



Università degli Studi “G. d’Annunzio”

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Corso di Laurea in
Tecniche di Fisiopatologia Cardiocircolatoria e
Perfusione Cardiovascolare

Presidente: Prof. Gabriele Di Giammarco

TESI DI LAUREA SPERIMENTALE

**“Influenza dell’infiammazione nel determinismo e
aggravamento dell’insufficienza renale nei
pazienti cardiocirurgici”**

Laureanda:
Matera Antonella

Relatore:
Chiar.mo Prof. Di Giammarco
Gabriele

INDICE

INTRODUZIONE

CAPITOLO I - SISTEMA IMMUNITARIO-	2
1.COMPONENTI DEL SISTEMA IMMUNITARIO	3
1.1. TIPO D'IMMUNITÀ	5
1.2.1 TIPO D'IMMUNITÀ	5
1.2.2. IMMUNITÀ SPECIFICA	6
1.3.1. CITOCHINE	7
1.3.2. CARATTERISTICHE GENERALI DELLE CITOCHINE	7
1.3.3. CLASSIFICAZIONE FUNZIONALE DELLE CITOCHINE	9
1.4.1. MEDIATORI DELL'IMMUNITÀ INNATA	11
1.4.2. MEDIATORI DELL'IMMUNITÀ SPECIFICA	18
CAPITOLO II - IL SANGUE-	20
2.1. I GLOBULI BIANCHI	24
2.2. CLASSIFICAZIONE DEI GLOBULI BIANCHI	25
CAPITOLO III - L'INFIAMMAZIONE-	30
3.1. L'INFIAMMAZIONE ACUTA	31
3.1.1. MEDIATORI CHIMICI DELL'INFIAMMAZIONE ACUTA	33
CAPITOLO IV - I RENI-	36
4.1. L'INSUFFICIENZA RENALE	46
4.2. AKIN	48

4.3. L'INSUFFICIENZA RENALE ACUTA SECONDO I CRITERI RIFLE	49
4.4. L'INSUFFICIENZA RENALE ACUTA SECONDO I CRITERI AKIN	50
4.5. CAUSE DELL'INSUFFICIENZA RENALE ACUTA	51
4.6. FISIOPATOLOGIA DELL'IRA	52
4.6.1. IRA PRE-RENALE	52
4.6.2. IRA RENALE	54
4.6.3. IRA POST-RENALE	56
4.7. LIMITI DELLE MISURE CONVENZIONALI DI FUNZIONALITÀ RENALE	57
4.7.1. CRATININA SIERICA	57
4.7.2. UREA SIERICA	58
4.7.3. CISTATINA-C	60
CAPITOLO V -PARTE SPERIMENTALE-	62
5.1. SCOPO DEL LAVORO	62
5.2. MATERIALI E METODI	63
5.3. CASISTICA ESAMINATA	68
5.4. ANALISI STATISTICA	70
5.6. RISULTATI E GRAFICI	72
5.7. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	74
BIBLIORAFIA	79

-INTRODUZIONE-

Tutte le evoluzioni tecniche e metodologiche, a partire dal momento in cui la Cardiocirurgia ha superato le prime fasi sperimentali, sono e continuano ad essere orientate a rendere sempre meno rilevanti i danni indotti dalla circolazione extracorporea.

Nonostante il continuo aumento della biocompatibilità dei materiali utilizzati, l'applicazione del bypass cardiopolmonare crea un sistema misto *biologico* (paziente) e *meccanico* (macchina cuore-polmoni e materiali estranei), caratterizzato da anomalie fisicochimiche e fisiopatologiche di varia entità.

Si generano così, nel paziente, delle risposte di adattamento mediate e delle risposte difensive nei confronti della nuova situazione che fondamentalmente, viene tuttora considerata come una potente aggressione all'omeostasi generale.

In tutti i pazienti sottoposti a circolazione extracorporea avvengono delle importanti modificazioni delle normali funzioni corporee.

Nella risposta sistemica alla CEC si scatena una fase infiammatoria caratterizzata da una complessa sequenza di eventi con attivazione finale di componenti cellulari e tissutali. L'attivazione cellulare, l'endotossiemia, i danni indotti dall'ischemia e dalla successiva riperfusione determinano la complessa formazione di mediatori anti-infiammatori e pro-infiammatori.

Il diverso grado di modulazione di questi fenomeni determina un'inevitabile attivazione a catena che provoca sin a quadri devastanti come la cosiddetta SIRS (*Systemic Inflammatory Response Syndrome* o *Sindrome della Risposta Infiammatoria Sistemica*).

CAPITOLO I

-IL SISTEMA IMMUNITARIO-

Il termine “immunità” deriva dalla parola latina *Immunitas*, che si riferiva all’esonero da certi doveri civili e alla non perseguibilità penale di cui godevano i romani in carica; da un punto di vista storico, il termine immunità ha significato la protezione dalle malattie, ed in particolare delle malattie infettive. Le cellule e le molecole responsabili di tale protezione compongono il cosiddetto sistema immunitario e la loro risposta coordinata all’introduzione di sostanze estranee è globalmente denominata risposta immunitaria.

Il sistema immunitario rappresenta un prodotto dell’evoluzione estremamente specializzato e complesso. La sua funzione è quella di proteggere l’organismo dall’attacco di agenti estranei (detti antigeni) mediante la sintesi di molecole altamente specializzate quali gli anticorpi e la generazione di elementi cellulari quali linfociti e fagociti che contrastano e distruggono gli antigeni. Una caratteristica fondamentale del sistema immunitario quindi è quella di distinguere tra strutture endogene ed esogene, che non costituiscono un pericolo e che dunque possono e devono essere preservate (self) e le strutture endogene ed

esogene che invece si dimostrano nocive per l'organismo, e che devono quindi essere eliminate (non self). Secondo le più recenti teorie sul sistema immunitario, si distingue un *non-infectious self* da un *infectious self*. La discriminazione tra self e non self avviene a livello molecolare ed è mediata da particolari strutture cellulari: i recettori Tool-like, i recettori dei linfociti T, i MHC e gli anticorpi, che consentono la presentazione ed il riconoscimento di componenti dell'agente lesivo "antigene".

1.1. COMPONENTI DEL SISTEMA IMMUNITARIO

Come tutte le cellule ematiche, le cellule del sistema immunitario derivano da un precursore comune, a livello del midollo osseo. Le risposte immunitarie specifiche sono dovute ai linfociti che maturano in organi linfoidei primari rappresentati nei mammiferi dal midollo osseo e dal timo. I linfociti, poi, dagli organi linfoidei centrali, migrano, in epoca perinatale, alla periferia e tendono ad aggregarsi in formazioni linfoidei più o meno grandi dette organi e tessuti linfoidei secondari o periferici rappresentati da: linfonodi, tonsille, milza, appendice, placche di Peyer dell'intestino ed altri aggregati di tessuto linfatico distribuiti in tutto il corpo. A livello degli organi linfoidei periferici avviene il contatto con l'antigene, che provoca una risposta immunitaria. I linfociti si compongono di sottopopolazioni distinte, molto diverse nelle loro funzioni e nei loro prodotti proteici.

- ◇ **LINFOCITI B** : sono le uniche cellule capaci di produrre anticorpi. Il loro recettore per l'antigene è rappresentato da anticorpi fissati alla membrana cellulare. L'interazione dell'antigene con questi anticorpi di superficie, determina l'attivazione dei linfociti B che si trasformano in plasmacellule

capaci di produrre e secernere anticorpi e in cellule B della memoria che intervengono nella risposta secondaria, cioè in una seconda stimolazione da parte dello stesso antigene. Gli anticorpi o immunoglobuline sono proteine specifiche che riescono ad identificare in maniera precisa e pressoché univoca specifici antigeni. Sono note cinque classi di Ig (dette M, A, G, D, ed E). Una volta che l'antigene patogeno viene circondato da anticorpi sensibili ad uno o più antigeni del patogeno stesso, viene attivato il sistema del complemento che provvede alla lisi del patogeno e richiama i macrofagi che “divorano” il patogeno.

- ◇ **LINFOCITI T** : derivano dal midollo osseo e successivamente migrano nel timo dove avviene la maturazione. I linfociti T sono a loro volta suddivisi in altre sottopopolazioni : Linfociti T helper e Linfociti T citotossici. Le funzioni principali dei linfociti T sono quelle di mediare tutte le risposte immuni verso gli antigeni proteici e di servire come cellule effettrici per eliminare i microbi intracellulari. Le cellule T non producono anticorpi e presentano sulla loro superficie una serie di molecole che costituiscono il sistema recettoriale per l' antigene, il cosiddetto TCR. I linfociti T helper e citotossici sono in grado di riconoscere solo peptidi antigenici legati a proteine codificate dai geni del cosiddetto complesso maggiore di istocompatibilità, l' MHC, espressi sulla membrana delle cellule accessorie. I linfociti T, quindi, riconoscono e rispondono solo ad antigeni associati alla superficie cellulare e non ad antigeni solubili. I linfociti T helper attivati producono e secernono citochine che a loro volta

agiscono su altre cellule attivandole, mentre i linfociti T citotossici uccidono direttamente la cellula infettata.

1.2.TIPO DI IMMUNITÀ

La difesa nei confronti dei patogeni si realizza attraverso risposte precoci mediate dall'immunità innata, chiamata anche immunità naturale; e su risposte più tardive mediate dall'immunità specifica- acquisita.

1.2.1. IMMUNITÀ INNATA

Consiste di meccanismi di difesa non specifici presenti fin dalla nascita di un individuo, quindi pre-esistenti all'infezione, capaci di reagire con rapidità contro patogeni, ma che si ripetono in modo sostanzialmente identico al ripetersi dell'infezione stessa. Rappresentano la prima vera barriera di difesa dell'organismo agli agenti patogeni. I componenti principali dell'immunità innata sono :

1. le barriere fisico-chimiche quali la pelle, la mucosa vaginale (il cui pH impedisce la crescita di batteri), la mucosa bronchiale (caratterizzata da muco e cellule ciliate), la mucosa nasale, la saliva e le lacrime (contenenti lisozima);
2. alcune proteine ematiche, tra cui i componenti del sistema del complemento ed altri mediatori dell'infiammazione;
3. le cellule fagocitiche (macrofagi) ed altri leucociti ad attività citotossica naturale (natural killer);

4. numerose proteine, fra cui le citochine e le chemochine, che regolano e coordinano molte funzioni svolte dalle cellule dell'immunità innata.

I meccanismi dell'immunità innata sono attivati da strutture molecolari comuni a gruppi di patogeni simili tra loro e non possono discriminare le sottili differenze che esistono tra le diverse sostanze estranee. L'immunità innata è immediata (0-96 h), altamente efficiente e non ha memoria immunologica.

1.2.2. IMMUNITÀ SPECIFICA

Agisce in senso specifico, ossia per ogni tipo di stimolo viene innescata una risposta che vale per quello stimolo e non per altri. Questa specificità assicura un alto grado di efficienza, in quanto evita le risposte non necessarie. Ha memoria immunologica e i tempi di risposta sono relativamente lunghi (da 96 h in poi). I componenti dell'immunità specifica sono i linfociti ed i loro prodotti, gli anticorpi. L'immunità specifica può essere di due tipi :

1. **UMORALE** (mediata da anticorpi). Le cellule responsabili dell'immunità umorale sono i linfociti B. Tale immunità può essere trasferita in soggetti non immunizzati (vergini) mediante plasma o siero
2. **CELLULO-MEDIATA** (mediata dai linfociti T). Le cellule responsabili dell'immunità cellulo-mediata sono i linfociti T. Tale immunità può essere trasferita in individui vergini mediante linfociti T prelevati da un individuo immunizzato.

Sono indispensabili entrambe le immunità specifiche perché, mentre l'immunità umorale costituisce un meccanismo di difesa nei confronti di microbi

extracellulari e delle loro tossine, dal momento che gli anticorpi possono legarsi a tali agenti ed eliminarli, l'immunità cellulo-mediata è indispensabile per la difesa contro microrganismi intracellulari, come virus e batteri, che proliferano all'interno delle cellule dell'ospite e quindi risultano essere inaccessibili agli anticorpi, ma accessibili ai linfociti T specifici che determinano la loro morte.

1.3.1. LE CITOCHINE

La fase effettrice dei meccanismi aspecifici di difesa e dell'immunità mediata da linfociti T nei confronti di organismi estranei, come batteri e virus, è in gran parte mediata da proteine con azione di tipo ormonale, denominate *Citochine*, prodotte soprattutto dai linfociti T e dai macrofagi. Costituiscono anche il linguaggio molecolare tra le diverse cellule del sistema immunitario e tra queste e altri sistemi. Le citochine sono prodotte dai macrofagi sono anche dette monochine, quelle prodotte dai linfociti linfocine, e quelle dotate di proprietà chemio tattica chemochine. Tutte le suddette tipologie sono indicate con il medesimo termine: **“Interleuchine”**.

1.3.2. CARATTERISTICHE GENERALI DELLE CITOCHINE

Le citochine sono polipeptidi prodotti in risposta ad antigeni in grado di mediare e regolare le risposte immunitarie ed infiammatorie. Sebbene strutturalmente molto diverse, esse hanno in comune alcune caratteristiche:

- ◇ La secrezione delle citochine è un evento di breve durata ed auto-limitato. Queste, di solito, non sono immagazzinate nelle cellule, ma la loro sintesi

richiede la trascrizione di geni fin ad allora silenti, attivati a seguito della stimolazione della cellula.

- ◇ Le azioni svolte dalle citochine sono spesso pleiotropiche e ridondanti. Il termine “pleiotropismo” si riferisce alla capacità di una singola citochina di svolgere la propria azione su più di un tipo cellulare diverso. Se da un lato tale caratteristica permette alla citochina di mediare effetti biologici differenti, dall’altro essa limita notevolmente il suo potenziale impiego terapeutico, dal momento che la sua somministrazione per ottenere un certo effetto può accompagnarsi ad una serie di effetti indesiderati. Il termine “ridondanza” si riferisce al fatto che sovente uno stesso effetto biologico è mediato da più di una citochina diversa.
- ◇ Le citochine influenzano spesso la sintesi e l’azione di altre citochine. La capacità di una citochina di stimolare la produzione di altre citochine porta all’accelerarsi di una cascata, in cui una seconda e una terza citochina possono mediare l’effetto biologico della prima.
- ◇ L’azione delle citochine può essere locale o sistemica. La maggior parte delle citochine svolge la propria azione in prossimità del sito di sintesi, sulla stessa cellula che l’ha prodotta (azione autocrina) o su cellule immediatamente vicine (azione parocrina). Quando vengono prodotte in grandi quantità, alcune citochine possono entrare in circolo ed agire a distanza dal sito di produzione (azione endocrina).
- ◇ Le citochine, al pari di altri ormoni polipeptidici, svolgono la loro azione legandosi a recettori specifici espressi sulla membrana delle cellule bersaglio. Tali recettori spesso legano le citochine con un’affinità molto

elevata. Per occupare il recettore e svolgere la propria azione biologica sono solitamente sufficienti concentrazioni di citochina molto basse.

- ◇ L'espressione dei recettori per citochine, e quindi la responsabilità ad esse, è regolata da segnali esterni alla cellula. La stimolazione dei linfociti T o B da parte dell'antigene porta ad un aumento dell'espressione dei recettori per citochine; l'espressione dei recettori può anche essere regolata da altre citochine o dalla citochina stessa, che legandosi al recettore innesca circuiti di amplificazione della risposta o di un *feedback* negativo.
- ◇ La risposta delle cellule bersaglio alla maggior parte delle citochine consiste in modificazioni dell'espressione genica, con conseguente acquisizione di nuove funzioni. Vi sono due eccezioni a questa caratteristica: le chemochine, che promuovono una rapida migrazione delle cellule senza bisogno dell'espressione di nuovi geni, ed il fattore di necrosi tumorale (TNF), che induce morte delle cellule bersaglio, anche in questo caso senza bisogno dell'espressione di geni fino ad allora .

1.3.3. CLASSIFICAZIONE FUNZIONALE DELLE CITOCHINE

Il gruppo delle citochine comprende circa una ventina di molecole e diverse in base alla loro azione biologica svolte nell'ambito nell'immunità innata o specifica. In base alle loro azioni biologiche principali suddivideremo le citochine in tre gruppi:

1. *Citochine che mediano e regolano l'immunità innata*, prodotte soprattutto dai fagociti mononucleati in risposta agli agenti infettivi. La maggior parte di queste citochine alimenta reazioni infiammatorie precoci

ai microbi; alcune svolgono anche una funzione regolatrice su queste risposte.

2. *Citochine che mediano e regolano l'immunità specifica*, principalmente prodotte dai linfociti T in risposta al riconoscimento di antigeni estranei. Alcune di esse svolgono prevalentemente una funzione regolatrice sulla crescita e differenziazione di varie popolazioni linfocitarie, svolgendo quindi un ruolo molto importante nella fase di attivazione delle risposte immunitarie T-dipendenti.
3. *Citochine che stimolano l'emopoiesi*, prodotte da cellule stromali del midollo osseo, leucociti ed altri tipi cellulari: esse stimolano la crescita e la differenziazione dei leucociti immaturi.

In generale, le citochine appartenenti all'immunità innata e specifica sono prodotte da popolazioni cellulari diverse, ed agiscono su cellule bersaglio differenti; questa dicotomia non è tuttavia assoluta, poichè una stessa citochina può essere prodotta nel corso di risposte innate e di risposte specifiche, e citochine diverse possono svolgere azioni parzialmente sovrapponibili.

1.4.1. MEDIATORI DELL'IMMUNITÀ INNATA

FATTORE DI NECROSI TUMORALE

Il TNF è il principale mediatore della risposta infiammatoria acuta ai batteri gram-negativi ed a altri agenti infettivi; esso è anche responsabile di molte manifestazioni sistemiche che spesso complicano le infezioni. Il TNF è spesso chiamato TNF- α ; sia per ragioni storiche che per distinguerlo da un'altra citochina ad esso strettamente correlata, TNF- β o linfotossina. Il TNF fu originariamente identificato come una sostanza presente nel siero di animali trattati con LPS batterico (o endossina), capace di mediare *in vivo* la necrosi di certi tumori. Possiede due distinti recettori: TNF-RI che determina l'attivazione dell'apoptosi e il TNF-RII che attiva i fattori di trascrizione. Stimola inoltre le cellule endoteliali a esprimere molecole di adesione per neutrofili, linfociti e monociti e a secernere chemochine, stimola i fagociti a produrre IL-1 e IL-6, induce la sintesi di G-CSF, ha un effetto antivirale simile all'IFN α e aumenta l'espressione del MHC di classe I, infine, induce l'apoptosi su alcuni tipi cellulari. Generalmente è considerato anche un pirogeno insieme all'IL-1 con aumento della sintesi di prostaglandine e stimola insieme all'IL-1 e l'IL-6 gli epatociti a produrre: alcune proteine della fase acuta, un soppressore della contrattilità miocardica e del tono della muscolatura vascolare, scatenanti l'aumento dell'espressione da parte delle cellule endoteliali del fattore tissutale, ed è la maggiore causa della necrosi tumorale da TNF. Ad alte concentrazioni provoca infatti shock settico con collasso cardiovascolare, coagulazione intravascolare disseminata e alterazioni metaboliche.

INTERLEUCHINA-1

Storicamente, l'IL-1 è stata "scoperta" tante volte, secondo ciascuna delle sue molteplici azioni: il mediatore endogeno della febbre, lo stimolo della risposta della fase acuta, il riassorbimento della cartilagine e dell'indebolimento muscolare nelle malattie infettive. Solo recentemente tutti questi effetti sono stati attribuiti ad un singolo mediatore. L'IL-1 è una glicoproteina con PM 17 kD, codificata da due geni, che danno origine a due proteine differenti solo per il punto isoelettrico, α e β . Le due proteine presentano il 30% di omologia, ma agiscono sullo stesso recettore. Oltre al recettore di tipo I, espresso sulla quasi totalità delle cellule; sui linfociti B è presente il recettore di tipo II; mentre il primo trasduce tutti gli effetti della IL-1, il secondo è un recettore fasullo, una sorta di "specchietto per le allodole" che compete con il vero recettore. I geni per la IL-1 sono stati clonati e le proteine vengono ottenute con ingegneria genetica.

Diversi tipi di cellule sono capaci di produrre IL-1: oltre che i macrofagi, la producono cheratinociti, neutrofili, cellule mesangiali renali, epitelio corneale, linfociti B stimolati, fibroblasti e cellule endoteliali.

Le azioni dell'IL-1, IL-6 e TNF sono molto simili nonostante agiscano su recettori completamente diversi; la spiegazione di questo fenomeno risiederebbe nel fatto che i recettori delle due citochine trasducono il segnale utilizzando proteine analoghe, ed attivano gli stessi fattori di trascrizione.

INTERLEUCHINA-6

L'IL-6 è una proteina glicosilata di 23 –30 kDa. Il recettore di IL-6 è un complesso di due proteine non legate covalentemente. Il recettore di IL-6 di 80 kDa di peso molecolare è stato recentemente clonato ed è un membro “hemopoietin receptor family”. La proteina recettoriale di 80 kDa è associata ad una componente di 130 kDa, probabilmente coinvolta nella trasduzione del segnale. Una grande varietà di tipi cellulari sono in grado di produrre IL-6 quando appropriatamente stimolati, fra cui monociti-macrofagi, linfociti T e B, cellule endoteliali, cellule muscolari vasali e mesengiali, fibroblasti. La produzione è indotta da stimoli infiammatori, in particolare prodotti batterici (es. endotossine) e citochine quali IL-1 e TNF. IL-6 è prodotta durante la risposta immune e regola la proliferazione e differenziazione di linfociti T e B. Tuttavia, nella maggior parte dei casi, IL-6 è inattiva di per sé in presenza di altri stimoli, uno dei quali può essere IL-1. L'effetto proliferativo su cellule B ha rilevanza fisiopatologia in alcune patologie neoplastiche o paraneoplastiche che interessano questo stipite cellulare. IL-6 è stata identificata come *hepatocyte stimulating factor*; questa citochina agisce direttamente sull'epatocita inducendo produzione di alcune proteine di fase acuta quale il fibrinogeno e la Proteina C reattiva. IL-6 è stata anche scoperta come interferone β_2 , in quanto cross-reagent con anticorpi anti-interferone. Tuttavia, IL-6 non ha attività antivirale apprezzabile. Nell'urina è stata identificata una forma solubile del recettore di IL-6 ed in alcuni patologie renali (es. glomerulonefrite membranosa) si misura IL-6 a livello urinario. Collettivamente queste osservazioni fanno pensare che IL-6 possa essere coinvolta nella patogenesi di alcune malattie renali, ma la sua

importanza rimane da definirsi. IL-6 agisce a livello del midollo emopoietico con attività simil-CSF (Fattore Stimolante le Colonie). In particolare, IL-6 è attiva a livello della linea megacariocitica e, quando somministrata in vivo nel topo e nei primati, aumenta il numero di piastrine circolanti. Questa attività emopoietica di IL-6 la rende oggetto di interesse applicativo. Come sopra menzionato, IL-6 è legata ad IL-1 nel senso che è indotta in seguito ad esposizione agli stessi stimoli ed agisce in parte sulle stesse cellule bersaglio. Inoltre, IL-1 è un potente induttore di IL-6 in varie cellule. È quindi, ragionevole chiedersi se IL-6 non costituisca il mediatore ultimo di alcune, se non di tutte, le azioni di IL-1. I risultati disponibili suggeriscono che, mentre per alcuni organi o cellule (timociti, fegato) IL-6 indotta da IL-1 è importante nel determinare lo spettro di risposte osservate in vivo o in vitro, su altre cellule bersaglio (es. endoteli vascolari). IL-1 agisce in quanto tale indipendentemente dall'induzione concomitante di IL-6.

INTERLEUCHINA 8

Citochina con azione pro-infiammatoria rilasciata da cellule endoteliali, monociti, linfociti T ed indicata come importante mediatore del danno tessutale e del potenziamento dell'azione dannosa dei leucociti; il suo aumento è direttamente proporzionale all'aumento della troponina I, quale indice di dannomiocardico. Inoltre induce una “down-regulation” degli inibitori tissutali delle proteinasi 1 (TIMP-1), favorendo la generazione della placca aterosclerotica instabile.

IL-8 può funzionare da chemoattrattante per le cellule-T ,inoltre ricopre un ruolo nell'angiogenesi, infatti può indurre la proliferazione e la migrazione delle cellule muscolari lisce vascolari .

INTERLEUCHINA-10

L'IL10 è un omodimero di 34 kD prodotto prevalentemente dai macrofagi attivati (esempio di feedback negativo, visto che la sua azione si esplica proprio sulle funzioni macrofagiche); ma anche cheratinociti e linfociti T. Differisce dalle altre citochine viste finora perché la sua azione è principalmente inibitoria della risposta immunitaria; fu, infatti, originariamente scoperta per la sua capacità di bloccare la sintesi di INF- γ . Inibisce altresì la produzione di IL-12 e di chemochine, l'espressione di molecole di membrana costimolatrici (B7.1 e B7.2) e di molecole MHC di classe II da parte dei macrofagi. Di significato un po' oscuro appaiono altre sue funzioni come l'induzione dell'apoptosi, lo stimolo alla proliferazione e l'attivazione dei linfociti B.

INTERFERONI DI TIPO I

Il termine “interferone” si riferisce alla capacità di queste molecole di interferire con l’infezione virale, bloccandone la replicazione e la disseminazione. Gli interferoni (IFN) di tipo I comprendono due gruppi di proteine sierologicamente distinte. Il primo gruppo, chiamato nell’insieme IFN- α , è costituito da una famiglia di circa 20 polipeptidi strutturalmente correlati del peso molecolare di circa 18 kD, ciascuno codificato da un singolo gene. Alcuni ricercatori suddividono attualmente la famiglia dell’IFN- α in due sottogruppi, IFN- $\alpha 1$ e IFN- $\alpha 2$, sulla base dell’omologia relativa nella sequenza aminoacidica.

Le preparazioni naturali di IFN- α impiegate in terapia sono di solito una miscela di queste molecole, ed i sieri neutralizzanti reagiscono con tutti i membri della famiglia. La principale sorgente di IFN- α sono i fagociti mononucleati; per tale motivo, l’IFN- α è talvolta chiamato interferone leucocitario.

Il secondo tipo sierologico di IFN di tipo I è costituito dal prodotto di un singolo gene, una glicoproteina del peso di 20 kD chiamata IFN- β , prodotto soprattutto da fibroblasti (interferone fibroblastico). Molte cellule sono tuttavia in grado di produrre sia IFN- α sia IFN- β .

L’infezione virale è il più potente segnale naturale capace di evocare la sintesi di IFN di tipo I. Sperimentalmente, la produzione di IFN di tipo I può essere comunemente indotta dalla presenza in coltura di molecole sintetiche di RNA a doppia elica. Sia l’IFN- α sia l’IFN- β vengono secreti anche durante le risposte immunitarie agli antigeni; in questo caso, le cellule T attivate stimolano i fagociti mononucleati a sintetizzare IFN. Sebbene siano strutturalmente molto differenti,

l'INF- α e INF- β si legano ad uno stesso recettore, e provocano effetti biologici simili.

Gli IFN di tipo I possiedono cinque principali attività biologiche:

- ◇ Inibitori della replicazione virale tramite la sintesi di numerose enzimi (ex 2-5-oligoadenilato sintetasi) che interferiscono con la trascrizione dell'RNA o del DNA virale. Attività prevalentemente paracrina, ma anche autocrina.
- ◇ Inibitori della proliferazione cellulare (stessi enzimi o altri che modificano metabolismo aminoacidico).
- ◇ Potenziatori dell'effetto litico degli NK.
- ◇ Modulatori di espressione delle molecole MHC (aumento classe I, diminuzione classe II).
- ◇ Induzione della generazione di cellule Th1 tramite l'incrementata espressione da parte dei linfociti T di recettori per l'IL-12 (che incrementa la produzione di INF γ e circuito di amplificazione).

CHEMOCHINE

Con questo termine, derivato dalle parole **chemotassi** e **citochine**, si definisce una famiglia relativamente omogenea di circa 50 polipeptidi del peso molecolare di 8-12 kD, accomunati dalla presenza di due ponti disolfuro. Sono prodotte dai fagociti mononucleati, dalle cellule endoteliali, dalle cellule epiteliali, dai fibroblasti, dalle piastrine e dai linfociti T stimolati dall'Ag. La loro funzione principale consiste nello stimolare la locomozione (chemiotassi) dei leucociti verso i focolai d'infezione e nell'attivarli. Svolgono anche un ruolo fondamentale

nel regolare il traffico dei leucociti attraverso i tessuti linfoidei periferici e si ipotizza regolino il traffico T cellulare dal sangue periferico al sistema nervoso centrale. Una recente scoperta ha evidenziato come molte di esse siano profondamente coinvolte nello sviluppo embrionale di molti organi.

La nomenclatura attuale le suddivide in due famiglie in base alla loro struttura chimica e alle loro caratteristiche funzionali: chemochine CC (o β -chemochine) in cui i due residui di cisteina che partecipano alla formazione dei ponti disolfuro sono adiacenti; chemochine CXC (o α -chemochine) se sono separati da un aminoacido. Le chemochine CXC agiscono soprattutto sui neutrofili, mentre le chemochine CC sui monociti, linfociti ed eosinofili.

1.4.2. MEDIATORI DELL'IMMUNITÀ SPECIFICA

INTERFERONE- γ

IFN- γ è una glicoproteina prodotta da cellule CD4 e CD8 attivati. Le sue principali attività biologiche sono: attivare i macrofagi inducendo la sintesi di enzimi che consentono ai macrofagi di operare il killing (fattore armante i macrofagi), stimolare lo sviluppo dei linfociti Th1 e inibire quello dei Th2, attivare neutrofili e cellule NK, attivare le cellule endoteliali favorendo l'adesione dei linfociti T alle pareti vasali e la loro extravasazione a livello dei focolai infiammatori, ma la sua azione è più modesta dell'interferone di tipo I.

LINFOTOSSINA

È una glicoproteina molto simile al TNF- α e si lega in parte al recettore per il TNF- α ; è prodotta dai linfociti T attivati e da altre cellule. Si comporta in genere come fattore paracrino e non provoca danni sistemici.

CAPITOLO II

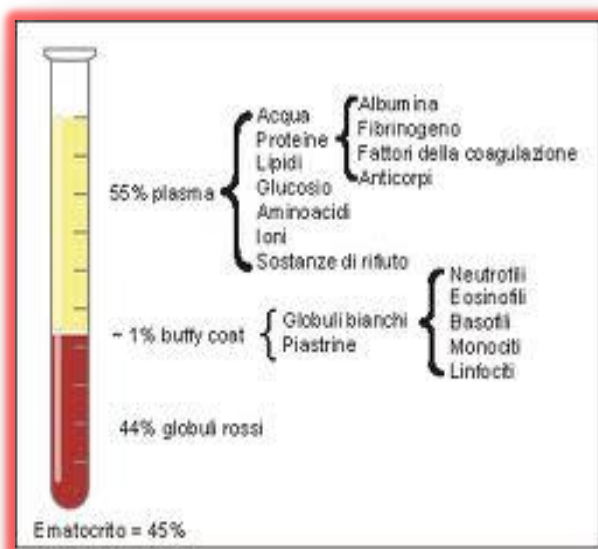
-IL SANGUE-

Il sangue è da sempre visto come un liquido con caratteristiche quasi mistiche. Gli uomini hanno indubbiamente associato il sangue alla vita da quando hanno iniziato a modellare arnesi e cacciare animali: un animale ferito che perda sangue si indebolisce e muore, e la logica conclusione è che il sangue è necessario per l'esistenza.

I medici dell'antica Cina correlarono il sangue al flusso di energia del corpo. Essi scrissero sulla circolazione del sangue nel cuore e nei vasi molto tempo prima che Willam Harvey la descrisse nel diciassettesimo secolo in Europa. In Cina le variazioni del flusso sanguigno erano utilizzate come mezzi diagnostici. I medici cinesi erano in grado di riconoscere circa 50 variazioni del polso. Il sangue era considerato un liquido vitale, da conservare e mantenere, e il salasso dei pazienti non era una forma di trattamento praticato comunemente.

Al contrario, le civiltà Occidentali credevano che le malattie fossero causate da spiriti maligni circolanti nel sangue e che il metodo per allontanare questi spiriti fosse rimuovere il sangue che li conteneva. Tuttavia il sangue era stato

riconosciuto come essenziale, quindi il salasso doveva essere praticato giudiziosamente. Le vene venivano aperte con bisturi o con strumenti taglienti (*venectomia*) oppure venivano applicate sulla cute delle sanguisughe. Nell'antica India, le sanguisughe erano considerate il trattamento elettivo in quanto si riteneva che fossero in grado di distinguere il sangue sano da quello infetto. Non ci sono prove scritte di venectomia nell'antico Egitto, ma Galeno e Pergamo nel secondo secolo dopo Cristo hanno influenzato la medicina Occidentale per quasi 2000 anni sostenendo la tecnica del salasso come trattamento per la maggior parte dei disturbi. La sede il tempo e la frequenza del salasso dipendeva dalla patologia, e i medici erano istruiti a rimuovere una quantità di sangue sufficiente a portare il paziente sul punto di svenire. Nel corso degli anni, questa pratica ha indubbiamente ucciso più persone rispetto a quelle che ha curato. Ancora più sorprendente è che ancora nel 1923 un testo di medicina americano indicava il salasso come una terapia per alcune patologie infettive come la polmonite. Ora che conosciamo l'importanza del sangue nella risposta immunitaria, è improbabile



che la medicina moderna possa praticare la rimozione del sangue come strumento non specifico per trattare varie patologie.

Il sangue costituisce 1/4 del liquido extracellulare, l'ambiente interno che bagna le cellule e agisce da

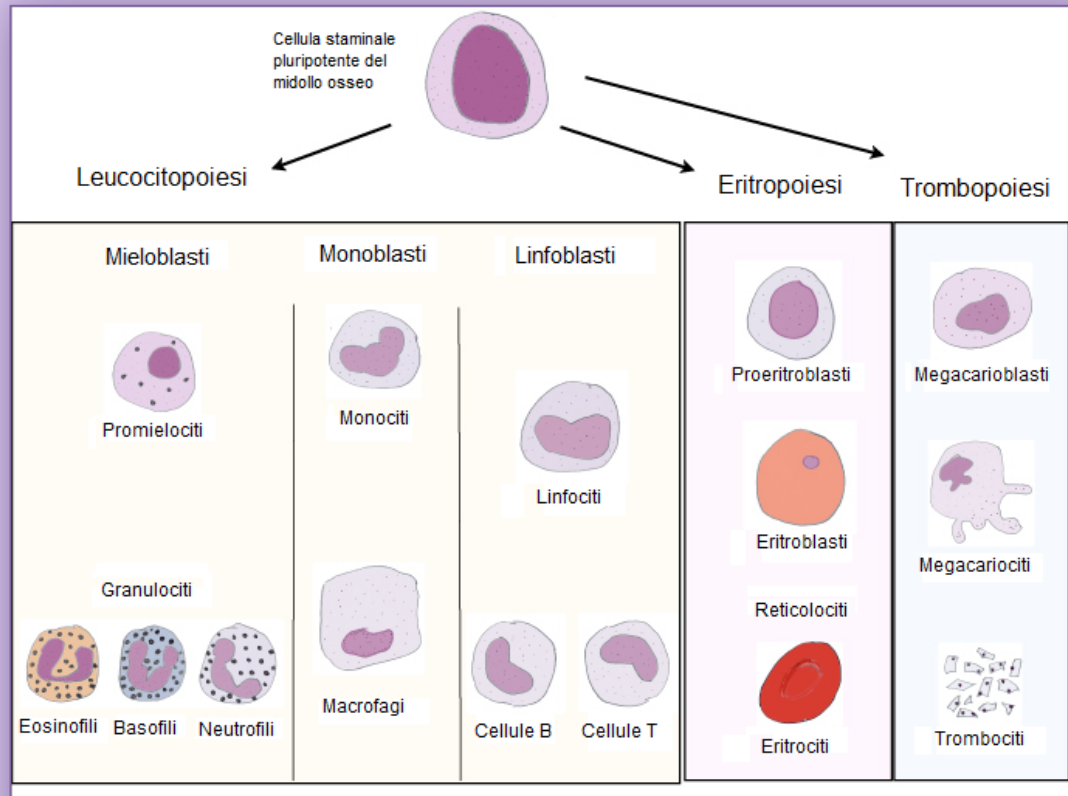
tampone tra le cellule e l'ambiente esterno. Il sangue è la componente circolante del liquido extracellulare, responsabile del trasporto di sostanza fra i vari distretti corporei. Il volume totale di sangue in un soggetto di 70 Kg corrisponde a circa il 7% del suo peso. Perciò, se si suppone che 1 Kg di sangue occupi il volume di 1L, un soggetto di 70 Kg ha circa 5 L di sangue. Di questo volume circa 2 L sono costituiti da cellule ematiche mentre i 3 restanti sono composti dal plasma.

Il plasma è la porzione liquida del sangue in cui sono sospesi gli elementi cellulari. L'acqua è il componente principale del plasma e corrisponde a circa il 92% del suo peso. Le proteine rappresentano un altro 7% il restante 1% è costituito da altre molecole organiche disciolte (amminoacidi, glucosio, lipidi, prodotti di scarto azotati), ioni (Na^+ , K^+ , Cl^- , H^+ , Ca^{++} , HCO_3^-), oligoelementi e vitamine, ossigeno e anidride carbonica. La composizione del plasma è identica a quella del liquido interstiziale salvo per la presenza delle proteine plasmatiche. Il fegato sintetizza la maggior parte delle proteine plasmatiche e le rilascia in circolo. Le albumine sono il tipo di proteine prevalente nel plasma, ma anche le globuline e la proteina della coagulazione, il fibrinogeno, sono comuni. Una classe particolare di globuline, le immunoglobuline, è sintetizzata e secreta da un particolare tipo di globuli bianchi, non dal fegato.

Nel sangue sono presenti tre principale elementi corpuscolati: i globuli rossi, detti eritrociti (erythros, rosso); i globuli bianchi, detti leucociti (leukos, bianco) e le piastrine; costituiscono il prodotto finito e funzionale di due sistemi cellulari la cui attività citoproductiva è regolata da fattori bioumorali, denominati citochine.

I sistemi cellulari, che presiedono alla produzione delle cellule circolanti, hanno sede nel midollo e negli organi linfoidei primari e secondari. L'eritopoiesi è

deputata alla produzione degli eritrociti, la granulomonocitopoiesi presiede alla produzione di granulociti neutrofili, eosinofili e basofili e di monociti e la piastrinopoiesi costituisce la mielopoiesi.



Questa ha sede esclusivamente nel midollo osseo. La linfocitopoiesi è il sistema cellulare che presiede alla produzione dei linfociti. Essa ha sede nel midollo osseo e timo (organi linfoidi primari), nei linfonodi, milza, tonsille e nelle placche del Peyer (organi linfoidi secondari). Infine con il termine di Emopoiesi si intende la mielo- più la linfocitopoiesi.

I due sistemi cellulari, mielo- e linfocitopoiesi, apparentemente separati tra di loro, ma regolati nella loro espansione e produzione da citochine diverse, hanno in realtà una cellula progenitrice comune denominata “cellula staminale totipotente”. Questa ha la peculiarità biologica di proliferare, dividersi e nel tempo auto mantenersi così che il compartimento delle cellule staminali rimane quantitativamente invariato nel tempo e viene definito “inesauribile”.

Il sistema mielopoietico nella sua articolazione eritro, granulo- e piastrinopoetica ha come compito primario quello di generare progenitori delle varie serie che, attraverso processi di proliferazione-maturazione, espandono e acquisiscono proprietà biologiche specifiche. Solo i globuli bianchi sono cellule complete, perché i globuli rossi perdono il nucleo nel momento in cui entrano in circolo, mentre le piastrine sono frammenti della cellula progenitrice, il megacariocita.

I globuli rossi trasportano ossigeno e anidride carbonica tra polmoni e tessuti; le piastrine sono fondamentali per la coagulazione, mentre i globuli bianchi svolgono un ruolo chiave nella difesa dell’organismo contro agenti esogeni come parassiti, batteri, virus.

2.1. I GLOBULI BIANCHI

La maggior parte dei globuli bianchi è molto più grande dei globuli rossi, però non sono altrettanto numerosi: ci sono circa 7000 globuli bianchi per ogni microlitro (μL) di sangue intero contro i 5 milioni di globuli rossi in $1\mu\text{L}$ di sangue intero. Nonostante i globuli bianchi circolino nel sangue il loro lavoro viene compiuto a livello tissutale piuttosto che all’interno del sistema circolatorio. Alcuni tipi possono vivere alcuni mesi fuori dai tessuti altri solo ore o giorni. I

globuli bianchi si dividono in sei gruppi principali: linfociti e plasmacellule che da essi derivano, monociti e macrofagi che da essi derivano, neutrofili, eosinofili, basofili in circolo e le mast cell o mastociti, correlati a i basofili nei tessuti, e le cellule dendritiche.

I differenti tipi di globuli bianchi possono essere raggruppati in base a caratteristiche morfologiche e funzionali comuni. I neutrofili, i monociti e i macrofagi sono definiti fagociti, per la loro capacità di inglobare e digerire particelle estranee come i batteri (Fagocitosi). I linfociti sono talvolta chiamati immunociti in quanto responsabili delle risposte immunitarie specifiche contro specifici antigeni. Basofili, eosinofili e neutrofili sono chiamati granulociti perché contengono inclusioni citoplasmatiche che conferiscono loro un aspetto granulare. Il nome dei differenti tipi di cellule deriva dalle proprietà tintoriali dei granuli: i granuli dei neutrofili non si colorano e pertanto sono considerati “neutri” , i granuli dei basofili si tingono di blu scuro con i coloranti basici (alcalini), mentre granuli degli eosinofili si tingono di rosa con il colorante acido eosina. In tutti e tre i tipi dei granulociti il contenuto dei granuli viene rilasciato nello spazio extracellulare in risposta ad alcuni tipi di segnale, in un processo noto come degranulazione.

2.2.CLASSIFICAZIONE DEI GLOBULI BIANCHI

- ◇ **NEUTROFILI:** sono i globuli bianchi più abbondanti (50-70% del totale) e più facili da identificare, per la presenza di un nucleo segmentato in tre-cinque lobi connessi da sottili ponti di materiale nucleico. A causa del nucleo segmentato, i neutrofili, vengono anche definiti leucociti

polimorfo-nucleati. I neutrofilo, come i globuli rossi, si formano nel midollo osseo. Occasionalmente un neutrofilo immaturo raggiunge la circolazione, dove può essere identificato dal nucleo a forma di ferro di cavallo. I neutrofilo tipicamente inglobano e uccidono da cinque a venti batteri nel corso della loro vita (uno o due giorni). La maggior parte dei neutrofilo rimane nel circolo, ma possono lasciarlo se vengono attratti a un sito extravascolare danneggiato o infetto. Oltre a inglobare batteri e particelle estranee, i neutrofilo rilasciano varie sostanze chimiche, tra cui i pirogeni, responsabili della febbre, e mediatori chimici della risposta infiammatoria.

- ◇ **MONOCITI E MACROFAGI:** fino alla fine degli anni '30 ancora non si sapeva che i monociti circolanti fossero i precursori dei macrofagi tissutali. I monociti non sono molto comuni in circolo (1-6% di tutti i globuli bianchi) ed è stato stimato vi rimangono solo otto ore, in transito dal midollo osseo alla loro definitiva posizione nei tessuti. quando escono dal circolo, i monociti si ingrandiscono e si specializzano diventando macrofagi. Alcuni macrofagi tissutali controllano il tessuto spostandosi per mezzo di movimenti ameboidi, altri trovano una posizione e vi restano. In entrambi i casi i macrofagi sono i principali spazzini dei tessuti. Sono più grandi e più efficaci dei neutrofilo, riuscendo ad inglobare più di cento batteri nel corso della loro vita. I macrofagi possono anche rimuovere grandi particelle come globuli rossi vecchi e neutrofilo necrotici.

I macrofagi svolgono un ruolo importante nello sviluppo della risposta immunitaria quando inglobano e digeriscono antigeni molecolari o cellulari, frammenti di questi antigeni vengono elaborati e inseriti nella membrana del macrofago come costituenti di complessi proteici di superficie. Le cellule che elaborano l'antigene in questo modo sono definite cellule presentanti l'antigene (APCs). Anche le cellule dendritiche e alcuni tipi di linfociti agiscono come le cellule presentanti l'antigene.

- ◇ **LINFOCITI E PLASMACELE:** sono i principali responsabili della risposta immunitaria. Solo il 5% di tutti i linfociti si trova in circolo dove essi rappresentano il 20-35% di tutti i globuli bianchi. La maggior parte dei linfociti si trova nei tessuti linfoidei, come linfonodi, milza, midollo osseo e ghiandole sotto mucose del tratto gastrointestinale. Queste sono tutte sedi in cui i linfociti hanno una maggiore probabilità di incontrare antigeni. È stato stimato che l'organismo adulto può contenere mille miliardi di linfociti. Nonostante la maggior parte di queste cellule sembri uguale al microscopio, esse possono presentare notevoli differenze di funzioni e specificità. La natura della loro risposta richiede che ogni linfocita si leghi a un ligando specifico; di conseguenza ci sono più di un milione di differenti tipi di linfociti.

- ◇ **EOSINOFILI:** facilmente riconoscibili dai loro granuli citoplasmatici colorati di rosa, sono coinvolti nelle reazioni allergiche e nelle risposte alla

patologie parassitarie. Essi attaccano i grandi parassiti come lo *Schistosoma* e rilasciano sostanze che li danneggiano o li uccidono. Poiché gli eosinofili uccidono i patogeni vengono anche definiti cellule citotossiche. Nelle reazioni allergiche come quelle ai pollini, gli eosinofili si aggregano vicino al sito di ingresso dell'antigene. Nonostante in *vitro* gli eosinofili presentino la capacità di inglobare queste particelle, non ci sono prove che riescano a farlo in *vivo*. Quando i granuli vengono rilasciati, le sostanze ossidanti attaccano l'invasore. Normalmente, una piccola quota di eosinofili si trova nella circolazione periferica, ma essi rappresentano solo circa l'1-3% di tutti i leucociti. La vita degli eosinofili il circolo è di sole 6-12 ore. La maggior parte degli eosinofili attivi si trova nel tratto digerente, nei polmoni e nel tessuto connettivo della cute.

- ◇ **BASOFILI:** rari in circolo, ma sono facilmente riconoscibili, in uno striscio di sangue colorato, per la presenza di grandi granuli citoplasmatici blu scuro. Essi sono molto simili ai mastociti tissutali. I granuli dei mastociti e dei basofili contengono istamina, eparina e altre sostanze chimiche coinvolte nella difesa dell'organismo. I mastociti, come gli eosinofili, sono concentrati nel tessuto connettivo cutaneo, nei polmoni e nel tratto digerente. In queste sedi essi sono localizzati in maniera ideale per intercettare i patogeni che vengono inalati o ingeriti o che entrano attraverso soluzioni di continuo dell'epidermide.

- ◇ **CELLULE DENDRITICHE** : sono cellule che presentano l'antigene. Sono caratterizzate da lunghi e sottili prolungamenti che ricordano i dendriti dei neuroni, e che si trovano nelle cute (cellule di Langerhans) e in vari altri organi. Quando le cellule dendritiche riconoscono e catturano gli antigeni, in particolar modo i virus, migrano verso i tessuti linfoidei. Qui esse presentano frammenti di antigeni ai linfociti e li attivano. Le cellule dendritiche nel sistema linfatico sono dette cellule velate.

CAPITOLO III

-L'INFIAMMAZIONE-

L'infiammazione o flogosi è un meccanismo di difesa non specifico innato, che costituisce una risposta protettiva, seguente all'azione dannosa di agenti fisici, chimici e biologici, il cui obiettivo finale è l'eliminazione della causa iniziale di danno cellulare o tissutale.

L'infiammazione consiste in una sequenza dinamica di fenomeni che si manifestano con una intensa reazione vascolare. Questi fenomeni presentano caratteristiche relativamente costanti, nonostante l'infinita varietà di agenti lesivi, in quanto non sono determinati soltanto dall'agente lesivo, quanto soprattutto dalla liberazione di sostanze endogene: i mediatori chimici della flogosi. I fenomeni elementari, che costituiscono la risposta infiammatoria, comprendono: vasodilatazione e aumento di permeabilità, che portano al passaggio di liquidi dal letto vascolare al tessuto lesso (*edema*), e infiltrazione leucocitaria nell'area di lesione. L'infiammazione serve, dunque, a distruggere, diluire e confinare l'agente lesivo, ma allo stesso tempo mette in moto una serie di meccanismi che favoriscono la riparazione o la sostituzione del tessuto danneggiato.

Clinicamente, i segni cardini dell'infiammazione sono: arrossamento, tumefazione, calore, dolore, alterazione funzionale. Sono manifestazioni delle modificazioni tissutali che consistono in: vasodilatazione, aumento permeabilità capillari, stasi circolatoria e infiltrazione leucocitaria (con *marginazione*, *rotolamento* e *adesione* sulla superficie endoteliale di leucociti attraverso l'espressione di molecole di adesione, fase finale di *diapedesi* attraverso l'endotelio, *chemiotassi* per risposta dei leucociti presenti nello spazio interstiziale agli agenti chemiotattici, i quali li indirizzano verso la sede del danno). L'infiammazione viene classificata secondo un criterio temporale in infiammazione acuta e infiammazione cronica. Quest'ultima può poi essere distinta secondo un criterio spaziale in diffusa (infiammazione cronica interstiziale) oppure circoscritta (infiammazione cronica granulomatosa).

3.1. L'INFIAMMAZIONE ACUTA

L'infiammazione acuta è una risposta immediata e precoce a uno stimolo lesivo.

È una reazione vascolare e cellulare al danno tissutale.

Si caratterizza per:

- ◇ modificazioni vascolari
- ◇ passaggio dei leucociti dal letto capillare al tessuto lesio
- ◇ migrazione dei leucociti all'interno del tessuto soggetto al processo flogistico

Queste fasi portano alla formazione di un essudato, fluido ricco di sostanze proteiche e cellule, con la finalità di contrastare, nell'area lesa, l'agente lesivo.

Le modificazioni vascolari prevedono una prima fase di vasocostrizione, non sempre presente, e una seconda fase di vasodilatazione che provoca iperemia, ulteriormente potenziata dall'aumento della permeabilità vascolare; la vasodilatazione è sostenuta da mediatori rapidi come istamina e prostaglandine, e successivamente da mediatori lenti come IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , LPS e PAF.

L'aumento del calibro vascolare provoca:

- ◇ riduzione della velocità del flusso sanguigno (stasi): questa condizione favorisce il rolling leucocitario, rallenta l'eventuale diffusione di patogeni e favorisce l'adesione del complemento ai patogeni
- ◇ aumento della pressione trasmurale con conseguente aumento della trasudazione vascolare e quindi del drenaggio linfatico che favorisce la presentazione antigenica.

Una funzione fondamentale dell'infiammazione è quella di permettere ai leucociti di giungere nella sede del danno e lì inglobano agenti lesivi, uccidono batteri, degradano il tessuto necrotico e gli agenti estranei. Se l'infiammazione è particolarmente intensa o interessa un'area molto estesa di tessuto, possono instaurarsi le cosiddette risposte di fase acuta che comprendono febbre, sintesi epatica delle proteine di fase acuta come la Proteina C Reattiva (PCR) e alterazioni metaboliche. L'infiammazione acuta può essere di tipo sieroso, fibrinoso, emorragica, catarrale, gangrenosa o purulenta.

3.1.1. MEDIATORI CHIMICI DELL'INFIAMMAZIONE ACUTA

Durante il processo infiammatorio vengono prodotti importanti mediatori chimici di origine plasmatica e cellulare, questi hanno un recettore specifico e un mediatore che può stimolare il rilascio di altri mediatori da parte di cellule bersaglio con effetto di amplificazione o effetto di modulazione o regolazione. I mediatori possono agire su uno o su più tipi cellulari e possono esercitare effetti diversi a seconda del tipo di tessuto o cellula; quando vengono prodotti o rilasciati hanno un'emivita breve.

- ◇ Mediatori di origine *PLASMATICA*: sono prodotti dal fegato, che li mette in circolo, sono in forma inattiva e vengono attivati quando serve, dall'attivazione del fattore XII (importante nel sistema delle chinine e in quello della coagulazione/fibrinolisi) e dall'attivazione del complemento (fattori che attivati interagiscono in successione in un sistema a cascata).
- ◇ Mediatori di origine *CELLULARE*: si suddividono in 2 sottogruppi:
 - Mediatori preformati, presenti in granuli di secrezione: *istamina* (mastociti, basofili, piastrine), *serotonina* (piastrine), *enzimi lisosomiali* (neutrofili, macrofagi). L'istamina causa nella fase immediata dilatazione delle arteriole, aumento della permeabilità delle venule.
 - Mediatori sintetizzati ex novo, al bisogno:
 - *prostaglandine* (tutti i leucociti, piastrine) derivano dal metabolismo dell'acido arachidonico, che tramite l'enzima

ciclo-ossigenasi si trasforma in prostaglandina, che a sua volta, tramite PGH₂ dà vita a prostaciclina (vasodilata e inibisce l'aggregazione piastrinica), trombossano (vasocostringe e promuove aggregazione piastrinica) e PGD₂, PGE₂, PGF₂ α , PGI₂. Queste ultime sostanze sostengono la vasodilatazione potenziando l'edema. Inoltre PGE₂ e PGF₂ α agiscono sulle fibre nervose polimodali di tipo C (in genere in risposta a bradichinina) abbassandone la soglia di scarica e determinando così i sintomi dolorosi associati all'infiammazione. Infine PGE₂ secreta dall'endotelio dei vasi ipotalamici in risposta ad alte concentrazioni di TNF, IL-1 e IL-6 agisce sul nucleo termoregolatore ipotalamico causando la febbre. Aspirina e farmaci non steroidei inibiscono la ciclo-ossigenasi bloccando la sintesi di prostaglandine.

- *Leucotrieni* (tutti i leucociti), derivano dal metabolismo dell'acido arachidonico e danno vasocostrizione, broncospasmo, aumento della permeabilità, chemiotassi.
- *Fattori attivanti le piastrine -PAF-* (leucociti, endotelio): fonti: mastociti, neutrofili, endotelio, piastrine, monociti/macrofagi; azioni pro-infiammatorie: aumento della permeabilità vascolare, vasodilatazione, aggregazione leucocitaria, chemiotassi, attivazione piastrinica. È molto più potente dell'istamina.

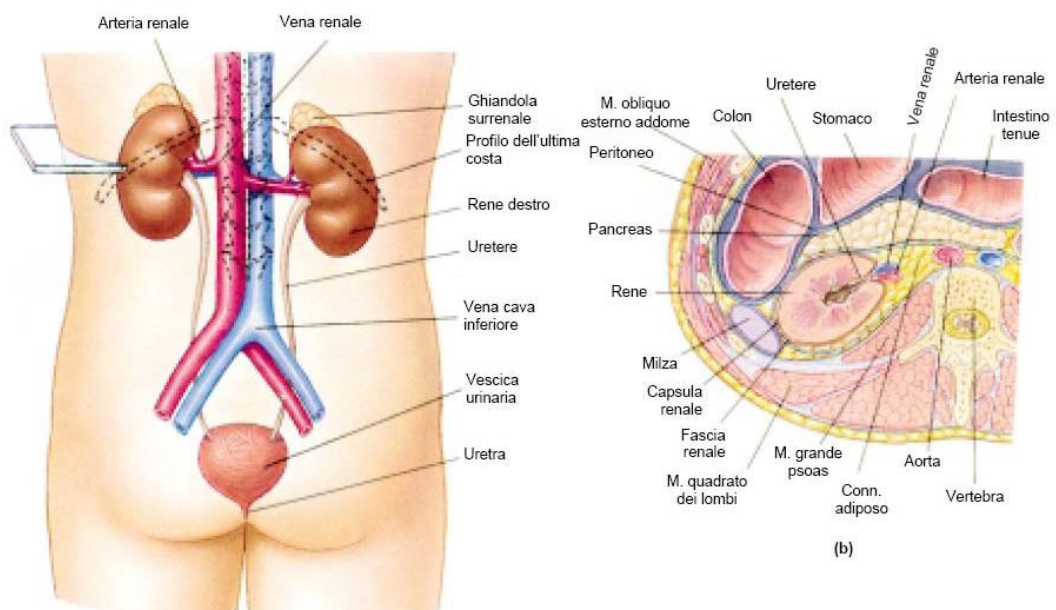
- *Specie reattive dell'ossigeno* (leucociti): i radicali liberi dell'O₂ vengono rilasciati dai leucociti nell'ambiente extracellulare in seguito ad esposizione ad agenti chemiotattici, immunocomplessi o durante la fagocitosi. Il loro rilascio può causare danni all'ospite.
- *Ossido di azoto-NO-* (macrofagi): gas solubile prodotto dalle cellule endoteliali, macrofagi, neuroni. Ha emivita breve e azione locale; nei vasi provoca vasodilatazione. Le specie reattive che derivano dalla NO sintetasi possiedono attività antimicrobiche.
- *Citochine* (linfociti, macrofagi, endotelio): proteine prodotte da diversi tipi cellulari che modulano la funzione delle altre cellule, sono coinvolte nell'immunità e nell'infiammazione. Avremo: *monochine* (prodotte da fagociti mononucleati), *linfocine* (da linfociti attivati), *interleuchine* (da cellule ematopoietiche), *chemochine* (condividono la capacità di stimolare la motilità e il movimento orientato dei leucociti, specie nell'infiammazione).

Prodotti batterici, immunocomplessi, tossine, agenti fisici e altre citochine, attivano macrofagi e altre cellule determinando: reazioni della fase acuta (febbre, sonno, neutrofilia, aumento delle proteine, diminuzione dell'appetito...), effetti sull'endotelio, sui fibroblasti e sui leucociti.

CAPITOLO IV

-I RENI-

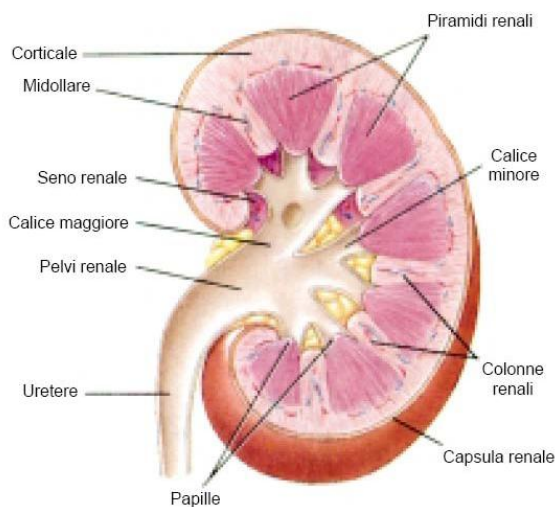
I reni sono organi pari, localizzati in sede retroperitoneale nella parte posteriore dell'addome, ai lati della colonna vertebrale. Il *polo superiore* del rene è al livello della XII vertebra toracica, mentre quello inferiore raggiunge la III vertebra lombare. Il rene destro è leggermente più basso del sinistro. I reni si abbassano regolarmente di 2,5 cm quando si passa dalla posizione supina a quella eretta; inoltre il loro spostamento oscilla da 2 a 4 cm durante la normale o forte inspirazione. Il polo superiore è rivolto più medialmente rispetto all'inferiore.



Nell'uomo adulto il peso di ciascun rene oscilla tra 125 e 170 grammi mentre nella donna è tra 115 e 155 grammi. Il peso si riduce con l'età. Il diametro longitudinale è circa 11-12 cm, quello trasversale è circa 5-7 cm; lo spessore del rene è 2,5-3 cm; l'idratazione dell'organo e i valori della pressione arteriosa possono apportare delle variazioni.

Sulla faccia interna di ogni rene c'è l'ilo che raccoglie la pelvi, l'arteria e la vena renale, i vasi linfatici, un nervo del plesso e l'uretere. L'ilo continua in una cavità (seno) dove l'uretere si espande per formare la pelvi. L'ilo è ruotato leggermente in avanti rispetto al muscolo psoas, mentre la parte convessa è ruotata posteriormente. Ciascun rene è coperto da una capsula fibrosa e liscia facilmente rimovibile quando gli organi sono normali.

Se si seziona a metà il rene si osservano sulla superficie di taglio *tre distinte regioni*: la parte esterna chiamata **corticale**, quella interna rappresentata dalla **midollare** che contiene 8-18 piramidi renali e la **pelvi**. Ogni piramide ha la base che poggia sulla giunzione cortico-midollare, mentre l'apice sporge nella pelvi renale e forma la papilla. Sull'apice di ogni papilla (**area cribrosa**) si osservano 10-25 piccoli fori che corrispondono agli sbocchi dei dotti collettori.



La zona **corticale** ha lo spessore di 1 cm; essa costituisce tutta la parte periferica del rene e copre la base di ogni piramide; si estende anche tra una piramide e l'altra, formando le colonne renali di Bertini.

Dalla base di ogni piramide

partono i raggi midollari di Ferrein che entrano nella corticale; essi sono costituiti dai dotti collettori o segmenti dei tubuli prossimali e distali.

CENNI D'ANATOMIA MICROSCOPICA

L'unità specifica e funzionale del rene è il nefrone. Ciascun rene contiene da 700.000 a 1.200.000 nefroni. Ogni nefrone è costituito dal glomerulo con la capsula di Bowman (corpuscolo di Malpighi), dal tubulo prossimale, dall'ansa sottile, dal tubulo distale e dal dotto collettore. Fa parte del nefrone anche l'apparato iuxtglomerulare.

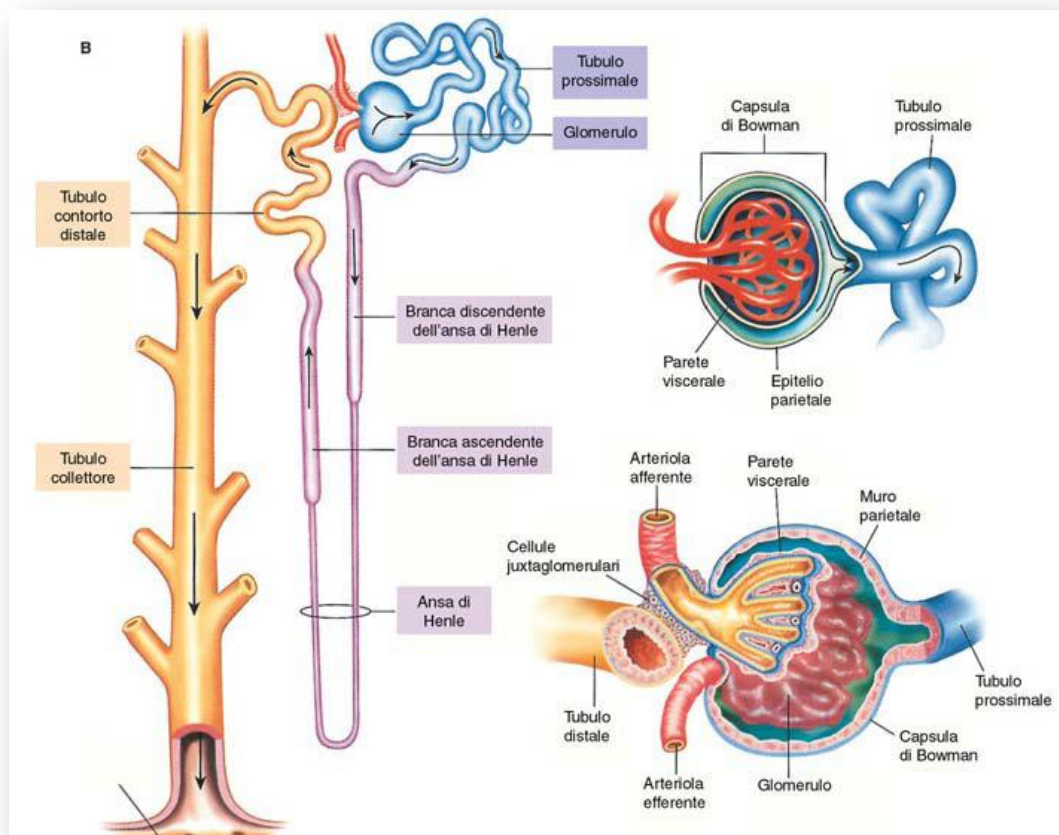
Secondo la posizione del glomerulo nella corticale i nefroni sono classificati in superficiali, mediani e iuxtamidollari. I nefroni superficiali hanno i glomeruli situati alla distanza di 0,5-1 mm dalla superficie del rene e le loro arteriole efferenti toccano direttamente la superficie della corticale. I glomeruli dei nefroni mediani sono situati nella parte media della corticale. Nella zona della giunzione cortico-midollare sono situati i glomeruli dei nefroni iuxtamidollari che hanno l'arteria efferente da cui derivano i vasa recta. Una piccola parte dei nefroni iuxtamidollari hanno l'arteria afferente che proviene dalle arterie arcuate.

Al corpuscolo di Malpighi segue il tubulo prossimale che origina dalla capsula di Bowman, l'ansa di Henle, il tubulo distale e il dotto collettore. Ciascun tubulo collettore riceve nella zona corticale mediamente 11 nefroni. I tubuli collettori, quando entrano nella midollare, man mano che avanzano dalla parte esterna verso quella interna si fondono nel *dotto collettore terminale*.

Secondo la lunghezza dell'ansa di Henle ci sono due popolazioni di nefroni nella corteccia; quelli ad ansa corta e quelli ad *ansa lunga*. La lunghezza dell'ansa è in rapporto alla posizione del glomerulo nella zona corticale per cui quelli

superficiali e mediani hanno un'ansa di Henle corta che in alcuni casi non arriva nella midollare, mentre i glomeruli iuxtamidollari possiedono un'ansa di Henle lunga che entra nella zona midollare.

La *zona midollare* gioca un ruolo importante nella concentrazione dell'urina; le anse di Henle agiscono come un sistema multiplo di controcorrente che stabilisce un gradiente osmotico a livello cortico-midollare.



Il glomerulo è costituito da un capillare arterioso, proveniente dalla circolazione sanguigna renale, che si avvolge su se stesso costituendo la cosiddetta “**matassa glomerulare**”. Il vaso prima dell'ingresso del glomerulo si chiama *arteriola afferente* mentre quando esce si chiama *arteriola efferente*.

Tra gli avvolgimenti della matassa si trova il *mesangio* costituito da cellule mesangiali che allocano nella matrice mesangiale. Il capillare glomerulare, costituito da un endotelio che poggia sulla membrana basale, è avvolto dall'epitelio viscerale che proviene dall'epitelio parietale che costituisce la **capsula di Bowman**. L'epitelio viscerale si continua in quello parietale a livello del polo vascolare dove si trovano l'arteriola afferente ed efferente, che entrano ed escono rispettivamente dal glomerulo. Tra l'epitelio viscerale e quello parietale è presente lo spazio di Bowman chiamato anche cavità urinaria.

Nella sua struttura microscopica il glomerulo è paragonabile ad un setaccio che permette il passaggio di acqua e alcuni soluti che formano la preurina, un ultrafiltrato del plasma. Questo setaccio si compone di un endotelio fenestrato, una membrana basale e un epitelio poroso.

L'endotelio fenestrato presenta numerosi pori o fenestre, situati tra una cellula e l'altra, essi sono coperti da un sottile diaframma che tuttavia non impedisce il passaggio delle macromolecole. La superficie dell'endotelio è coperta da cariche negative; forma la prima barriera dei costituenti del sangue e seleziona il passaggio delle proteine sulla base della loro carica.

L'epitelio viscerale è costituito da cellule chiamate *podociti* che possiedono un abbondante citoplasma distribuito nella parte periferica della cellula sotto forma di pseudopodi o *pedicelli*. Queste cellule, simili a polipi, avvolgono con le espansioni citoplasmatiche i capillari glomerulari e hanno diretto contatto con la lamina rara esterna della membrana basale.

La distanza tra i pedicelli che poggiano sulla lamina rara esterna della membrana basale è 25-60 nm. Questo spazio corrisponde al *poro*, coperto da un sottile

diaframma. Sulla superficie dei podociti ci sono cariche negative che sono rappresentate dalla podocalicina; la rimozione di questa causa il distacco delle cellule endoteliali ed epiteliali della membrana basale; ciò dimostra che queste cariche negative sono molto importanti nel mantenere inalterate la struttura e la funzione del filtro glomerulare.

La **membrana basale** si compone di tre strati: la lamina rara esterna e quella interna su cui poggiano rispettivamente i podociti e le cellule endoteliali, la parte centrale della membrana basale è costituita da lamina densa. Sulla superficie della membrana basale sono situate cariche negative che influenzano la filtrazione delle macromolecole. Nella lamina rara è stato osservato un lattice di siti anionici (**glicosaminoglicani ricchi di eparansolfato**) che costituisce la carica della barriera, la loro rimozione enzimatica causa un incremento della permeabilità della membrana basale.

Il filtro glomerulare, costituito dalla membrana basale e dalle cellule epiteliali ed endoteliali, funziona da **setaccio** e regola il passaggio delle macromolecole secondo la loro dimensione e la loro carica.

Il **mesangio** si compone di cellule mesangiali e matrice; *le cellule mesangiali* hanno una forma irregolare, sono caratterizzate da propaggini che avvolgono le pareti dei capillari glomerulari, possiedono inoltre numerosi filamenti di actina e miosina; esse sono immerse nella matrice mesangiale che contiene glicosaminoglicani, fibronectina e laminina.

Le cellule mesangiali hanno **capacità contrattile** come le cellule muscolari lisce e funzione fagocitaria, ecco perchè la collocazione delle cellule mesangiali all'interno della matassa glomerulare è molto importante: le **proprietà di**

contrazione e rilascio delle cellule, che si avvinghiano ai capillari glomerulari e si insinuano tra endotelio e membrana basale, permettono la regolazione della circolazione sanguigna nel glomerulo.

La **capsula di Bowman** si compone dell'**epitelio viscerale** che continua a livello del polo viscerale con quello parietale; quest'ultimo continua con l'epitelio del tubulo prossimale a livello del polo urinario. L'epitelio parietale forma la parete esterna della capsula ed è costituito da cellule piatte che assumono un aspetto cuboidale nella zona di transizione con l'epitelio del tubulo prossimale che è l'orletto a spazzola.

L'**apparato iuxtaglomerulare** è situato a livello del polo vascolare del glomerulo e ha contatto con una parte del tubulo distale. E' costituito da due componenti: vascolare e tubulare. La **parte vascolare** è formata dalla porzione terminale dell'arteriola afferente, dalla porzione iniziale dell'arteriola efferente e dall'area del mesangio extraglomerulare. La **parte tubulare** è costituita dalla macula densa che è la porzione spessa della branca ascendente dell'ansa di Henle. L'area del mesangio extraglomerulare è delimitata dalle cellule della macula densa, dall'arteriola afferente ed efferente e dalle cellule mesangiali che si trovano in corrispondenza del polo vascolare del glomerulo.

Nella componente vascolare dell'apparato iuxtaglomerulare si distinguono due tipi di cellule: **cellule granulari iuxtaglomerulari**, questi granuli al loro interno contengono renina e angiotensina II e sono più abbondanti nelle cellule dell'arteriola afferente e **cellule mesangiali extraglomerulari senza granuli**, queste sono localizzate tra l'arteriola afferente ed efferente e sono a stretto

contatto con la macula densa, l'ipotesi è che esse siano elementi di collegamento tra le strutture dell'apparato iuxtaglomerulare e il mesangio glomerulare.

La **macula densa** è costituita da cellule localizzate sulla parete del tratto spesso della branca ascendente dell'ansa di Henle solo nel punto che tocca il polo vascolare del glomerulo. Il **tubulo prossimale** inizia in corrispondenza del polo urinario del glomerulo e in base alla sede è costituito da due parti: quella iniziale, parte convoluta, che segue un percorso contorto ed è localizzato esclusivamente nella parte corticale; segue la parte retta che ha un andamento rettilineo ed è situato nel raggio midollare. Tra le cellule si trova uno spazio intracellulare mediante un diaframma costituito da una propaggine della membrana plasmatica chiamata “*giunzione sottile*” o “*zona occludente*”. Queste giunzioni collegando le cellule tra loro fanno sì che l'epitelio sia un tutt'uno. Lo spessore della membrana basale del tubulo si riduce gradualmente lungo il decorso del tubulo. Nello spazio basale e quello laterale sono sistemate le pompe ioniche (Na^+ , K^+) . L'**orletto a spazzola** è costituito da numerosi microvilli che aumentano la superficie apicale di 36 volte.

Le cellule della parte convoluta del tubulo prossimale contengono un apparato lisosomiale che partecipa al riassorbimento e alla degradazione delle macromolecole proveniente dall'ultra filtrato; l'assorbimento delle macromolecole avviene per un processo di endocitosi. *L'assorbimento delle proteine a livello del tubulo prossimale avviene per mezzo di un processo di selettività che è basato sulla carica elettrica, la dimensione e la forma delle proteine.* La parte retta del tubulo è costituita da cellule molto semplici, ciò spiega la scarsa funzione di

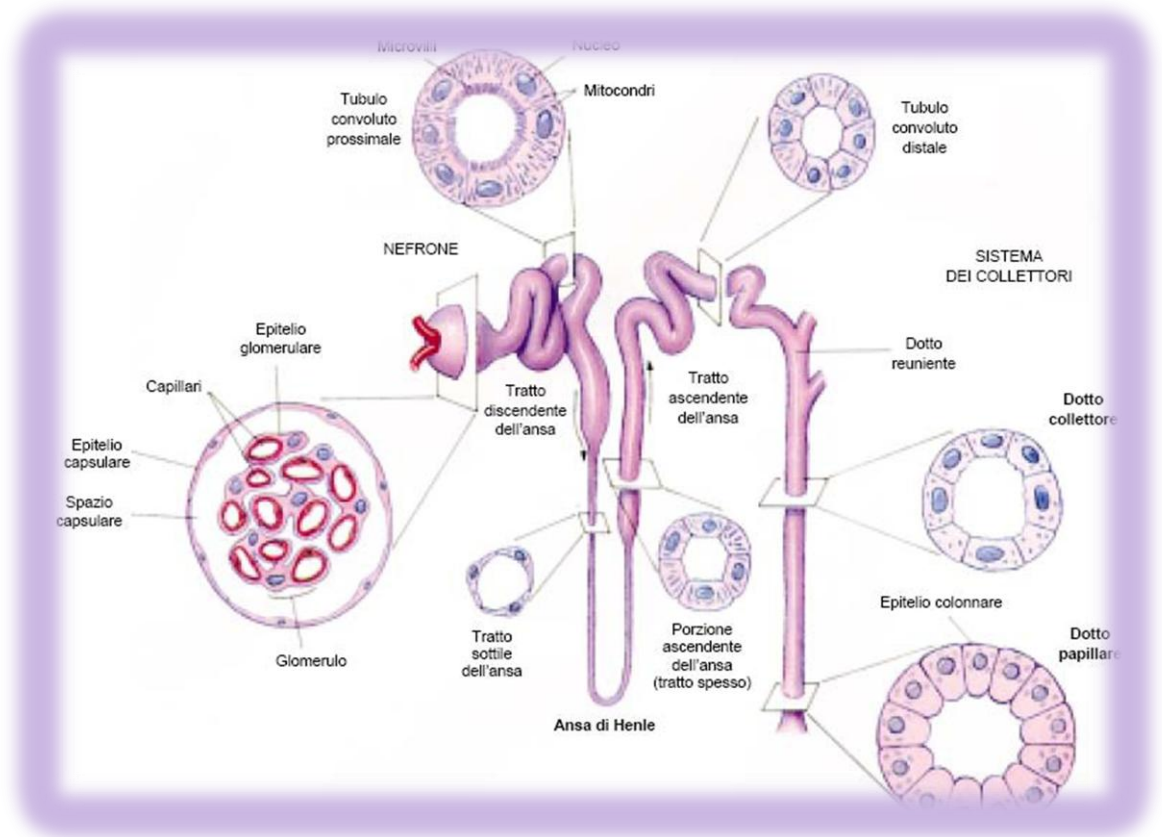
riassorbimento svolto da questo tratto del tubulo, questa porzione è coinvolta nel processo di secrezione degli acidi organici e delle basi.

Il punto di passaggio dal tubulo prossimale al tratto sottile dell'ansa di Henle avviene in modo netto ed è il punto di demarcazione tra la parte esterna e quella interna della midollare. L'**ansa di Henle** è costituita da 4 tipi di cellule: il **tipo I** è localizzato nella branca sottile discendente delle anse corte; il **tipo II** forma la branca sottile discendente delle anse lunghe nella zona esterna della midollare; il **tipo III** è presente nella branca discendente delle anse lunghe nella zona interna della midollare; il **tipo IV** si trova nella branca ascendente dell'ansa. Le cellule epiteliali di tipo I e II sono molto permeabili all'acqua, mentre la permeabilità al sodio e al cloro è più evidente nel tipo II; la permeabilità all'urea è maggiore nelle cellule di tipo I.

Il **tubulo distale** si compone di tre segmenti: il **tratto spesso** (*pars recta*) è la parte iniziale del tubulo distale che in parte decorre nella midollare e in parte in quella corticale, il passaggio tra il tratto sottile e quello spesso dell'ansa di Henle costituisce la demarcazione dalla parte interna e quella esterna della midollare esterna. La branca ascendente entra successivamente nella corticale e passa vicino al glomerulo dove nel punto di contatto forma la **macula densa** (*secondo tratto*). Subito dopo continua con il **tubulo convoluto distale** localizzato esclusivamente nella midollare che sbocca nel dotto collettore.

Il **dotto collettore** si estende dalla corticale alla midollare fino al collo della papilla. Si compone di tre segmenti: **tratto corticale**, quello **midollare esterno** e infine il **tratto midollare interno**, che si continua con il dotto collettore papillare che sbocca sull'apice della papilla formando l'area cribrosa. Nel dotto collettore ci

sono **due tipi di cellule**: le principali che sono **chiare** e le cellule interposte **scure**. Il dotto collettore nel tratto midollare esterno si fonde con altri e nel progredire verso la papilla aumenta di calibro sino a continuare nel dotto di Bellini.



L'interstizio renale è costituito da *cellule interstiziali e matrice extracellulare* formata da glicosaminoglicani solfati e non solfati. Esso è poco rappresentato nella corticale ed è presente per il 10-15% di tutto il tessuto renale, mentre ai reni sono organi molto vascolarizzati se si tiene presente che passa attraverso essi 1 litro di sangue al minuto; questa abbondante vascolarizzazione serve per la formazione dell'urina (1 ml/min).

Le tecniche moderne hanno dimostrato che la circolazione sanguigna a livello renale non è unica ma si compone di **tre microcircoli** localizzati a livello

glomerulare, cortico-peritubulare e midollare .Aumenta gradualmente sino al 30-40% dalla midollare esterna a quella interna.

4.1. L'INSUFFICIENZA RENALE

L'insufficienza renale acuta si distingue da quella cronica principalmente per la rapidità con cui avviene la perdita di funzionalità dei reni e il conseguente brusco aumento dei valori di creatinina (prodotta dai muscoli mediante il c.d. catabolismo) e azotemia nel sangue, proprio per la difficoltà dell'apparato urinario di espellere tali sostanze che, se contenute in eccesso, sono nocive per l'intero organismo. In modo simile all'insufficienza renale cronica, ma con tempistiche assai più incalzanti, nell'insufficienza renale acuta, l'organismo, almeno in un primissimo momento, tenta di reagire agli ostacoli incontrati nel filtrare il sangue, producendo quantità maggiorate di urina (poliuria), nonostante il livello di concentrazione resti sempre troppo basso. A tale fase segue comunque la c.d. oliguria, in cui il liquido espulso tramite le vie urinarie è notevolmente al di sotto dei parametri di normalità. Al contrario di quella cronica, invece, l'insufficienza renale acuta, di regola, non passa inosservata fin dai primi giorni o addirittura dalle prime ore di insorgenza della stessa. Al rapido squilibrio dei valori di laboratorio e delle quantità e concentrazioni di urina emesse, infatti, corrispondono segni clinici spesso preoccupanti, soprattutto per il loro celere peggioramento. Innanzitutto si ha ematuria, che, a sua volta, può manifestarsi come microematuria (macchie di sangue nelle urine) o macroematuria (l'intero liquido urinario assume un colore più scuro, quasi violaceo). Le gambe tenderanno a gonfiarsi e, in genere, si registra un apparentemente inspiegabile

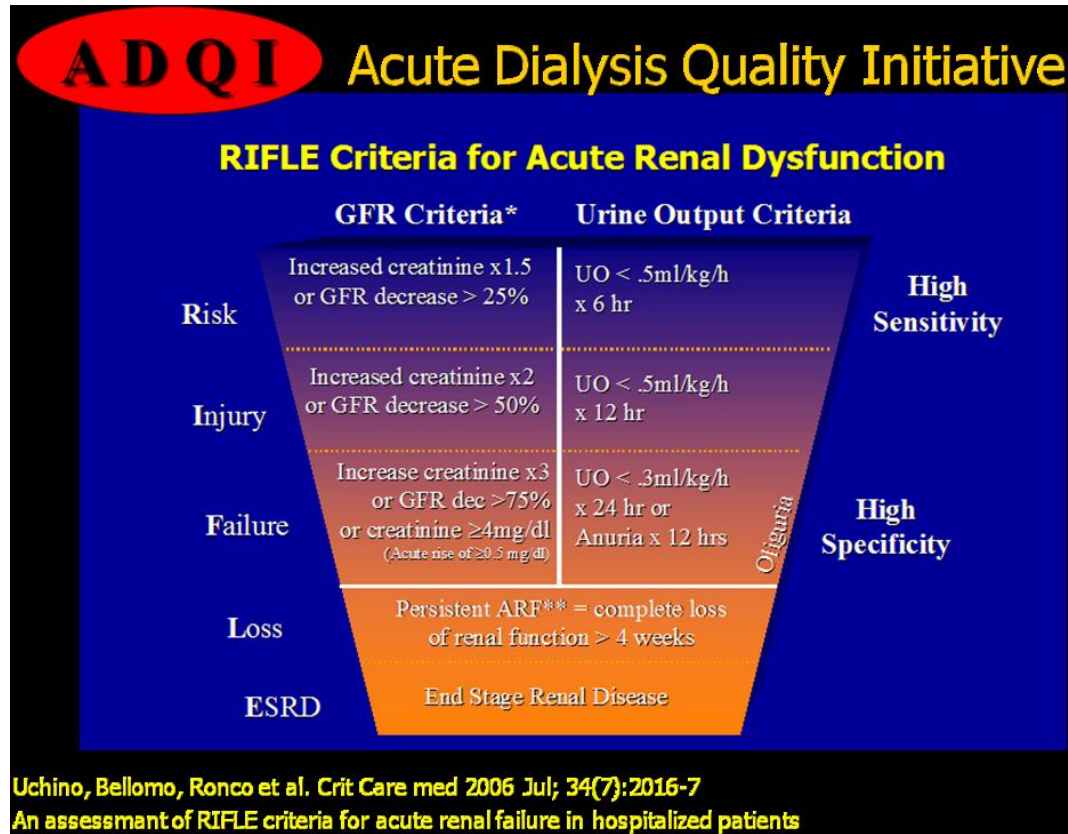
aumento di peso: entrambi chiari segni della ritenzione idrica e dei difetti circolatori in corso. In alcuni casi, la tendenza a trattenere nel corpo elevate quantità di acqua e sali minerali è talmente accentuata da aversi una sorta di “infiltrazioni idriche” all’interno delle cellule; qualora tale evenienza colpisca strutture del sistema nervoso centrale, il malato percepirà stanchezza, astenia e difficoltà di concentrazione associate, nelle situazioni più gravi, perfino a convulsioni. Gli squilibri nei valori sanguigni esaminati in laboratorio (soprattutto innalzamento della creatinina, del fosforo, dell’azoto, del potassio e degli acidi corporei), già visti per l’insufficienza renale cronica, si verificano anche per quella acuta, anche se gli sbalzi sono assai repentini, tanto che è probabile arrivare ai sintomi della pericolosa fase c.d. “uremica” addirittura nel giro di pochi giorni. In tale stadio si susseguono crisi gastrointestinali (con frequenti episodi di nausea, vomito e perfino anoressia), segni evidenti di anemia, ipertensione arteriosa, aritmie e altri disturbi cario-vascolari, deficit immunologici (con facilità a contrarre virus e batteri), emorragie e tendenza a disturbi neurologici ed encefalopatie, che possono arrivare a una gravità tale da degenerare anche in coma. Per quanto riguarda l’aspetto terapeutico, dato che si tratta di una condizione solitamente a carattere spiccatamente progressivo ma non irreversibile, l’insufficienza renale acuta deve essere trattata risalendo alla fonte, ossia combattendo la causa che l’ha provocata, oltre che, ovviamente, attenersi alle regole di uno stile di vita sano (soprattutto non fumare, non sostare a lungo in ambienti ricchi di sostanze tossiche e tenere una dieta povera di proteine). Solo qualora non sia possibile eliminare la causa dell’insufficienza renale, sarà necessario procedere all’assunzione di farmaci specifici per quest’ultima o, nelle

fattispecie ormai troppo evolute, ricorrere alla dialisi o al trapianto. In merito alle possibili fonti che sono in grado di scatenare la patologia de quo, innanzitutto, vi sono tutte quelle situazioni che determinano una diminuzione del volume di sangue che circola nella zona lombare, ove sono situati i reni, per l'appunto. Questa evenienza può essere la conseguenza, ad esempio, di emorragie, soprattutto se localizzate (compreso un eccessivo flusso mestruale o intensa ematuria), intense disidratazioni, in grado di ridurre notevolmente il plasma sanguigno, o certe malattie croniche del fegato. L'insufficienza renale acuta, inoltre, può essere provocata da disturbi che interessano ancor più da vicino le vie urinarie, compromettendone, così, la loro funzionalità: si pensi, in proposito a tutte le infiammazioni o le infezioni che colpiscono i tubuli o l'interstizio, elementi fondamentali nella struttura del rene. Anche patologici rigonfiamenti di uno o più organi presenti nei pressi della zona lombo-sacrale (per fenomeni infiammatori, tumorali o di calcolosi), determinando un aumento della pressione sui vasi sanguigni che irrorano l'apparato urinario, possono essere fonte di disfunzioni nella depurazione sanguigna.

4.2.AKIN

La definizione su riportata ha due limiti: il primo è che il peggioramento della funzione renale necessario e sufficiente a parlare di insufficienza renale acuta non è esattamente quantificato, il secondo che molti autori negano l'attendibilità della creatininemia come parametro di valutazione della funzione renale in pazienti non stabili. Per ottenere una definizione univoca è stato pertanto creato un gruppo di

studio (Acute Dialysis Quality Initiative o ADQI) con lo scopo di creare delle linee guida per la definizione il trattamento e la prevenzione della IRA.



Questo gruppo ha proposto un criterio denominato RIFLE (Risk, Injury, Failure, Loss, and End-stage kidney disease) successivamente ampliato e modificato dal gruppo di studio denominato Acute Kidney Injury Network (AKIN) che ha stabilito criteri più completi.

4.3. L'INSUFFICIENZA RENALE ACUTA SECONDO I CRITERI RIFLE

I criteri RIFLE definiscono l'insufficienza renale acuta in base a due variabili: i livelli sierici di creatinina e la diuresi.

Come precedentemente detto, RIFLE è l'acronimo inglese di:

- ◇ RISK (rischio di IRA): aumento della creatinina di 1,5 volte, riduzione della velocità di filtrazione glomerulare (VFG) del 25% o della diuresi a meno di 0,5 ml/kg per oltre 6 ore;
- ◇ INJURY (danno renale): raddoppio della creatinina, riduzione del VFG del 50% o o della diuresi a meno di 0,5 ml/kg per oltre 12 ore;
- ◇ FAILURE (malfunzionamento dei reni): aumento di tre volte della creatinina, riduzione del VFG del 75% o della diuresi a meno di 0,5 ml/kg per oltre 24 ore (oliguria) o anuria per 12 ore;
- ◇ LOSS (perdita di funzione renale): perdita completa della funzione renale che richiede terapia sostitutiva (dialisi) per più di quattro settimane;
- ◇ END-STAGE KIDNEY DISEASE (insufficienza renale terminale): uremia, cioè perdita completa della funzione renale che richiede terapia sostitutiva (dialisi) per più di tre mesi.

Questo criterio si è dimostrato valido per definire il rischio morte dei pazienti con IRA (più alto il RIFLE più alto il rischio morte dei pazienti). Nel caso in cui la creatininemia e la diuresi indichino due diversi livelli di gravità, lo stadio è indicato dalla funzione maggiormente compromessa.

4.4. L'INSUFFICIENZA RENALE ACUTA SECONDO I CRITERI AKIN

Il criterio stabilito dal gruppo di studio denominato Acute Kidney Injury Network (AKIN) stabilisce che si parla di insufficienza renale acuta quando in 48 ore la creatininemia sale di 0,3 mg/dl, ovvero di oltre il 50% ovvero vi è una riduzione

della diuresi al di sotto di 0,5 ml/kg per più di sei ore (questi ultimi due criteri sono identici a quelli del RIFLE). L'ultimo criterio non si applica se vi è una ostruzione delle vie urinarie. La stadiazione prevede tre livelli di crescente gravità: stadio 1 (corrisponde al rischio del criterio RIFLE); stadio 2 (corrisponde al danno renale del RIFLE) e stadio 3, che corrisponde al malfunzionamento renale del RIFLE. Gli stadi successivi del RIFLE non vengono presi in considerazione in quanto di eccessiva gravità. Sebbene gli studi epidemiologici al riguardo siano ancora pochi, appare evidente la correlazione tra lo stadio di malattia e la mortalità o la perdita permanente della funzione renale.

A COSA SERVONO QUESTE DEFINIZIONI?

Questi criteri sono di estrema importanza in quanto confermano che piccoli incrementi della creatininemia costituiscono una insufficienza renale acuta e possono avere conseguenze importanti sulla sopravvivenza dell'individuo. Tuttavia essi sono più importanti in studi epidemiologici che non al letto del paziente. Studi più recenti tendono a risolvere il problema identificando marcatori più sensibili della funzione renale, analoghi alla troponina che permetteranno una classificazione non dipendente dalla creatininemia i cui limiti in questi casi sono evidenti.

4.5. CAUSE DI INSUFFICIENZA RENALE ACUTA

Classicamente le cause di *insufficienza renale* vengono classificate in base alla sede anatomica del danno renale. È pertanto necessario ricordare che:

1. il sangue arriva al rene attraverso le arterie renali

2. viene filtrato a livello glomerulare
3. il filtrato glomerulare passa attraverso i tubuli renali e viene in gran parte riassorbito
4. Il fluido finale (le urine) lascia il rene attraverso le vie escrettrici (pelvi renale, uretere, vescica, uretra)

Una alterazione della funzione renale (acuta o cronica) può essere causata da qualsiasi processo che altera qualunque di queste strutture e/o la loro funzionalità.

Si parlerà pertanto di cause prerenali di IRA (IRA prerenale) quando vi è un'alterazione dell'elemento 1, cause renali di IRA (IRA renale) quando gli elementi interessati sono il 2 od il 3 e di IRA post renale (od ostruttiva) quando l'elemento interessato è il 4. Molte di queste condizioni possono determinare IRA o insufficienza renale cronica in relazione alle modalità di presentazione e di progressione della malattia.

4.6. FISIOPATOLOGIA DELL'IRA

4.6.1. IRA PRERENALE

Affinché i reni lavorino adeguatamente è necessario che ad essi giunga un flusso di sangue sufficiente (esso è incredibilmente alto in quanto nell'adulto è intorno a valori di 1100 ml di sangue al minuto). Se questo si riduce rapidamente si ha una IRA. Ovviamente molte delle alterazioni riportate sotto possono instaurarsi anche lentamente, causando in tal caso una insufficienza renale a più lenta evoluzione, quindi di tipo cronico. Il flusso di sangue renale può essere compromesso da:

-
- ◇ Insufficiente gittata cardiaca legata a scompenso cardiaco. La diagnosi si pone di norma con l'ecocardiografia che valuta la funzionalità cardiaca e la frazione di eiezione. Da notare che uno scompenso cardiaco cronico è causa di (o può aggravare una) insufficienza renale cronica, mentre un'improvvisa riduzione della gittata cardiaca (scompenso acuto di cuore) si accompagna ad IRA.
 - ◇ Riduzione del volume di sangue circolante per emorragie o più frequentemente (specie nelle persone anziane) per disidratazione. Nel primo caso la diagnosi si pone con la valutazione clinica e con l'emocromo, nel secondo un sistema semplice e spesso (anche se non sempre) efficace è quello di valutare la pressione arteriosa e la frequenza cardiaca in clinostatismo (cioè a paziente coricato) e subito dopo in ortostatismo (in piedi): una riduzione dei valori di pressione sistolica di oltre 20 mmHg e un aumento della frequenza cardiaca sono indicativi di disidratazione.
 - ◇ Stenosi (da aterosclerosi), compressione (da tumori degli organi vicini) o riduzione di calibro (anche congenita) delle arterie che portano il sangue ai reni (arterie renali). Anche qui il danno può instaurarsi acutamente e causare IRA, o in maniera lenta e progressiva e causare insufficienza renale cronica.

La diagnosi si pone con l'ecografia, l'ecodoppler delle arterie renali, l'angio-TAC o l'arteriografia. La terapia delle stenosi arteriose consiste nella dilatazione delle arterie (di norma effettuata penetrando attraverso un vaso inguinale, quindi senza

un intervento chirurgico laparotomico) cui può seguire il posizionamento di uno stent arterioso.

4.6.2. IRA RENALE

Le arterie renali si suddividono all'interno del rene in vasi sempre più piccoli che giungono ai glomeruli renali. Questo sistema vascolare intrarenale può essere sede di processi arteriosclerotici che riducono lentamente e progressivamente il calibro dei vasi e quindi il flusso di sangue ai glomeruli (si parla di *nefroangiosclerosi*); tuttavia, in conseguenza di brusche variazioni pressorie, interventi sui vasi addominali o anche per motivi non noti, le arteriole possono acutamente ostruirsi. A volte è ipotizzabile (e a volte anche dimostrabile, ma solo con la biopsia renale) che l'acuto peggioramento sia dovuto a microemboli di colesterolo. In tal caso si ha una IRA, le cui cause non sempre sono facili da identificare e che frequentemente non ha una terapia specifica.

- ◇ Danni glomerulari: i processi che danneggiano i glomeruli renali prendono il nome di *glomerulonefriti*. Esse possono essere croniche od acute e possono alterare la funzionalità renale lentamente e progressivamente o determinare IRA. Per una trattazione delle singole malattie si rimanda alla voce *glomerulonefrite* ed alle singole patologie. Un esempio di glomerulonefrite acuta è la *glomerulonefrite poststreptococcica*, malattia acuta, che spesso determina una rapida ed importante compromissione della funzione renale, di solito completamente reversibile.

-
- ◇ Il filtrato glomerulare scorre dai glomeruli ai tubuli renali dove subisce importanti modificazioni che ne riducono il volume, risparmiano sostanze utili e lo trasformano in urina che viene escreta. Un danno al sistema tubulare renale altera questo processo compromettendo la funzione renale. Spesso il danno tubulare è dovuto ad una riduzione improvvisa del flusso di sangue al rene. Ciò ad esempio si verifica dopo una copiosa emorragia che determina una grave e prolungata riduzione della pressione arteriosa. L'ipotensione comporta una improvvisa riduzione del flusso di sangue ai tubuli e, di conseguenza, la necrosi di alcuni di essi (*necrosi tubulare acuta*). Questa si rende clinicamente evidente con un rapido ed importante peggioramento della funzione renale che frequentemente può essere reversibile.

Un'altra possibile causa di danno tubulare e del tessuto situato fra i tubuli (detto tessuto interstiziale) sono i farmaci. Il danno in questo caso può instaurarsi lentamente (come ad es. il danno tossico da analgesici non steroidei o FANS) ed in tal caso causare un'insufficienza renale cronica, ovvero instaurarsi rapidamente o per alterazioni acute dell'emodinamica renale (danno acuto da FANS) o con un meccanismo immuno-allergico (in un terzo dei casi causato da antibiotici) causando IRA. Quest'ultimo fenomeno (*nefrite interstiziale acuta* da farmaci) è immunologicamente simile ad un'allergia in cui è coinvolto elettivamente il rene. Si ha quindi un'intensa reazione con infiltrazione del tessuto interstiziale da parte di globuli bianchi; il tessuto compresso ed alterato perde rapidamente la sua funzionalità e si genera una IRA. Una rapida identificazione della patologia, la rimozione della causa (il farmaco che l'ha generata) e la terapia (di norma con

cortisonici) può condurre ad una guarigione rapida e completa. Anche alcune infezioni (da legionella, leptospira, citomegalovirus, streptococchi etc. possono causare un danno tubulo-interstiziale acuto con IRA. Esistono inoltre molte altre cause più rare di danno tubulare renale (o tubulo-interstiziale) per la cui trattazione si rimanda alle voci specifiche.

4.6.3. IRA POST RENALE

La perdita, anche improvvisa, della funzionalità di un rene (se il controlaterale funziona correttamente) è, di per sè, asintomatica. In altri termini, è perfettamente noto che l'asportazione di un rene (ad esempio nei casi di donazione di rene da vivente) non modifica la funzionalità renale globale dell'individuo, in quanto il rene supestate è perfettamente in grado di vicariare la funzione del rene asportato ed il volume del filtrato glomerulare rimane nei limiti della norma. A comprova di ciò vi è il fatto che esistono persone con un solo rene dalla nascita (condizione di monorene congenito) che ignorano tale condizione che viene scoperta solo casualmente. Pertanto, se un processo patologico (un calcolo ad esempio) ostruisce un uretere in un individuo con il rene controlaterale funzionante, la sintomatologia dolorosa (*colica renale*) non si accompagnerà a peggioramento della funzione renale. Ma se il rene controlaterale è compromesso (o mancante) si avrà una IRA. L'ostruzione può essere a qualsiasi livello del sistema escretore (pelvi renale, uretere, vescica ed uretra) causata da una concrezione calcolotica (molto più frequente), da un tumore intrinseco all'organo o da una compressione estrinseca (da masse esterne che lo comprimono). Se essa si genera rapidamente si avrà IRA (come nel caso di un calcolo che ostruisce l'uretere di una persona con

un unico rene), mentre se si genera più lentamente (come ad es l'ostruzione da ipertrofia prostatica benigna) si genera un'insufficienza renale cronica da ostruzione cronica delle vie escrettrici.

4.7. LIMITI DELLE MISURE CONVENZIONALI DI FUNZIONALITA' RENALE

Al momento, la diagnosi di AKI si avvale delle variazioni sieriche di creatinina ed urea, poche volte anche degli altri test urinari. Purtroppo questi markers risultano poco attendibili, hanno delle limitazioni: non riflettono realmente nel tempo le variazioni dinamiche del GFR e non si esprimono su quale sia il danno. Questi markers endogeni richiedono del tempo per accumularsi e risultare quantitativamente alterati nel sangue, questo determina un inevitabile ritardo nella diagnosi.

4.7.1. CREATININA SIERICA

La creatinina è un aminoacido composto, che deriva dalla conversione non enzimatica di creatina in creatinina-fosforica a livello del muscolo scheletrico e dal metabolismo epatico dell'acido guanidinaminoacetico. La creatinina è una molecola di 113 Da che viene rilasciata nel plasma ad una quota relativamente costante, è liberamente filtrata non viene ne riassorbita ne metabolizzata dal rene. La clearance della creatinina è comunemente utilizzata come indicatore della GFR e la concentrazione sierica della molecola gode di una relazione inversa con la GFR stessa: se questa diminuisce, indice di una diminuzione delle funzione renale, la creatinina nel sangue aumenta e viceversa.

Ci sono delle limitazioni però, nell'uso della SCr come marker della funzione renale: 1) produzione e rilascio di creatinina nel sangue possono essere altamente variabili. Differenze nell'età, nel sesso, nell'introduzione dietetica e nella massa muscolare possono influire molto sulle concentrazioni basali della proteina, ugualmente questa variabilità può essere determinata da stati patologici (es. rabdomiolisi).

2) Studi hanno dimostrato come i farmaci possono alterare la secrezione di creatinina, determinando fenomeni di incremento, transitorio e reversibile, della creatinina sierica.

3) Elementi patologici concomitanti possono ridurre l'accuratezza con cui si rilevano i valori ematici di creatinina mostrando falsi aumenti della proteina; un esempio è la chetoacidosi diabetica, l'aumento degli acetoacetati nel sangue, disturba la misurazione di creatinina con i comuni metodi, questo fenomeno prende il nome di "reazione di Jaffe".

4) Infine, come detto precedentemente, il tempo necessario affinché la creatinina si accumuli nel sangue con valori da risultare diagnostici è molto lungo, questo ritarda il momento della diagnosi con la possibilità che si siano già instaurati processi patologici irreversibili.

4.7.2. UREA SIERICA

L'urea è una molecola di 60 Da, solubile in acqua, derivante dal metabolismo delle proteine, viene comunemente usata come marker sierico della ritenzione o diminuzione dei soluti uremici. Un aumento acuto della concentrazione sierica di urea è indicativo di sviluppo della "sindrome uremica" con ritenzione di una larga

varietà di tossine uremiche. L'accumulo di urea predispone a effetti metabolici, biochimici e fisiopatologici avversi, poiché si incrementa lo stress ossidativo; si ha alterazione del co-trasportatore $\text{Na}^+ / \text{K}^+ / \text{Cl}^-$ con conseguente deregolazione del potassio e dell'acqua intracellulare ed infine alterazioni dell'apparato immunitario.

L'urea, come la creatinina, è legata al GFR da un rapporto inverso, se l'urea sierica aumenta vuol dire che la GFR è diminuita; malgrado ciò l'uso di questa molecola è ancora più problematico, dato che sono numerosi gli agenti extra renali che possono modificarne la concentrazione nel sangue. La sua produzione non è costante e la sua concentrazione può variare in funzione dell'apporto dietetico di proteine, ma anche di stati critici del paziente, in seguito per esempio a trauma o a sepsi, emorragie gastrointestinali e terapie farmacologiche prolungate soprattutto a base di corticosteroidi .

Inoltre la clearance dell'urea non è costante: si stima che un 40-50 % dell'urea filtrata è riassorbita a livello del tubulo prossimale e distale e che in condizioni in cui si ha un notevole decremento del volume circolante di sangue, a livello del tubulo renale, aumenta il riassorbimento di Na^+ e H_2O che stimola un conseguente riassorbimento di urea. Questo finisce con il sottostimare il GFR, indipendentemente da una non parallela variazione della creatinina sierica. (Il rapporto urea-creatinina sierica viene comunemente usato per definire la condizione di "azotemia prerenale" e distinguerla dal quadro dell' "ATN"). In conclusione l'urea come la creatinina è indice di funzionalità del GFR ma non è comunque attendibile, per tempi e concentrazioni, come indicatore della fase "acuta" del danno renale.

4.7.3. CISTATINA-C

E' una molecola di 13 Da, endogena, inibitrice delle proteinasi della cisteina, è sintetizzata ad una quota pressoché costante e metabolizzata per il 99% a livello del rene, è totalmente filtrata, non secreta ne riassorbita, si deduce come questa molecola sia un ottimo indicatore della GFR e della funzione renale. Purtroppo le sue piccolissime dimensioni ed il completo metabolismo a livello tubulare, non la rendono rilevabile nell'urina, perciò diversi studi stanno attualmente lavorando al completamento di formule che potrebbero esserci utili per il calcolo della sua concentrazione .

Inizialmente si credeva che la concentrazione della molecola fosse indipendente da età, sesso, massa muscolare o variazioni nella dieta, solo recentemente si è dimostrato che non è così.

Su uno studio randomizzato di circa 8.000 pazienti si è notato come alti livelli, sopra la norma, di cistatina-C si siano ritrovati in pazienti maschi, anziani, molto alti e di peso aumentato, con l'abitudine al fumo ed elevati livelli di proteina C reattiva; inoltre si è notato come livelli di cistatina-C alterati si ritrovino in pazienti con funzione tiroidea aumentata, trattati con terapia immunosoppressiva a base di corticosteroidi .

A differenza però di creatinina ed urea, la cistatina-C gode di due caratteristiche peculiari: si è osservato in alcuni studi recenti che pazienti con danno renale acuto mostrano nel sangue livelli aumentati della molecola, anche del 50% rispetto ai valori basali e con un anticipo sulla creatinina di 2-3 gg; pazienti con danno renale mostrano con una certa facilità cistatina-C nelle urine, fenomeno invece assente, come precedentemente detto, nel paziente sano.

Queste due caratteristiche rendono facilmente intuibile come, l'utilizzo di questa molecola come marker diagnostico, non solo riduca i tempi di intervento sulla patologia, ma ci indirizzi anche verso la diagnosi di un eventuale ATN.

-PARTE SPERIMENTALE-

1. SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo dello studio è stato quello di valutare il ruolo dell'inflammation nel determinismo e aggravamento dell'insufficienza renale in pazienti sottoposti ad interventi cardiocirurgico.

Il paziente cardiocirurgico, può sviluppare diversi gradi d'inflammation, poiché vi sono numerosi fattori che possono sicuramente influire sull'instaurarsi di una risposta infiammatoria sistemica; è stato possibile esaminare i diversi gradi d'inflammation in base alla modulazione dei globuli bianchi e dei livelli delle citochine sieriche, correlata alla variazione di creatinina (basale-uscita). Sono stati esaminati, attraverso analisi statistiche, dati clinici quali: tipi d'intervento (Bypass isolato e non, e valvolare isolato e/o combinato), le varie tecniche cardiocirurgiche relativi ad essi, parametri clinici di laboratorio, caratteristiche cliniche proprie del paziente come patologie associate a quella cardiaca, terapie farmacologiche in atto, sia cardiache che non. Tutti i singoli parametri sono stati valutati nelle varie fasi dell'iter clinico-chirurgico.

Da altri studi è ben visibile come la risposta infiammatoria sistemica indotta da un intervento cardiocirurgico provochi la modulazione delle citochine pro-infiammatorie come IL-1 β , IL-6, IL-8, e IL TNF- α e citochine anti-infiammatorie come IL-10.

Tutto questo può essere associato alla concomitante presenza di fattori concatenati e concatenanti come: trauma chirurgico, tecniche anestesilogiche, durata dell'ischemia miocardica e riperfusione miocardica, cardioplegia, nonché il

contatto del sangue con superfici estranee (circuiti utilizzati per la circolazione extracorporea).

2. MATERIALI E METODI

I prelievi sono stati effettuati in specifiche provette da siero con la seguente tempistica: un prelievo basale all'ingresso del paziente in reparto, un prelievo al termine dell'intervento dopo protaminizzazione sistemica e chiusura sternale, un prelievo dopo sei ore dall'uscita del paziente dalla sala operatoria (prelievo non effettuato a tutti i pazienti), un prelievo al rientro in reparto di cardiocirurgia, dopo dimissione dal reparto di terapia intensiva cardiocirurgica.

I prelievi così effettuati sono stati sottoposti a trattamento con centrifuga a 3600 r/min per sei minuti per aliquotarne i sieri dal resto del contenuto della provetta, e successivamente congelati ad una temperatura di -80°C .

I sieri così trattati sono stati in seguito analizzati, in serie successive, tramite citofluorimetro a flusso BD FACSCanto. Il citofluorimetro è particolarmente adatto per l'analisi degli eventi rari con la sua velocità e grande sensibilità. Il sistema BDFASCanto combina un'ottica brevettata e progettata per la conservazione del segnale migliorata su sei fluorescenti e due parametri di dispersione.

Il sistema è formato da un raggio blu (488 nm, raffreddato ad aria, 20 mW a stato solido) e rosso (633 nm, 17 mW HeNe) sorgente di eccitazione. I fasci laser vengono poi instradati via fibra ottica per il fascio-formazione di prismi in cui i due laser sono proiettati separatamente su punti distinti nella cella di flusso.

Qui, le particelle vengono intercettate con i raggi laser di eccitazione e i segnali ottici che sono raccolti sul retro della cella di flusso da un gel legante una serie di

lenti. Il gel ottico, possiede un indice di rifrazione abbinato alla lente, questo massimizza l'efficienza di raccolta della luce. La luce diffusa e i segnali fluorescenti sono poi focalizzati su dei forellini di emissione in fibra. La cella di flusso è incorporata in una lamina ottica, creando un solido di eccitazione e un sistema di raccolta con l'allineamento fisso, e nessuna necessità di intervento da parte dell'utente.

L'emissione di segnali vengono trasmessi dalla cella di flusso da un ottagono per il blu ed un triangolo per i segnali laser rosso. Questi BD hanno brevettato matrici usando una serie di riflessioni per guidare i segnali al loro target rivelatori. L'uso di rivestimenti riflettenti sono risultati altamente efficienti per la raccolta della luce, garantendo il massimo mantenimento del segnale a livello del rivelatore. Un ulteriore vantaggio del design seriale riflessivo è la capacità di raccogliere i primi segnali di emissione più debole, a partire dalle lunghezze d'onda più lunghe (tipicamente PE-Cy7), e la finitura con la più breve (CIC) e di rafforzare ulteriormente la sensibilità.

Il BD FACSCanto viene utilizzato per il rilevamento delle citochine nel siero ma come software di lettura viene utilizzato il BD FACSDiva che ci trascrive in grafici il movimento delle citochine e poi questi dati verranno esportati in un altro software.

Il BD FACSDiva dovrà eseguire una calibrazione di 10 punti che servirà a dosare le interleuchine, quindi ad ogni seduta analitica saranno presenti due cartelle: la prima conterrà 10 file con la calibrazione dello strumento, la seconda cartella avrà al suo interno un numero di file pari ai campioni di siero analizzato.

Successivamente le due cartelle verranno esportate per essere quantizzate tramite il FCAP Array.

Per la modulazione dei Globuli Bianchi è stato usato l'esame emocromocitometrico o emocromo, esame utilizzato per la valutazione del numero delle cellule del sangue.

Il sangue, prelevato, è messo in una provetta contenente una sostanza anticoagulante "sodio citrato 3,8%" (per impedirne la coagulazione che lo renderebbe inservibile per questo esame) e conservato a temperatura ambiente fino al momento dell'effettuazione dell'esame.

Oggi si usano macchine, chiamate contatori elettronici, che permettono di analizzare un campione in poche decine di secondi e forniscono anche numerosi indici utili per stabilire se esistono anomalie a carico delle cellule del sangue.

L'unità di misura per il numero delle cellule del sangue può essere il microlitro μL . I parametri più importanti dell'emocromo sono:

- √ WBC: White Blood Cells, cioè Globuli Bianchi (GB). Indica il numero di GB per mL o L di sangue.
- √ RBC: Red Blood Cells o Globuli Rossi (GR). È il numero di GR per mL o L di sangue.
- √ HB: emoglobina ; esprime la quantità (espressa in grammi) di Hb presente in un L di sangue
- √ HT: ematocrito; esprime la percentuale del volume del sangue che è occupato dai GR
- √ MCV: Mean Corpuscular Volume, o Volume Corpuscolare Medio. Indica il volume medio dei globuli rossi.

- √ MCH: Mean Corpuscular Hemoglobin. Indica la quantità media di emoglobina in ogni globulo rosso
- √ MCHC: Mean corpuscular Hemoglobin Concentration o Concentrazione Emoglobinica Corpuscolare Media. Indica la concentrazione media di emoglobina all'interno del singolo globulo rosso.
- √ PLTS: Piastrine; indica il numero di piastrine presenti nel campione esaminato.
- √ MPV: Mean platelet Volume o Volume Piastrinico Medio. Indica il volume medio delle piastrine
- √ Reticolociti: Sono così chiamati i G.R. più giovani, appena sfornati dal midollo.
- √ Formula Leucocitaria: Conosciuta anche come conteggio differenziale dei leucociti, permette di valutare la percentuale di ognuno dei cinque tipi di GB (neutrofili, eosinofili, basofili, linfociti, monociti). Può essere effettuata automaticamente dai contatori elettronici, oppure mediante l'osservazione al microscopio ottico di una goccia di sangue strisciata su un vetrino. Questo viene colorato con appositi coloranti contenenti sostanze chimiche che reagiscono con i costituenti delle cellule del sangue, impartendo loro una colorazione diversa, permettendo così di riconoscere i vari tipi cellulari. L'osservazione al microscopio presenta, rispetto alla formula generata dai contatori elettronici, il vantaggio di poter osservare direttamente le cellule ematiche e di valutare l'eventuale presenza di cellule anomale.

Conoscendo il numero totale di GB (ottenuto con l'emocromo) e la percentuale relativa di ognuno dei cinque tipi di leucociti è possibile conoscere il numero assoluto di questi ultimi nel sangue. Basta moltiplicare la percentuale del tipo di leucocita considerato per il numero totale di GB e dividere per 100. Es. Se il numero di globuli bianchi totali è 10.000/mL ed i neutrofili sono il 50%, il numero assoluto di neutrofili è 5.000/mL cioè $(10.000 \times 50)/100$. Per valutare se c'è un aumento (o una diminuzione) reale di un tipo leucocitario è importante considerare non tanto la percentuale relativa, bensì il valore assoluto calcolato con la formula di cui sopra.

3. CASISTICA ESAMINATA

Sono stati sottoposti ad analisi statistica, 205 pazienti candidati ad intervento cardiocirurgico.

Tra questi, 115 candidati a by-pass aorto-coronarico, 33 candidati a by-pass aorto coronarico associato, 37 candidati ad intervento valvolari isolati, 15 a valvolari combinati e 4 a impianto d'assistenza ventricolare tipo Jarvik 2000.

I dati sono stati raccolti nell'unità operativa di Cardiocirurgia dell'ospedale SS. Annunziata di Chieti.

Nessuno dei pazienti presentava gravi stati d'infezione nel post-operatorio.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a tecniche operatorie e anestesologiche di routine; è stato praticato un accesso in sternotomia mediana e l'uso di CPB in normotermia con cannulazione arteriosa in aorta ascendente e cannulazione venosa in atrio destro attraverso la cannula two stage nel caso di pazienti candidati a solo by-pass aorto coronarico, e cannulazione bicavale per quanto riguarda i pazienti sottoposti ad interventi valvolari e interventi combinati. I valori dall'ACT sono stati mantenuti superiori a 480s, secondo il protocollo eparinico 3mg/kg, antagonizzata a fine intervento con protamina secondo un rapporto di 1:1.

I pazienti sono stati perfusi a seconda della necessità con pompa roller o pompa centrifuga con flussi pari a $2/4L/min/m^2$ di superficie corporea, mantenendo una pressione di perfusione sistemica sempre nel range di 55-75 mmHg.

Le tecniche di cardioplegia utilizzate prevedevano l'utilizzo di cardioplegia ematica normotermica iperpotassica nei candidati al solo intervento di bypass aorto-coronarico, e soluzione HTK di Bretschneider (Custodiol) per quanto riguarda tutti gli altri pazienti.

CARATTERISTICHE PAZIENTI

ETÀ	68	BPCor ISOLATI	115
SESSO FEMMINILE	71	BPCor ASSOCIATI	33
SESSO MASCHILE	134	VALVOLARI ISOLATI	37
DIABETI	73	VALVOLARI ASSOCIATI	15
IPERTESI	153	IMPIATO JARVIK	4
GLOBULI BIANCHI BASALI >10.000	8	CPL EMATICA	90
CREATININA BASALE > 1,5	20	CPL CRISTALLOIDE	83
FANS	8	TEMPO DI CEC	95,5
STATINE	1	TEMPO DI CLAMPAGGIO AORTICO	69,7

4. ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata condotta sui livelli sierici di interleuchine, e sulla loro cinetica di modulazione, sui globuli bianchi rilevati nel post-operatorio e sulla variazione della creatininemia rispetto al valore basale. Inoltre sono stati analizzati tutti i possibili fattori con ipotetica rilevanza nel determinismo di rialzo di creatininemia, come codificato dalla classificazione AKI Network, quali età, sesso, ipertensione, pressione media di perfusione, tipo di cardioplegia, tempo di durata di clampaggio aortico e di circolazione extracorporea. È stata studiata la variazione di creatinina in tutti i pazienti che presentavano una malattia ischemica isolata e non. Questa scelta, che inevitabilmente porta alla riduzione del power dello studio, è motivata dalla necessità di uniformare il campione analizzato, scegliendo solo i pazienti con malattia coronarica aterosclerotica, in cui potenzialmente si potrebbe avere un interessamento del microcircolo renale: si considera perciò la malattia coronarica come fattore di rischio nello sviluppo di movimento significativo di creatininemia nel post-operatorio. Questo gruppo di pazienti è stato suddiviso in base al tipo di cardioplegia utilizzata durante l'intervento, quali ematica e cristalloide (Custodiol). Come prima accennato, la variazione di creatinina è stata valutata in base alla classificazione dell'AKIN:

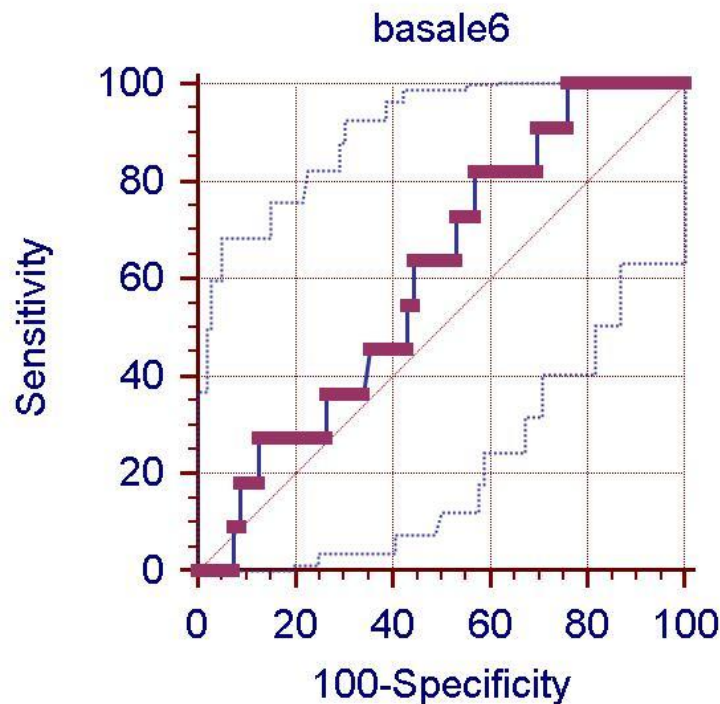
STAGE	SERUM CREATININE CRITERIA
1	Increase in serum creatinine of more than or equal to 0,3mg or increase to more than or equal to 150-200% (1,5- to 2-fold) from baseline
2	Increase in serum creatinine to more than 200-300% (>2- to 3-fold) from baseline
3	Increase in serum creatinine to more than 300% (>3-fold) from baseline or requiring renal replacement therapy

Come supporto strumentale dell'analisi statistica è stato utilizzato il software Med-Cal versione 11.4.1.0., proponendo una regressione logistica sulle variabili in esame. Come variabile dipendente è stato scelto il movimento di Creatininemia rispetto al valore basale preoperatorio; variabili indipendenti sono state invece pressione di perfusione media, creatininemia pre-operatoria, globuli bianchi pre-operatori, IL-6 basale, dopo protaminizzazione sistemica e chiusura sternale, dopo sei ore dall'uscita della sala e al rientro in reparto; IL-8 basale, dopo protaminizzazione sistemica e chiusura sternale, dopo sei ore dall'uscita della sala e al rientro in reparto; globuli bianchi post-intervento; è stato considerato significativo ogni valido risultato con $p < 0,05$. Le variabili risultate significative sono state sottoposte ad analisi ROC (Receiver Operating Characteristic).

5. RISULTATI E GRAFICI

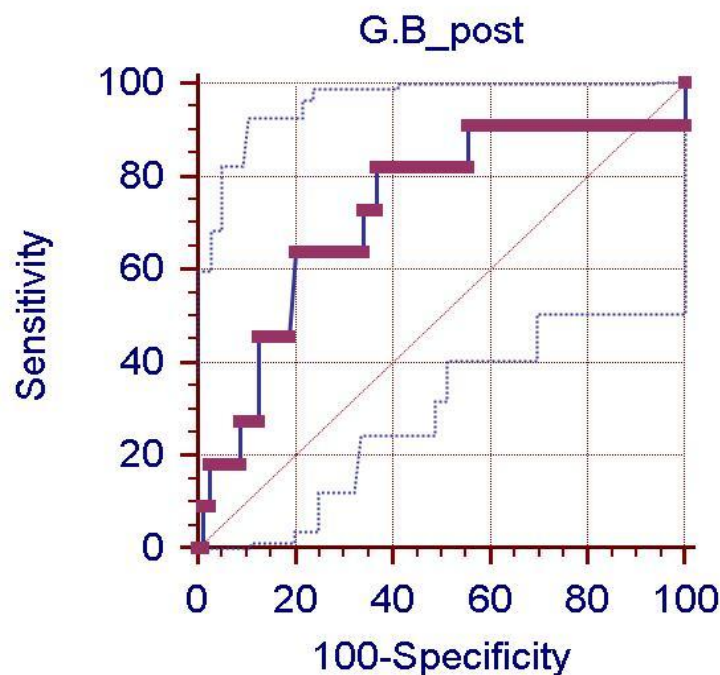
Dall'analisi del database suddiviso in due gruppi a seconda del tipo di cardioplegia ematica utilizzata, è risultato che la frequenza di movimento significativo di Creatininemia rispetto al basale è stata di 11/90 nel gruppo "ematica" e 2/30 nel gruppo "cristalloide". Dall'ulteriore analisi condotta due sono risultate le variabili predittive di movimento post-operatorio significativo della creatininemia, nel gruppo dei pazienti che ha subito procedura chirurgica con cardioplegia ematica, mentre nessuna variabile è risultata nel gruppo "cristalloide".

In prima battuta i valori basali di interleuchina-6 sono risultati correlati all'end point in esame, con una $p = 0,046$. Questa interleuchina è ritenuta essere un markers specifico dello stato infiammatorio del paziente, sia nel preoperatorio che nel postoperatorio.



Il grafico evidenzia una AUC (area sotto la curva) di 0,606; con errore standard di 0,0808, e una $p= 0,19$. Questi dati indicano che IL-6 pre-operatorio pur mostrando una significatività alla regressione logistica di 0,046, ha una modesta rilevanza clinica avendo una sensibilità del 81,1%, ed una specificità del 43%.

Inoltre un secondo parametro nel postoperatorio si è dimostrato correlare con lo sviluppo dell'end point considerato, ovvero l'aumento del livello ematico di globuli bianchi (senza distinzione delle sottopopolazioni). Come è intuitivo ogni gesto chirurgico comporta una attivazione e reclutamento dei globuli bianchi, come segno della cascata infiammatoria aspecifica. Nella presente tesi, sono stati presi in esame soltanto gli interventi condotti con la CEC; risulta quindi chiaro come la montata post-operatoria dei globuli bianchi sia da imputare non solo al gesto chirurgico, ma anche al contatto dei globuli bianchi stessi con le superfici non biologiche dei circuiti della CEC. Si è osservato per questo parametro una $p= 0,0048$



Il grafico evidenzia una $AUC=0,724$, con errore standard di $0,0918$; ed una $p=0,0147$. La valenza clinica dei dati è mostrata dalla sensibilità= $81,8\%$, e dalla specificità= 63% .

6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La tesi in esame esordisce da un problema osservato in una fetta significativa dei pazienti che devono essere sottoposti a chirurgia cardiaca, ovvero la possibilità di un movimento significativo di creatininemia e il possibile sviluppo quindi di una insufficienza renale di grado variabile capace di influenzare l'outcome del paziente.

Da quando nacque la disciplina cardiocirurgica, si è assistito ad un progressivo cambiamento della popolazione oggetto di intervento: l'età media dei pazienti è aumentata e con essa l'incidenza di comorbidità capaci di ridurre la riserva d'organo in toto e aumentare la fragilità del paziente. Esempi lampanti sono le problematiche respiratorie, critiche soprattutto nella gestione anestesiologicala del soggetto, e appunto quelle renali.

Nella precedente trattazione si è dimostrato quali sono gli effetti di una insufficienza renale nel periodo postoperatorio. Oggetto della tesi è stato proprio capire quali parametri, possibilmente modulabili dal medico, sono correlati con movimento significativo della creatininemia, secondo la classificazione AKI Network.

Dalla coorte originale dei pazienti consecutivi, sottoposti ad interventi chirurgico nel periodo Marzo 2009 - Maggio 2010, sono stati selezionati solo quelli che necessitavano di rivascolarizzazione chirurgica per presenza di stenosi emodinamicamente significative documentate all'esame coronarografico. Questa

scelta da un lato ha ridotto il power dello studio, ma dall'altro ha restituito un campione più omogeneo: infatti la presenza di aterosclerosi coronarica rappresenta una manifestazione di un processo sistemico, che ipoteticamente avrebbe potuto colpire anche il circolo renale, riducendone la riserva d'organo. In assenza di esami mirati a valutare la qualità dei vasi renali di medio e piccolo calibro, si è preferito eliminare coloro i quali non risultassero portatori di malattia coronarica, eliminando un possibile bias.

Nel campione così conformato si è passati a fare due gruppi, scindendolo in base alla soluzione cardioplegica usata (ematica o cristalloide).

Questa scelta nasce da due ordini di motivi:

Gli interventi condotti con cardioplegia ematica sono tutti CABG isolati, con tempo di clampaggio medio= 59,95'; deviazione standard= 21,81 e tempo di CEC medio=78,16'; deviazione standard=21,81; mentre quelli condotti con cardioplegia cristalloide – HTK solution sono procedure associate, con tempo di clampaggio medio= 101',deviazione standard=27,48; e tempo di CEC medio= 145',deviazione standard= 47,12.

La differenza in termini di durata, ponendo che le equipe chirurgiche nei due gruppi sono le stesse e si alternano con la medesima frequenza, è lampante e concettualmente propende per una differenza di insulto infiammatorio tra i gruppi.

Le due cardioplegie sono profondamente differenti, sia nella modalità di somministrazione che nella natura dei suoi costituenti. La cardioplegia ematica è composta dal sangue del paziente stesso addizionato con potassio per provocare l'arresto in diastole del cuore; viene somministrata ogni 15 minuti circa, in quantità variabile alla risposta del miocardio. In una ottica puramente pratica si

tratta di un ricircolo intermittente di sangue, protratto per tutta la durata dell'intervento, che ad ogni ciclo origina e termina nel circolo "generale" (vasi ematici + tubi + pompa). Questa dinamica comporta che nelle somministrazioni successive alla prima, il cuore riceve sangue contaminato da mediatori dell'infiammazione e che il sangue stesso "lava" i cataboliti e mediatori paracrini prodotti dal cuore durante l'arresto cardioplegico.

Ciò non accade durante l'uso della cardioplegia cristalloide, poiché la unica somministrazione (fino a 3 ore di arresto) è fatta con sostanza esogena. Ritornando all'analisi condotta, è risultato che nell'ottica di un movimento significativo di creatininemia nel post-operatorio, si sono rilevate frequenze di evento differenti – 11/90 nel gruppo "ematica" vs 2/30 nel gruppo "cristalloide" – ma non statisticamente significative, a causa del campione ridotto. Se però si considera la maggiore complessità degli interventi condotti con soluzione cardioplegica HTK (nota dalla presenza di procedure associate e dalla diversità dei tempi di clampaggio e CEC medi) il dato si dimostra più interessante.

Tentando di chiarire quali variabili fossero predittive dell'evento, utilizzando una regressione logistica, è emerso come solo nel gruppo "ematica" fossero significativi i livelli basali di IL-6 e i livelli post-operatori di IL-8.

L'IL-6 preoperatoria rappresenta una istantanea del processo infiammatorio latente (poiché non documentato da una leucocitosi tale da controindicare l'intervento, né tantomeno da iperpiressia) che iperbolizza all'atto del trauma chirurgico e CEC.

Il livello ematico di globuli bianchi risente e risponde all'insulto della circolazione extracorporea, in cui i leucociti a contatto con le superfici non

biologiche del circuito, vengono attivati, producendo mediatori paracrini e autocrini, tra cui la IL-8. In letteratura questa citochina è correlata da studi recenti allo sviluppo dell'evento in esame. Non è stato possibile, in questo lavoro, documentare il movimento di IL-8 per problemi organizzativi nell'interfaccia tra i reparti coinvolti.

Poiché l'IL-8 è prodotta proprio dai leucociti attivati, è possibile ipotizzare che la montata dei leucociti nel post-operatorio possa essere misura indiretta dei livelli sierici della citochina in questione; inoltre l'emivita di questi mediatori paracrini e autocrini risulta essere molto breve, 6-12 ore al massimo, mentre la leucocitosi relativa indotta dal trauma chirurgico permane riducendosi, in assenza di fenomeni di marginazione, con una emivita di 1,5-2 giorni.

Nel gruppo "cristalloide", nessun parametro è risultato statisticamente significativo, tantomeno l'IL-6 basale e leucociti post-operatori, risultati predittivi dell'evento nel gruppo precedente.

Possiamo perciò affermare che l'utilizzo della cardioplegia HTK risulterebbe protettiva nel determinismo di movimento significativo di creatininemia come stabilito dalla classificazione AKIN.

Nell'ottica della gestione complessiva del paziente candidato a chirurgia cardiaca maggiore, questo studio preliminare suggerisce l'impiego della cardioplegia cristalloide in tutti quei pazienti a rischio di sviluppare insufficienza renale acuta post-operatoria o quei pazienti che già nel preoperatorio dimostrano valori di clearance renali borderline o patologici. Infatti in questi pazienti allo stato dell'arte, ove possibile, è praticata la rivascolarizzazione miocardica a cuore battente, tecnica che richiede una manualità e velocità non propria degli operatori

meno esperti; inoltre la presenza di vasi target intramiocardici rende problematica, se non impossibile, l'esposizione degli stessi durante la normale attività contrattile del cuore.

Dallo studio prospettico illustrato la cardioplegia ematica si è dimostrata essere un fattore di rischio, il cui peso deve essere ancora indagato, per lo sviluppo di un movimento significativo di creatininemia nel post-operatorio rispetto al basale, così come classificato dai criteri AKIN. Questo fenomeno è stato correlato al livello basale di IL-6, marker dello stato infiammatorio preoperatorio del paziente e alla leucocitosi relativa osservata nel post-operatorio, come surrogato del livello sierico di IL-8.

Nel gruppo sottoposto a chirurgia cardiaca maggiore con soluzione cardioplegica HTK, nonostante una maggiore complessità operatoria, le frequenze di evento osservate sono state più basse e nessun parametro pre- o postoperatorio si è dimostrato essere predittivo di movimento significativo di creatininemia rispetto al basale.

Questo studio preliminare, suggerisce l'eventuale effetto protettivo della cardioplegia cristalloide HTK sulla performance renale in pazienti con funzionalità renale normale e patologica, ponendo le basi per ulteriori studi.

BIBLIOGRAFIA

- Giuseppe C. Baldoni “Anatomia Umana”, 3° edizione EDI-ERMES
- F.P. Schena, F.P. Selvaggi “Malattie dei reni e delle vie urinarie”, 2° edizione Mc Graw-Hill
- D.U. Silverthorn “Fisiologia”, Ambrosiana
- Sante Tura “Lezioni di Ematologia” Esculapio 2003
- Charles A. Janeway; Paul Travers, Mark Walport, Mark J. Shlomchik, Immunobiologia (3° edizione italiana sulla 6° inglese), Padova, Piccin, 2007
- Renzo Lodi, Giorgio Norea, Claudio Costantini; Circolazione Extracorporea e Supporti Circolatori (2° edizione), Mattioli
- Sean M. Bagshaw, MD MSc, FRCPC; R. T. Noel Gibney, MB, FRCP(C) “Conventional markers of kidney function”, Crit Care Med 2008 Vol. 36, No. 4 (Suppl.)
- Szu-Yuan Li, Jinn-Yang Chen, Wu-Chang Yang, Chiao-Lin Chuang; “Acute Kidney injury network classification predicts in-hospital and long term mortality in patients undergoing elective coronary artery bypass grafting surgery” 2010
- Maurício de Nassan Machado, Rafael Carlos Miranda, Isabela Thomaz Takakura, Eduardo Palmegiani; “Acute Kidney Injury after On-pump Coronary Artery Bypass Graft Surgery” 2009
- Carlos V. Serrano Jr MD, PhD, FACC, Juliana A. Souza MD, Neuza H. Lopes MD, PhD, Juliano L. Fernandes MD, José Carlos Nicolau MD, PhD, FACC, Maria Heloisa S.L. Blotta PhD; “Reduce expression of

systemic proinflammatory and myocardial biomarkers after off-pump versus on-pump coronary artery bypass surgery: A prospective randomized study” 2010

- Rinaldo Bellomo, Claudio Ronco, John A Kellum, Ravindra L Mehta, Paul Palevsky and the ADQI workgroup “Acute renal failure –definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group” May 2004
- Orfeas Liangos, Alexey Kolyada, Hocine Tighiouart, Mary C. Perianayagam, Ron Wald, Bertrand L. Jabert; “Interleukin-8 and Acute Kidney Injury following Cardiopulmonary Bypass: A Prospective Cohort Study” August 2009
- Song Wan, MD, PhD, Mohammad Bashir Izzat, FRCS (Cth), Tak Wai Lee, FRCS, Innes Y.P. Wan, FRCS, Nelson L.S. Tang, FRCPA, And Anthony P.C. Yim, MD; “Avoiding Cardiopulmonary Bypass In Multivessel CABG Reduces Cytokine Response And Myocardial Injury” 1999

Grazie....

Nonostante la pagina che mi accingo a completare sia l'ultima di questa tesi, è stata la prima che ho iniziato a scrivere, fin dall'inizio dell'università.

Pertanto non posso far altro che ringraziare, dedicando questo lavoro a tutti coloro che mi hanno sostenuto ed incoraggiato fino ad arrivare a questo obiettivo della mia vita:

Il mio primo pensiero va ai Miei Genitori, senza il loro aiuto non avrei mai raggiunto questa meta. Sono davvero grata per tutto il sostegno economico, ma più di ogni altra cosa di quell'aiuto tacito o esplicito che è venuto dal loro cuore; ma soprattutto per la soddisfazione che hanno saputo donarmi, dimenticandosi del mio "caratterino", ultimamente non di certo facile. Mi auguro che tutti i sacrifici spesi siano in questo modo ripagati, almeno in parte.

A Mia Sorella con la quale non so mai dove finisce la sorella e dove inizia l'amicizia

A Mio Fratello, sono sincera, sono impazzita nel vero senso della parola per cercare una frase giusta per descrivere il suo sostegno ricevuto in questi anni da studentessa...per questo ti dico solo grazie per essere mio fratello....

A Maurizio, che con estrema pazienza ha sopportato i miei sbalzi d'umore e le mie paranoie, quando, sotto stress, mi sfogavo in modo particolare con lui. Se ho raggiunto questo traguardo lo devo alla sua continua presenza, per avermi fatto capire che potevo sempre farcela, incoraggiandomi a "non mollare mai".

Ai Miei Zii e ai Miei Cugini, in particolare al piccolo Antonio che benchè il più piccolo ha dato il suo contributo nella realizzazione di questo lavoro

A Zia e a Nonno che ci hanno sempre creduto e che oggi gioiranno da lassù

A Gina che trova sempre il metodo per ricaricarmi

Ai Miei Colleghi nonché amici, in particolare a Fausto che prima di essere il collega è il vero amico, ad Angela con cui ho superato sempre la magica frase “questa volta non ci riusciamo” e alla fine abbiamo ottenuto quasi sempre i miglior risultati, a Laura che grazie al nostro fantastico inglese siamo Friends of the bank, a Sara che con la sua ansia mi ha sempre tranquillizzata, a Marco il super preciso, e a Rocco. Inoltre non finirò mai di ringraziarli per l’infinito sostegno e per i loro sorrisi nei miei momenti di panico, e soprattutto nel momento in cui urlavo: aiuto questi pensano che io sia un genio in tutto soprattutto in statistica, ma non sanno che io non ci capisco nulla!!!”

A tutti i Miei Amici in particolare alla “Fanatch”

A Daniele che mi ha accompagnata in questa avventura sin dai tempi del disgelo

A Gabriele che nonostante le discordanze abbiamo sempre trovato un punto d’incontro, e con il suo “modo di fare” mi ha sostenuto .

A tutto il personale del reparto di Cardiologia di Chieti, e a tutta l’equipe delle sale Cardiologiche, in particolare ai perfusionisti

A Me Stessa che Km dopo Km ho cercato solo di trovare il ritmo migliore, per tagliare quel traguardo che oggi mi accingo ad attraversare.