



Università di Pisa

Facoltà di Medicina Veterinaria

Corso di Laurea Specialistica in
Medicina Veterinaria

Tesi di Laurea:

**“Metodo semplificato per la valutazione della velocità di
filtrazione glomerulare (GFR) tramite la clearance plasmatica
dello ioexolo”**

**Relatore:
Prof.^{ssa} Grazia Guidi**

**Candidata:
Ilaria Lippi**

**Correlatore:
Dott.^{ssa} Valentina Meucci**

Anno Accademico 2005/2006

Indice

<i>Riassunto</i>	3
<i>Summary</i>	3
<i>Premessa</i>	5
INTRODUZIONE	7
<i>Velocità di filtrazione glomerulare (GFR) e suo significato clinico</i>	7
<i>Modelli farmacocinetici</i>	14
Metodiche di valutazione della GFR nel cane	21
Metodi che prevedono la raccolta delle urine	21
<i>Clearance dell'inulina (gold standard)</i>	21
<i>Clearance della creatinina endogena</i>	24
<i>Clearance della creatinina esogena</i>	29
Metodi di valutazione della scomparsa plasmatica della sostanza	31
<i>Clearance dell'inulina in singola iniezione</i>	31
<i>Clearance della creatinina</i>	33
<i>Clearance dello ioexolo</i>	36
<i>Clearance del Technetium Tc 99m pentetate</i>	38
Metodo scintigrafico renale	41
<i>Determinazione del Tc-99m-acido dietilenetriaminopentacetico (DTPA) nel rene mediante metodo scintigrafico</i>	41
Formule di Cockcroft – Gault (modelli di predizione del GFR)	43
Metodi di valutazione della GFR nel gatto	44
Metodi che prevedono la raccolta delle urine	44
<i>Clearance della creatinina endogena</i>	44
<i>Clearance della creatinina esogena</i>	46
Metodi di valutazione della scomparsa plasmatica della sostanza	48
<i>Clearance dell'inulina in singola iniezione</i>	48
<i>Clearance dello ioexolo</i>	51
<i>Clearance del Tc 99m acido dietilenetriaminopentacetico (DTPA)</i>	53
SCOPO DELLA TESI	57
MATERIALI E METODI	58
<i>Materiali</i>	58
<i>Strumentazione</i>	58
<i>Soluzioni standard e soluzioni stock</i>	59
<i>Standard interno</i>	59
<i>Condizioni cromatografiche</i>	60
<i>Curve di calibrazione</i>	60
<i>Trattamento degli animali</i>	60
<i>Preparazione dei campioni</i>	64

<i>Analisi farmacocinetica</i>	65
<i>Formule predittive per la GFR</i>	66
RISULTATI	67
<i>Analisi dei campioni plasmatici</i>	67
<i>Valutazione della GFR</i>	67
<i>Valutazione della GFR con modelli di campionamento ridotto</i>	71
Modello A	72
Modello B	73
Modello C	74
Modello D	76
Modello A	77
Modello B	79
Modello C	80
Modello D	81
<i>Stima della GFR mediante formule predittive (Crockroft – Gault)</i>	83
DISCUSSIONE	86
BIBLIOGRAFIA	91

Riassunto

La velocità di filtrazione glomerulare (GFR) indica la velocità con cui si forma il filtrato glomerulare per passaggio dal plasma attraverso i glomeruli renali e permette una valutazione quantitativa della funzionalità renale sia nell'animale sano che nel malato. Essere in grado di stabilire una diagnosi precoce di disfunzione renale è importante sia per il paziente che per il proprietario, in quanto può aiutare a formulare una prognosi a lunga scadenza e a fornire tempestivamente una terapia medica di sostegno per la funzionalità renale. È, infatti, la diagnosi precoce degli stadi subclinici o borderline di insufficienza renale a costituire la sfida maggiore nella pratica veterinaria delle patologie renali. I parametri che vengono comunemente analizzati (creatinina e urea plasmatica, peso specifico urinario) non appaiono alterati finché una buona parte della funzionalità renale non è ormai perduta (circa il 67%).

Lo ioexolo è un mezzo di contrasto non ionico a bassa osmolarità che può essere utilizzato per determinare il GFR sia nell'uomo che negli animali. Lo ioexolo può essere utilizzato come marker per la determinazione del GFR in quanto presenta un'eliminazione esclusivamente renale.

Scopo di questo studio è stato di valutare metodi semplificati per la determinazione della clearance plasmatica dello ioexolo nel cane. Sono stati effettuati prelievi di sangue in 35 cani prima dell'inoculazione dello ioexolo e 5, 15, 30, 45, 60, 90, 180, 240, 300, 420 minuti e 24 ore dopo tale iniezione. La concentrazione plasmatica dello ioexolo è stata determinata usando un metodo HPLC. La clearance è stata calcolata dividendo la dose inoculata per l'area sottostante la curva di eliminazione plasmatica, stabilita tramite un modello bicompartimentale. La clearance è stata normalizzata per la superficie corporea. Il valore di clearance ottenuto mediante undici prelievi è stato utilizzato come riferimento per la valutazione di metodi semplificati. Sono stati sperimentati quattro modelli a cinque prelievi, basati su un modello bicompartimentale.

È stata effettuata un'analisi di regressione lineare tra il metodo di riferimento e i metodi semplificati. Tutte le combinazioni hanno rivelato una buona correlazione con il metodo di riferimento. Il metodo migliore tra le metodiche a cinque prelievi è stato il modello basato su prelievi a 5, 15, 60, 90 e 180 minuti.

Si può concludere che la clearance plasmatica dello ioexolo può essere ottenuta mediante cinque prelievi con un accettabile margine di errore.

Parole chiave: GFR, cane, ioexolo, HPLC, clearance

Summary

GFR shows the rate of glomerular filtration from plasma through renal glomeruli and allows a quantitative evaluation of renal function both in healthy and unhealthy animals. Being able to establish an early diagnosis of renal dysfunction is equally important for the animal patient and the owner. GFR can help to formulate a long term prognosis and to suggest an early renal support therapy.

Diagnosis of subclinical or borderline renal failure remains a major challenge in small animal patients. Plasmatic creatinine, urea and urine specific gravity are the markers commonly used but they are not altered until a substantial proportion of total nephron function (generally > 67%) has been lost.

Iohexol is a nonionic low-osmolarity contrast medium used as a GFR marker in both animals and humans as it is eliminated solely through renal excretion.

The purpose of the study was to evaluate simplified methods for iohexol plasma clearance estimation in dogs.

Serial blood samples were taken before and 5, 15, 30, 45, 60, 90, 180, 240, 300, 420 minutes and 24 hours after a bolus injection of iohexol in 35 dogs. Iohexol plasma

concentration was determined by using an HPLC method. Clearance was calculated by dividing the injected dose by the area under the plasma elimination curve estimated with a 2-compartment pharmacologic model. Clearance was normalized to body surface area (BSA). The 11-point clearance was used as a reference for the evaluation of simplified methods. Four 5-sample methods based on a two exponential fit were investigated. Linear regression analysis was performed between the reference method and the optimized simplified methods. All the combinations showed a good correlation with the reference method. The best time for sampling in the 5-sample method was 5, 15, 60, 90 and 180 minutes in dogs. Plasma clearance of iohexol can be estimated in dogs from 5 blood samples with a reasonable margin of error.

Key words: GFR, dog, iohexol, HPLC, clearance

Premessa

Nelle patologie renali esistono diversi fattori che, indipendentemente dalla patologia di base, determinano la progressione della malattia verso l'irreversibilità e conducono inevitabilmente all'insufficienza renale. Nella pratica clinica veterinaria la terapia medico-conservativa rappresenta, se non l'unica possibilità, senza dubbio quella più frequentemente utilizzata. La precocità della diagnosi, il rilievo di alterazioni renali anche minime e la tempestività dell'intervento terapeutico rappresentano attualmente le uniche armi potenzialmente efficaci per una corretta gestione del paziente affetto da una nefropatia e/o da insufficienza renale. Ad oggi la diagnosi di insufficienza renale viene effettuata con il dosaggio dell'urea e della creatinina che, pur essendo i metodi di controllo ufficiale della funzionalità renale, sono estremamente limitate per ciò che riguarda la precocità diagnostica. E' stato stimato infatti che deve essere compromesso circa il 70 % della funzionalità renale prima che si osservi ipercreatininemia. Da tempo, pertanto, l'attenzione dei ricercatori sulla gestione degli animali da compagnia affetti da patologia renale si è spostata sulla diagnosi precoce della malattia e sul controllo di tutti i processi responsabili della sua progressione, dallo stadio iniziale silente a quello finale di uremia. La diagnosi precoce facilita anche l'introduzione di una terapia atta a rallentare la progressione della nefropatia, come è stato confermato nell'uomo, negli animali e in molti modelli sperimentali. Di conseguenza lo scopo del clinico è quello di mettere in evidenza l'affezione renale prima della manifestazione clinica e di evidenziare i valori soglia di alcuni parametri ragionevolmente preoccupanti per la funzionalità renale. I metodi disponibili per la diagnosi di alterazione renale si dividono in: a) metodi che mettono in evidenza l'alterazione organica e b) metodi che evidenziano l'alterata funzione, direttamente o indirettamente. Tra i secondi si include, oltre alla valutazione del peso specifico delle urine e della creatinina, la velocità di filtrazione glomerulare (GFR).

Lo scopo del nostro lavoro è quello di prendere in esame i vari metodi per la valutazione della GFR, valutarne i pro ed i contro ed, in particolare, studiare l'applicabilità di un metodo "semplificato" di misurazione della velocità di filtrazione glomerulare con il metodo della clearance plasmatica dello ioexolo attualmente in uso nel Dipartimento di Clinica Veterinaria.

INTRODUZIONE

Velocità di filtrazione glomerulare (GFR) e suo significato clinico

Il rene, uno degli organi più irrorati dell'organismo, riceve 1/3 – 1/4 della gittata cardiaca. Di conseguenza, ogni giorno, i reni filtrano una quantità di liquido pari a circa sessanta volte quella della massa plasmatica.

Il sangue che arriva ai capillari glomerulari, venendo a contatto con la barriera di filtrazione, va incontro ad un processo di filtrazione selettiva, che è responsabile della formazione dell'ultrafiltrato. Il prodotto dell'ultrafiltrazione si raccoglie nello spazio periglomerulare della capsula di Bowman e presenta le stesse caratteristiche chimico-fisiche del sangue, ma una differente pressione oncotica. Esso viene definito ultrafiltrato di plasma in quanto, in condizioni cliniche normali, non contiene gli elementi figurati del sangue che, per le loro dimensioni, non riescono ad attraversare la barriera di filtrazione. Ciò significa che non sono normalmente presenti nell'ultrafiltrato α -globuline (200.000 – 300.000), β -globuline (90.000), γ -globuline (156.000) e fibrinogeno (400.000). L'albumina (69.000), essendo al limite di soglia di permeabilità, può passare nell'ultrafiltrato solo in quantità insignificanti, in quanto respinta dalle cariche elettriche della barriera glomerulare. Secondo la relazione di Gibbs-Donnan il rapporto tra le concentrazioni dei cationi monovalenti è costante ed inverso a quello tra le concentrazioni degli anioni monovalenti. Quindi, all'equilibrio, l'ultrafiltrato presenta la stessa osmolarità del plasma.

Tabella 1: sostanze presenti nel plasma e sostanze presenti (+) e assenti (-) nell'ultrafiltrato

Componenti nel plasma	Diametro della molecola	Componenti dell'ultrafiltrato
H ₂ O	2 A°	+
Eritrociti	80.000 A°	-
Urea	3,2 A°	+
Glucosio	7 A°	+
Proteine	70 - 100.000 A°	-
Albumine	36 - 65 A°	+/-
Emoglobina	65 A°	+
Na ⁺	4 A°	+
Cl ⁻	3,5 A°	+
K ⁺		+
PH		7,3 - 7,4
POsm		0,300

Le forze che regolano l'ultrafiltrazione sono uguali a quelle che presiedono alla formazione del liquido interstiziale a livello dei capillari sistemici. Dato che tali forze soggiacciono alla legge di Starling, la pressione netta di filtrazione (PNF) può essere espressa secondo la seguente relazione:

$$\text{PNF} = (\text{Pc} + \text{POt}) - (\text{PO} + \text{Pt})$$

Pc: pressione idrostatica nei capillari

POt: pressione oncotica dell'ultrafiltrato

PO: pressione oncotica del plasma

Pt: pressione idrostatica nello spazio di Bowman

Possiamo concludere che la PNF è il risultato della differenza tra la pressione idrostatica netta e la pressione oncotica netta, le quali agiscono in senso opposto nel processo di filtrazione.

Dato che lungo il percorso del nefrone l'ultrafiltrato si modifica notevolmente, non è possibile valutare in modo diretto la velocità di filtrazione glomerulare (GFR). È necessario quindi utilizzare un sistema indiretto che ci consenta di avere un indice dell'attività glomerulare totale dei due reni. Applicando al glomerulo la relazione per la quale il volume di un liquido è uguale al rapporto tra la quantità del soluto e la sua concentrazione ($V = Q/C$), si ottiene che:

$$V_u = Q_u/C_u$$

V_u : volume dell'ultrafiltrato

Q_u : quantità di una sostanza nota presente nell'ultrafiltrato

C_u : concentrazione nell'ultrafiltrato

Da ciò deriva che:

$$U_a \times V = P_a \times GFR, \text{ quindi } GFR = (U_a \times V)/P_a$$

U_a : concentrazione della sostanza nell'urina

V : volume di urina prodotto nell'unità di tempo

P_a : concentrazione della sostanza nel plasma

GFR: velocità di filtrazione glomerulare¹

La GFR indica la velocità con cui si forma il filtrato glomerulare per passaggio dal plasma attraverso i glomeruli renali e permette una valutazione quantitativa della funzionalità renale sia nell'animale sano che nel malato².

Il rene del cane è costituito da migliaia di nefroni che lavorano in parallelo e la perdita di una certa quota di essi può verificarsi senza che si abbia alcuna evidenza di alterazione della funzionalità di tali organi. Basti pensare che è necessaria la distruzione di circa il 50% dei nefroni prima di poter riscontrare una diminuzione della capacità dei reni di concentrare l'urina e del 70% dei nefroni prima che compaiano i sintomi di un'insufficienza renale³. Essere in grado di stabilire una diagnosi precoce di disfunzione renale è importante sia per il paziente che per il proprietario, in quanto può aiutare a formulare una prognosi a lunga scadenza e a fornire tempestivamente una terapia medica di sostegno per la funzionalità renale. È infatti la diagnosi precoce degli stadi subclinici o borderline di insufficienza renale a costituire la sfida maggiore nella pratica veterinaria delle patologie renali. I parametri che vengono comunemente analizzati (creatinina e urea plasmatica, peso specifico urinario) non appaiono alterati finché una buona parte della funzionalità renale non è ormai perduta (circa il 67%)⁴.

I valori di urea e creatinina plasmatica sono parametri predittivi della GFR scarsamente sensibili. Sono stati effettuati studi di correlazione tra urea (mg/dl) e GFR (ml/min-kg) che hanno mostrato una dispersione dei valori al diminuire della GFR. Tale dispersione è risultata maggiore rispetto a quella evidenziata dallo studio di correlazione tra creatinina (mg/dl) e GFR. Questi risultati mostrano quanto creatinina e urea siano parametri poco attendibili per prevedere la GFR⁵.

Viene riportato che la capacità del rene a concentrare le urine sia la prima funzione ad essere alterata quando si verifica una riduzione a livello di massa renale effettivamente funzionante. Sfortunatamente nel cane non sono ancora disponibili dati sulla sensibilità e specificità di questo parametro⁶.

La determinazione della GFR è considerata un parametro particolarmente importante per poter attuare una diagnosi precoce di danno renale. Se consideriamo, per esempio, le fasi iniziali di un'insufficienza renale, si può osservare una notevole riduzione della GFR ma soltanto un leggero incremento della concentrazione plasmatica di creatinina e con notevoli differenze individuali.

La valutazione della GFR nel cane e nel gatto è considerata il metodo migliore per l'identificazione precoce di insufficienza renale. Nel cane sano la GFR è compresa tra 3-4 ml/min-kg, mentre si può parlare di insufficienza renale quando tale valore scende a 1,5-1,8 ml/min-kg. Si deve considerare che il range di riferimento varia a seconda della metodica utilizzata. Poiché il tasso metabolico è in genere più strettamente correlato alla superficie corporea che al peso dell'animale è preferibile esprimere la GFR come mL/min-m²⁷.

Per calcolare la superficie corporea del paziente si applica la formula:

$$\text{superficie corporea (m}^2\text{)} = 4 \times \text{PV(kg)} + 7/90 + \text{PV(kg)}$$

PV: peso vivo espresso in kg

Tabella 2: GFR media \pm deviazione standard⁸

Metodica	Cane (GFR, ml/min/kg)	Gatto (GFR, ml/min/kg)
○ Clearance urinaria inulina	3,55 \pm 0,14	2,71 \pm 0,12
○ Clearance urinaria creatinina endogena	3,77 \pm 0,77	2,3 \pm 0,5
○ Clearance urinaria creatinina esogena	3,45 \pm 0,7	2,74 \pm 0,04
○ Clearance plasmatica creatinina esogena	3,0 \pm 0,52	-
○ Clearance plasmatica ioexolo	2,22 \pm 0,86	1,83 \pm 0,56
○ Metodo scintigrafico (TC-99-DTPA)	2,56 \pm 0,99	2,5 \pm 0,6

Per la valutazione della GFR sono state proposte diverse sostanze ma l'alto numero di prelievi necessari o, nel caso di impiego di composti radioattivi, la complessità delle analisi lo rende un metodo ancora poco utilizzato nella routine diagnostica³.

Nonostante la GFR costituisca un ottimo indice di valutazione della funzionalità renale, essendo direttamente correlata alla massa renale funzionante, nella pratica clinica la determinazione di urea e creatinina plasmatica rimane il metodo più frequentemente utilizzato per monitorare la funzionalità e accertare la presenza di un danno renale. Sfortunatamente tali parametri forniscono una buona stima della GFR soltanto quando questa ha subito una riduzione del 75% o più del suo normale valore⁹⁻¹⁰.

La valutazione della GFR può essere utilizzata per diverse finalità cliniche:

- Individuazione precoce di disfunzione renale prima dell'instaurarsi dell'azotemia
- Monitoraggio della progressione del danno renale
- Determinazione della funzione renale controlaterale prima di una nefrotomia o nefrectomia
- Valutazione della risposta del paziente alla terapia in corso di patologia renale.
- Modificazione della dose o della frequenza di somministrazione di farmaci eliminati per via renale⁸

La clearance renale di un farmaco (Cl_r), infatti, è una funzione lineare della GFR e può essere espressa tramite la seguente formula:

$$\text{Cl}_r = M \times \text{GFR}$$

M: costante proporzionale

Esiste una correlazione tra la GFR e il tempo di emivita ($t_{1/2}$) di un farmaco che segue la seguente relazione:

$$t_{1/2} (\text{min}) = 0,693/\text{Kel}$$

Kel: costante di eliminazione del farmaco determinata dalla somma delle costanti di eliminazione renale e non renale del farmaco.

Per farmaci eliminati principalmente per via extra-renale il tempo di emivita rimane relativamente stabile per vari gradi di funzionalità renale. Al contrario, farmaci che presentano escrezione renale hanno un tempo di emivita che

rimane stabile per valori di creatinina plasmatica non superiori al 30-40% del normale; al di sopra di tale percentuale si verifica un aumento drastico dell'emivita¹¹.

La valutazione della GFR può essere attuata nel cane e nel gatto mediante metodi che si basano sulla clearance urinaria di una sostanza, metodi che sfruttano il decadimento plasmatici di un analita o metodi scintigrafici⁸.

L'analita ideale da utilizzare per la determinazione della GFR deve essere una sostanza eliminata soltanto attraverso la filtrazione renale. In questo caso la sua scomparsa, nel tempo, dal circolo ematico corrisponde alla GFR. Ciò viene indicato attraverso la formula:

$$\mathbf{GFR \times P_x = U_x \times V}$$

P_x: concentrazione plasmatica della sostanza filtrata

U_x: concentrazione urinaria della medesima sostanza

V: volume di urina prodotta

Tale analita dovrebbe non subire metabolismo sistemico, secrezione o riassorbimento tubulare.

A differenza dell'uomo, dove la GFR viene espressa come mL/min, in medicina veterinaria si deve tener conto della variabilità della taglia dei pazienti, per cui la GFR viene indicata in mL/min-kg o mL/min-m²⁸.

Modelli farmacocinetici

L'accuratezza della misura della GFR dipende dal tempo di campionamento del plasma e dal modello matematico utilizzato (numero di compartimenti).

Il tempo di campionamento ottimale dipende a sua volta dal valore assunto dalla GFR (più bassa è la GFR più lungo dovrà essere il periodo di

campionamento). Questo può essere previsto mediante la determinazione rapida della concentrazione di creatinina endogena, considerando che il range di riferimento per un cane non nefropatico è 0,5-1,7 mg/dl¹².

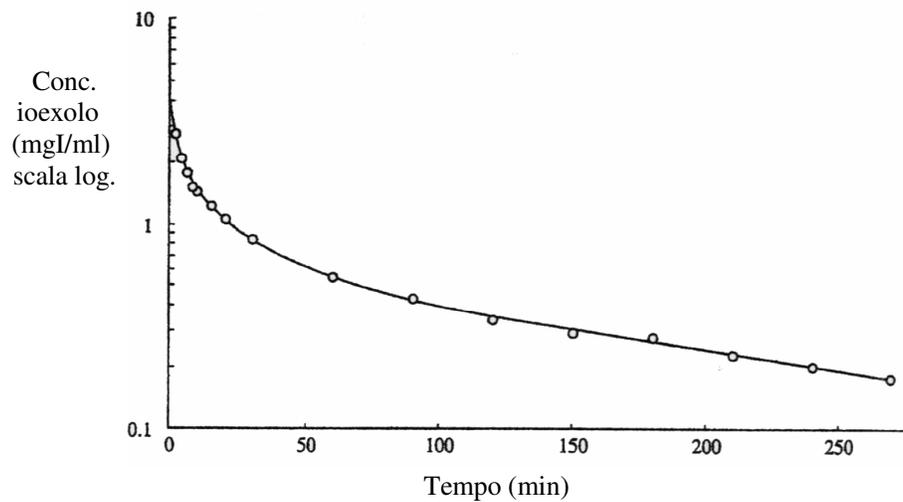
I metodi matematici necessari per calcolare la clearance plasmatica si distinguono in monocompartimentale, bicompartimentale e tricompartmentale, a seconda del numero di compartimenti in cui viene suddiviso il corpo. Essi consentono di descrivere la distribuzione e l'eliminazione di una sostanza nell'organismo.

In seguito ad iniezione endovena di un marker per la GFR la concentrazione plasmatica raggiunge rapidamente un picco seguito da una caduta esponenziale, in quanto il marker si diluisce nel plasma circostante e inizia a diffondere negli spazi extravasali. Circa il 70% della dose lascia il plasma entro 2-5 minuti dall'iniezione. Durante la diffusione delle molecole dal plasma agli spazi extracellulari c'è una contemporanea diffusione di acqua e alcune molecole del marker tornano nel plasma, fino a quando si stabilisce un equilibrio tra il plasma e lo spazio extravasale.

Man mano che il marker viene eliminato per via renale, la sua concentrazione nel plasma diminuisce e si verifica una diffusione delle molecole dagli spazi extravasali al plasma. Una piccola frazione può giungere ai compartimenti meno perfusi.

L'andamento della concentrazione plasmatica è descritto dalla curva rappresentata in figura 1.

Figura 1: Curva concentrazione plasmatica/tempo in seguito ad iniezione endovenosa di ioexolo in un soggetto umano



Nel modello monocompartimentale l'organismo è considerato come un unico compartimento dove si distribuisce uniformemente il marker subito dopo l'iniezione; in questo modello la concentrazione plasmatica del marker è descritta da una funzione esponenziale:

$$P = I_1 e^{-b_1 t}$$

P: concentrazione plasmatica del marker al tempo t

b_1 : costante di velocità di eliminazione (min^{-1})

I_1 : intercetta sulle ordinate (mg/ml)

L'integrale di questa funzione tra il tempo d'iniezione e l'infinito risulta:

$$\text{AUC} = A = I_1/b_1 \quad \text{GFR} = \text{dose}/\text{AUC}$$

AUC: area sotto la curva concentrazione/tempo

dose: dose del marker somministrata

Figura 2: Modello monocompartimentale

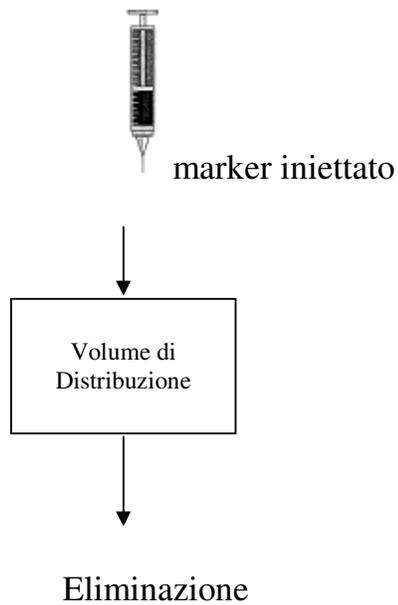
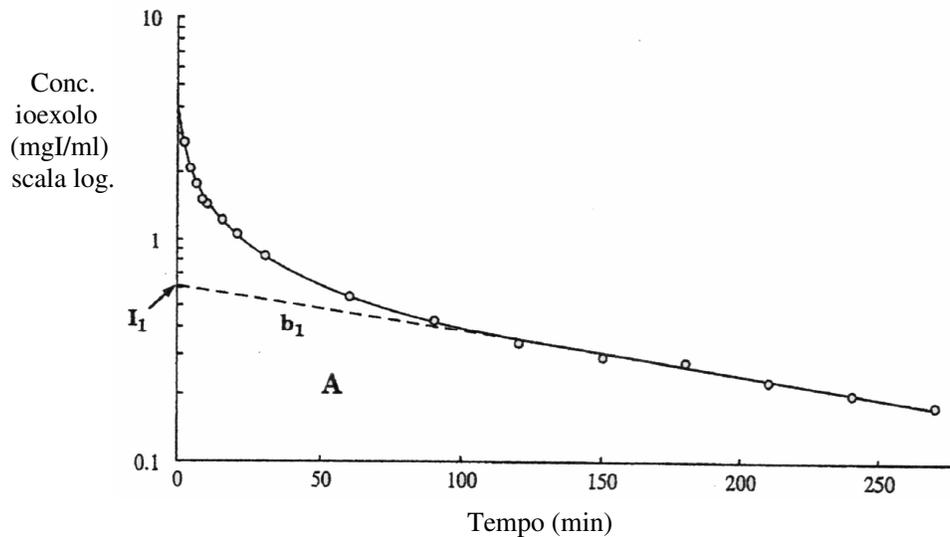


Figura 3: Curva concentrazione-tempo costruita, secondo il modello monocompartimentale, dalla linea tratteggiata basata sugli ultimi quattro campioni di plasma prelevati tra 180 e 240 minuti dall'iniezione di ioexolo.



L'area sotto la linea tratteggiata della figura 3, corrispondente al modello monocompartimentale, è minore di quella sotto la curva reale. Si ha quindi una AUC sottostimata ed una GFR sovrastimata. Questo comporta la necessità di introdurre fattori di correzione.

Nel modello bicompartimentale il marker, subito dopo l'iniezione, si distribuisce nel compartimento centrale (plasma) e in un compartimento periferico (spazio extravasale). L'eliminazione avviene dal compartimento centrale (figure 4 e 5); la concentrazione plasmatica del marker è descritta dalla somma di due funzioni esponenziali:

$$P = I_1 e^{-b_1 t} + I_2 e^{-b_2 t}$$

b_1, b_2 : costanti di eliminazione dei due compartimenti

I_1, I_2 : intercette sulle ordinate

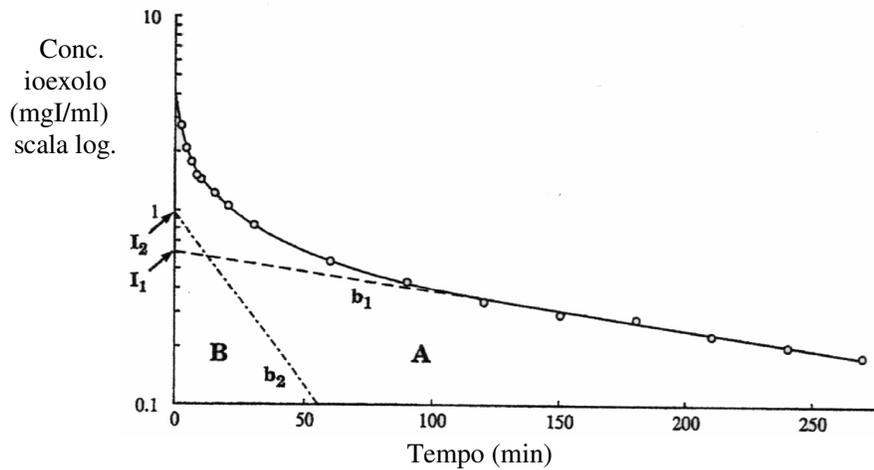
L'integrale di questa funzione tra il tempo d'iniezione e l'infinito risulta

$$AUC = A+B = I_1/b_1 + I_2/b_2 \qquad GFR = \text{dose}/AUC$$

Figura 4: Modello bicompartimentale.



Figura 5: Curva concentrazione-tempo dello ioexolo basata su 16 campioni ottenuti nel periodo 2-270 minuti dopo l'iniezione.



Nel modello tricompartmentale il marker raggiunge anche un terzo compartimento rappresentato dai tessuti più profondi; l'eliminazione avviene solo dal compartimento centrale (figure 6 e 7). E' descritto matematicamente dalla somma di tre funzioni esponenziali:

$$P = I_1 e^{-b_1 t} + I_2 e^{-b_2 t} + I_3 e^{-b_3 t}$$

b_1, b_2, b_3 : costanti di eliminazione dei tre compartimenti

I_1, I_2, I_3 : intercette sulle ordinate

L'integrale risulta

$$AUC = A+B+C = I_1/b_1 + I_2/b_2 + I_3/b_3 \quad GFR = \text{dose}/AUC$$

Il modello tricompartmentale richiede molti campioni di plasma, in genere 10-12, per determinare sia il cambiamento rapido iniziale della concentrazione durante la distribuzione che la successiva diminuzione lenta, durante la fase di escrezione.

Figura 6: Modello tricompartimentale

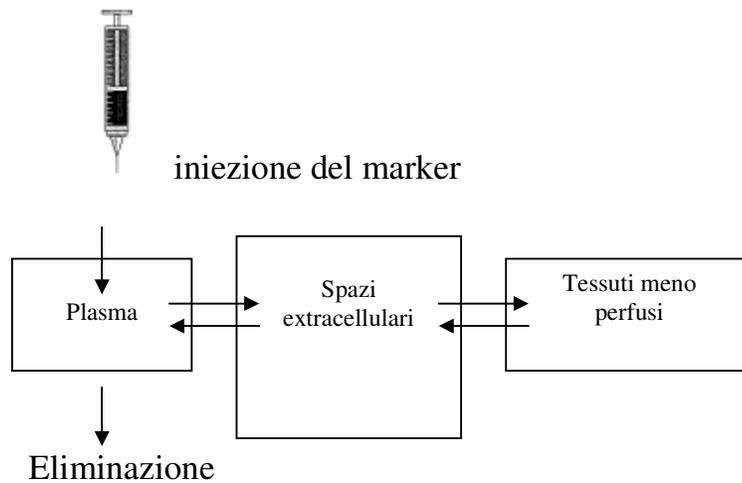
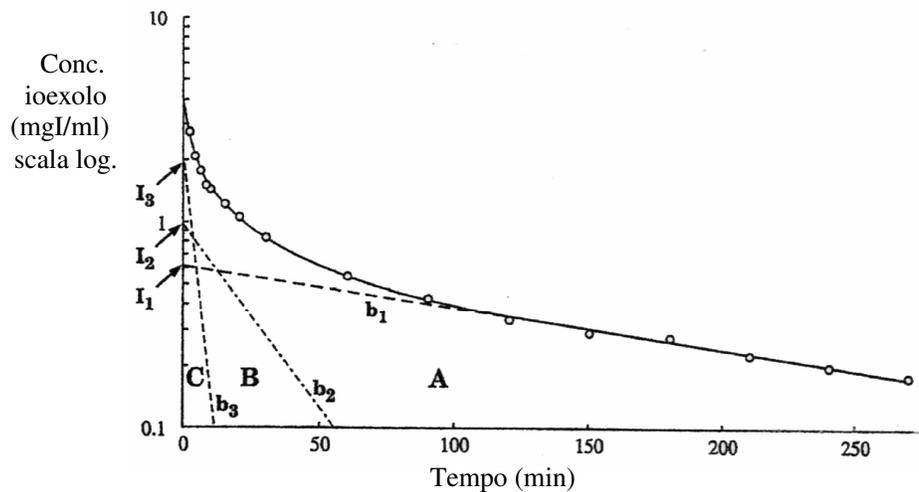


Figura 7: Curva concentrazione-tempo dello ioexolo basata su 16 campioni ottenuti nel periodo 2-270 minuti dopo l'iniezione



Il modello a compartimenti viene generalmente scelto verificando se la curva prevista concorda, in senso statisticamente significativo, con i dati sperimentali. In questo lavoro è stato adottato il modello bicompartimentale, che fornisce una buona stima della GFR in un ampio range di funzionalità renale¹³.

Metodiche di valutazione della GFR nel cane

La valutazione della GFR può essere eseguita secondo diverse metodiche:

- **Metodi che prevedono la raccolta delle urine:**
 - Clearance dell'inulina (gold standard)
 - Clearance della creatinina endogena
 - Clearance della creatinina esogena
- **Metodi di valutazione della scomparsa plasmatica della sostanza:**
 - Clearance dell'inulina in singola iniezione
 - Clearance della creatinina esogena
 - Clearance ioexolo
 - Clearance del Tc-99m pentate
- **Metodo scintigrafico renale:**
 - Determinazione del Tc-99m-DTPA all'interno del rene⁸

Metodi che prevedono la raccolta delle urine

Clearance dell'inulina (gold standard)

La valutazione della clearance urinaria dell'inulina viene considerata il gold standard test nella determinazione della GFR, cioè la metodica con cui raffrontare gli altri tests disponibili¹⁰.

L'inulina, infatti, è un analita metabolicamente inerte che non si lega alle proteine plasmatiche, in grado di attraversare la barriera glomerulare liberamente e tale da non subire riassorbimento o secrezione tubulare⁸. La sua

tossicità è molto bassa e, negli studi presi in considerazione, non ha mostrato effetti collaterali negli animali¹⁴. L'inulina è disponibile sul mercato solo negli USA ma esiste un polifruuttosano inulina-simile reperibile in Austria. La metodologia del test è complessa e improponibile per l'uso ambulatoriale di routine⁸.

Per eseguire la valutazione della clearance urinaria dell'inulina il cane deve essere posto in una gabbia singola con mangime e acqua disponibili. Quindici ore prima dell'effettuazione dell'esame si toglie il cibo ma non l'acqua, che rimane ad libitum. Attraverso un'agocannula posizionata nella vena safena si inoculano 2.5 µCi di Inulina-C₁₄ (radiomarcata)(tempo 0 = t₀) e si mantiene in infusione costante alla velocità di 0.5 mL/min attraverso una pompa ad infusione. Viene posizionato un catetere urinario e si preleva l'urina ad intervalli regolari: tra 90 e 120 min, tra 120 e 180 min, e tra 180 e 240 min. Per una maggiore accuratezza nella raccolta dell'urina, la vescica deve essere svuotata completamente e risciacquata con soluzione fisiologica sterile prima di eseguire il primo prelievo. Circa tre minuti prima di ogni prelievo vengono ripetute queste due operazioni. L'urina raccolta durante l'intervallo considerato viene posta insieme alla soluzione di lavaggio in un cilindro graduato e il volume deve essere registrato. Una volta sigillato il cilindro, si miscela il suo contenuto e si preleva un campione. L'operazione viene ripetuta per ogni intervallo. Contemporaneamente, all'inizio e alla fine di ogni raccolta di urina, viene prelevato un campione di sangue. Dopo l'ultimo prelievo di urina (a duecentoquaranta minuti dall'inizio della somministrazione dell'inulina-C₁₄) l'infusione viene bloccata ed entrambi i cateteri (urinario e venoso) rimossi. Viene quindi valutata la clearance urinaria dell'inulina-C₁₄ per ognuno dei tre intervalli di tempo considerati (90-120', 120-180', 180-240') attraverso la formula:

$$[C = (U_v \times U_c) / P_c]$$

C: clearance urinaria dell'inulina

Uv: volume di urina emessa nell'intervallo

Uc: concentrazione di inulina urinaria

Pc: concentrazione di inulina plasmatica media dei due valori di Pc ottenuti con i prelievi di sangue eseguiti all'inizio e alla fine di ogni intervallo considerato.

Per ogni cane viene identificato un valore di clearance urinaria dell'inulina (UCI) derivante dalla media dei valori di clearance ottenuti nei tre intervalli. La UCI viene espressa come mL/min-kg di peso corporeo. I valori di UCI non sono significativamente diversi nei tre periodi considerati sia per quanto riguarda i cani con ridotta funzionalità renale sia per quelli clinicamente sani¹⁰. Nella seguente tabella sono indicati i vantaggi e gli svantaggi che si possono riscontrare nell'utilizzo della clearance dell'inulina per la valutazione della GFR.

Tabella 3: vantaggi e svantaggi della clearance dell'inulina

Metodica	Vantaggi	Svantaggi
Clearance dell'inulina ⁸	Gold standard per la valutazione della GFR	<ul style="list-style-type: none">• Richiede campioni urinari• Inulina non facilmente reperibile sul mercato• Scarsa disponibilità di laboratori che eseguano l'analisi• Costo elevato

Clearance della creatinina endogena

La creatinina è il prodotto della ciclizzazione della creatina e della creatina fosfato. La creatina e la creatinina originano dal processo di biosintesi della glicina, arginina e metionina (per la maggior parte) e dal cibo. La fonte alimentare di creatina e creatinina è particolarmente importante nei carnivori per l'elevata concentrazione, soprattutto di creatina, nella carne. La creatinina è una piccola molecola (113 Daltons), altamente solubile in acqua, che attraversa liberamente il filtro glomerulare e che subisce una secrezione tubulare nel tubulo prossimale di importanza non significativa¹⁵⁻¹⁶⁻¹⁷⁻¹⁸⁻⁴. La sua concentrazione nel filtrato glomerulare è quindi pari a quella nel plasma. Dato che l'immissione di creatinina nel plasma è pressoché costante nel tempo ed è escreta tramite filtrazione glomerulare, con secrezione tubulare e metabolismo extrarenale trascurabili, la clearance urinaria della creatinina può essere considerata uguale alla GFR¹⁹. Alcuni studi effettuati su pazienti umani con insufficienza renale hanno dimostrato una certa attività di degradazione della creatinina da parte di batteri del colon, mentre nel cane con azotemia non è stata evidenziata perdita enterica di creatinina⁴⁻²⁰.

La concentrazione plasmatica di creatinina è influenzata da fattori non patologici di tipo interindividuale o intraindividuale:

- **Sesso:** sembra che il sesso influenzi debolmente o per niente la concentrazione ematica di creatinina²¹⁻²².
- **Età:** anche se i dati sono discordanti, la maggior parte degli studi conferma che la concentrazione plasmatica di creatinina decresce nei primi giorni di vita, rimane stabile dai due mesi in poi o aumenta moderatamente oltre l'anno di età²³⁻²⁴. Nei cani adulti, fino a 8-10 anni, tale concentrazione plasmatica rimane stabile²⁵⁻²⁶ o aumenta moderatamente²⁷. Negli anni successivi essa decresce²⁸⁻²⁹.

- **Peso/Massa muscolare:** la concentrazione plasmatica di creatinina è più alta nei neonati di taglia grande rispetto a quelli di taglia piccola²³. Per quanto riguarda gli adulti tale concentrazione plasmatica aumenta con l'aumentare del peso corporeo³⁰⁻³¹⁻³². Esiste comunque un'alta variabilità individuale.
- **Ambiente di vita del cane:** la concentrazione plasmatica di creatinina maggiore in cani che vivono all'aperto³³⁻³⁴.
- **Stagione:** tale concentrazione sembra essere leggermente più alta in estate e in autunno³⁵.
- **Ritmi biologici:** in alcuni soggetti è stato notato che la concentrazione plasmatica di creatinina segue un ritmo circadiano con un moderato aumento nel primo pomeriggio³⁶ mentre in altri non si sono registrate variazioni della concentrazione nel corso della giornata⁴⁻³⁷. Sembrerebbero presenti anche un ritmo settimanale³⁸ mensile ed annuale, con un picco massimo di concentrazione tra la metà della primavera e la metà dell'estate e un picco minimo in inverno.
- **Stato di idratazione:** soltanto uno stato di disidratazione superiore al 5% incrementa la concentrazione plasmatica di creatinina³⁹. Tale aumento non è proporzionale al grado di disidratazione e le variazioni da individuo a individuo sono notevoli⁴⁰.
- **Sforzo fisico:** l'influenza dello sforzo fisico sulla concentrazione plasmatica di creatinina è stata studiata nei cani da slitta. Si è notato che essa non subisce variazioni dopo corse molto lunghe⁴¹ e che addirittura, in cani ben allenati, diminuisce trenta minuti dopo gli scatti finali. Se, al contrario, i cani non sono allenati la concentrazione di creatinina plasmatica aumenta⁴². Durante l'allenamento tale concentrazione non varia⁴³ o si riduce del 33%⁴²⁻⁴⁴. In cani da slitta sottoposti ad esercizio fisico estremamente

intenso si ha un aumento del 50%⁴⁵. Nei Greyhounds la concentrazione plasmatica di creatinina aumenta leggermente dopo le gare per circa un'ora⁴⁶⁻⁴⁷.

- **Sito del prelievo sanguigno:** la concentrazione plasmatica di creatinina è moderatamente più alta in prelievi ottenuti dalla giugulare⁴⁸.

La creatinina sia plasmatica che urinaria può essere misurata attraverso due metodi:

Il metodo della Jaffe's reaction

Il metodo enzimatico

Nella Jaffe's reaction la creatinina entra in contatto con il reagente di Jaffe e forma un cromogeno giallo-arancio, in condizioni di pH alcalino. Tale reazione è piuttosto aspecifica in quanto il reagente di Jaffe è in grado di reagire anche con la bilirubina, lipidi, acetoacetato, acetone e glucosio⁴⁹⁻⁵⁰. Ciò comporta una sovrastima della quantità di creatinina presente nel plasma che supera il 45% nei cani sani. Il grado di interferenza dato da queste sostanze varia molto da soggetto a soggetto e diminuisce progressivamente in cani con insufficienza renale a causa dell'aumentare della concentrazione di creatinina⁵¹. La Jaffe's reaction può essere usata anche per la determinazione della creatinina urinaria. Dato che nelle urine la quantità di sostanze interferenti con tale reazione è minore, la concentrazione urinaria di creatinina può essere sovrastimata solo leggermente (intorno ad un 6%) o per niente⁵¹⁻⁵². La determinazione della creatinina plasmatica mediante reazioni enzimatiche(creatinina aminoidrolasi o creatinina iminoidrolasi) non è stata ancora confermata nel cane ma nell'uomo ha dimostrato una maggiore accuratezza⁵³⁻⁵⁴. La valutazione della clearance urinaria della creatinina endogena può essere utilizzata per determinare la GFR.

Il paziente deve essere normalmente idratato e le sue condizioni cliniche stabilizzate. Dopo un digiuno di dodici ore possiamo cateterizzare l'animale in modo sterile per tutto il tempo necessario alla prova, oppure utilizzare una cateterizzazione intermittente secondo i vari intervalli di raccolta. In alternativa si può posizionare l'animale in una gabbia metabolica capace di raccogliere l'urina prodotta dal paziente. L'animale deve poter bere liberamente durante la prova di clearance e mangiare ad intervalli regolari. Se si usa una gabbia metabolica l'acqua viene somministrata regolarmente ma non si deve lasciare a disposizione dell'animale, in quanto c'è il rischio che ricada sul pavimento della gabbia sommandosi alle urine prodotte e, quindi, provocando un aumento fittizio della loro quantità finale.

Se si utilizza un catetere la vescica deve essere svuotata completamente ad ogni prelievo. A metà di ogni periodo di raccolta delle urine si preleva un campione di sangue per la valutazione della creatinina plasmatica. L'urina prelevata in ogni periodo deve essere refrigerata. Alla fine delle ventiquattro ore necessarie per il test, si svuota completamente la vescica e, l'urina raccolta, viene aggiunta a quella precedentemente refrigerata.

Dal totale dell'urina prodotta nelle ventiquattro ore si preleva un campione dopo averla mescolata accuratamente.

A questo punto si inseriscono i valori di creatinina urinaria e plasmatica ottenuti nella seguente formula:

$$\text{clearance creatinina endogena} = \text{Cu} \times \text{Vu} / \text{Cp} \times \text{T} \times \text{Pc}^8$$

Cu: creatinina urinaria

Vu: volume urinario

Cp: creatinina plasmatica

T: intervallo di tempo

Pc: peso corporeo

Nella seguente tabella vengono riportati i vantaggi e gli svantaggi che si riscontrano nell'impiego della clearance della creatinina endogena come metodica di valutazione della GFR.

Tabella 4: vantaggi e svantaggi della clearance della creatinina endogena

Metodica	Vantaggi	Svantaggi
Clearance della creatinina endogena ⁸	<ul style="list-style-type: none"> • Non implica somministrazione di alcuna sostanza esogena • Non necessita di particolari sistemi di rilevamento e calcolo 	<ul style="list-style-type: none"> • Necessità di raccogliere tutta l'urina prodotta nelle 24 ore • Possibilità che il catetere si dislochi o che una parte dell'urina fuoriesca all'esterno del catetere inficiando il test • Il catetere permanente può causare infezioni delle bassa vie urinarie • Necessità di refrigerare le urine al momento della formazione del pool • Necessario laboratorio specializzato poiché i sistemi di rilevamento ad uso ambulatoriale sottostimano la concentrazione di creatinina urinaria

Clearance della creatinina esogena

la valutazione della clearance della creatinina esogena è una metodica che prevede la somministrazione di tale analita in infusione continua e la raccolta di campioni urinari a determinati intervalli⁸. Questa tecnica non dovrebbe essere utilizzata in animali in lieve stato di azotemia o uremia⁴⁻¹⁵⁻⁵⁵⁻⁵⁶⁻⁵⁷.

Si applicano all'animale due agocannule, una a livello della vena giugulare e una della safena. Prima della somministrazione della creatinina al paziente viene fornita una quantità di fluidi, corrispondente al 3% del peso corporeo, per via orale (acqua) o intravenosa (cristalloidi) per garantire un'adeguata emissione di urine (che si renderà necessaria per lo studio della clearance).

Si inietta un primo bolo di soluzione di creatinina (25mg/ml) attraverso la safena, ad un dosaggio di 3 ml/kg di peso corporeo (in cani che non presentano problemi renali) o 2,5 ml/kg (in soggetti nefropatici). La concentrazione ematica della creatinina viene mantenuta ad un flusso di 0,5 ml/min mediante l'impiego di una pompa a infusione. La soluzione di creatinina utilizzata per l'infusione continua ha una concentrazione di 9 mg/ml in cani sani e 6 mg/ml nei nefropatici. Una volta cateterizzata la vescica, la si svuota completamente e si effettuano dei lavaggi successivi con quantità di soluzione fisiologica pari a 30 ml. I periodi di raccolta delle urine hanno una durata di trenta minuti. Il primo campionamento urinario inizia a 150' dall'inoculazione del bolo iniziale di creatinina. Il secondo viene condotto tra 180' e 210'. Infine si pratica l'ultimo, tra 210' e 240'. Prima della fine di ciascun campionamento la vescica viene accuratamente risciacquata in modo da raccogliere tutta la creatinina che è stata filtrata. In corrispondenza di 150' – 180' – 210' e 240'si eseguono altrettanti prelievi ematici. Una volta raccolto il sangue in provette contenenti eparina, la

concentrazione di creatinina in tali campioni viene determinata mediante un analizzatore semiautomatico.

Applicando la seguente relazione si ottiene un valore di clearance urinaria per ciascuno dei tre periodi:

$$C = (U_v \times U_c) / P_c$$

C: clearance urinaria

U_v: volume di urine emesso

U_c: concentrazione di creatinina nelle urine

P_c: concentrazione di creatinina nel plasma

La concentrazione di creatinina plasmatica (P_c) utilizzata al denominatore della formula della clearance, corrisponde alla media dei valori plasmatici di creatinina ottenuti all'inizio e alla fine di ogni periodo di raccolta delle urine.

Il valore finale di clearance urinaria della creatinina è dato dalla media dei tre⁵⁶. In tabella vengono elencati i vantaggi e gli svantaggi che si possono riscontrare nella determinazione della GFR mediante clearance della creatinina esogena.

Tabella 5: vantaggi e svantaggi della clearance della creatinina esogena

Metodica	Vantaggi	Svantaggi
Clearance della creatinina esogena ⁸	<ul style="list-style-type: none"> • Misurazioni facilmente disponibili • Calcolo matematico semplice 	<ul style="list-style-type: none"> • Sconsigliato in animali in stato di lieve azotemia o di uremia • Sedazione necessaria per mantenere correttamente in sito il catere • Indisponibilità in commercio di una preparazione di creatinina per inoculazione • Necessità di raccogliere tutte le urine prodotte (gabbia metabolica o catetere a permanenza) • Prelievi ematici e raccolta di urina a diversi intervalli di tempo

Metodi di valutazione della scomparsa plasmatica della sostanza

Clearance dell'inulina in singola iniezione

Per eseguire l'esame della clearance plasmatica attraverso una singola iniezione di inulina (Inutest®), il cane deve essere stato privato del cibo da almeno dodici ore, mentre l'acqua può essere lasciata ad libitum anche durante l'esame stesso. Dopo aver applicato all'animale un'agocannula a

livello della vena cefalica e della safena, si effettua un primo prelievo dalla giugulare (basale) registrando tale tempo come 0 (tempo 0). Successivamente, vengono somministrati 100 mg/kg di peso corporeo di inulina in un unico bolo per via endovenosa, oppure 3000 mg/m² di superficie corporea.

Cani di grossa taglia hanno una velocità di clearance inferiore, per cui la concentrazione di inulina dopo 120 minuti è maggiore rispetto a quella di cani di piccola taglia, che possiedono una velocità di clearance superiore¹⁴. I prelievi ematici vengono effettuati dalla giugulare a 3' - 20' - 40' - 80' e 120' dalla somministrazione. I tempi per il prelievo dei campioni sono stati fissati dopo aver osservato che, in cani clinicamente sani, la concentrazione di inulina dopo tre ore dall'iniezione scende al di sotto della soglia di determinazione.

I campioni di sangue vengono fatti coagulare, vengono centrifugati e il siero analizzato. Quest'ultimo può subire congelamento a -20°C fino al momento dell'analisi.

L'inulina viene scissa nei suoi monomeri di D-Fruuttosio per reazione di idrolisi acida. Successivamente si utilizza un kit disponibile in commercio per il dosaggio enzimatico del D-Fruuttosio. Per l'esame sono necessarie quantità non inferiori a 100µl di siero o plasma e possono essere misurate concentrazioni di inulina comprese tra 5 e 2000 mg/l.

L'inulina iniettata presenta una fase iniziale di rapido declino della concentrazione plasmatica e una seconda fase di diminuzione più graduale. Per la sua determinazione viene utilizzato un modello bicompartimentale attraverso un programma computerizzato per l'analisi farmacocinetica.

Anche uno studio effettuato sull'uomo⁵⁸ ha dimostrato che il modello bicompartimentale esprime al meglio l'andamento della curva concentrazione di inulina/tempo. Al contrario, il modello monocompartimentale sottostima l'area sotto la curva (AUC) tralasciando la prima fase di rapida diminuzione plasmatica. Ciò comporta una sovrastima del GFR. Questo metodo di

determinazione della clearance plasmatica dell'inulina richiede il prelievo di cinque campioni di sangue. Sono disponibili anche metodiche che, utilizzando fattori di correzione o un modello monocompartimentale, permettono un minor numero di campionamenti ematici, ma è dimostrato che sottostimino la AUC¹⁴. Somministrazioni di inulina (3000 mg/m²) anche ripetute non hanno mostrato effetti collaterali apprezzabili negli animali, tuttavia, in cani gravemente azotemici il protocollo dovrebbe subire adattamenti, in quanto in tali soggetti una gran quantità di inulina non è ancora stata eliminata a due ore dall'iniezione. In cani azotemici dovrebbero essere prelevati campioni fino a quattro o otto ore dall'iniezione di inulina. Nella seguente tabella sono riportati i vantaggi e gli svantaggi che può presentare la valutazione della GFR mediante clearance plasmatica dell'inulina in singola iniezione.

Tabella 6: vantaggi e svantaggi della clearance dell'inulina in singola iniezione

Metodica	Vantaggi	Svantaggi
Clearance dell' inulina in singola iniezione ⁸	<ul style="list-style-type: none"> • Non richiede campioni di urina • Può essere confrontata con il golden test 	<ul style="list-style-type: none"> • Insufficiente disponibilità dell'analita • Metodica eccessivamente indaginosa per una valutazione routinaria del GFR • Metodica costosa

Clearance della creatinina

Questo tipo di test si basa sulla determinazione farmacocinetica della curva di decadimento plasmatico della creatinina dopo somministrazione intravenosa. Tale curva è data dai valori di creatinina registrati nel plasma in prelievi

successivi. Si è cercato di ridurre il più possibile il numero di prelievi da effettuare e studi recenti hanno dimostrato che i protocolli, che utilizzano un numero di prelievi di sangue superiore a quattro in un periodo di studio di dieci ore, hanno una percentuale di errore inferiore al 6% quando si applica un modello matematico non compartimentale nella determinazione dell'area sotto la curva (AUC). La clearance plasmatica della creatinina non comporta la raccolta delle urine, non necessita dell'uso di radioisotopi e viene attuata in meno di ventiquattro ore⁸. La prova viene effettuata senza l'utilizzo di anestetici o sedativi. Quindici ore prima dell'inizio del test l'animale deve essere privato del cibo, mentre l'acqua rimane disponibile ad libitum. Vengono applicate due agocannule, una delle quali a livello della giugulare, l'altra della safena. Dopo aver pesato il cane viene somministrata per via endovenosa una quantità di fluidi corrispondente al 3% del peso corporeo, in modo da garantire un'adeguata idratazione. A circa un'ora dalla somministrazione endovenosa di fluidi, un campione di sangue, che verrà utilizzato come basale, viene prelevato dalla giugulare. A questo punto si procede alla somministrazione di un unico bolo di soluzione di creatinina per via endovenosa al dosaggio di 1,0 mL per kg di peso corporeo. La soluzione di creatinina è ottenuta sciogliendo la creatinina anidra in acqua distillata (80 mg/ml). La soluzione viene poi sterilizzata mediante filtrazione, in quanto la permanenza in autoclave riduce la concentrazione di creatinina. Alla fine della somministrazione del bolo si prelevano con la stessa siringa alcuni millilitri di sangue, che vengono prontamente iniettati di nuovo. Tolta la siringa si immettono nel catetere venoso 20 ml di Ringer lattato in modo da pulirlo. I prelievi di sangue per la determinazione della curva di decadimento plasmatico della creatinina sono effettuati attraverso un catetere posizionato nella giugulare. Nella valutazione della clearance, la concentrazione di creatinina endogena dell'animale prima dell'iniezione viene sottratta dai valori ottenuti dopo l'iniezione stessa. La clearance plasmatica della

creatinina esogena si ottiene mediante un programma computerizzato che analizza i dati provenienti dai campionamenti plasmatici, sfruttando un modello non compartimentale.

La valutazione della GFR mediante clearance plasmatica della creatinina può essere eseguita attraverso un numero variabile di prelievi ematici.

La prima metodica prevede tredici campionamenti ematici (Cr-13) nell'arco di dieci ore, rispettivamente a 5' – 10' – 20' – 30' – 45' – 60' – 90' – 120' – 180' – 240' – 300' – 420' – 600' dall'inoculazione della creatinina.

Nella seconda metodica (Cr-5), in cui il numero dei prelievi di sangue scende a cinque, è stata osservata una sovrastima della clearance per bassi valori di clearance e una sottostima per alti valori.

La terza metodica (Cr-2) prevede soltanto due campionamenti ematici, il primo dei quali a 90' e il secondo a 420' dall'inoculazione dell'inulina. Uno studio di correlazione effettuato tra Cr-2 e il metodo che prevede la clearance dell'inulina (gold standard test) ha mostrato che le due metodiche, all'abbassarsi di valori di clearance, forniscono valori quasi uguali. Quando, invece, i valori di clearance aumentano si evidenzia una maggiore differenza tra Cr-2 e il gold standard test¹⁰.

Nella seguente tabella vengono elencati i vantaggi e gli svantaggi che si possono incontrare nella determinazione della GFR mediante il metodo della clearance plasmatica della creatinina esogena.

Tabella 7: vantaggi e svantaggi della clearance della creatinina esogena

Metodica	Vantaggi	Svantaggi
Clearance della creatinina esogena ⁸	<ul style="list-style-type: none"> • Misurazioni della concentrazione di creatinina facilmente ottenibili • Non impiego di radioisotopi • Prelievi urinari non necessari • Test eseguibile in meno di 24 ore • Non richiede sedazione 	<ul style="list-style-type: none"> • Metodo non ampiamente studiato nel cane • Necessità di eseguire prelievi sanguigni seriali nel corso di dieci ore

Clearance dello ioexolo

Lo ioexolo è un mezzo di contrasto non ionico a bassa osmolarità che può essere utilizzato per determinare la GFR⁵⁶ sia nell'uomo⁵⁹ che negli animali⁶⁰. È presente in commercio come soluzione acquosa iniettabile per somministrazione endovenosa (Omnipaque®). Tale soluzione è composta da due isomeri (eso e endo ioexolo). Lo ioexolo può essere utilizzato come marker per la determinazione della GFR in quanto presenta un'eliminazione esclusivamente renale. La nefrotossicità di tale analita, osservata nell'uomo soprattutto in pazienti con insufficienza renale e alle alte dosi utilizzate per il contrasto, non è stata evidenziata nel cane in seguito a nefroangiografia con metrizamide e ioexolo⁶¹.

La valutazione della GFR mediante studio del decadimento plasmatico dello ioexolo si basa sull'inoculazione di tale analita per via endovenosa e sulla determinazione della sua concentrazione nel sangue ottenuto da prelievi seriali.

La concentrazione plasmatica dello ioexolo può essere rilevata attraverso tre diverse metodiche:

- Metodo chimico
- Metodo ICP (inductively coupled plasma emission spectroscopy)
- Metodo HPLC (high-performance liquid chromatography)

Il metodo chimico si basa sulla deiodazione dello ioexolo attraverso idrolisi alcalina e misurazione dello iodio con utilizzando l'arsenito di cerio.

La metodica ICP permette la determinazione della concentrazione dello ioexolo plasmatico, mediante quantificazione dello iodio presente nel siero ed è caratterizzata da una particolare accuratezza e precisione⁶².

Il sistema HPLC consente una valutazione diretta della concentrazione di ioexolo nel campione.

Nella tabella che segue sono indicati vantaggi e svantaggi che l'utilizzo della clearance plasmatica dello ioexolo offre nel determinare la GFR.

Tabella 8: vantaggi e svantaggi della clearance dello ioexolo

Metodica	Vantaggi	Svantaggi
Clearance dello ioexolo ⁸	<ul style="list-style-type: none"> • Disponibilità di ioexolo iniettabile • Non necessita di raccolta di urine • Non necessita di sedazione/anestesi a • Il cane può mangiare e bere prima e durante il test 	<ul style="list-style-type: none"> • Necessità di prelievi sanguigni • Necessità di un metodo di calcolo accurato per ottenere la AUC

Clearance del Technetium Tc 99m pentetate

La GFR può essere calcolata anche attraverso la valutazione della clearance plasmatica del Tc 99m pentetate¹⁰.

Tale analita è considerato un buon marker della GFR nell'uomo, nel cane, nel gatto e nel cavallo⁶³. Il test si basa sullo studio del decadimento della concentrazione del Tc 99m pentetate nel plasma rispetto al tempo.

Per tracciare la curva di decadimento plasmatico della sostanza possono essere usati un numero variabile di prelievi ematici (13 campionamenti, 2 oppure uno soltanto). Viene preparata una soluzione di Tc 99m pentetate e Ringer lattato entro un'ora dalla sua utilizzazione in modo da somministrare al paziente 300 µCi di Tc 99m pentetate in circa 5.6 mL di soluzione. Per valutare quale sia l'effettiva dose somministrata al cane, la siringa viene pesata prima e dopo l'iniezione. Non è necessario che l'animale sia sedato o anestetizzato ma il cibo viene tolto circa quindici ore prima dell'esame. L'acqua invece può rimanere ad libitum. Circa un'ora prima dell'inizio del test si fornisce all'animale una quantità di fluidi corrispondenti al 3% del peso corporeo, in modo da garantire un buon stato di idratazione. Vengono posizionate due agocannule, una a livello della giugulare e una della safena. Si effettua un primo prelievo di sangue dalla giugulare (da utilizzare come basale) e tale tempo viene indicato come 0. Si procede quindi ad inoculare la soluzione di Tc 99m in singolo bolo attraverso la safena. Con la stessa siringa con cui si è effettuata l'iniezione, si aspirano alcuni ml di sangue e si inoculano rapidamente. Infine si completa il flushing dell'agocannula iniettando 20 mL di soluzione di Ringer lattato. Il sangue (circa 3 ml per campione) proveniente dai vari campionamenti deve essere raccolto in provette contenenti eparina. Il decadimento plasmatico del Tc 99m pentetate può essere valutato attraverso tre protocolli che si basano su un numero diverso di campioni ematici:

1. Tc-13

Nella metodica a tredici campionamenti, i prelievi vengono effettuati dalla giugulare a 5 – 10 – 20 – 30 – 45 – 60 – 90 – 120 – 180 – 240 – 300 – 420 e 600 minuti dall'inoculazione del Tc 99m pentate. La valutazione della clearance del Tc 99m pentate si ottiene mediante l'utilizzo di uno specifico software per l'analisi farmacocinetica.

2. Tc-2

Se vengono effettuati solo due prelievi, rispettivamente, a 20 e a 180 minuti il decadimento plasmatico dell'analita si ottiene mediante un modello monocompartimentale. La concentrazione del Tc 99m pentate al tempo zero viene estrapolata dal ln della concentrazione a 20 minuti e ln della concentrazione a 180 minuti.

AUC = C Tc 99m pentate al tempo 0/ln pendenza della curva

C Tc 99m pentate: concentrazione di Tc 99m pentate al tempo 0.

Per il calcolo della clearance del Tc 99m pentate si applica quindi la formula:

Cl = dose di Tc 99m pentate/AUC

Cl: clearance del Tc 99m pentate

AUC: area sottesa alla curva di decadimento plasmatico

3. Tc-1

In alternativa è possibile utilizzare un solo prelievo ematico a 120 minuti dall'iniezione ed affidarsi ad un modello quadratico lineare⁶⁴⁻⁶⁵. In questo caso per calcolare la clearance del Tc 99m pentate si ricorre alla seguente equazione:

$$Cl = (-4.69 \times 0.01) Vt + 3.89Vt - 8.21$$

Cl: clearance.

Vt: volume di distribuzione del Tc 99m pentate. Tale volume viene calcolato mediante la formula:

$$Vt = \text{dose del Tc 99m pentate} / \text{Tc 99m pentate rilevato a 120'}$$

L'attività del Tc 99m pentate nei campioni viene determinata, con un apposito rilevatore, circa 600 minuti dopo il loro prelievo. Il valori di concentrazione così ottenuti vengono corretti mediante una formula matematica, tenendo conto del tempo di emivita del Tc 99m pentate.

Tc-13, rispetto agli altri metodi, permette una migliore caratterizzazione della curva di decadimento plasmatico. Tc-2 si discosta maggiormente, rispetto a Tc-13, dai risultati ottenuti mediante clearance dell'inulina in infusione continua (UCI) soprattutto all'abbassarsi del GFR.

Le differenze tra Tc-1 e il gold standard test per la valutazione del GFR sono tanto ampie e imprevedibili da permettere di considerare il Tc-1 solo come indicatore relativo della funzionalità renale. Tc-13 e Tc-2 hanno un'alta correlazione con il gold standard test e possono essere applicati per valutare il GFR. Nella seguente tabella sono evidenziati i vantaggi e gli svantaggi che la

determinazione della GFR mediante clearance plasmatica del Tc 99m pentate presenta.

Tabella 9: vantaggi e svantaggi della clearance del Tc 99m pentate

Metodica	Vantaggi	Svantaggi
Clearance del Tc 99m pentate ⁸	<ul style="list-style-type: none"> • Buon marker della GFR nel cane • Non richiede campionamenti urinari • Non richiede sedazione/anestesia 	<ul style="list-style-type: none"> • Necessità di autorizzazioni particolari e speciali apparecchiature • Il paziente deve rimanere in isolamento nelle 24 ore successive al test

Metodo scintigrafico renale

Determinazione del Tc-99m-acido dietilenetriaminopentacetico (DTPA) nel rene mediante metodo scintigrafico

La GFR può essere determinata nel cane anche mediante metodo scintigrafico. Tale metodica consente di visualizzare la morfologia e di apprezzare la funzionalità renale sia complessiva che individuale⁸⁻⁶⁵⁻⁶⁶. Prima dell'iniezione dell'analita, la siringa contenente il Tc-99m-DTPA viene posta 26 cm al di sopra del detector esterno di radioattività (camera gamma) per identificare la quantità esatta di sostanza presente. Il dato così ottenuto viene registrato. Una volta posizionato il cane in decubito laterale sinistro, ed inserita un'agocannula a livello venoso, si pone la camera gamma dorsalmente ai reni. Contemporaneamente all'accensione della camera gamma si inizia la somministrazione endovenosa del Tc-99m-DTPA (3-4mCi). Le immagini vengono raccolte ogni sei secondi in modo da avere una

registrazione complessiva di almeno tre minuti. Nel cane è necessario effettuare regolazioni della profondità a causa della grande variabilità nella posizione dei reni che potrebbe condurre ad errori di misurazione. Si procede ad analizzare la quantità di analita rimasta nella siringa posizionandola a 26 cm dalla camera gamma. Così facendo è possibile ricavare la dose effettivamente iniettata al paziente. Vengono considerati i dati raccolti in circa due minuti nell'intervallo compreso tra 60 e 180 secondi e il radiologo identifica la regione di interesse attorno ad ogni rene. Viene inclusa nello studio anche una porzione periferica rispetto a quella renale, avendo l'accuratezza di non comprendere in essa gli ureteri, la milza e l'aorta.

Il metodo scintigrafico permette di identificare una curva della concentrazione rispetto al tempo dell'isotopo nel sangue. La pendenza della curva per ogni rene tende ad incrementare tra 15 e 30 secondi dall'inoculazione. Si verifica poi un aumento del Tc-99m-DTPA nei reni per un progressivo accumulo nei nefroni, fino al raggiungimento di un picco massimo di concentrazione tra 2,5 e 3,5 minuti dall'iniezione. Nei soggetti clinicamente sani la curva decresce progressivamente. I pazienti nefropatici mostrano invece una curva concentrazione-tempo piatta.

I vantaggi e gli svantaggi dell'utilizzo del metodo scintigrafico nella determinazione della GFR sono elencati nella tabella che segue.

Tabella 10: vantaggi e savantaggi della scintigrafia renale (Tc 99m pentate DTPA)

Metodica	Vantaggi	Svantaggi
Determinazione del Tc 99m pentate mediante metodo scintigrafico ⁸	<ul style="list-style-type: none"> • Non sono necessari prelievi ematici e urinari • Possibilità di valutare la funzionalità renale complessiva ed individuale 	<ul style="list-style-type: none"> • Necessità di autorizzazioni particolari e speciali apparecchiature • Il paziente deve rimanere in isolamento nelle 24 ore successive al test

Formule di Cockroft – Gault (modelli di predizione del GFR)

In medicina umana sono presenti delle equazioni che permettono di stimare la GFR⁹ a partire dalla concentrazione di creatinina nel plasma, sesso, età e peso corporeo (ad esempio l'algoritmo di Cockroft-Gault). È stato riportato però che tale equazione non fornisce molte più informazioni del reciproco della creatinina. Sono state perciò messe a punto nuove equazioni che forniscano una stima più accurata della GFR.

Nel cane, pur non essendo consigliato ricavare la GFR a partire dalla creatinina plasmatica a causa della scarsa precisione di tale metodica, sono state identificate due equazioni. Prima di applicare tali formule è necessario convertire i valori di creatinina plasmatica da mg/l a $\mu\text{mol/l}$, secondo la seguente relazione:

$$\mathbf{C \mu\text{mol/L} = C \text{mg/L} \times 8.84}$$

C $\mu\text{mol/L}$: Creatinina espressa in $\mu\text{mol/L}$

C mg/L: Creatinina espressa in mg/kg

Equazione 1:

$$\mathbf{GFR = 227 \times (1/\text{Creatinina plasmatica})}$$

Equazione 2:

$$\mathbf{GFR = 246 \times (1/\text{Creatinina plasmatica}) - 0.1}$$

Metodi di valutazione della GFR nel gatto

Metodi che prevedono la raccolta delle urine

Clearance della creatinina endogena

Nel gatto, così come nel cane, la GFR è considerata il miglior indice per la valutazione quantitativa della funzionalità renale. I metodi attualmente utilizzabili presentano però lo svantaggio di essere difficilmente applicabili nella routine diagnostica sia per l'elevato numero di prelievi richiesti sia per il rischio di insorgenza di infezioni delle basse vie urinarie⁶⁷.

Per questo motivo la valutazione della funzionalità renale del gatto è generalmente affidata alla determinazione plasmatica di urea e creatinina endogena. La valutazione della GFR può essere molto utile soprattutto se si considera il fatto che la creatinina è un prodotto di degradazione della fosfocreatina muscolare e che, quindi, la sua produzione dipende dalla massa muscolare del paziente. Dato che, infatti, la maggior parte dei laboratori non corregge i valori di creatinina per la massa muscolare del soggetto, si possono trovare gatti di piccole dimensioni con livelli di creatinina normali e GFR diminuita che verrebbero considerati non patologici se ci si basasse solo sul valore ematico di creatinina. La valutazione della GFR può, d'altra parte, aiutare ad interpretare in senso patologico o meno un innalzamento della creatinina in un gatto di grosse dimensioni⁶⁸. A differenza di altre specie, in cui una certa quota di creatinina viene secreta a livello tubulare, nel gatto essa subisce solo filtrazione glomerulare.

Sfortunatamente tali parametri sono poco sensibili e capaci di svelare un danno renale soltanto una volta perso il 50 – 75% della funzionalità dell'organo⁶⁹.

Il test di valutazione della clearance della creatinina endogena rappresenta, nel gatto, il golden standard test per la determinazione della GFR. In questa specie, infatti, la creatinina, viene esclusivamente filtrata a livello glomerulare, senza subire alcun processo di riassorbimento o escrezione tubulare⁷⁰.

Il test può essere effettuato nell'arco di 60'.

Una volta applicato all'animale un catetere urinario, si procede al completo svuotamento della vescica. Dopo 30' si prelevano 5 ml di sangue dalla vena giugulare. Trascorsi 30' dal prelievo ematico si raccoglie, mediante il catetere, tutta l'urina presente in vescica. Il campione di sangue viene centrifugato per 15' a 1600 giri. La concentrazione di creatinina presente nel siero si ottiene applicando il metodo Folin – WU (22). Attraverso la seguente relazione è possibile individuare la clearance della creatinina, che corrisponde alla GFR:

$$C = U_c/P_c \times \text{Peso corporeo}$$

U_c: concentrazione di creatinina nelle urine

P_c: concentrazione di creatinina nel plasma

I valori medi della GFR, ottenuti mediante clearance della creatinina endogena, sono stati individuati sia in gatti sani che in gatti con insufficienza renale⁷¹.

Tabella 11: valori medi di GFR ± deviazione standard in gatti sani e nefropatici

Gatti sani (ml/min/kg)	Gatti con insufficienza renale (ml/min/kg)
2,64 ± 0,22	0,79 ± 0,41

Vantaggi e svantaggi dell'utilizzo della clearance della creatinina endogena nella determinazione della GFR vengono elencati nella seguente tabella.

Tabella 12: vantaggi e svantaggi della clearance della creatinina endogena

Metodica	Vantaggi	Svantaggi
Clearance della creatinina endogena	<ul style="list-style-type: none"> • Golden standard test • Eseguitibile in 60' • Facilità di esecuzione • Basso costo 	<ul style="list-style-type: none"> • Necessità di cateterizzare l'animale • Possibilità di infezioni iatrogene delle vie urinarie

Clearance della creatinina esogena

Lo studio della clearance della creatinina esogena nel gatto, sebbene eccessivamente indaginoso per l'utilizzo nella pratica clinica rappresenta il gold standard test⁶⁸⁻⁷²⁻⁷³. La metodica si basa sulla determinazione della clearance della creatinina esogena mediante identificazione della concentrazione di tale analita nel plasma e nelle urine.

Il gatto deve essere a digiuno da circa 16-20 ore prima di effettuare l'esame, mentre l'acqua può essere lasciata ad libitum. Dopo aver applicato un'agocannula a livello della vena cefalica si effettua un prelievo di sangue che verrà utilizzato come campione basale. Per l'effettuazione della metodica è necessario sottoporre l'animale ad anestesia generale. Viene posizionata una seconda agocannula a livello della giugulare. Prima della somministrazione della creatinina si inocula all'animale una quantità di fluidi pari al 3% del loro peso corporeo, mediante una sonda naso-gastrica. Il catetere venoso verrà utilizzato per i prelievi di sangue e rimarrà in sede per tutta la durata del test.

Infine viene applicato un catetere urinario. Utilizzando il catetere a livello della cefalica si somministra il primo bolo di creatinina, da 30 a 60 mg/kg a seconda di quanto grave si sospetti essere il danno renale del paziente. L'orario in cui si è effettuato il primo bolo viene registrato e considerato come tempo 0 (t0). L'animale viene mantenuto in infusione endovenosa continua di soluzione di creatinina (3,2 mg/ml) a 16 mg/kg/ora. Ciò permette di ottenere e mantenere una concentrazione ematica di creatinina > 6 mg/dl. Dopo 60 minuti dall'inoculazione del primo bolo vengono effettuati tre prelievi di urina a 30 minuti di distanza uno dall'altro. I campioni di sangue vengono invece raccolti dall'agocannula posizionata nella giugulare a 90-120-150 e 180 minuti dall'iniezione del primo bolo di creatinina (tempo 0). Il sangue viene raccolto in provette contenenti eparina. La concentrazione di creatinina nei campioni di sangue ed urina viene determinata utilizzando un analizzatore semiautomatico, mediante metodo Jaffe. Una volta raccolti i quattro valori di creatinina ottenuti dai quattro prelievi ematici, si calcola la media dei valori di creatinina di ciascuno dei tre periodi (tra 90' e 120', tra 120' e 150', tra 150' e 180'). Si ottengono così tre valori di creatinina plasmatica.

La clearance della creatinina esogena si ottiene mediante l'applicazione di tale formula:

$$Cl = (Ucrea \times V) / Pcrea$$

Cl: clearance della creatinina esogena

Ucrea: valore medio di creatinina urinaria

V: volume di urina

Pcrea: valore medio di creatinina plasmatica

Nella tabella che segue vengono elencati i vantaggi e gli svantaggi che si incontrano nell'utilizzo della clearance della creatinina esogena nella determinazione della GFR.

Tabella 13: vantaggi e svantaggi della clearance della creatinina esogena

Metodica	Vantaggi	Svantaggi
Clearance della creatinina esogena	<ul style="list-style-type: none"> ○ Misura accurata della GFR 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Anestesia generale
		<ul style="list-style-type: none"> ○ Infusione continua di creatinina
		<ul style="list-style-type: none"> ○ Campioni di sangue e di urina in serie

Metodi di valutazione della scomparsa plasmatica della sostanza

Clearance dell'inulina in singola iniezione

La maggior parte dei metodi utilizzati nel gatto per la valutazione della GFR richiede la raccolta di campioni urinari. Ciò comporta di ricorrere all'uso di gabbie metaboliche o della cateterizzazione vescicale. Altri metodi, invece, utilizzano composti radiomarcanti che limitano notevolmente la loro applicabilità nella routine diagnostica. Tra tutte le metodiche presenti, la clearance plasmatica dell'inulina dopo singola iniezione rappresenta un'allettante alternativa.

Per poter effettuare questo test, è necessario sospendere la somministrazione di cibo all'animale circa 12 ore prima. Al contrario, possiamo lasciare libero accesso all'acqua. Si posiziona una prima agocannula nella vena cefalica di sinistra e si inocula un unico bolo di soluzione di inulina al 25% (Inutest®) al dosaggio di 3000 mg/m² di superficie corporea. Da una seconda agocannula presente a livello della cefalica destra, si prelevano campioni di sangue prima

dell'iniezione del bolo di inulina (t0) e 3-10-20-40-80-120-180 minuti dopo. Non sono necessarie quantità di sangue superiori a 1,5 ml per campione. Il sangue viene lasciato coagulare e sottoposto a centrifugazione. L'inulina viene scissa mediante reazione di idrolisi acida in d-fruttosio. A questo punto si determina la concentrazione di d-fruttosio attraverso un kit commerciale che sfrutta un sistema rilevatore enzimatico. Tale metodica può essere applicata ad una quantità minima di siero o plasma pari a 100 µl. La GFR può essere così determinata mediante valutazione del decadimento serico dell'inulina. Attraverso l'utilizzo del programma informatico INUSOFT® è possibile calcolare la GFR del gatto sulla base del decadimento plasmatico della concentrazione di inulina. I calcoli sfruttano un modello cinetico bicompartimentale, in quanto esso fornisce un'ottima descrizione della curva concentrazione/tempo dell'inulina⁷⁴. Vengono elencati nella seguente tabella i vantaggi e gli svantaggi dell'utilizzo della clearance dell'inulina in singola iniezione per la determinazione della GFR.

Tabella 14: vantaggi e svantaggi della clearance dell'inulina in singola iniezione

Metodica	Vantaggi	Svantaggi
Clearance dell'inulina in singola iniezione	<ul style="list-style-type: none"> ○ Metodica molto sensibile 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Numero elevato di prelievi
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Metodica semplice e sicura 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Tempi troppo lunghi per un uso di routine
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Non richiede prelievi di urina 	
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Non necessita di infusione continua 	

È possibile modificare tale metodica mettendo in atto una sorta di test di escrezione dell'inulina, andando ad effettuare un unico prelievo di sangue

dopo tre ore dall'inoculazione di un unico bolo di analita (3000 mg/m² di superficie corporea). Questo test mostra un'eccellente sensibilità e una buona specificità nell'individuare pazienti in fase precoce di danno renale. Da un confronto effettuato tra la clearance dell'inulina in singola iniezione e la clearance della creatinina (gold standard test), è risultata, per la prima metodica, una sensibilità del 100% contro una sensibilità dell'83% per la creatinina. La valutazione dell'eliminazione di un singolo bolo di inulina a tre ore dall'inoculazione è particolarmente indicata in gatti in sopetta fase iniziale di danno renale, in soggetti con valori di creatinina borderline o quando si nota una discrepanza tra i valori di BUN e di creatinina. La determinazione della GFR mediante test di escrezione dell'inulina in singolo bolo presenta una serie di vantaggi e svantaggi, che vengono indicati nella tabella seguente.

Tabella 15: vantaggi e svantaggi del test di escrezione dell'inulina in singolo bolo

Metodica	Vantaggi	Svantaggi
Test di escrezione dell'inulina in singolo bolo	<ul style="list-style-type: none"> ○ Unico prelievo dopo l'inoculazione 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Insufficiente disponibilità dell'analita
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Semplice 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Costoso
	<ul style="list-style-type: none"> ○ sensibilità e specificità elevate 	

Il test di valutazione del decadimento plasmatico dell'inulina dopo inoculazione di singolo bolo sembra quindi fornire nel gatto una valutazione realistica della GFR. Le perplessità suscitate, invece, in uno studio⁷³ legate alla scarsa correlazione identificata tra tale metodica e la clearance della creatinina esogena potrebbero trovare risposta nel fatto che, in tale studio, la GFR è stata determinata solo in gatti clinicamente sani, mentre gli studi successivi⁷⁴⁻⁷⁵ sono stati eseguiti anche su soggetti con problemi renali, con margini di variabilità della GFR maggiori.

Clearance dello ioexolo

il test di valutazione della clearance dello ioexolo⁶⁷ per determinare la GFR può essere praticato anche nel gatto. Esso si basa sulla clearance plasmatica di tale analita, che si ottiene dividendo la dose inoculata per l'area sottostante la curva concentrazione/tempo (AUC).

Circa 12 – 16 ore prima di effettuare lo studio si toglie il cibo all'animale e gli si somministra una quantità di fluidi corrispondente al 3% del peso corporeo mediante una sonda naso-gastrica. Attraverso un'agocannula sistemata a livello della giugulare si preleva il primo campione ematico (basale) al tempo 0. Il sangue viene raccolto in provette con eparina (500 microlitri). Una seconda agocannula viene posizionata nella vena cefalica. Lo ioexolo viene somministrato attraverso l'agocannula precedentemente inserita, ad un dosaggio di 90 mg/kg (nei gatti che non presentano alterazioni renali) o di 45 mg/kg (nei soggetti nefropatici). I successivi prelievi ematici, effettuati dalla giugulare, vengono raccolti a 120' – 180' – 240' dall'inoculazione dell'analita nei gatti sani. Nei pazienti con alterazioni della funzionalità renale, invece, i campioni successivi al basale, si prelevano a 120' – 240' – 360'. I campioni vengono mantenuti a 5°C fino al momento dell'analisi. La concentrazione dello iodio nei campioni, che si libera dallo ioexolo per reazione di idrolisi alcalina, viene determinata mediante reazione colorimetrica⁷⁶. La clearance dello iodio (CI) si ottiene dalla seguente relazione, sfruttando un modello mono-compartimentale corretto mediante la formula di Mortensen:

$$CI = \text{Dose di ioexolo}/AUC$$

CI: clearance dello iodio

AUC: area sottesa alla curva di decadimento plasmatico dello iodio

Una volta ottenuta la clearance dello iodio viene determinata la clearance dello ioexolo attraverso la formula:

$$PCio = (0,990778 \times CI) - (0,001218 \times CI)$$

PCio: clearance dello ioexolo

CI: clearance dello iodio

La determinazione della clearance plasmatica dello ioexolo mediante tale reazione colorimetrica richiede tre soli prelievi ematici e una quantità minima di plasma (50 µl). In alternativa, per ottenere la concentrazione di iodio nel plasma si possono usare X-ray fluorescence (XRF)⁷⁷, sistema HPLC⁷⁸, elettroforesi capillare⁷⁹ e ICP⁶². La determinazione della AUC può sfruttare anche un modello bicompartimentale o non compartimentale i quali, rispetto al monocompartimentale, forniscono una misura più accurata della AUC, necessitando, però, di un numero maggiore di campioni ematici⁶⁷.

Nella tabella che segue vengono elencati i vantaggi e gli svantaggi nell'utilizzo della clearance dello ioexolo per la determinazione della GFR.

Tabella 16: vantaggi e svantaggi della clearance dello ioexolo

Metodica	Vantaggi	Svantaggi
Clearance dello ioexolo	<ul style="list-style-type: none"> ○ Valore della GFR non significativamente diverso da quello fornito da clearance urinaria creatinina ○ Necessari soli tre campioni plasmatici ○ Metodica poco invasiva e più facilmente attuabile in ambito clinico rispetto alla clearance urinaria della creatinina 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Eventuali restrizioni legate alla presenza di arsenicato e residui chimici della reazione colorimetrica ○ L'applicabilità della formula di Mortensen nel gatto dovrebbe essere accuratamente verificata

Clearance del Tc 99m acido dietilenetriaminopentacetico (DTPA)

La determinazione della GFR mediante valutazione della curva di decadimento plasmatico del Tc 99m DTPA è stata utilizzata con successo sia nell'uomo che nel cane⁶⁶⁻⁸⁰. Il Tc 99m DTPA presenta una serie di caratteristiche che lo rendono particolarmente adatto ad essere utilizzato come analita per lo studio di valutazione della GFR. Esso viene completamente filtrato dal glomerulo renale e non va incontro a processi di secrezione o riassorbimento tubulare. Il TC 99m DTPA non è metabolizzato o prodotto dall'organismo e non mostra un legame significativo con le proteine plasmatiche. Tale composto viene eliminato con un'emivita effettiva di circa sei ore. È necessario ricordare anche che il TC 99m DTPA è facilmente disponibile in commercio e, date le basse dosi richieste per questo tipo di test,

il rischio radioattivo è trascurabile⁸¹⁻⁸². Questa metodica prevede la somministrazione dell'analita in singola iniezione e ha quindi il vantaggio di non richiedere campionamenti di urina.

Per effettuare lo studio di clearance del Tc 99m DTPA il gatto deve essere a digiuno da circa dodici ore, mentre non si prevedono restrizioni per quanto riguarda il consumo di acqua. Una volta effettuata l'anestesia generale, si applicano un'agocannula a livello della vena safena mediale per l'inoculazione del mezzo diagnostico e dei fluidi e una nella giugulare per il prelievo dei campioni. Dopo aver ottenuto il primo campione di sangue, che verrà utilizzato come basale e che corrisponde al tempo 0 viene somministrata al paziente per via endovenosa una quantità di fluidi (soluzione fisiologica) pari al 3% del suo peso corporeo. Un unico bolo di Tc 99m DTPA al dosaggio di 0,91 +/- 0,11 mCi viene inoculato attraverso il catetere venoso. L'orario esatto di inoculazione del Tc 99m DTPA viene registrato e corrisponde al tempo 0 (t0). Una volta terminata l'inoculazione del Tc 99m DTPA, viene valutata la radioattività residua nella siringa mediante un rilevatore gamma. Il valore di radioattività così ottenuto è sottratto alla dose iniziale, in modo da conoscere la dose effettivamente inoculata. Per valutare la curva di decadimento plasmatico del Tc 99m DTPA sono necessari tre prelievi ematici (a 60 - 120 - 180 minuti dall'inoculazione dell'analita) (DTPA-1). La clearance del Tc 99m DTPA può essere ottenuta anche mediante un solo prelievo ematico eseguito a 60' (DTPA-2). Studi di correlazione effettuati tra valori della GFR ottenuti mediante il gold standard test e la clearance del Tc 99m DTPA, mostrano che DTPA-1 correla meglio di DTPA-2 con la clearance della creatinina esogena. La valutazione del coefficiente di correlazione di Pearson (correlazione significativa quando $P \leq 0.05$) mostra una correlazione significativa tra il gold standard test e DTPA-1 ($P \leq 0.05$), una minore tra gold standard test e DTPA-2 ($P \leq 0.1$), una significativa tra DTPA-1 e DTPA-2 ($P \leq 0.05$).⁷³ I vantaggi e gli svantaggi

della determinazione della GFR mediante clearance del Tc 99m DTPA vengono elencati nella seguente tabella.

Tabella 17: vantaggi e svantaggi della clearance del Tc 99m DTPA

Metodica	Vantaggi	Svantaggi
Clearance del Tc 99m DTPA	<ul style="list-style-type: none"> ○ Completamente filtrato dal glomerulo, no secrezione, riassorbimento, metabolizzazione o produzione da parte dell'organismo 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Richiede licenza per l'utilizzo di radionuclidi. Ciò ne limita l'uso ai soli centri veterinari specializzati
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Non si lega in modo apprezzabile alle proteine plasmatiche 	
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Emivita di 6 ore 	
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Facilmente disponibile in commercio 	
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Richiede basse dosi di radioattività che limitano il rischio di radiazione 	
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Metodica accurata e semplice da mettere in atto 	
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Il Tc 99m DTPA può essere usato anche per la contemporanea valutazione della funzionalità di un singolo rene 	
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Potrebbe anche essere effettuata senza anestesia* 	

* Nello studio che ho preso in considerazione⁷³ i gatti sono stati sottoposti ad anestesia generale per facilitare il prelievo di campioni di sangue e urina

necessari per le contemporanee valutazioni della clearance di creatinina esogena e inulina.

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della presente tesi è stato quello di valutare metodi semplificati per la determinazione della GFR nel cane tramite la misurazione della clearance plasmatica dello ioexolo.

MATERIALI E METODI

Materiali

La soluzione iniettabile di ioexolo (Omnipaque® 350: 350 mgI/ml) e di iopentolo (Imagopaque® 300: 300 mgI/ml) sono state gentilmente fornite dalla ditta Nycomed Amersham Sorin (Milano, Italia).

Tutti i solventi utilizzati sono di grado HPLC (Baker Analyzed® Reagent, J.T. Baker, Deventer, Holland).

L'acqua, di grado analitico, se impiegata per portare a concentrazione la fase mobile in HPLC, veniva prefiltrata mediante filtri d'aceto di cellulosa impermeabilizzati con silicone (PS Whatman®, Millipore Corporation, Maid Stone, England).

Tutti gli altri reagenti sono stati acquistati dalle più comuni fonti commerciali.

Strumentazione

Il sistema HPLC utilizzato consiste in una pompa a gradiente binario SpectraSYSTEM® P2000 Thermo Finnigan, con un rilevatore UV-VIS SpectraSYSTEM® 3000 Thermo Finnigan ed un autocampionatore SpectraSYSTEM® AS3000 Thermo Finnigan (Waltham, MA, USA).

È stata utilizzata una colonna cromatografica Waters SunFire® (250 x 4,60 mm), avente una granulometria delle particelle di 5 µm, una precolonna Waters Guard-Pack™ (Waters, Milford, MA, USA) impaccate con gel di silice derivatizzato con gruppi alchilici C18. È stato utilizzato un volume di iniezione di 100 µl.

Soluzioni standard e soluzioni stock

Le soluzioni standard dello ioexolo sono state preparate dalla soluzione acquosa in commercio Omnipaque® 350 mgI/ml ovvero 755 mg/ml di ioexolo da cui è stata ottenuta una soluzione madre alla concentrazione di 2 mg/ml. Dalla soluzione madre per diluizioni successive sono state allestite le soluzioni standard a concentrazione 5, 10, 25, 50, 100 e 200 µg/ml da cui è stata ottenuta la retta di taratura per iniezione di 100 µl in HPLC. Le soluzioni standard dello iopentolo sono state preparate dalla soluzione acquosa in commercio Imagopaque® 300mgI/ml ovvero 658 mg/ml di iopentolo da cui è stata allestita la soluzione madre di 2 mg/ml; da quest'ultima per diluizioni successive si sono ottenute le soluzioni standard a concentrazione 5, 10, 15, 50, 100 e 200 µg/ml. Le soluzioni di ioexolo e iopentolo sono state conservate a 4°C ed al riparo dalla luce. Le soluzioni di ioexolo e iopentolo sono costituite da due isomeri aventi diversi tempi di ritenzione in HPLC di cui è stato preso in riferimento il picco corrispondente all'isomero più abbondante.

Standard interno

Per utilizzare una molecola come standard interno occorre considerare una serie di requisiti: questa non deve essere presente nella miscela da analizzare, non deve reagire con alcun componente del campione, non deve contenere impurezze rilevabili, deve essere strutturalmente simile alla sostanza ed avere simile solubilità. Come standard interno per lo ioexolo è stato scelto lo iopentolo⁸³. Lo iopentolo differisce nella struttura chimica dallo ioexolo soltanto per la presenza di un gruppo metossilico ed è anch'esso un mezzo di contrasto non ionico disponibile in soluzione acquosa iniettabile.

Condizioni cromatografiche

Sono state utilizzate le seguenti condizioni cromatografiche: come fase mobile è stata utilizzata una miscela costituita da acqua a pH 2,6 e acetonitrile in rapporto 94/6 % v/v. L'acqua è stata portata a pH 2,6, adatto alla colonna utilizzata, con l'aggiunta di H₃PO₄ 85%. E' stato utilizzato un flusso pari a 1,3 ml/min. La fase mobile, una volta preparata, è stata degassata sotto flusso di azoto ed ogni volta che terminava e veniva sostituita con la nuova, si attendeva che le condizioni della colonna si riequilibrassero prima di procedere con le analisi.

Curve di calibrazione

Nelle condizioni cromatografiche sopra riportate sono state ottenute le rette di taratura dello ioexolo e dello iopentolo mediante iniezione delle soluzioni standard precedentemente preparate. Ciascuna soluzione è stata iniettata tre volte e utilizzando la media delle tre determinazioni, è stata ottenuta l'equazione della retta di calibrazione al computer mediante il programma Graph Pad Prism® (Graph Pad Software Inc., IL, USA). Come parametro quantitativo è stata impiegata l'area sottesa ai picchi del tracciato cromatografico, misurata direttamente dal software di integrazione ChromQuest 4.2 (Thermo Finnigan, Waltham, MA, USA).

Trattamento degli animali

La valutazione della GFR mediante clearance dello ioexolo è stata applicata a 35 cani di peso corporeo compreso tra 11 e 37 Kg. Le fasi in vivo del trattamento sono state svolte presso il Dipartimento di Clinica Veterinaria dell'Università di Pisa. Per ciascun paziente sono state compilate: cartella

clinica, scheda di accompagnamento (Figura 8) e sono stati eseguiti una serie di esami specifici per la valutazione della funzionalità renale.



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA
 Dipartimento di Clinica Veterinaria
 Sezione di Farmacologia e Tossicologia
 V.le delle Piagge 2, 56124 PISA tel. 050 577351 fax: 050 542892

Tempi dei prelievi ematici (min)

Iniettato ora _____

5' _____ 60' _____

10' _____ 90' _____

15' _____ 180' _____

20' _____ 240' _____

30' _____ 300' _____

45' _____ 420' _____

Filtrato glomerulare, GFR (clearance plasmatica dello iohexolo)
Flusso plasmatico renale (clearance plasmatica dell'acido p- aminoippurico)

DATA _____

PROPIETARIO _____

INDIRIZZO _____

CANE _____ RAZZA _____

PESO (Kg) _____

SUPERFICIE (m²) [4(kg)+7/(kg)+90] _____

CREATININA SIERICA (mg/dl) _____

Terapia:

Dose Iniettata

SIRINGA VUOTA (gr) _____

SIRINGA PIENA (gr) _____

SIRINGA DOPO INIEZIONE (gr) _____

INIETTATO (gr) _____

L'analista _____

Figura 8: scheda di accompagnamento

La dose di iohexolo somministrata è stata di 64,7 mg/kg. La dose esatta è stata determinata dalla differenza tra il peso della siringa prima e dopo l'iniezione (Figura 9).

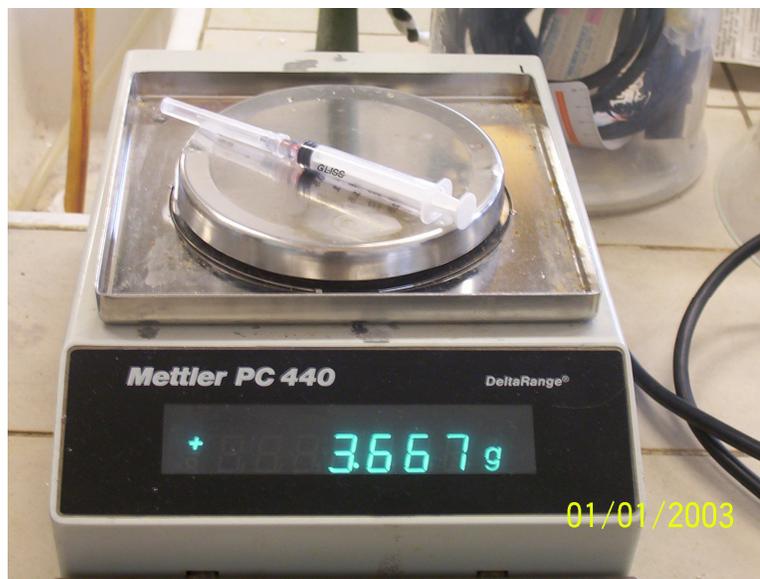


Figura 9: pesatura della siringa dopo l'inoculazione dello ioexolo

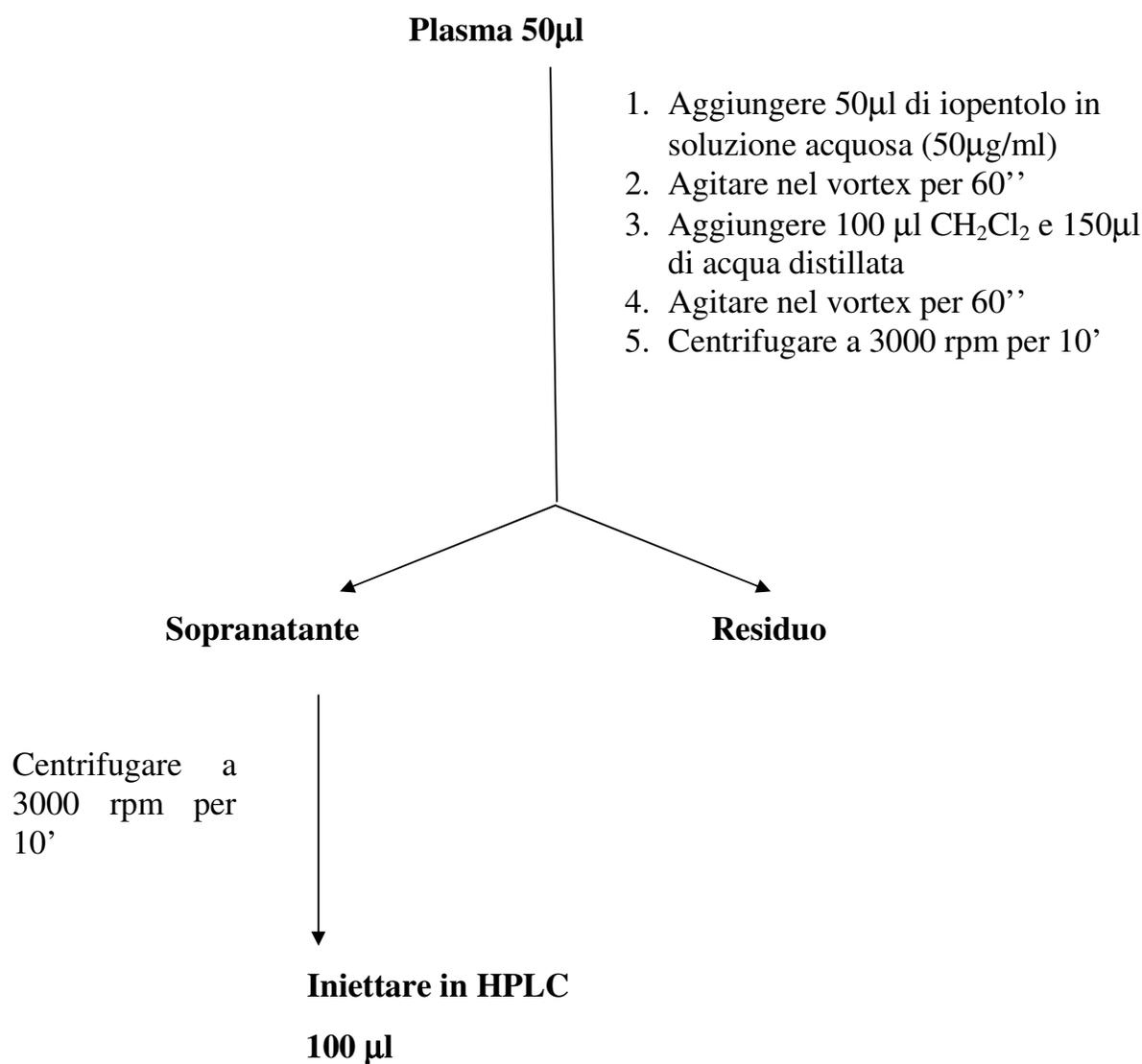
La procedura adottata è stata la seguente: viene posizionata un'agocannula a livello della vena cefalica destra o sinistra. Da questa si preleva, mediante una siringa da 2,5 ml, un campione di sangue (di volume non inferiore a 1 ml) che servirà da basale (t_0). Una volta tolto l'ago, si depone il sangue in una provetta eparinizzata. Si posiziona la siringa contenente lo ioexolo a livello dell'agocannula (Figura 10) e lo si inietta lentamente nell'arco di 60". Considerando il momento dell'iniezione come tempo 0, si effettuano i prelievi di sangue dalla vena cefalica controlaterale rispetto a quella in cui è inserita l'agocannula o, in caso di cani di piccole dimensioni o quando non è facile reperirla, dalla giugulare. Tali prelievi vengono eseguiti ai tempi stabiliti (5' – 15' – 30' – 45' – 60' – 90' – 180' – 240' – 300' – 420' – 24 h). Per i prelievi è preferibile utilizzare siringhe piuttosto che un'agocannula, in quanto questa tende ad ostruirsi rapidamente. Durante gli intervalli tra i campionamenti, il cane può bere e mangiare liberamente. I campioni sono stati posti in provette eparinizzate e centrifugati a 3000 rpm per 10 minuti al fine di separare il plasma. Ciascun campione è stato classificato e conservato alla temperatura di -20°C fino al momento dell'analisi.



Figura 10: inoculazione dello ioexolo attraverso l'agocannula

Preparazione dei campioni

I campioni plasmatici sono stati sottoposti ad estrazione⁸³. In eppendorff pulite sono stati posti 50 µl di plasma e 50 µl di iopentolo in soluzione acquosa (50 µg/ml). Dopo agitazione nel vortex per circa 60'' sono stati estratti con 100 µl di diclorometano (CH₂Cl₂) e 150 µl di acqua distillata. La soluzione è stata sottoposta ad agitazione nel vortex per 60'' e centrifugazione a 3000 rpm per 10 minuti. Il soprannatante è stato sottoposto nuovamente a centrifugazione e iniettato in HPLC.



Analisi farmacocinetica

I campioni, dopo essere stati sottoposti al procedimento di estrazione, sono stati iniettati in HPLC (Figura 11) e i risultati ottenuti sono stati elaborati al computer mediante il programma Easy Fit® per Macintosh (Istituto Mario Negri, Milano, Italia). Per ciascun soggetto sono state analizzate le curve della concentrazione plasmatica in funzione del tempo e calcolati i parametri relativi ad un modello cinetico bicompartimentale aperto⁸⁴. L'analisi farmacocinetica è stata poi ripetuta per ciascun soggetto applicando modelli ridotti di campionamento e analizzando nuovamente le curve della concentrazione plasmatica in funzione del tempo relative ad un modello cinetico bicompartimentale aperto. Sono stati valutati diversi modelli comprendenti la riduzione dei campionamenti da 11 fino a 4 con combinazioni diverse dei prelievi effettuati.



Figura 11: sistema HPLC

Formule predittive per la GFR

È stata valutata l'applicabilità di formule predittive per il calcolo della GFR nel cane⁸⁵. In particolare è stata valutata la correlazione presente tra il valore della GFR ottenuto con il numero completo di prelievi, esprimendo la GFR in ml/min-kg di peso corporeo dell'animale, e il valore fornito dalle seguenti equazioni predittive:

$$\text{Equazione 1: } \text{GFR} = 227 \times (1/\text{Creatinina plasmatica})$$

$$\text{Equazione 2: } \text{GFR} = 246 \times (1/\text{Creatinina plasmatica}) - 0,1$$

Prima di applicare tali formule è necessario convertire i valori di creatinina plasmatica da mg/dl a $\mu\text{mol/l}$, secondo la seguente relazione:

$$C \mu\text{mol/l} = C \text{ mg/dl} \times 10 \times 8,84$$

$$C \mu\text{mol/l} = \text{Creatinina espressa in } \mu\text{mol/l}$$

$$C \text{ mg/dl} = \text{Creatinina espressa in mg/dl}$$

RISULTATI

Analisi dei campioni plasmatici

In seguito all'analisi HPLC dei campioni plasmatici estratti sono stati ottenuti i valori delle aree di ciascun picco, corrette per il recupero dello standard interno (iopentolo), dalle quali sono state calcolate le concentrazioni di ioexolo in µg/ml. Il recupero medio dal plasma per lo ioexolo è risultato di 92±4 %.

Valutazione della GFR

I valori della GFR ottenuti per ogni animale sono riportati nella tabella 18. La GFR è stata calcolata come rapporto tra la clearance (ml min^{-1}) e la superficie corporea, dove la superficie è data da: $S = (4 \cdot (\text{Kg}) + 7) / ((\text{Kg}) + 90)$ espressa in m^2 .

In questa tesi è stato adottato il modello farmacocinetico bicompartimentale aperto, che fornisce una buona stima della GFR in un ampio range di funzionalità renale⁸⁴⁻¹³ con un coefficiente di correlazione $r^2 > 0,99$. Le curve della concentrazione plasmatica in funzione del tempo dello ioexolo sono riportate nelle figure 12-13 e 14. Nella curva della concentrazione plasmatica dello ioexolo in funzione del tempo si può notare come in un cane sano la concentrazione di ioexolo scenda sotto il limite di quantificazione dopo 3 ore dall'iniezione, mentre un cane nefropatico mostra livelli costanti di ioexolo fino a 24 ore dalla somministrazione.

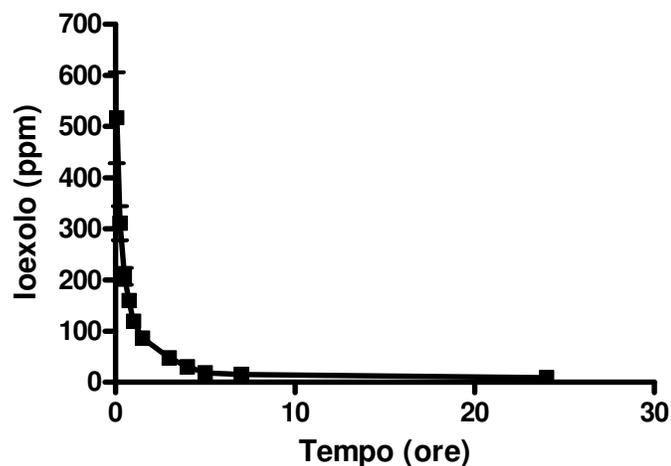


Figura 12: Grafico della concentrazione plasmatica media dello ioexolo in funzione del tempo.

Grafico ioexolo in cane non nefropatico

Il grafico seguente mostra l'andamento nel tempo della concentrazione plasmatica dello ioexolo in un cane non nefropatico.

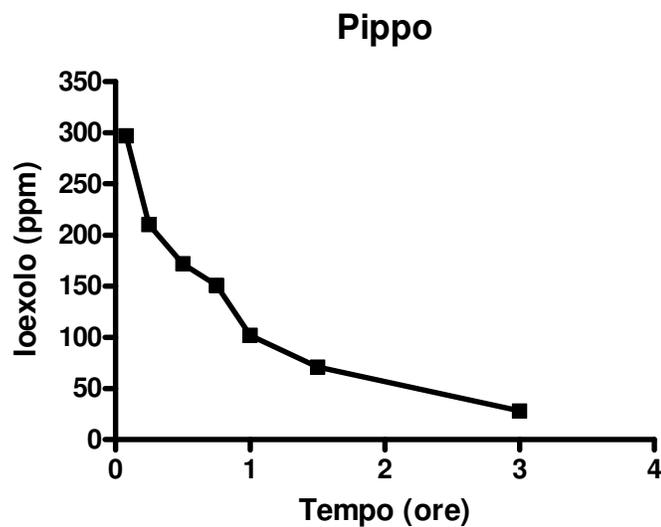


Figura 13: Grafico della concentrazione plasmatica dello ioexolo rispetto al tempo in un cane non nefropatico

Grafico ioexolo in cane nefropatico

Il grafico seguente mostra l'andamento nel tempo della concentrazione plasmatica dello ioexolo in un cane nefropatico.

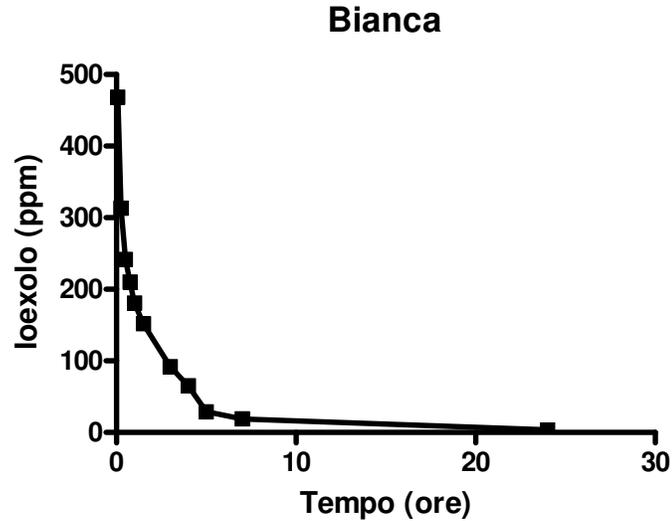


Figura 14: Grafico della concentrazione plasmatica dello ioexolo rispetto al tempo in un cane nefropatico

Tabella 18: Gruppo dei cani sottoposti a valutazione della GFR mediante clearance dello ioexolo

Caso clinico	Razza	Sesso	Peso	Superficie corporea	Creatinina (mg/dl)	GFR (ml/min m ²)	GFR (ml/min kg)
Gano	Meticcio	M	31	1,10	1,70	61,70	2,18
Bianca	Pastore maremmano	F	34	1,15	1,20	36,42	1,23
Lilli	Meticcio	F	17	0,70	0,80	85,22	3,51
Nike	Golden retriever	M	26,5	0,97	0,80	170,90	6,25
Pippo	Meticcio	M	26	0,96	1,00	86,80	3,20
Kitti	Boxer	F	18,5	0,75	2,30	58,02	2,35
Pinturicchio	Meticcio	M	25	0,93	0,90	137,73	5,12

Rogna	Pastore tedesco	F	25	0,93	1,10	127,60	4,74
Olim	Golden retriever	M	28	1,01	0,90	168,60	6,08
Biko	Golden retriever	M	30	1,06	1,10	55,40	1,96
Sergianni	Setter inglese	M	16	0,67	4,52	20,44	0,85
Montesenario	Meticcio	M	37	1,22	0,60	70,30	2,32
Rudy	Levriero afgano	M	30	1,06	1,10	46,60	1,65
Buck	Meticcio	M	28	1,01	0,92	68,51	2,47
Aro	Siberian husky	M	32	1,11	1,10	40,90	1,41
Oscar	Golden retriever	M	37	1,06	1,10	31,10	0,89
Marrone	Pointer	M	24	0,90	_	50,32	1,88
Martelli	Segugio	M	28	1,01	0,82	62,48	2,25
Lampo	Meticcio	M	28	1,01	1,00	67,17	2,42
Neve	Siberian husky	M	32	1,11	1,10	37,92	1,31
Lord	Setter inglese	M	25	0,93	0,70	81,30	3,02
Titti	Meticcio	F	17	0,70	0,80	80,78	3,32
Belene	Bracco	M	25,7	0,95	0,60	82,09	3,03
Pepe	Bracco	M	25	0,95	0,60	14,95	0,56
Tobia	Setter inglese	M	25	0,93	0,70	61,04	2,27
Corto	Meticcio	M	12	0,54	1,20	40,00	2,04
Birra	Epagneul	F	11	0,50	0,80	80,20	3,65

	breton						
Zigo	Meticcio	M	32,5	1,12	1,20	70,20	2,42
Rampello	Pastore tedesco	M	25	0,93	0,90	43,30	1,61
Nera	Meticcio	F	17	0,70	0,80	101,30	4,17
Smilza	Meticcio	F	10	0,47	1,60	57,30	2,69
Piccola	Bracco	F	22	0,85	1,20	68,09	2,63
Dick	Meticcio	M	28	1,01	0,99	55,60	2,00
Gemon	Meticcio	M	34	1,15	1,10	70,30	2,37
Gombi	Meticcio	M	31,5	1,10	1,73	61,70	2,15
Spino	Segugio	M	17	0,70	1,40	65,40	2,69

Il valore della GFR nei soggetti esaminati si è mostrato entro valori normali (75 ± 15 ml/min-m²) in 20 soggetti che presentavano un GFR medio di $89,54 \pm 7,67$ ml/min-m² pari a un valore di $3,61 \pm 0,37$ ml/min-Kg , 15 soggetti presentavano invece un valore di GFR diminuito come valore medio $43,57 \pm 2,98$ ml/min-m² pari a $1,71 \pm 0,15$ ml/min-Kg.

Valutazione della GFR con modelli di campionamento ridotto

Sono state sperimentate combinazioni di prelievi riducendo il numero dei campioni. È stato possibile osservare che riducendo il numero dei prelievi tra undici e sei si ottengono buoni valori di correlazione ma con un numero troppo alto di campioni che riducono la compliance del paziente. Un numero di prelievi inferiore a quattro non consente l'analisi con il programma Easy Fit® per Macintosh. Nella valutazione di combinazioni a cinque prelievi i risultati migliori sono stati raggiunti con i seguenti quattro modelli.

Modello A

Il modello A prevede una riduzione dei campionamenti ematici e si basa su soli cinque prelievi. Vengono mantenuti i campionamenti a 5-15-60-90 e 180 minuti. Lo studio di correlazione tra i valori della GFR ottenuti mediante clearance dello ioexolo con undici prelievi e i valori che sono stati determinati mediante il modello A mostra una correlazione lineare positiva caratterizzata da un valore di coefficiente di Pearson di 0,9173 e un R^2 di 0,8415.

Vengono mantenuti i prelievi a:

- 5'
- 15'
- 60'
- 90'
- 180'

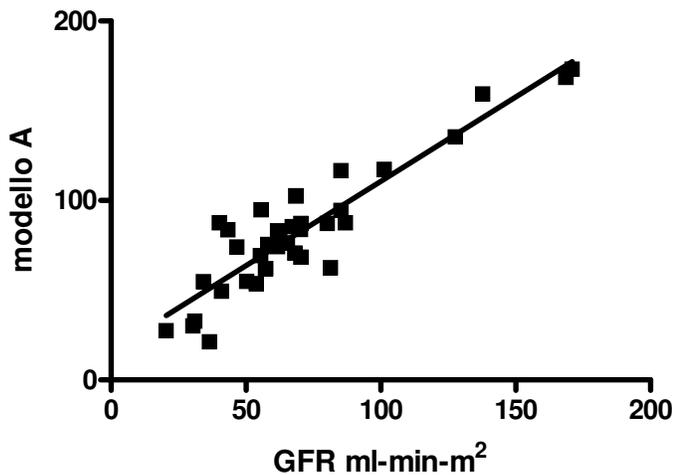


Tabella 19: Risultati dello studio di correlazione tra il modello A e il modello a numero completo di prelievi

Numero di casi	35
Pearson r	0,9173
Intervallo di confidenza	0,8412 to 0,9578
P-value (two-tailed)	P<0,0001
Correlazione significativa	Alpha = 0,05
R ²	0,8415

Modello B

Il modello B prevede una riduzione dei campionamenti ematici e si basa su soli cinque prelievi. Vengono mantenuti i campionamenti a 5-45-60-240 e 300 minuti. Lo studio di correlazione tra i valori della GFR ottenuti mediante clearance dello ioexolo con undici prelievi e i valori che sono stati determinati mediante il modello B mostra una correlazione lineare positiva caratterizzata da un coefficiente di Pearson di 0,8911 e un R² di 0,7940.

Vengono mantenuti i prelievi a :

- 5'**
- 45'**
- 60'**
- 240'**
- 300'**

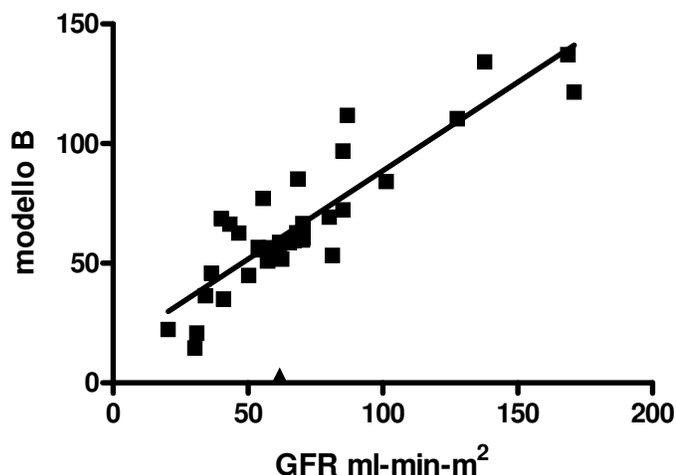


Tabella 20: Risultati dello studio di correlazione tra il modello B e il modello a numero completo di prelievi

Numero di casi	35
Pearson r	0,8911
Intervallo di confidenza	0,7934 to 0,9440
P-value (two-tailed)	P<0,0001
Correlazione significativa	Alpha = 0,05
R ²	0,7940

Modello C

Il modello C prevede una riduzione dei campionamenti ematici e si basa su soli cinque prelievi. Vengono mantenuti i campionamenti a 15-45-90-240 e 420 minuti. Lo studio di correlazione tra i valori della GFR ottenuti mediante clearance dello ioexolo con undici prelievi e i valori che sono stati determinati mediante il modello C mostra una correlazione lineare positiva caratterizzata da un coefficiente di Pearson di 0,9208 e un R² di 0,8480.

Vengono mantenuti i prelievi a:

- 15'
- 45'
- 90'
- 240'
- 420'

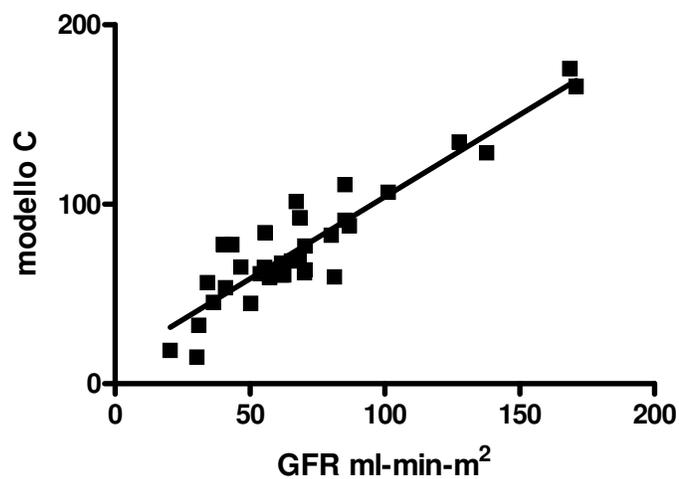


Tabella 21: Risultati dello studio di correlazione tra il modello C e il modello a numero completo di prelievi

Numero di casi	35
Pearson r	0,9208
Intervallo di confidenza	0,8477 to 0,9596
P-value (two-tailed)	P<0,0001
Correlazione significativa	Alpha = 0,05
R ²	0,8480

Modello D

Il modello D prevede una riduzione dei campionamenti ematici e si basa su soli cinque prelievi. Vengono mantenuti i campionamenti a 5-30-60-180 e 300 minuti. Lo studio di correlazione tra i valori della GFR ottenuti mediante clearance dello ioexolo con undici prelievi e i valori che sono stati determinati mediante il modello D mostra una correlazione lineare positiva caratterizzata da un coefficiente di Pearson di 0,9201 e un R^2 di 0,8465.

Vengono mantenuti i prelievi a:

- 5'
- 30'
- 60'
- 180'
- 300'

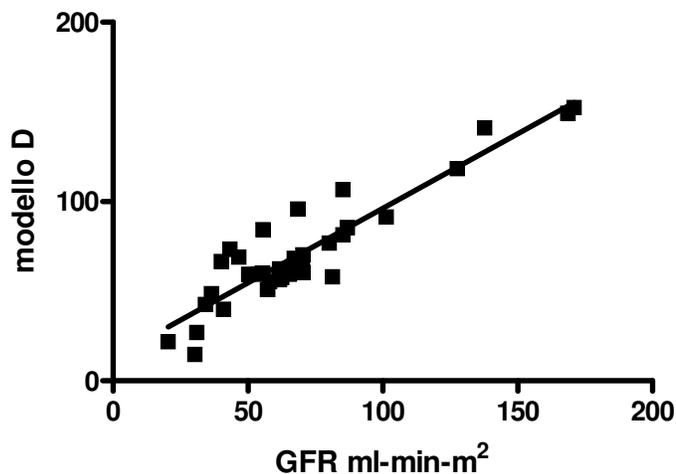


Tabella 22: Risultati dello studio di correlazione tra il modello D e il modello a numero completo di prelievi

Numero di casi	35
Pearson r	0,9201
Intervallo di confidenza	0,8463 to 0,9592
P-value (two-tailed)	P<0,0001
Correlazione significativa	Alpha = 0,05
R ²	0,8465

È stata inoltre valutata la correlazione presente tra il valore di GFR ottenuto con il numero completo di prelievi e il valore fornito dai modelli ridotti, esprimendo la GFR in ml/min-kg di peso corporeo dell'animale.

Modello A

Il modello A prevede una riduzione dei campionamenti ematici e si basa su soli cinque prelievi. Vengono mantenuti i campionamenti a 5-15-60-90 e 180 minuti. Lo studio di correlazione tra i valori della GFR ottenuti mediante clearance dello ioexolo con undici prelievi e i valori che sono stati determinati mediante il modello A mostra una correlazione lineare positiva caratterizzata da un coefficiente di Pearson di 0,9115 e un R² di 0,8308.

Vengono mantenuti i prelievi a:

- 5'
- 15'
- 60'
- 90'
- 180'

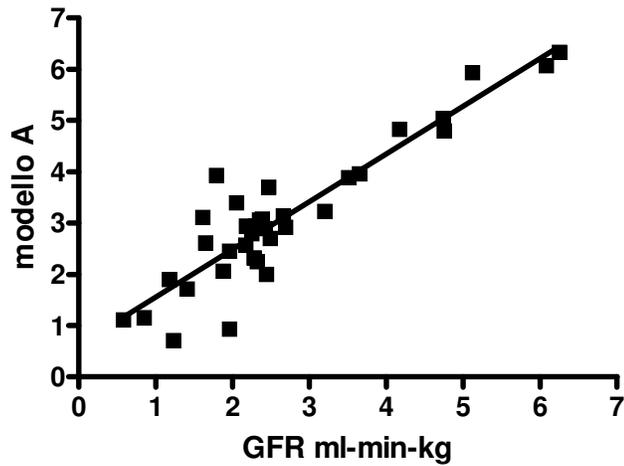


Tabella 23: Risultati dello studio di correlazione tra il modello A e il modello a numero completo di prelievi

Numero di casi	35
Pearson r	0,9115
Intervallo do confidenza	0,8305 to 0,9547
P-value (two-tailed)	P<0,0001
Correlazione significativa	Alpha=0,05
R ²	0,8308

Modello B

Il modello B prevede una riduzione dei campionamenti ematici e si basa su soli cinque prelievi. Vengono mantenuti i campionamenti a 5-45-60-240 e 300 minuti. Lo studio di correlazione tra i valori della GFR ottenuti mediante clearance dello ioexolo con undici prelievi e i valori che sono stati determinati mediante il modello A mostra una correlazione lineare positiva caratterizzata da un coefficiente di Pearson di 0,8958 e un R^2 di 0,8024.

Vengono mantenuti i prelievi a:

- 5'
- 45'
- 60'
- 240'
- 300'

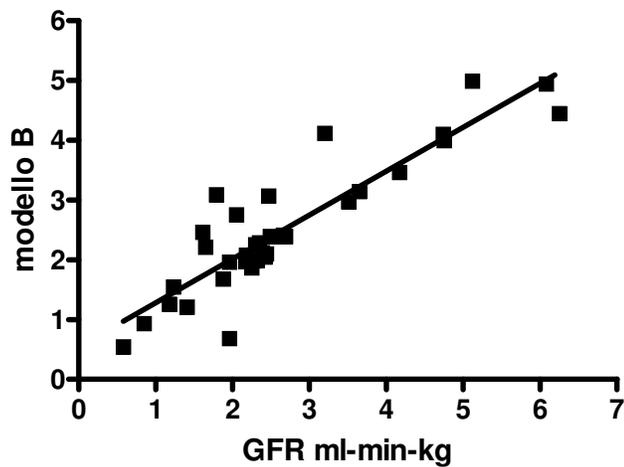


Tabella 24: Risultati dello studio di correlazione tra il modello B e il modello a numero completo di prelievi

Numero di casi	35
Pearson r	0,8958
Intervallo di confidenza	0,8019 to 0,9465
P-value (two-tailed)	P<0,0001
Correlazione significativa	Alpha=0,05
R ²	0,8024

Modello C

Il modello C prevede una riduzione dei campionamenti ematici e si basa su soli cinque prelievi. Vengono mantenuti i campionamenti a 15-45-90-240 e 420 minuti. Lo studio di correlazione tra i valori della GFR ottenuti mediante clearance dello ioexolo con undici prelievi e i valori che sono stati determinati mediante il modello A mostra una correlazione lineare positiva caratterizzata da un coefficiente di Pearson di 0,9296 e un R² di 0,8641.

Vengono mantenuti i prelievi a:

- 15'**
- 45'**
- 90'**
- 240'**
- 420'**

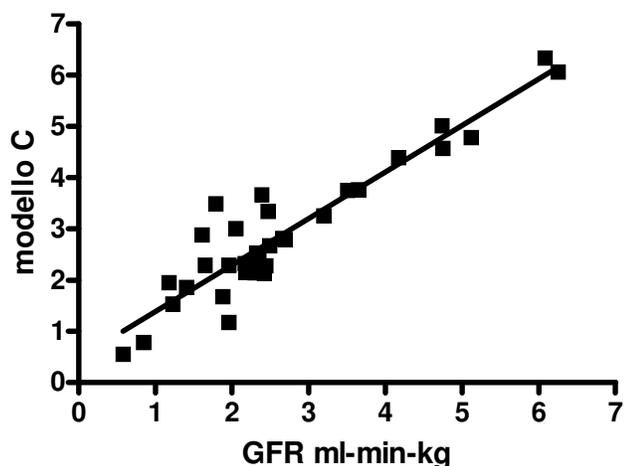


Tabella 25: Risultati dello studio di correlazione tra il modello C e il modello a numero completo di prelievi

Numero di casi	35
Pearson r	0,9296
Intervallo di confidenza	0,8639 to 0,9642
P-value (two-tailed)	P<0,0001
Correlazione significativa	Alpha=0,05
R ²	0,8641

Modello D

Il modello D prevede una riduzione dei campionamenti ematici e si basa su soli cinque prelievi. Vengono mantenuti i campionamenti a 5-30-60-180e 300 minuti. Lo studio di correlazione tra i valori della GFR ottenuti mediante clearance dello ioexolo con undici prelievi e i valori che sono stati determinati

mediante il modello A mostra una correlazione lineare positiva caratterizzata da un coefficiente di Pearson di 0,9040 e un R^2 di 0,8172.

Vengono mantenuti i prelievi a:

- 5'
- 30'
- 60'
- 180'
- 300'

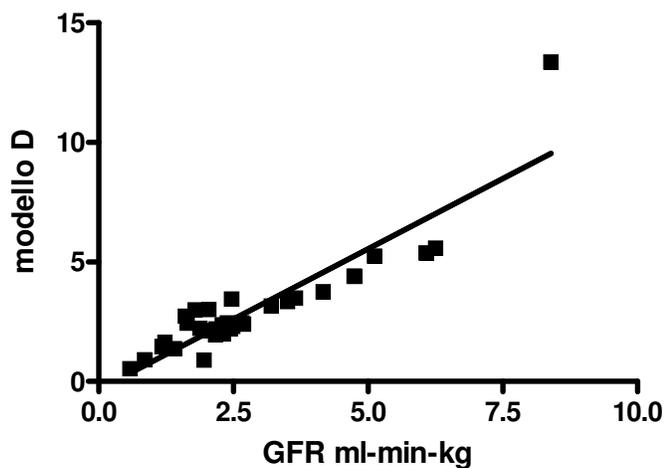


Tabella 26: Risultati dello studio di correlazione tra il modello D e il modello a numero completo di prelievi

Numero di casi	35
Pearson r	0,9040
Intervallo di confidenza	0,8185 to 0,9503
P-value (two-tailed)	P<0,0001
Correlazione significativa	Alpha=0,05
R^2	0,8172

Stima della GFR mediante formule predittive (Crockroft – Gault)

Lo studio di correlazione, che è stato eseguito tra i valori della GFR ottenuti mediante la formula predittiva A ($GFR = 227 \times 1/\text{creatinina plasmatica}$) e i valori derivanti dalla clearance dello ioexolo con numero completo di prelievi, non ha mostrato una correlazione significativa. Tale studio ha presentato un valore di coefficiente di Pearson di 0,2593 e di R^2 pari a 0,06726.

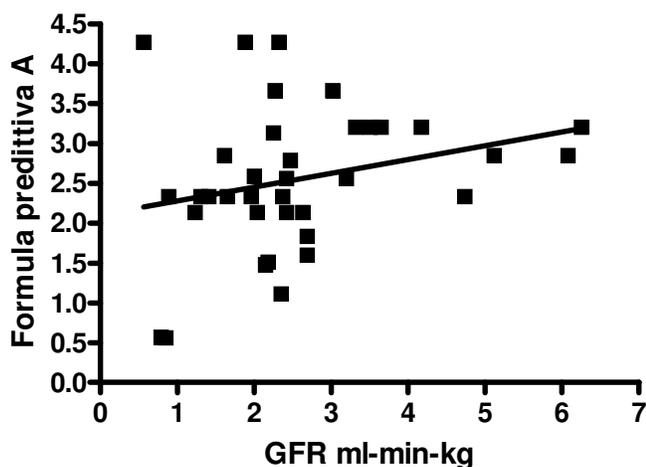


Tabella 27: Risultati dello studio di correlazione tra la formula A e la GFR ottenuta mediante clearance dello ioexolo a numero completo di prelievi

Numero di casi	35
Pearson r	0,2593
Intervallo di confidenza	-0,07572 to 0,5418
P - value (two-tailed)	0,1267
Correlazione significativa	(alpha = 0,05) No
R^2	0,06726

Lo studio di correlazione, che è stato eseguito tra i valori della GFR ottenuti mediante la formula predittiva B [$GFR = (246 \times 1/\text{creatinina plasmatica}) - 0,1$] e i valori derivanti dalla clearance dello ioexolo con numero completo di prelievi, non ha mostrato una correlazione significativa. Tale studio ha presentato un valore di coefficiente di Pearson di 0,2598 e di R^2 pari a 0,06751.

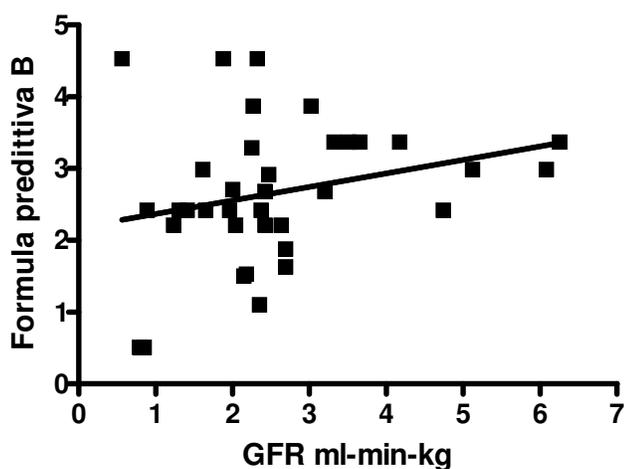


Tabella 28: Risultati dello studio di correlazione tra la formula B e la GFR ottenuta mediante clearance dello ioexolo a numero completo di prelievi

Numero di casi	35
Pearson r	0,2598
Intervallo di confidenza	-0,07522 to 0,5421
P – value (two-tailed)	0,1259
Correlazione significativa	(alpha = 0,05) No
R^2	0,06751

Lo studio di correlazione tra i valori della GFR ottenuti mediante clearance dello ioexolo a numero completo di prelievi e i valori del reciproco della

creatinina plasmatica di ogni soggetto non ha evidenziato alcuna correlazione. Tale studio ha mostrato un valore di coefficiente di Pearson di 0,2466 e un R^2 pari a 0,06083.

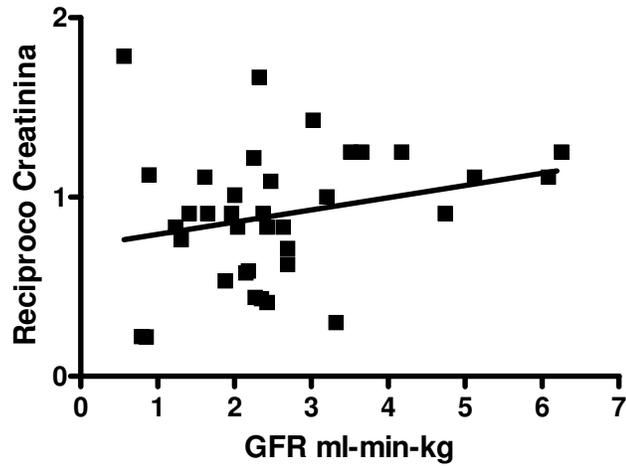


Tabella 29: Risultati dello studio di correlazione tra il reciproco della creatinina e la GFR ottenuta mediante clearance dello ioexolo a numero completo di prelievi

Numero di casi	35
Pearson r	0,2466
Intervallo di confidenza	-0,08921 to 0,5321
P – value (two-tailed)	0,1470
Correlazione significativa	(alpha = 0,05) No
R^2	0,06083

DISCUSSIONE

La GFR è ritenuta essere uno dei più precoci e sensibili indicatori di disfunzione renale⁸⁶ e, poiché direttamente correlata alla massa renale funzionante⁹, viene considerata il gold standard test per la valutazione quantitativa della funzionalità renale.

Essendo i reni del cane costituiti da migliaia di nefroni che lavorano in parallelo, la perdita di una certa quota di essi può verificarsi senza che si abbia alcuna evidenza di alterazione della funzionalità di tali organi. Basti pensare che è necessaria la distruzione di circa il 50% dei nefroni prima di poter riscontrare una diminuzione della capacità dei reni di concentrare l'urina e la perdita del 70% dei nefroni prima che compaiano i sintomi di un'insufficienza renale⁹. Le metodiche di valutazione della GFR, che sfruttano lo studio della clearance urinaria, risultano poco praticabili nella routine diagnostica ambulatoriale in quanto necessitano di un'accurata raccolta delle urine prodotte. Ciò comporta l'utilizzo di gabbie metaboliche e una durata dell'esame che può arrivare alle 24 ore, con una conseguente ridotta compliance dell'animale e scarsa praticità per il proprietario. Lo studio della clearance urinaria di una sostanza nelle 24 ore necessita di una particolare accuratezza nella raccolta delle urine dalla gabbia metabolica. È stato infatti valutato che un prelievo poco accurato delle urine dal fondo della gabbia possa determinare una sottostima della GFR del 45%. Non è da sottovalutare, poi, il ruolo che i cateteri urinari possono avere nell'insorgenza di infezioni delle vie urinarie⁴. Negli studi di clearance effettuati per periodi superiori alle dieci ore esiste un potenziale problema di disidratazione. Infatti, pur fornendo fluidi all'animale durante la somministrazione dell'analita e lasciando la possibilità di abbeverarsi ad libitum, non sono disponibili dati

riguardanti il volume di acqua assunto e il volume di urine emesso, la quota di fluidi persa con la respirazione e per via cutanea. Quindi non possiamo escludere il rischio di alterazione dell'equilibrio idrico durante il test¹⁰.

Le metodiche che identificano la GFR a partire dal decadimento plasmatico dell'analita inoculato presentano lo svantaggio di richiedere un numero elevato di prelievi ematici e la possibilità di errore nel calcolo dell'area sotto la curva concentrazione/tempo (AUC)⁸. Da qui la necessità di studi sulla distribuzione corporea delle sostanze utilizzate e sul migliore modello farmacocinetico da utilizzare⁸⁶.

Non è da trascurare la scarsa disponibilità in commercio di alcune sostanze, come l'inulina, utilizzate per lo studio della clearance plasmatica, che può rendere scarsamente applicabile la metodica.

I metodi di determinazione della GFR mediante l'utilizzo di composti radioattivi, come il Tc 99m pentate, non necessitano di campionamenti di urina, ma di strumentazioni complesse, particolari autorizzazioni e 24 ore di isolamento per il paziente.

La valutazione della GFR mediante metodo scintigrafico offre il grande vantaggio di poter valutare la funzionalità renale complessiva ed individuale e di non richiedere campioni ematici o urinari. Basandosi, però, tale test sull'utilizzo di un composto radioattivo, si rende necessaria la disponibilità di una particolare strumentazione ed un isolamento del cane nelle 24 ore che seguono l'inoculazione dell'analita⁸.

La metodica utilizzata in questo studio si basa sulla valutazione del decadimento plasmatico della concentrazione dello ioexolo inoculato in unico bolo, mediante l'esecuzione di 11 campionamenti ematici. La determinazione della concentrazione dello ioexolo nel plasma viene effettuata tramite un sistema HPLC e risulta più facilmente eseguibile e meglio tollerata dall'animale rispetto all'infusione continua⁸⁷. Il valore della GFR ottenuto con questo metodo viene espresso in $\text{ml}/\text{min}\cdot\text{m}^2$ in modo da ottenere, data la

grande variabilità di taglia dei pazienti, una valutazione più accurata. Infatti, per cani di piccola taglia, avendo essi una maggiore superficie corporea, si può andar incontro ad una sovrastima della GFR quando la si esprime in ml/min-kg¹⁴⁻⁸⁸. Questa metodica richiede ben 11 prelievi ematici, di cui l'ultimo a 24 ore dall'inoculazione dello ioexolo e ciò riduce notevolmente la compliance dell'animale e del proprietario. Da qui la necessità di mettere a punto un protocollo che, pur riducendo il numero dei prelievi, mantenesse una buona correlazione con il valore della GFR (GFR reale) ottenuto applicando la metodica a numero completo di prelievi. È stato possibile osservare che riducendo il numero dei prelievi tra undici e sei si ottengono buoni valori di correlazione ma con un numero troppo alto di campioni che ha effetti negativi sulla compliance del paziente. Un numero di prelievi inferiore a quattro non consente l'analisi con il software utilizzato. I risultati migliori sono stati ottenuti con quattro protocolli a cinque prelievi. Per ciascuno di tali modelli (A, B, C, D) è stata valutata la correlazione esistente con il valore della GFR reale. Tutti i protocolli hanno mostrato una correlazione positiva lineare con il valore della GFR reale, e il modello C, che presenta prelievi a 15' - 45' - 90' - 240' - 420', mostra i migliori valori di R² e coefficiente di Pearson. Tuttavia il modello A, in cui sono stati mantenuti i prelievi a 5' - 15' - 60' - 90' - 180' risulta essere il migliore se consideriamo congiuntamente il grado di correlazione che esso mostra con il valore della GFR reale e il vantaggio in termini di tempo per il cane e il proprietario. Questo nuovo protocollo permette infatti di eseguire un esame di clearance plasmatica dello ioexolo in sole tre ore e consente di dimezzare il numero dei prelievi.

I cani sottoposti a valutazione della GFR sono stati anche oggetto dell'applicazione di formule predittive della velocità di filtrazione glomerulare⁸⁵. Mentre lo studio della clearance dello ioexolo fornisce un valore vero della GFR, applicando particolari formule predittive è possibile ottenere una stima della velocità di filtrazione glomerulare. In medicina

umana sono disponibili delle formule (Crockroft – Gault) che, basandosi sul peso corporeo, sul sesso, età e valore di creatinina plasmatica, sono in grado di fornire una stima della GFR. È stato comunque dimostrato che tali formule rivelino poche più informazioni rispetto a quanto fatto dal reciproco della creatinina⁹⁻⁸⁹. Nel cane, pur non essendo raccomandabile derivare la GFR a partire dalla creatinina plasmatica a causa della scarsa precisione di tale analita⁸⁵, sono state messe a punto due formule, che sono state applicate a tutti i cani in studio (35 soggetti). Effettuando uno studio di correlazione tra le singole formule e i valori della GFR reale è stato riscontrato che non esiste una correlazione lineare positiva. Lo studio di correlazione effettuato tra i valori della GFR stimati dalle formule A e B e i valori della GFR reale fornisce risultati molto simili allo studio di correlazione tra reciproco della creatinina plasmatica e GFR reale.

In conclusione si può affermare che le formule predittive attualmente utilizzate nel cane per la stima della GFR non sono in grado di fornire al medico veterinario più informazioni sullo stato e la progressione della patologia renale rispetto alla creatinina plasmatica. Determinare la GFR rimane, quindi, l'unico strumento a disposizione per poter effettuare una diagnosi precoce e per una valutazione quantitativa del danno renale. A questo scopo, la valutazione della GFR mediante clearance plasmatica dello ioexolo a numero ridotto di campionamenti appare un metodo valido e facilmente applicabile. Lo ioexolo possiede tutte le caratteristiche per essere considerato marker ideale per l'identificazione della velocità di filtrazione glomerulare e, al dosaggio utilizzato in questo studio, può essere usato in sicurezza anche in pazienti nefropatici. Considerato l'alto grado di correlazione che il modello A presenta con la GFR reale, e la possibilità di eseguire l'esame in sole tre ore, tale protocollo sembra possedere i requisiti per divenire un ausilio importante nella diagnostica ambulatoriale precoce delle malattie renali del cane. Rimane da investigare per lo ioexolo

l'eventuale applicabilità di un vero e proprio test di escrezione plasmatica dell'analita, che richiedendo un solo prelievo di sangue, comporterebbe notevoli vantaggi per il cane e per il proprietario. Non è, infine, da escludere la possibilità di individuare e applicare in futuro un metodo di valutazione della GFR mediante clearance plasmatica dello ioexolo a numero ridotto di prelievi anche nel gatto. Ciò provocherebbe effetti positivi sulla compliance del paziente e potrebbe permettere di attuare l'esame senza la necessità dell'anestesia.

Bibliografia

¹M.G. Clement, 2002, *Il rene*. In: FISILOGIA DEGLI ANIMALI DOMESTICI CON ELEMENTI DI ETOLOGIA, (seconda edizione), 595-600, G. Aguggini, V. Beghelli, M.G. Clement, A. d'Angelo, A. Debenedetti, C. Facello, L.F. Giulio, R. Guglielmino, A. Lucaroni, G. Maffeo, A. Marongiu, S. Naitana, P. Nuvoli, R. Piazza (Eds); UTET, Torino, Italia

²G. Delfino, E. Panciotti, G. Liguri, M. Stefani, 2003, IL NUOVO MEDICINA E BIOLOGIA - DIZIONARIO ENCICLOPEDICO DI SCIENZE MEDICHE E BIOLOGICHE E DI BIOTECNOLOGIE, (seconda edizione); Zanichelli, Bologna, Italia

³A. Gleadhill, 1994, Evaluation of screening tests for renal insufficiency in the dog, *J. Small Anim Pract* 35, 391-396

⁴A.D.J. Watson, H.P. Lefebvre, D. Concordet, V. Laroute, J.P. Ferrè, J.P. Braun, F. Conchou, P.L. Toutain, 2002, Plasma exogenous creatinine clearance test in dogs: comparison with other methods and proposed limited sampling strategy, *J Vet Intern Med* 16, 22-33

⁵D.R. Finco, 1999, *Valutazione della funzionalità renale*. In: NEFROLOGIA E UROLOGIA DEL CANE E DEL GATTO, 219-232, C.A. Osborne and D.R. Finco (Eds); UTET, Torino, Italia

⁶A.D.J. Watson, 1998, Urine specific gravity in practice, *Aust Vet J* 76, 392-398

⁷L. Moe and R. Heiene, 1995, Estimation of glomerular filtration rate in dogs with 99m-Tc-DTPA and iohexol, *Res Vet Sci* 58, 138-143

⁸M.E. Kerl and C.R. Cook, 2005, Glomerular filtration rate and renal scintigraphy, *Clin Tech Small Animal Pract* 20, 31-38

- ⁹J.P. Braun and H.P. Lefebvre, 2005, Early detection of Renal disease in the canine patient, *EJCAP* 15, 59-65
- ¹⁰D.R. Finco, 2005, Measurement of glomerular filtration rate via urinary clearance of inulin and plasma clearance of technetium Tc 99m pentate and exogenous creatinine in dogs, *Am J Vet Res* 66, 1046-1055
- ¹¹J.E. Riviere and S.L. Vaden, 1999, *Terapia farmacologia in corso di patologie renali e di insufficienza renale*. In: *NEFROLOGIA E UROLOGIA DEL CANE E DEL GATTO*, 577-593, C.A. Osborne and D.R. Finco (Eds); UTET, Torino, Italia
- ¹²S.A. Brown, D.R. Finco, D. Boudinot, J. Wright, S.L. Tarver, T. Cooper, 1996, Evaluation of a single injection method, using iohexol, for estimating glomerular filtration rate in cats and dogs, *Am J Vet Res* 57, 105-110
- ¹³L. Pucci, S. Bandinelli, M. Pilo, M. Nannipieri, R. Navalesi, G. Penno, 2001, Iohexol as a marker of glomerular filtration rate in patients with diabetes: comparison of multiple and simplified sampling protocols, *Diabet Med* 18, 116-120
- ¹⁴M. Haller, W. Muller, H. Binder, W. Estelberger, P. Arnold, 1998, Single-injection inulin clearance – a simple method for measuring glomerular filtration rate in dogs, *Res Vet Sci* 64, 151-156
- ¹⁵J.P. Braun, H.P. Lefebvre, A.D.J. Watson, 2003, Creatinine in the dog: a review, *Vet Clin Pathol* 32, 162-179
- ¹⁶J.M.B. O'Connell, J.A. Romeo, G.H. Mudge, 1962, Renal tubular secretion of creatinine in the dog, *Am J Physiol* 203, 985-990
- ¹⁷R.E. Swanson and A.A. Hakim, 1962, Stop-flow analysis of creatinine excretion in the dog, *Am J Physiol* 203, 980-984
- ¹⁸M.A. Labato and L.A. Ross, 1991, Plasma disappearance of creatinine as a renal function test in the dog, *Res Vet Sci* 50, 253-258

- ¹⁹S. Reder and H. Hartmann, 1994, Diagnostische and pathophysiologische aspekte dier nierenfunktionsbestimmung bei Tieren, J Vet Med A 41, 253-267
- ²⁰J. Greenberg, I.L. Schwartz, M. Spinner, L. Silver, N. Starr, 1952, Apparent volumes of distribution of p-aminohippurate and creatinine in the dog, Am J Physiol 168, 86-92
- ²¹T. Matsuzawa, M. Nomura, T. Unno, 1993, Clinical pathology reference ranges of laboratory animals, J Vet Med Sci 55, 351-362
- ²²R.H. Teske, S.P. Bishop, H.F. Righter, D.K. Detweiler, 1976, Subacute digoxin toxicosis in the Beagle dog, Toxicol Appl Pharmacol 35, 283-301
- ²³S. Kuhl, R. Mischke, C. Lund, A.R. Gunzel-Apel, 2000, Referenzwerte klinisch-chemischer blutparameter bei hundewelpen in den ersten acht lebenswochen, Dtsch Tierarztl Wschr 107, 438-443
- ²⁴S.T. Wolford, 1988, Effect of age on serum chemistry profile, electrophoresis and thyroid hormones in Beagle dogs two weeks to one year of age, Vet Clin Pathol 17, 35-42
- ²⁵V. Broulet, P. Fayolle, J.P. Braun, J.P. Thouvenot, A.G. Rico, 1986, Influence du sexe et de l'age sur les valeurs usuelles de l'hematologie et de la biochimie serique de chiens tout venant, Prat Med Chir Anim Comp 21, 221-225
- ²⁶W. Kraft, K. Hartman, R. Dereser, 1996, Altersabhängigkeit von laborwerten bei hund un katze. Teil III. Bilirubin, kreatinin und protein im Blutserum, Tierarztl Prax 24, 610-615
- ²⁷A. Strasser, M. Seiser, M. Simunek, V. Heizmann, H. Niedermuller, 1997, Physiologische altersveränderungen beim hund (longitudinalstudie in einer Beagle-Kolonie), Wien Tierarztl Mschr 84, 189-198
- ²⁸S. Fukunda, N. Kawashima, H. Iida, J. Aoki, K. Tokita, 1989, Age dependency of hematological values and concentrantions of serum

biochemical constituents in normal Beagles from 1 to 14 years of age, *Jpn J Vet Sci* 51, 636-641

²⁹L.A. Lowseth, N.A. Gillett, R.F. Gerlach, B.A. Muggenburg, 1990, The effects of aging on hematology and serum chemistry values in the beagle dog, *Vet Clin Pathol* 19, 13-19

³⁰S.A. Center, E. Wilkinson, C.A. Smith, R.M. Lewis, 1985, 24-hour urine protein/creatinine ratio in dogs with protein-losing nephropathies, *Am J Vet Med Assoc* 187, 820-824

³¹A. Perxachs, 2000, Cistatine C plasmatique chez le chien. Etude préliminaire. Université Paul Sabatier, Toulouse, France

³²W.E. van der Brom and W.J. Bienwega, 1981, Assessment of glomerular filtration rate in normal dogs: Analysis of the Cr-EDTA clearance and its relation to several endogenous parameters of glomerular filtration rate, *Res Vet Sci* 30, 152-157

³³G. Kuhn and W. Hardegg, 1988, Effects of indoor and outdoor maintenance of dogs upon food intake, body weight and different blood parameters, *Z Versuchstierkd* 31, 205-214

³⁴G.H. Rautenbach and H.F. Joubert, 1988, A comparison of health parameters in two different canine populations. Part II: Chemical pathology data, *J S Afr Vet Assoc* 59, 135-138

³⁵A. Strasser, M. Seiser, V. Heizmann, H. Niedermuller, 2001, Einfluss des jahreszeit auf hamatologische und klinische parameter in einer Beagleskohorte, *Kleintier-Praxis* 46, 798-804

³⁶U.Singer and H. Kraft, 1989, Biologiscghe rhythmien beim hund, *Kleintierpraxis* 36, 167-174

³⁷M.E. Epstein, J.A. Barsanti, D.R. Finco, I.M. Cowgill, 1984, Postprandial changes in plasma urea nitrogen and plasma creatinine concentrations in dogs fed commercial diets, *J Am Anim Hosp Assoc* 20, 779-782

- ³⁸R.B. Sothern, 1993, Circannual variations in baseline values in dogs, *Chrobiol Int* 10, 364-382
- ³⁹P.B. English, L.J. Filippich, H.L. Thompson, 1980, Clinical assessment of renal function in the dog with a reduction in nephron number, *Aust Vet J* 56, 305-312
- ⁴⁰R.M. Hardy and C.A. Osborne, 1979, Water deprivation test in the dog: maximal normal values, *J Am Vet Assoc* 174, 479-483
- ⁴¹K.W. Hinchcliff, J. Olson, C. Crusberg, 1993, Serum biochemical changes in dogs competing in a long-distance sled race, *J Am Vet Med Assoc* 202, 401-405
- ⁴²A. Qerengaesser, C. Iben, J. Leibetseder, 1994, Blood changes during training and racing in sled dogs, *J Nutr* 124, 2760S-2764S
- ⁴³A.J. Reynolds, G.A. Reinhart, D.P. Carey, D.A. Simmerman, D.A. Frank, F.A. Kallfelz, 1999, Effect of protein intake during training on biochemical and performance variables in sled dogs, *Am J Vet Res* 60, 789-795
- ⁴⁴D.S. Kronfeld, E.P. Hammel, C.F. Ramberg, H.L. Dunlap, 1977, Hematological and metabolic responses to training in racing sled dogs fed diets containing medium, low or zero carbohydrate, *Am J Clin Nutr* 30, 419-430
- ⁴⁵E.P. Hammel, D.S. Kronfeld, V.K. Ganjam, H.L. Dunlap, 1977, Metabolic responses to exhaustive exercise in racing sled dogs fed diets containing medium, low or zero carbohydrate, *Am J Clin Nutr* 30, 409-418
- ⁴⁶R.J. Rose and M.S. Bloomberg, 1989, Response to sprint exercise in the Greyhound: effects on hematology, serum biochemistry and muscle metabolites, *Res Vet Sci* 47, 212-218
- ⁴⁷D.H. Snow, R.C. Harris, E. Stuttard, 1988, Changes in hematology and plasma biochemistry during maximal exercise in Greyhounds, *Vet Rec* 123, 487-489

- ⁴⁸A.L. Jensen, A. Wenk, J. Koch, 1974, Comparison of results of hematological and clinical chemical analyses of blood samples obtained from the cephalic and external jugular vein in dogs, *Res Vet Sci* 56, 24-29
- ⁴⁹R.M. Jacobs, J.H. Lumsden, E. Grift, 1992, Effects of bilirubinemia, hemolysis and lipemia on clinical chemistry analytes in bovine, canine, equine and feline sera, *Can J Vet* 33, 605-608
- ⁵⁰R.M. Jacobs, J.H. Lumsden, J.A. Taylor, E. Grift, 1991, Effects of interferences on the kinetic Jaffé reaction and an enzymatic colorimetric test for serum creatinine concentration determination in cats, cows, dogs and horses, *Can J Vet Res* 55, 150-154
- ⁵¹P. Balint and M. Visy, 1965, "True creatinine" and "pseudocreatinine" in blood plasma of the dog, *Acta Physiol Hung* 28, 265-272
- ⁵²D.R. Finco, H. Tabaru, S.A. Brown, J.A. Barsanti, 1993, Endogenous creatinine clearance measurement of glomerular filtration rate in dogs, *Am J Vet Res* 53, 1575-1578
- ⁵³B.G. Blijenberg, H.J. Brouwer, T.J. Kuller, R. Leeneman, C.J.M. Leeuwen, 1994, Improvements in creatinine methodology: a critical assessment, *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 32, 529-537
- ⁵⁴B.G. Blijenberg, R.J. Brouwer, H. Baadenhuiksen, G.J.M. Boerma, 1995, Creatinine and surveys: an assessment, *Eur J Clin Biochem* 33, 855-858
- ⁵⁵D.R. Finco, S.A. Brown, W.A. Crowell, J.A. Barsanti, 1991, Exogenous creatinine clearance as a measure of glomerular filtration rate in dogs with reduced renal mass, *Am J Vet Res* 52, 1029-1032
- ⁵⁶D.R. Finco, E. Braselton, T.A. Cooper, 2001, Relationship between plasma iothexol clearance and urinary exogenous creatinine clearance in dogs, *J Vet Inter Med* 15, 368-373
- ⁵⁷S.A. Brown, 1994, Evaluation of a single-injection method for estimating glomerular filtration rate in dogs with reduced renal function, *Am J Vet Res* 55, 1470-1473

- ⁵⁸W. Estelberger, W. Petek, S. Zitta, A. Mauric, S. Horn, H. Holzer, H. Pogglitsch, 1995, Determination of the glomerular filtration rate by identification of sinistrin kinetics, *Eur J Clin Chem Clin biochem* 33, 201-209
- ⁵⁹F. Gaspari, N. Perico, M. Matalone, 1998, Precision of plasma clearance of iohexol for estimation of GFR in patients with renal disease, *J Am Soc Nephrol* 9, 310-313
- ⁶⁰B. Frennby, 1997, Use of iohexol to determine glomerular filtration rate. A comparison between different clearance techniques in man and animals, *Scand J Urol Nephrol S-182*, 1-61
- ⁶¹C. Tornquist, T. Almen, K. Golman, S. Holtas, 1985, Renal function following nephroangiography with metrizamide and iohexol. Effects on renal blood flow, glomerular permeability and filtration rate and diuresis in dogs, *Acta Rad Diag* 26, 483-489
- ⁶²W.E. Braselton, 1997, Measurement of serum iohexol by determination of iodine with inductively coupled plasmatomic emission spectroscopy, *Clin Chem* 43, 1429-1435
- ⁶³P.Y. Barthez, D.J. Chew, S.P. Di Bartola, 2000, Effect of sample number and time on determination of plasma clearance of technetium Tc 99m pentate and orthoiodo hippurate sodium I 131 in dogs and cats, *Am J Vet Res* 61, 280-285
- ⁶⁴P.Y. Barthez, D.J. Chew, S.P. Di Bartola, 2001, Simplified methods for estimation of 99m Tc-pentate and 131I-orthoiodohippurate plasma clearance in dogs and cats, *J Vet Intern Med* 15, 200-208
- ⁶⁵A.R. Twardock, D.R. Krawiec, R.J. Itkin, 1996, *Renal imaging I and II: Functional renal scintigraphy*. In: HANDBOOK OF VETERINARY NUCLEAR MEDICINE, 122-133, C.R. Berry, G.B. Daniel (Eds); Raleigh, NC, North Carolina State University, USA
- ⁶⁶D.R. Krawiec, R.R. Badertscher, A.R. Twardock, 1986, Evaluation of technetium 99m-diethylenetriaminepentaacetic-acid nuclear imaging for

quantitative determination of the glomerular filtration rate of dogs, *Am J Vet Res* 47, 2175-2179

⁶⁷K. Miyamoto, 2001, Use of plasma clearance of iohexol for estimating glomerular filtration rate in cats, *Am J Vet Res*:62, 572-575

⁶⁸D.R. Finco, 1995, *Evaluation of renal function*. In: *CANINE AND FELINE NEPHROLOGY AND UROLOGY*, 216-229, C.A. Osborne and D.R. Finco (Eds); The Williams & Wilkins Co, Baltimore, Maryland, USA

⁶⁹D.R. Finco and J.R. Duncan, 1976, Evaluation of blood urea nitrogen and serum creatinine as indicators of renal dysfunction: a study of 111 cases and a review of related literature, *J Am Vet Med Assoc* 168, 593-601

⁷⁰D.R. Finco and J.A. Barsanti, 1982, Mechanism of urinary excretion of creatinine by the cat, *Am J Vet Res* 43, 2207-2209

⁷¹E. Deguchi and M. Akuzawa, 1997, Renal clearance of endogenous creatinine, urea, sodium and potassium in normal cats and cats with chronic renal failure, *J Vet Med Sci* 59, 509-512

⁷²K Miyamoto, 2001, Evaluation of plasma clearance of inulin in clinically normal and partially nephrectomized cats, *Am J Vet Res* 62, 1332-1335

⁷³K.S. Rogers, A. Komkov, S.A. Brown, G.E. Lees, D. Hightower, E.A. Russo, 1991, Comparison of four methods of estimating glomerular filtration rate in cats, *Am J Vet Res* 52, 961-964

⁷⁴M. Haller, K. Rohner, W. Muller, F. Reutter, H. Binder, W. Estelberger, P. Arnold, 2003, Single-injection inulin clearance for routine measurement of glomerular filtration rate in cats, *J Fel Med Surg* 5, 175-181

⁷⁵S.A. Brown, C. Haberman, D.R. Finco, 1996, Use of plasma clearance of inulin for estimating glomerular filtration rate in cats, *Am J Vet Res* 57, 1702-1705

⁷⁶S.E. Back, P. Masson, P. Nilsson-Ehle, 1988, A simple chemical method for the quantification of the contrast agent iohexol, applicable to glomerular filtration rate measurements, *Scand J Clin Lab Invest* 48, 825-829

- ⁷⁷F. Gaspari, N. Perico, G. Remuzzi, 1998, Application of newer clearance techniques for the determination of glomerular filtration rate, *Curr Opin Nephrol Hypert* 7, 675-680
- ⁷⁸F. Gaspari, N. Perico, P. Ruggenti, L. Mosconi, C.S. Amuchastegui, E.Guerini, E.Daina e G.Remuzzi, 1995, Plasma clearance of nonradioactive iohexol as a measure of glomerular filtration rate, *J Am Soc Nephrol* 6: 257-263
- ⁷⁹Z.K. Shibabi and M.S. Constantinescu, 1992, Iohexol in serum determined by capillary electrophoresis, *Clin Chem* 38, 2117-2120
- ⁸⁰M.L. Cohen, 1974, Radionuclide clearance techniques, *Semin Nucl Med* 4, 23-38
- ⁸¹E.V. Dubovsky and C.D. Russell, 1982, Quantitation of renal function of glomerular and tubular agents, *Semin Nucl Med* 12, 308-329
- ⁸²L.R. Chervu and M.D. Blafox, 1982, Renal radiopharmaceuticals – an update, *Semin Nucl Med* 12, 224-245
- ⁸³V. Meucci, A. Gasperini, G. Soldani, G. Guidi, M. Giorgi, 2004, A new HPLC method to determine glomerular filtration rate and effective renal plasma flow in conscious dogs by single intravenous administration of iohexol and p-aminohippuric acid, *J Chrom Sci* 42, 107-111
- ⁸⁴V. Laroute, H.P. Lefebvre, G. Costes, P.L. Toutain, 1999, Measurement of glomerular filtration rate and effective renal plasma flow in the conscious Beagle dog by single intravenous bolus of iohexol and p-aminohippuric acid, *J Pharmacol Toxicol* 41, 17-25
- ⁸⁵D.R. Finco, S.A. Brown, S.L. Vaden, D.C. Ferguson, 1995, Relationship between plasma creatinine and glomerular filtration rate in dogs, *J Vet Pharm Therap* 18, 418-421
- ⁸⁶R. Heiene and L. Moe, 1998, Pharmacokinetic aspects of measurement of glomerular filtration rate in the dog: a review, *J Vet Int Med* 12, 401-414

⁸⁷B. Frennby and G. Sterner, 2002, Contrast media as markers of GFR, *Eur Radiol* 12, 475-484

⁸⁸S.P. Di Bartola, 2000, *Clinical approach and laboratory evaluation of renal disease*. In: TEXTBOOK OF VETERINARY INTERNAL MEDICINE, (5th edn), 1600-1614, S.J. Ettinger and E.C. Feldam (Eds); W.B. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, USA

⁸⁹D.J. Newman and C.P. Price, *Renal function and nitrogen metabolites*. In: TIETZ TEXTBOOK OF CLINICAL CHEMISTRY, (3rd edn), 1204-1270, C.A. Burtis and E.R. Ashwood (Eds), W.B. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, USA

Ringraziamenti

Giunta al termine del lavoro vorrei ringraziare tutti coloro che mi hanno aiutata e sostenuta in ogni modo durante la stesura di questa tesi.

In particolare desidero ringraziare la Prof.^{ssa} Grazia Guidi per il grande impegno e disponibilità che ha mostrato verso questo lavoro ma, soprattutto, per tutto ciò che sono riuscita ad imparare standole vicina.

Un vivo ringraziamento alla Dott.^{ssa} Valentina Meucci per il tanto tempo e per la competenza che ha messo a mia disposizione.

Infine vorrei ringraziare la mia famiglia per avermi sempre sostenuta ed incitata nel corso di questi cinque anni.

Ilaria