

# **Introduzione generale sulle metodiche: plasmaexchange, plasmatrattamento, citoaferesi terapeutica**

**Gianpaolo Russi**

Medicina Trasmfusionale

Azienda Ospedaliera - IRCCS  
Arcispedale S. Maria Nuova di Reggio Emilia

## Una metodica aferetica consiste in:

- 1. PRELIEVO DEL SANGUE DEL PAZIENTE**  
con flusso continuo o discontinuo;
- 2. SEPARAZIONE DEI COMPONENTI EMATICI**  
mediante centrifugazione o filtrazione su membrane separatrici;
- 3. RIMOZIONE DELL'EMOCOMPONENTE (CELLULA O MOLECOLA) DA ELIMINARE**  
più o meno selettiva
- 4. REINFUSIONE DEI COMPONENTI EMATICI NON ELIMINATI**  
con eventuale aggiunta di liquidi di sostituzione per mantenere costante il volume ematico.

# Metodiche Aferetiche

## 1. PLASMAEXCHANGE (PLASMAFERESI TERAPEUTICA)

→ rimozione di tutto il plasma del paziente con successiva infusione di una soluzione sostituyente (plasma fresco congelato, soluzioni elettrolitiche, albumina) per reintegrare il volume sottratto;

## 2. PLASMATRATTAMENTO

→ tutte le metodiche di **rimozione semiselettiva** (Filtrazione a cascata) e **selettiva** (Adsorbimento) dal plasma di sostanze patogene. Di norma non prevede reinfusione di soluzioni sostituyente;

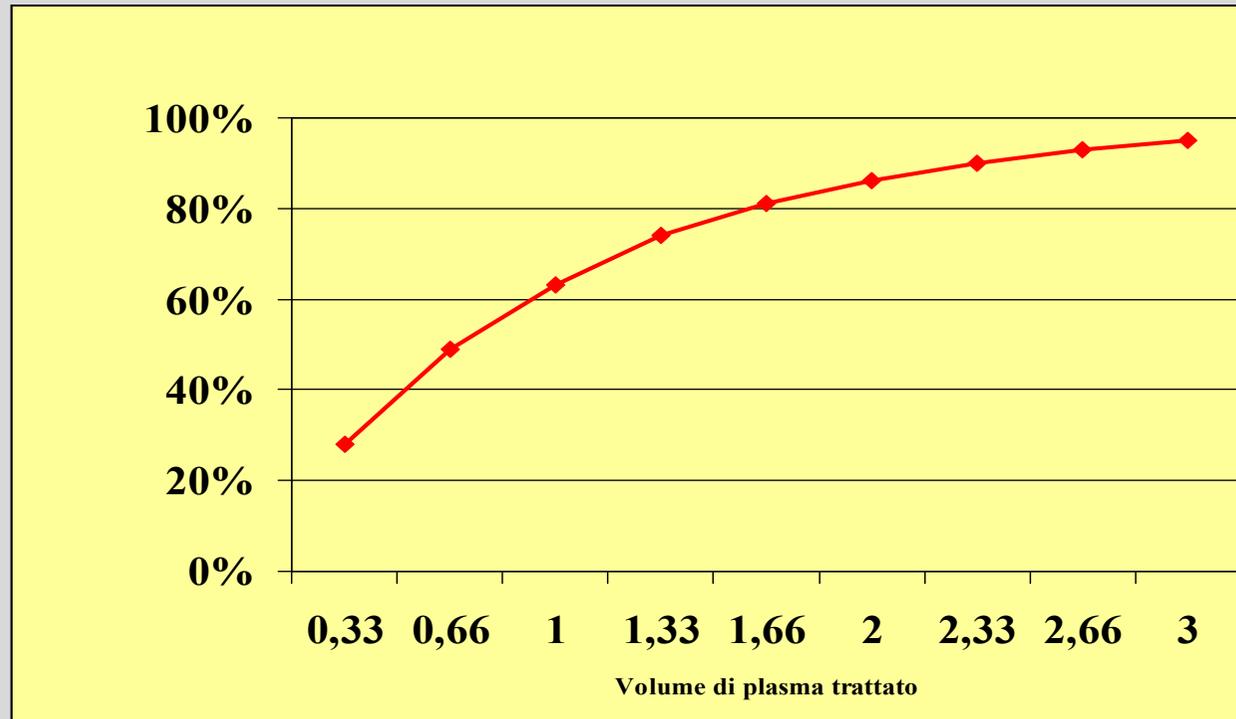
## 3. CITOAFERESI TERAPEUTICA

→ rimozione di una o più componenti cellulari ematiche in eccesso o patogene.

## Caratteristiche delle molecole patogene che influenzano l'efficacia della terapia aferetica

- **Tossicità acuta intrinseca**, che ne renda conveniente l'eliminazione rapida
- **Dimensioni sufficientemente grandi** (PM>15000 Dalton) o formazione di complessi che rendano inefficaci tecniche di depurazione come la dialisi
- **Distribuzione della molecola tra spazio intravascolare ed extravascolare** ( IgM all'80% intravascolari, IgG solo al 40%) e velocità di riequilibrio tra i due compartimenti
- **Velocità di sintesi e degradazione** della sostanza (Clearance endogena della sostanza o emivita: IgM 5 gg, IgG 23 gg)

## Riduzione percentuale di sostanze patologiche



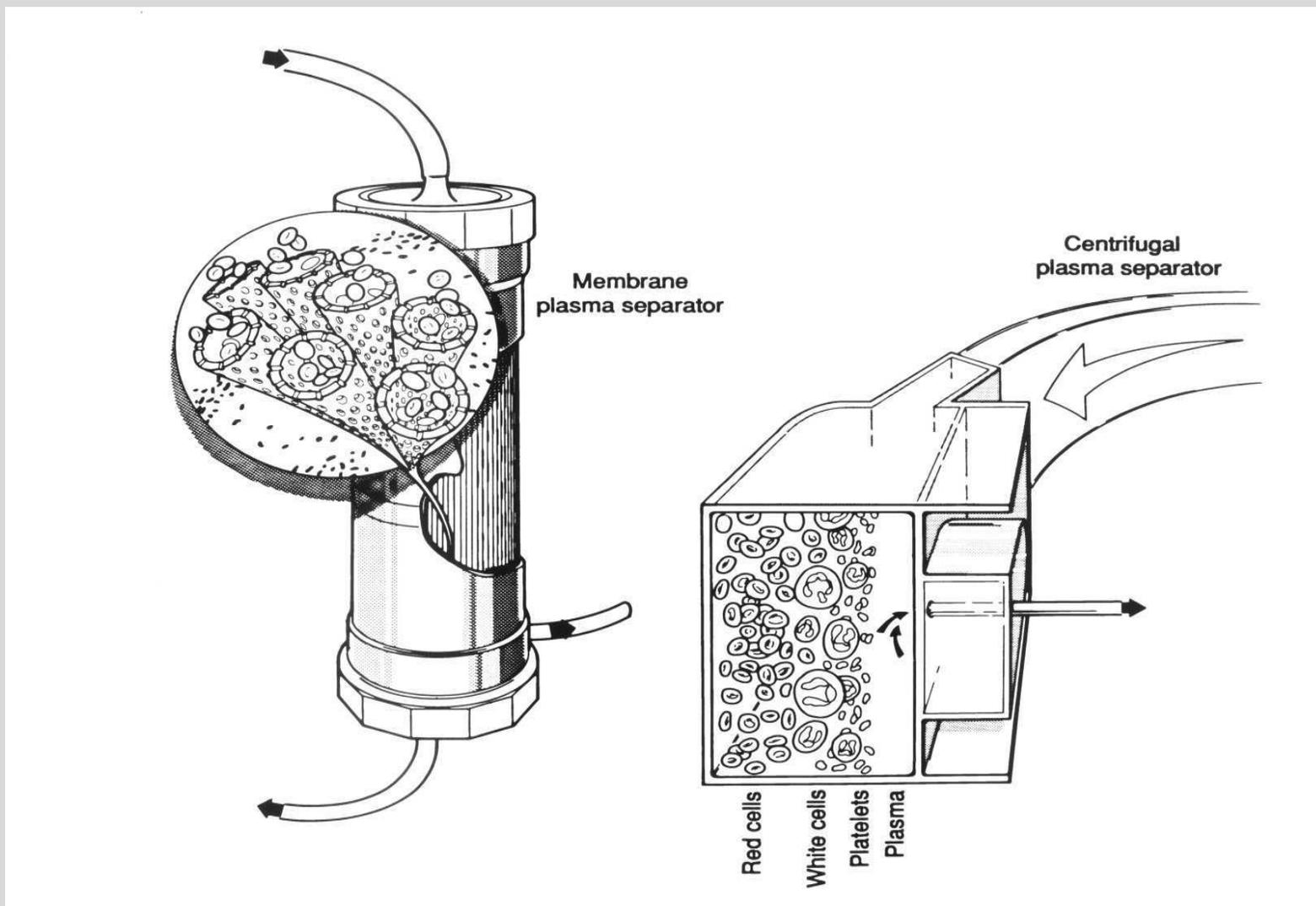
Volume plasmatico scambiato	Percentuale di sostanza rimossa
1 volume	63%
2 volumi	86%
3 volumi	95%

## Caratteristiche fisiche del sangue utilizzate per la sua separazione

Filtration			Centrifugation		
	Diameter ( $\mu\text{m}$ )			Density (specific gravity)	
	Plasma		Plasma	(1.025-1.029)	
	Platelet	3		(1.040)	
	RBC	7		(1.070)	
	Lymphocyte	10		(1.087-1.092)	
	Granulocyte	13		(1.093-1.096)	

Figure 5-1. Distribution of blood components by size and weight. (Courtesy of Mayo Clinic)

# Separazione del plasma dal sangue intero utilizzando la centrifugazione e/o la filtrazione.



# CENTRIFUGAZIONE

La separazione del plasma dalle cellule ematiche avviene in base al coefficiente di sedimentazione sfruttando il diverso peso specifico (**separazione per densità**) e in certi casi le differenti dimensioni (**elutrazione per centrifugazione**) dei componenti ematici .

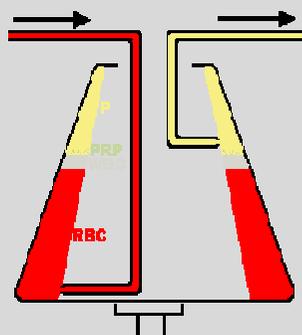
Il sangue scoagulato con citrato e sottoposto ad una forza centrifuga (**forza G**) sedimenta nella camera di separazione in strati che dal plasma attraverso le piastrine ed i leucociti arrivano alle emazie.

Qualora si utilizzi una bassa forza di centrifugazione alcune cellule, in particolare le piastrine, possono fluttuare nel compartimento plasmatico.

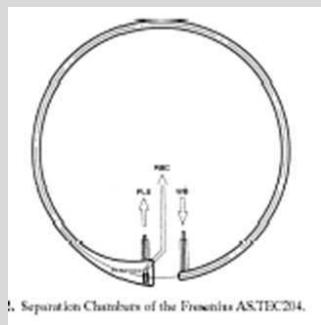
# CENTRIFUGAZIONE: SEPARATORI CELLULARI

- A flusso continuo o discontinuo a seconda degli accessi vascolari.
- Indicatori di flusso ematico e plasmatico
- Sistemi di controllo sui flussi di prelievo e reinfusione (allarme per bolle d'aria in reinfusione)
- Indicatori di emolisi
- Indicatori di pressione per eventuali filtri inseriti nel circuito
- Display visualizzante lo stato operativo e gli allarmi
- Protocolli operativi automatici con possibilità di modifica

## CAMERA DI SEPARAZIONE

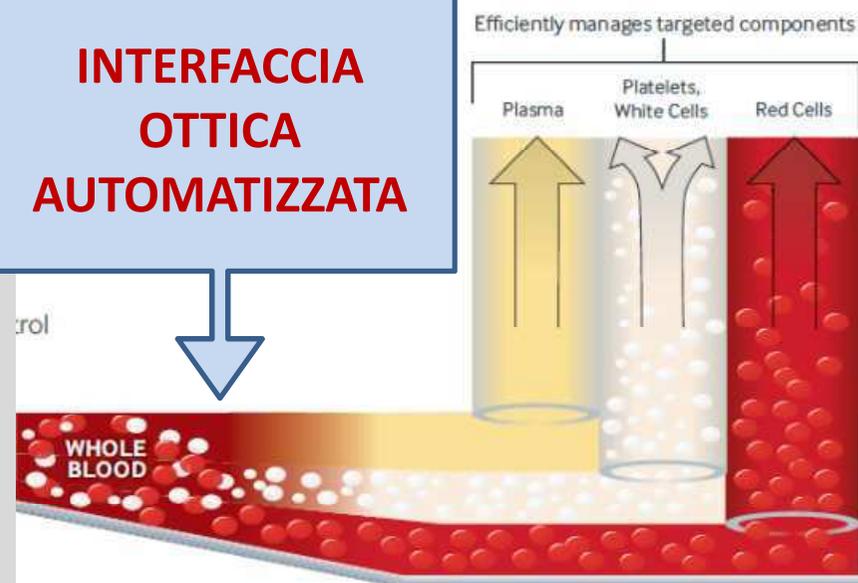


Spinning bowl  
(Campana)



Rotary belt  
(Cintura rotante)

## INTERFACCIA OTTICA AUTOMATIZZATA



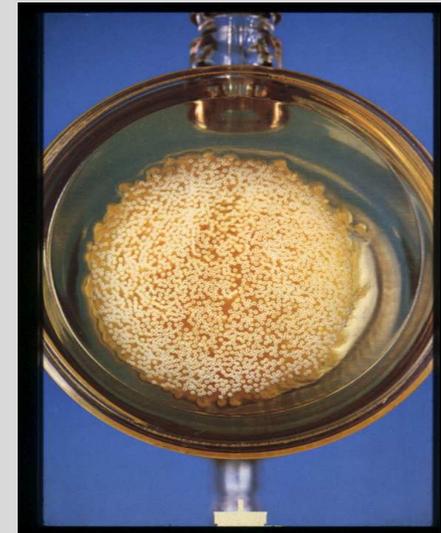
# FILTRAZIONE

Metodica mediata dall'emo dialisi dove il sangue scoagulato con eparina viene fatto fluire in un **plasmafiltro** composto da una membrana con micropori con volumi di extracorporea molto contenuti.

Sfruttando una bassa pressione di transmembrana e un Shear Rate ottimale per evitare l'emolisi, i micropori separano il plasma dalle cellule.

La filtrazione su membrana produce un plasma acellulare che può essere:

- scartato e rimpiazzato con un liquido sostituyente,
- avviato al plasmatrattamento per filtrazione cascata o su colonne adsorbenti.



# FILTRAZIONE

## Requisiti delle membrane filtranti:

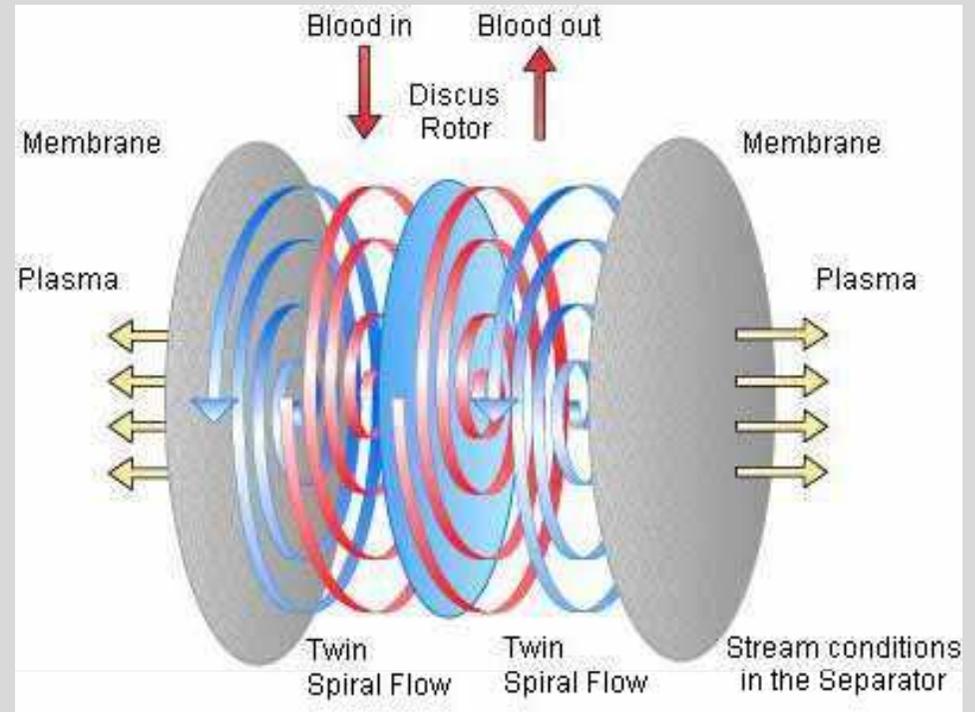
- porosità uniforme (0,2-0,6mm) con coefficiente di "sieving" vicino ad 1;
- idrofilia, biocompatibilità, apirogenicità,
- assenza di emolisi; elasticità e resistenza alle variazioni di flusso,
- pressione di transmembrana (PTM) costante,
- possibilità di sterilizzazione, nessuna perdita di sostanza.

Per il **fenomeno della polarizzazione da concentrazione**, si può formare uno strato proteico all'interno della membrana limita rapidamente la filtrazione.

Pressioni di transmembrana (PTM) elevate peggiorano la capacità di filtrazione, dando un precoce intasamento dei pori della membrana e un aumento del rischio di emolisi.

La plasmafiltrazione deve essere eseguita con PTM < 50mmHg e con flusso ematico tra 50 e 150 ml/min, per minimizzare la tendenza all'emolisi.

# METODICA DI FILTRAZIONE E CENTRIFUGAZIONE



Il sangue fluisce all'interno di una camera cilindrica contenente una membrana in policarbonato con pori di pochi micron ed un disco che ruota grazie ad un campo magnetico.

La forza centrifuga creata dal disco rotante separa i vari costituenti del sangue e la rotazione allontana le cellule dalla membrana filtrante attraverso la quale passa la componente plasmatica impedendo la saturazione del filtro.

# PLASMATRATTAMENTO

Le metodiche aferetiche sono tanto più selettive e specifiche quanto più il plasma viene trattato anziché sostituito in toto.

La differenza fondamentale rispetto al plasmaexchange consiste nel fatto che il plasma depurato viene restituito al paziente riducendo fortemente i rischi di infezione o di allergia legati all'uso di soluzioni sostituenti proteiche esogene.

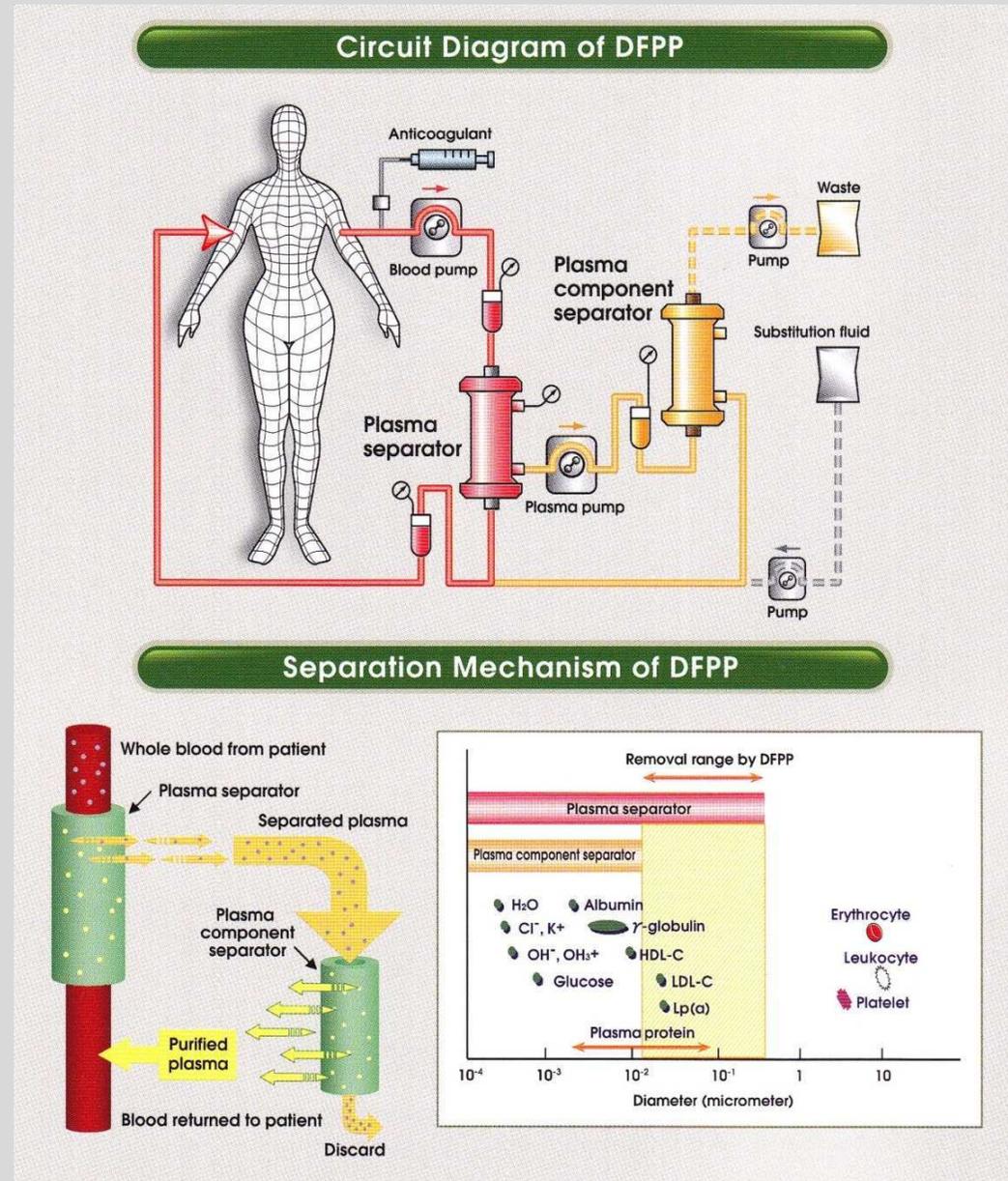
Il plasma può essere trattato e frazionato con tecniche di:

- 1. Filtrazione a cascata (tecniche semiselettive)**
- 2. Adsorbimento (tecniche selettive)**

# PLASMATRATTAMENTO SEMISELETTIVO

## Doppia filtrazione o filtrazione a cascata

Utilizza il principio di separare le molecole plasmatiche a più alto peso molecolare usando in sequenza due plasmafiltri, con differenti caratteristiche di porosità, posti in serie in un circuito extracorporeo.

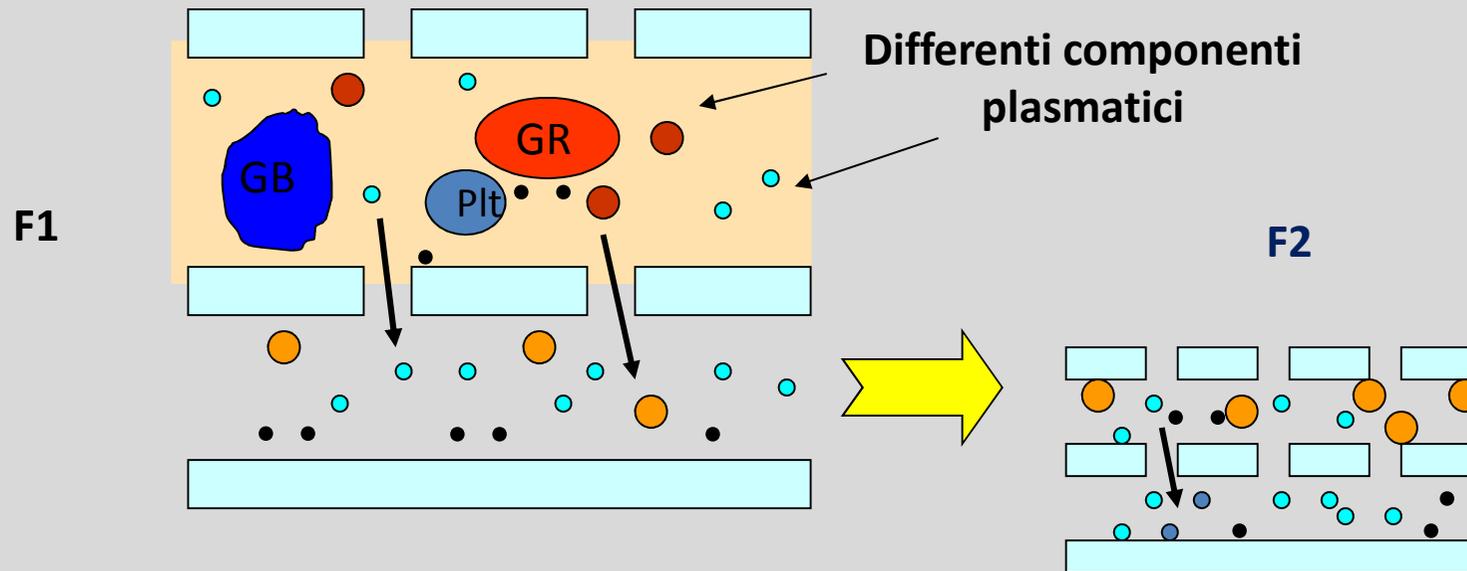


# PLASMATRATTAMENTO SEMISELETTIVO

## Doppia filtrazione o filtrazione a cascata

Si utilizzano filtri con pori di 0.01 – 0.06 mm in grado di permettere una rimozione semiselettiva di proteine con PM elevato.

Selezionando il diametro dei fori della membrana filtrante è possibile modulare il tipo e la quantità di molecole da rimuovere.



**Il plasma filtrato viene restituito al paziente evitando così l'uso di liquidi di sostituzione**

# ADSORBIMENTO

La tecnica di **adsorbimento mediante plasmaperfusione** su colonne con ligandi specifici è in grado di adsorbire selettivamente molecole dannose per l'organismo con metodiche immunologiche o chimico-fisiche.

Il limite di questa tecnica è nella **saturazione del ligando** che dipende sia dalla concentrazione plasmatica della sostanza da trattare sia dalla capacità di legame e dal volume di ligando utilizzato.

Esistono sistemi di adsorbimento che prevedono la possibilità di rigenerare la colonna utilizzando, con circolazione crociata, due colonne adsorbenti in parallelo che consentono con un software dedicato l'adsorbimento del plasma su una colonna e la contemporanea rigenerazione della seconda.

# ADSORBIMENTO

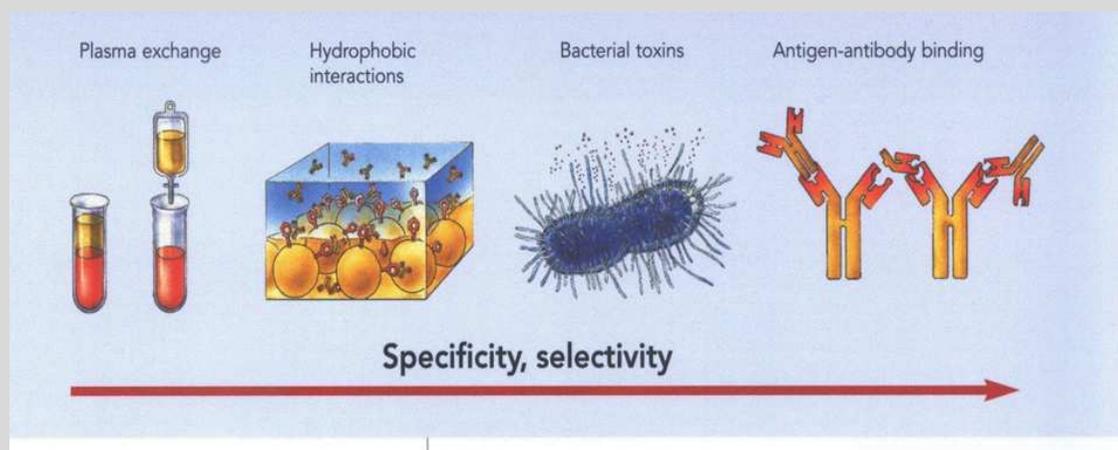
Le modalità operative dell'adsorbimento con plasmaperfusione sono simili a quelle della filtrazione a cascata a "dead-end":

1. Un plasma separatore produce plasma dal sangue intero del paziente che viene spinto con bassi flussi su una colonna di adsorbimento opportunamente scelta in base alla patologia da trattare.
2. Il plasma privo delle molecole adsorbite viene riunito alla fase cellulare e reinfuso al paziente.

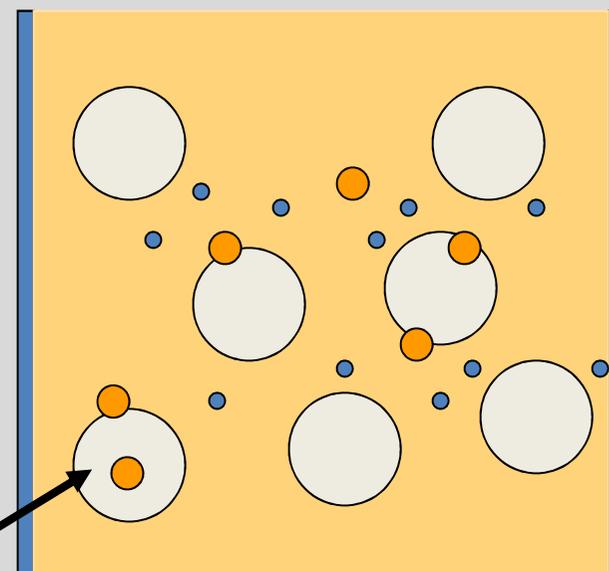
A seconda del tipo di colonne di affinità utilizzate, esistono sistemi di controllo che impediscono l'infusione al paziente di liquidi diversi dal plasma depurato, quali soluzioni di lavaggio o di rigenerazione.

# PLASMATRATTAMENTO MEDIANTE ADSORBIMENTO

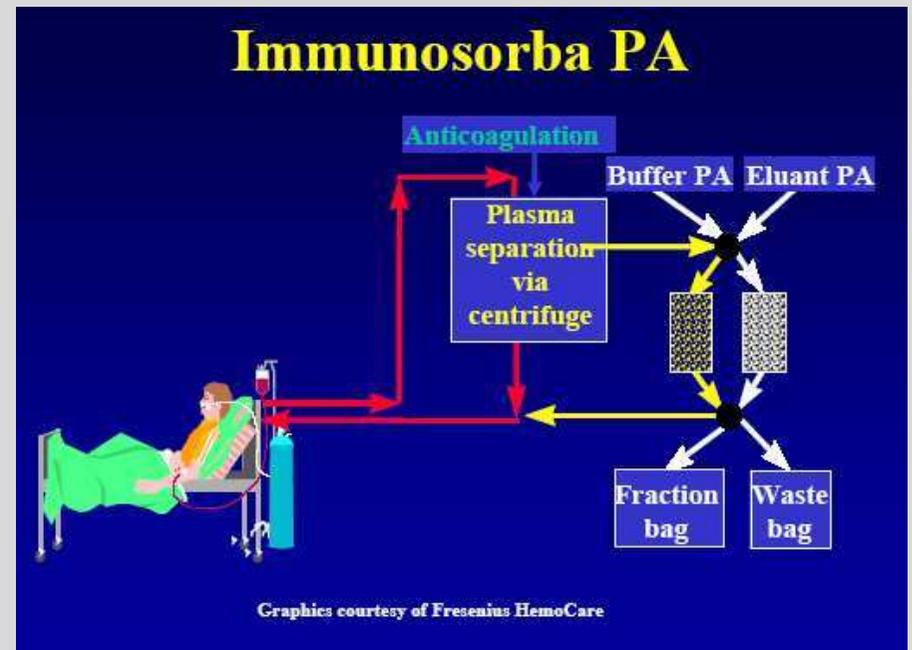
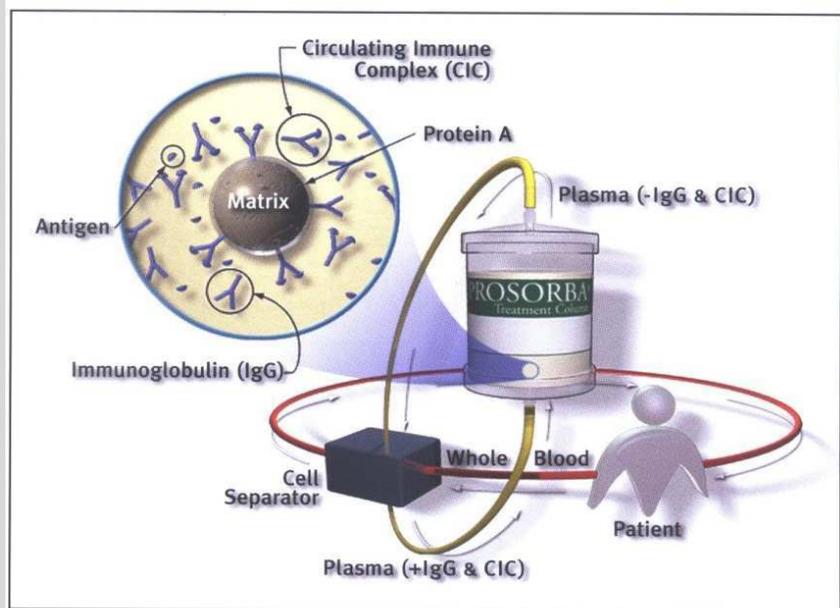
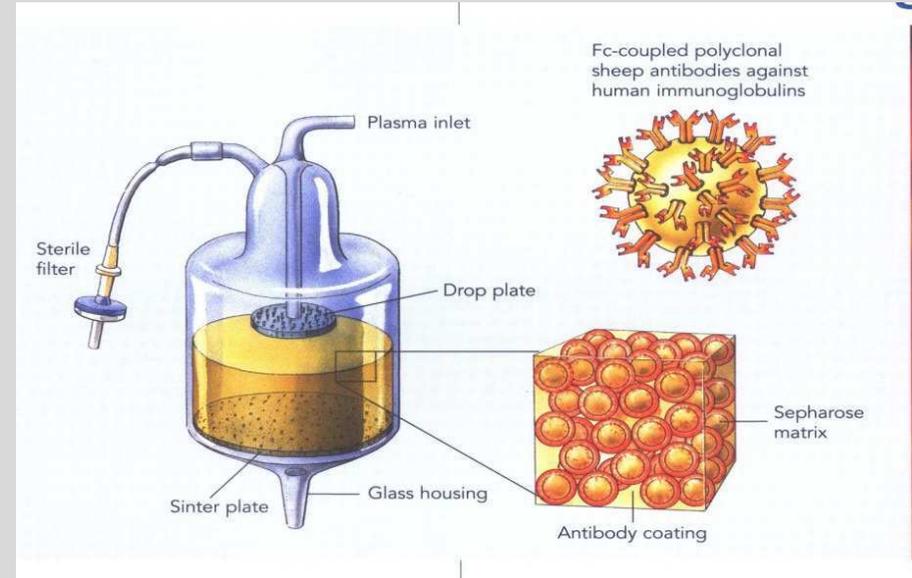
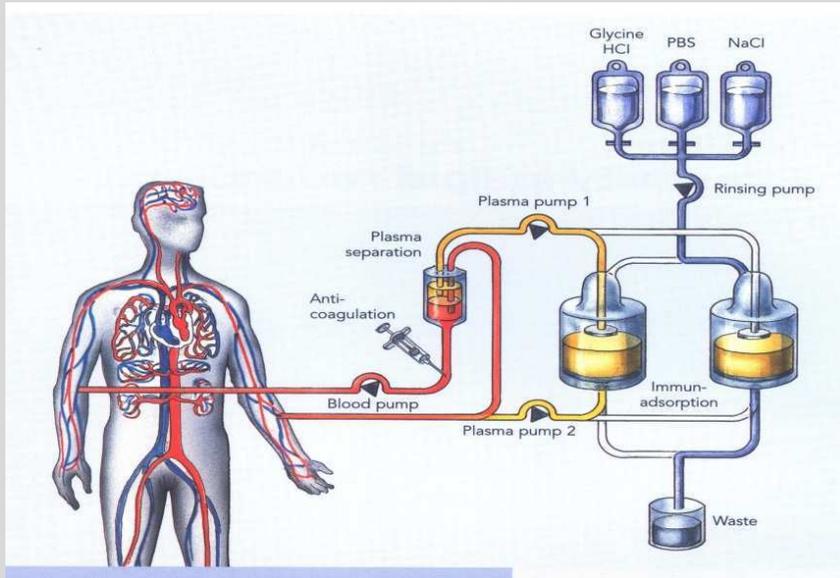
- **FISICO-CHIMICO**
  - **Precipitazione** mediante Eparina a pH acido (HELP)
  - **Legami elettrostatici:** Destrano solfato; Poliacrilato
  - **Idrofobico:** Triptofano; Fenilalanina
  - **Ionico:** Stirene-Divinilbenzene
- **BIOLOGICO (IMMUNOADSORBIMENTO):**
  - **Legame porzione Fc IgG:** Proteina A Stafilococco, Peptidi sintetici
  - **Legame Ag-Ac:** Ac anti ApoB100, Ac anti recettore  $\beta$ 1 adrenergico
  - **Legame Complemento:** C1q per Immunocomplessi



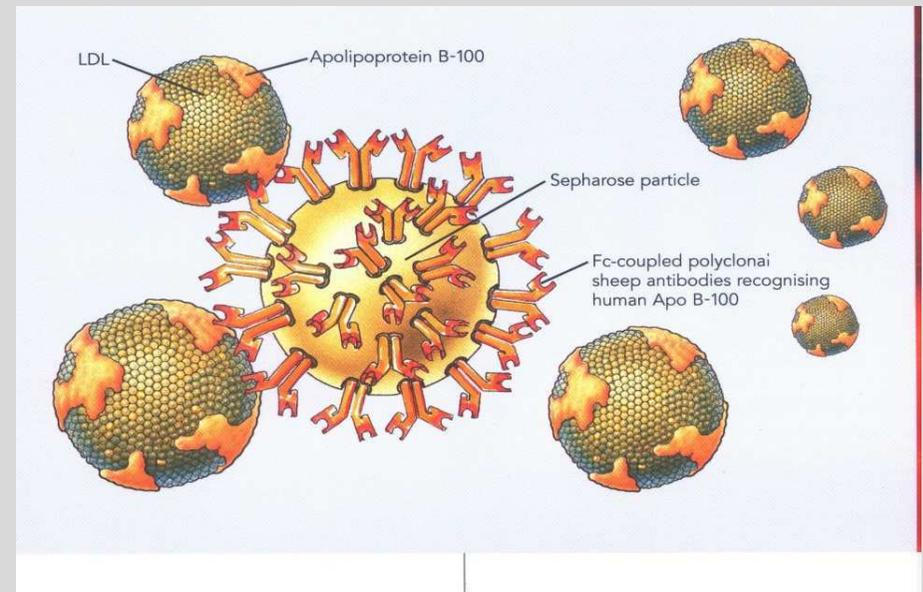
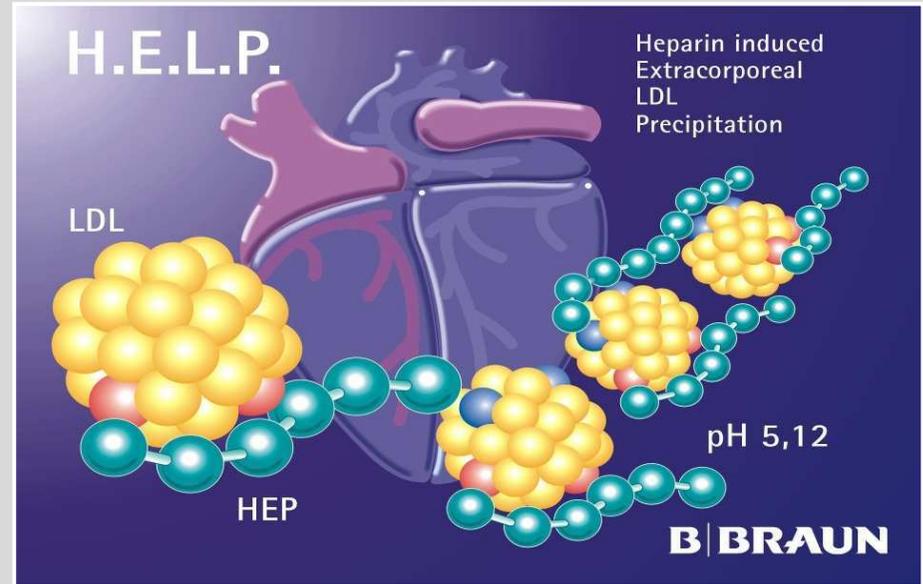
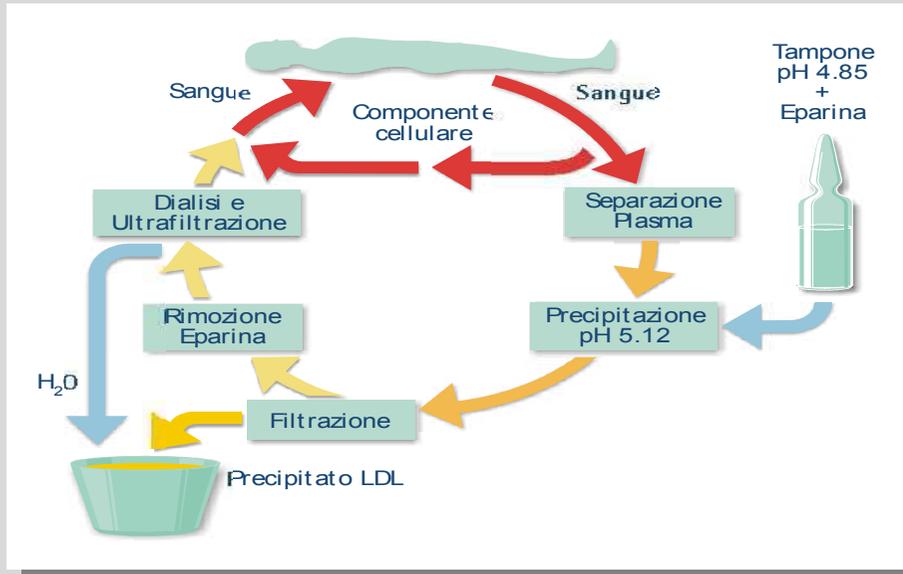
Mezzo Adsorbente



# IMMUNOASSORBIMENTO



# LDL-Aferesi



# Emoperfusione: Adsorbimento selettivo su sangue intero

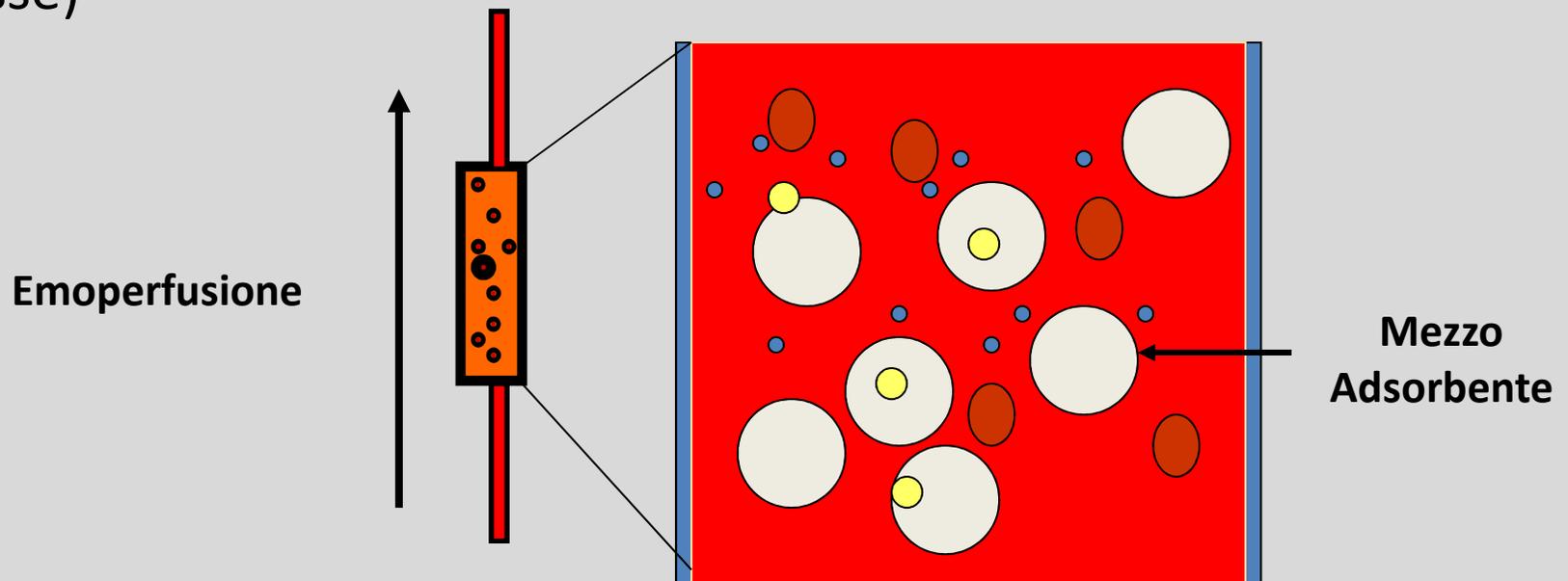
- **Legami elettrostatici:**

ApoB100 si lega al poliacrilato o al destrano solfato (DALI<sup>®</sup>; LiposorberD<sup>®</sup>-DX21)

- **Legami chimici:**

Polimixina B si lega al lipide A endotossina Gram- nella sepsi (Toraymyxin<sup>®</sup>)

Polimetacrilato si lega ai lipolisaccaridi e al TNF $\alpha$  nella sepsi (Matisse)



# CITOAFERESI TERAPEUTICA

I separatori cellulari consentono di separare il sangue del paziente con la **metodica del plasmaexchange** nei suoi vari componenti cellulari sfruttandone i diversi coefficienti di sedimentazione e in certi casi le differenti dimensioni (**elutrazione per centrifugazione**) quando sono sottoposti ad una appropriata forza centrifuga (forza G).

Questo permette di:

1. eliminare le cellule patogene o in eccesso,
2. prelevare, manipolare e reinfondere cellule ematiche a fini terapeutici (trasfusionali e trapiantologici)

# CITOAFERESI TERAPEUTICA

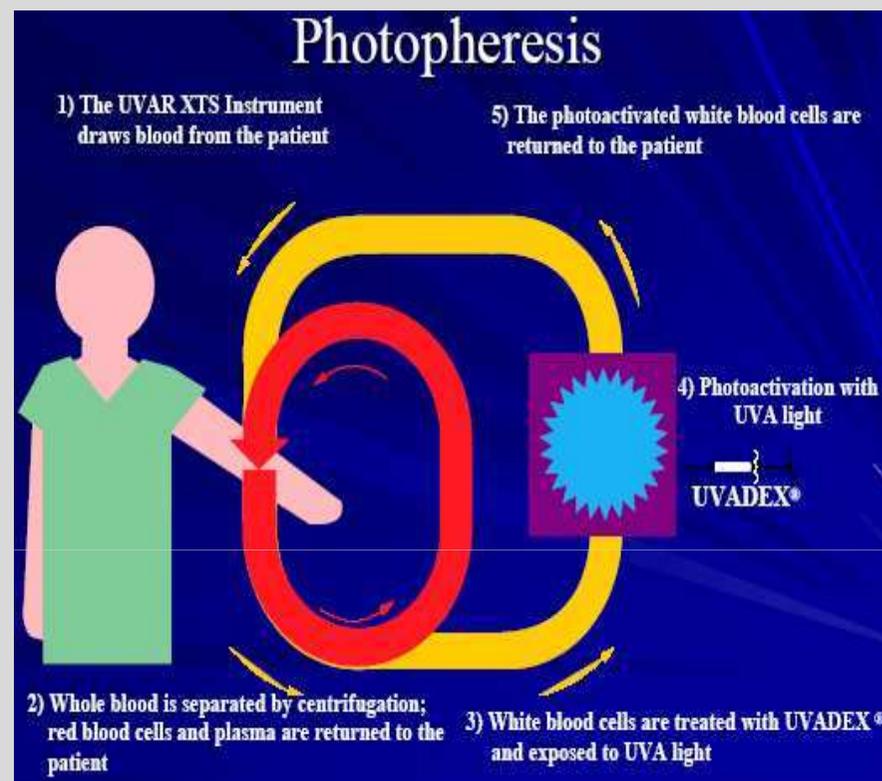
La Citoaferesi Terapeutica viene utilizzata sotto forma di:

1. **Deplezione cellulare (Leucoaferesi terapeutica, Piastrinoaferesi terapeutica, Eritroaferesi terapeutica)** per rimuovere rapidamente una componente cellulare patogena o in eccesso senza sostituzione.
2. Come **Eritroexchange o Scambio Eritrocitario** per rimuovere rapidamente emazie patologiche (Drepanocitosi) o parassitate (Malaria, Babesiosi) e sostituirle con eritrociti di donatori.

Dal punto di vista procedurale i software dei separatori cellulari permettono di eseguire in tutta sicurezza lo scambio eritrocitario calcolando dopo l'inserimento dei valori di peso ed ematocrito delle sacche di emazie da donatore il volume di emazie falciformi o parassitate da scambiare.

# FOTOAFERESI

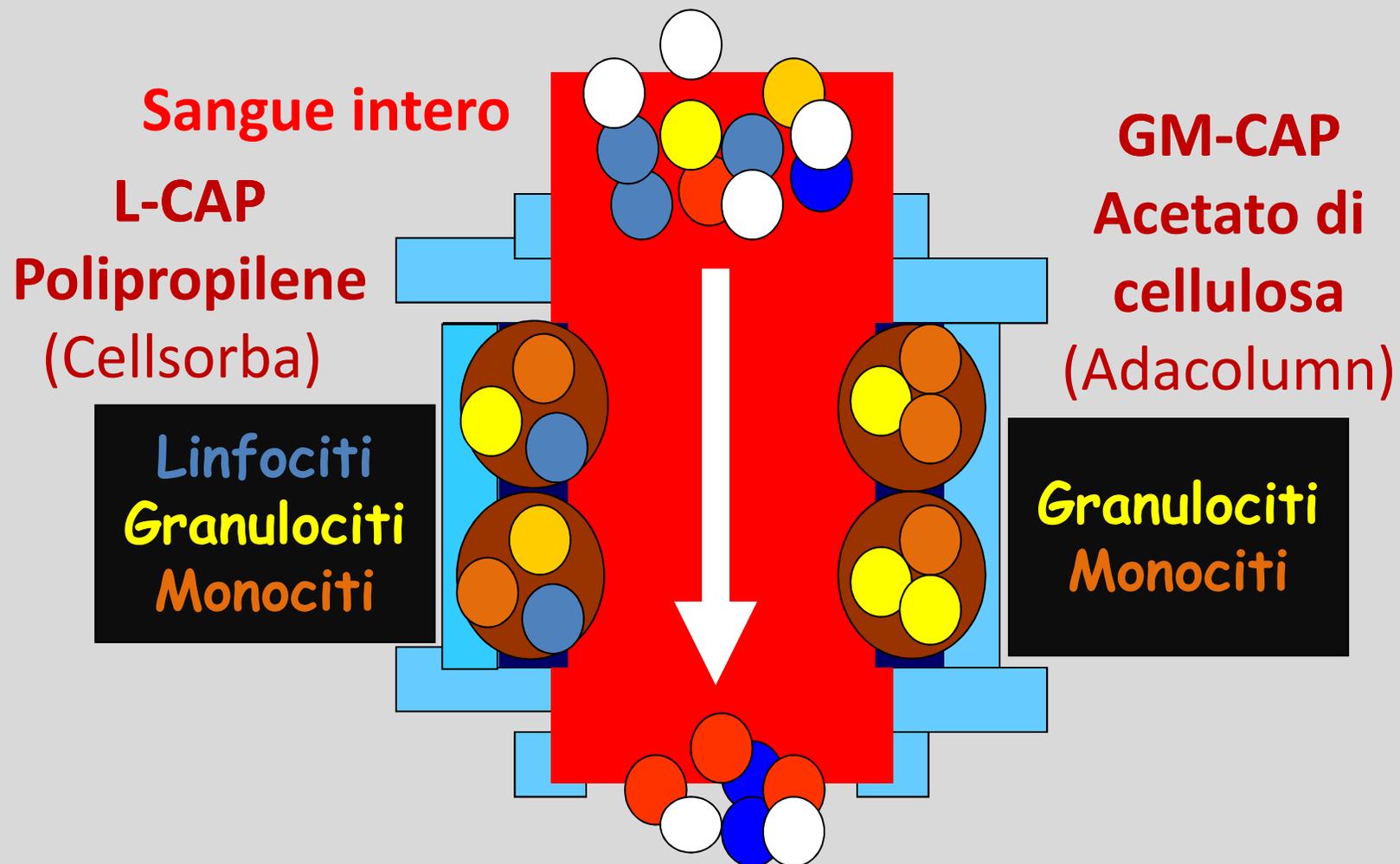
I leucociti del paziente vengono prelevati mediante centrifugazione, legati ex vivo con 8-metossipsoralene (composto sensibile ai raggi UV), irradiati con raggi UV e al termine della fotoattivazione (dopo 24 ore in camera refrigerata) reinfusi al paziente.



Questo processo di manipolazione cellulare innesca un parziale meccanismo di apoptosi dei leucociti che attiva le cellule dendritiche e trova il suo utilizzo nel trattamento della GVHD, del rigetto di trapianto renale e cardiaco e nei sarcomi cutanei.

# CITOAFERESI ADOTTIVA

Rimozione più o meno selettiva di linfociti, granulociti, monociti ottenuta per adsorbimento su filtri specifici con azione immunomodulante su citochine infiammatorie

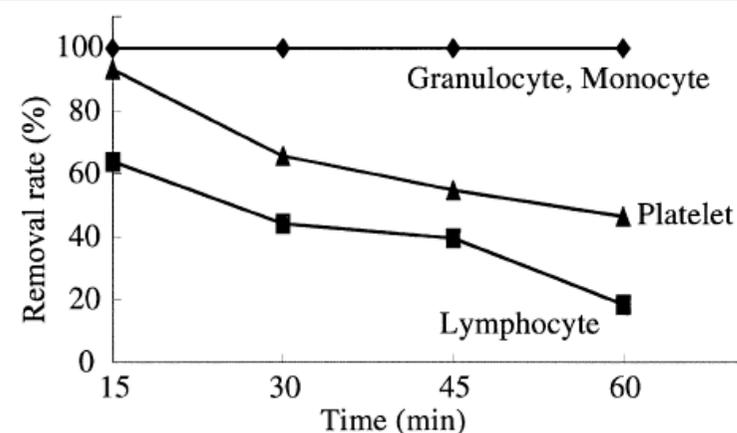
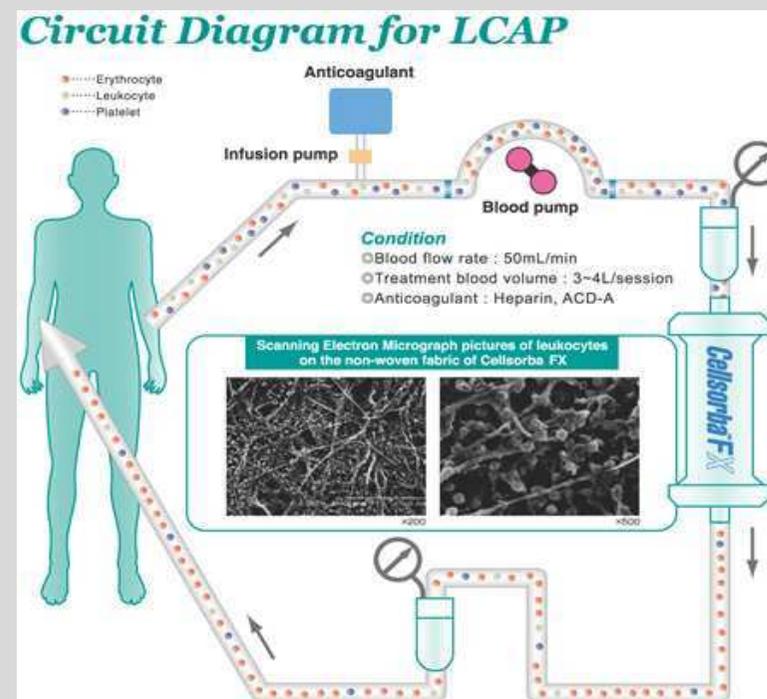


# L-CAP (CELLSORBA FX)

- **Filtro:** fibre poliestere per la rimozione di leucociti. Utilizza 2 meccanismi:
  1. **Pre-Filtrazione:** Diametro delle fibre di 10-40  $\mu\text{m}$
  2. **Filtrazione fine:** Diametro delle fibre di poliestere inferiore a 3  $\mu\text{m}$
- **Flusso:** 50 ml/min
- **Volume di sangue processato:** 3000 ml
- **Volume colonna:** 270 ml
- **Anticoagulante:** Eparina sodica/ACD-A
- **Durata procedura:** 60 min.

Normalizzazione delle citochine infiammatorie (TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-8, INF-g) e Rimozione dei monociti che producono TNF- $\alpha$  e IL-12

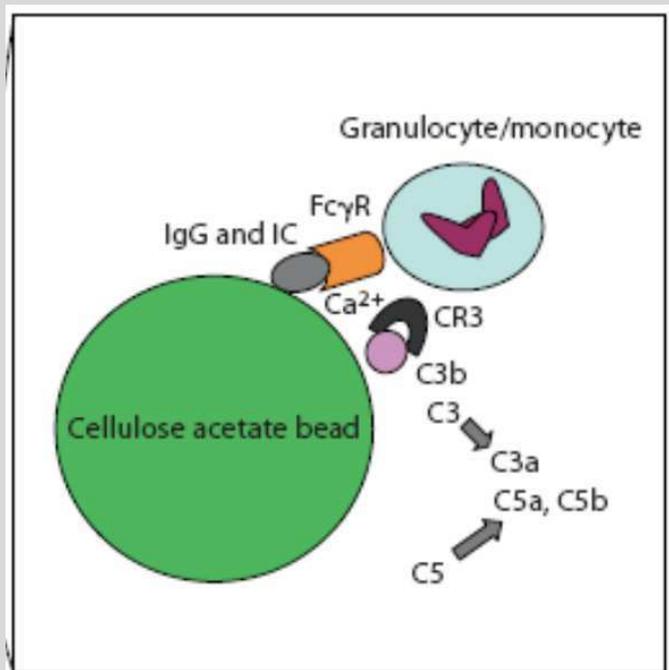
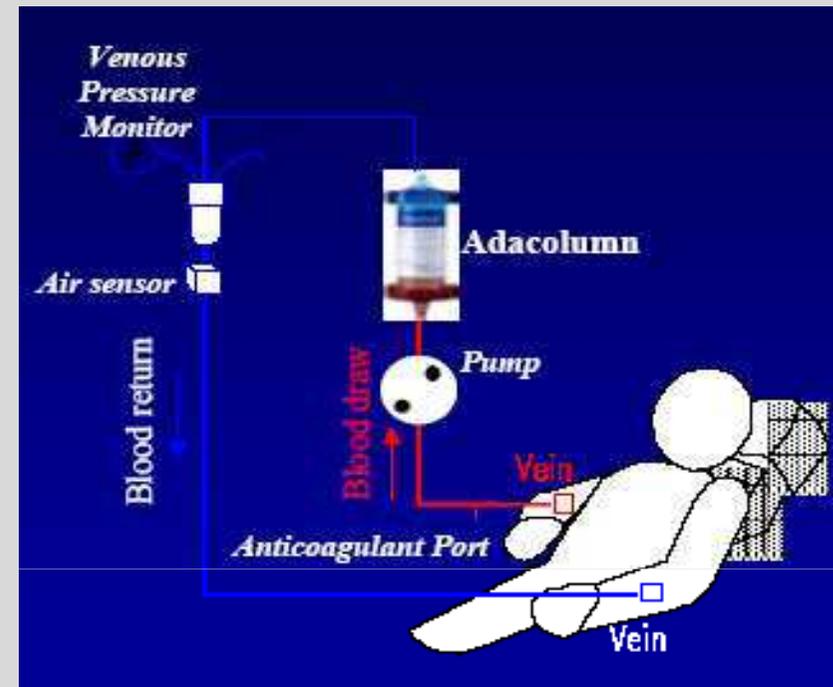
**Terapia extracorporea anti TNF- $\alpha$**



**FIG. 5.** Average changes in the removal rate of blood-cell components during treatment.  $Q_b$ , 50 mL/min;  $N = 14$ .

# GM-CAP (ADACOLUMN)

- **Filtro:** sfere di acetato di cellulosa in soluzione salina
- **Flusso:** 30 ml/min
- **Volume di sangue processato:** 1800 ml
- **Volume colonna:** 210 ml
- **Anticoagulante:**  
Eparina sodica 1500-2000 UI
- **Durata procedura:** 60 min.



Adsorbimento selettivo dei granulociti (65%) e monociti (55%) grazie ai recettori Fc $\gamma$  e C.  
I linfociti (2%) non aderiscono perché non hanno il recettore per il complemento

**Reazione infiammatoria acuta all'interno della colonna con creazione di un sito infiammatorio extracorporeo**

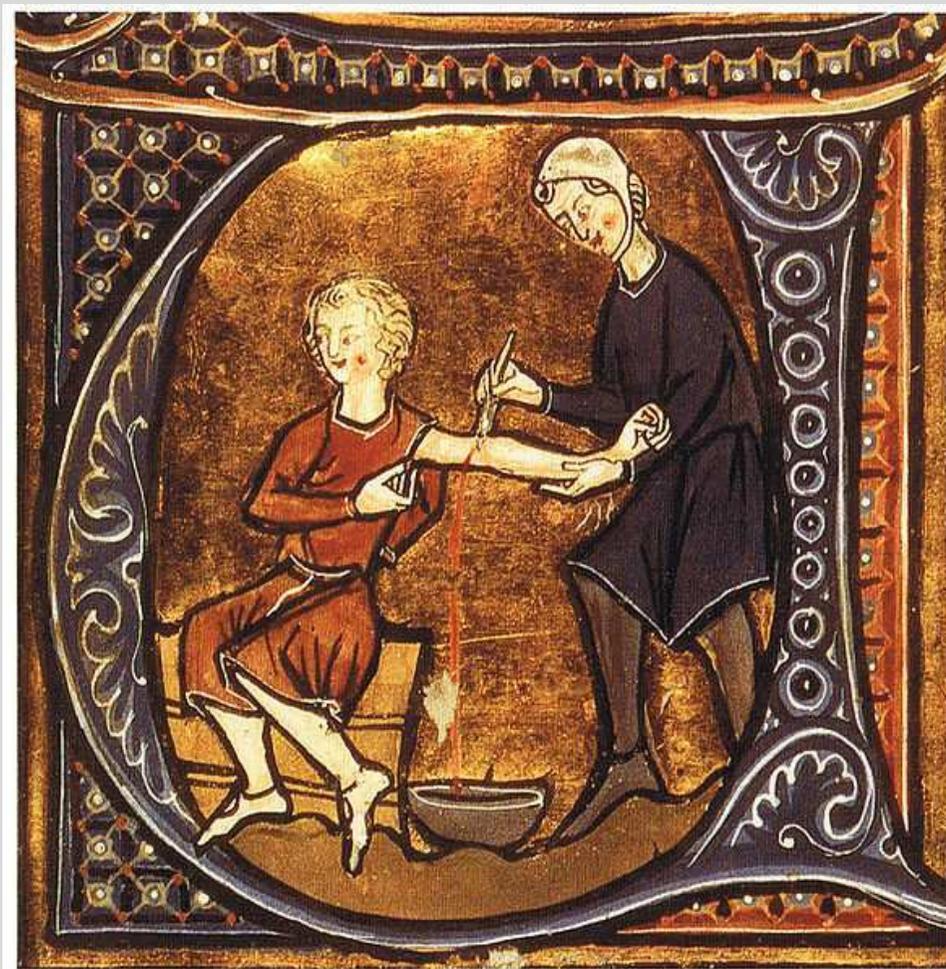
# Il ciclo vitale delle metodiche aferetiche: Dal Plasma-Exchange all'Aferesi Selettiva

**IDEA:** Avvento dei separatori cellulari per la rimozione automatica, sicura ed efficiente di grossi volumi plasmatici o di cellule

**ADOZIONE DELLA TECNOLOGIA:** Ampio utilizzo del plasmaexchange nel trattamento di molte patologie (dagli anni 80 serie di casi e case-reports)

**ACCETTAZIONE DELLA TECNOLOGIA:** Dimostrazione dell'efficacia del plasmaexchange in alcune patologie ( dagli anni 90 utilizzo di RCTs )

**ABBANDONO DELLA TECNOLOGIA:** Sostituzione del plasmaexchange con l'aferesi selettiva grazie a una migliore conoscenza fisiopatologica delle patologie trattate e a tecnologie più raffinate



Grazie per la vostra attenzione