

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Farmacologia ed Anestesiologia

Dottorato di Ricerca in

**Farmacologia e Tossicologia,
Terapia Rianimativa e Intensiva**

XX ciclo

**EFFETTO DELL'EMODIAFILTRAZIONE CON
RIGENERAZIONE ON-LINE DELL'ULTRAFILTRATO
(HFR)**

**SULLO STRESS OSSIDATIVO NEI PAZIENTI
CON INSUFFICIENZA RENALE TERMINALE
IN DIALISI CRONICA**

Coordinatore: Ch.mo Prof. Rosa Maria Gaion

Supervisore: Ch.mo Prof. Guglielmina Frolidi

Cotutore: Dr. Lorenzo A. Calò

Dottoranda: Lara Bertipaglia

31 gennaio 2008

INDICE

	RIASSUNTO	3
	SUMMARY	6
Capitolo 1	INTRODUZIONE	9
Capitolo 2	LO STRESS OSSIDATIVO	11
2.1	I radicali liberi, gli altri ossidanti e le loro fonti	13
2.1.1	Il sistema NADH/NADPH ossidasi	14
2.2	Effetti dello stress ossidativo su componenti e funzioni cellulari	16
2.3	Il sistema del <i>plasminogen activator inhibitor 1</i> (PAI-1)	17
2.3.1	PAI-1 e lo stress ossidativo	19
2.3.2	Regolazione dell'espressione di PAI-1 da parte delle ROS	22
2.4	Il sistema dell'eme ossigenasi	23
2.5	Stress ossidativo e antiossidanti endogeni	28
Capitolo 3	LA DIALISI	31
3.1	La dialisi peritoneale	31
3.2	L'emodialisi	32
3.2.1	I filtri dializzanti e le membrane	34
3.2.2	Il liquido di dialisi	34
3.2.3	Il monitor	34
3.3	Tecniche emodialitiche	35
3.3.1	Tecniche diffuse	35
3.3.2	Tecniche convettive	35
3.3.3	Tecniche "miste" convettivo-diffusive	35
3.4	Lo stress ossidativo in dialisi e l'approccio antiossidante	39
Capitolo 4	SCOPO DEL LAVORO	43

Capitolo 5	PAZIENTI E METODI	45
5.1	Pazienti	45
5.2	Metodi	46
5.2.1	Separazione dei linfociti e monociti	46
5.2.2	Estrazione dell'RNA	46
5.2.3	Quantificazione ed integrità di RNA	47
5.2.4	Retrotrascrizione ed amplificazione mediante RT-PCR	47
5.2.5	Visualizzazione dei prodotti di PCR	49
5.2.6	Quantificazione dell'espressione genica	49
5.2.7	Determinazione del lisato proteico	49
5.2.8	Determinazione della concentrazione di proteine	49
5.2.9	Separazione elettroforetica delle proteine e trasferimento su membrana di nitrocellulosa	50
5.2.10	Formazione e visualizzazione degli immunocomplessi	51
5.2.11	Determinazione delle LDL ossidate plasmatiche	51
5.2.12	Analisi statistica	52
Capitolo 6	RISULTATI	53
6.1	Valutazione dell'espressione genica e proteica di p22^{phox} in cellule mononucleate del sangue di pazienti in trattamento emodialitico con HFR	53
6.2	Valutazione dell'espressione genica e proteica di PAI-1 in cellule mononucleate del sangue di pazienti in trattamento emodialitico con HFR	55
6.3	Valutazione dell'espressione genica e proteica di HO-1 in cellule mononucleate del sangue di pazienti in trattamento emodialitico con HFR	57
6.4	Valutazione dei livelli di LDL ossidate in plasma di soggetti in trattamento emodialitico con HFR	59
Capitolo 7	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	61
BIBLIOGRAFIA		65

RIASSUNTO

Le malattie cardiovascolari rimangono la causa più frequente di morte nei pazienti con malattia renale in fase terminale (ESRD). In questi pazienti l'aumentato stato di stress ossidativo, lo stato infiammatorio cronico e la disfunzione endoteliale sono riconosciuti come fattori di rischio non tradizionali per le malattie cardiovascolari. Questi pazienti infatti, presentano elevati livelli di citochine proinfiammatorie, come l'interleuchina-6 (IL-6) e la proteina C reattiva (PCR), e anche proteine correlate allo stress ossidativo, come la NAD(P)H ossidasi che contribuisce a ridurre la disponibilità del monossido d'azoto (NO) e alla conseguente disfunzione endoteliale. È stato dimostrato che le cause che provocano lo stato infiammatorio in dialisi sono multi fattoriali e comprendono sia fattori derivanti dalla dialisi stessa, sia altri fattori non correlati ad essa. Sfortunatamente, durante gli ultimi venti anni, la mortalità dei pazienti con ESRD trattati con la dialisi è rimasta elevata. Questo fatto ha portato alla ricerca di possibili strategie basati su trattamenti antinfiammatori con approcci sia farmacologici che dialitici per migliorare la qualità della vita in questi pazienti.

Recenti studi hanno evidenziato che la dialisi eseguita con la tecnica di emodiafiltrazione con rigenerazione on-line dell'ultrafiltrato (*Hemodiafiltration with endogenous reinfusion*, HFR) riduce i livelli delle citochine proinfiammatorie, come il fattore α di necrosi tumorale (TNF- α), IL-6 e PCR, coinvolte nello stato infiammatorio, mentre nessuno studio ha dimostrato un possibile effetto dell'HFR sullo stress ossidativo. Questa tecnica dialitica, a differenza della bicarbonato dialisi standard, utilizza la reinfusione di un fluido endogeno che passa attraverso una cartuccia rigenerante, composta in sequenza da una resina, capace di interazioni idrofobiche, e carbone minerale non rivestito. Il metodo attua quindi contemporaneamente e separatamente i tre meccanismi di depurazione extracorporea: diffusione, convezione e adsorbimento. In particolare, la resina che compone la cartuccia rigenerante è capace di adsorbire le citochine proinfiammatorie. Dato l'importante ruolo che giocano lo stress ossidativo e le molecole ad esso associate, incluse quelle correlate all'infiammazione, nell'aumentare il rischio di malattie cardiovascolari nei pazienti in ESRD, l'HFR può essere utile nel ridurre i livelli di queste molecole, e quindi nel diminuire la mortalità dei pazienti in dialisi.

Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare un possibile effetto diretto dell'emodiafiltrazione con rigenerazione on-line dell'ultrafiltrato (HFR) su alcuni *markers* di stress ossidativo coinvolti nell'aterosclerosi e nelle sue complicanze, utilizzando un approccio biologico molecolare. In particolare abbiamo valutato *ex vivo*, su cellule mononucleate del sangue di pazienti in trattamento dialitico con HFR lo stato di proteine correlate allo stress ossidativo, quali: p22^{phox}, subunità della NADPH ossidasi, essenziale nella produzione di superossido, l'inibitore 1 dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1), importante fattore profibrotico, eme ossigenasi 1 (HO-1), una delle tre isoforme di HO, indotto e protettivo nei confronti dello stress ossidativo, e lo stato di *markers* plasmatici di stress ossidativo, indicatori del rischio cardiovascolare, come le lipoproteine a bassa densità ossidate (LDLox) cruciali nello sviluppo della reazione infiammatoria cronica dello stato intimale delle arterie.

Un totale di 18 pazienti in cura dialitica presso la Divisione di Nefrologia II del Policlinico Universitario di Padova, di età compresa tra i 19 e i 60 anni, sottoposti a bicarbonato-dialisi cronica (210-240 minuti, 3 volte alla settimana) da almeno un anno (range 1-6 anni) sono stati reclutati e randomizzati in uno studio *cross-over* di un anno. Un gruppo di pazienti è stato inizialmente trattato per 6 mesi con HFR (SG8 Plus-Bellco, Mirandola Italia) seguiti poi da altri 6 mesi di *low-flux* bicarbonato dialisi (BD) con un dializzatore polisulfone 1.8 m². L'altro gruppo è stato inizialmente trattato per 6 mesi con *low-flux* bicarbonato dialisi (BD) con un dializzatore polisulfone 1.8 m² seguiti da 6 mesi di trattamento con HFR.

I risultati dello studio hanno evidenziato che il trattamento con HFR riduce notevolmente l'effetto dello stress ossidativo. L'espressione genica e proteica di p22^{phox} e PAI-1, infatti, sono risultate ridotte rispetto al trattamento con la bicarbonato dialisi standard, mentre non si sono osservate variazioni a livello di espressione genica e proteica di HO-1. Un altro importante risultato dello studio è stato la dimostrazione dell'efficacia di HFR nel ridurre i livelli plasmatici di LDL ossidate rispetto alla bicarbonato dialisi standard.

I risultati di questo studio indicano che il trattamento emodialitico con HFR è in grado di ridurre notevolmente l'effetto dello stress ossidativo perché in grado di diminuire l'espressione di proteine e markers ad esso correlati, risultati minori rispetto alla dialisi standard. La spiegazione più plausibile è da attribuire alla capacità dell'HFR di ridurre i livelli di citochine proossidanti e proinfiammatorie come TNF- α e IL-6 e per il possibile effetto di risparmio dell'HFR di antiossidanti idrosolubili. Questi effetti dell'HFR possono contribuire a ridurre lo stato ossidativo nei pazienti in dialisi e spiegare la sua capacità nel ridurre l'espressione genica e

proteica di proteine correlate allo stress ossidativo rispetto alla bicarbonato dialisi standard.

I dati ottenuti suggeriscono che l'HFR è una tecnica dialitica più biocompatibile rispetto alla bicarbonato dialisi. Vista la stretta correlazione tra stress ossidativo e infiammazione e il determinante ruolo svolto dallo stress ossidativo nell'induzione dei meccanismi correlati all'infiammazione nei pazienti con malattia renale in fase terminale, il trattamento dialitico con HFR può quindi rappresentare un'importante innovazione terapeutica attraverso la riduzione della malattia cardiovascolare aterosclerotica dei pazienti in dialisi, principale causa di morte in questi pazienti.

SUMMARY

Cardiovascular disease remains the most common cause for the excess of morbidity and mortality in end-stage renal disease (ESRD) patients. Increased oxidative stress (OxSt), inflammation and endothelial dysfunction are recognized non-traditional cardiovascular risk factors in these patients. These patients, in fact, have increased levels of inflammation-related proteins, such as interleukin-6 (IL-6) and C-reactive protein (PCR), as well as OxSt-related proteins, such as NAD(P)H oxidase, which lead to reduced nitric oxide (NO) availability and endothelial dysfunction. The cause(s) of inflammation in dialysis have been shown to be multi-factorial and to include both factors arising from dialysis as well as other non-dialysis-related factors. Unfortunately, during the last 20 years the mortality rate in ESRD patients treated with dialysis has remained high, which has prompted the exploration of multiple strategies such as anti-inflammatory treatment using either pharmacological or dialysis-based approaches, to improve outcomes in these patients.

A novel dialysis technique, haemodiafiltration with online regeneration of ultrafiltrate (HFR), has recently been reported to reduce levels of inflammation-related proteins, such as tumour necrosis factor (TNF- α), IL-6 and PCR, counteracting the inflammatory state while no data are available on the effect of HFR on OxSt. HFR (double chamber HDF with reinfusion of ultrafiltrate regenerated through a charcoal-resin cartridge), combines the processes of diffusion, convection and adsorbance. During HFR, the ultrafiltrate derived from the convective section of the filter is processed in a charcoal-resin cartridge and the regenerated ultrafiltrate is reinfused into the bloodstream before the diffusive section of the filter. An additional feature is that the resin component of the cartridge adsorbs in particular pro-inflammatory cytokines. Given the important role played by OxSt and its associated molecules, including those related to inflammation in increasing cardiovascular disease (CVD) risk in end-stage renal disease (ESRD), HFR may be useful in reducing the levels of these molecules, and thereby, in reducing the morbidity and mortality of dialysis patients.

The aim of the current study was to evaluate the effect of dialysis using HFR on OxSt as assessed by plasma markers of OxSt such as oxidized low density lipoproteins (LDL), an indicator of cardiovascular risk factor, as well as gene and protein expression levels of OxSt-related proteins in mononuclear cells such as

p22phox, a 22 kDa subunit of cytochrome b_{558} included in the NADH/NADPH oxidase which is present both in leucocytes and in the vascular wall which functions as an integral subunit of the final electron transport from NAD(P)H to haeme and molecular oxygen in generating O_2 , plasminogen activator inhibitor (PAI)-1, a proatherothrombogenic factor; haeme-oxygenase-1 (HO-1), one of three different isoforms of HO, it acts on haeme, producing CO and biliverdin, which is further metabolized to bilirubin, a potent antioxidant itself.

Eighteen patients from the Division of Nephrology II at the Padova University Hospital, age range 19–60 years, undergoing chronic dialysis treatment (210–240 min three times a week bicarbonate-dialysis) for at least 1 year (range 1–6 years), were recruited and randomized into a 1 year cross-over study. One group of patients was initially treated for 6 months with HFR (SG8 Plus-Bellco, Mirandola Italy) then followed by 6 months of low-flux bicarbonate dialysis with ultrapure dialysate, using a polysulphone dialyser $1.8m^2$ and the other group was first treated with low flux bicarbonate dialysis with ultrapure dialysate, using a polysulphone dialyser $1.8m^2$ for 6 months followed by 6 months of treatment using HFR.

Treatment with HFR significantly reduced mononuclear cell p22phox mRNA level and protein expression compared with the treatment with BD. Also mononuclear cell PAI-1 mRNA level and protein expression was significantly reduced by the treatment with HFR compared with the treatment with BD. Whereas treatment with HFR did not modify gene and protein expression of HO-1 compared with the treatment with BD. Treatment with HFR compared with the treatment with BD significantly reduced the plasma level of OxLDL: $-14 \pm 19 \Delta\%$ vs 1 ± 14 , $p < 0.01$.

The results of this study indicate that the treatment with HFR has a much lower impact on OxSt, as the levels of expression of proteins related to and the level of markers of OxSt were lower than those seen with standard dialysis. The more plausible explanation may come from both the efficacy of HFR in reducing the level of pro-oxidant/proinflammatory cytokines such as $TNF-\alpha$, IL-6, which are inducers of and involved in the OxSt and inflammatory response, and from a possible sparing effect of HFR on several water soluble antioxidants. These effects of HFR might contribute to reduce the oxidative status in dialysis patients in general and explain its effects compared with standard bicarbonate dialysis in reducing the gene and protein expression of the OxSt-related proteins. This lower impact on OxSt suggests that HFR is a more biocompatible system for dialysis. Given the very close relationships between OxSt and inflammation and the determinant role played by OxSt in the induction of inflammation-related mechanisms in ESRD patients,

HFR treatment could have considerable clinical impact in reducing the risk of progressive atherosclerotic cardiovascular disease in dialysis patients, which is the main cause of death in these patients.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni i ricercatori hanno rivolto sempre maggiore interesse al ruolo dello stress ossidativo ed al danno ossidativo indotto dai radicali liberi dell'ossigeno in varie patologie umane. Queste sostanze sono in grado di ossidare molecole biologiche tra cui le proteine, il DNA e i lipidi; a causa della loro configurazione elettronica altamente instabile, possono quindi generare reazioni ossidative a catena.

È proprio per l'elevato rischio di esposizione a numerose sostanze ossidanti, presenti anche in condizioni fisiologiche, che l'organismo umano ha sviluppato un'ampia serie di enzimi antiossidanti quali superossido dismutasi, catalasi, e glutatione perossidasi. A coadiuvare l'azione antiossidante di questi enzimi, negli eucarioti vengono utilizzate anche difese antiossidanti non enzimatiche che comprendono: le vitamine (A, E, C), bilirubina, glutatione, albumina, ceruloplasmina e lactoferrina (Calò, 1999).

Sempre maggiori evidenze indicano un ruolo importante delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), dello stress ossidativo e delle molecole correlate all'infiammazione come importante fattore di rischio cardiovascolare nei pazienti con malattia renale (Locatelli et al., 2003). Lo stress ossidativo, infatti, è presente nei pazienti con malattia renale; nei pazienti in fase avanzata di danno renale (ESRD) è presente uno sbilanciamento tra capacità pro-ossidante ed anti-ossidante a favore di un aumento dello stress ossidativo che è stato associato alle complicanze della malattia renale prima fra tutte l'aterosclerosi (Descamps-Latscha et al., 2001).

La ricerca di strategie antiossidanti per proteggere il sistema cardiovascolare dal danno indotto da specie reattive dell'ossigeno e quindi dallo stress ossidativo, ha indotto a focalizzare l'attenzione sugli effetti di farmaci usati in terapia dialitica o di filtri di dialisi sullo stress ossidativo. È stato infatti dimostrato che il trattamento con vitamina E, per via orale, in pazienti con insufficienza renale cronica ha corretto l'anemia e ridotto la suscettibilità all'ossidazione delle LDL (Islam et al., 2000), causando anche beneficio a pazienti dializzati con preesistente malattia cardiovascolare (Boaz et al., 2000).

Nel tentativo di migliorare la prognosi dei pazienti in emodialisi cronica sono state introdotte nuove tecniche di dialisi con l'obiettivo di ridurre lo stress ossidativo

come i dializzatori con vitamina E adesa alla membrana (Galli et al., 1998 e 2007). Uno recente studio ha dimostrato che il trattamento dialitico con dializzatori con vitamina E adesa alla membrana modifica l'espressione genica di importanti proteine correlate allo stress ossidativo migliorando le condizioni cliniche dei pazienti (Calò et al., 2004).

CAPITOLO 2

LO STRESS OSSIDATIVO

Il termine "stress ossidativo" viene generalmente utilizzato per descrivere il livello raggiunto di danno ossidativo presente nelle cellule, nei tessuti o negli organi, causato dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS). Tale danno può riguardare una molecola specifica, un tessuto o l'intero organismo.

Le specie reattive dell'ossigeno, come perossidi, radicali superossido e idrossilico, rappresentano una classe di molecole che derivano dal normale metabolismo dell'ossigeno e pertanto sono presenti naturalmente in tutti gli organismi aerobi. L'ossigeno molecolare, infatti, agendo da accettore finale d'elettroni nella respirazione mitocondriale aerobica, contribuisce alla formazione di ROS. Esistono sorgenti di ROS esogene come: il fumo di sigaretta, l'inquinamento ambientale come gas di scarico delle automobili, un consumo di alcol in eccesso, l'esposizione a radiazioni ionizzanti, le infezioni batteriche, fungine e virali, ecc. Questi agenti ossidanti possono provocare danni cellulari (comunemente riferiti allo stress ossidativo) dovuti all'ossidazione di acidi nucleici, proteine e lipidi di membrana. L'organismo ha tuttavia sviluppato un elaborato meccanismo di difesa nei confronti di questi prodotti secondari del suo metabolismo ed ha cercato anche di utilizzarli nei processi fisiologici al fine di assicurarsi la sopravvivenza (Calò, 1999).

Nei batteri sono stati individuati induttori genetici che hanno la funzione di regolare l'espressione dei geni di enzimi antiossidanti (AOE) i quali difendono e/o adattano la cellula contro le ROS e ne preservano l'omeostasi. Per esempio, in risposta al perossido di idrogeno (H_2O_2) i prodotti del gene *oxyR* di *E. coli* attivano la trascrizione di una serie di geni inclusi la catalasi, la glutatione-reduttasi, e la alchil-idroperossido-reduttasi. In risposta all'anione superossido i prodotti del gene *soxRS* mediano la trascrizione di geni che codificano diverse proteine incluse la superossido dismutasi Mn-dipendente (MnSOD), enzimi di riparazione del DNA, e la glucosio-6-fosfato deidrogenasi (Choi e Alam, 1996).

Anche negli eucarioti si sono sviluppati meccanismi antiossidanti enzimatici e non, deputati alla difesa della cellula contro gli effetti deleteri delle ROS.

Le difese non-enzimatiche comprendono le vitamine, la bilirubina, il glutatione, l'albumina, la ceruloplasmina e la transferrina-lactoferrina (Choi e Alam, 1996).

Gli enzimi antiossidanti quali la superossido dismutasi (SOD), la catalasi (CAT), e la glutazione perossidasi (GP) detossificano le ROS per proteggere l'organismo dagli effetti deleteri delle stesse. La SOD detossifica l'anione superossido, mentre la catalasi e la glutazione perossidasi convertono H_2O_2 in H_2O e O_2 .

Molti studi effettuati in modelli *in vitro* ed *in vivo*, sono stati utilizzati per caratterizzare a livello molecolare le risposte allo stress ossidativo al fine di migliorare le conoscenze sui meccanismi che stanno alla base della fisiopatologia di numerose malattie in cui è implicato lo stress ossidativo.

In cellule in coltura, lo stress ossidativo può provocare l'induzione dei "classici" geni AOE (codificanti per enzimi antiossidanti) tra cui MnSOD, CuZnSOD, CAT, e GP. La funzione principale di tali enzimi consiste nell'agire da *scavenger* verso le ROS ed aiutare così la cellula ad attenuare lo stato pro-ossidante al fine di mantenere la normale omeostasi cellulare (Choi et Alam, 1996).

Di recente si è evidenziato che anche l'espressione di altri geni viene incrementata dal danno ossidativo. Questi geni includono proteine responsive allo stress come le *heat shock proteins* (HSP), la metallothioneina (MT) e l'eme ossigenasi-1 (HO-1) [Figura 2.1] (Choi et Alam, 1996).

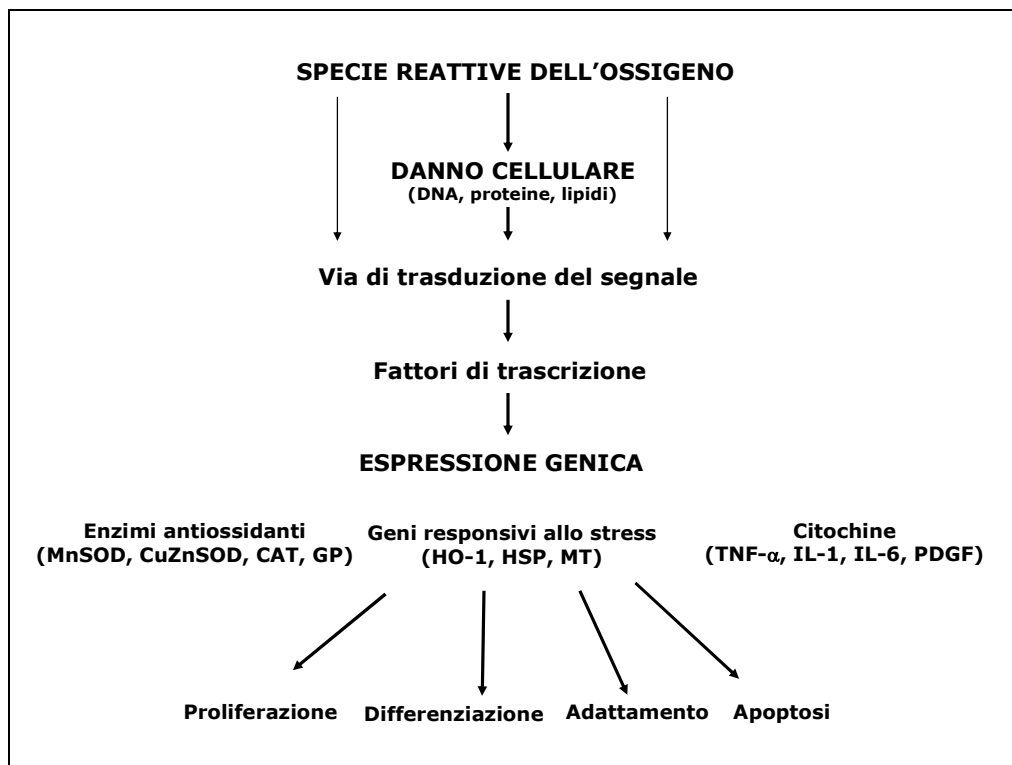


Figura 2.1 Diagramma dei meccanismi cellulari e molecolari che rispondono allo stress ossidativo.

Prove ulteriori suggeriscono che anche regolatori trascrizionali come c-Fos, c-Jun, Egr-1 e NF- κ B giocano un ruolo critico nell'ampio evento molecolare che caratterizza la risposta cellulare allo stress ossidativo. Questi regolatori genetici potrebbero attivare alcuni dei geni menzionati o altri geni non identificati i cui prodotti sono necessari alla difesa della cellula contro insulti ossidativi (Choi et Alam, 1996).

2.1 I RADICALI LIBERI, GLI ALTRI OSSIDANTI E LE LORO FONTI

I radicali liberi e le altre specie reattive dell'ossigeno sono molecole che contengono un elettrone spaiato nell'orbitale esterno. Essi si formano durante la riduzione incompleta dell'ossigeno molecolare quando l'ossigeno accetta un solo elettrone. Tale conformazione è energeticamente instabile per cui le molecole che si formano risultano altamente reattive inducendo reazioni ossidative a catena. Infatti, la stabilità viene raggiunta rimuovendo un elettrone da molecole circostanti che vengono pertanto ossidate mentre il radicale libero, acquistando l'elettrone, appaia gli elettroni nell'orbitale esterno e si riduce. La molecola a cui è stato sottratto un elettrone, invece, diventerà a sua volta un radicale libero, capace di generarne uno nuovo dopo aver sottratto un elettrone ad un'altra molecola, perpetuando così ed amplificando la sequenza delle reazioni di ossido-riduzione (Calò, 1999).

Le specie reattive dell'ossigeno più conosciute e biologicamente importanti sono l'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$), il radicale idrossilico ($OH\cdot$) e l'acqua ossigenata (H_2O_2). L'anione superossido è il primo composto intermedio della riduzione dell'ossigeno; non è estremamente tossico, ma può indurre la formazione di composti altamente reattivi e tossici come il radicale idrossilico ($OH\cdot$) ed il perossinitrito ($OONO^-$) [Figura 2.2].

Il radicale idrossilico $OH\cdot$ è un energetico ossidante ma ha una emivita molto breve ed una ridotta capacità di diffondere. L'acqua ossigenata (H_2O_2) si forma per dismutazione del superossido, reazione che si può verificare spontaneamente o per catalisi ad opera dell'enzima superossido dismutasi (SOD). Di per sé, essa non risulta molto reattiva, ma in vivo può diffondere attraverso le membrane biologiche e generare il radicale idrossilico $OH\cdot$ altamente reattivo, ossidante e tossico (Calò, 1999).

Le fonti di radicali liberi e ROS sono varie e comprendono i sistemi di trasporto di elettroni associati alle membrane mitocondriali come conseguenza di fosforilazioni ossidative e di prodotti intermedi di reazioni mediate da enzimi microsomiali come la cicloossigenasi, la lipoossigenasi e la citocromo P_{450}

ossigenasi. Recentemente, l'enzima NADH/NADPH ossidasi si è rivelato una fonte molto importante di anioni superossido. Questo enzima viene stimolato dall'angiotensina II (Griendling et al., 1994) ed aumenti plasmatici di quest'ultima incrementano a loro volta l'attività del sistema ossidativo vascolare.

Un altro enzima è la xantina-ossidasi, che regola il metabolismo della xantina formando O_2^- , H_2O_2 ed acido urico. Radicali liberi e ROS vengono anche prodotti in condizioni infiammatorie come risultato dell'attivazione di neutrofili ed altri fagociti (Rosen et al., 1995), nel metabolismo di farmaci e dal fumo di sigaretta.

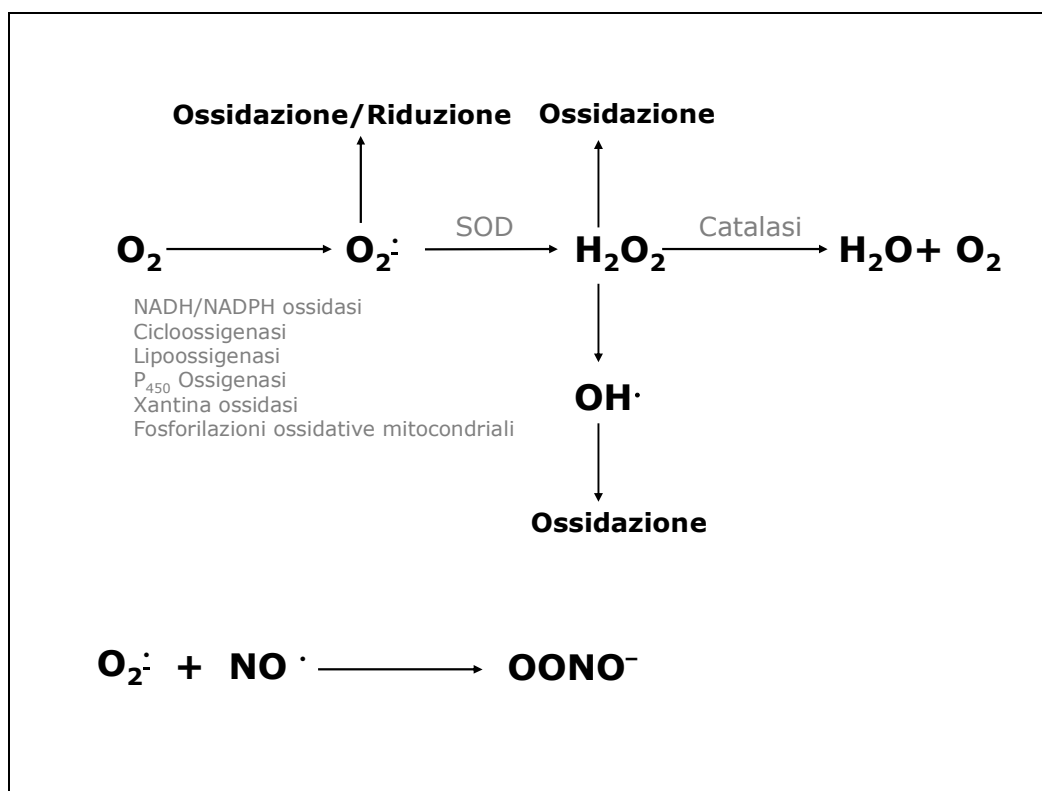
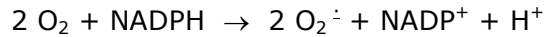


Figura 2.2 Formazione di radicali liberi e composti altamente reattivi e tossici a partire dall'ossigeno molecolare. SOD=Superossido Dismutasi.

2.1.1 Il sistema NADH/NADPH ossidasi

Il delicato bilancio tra stato ossidativo e riduttivo (redox) è mantenuto da una serie di enzimi e molecole pro-ossidanti ed anti-ossidanti. Tra questi molto studiate sono le NADPH ossidasi, un gruppo di enzimi associati alle membrane plasmatiche (Babior, 1999).

La NADPH ossidasi leucocitaria è stata bene caratterizzata nei fagociti e linfociti B. Essa catalizza la produzione di anione superossido attraverso la riduzione dell'ossigeno, sfruttando l'NADPH quale donatore dell'elettrone:



L'anione superossido generato da questa reazione inizia la produzione di un vasto assortimento di ossidanti reattivi, inclusi i radicali liberi. Tali ossidanti, nella loro azione fisiologica, sono sfruttati dai fagociti per uccidere i microrganismi esogeni, ma sono anche causa di danno ai tessuti vicini, così che la loro produzione viene rigidamente controllata. Il nucleo enzimatico comprende cinque componenti: p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, p22^{phox} e p91^{phox}. Nelle cellule a riposo tre di queste, p40^{phox}, p47^{phox} e p67^{phox}, formano un complesso nel citosol. Le altre due, p22^{phox} e p91^{phox}, sono localizzate nelle membrane delle vescicole secretorie e di granuli specifici, dove si trovano come flavoemoproteina eterodimerica conosciuta come citocromo b₅₅₈.

La separazione di questi due gruppi di componenti garantisce che l'ossidasi rimanga inattivata. Quando però le cellule vengono esposte ad uno dei numerosi stimoli, la componente citosolica p47^{phox} viene fosforilata e l'intero complesso citosolico migra verso la membrana, dove si unisce al citocromo b₅₅₈ per assemblare l'ossidasi attiva [Figura 2.3]. L'ossidasi così assemblata può trasferire elettroni dal substrato all'ossigeno (Sirker et al., 2007).

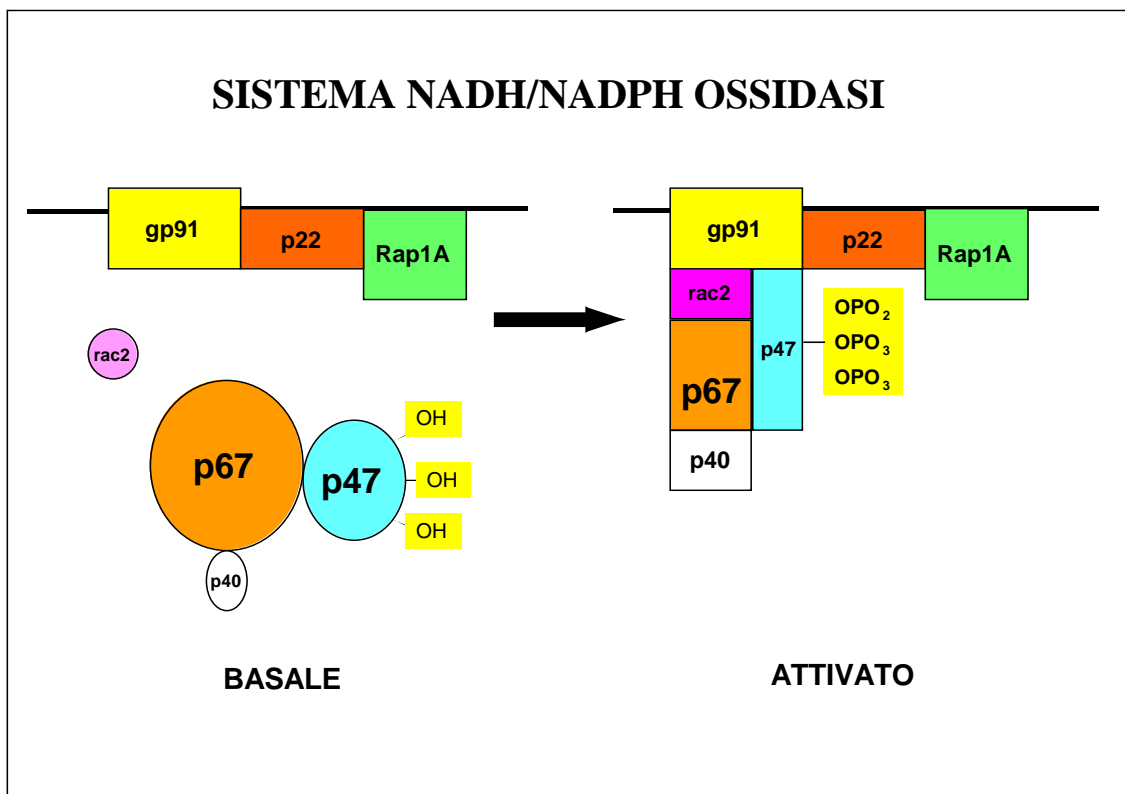


Figura 2.3 Attivazione della NADPH ossidasi leucocitaria (Babior, 1999).

L'attivazione richiede la partecipazione anche di due proteine a basso peso molecolare che legano i nucleotidi guanidinici: Rac2, localizzata, inattiva, nel citosol

in un complesso dimerico con Rho-GDI (*Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor*), e Rap1 A, localizzata nella membrana. Durante l'attivazione, Rac2 lega il GTP e migra verso la membrana con il complesso citosolico; allo stesso tempo il citocromo b₅₅₈ e il Rap1 A si distribuiscono sulla superficie cellulare grazie alla fusione delle membrane delle vescicole secretorie e successivamente grazie alla fusione delle membrane di granuli specifici con la membrana plasmatica della cellula. Questo processo di fusione inoltre attiva il rilascio del contenuto degli organelli verso l'ambiente esterno (Sirker et al., 2007).

Quando si attiva la fagocitosi, la membrana plasmatica viene inglobata come parete delle vescicole fagocitarie, in questo modo quella che prima era la parete esterna della membrana, ora diventa la parete interna della vescicola. Da questa posizione l'enzima riversa O₂⁻ nella vescicola e la rapida conversione di questo anione nei prodotti successivi invade l'ambiente interno con tutta una serie di agenti ossidanti letali. In tale contesto la subunità p22^{phox} risulta essere un componente critico della generazione di anioni superossido (Masuko, 1996; Sirker et al., 2007).

2.2 EFFETTI DELLO STRESS OSSIDATIVO SU COMPONENTI E FUNZIONI CELLULARI

Gli effetti principali dei radicali liberi in generale e delle ROS in particolare consistono essenzialmente nella distruzione dell'equilibrio esistente all'interno dei sistemi biologici danneggiando molecole di importanza primaria per le funzioni cellulari come le proteine, il DNA e i lipidi, fino a portare la cellula a morte (Calò, 1999).

Gli acidi grassi polinsaturi e le lipoproteine sono particolarmente suscettibili all'azione ossidativa dei radicali liberi e delle ROS che inducono perossidazione lipidica, dovuta molto spesso alla formazione di radicali idrossilici ad opera della reazione con metallo-ioni come il ferro o il rame (Aust et al., 1996). Ne deriva un danno rilevante alla membrana cellulare particolarmente ricca di lipidi e una compromissione delle funzioni di membrana.

Le proteine che subiscono l'attacco ossidativo si possono frammentare e/o reagire e/o aggregare. Ne derivano anomalie della funzione di canali ionici, di recettori cellulari posti a livello della membrana cellulare, alterazioni delle fosforilazioni ed una generale alterazione delle strutture proteiche e lipidiche associate alla membrana cellulare, che compromette in definitiva le funzioni della cellula interessata.

Il danno a carico del DNA può indurre distruzione di basi ed interruzioni della doppia elica, mutagenesi, carcinogenesi e morte cellulare (Birnboim e Kanabus-Kominska, 1987; Aruoma et al., 1989).

Questi effetti dei radicali liberi e di altri ossidanti sulle funzioni cellulari sopramenzionate, possono estendersi all'induzione della crescita cellulare grazie all'inattivazione del monossido di azoto di origine endoteliale (NO^{*}), nota sostanza vasodilatatrice ed antiproliferativa. Diventano così favorite risposte tissutali come l'ipertrofia e l'iperplasia delle cellule muscolari lisce vascolari, il cui significato patologico e prognostico nell'evoluzione dell'aterosclerosi è ben noto. L'incremento dello stress ossidativo, infatti, risulta associato a quasi tutti i fattori di rischio dell'aterosclerosi e delle sue complicanze come l'ipercolesterolemia, l'ipertensione arteriosa, il diabete mellito, il fumo di sigaretta, il deficit di estrogeni nella donna, l'iperomocisteinemia (Griendling e Alexander, 1997; Harrison et al., 2003). [Figura 2.4].



Figura 2.4 Principali conseguenze dello stress ossidativo a livello vascolare.

2.3 IL SISTEMA del PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR 1

L'inibitore-1 dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1) è stato purificato per la prima volta 20 anni fa come proteina secreta dalle cellule endoteliali capace di inibire la lisi del coagulo di fibrina (Van Mourik et al., 1984). Il cDNA di PAI-1 è

stato poi clonato simultaneamente da 3 differenti gruppi (Ginsburg et al., 1986; Ny et al., 1986; Pannekoek et al., 1986) ed è stato così dimostrato che esso rappresentava un nuovo membro della superfamiglia delle serpine, inibitori delle serine proteasi, ed è stata codificata anche la sua struttura genetica (Luskutoff et al., 1987).

PAI-1 agisce inibendo l'attività degli attivatori del plasminogeno di tipo tissutale (t-PA) e di tipo urochinasico (u-PA), specifiche proteasi seriniche che contribuiscono con la trombina alla formazione di plasmina a partire dal suo precursore inattivo plasminogeno (Esmon, 2000) [Figura 2.5].

PAI-1 viene secreto dalle piastrine, dalle cellule endoteliali vascolari, dalle cellule muscolari lisce vascolari (VSMC) e da molti altri tipi di cellule non vascolari, tra le quali anche gli epatociti (Kohler e Grant, 2000). Esiste in una forma attiva, latente, e in conformazione inattiva; circola con le proteasi u-PA e t-PA in complessi equimolecolari e al momento opportuno li inibisce formando complessi 1:1 altamente irreversibili che vengono poi eliminati dalla circolazione dagli epatociti (Van Meijer e Pannekoek, 1995).

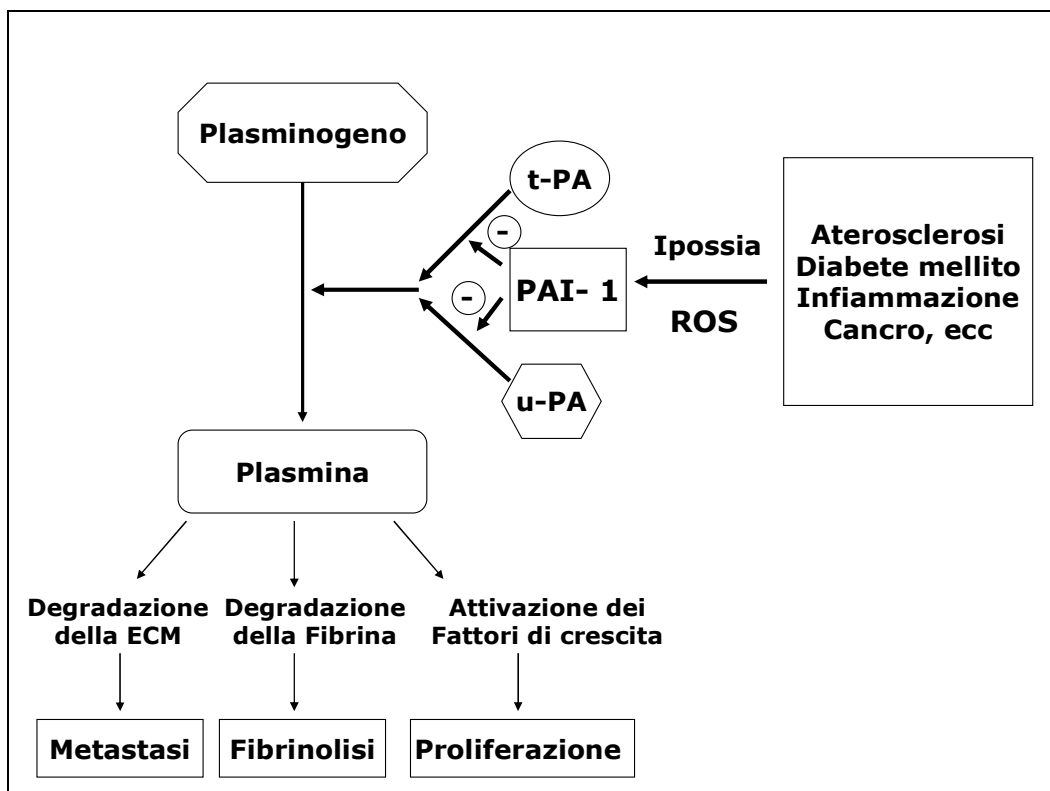


Figura 2.5 PAI-1 nello stato di salute e malattia. t-PA, Attivatore del Plasminogeno di tipo tissutale; u-PA, Attivatore del Plasminogeno di tipo urochinasico; PAI-1, Inibitore dell'Attivatore del Plasminogeno di tipo 1; ECM, Matrice ExtraCellulare.

A differenza delle altre serpine, PAI-1 si converte prontamente in una forma inattiva per riarrangiamento strutturale e, in condizioni fisiologiche, ha breve emivita. Inoltre la specificità della sua azione di proteasi è determinata dalla regione allosterica della molecola. L'efficienza di questa regione allosterica per le reazioni di inibizione è modulata in gran misura da piastrine, proteine della matrice e vitronectina che agiscono come cofattori proteici stabilizzando PAI-1 nella sua conformazione attiva (Ehrlich et al., 1990).

PAI-1 oltre a trovarsi nella matrice extracellulare complessato con la vitronectina, che ne prolunga la sua emivita e che ne permette il legame alla fibrina (Podor et al., 2000), può essere legato a ligandi non proteasici, come eparina o recettori *scavenger* della famiglia dei recettori per le lipoproteine a bassa densità (LDL) (Mimuro e Loskutoff, 1989). Queste osservazioni evidenziano che PAI-1 non è coinvolto solo nella regolazione della fibrinolisi.

Il sistema plasminogeno-plasmina, oltre all'ormai noto ruolo nella fibrinolisi, è infatti coinvolto nella conversione di numerose molecole, come laminina, collagene di tipo IV, fattore di crescita degli epatociti, o *Tumor Growth Factor* (TGF- β), che sono coinvolti nel *turnover* della matrice extracellulare, nella proliferazione, nei processi di rimodellamento tissutale. Per questi motivi PAI-1 è un inibitore chiave non solo nella fibrinolisi, ma anche nei processi proteolitici che sono associati alla neovascolarizzazione, rimodellamento tessutale e rigenerazione come infiammazione, metastasi e fibrosi [**Figura 2.5**], (Dimova et al., 2004).

L'importanza dell'equilibrio tra gli attivatori del plasminogeno (PA) e il loro principale inibitore, PAI-1, è stata sottolineata da numerosi studi clinici: una diminuzione dei livelli di PAI-1 sono associati con diatesi emorragica, mentre il suo aumento è stato riscontrato in numerose condizioni cliniche, come aterosclerosi, disturbi coronarici cardiaci, trombosi venosa profonda, infiammazione acuta e cronica, disturbi polmonari, disturbi renali cronici, sepsi, emorragia e metastasi cancerosa (Yamamoto e Saito, 1998). Inoltre aumentati livelli di PAI-1 sono stati riscontrati in pazienti affetti da insulino resistenza e sindrome metabolica (Juhan Vague et al., 1991).

2.3.1 PAI-1 e lo stress ossidativo

È stato dimostrato che condizioni cliniche come emorragie, eventi pretrombotici e formazione di trombi sono associati ad una condizione di ipossia che determina direttamente l'attivazione di PAI-1. Altre condizioni patologiche in cui si riscontrano aumentati livelli di PAI-1, sono vari disturbi cardiovascolari, polmonari e renali e anche il diabete mellito, associati a stress ossidativo e ad aumentata

produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Quindi l'ipossia e la riduzione dei livelli di ROS da una parte, o lo stress ossidativo e l'aumento dei livelli di ROS dall'altra, possono innescare l'espressione di PAI-1, sottolineando il ruolo delle ROS come secondi messaggeri [Figura 2.5] (Dimova et al., 2004).

Il ruolo delle ROS nella regolazione dell'espressione genica di PAI-1 è stato dimostrato in numerosi studi *in vitro* che utilizzavano cellule endoteliali, cellule epiteliali di tubulo renale, cellule mesangiali glomerulari, adipociti, epatociti e cellule di epatoma HepG2. Le cellule vascolari endoteliali sono state spesso usate per dimostrare l'induzione di PAI-1 da parte delle ROS (Du et al., 2000; Xu et al., 2000; Swiatkowska et al., 2002). In questi studi lo stress ossidativo è stato generato utilizzando differenti agenti che causavano una sovrapproduzione di ROS con diversi meccanismi. L' H_2O_2 può essere generata come prodotto dell'idrossilazione ossidativa dell'ipoxantina a xantina catalizzata dalla xantina ossidasi, sistema xantina ossidasi/ipoxantina (XO/HX). Le citochine interleuchina-1 (IL-1 β) e il fattore α di necrosi tumorale (TNF- α) inducono la formazione di ROS nelle cellule endoteliali attraverso un meccanismo non del tutto chiarito che coinvolge una sovrapproduzione di ROS nella catena respiratoria mitocondriale o nell'attivazione della NADPH ossidasi (Chen et al., 2004). Anche l'iperglicemia stimola la produzione di ROS attraverso l'enolizzazione del glucosio (Ceriello et al., 1995) o l'induzione della produzione di superossido nei mitocondri (Du et al. 2000). Inoltre l'ossidazione del rame o dell'ossigeno dipendente dell'aminoacido omicisteina aumenta la produzione di H_2O_2 (Starkemaum e Harlan, 1986).

In particolare, Okada e colleghi (1998) hanno dimostrato non solo che il trattamento di cellule endoteliali microvascolari cardiache primarie di ratto (CMEC) con XO/HX e con H_2O_2 induce la sintesi e l'attività di PAI-1, ma anche che l'IL-1 β induce la produzione di radicali anioni superossido, H_2O_2 e radicali idrossilici, responsabili dell'accumulo di PAI-1 nella matrice extracellulare.

Oltre al più diretto effetto delle ROS nella regolazione dell'espressione di PAI-1, è stato anche studiato l'indiretto coinvolgimento delle ROS nell'ossidazione delle LDL. È stato osservato che la modificazione ossidativa delle LDL native o glicate aumenta la produzione di PAI-1 in cellule umane endoteliali di vena ombelicale (HUVEC) e in cellule umane endoteliali di arteria coronaria (Ren e Shen, 2000). Il trattamento di queste cellule con sostanze antiossidanti come la vitamina E, blocca i cambiamenti indotti dalle LDL nell'espressione di PAI-1 (Ren e Shen, 2000).

L'induzione dell'espressione di PAI-1 dipendente dalle ROS è stata anche studiata in cellule epiteliali di tubulo renale o mesangiali glomerulari (Eberhardt et al. 2002; Jiang et al. 2003; Motojima et al. 2003). Anche in questo caso lo stress

ossidativo è stato prodotto usando diversi stimoli come esposizione a raggi γ , citochine (IL-1 β , TGF- β 1 e TNF- α) e tossina uremica. L'effetto delle radiazioni ionizzanti porta alla produzione di differenti specie reattive dell'ossigeno, inclusi anioni superossido, H₂O₂, radicali idrossilici, perossilici e alcossilici. L'esposizione a raggi γ di cellule epiteliali di tubulo renale porta ad un aumento, dose dipendente, dei livelli di mRNA e di proteina espressa di PAI-1 (Zhao et al., 2001). Similmente è stato dimostrato anche che TGF- β 1 induce un'aumentata regolazione dell'espressione genica e proteica di PAI-1 nelle cellule mesangiali glomerulari, dipendenti da H₂O₂. Il trattamento con N-acetilcisteina (NAC) inibisce gli effetti indotti da H₂O₂ e TGF- β 1 sull'espressione di PAI-1 (Dimova et al., 2004).

Uno schema riassuntivo di come l'espressione di PAI-1 sia indotta dalle ROS è riportato in **Figura 2.6**.

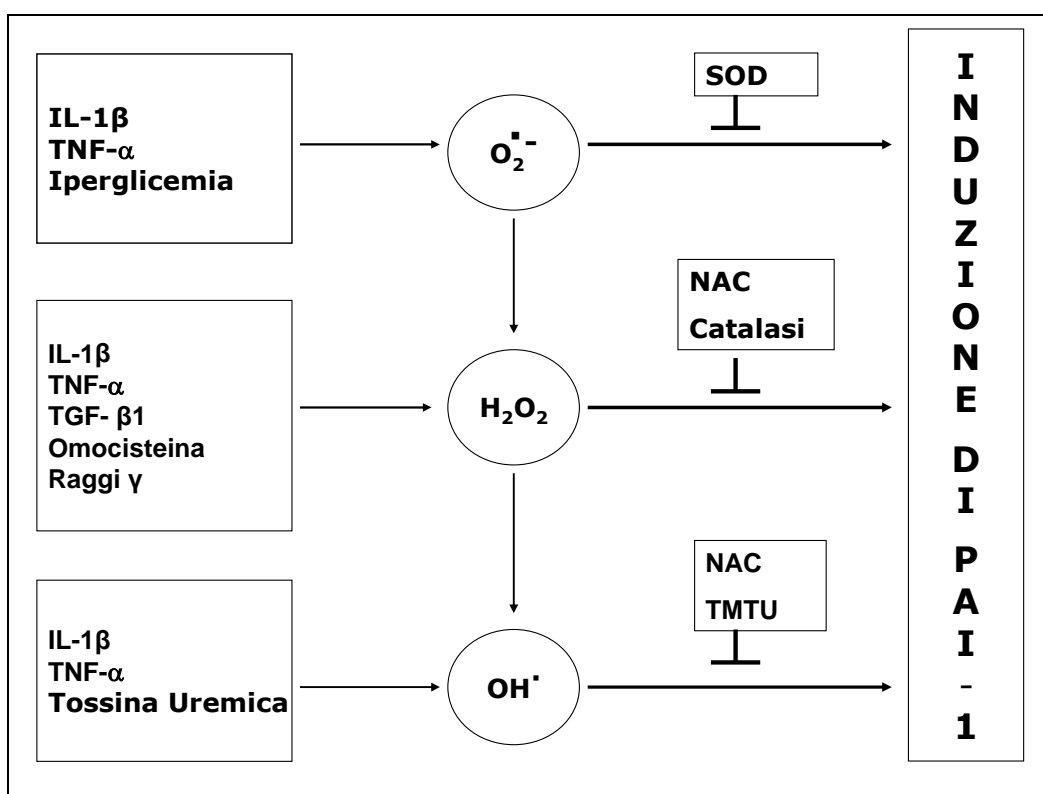


Figura 2.6 Induzione di PAI-1 via ROS. Per indurre l'espressione di PAI-1 attraverso una sovrapproduzione di ROS, come O₂^{•-}, H₂O₂, e OH[•], sono stati utilizzati, in diversi studi, diversi stimoli come citochine (IL-1 β , interleuchina-1; TNF- α , fattore α di necrosi tumorale; TGF- β 1, fattore di crescita trasformante) composti chimici come glucosio, omocisteina e tossine uremiche, agenti fisici come i raggi γ . Si è dimostrato che questi effetti possono essere bloccati dall'applicazione di antiossidanti (NAC, N-Acetilcisteina; TMTU, Tetrametiltiourea) e enzimi scavenger come SOD, Superossido Dismutasi e Catalasi. (Dimova et al., 2004).

2.3.2 Regolazione dell'espressione di PAI-1 da parte delle ROS

Sebbene numerosi studi abbiano dimostrato, utilizzando differenti stimoli che inducono stress ossidativo e/o molecole ad azione antiossidante, che le ROS giocano un ruolo fondamentale nella regolazione dell'espressione genica e proteica di PAI-1, pochi lavori hanno cercato di spiegare la via di trasduzione del segnale coinvolto nella regolazione di PAI-1 dipendente da ROS. Il meccanismo molecolare coinvolto rimane ancora da chiarire anche se sembra essere diverso a seconda del distretto cellulare coinvolto. In particolare sono state proposte due vie di trasduzione del segnale che potrebbero essere coinvolte nell'induzione di PAI-1 da parte delle specie reattive all'ossigeno: la MAP chinasi (MAPK) e la via della serina-treonina chinasi che comprende PKB. Il segnale intracellulare mediato dalle vie sopra citate provoca l'attivazione di fattori di trascrizione, quali ad esempio NFkB e HIF1 rispettivamente per MAPK e PKB, i cui elementi responsivi sono presenti nel promotore di PAI-1 (Dimova et al., 2004) [Figura 2.7].

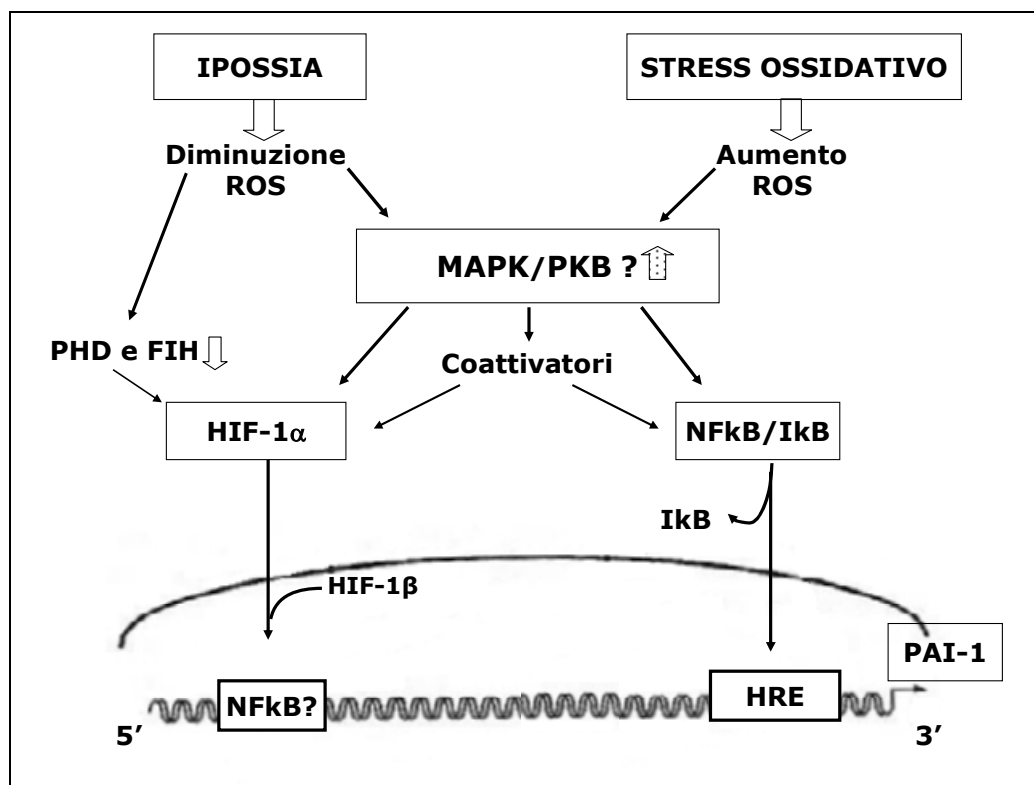


Figura 2.7 Regolazione di PAI-1 da parte di ipossia e ROS. MAPK, MAP chinasi; PKB, serina-treonina chinasi; NF-κB, fattori di trascrizione; HIF-1, fattore di trascrizione; PHD, prolil idrossilasi; FIH, asparaginil idrossilasi; HRE, elemento responsivo di ipossia.

2.4 IL SISTEMA DELL'EME OSSIGENASI

Il sistema dell'eme-ossigenasi (HO) consiste di tre isoforme: la proteina HO-1 inducibile dallo stress ossidativo, e due isoforme costitutive HO-2, stimolato maggiormente dai corticosteroidi e HO-3, quest'ultima recentemente isolata e caratterizzata nel cervello di ratto e di scarso interesse biochimico (Nath, 2006).

Le proteine HO-1 e HO-2, prodotte da due geni differenti, hanno poco in comune se si considera la struttura primaria, la regolazione e la distribuzione tissutale (Maines, 1997). Tuttavia, entrambe catalizzano la degradazione dell'eme mediante la rottura del ponte α -metenico della molecola dell'eme per dare quantità equimolari di biliverdina, monossido di carbonio (CO, un importante secondo messaggero) e ferro (cofattore essenziale di molti enzimi cellulari e proteine riducenti) [Figura 2.8].

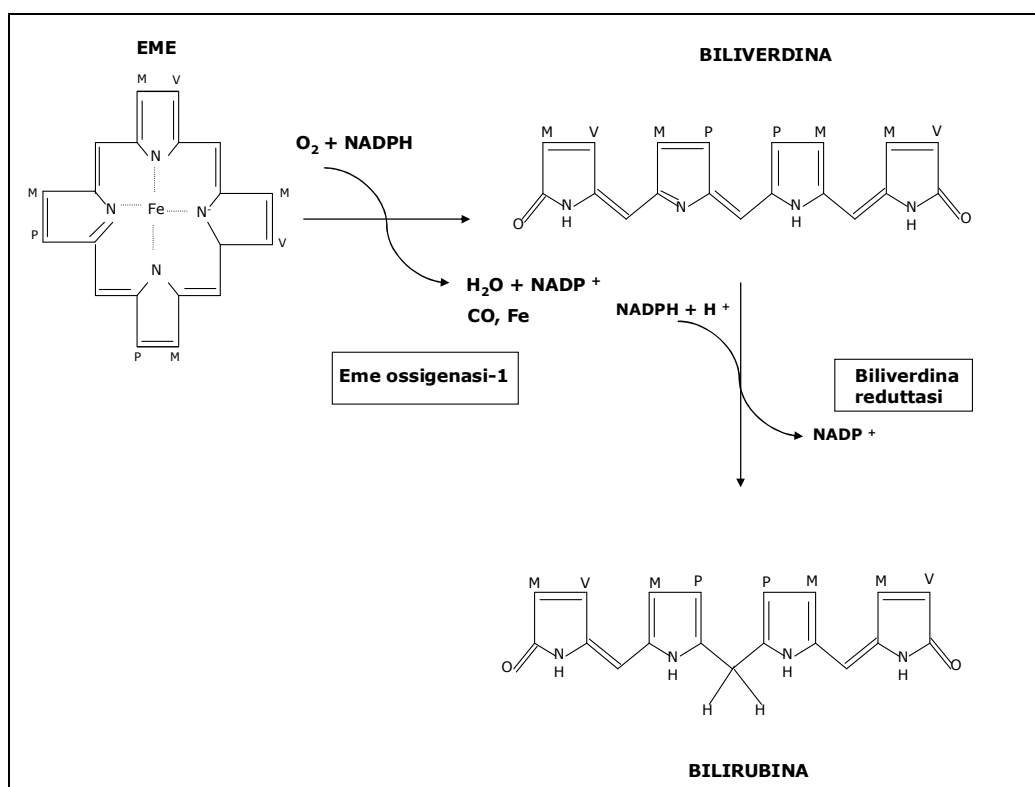


Figura 2.8 Reazione catalitica dell'eme ossigenasi-1; esso catalizza la conversione dell'eme a biliverdina, rilasciando ferro²⁺ e CO; la biliverdina reduttasi successivamente catalizza la conversione della biliverdina a bilirubina.

La biliverdina viene successivamente convertita in bilirubina nel citosol dalla biliverdina reduttasi. E' ormai accettato che la bilirubina risulta avere energiche proprietà antiossidanti e citoprotettive. Al CO proveniente dalla degradazione dell'eme sono state invece riconosciute varie funzioni fisiologiche, che sembrano

avere marcata somiglianza con quelle dell'NO. Inoltre è stato osservato che il CO protegge la microcircolazione epatica in condizioni di stress, sembra giocare un ruolo regolatorio sul tono cardiovascolare promuovendo la vasodilatazione, ed inoltre ha spiccate proprietà antiinfiammatorie, antiapoptotiche ed antiproliferative (Kaczorowski e Zuckerbraun, 2007).

Sebbene l'eme sia l'induttore principale di HO-1, precedenti studi dimostravano che l'attività di HO (più tardi attribuita all'HO-1) può essere stimolata anche da una varietà di prodotti non-eme, tra cui metalli pesanti, endotossine ed ormoni (Choi e Alam, 1996). La successiva identificazione di altri induttori dell'HO-1, inclusi sodio arsenito, H₂O₂, radiazioni ultraviolette, ipertermia, iperossia e reagenti sulfidrilici, suggeriscono che la stimolazione dell'attività di HO-1 da induttori del tipo non-eme potrebbe non essere una risposta ad un diretto effetto di questi agenti sul metabolismo dell'eme [Figura 2.9].

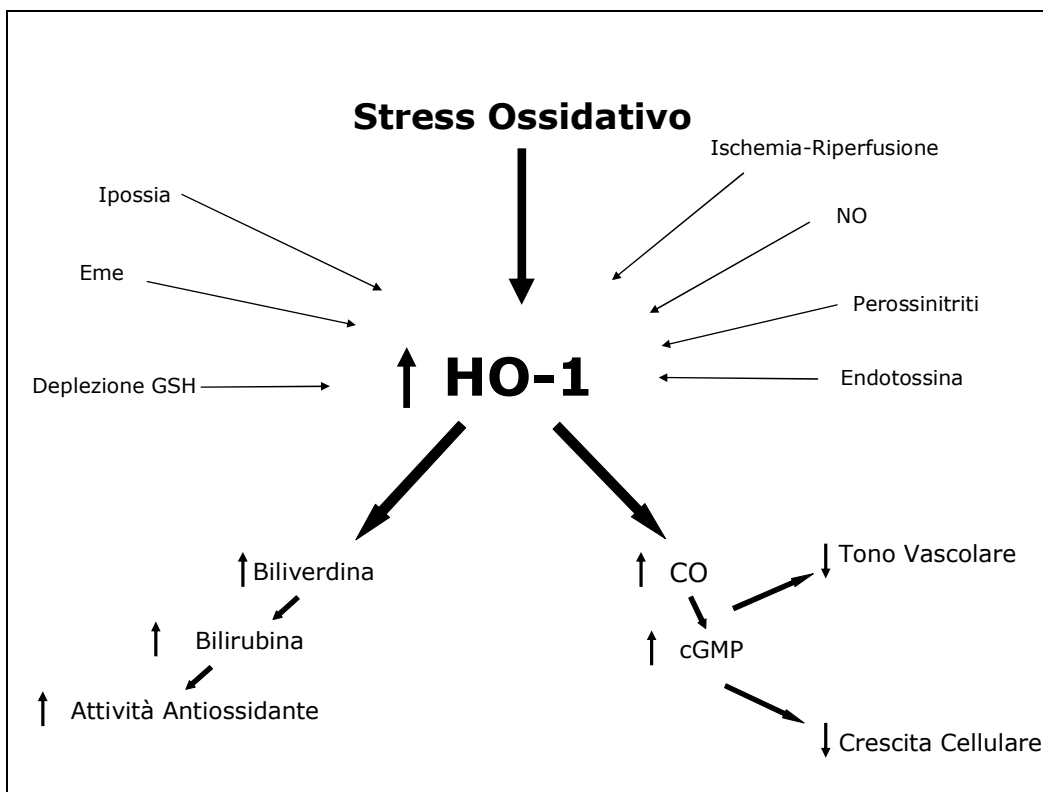


Figura 2.9 Meccanismi cellulari e molecolari dell'azione di HO-1.

Una caratteristica comune tra i vari induttori di HO-1 è che questi agenti, incluso l'eme, generano una facilitata produzione di ROS e/o modificano i livelli di glutazione. Questa correlazione e l'osservazione che la bilirubina, uno dei prodotti finali del catabolismo dell'eme, funziona come antiossidante, ha portato all'ipotesi

che l'HO-1 sia parte di una risposta generale allo stress ossidativo e che in tali condizioni questo enzima giochi un ruolo protettivo.

Inoltre, alcuni studi sottolineano che il CO, un prodotto di disgregazione della degradazione enzimatica dell'eme, può attivare la guanil-ciclastasi e regolare così i livelli di cGMP (Morita et al., 1995). Mimando le funzioni dell'ossido nitrico, il CO potrebbe funzionare come un messaggero cellulare e regolare il tono vascolare. Queste osservazioni e la possibilità che l'HO-1 funzioni come un enzima antiossidante, in virtù della sua capacità di generare bilirubina e decomporre un pro-ossidante cellulare (eme), suggeriscono che questo enzima possa giocare un ruolo importante nel mantenimento dell'omeostasi cellulare in risposta allo stress ossidativo (Ryter et al., 2007).

Funzioni. Il significato funzionale dell'induzione dell'HO-1 in seguito allo stress ossidativo acquista importanza nella protezione contro danni ossidativi sia eme- che non eme-mediati (Choi e Alam, 1996).

Meccanismi di protezione HO-1 mediati. La possibilità che l'induzione di HO-1 dia una risposta citoprotettiva è stato oggetto di studio fin dal 1989 quando HO è stata identificata come una proteina di 32 KDa indotta comunemente nelle cellule danneggiate. Per spiegare l'induzione di HO-1, si è ipotizzato che esso attivi una risposta antiossidante protettiva che rende capaci le cellule, non solo di rimuovere l'eme, proossidante, ma anche di rimpiazzarlo con la bilirubina, potente antiossidante (Nath, 2006).

Il preciso meccanismo con il quale HO-1 conferisce protezione contro lo stress cellulare non è ancora chiarito. I prodotti derivati dalla reazione catalizzata dall'HO-1 potrebbero fornire alcuni suggerimenti. Per esempio potrebbe essere coinvolta l'induzione della sintesi di ferritina come risultato della rimozione di ferro in seguito alla degradazione dell'eme. Ci sono infatti ampie prove che gli effetti deleteri delle ROS, come l'anione superossido e l' H_2O_2 , dipendono dalla presenza di ferro. Il pool intracellulare di ferro libero può reagire sia con l' H_2O_2 che con il superossido, dando origine al radicale idrossilico tossico. Poiché la catalisi dell'eme da parte dell'HO rilascia ferro libero, la ferritina potrebbe essere indotta dal rilascio di questo ferro e servire come una riserva per impedire al ferro di partecipare alla reazione di formazione dei radicali tossici. L'accumulo di ferritina, indotta in queste condizioni, si associa al sequestro di ferro ed alla conseguente protezione da danni ossidativi (Nath, 2006).

La bilirubina, un altro metabolita della degradazione dell'eme, è esso stesso un potente antiossidante. Già nel 1987 Stoker e colleghi avevano osservato che *in vitro* la bilirubina intrappola i radicali perossidici tanto efficacemente quanto l' α -tocoferolo che è considerato il più potente antiossidante della perossidazione

lipidica. Inoltre, l'aggiunta diretta di bilirubina al terreno di cultura è in grado di proteggere le cellule endoteliali e altri tipi di cellule da fattori ossidanti e dalla citotossicità indotta *in vitro* (Clark et al., 2000; Baranano et al., 2002). In molti studi *in vivo*, gli aumentati livelli di bilirubina sierica sono stati correlati con protezione vascolare e resistenza allo stress ossidativo (Ryter et al., 2007).

Un altro prodotto proveniente dal catabolismo dell'eme è il monossido di carbonio (CO). Sebbene l'ossidazione delle molecole organiche contribuisca alla produzione endogena di CO, la principale fonte di CO è la degradazione dell'eme mediante HO. Il monossido di carbonio, comunemente classificato come gas tossico e scarto biologico, è stato da poco rivalutato come membro di una nuova classe di messaggeri cellulari gassosi che includono anche l'ossido nitrico (NO) (Durante, 2002). Similmente all'NO, il CO è in grado di incrementare i livelli intracellulari di cGMP mediante l'attivazione della guanilato ciclasi. Tra le altre risposte fisiologiche, l'aumento di cGMP causa rilasciamento della muscolatura liscia e aggregazione piastrinica. Questo effetto vasodilatatore del CO potrebbe essere critico nel mantenimento di un'adeguata ossigenazione e perfusione tissutale durante il danno acuto generato dagli stimoli dello stress ossidativo. Alcuni studi suggeriscono che il CO endogeno, prodotto via HO-1, può regolare il tono vascolare in condizioni fisiopatologiche, quali quelle derivanti da stress ossidativo. Ulteriori studi dimostrano in sistemi in co-cultura, che il CO prodotto via HO-1 da cellule muscolari lisce esercita effetti paracrini sulle cellule endoteliali poiché aumenta il cGMP endoteliale e diminuisce l'espressione di mitogeni quali l'endotelina-1 e il PDGF (Ryter et al., 2007). Inoltre, il CO può anche contribuire al mantenimento dell'integrità delle pareti vascolari bloccando direttamente l'apoptosi cellulare inibendo il rilascio delle citochine infiammatorie pro-apoptotiche dalla parete dei vasi, agendo sui canali del potassio o inibendo il citocromo p450 (Durante, 2002; Ryter et al., 2007) e inibendo l'aggregazione piastrinica. Perciò, il CO via HO-1 potrebbe anche modulare le interazioni intercellulari e la proliferazione cellulare nelle pareti vasali dopo stress di varia natura, mantenendo l'omeostasi cardiovascolare (Ohta e Yachie, 2004; Ryter et al., 2007).

La **Figura 2.10** riporta le principali applicazioni terapeutiche dei metaboliti dell'eme che seguono le vie citoprotettive endogene coinvolgendo meccanismi antiinfiammatori, antiapoptotici e antiproliferativi (Ryter et al., 2007).

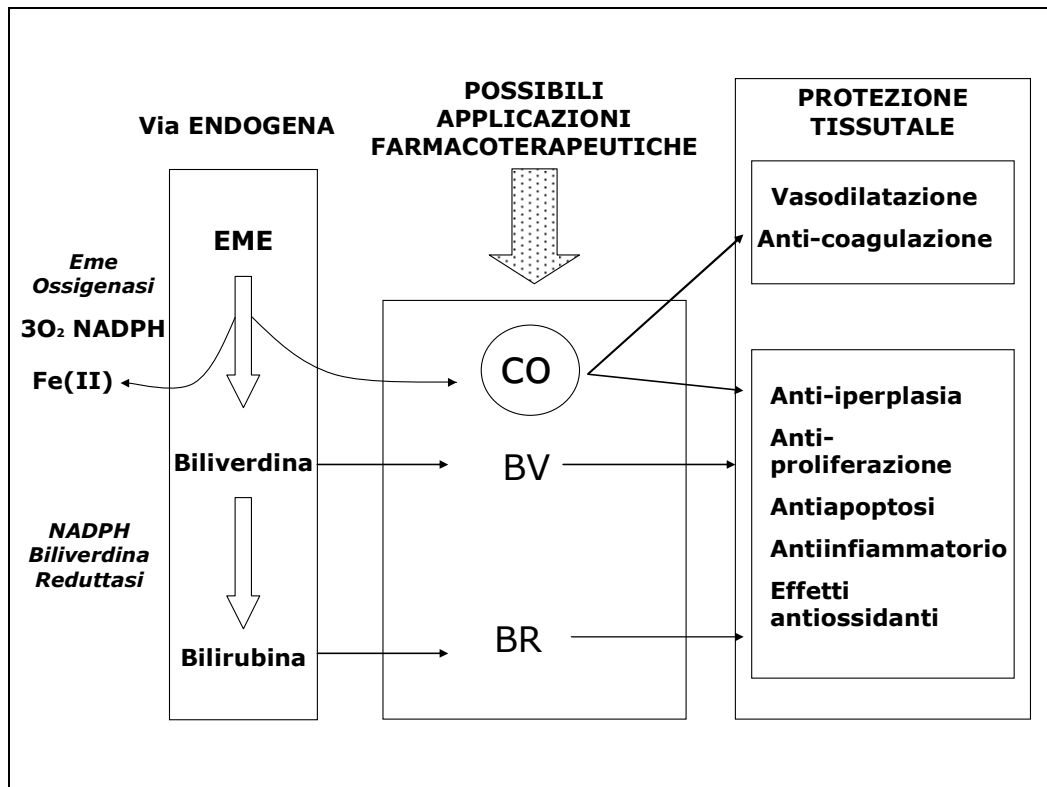


Figura 2.10 Principali attività dei metaboliti dell'eme che seguono le vie citoprotettive endogene. CO (Monossido di carbonio), BV (Biliverdina), ione ferroso Fe(II), BR (Bilirubina) (Ryter et al. 2007).

Regolazione. Nel 1998, alcuni Autori (Ader e Rostaing, 1998) osservarono che la stimolazione dell'attività eme-dipendente dell'HO veniva inibita dal trattamento con un inibitore della sintesi dell'RNA, l'actinomicina D, suggerendo che l'induzione dell'attività enzimatica fosse passibile di regolazione a livello di trascrizione genica.

Più tardi altri studi confermarono questa ipotesi, aggiungendo che la modulazione della trascrizione genica è il principale meccanismo mediante il quale la maggior parte degli agenti, se non tutti, regolano la produzione di HO-1. Il numero e la diversità chimica dei vari induttori dell'HO-1 suggeriscono che vi siano diverse vie di attivazione trascrizionale. D'altro canto, il fatto che ci siano alcuni induttori generati dallo stress ossidativo suggerisce anche che l'azione di almeno alcuni agenti potrebbe convergere su un comune elemento e possibilmente su un comune fattore di trascrizione (Ojo et al., 2000).

L'espressione dell'isoforma HO-1 risulta strettamente regolata dalle condizioni correlate allo stress ossidativo che alterano il bilancio ossido-riduttivo della cellula.

Molti fattori pro-ossidanti incrementano l'espressione e l'attività dell'eme ossigenasi-1 (HO-1) in molti tessuti. E' stato quindi proposto un coinvolgimento di questo enzima nelle condizioni di stress ossidativo al fine di difendere e proteggere

la cellula (Immenschuh e Ramadori, 2000). A sostegno di questa ipotesi, è noto che la biliverdina e la bilirubina possiedono proprietà antiossidanti e che il CO sembra essere un efficace protettore vascolare (Kaide et al., 2001).

L'HO-1 viene indotta in molte patologie e nel danno di vari organi, in particolare quelli dell'apparato cardiovascolare, ed è stato dimostrato che un'analogia produzione di questa isoforma è protettiva verso gli effetti deleteri del danno indotto da stress ossidativo (Abraham et al., 1996). Essa, infatti, libera la cellula dalle molecole pro-ossidanti e le sostituisce con molecole antiossidanti, proteggendo così l'ambiente dagli effetti tossici che possono derivare da un accumulo di agenti ossidanti.

In definitiva, l'attivazione dell'HO-1 in condizioni di stress ossidativo per la cellula, indica che la citoprotezione mediata dall'espressione dell'HO-1 e di altri geni considerati protettivi e/o antiapoptotici, può rappresentare un meccanismo generale di difesa della cellula in risposta a stimoli nocivi (Nath, 2006).

Alla luce di questi dati un'induzione mirata dell'espressione di HO-1 mediante uno stimolo 'non stressorio' potrebbe avere implicazioni terapeutiche nelle patologie associate allo stress ossidativo (Tracz et al., 2007).

2.5 STRESS OSSIDATIVO E ANTIOSSIDANTI ENDOGENI

La produzione di radicali liberi avviene continuamente in tutte le cellule come espressione di normali funzioni cellulari. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono generate ad esempio nei siti di infiammazione e di danno tissutale; a concentrazioni ridotte le ROS possono fungere da molecole segnale e partecipare alla regolazione di attività fondamentali per la cellula, come la crescita e le risposte di adattamento. Tuttavia, una produzione eccessiva di radicali liberi e ROS da parte di fonti endogene o esogene, può giocare un ruolo chiave in molte patologie. Infatti, quando in eccesso, le specie reattive dell'ossigeno e i loro sottoprodotti sono in grado di causare danni ossidativi che possono risultare molto tossici per la cellula (Young e Woodside, 2001).

L'endotelio vascolare che regola il passaggio di macromolecole e cellule circolanti dal sangue ai tessuti è il principale bersaglio dello stress ossidativo. Ne deriva che il danno endoteliale determinato dalle ROS gioca un ruolo critico nella patofisiologia di molti disordini e malattie vascolari (Lum e Roebuck, 1994).

Una aumentata concentrazione di metaboliti ossidati è stata riscontrata in pazienti con differenti patologie [Tabella 2.1], ed in molte di tali patologie sono state riscontrate anomalie delle difese antiossidanti naturali. In particolare, un

numero sempre crescente di evidenze indica un ruolo molto importante dei radicali liberi dell'ossigeno e delle altre specie reattive dell'ossigeno (ROS) nella patogenesi delle complicanze a medio e lungo termine della malattia renale in fase terminale, come la disfunzione endoteliale e l'aterosclerosi, e nella patogenesi e fisiopatologia di eventi cardiovascolari, come l'angina instabile, l'infarto del miocardio e la morte improvvisa (Calò, 1999).

Tabella 2.1 Patologie in cui è stata riscontrata un'aumentata attività ossidativa.

Aterosclerosi
Ipertensione arteriosa
Diabete
Danno da ischemia/riperfusione
Trapianto
Emodialisi
Artrite reumatoide
Malattie infiammatorie dell'intestino
Cancro
Fibrosi polmonare idiomatica
ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome)
Fibrosi cistica

Pertanto, l'evidenza in patologia umana, ed in particolare nella malattia renale in fase terminale ed in patologia cardiovascolare, di uno squilibrio tra stress ossidativo e difese antiossidanti, incoraggia la ricerca di possibili interventi atti a ripristinare o potenziare le difese antiossidanti.

L'organismo possiede un complesso sistema antiossidante costituito da sostanze endogene di diversa natura con le quali si difende dall'insulto dei radicali liberi ed altri ossidanti prevenendone la formazione e la propagazione, oltre ad incrementarne la rimozione (Yu, 1994). I principali antiossidanti endogeni sono la vitamina E, la vitamina C, il glutatione ridotto (GSH) [**Tabella 2.2**].

L'organismo è anche dotato di enzimi che catabolizzano i radicali liberi come la SOD e la catalasi [**Tabella 2.2**].

Tabella 2.2 Varietà di antiossidanti.

PRINCIPALI ANTIOSSIDANTI NATURALI	ANTIOSSIDANTI SINTETICI	ENZIMI ANTIOSSIDANTI	INIBITORI DELLA PRODUZIONE DI RADICALI LIBERI	ANTIIPERTENSIVI
Tocoferolo (Vitamina E) Ac. Ascorbico (Vitamina C) Glutazione Beta-Carotene	Probucol Lazaroidi	Superossido Dismutasi (SOD) Catalasi	Allopurinolo Oxopurinolo	Carvedilolo

CAPITOLO 3

LA DIALISI

La dialisi è la terapia sostitutiva della funzionalità renale e ancor oggi rimane l'unica tecnica terapeutica in grado di garantire al paziente con insufficienza renale un buon stato di salute. Questa tecnica permette di depurare il sangue dalle sostanze tossiche che si accumulano in circolo quando il rene non è più in grado di svolgere tale funzione. Sfruttando i principi fisici di diffusione e convezione il sangue viene messo a contatto con il liquido di dialisi (soluzione a composizione nota) attraverso una membrana semiimpermeabile. Per diffusione passano dal sangue al liquido di dialisi quelle sostanze tossiche che il rene non è più in grado di eliminare, allo stesso modo possono passare dal liquido di dialisi al sangue ioni come sodio, calcio, magnesio, potassio per mantenere i loro valori equilibrati nel sangue. Sfruttando il fenomeno della convezione si può creare un passaggio di fluidi (ultrafiltrazione) che permette la rimozione dei liquidi accumulati nel corpo, senza la quale il paziente andrebbe incontro a pericolosi fenomeni di scompenso cardiocircolatorio. L'ultrafiltrazione avviene in vari modi a seconda della tecnica dialitica usata.

Esistono due tecniche per praticare la dialisi: una intracorporea detta **dialisi peritoneale**, che sfrutta la capacità del peritoneo di agire come membrana dializzante naturale, l'altra extracorporea detta **emodialisi** che si divide a sua volta in tradizionale, emodiafiltrazione e emofiltrazione.

3.1 LA DIALISI PERITONEALE

La dialisi peritoneale è un trattamento depurativo intracorporeo che sfrutta la capacità del peritoneo di agire come membrana dializzante naturale. Il peritoneo è una membrana sierosa che riveste internamente ed esternamente i visceri addominali, esso è costituito da due foglietti che avvolgono la parete addominale (peritoneo parietale) e la maggior parte degli organi addominali (peritoneo viscerale). Lo spazio delimitato da questi foglietti è chiamato cavità peritoneale. Tramite un catetere si introduce nella cavità peritoneale il liquido di dialisi che ha la capacità di sottrarre le scorie contenute nel sangue (il peritoneo è ricco di arterie e capillari) e l'acqua in eccesso. Il liquido di dialisi viene lasciato in addome per il tempo necessario a consentire la depurazione, viene fatto uscire e sostituito con il

liquido nuovo. Il tempo di sosta e il numero delle sedute variano a seconda della tecnica usata.

Tipi di dialisi peritoneale:

- *Dialisi Peritoneale Intermittente (IPD)*: si effettua tre volte al settimana in un centro di dialisi;
- *Dialisi Peritoneale Ambulatoria Continua (CAPD)*: il paziente si sottopone al proprio domicilio a quattro sedute di dialisi, ogni giorno, della durata di circa trenta minuti. Negli intervalli tra gli scambi il paziente ha l'addome pieno di liquido di dialisi, ma può svolgere liberamente le proprie attività;
- *Dialisi Peritoneale Automatizzata (APD)*: un *cycler* permette di praticare gli scambi durante la notte, il paziente dorme collegato alla macchina che gestisce automaticamente la terapia programmata.

3.2 L'EMODIALISI

Nell'emodialisi il contatto tra liquido di dialisi avviene al di fuori dell'organismo e si usa una membrana artificiale, chiamata dializzatore o filtro, inserita in una particolare apparecchiatura detta unità dialitica o rene artificiale. Il sangue arterioso del paziente esce attraverso un accesso vascolare (costituito da uno shunt o da una fistola artero-venosa interna che crea un collegamento permanente tra arteria e vena) e viene fatto passare dentro le linee del circuito extracorporeo; il sangue, spinto da una pompa peristaltica arriva al filtro dializzatore, al quale arriva anche il liquido di dialisi e qui avviene la depurazione; per aumentare l'ultrafiltrazione e quindi la rimozione dell'acqua è possibile aumentare la velocità a livello delle linee dove passa il sangue. Dopo la depurazione il sangue rientra nel paziente attraverso la parte venosa dell'accesso vascolare [**Figura 3.1**]. Una seduta di dialisi dura circa 4 ore e viene ripetuta tre volte la settimana presso il Centro di Dialisi.

L'incoagulabilità del sangue nel circuito extracorporeo in generale e nel filtro dializzatore in particolare, è assicurata dal lavaggio di queste strutture, nella fase di preparazione del circuito, con una soluzione eparinata e dalla somministrazione di eparina durante la seduta emodialitica.

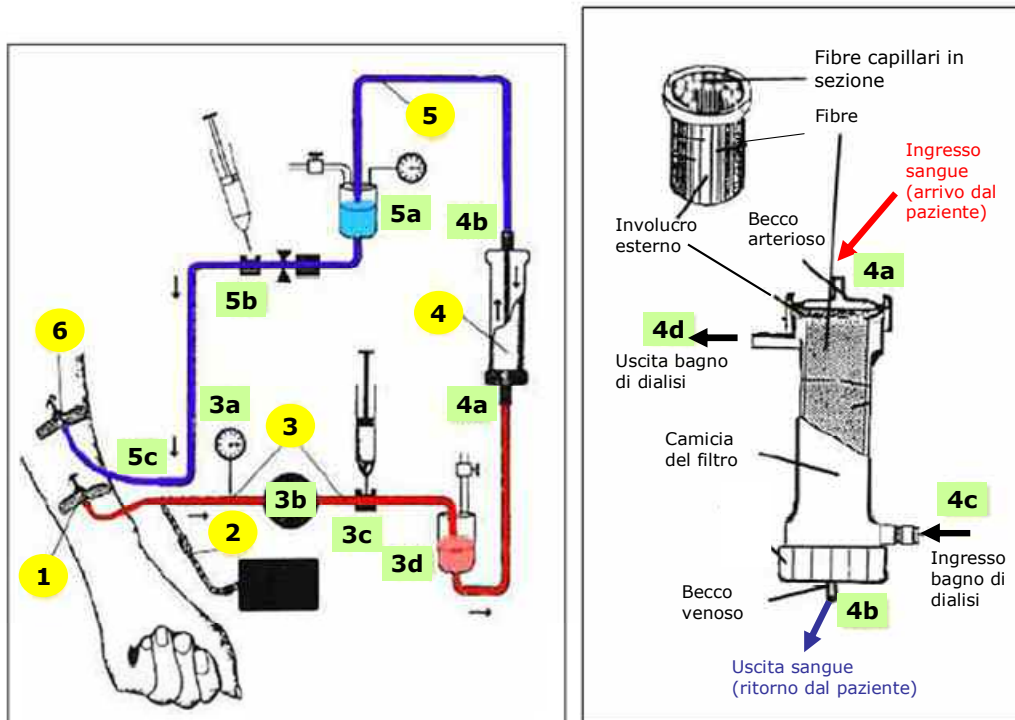


Figura 3.1 Il circuito ematico extracorporeo è costituito da una serie di tubi di piccolo calibro, di materiale plastico, articolati in due segmenti principali: la linea arteriosa e la linea venosa. Il sangue proveniente dal paziente arriva al filtro dializzatore per mezzo della linea arteriosa; dopo aver attraversato il filtro, ritorna depurato al paziente lungo la linea venosa. Ciò accade centinaia di volte nel corso di ogni singola seduta dialitica. Il processo può essere così semplificato:

1. AGO ARTERIOSO: con esso si preleva il sangue dal paziente;
2. LINEA FISIOLÓGICA: deflussore in materiale plastico con adattatore interposto tra ago arterioso e linea arteriosa. Esso permette di infondere la fisiologica durante la preparazione del circuito extracorporeo, durante la reinfusione ed in caso di necessità durante la dialisi;
3. LINEA ARTERIOSA: è composta da: 3a. un polmoncino di rilevazione della pressione arteriosa. Esso è rappresentato da un cuscinetto in plastica morbida in grado di collabire qualora venga a diminuire il flusso ematico rispetto a quanto richiesto dalla pompa peristaltica; 3b. tratto pompa di linea arteriosa (a volte di materiale differente rispetto al resto della linea arteriosa). Viene inserito nella pompa peristaltica che determina il movimento del sangue al flusso desiderato all'interno del circuito extracorporeo; 3c. polmoncino in caucciù: perforabile con ago per eventuali prelievi; 3d. camera di espansione ("gocciolatore arterioso"): trattiene le eventuali bolle d'aria presenti nel circuito e regolarizza il flusso ematico a livello del filtro. La linea arteriosa nel suo insieme rappresenta un settore assai delicato dell'intero circuito extracorporeo; la massima attenzione può evitare numerosi incidenti dialitici, potenzialmente pericolosi, quali ad esempio l'embolia gassosa.
4. FILTRO DIALIZZANTE: costituisce l'unità funzionale del rene artificiale. Il filtro dializzante è interposto tra linea arteriosa e linea venosa. Nel filtro avviene la vera e propria dialisi, ovvero lo scambio tra sangue e bagno di dialisi di tutte le sostanze diffusibili attraverso una membrana semipermeabile. Esistono tre tipi di filtro (a rotolo, a piastra, a capillare). In un filtro si distinguono: 4a. connessione tra linea arteriosa e tratto arterioso del filtro. 4b. connessione tra tratto venoso del filtro e linea venosa di rientro del sangue. 4c. ingresso bagno di dialisi. 4d. uscita bagno di dialisi. Le membrane dializzanti possono essere costituite da materiali diversi che ne conferiscono differenti caratteristiche depurative e di biocompatibilità, derivanti dalla cellulosa, cellulosa modificata o membrane di derivazione sintetica.
5. LINEA VENOSA: collega il filtro all'ago venoso, attraverso il quale il sangue dializzato torna al paziente. La linea venosa è composta da: 5a. un gocciolatore venoso le cui funzioni sono quelle di visualizzare il flusso ematico, arrestare eventuali bolle d'aria, arrestare eventuali coaguli ematici tramite un filtro a rete interno, costituire una via di accesso per la somministrazione di farmaci, permettere la rilevazione della pressione interna al circuito extracorporeo (chiamata pressione venosa) tramite collegamento ad un manometro; 5b. polmoncino in caucciù, perforabile con ago per eventuali prelievi o somministrazioni di farmaci; 5c. connessione tra linea venosa ed ago venoso.
6. AGO VENOSO: attraverso quest'ago il sangue ritorna al paziente.

La sterilità del filtro dializzatore e di tutto il circuito extracorporeo è ottenuta mediante sterilizzazione con ossido di etilene, raggi gamma e a vapore. I prodotti che compongono il sistema sono monouso per garantire la sicurezza del paziente.

Il sistema emodialisi è costituito fondamentalmente da 2 parti: il dializzatore, che contiene una membrana semipermeabile (filtro) ed il monitor formato dalle pompe di supporto e di adatti dispositivi di controllo. L'efficienza dell'emodialisi dipende sia dal dializzatore (superficie, tipo di membrana, geometria del filtro) sia dalla tecnica di dialisi (diffusiva, diffusiva-convettiva, sola emofiltrazione, intermittente o continua, ecc). Di non secondaria importanza la biocompatibilità del sistema che si correla particolarmente al tipo di membrana oltre che alla qualità del dializzato o della soluzione di infusione.

3.2.1 I filtri dializzanti e le membrane

Il filtro dializzante costituisce l'unità funzionale del rene artificiale, può essere assorbente (cioè a carboni attivi capaci di trattenere sostanze non ionizzate a basso peso molecolare) o per la microfiltrazione (capaci di eliminare particelle insolubili di diametro superiore ai 5 µm). Il filtro dializzante è interposto tra linea arteriosa e linea venosa. Nel filtro avviene la vera e propria dialisi, ovvero lo scambio tra sangue e bagno di dialisi di tutte le sostanze diffusibili attraverso una membrana semipermeabile. Le membrane dializzanti possono essere costituite da materiali diversi che ne conferiscono differenti caratteristiche depurative e di biocompatibilità, derivanti dalla cellulosa e dalla cellulosa modificata (come cuprophan, hemophan, acetato-diacetato-triacetato di cellulosa, Excebrane) o membrane di derivazione sintetica (come poliacrilonitrile (PAN), polisulfone (PN), polimetilmetacrilato (PMMA), etilen-vinil-alcool (EVAL)). La scelta del filtro e delle membrane è in funzione del soggetto e delle sue patologie.

3.2.2 Il liquido di dialisi

Il liquido di dialisi è una soluzione costituita essenzialmente da acqua (demineralizzata chimicamente attraverso scambio ionico), sali minerali (sodio, potassio, calcio, magnesio, cloruro, acetato e glucosio), sostanze osmoticamente attive e sostanze tampone (acetato o bicarbonato).

3.2.3 Il monitor

Nel rene artificiale è presente anche una specifica apparecchiatura che svolge due compiti: la preparazione del liquido di dialisi e il controllo di alcuni parametri essenziali per la conduzione della seduta dialitica in condizioni di efficacia e sicurezza per il paziente. Infatti sensori dislocati lungo il flusso extracorporeo rivelano costantemente le temperature del paziente, del sangue e del liquido di dialisi, i flussi, l'ultrafiltrazione, la conducibilità, il pH, la composizione del liquido di

dialisi e se si presentano perdite ematiche attraverso le membrane. Esistono inoltre sensori paziente-specifici che misurano in continuo alcune variabili biologiche ed emodinamiche come la temperatura corporea, il volume ematico, le variazioni di urea, la pressione arteriosa permettendo un accurato monitoraggio intradialitico.

3.3 TECNICHE EMODIALITICHE

Esistono diversi tipi di trattamento emodialitico che corrispondono a diverse esigenze terapeutiche e possono essere ricondotte a due tipi:

- 1) i trattamenti essenzialmente diffusivi,
- 2) le tecniche miste convettivo-diffusive.

3.3.1 Tecniche diffusive

Emodialisi standard o tradizionale

L'acetato-dialisi è stata sostituita dalla classica *bicarbonato-dialisi* in quanto la prima comportava notevoli problemi di instabilità cardiovascolare dovuti all'effetto inotropo negativo del tampone acetato a livello cardiaco. Si sfrutta solo il meccanismo diffusivo con membrane solitamente a basso *cut-off* (depurano meglio solo molecole a basso peso molecolare).

Emodialisi High Flux

Anche in questo caso viene sfruttato solo il meccanismo diffusivo ma si utilizzano filtri a permeabilità superiore che consentono l'eliminazione di sostanze a peso molecolare più elevato.

3.3.2 Tecniche convettive

Emofiltrazione

Tecnica che sfrutta la capacità convettiva di un filtro ad elevata permeabilità in grado di rimuovere notevoli quantità di liquido e, di conseguenza, di soluti.

3.3.3 Tecniche "miste" convettivo-diffusive

Attualmente sono le tecniche sempre più in uso perché ad alta efficienza, sfruttano contemporaneamente il meccanismo diffusivo e quello convettivo garantendo la rimozione ottimale di molecole piccole e medie. Necessitano l'infusione di liquido sterile ed apirogeno che può essere di preparazione industriale, o preparato istantaneamente dall'apparecchiatura di dialisi stessa (*On-Line*) per evitare problemi di stoccaggio e contaminazioni batteriche.

Emodiafiltrazione e Emodiafiltrazione *On-Line*

Sono le metodiche più diffuse e di prima scelta nei pazienti con problemi di instabilità cardiovascolare intradilattica. L'emiafiltrazione on-line permette una dialisi con ultrafiltrato sterile ed ultrapuro.

AFB – Acetate Free Biofiltration

Metodica mista in cui l'infusione è costituita da liquido che contiene bicarbonato mentre il concentrato è privo di acetato.

PFD – Paired Filtration Dialysis

Separa le fasi di convezione e di diffusione grazie ad un filtro bi-compartimentale; può essere eseguita in modalità *On-Line*. (La Dialisi – Centro studi Assobiomedica, 2003).

HFR - Haemo diaFiltration with Reinfusion

Tra le tecniche convettivo-diffusive di emodiafiltrazione on-line particolare attenzione merita l'HFR ovvero l'emiafiltrazione con rigenerazione *on-line* dell'ultrafiltrato (Haemo diaFiltration with Reinfusion). Questa tecnica dialitica utilizza la reinfusione di un fluido endogeno e attua, contemporaneamente e separatamente, tre meccanismi di depurazione extracorporea: diffusione, convezione, assorbimento.

Nel 1992 il gruppo di Ghezzi (Ghezzi et al., 1992) sviluppò un sistema per la rigenerazione dell'ultrafiltrato nel circuito chiuso con una cartuccia contenente carbone non rivestito inserito nel circuito dell'ultrafiltrazione. Il metodo è stato successivamente perfezionato con lo sviluppo di un filtro formato da due camere: la prima con il settore convettivo seguita da quello diffusivo. Il liquido di reinfusione è liquido endogeno che passa attraverso una cartuccia rigenerante, composta in sequenza da una resina, capace di interazioni idrofobiche, e carbone minerale non rivestito [**Figura 3.2**].

La resina assorbe la β_2 -microglobulina, l'omocisteina, peptidi vasodilatatori e solo parzialmente aminoacidi, mentre il carbone assorbe creatinina, acido urico, tossine uremiche a basso peso molecolare, calcio (solo nei primi 15 minuti di trattamento), e glucosio (nei primi 60-90 minuti). L'urea, gli ioni sodio e potassio, i fosfati e i bicarbonati non sono assorbiti e rimangono presenti nell'ultrafiltrato dopo il passaggio nella cartuccia, ma la reinfusione della soluzione così ottenuta nel circuito sanguigno a valle del primo settore e a monte del secondo, permette la loro rimozione o il loro riequilibrio per diffusione ottenendo così un miglior controllo

dell'acidosi metabolica (Ghezzi et al., 1991 e 1992; La Greca et al., 1998; Sidoti et al., 2004). L'ultrafiltrato così rigenerato nel circuito chiuso costituisce una soluzione di reinfusione "endogena", sterile e ultrapura, contenete bicarbonato e amminoacidi (Fasianos et al., 2003).



Figura 3.2 Metodica dell'HFR-Emodiafiltrazione con Reinfusione Endogena.

L'HFR *on-line*, inoltre, combina il possibile vantaggio che deriva dall'utilizzo dell'ultrafiltrato rigenerato come fluido di reinfusione endogeno con l'uso di una doppia camera di emodiafiltrazione, che riduce lo stress ossidativo e l'infiammazione cronica in assenza di filtrazione di ritorno e riduce la perdita di amminoacidi permettendo così il mantenimento di un migliore stato nutrizionale del paziente e prevenendone il suo deterioramento (Meloni et al., 2004).

La riduzione dello stress ossidativo e dello stato di infiammazione cronica nel caso dei pazienti in trattamento dialitico con HFR è molto importante dal momento che molti pazienti in emodialisi presentano uno stato cronico di infiammazione definita da un aumento dei markers biochimici della risposta infiammatoria di fase acuta, come la proteina C reattiva (PCR) e l'amiloide A sierica. L'uremia è da considerarsi tra i fattori favorenti il processo infiammatorio così come la dialisi stessa contribuisce in larga misura a perpetuare questo fenomeno.

Durante l'HFR si è osservato una significativa diminuzione dei livelli plasmatici sia di IL-6 che di TNF- α ; questo dato avvalorava l'ipotesi che questa tecnica emodialitica abbia una buona emobiocompatibilità. L'emobiocompatibilità dell'HFR può essere dovuta sia alla purezza della soluzione rinfusa ottenuta per "rigenerazione" dell'ultrafiltrato, che alla minimizzazione della retrofiltrazione. L'importanza della qualità e della purezza della soluzione dializzata e della sostituzione dei liquidi è stata ben dimostrata nei confronti dello stato infiammatorio in generale e in particolare nei livelli plasmatici di TNF- α e IL-6 dei pazienti in emodialisi (Memoli, 1999; Hörl, 2002).

Studi condotti da De Francisco e collaboratori (De Francisco et al., 2000) hanno dimostrato che il trattamento dialitico con HFR riduce la risposta infiammatoria diminuendo la produzione di citochine proinfiammatorie. In particolare l'HFR, come le altre tecniche di emodiafiltrazione, è molto efficiente nella rimozione non solo di soluti con alto peso molecolare come la β_2 -microglobulina che viene rimossa nella fase convettiva ma anche di tossine uremiche a basso e medio peso molecolare (Emiliani et al., 2004). L'omocisteina viene rimossa non solo attraverso una possibile riduzione delle tossine uremiche, ma anche attraverso l'assorbimento sulla cartuccia di carbone e resina (De Angelis et al., 2004).

Inoltre Aucella et al. (2004) hanno confermato questo dato dimostrando che l'attivazione dei leucociti nei soggetti in trattamento con emodialisi classica era simile a quella dei soggetti in HFR, mentre il trattamento con HFR è capace di diminuire il rilascio di IL-6. Numerosi studi confermano il fatto che l'HFR ha una buona biocompatibilità e riduce l'attività proinfiammatoria indotta dall'emodialisi.

È stato dimostrato che tale metodica è sicura, semplice e ben tollerata, e se eseguita in tecnica di post-diluizione, cioè con reinfusione dell'ultrafiltrato sterile direttamente al paziente nella linea venosa, permette di ottenere:

1. valori di depurazione ottimali, paragonabili alle altre tecniche ad alta efficienza;
2. una ottimale depurazione sia delle medio molecole, come la β_2 -microglobulina, sia delle citochine, come il TNF- α e l'IL-6.

È da sottolineare inoltre che, come altre tecniche di emodiafiltrazione, anche l'HFR può migliorare la correzione dell'anemia aumentando la rimozione delle tossine uremiche (Righetti et al., 2004). Infatti per mantenere valori standard di emoglobina, questi pazienti necessitano di dosi di eritropoietina significativamente inferiori rispetto ai pazienti sia in trattamento con la bicarbonato dialisi (Cristofano et al., 2004; Righetti et al., 2004) sia con la PFD (Schelotto et al., 2004). Dato poi il riconosciuto ruolo patogenetico dello stress ossidativo nella genesi dell'anemia del

paziente in insufficienza renale terminale, è verosimile che l'effetto positivo dell'HFR sul miglioramento dell'anemia possa avvenire anche attraverso una riduzione dello stress ossidativo stesso da parte di HFR.

3.4 LO STRESS OSSIDATIVO IN DIALISI E L'APPROCCIO ANTIOSSIDANTE

E' ormai noto che i pazienti affetti da malattia renale posseggono tutta una serie di fattori di rischio per malattia cardiovascolare che è assolutamente spropositata rispetto alla popolazione generale (Zoccali, 2000; Galli, 2007). Infatti la morbilità e la mortalità cardiovascolare dei pazienti con malattia renale, sia dei pazienti con insufficienza renale cronica che di quelli in trattamento sostitutivo dialitico che dei trapiantati, è estremamente elevata (Luke, 1998; Locatelli et al., 2000).

Questa elevata mortalità non può essere giustificata solo dalla presenza dei classici fattori di rischio cardiovascolare come per esempio l'ipertensione arteriosa, il diabete, la dislipidemia e l'ipertrofia ventricolare sinistra. A questi si aggiungono infatti fattori di rischio emergenti o associati allo stato uremico come l'espansione cronica di volume, l'anemia, i disturbi del metabolismo calcio-fosforo, l'iperomocisteinemia e lo stress ossidativo (Locatelli et al., 2003; Morena et al., 2005). L'associarsi di tutti questi fattori di rischio nella malattia renale aggrava il danno renale e chiude un circolo vizioso che porta all'aterogenesi accelerata che è poi una complicanza frequente e temibile per i pazienti con malattia renale (Anavekar et al., 2004).

Allo stress ossidativo come importante fattore di rischio cardiovascolare nei pazienti con malattia renale è stato dato di recente una notevole enfasi (Locatelli et al., 2003; Galli, 2007). I meccanismi cellulari del *signaling* dello stress ossidativo sono complessi e non completamente noti. Un aspetto sicuramente stabilito è il ruolo svolto dall'apoptosi nell'indurre danni mediati dallo stress ossidativo a livello del miocardico (Olivetti et al., 1997; Galli, 2007).

Le potenziali cause dello stress ossidativo nei pazienti in dialisi sono di seguito elencate.

Fattori associati a uremia

1. Attivazione dei leucociti a produrre ROS.
2. Disequilibrio nei meccanismi di difesa antiossidanti:
 - disturbo del complesso GSH/GPx selenio,
 - attività della SOD danneggiata,
 - basso contenuto di Vitamina E negli eritrociti e cellule mononucleate,

modifiche nel sistema dell'NO,
aumento dell'attività proossidante.

Fattori correlati a dialisi

1. Tipo di membrana, lipopolisaccaride, citochine.
2. Sovraproduzione di ROS da parte dei leucociti.
3. Alta permeabilità delle membrane:
disequilibrio nei meccanismi di difesa antiossidanti;
perdita di antiossidanti (vitamina C) e nutrienti.

L'emodialisi (HD) è un processo non selettivo che rimuove esclusivamente i soluti in base al loro peso molecolare, basandosi sulla proprietà delle membrane e sul legame delle proteine. Di conseguenza, certe tecniche di emodialisi che utilizzano membrana ad alta permeabilità inducono perdita di soluti includendo sia prodotti di scarto che sostanze essenziali come gli antiossidanti, e in particolare le sostanze a basso peso molecolare come le vitamine. In questi pazienti, infatti, sono state osservate varie deficienze a livello delle difese antiossidanti come per esempio ridotti livelli di vitamina C (sia per riduzione dell'apporto di frutta fresca con la dieta per evitare l'iperpotassiemia che per perdita di vitamine con la dialisi), ridotti livelli intracellulari di vitamina E, ridotte concentrazioni di selenio e ridotti livelli di GSH (Zoccali, 2000; Descamps-Latscha et al., 2001). Inoltre Chen et al (1998) hanno dimostrato che il livello basale nel sangue di anione superossido è maggiore nei pazienti cronici in HD rispetto ai soggetti sani e che tale livello è aumentato ancor di più dopo una sessione emodialitica. Anche alti livelli plasmatici di omocisteina, che si accumula nella fase iniziale della malattia renale cronica (CKD) contribuisce allo stato proossidante di questi pazienti.

L'emoincompatibilità del sistema dialitico gioca un ruolo determinante nella produzione delle ROS. Infatti è stato studiato il contributo delle membrane dialitiche alla produzione dei radicali liberi dell'ossigeno in condizioni acute di HD confrontando membrane cellulosiche (cuprophane) e sintetiche (polisulfone). Esistono anche evidenze indirette che dimostrano che tracce di endotossine (LPS) nel dializzato aumentano la produzione di ROS via attivazione dei leucociti (Descamps-Latscha et al., 2001). Numerosi studi riportano che i prodotti della perossidazione lipidica come malondialdeide (MDA), 4-idrossinonenale, F₂-isoprostani, le ultime specie enzimaticamente prodotte dalla perossidazione dei lipidi derivati dall'acido arachidonico catalizzata dai radicali liberi, sono presenti in quantità elevate nei pazienti in HD (Handelman et al., 2001) ed è stato dimostrato che esiste una correlazione tra i livelli di MDA, come marker di stress ossidativo, e lo sviluppo dell'aterosclerosi nei pazienti in emodialisi (Boaz et al., 1999).

Le ROS sono rilasciate assieme alle citochine proinfiammatorie, che di conseguenza amplificano la produzione di ossidanti. Inoltre molti pazienti in ESRD e in HD presentano uno stato cronico di infiammazione definita da un aumento dei markers biochimici della risposta di fase acuta, come la proteina C reattiva (PCR) e l'amiloide A sierica. L'uremia è incriminata nel processo infiammatorio, e la dialisi contribuisce in larga misura a perpetuare questo fenomeno. Infatti, l'HD può indurre stimolazione cronica dei monociti-macrofagi esponendo queste cellule a sistemi generalmente bioincompatibili soprattutto attraverso l'interazione con le membrane da dialisi (Memoli, 1999) e nell'infiltrazione di endotossine da dializzato contaminato [Figura 3.3](Canard, 2000).

L'interazione del sangue con le membrane cellulose attiva la via alternativa del complemento con produzione di anafilatossine C5a e C3a. L'attivazione diretta dei monociti può anche essere dovuta alla loro adesione sulle membrane da dialisi, in particolare a quelle sintetiche. Le endotossine contaminanti nel dializzato giocano un importante ruolo nel rilascio di citochine durante l'emodialisi, infatti la presenza di lipopolisaccaride (LPS) e/o di endotossine nel dializzato possono attivare i monociti/macrofagi del sangue attraverso la membrana di dialisi contribuendo all'induzione delle citochine proinfiammatorie IL-1, IL-6 e TNF- α con effetti deleteri sul sistema cardiovascolare (Lonnemann, 2000) e in particolare sull'induzione dell'ipertrofia cardiaca [Figura 3.3] (Zoccali et al., 2004).

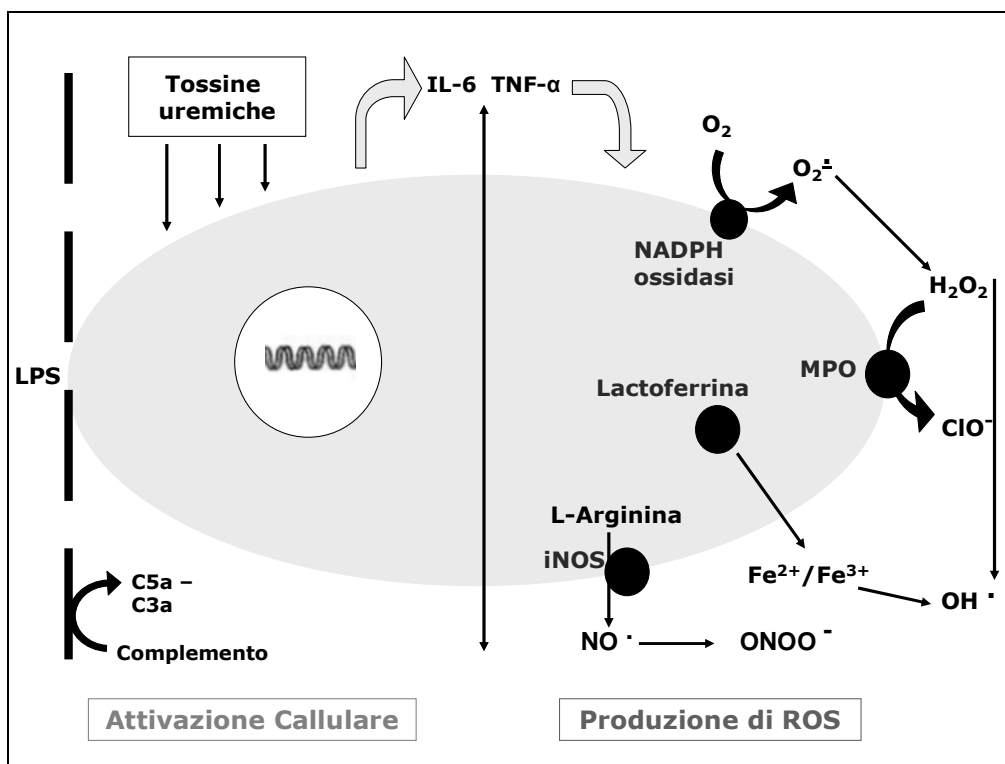


Figura 3.3 Attivazione cellulare e sovrapproduzione di ROS durante ESRD.

Dato che i pazienti in HD sono caratterizzati da un aumento di stress ossidativo che risulta essere concausa di complicanze in particolar modo a livello cardiovascolare, sono stati proposti differenti approcci per tentare di ridurre la produzione di ROS. Uno di questi approcci è il trattamento con antiossidanti, infatti, il trattamento con vitamina E per via orale in pazienti con insufficienza renale cronica ha corretto l'anemia e ridotto la suscettibilità all'ossidazione delle LDL (Cristol et al. , 1997; Islam et al., 2000). Lo studio SPACE ha dimostrato che la supplementazione di vitamina E era in grado di fornire beneficio a pazienti dializzati con preesistente malattia cardiovascolare (Boaz et al., 2000). Si è visto inoltre che altre sostanze somministrate per via endovenosa (per esempio il selenio) sono clinicamente efficaci e ben tollerate, tanto che i livelli plasmatici di selenio, come anche l'attività della glutatione perossidasi risultano significativamente aumentate in questi pazienti (Temple et al., 2000). Recentemente è stato dimostrato, inoltre, che anche le statine, farmaci utilizzati in gran misura per la prevenzione e la cura delle malattie cardiovascolari, posseggono proprietà antiossidanti dal momento che sono capaci di ridurre la produzione di O_2^{\bullet} .

Nel tentativo di migliorare la prognosi di questi pazienti in HD sono state introdotte nuove tecniche di dialisi con l'obiettivo di ridurre lo stress ossidativo come i dializzatori con vitamina E adesa alla membrana (Galli et al., 1998 e 2007). Uno studio del nostro gruppo ha dimostrato che il trattamento dialitico con dializzatori con vitamina E adesa alla membrana era in grado di modificare l'espressione genica di importanti proteine correlate allo stress ossidativo ed in particolare di ridurre l'espressione genica di $p22^{phox}$ (subunità della NADH/NAD(P)H ossidasi, essenziale per la produzione di superossido) e di aumentare l'espressione genica di eme-ossigenasi-1 (HO-1) (protettiva nei riguardi dello stress ossidativo) oltre a ridurre la concentrazione di lipoperossidi ed incrementare il potere antiossidante totale del plasma (Calò et al., 2004).

CAPITOLO 4

SCOPO DEL LAVORO

Sempre maggiori evidenze indicano un ruolo importante delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), dello stress ossidativo e delle molecole correlate all'infiammazione come importante fattore di rischio cardiovascolare nei pazienti con malattia renale (Locatelli et al., 2003). Lo stress ossidativo è presente nei pazienti con malattia renale e nei pazienti in fase avanzata di danno renale (ESRD), è determinato da uno sbilanciamento tra capacità pro-ossidante ed anti-ossidante ed è associato alle complicanze della malattia renale prima fra tutti l'aterosclerosi (Descamps-Latscha et al., 2001).

La dimostrazione che alcune tecniche dialitiche agiscono a livello di questo squilibrio spostandolo a favore dell'attività antiossidante, ha determinato sempre un maggiore interesse nei confronti dell'azione antiossidante di alcuni filtri di dialisi.

In precedenza, nel laboratorio dove ho svolto le ricerche durante il Dottorato, si è evidenziato che il trattamento dialitico con dializzatori con vitamina E adesa alla membrana (Excebrane CL-E), è in grado di modificare l'espressione genica di importanti proteine correlate allo stress ossidativo ed in particolare di ridurre l'espressione genica di p22^{phox} e di aumentare l'espressione genica di eme ossigenasi-1 (HO-1), oltre a ridurre la concentrazione di lipoperossidi ed incrementare il potere antiossidante totale del plasma (Calò et al., 2004).

D'altro canto altri studi hanno dimostrato anche che la tecnica di emodiafiltrazione con reinfusione endogena (HFR) riduce l'infiammazione cronica perché non presenta filtrazione di ritorno. In particolare, durante la dialisi HFR vengono ridotti i livelli plasmatici di TNF- α e IL-6, mediatori delle complicanze a lungo termine, e in particolare delle malattie cardiovascolari, dei pazienti in emodialisi. (De Francisco et al., 2000; Aucella et al., 2004; Meloni et al., 2004).

Lo scopo dello studio intrapreso durante il Dottorato è stato quello di valutare un possibile effetto diretto dell'emodiafiltrazione con rigenerazione *on-line* dell'ultrafiltrato (HFR) verso alcuni markers di stress ossidativo coinvolti nell'aterosclerosi e nelle sue complicanze, utilizzando un approccio biologico molecolare. In particolare è stato valutato *ex vivo*, su cellule mononucleate del sangue di pazienti in trattamento dialitico con HFR lo stato di proteine correlate allo stress ossidativo, quali:

1) $p22^{phox}$, subunità del citocromo b_{558} incluso nella NADH/NADPH ossidasi, presente nei leucociti e nelle pareti vascolari. Questo enzima funziona da subunità integrale nel trasporto finale di elettroni dalla NAD(P)H all'eme ed è critica per la produzione di anione superossido (Babior, 1999).

2) *PAI-1*, Inibitore 1 dell'Attivatore del Plasminogeno, proteina regolatrice della fibrinolisi che agisce inibendo l'attività degli attivatori del plasminogeno, specifiche serine proteasi che contribuiscono con la trombina alla formazione di plasmina a partire dal suo precursore inattivo plasminogeno. PAI-1 è espresso nei monociti del sangue periferico e nei macrofagi della placca aterosclerotica (Dimova et al., 2004).

3) *Eme ossigenasi 1*, *HO-1*, isoforma inducibile del sistema dell'eme ossigenasi. Questa proteina catalizza la reazione iniziale del catabolismo dell'eme mediante la rottura del ponte α -metenico della molecola dell'eme per dare quantità equimolari di biliverdina, monossido di carbonio (CO) e ferro. La biliverdina viene successivamente convertita in bilirubina per azione della biliverdina reduttasi (Choi e Alam, 1996). Questo enzima viene indotto da tutta una serie di fattori ossidanti (metalli pesanti, endotossine, sodio arsenito, H_2O_2 , ipertermia e ipossia...) ed è capace di esplicare azione antiossidante (Applegate et al., 1991).

Inoltre sono stati valutati markers plasmatici di stress ossidativo come le LDL (lipoproteine a bassa densità) ossidate (oxLDL) cruciali nello sviluppo della reazione infiammatoria cronica dell'intima in quanto restano intrappolate nella matrice extracellulare dello spazio subendoteliale dando il via al processo aterosclerotico (Meisinger et al., 2005; Galle et al., 2006).

CAPITOLO 5

PAZIENTI E METODI

5.1 PAZIENTI

18 pazienti, 10 maschi e 8 femmine, uremici cronici in trattamento emodialitico seguiti presso la Divisione di Nefrologia II del Policlinico Universitario di Padova, età compresa tra i 19 e i 60 anni, sottoposti a bicarbonato-dilialisi cronica (210-240 minuti, 3 volte alla settimana) da almeno un anno (range 1-6 anni) sono stati reclutati e randomizzati in uno studio *cross-over* di un anno. Un gruppo di pazienti è stato inizialmente trattato per 6 mesi con HFR (SG8 Plus-Bellco, Mirandola Italia) seguiti poi da altri 6 mesi di *low-flux* bicarbonato dialisi (BD) con un dializzatore polisulfone 1.8 m², l'altro gruppo è stato inizialmente trattato per 6 mesi con *low-flux* bicarbonato dialisi (BD) con un dializzatore polisulfone 1.8 m² seguiti da 6 mesi di trattamento usando HFR.

L'eziologia di ESRD dei pazienti era la seguente: glomerulonefrite (10 pazienti), malattia di Alport (1 paziente), nefroangiosclerosi (3 pazienti), non diagnosticata (4 pazienti). I pazienti sono stati scelti sulla base dei seguenti criteri: relativa giovane età, non fumatori, mancanza di altre malattie come diabete, malattia ostruttiva polmonare cronica, infarto cardiaco, cancro e con fistola artero-venosa o accessi vascolari e assenza di ricoveri ospedalieri negli ultimi 6 mesi.

Per minimizzare la possibilità, anche se non è stata provata, che una differenza quantitativa di espressione genica tra i sottotipi di cellule mononucleate potesse influenzare l'espressione genica delle proteine correlate allo stress ossidativo considerate nel nostro studio, per esempio attraverso la fluttuazione del numero dei diversi sottotipi di cellule mononucleate, abbiamo controllato nei pazienti l'assenza di variazioni di *markers* biochimici di infiammazione come PCR, α 2 globuline, conta dei monociti e dei linfociti, e anche l'assenza di evidenze cliniche di infezioni o malattie infiammatorie all'inizio dello studio, al *cross over* e alla fine dello studio.

La pressione arteriosa dei pazienti era compresa tra 135/85 e 150/90 mmHg, sono stati inclusi i trattamenti antiipertensivi con calcio antagonisti, ACE inibitori e α -antagonisti. Tutti i pazienti erano in trattamento con eritropoietina alla dose media di 8000 U/settimana all'inizio dello studio (*range* 4000-16000U). Durante lo studio la dose di eritropoietina è stata modificata in base al livello di

emoglobina. Non abbiamo riscontrato variazioni significative nella somministrazione di EPO tra *low-flux* HD e HFR. Il livello di emoglobina era tra 11 e 13 mg/dl. Per gli stessi pazienti erano presenti anche regimi terapeutici contenenti vitamina D, agenti leganti i fosfati e supplementi di calcio. Nessuno dei pazienti era sottoposto a trattamento antilipidemico. Tutti i pazienti sono stati trattati con supplementi di acido folico (10 mg) dopo le sessioni di dialisi senza variazioni durante tutto lo studio.

Per tutti i pazienti il rapporto KT/V era compreso tra 1.3-1.7.

5.2 METODI

5.2.1 Separazione dei linfociti e monociti

Dopo separazione del plasma da 30 ml di sangue intero anticoagulato con EDTA, ottenuta per centrifugazione a 200xg per 10 minuti a 20°C, la separazione dei linfo-monociti è stata effettuata in gradiente utilizzando Ficoll-Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotech, Svezia). Sopra una soluzione di opportuna densità e forza osmotica formata da Ficoll, agente polimerico aggregante gli eritrociti, e diatrizzato sodico, è stato stratificato il sangue intero anticoagulato con EDTA. Il sistema a due fasi è stato quindi centrifugato a 400xg per 30 minuti a 20°C. Alla popolazione linfo-monocitaria recuperata è stata aggiunta una soluzione isotonica per effettuare i lavaggi. La sospensione è stata centrifugata a 100 g per 10 minuti a 20°C. Quest'ultima operazione è stata ripetuta due volte prima di essere lisata per l'ottenimento della frazione proteica e l'estrazione dell'RNA totale.

5.2.2 Estrazione dell'RNA

L'estrazione dell'RNA mediante RNABle (miscela di isotiocianato, 2-mercaptoetanolo e fenolo) (Eurobio, Francia) prevede quattro fasi: 1. Fase di omogenizzazione: ai linfo-monociti isolati dal sangue intero anticoagulato con EDTA sono stati rispettivamente addizionati 200 µl di RNABle (miscela di isotiocianato, 2-mercaptoetanolo e fenolo, Eurobio) per milione di cellule. Le cellule sono state contate, dopo trattamento con il colorante vitale eosina, in camera di Bürker. 2. Fase di estrazione: alla miscela contenente RNABle è stato addizionato cloroformio (Merk, Germania) in un volume pari a 1/10 del volume di RNABle. Sono effettuati 3 cicli di vortex e riposo in ghiaccio, ciascuno di 20 secondi, successivamente i campioni sono stati lasciati a 4°C per 5 minuti e quindi centrifugati a 12000xg per 15 minuti a 4°C. 3. Fase di precipitazione: la fase acquosa superiore, contenente l'RNA, è stata recuperata ed è stato addizionato un ugual volume di isopropanolo (Carlo Erba, Italia). Dopo tre cicli di 20 secondi di vortex e riposo in ghiaccio, i

campioni sono stati lasciati per almeno 12 ore a -20°C . Il fondello di RNA totale è stato raccolto tramite centrifugazione a $12000\times g$ per 15 minuti a 4°C . 4. Fase di lavaggio: dopo rimozione del surnatante, il fondello di RNA è stato lavato due volte con 1ml di etanolo (Zonin, Italia) al 70% in acqua DEPC, cioè RNasi free, centrifugato a $12000\times g$ per 15 minuti a 4°C .

5.2.3 Quantificazione ed integrità di RNA

Il fondello di RNA è stato solubilizzato in acqua DEPC e quantificato spettrofotometricamente mediante lettura a lunghezza d'onda di 260 nm.

La concentrazione di RNA è stata estrapolata dall'equazione di Lambert-Beer:

$$A = C/\varepsilon \cdot l$$

dove A= assorbanza a 260 nm; ε = coefficiente di estinzione molare; l= cammino ottico.

Da cui: $C = A \cdot \varepsilon \cdot l$, opportunamente moltiplicata per un fattore di diluizione (pari a 60).

Per garantire la bontà dell'estrazione, il rapporto tra A_{260}/A_{280} deve essere compreso tra 1.8 e 2.0. L'integrità dell'RNA è stata valutata mediante elettroforesi in gel di agarosio (BDH, England) all'1,4%, con il colorante etidio bromuro.

5.2.4 Retrotrascrizione ed amplificazione mediante RT-PCR

La valutazione dell'espressione genica di p22^{phox}, di PAI-1 e di HO-1 è stata effettuata mediante analisi semiquantitativa dei prodotti di RT-PCR.

Retrotrascrizione: 1 μg di RNA totale del campione in esame è stato retrotrascritto utilizzando Random Hexamers come primers e MuLV Reverse Transcriptase come trascrittasi inversa secondo il protocollo della ditta produttrice del Kit GeneAmp Core Kit (Applied Biosystems, Roche, New Jersey USA). Come termociclatore è stato utilizzato il GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems).

La miscela di retrotrascrizione per 1 μg di RNA è così composta: MgCl_2 5mM, Buffer II (500mM KCl, 100mM Tris-HCl, pH 8.3) 1X, dNTPs 1mM, Random Hexamers 2,5 μM , MuLV Reverse Transcriptase 1U, RNase Inhibitor 1U, H_2O DEPC q.b. a 20 μl .

Le condizioni di retrotrascrizione utilizzate sono: 10 minuti a 25°C per l'estensione dei Random Hexamers; 15 minuti a 42°C per la retrotrascrizione; 5 minuti a 99°C per la denaturazione della trascrittasi; 5 minuti a 5°C per raffreddare i campioni.

Polymerase Chain Reaction (PCR): Retrotrascritto l'mRNA presente nel campione di partenza, si è proceduto all'amplificazione solamente del cDNA dei 3 geni di

interesse tramite l'utilizzo di *primers* e quindi protocolli specifici per p22^{phox} e PAI-1 (RT-PCR in due step).

Protocollo per la p22^{phox}

Sono stati utilizzati i seguenti *primers*:

5'-TGGGCGGCTGCTTGATGGT-3' e 5'-GTTTGTGTGCCTGCTGGAGT-3' disegnati per l'amplificazione di una regione compresa tra 169 e 485 pb.

Le condizioni di amplificazione hanno previsto per 5 µl di cDNA la formazione di una miscela (MIX-PCR) contenente: MgCl₂ 1,5 mM; Buffer II 1X, Primer senso ed antisenso 0,4 µM; AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems, Roche, New Jersey USA) 0,625 U; H₂O DEPC q. b. a 25µl.

I campioni sono stati posti a 94°C per 10 minuti (hot start) seguita da 30 cicli formati da 94°C per 1 minuto (denaturazione), 60°C per 1 minuto (annealing) e 72°C per 1 min (estensione). L'amplificazione è stata terminata con una fase di 7 minuti a 72°C e raffreddamento a 4°C.

Protocollo per PAI-1:

Si sono utilizzati i seguenti *primers*: 5'-CTCTCTCTGCCCTCACCAAC-3' e 5'-GTGGAGAGGCTCTTGGTCTG-3' disegnati per l'amplificazione di una regione compresa tra 969 e 950 pb.

Le condizioni di amplificazione hanno previsto per 5 µl di cDNA la formazione di una miscela (MIX-PCR) contenente: MgCl₂ 0 mM; Buffer II 1X, Primer senso ed antisenso 0,4 µM; AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems, Roche, New Jersey USA) 0,625 U; H₂O DEPC q. b. a 25µl.

I campioni sono stati posti a 94°C per 10 minuti (hot start) seguita da 30 cicli formati da 94°C per 1 minuto (denaturazione), 60°C per 1 minuto (annealing) e 72°C per 1 min (estensione). L'amplificazione è stata terminata con una fase di 7 minuti a 72°C e raffreddamento a 4°C.

Protocollo per HO-1:

Sono stati utilizzati i seguenti *primers*: 5'-CAGGCAGAGAATGCTGAGTTC-3' e 5'-GCTTCACATAGCGCTGCA-3' (Yoshida. 1988) disegnati per l'amplificazione della regione compresa tra 79 e 349 bp. Le condizioni di amplificazione hanno previsto per 5 µl di cDNA la formazione di una miscela (MIX-PCR) contenete: MgCl₂ in concentrazione 1.5 mM, Buffer II 1X, Primer senso ed antisenso in concentrazione pari a 0.5 µM, AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems, Roche, New Jersey USA) 0.625 U; H₂O DEPC q. b. a 25 µl.

I campioni sono stati posti a 94°C per 10 minuti (hot start) seguita da 26 cicli formati da 94°C per 30 secondi (denaturazione), 58°C per 1 minuto

(annealing) e 72°C per 1 minuto (estensione). L'amplificazione è stata terminata con una fase di 7 minuti a 72°C e raffreddamento a 4°C.

Come gene di controllo è stata usata GAPDH con i seguenti *primers* 5'-CAACTTGGTATCGTGGA-3' e 5'-GTAGCCAAATTCGTTGTC-3'.

5.2.5 Visualizzazione dei prodotti di PCR

10 µl di ciascun amplificato sono stati caricati in gel di poliacrilammide (BDH, England) al 7%, separati a 160 V per 1 ora ed evidenziati con etidio bromuro. La visualizzazione dei prodotti di amplificazione è stata effettuata con lampada UV. Successivamente i gel sono stati colorati con colorazione argentica.

Come marker è stato utilizzato il Marker IX (Roche Diagnostic, New Jersey USA).

5.2.6 Quantificazione dell'espressione genica

Per quantificare l'espressione genica di p22^{phox}, PAI-1 e HO-1 è stata utilizzata un'analisi semiquantitativa dei prodotti di PCR. Le bande corrispondenti a GAPDH e ai tre geni in esame presi singolarmente sono state quantificate densitometricamente per mezzo della densità pixel utilizzando il software NIH Image. Il rapporto tra i prodotti dell'amplificazione di GAPDH e rispettivamente p22^{phox}, PAI-1 o HO-1 è stato utilizzato come indice dell'espressione genica.

5.2.7 Determinazione del lisato proteico

Per ottenere un estratto totale di proteine, i linfo-monociti isolati dal sangue intero anticoagulato con EDTA, sono stati lisati, con uno specifico buffer di lisi: il RIPA Buffer (Tris HCl 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5.0 mM, Niaproof 1.5%, Na₃VO₄ 1.0 mM, SDS 0.1%). Al momento dell'uso sono stati addizionati gli inibitori delle proteasi (Roche Diagnostic, New Jersey USA) e Fenil-Metil-Sulfonil Fluoride (PMSF, 1 mM).

La soluzione contenente il *buffer* di lisi e le cellule è stata sottoposta a 3 cicli di 30 secondi di sonicazione (UP200S, Hielscher Gimbla Teltow, Germania) e 30 secondi di riposo in ghiaccio, per liberare la maggior quantità possibile di proteine. La soluzione è stata poi centrifugata a 4°C per 10 minuti a 10000xg recuperando il surnatante contenente le proteine in soluzione.

5.2.8 Determinazione della concentrazione di proteine

Il BCA Assay (Pierce, Rockford USA) è un metodo che combina la reazione del biureto (una proteina che in ambiente alcalino è capace di ridurre Cu²⁺ a Cu⁺)

con la determinazione colorimetrica data dal rame rameoso che chela due molecole di acido bicinconinico.

25 µl della soluzione contenente le proteine e la stessa quantità del tampone di lisi sono state diluite per un opportuno fattore di diluizione (1:10) con acqua DEPC. Sono state poi caricate in triplo in piastra a 96 pozzetti (Falcon, Necton Dickinson, Labware, New Jersey USA) assieme allo standard (albumina sierica bovina, BSA) a diverse concentrazioni note. Ogni pozzetto è stato riempito con 200 µl di reagente composto da 50 parti di reagente BCA A (sodio carbonato, sodio bicarbonato, acido bicinconinico, sodio tartrato in sodio idrossido 0,1M) e 1 parte di reagente BCA B (contenente 4% di solfato rameico). La piastra è stata successivamente incubata a 37°C per 30 minuti e letta a 540nm con spettrofotometro (Labsistem Multiscan MS). Con i valori delle concentrazioni note di albumina (standard) è stata creata una curva standard in base alla quale sono state ricavate le concentrazioni delle proteine.

5.2.9 Separazione elettroforetica delle proteine e trasferimento su membrana di nitrocellulosa

60 µg di proteine estratte dai linfo-monociti sono state denaturate per 5 minuti in presenza di *loading buffer* (10 mM Tris HCl, pH 6.8, 20mM DTT, 0,4% SDS (*electrophoresis grade*), 0.025% bromofenolo blu e 2% glicerolo). I campioni sono stati quindi portati a 4°C e caricati su gel di poliacrilammide, la cui percentuale variava a seconda della proteina di interesse e quindi del suo peso molecolare, rispettivamente: 12% per determinare l'espressione di p22^{phox} e HO-1 e 10% per PAI-1.

Le proteine sono state quindi separate a 80 V per 6-8 ore in tampone di corsa così composto: Tris 25 mM, glicina 0,25M, SodioDodecilSolfato 3,47mM. Il *marker* molecolare utilizzato è *Full Range Rainbow*, RPN800 (Amersham Life Science, Inghilterra).

Le proteine separate elettroforeticamente sul gel sono state poi trasferite su membrana di nitrocellulosa (Hybond ECL, Amersham bioscience, Inghilterra) per 1 ora a 80 V in ghiaccio, usando uno specifico tampone di trasferimento a 4°C (39 mM glicina, 48 mM Tris base, 0,037% SDS (*electrophoresis grade*), 20% metanolo).

Le membrane di nitrocellulosa sono state quindi incubate per tutta la notte a 4°C con PBS addizionato dello 0,1% di Tween-20 (Merck Schuchardt, Germania) (tPBS) e il 5% di latte scremato in polvere (*Non Fat Dry Milk*, Nestlé).

5.2.10 Formazione e visualizzazione degli immunocomplessi

Le membrane di nitrocellulosa sono state incubate con soluzioni di anticorpi primari specifici per 3 ore a temperatura ambiente, come riportato in **Tabella 5.1**. Le membrane sono state quindi lavate 3 volte per 15 minuti a temperatura ambiente con tPBS e incubate con specifico anticorpo secondario [**Tabella 5.1**] coniugato con Horseradish Peroxidase (HRP) per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo 3 lavaggi per 15 minuti ciascuno a temperatura ambiente, le membrane sono state incubate per 5 minuti con una soluzione chemiluminescente (soluzione preparata al momento, composta da luminolo e perossido in uguali volumi, Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, Rockford USA). Gli immunocomplessi formati sono quindi stati visualizzati a seguito di impressione su lastra radiografica (Amersham biosciences, Inghilterra) e successivo sviluppo.

Le bande corrispondenti a GAPDH ed alle tre proteine in esame prese singolarmente sono state quantificate densitometricamente per mezzo della densità pixel utilizzando il *software* NIH Image. Il rapporto tra l'espressione proteica di GAPDH e rispettivamente p22^{phox}, o PAI-1 o HO-1 è stato utilizzato come indice dell'espressione proteica.

Tabella 5.1: Concentrazione degli anticorpi usati per la formazione degli immunocomplessi.

Linfo-monociti	p22^{phox} (policlonale) 22 KDa	PAI-1 (monoclonale) 50 KDa	HO-1 (policlonale) 32 KDa	GAPDH (monoclonale) 36 KDa
Anticorpo 1	(Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA) 1:500	(Santa Cruz, Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA) 1:250	(Stressgen, Victoria, BC, Canada) 1:750	(Chemicon International, Temecula, Canada) 1:1000
Anticorpo 2	Antirabbit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) 1:2000	Antimouse (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) 1:5000	Antirabbit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) 1:5000	Antimouse (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) 1:20000

5.2.11 Determinazione delle LDL ossidate plasmatiche

La concentrazione plasmatica delle LDL ossidate (ox-LDL) è stata misurata utilizzando un kit ELISA in commercio (Immundiagnostik AG, Bensheim, Germany).

I campioni di plasma sono stati incubati per 4 ore a temperatura ambiente con un anticorpo ad alta affinità adeso alle pareti dei pozzetti della piastra. Dopo 5 lavaggi con *buffer* apposito, è stato addizionato un anticorpo secondario perossidasi-coniugato per 1 ora. Come substrato cromogeno è stato utilizzato la tetrametilbenzidina in ambiente acido. L'intensità del colore, direttamente proporzionale alla concentrazione delle ox-LDL presenti nel campione, è stata rilevata a 450 nm. I risultati sono stati riportati ad una curva standard ottenuta da campioni a concentrazione nota di ox-LDL.

5.2.12 Analisi statistica

I dati sono espressi come variazioni percentuali del trattamento con HFR e HD rispetto al basale. I dati sono stati valutati con un computer Macintosh G54 (Apple Computer, Cupertino, CA) usando il pacchetto statistico Statview II (BrainPower Inc, Calabasas CA, USA). La significatività dei valori è stata analizzata con ANOVA valutando gli effetti del trattamento e della sequenza. Valori di $p < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

L'analisi dei dati con ANOVA effettuata per eliminare gli effetti del cross-over in entrambe le sequenze non è risultata significativa e perciò i valori ottenuti da entrambe le sequenze sono stati combinati e successivamente analizzati statisticamente.

CAPITOLO 6

RISULTATI

6.1 VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA E PROTEICA DI P22^{PHOX} IN CELLULE MONONUCLEATE DEL SANGUE DI PAZIENTI IN TRATTAMENTO EMODIALITICO CON HFR

Il trattamento con emodiafiltrazione con reinfusione endogena (HFR) ha determinato un decremento dei livelli di espressione genica di p22^{phox} pari a $-9 \pm 5 \Delta\%$. Tale decremento è risultato significativamente inferiore rispetto al trattamento con bicarbonato dialisi ($2 \pm 6 \Delta\%$), $p < 0,0001$ [Figura 6.1].

Anche a livello proteico si è osservato una diminuzione dei livelli di p22^{phox} nei soggetti in trattamento dialitico con HFR di $-15 \pm 20 \Delta\%$. La riduzione a livello di proteina di p22^{phox} indotta dal trattamento con HFR è risultata significativamente inferiore a quella ottenuta dopo il trattamento con bicarbonato dialisi: $-15 \pm 20 \Delta\%$ vs $3 \pm 17 \Delta\%$, $p < 0,05$ [Figura 6.2].

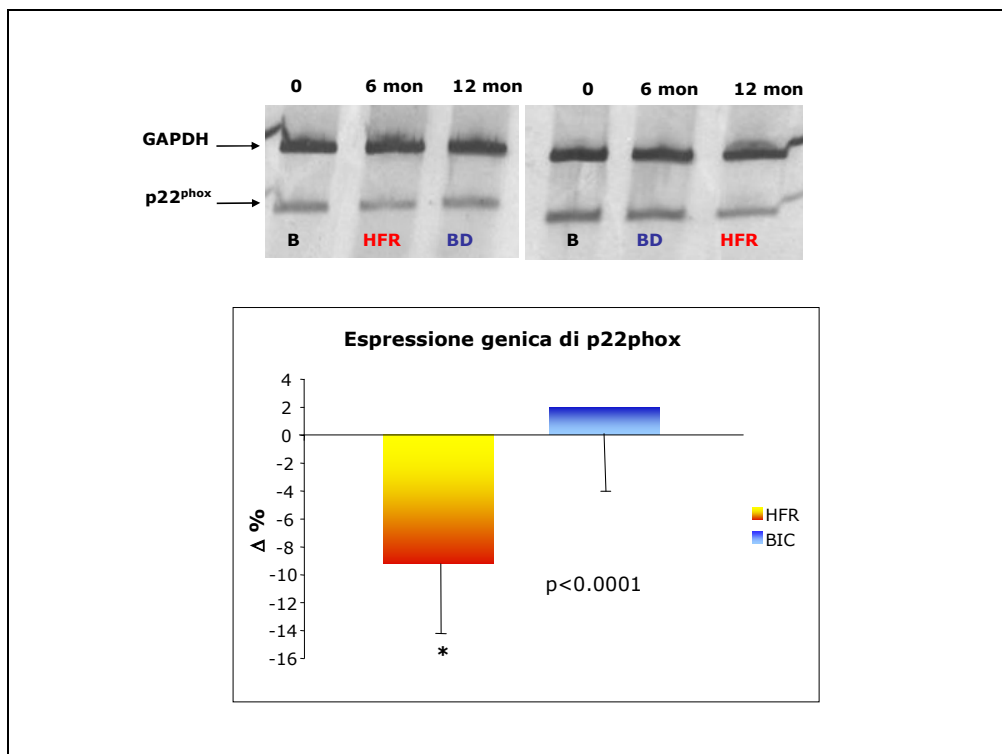


Figura 6.1 Analisi percentuale dell'espressione genica di p22^{phox} in cellule mononucleate del sangue di soggetti in trattamento emodialitico con HFR e di soggetti in trattamento con bicarbonato-dialisi. * $p < 0,0001$ vs bicarbonato-dialisi.

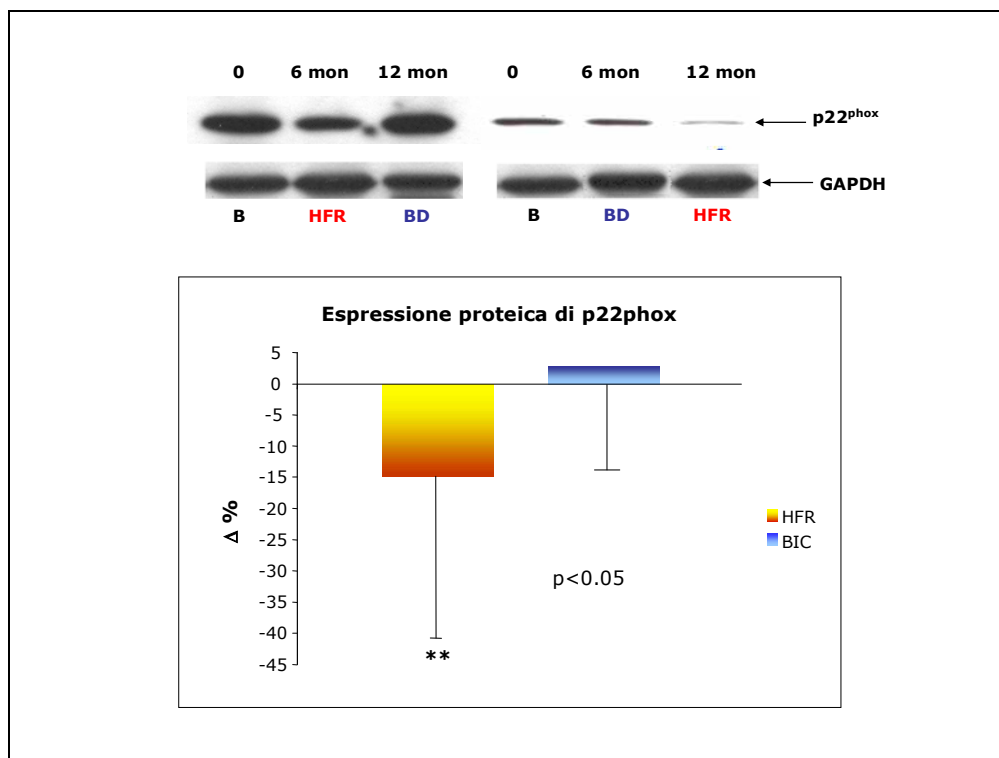


Figura 6.2 Analisi percentuale dell'espressione proteica di p22^{phox} in cellule mononucleate del sangue di soggetti in trattamento emodialitico con HFR e di soggetti in trattamento con bicarbonato-dialisi. **p<0,05 vs bicarbonato-dialisi.

6.2 VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA E PROTEICA DI PAI-1 IN CELLULE MONONUCLEATE DEL SANGUE DI PAZIENTI IN TRATTAMENTO EMODIALITICO CON HFR

L'espressione genica di PAI-1 è risultata diminuita nei soggetti in trattamento con HFR di $14.74 \pm 10.48\%$. Il trattamento con l'HFR ha abbassato in modo significativo l'espressione genica di PAI-1 rispetto ai soggetti in trattamento con la bicarbonato dialisi: $-19 \pm 6 \Delta\%$ vs $-5 \pm 5 \Delta\%$, $p < 0,0001$ [Figura 6.3].

Andamento analogo è stato evidenziato nella valutazione dell'espressione proteica di PAI-1; si è osservato, infatti, che il trattamento dialitico con HFR riduce l'espressione proteica di PAI-1 del $24 \pm 12 \Delta\%$. Il trattamento emodialitico con HFR riduce significativamente l'espressione proteica di PAI-1 rispetto ai soggetti in trattamento con bicarbonato dialisi: $-24 \pm 12 \Delta\%$ vs 9 ± 15 , $p < 0,0001$ [Figura 6.4].

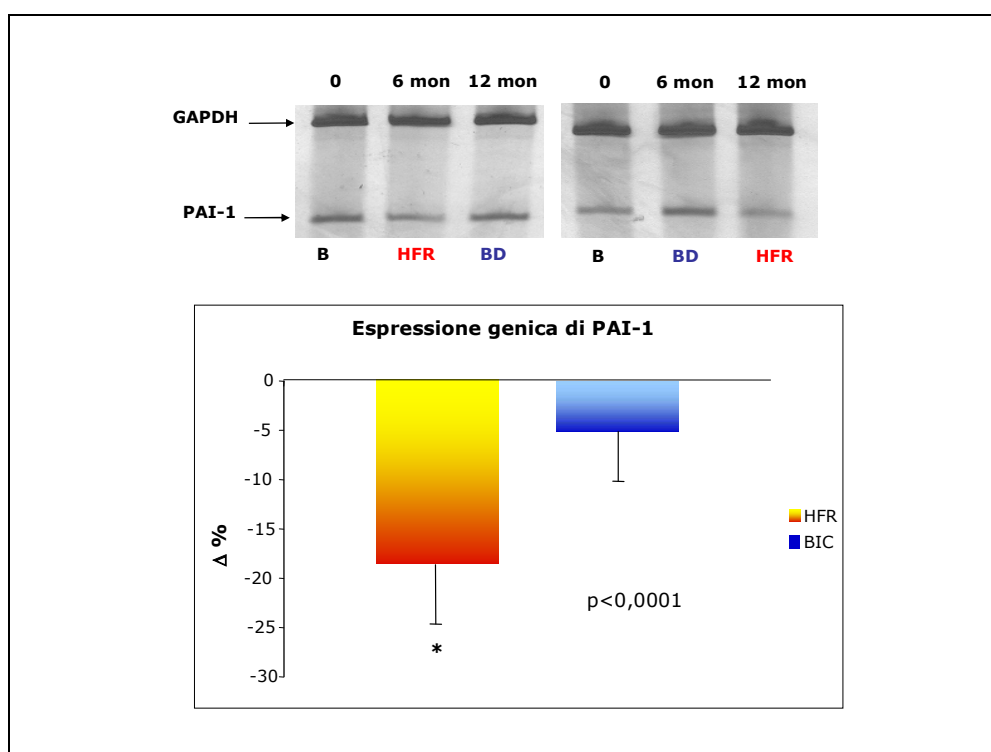


Figura 6.3 Analisi percentuale dell'espressione genica di PAI-1 in cellule mononucleate del sangue di soggetti in trattamento emodialitico con HFR e di soggetti in trattamento con bicarbonato-dialisi. * $p < 0,0001$ vs bicarbonato-dialisi.

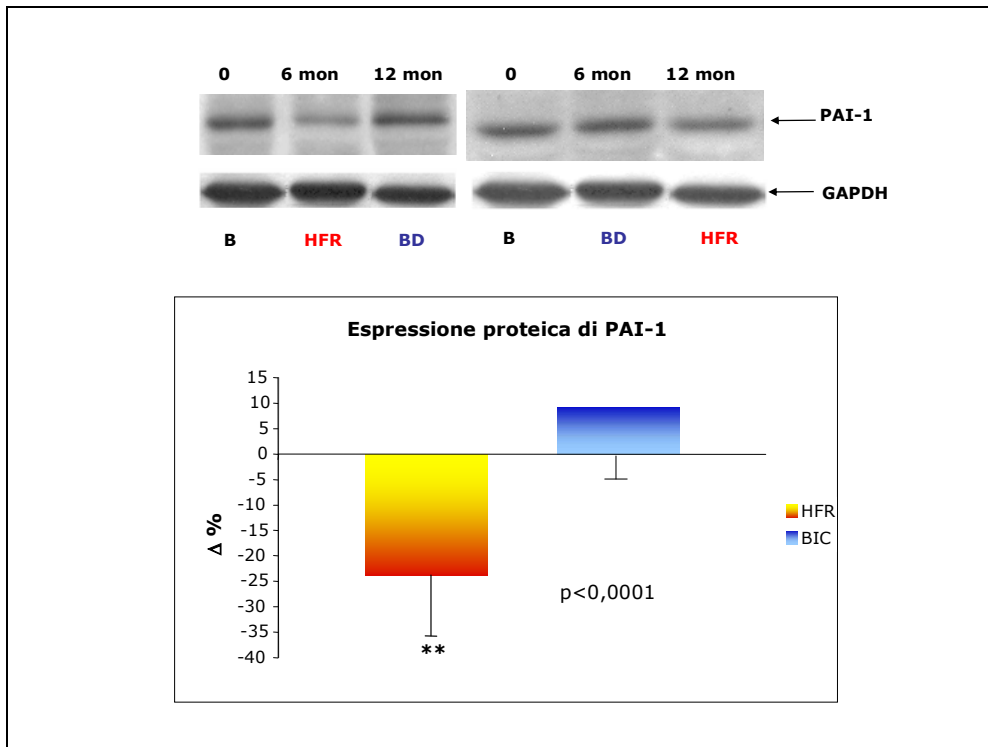


Figura 6.4 Analisi percentuale dell'espressione proteica di PAI-1 in cellule mononucleate del sangue di soggetti in trattamento emodialitico con HFR e di soggetti in trattamento con bicarbonato-dialisi. **p<0,0001 vs bicarbonato-dialisi.

6.3 VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA E PROTEICA DI HO-1 IN CELLULE MONONUCLEATE DEL SANGUE DI PAZIENTI IN TRATTAMENTO EMODIALITICO CON HFR

Il trattamento con HFR non ha modificato l'espressione genica di HO-1 rispetto ai soggetti in trattamento con bicarbonato dialisi: $-12 \pm 8 \Delta\%$ vs -10 ± 8 [Figura 6.5].

Anche a livello proteico non si è osservata una differenza di espressione di HO-1 nei soggetti in trattamento con HFR rispetto ai soggetti in trattamento con bicarbonato dialisi: $-21 \pm 12 \Delta\%$ vs -14 ± 8 [Figura 6.6].

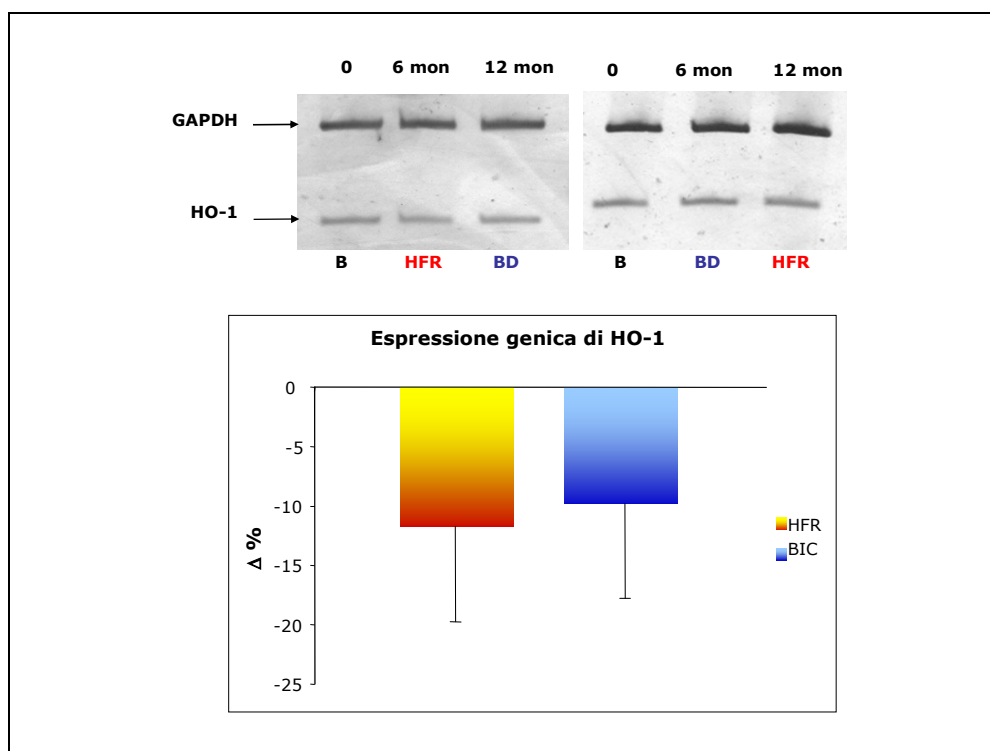


Figura 6.5 Analisi percentuale dell'espressione genica di HO-1 in cellule mononucleate del sangue di soggetti in trattamento emodialitico con HFR e di soggetti in trattamento con bicarbonato-dialisi. $p=ns$

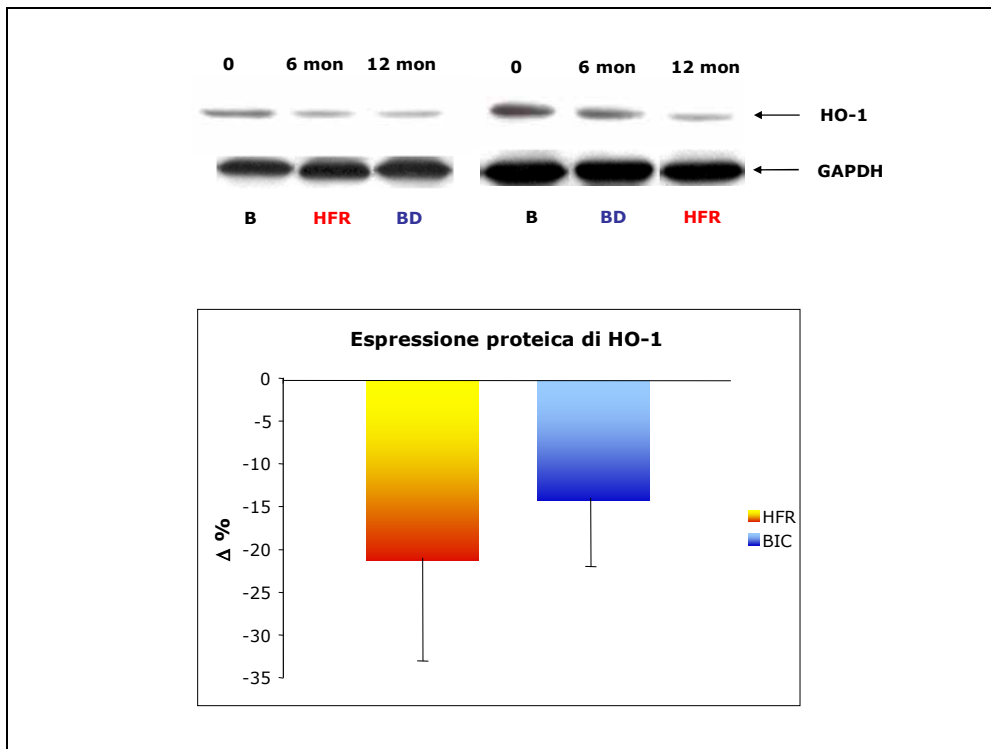


Figura 6.6 Analisi percentuale dell'espressione proteica di HO-1 in cellule mononucleate del sangue di soggetti in trattamento emodialitico con HFR e di soggetti in trattamento con bicarbonato-dialisi. $p=ns$

6.4 VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI LDL OSSIDATE IN PLASMA DI SOGGETTI IN TRATTAMENTO EMODIALITICO CON HFR

Dopo trattamento con HFR si è osservata una diminuzione dei livelli plasmatici di LDL ossidate rispetto ai soggetti in trattamento con bicarbonato dialisi e tale decremento è risultato significativo: $-14 \pm 19 \Delta\%$ vs 1 ± 14 , $p < 0,01$ [Figura 6.7].

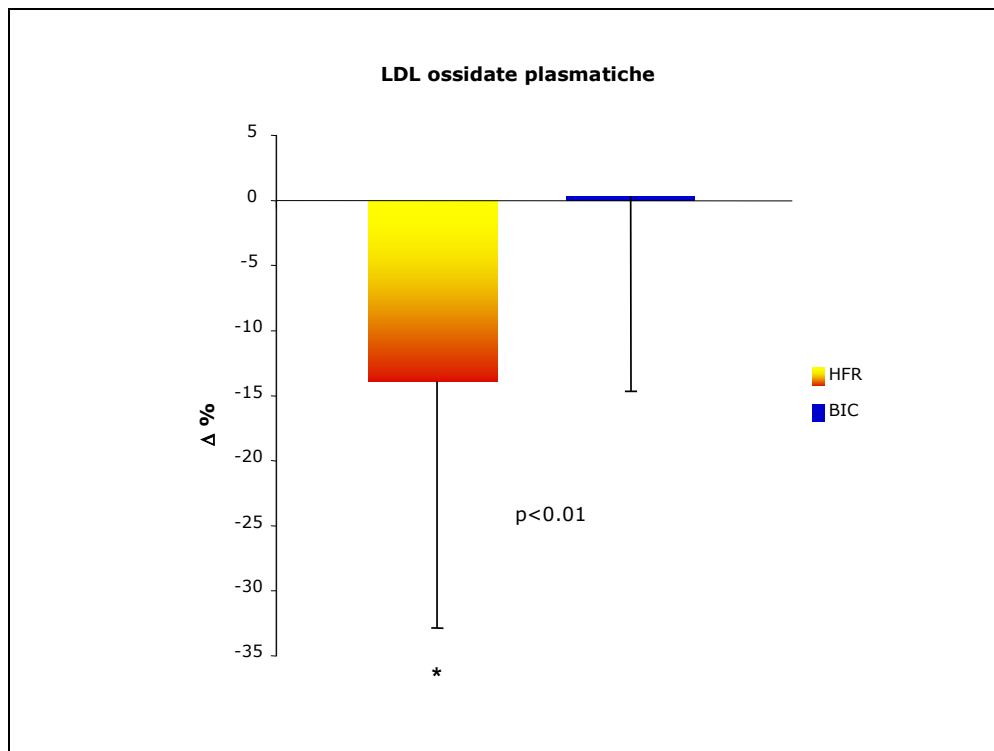


Figura 6.7 Analisi percentuale dei livelli plasmatici di LDL ossidate in pazienti in trattamento con HFR rispetto ai soggetti in trattamento con bicarbonato- dialisi. * $p < 0,01$ vs bicarbonato dialisi.

CAPITOLO 7

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I pazienti con danno renale e quelli sottoposti a trattamento renale sostitutivo con emodialisi sono esposti allo stress ossidativo (Galli e Ronco, 2000; Locatelli et al., 2003) ed in particolare alle specie reattive dell'ossigeno (ROS) che derivano dall'attivazione delle cellule endoteliali, dalla riduzione dei sistemi antiossidanti e dall'aumentata attività proossidante. L'aumento delle ROS colpisce il tono vascolare non solo diminuendo la biodisponibilità del monossido d'azoto (NO) vasodilatatore, ma anche attraverso la loro interazione con le LDL a formare LDL ossidate. Entrambi questi eventi aumentano il rischio di malattie cardiovascolari (Locatelli et al., 2003). In questi pazienti lo stress ossidativo contribuisce anche alla perossidazione lipidica delle membrane dei globuli rossi (RBC) ed alla distruzione degli stessi peggiorando l'anemia indotta dalla malattia renale.

Recentemente è stata introdotta in terapia dialitica l'emodiafiltrazione con rigenerazione *on-line* dell'ultrafiltrato (HFR) che attua contemporaneamente e separatamente i tre processi di depurazione extracorporea del sangue: diffusione, convezione e assorbimento (Ghezzi et al., 1992). Alcuni studi hanno riportato che l'HFR riduce i livelli di citochine proinfiammatorie come TNF- α , IL-6 e PCR (De Francisco et al., 2000; Meloni et al., 2005; Panichi et al., 2006), coinvolte nelle risposte di stress ossidativo e in quelle infiammatorie. Questa nuova tecnica dialitica è anche in grado di aumentare i livelli della citochina anti-infiammatoria IL-10 (Panichi et al., 2006). Questo recente studio ha anche dimostrato come il fenomeno di convezione può giocare un ruolo importante nella riduzione dei livelli predialitici di *markers* infiammatori (Panichi et al., 2006). In questa ricerca si confrontava l'HFR e l'emodiafiltrazione (HDF) con la bicarbonato dialisi standard (HD). HFR e HDF, rispetto alla HD standard, erano entrambe capaci di diminuire i livelli di citochine proinfiammatorie. Se da un lato questo dato sottolinea l'importanza della convezione per la riduzione delle citochine, dall'altro rende ragionevole ipotizzare che l'HFR può svolgere un maggior ruolo protettivo nei confronti dello stress ossidativo. Infatti, mentre l'HDF è stata associata ad un'aumentata perdita della vitamina C antiossidante, che non viene rimpiazzata durante la reinfusione (Morena et al., 2002), l'HFR può essere associato con il risparmio di molti antiossidanti idrosolubili che non hanno affinità per la cartuccia adsorbente. In letteratura non sono riportati studi sul possibile effetto dell'HFR sullo

stato dello stress ossidativo. Il lavoro di ricerca svolto in questi anni di Dottorato ha valutato se la dialisi con HFR, confrontata con la bicarbonato dialisi standard, 210-240 min 3 volte alla settimana, possa influenzare lo stress ossidativo nei pazienti sottoposti a questa tecnica dialitica.

Lo stress ossidativo è stato valutato attraverso la determinazione dei livelli di *markers* plasmatici, come le LDL ossidate, e attraverso la determinazione *ex vivo*, in cellule mononucleate del sangue di pazienti in trattamento dialitico dei livelli di espressione genica e proteica di mediatori correlati allo stress ossidativo quali p22^{phox}, HO-1 e PAI-1.

La p22^{phox} è una subunità del citocromo b₅₅₈, di 22 KDa, inclusa nella NADH/NADPH ossidasi. Essa è presente sia nei leucociti che nelle pareti vascolari e funziona come subunità integrale del trasporto finale dell'elettrone da NAD(P)H all'eme e all'ossigeno molecolare per generare O₂^{•-} (Babior, 1999). La stimolazione di p22^{phox}, infatti, contribuisce all'attivazione di NAD(P)H ossidasi. Questo *marker* gioca un ruolo essenziale nella produzione di O₂^{•-}, per cui ridotti livelli di p22^{phox}, sia a livello di produzione di mRNA che di espressione proteica, indotti dall'HFR ed evidenziati in questa sperimentazione determinano verosimilmente una ridotta produzione di specie reattive dell'ossigeno e in particolare di O₂^{•-} e quindi in una riduzione dello stress ossidativo. Inoltre, dal momento che la p22^{phox} è presente nei leucociti (Babior, 1999), la diminuzione dell'espressione genica e proteica della p22^{phox} indica un'inibizione dell'attivazione dei leucociti, una delle maggiori cause di stress ossidativo in ESRD (fase terminale di malattia renale), e di conseguenza un'inibizione dei meccanismi di trasmissione cellulare mediati dallo stress ossidativo noti responsabili del rimodellamento vascolare e dell'aterogenesi indotti dall'emodialisi (Dhalla et al., 2000; Locatelli et al., 2003).

Il PAI-1 è noto come un componente che altera la deposizione di matrice extracellulare attraverso la sua capacità di diminuire la produzione di plasmina dal plasminogeno, quindi inducendo accumulo di matrice extracellulare attraverso la riduzione delle vie proteolitiche dipendenti dall'attivazione delle metalloproteinasi mediate dalla plasmina. Più studi hanno dimostrato l'induzione di questo importante fattore profibrotico ad opera delle specie reattive dell'ossigeno e dello stress ossidativo. Infatti è stato osservato che una sovrapproduzione di ROS induce l'espressione genica di PAI-1 che si è visto essere bloccata dall'utilizzo di antiossidanti ed enzimi scavenger (Dimova et al., 2004). Alcuni studi hanno anche caratterizzato la via intracellulare coinvolta dall'induzione di PAI-1 ROS mediata, dimostrando che essa coinvolge MAPK/PKB, RhoA/Rho Kinasi ed anche fattori di trascrizione come NFκB, AP-1 e SP1 (Dimova et al., 2004). Inoltre, la produzione di PAI-1 è modulata anche alle citochine infiammatorie come IL-1 e TNF-α, che

promuovono infiammazione vascolare e aterosclerosi (Vaughan, 2005). La dimostrazione che le LDL ossidate, il primo gradino del processo aterogenetico, inducono l'espressione di PAI-1 (Dichtl et al., 1999) unito all'effetto proaterotrombogenico di PAI-1 (Vaughan, 2005; Agirbasli, 2005) sottolineano il ruolo di PAI-1 nell'induzione della malattia cardiovascolare aterosclerotica.

Le LDL ossidate sono un altro indicatore di stress ossidativo e fattore di rischio cardiovascolare (Meisinger et al., 2005). I nostri risultati dimostrano che i pazienti trattati con HFR hanno minori livelli di LDL ossidate e questo sottolinea ulteriormente l'osservazione che l'HFR è capace di ridurre lo stress ossidativo nei pazienti in emodialisi.

I dati ottenuti in questo lavoro di ricerca durante il Dottorato hanno evidenziato un ruolo protettivo dell'HFR rispetto alla dialisi standard con bicarbonato in quanto si è evidenziato una significativa inibizione di espressione genica e proteica per i *markers* di stress ossidativo quali la p22^{phox} e il PAI-1.

In contrasto alle differenze tra HFR e bicarbonato dialisi standard in termini di effetti su p22^{phox} e PAI-1, non si sono osservate variazioni dei livelli di espressione genica e proteica di eme ossigenasi 1 (HO-1). HO-1 è l'enzima che catalizza la reazione iniziale del catabolismo dell'eme per dare quantità equimolari di monossido di carbonio (CO), ferro e biliverdina che viene successivamente convertita in bilirubina, essa stessa potente antiossidante. Esistono tre diverse isoforme di HO: HO-1, HO-2 e HO-3. HO-1 ha un'espressione basale molto bassa ma che aumenta rapidamente in condizioni, di stress ossidativo, mentre HO-2 e HO-3, isoenzimi recentemente identificati, sono maggiormente espressi costitutivamente. La produzione del vasodilatatore CO, HO-1 mediata, può contribuire alla regolazione del tono vascolare e quindi alla pressione sanguigna e alla funzione endoteliale (Maines, 1997). Infine è stato dimostrato che HO-1 ha effetti anti-proliferativi e anti-infiammatori a lungo termine (Nath et al., 2001). Nei nostri esperimenti l'HFR non produce nessun effetto sull'espressione di HO-1 rispetto alla bicarbonato dialisi, questo può essere dovuto alla specifica regolazione dell'HO-1. I nostri pazienti necessitano di dialisi a lungo termine e si caratterizzano per avere i processi infiammatori già attivati; è plausibile che l'HO-1 sia già stimolato al massimo livello. Un'altra possibile spiegazione può essere relativa alla durata dello studio, insufficiente per cambiare i livelli di HO-1, oppure il numero di pazienti coinvolti forse troppo piccolo. Ulteriori studi sarebbero necessari per valutare questi aspetti.

In conclusione, i risultati di questo studio indicano che il trattamento emodialitico con HFR è in grado di ridurre notevolmente l'effetto dello stress ossidativo; infatti i livelli di espressione delle proteine ad esso correlate e i livelli di

markers di stress ossidativo sono minori rispetto a quelli osservati nei pazienti in trattamento con bicarbonato dialisi standard. Il meccanismo responsabile dell'efficacia dell'HFR dipende dalla capacità di ridurre i livelli delle citochine proossidanti e proinfiammatorie come TNF- α e IL-6 (De Francisco et al., 2000; Meloni et al., 2005), noti induttori dello stress ossidativo e coinvolti nella risposta infiammatoria, può essere dovuto anche ad un possibile effetto di risparmio dell'HFR nei confronti di molti antiossidanti idrosolubili. Ciò che conferma questo possibile effetto di risparmio di antiossidanti attuato dall'HFR è l'associazione con l'HDF, un'altra tecnica emodialitica che combina convezione e diffusione e che è in grado di abbassare le citochine proinfiammatorie (Panichi et al., 2006), con la perdita di vitamina C antiossidante idrosolubile, che non viene sostituita durante la rinfusione (Morena et al., 2002). Questi effetti dell'HFR possono contribuire a ridurre lo stato di stress ossidativo nei pazienti in dialisi e spiegare i suoi effetti, confrontati con la bicarbonato dialisi standard, nel ridurre l'espressione genica e proteica di proteine correlate allo stress ossidativo come quelle considerate nel nostro studio. Questo è ulteriormente confermato dalla dimostrazione dei ridotti livelli di LDL ossidate osservati dopo il trattamento con HFR rispetto al trattamento con bicarbonato dialisi standard, come dimostrato dal nostro studio e da un possibile effetto dell'HFR di risparmio di antiossidanti.

Complessivamente i dati ottenuti suggeriscono che l'HFR è una tecnica dialitica più biocompatibile rispetto a quelle più tradizionali. Vista la stretta correlazione tra stress ossidativo e infiammazione e il determinante ruolo giocato dallo stress ossidativo nell'induzione dei meccanismi correlati all'infiammazione nei pazienti con malattia renale in fase terminale, il trattamento dialitico con HFR potrebbe riscontrare un elevato impatto clinico nella riduzione della malattia cardiovascolare aterosclerotica dei pazienti in dialisi, che resta la principale causa di morte di questi pazienti (Locatelli et al., 2003).

I dati sperimentali ottenuti durante il mio Dottorato di Ricerca indicano l'importanza del trattamento dialitico con l'HFR e suggeriscono l'importanza di avviare nuovi ulteriori studi da realizzare con un numero maggiore di pazienti, afferenti da vari centri di dialisi. Sarebbe anche utile prolungare la durata dello studio per permettere di evidenziare meglio i benefici dell'HFR sulle complicanze della dialisi, correlati allo stress ossidativo e all'infiammazione.

BIBLIOGRAFIA

- Abraham** G, Bhaskaran S, Soundarajan P, Ravi R, Nitya S, Padma G, Jayanthi V. Continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Assoc Physicians India*. 1996 Sep;44(9):599-601.
- Ader** JL, Rostaing L. Cyclosporin nephrotoxicity: pathophysiology and comparison with FK-506. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1998 Sep;7(5):539-45.
- Agirbasli** M. Pivotal role of plasminogen-activator inhibitor 1 in vascular disease. *Int J Clin Pract* 2005; 59:102-106.
- Anavekar** NS, Pfeffer MA. Cardiovascular risk in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2004; 66 (suppl 92):S11-5.
- Applegate** LA, Luscher P, Tyrrell RM. Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. *Cancer Res*. 1991 Feb 1;51(3):974-8.
- Aruoma** OI, Halliwell B, Dizdaroglou M. Iron ion-dependent modification of bases in DNA by the superoxide radical generating system hypoxanthine/xanthine oxidase. *J Biol Chem* 1989; 264:13024-13028.
- Aucella** F, Gesuete A, Sereni L, Netti S, Savastano AM, Querques M, Specchio A, De Min A, Avanzi C, Montemurno C, Grandone E, Cappucci F, Procaccini DA, Stallone C, Gesualdo L; Gruppo collaborativo sull'HFR. [Acute biocompatibility of hemodiafiltration with endogenous reinfusion (HFR)]. *G Ital Nefrol* 2004 Nov-Dec; 21Suppl 30:S185-9.
- Aust** SD, Morehouse LA, Thomas CE. Role of metals in oxygen radical reaction. *Free Radic Biol Med* 1985; 1:13-8.
- Babior** BM. NADPH Oxidase. An Update. *Blood* 1999; 93(5):1464-1476.
- Baranano** DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99: 16093-16098.
- Birnboim** HC, Kanabus-Kominska M. The production of DNA strand breaks in human leukocytes by superoxide may involve a metabolic process. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 82:6820-6824.
- Boaz** M, Matas Z, Biro A, Katzir Z, Green M, Fainaru M, Smetana S. Serum malondialdehyde and prevalent cardiovascular disease in hemodialysis. *Kidney Int*. 1999 Sep;56(3):1078-83.
- Boaz** M, Smetana S, Weinstein T, Matas Z, Gafer U, Iaina A, Knecht A, Weissgarten Y, Brunner D, Fainaru M, Green MS. Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2000 Oct 7;356(9237):1213-8.

Calò L. Radicali liberi, superossidi, e stress ossidativo nella patogenesi e fisiopatologia dell'ipertensione arteriosa e delle sue complicanze. *Current Therapeutics ADIS International* 1999;1-8.

Calò LA, Davis PA, Giacom B, Pagnin E, Sartori M, Riegler P, Antonello A, Huber W, Semplicini A. Oxidative stress in kidney transplant patients with calcineurin inhibitor-induced hypertension: effect of ramipril. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; 40:625-631.

Calò LA, Davis PA, Piccoli A, Pessina AC. A role for heme oxygenase-1 in the antioxidant and antiapoptotic effects of erythropoietin: the start of a good news/bad news story? *Nephron Physiol* 2006; 103: 107-111

Calò LA, Davis PA, Semplicini A, Pessina AC. L-carnitine and erythropoiesis: relationship with heme oxygenase-1. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20:1769-1770.

Calò LA, Naso A, Pagnin E, Davis PA, Castoro M, Corradin R, Riegler P, Cascone C, Huber W, Piccoli A. Vitamin E-coated dialyzers reduce oxidative stress related proteins and markers in hemodialysis--a molecular biological approach. *Clin Nephrol* 2004; 62:355-61.

Calò LA, Pagnin E, Davis PA, Semplicini A, Nicolai R, Calvani M, Pessina C. Antioxidant effect of L-carnitine and its short chain esters: relevance for the protection from oxidative stress related cardiovascular damage. *Int J Cardiol* 2006; 107: 54-60.

Calò LA, Stanic L, Davis PA, Pagnin E, Munaretto G, Fusaro M, Landini S, Semplicini A, Piccoli A. Effect of epoetin on HO-1 mRNA level and plasma antioxidants in hemodialysis patients. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2003; 41: 187-192

Ceriello A, Curcio F, dello Russo P, Pegoraro I, Stel G, Amstad P, Cerutti P. The defence against free radicals protects endothelial cells from hyperglycaemia-induced plasminogen activator inhibitor 1 over-production. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995; 6:133-137.

Chen YH, Yet SF, Perrella MA. Role of heme oxygenase-1 in the regulation of blood pressure and cardiac function. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003 May;228(5):447-53.

Chen XL, Zhang Q, Zhao R, Medford RM. Superoxide, H₂O₂, and iron are required for TNF- α -induced MCP-1 gene expression in endothelial cells: role of Rac 1 and NADPH oxidase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286:H1001-H1007.

Choi AMK e Alam J. Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein. *Am J Respir Cell Biol* 1996; 15:9-19.

Clark JE, Foresti R, Sarathchandra P, Kaur H, Green CJ, Motterlini R. Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction. *Am J Physiol* 2000;278:H643-H651.

Cristofano C, Vernaglione L, Perniola MA, Lo Barco C, Muscogiuri P, Chimienti S. [Cystatin C, beta2-microglobulin and C-reactive protein in hemodiafiltration and on-line endogenous liquid reinfusion and in low flux polysulphone bicarbonate conventional hemodialysis]. *G Ital Nefrol* 2004 Nov-Dec;21 Suppl 30:S197-200.

- Cristol** JP, Bosc JY, Badiou S, Leblanc M, Lorrho R, Descomps B, Canaud B. Erythropoietin and oxidative stress in haemodialysis: beneficial effects of vitamin E supplementation. *Nephrol Dial Transplant*. 1997 Nov;12(11):2312-7.
- De Angelis** A, Tullio T, Ferrannini M, Vega A, Dessi MR, Casciani S, Ruggia R, Pastore A, Cortese C, Splendiani G. [Selective adsorption of homocysteine using HFR-on line technique]. *G Ital Nefrol* 2004 Nov-Dec;21 Suppl 30:S106-10.
- De Francisco** ALM, Ghezzi PM, Brendolan A, et al. Hemodiafiltration with on-line regeneration of the ultrafiltrate. *Kidney Int* 2000;58(Suppl.76):66-71.
- Descamps-Latscha** B, Druke T, Witko-Sarsat V. Dialysis-induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences, and therapy. *Semin Dial* 2001; 14:193-9.
- Dhalla** NS, Temsha RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertension* 2000; 18: 655-673.
- Dimova** EY, Samoylenko A, Kietzmann T. Oxidative stress and hypoxia: implications for plasminogen activator inhibitor-1 expression. *Antioxidants & Redox Signaling* 2004; (6) 4:777-791.
- Du** XL, Edeistein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg 11, Ziyadeh E, Wu J, Brownlee M. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:12222-12226.
- Durante** W. Carbon monoxide and bile pigments: surprising mediators of vascular function. *Vasc Med* 2002; 7(3): 195-202.
- Eberhardt** W, Beck KF, Pfeilschifter J. Cytokine-induced expression of tPA is differentially modulated by NO and ROS in rat mesangial cells. *Kidney Int* 2002; 61:20-30.
- Ehrlich** HJ, Gebbink RK, Keijer J, Linders M, Preissner KT, Pannekoek H. Alteration of serpin specificity by a protein cofactor. Vitronectin endows plasminogen activator inhibitor 1 with thrombin inhibitory properties. *Journal of Biological Chemistry* 1990; 265:13029-13035.
- Emiliani** G, Briganti M, Montanari A, Isola E, Fusaroli M. [On-line haemodiafiltration with sorbent-regenerated ultrafiltrate as replacement fluid: Beta2-microglobulin removal versus filtration fraction]. *G Ital Nefrol* 2004 Nov-Dec; 21 Suppl 30:S80-4.
- Esmon** CT. Regulation of blood coagulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; 1477:349-360.
- Fasianos** E, Sacchetti A, Cataldi G et al: Hemodiafiltration with online reinfusion (on-line HFR) induces a minor loss of essential amino acids during hemodialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18 (suppl 4):193.
- Galle** J, Hansen-Hagge T, Wanner C, Seibold S. Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells. *Atherosclerosis*. 2006 Apr;185(2):219-26.
- Galli** F. Protein damage and inflammation in uraemia and dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22 Suppl 5: 20-36.

Galli F, Rovidati S, Chiarantini L, Campus G, Canestrari F, Buoncristiani U. Bioreactivity and biocompatibility of a vitamin E-modified multi-layer hemodialysis filter. *Kidney Int.* 1998 Aug;54(2):580-9.

Galli F, Ronco C. Oxidant stress in hemodialysis. *Nephron* 2000; 84:1-5.

Ghezzi PM, Bottella J, Sartoris AM, Gervasio R, Diez C. use of the ultrafiltrate obtained in two-chamber (PFD) hemodiafiltration as replacement fluid. Experimental ex vivo and in vitro study. *Artif Kidney Dial* 1991; 14:1458-64.

Ghezzi PM, Gervasio R, Tessore V, Sartoris AM, Botella J: Hemodiafiltration without replacement fluid. An experimental study. *ASAIO J* 1992; 38:61-65.

Ginsburg D, Zeheb R, Yang AY, Rafferty UM, Andreasen PA, Nielsen L, Dano K, Lebo RV, Gelehrter TD. cDNA cloning of human plasminogen activator-inhibitor from endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation* 1986; 78:1673-1680.

Griendling KK, Minieri CA, Oilerenshaw ID. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; 74:1141-1148.

Griendling KK, Soresen D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase. Role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000; 86:494-501.

Handelman GJ. Current studies on oxidant stress in dialysis. *Blood Purif.* 2003;21(1):46-50.

Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2003; 91:7A-11A.

Harrison DG. Endothelial function and oxidant stress. *Clin Cardiol* 1997; 20(Suppl II):11-17.

Hörl WH. Hemodialysis Membranes: Interleukins, Biocompatibility, and Middle Molecules. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:S62-S71.

Immenschuh S, Ramadori G. Gene regulation of Heme Oxygenase-1 as a Therapeutic Target. *Biochem Pharmacol* 2000; 60:1121-1128.

Jiang Z, Seo JY, Ha H, Lee EA, Kim YS, Han DC, Uh ST, Park CS, Lee HB. Reactive oxygen species mediate TGF-beta1-induced plasminogen activator inhibitor-1 upregulation in mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309:961-966.

Juhan-Vague I, Alessi MC, Vague P. Increased plasma plasminogen activator inhibitor 1 levels. A possible link between insulin resistance and atherothrombosis. *Diabetologia* 1991; 34:457-462.

Kaczorowski DJ, Zuckerbraun BS. Carbon monoxide: medicinal chemistry and biological effects. *Curr Med Chem.* 2007;14(25):2720-5.

Kaide JI, Zhang F, Wei Y. Carbon monoxide of vascular origin attenuates the sensitivity of renal arterial vessels to vasoconstrictors. *J Clin Invest* 2001; 107: 1163-1171.

Keyse SM, Tyrrel RM. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced

in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 99-103.

Kohler HP e Grant PJ. Mechanisms of disease: plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2000; 342:1792-1801.

La Dialisi – Centro studi Assobiomedica 2003.

La Greca G, Brendolan A, Grezzi PM, et al. The concept of sorbent in hemodialysis. *Int J Artif Organs* 1998; 21: 303-8.

Locatelli F, Aljama P, Barany P et al. European Best Practice Guidelines Working Group. Revised European best practice guidelines for the management of anaemia in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 1-47.

Locatelli F, Canaud B, Eckardt K et al. Oxidative stress in endstage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 1272-1280.

Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU, Stenvinkel P, Wanner C and Zoccali C. Oxidative stress in endstage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transpl* 2003; 18:1272-80.

Locatelli F, Marcelli D, Conte F et al. Cardiovascular disease in chronic renal failure: the challenge continues. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15 (suppl 5): 69-80.

Lonnemann G. Should ultra-pure dialysate be mandatory? *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15 Suppl 1:55-9. Review. No abstract available.

Luke RG. Chronic renal failure-a vasculopathic state. *N Engl J Med* 1998; 339: 841-3.

Lum H e Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280:C719-C741.

Luskutoff DJ, Linders M, Keijer J, Veerman H, van Heerikhuizen H, Pannekoek H. Structure of the human plasminogen activator inhibitor 1 gene: nonrandom distribution of introns. *Biochemistry* 1987; 26:3763-3768.

Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37: 517-554.

Masuko UF, Maziar ZA, Toshiki F. p22^{phox} Is a Critical Component of the Superoxide-generating NADH/NADPH Oxidase System and Regulates Angiotensin II – Induced Hypertrophy in Vascular Smooth Muscle Cells. *J Biol Chem* 1996; 271(38):23317-23321.

Meisinger C, Baumert J, Khuseyinova N, et al. Plasma oxidized low-density lipoprotein, a strong predictor for acute coronary heart disease events in apparently healthy, middle-aged men from the general population. *Circulation* 2005; 112: 651-657.

Meloni C, Ghezzi PM, Cipriani S, Petroni S, Del Poeta G, Rossini B, Rossi V, Recino G, Suppo G, Cecilia A, Casciani CU. One year of clinical experience in postdilution hemofiltration with online reinfusion of regenerated ultrafiltrate. *Blood Purif*. 2004; 22(6):505-9.

- Memoli B.** Cytokine production in haemodialysis. *Blood Purif* 1999; 17:149-158.
- Mimuro J** e Loskutoff DJ. Purification of a protein from bovine plasma that binds to type 1 plasminogen activator inhibitor and prevents its interaction with extracellular matrix. Evidence that the protein is vitronectin. *J Biol Chem* 1989; 264:936-939.
- Morena M,** Cristol JP, Bosc JY, Tetta C, Forret G, Leger CL, Delcourt C, Papoz L, Descomps B, Canaud B. Convective and diffusive losses of vitamin C during haemodiafiltration session: a contributive factor to oxidative stress in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2002 Mar;17(3):422-7.
- Morena M,** Delbosc S, Dupuy AM, Canaud B, Cristol JP. Overproduction of reactive oxygen species in end-stage renal disease patients: a potential component of hemodialysis-associated inflammation. *Hemod Int* 2005; 9:37-46.
- Morita T,** Kourembanas S. Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell-derived carbon monoxide. *J. Clin. Invest.* 1995; 96:2676-2682.
- Morita T,** Perrella MA, Lee M et al. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92:1475-1479.
- Motojima M,** Hosokawa A, Yamato H, Muraki T, Yoshioka T. Uremic toxins of organic anions up-regulate PAI-1 expression by induction of NF-kappa 13 and free radical in proximal tubular cells. *Kidney Int* 2003; 63:1671-1680.
- Nath KA.** Heme oxygenase-1: A provenance for cytoprotective pathways in the kidney and other tissues. *Kidney International* 2006; 70: 432-443.
- Nath KA,** Vercellotti GM, Grande JP, et al. Heme protein-induced chronic renal inflammation: suppressive effect of induced heme oxygenase-1. *Kidney Int* 2001; 59:106-117.
- Ny T,** Sawdey M, Lawrence D, Millan JL, Loskutoff DJ. Cloning and sequence of a cDNA coding for the human betamigrating endothelial-cell-type plasminogen activator inhibitor. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986; 83:6776-6780.
- Ohta K,** Yachie A. Development of vascular biology over the past 10 years: heme oxygenase-1 in cardiovascular homeostasis. *J Endovasc Ther* 2004; 11 Suppl 2:II140-150.
- Ojo AO,** Leichtman AB, Punch JD, Hanson JA, Dickinson DM, Wolfe RA, Port FK, Agodoa LY. Impact of pre-existing donor hypertension and diabetes mellitus on cadaveric renal transplant outcomes. *Am J Kidney Dis.* 2000 Jul;36(1):153-9.
- Olivetti G,** Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med.* 1997 Apr 17;336(16):1131-41.
- Panichi V,** Rizza GM, Taccola D, Paoletti S, Mantuano E, Migliori M, Frangioni S, Filippi C, Carpi A. C-reactive protein in patients on chronic hemodialysis with different techniques and different membranes. *Biomed Pharmacother.* 2006 Jan;60(1):14-7.

Pannekoek H, Veerman H, Lambers H, Diergaarde P, Verweij CL, van Zonneveld AJ, van Mourik JA. Endothelial plasminogen activator inhibitor (PAI): a new member of the Serpin gene family. *EMBO Journal* 1986; 5:2539-2544.

Podor TJ, Peterson CB, Lawrence DA, Stefansson S, Shaughnessy SG, Foulon DM, Butcher M, Weitz JL. Type 1 plasminogen activator inhibitor binds to fibrin via vitronectin. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275:1 9788-1 9794.

Ren S e Shen GX. Impact of antioxidants and HDL on glycated LDL-induced generation of fibrinolytic regulators from vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1688-1693.

Righetti M, Ferrario GM, Milani S, Serbelloni P, Sessa A. [A single centre study about the effects of HFR on anemia]. *G Ital Nefrol* 2004 Nov-Dec;21 Suppl 30:S168-71.

Rosen GM, Pou J, Ramos CL. Free radicals and phagocytic cells. *FASEB J* 1995; 9:200-209.

Ryter SW, Morse D, Choi AMK. Carbon monoxide and bilirubin potential therapies for pulmonary/vascular injury and disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36: 175-182.

Schelotto C, Santoni O, Nasini MG, Pietrucci A, Caviglia PM, Tirota A, Repetto M, Carozzi S. [Two-chamber hemodiafiltration: comparison between exogenous reinfusion (PFD) and endogenous reinfusion (HFR)]. *G Ital Nefrol* 2004 Nov-Dec;21 Suppl 30:S111-6.

Sidoti A, Borracelli D, Biagioli M, Ghezzi PM. [Bicarbonate balance in hemodiafiltration (HDF): a comparison between two infusion methods of on-line prepared solution]. *G Ital Nefrol* 2004 Nov-Dec;21 Suppl 30:S177-80.

Sirker A, Zhang M, Murdoch C, Shah AM. Involvement of NADPH oxidases in cardiac remodelling and heart failure. *Am J Nephrol*. 2007;27(6):649-60.

Starkebaum G e Harlan JM. Endothelial-cell injury due to copper-catalyzed hydrogen-peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest* 1986; 77:1370-1376.

Stoker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, et al. Bilirubin Is an Antioxidant of Possible Physiological Importance. *Science*. 1987; 235:1043-1046.

Swiatkowska M, Szemraj J, Al Nedawi KN, Pawiowska Z. Reactive oxygen species upregulate expression of PAI-1 in endothelial cells. *Cell Mol Biol Lett* 2002; 7:1065-1071.

Tracz MJ, Alam J, Nath KA. Physiology and pathophysiology of heme: implications for kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 414-420.

Van Meijer M e Pannekoek H. structure of PAI-1 and its function in fibrinolysis: an update. *Fibrynolisi* 1995; 9:263-276.

Van Mourik JA, Lawrence DA, Loskutoff DJ. Purification of an inhibitor of plasminogen activator (antiactivator) synthesized by endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 1984; 259:14914-14921.

Vaughan DE. PAI-1 and atherothrombosis. *J Thromb Haemost* 2005; 3:1879-1883.

Verma A, Hirsch DJ, Glatt CE, et al. Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science*. 1993; 259:381-384.

Xu D, Neville R, Finkel T. Homocysteine accelerates endothelial cell senescence. *FEBS Lett* 2000; 470: 20-24.

Yamamoto K, Saito H. A pathological role of increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 in human or animal disorders. *Int J Hematol* 1998; 68: 371-385.

Young, Woodside JW. Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Phatol.* 2001; 54(3):176-186.

Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994;74:139-162.

Zhao W, Spitz DR, Oberley LW, Robbins ME. Redox modulation of the pro-fibrogenic mediator plasminogen activator inhibitor-1 following ionizing radiation. *Cancer Res* 2001; 61:5537-5543.

Zoccali C. Cardiovascular risk in uremic patients-is it fully explained by classical risk factors? *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 454-7.

Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G. Novel cardiovascular risk factors in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Jan;15 Suppl 1:S77-80.