il filtro dializzatore è il “cuore” vero e proprio del circuito di dialisi, tanto che viene chiamato “rene artificiale” proprio per questo motivo. In esso avvengono gli scambi e i fenomeni di trasporto che permettono al sangue di essere depurato.

I filtri (figura 9) sono propriamente prodotti biomedicali monouso, anche se talvolta, per motivi economici, si è costretti al loro riutilizzo.



**Figura 9** Filtro dializzatore monouso.

Prerequisito per qualsiasi prodotto biomedicale è la biocompatibilità; nel caso specifico dei filtri, essi devono rispondere a precise proprietà per garantire l'emocompatibilità, in quanto dispositivi comunicanti esternamente con il sangue. La normativa che disciplina le prove *in vitro* ed *in vivo* per questo tipo di dispositivi biomedicali è la UNI EN ISO 10993-4: essa prevede test riguardanti trombosi, coagulazione, funzionalità delle piastrine, parametri ematologici e immunologici.

Da un punto di vista ingegneristico un dializzatore può essere considerato semplicemente come uno scambiatore di massa.

La sua funzionalità dipende da:

- Composizione della membrana
- Geometria e disposizione della membrana
- Modalità di utilizzo
- Biocompatibilità/emocompatibilità
- Sterilizzazione

Le caratteristiche fondamentali che un filtro ideale dovrebbe avere sono:

- Grandi superfici di scambi per un pieno sfruttamento
- Dimensioni ridotte
- Geometria di flusso ottimale per sangue e dializzato
- Alta *clearance* (rimozione) per molecole tossiche di piccolo e medio peso molecolare
- Perdita trascurabile di soluti vitali (albumina)
- Portata di ultrafiltrazione adeguata al tipo di trattamento
- Volume ematico residuo limitato
- Costi di produzione minimi

Risulta evidente come alcune delle caratteristiche richieste siano in contraddizione tra loro; di conseguenza, dal punto di vista progettuale, bisogna ottenere un buon compromesso attraverso diverse soluzioni specifiche a seconda della singola richiesta [3].

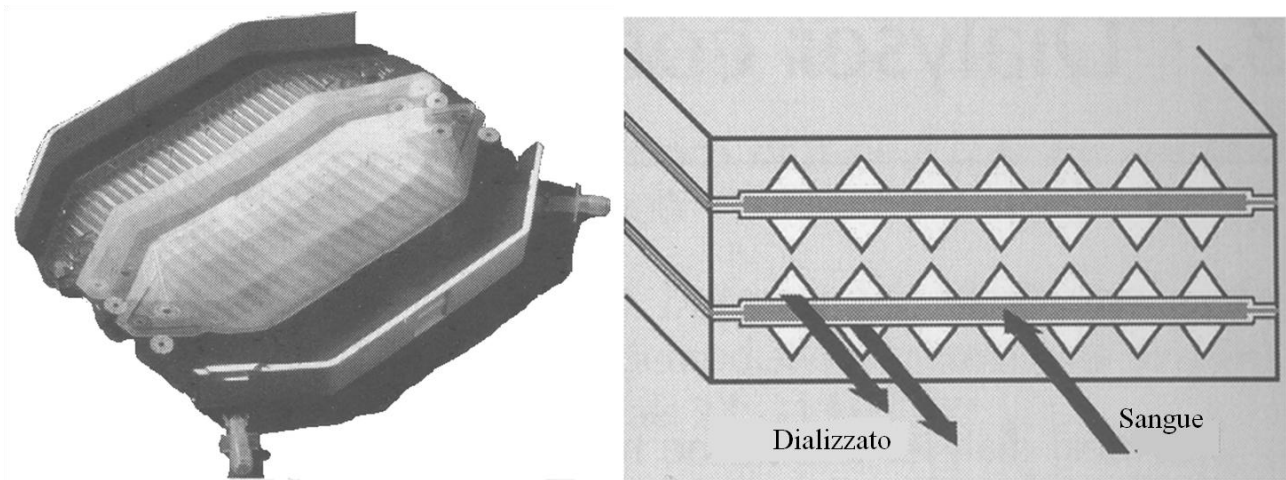
### 3.1 Struttura e geometria

I filtri a rotolo furono i primi filtri utilizzati in campo clinico. Risalgono agli anni '50 ed erano costituiti da una membrana avvolta a rotolo contenente un manicotto di plastica di sostegno. Furono successivamente sostituiti da una membrana tubolare, racchiusa fra due supporti di fibra di vetro, avvolta ed incollata attorno ad un nucleo centrale. Questi filtri avevano un'elevata capacità volumetrica nel comparto sangue (1.2 – 1.8 L) e un'elevata resistenza al flusso sangue (che è in ogni caso dipendente dall'ematocrito). In realtà furono rapidamente sostituiti dalla comparsa di filtri a piastre e capillari, capaci di assicurare una migliore rimozione e caratterizzati da un minore volume del compartimento ematico.

I filtri a piastre (figura 10) sono entrati in commercio a partire dagli anni '60. Attualmente vengono prodotti e commercializzati solo da un'azienda (gruppo *Gambro, Lund, Svezia*).

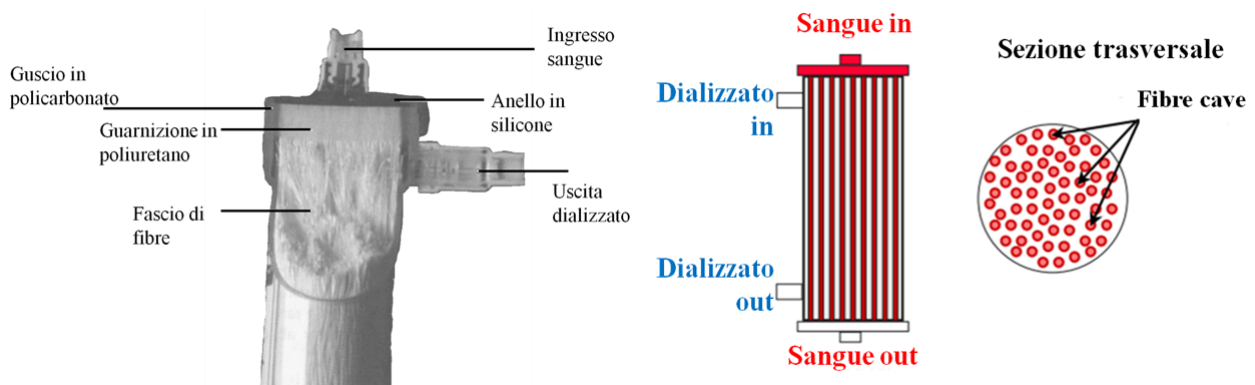
Le membrane di questi filtri, costituite da fibre di cellulosa, vengono impilate longitudinalmente con orientazione parallela alla direzione della scanalature di supporti che vengono impiegati per motivi strutturali. Questi filtri non contengono, a differenza di quelli a fibre cave, poliuretano: ciò permette una sterilizzazione con ossido di etilene molto più semplice. Il loro uso, molto esteso durante la prima metà degli anni '70, è diminuito notevolmente con l'avvento dei filtri a fibre cave.





**Figura 10** Filtri a piastre[4]

Attualmente, i filtri utilizzati in tutto il mondo sono quelli a fibre cave o capillari (figura 11). Questi dializzatori sono costituiti da un fascio di fibre (10000-15000) fissato agli estremi con guarnizioni in poliuretano e attraverso un anello in silicone. Un sofisticato processo di taglio durante la fase produttiva risulta necessario per ottenere una superficie finale liscia in modo tale da assicurare una minima attivazione dei processi umorali e cellulari nel sangue. Il guscio esterno di contenimento è in policarbonato, biomateriale che garantisce buona biocompatibilità, resistenza chimica e meccanica. Agli estremi del guscio (*housing*) vi sono le porte di ingresso e uscita di sangue e dializzato. Il sangue viene fatto passare tra le fibre dalle quali esce depurato, mentre il liquido di dialisi negli spazi tra fibra e fibra.



**Figura 11** Componenti e funzionamento di un filtro a fibre cave

Le caratteristiche e il rendimento di un dializzatore sono prima di tutto influenzate dalla dimensione e dalla geometria del fascio di fibre che esso contiene. Il volume del comparto sangue deve essere il

più basso possibile (il volume di sangue nel compartimento ematico e quello residuo non superano rispettivamente, nei casi limite, i 120 ml e 1 ml) e ogni fibra dovrebbe essere circondata da un flusso uniforme di liquido di dialisi durante il trattamento. A tal proposito, sono state progettate, nel corso degli anni recenti, diverse configurazioni del fascio di fibre: distribuzione a blocchi rettangolari, configurazione “cross flow” in cui il liquido di dialisi scorre attraverso le fibre anziché lungo di esse, fasci multipli, uso di un solido centrale con le fibre avvolte a spirale, o maglie di fibre cave deformate. Oggi, alternativamente alla disposizione standard già esposta, la configurazione può far uso di fibre ondulate (struttura *moirè*) oppure di multifilamenti (*spacer yarns*) interposti tra le fibre, in modo tale da garantire un flusso continuo ed uniforme del liquido di dialisi[5].

### 3.2 Membrane di dialisi

Una membrana artificiale è definita come un fase – solida, liquida o gassosa – caratterizzata in genere da un elevatissimo rapporto superficie/spessore, capace di lasciarsi attraversare selettivamente, sotto adatte forze applicate, da materia o energia. La dialisi si basa su processi di scambio fra due compartimenti, il sangue e il dializzato, governati da gradienti di concentrazione (diffusione) o di pressione idrostatica (ultrafiltrazione e convezione), singolarmente o in associazione tra di loro, e pertanto il ruolo della membrana come elemento di separazione e di trasporto selettivo di soluti risulta determinante.

Le membrane di dialisi, assieme alle parti di sostegno, sono parte fondamentale della struttura del dializzatore e corrispondono, nel senso comune del termine, ad un filtro. Sono una massa spugnosa con pori di varia grandezza attraverso i quali i soluti, di diverse dimensioni, vengono eliminati. Esse sono caratterizzate da alcuni parametri funzionali che ne determinano le proprietà e gli usi:

*Area di scambio A*: l’area efficace di scambio è la superficie effettiva che entra in contatto con il sangue e ne permette la depurazione. L’area di scambio si può esprimere come segue:

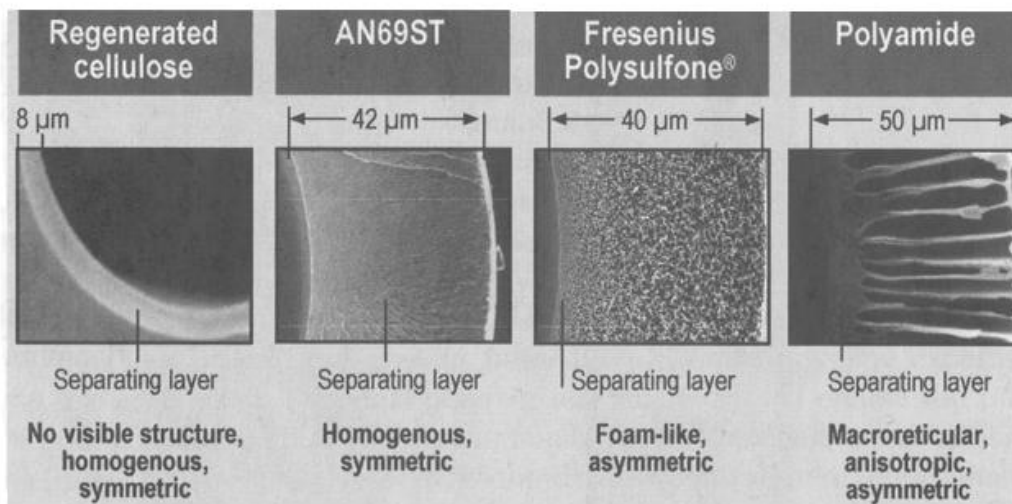
$$A = 2 \pi r \times l \times N_f$$

dove  $r$  è il raggio interno delle fibre,  $l$  è la loro lunghezza e  $N_f$  è il numero di fibre.

L’area di scambio risulta essere un parametro fondamentale per la scelta del trattamento (emodialisi, emofiltrazione, emodiafiltrazione). I valori limite di area per i filtri a fibra cave va da 1 m<sup>2</sup> ai 2.4 m<sup>2</sup>. Il termine "dializzatori a grandi superfici" indica filtri con una superficie maggiore di 1.6 m<sup>2</sup>. Maggiore è l’area di scambio, maggiore è il coefficiente di ultrafiltrazione ( $K_{UF}$ ).

*Diametro interno:* il diametro interno delle fibre è compreso tra i 100 µm e i 300 µm. E' un altro parametro fondamentale perché aumentando il suo valore, aumenta anche l'area di scambio secondo la relazione scritta precedentemente[6].

*Spessore:* lo spessore delle fibre risulta determinante nel passaggio dei soluti per diffusione. Per la legge di Fick, il flusso diffusivo J è inversamente proporzionale alla distanza Δx tra lato sangue e dializzato e, quindi, allo spessore. I valori dello spessore della fibre variano dai 5 µm ai 40 µm.



**Figura 12** Struttura e spessori di diverse membrane di dialisi[4]

Come si può notare, lo spessore delle membrane cellulosiche deve essere molto più piccolo, in modo tale da aumentare il trasporto diffusivo, e deve avere una struttura uniforme e simmetrica.

*Coefficiente di ultrafiltrazione  $K_{UF}$ :* uno degli obiettivi della dialisi è quello di rimuovere acqua dai pazienti iperidratati. Affinché ciò avvenga, le membrane di dialisi devono avere un'alta permeabilità idraulica. Questa è definita come il flusso d'acqua per unità di area della membrana per il gradiente di pressione (ml/min/cm<sup>2</sup>/mmHg).

Il  $K_{UF}$  viene usato nella pratica per caratterizzare la permeabilità all'acqua ( $L_h$ ) di un dializzatore.

Esso è dato da:

$$K_{UF} = L_h \times A$$

dove A è la superficie efficace di scambio della membrana e  $L_h$  è la permeabilità idraulica.

La permeabilità idraulica  $L_h$  dipende in maniera sensibile dalla porosità della membrana, in particolare dalla dimensione, dalla forma e dal numero dei pori. Si può infatti dire che la

permeabilità idraulica dipende dalla porosità della membrana la quale, a sua volta, è determinata dalla densità  $\rho$ :

$$\rho = N \times \pi \times R_p^2$$

dove  $N$  è il numero di pori e  $R_p$  è raggio dei pori.

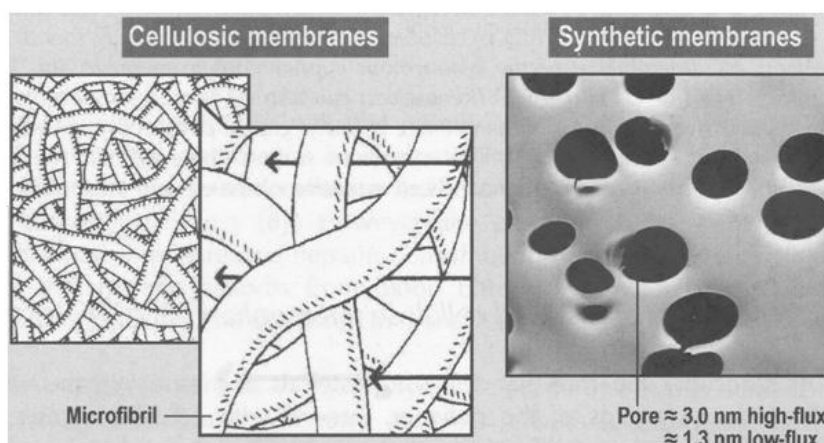
Il coefficiente di ultrafiltrazione dipende in gran parte dal tipo di materiale utilizzato per la membrana e dalla dimensione dei pori.

Il valore del  $K_{UF}$  per cui un dializzatore può essere considerato *high-flux* o *low-flux* è oggetto tutt'ora di grosso dibattito in letteratura. In Europa questo limite è 20 ml/ora/mmHg e, in questo lavoro, tale valore verrà preso in considerazione. Quindi sono detti filtri *high-flux* quelli in cui il fattore di ultrafiltrazione è superiore a 20 ml/ora/mmHg. Attraverso questi filtri è possibile rimuovere molecole a più alto peso molecolare.

*Coefficiente di permeabilità diffusiva  $K_0$* : il coefficiente di permeabilità diffusiva  $K_0$  è inversamente proporzionale alla resistenza totale di tutti e tre i “compartimenti” (layers) che si oppongono al movimento diffusivo: il lato sangue, la membrana in sé e il comparto dializzato. Di conseguenza,  $K_0$  è influenzata principalmente dalle proprietà della membrana (come lo spessore) e dalle proprietà dei singoli soluti (come il coefficiente di diffusività  $D$ ), mentre lo è molto meno dalle variazioni di temperatura a causa del ristretto *range* permesso per motivi fisiologici. Spesso risulta più utile considerare anche l'area di scambio  $A$  nella costante per permettere un confronto completo tra i dializzatori.  $K_0A$ , misurata in ml/min, è una proprietà del dializzatore indicata come coefficiente di trasferimento di massa.

Il coefficiente di trasferimento di massa riflette la capacità intrinseca del dializzatore di rimuovere un particolare soluto.

*Dimensioni e morfologia dei pori*: la porosità è caratterizzata dal numero, dalla dimensione e dalla morfologia dei pori. Tali variabili dipendono dalla categoria di materiale a cui appartengono le membrane: nelle membrane cellulosiche, il trasporto di soluti avviene attraverso “spazi” formati dalle micro-fibrille. Al contrario, le membrane sintetiche contengono pori distinti che si formano durante il processo di filatura (figura 13). Di conseguenza, la dimensione media nelle membrane cellulosiche ha una dispersione molto alta, cosa che invece è molto più ristretta in quelle sintetiche.



**Figura 13** Struttura e morfologia dei pori in membrane cellulosiche e sintetiche[4]

Conseguentemente le membrane, a seconda della loro struttura, possono essere classificate come microporose (simmetriche) o asimmetriche; le membrane microporose sono poi ulteriormente suddivise in isotrope, che presentano pori di dimensioni uniformi in tutta la membrana, o anisotrope, in cui, invece, le dimensioni dei pori cambiano passando da una superficie all'altra (lato sangue-lato dializzato). Le membrane microporose vengono generalmente progettate per trattenere tutte le particelle al di sopra di una certa dimensione; ad esempio una membrana con *cut off* di 50000 Da non permette il passaggio di particelle di pesi molecolari superiori ai 50000 Da mentre risulta permeabile a molecole di peso pari o inferiore ai 50000Da. E' stato infatti osservato che i pori sono di solito più grandi delle particelle che trattengono e che esiste una certa distribuzione delle dimensioni dei pori lungo la superficie della membrana, perciò le particelle che sono all'incirca delle stesse dimensioni dei pori, possono parzialmente penetrarvi all'interno ed ostruirli; i pori più grandi quindi, che inizialmente hanno i flussi maggiori al loro interno, sono i primi ad ostruirsi. Questo giustifica la classica rapida diminuzione dei flussi nei primi minuti di funzionamento che si osserva con questo tipo di membrane.

Le membrane asimmetriche, invece, sono caratterizzate da uno *skin* sottile, che costituisce lo strato attivo, sulla superficie della membrana, mentre gli strati al di sotto sono caratterizzati da elevata porosità e hanno lo scopo di supportare lo strato attivo. La separazione avviene ancora una volta sulla superficie, ma in virtù di questa particolare struttura, le particelle trattenute o le molecole al di sopra di un certo peso molecolare non possono penetrare nel corpo principale della membrana.

Un'importante differenza fra le membrane microporose e quelle asimmetriche sta nella definizione dei limiti di reiezione; per le membrane microporose esiste un limite assoluto in termini di massimo diametro equivalente del poro, e cioè esse trattengono tutte le particelle con dimensioni al di sopra di tale valore, fino a specifici limiti di concentrazione in alimentazione; per le membrane asimmetriche invece sono forniti dei valori nominali, che si riferiscono alle dimensioni delle

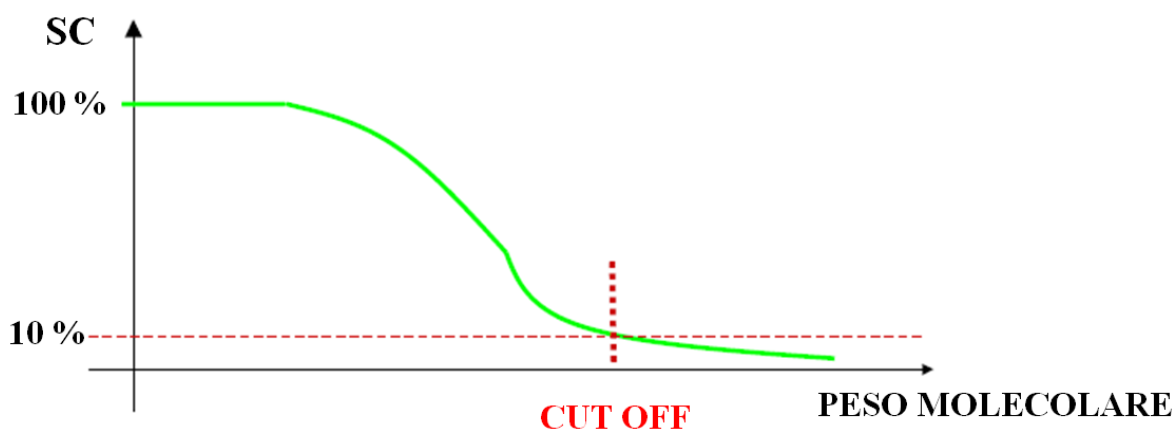
molecole o al peso molecolare sopra il quale una certa percentuale di soluto della soluzione di alimentazione viene trattenuto dalla membrana, sotto specifiche e controllate condizioni operative.

*Coefficiente di sieving SC*: il coefficiente di *sieving* SC (*sieving coefficient*) è definito come il rapporto tra la concentrazione di un soluto nell'ultrafiltrato in uscita dal filtro e la concentrazione dello stesso nell'acqua plasmatica in ingresso del filtro:

$$SC = C_{UF} / C_{PW}$$

Il SC è determinato dalle caratteristiche del soluto in considerazione (il peso molecolare) e dalle caratteristiche fisiche della membrana, come per esempio la dimensione e la morfologia dei pori (che a loro volta dipendono dal materiale).

Se, per una determinata “coppia” membrana-soluto, il SC=1 (100%), il soluto passa liberamente, se SC=0 il soluto non passa attraverso la membrana (figura 14).



**Figura 14** Grafico SC in funzione del peso molecolare dei soluti

*Cut off*: il limite di separazione (*cut off*) è la massima permeabilità di una membrana ad un soluto. Questo indice è definito come il valore del peso molecolare (MW) al quale corrisponde un *sieving coefficient* di 0.1 (10%) (figura 24). Il Cut Off può variare da membrana a membrana, ma in linea di massima è pari a circa 50000 Da, peso molecolare leggermente inferiore a quello dell'albumina (60000-65000 Da), una proteina del plasma che non deve essere eliminata durante il trattamento dialitico.

### 3.3 Materiali per membrane

Le tecniche di produzione di membrane semipermeabili partendo da materiali naturali sono note fin dall'inizio del secolo ma, in risposta a particolari esigenze di separazione, negli ultimi decenni si

sono sviluppate tecnologie di produzione di membrane sintetiche a partire da polimeri. Nel settore della dialisi, le membrane possono essere grossolanamente classificate in due grandi famiglie, CELLULOSICHE e SINTETICHE (ulteriormente distinte in idrofiliche e idrofobiche), ma questi concetti, con il progresso biotecnologico, tendono ad assumere contorni sempre più sfumati in presenza di ibridazioni mirate allo sviluppo di caratteristiche specifiche. Oggi esiste in effetti la possibilità di rendere le membrane più o meno idrofiliche con l'aggiunta di sostanze come il polivinilpirrolidone (PVP) all'interno della struttura in fase di estrusione o copolimerizzandole durante il processo di produzione con polimeri idrofilici come l'acrilamide o il metallilsulfonato.

### 3.3.1 Membrane cellulose

La cellulosa è un polimero naturale semicristallino derivato dalla ripetizione di unità di cellobiosio, costituito da due molecole di D-glucosio ciascuna contenente tre gruppi idrossilici (figura 15), legate mediante legame 1→4 β-glucosidico.

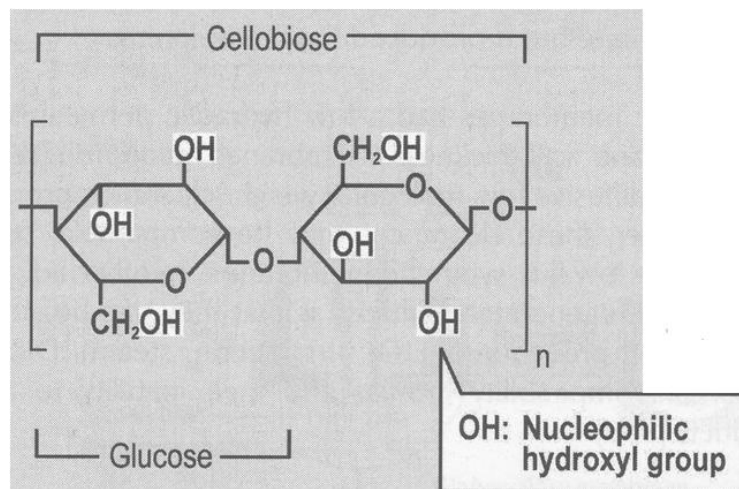


Figura 15 Struttura chimica del cellobiosio[4]

Data l'insolubilità del polimero naturale, per la preparazione di queste membrane vengono utilizzati derivati ottenuti per acetilazione (acetato, diacetato e triacetato) o per formazione di complessi amminici con il rame (cuprammonio), successivamente liquefatti o sciolti in solventi. Il materiale così ottenuto, risulta fortemente idrofilo e le membrane, al momento della loro formazione, hanno un notevole contenuto in acqua. Il grado di idrofilia deriva dalla struttura polimerica della cellulosa, fortemente polare in soluzione. Questa polarità, che conferisce alla membrana una elevata capacità di idratazione e una conseguente elevata  $K_0$ , è dovuta alla capacità dei gruppi idrossilici di

superficie di formare legami a ponte d'idrogeno. A loro volta i gruppi OH sono responsabili della scarsa emocompatibilità in quanto determinano una forte attivazione del sistema del complemento e del sistema cellulare. Per mantenere nel tempo la  $K_0$  iniziale, le membrane vengono conservate in una soluzione arricchita in glicerina fino al 40% del peso del polimero. Nella successiva fase di lavaggio l'acqua va a rimpiazzare la glicerina occupando, durante l'uso, dal 40 al 50% della struttura.

Dal 1965 a oggi è stato possibile, mediante procedimenti come lo stiramento bidirezionale, ridurre lo spessore delle membrane cellulosiche fino 5  $\mu\text{m}$  (lo spessore deve essere molto basso per garantire le caratteristiche di diffusibilità richieste) e incrementare il diametro dei pori fino a 50 Å, migliorando i coefficienti di diffusibilità ( $K_0$ ) e di ultrafiltrazione ( $K_{UF}$ ). La porosità di questo tipo di membrane garantisce ottime  $K_0$  per i soluti a basso peso molecolare, mentre il trasporto di quelli a peso medio-alto viene generalmente penalizzato. Le capacità di adsorbimento proteico sono ridotte, caratteristica che deriva dalla scarsa emocompatibilità ma che, d'altro canto, garantisce una buona costanza di prestazioni durante il trattamento.

Vengono elencate di seguito le principali membrane cellulosiche.

#### *Acetato, diacetato e triacetato di cellulosa*

L'acetato di cellulosa in configurazione capillare è entrato in uso in dialisi nella seconda metà degli anni '60 risolvendo, in ragione della rigidità del compartimento ematico caratteristica delle fibre cave autosupportate, almeno tre dei problemi tipici dei filtri a piastre o a rotolo fino ad allora in uso: le dimensioni complessive dei filtri (rendendone possibile la miniaturizzazione), il volume di *priming* in statica (riducendo la capacità del circuito ematico) e quello in dinamica. L'acetilazione della cellulosa, ottenuta pretrattando il polimero puro con acido acetico e con anidride acetica e acido acetico in presenza di acido solforico come catalizzatore, condotta in gradi diversi, condotta più o meno estesamente, consente di ottenere l'acetato di cellulosa. La reazione di due (diacetato) o tre (triacetato) gruppi idrossilici con radicali acetati incrementa l'emocompatibilità (figura 16).



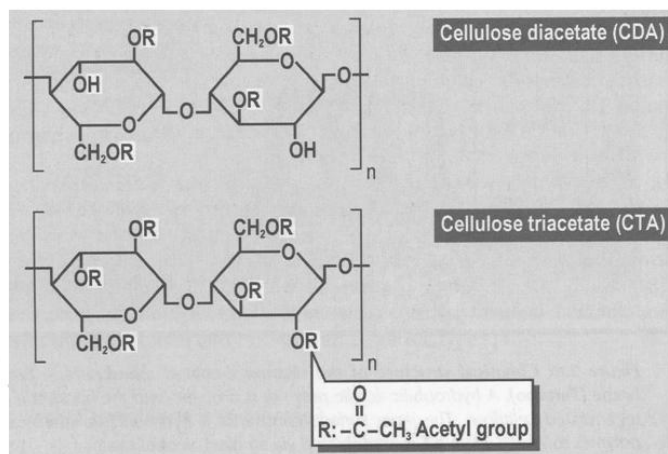


Figura 16 Struttura chimica del diacetato e triacetato di cellulosa[4]

In seguito a tale trasformazione, la membrana assume caratteristiche relativamente idrofobiche e non si verificano variazioni significative di struttura una volta che sia entrata in contatto con l'acqua. Durante la dialisi, queste caratteristiche di idrofobicità consentono l'adsorbimento di uno strato di proteine sulla superficie interna delle fibre. Nel triacetato di cellulosa, tutti i gruppi reattivi sulla superficie della struttura vengono bloccati con radicali acetilici e la membrana conserva molte delle caratteristiche delle altre membrane cellulose, dimostrando nel contempo una migliore emocompatibilità e più elevati  $K_{UF}$ . Dal punto di vista depurativo il triacetato sembra costituire il punto di incontro fra le caratteristiche positive delle membrane cellulose (alta  $K_0$  per i soluti a piccolo peso) e quelle, altrettanto positive, di alcune membrane sintetiche (buona  $K_0$  per i soluti a medio-alto peso). L'elevato  $K_{UF}$  rende la membrana adatta alla dialisi *high-flux*. Gli esteri acetilici sono sensibili alle variazioni di pH: in un ambiente alcalino tende a deacetilare la membrana mentre un ambiente acido tende a idrolizzare il polimero. Queste membrane sono scarsamente resistenti alle alte temperature, per cui è difficile sottoporle a sterilizzazione a caldo, mentre non si verificano variazioni importanti nelle loro caratteristiche fisiche se sterilizzate con ossido di etilene (ETO) o mediante raggi gamma.

### Cuprophane®

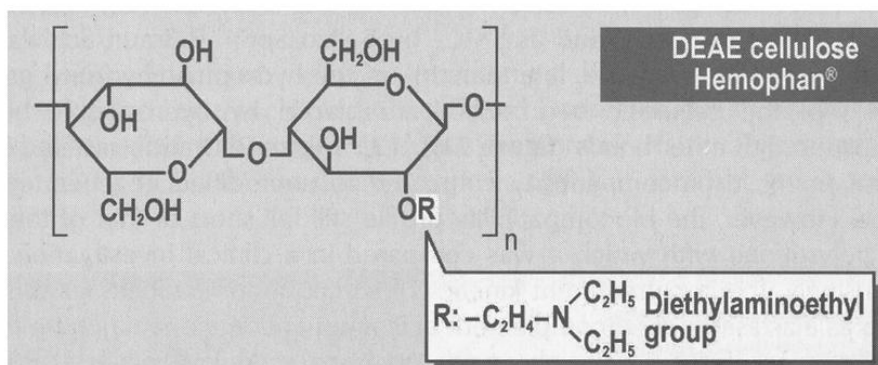
Il cuprophane possiede una struttura fibrillare di cellulosa e può essere considerata come la madre di tutte le membrane anche se oggi il suo uso va scomparendo. Di struttura simmetrica e omogenea si presta molto bene al trasporto dei soluti a basso peso molecolare. Offre prestazioni meno buone nei confronti dei soluti a medio-alto peso molecolare, anche se l'evoluzione tecnologica ne ha consentito l'assottigliamento dello spessore fino a portarlo a 5-6  $\mu\text{m}$ . Il suo campo di applicazione è

limitato all'emodialisi standard, non essendone proponibile l'impiego in trattamenti in cui sia presente l'ultrafiltrazione a causa del modesto  $K_{UF}$ . Tale membrana presenta inoltre notevoli problemi per quanto riguarda l'emocompatibilità: i gruppi idrossilici attivi presenti sulla sua superficie sono i maggiori responsabili dell'attivazione del complemento nel contatto con il sangue, questione che sta decretando l'abbandono di questo tipo di membrane.

Un aspetto positivo di tale membrana è il costo che risulta il più basso tra tutte le membrane per dialisi.

### *Hemophan®*

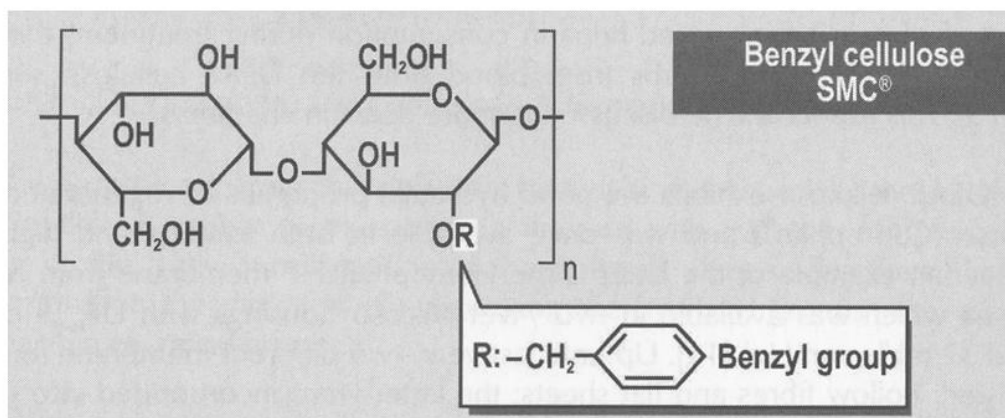
Questa membrana mantiene le caratteristiche fondamentali del Cuprophan, risultando particolarmente efficiente nella rimozione di soluti a piccolo peso. Hemophan risulta simile a cuprophan anche per ciò che riguarda le limitazioni nei confronti del trasporto dei soluti a più alto ingombro sterico e del  $K_{UF}$ , ma risulta migliore per quanto riguarda le caratteristiche di emocompatibilità. Come il Cuprophan, ha una struttura fibrillare di cellulosa, omogenea e simmetrica, modificata però con l'introduzione per via sintetica di gruppi amminici terziari in sostituzione dei gruppi idrossilici (figura 17). Questo intervento riguarda un numero molto basso di gruppi idrossilici (circa il 5%), per cui non ne vengono alterate le caratteristiche di resistenza meccanica. E' pertanto una membrana molto flessibile, sterilizzabile con tutti gli agenti oggi in uso, alcuni dei quali sono però in grado di modificarne le permeabilità. Anche hemophan presenta un costo contenuto.



**Figura 17** Struttura chimica del Hemophan®[4]

## Cellulosa modificata sinteticamente

La cellulosa modificata sinteticamente si ottiene per sostituzione dei gruppi ossidrilici con gruppi benzilici a carica superficiale nulla (figura 18).



**Figura 18** Struttura chimica della cellulosa modificata sinteticamente (SMC)[4]

La principale caratteristica della cellulosa modificata sinteticamente (Synthetically Modified Cellulose, SMC o Polysynthane PSN<sup>®</sup>) (che prende anche il nome di Polysynthane PSN<sup>®</sup>) è rappresentata dal polimero impiegato, che ha la peculiarità di essere costituito da zone idrofobiche (gruppi benzilici) in una matrice idrofila (gruppi ossidrilici/cellulosa). Ne deriva un miglioramento delle caratteristiche di emocompatibilità e una bassa trombogenicità, senza riduzione della resistenza meccanica tipica delle membrane cellulose. Buono sembra il comportamento nei confronti dell'attivazione del complemento (C3a) e del complesso trombina-antitrombina III, per il quale non sono state dimostrate differenze significative rispetto ad altre membrane a basso flusso anche di origine sintetica.

Anche la SMC può essere sterilizzata con qualsiasi metodica. Come nel caso di Cuprophan ed Hemophan, bisogna però tener conto che l'irraggiamento gamma è in grado di produrre un cambiamento sostanziale della struttura chimica della membrana, modificando i legami delle molecole e variando l'idrofilicità e il  $K_{UF}$  (diminuzione delle *clearance* dei soluti a medio-alto peso e dell'ultrafiltrazione). La sterilizzazione a vapore non provoca invece alterazioni del  $K_{UF}$  ma agisce negativamente sulle  $K_0$  dei soluti a basso peso molecolare.

### 3.3.2 Membrane sintetiche

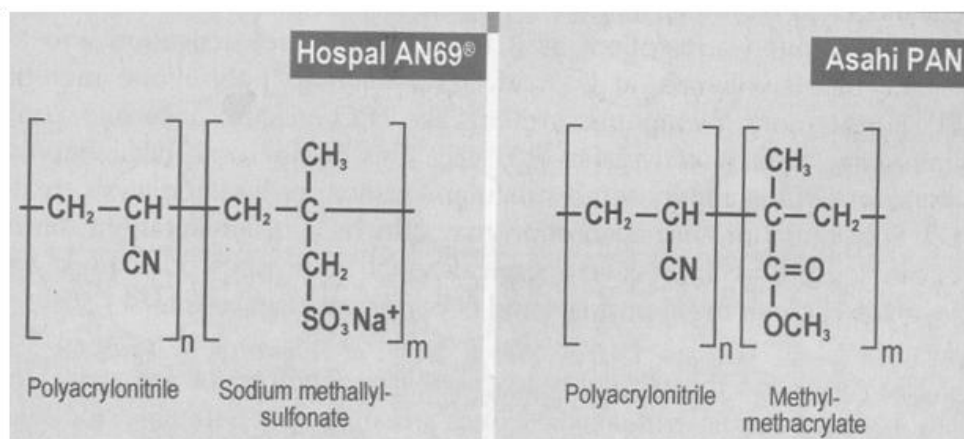
Le membrane sintetiche sono quelle più utilizzate in ambito dialitico perché sono maggiormente “biocompatibili” e permettono modalità di rimozione decisamente migliori garantendo principalmente l’effetto convettivo e quindi l’eliminazione di sostanze a più alto peso molecolare (ad es. la  $\beta$  2 microglobulina).

Ad eccezione del Copolimero etilenvinilalcol (EVAL), le membrane sintetiche sono tutte idrofobiche, garantendo di conseguenza una migliore biocompatibilità rispetto alle membrane cellulosiche. Di contro, queste membrane hanno l’inconveniente della cosiddetta *backfiltration*, fenomeno che riguarda un pressione negativa sul lato sangue nella seconda metà della lunghezza del filtro e che provoca, come dice il termine stesso, il passaggio di solvente e soluti dal lato dializzato al lato sangue (verrà comunque esposto in maniera esauriente nel successivo capitolo). Per questo si è cercato di aumentare le caratteristiche idrofiliche attraverso l’utilizzo di additivi e, soprattutto, copolimeri.

Vengono di seguito elencate le principali membrane sintetiche.

#### *Poliacrilonitrile (PAN)*

Dalla necessità di poter disporre di membrane per dialisi con maggiore permeabilità ai soluti di medio peso molecolare rispetto al cuprophan, nel 1970, nasce la prima membrana per dialisi sintetica ad alta permeabilità a base di poliacrilonitrile (PAN), denominata PAN AN69 (Hospal) . Nella versione originale è una membrana sintetica idrofobica per la cui produzione viene utilizzato come materia prima un copolimero di poliacrilonitrile metallil-sulfonato di sodio ottenuto con un procedimento di addizione lineare di due monomeri dalle caratteristiche chimico-fisiche differenti: l'acrilonitrile è idrofobico mentre il metallil-sulfonato è idrofilico (figura 19). L’hospital AN69 ha una struttura simmetrica (mentre asimmetrica è quella dei PAN di produzione Asahi, copolimero non sulfonato ottenuto dall'addizione di monomeri idrofobici come l'acrilonitrile e il metacrilato, e idrofilici come l'acido acrilico), omogenea e mesoporosa, con porosità fitta e diffusa su tutta la superficie, con caratteristiche di stabilità e di resistenza.



**Figura 19** Struttura chimica del AN69® Hospal e del PAN Asahi[4]

Il PAN AN69 viene prodotto mediante trasformazione termo reversibile del polimero, e la gelificazione avviene inizialmente per contatto con l'aria rendendo possibile la sua precipitazione isotropa. L'aggiunta di un opportuno liquido non miscibile permette di ottenere la porosità desiderata. La filatura della fibra comprende un processo di insufflazione con un gas inerte come l'azoto, mentre procedure differenti sono utilizzate per ottenere la membrana in fogli (essiccazione anziché gelificazione). La stabilizzazione e l'inalterabilità vengono ottenute con processi termici di finitura e, per evitare il collasso della struttura in fase di stoccaggio, la membrana viene essiccata in presenza di glicerolo.

Il PAN Asahi viene invece ottenuto mediante immersione veloce del polimero in un bagno di precipitazione, cui fa seguito una deposizione non omogenea con formazione di una struttura asimmetrica. La precipitazione in bagno di acido nitrico viene effettuata sia all'interno (completa) che all'esterno delle fibre (parziale), dando luogo alla formazione di *skin layers* che rappresentano la vera barriera al trasporto dei soluti e caratterizzano il coefficiente di setacciamento (SC).

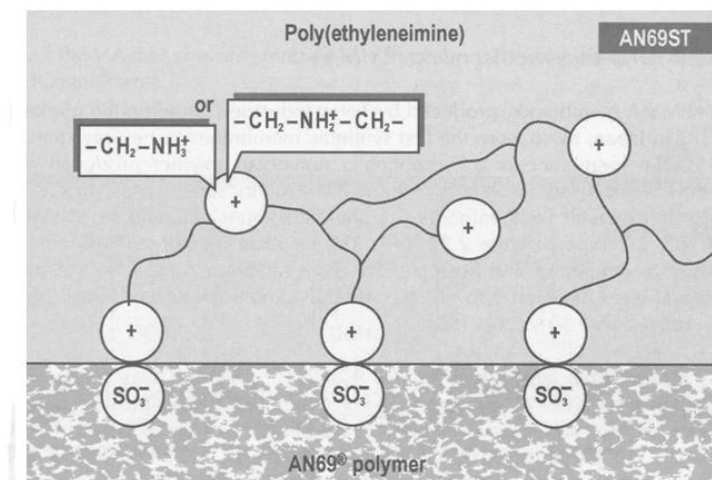
Le dimensioni dei pori dei PAN AN69® sono comprese fra 25 e 55 Å con un valore medio attorno ai 29 Å: ne deriva una porosità adatta alla diffusione delle piccole molecole e alla convezione di quelle più grandi. A uno studio più approfondito mediante diffrazione ai raggi X, la morfologia della membrana appare come un insieme di zone ordinate dovute a repulsioni steriche e bipolari dei gruppi nitrilici e di zone amorfe con predominanza nelle zone superficiali di queste ultime, contenenti i gruppi sulfonici. La struttura è semicristallina e si presenta in forma sia atattica (ad elica) che sindiotattica (planare a zig-zag). La superficie della membrana analizzata con spettroscopia ESCA (electron microscopy for chemical analysis) dimostra una più elevata concentrazione di gruppi sulfonici e di sodio rispetto alle zone più profonde e presenta caratteristiche polari dovute ai gruppi sulfonici e nitrilici, che provocano legami idrogeno con le molecole di acqua. Le zone superficiali a prevalente presenza di poliacrilonitrile sono idrofobiche

mentre quelle a prevalente presenza di metallilsulfonato sono idrofiliche e proprio l'idrofilia superficiale del PAN AN69<sup>®</sup> sembra essere alla base delle buone caratteristiche di emocompatibilità e di trasferimento diffusivo dei soluti. Lo strato acquoso della superficie genera un mezzo omogeneo di trasporto con ottimizzazione della diffusione che non potrebbe verificarsi in presenza di fenomeni di repulsione a contatto con superfici idrofobiche.

La membrana in PAN AN69<sup>®</sup> è in grado di allontanare  $\beta$ -2-microglobulina anche per adsorbimento. Questo materiale infatti ha un'alta capacità di adsorbimento per le proteine (in particolare quelle con carica positiva) proprio per la sua carica superficiale negativa (potenziale Zeta = -60 mV) dovuta alla presenza dei gruppi solfonati  $\text{SO}_3^-$ .

Il suo  $K_{UF}$  è elevato ed è quindi adatta sia per l'emodiafiltrazione che per l'emofiltrazione. È disponibile sia in configurazione piana che capillare e alcuni filtri vengono offerti in sterilizzazione sia con ETO che con raggi gamma senza che l'agente impiegato ne modifichi significativamente le caratteristiche.

Più recentemente si è aggiunta alla famiglia dei PAN un'altra membrana: lo AN69ST della Hospal (figura 20).



**Figura 20** Ricoprimento superficiale del PAN (AN69) con PEI[4]

In questo caso, il PAN viene coperto da uno strato di polietilenimina (PEI), un polimero policationico. Il PEI viene depositato durante il processo produttivo dove si raggiunge una concentrazione di  $9 \text{ mg/m}^2$ . Il potenziale zeta, così facendo, viene abbassato a valori di circa -20 mV, riducendo così l'alto adsorbimento di proteine come la  $\beta$ 2 microglobulina. I gruppi solfonici carichi negativamente vengono mascherati dal polimero policationico; lo spessore di questo layer costituisce comunque un'ulteriore barriera sterica che i soluti devono superare.

## Polimetilmetacrilato (PMMA)

Le membrane in PMMA, prodotte dalla Toray (Tokyo, Giappone), sono entrate nel mercato a partire dal 1977 in Giappone; sono state le prime ad essere sterilizzate con raggi  $\gamma$ . Si tratta di una membrana sintetica asimmetrica idrofobica, un idrogel ad elevato contenuto in acqua, ottenuta dalla fusione, di polimetilmetacrilato isotattico (PMMA) in dimetilsolfossido. In alcune versioni (Toray serie B2, B3, BG), la copolimerizzazione avviene con una piccola aggiunta di para-stirene sodio sulfonato (figura 21). In questo caso la membrana risulta simmetrica, abbastanza omogenea e isotropa. Il raggio dei pori varia tra i 2 e i 10 nm e la frazione in volume dei pori varia tra il 50% e il 70%.

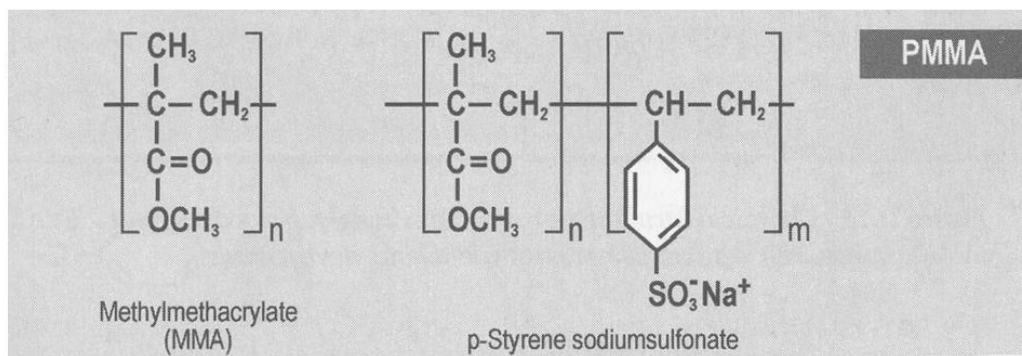


Figura 21 Struttura chimica del monomero MMA e del para-stirene sodio sulfonato[4]

È una tipica membrana prodotta con meccanismo di inversione di fase in cui si utilizza un processo termico: il polimero viene liquefatto o combinato con un opportuno solvente e un plastificante per ottenere una pasta polimerica. Si procede quindi all'estrusione o filatura e la fibra viene creata mediante allontanamento del solvente (gelificazione per raffreddamento e sostituzione del solvente con acqua). Il processo di gelificazione avviene in maniera differenziata a seconda dei due polimeri isotattico e sindiotattico e/o del contenuto in acqua del gel, è possibile ottenere membrane a diversa composizione, densità e porosità. La miscela di polimeri di PMMA a diversa strutturazione spaziale induce *cross-linking* stechiometrici e termo-reversibili mediante formazione di legami idrofobici tra le parti isotattiche e sindiotattiche dei due polimeri. È possibile quindi ottenere membrane adatte a diverse condizioni operative. In effetti il PMMA viene utilizzato sia in HD standard che in trattamenti *high-flux* che in emodiafiltrazione. Le sue caratteristiche di emocompatibilità sono buone ed è in grado di allontanare molecole a medio peso molecolare come la  $\beta_2$  microglobulina. Come verrà esposto meglio in seguito, la rimozione avviene quasi esclusivamente per adsorbimento (la componente diffusivo-convettiva è praticamente trascurabile). La membrana è disponibile in

configurazione capillare sterilizzata con raggi gamma; non è invece sterilizzabile con vapore o con ossido di etilene.

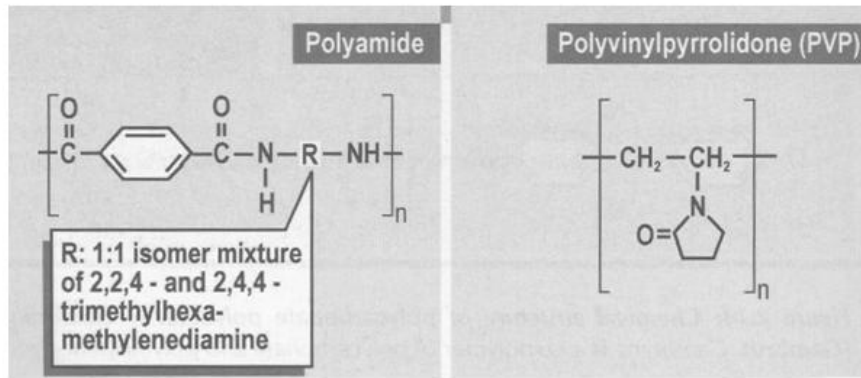
### *Poliamide*

E' una membrana sintetica fortemente asimmetrica. La sua struttura è costituita da (i) uno strato interno molto sottile (anche  $0.1 \mu\text{m}$ ) che rappresenta la barriera reale che caratterizza il coefficiente di setacciamento, (ii) uno strato finemente poroso intermedio di circa  $5-10 \mu\text{m}$  e (iii) uno strato esterno macroporoso di supporto di  $40-50 \mu\text{m}$  con digitazioni oblunghe che appaiono alla microscopia a scansione come fessure longitudinali ortogonali allo *skin layer*. Membrane in poliammide (PA) sono state in un primo tempo sviluppate dalla Gambro (Lund, Svezia) in fogli e successivamente in fibra cava, con alto  $K_{UF}$  ed elevata idrofobicità, adatte a trattamenti convettivi. In un secondo tempo la PA è stata sostituita con una membrana più idrofilica, allargandone le possibilità di utilizzazione nella dialisi ad alto flusso e nella emodiafiltrazione. Le caratteristiche idrofobiche del polimero originale vengono ancor oggi utilizzate per la creazione di ultrafiltri da inserire nel circuito della soluzione dializzante, sfruttandone le capacità di reiezione-adsorbimento di batteri ed endotossine.

Il polimero di base, utilizzato come componente idrofobica, è una copoliamide aromatico-alifatica contenente una miscela isomerica di 2,2,4 e 2,4,4 trimetil-esametilene-diamina (figura 22).

In contrasto con altre copoliammidi, in particolare quelle alifatiche, questo polimero dimostra eccellenti caratteristiche di emocompatibilità con minima attivazione complementare, scarso adsorbimento proteico e modesta trombogenicità. Per ottenere la versione più idrofilica della PA, il copolimero viene mescolato con PVP (polivinilpirrolidone), polimero idrofilico e idrosolubile utilizzato come seconda componente sintetica della membrana (figura 21). Legami idrogeno fra PVP e PA permettono una buona miscibilità entro un ampio *range* di concentrazioni e la loro forza impedisce il rilascio di PVP dalla membrana durante l'impiego clinico. La PA risulta praticamente neutra dal punto di vista delle cariche elettriche di superficie e l'interazione fra membrana e proteine plasmatiche risulta molto bassa grazie alla bassa idrofilicità che consente una scarsa formazione di legami polari. La membrana è disponibile in configurazione capillare sterilizzata con ETO.



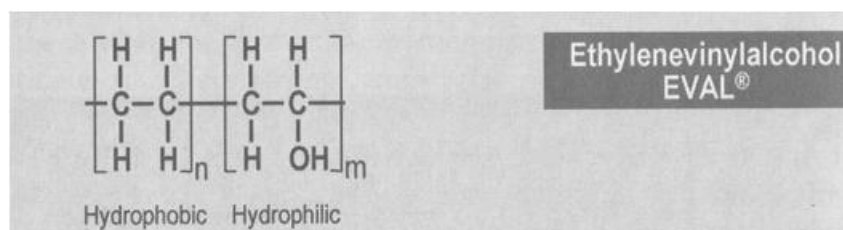


**Figura 22** Struttura chimica della poliamide e del PVP[4]

### *Etilenvinilalcol (EVAL®)*

Il copolimero etilenvinilalcol (EVAL®) è una membrana sintetica simmetrica relativamente idrofilica, simile nella struttura e nella morfologia al Cuprophan e alle altre membrane cellulosiche. La membrana presenta buone le caratteristiche di emocompatibilità, che si manifestano con una ridotta stimolazione dei processi della coagulazione che la rendono adatta per trattamenti senza eparina. A differenza delle membrane cellulosiche infatti, in queste membrane il contenuto superficiale di ossigeno, che viene considerato secondo molte studi come causa importante dell'assorbimento di proteine e dell'attivazione dei sistemi umorali, è più basso (25.5% per l'etilenvinilalcol, 37.4% per le membrane cellulosiche).

Questa membrana viene ottenuta per polimerizzazione di etilene (idrofobico) e vinil-acetato (idrofilico), successiva saponificazione alcalina ed estrusione, variando le condizioni fisico-chimiche della quale è possibile modificare la struttura finale, da densa a fortemente porosa (figura 23). La  $K_0$  dell'EVAL per i soluti a piccolo peso molecolare è di poco inferiore a quella delle membrane cellulosiche mentre è superiore a quella per i soluti a peso molecolare più elevato. La membrana EVAL è classificabile come membrana a basso flusso e il suo campo di applicazione è limitato a trattamenti di tipo esclusivamente diffusivo. E' disponibile in configurazione capillare sterilizzata con raggi gamma o con ossido di etilene.

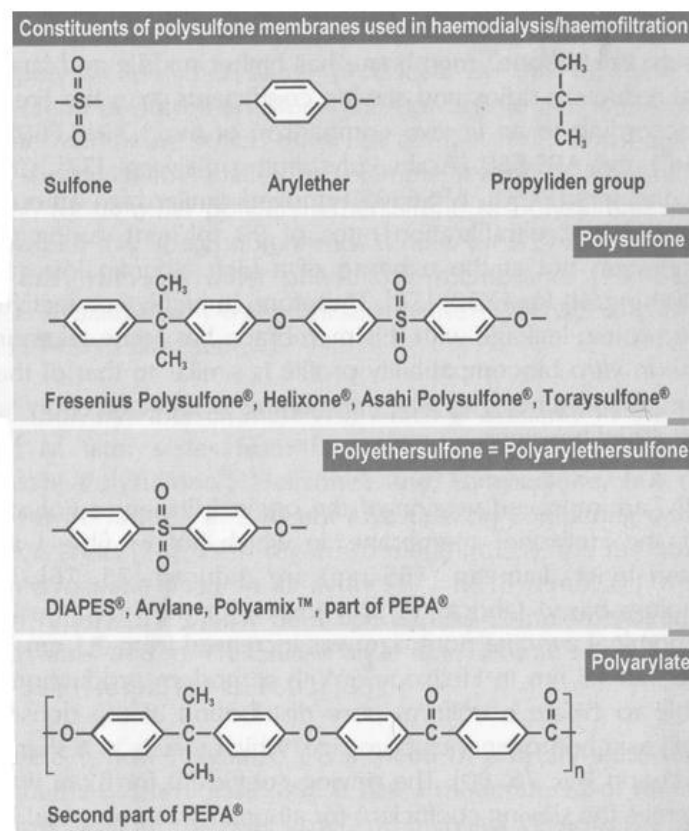


**Figura 23** Struttura chimica del copolimero etilenvinilalcol (EVAL®)[4]

## Polisulfone e poli(aril)etersulfone

Le membrane sintetiche in polisulfone e in poli(aril)etersulfone sono quelle con più versatilità e che hanno avuto il più grande successo sul mercato. Questo perché tali membrane sono sterilizzabili con tutti i metodi, sono altamente biocompatibili e hanno alta resistenza meccanica (derivante dalla rigidità e dall'ingombro sterico dei gruppi che le compongono), oltre ad un'elevata resistenza agli agenti chimici.

La differenza nella struttura chimica tra polisulfone e poli(aril)etersulfone è evidenziata in figura 24: il primo infatti contiene anche gruppi isopropilenici che invece non sono presenti nel secondo.



**Figura 24** Struttura chimica dei diversi polisolfoni[4]

La grande versatilità di questo materiale ha permesso, negli anni, diverse modifiche in ambito industriale con una conseguente copertura di tutti i tipi di trattamento emodialitico. Per comprendere ciò, basti guardare la tabella 2 che riassume i principali produttori, i tipi di sterilizzazione consigliati e la morfologia delle fibre.

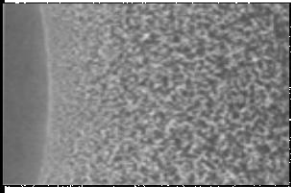
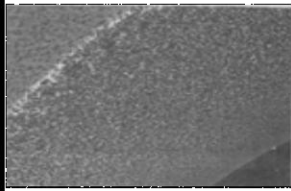
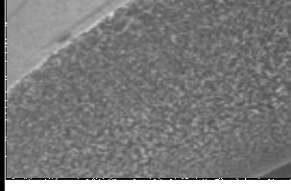
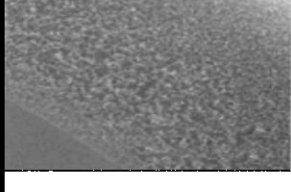
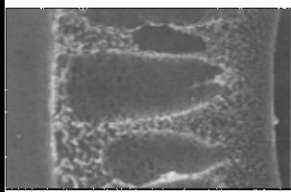
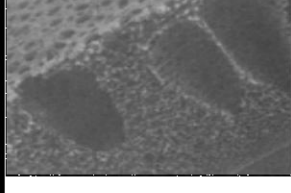
<b>Azienda produttrice</b>	<b>Brand (polimero)</b>	<b>Sterilizzazione (flusso)</b>	<b>Immagine al SEM</b>
Fresenius Medical Care	Fresenius Polysulfone® (Polisulfone)  Helixone® (Polisulfone)	Vapore, Ossido di etilene (High-flux Low-flux)  Vapore (High-flux Low-flux)	
Asahi Medical (Diamed)	APS® (Polisulfone)	Raggi γ (High-flux)	
Toray Industries	Toraysulfone® (Polisulfone)	Raggi γ (High-flux)	
Membrana (Allmed, Baxter, Belco, Helbio, Haidylena, Idemsa, Kawasumi, Saxonia)	DIAPES® (polietersulfone)	Raggi γ a secco Calore, ossido di etilene (High-flux Low-flux)	
Hospal/Cobe	Arylane (Polietersulfone)	Raggi γ (High-flux)	
Kimal	Polietersulfone	Raggi γ (High-flux)	
Mimntech	Mimntech PS Polyphen® (Polietersulfone)	Ossido di etilene (High-flux)	
Gambro	Polyamix™ (polietersulfone)	Calore (High-flux Low-flux)	
Nikkiso	PEPA® (Polietersulfone)	Raggi γ (High-flux)	

Tabella 2 Famiglie di membrane in polisulfone e poli(aril)etersulfone attualmente sul mercato e loro caratteristiche[4]

La membrana in polisulfone è una membrana sintetica asimmetrica idrofobica ad alta permeabilità con buone caratteristiche di emocompatibilità, disponibile in versioni a diverso  $K_{UF}$  (*high-flux*, *middle-flux* e *low-flux*). La particolare struttura del polimero, con anelli fenilici che si ripetono, conferisce al polisulfone (PS) un'elevata rigidità, resistenza alla trazione e alla compressione, stabilità termica e meccanica. Equilibrato con acqua, il polimero è vetroso a temperatura ambiente. La sua idrofobicità si riflette in un  $K_{UF}$  e in una selettività molecolare fortemente dipendente dalla presenza di proteine. Presenta particolari caratteristiche positive fra cui l'elevata resistenza alla temperatura e alle variazioni di pH e la possibilità di modulazione della selettività molecolare con *cut-off* diversi fino a 50 kDa. Come accade durante la produzione di altre membrane sintetiche, la precipitazione può avvenire all'interno, all'esterno o da entrambi i lati delle fibre, dando luogo alla formazione di uno o più *skin layers*.

La morfologia della membrana può presentare differenze notevoli: esistono strutture omogenee a densità variabile dall'interno all'esterno, membrane con *skin layer* interno e struttura *finger Type* di supporto esterno, altre con *skin layer* interno e struttura esterna a macropori e lacune ricoperta in modo completo o parziale da un ulteriore *skin layer*. I diversi PS differiscono anche per quanto riguarda il grado di idrofobicità e le cariche di superficie: alcuni tendono ad adsorbire le proteine in modo rapido e rilevante, altri invece stabiliscono legami meno stabili o quantitativamente minori.  $K_0$  e il  $K_{UF}$  sono elevati e questo tipo di membrana si presta bene ad un impiego in terapie convettive (emodiafiltrazione (HDF) e emofiltrazione (HF)). Per l'impiego in emodialisi standard standard (sola diffusione) e in emodialisi *high-flux* sono state messe a punto versioni di PS con  $K_{UF}$  più contenuti (PS 400 e PS 550 Fresenius). Come accennato, la stabilità dimensionale e termica sono elevate, e questa membrana è disponibile in configurazione capillare sterilizzata sia con ETO che con calore (autoclave): quest'ultima tecnica ne modifica le caratteristiche di permeabilità nel senso di un aumento del diametro dei pori e del  $K_{UF}$ .

Tra i marchi più importanti per quanto riguarda le membrane in polisulfone, coperti da brevetti, si sottolineano:

*Asahi*: in trattamenti misti convettivo-diffusivi, queste membrane permettono un'ottima *clearance* di molecole a medio/alto peso molecolare, garantiscono un buonissimo rapporto di riduzione (in particolare per le molecole a medio peso molecolare) e coefficienti di *sieving* (anche superiori a quelli di Fresenius); lo svantaggio è che si ha anche una rimozione di albumina relativamente alta. La biocompatibilità è molto buona.

*Fresenius*: il brand attualmente più utilizzato dal marchio Fresenius per il materiale in polisulfone è Helixone®. Rispetto alla precedente versione del Fresenius Polysulfone®, le membrane in Helixone® hanno uno spessore ridotto ( $\approx 35\mu\text{m}$ ), un diametro interno delle fibre ridotto ( $\approx 185\mu\text{m}$ ) e

una dimensione media dei pori più elevata ( $\approx 3.3\text{nm}$ ). Con Helixone® si ha inoltre una distribuzione molto omogenea delle dimensioni dei pori (bassa dispersione) che garantisce un preciso valore di cut off. I valori del coefficiente di *sieving* per la  $\beta$ -2-microglobulina per l'FX100, che è il filtro con il più alto *cut-off* a disposizione, è 0.8 (è un ottimo valore considerando il fatto che il S.C. per l'albumina non supera lo 0.01). E' un materiale con basso potenziale zeta (molto vicino allo 0), il che garantisce un'ottima biocompatibilità e scarsa interazione tra proteine e membrana.

*Toray*: il Toraysulfone® è la membrana in polisulfone della Toray (disponibile solo per trattamenti *high flux*) con il più alto valore di *Reduction Ratio* (R.R.) di  $\beta$ -2-microglobulina in trattamenti convettivo-diffusivi. Anche in questo caso però, il problema è l'alta perdita di albumina, dovuta principalmente all'elevata interazione membrana-proteine.

Tra i marchi più importanti per quanto riguarda le membrane in polietersulfone invece si sottolineano:

*Nikkiso*: il brand è PEPA® (Polyester Polymer Alloy). E' una membrana sintetica, asimmetrica e idrofobica ottenuta amalgamando poliarilato e sulfone polietere (figura 24) ed è l'unico poliariletersulfone che non contiene PVP (che come abbiamo visto è un polimero fortemente idrofilico): di conseguenza presenta maggiore assorbimento di proteine rispetto a tutti gli altri polisolfoni (in particolare assorbimento di  $\beta$ -2-microglobulina).

In ogni caso, nonostante questa peculiare caratteristica, a parità di condizioni operative (e ovviamente di area superficiale) il grado di riduzione di  $\beta$ -2-microglobulina totale (*in vivo*) è inferiore rispetto alle altre membrane polisulfoniche.

*Hospal*: il nome è Arylane® (poliariletersulfone + PVP). Come qualità di rimozione di molecole a medio peso molecolare si può dire che le caratteristiche sono nella media delle membrane in polisulfone.

*Gambro*: Polyamix™, ha struttura chimica uguale all'Arylane®, con una piccola aggiunta di poliammide. Questo tipo di membrane permette una moderata rimozione di  $\beta$ -2-microglobulina e bassa eliminazione di albumina.

### 3.3 Sterilizzazione

Una fase importante e imprescindibile per la realizzazione di un filtro, ma in più in generale di un qualsiasi prodotto biomedicale, è la sterilizzazione. Un prodotto si definisce sterile quando è privo di microrganismi vitali come batteri, spore, lieviti, muffe e virus; per etichettarlo tale, il suo grado

di sterilità (Sterility Assurance Level), che indica la probabilità di trovare un microrganismo vitale nel dispositivo, deve essere minore o uguale a  $10^{-6}$ .

Il processo di sterilizzazione di un filtro (ma anche per le altri componenti di un circuito di dialisi, come le linee sangue) può influire sulle caratteristiche della membrana, modificandone la struttura chimico-fisica e alterandone le proprietà di trasporto e biocompatibilità. Le tecnologie e i metodi di sterilizzazione (accettati dalla farmacopea) sono:

- Sterilizzazione con ossido di etilene (EtO)
- Sterilizzazione a vapore
- Sterilizzazione a caldo
- Sterilizzazione con raggi  $\gamma$
- Sterilizzazione con raggi  $\beta$

La sterilizzazione con ossido di etilene dei filtri è stato il metodo più utilizzato soprattutto negli anni '80 in Europa e in America. Attualmente il suo uso sta andando via via decadendo visto il sempre maggior utilizzo di tecniche alternative (figura 25).

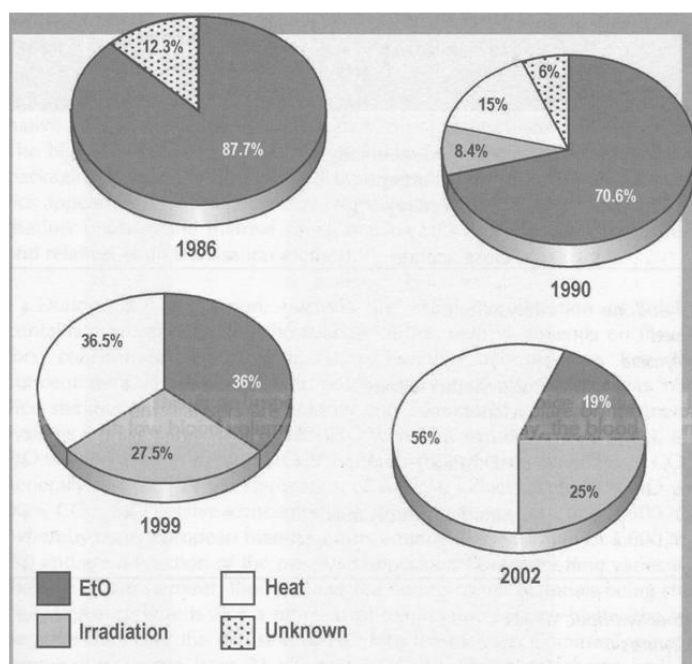


Figura 25 Metodi di sterilizzazione per filtri nell'unione Europea a partite dal 1986[4]

L'ossido di etilene (EtO) è un gas di formula bruta  $C_2H_4O$ , utilizzabile a basse temperature. In realtà, durante il suo utilizzo esso viene miscelato con gas inerte in autoclave in modo tale da ridurne la tossicità e l'infiammabilità.

L'inattivazione dei microrganismi da parte dell'EtO è influenzata da vari parametri quali la concentrazione del gas, la temperatura, l'umidità relativa, il tempo di esposizione e il livello di vuoto in autoclave.

I vantaggi di questo metodo sono la possibilità di lavorare a bassa temperatura (20-55°C) e la conseguente alta compatibilità con la maggior parte dei polimeri con cui sono costruiti i filtri.

Di contro, gli svantaggi sono un lungo tempo di rilascio (dai 5 ai 30 giorni) e la possibilità di presenza di residui nel dispositivo. L'ossido di etilene è irritante per pelle e mucose, è cancerogeno, infiammabile ed esplosivo: risulta quindi evidente l'importanza di prendere adeguate precauzioni nell'ambiente di lavoro.

Particolari precauzioni invece non sono richieste durante la sterilizzazione a vapore, la quale si può considerare il metodo più semplice. In questo caso il filtro viene immesso in un'autoclave pressurizzata (normalmente a 1-2 bar) ad una temperatura (circa 120°C) e per un tempo (20-90 minuti) sufficienti ad assicurare l'eliminazione di tutti i microrganismi che possono essere presenti. Pur essendo un metodo ecologico, la sterilizzazione a vapore può essere usata solo con polimeri termostabili e può provocare il degrado ossidativo della superficie della membrana.

Un altro metodo molto utilizzato e che sta avendo sempre più successo è la sterilizzazione a caldo, che viene eseguita a secco. La temperatura raggiunta durante questo metodo è di circa 160°C. Il processo è molto simile a quello a vapore. La differenza è che, alzando la temperatura di lavoro, in ogni punto del dializzatore viene assicurata l'eliminazione anche di endotossine e altri pirogeni resistenti alle alte temperature. Anche in questo caso, i parametri da controllare durante la sterilizzazione sono la temperatura e il tempo.

La sterilizzazione con radiazioni,  $\gamma$  e  $\beta$ , ha avuto un notevole successo a partire dalla fine degli anni '90 (figura 25). In realtà la tecnologia a raggi  $\beta$  non è molto utilizzata (solo Fresenius in Nord America, Helbio e Meditech la utilizzano su alcuni filtri). Il meccanismo attraverso il quale avviene la sterilizzazione è la scomposizione dell'acido desossiribonucleico (DNA) dei batteri. I raggi  $\gamma$  liberati nel corso del processo di irradiazione, mediante l'impiego di materiale radioattivo come il Cobalto 60, distruggono infatti i legami chimici, interagendo con gli elettroni che li compongono. I filtri vengono posti vicino alla sorgente e irradiati per un tempo appropriato (pochi secondi per i raggi  $\beta$ , minuti o addirittura ore per i raggi  $\gamma$ ). Un parametro importantissimo è il grado di radiazione assorbita. Questa viene comunemente misurata in rads (l'equivalente per il SI è il Gray (Gy)). 1 Gy è definito come la dose d'irradiazione assorbita quando l'energia per grammo impartita per ottenere la radiazione è 1 J/Kg. I vantaggi di questa tecnica sono l'elevata capacità di penetrazione e la possibilità di raggiungere anche cavità chiuse. Gli svantaggi invece possono essere il degrado di alcuni polimeri (provocando in tal caso il fenomeno dell'invecchiamento), la

formazione di sottoprodotti tossici e cancerogeni a causa di solventi utilizzati e il degrado delle performance del filtro (per es la permeabilità diffusiva  $K_0$ ).



## 4. I meccanismi di trasporto e i trattamenti in terapia dialitica

### 4.1 Meccanismi di trasporto

Il trasporto delle sostanze attraverso la membrana dipende:

- dalla differenza di concentrazione delle sostanze ai due lati della membrana semipermeabile e cioè tra lato “sporco” (comparto sangue) e il “lato pulito” (comparto dializzato) o viceversa;
- dalla pressione idrostatica del liquido da filtrare;
- dalla pressione osmotica esercitata dalle sostanze presenti in soluzione;
- dall'interazione tra la membrana semipermeabile e il liquido da filtrare.

I principi fisico-chimici che stanno alla base di questo trasporto da un lato all'altro della membrana semipermeabile sono: diffusione, filtrazione e convezione, osmosi e adsorbimento.

#### 4.1.1 Diffusione

La diffusione è definita come la migrazione di molecole, provocata da movimento casuale, da un regione in cui la concentrazione delle stesse è maggiore a una regione a concentrazione inferiore. In termini termodinamici, i soluti a più alta concentrazione sono a un più alto stato energetico, quindi tendono naturalmente a raggiungere uno stato energetico più basso dove la loro concentrazione è inferiore. La diffusione è un fenomeno del primo ordine; ciò significa che il flusso di diffusione ( $J$ ) per unità d'area ( $A$ ) è proporzionale al gradiente di concentrazione ( $\Delta c$ ), che è la “forza motrice” (*driving force*):

$$\frac{J}{A} = -D \times \frac{\Delta c}{\Delta x}$$

dove  $D$  è il coefficiente di diffusione di un singolo soluto e  $\Delta x$  è la distanza, che con buona approssimazione può essere considerata lo spessore della membrana che il soluto deve attraversare. Questa relazione, la prima legge di Fick sulla diffusione, è basata su leggi matematiche di calcolo di probabilità. Il coefficiente di diffusione  $D$  dipende dall'interazione tra la singola molecola e la membrana.

### 4.1.2 Filtrazione e convezione

Con il termine ultrafiltrazione si intende il passaggio o il trasporto del solvente (acqua plasmatica) da un lato della membrana all'altro. Per ottenere l'ultrafiltrazione è necessaria una differenza di pressione idrostatica che viene applicata grazie a delle pompe nella macchina di dialisi.

In realtà, come sarà spiegato meglio in seguito, un'ultrafiltrazione naturale all'interno del filtro c'è sempre. Tale fenomeno viene definito filtrazione interna ed avviene come conseguenza dell'instaurarsi di una pressione positiva sul lato del sangue, originata dalla resistenza al flusso offerta dal dializzatore, dalla viscosità del sangue e dalla pressione artero-venosa del paziente. La filtrazione interna è alla base del trattamento di *high flux* HD.

Il flusso di ultrafiltrazione  $Q_{UF}$  è esprimibile in funzione delle caratteristiche della membrana e del gradiente di pressione:

$$Q_{UF} = K_{UF} \times \Delta P$$

dove  $Q_{UF}$  è il flusso di filtrazione,  $K_{UF}$  è il coefficiente di permeabilità idraulica della membrana e  $\Delta P$  è la pressione transmembrana.

La pressione trans-membrana, indicata anche come TMP dall'inglese *trans membrane pressure*, è definita da:

$$TMP = \frac{(P_{B\_in} + P_{B\_out})}{2} - \frac{(P_{D\_in} + P_{D\_out})}{2} - P_{onc}$$

dove  $P_{B\_in}$  e  $P_{B\_out}$  sono le pressioni dal lato sangue rispettivamente in ingresso e in uscita del filtro dializzatore,  $P_{D\_in}$  e  $P_{D\_out}$  sono le pressioni del lato dializzato in ingresso e in uscita del filtro dializzatore e  $P_{onc}$  (anche indicata come  $\Pi$ ) è la pressione oncotica esercitata dai soluti. Per pressione oncotica si intende la pressione osmotica esercitata da soluzioni colloidali.

Se consideriamo solamente il lato sangue, la caduta di pressione tra ingresso e uscita è fortemente influenzata dalle caratteristiche geometriche del filtro e dalle condizioni operative del sangue stesso, secondo la legge di Hagen-Poiseuille:

$$P_{B\_in} - P_{B\_out} = \frac{8 \eta \times Q_B \times L}{N \times r^4 \times \Pi}$$

dove  $r$  è il raggio delle fibre,  $L$  è la lunghezza delle fibre,  $N$  è il numero di fibre,  $\eta$  è la viscosità del sangue e  $Q_B$  è il flusso sangue applicato tramite la pompa peristaltica del circuito.

Da queste considerazioni si può quindi intuire che per uno specifico gradiente di pressione applicato si avrà un altrettanto specifico flusso di filtrazione  $Q_{UF}$ , il cui valore dipenderà sia dal  $K_{UF}$  di quel

determinato filtro ma anche da molti altri parametri geometrici e reologici: in particolare,  $Q_F$  risulta proporzionale alla quarta potenza del raggio delle fibre e quindi risulta fortemente influenzato dal diametro delle fibre.

Come accennato in precedenza nel capitolo 3, i filtri solitamente vengono classificati in funzione del valore del coefficiente di ultrafiltrazione: vengono definiti ad alto flusso (*high-flux*) se il loro  $K_{UF}$  è superiore a 20 ml/h/mmHg, mentre sono definiti a basso flusso (*low-flux*) se il loro  $K_{UF}$  risulta inferiore (ovviamente devono essere standardizzati  $Q_B$  e condizioni reologiche del sangue come ematocrito, concentrazione di proteine plasmatiche, ecc). Alcuni filtri hanno un  $K_{UF}$  superiore ai 50 ml/h/mmHg; in questo caso, i filtri sono particolarmente adatti a trattamenti convettivi o misti diffusivo-convettivi e il liquido e i soluti vitali che vengono forzatamente eliminati devono essere reintegrati tramite soluzione fisiologica per riequilibrare il bilancio idrico corporeo.

A seconda delle caratteristiche della membrana, nel processo di ultrafiltrazione vengono trasportati anche alcuni tipi di soluti; questo trasporto di sostanze si chiama convezione. Il flusso netto di soluto che attraversa la membrana per convezione è esprimibile come

$$J_{conv} = SC \times Q_{UF} \times C_s = SC \times K_{UF} \times A \times TMP \times C_s$$

dove  $J_{conv}$  è il flusso (in massa) convettivo del soluto in questione,  $SC$  è il coefficiente di *sieving* (setacciamento),  $Q_{UF}$  è la portata di ultrafiltrazione,  $K_{UF}$  è il coefficiente di ultrafiltrazione,  $A$  è l'area superficiale del dializzatore,  $TMP$  è la pressione transmembrana e  $C_s$  è la concentrazione del soluto.

### 4.1.3 Osmosi

L'osmosi consiste nel trasporto del solvente attraverso una membrana semipermeabile dal lato a contatto con la soluzione diluita al lato a contatto con la soluzione concentrata e la forza motrice è la differenza di potenziale chimico fra le soluzioni in ciascun lato della membrana. Di conseguenza, l'osmosi può essere vista come una diffusione "ostacolata": se i pori della membrana sono abbastanza piccoli da trattenere le sostanze in soluzione e permettere il passaggio del solvente, si verifica una "differenza di pressione osmotica" che causa, a sua volta, la diffusione del solvente dalla soluzione meno concentrata a quella più concentrata.

#### 4.1.4 Adsorbimento

Il fenomeno dell'adsorbimento prevede un'interazione diretta tra fluido biologico e membrana di dialisi. L'adesione dei soluti, in particolare di proteine, sulla superficie delle membrane del filtro può essere considerata sia come un aspetto positivo che negativo. Se da un lato, infatti, c'è la possibilità di eliminare, tramite interazione chimico-fisica, sostanze e soluti dannosi per il paziente dializzato (come per esempio la  $\beta$ -2-microglobulina), dall'altro l'ingombro sterico che ne consegue può ridurre i flussi di diffusione e convezione.

Le variabili che influenzano l'interazione tra proteine e membrane possono essere divise in funzione della considerazione delle une o delle altre. Nel caso delle proteine le proprietà che ne caratterizzano l'interazione sono:

- Dimensione: molecole più grandi possono avere più siti di contatto con la superficie.
- Carica: le molecole vicine al punto isoelettrico, che rappresenta il pH della soluzione per il quale quella singola proteina assume un valore di carica nullo, vengono adsorbite più rapidamente.
- Struttura: proteine meno stabili, quali quelle che possiedono meno *cross-linking* intramolecolari, possono denaturarsi esponendo domini idrofobici verso il materiale domini idrofobici.

Nel caso invece del materiale delle membrane le proprietà sono:

- Topografia: tessiture maggiori danno origine ad aree superficiali più grandi favorendo il contatto con le proteine.
- Composizione: la natura chimica delle superfici controlla il tipo di interazioni intermolecolari con le proteine.
- Idrofobicità: superfici idrofobiche tendono a legare un numero maggiore di proteine denaturandole.
- Eterogeneità: superfici che presentano caratteristiche non uniformi possiedono domini capaci di interagire in modo diverso con le proteine.
- Potenziale: il potenziale superficiale influenza la distribuzione degli ioni in soluzione e il livello di interazione con le proteine.

## 4.2 Trattamenti in terapia dialitica

I fenomeni di trasporto esposti precedentemente permettono la depurazione del sangue del paziente uremico ricoverato in un centro dialisi. Diffusione, convezione, osmosi e adsorbimento sono alla base delle terapie dialitiche che vengono effettuate. Mentre osmosi e adsorbimento avvengono in

qualsiasi trattamento scelto, a causa della natura chimico-fisica e dell'interazione con le membrane del dializzatore da parte del sangue, diffusione e convezione possono essere applicate a seconda delle esigenze del singolo paziente. Le classiche metodiche di depurazione extracorporea possono essere considerate fondamentalmente tre, suddivise in base al meccanismo di trasporto:

- Emodialisi (HD): meccanismo diffusivo o prevalentemente diffusivo;
- Emodialisi *high flux* (*High flux* HD): meccanismo diffusivo-convettivo;
- Emofiltrazione (HF): meccanismo esclusivamente convettivo;
- Emodiafiltrazione (HDF): meccanismo misto diffusivo-convettivo.

In realtà, esistono altre metodiche, come *mid-dilution HDF*, *paired filtration dialysis (PFD)*, *push-pull HDF*, *double high-flux HDF*, *enhanced internal filtration HD*, che combinano insieme in diverso modo i fenomeni di rimozione sopra esposti. Queste ultime non verranno prese in considerazione in questo lavoro.

Da sottolineare ancora che esistono anche metodiche a basso flusso, applicate per periodi di tempo limitati o su pazienti acuti o in condizioni cliniche particolari. Questi trattamenti solitamente non vengono effettuati all'interno di un centro dialisi ma in altri reparti ospedalieri come quello di terapia intensiva. Anche questo aspetto non verrà analizzato.

#### **4.2.1 Emodialisi standard (HD)**

L'emodialisi standard è il trattamento più semplice ed economico che viene effettuato in un centro dialisi. A differenza di ciò che avviene durante la filtrazione glomerulare naturale, governata da un processo di ultrafiltrazione e riassorbimento, questa tecnica è puramente diffusiva e sfrutta, come *driving force*, la differenza di concentrazione tra lato sangue e lato dializzato: se il soluto presente nel sangue è diffusibile, cioè è possibile il suo passaggio attraverso la membrana, la sua migrazione dal plasma viene regolata dal gradiente di concentrazione creato dalla sua contemporanea assenza (a bassa concentrazione) nel liquido dializzante. E' possibile anche il trasferimento inverso, in senso dializzato-plasma, regolato dallo stesso principio. Agendo sulla composizione della soluzione dializzante si possono ottenere gradienti di concentrazione e quindi passaggio di elettroliti in un senso o nell'altro, con la correzione del disequilibrio elettrolitico.

In realtà, come detto, è presente la filtrazione interna. Nel caso dell'HD standard, per la quale si utilizzano filtri *low-flux* ( $K_{UF} < 20$  ml/h/mmHg), questa filtrazione naturale può essere considerata

trascurabile; nel caso invece di filtri *high flux* ( $K_{UF} > 20 \text{ ml/h/mmHg}$ ), questo fenomeno non sarà più considerabile tale.

La rimozione dei soluti dipende in maniera diretta sia dal flusso sangue che dal flusso dializzato. Il flusso del dializzato viene fatto passare in controcorrente rispetto alla direzione del flusso ematico (figura 26) in quanto è possibile soddisfare al meglio, in ogni punto del dializzatore, la richiesta del massimo gradiente di concentrazione possibile tra sangue e dializzato, necessario per favorire la depurazione.

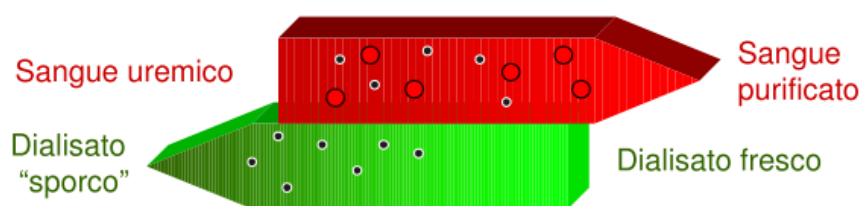


Figura 26 Direzioni e versi del flusso sangue e del flusso dializzato

Il limite superiore al flusso sangue ( $Q_B$ ) è determinato dall'accesso vascolare. Per quanto riguarda invece il flusso dializzato ( $Q_D$ ) si è osservato sperimentalmente che il limite superiore è  $Q_D = 2 \times Q_B$ , in quanto viene massimizzato l'effetto diffusivo. Se il flusso sangue viene aumentato anche il flusso dializzato deve essere incrementato proporzionalmente per mantenere questo rapporto.

Il meccanismo diffusivo opera principalmente secondo una discriminante di peso molecolare (altri fattori che influenzano le modalità di rimozione dei soluti sono solubilità in acqua, carica e struttura molecolare). I soluti nel liquido plasmatico infatti possono essere divisi in diverse categorie come evidenziato in figura 27.

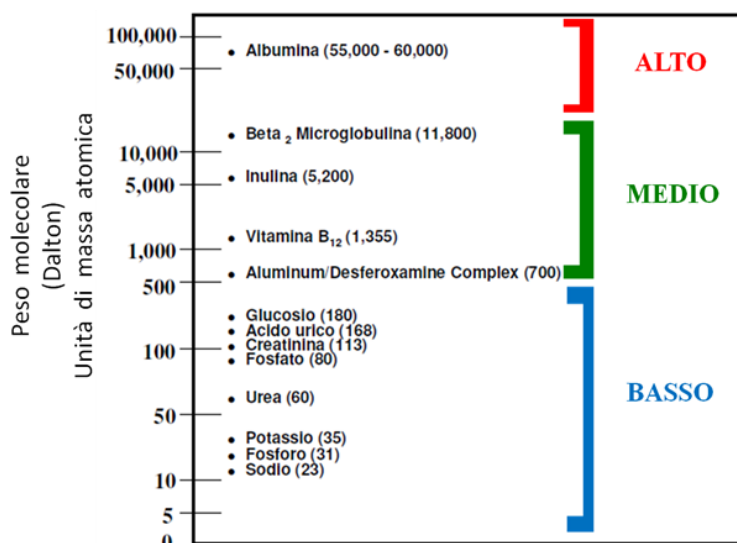
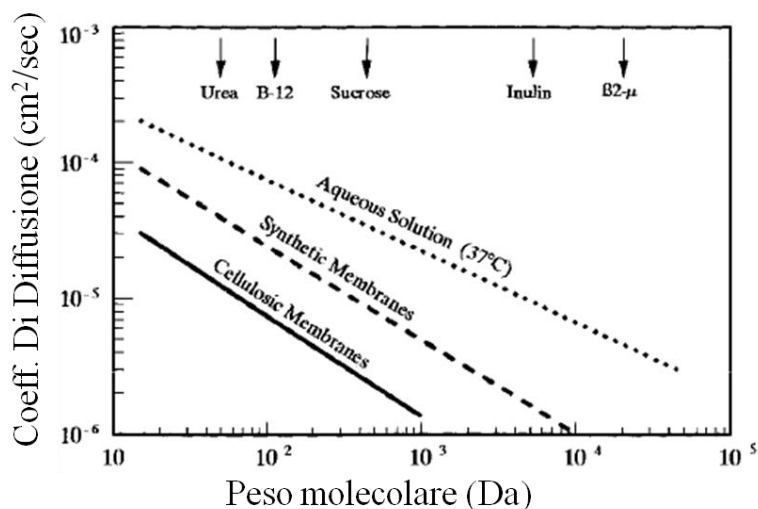


Figura 27 Peso molecolare dei principali soluti presenti nel sangue

Si definiscono a basso peso molecolare i soluti inferiori ai 500 Da. Queste molecole vengono eliminate principalmente per diffusione in quanto il coefficiente di diffusione, e di conseguenza il flusso diffusivo  $J_{DIFF}$ , dipendono dal tipo di materiale (figura 28) e dal raggio della particella (relazione di Stokes Einstein<sup>2</sup>).



**Figura 28** Grafico Coeff. di diffusione D vs peso molecolare

I soluti a medio peso molecolare sono compresi in un range di peso molecolare tra i 500 Da e i 15000 Da. Tra queste molecole ci sono parecchie proteine, tra cui la  $\beta$ -2-microglobulina (11800 Da). Come verrà esposto meglio in seguito, la modalità di rimozione principale è la convezione. La rimozione per diffusione può avvenire solo se il *cut off* della membrana è superiore alle dimensioni dei singoli soluti. Nel caso del trattamento di HD standard questo limite è molto basso, quindi tali molecole (e quelle ad alto peso molecolare) non vengono rimosse.

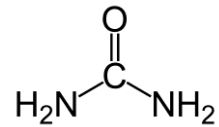
Per ultimo, le sostanze ad alto peso molecolare sono quelle superiori ai 15000 Da. L'albumina (55000-60000 Da) ad esempio, è tra queste: il *cut off* di molte membrane viene fissato proprio in funzione del peso molecolare di questa proteina, che non deve essere eliminata in quanto regolatrice di parecchie funzioni biologiche, quali il mantenimento della pressione oncotica e il trasporto di diversi ormoni.

Tra le molecole a basso peso molecolare, eliminate principalmente per diffusione, se ne evidenzia in particolare una: l'urea. E' un soluto molto importante in quanto, oltre ad essere una tossina da

<sup>2</sup> La legge di Stokes-Einstein definisce il coefficiente di diffusione D in funzione di diversi parametri secondo:  $D = \frac{KT}{6\pi r \eta}$  dove K è la costante di Boltzman, T è la temperatura (KT corrisponde all'energia cinetica della particella), r è il raggio della particella (sferica) e  $\eta$  è la viscosità del mezzo.

eliminare nel corso della dialisi, è un indicatore (marcatore) fondamentale per il controllo e l'eventuale successo della terapia dialitica.

L'urea è il prodotto finale del catabolismo delle proteine, ha un peso molecolare di circa 60 Da ed ha la seguente formula chimica:



La concentrazione fisiologica nel sangue umano va dai 18 ai 40 mg/dl. Quello che interessa in realtà non è l'urea ma il valore di azotemia nel sangue, cioè il *Blood Urea Nitrogen* (B.U.N.) o azoto ureico. Essendoci una proporzionalità diretta tra i due suddetti valori (l'azoto ureico contribuisce per 28/60 al peso molecolare di una molecola di urea), la misurazione del B.U.N. risulta di facile derivazione.

#### 4.2.2 Emodialisi *high flux*

Il nome emodialisi *high flux* (*high flux* HD) indica il fatto che il  $K_{UF}$  del filtro utilizzato è superiore a 20 ml/ora/mmHg. Ciò significa che l'ultrafiltrazione interna, conseguenza dell'instaurarsi di una pressione positiva sul lato del sangue, non può più essere considerata ininfluyente. In questo caso quindi si ha anche un effetto convettivo nella rimozione dei soluti, tanto maggiore quanto maggiore è il  $K_{UF}$ , ovviamente a parità di condizioni operative. Di fatto quindi, questo trattamento può essere considerato di tipo misto diffusivo-convettivo, con il secondo fenomeno comunque che influisce in maniera inferiore rispetto ad altri trattamenti come emofiltrazione e emodiafiltrazione [7, 8].

La componente convettiva risulta determinante nella rimozione di soluti a medio-peso molecolare. Tra questi, la  $\beta$ -2-microglobulina è sicuramente quello più interessante e viene considerata come marcatore principale. La  $\beta$ -2-microglobulina è una proteina plasmatica del peso molecolare di 11800 Da e ha un punto isoelettrico di 5.8. Questo comporta un alto fenomeno di adsorbimento, specialmente con le membrane sintetiche a valore negativo di potenziale Zeta (su tutti PAN), che non può essere considerato ininfluyente nella valutazione generale della rimozione di questa molecola. L'eccesso di  $\beta$ -2-microglobulina nel plasma sanguigno è stata identificato come maggiore causa dell'amiloidosi[9], una malattia caratterizzata dalla deposizione in sede extracellulare di materiale proteico a ridotto peso molecolare ed insolubile. Nei pazienti con insufficienza renale cronica, questa alta concentrazione può portare a dolore, alla sindrome del tunnel carpale e a lesioni osteoarticolari. Di conseguenza evitare l'amiloidosi risulta di vitale importanza.



### 4.2.3 Emofiltrazione (HF)

L'emofiltrazione (HF) è una tecnica che consiste nell'effettuare una considerevole ultrafiltrazione del sangue, tramite una elevata pressione idrostatica esercitata su una membrana ad alta permeabilità e senza l'impiego del bagno di dialisi. E' la modalità convettiva di depurazione del sangue quando l'ultrafiltrazione, ottenuta tramite pompe esterne, rende conto di tutta la rimozione dei soluti (ovviamente deve essere considerato anche l'effetto dell'adsorbimento). Rappresenta la migliore imitazione della funzione glomerulare: l'allontanamento dei soluti avviene secondo il principio fisico della convezione, senza discriminante la taglia molecolare, fino al *cut-off* della membrana, esattamente come avviene in fisiologia. La funzione tubulare viene mimata in parte dalla reinfusione, che compensa qualitativamente e quantitativamente la sottrazione di acqua plasmatica. Il liquido di sostituzione è costituito da una soluzione contenente  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , ioni bivalenti e tampone in concentrazioni variabili, comunque vicine a quelle plasmatiche fisiologiche e aggiustate in relazione alla situazione del paziente.

La reinfusione, effettuata con liquidi sterili e apirogeni a composizione controllata che permettono la ricostituzione del volume ematico, può avvenire prima o dopo la depurazione nel filtro: nel primo caso viene definita pre-diluizione (pre-infusione), nel secondo invece viene definita post-diluizione (post-infusione).

Il trattamento di HF pre-diluizione permette di operare in condizioni reologiche del sangue migliori, migliorando le performance del filtro nel lungo periodo. Infatti l'ematocrito e la viscosità vengono diminuiti e si limitano le conseguenti possibili problematiche quali *clotting* o coagulazione all'interno delle membrane. Lo svantaggio è che, aumentando il volume di acqua plasmatica prima della depurazione, la *clearance* di ogni singola molecola risulta ovviamente più bassa.

Viceversa, il trattamento HF post-diluizione aumenta sì il rischio di incorrere nel *clotting* del sangue, ma permette di raggiungere valori di *clearance* sicuramente superiori.

I filtri per questo tipo di trattamento devono avere un'elevata permeabilità idraulica e, conseguentemente, un elevato coefficiente di ultrafiltrazione  $K_{\text{UF}}$ : per questo motivo la quasi totalità delle membrane per HF e, come si vedrà in seguito, per HDF è costituita da materiali sintetici (su tutti PMMA, PAN e Polisulfone).

L'applicazione di un gradiente pressorio fra i due lati della membrana permette di rimuovere, tramite effetto esclusivamente convettivo, soluti a più alto peso molecolare rispetto a quello che avviene durante l'HD standard (figura 27).

Tenendo conto delle varie componenti del sistema (tipo di membrana, ematocrito, concentrazione proteica, flusso di acqua plasmatica e di UF, loro rapporto, interazione sangue-membrana, quantità

e modalità di somministrazione del reinfusato e durata della seduta), è molto difficile ottenere in HF con la sola convezione delle molecole a basso peso molecolare (come urea e creatinina) risultati simili a quelli ottenibili in HD standard. I migliori risultati raggiunti in HF nei confronti di soluti a medio-alto peso molecolare possono essere compromessi da un più lento allontanamento dei soluti più piccoli, rovesciando in pratica il problema dell'HD standard.

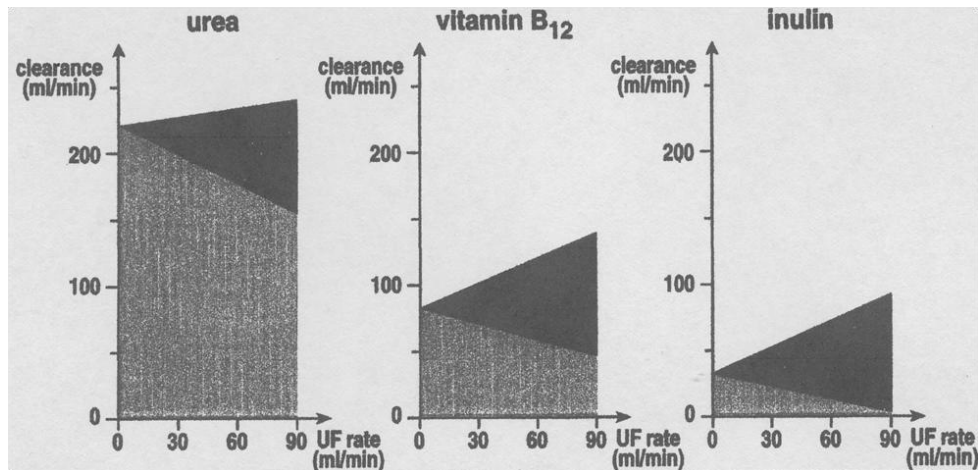
Come detto, il trattamento in HF risulta buono per tale compito anche se, come vedremo in seguito, il metodo migliore sarà l'emodiafiltrazione.

#### **4.2.4 Emodiafiltrazione HDF**

L'emodiafiltrazione è un trattamento dialitico basato sulla associazione di trasferimento convettivo e diffusivo di soluti attraverso la stessa membrana nello stesso tempo, cioè vengono associate l'emofiltrazione e l'emodialisi con lo scopo di ottenere contemporaneamente i vantaggi dell'una e dell'altra. Il principio consiste nell'ottenere una certa quantità di ultrafiltrazione, di cui una parte viene reintegrata mediante infusione di liquido idoneo (emofiltrazione), l'altra parte si fa contemporaneamente passare attraverso il filtro (emodialisi). Come per l'HF, la reinfusione può avvenire sia prima che dopo il filtro, anche se è più utilizzata la post-diluizione. L'alta rimozione di fluido dal filtro per unità di tempo e il conseguente alto valore del volume del reinfusato devono essere applicati in base all'emodinamica e alla capacità di sopportazione del singolo paziente.

L'efficienza del trasferimento convettivo di un soluto diffusibile è tanto più bassa quanto più alta è quella del trasferimento contemporaneo dello stesso soluto per diffusione. Esiste infatti un'interferenza negativa fra diffusione e convezione, come mostra la figura 29.

Come si può notare, all'aumentare del flusso di ultrafiltrazione  $Q_{UF}$ , aumenta anche l'effetto convettivo a discapito di quello diffusivo. Nel caso particolare dell'inulina, una molecola simile quanto a peso molecolare alla  $\beta$ -2-microglobulina, la rimozione avviene ovviamente solo per diffusione nel caso in cui il  $Q_{UF}$  applicato sia 0, mentre l'effetto si ribalta nel caso, per esempio, di un  $Q_{UF} = 90$  ml/min, in cui l'effetto diffusivo praticamente viene annullato e si ha solo rimozione convettiva. Da notare che valori di ultrafiltrazione di circa 90 ml/min in trattamenti HDF non sono rari, di conseguenza questa situazione risulta abbastanza consueta.



**Figura 29** Clearance diffusiva e convettiva in HDF calcolate per un  $Q_B = 300\text{ml/min}$  (grigio: diffusione, nero: convezione)[10]

In considerazione di quanto detto, l'HDF costituisce una valida metodica di depurazione extracorporea, durante la quale la rimozione di soluti a diverso peso molecolare può essere modulata selettivamente, privilegiando la diffusione o la convezione modificando il  $Q_{UF}$  [11].

### *Backfiltration*

La *backfiltration* è un fenomeno che si manifesta principalmente nei trattamenti in cui sono utilizzati filtri *high flux*. La pressione trans membrana, come detto, è determinata dalla caduta di pressione nel lato sangue, dalla caduta di pressione nel lato dializzato. Il fenomeno della *backfiltration* è generato dai sistemi di controllo dell'ultrafiltrazione i quali possono generare inversioni del gradiente di pressione nel filtro, che è la driving force, generando il passaggio di ultrafiltrato dal lato dializzato al lato sangue. Nella parte iniziale del filtro la TMP risulta positiva e di conseguenza si ha filtrazione interna con rimozione convettiva e diffusiva dei soluti, ma quando si raggiunge la parte distale dello stesso, il valore della TMP diminuisce a tal punto da diventare negativa (Figura 30). Nella parte distale si ha quindi un *back transport* del liquido di dialisi in entrata che può provocare problemi nel caso in cui ci siano contaminanti: di conseguenza la qualità e la purezza dello stesso devono essere garantite.

Il fenomeno della *backfiltration* è presente in piccola parte durante l'HD standard, mentre è rilevante nell'*high flux* HD ed ancora di più nell'HDF. E' tanto maggiore quanto maggiore è il  $Q_{UF}$ . Anche il materiale delle membrane risulta determinante: le membrane sintetiche, avendo un più alto  $K_{UF}$  rispetto alle membrane cellulosiche (in realtà poco utilizzate in HDF proprio per la loro bassa permeabilità idraulica), ne risentono molto di più. Per ovviare a questa problematica, in ambito industriale, si è cercato nel corso degli anni di ridurre al minimo la lunghezza delle fibre e di

conseguenza dei filtri, in quanto è nella parte distale che avviene la backfiltration; di contro però, così facendo diminuisce anche l'area effettiva di scambio, riducendo l'efficienza della terapia. Risulta quindi determinante in ambito progettistico trovare un giusto compromesso tra questi due parametri.

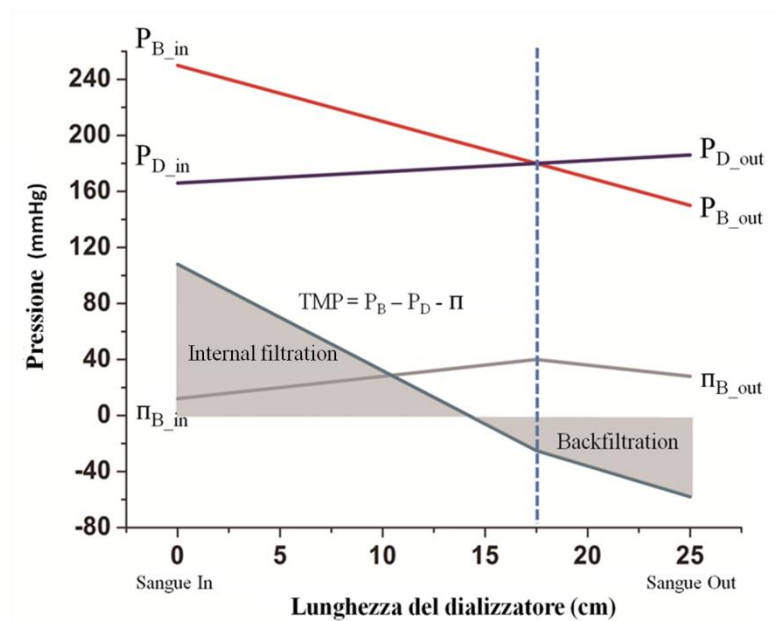


Figura 30 Profilo di pressione lungo il dializzatore con generazione di backfiltration[12]

### 4.3 Metodi di valutazione del trattamento

I metodi principali per caratterizzare l'efficacia di un trattamento dialitico sono:

- Profilo di concentrazione di un soluto nel tempo
- *Clearance*
- *Dialysance*
- Rapporto di riduzione R.R. (Reduction Ratio)
- Nel caso specifico dell'urea,  $Kt/V$
- Coefficiente di *sieving* SC

### *Profilo di concentrazione nel tempo*

Il profilo di concentrazione nel tempo è un metodo relativamente semplice: consiste nel prelevare dei campioni di sangue durante diversi momenti del trattamento e graficarne i valori in funzione del tempo di prelevamento. In questo modo si ha un'indicazione immediata riguardo l'andamento di quel determinato soluto nel tempo e, soprattutto, su qual è la sua concentrazione finale nel paziente.

### *Clearance*

La *clearance* di un dializzatore è definita come il suo grado di rimozione volumetrico di un particolare soluto del sangue, in particolare come la quantità di soluto eliminato per unità di tempo diviso per la concentrazione nel sangue prima di essere depurato:

$$K = Q_{Bi} \times [(C_{Bi} - C_{Bo})/C_{Bi}] + Q_{UF} \times (C_{Bo}/C_{Bi})$$

dove  $Q_{Bi}$  è il flusso sangue in ingresso del filtro,  $C_{Bi}$  è la concentrazione del soluto all'ingresso del filtro,  $C_{Bo}$  è la concentrazione del soluto in uscita dal filtro e  $Q_{UF}$  è il flusso di ultrafiltrazione applicato esternamente.

La *clearance*  $K$ , per una determinata molecola, viene misurata in ml/min e viene utilizzata quando la concentrazione della stessa molecola, nel dializzato, è nulla.

Nella teorica condizione di assenza di adsorbimento il flusso di ultrafiltrazione  $Q_{UF}$  può essere espresso come:

$$Q_{UF} = Q_{Bi} - Q_{Bo}.$$

Come si può notare osservando la formula della *clearance*, essa è divisa in due componenti: la prima riflette la rimozione dei soluti tramite fenomeno diffusivo, la seconda la rimozione degli stessi per metodo convettivo. Ovviamente, in assenza di  $Q_{UF}$ , come nel caso dell'HD standard, la *clearance* sarà ottenuta solamente tramite l'apporto diffusivo.

Un esempio di grafico di *clearance* in funzione del peso molecolare e dei trattamenti dialitici è dato in figura 31.

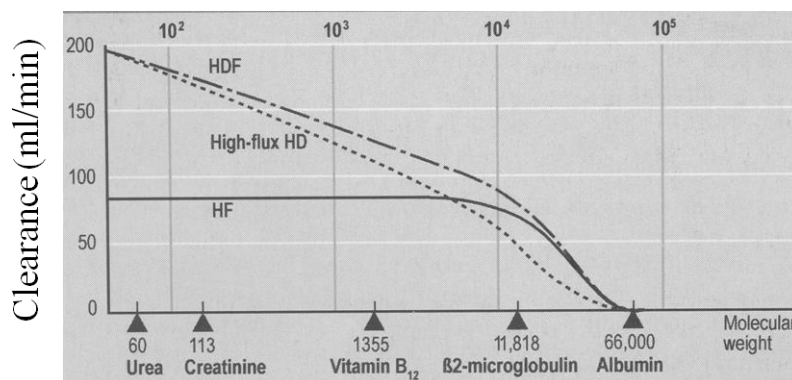


Figura 31 Clearance vs peso molecolare in diversi trattamenti dialitici

Come si nota, l'HF non è discriminante per il peso molecolare, per cui tutte le molecole al di sotto del *cut off* di quella singola membrana avranno lo stesso valore di *clearance* per quel determinato  $Q_{UF}$  applicato. Non è così invece per i trattamenti diffusivi o misto convettivo-diffusivi (HD, *high flux* HD e HDF).

### Dialysance

Nel caso in cui la concentrazione di quel determinato soluto sia diversa da 0 nel liquido di dialisi, si preferisce utilizzare la *dialysance*:

$$D = Q_{Bi} [(C_{Bi} - C_{Bo}) / (C_{Bi} - C_{Di})]$$

dove  $C_{Di}$  è la concentrazione del soluto nel liquido di dialisi in ingresso del filtro.

Nella pratica, la *dialysance* viene utilizzata raramente anche se, formalmente, più precisa. Nel caso specifico di urea e β-2-microglobulina, essendo assenti nel liquido dializzante in quanto da eliminare completamente, si usa la *clearance*. Viceversa per elettroliti come sodio, potassio, calcio, magnesio, cloro si usa la *dialysance* in quanto presenti da ambo i lati della membrana.

### Rapporto di riduzione

Il rapporto di riduzione percentuale (R.R.) è semplicemente la percentuale di riduzione di una particolare molecola dall' inizio alla fine del trattamento. La riduzione viene misurata come segue:

$$R.R. = [(C_{pre} - C_{post}) / C_{pre}] \times 100$$

dove  $C_{pre}$  è la concentrazione del soluto prima di cominciare il trattamento mentre  $C_{post}$  è la concentrazione una volta concluso il trattamento. In realtà il rapporto di riduzione viene utilizzato

maggiormente per quanto concerne molecole ad alto peso molecolare. E' una valutazione più generale rispetto alla *clearance* in quanto considera solamente le concentrazioni finali e iniziali.

### *Kt/V*

Il  $Kt/V$  è un parametro molto utilizzato nel caso dell'urea; il valore che se ne ricava definisce un indice preciso per l'efficienza dialitica diffusiva.  $K$  è la *clearance* dell'urea,  $t$  è la durata del trattamento dialitico e  $V$  è il volume di distribuzione dell'urea nel sangue. Viene utilizzato molto raramente nei casi di molecole a medio peso molecolare.

### *Coefficiente di sieving*

La valutazione tramite coefficiente di *sieving*  $SC$  è una misurazione esclusivamente convettiva. Il  $S.C.$  è una caratteristica di ogni singola membrana per quello specifico soluto. Il  $SC$  viene misurato istantaneamente tramite la seguente formula

$$SC = C_{UF}/C_{Pi}$$

dove  $C_{UF}$  è la concentrazione nell'ultrafiltrato e  $C_{Pi}$  è la concentrazione plasmatica in ingresso del filtro.

In realtà, la concentrazione plasmatica varia nel tempo  $t$ , quindi solitamente si usa un'altra formula per valutare questo valore:

$$\text{Corrected } C_P(t) = C_P(t) \times (T_P(t_0)/T_P(t))$$

dove "Corrected  $C_P(t)$ " è il valore corretto di concentrazione plasmatica da considerare,  $C_P(t)$  è il valore misurato al tempo  $t$  e  $T_P(t_0)/T_P(t)$  è il rapporto delle proteine totali del plasma dall'inizio della dialisi ( $t_0$ ) al tempo  $t$ .

## **4.4 Fattori che influenzano il trasporto**

Sono molti i fattori e le variabili che influenzano il trasporto dei soluti da una parte all'altra della membrana e di conseguenza i valori dei metodi di valutazione del trattamento. Si prenderà spesso come metodo di valutazione principale la *clearance*.

#### 4.4.1 Flusso sangue $Q_B$

La *clearance* e gli altri metodi di valutazione vengono influenzate dal flusso sangue: dal punto di vista diffusivo, se si convoglia un maggior quantitativo di sangue per unità di tempo alla membrana, si avrà un maggior afflusso di soluti e la differenza di concentrazione tra i due lati risulterà maggiore. L'effetto convettivo invece risente meno di questo fattore in quanto il contributo della convezione alla *clearance* non è diretto. Di conseguenza molecole in cui l'effetto diffusivo è prevalente (come l'urea) risentiranno maggiormente di un incremento del  $Q_B$  rispetto a sostanze a medio peso molecolare (come inulina o  $\beta$ -2-microglobulina). La relazione tra *clearance* e  $Q_B$  è non lineare ed è mostrata per differenti soluti in figura 32 e per l'urea, per diversi valori di  $K_0A$ , in figura 33.

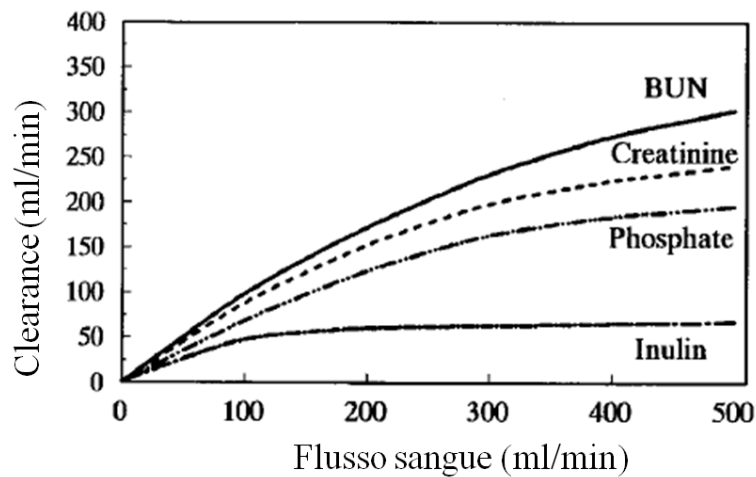


Figura 32 Clearance di diverse molecole in funzione del flusso sangue[13]

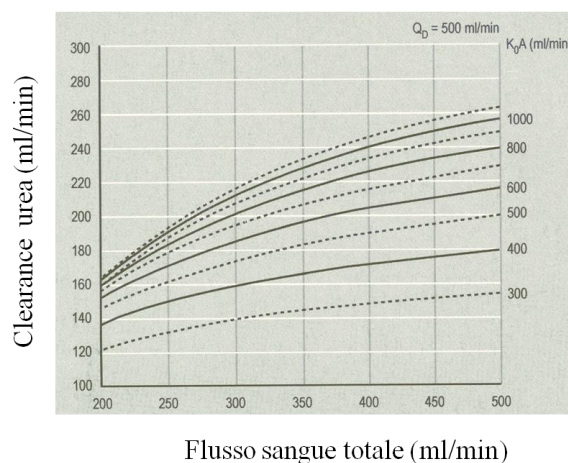


Figura 33 Grafico delle clearance di urea in funzione del  $Q_B$



Il flusso sangue da applicare dipende dal tipo di trattamento (in HDF, dovendo essere rimossa anche acqua plasmatica per ultrafiltrazione il  $Q_B$  dovrà essere superiore rispetto a un trattamento di HD standard), dalla qualità dell'accesso vascolare e dalla capacità del paziente di tollerare alti flussi.

#### 4.4.2 Flusso dializzato $Q_D$

Come detto, il flusso del liquido di dialisi passa in controcorrente a quello sangue. Valori tipici di  $Q_D$  sono 300, 500 o 800 ml/min. Maggiore è il flusso, minore è lo "spessore" del *layer* di liquido stagnante sulla superficie esterna della membrana, riducendo così la resistenza associata al comparto dializzato. Ha comunque un'influenza molto più limitata sulla *clearance* rispetto al  $Q_B$  (figura 34).

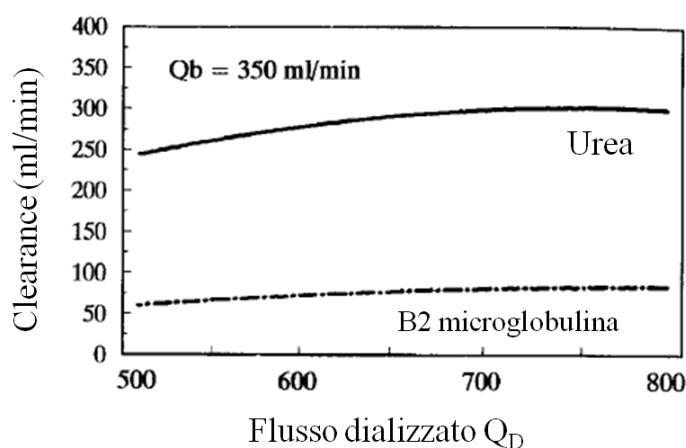


Figura 34 Relazione tra *clearance* e  $Q_D$  per urea e microglobulina[13]

#### 4.4.3 Flusso di ultrafiltrazione $Q_{UF}$

Se il  $Q_{UF} \neq 0$  è presente anche il flusso convettivo, isolato nel caso dell'HF, misto convettivo-diffusivo nel caso dell'HDF. Aumentando il  $Q_{UF}$  risulta evidente come aumenti anche l'effetto convettivo nella formula della *clearance* a discapito invece della componente diffusiva. In trattamenti HDF risulta quindi difficile separare le due componenti in quanto una influenza l'altra: per esempio, l'effetto convettivo contribuisce a un accumulo di soluti impermeabili alla membrana (per esempio albumina) sul lato interno della stessa. Ciò influenza molto anche l'effetto diffusivo in quanto le piccole molecole dovranno superare una ulteriore componente di resistenza al trasporto. Il fenomeno del *protein cake* sarà evidenziato meglio in seguito.

Il  $Q_{UF}$  scelto dipende notevolmente dal  $Q_B$ : maggiore è quest'ultimo, maggiore sarà l'influenza del  $Q_{UF}$  sulla *clearance* dei soluti a medio peso molecolare (figura 35).

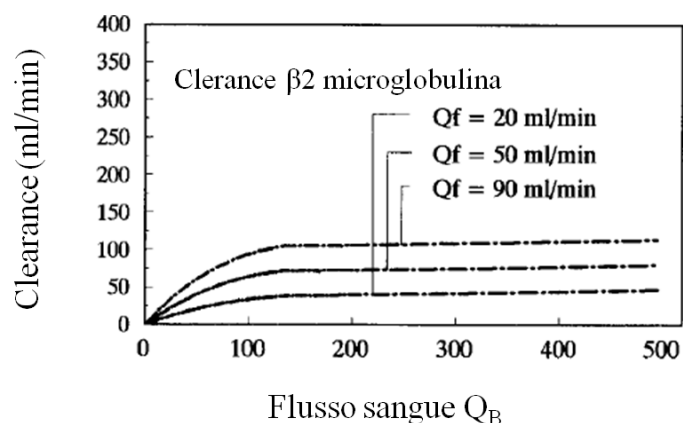


Figura 35 Effetto del  $Q_{UF}$  sulla clearance di  $\beta$ -2-microglobulina[13]

#### 4.4.4 Ematocrito, contenuto d'acqua nel sangue, e volume di distribuzione dei soluti

Il sangue, come detto, contiene una componente solida, l'ematocrito, e una componente acquosa, la quale, a sua volta, può essere suddivisa in acqua plasmatica e acqua intracellulare; quest'ultima è quella contenuta all'interno della membrana cellulare delle cellule ematiche. La frazione "non acquosa" non è ovviamente dializzabile dalla membrana. La maggior parte dei soluti, come le proteine, sono contenute solamente nell'acqua plasmatica, ma altre, come l'urea, sono contenute anche nell'acqua intracellulare[14]. Questo aspetto è importante in quanto influenza il flusso sangue: se il volume di distribuzione del soluto in questione è presente solamente nell'acqua plasmatica, il flusso sangue, che poi influenzerà la clearance, dovrà essere considerato come segue:

$$Q_{PW} = Q_B \times 0.93 (1 - HCT)$$

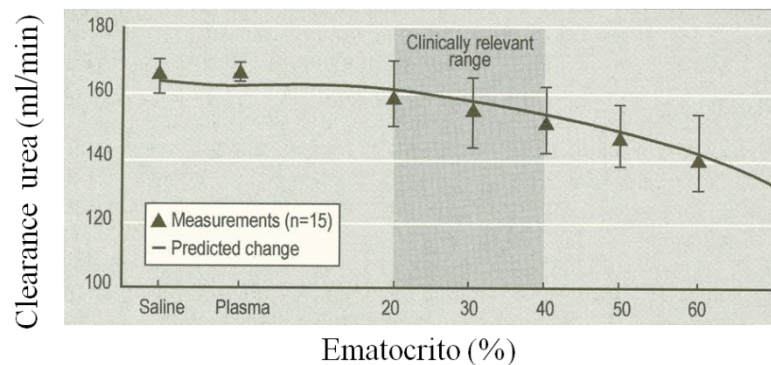
dove  $Q_{PW}$  è il flusso dell'acqua plasmatica,  $Q_B$  è il flusso sangue totale misurato, 0.93 è la percentuale acquosa plasmatica in volume e HCT è l'ematocrito.

Nel caso invece di soluti contenuti anche nell'acqua cellulare dei globuli rossi, come l'urea, dove si raggiunge un equilibrio di concentrazione con l'acqua plasmatica, il flusso sangue da considerare sarà:

$$Q_{BW} = Q_B [0.72\gamma (HCT) + 0.93 (1 - HCT)]$$

dove  $Q_{BW}$  è il flusso dell'acqua plasmatica più quella intracellulare,  $Q_B$  è il flusso sangue totale misurato, 0.72 è la percentuale acquosa in volume all'interno degli eritrociti, 0.93 è la percentuale acquosa plasmatica, HCT è l'ematocrito e  $\gamma$  è una costante aggiuntiva particolare per ogni singolo soluto (ad esempio per l'urea  $\gamma$  vale 1.11).

Come si evince facilmente, il valore dell'ematocrito influenza il flusso sanguigno effettivo e di conseguenza la *clearance*. Nel caso dell'urea il grafico *clearance*-ematocrito viene mostrato in figura 39.



**Figura 36** Grafico *clearance* diffusiva dell'urea vs ematocrito

#### 4.4.5 Area superficiale del dializzatore

La diffusione, governata dalla legge di Fick, è funzione diretta della diffusività del soluto e dell'area nominale degli emodializzatori. A parità di flusso sanguigno e flusso dializzato, la componente diffusiva della *clearance* delle sostanze aumenta linearmente all'aumentare della superficie di scambio del filtro fino a raggiungere un andamento asintotico per un valore di circa 1.2-1.4 m<sup>2</sup>. Per questo motivo l'area di dializzatori per HD standard solitamente non supera mai questa quota. Per trattamenti convettivi invece la superficie di scambio raggiunge valori più alti per incrementare al massimo tale effetto; si possono raggiungere i 2.4-2.6 m<sup>2</sup> per trattamenti di HDF.

#### 4.4.6 Adsorbimento di soluti

La rimozione di soluti per adsorbimento, soprattutto a medio peso molecolare, gioca un ruolo fondamentale nella rimozione generale degli stessi. Questo fenomeno influisce notevolmente sulle performance operative, tanto che alcune membrane hanno tale fenomeno come principale modalità di rimozione.

Tra le molecole a medio peso molecolare, quelle che risentono di più del fenomeno dell'adsorbimento sono le proteine, anche perché la loro concentrazione nel liquido plasmatico è alta. Tra queste, la  $\beta$ -2-microglobulina viene presa in considerazione come marcatore principale per evidenziare questo fenomeno.

La  $\beta$ -2-microglobulina, ma anche altre proteine come l'albumina e il fibrinogeno, presentano un comportamento relativamente idrofobico sulla superficie esterna e questo fattore determina un'elevata interazione con le superfici delle membrane che presentano lo stesso carattere [15, 16].

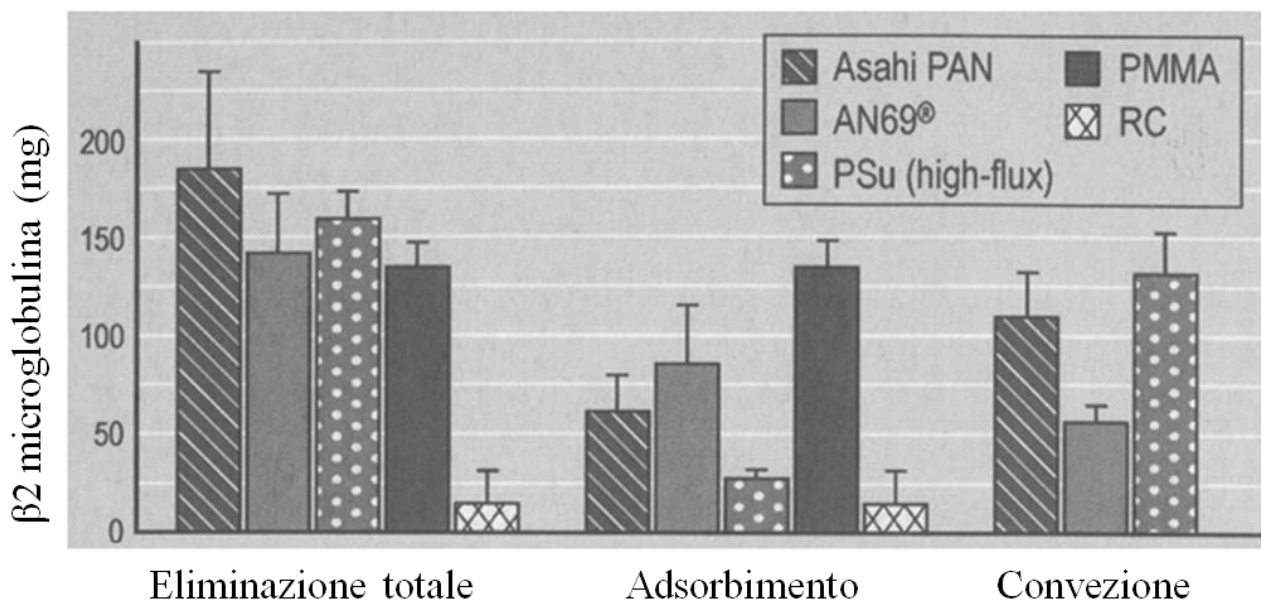
Le membrane sintetiche infatti, a differenza di quelle a base cellulosica, presentano una spiccata idrofobicità, determinata dai gruppi laterali.

Altro fattore da considerare è la porosità: le membrane sintetiche presentano infatti dimensione media e concentrazione dei pori decisamente superiori rispetto alle membrane cellulosiche, proprio per permettere anche la rimozione, per via convettiva, di molecole a più alto peso molecolare. Spesso, per elevati flussi di ultrafiltrazione, accade che molecole di poco inferiori al cut off della membrana rimangano intrappolate tra i pori, formando un'ulteriore "barriera sterica" ai soluti che devono essere rimossi successivamente. Di conseguenza, i metodi di valutazione del trattamento risentono non poco di questo fenomeno ma non sono in grado di quantificarlo esaustivamente.

Il fatto che proteine come la  $\beta$ -2-microglobulina si leghino elettrochimicamente o meccanicamente alla membrana non costituisce di per sé un fatto del tutto negativo: se da un lato infatti la rimozione diffusiva e convettiva vengono ridotte, dall'altro l'adsorbimento costituisce di per sé un metodo alternativo per la rimozione di tale sostanza.

Esempi di membrane che presentano tale fenomeno sono PMMA, PAN e, in forma inferiore, Polisulfone [17].

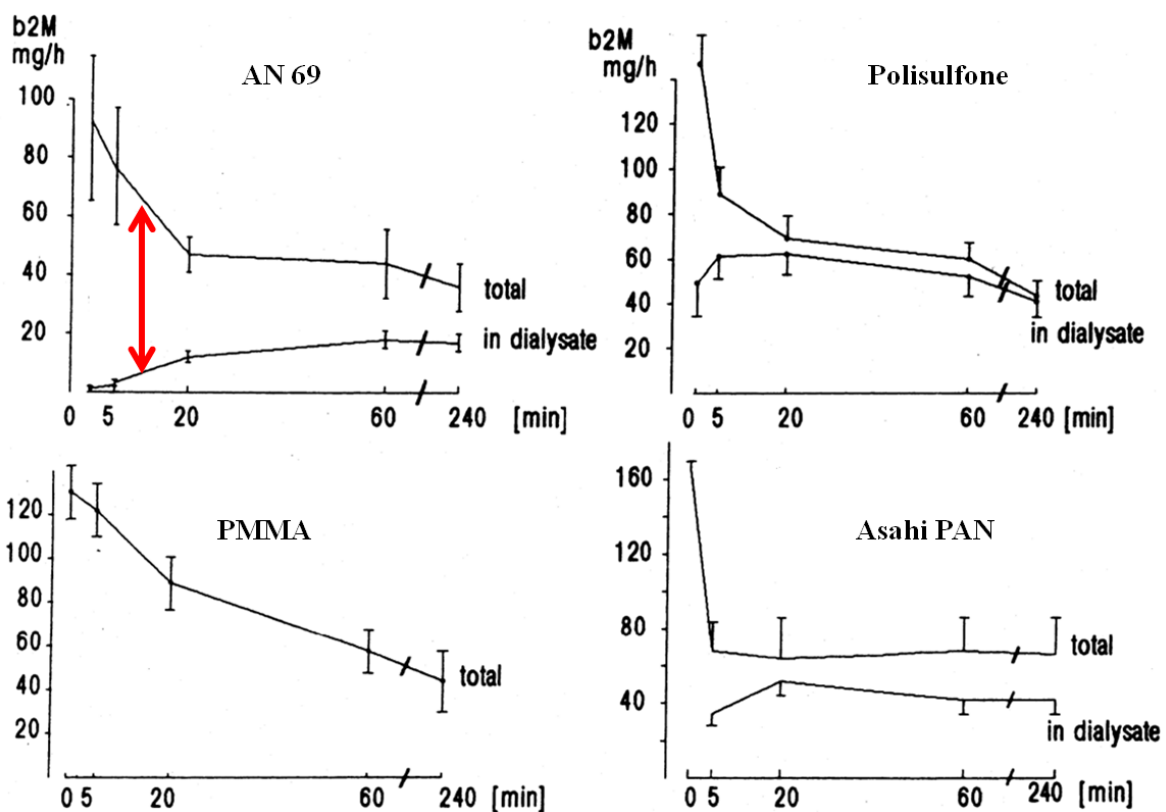
Nella seguente figura 37 vengono evidenziati i contributi di convezione e adsorbimento nell'eliminazione di  $\beta$ -2-microglobulina per cinque diversi materiali tra i più utilizzati in ambito dialitico. I parametri operativi come  $Q_B$ ,  $Q_D$ ,  $Q_{UF}$ , area superficiale e concentrazione iniziale di  $\beta$ -2-microglobulina sono paragonabili. Il trattamento applicato con le quattro membrane sintetiche è *high flux* HD, mentre con la membrana cellulosica è stato ovviamente applicato un semplice trattamento di HD standard (per ovvi motivi di basso  $K_{UF}$ ).



**Figura 37** Contributo di adsorbimento e convezione alla rimozione totale di  $\beta$ -2-microglobulina in 5 diversi materiali per membrane[18]

Come si nota, l'eliminazione totale di  $\beta$ -2-microglobulina in peso è superiore con la membrana Asahi PAN<sup>®</sup>, ma il contributo convettivo maggiore, in proporzione, è ottenuto tramite polisulfone. Questo spiega il grande uso di questa membrana in ambito dialitico. Si noti ancora il comportamento particolare del PMMA: la rimozione totale di  $\beta$ -2-microglobulina (comunque inferiore alle altre membrane sintetiche) avviene esclusivamente per adsorbimento.

L'adsorbimento è un fenomeno che avviene immediatamente all'inizio del trattamento. Inizialmente infatti la membrana è "nuda" e di conseguenza la  $\beta$ -2-microglobulina può facilmente raggiungere i siti di contatto. Dopo un po' di tempo la riduzione per adsorbimento comincia a diminuire in quanto questi siti sono già occupati. Un grafico che aiuta a capire meglio il tutto è quello rappresentato in figura 38.



**Figura 38** Andamento della rimozione di  $\beta$ -2-microglobulina in 4 diversi materiali sintetici in trattamento di *high flux* HD[18]

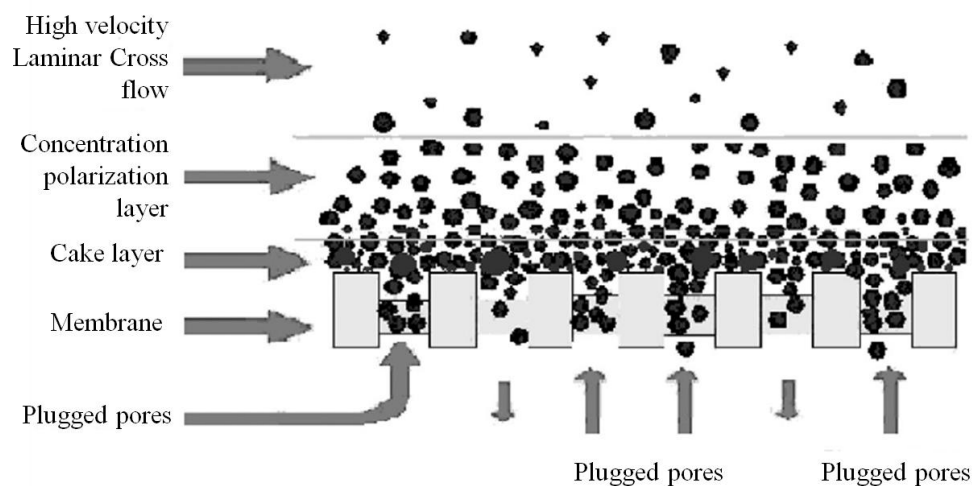
Lo studio è stato effettuato in un trattamento di HDF. Il calcolo della  $\beta$ -2-microglobulina rimossa per adsorbimento è stato calcolato come differenza di quella eliminata in totale e quella eliminata per convezione e diffusione (in rosso nel grafico), misurandone la concentrazione nel liquido di dialisi in uscita dal filtro. Viene confermata prima di tutto la totale assenza della proteina nel liquido

di dialisi se la membrana è PMMA: ciò significa che la rimozione avviene totalmente per adsorbimento. In questo caso, l'andamento dell'adsorbimento risulta decrescente (c'è da considerare naturalmente anche la riduzione di  $\beta$ -2-microglobulina nel circolo ematico). Anche con il polisulfone la differenza a inizio trattamento è elevata, ma dopo pochissimo tempo (5 minuti) la totalità della rimozione avviene quasi solo per convezione-diffusione. I due filtri in AN69 e Asahi PAN, dopo un'elevata differenza iniziale, mostrano un comportamento intermedio tra quelli sopra citati.

La velocità di adsorbimento è dipendente dal flusso di ultrafiltrazione  $Q_{UF}$ : aumentando tale valore aumenta anche la velocità. Di conseguenza il trattamento in cui si evidenzia maggiormente è l'HDF.

## 5. La membrana secondaria e la vibrazione meccanica

Un altro fenomeno che si verifica durante il passaggio del circolo ematico all'interno delle membrane di un dializzatore è la formazione della membrana secondaria e la cosiddetta concentrazione di polarizzazione. Il sangue infatti, all'interno di una fibra cava, in direzione radiale presenta un gradiente di concentrazione dei soluti che determina una disposizione degli stessi non omogenea (figura 39). Ai lati della membrana, la concentrazione risulta maggiore rispetto al *bulk* della stessa: questo è dovuto principalmente al gradiente di pressione, che viene applicato durante il trattamento, che “spinge” i soluti, in particolare le proteine plasmatiche, verso l'esterno. Tale fenomeno risulta quindi più accentuato in terapie dialitiche in cui si utilizzano membrane *high flux*. Se le dimensioni dei pori della membrana non permettono una rimozione immediata dei soluti in questione, cioè se il valore di *cut off* è inferiore o non è di molto superiore alle loro dimensioni, questi vengono respinti e si accumulano sulla faccia ad alta pressione generando un profilo di concentrazione determinato dalla competizione fra il trasporto convettivo verso la membrana e il retrotrasporto diffusivo, che riporta il soluto verso il cuore della soluzione [19, 20]. Tale fenomeno, noto come polarizzazione di concentrazione, induce una maggiore concentrazione del soluto respinto sulla superficie della membrana rispetto alla concentrazione del *bulk*.

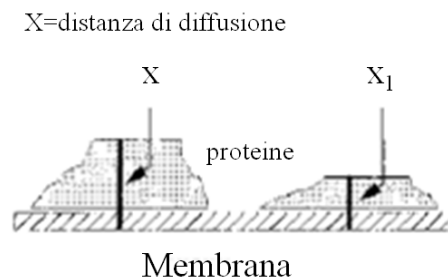


**Figura 39** Formazione della membrana secondaria e della concentrazione di polarizzazione lungo una membrana di dialisi[21]

La concentrazione di polarizzazione è strettamente correlata con la formazione della cosiddetta membrana secondaria, detta anche *protein cake layer* o *protein gel layer*. Come è già stato visto nei capitoli precedenti, le proteine interagiscono notevolmente con la membrana secondo fenomeni di

tipo elettrochimico e ciò determina la formazione di uno strato lungo la parete interna della fibra soprattutto di proteine a medio-alto peso molecolare.

La concentrazione di polarizzazione e il *protein gel layer* influiscono notevolmente sul trasporto dei soluti. Se da un lato infatti c'è la possibilità di creare uno strato di materiale autologo lungo le pareti della membrana, migliorando la biocompatibilità della stessa nell'interazione con il sangue, dall'altro c'è un notevole decremento delle proprietà di rimozione dei soluti, riducendone la permeabilità idraulica (e quindi la capacità convettiva) e il coefficiente di *sieving*, specialmente per le proteine a medio peso molecolare come la  $\beta$ -2-microglobulina. Anche l'effetto diffusivo ne risente: in questo caso infatti la distanza da superare per il soluto aumenta (figura 40) e quindi il flusso diffusivo, secondo la legge di Fick, diminuisce.



**Figura 40** Influenza della concentrazione di polarizzazione e del *protein gel layer* sulla distanza di diffusione  $x$ [13]

Nonostante concentrazione di polarizzazione e *protein gel layer* siano fisicamente differenti, essi sono legati tra loro e si influenzano l'un l'altro. La concentrazione di polarizzazione accelera l'ostruzione dei pori, mentre il *protein cake* influenza il profilo della concentrazione di polarizzazione[22]. In letteratura[23], è stata proposta l'introduzione di un parametro termodinamico, il cosiddetto "numero di filtrazione", per distinguere questi due fenomeni. Il numero di filtrazione è definito come:

$$N_F = \frac{4 \pi a_p^3}{3 K T} \Delta P$$

dove  $Q_F$  è il numero di filtrazione,  $a_p$  è il raggio della particella,  $K$  è la costante di Boltzmann,  $T$  è la temperatura assoluta e  $\Delta P$  è la caduta di pressione lungo lo strato della concentrazione di polarizzazione. Se il numero di filtrazione è inferiore a 15, la formazione della *protein cake* non avviene. Durante il processo di purificazione extracorporea del sangue, il *range* di valori del numero di filtrazione varia tra 0.1 e  $10^6$ , ed è proporzionale alla terza potenza del raggio della



particella. Di conseguenza, la filtrazione di proteine a medio peso molecolare il cui coefficiente di *sieving* è inferiore a 1 può innescare lo sviluppo del *protein gel layer* durante il trattamento.

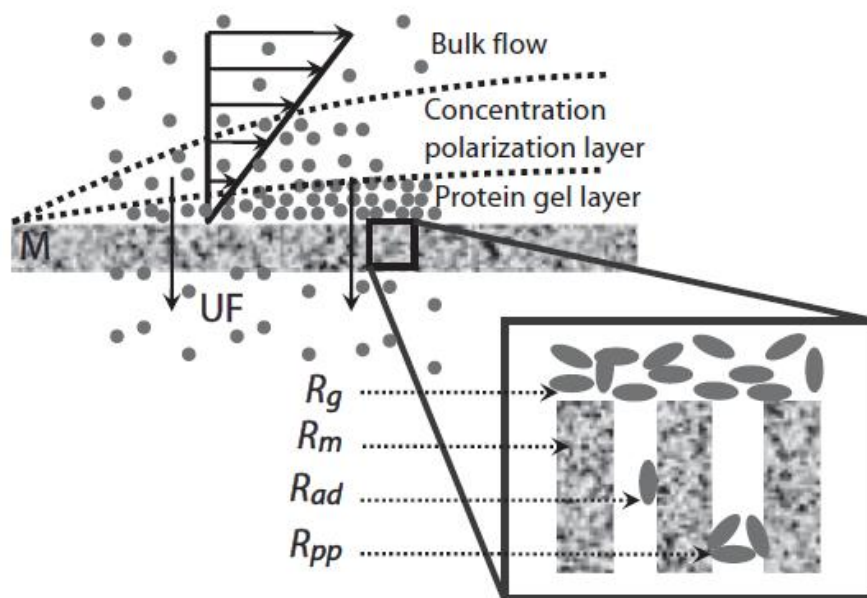
Il *protein gel layer* si forma tra la superficie della membrana e il *layer* di concentrazione di polarizzazione (figura 41) quando le condizioni idrodinamiche (il numero di filtrazione) raggiungono un valore critico. Questo fenomeno provoca anche la diminuzione della porosità della membrana per adsorbimento delle proteine e ingombro sterico. In questo ambiente di filtrazione, la resistenza idraulica di una membrana può essere rappresentata come:

$$R = R_g + R_{ad} + R_{pp}$$

dove  $R_g$  è la resistenza del *protein layer*,  $R_{ad}$  è la resistenza derivata dall'adsorbimento interno ai pori della membrana e  $R_{pp}$  è la resistenza dovuta all'ingombro sterico nei pori. Di conseguenza, la resistenza totale della membrana diventa

$$R_{total} = R_{cp} + R_g + R_m + R_{ad} + R_{pp}$$

dove  $R_m$  è la resistenza intrinseca della membrana e  $R_{cp}$  è la resistenza dovuta alla concentrazione di polarizzazione [24].



**Figura 41** Componenti della resistenza totale della membrana per dialisi[21]

I due fenomeni esposti avvengono quasi immediatamente durante il trattamento: già dopo pochi minuti dall'inizio della terapia i *layers* sono formati.

Lo spessore della concentrazione di polarizzazione è funzione di diverse variabili (concentrazione plasmatica, distanza longitudinale dalla porta d'accesso del dializzatore), ma quella che più delle altre ne determina il fenomeno è lo *share rate*.

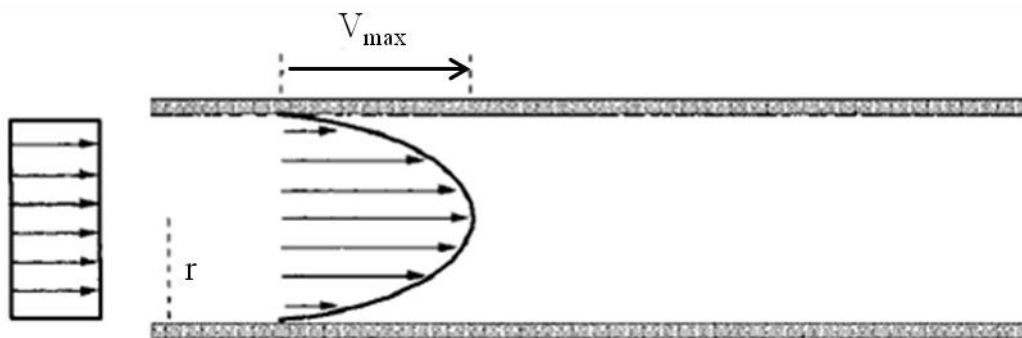
## 5.1 Fluidodinamica del sangue

Il sangue, a causa della presenza di un'elevata componente solida in percentuale principalmente determinata dalla presenza dei globuli rossi, allo stato stazionario possiede un comportamento non newtoniano.

Si definisce non newtoniano un fluido la cui viscosità varia a seconda dello sforzo di taglio  $\tau$  (*shear stress*) che viene applicato e la velocità di deformazione del fluido dipende in maniera non lineare da tale valore.

In realtà, in letteratura, si preferisce considerare il fluido ematico un fluido newtoniano. Infatti, il sangue presenta uno *yield stress*, cioè un valore di soglia dello sforzo di taglio che determina il passaggio da un comportamento all'altro, di  $200 \text{ s}^{-1}$ , valore leggermente superiore agli sforzi di taglio che si raggiungono quando il sangue passa lungo una singola fibra del dializzatore ma che comunque permette una buona approssimazione nel considerarlo tale.

In queste condizioni, quando il sangue entra all'interno di una fibra, lo *shear stress*  $\tau$  genera diversi "strati" laminari di fluido in direzione radiale con diverse velocità dalla zona centrale della fibra (bulk) alla zona periferica della stessa (*wall*), come mostrato in figura 42.



**Figura 42** Gradiente della velocità all'interno di una singola fibra di un dializzatore[13]

Il gradiente di velocità dipende in maniera lineare dallo sforzo di taglio secondo la seguente relazione:

$$\tau = -\mu \times \frac{\delta v}{\delta r}$$

dove  $\tau$  è lo sforzo di taglio o *shear stress*,  $\mu$  è la viscosità del sangue (che dipende dall'ematocrito) e  $\frac{\delta v}{\delta r}$  è il gradiente di velocità o velocità di deformazione tangenziale o *share rate*, anche indicato con  $\gamma$ .

Lo spessore del *protein layer* (ma anche quello della concentrazione di polarizzazione), come detto, è fortemente influenzato dallo *share rate* nei pressi della superficie interna della membrana: maggiore risulta tale valore, minore sarà il deposito e la concentrazione di polarizzazione di proteine sulla superficie. A conferma di ciò, basti considerare il valore del coefficiente di *sieving* come varia in funzione di  $\gamma$  (figura 43):

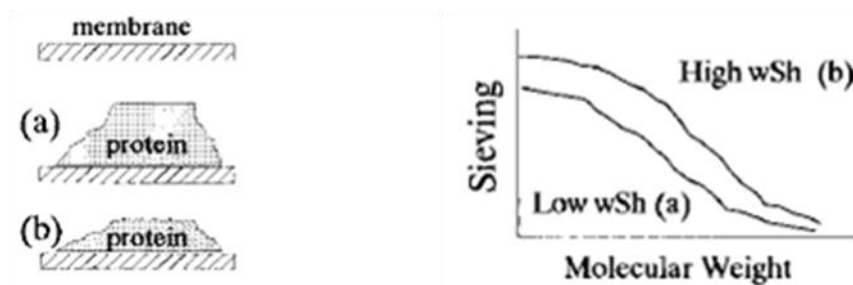


Figura 43 Variazione del coefficiente di *Sieving* in funzione dello share rate[13]

Anche il flusso di ultrafiltrazione è influenzato dallo *shear rate*, come indicato nella seguente formula:

$$Q_{UF} = 3.40 \times 10^{-5} \left[ \frac{\gamma}{x} \right]^{1/3} \ln \frac{28.7}{C_B} [25]$$

dove  $\gamma$  è lo *share rate*,  $x$  è la distanza dalla porta d'ingresso sangue del dializzatore e  $C_B$  è la concentrazione plasmatica delle proteine nel bulk.

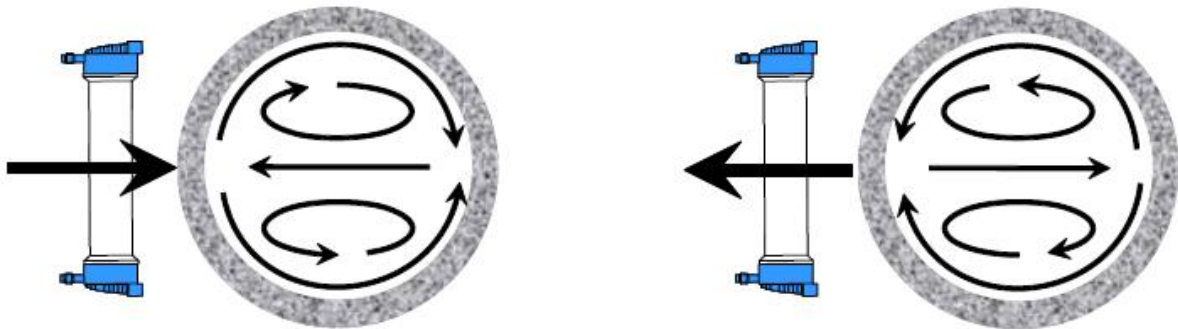
Risulta importante quindi cercare di operare a valori di gradienti di velocità il più elevati possibile proprio per evitare la formazione di questi due fenomeni e poter mantenere pulita la membrana interna del dializzatore.

Per ottenere questo proposito, una soluzione può essere quella di incrementare la velocità laminare sulla parete interna delle membrane aumentando il flusso sangue  $Q_B$  in entrata. Questo metodo però, come detto, ha i suoi limiti (accesso vascolare, tolleranza del paziente, ecc).

Un metodo alternativo può essere quella di applicare una vibrazione meccanica al filtro in modo tale da creare dei vortici all'interno delle fibre.

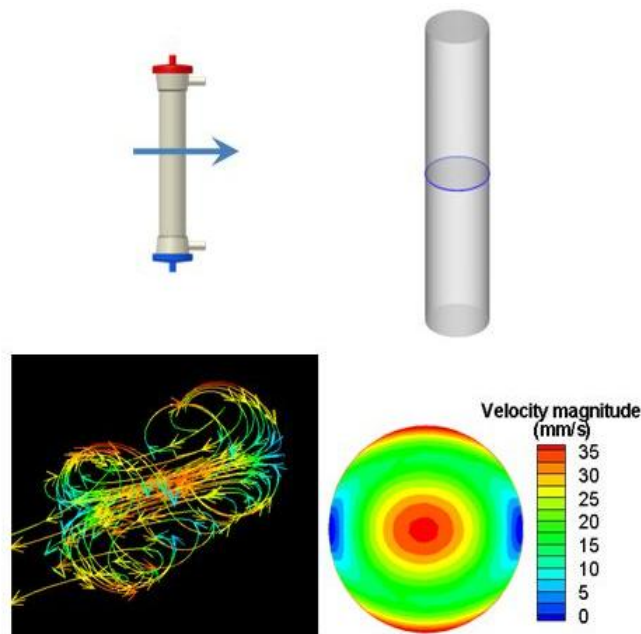
## 5.2 Applicazione di una vibrazione meccanica

L'applicazione meccanica di una vibrazione al filtro può creare vortici all'interno di ogni singola fibra in modo da aumentare la velocità e quindi lo *share rate* sulla parete interna delle membrane. In questo modo possono essere ridotti gli spessori indotti dal *protein layer* e dalla concentrazione di polarizzazione che riducono la capacità di rimozione dei soluti nel tempo. Se l'applicazione della vibrazione avviene trasversalmente al filtro, un flusso di agitazione simmetrico nella sezione trasversale della fibra può essere sviluppato, come mostra la figura 44.



**Figura 44** Induzione, tramite vibrazione meccanica trasversalmente al filtro, di vortici all'interno di una singola fibra in un verso e nell'altro

Studi recenti hanno mostrato, attraverso simulazioni computerizzate, il profilo di velocità e le linee di flusso all'interno di una fibra di un dializzatore quando risulta sottoposto a vibrazione (figura 45).



**Figura 45** Simulazione computerizzata del profilo di velocità e linee di flusso all'interno di una fibra

Per una vibrazione unidimensionale (trasversale o longitudinale), dal punto di vista matematico la posizione  $x(t)$ , la velocità  $v(t)$  e l'accelerazione  $a(t)$  sono descritte come:

$$x(t) = A \sin(\omega t), v(t) = A \omega \cos(\omega t), a(t) = -A \omega^2 \sin(\omega t)$$

dove  $A$  è l'ampiezza della vibrazione e  $\omega = 2\pi f$  (con  $f$  che è la frequenza).

Oltre a ridurre gli spessori dei *layers* citati, l'effetto di una vibrazione meccanica trasversale può determinare una modifica dei contributi alla rimozione dei tre principali meccanismi che sono diffusione, convezione e adsorbimento. Quest'ultimo, per esempio, può essere limitato grazie all'agitazione meccanica che viene applicata, favorendo di conseguenza le prime due vista la possibile riduzione della resistenza determinata dall'ingombro sterico delle molecole, e in particolare delle proteine.



## 6. Scopo della tesi

Il presente lavoro di tesi è uno studio pilota sperimentale per valutare l'efficienza di un'oscillazione meccanica nella rimozione di soluti a medio peso molecolare durante un trattamento di dialisi extracorporea.

Durante i primi minuti del trattamento, la formazione di barriere secondarie (*protein gel layer*) e la concentrazione di polarizzazione determinano un abbassamento della capacità dializzante del filtro che quindi, nel tempo, non mantiene la capacità originaria di rimozione dei soluti. Recentemente è stato dimostrato, attraverso delle simulazioni computerizzate[21], che la fluidodinamica del sangue all'interno delle membrane di un filtro dializzatore, al quale viene applicato un movimento oscillatorio, può creare dei vortici con conseguente incremento dello *share rate*. Questo fenomeno potrebbe determinare a sua volta una riduzione dello spessore del *protein layer* e della concentrazione di polarizzazione e conseguentemente potrebbe incrementare la rimozione dei soluti, soprattutto a medio peso molecolare, che avviene per diffusione e convezione. Inoltre, in presenza di vibrazione, anche i meccanismi di trasporto (diffusione, convezione e adsorbimento) dei soluti potrebbero essere modificati.

In questo lavoro si sono cercate le evidenze sperimentali a sostegno della tesi suddetta.

Non essendo stato possibile ottenere in breve tempo l'approvazione da parte del Comitato Etico per un'applicazione *in vivo*, lo studio effettuato è stato condotto *in vitro* utilizzando diverse soluzioni di una proteina di peso molecolare medio ( $\beta$ -2-microglobulina) che potessero simulare nel miglior modo possibile il comportamento del sangue umano all'interno delle membrane del dializzatore in presenza o meno di vibrazione. A tal scopo sono stati utilizzati, in diverse fasi dell'esperimento, i seguenti liquidi:

- soluzione concentrata in  $\beta$ -2-microglobulina;
- soluzione concentrata in  $\beta$ -2-microglobulina e latte parzialmente scremato;
- soluzione concentrata in  $\beta$ -2-microglobulina e sangue bovino fresco.

Ogni test è stato effettuato per due volte nelle stesse condizioni operative, in presenza o meno di vibrazione meccanica al filtro.

Molte delle variabili del sistema sono state mantenute costanti. Tra queste citiamo:

- il tipo di materiale delle membrane (polisulfone), l'area superficiale, il coefficiente di ultrafiltrazione  $K_{UF}$  e le altre proprietà meccaniche e idrodinamiche del dializzatore;

- i parametri delle macchine di dialisi utilizzate, come flusso sangue, flusso di ultrafiltrazione, flusso del liquido di dialisi, flusso di infusione;
- direzione, ampiezza e frequenza dell'oscillazione meccanica;
- parametri esterni come la temperatura.

L'effetto della vibrazione è stato valutato mediante:

- determinazione del contenuto di  $\beta$ -2-microglobulina prima e dopo il passaggio attraverso il filtro dializzatore a diversi tempi;
- determinazione del rapporto di riduzione di  $\beta$ -2-microglobulina da inizio a fine trattamento e valutazione della diversa influenza sulla rimozione totale dei meccanismi di rimozione (diffusione, convezione, adsorbimento).



# MATERIALI E METODI

## 1. Materiali

### 1.1 Soluti

Prodotti forniti dalla *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Germania):

- Urea in polvere (98%)

### 1.2 Filtri dializzatori

Il filtro dializzatore utilizzato per la preparazione del liquido concentrato in  $\beta$ -2-microglobulina è il Fresenius FX10, *Fresenius Medical Care* (Bad Homburg, Germania). Le caratteristiche tecniche del filtro sono le seguenti:

Nome filtro	$K_{UF}$ (ml/h/mmHg)	Applicazione	Sterilizzazione	Materiale membrana	Superficie effettiva (m <sup>2</sup> )	Spessore ( $\mu$ m)	Diametro interno ( $\mu$ m)
FX 10	18	HD standard	Vapore	Polisulfone Helixone®	1,8	35	185

I filtri dializzatori utilizzati invece per il test *in vitro* sono:

- FX80, Fresenius Medical Care

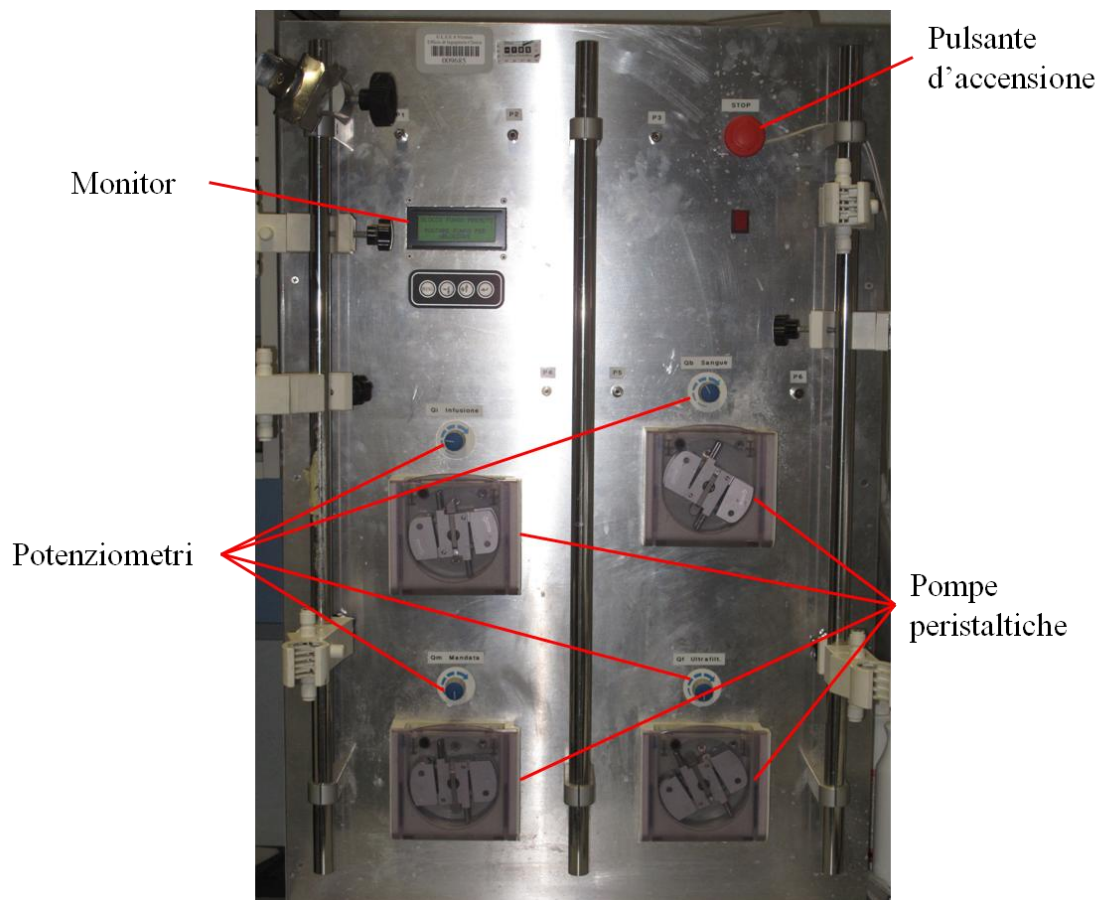
Nome filtro	$K_{UF}$ (ml/h/mmHg)	Applicazione	Sterilizzazione	Materiale membrana	Superficie effettiva (m <sup>2</sup> )	Spessore ( $\mu$ m)	Diametro interno ( $\mu$ m)
FX80	59	High flux HD HF HDF	Vapore	Polisulfone Helixone®	1,8	35	185

- FX100, *Fresenius Medical Care*

Nome filtro	$K_{UF}$ (ml/h/mmHg)	Applicazione	Sterilizzazione	Materiale membrana	Superficie effettiva (m <sup>2</sup> )	Spessore ( $\mu$ m)	Diametro interno ( $\mu$ m)
FX 100	73	High flux HD HF HDF	Vapore	Polisulfone Helixone®	2,2	35	185

### 1.3 Macchine di dialisi

Per la preparazione della soluzione concentrata in  $\beta$ -2-microglobulina e della miscelazione della stessa con sangue bovino è stato usato un prototipo, di nome “silver machine” (figura 46), in cui sono state installate 4 pompe peristaltiche (ottenute da vecchie macchine in disuso) e 6 connessioni per altrettanti trasduttori di pressione. Tramite 4 potenziometri è possibile modificare la velocità di rotazione delle pompe e, di conseguenza, il flusso per ognuna di esse. I valori di pressioni e flussi sono visibili attraverso un monitor.



**Figura 46** Silver Machine e suoi componenti

Per il test *in vitro* sono stati utilizzati due macchinari:

- Fresenius 5008 (*Fresenius Medical Care*)
- AK200 (*Gambro*)

Per la preparazione delle macchine con linee sangue (arteriosa e venosa), linee infusione e connettori sono stati utilizzati i kit, unici per il tipo specifico di pompe, forniti dalle case produttrici. Nel caso della “silver machine” è stato utilizzato un kit *Bellco* (Modena, Italia) in quanto le pompe installate sono della stessa azienda.

## 1.4 Liquidi per soluzioni

I liquidi utilizzati per il test *in vitro* sono:

- Soluzione concentrata in  $\beta$ -2-microglobulina (vedi metodi).
- Soluzione concentrata in  $\beta$ -2-microglobulina e latte parzialmente scremato acquistato in supermercato. La scelta del latte parzialmente scremato è stata effettuata al fine di non contenere un eccessivo quantitativo di grassi nella soluzione finale.
- Soluzione concentrata in  $\beta$ -2-microglobulina e sangue bovino fresco (10L per ogni prova) consegnato dall'azienda *B-Braun* (Milano, Italia). Il sangue, per evitarne la coagulazione e il deterioramento durante il percorso, è stato trattato con le seguenti sostanze: 5.5 g di sodio citrato diidrato, 6.15 g di glucosio, 2 g di acido citrico monoidrato, 10 ml di eparina, 250 ml di acqua purificata.

Prima di ogni trattamento le soluzioni sono state riscaldate tramite uno riscaldatore per sacche di dialisi peritoneale alla temperatura di 36°C.

## 1.5 Macchina per oscillazioni meccaniche

La macchina per oscillazioni meccaniche utilizzata (figura 47) è un prototipo progettato dall'ing. coreano Kim Jeong Chul e costruito nella facoltà di ingegneria meccanica dell'università di Seoul in Corea del Sud. La macchina si basa su un semplice meccanismo disco-manovella: la rotazione del disco, ottenuta tramite un motorino elettrico, permette il movimento oscillatorio della manovella che a sua volta è collegata a una slitta che termina con un supporto per il dializzatore.



**Figura 47** Dispositivo per oscillazione meccanica

La manovella può essere collegata al disco in diverse posizioni radiali: ciò permette di modificare l'ampiezza (A). Un display inoltre permette di visualizzare il numero di giri che a sua volta determina la frequenza. I possibili valori di ampiezza e frequenza di vibrazione sono evidenziati in figura 48.

Ampiezza (mm)	Frequenza (display)	Frequenza (Hz)
5	180	0,5
10	360	1
15	540	1,5
20	720	2
	900	2,5
	1080	3
	1260	3,5
	1440	4
	1620	4,5

**Figura 48** Valori di ampiezza e frequenza regolabili nella macchina

## 2. Metodi

### 2.1 Preparazione della soluzione concentrata in $\beta$ -2-microglobulina

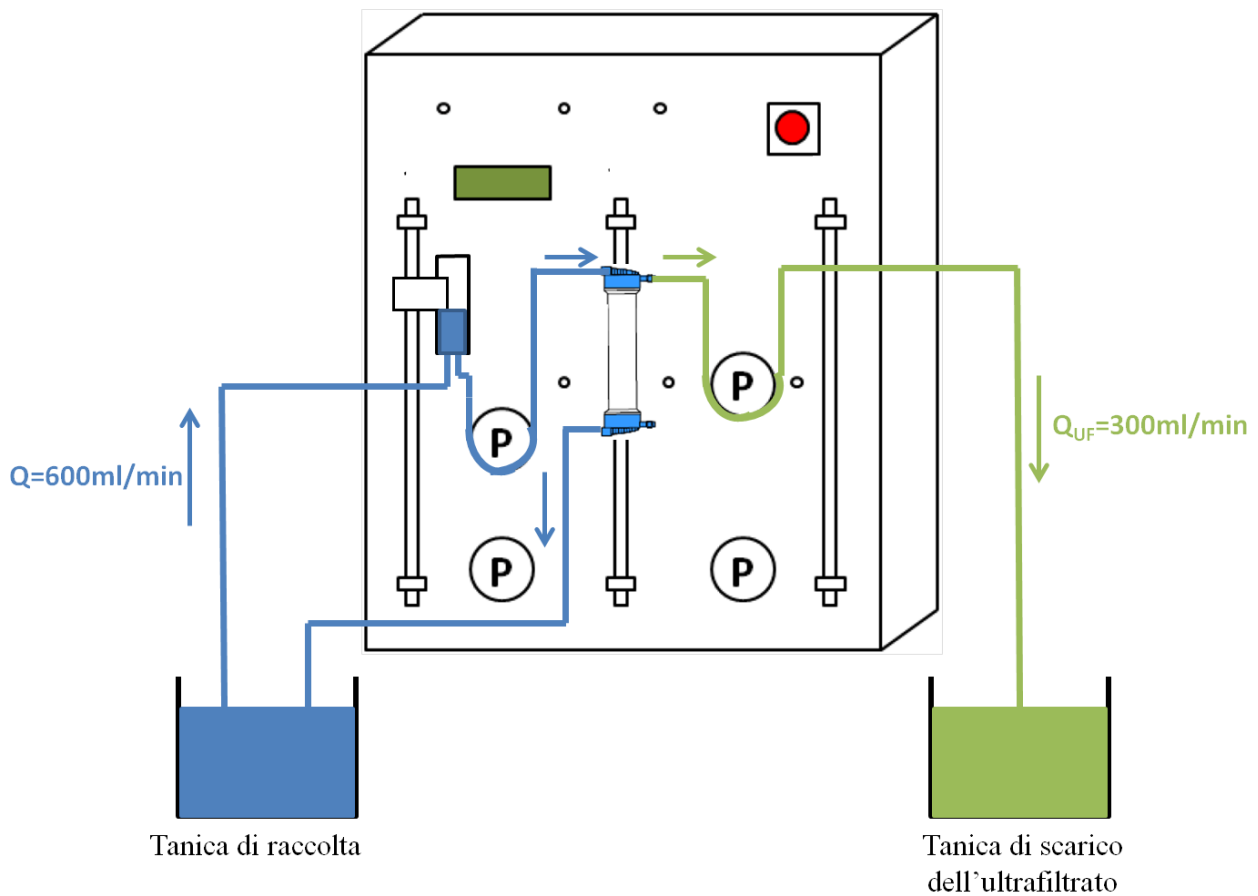
Per verificare l'effetto di una vibrazione meccanica sulla rimozione di molecole a medio peso molecolare è stato necessario ottenere una soluzione con una concentrazione di  $\beta$ -2-microglobulina, scelta come marcatore di tale classe di soluti, simile a quella che un paziente soggetto a insufficienza renale cronica può realisticamente avere nel plasma del circolo ematico prima di essere sottoposto a trattamento. Tale valore può essere compreso in un *range* tra i 15 e i 50 mg/L. Per ottenere una concentrazione del genere in un volume che comunque non può essere esiguo per effettuare un realistico test *in vitro* (almeno 5 litri, tanto quanto è l'effettivo volume di sangue in un uomo adulto), è necessario un quantitativo in massa di  $\beta$ -2-microglobulina non indifferente (almeno 200 mg per un singolo test). Per motivi economici non è stato quindi possibile acquistare da catalogo la proteina in questione. Si è cercato allora un metodo alternativo per l'ottenimento della stessa.

Il metodo ha previsto la raccolta del liquido in uscita dallo scarico di una macchina utilizzata per un paziente sottoposto a trattamento dialitico tramite due taniche graduate con capienza massima di circa 40 litri. Il paziente è stato selezionato tra tutti quelli che effettuano dialisi extracorporea all'interno del reparto di nefrologia dell'ospedale di Vicenza e le discriminanti principali nella scelta dello stesso sono state la concentrazione di  $\beta$ -2-microglobulina nel circolo ematico misurata durante l'analisi del sangue più recente e il tipo di trattamento effettuato, in questo caso HDF post diluizione in quanto quello che permette la rimozione più importante di  $\beta$ -2-microglobulina. Il volume totale di liquido raccolto ogni volta è stato di 80 L: se si considerano il flusso del dializzato (500 ml/min) e il flusso di ultrafiltrazione applicato durante il trattamento del paziente in questione ( $\approx$ 80 ml/min), il tempo impiegato per la raccolta è stato più di 2 ore.

Successivamente, il dializzato dello scarico è stato concentrato tramite l'applicazione di un trattamento HF con la "silver machine" (Figura 49). Facendo ricircolare in continuo la soluzione è stato possibile ultrafiltrare l'acqua e ridurre così il volume iniziale di 80 L a un volume finale di 10 L, ottenendo una soluzione concentrata in  $\beta$ -2-microglobulina. Il liquido ultrafiltrato è stato raccolto in una tanica di scarico e successivamente eliminato. Il filtro utilizzato è stato il Fresenius FX10 in quanto il suo  $K_{UF}$  è 18 ml/h/mmHg: ciò permette di ottenere un compromesso tra l'ultrafiltrazione voluta di acqua, in realtà molto lenta in quanto il filtro è *low flux*, e la contemporanea ritenzione di

$\beta$ -2-microglobulina. In più il polisulfone delle membrane permette un bassa percentuale di adsorbimento della proteina. Il flusso del dializzato di partenza applicato è stato 600 ml/min mentre il  $Q_{UF}$  è stato di 300 ml/min. Anche in questo caso il tempo necessario all'ottenimento della soluzione finale dipende dal flusso di ultrafiltrazione: per rimuovere ogni volta 70 L di acqua sono state impiegate circa 4 ore. Per ridurre i tempi, spesso sono stati utilizzati due filtri identici operanti in parallelo.

La concentrazione finale di  $\beta$ -2-microglobulina nella soluzione così ottenuta è stata valutata tramite chemiluminescenza ed è risultata compresa tra i 20 e i 25 mg/L e la densità finale è molto simile a quella dell'acqua ( $1 \text{ g/cm}^3$ ).



**Figura 49** Metodo per l'ottenimento della soluzione concentrata in  $\beta$ -2-microglobulina tramite "silver machine"

Per poter verificare il bilancio di massa è stata posta in soluzione anche urea. Anche in questo caso, l'aggiunta è stata effettuata in base al *range* di concentrazione che può essere presente nel sangue di un paziente uremico, circa 100 mg/dL. Di conseguenza, in massa, per 10 L di soluzione, sono stati aggiunti 10 g di urea.

Successivamente, la soluzione concentrata in  $\beta$ -2-microglobulina è stata divisa a metà (5L) e posta in due sacche della capienza massima di 12L: la prima sacca sarà utilizzata per un trattamento normale e con la seconda sarà utilizzata per un trattamento con oscillazione meccanica del filtro.

## 2.2 Preparazione della soluzione concentrata in $\beta$ -2-microglobulina con latte

Per cercare di rendere la fluidodinamica della soluzione il più simile possibile a quella del fluido ematico fisiologico, alla soluzione concentrata in  $\beta$ -2-microglobulina è stato addizionato latte. Il latte viene utilizzato dalle aziende per testare *in vitro* i dializzatori al fine di ottenere parametri tecnici di resistenza meccanica come, per esempio, la valutazione della massima TMP applicabile. L'aggiunta di latte aumenta la viscosità della soluzione.

Ai 10L di soluzione concentrata in  $\beta$ -2-microglobulina, ottenuti come descritto in precedenza, sono stati aggiunti 10L di latte parzialmente scremato. Il fluido è stato sottoposto poi a nuova ultrafiltrazione fino ad ottenere nuovamente 10L finali.

La concentrazione finale di  $\beta$ -2-microglobulina è risultata compresa in un *range* 18-23mg/L.

Il quantitativo di miscela con il latte è stato suddiviso in 2 sacche, di 5L ciascuna, per il test *in vitro*.

## 2.3 Preparazione della soluzione concentrata in $\beta$ -2-microglobulina con sangue bovino

Per cercare di avere caratteristiche fluidodinamiche il più simile possibile a quella del sangue, il dializzato concentrato in  $\beta$ -2-microglobulina è stato arricchito con sangue bovino. In questo caso però il volume della soluzione finale è stato ridotto ulteriormente (1L) per non abbassare troppo la frazione di ematocrito del sangue. La concentrazione finale della soluzione mista sangue/dializzato può essere espressa come:

$$C(\beta\text{-}2_{\text{Totale}}) = \frac{[(V_{\text{Sangue}} - (HCT \times V_{\text{Sangue}})) \times C(\beta\text{2}_{\text{Sangue}}) + (V_{\text{Dializzato}} \times C(\beta\text{2}_{\text{Dializzato}}))]}{(V_{\text{Sangue}} - (HCT \times V_{\text{Sangue}}) + V_{\text{Dializzato}})}$$

dove  $C(\beta\text{2}_{\text{Totale}})$  è la concentrazione plasmatica finale di  $\beta$ -2-microglobulina nella soluzione mista sangue/dializzato,  $C(\beta\text{2}_{\text{Sangue}})$  è la concentrazione plasmatica di  $\beta$ -2-microglobulina nel sangue bovino,  $C(\beta\text{2}_{\text{Dializzato}})$  è la concentrazione di  $\beta$ -2-microglobulina nel dializzato aggiunto,  $V_{\text{Sangue}}$  è

il volume di sangue bovino (10L),  $V_{\text{Dializzato}}$  è il volume di dializzato e HCT è l'ematocrito base del sangue bovino (circa 36%).

Considerando nulla la  $C(\beta_{2\text{Sangue}})$  del sangue bovino puro, per riuscire ad ottenere una  $C(\beta_{2\text{Totale}})$  di almeno 15-18 mg/L e non alterare troppo il volume dell'ematocrito, la  $C(\beta_{2\text{Dializzato}})$  in tale volume deve essere presente almeno una concentrazione di 120 mg/L. In figura 50 viene mostrato l'andamento di tale concentrazione in funzione del volume rimanente in una tanica da 40 L durante il trattamento di HF (l'andamento negli 80 L è semplicemente il doppio). Si può notare che il valore viene raggiunto quando il volume rimanente nella tanica è al massimo 1 L (non si è ultrafiltrato ulteriormente per evitare un'eccessiva perdita in massa di  $\beta$ -2-microglobulina).

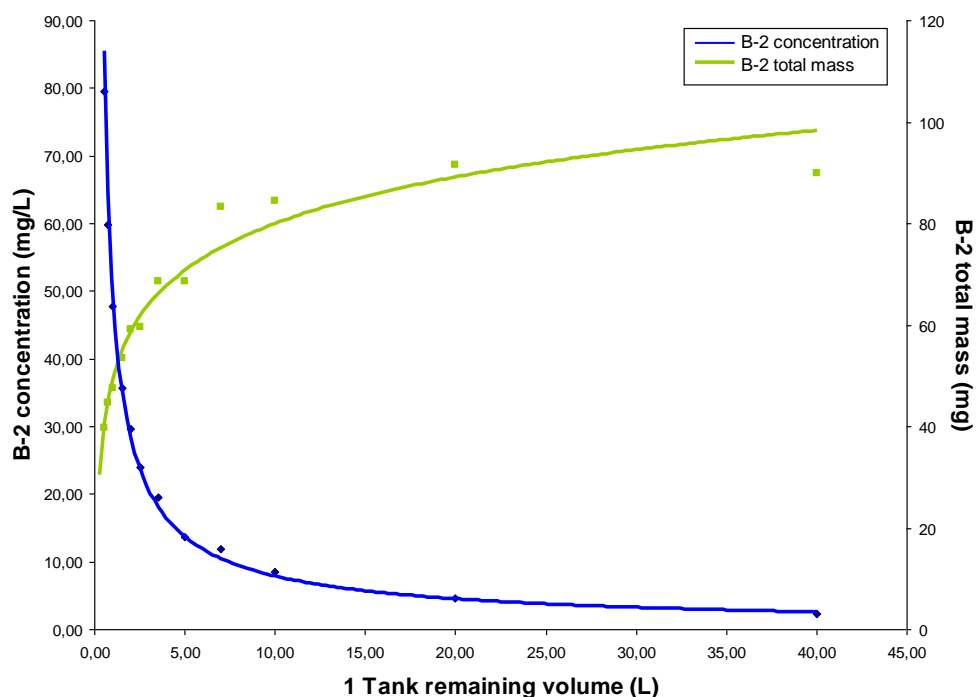


Figura 50 Andamento della concentrazione di  $\beta$ -2-microglobulina durante il trattamento HF con “Silver machine”

Il mixing tra sangue e soluzione concentrata in  $\beta$ -2-microglobulina è stato effettuato sempre tramite “silver machine”: dopo avere iniettato 5ml di eparina in soluzione fisiologia e averli fatti circolare all'interno delle linee sangue per permetterne il deposito sulle pareti interne delle linee per evitare *clotting* (non è stato utilizzato alcun dializzatore), l'iniezione del dializzato nel flusso del sangue bovino è stata ottenuta tramite pompa peristaltica attraverso una linea di infusione dal calibro più piccolo (figura 51). Per permettere una buona miscelazione tra i 2 liquidi sono stati applicati un flusso  $Q_B$  di 200ml/min e un flusso  $Q_{INF}$  (flusso di infusione del dializzato) di 20ml/min (proporzionale al rapporto tra i 2 volumi). La soluzione mista ottenuta è stata direttamente convogliata in 2 sacche pre-eparinizzate attraverso un connettore a doppio lume.



La concentrazione finale di  $\beta$ -2-microglobulina si attesta in un range tra i 18mg/dL e i 22mg/dL e l'ematocrito finale tra il 30% e il 34%.

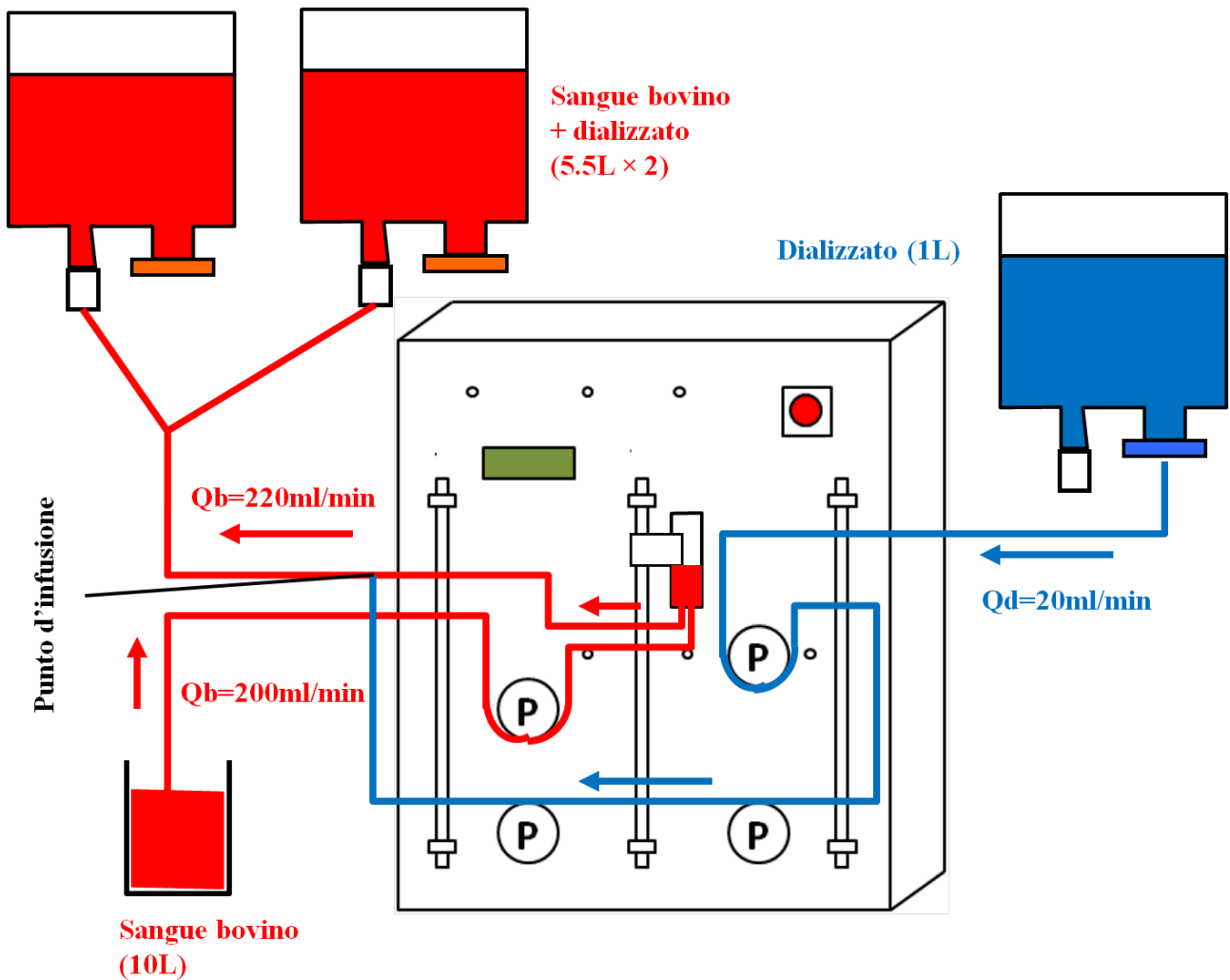


Figura 51 Metodo per l'ottenimento della soluzione sangue/dializzato tramite "silver machine"

## 2.4 Test in vitro

Il test *in vitro* applicato ha previsto sempre la ripetizione del trattamento, con le stesse identiche condizioni operative, con e senza l'applicazione dell'oscillamento meccanico. La vibrazione è stata applicata tramite il macchinario in maniera unidirezionale e trasversalmente al filtro. I parametri utilizzati sono stati sempre i seguenti:

- Ampiezza  $A = 10 \text{ mm}$
- Frequenza  $f = 4 \text{ Hz}$

Essendo il presente lavoro di tesi uno studio preliminare sull'efficienza o meno dell'oscillazione meccanica nella rimozione di soluti a medio peso molecolare, non è stata considerata l'influenza di questi 2 parametri che sono quindi stati mantenuti costanti.

I fenomeni della concentrazione di polarizzazione e del *protein layer*, come detto, avvengono molto rapidamente e si formano già nei primi minuti dall'inizio del trattamento.

La prima valutazione dell'effetto dell'oscillazione meccanica è stata effettuata quindi tramite un confronto della capacità di rimozione di  $\beta$ -2-microglobulina, valutandone la *clearance* istantanea, in momenti temporalmente molto ravvicinati, nei primi 20 minuti di trattamento.

In questa prima fase sono state utilizzate la soluzione concentrata in  $\beta$ -2-microglobulina e la soluzione latte + soluzione concentrata in  $\beta$ -2-microglobulina. E' stato applicato il metodo *single pass*, cioè non è stato effettuato il ricircolo della soluzione una volta passata nel filtro.

I parametri tecnici utilizzati in questa prima parte dello studio sono riassunti in figura 52.

Soluzione	Macchinario di dialisi	Dializzatore	Trattamento	Q <sub>B</sub> (ml/min)	Q <sub>D</sub> (ml/min)	Q <sub>INF</sub> (ml/min)	UF <sub>NET</sub> (ml/min)	Q <sub>UF</sub> (ml/min)	Temperatura della soluzione (°C)
Dializzato concentrato in $\beta$ -2-microglobulina	Fresenius 5008	FX100	HDF post inf	250	500	84	0	84	36
Soluzione	Macchinario di dialisi	Dializzatore	Trattamento	Q <sub>B</sub> (ml/min)	Q <sub>D</sub> (ml/min)	Q <sub>INF</sub> (ml/min)	UF <sub>NET</sub> (ml/min)	Q <sub>UF</sub> (ml/min)	Temperatura della soluzione (°C)
Latte + dializzato concentrato in $\beta$ -2-microglobulina	Fresenius 5008	FX 80	High Flux HD	250	500	0	0	0	36

**Tabella 3** Parametri tecnici utilizzati durante la prima fase del test in vitro

Il flusso di infusione Q<sub>INF</sub> indica il flusso da infondere nel paziente (che nel caso in questione è rappresentato dalla sacca) per riequilibrare il bilancio idrico mentre UF<sub>NET</sub> indica il bilancio netto di volume di liquido effettivamente rimosso nell'arco temporale considerato (viene applicato un UF<sub>NET</sub> negativo solitamente per i pazienti con ritenzione idrica). Il Q<sub>UF</sub> è semplicemente la somma tra Q<sub>INF</sub> e UF<sub>NET</sub>.

Considerando che il volume di partenza è di 5 L per sacca, con un Q<sub>B</sub> di 250 ml/min la soluzione all'interno della sacca è stata esaurita in 20 minuti.

I campioni di liquido sono stati raccolti dopo 4, 8, 12 e 16 in tre punti del circuito (linea arteriosa pre-filtro, linea venosa post-filtro e scarico del dializzato). Per ogni campione sono state misurate le concentrazioni di  $\beta$ -2-microglobulina e di urea.

La *clearance* istantanea K(t) della  $\beta$ -2-microglobulina è stata misurata tramite la seguente formula:

$$K(t) = Q_{Bi} \times [(C_{Bi} - C_{Bo})/C_{Bi}] + SC \times Q_{UF} \times (C_{Bo}/C_{Bi})$$

dove SC è il coefficiente di *sieving* del dializzatore per la  $\beta$ -2-microglobulina. Il flusso sangue considerato è il flusso effettivo che viene impostato nella macchina, in quanto non è presente alcuna componente solida nelle due soluzioni.

La misurazione della concentrazione di urea nei campioni è stata necessaria per valutare il bilancio di massa: questa molecola infatti, essendo di basso peso molecolare, non risente del fenomeno di adsorbimento. L'errore percentuale nel bilancio di massa di urea è stato calcolato tramite la seguente formula [25]:

$$MBE \% = \frac{[Q_{UF} \times C_{UF} - (Q_{Bi} \times C_{Bi} - Q_{Bo} \times C_{Bo})]}{[Q_{UF} \times C_{UF} + (Q_{Bi} \times C_{Bi} - Q_{Bo} \times C_{Bo})]} \times 100$$

Lo *step* successivo ha previsto il prolungamento del tempo di trattamento. La soluzione, in questo caso solo latte + dializzato concentrato in  $\beta$ -2-microglobulina, è stata trattata per 60 minuti con ricircolo della stessa. Non è stato possibile ampliare ulteriormente tale tempo in quanto la concentrazione di  $\beta$ -2-microglobulina dopo un'ora scendeva a valori troppo bassi per la rilevabilità nei minuti successivi. I parametri tecnici utilizzati in questa seconda fase dello studio sono riassunti in figura 53.

Soluzione	Macchinario di dialisi	Dializzatore	Trattamento	Q <sub>B</sub> (ml/min)	Q <sub>D</sub> (ml/min)	Q <sub>INF</sub> (ml/min)	UF <sub>NET</sub> (ml/min)	Q <sub>UF</sub> (ml/min)	Temperatura della soluzione (°C)
Latte + dializzato concentrato in $\beta$ -2-microglobulina	Fresenius 5008	FX80	High flux HD	250	500	0	0	0	36

**Tabella 4** Parametri tecnici utilizzati durante il secondo step del test in vitro

Anche in questo caso la valutazione del trattamento è stata effettuata tramite *clearance* istantanea K(t) di  $\beta$ -2-microglobulina dopo 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60 minuti. I punti di campionamento e le formule utilizzate per la *clearance* e per il bilancio di massa percentuale (MBE%) di urea sono le stesse riportate in precedenza.

La terza e ultima fase ha previsto una valutazione più generale del trattamento con e senza vibrazione. Non è stata considerata la *clereance* istantanea K(t) ma il rapporto di riduzione R.R. di  $\beta$ -2-microglobulina tra inizio e fine trattamento. In questo caso sono state utilizzate come soluzioni il dializzato concentrato in  $\beta$ -2-microglobulina e la soluzione sangue bovino + dializzato

concentrato in  $\beta$ -2-microglobulina. Il tempo di trattamento è stato di 60 min con ricircolo. Come prima vengono riassunti i parametri tecnici applicati (figura 54).

Soluzione	Macchinario di dialisi	Dializzatore	Trattamento	Q <sub>B</sub> (ml/min)	Q <sub>D</sub> (ml/min)	Q <sub>INF</sub> (ml/min)	UF <sub>NET</sub> (ml/min)	Q <sub>UF</sub> (ml/min)	Temperatura della soluzione (°C)
Dializzato concentrato in $\beta$ -2-microglobulina	AK 200	FX100	High flux HD HDF post inf	250	500 500	0 67	1,6 1,6	1,6 68,6	36

Soluzione	Macchinario di dialisi	Dializzatore	Trattamento	Q <sub>B</sub> (ml/min)	Q <sub>D</sub> (ml/min)	Q <sub>INF</sub> (ml/min)	UF <sub>NET</sub> (ml/min)	Q <sub>UF</sub> (ml/min)	Temperatura della soluzione (°C)
Sangue bovino + dializzato concentrato in $\beta$ -2-microglobulina	AK 200	FX100	HDF post inf	250	500	0 67 67	1,6	1,6 68,6 68,6	36

**Tabella 5** Parametri tecnici utilizzati durante il terzo step del test in vitro

Con la macchina AK 200 non è stato possibile inserire il valore  $UF_{NET} = 0$ ; è stato quindi inserito come parametro il valore minimo possibile, cioè  $UF_{NET} = 10\text{ml/ora}$  che corrispondono a 1.6 ml/min.

Il campionamento è stato effettuato:

- nella sacca prima di iniziare il trattamento
- nella sacca finito il trattamento
- nella tanica dove è stato raccolto l'intero volume dell'ultrafiltrato.

Nel caso del dializzato, per ogni campione sono stati misurate concentrazione di  $\beta$ -2-microglobulina e di urea.

Per la soluzione con sangue bovino, per ogni campione sono stati misurati concentrazione plasmatica di  $\beta$ -2-microglobulina, concentrazione nel sangue di urea ed ematocrito.

Inoltre sono stati misurati:

- Massa netta della soluzione nella sacca prima e dopo il trattamento
- Volume nella tanica graduata di raccolta dell'ultrafiltrato.

Il rapporto di riduzione R.R. percentuale è stato calcolato in funzione della massa totale di  $\beta$ -2-microglobulina, nel caso più generale, come segue:

$$R.R. = 1 - \frac{T.M._{POST}}{T.M._{PRE}} \times 100$$

dove T.M.<sub>PRE</sub> è la massa totale di  $\beta$ -2-microglobulina nella sacca prima di cominciare il trattamento e T.M.<sub>POST</sub> è la massa totale di  $\beta$ -2-microglobulina nella sacca dopo aver effettuato il trattamento.

Questa espressione può essere riscritta, nel caso di dializzato concentrato in  $\beta$ -2-microglobulina, come:

$$R. R. = \left(1 - \frac{C_{POST} \times V_{POST}}{C_{PRE} \times V_{PRE}}\right) \times 100$$

dove  $C_{POST}$  e  $C_{PRE}$  sono le concentrazioni di  $\beta$ -2-microglobulina nella sacca rispettivamente a fine e inizio trattamento e  $V_{POST}$  e  $V_{PRE}$  sono i volumi nella sacca rispettivamente a fine e inizio trattamento.

Nel caso del sangue invece l'espressione diventa:

$$R. R. = \left(1 - \frac{C_{POST} \times V_{POST} \times (1 - HCT_{PRE})}{C_{PRE} \times V_{PRE} \times (1 - HCT_{POST})}\right) \times 100$$

con  $HCT_{PRE}$  e  $HCT_{POST}$  che sono i valori dell'ematocrito del sangue nella sacca rispettivamente prima e dopo il trattamento.

Il bilancio di massa è stato verificato anche in questo caso tramite urea e l'errore percentuale può essere espresso come:

$$UREA M.B.E. = \frac{[(C_{PRE} \times V_{PRE}) - (C_{POST} \times V_{POST})] - (C_{UF} V_{UF})}{[(C_{PRE} \times V_{PRE}) - (C_{POST} \times V_{POST})]} \%$$

dove  $C_{PRE}$  e  $C_{POST}$  sono le concentrazioni di urea nella sacca prima e dopo il trattamento,  $C_{UF}$  è la concentrazione di urea nell'ultrafiltrato,  $V_{PRE}$  e  $V_{POST}$  sono i volumi rispettivamente della sacca prima e dopo il trattamento e  $V_{UF}$  è il volume dell'ultrafiltrato raccolto nella tanica.

E' stato inoltre calcolato l'effetto dei tre diversi meccanismi di rimozione di  $\beta$ -2-microglobulina[16].

La percentuale in massa di  $\beta$ -2-microglobulina rimossa per via diffusiva e convettiva (non è possibile separare le due componenti) è stata calcolata come:

$$\beta\text{-2-M}_{DIFF+CONV} (\%) = \frac{(C_{UF} \times V_{UF})}{(C_{PRE} \times V_{PRE} - C_{POST} \times V_{POST})} \%$$

dove l'espressione al denominatore indica la rimozione totale di  $\beta$ -2-microglobulina.

La frazione di  $\beta$ -2-microglobulina in massa eliminata per adsorbimento è stata calcolata semplicemente come la differenza tra l'eliminazione totale e la frazione eliminata per diffusione + convezione:

$$\beta\text{-2-M}_{\text{ADS}} = \left[ 1 - \frac{\beta\text{-2-M}_{\text{DIFF+CONV}}}{(C_{\text{PRE}} \times V_{\text{PRE}} - C_{\text{POST}} \times V_{\text{POST}})} \right] \%$$

Per il sangue le due espressioni diventano:

$$\beta\text{-2-M}_{\text{DIFF+CONV}} (\%) = \frac{(C_{\text{UF}} \times V_{\text{UF}})}{[C_{\text{PRE}} \times (V_{\text{PRE}} \times \text{HCT}_{\text{PRE}}) - C_{\text{POST}} \times (V_{\text{POST}} \times \text{HCT}_{\text{POST}})]} \%$$

$$\beta\text{-2-M}_{\text{ADS}} = \left[ 1 - \frac{\beta\text{-2-M}_{\text{DIFF+CONV}}}{[C_{\text{PRE}} \times (V_{\text{PRE}} \times \text{HCT}_{\text{PRE}}) - C_{\text{POST}} \times (V_{\text{POST}} \times \text{HCT}_{\text{POST}})]} \right] \%$$

## 2.5 Analisi delle concentrazioni di $\beta\text{-2-microglobulina}$ e urea

L'analisi quantitativa delle concentrazioni di  $\beta\text{-2-microglobulina}$  e urea è stata effettuata presso il Laboratorio Analisi centrale dell'ospedale di Vicenza.

Il metodo per la determinazione di  $\beta\text{-2-microglobulina}$  è un immunodosaggio competitivo in chemiluminescenza, effettuato tramite analizzatore Liaison<sup>®</sup>.

La valutazione invece della concentrazione di urea nei campioni è stata effettuata tramite metodo enzimatico con analizzatore Menarini 360F<sup>®</sup>.

# RISULTATI

Nel corso di questo lavoro sono state eseguite numerose prove sperimentali. Trattandosi di uno studio pilota, in questo capitolo verranno mostrati tutti i risultati ottenuti in modo tale da poter pianificare in futuro uno studio più approfondito con un protocollo che possa consentire un'analisi statistica migliore.

Nella presentazione dei risultati vengono esposti i dati ottenuti da tutte e tre le fasi enunciate in precedenza.

## 1. Risultati della prima fase

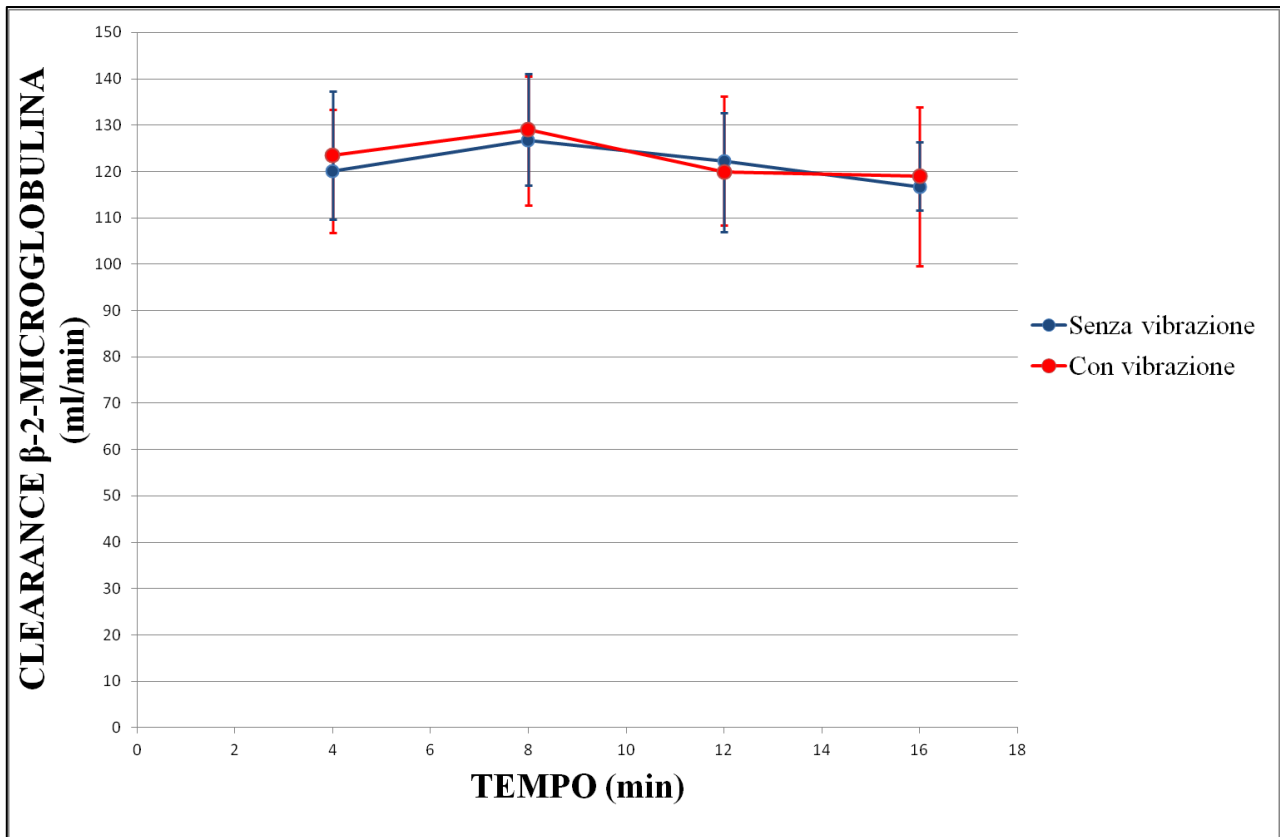
La prima parte dello studio ha permesso di verificare la differenza, nei primi 16 minuti del trattamento, della *clearance* istantanea della  $\beta$ -2-microglobulina applicando o meno l'oscillazione meccanica trasversale al filtro. Le soluzioni utilizzate sono state:

- dializzato concentrato in  $\beta$ -2-microglobulina;
- latte + dializzato concentrato in  $\beta$ -2-microglobulina.

Nel primo caso è stato applicato un trattamento di HDF post infusione utilizzando un filtro dializzatore *high flux* FX100.

Sono stati considerati solamente i valori delle *clearance* istantanee di  $\beta$ -2-microglobulina per cui il bilancio di massa di urea è risultato compreso tra -10% e +10%.

L'andamento delle *clearance* è mostrato nel grafico di figura 52.



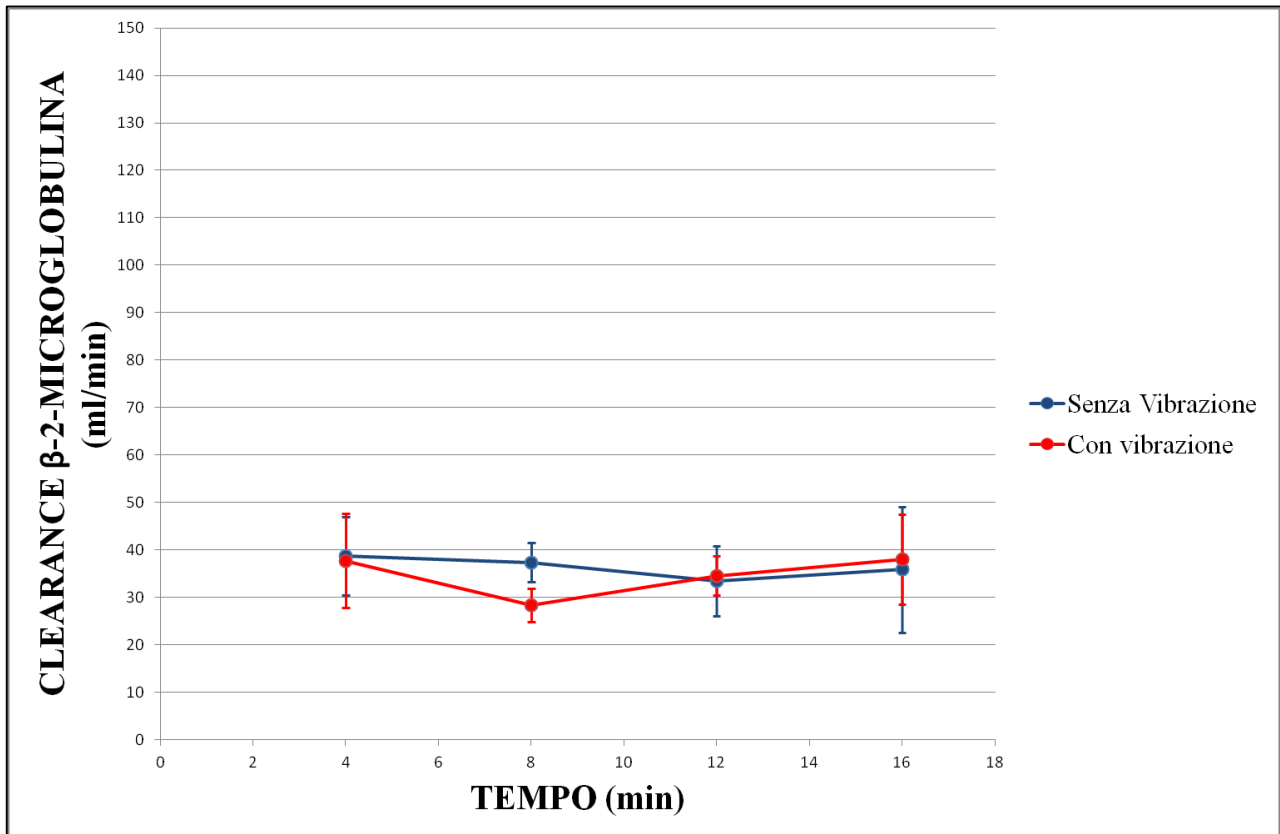
<b>N=3</b>	<b>Tempo (minuti)</b>	<b>Clearance <math>\beta</math>-2-microglobulina (ml/min) (<math>\pm</math> deviazione standard <math>\sigma</math>)</b>
<b>Senza vibrazione</b>	4	120,15 $\pm$ 13,27
	8	126,67 $\pm$ 13,87
	12	122,28 $\pm$ 13,96
	16	116,68 $\pm$ 17,12
<b>Con vibrazione</b>	4	123,46 $\pm$ 13,88
	8	129,13 $\pm$ 12,03
	12	119,80 $\pm$ 12,85
	16	118,95 $\pm$ 7,37

**Figura 52** Grafico e dati relativi al primo step del test in vitro utilizzando dializzato concentrato in  $\beta$ -2-microglobulina

Come si può notare, la *clearance* della  $\beta$ -2-microglobulina con e senza vibrazione non varia nel tempo in maniera significativa. L'andamento della *clearance* nel tempo, nel caso del test senza oscillazione, dovrebbe decrescere più velocemente a causa della formazione del *protein layer* e della concentrazione di polarizzazione. In realtà tale differenza non si nota.



Allo stesso modo, questo comportamento è altrettanto riscontrabile nell'analisi della *clearance* di  $\beta$ -2-microglobulina nei primi minuti di trattamento con la soluzione latte + dializzato concentrato in  $\beta$ -2-microglobulina. Il tipo di trattamento in questo caso è *high flux HD* con filtro FX80. I risultati sono evidenziati in figura 53.



<b>N=3</b>	<b>Tempo (minuti)</b>	<b>Clearance <math>\beta</math>-2-microglobulina (ml/min) (<math>\pm \sigma</math>)</b>
<b>Senza vibrazione</b>	4	38,67 $\pm$ 8,29
	8	37,36 $\pm$ 4,09
	12	33,40 $\pm$ 7,34
	16	35,82 $\pm$ 13,22
<b>Con vibrazione</b>	4	37,7 $\pm$ 9,9
	8	28,31 $\pm$ 3,51
	12	34,55 $\pm$ 4,18
	16	38,04 $\pm$ 9,44

**Figura 53** Grafico e dati relativi al primo step del test *in vitro* utilizzando latte + dializzato concentrato in  $\beta$ -2-microglobulina

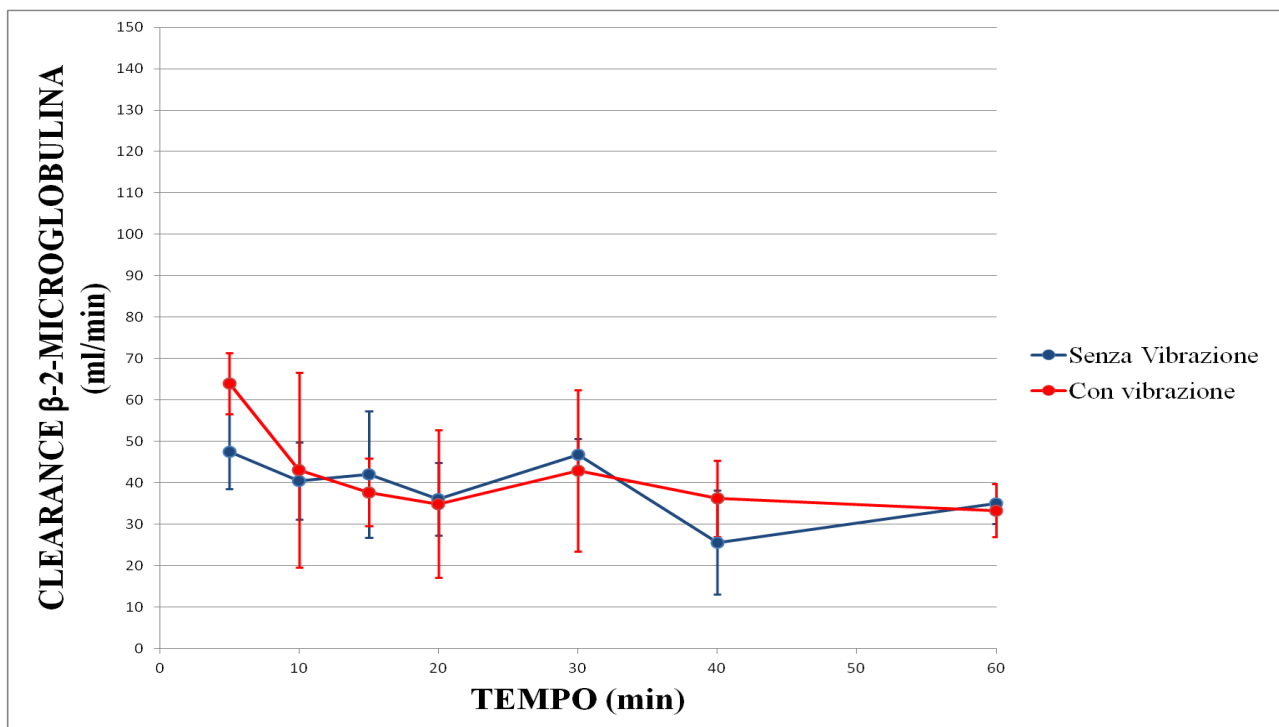
Con il latte, aumenta la viscosità della soluzione e, associato al fatto che il trattamento applicato è un *high flux HD*, la *clearance* istantanea di  $\beta$ -2-microglobulina diminuisce. Anche in questo caso però, i valori istantanei di *clearance* calcolati in diversi momenti temporali non differiscono in maniera sostanziale nel test senza vibrazione rispetto a quello effettuato con vibrazione.

E' probabile che l'applicazione dell'oscillazione meccanica (ampiezza  $A=10$  mm, frequenza  $f = 4\text{Hz}$ ) non permetta di evitare, nei primi minuti del trattamento, la formazione della concentrazione di polarizzazione e del *protein layer*.

## 2. Risultati della seconda fase

Nel secondo step si è cercato di valutare l'andamento della *clearance* di  $\beta$ -2-microglobulina in un lasso di tempo più ampio, considerando in questo caso il ricircolo del liquido all'interno della sacca. La soluzione utilizzata è stata solo latte + dializzato concentrato in  $\beta$ -2-microglobulina e il trattamento applicato è stato quello di *high flux HD*. Anche in questo caso sono stati considerati i valori di *clearance* per cui il bilancio di massa istantaneo di urea è stato inferiore, in valore assoluto, al 10%.

I risultati sono mostrati in figura 54.



<b>N=3</b>	<b>Tempo (minuti)</b>	<b>Clearance <math>\beta</math>-2- microglobulina (ml/min) (<math>\pm \sigma</math>)</b>
<b>Senza vibrazione</b>	5	47,55 $\pm$ 9,00
	10	40,47 $\pm$ 9,32
	15	41,99 $\pm$ 15,31
	20	36,12 $\pm$ 8,74
	30	46,78 $\pm$ 3,82
	40	25,55 $\pm$ 12,54
	60	34,94 $\pm$ 4,86
<b>Con vibrazione</b>	5	64,02 $\pm$ 7,34
	10	43,08 $\pm$ 23,54
	15	37,71 $\pm$ 8,18
	20	34,90 $\pm$ 17,85
	30	42,93 $\pm$ 19,44
	40	36,18 $\pm$ 9,20
	60	33,34 $\pm$ 6,37

**Figura 54** Grafico e dati relativi al secondo step del test in vitro utilizzando dializzato concentrato in  $\beta$ -2-microglobulina

Come nel caso precedente, anche in questa situazione non si ha differenza statistica tra i valori istantanei di *clearance* calcolati applicando o meno l'oscillazione meccanica.

Dai risultati delle prime due fasi, si possono trarre le seguenti considerazioni:

- l'andamento della *clearance* di  $\beta$ -2-microglobulina nel tempo non è quello atteso. Teoricamente, il valore della *clearance* dovrebbe decrescere in maniera esponenziale nella prima parte del trattamento (primi 20 minuti circa) a causa della formazione del *protein layer* e della concentrazione di polarizzazione. Nell'esperimento *in vitro* invece, la *clearance* varia nel tempo in maniera molto incostante: talvolta cresce, talvolta decresce. Questo comportamento può essere associato al fatto che i macchinari di dialisi non operano in condizioni stabili, soprattutto per quanto riguarda il flusso della soluzione: le pompe peristaltiche infatti, proprio per come sono progettate, determinano un flusso pulsatile all'interno delle linee e questo fenomeno può comportare una valutazione errata per quanto concerne le misurazioni istantanee di concentrazione di  $\beta$ -2-microglobulina al momento del campionamento. A prova di quanto detto, basti vedere l'alta deviazione standard  $\sigma$  ottenuta;
- al di là delle problematiche tecniche appena enunciate, l'effetto dell'oscillazione meccanica non è evidente dai risultati fin qui mostrati. Ciò significa che probabilmente lo *share rate* sviluppato

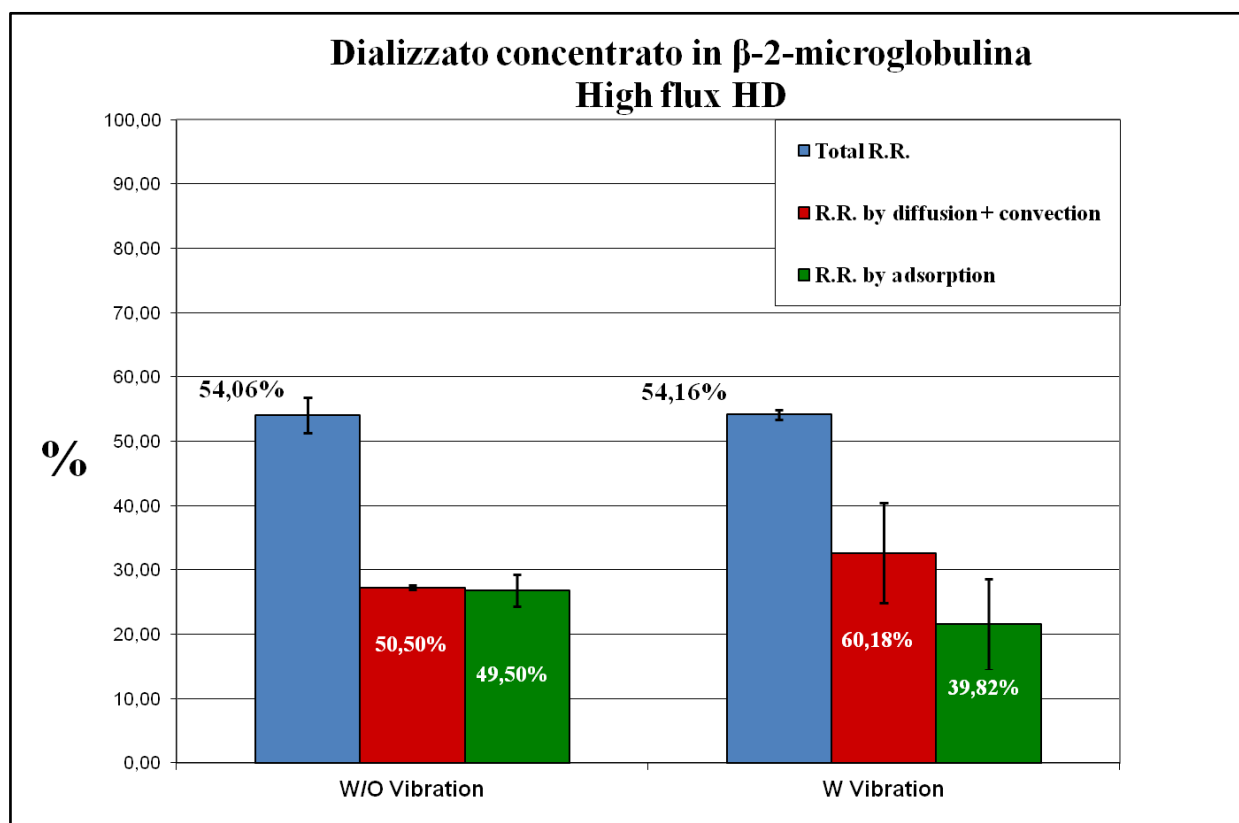
durante il test *in vitro* non è sufficiente ad evitare la formazione del *protein layer* e della concentrazione di polarizzazione.

### 3. Risultati della terza fase

Durante la terza fase dell'esperimento *in vitro*, si è cercato di ottenere una valutazione più generale nella rimozione di  $\beta$ -2-microglobulina durante il trattamento. Si sono quindi calcolati il rapporto di riduzione R.R. e l'influenza, sulla rimozione totale di  $\beta$ -2-microglobulina, dei meccanismi di rimozione di tale proteina (diffusione + convezione e adsorbimento). Le soluzioni utilizzate sono state:

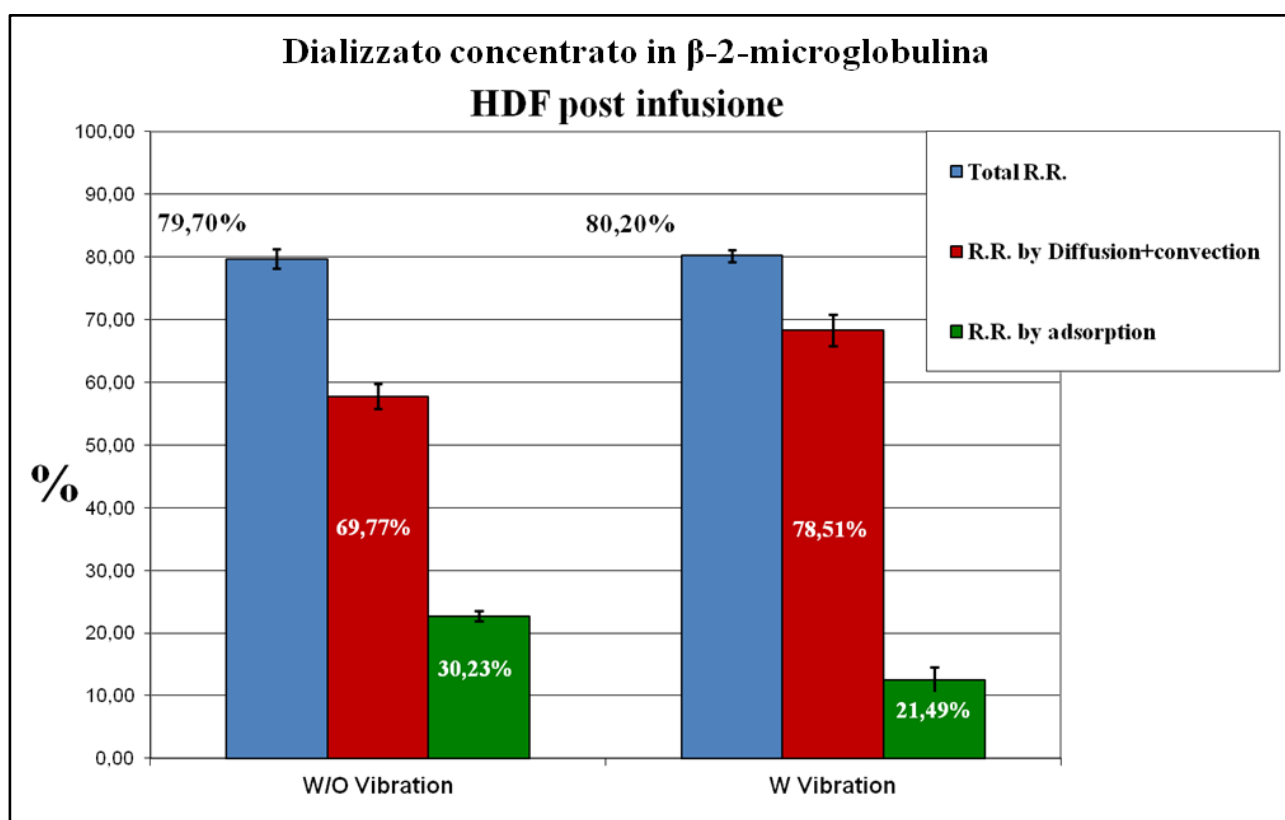
- dializzato concentrato in  $\beta$ -2-microglobulina;
- sangue bovino + dializzato concentrato in  $\beta$ -2-microglobulina.

Nel primo caso sono stati applicati due tipi di trattamento, *high flux* HD e HDF post infusione, mentre nel secondo caso solo HDF post infusione. Sono stati considerati solamente i risultati per cui il bilancio di massa di urea generale da inizio e fine trattamento è stato inferiore, in valore assoluto, al 10%. I risultati relativi al dializzato concentrato in  $\beta$ -2-microglobulina sono mostrati in figura 55, mentre quelli relativi al sangue bovino + dializzato concentrato in  $\beta$ -2-microglobulina in figura 56.



<b>N=3</b>	<b>R.R. (%) (± σ)</b>	<b>DIFFUSIONE + CONVEZIONE (%) (± σ)</b>	<b>ADSORBIMENTO (%) (± σ)</b>
<b>Senza vibrazione</b>	54,06 ± 2,81	50,5 ± 0,38	49,5 ± 2,44
<b>Con vibrazione</b>	54,16 ± 0,76	60,18 ± 7,82	39,82 ± 7,05

**Figura 55** Grafico e dati relativi al terzo step del test in vitro utilizzando dializzato concentrato in β-2-microglobulina con trattamento *high flux* HD



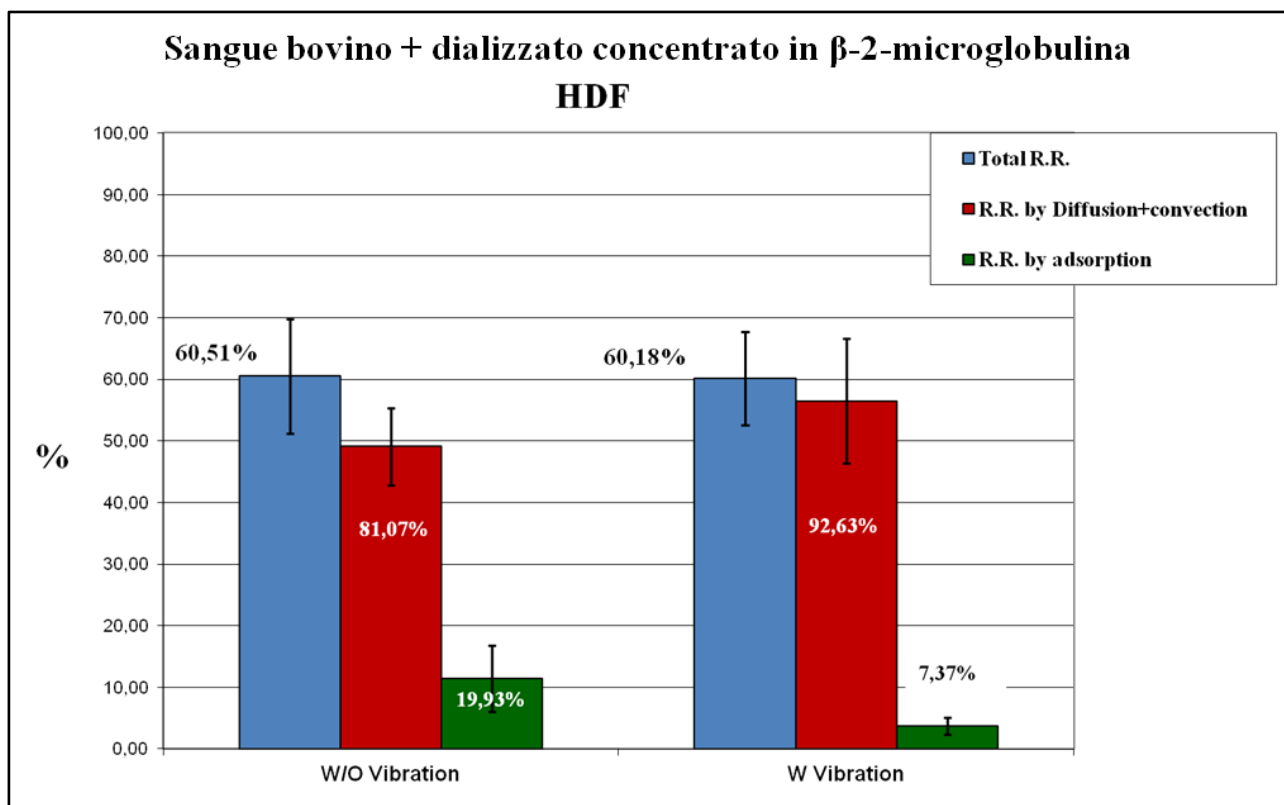
<b>N=4</b>	<b>R.R. (%) (± σ)</b>	<b>DIFFUSIONE + CONVEZIONE (%) (± σ)</b>	<b>ADSORBIMENTO (%) (± σ)</b>
<b>Senza vibrazione</b>	79,7 ± 1,53	69,77 ± 1,94	30,23 ± 0,80
<b>Con vibrazione</b>	80,2 ± 0,93	78,51 ± 2,48	21,49 ± 2,02

**Figura 56** Grafico e dati relativi al terzo step del test in vitro utilizzando dializzato concentrato in β-2-microglobulina con trattamento HDF post infusione

Come si nota, il rapporto di riduzione R.R. della β-2-microglobulina in entrambi i trattamenti non cambia applicando o meno l'oscillazione meccanica.

Quello che risulta interessante però è la diversa influenza dei meccanismi di rimozione nei due casi: l'apporto percentuale dei fenomeni di diffusione e convezione sulla rimozione totale di  $\beta$ -2-microglobulina, nel test *in vitro* in cui è applicata la vibrazione, aumenta a discapito dell'adsorbimento.

Tale effetto è stato riscontrato anche nel successivo test effettuato con sangue bovino + dializzato concentrato in  $\beta$ -2-microglobulina, i cui risultati vengono mostrati in figura 57.



N=2	R.R. (%) ( $\pm \sigma$ )	DIFFUSIONE + CONVEZIONE (%) ( $\pm \sigma$ )	ADSORBIMENTO (%) ( $\pm \sigma$ )
Senza vibrazione	60,51 $\pm$ 9,25	81,07 $\pm$ 6,25	19,93 $\pm$ 5,32
Con vibrazione	60,18 $\pm$ 7,56	92,63 $\pm$ 10,12	7,37 $\pm$ 1,36

**Figura 57** Grafico e dati relativi al terzo step del test *in vitro* utilizzando sangue bovino + dializzato concentrato in  $\beta$ -2-microglobulina con trattamento HDF post infusione

Dai dati ottenuti da questo terzo step si possono trarre le seguenti conclusioni:

- la valutazione tramite rapporto di riduzione della  $\beta$ -2-microglobulina non permette ovviamente un'analisi temporale sulla rimozione di tale proteina durante il trattamento ma ha garantito una valutazione più generale e meno soggetta ai problemi tecnico-pratici visti durante i primi due

step del trattamento *in vitro*. A conferma di ciò basti osservare la deviazione standard molto più limitata rispetto ai risultati precedenti;

- l'applicazione della vibrazione meccanica e, in particolare, i parametri dell'oscillazione utilizzati ( $A=10\text{mm}$ ,  $f=4\text{Hz}$ ) non permettono di evitare la formazione del protein gel layer e della concentrazione di polarizzazione sulla membrana interna del comparto sangue del filtro dializzatore. I rapporti di riduzione della  $\beta$ -2-microglobulina infatti, nei due casi, non differiscono statisticamente in tutti i casi evidenziati. Ciò conferma quanto visto nei primi due step dell'esperimento *in vitro*;
- l'effetto dell'oscillazione meccanica può trovare riscontro nella modifica delle percentuali dei meccanismi di trasporto dei soluti a medio peso molecolare e, in particolare, della  $\beta$ -2-microglobulina: il peso di diffusione e convezione (si ricorda che non sono valutabili separatamente) aumenta a discapito di quello dell'adsorbimento. Tale fenomeno può essere spiegato con il fatto che una parte delle molecole a medio peso molecolare che vengono adsorbite all'interno dei pori della membrana, in particolare quelle più labili che determinano ingombro sterico per "intasamento" dovuto alle dimensioni paragonabili tra pori e soluti, se sottoposte a oscillazione possono essere spinte verso il comparto del liquido di dialisi ed essere quindi eliminate definitivamente.





## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi è uno studio pilota sperimentale per valutare l'efficienza di un'oscillazione meccanica nella rimozione di soluti a medio peso molecolare durante un trattamento di dialisi extracorporea.

In letteratura, in ambito nefrologico e in particolare per quanto riguarda le terapie dialitiche extracorporee, esistono pochi studi sperimentali sull'argomento. In realtà, in altri settori dove vengono utilizzati processi a membrana, l'applicazione di un effetto oscillatorio per migliorare l'efficienza di rimozione di soluti è già stata studiata: per esempio, in campo industriale, alcuni studi hanno dimostrato che l'efficienza di filtrazione in sistemi vibrazionali può essere incrementata di un fattore 10 rispetto agli stessi sistemi in condizioni statiche di processo. In campo biomedicale è stato dimostrato che l'incremento di *share rate* lungo la superficie interna della membrana di un filtro in un trattamento di plasmaferesi, indotto da un sistema rotante, può migliorare l'efficienza dello scambio di sostanze plasmatiche e il flusso di ultrafiltrazione [14, 26].

Dal punto di vista teorico, sono state sviluppate delle simulazioni computerizzate per stimare, in prima battuta, la fluidodinamica del sangue all'interno delle membrane di un filtro dializzatore applicando un'oscillazione meccanica [21]: da questo studio si evince che la vibrazione possa determinare dei vortici all'interno delle membrane in cui scorre il sangue e, di conseguenza, un incremento dello *share rate* lungo la parete interna delle stesse. Questo fenomeno potrebbe determinare a sua volta una riduzione degli spessori del *protein layer* e della concentrazione di polarizzazione migliorando la rimozione dei soluti, soprattutto a medio peso molecolare, che vengono rimossi per diffusione e convezione.

Il presente lavoro di tesi ha cercato evidenze sperimentali a sostegno di tale ipotesi. Si è cercato quindi di provare se l'applicazione dell'oscillazione meccanica fosse in grado di aumentare l'efficienza della terapia dialitica sui soluti a medio peso molecolare. Molti dei parametri in gioco in questo tipo di applicazione, i quali possono anche fortemente influenzarne i risultati, sono stati mantenuti costanti: i materiali delle membrane, le caratteristiche geometriche del dializzatore, l'ampiezza, la frequenza e la direzione dell'oscillazione, i flussi sangue e di ultrafiltrazione impostati sono solo alcuni esempi di parametri impostati.

I risultati ottenuti, al momento, dimostrano che la vibrazione meccanica non influisce sull'incremento rimozione di soluti a medio peso molecolare. I valori della *clearance* istantanea di  $\beta$ -2-microglobulina, utilizzata come proteina modello di questa classe di molecole, ottenuti nei primi due step del test *in vitro* non presentano sostanziali differenze statistiche nel caso in cui l'oscillazione venga applicata rispetto al controllo.

Tale risultato è confermato anche dall'analisi del rapporto di riduzione della  $\beta$ -2-microglobulina da inizio a fine trattamento. In compenso, l'incidenza della vibrazione sui singoli meccanismi di rimozione è rilevante: nell'arco di tempo di 60 minuti il fenomeno dell'adsorbimento di  $\beta$ -2-microglobulina viene ridotto mentre la rimozione per via mista diffusivo-convettiva viene incrementata, pur rimanendo invariato il rapporto di riduzione totale. Questo aspetto può risultare positivo a lungo termine soprattutto perché viene ridotto, nel tempo, l'effetto dell'ingombro sterico causa di abbassamento dell'efficienza dialitica.

Risulta doveroso sottolineare infine come questo lavoro sia stato condotto *in vitro*, condizione ben diversa dalla situazione che si avrebbe *in vivo*, che rimane comunque l'obiettivo ultimo dello studio. La reologia del sangue umano, gli accessi vascolari, il fenomeno di emolisi dei globuli rossi rappresentano solo alcuni esempi di condizioni operative reali che, nell'analisi *in vitro* effettuata, non è stato possibile considerare ma che sono di primaria importanza nella pratica dialitica.

In ogni caso, studi futuri devono essere condotti per poter verificare i risultati ottenuti.

Analisi superficiali tramite *AFM* (microscopio a forza atomica) o *XPS* (spettroscopia a raggi X) potrebbero garantire una valutazione più dettagliata e approfondita circa la deposizione dei *layers* sulla superficie interna delle membrane. Il problema, in questo caso, sarebbe quello di riuscire a tagliare longitudinalmente una fibra del diametro di 200  $\mu\text{m}$  senza compromettere in maniera significativa lo strato biologico che si vuole analizzare.

Per ultimo, probabilmente, lo sviluppo di metodi alternativi a quello meccanico per l'applicazione di un'oscillazione, come per esempio gli ultrasuoni, potrebbero risultare più efficienti in quanto si possono raggiungere più facilmente frequenze, e quindi valori di *share rate*, elevati.

# BIBLIOGRAFIA

1. Arthur C. Guyton, J.E.H., *Fisiologia medica*. 2006: Elsevier srl.
2. [www.renalgate.it/](http://www.renalgate.it/).
3. Walter H. Hörl, et al., *Replacement of Renal Function by Dialysis*. 5th ed. 2004: Kluwer.
4. I. Uhlenbusch-Körwer, et al., *Understanding Membranes and Dialysers*. 2004, pabst: Kronberg.
5. Ronco, C., et al., *Blood and dialysate flow distributions in hollow-fiber hemodialyzers analyzed by computerized helical scanning technique*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13 Suppl 1**: p. S53-61.
6. Ronco, C., et al., *Effects of a reduced inner diameter of hollow fibers in hemodialyzers*. Kidney Int, 2000. **58**(2): p. 809-17.
7. Krieter, D.H., et al., *Beta(2)-microglobulin removal by extracorporeal renal replacement therapies*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1753**(1): p. 146-53.
8. Randoux, C., et al., *Filtration of native and glycated beta2-microglobulin by charged and neutral dialysis membranes*. Kidney Int, 2001. **60**(4): p. 1571-7.
9. Brancaccio, D., M. Cozzolino, and M. Gallieni, *Dialysis amyloidosis: clinical aspects and therapeutic approach*. Nephrol Dial Transplant, 1996. **11 Suppl 3**: p. 102-5.
10. Ledebro, I., *Principles and practice of hemofiltration and hemodiafiltration*. Artif Organs, 1998. **22**(1): p. 20-5.
11. Messer, J., B. Mulcahy, and W.H. Fissell, *Middle-molecule clearance in CRRT: in vitro convection, diffusion and dialyzer area*. ASAIO J, 2009. **55**(3): p. 224-6.
12. Rangel, A.V., et al., *Backfiltration: past, present and future*. Contrib Nephrol, 2011. **175**: p. 35-45.
13. Ronco, C., et al., *The haemodialysis system: basic mechanisms of water and solute transport in extracorporeal renal replacement therapies*. Nephrol Dial Transplant, 1998. **13 Suppl 6**: p. 3-9.
14. Okazaki, M. and F. Yoshida, *Ultrafiltration of blood: effect of hematocrit on ultrafiltration rate*. Ann Biomed Eng, 1976. **4**(2): p. 138-50.
15. Vroman, L., *Effect of absorbed proteins on the wettability of hydrophilic and hydrophobic solids*. Nature, 1962. **196**: p. 476-7.
16. Padrini, R., et al., *Convective and adsorptive removal of beta2-microglobulin during predilutional and postdilutional hemofiltration*. Kidney Int, 2005. **68**(5): p. 2331-7.

17. Kandus, A., et al., *Beta 2-microglobulin elimination characteristics during hemofiltration with acrylonitrile and polysulfone membrane hemofilters*. Int J Artif Organs, 1990. **13**(4): p. 200-4.
18. Klinke, B., et al., *Transmembranous transport and adsorption of beta-2-microglobulin during hemodialysis using polysulfone, polyacrylonitrile, polymethylmethacrylate and cuprammonium rayon membranes*. Int J Artif Organs, 1989. **12**(11): p. 697-702.
19. Rockel, A., et al., *Permeability and secondary membrane formation of a high flux polysulfone hemofilter*. Kidney Int, 1986. **30**(3): p. 429-32.
20. Parzer, S., P. Balcke, and C. Mannhalter, *Plasma protein adsorption to hemodialysis membranes: studies in an in vitro model*. J Biomed Mater Res, 1993. **27**(4): p. 455-63.
21. Kim, J.C., et al., *Enhancement of solute removal in a hollow-fiber hemodialyzer by mechanical vibration*. Blood Purif, 2011. **31**(4): p. 227-34.
22. Bhattacharjee, S., A.S. Kim, and M. Elimelech, *Concentration Polarization of Interacting Solute Particles in Cross-Flow Membrane Filtration*. J Colloid Interface Sci, 1999. **212**(1): p. 81-99.
23. Song and L.E. M, *Theory of concentration polarization in crossflow filtration*. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions. **91**: p. 3389-3398.
24. Clark, W.R., R.J. Hamburger, and M.J. Lysaght, *Effect of membrane composition and structure on solute removal and biocompatibility in hemodialysis*. Kidney Int, 1999. **56**(6): p. 2005-15.
25. Locatelli, F., S. Di Filippo, and C. Manzoni, *Removal of small and middle molecules by convective techniques*. Nephrol Dial Transplant, 2000. **15 Suppl 2**: p. 37-44.
26. Kaplan, A.A. and S.E. Halley, *Plasma exchange with a rotating filter*. Kidney Int, 1990. **38**(1): p. 160-6.

# RINGRAZIAMENTI

*Al termine di questo lavoro di tesi desidero ringraziare tutte le persone che in questi mesi mi hanno aiutato e supportato in ogni modo.*

*Desidero ringraziare la Prof.ssa Monica Dettin che mi ha seguito, restando costantemente a mia disposizione con estrema gentilezza e cordialità.*

*Un ringraziamento particolare va a tutto il Dipartimento di Nefrologia dell'Ospedale San Bortolo di Vicenza, presso cui ho svolto il progetto di tesi. Un grazie particolare al Primario Prof. Claudio Ronco che mi ha insegnato che tutto ciò che è grande si ottiene attraverso una lenta e impercettibile crescita. Un grande ringraziamento anche all'Ing. Francesco Garzotto, che mi ha seguito con costanza durante questa mia esperienza e che mi ha sempre sostenuto. Devo poi uno speciale ringraziamento all'Ing. Jeong Chul Kim, grande amico e senza il quale non sarei riuscito a fare molto in dipartimento.*

*Un grazie va anche ad Armando, Dinna, Elisa, Massimo, Pietro, Tiziana e Valentina che mi hanno insegnato molto.*

*Voglio infine ringraziare tutta la mia famiglia, i miei genitori Valter e Carla, Claudio ed Enrico, Paola, Irene, San Lore e tutta la combriccola, e tutti coloro che mi sono stati vicini durante questo periodo.*



