

UNIVERSITÀ DI PISA
Dipartimento di Farmacia



Corso di Laurea Specialistica in Farmacia

Tesi di Laurea

Marcatori plasmatici ed urinari di danno renale acuto dopo
chirurgia maggiore

Relatore

Prof. Antonio Lucacchini

Correlatore

Prof. Carlo Donadio

Candidata

Caterina Del Becaro

Anno Accademico 2013/2014

Sommario

| | |
|--|----|
| Introduzione | 1 |
| 1. Il rene | 1 |
| 1.1 Anatomia macroscopica del rene | 1 |
| 1.1a La corticale e midollare | 1 |
| 1.1b Vascolarizzazione..... | 2 |
| 1.2 Anatomia microscopica del rene..... | 4 |
| 1.3 Fisiologia dell'apparato urinario | 7 |
| 1.3a Filtrazione | 8 |
| 1.3b Riassorbimento..... | 8 |
| 1.3c Secrezione..... | 9 |
| 1.4 Composizione delle urine | 10 |
| 1.5 Parametri di funzionalità renale | 11 |
| 1.5a Flusso ematico renale (FER) | 11 |
| 1.5b Velocità di filtrazione glomerulare (VFG)..... | 11 |
| 1.5c Autoregolazione del flusso ematico renale e della velocità di filtrazione glomerulare | 12 |
| 1.5d Calcolo del filtrato glomerulare e il concetto di clearance | 12 |
| 2. L'insufficienza renale acuta | 15 |
| 2.1 Definizione, Epidemilologia, classificazione | 15 |
| 2.2 Diagnosi | 19 |
| 2.3 Cause specifiche di insufficienza renale acuta | 22 |
| 2.3a Nefrotossine esogene..... | 22 |
| 2.3b Nefrotossine endogene | 24 |
| 2.4 L'utilizzo di nuovi biomarker nella diagnosi della malattia | 26 |
| 2.4a NGAL | 29 |
| 2.4b CISTATINA C..... | 29 |
| 2.4c NAG..... | 30 |
| 2.4d KIM – 1 | 31 |
| 2.4e IL-18 | 31 |
| 2.4f L-FABP | 32 |
| 2.4g HSP70 | 33 |
| 3. HSP 70 “Heat shock protein” | 34 |
| 3.1 Nomenclatura e principali caratteristiche | 35 |
| 3.2 Struttura Hsp70..... | 36 |
| 3.3 Ciclo hsp 70 | 37 |

| | |
|--|-----------|
| 3.4 Meccanismo Regolazione HSP | 38 |
| 3.5 Meccanismo induttivo di HSP | 39 |
| 3.6 HSP70 e IRA in terapia intensiva | 40 |
| 4. Il test ELISA | 42 |
| Scopo della tesi..... | 45 |
| Pazienti e Metodi | 46 |
| 1.1 Pazienti..... | 46 |
| 1.2 Metodi | 48 |
| 1.2a Dosaggio di HSP70..... | 48 |
| 1.2b Dosaggio di altri biomarker..... | 51 |
| 1.1a Dosaggio ELISA HSP70 | 52 |
| 1.1b Pazienti..... | 52 |
| Discussione e Conclusioni | 60 |
| Bibliografia | 62 |

Riassunto

L'insufficienza renale acuta (IRA) è una sindrome che determina un'improvvisa riduzione della funzionalità renale con conseguente ritenzione nell'organismo di cataboliti azotati (iperazotemia e ipercreatininemia) e compromissione di altre funzioni renali (endocrino-metaboliche e di mantenimento dell'equilibrio idro-elettrolitico). L'insufficienza renale acuta si manifesta con frequenza maggiore nel sesso maschile ed in età avanzata, ma è una patologia presente anche nei bambini e nell'adulto. Ancora oggi dare una definizione universale della malattia resta oggetto di dibattito, non solo per quanto riguarda la sua incidenza e la mortalità in continua crescita, ma anche per quanto riguarda il trattamento e la prevenzione. Negli ultimi anni, è stato appurato che molti pazienti sottoposti ad interventi di chirurgia maggiore presentano un rischio elevato di sviluppare IRA durante il ricovero in terapia intensiva. La valutazione dei marker generalmente utilizzati nella pratica clinica (creatinina, azotemia, sodiemia etc.), ha dimostrato non essere sufficientemente utile nell'individuare tempestivamente la patologia in quanto, ad esempio, i livelli di creatinina e azotemia risultano quantitativamente elevati in tempi piuttosto lunghi; questo ha spinto la Ricerca ad intraprendere studi approfonditi con l'intento di rilevare marcatori biologici di nuova generazione, in grado di evidenziare IRA e soprattutto capaci di diagnosticarla precocemente, per poter intraprendere in tempo utile le terapie necessarie.

Recentemente sono state scoperte più di venti molecole con probabile attività di biomarker, tra queste alcune hanno mostrato una buona sensibilità e specificità per la patologia in studi condotti su modelli animali. Analizzando gli stessi sull'uomo la Ricerca ha ottenuto risultati positivi, ipotizzando l'abilità di queste molecole anche come classificatori di gravità nel danno renale acuto. Questo studio è finalizzato quindi alla validazione di marcatori biologici plasmatici ed urinari (HSP70, NGAL, albuminuria, cistatina C, gamma GT, LDH) utili nella diagnosi precoce di IRA, possibilmente in fase pre-clinica.

Introduzione

1. Il rene

1.1 Anatomia macroscopica del rene

I reni insieme alle vie urinarie costituiscono l'apparato urinario che filtra dal sangue i prodotti di scarto del metabolismo e li espelle tramite l'urina. Essi sono due organi retro-peritoneali a forma di fagiolo di colore bruno-rossastro, posti a lato della colonna vertebrale (tra T12 e L3). Misurano circa 12 cm di lunghezza, 6 cm di larghezza e 3 cm trasversalmente, con il rene sinistro tendenzialmente più lungo del destro, anche se i due possono risultare di dimensioni molto simili. Il loro peso è variabile, mediamente circa 150 g negli uomini e 135 g nelle donne (*Wein AJ, 2007*).

1.1a La corticale e midollare

Ciascun rene presenta due poli, uno superiore, arrotondato e in rapporto con la ghiandola surrenale, da cui è separato da un sottile strato capsulare fibroso, ed uno inferiore arrotondato immerso nel tessuto adiposo perirenale. In ognuno di essi si distinguono due margini: il margine laterale, uniformemente convesso, mentre quello mediale è convesso in prossimità dei poli superiore e inferiore ma concavo al centro, presso l'ilo. Nell'ilo, penetrano i vasi di maggior calibro diretti a quest'organo, l'arteria renale e la vena renale, rispettivamente, ramo dell'aorta e affluente della vena cava inferiore, vasi linfatici e nervi. Una volta sezionato è possibile distinguere due parti, una esterna di colore scuro, la corticale e una interna, chiara, la midollare, racchiuse in un resistente involucro fibroso, la capsula renale.

La *corticale*, si trova alla periferia dell'organo, sotto la capsula, e forma le colonne renali del Bertin, che si interpongono tra una piramide e l'altra, dirigendosi verso il seno renale e gli archi che sovrastano la base di ciascuna piramide, le piramidi di Malpighi. Gli archi corticali sono attraversati dai raggi midollari, delle striature di colore più chiaro che si assottigliano procedendo dalle piramidi da cui hanno origine verso la capsula renale. La stessa sostanza corticale è divisibile in una zona esterna ed in una interna. La zona esterna è quella sottocapsulare, mentre quella interna dove si dispongono i vasi tangenziali alla

base delle piramidi è detta anche sostanza corticale iuxtamidollare. Nella corticale troviamo due porzioni, una è la parte radiata, a contatto con la base delle piramidi e l'altra è la parte convoluta, più superficiale, sede dei corpuscoli renali di Malpighi e dei tubuli contorti.

La *midollare*, posta in profondità nell'organo e presso il suo ilo, è costituita dalle piramidi renali, delle formazioni triangolari striate e pallide con la base rivolta verso la corticale, e la capsula e l'apice disposto verso il seno renale. All'apice delle papille renali sboccano i dotti collettori che riversano l'urina in uno o più calici minori, delle cavità a forma di imbuto. La capsula renale penetra nell'ilo e va a fondersi con la tonaca avventizia dei calici minori. Un calice minore si unisce agli adiacenti per formare cavità più ampie, i calici maggiori, che drenano negli infundiboli renali, generalmente due per rene, che costituiscono presso l'ilo la pelvi renale, un grosso imbuto biancastro che medialmente si restringe formando un unico dotto che prosegue inferiormente, l'uretere. Lo spazio presente tra la fascia e il rene contiene il tessuto adiposo perirenale, in cui sono immersi il rene, la ghiandola surrenale e i vasi renali e surrenali, oltre a vasi linfatici e nervi (*Saladin, 2007*).

1.1b Vascolarizzazione

I reni necessitano di un grande apporto ematico e pertanto presentano una ricca vascolarizzazione. Per ogni gettata cardiaca, circa il 20% del sangue fluisce attraverso questi organi; da ciò risulta che nei reni circolano in media 1.100 ml di sangue al minuto. I principali vasi arteriosi del rene sono le due *arterie renali*, sinistra e destra, due vasi di grosso calibro (5–7 mm) che si distaccano quasi ad angolo retto dall'aorta addominale, poco sotto l'arteria mesenterica superiore e decorrono dietro le *vene renali*. Dalle arterie renali si distaccano superiormente dei vasi di piccolo calibro, le *arterie surrenali* inferiori, che vascolarizzano la parte inferiore delle ghiandole surrenali. Ciascuna arteria renale si divide in un ramo anteriore alla pelvi renale e in uno posteriore. Il ramo anteriore si divide in ulteriori quattro rami, dette *arterie segmentali*, che irrorano le porzioni apicale, superiore, media ed inferiore di ciascun rene, mentre l'arteria posteriore si divide in rami che vascolarizzano tutti un unico segmento, quello posteriore. Ogni arteria segmentale si divide in alcune *arterie lobari*, di norma una per ciascuna piramide renale verso cui si

dirigono, ma prima di giungervi ciascuna di queste si divide in 2-3 *arterie interlobari*, che decorrono attorno alla corrispondente piramide renale dirigendosi dall'apice alla base, verso la corticale all'interno delle colonne del Bertin. Giunte a livello della sostanza corticale iuxtamidollare, o corticale interna, ogni arteria interlobare si sdoppia ad angolo retto in due *arterie arcuate*, che decorrono alla base delle piramidi renali. Ogni arteria arcuata emette ulteriori rami che si portano superiormente e quindi si distaccano da essa ad angolo retto, queste sono le *arterie interlobulari*, che si dispongono radialmente nella corticale iuxtamidollare ed esterna del rene. Alcune arterie interlobulari non originano dalle arterie arcuate ma direttamente dalle arterie interlobari. La maggior parte delle arterie interlobulari si dirige verso un glomerulo, ma alcune perforano la corticale vascolarizzando la capsula renale dove formano il plesso capsulare. Un'arteria interlobulare non entra direttamente in un glomerulo ma rilascia rami laterali, le *arteriole glomerulari afferenti*; tali rami si distaccano obliquamente verso la capsula nella parte più superficiale della corticale (corticale esterna) e obliquamente verso la midollare nella corticale interna. Un'arteriola glomerulare afferente penetra in un corpuscolo renale formando il glomerulo, per poi uscirne sotto il nome di *arteriola glomerulare efferente*. Le arteriole glomerulari efferenti, che raccolgono il sangue filtrato nei glomeruli, formano un plesso di *capillari arteriosi* attorno ai tubuli renali. Giunte nella midollare, le arteriole efferenti danno origine a 10-25 arteriole rette che discendono nei raggi midollari formando un plesso capillare a livello della papilla. Seguono quindi in generale il percorso dei tubuli contorti prossimali e distali e dei dotti collettori. Alcune arteriole rette originano direttamente dalle arterie arcuate e sono chiamate arteriole rette "vere" (Landman, 2013).

I capillari venosi che si formano da quelli arteriosi a livello della papilla renale si uniscono a formare le *venule rette ascendenti*, che risalgono lungo i raggi midollari seguendo le arteriole a cui sono accoppiate fino a drenare a livello della base delle piramidi renali nelle *vene arcuate* o nelle *vene interlobulari*. Le arteriole discendenti e le venule ascendenti sono perciò molto vicine tra loro e questo facilita fenomeni di scambio. Le venule ascendenti drenano direttamente nelle vene arcuate ma più spesso nel *plesso venoso peritubulare* che a sua volta drena nella *vena interlobulare*, così come fanno le *vene stellate* della capsula renale. Le vene interlobulari decorrono verso la corticale interna dove drenano nelle vene arcuate, le vene arcuate procedono trasversalmente e drenano nelle vene interlobari, che discendono lungo le colonne renali per formare infine le due *vene renali* che escono dall'ilo del rene. Le vene renali sono anteriori alle arterie renali, si

portano medialmente verso la *vena cava inferiore* che drena il loro sangue. La vena renale sinistra è appena posteriore all'arteria mesenterica superiore che la scavalca e drena il sangue della *vena gonadica* sinistra che vi affluisce inferiormente, così come quello della *vena surrenale* sinistra che vi affluisce superiormente. La vena renale sinistra drena nella vena cava inferiore poco al di sopra della destra. Le vene renali possono essere doppie. I vasi linfatici del rene drenano in tre plessi, collocati nel tessuto adiposo perirenale, nella capsula renale e attorno ai tubuli renali. I vasi linfatici che decorrono lungo i dotti collettori seguono il decorso delle vene renali e drenano la linfa in vasi di calibro sempre maggiore sino a formare a livello dell'ilo 4-5 tronchi linfatici che seguono la vena renale, ricevono i vasi linfatici del plesso capsulare e terminano nei linfonodi aortici laterali. Il plesso nel tessuto adiposo perirenale, invece, drena direttamente nei linfonodi aortici laterali.

1.2 Anatomia microscopica del rene

L'unità funzionale del rene è il nefrone, in grado di svolgere tutte le funzioni dell'organo e capace, come tale, di filtrare il sangue e raccogliere il filtrato che darà origine all'urina. Il prodotto finale della filtrazione confluirà nella pelvi renale e poi, attraverso l'uretere, nella vescica, dove si accumulerà prima di essere escreto attraverso l'uretra. In ciascun rene sono presenti circa un milione di nefroni ognuno dei quali è costituito da un corpuscolo e da un tubulo renale.

Il *corpuscolo renale* a sua volta è divisibile in:

- *glomerulo*, che si presenta come una fitta rete di capillari sanguigni fenestrati a forma di “gomitolo” ed ha il compito di filtrare il sangue dall'arteriola glomerulare afferente e convogliarlo nell'arteriola glomerulare efferente;
- *capsula di Bowman*, un calice a doppia parete che funge da rivestimento del plesso glomerulare; troviamo infatti un polo vascolare a ridosso del glomerulo e un polo urinario, parte che si continua con il sistema tubulare. I capillari del glomerulo vascolare sono rivestiti da podociti, delle caratteristiche cellule dendritiche con un corpo centrale da cui si dipartono prolungamenti (processi primari) che vanno ad avvolgere l'endotelio. I pedicelli (processi secondari) di ciascun podocita formano una vera e propria guaina perivascolare adesa alla

membrana basale; ciascun processo secondario si divide poi in processi terziari e processi terminali, sempre più piccoli, che si interdigitano con quelli dei podociti adiacenti in una giunzione "a pettine" i cui spazi rappresentano le fessure di filtrazione. Il rivestimento podocitico costituisce il foglietto viscerale della capsula di Bowman. Il foglietto esterno della capsula è costituito da un epitelio pavimentoso semplice. Lo spazio tra i due foglietti della capsula è detto spazio urinario (di Bowman). Il filtrato del sangue oltrepassa la lamina basale glomerulare e quella podocitica (insieme vengono definite membrana basale glomerulare) per poi entrare nello spazio urinario. Tale membrana ha uno spessore di soli 330 nm, per cui è una barriera contro le proteine più grandi (ma l'emoglobina può penetrarvi) e generalmente fa passare solo le molecole di piccole dimensioni e gli ioni. Il glomerulo renale ricoperto dai podociti è immerso in una matrice composta da cellule mesangiali. Esse hanno forma irregolare, capacità fagocitarie e nel contempo contrattili, secernono inoltre la matrice del mesangio e la membrana basale glomerulare. Sono più propriamente definite cellule mesangiali intraglomerulari.

Il *tubulo renale* veicola il filtrato dallo spazio urinario sino al dotto collettore. Origina dal polo urinifero della capsula di Bowman tramite il tubulo contorto prossimale il cui prolungamento, definito ansa di Henle, prosegue nel tubulo contorto distale e da qui si immette nel dotto collettore. Il dotto collettore è una struttura tubulare che accoglie l'urina da più tubuli renali, quindi non è parte del nefrone; esso discende di nuovo in un raggio midollare sino a sboccare in un dotto di calibro maggiore detto dotto papillare, il quale sbocca nell'area cribrosa della papilla renale. La capsula è un'espansione del tubulo contorto prossimale e si continua con esso mediante una breve zona che forma un colletto. Il filtrato quindi, dalla capsula di Bowman, prosegue nelle diverse zone del tubulo renale:

- *tubulo contorto prossimale*, ha la funzione di riassorbimento di circa 80% dell'ultrafiltrato glomerulare. È rivestito da un epitelio cubico o cilindrico basso (l'altezza dipende dalla pressione) semplice per permettere gli scambi, le cui cellule presentano dei microvilli nel polo luminale che aumentano la superficie di assorbimento della membrana plasmatica. Queste cellule possiedono nuclei in posizione centrale, un citoplasma acidofilo e numerosi mitocondri soprattutto nella porzione basale della cellula oltre a numerosi perossisomi; la membrana plasmatica

basale presenta profonde invaginazioni, mentre quella laterale si interdigita con le cellule adiacenti. Possiede notevole attività pinocitotica per internalizzare grandi molecole come le proteine. L'acqua passa liberamente tra queste cellule;

- *ansa di Henle*, è un segmento del tubulo renale di appena 30 μm di diametro nella sua parte discendente più sottile (rappresenta la maggior parte della porzione a U, la cui concavità è rivolta verso la corticale) permeabile ad acqua e sali, e di 60 μm nel segmento spesso ascendente poco permeabile ad acqua e sali e coinvolto nel trasporto di ioni sodio e cloro. L'ansa di Henle è importante per la diluizione e la concentrazione dell'urina;
- *tubulo contorto distale*, ha la funzione di riassorbimento e secrezione ed è rivestito da cellule cubiche con nucleo centrale tondeggianti, introflessioni basolaterali della membrana plasmatica, scarsi mitocondri, corti microvilli sul lato luminale. Quando il tubulo contorto distale si avvicina al tubulo rettilineo distale, cioè presso l'incrocio dell'arteriola glomerulare afferente con quella efferente, la parete del tubulo è formata da cellule tubulari che formano una struttura chiamata macula densa. Essa è coinvolta nella regolazione di flusso sanguigno e nella velocità di filtrazione del tubulo renale. La macula densa e la componente vascolare, insieme alle cellule mesangiali extraglomerulari, creano una struttura specializzata, denominata apparato juxtaglomerulare. Questa struttura è il sito di formazione della renina ed è importante nella coordinazione funzionale del glomerulo e del tubulo;
- *dotto collettore*, è la sede di sbocco di numerosi tubuli provenienti dai vari nefroni, ha un calibro decisamente maggiore di questi ed è rivestito da un epitelio cubico o cilindrico semplice. Generalmente l'epitelio, inizialmente cubico, si fa sempre più alto procedendo dalla corticale verso la midollare. Le cellule della parete hanno un nucleo centrale ovalare, un citoplasma acidofilo, pochi organuli, numerose interdigitazioni laterali con le cellule adiacenti, corti microvilli nella porzione corticale e rari e corti microvilli nella maggior parte della sua estensione nella midollare. Vi è un secondo tipo di cellule che forma la parete del dotto collettore, dette cellule intercalari, che possiedono microvilli più lunghi e secernono protoni nel filtrato equilibrando il pH. Tra i dotti collettori è presente una popolazione di cellule interstiziali midollari, generalmente fibroblasti modificati, che si inseriscono tra due dotti tangenzialmente come se fossero i pioli di una scala, la loro funzione,

oltre che strutturale, è quella di secernere prostaglandine ed eritropoietina (*Fogo, 2013*).

1.3 Fisiologia dell'apparato urinario

Il rene è principalmente un organo escretore, ma svolge molte altre funzioni:

- regola l'equilibrio elettrolitico nei liquidi corporei normalizzando la concentrazione di Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- , PO_4^{3-} , Ca^{2+} , glucosio, amminoacidi, acido urico e urea, mediante integrazione tra processi di filtrazione, riassorbimento, secrezione ed escrezione a livello del nefrone;
- partecipa al mantenimento dell'equilibrio acido base (controllo del pH ematico) agendo sul riassorbimento di HCO_3^- e sulla secrezione di H^+ ;
- partecipa alla regolazione del volume dei liquidi corporei mediante meccanismi che permettono il recupero e l'eliminazione di acqua (clearance dell'acqua libera) con conseguente escrezione di un'urina che, a seconda delle esigenze dell'equilibrio idrico ed elettrolitico, può essere ipertonica, isotonica o ipotonica (cioè avente una concentrazione di soluti maggiore, uguale o minore rispetto a quella del sangue);
- svolge importanti funzioni endocrine mediante la secrezione di renina, eritropoietina, prostaglandine e la sintesi, a partire dalla vitamina D, di 1,25-diidrossicolecalciferolo, necessario per la regolazione ed il trasporto del calcio. La renina svolge un importante ruolo nel controllo della pressione sanguigna agendo nel Sistema renina-angiotensina-aldosterone, l'eritropoietina è un ormone indispensabile per la formazione e la maturazione dei globuli rossi nel processo detto eritropoiesi, mentre gli effetti fisiologici delle prostaglandine sono molti e svariati e si esercitano a diversi livelli;
- partecipa all'omeostasi di proteine di piccolo peso molecolare (lisozima, beta2-microglobulina, cistatina C) e di ormoni polipeptidici (PTH, insulina, GH, etc);
- partecipa sia al metabolismo ossidativo (β -ossidazione degli acidi grassi, principalmente dell'acido palmitico, gluconeogenesi, a partire da acido lattico e da aminoacidi gluconeogenici, e chetogenesi) con la porzione corticale, che al metabolismo anaerobio (glicolisi) con la porzione midollare. (*Robert M. 2000*)

1.3a Filtrazione

Il primo processo mediante il quale i reni producono urina è chiamato *filtrazione* glomerulare. Il sangue entra nel glomerulo ad alta pressione, costringendo le sostanze ad oltrepassare la barriera glomerulare (endotelio, membrana basale epitelio). Questa barriera agisce come un setaccio che permette alle particelle dal piccolo peso molecolare caricate negativamente di filtrare, mentre grandi molecole come le proteine plasmatiche, restano nel sangue. Il liquido filtrato prende il nome di ultrafiltrato (o pre-urina) e passa nel tubulo contorto prossimale. Tale processo è regolato da tre forze :

- pressione idrostatica intracapillare (PIn) circa 55 mmHg, favorisce la filtrazione;
- pressione oncotica (PO), circa 30 mmHg è proporzionale alla concentrazione proteica plasmatica, ostacola quindi la filtrazione;
- pressione idrostatica (PI_d) della capsula di Bowman circa 15 mm Hg, come la precedente ostacola il processo di filtrazione in quanto la pressione del liquido proveniente dai capillari si trova in competizione con quella interna alla capsula di Bowman.

La risultante di tali valori [PIn. – (PO. + PI_d.)] determina una *pressione netta di ultrafiltrazione* di 10 mm Hg, che influenza la velocità di filtrazione glomerulare (VGF) (all' aumentare di essa aumenta la VGF).

La pre-urina subisce variazioni importanti sia per quanto riguarda la composizione che la quantità, per azione delle cellule tubulari che agiscono mediante meccanismi di trasporto cellulari attivi, quali trasporto di membrana e pompe di scambio con l'intervento di alcuni enzimi (Monetti, 2013).

1.3b Riassorbimento

Alcune sostanze contenute nella pre-urina sono riassorbite principalmente dalle cellule del tubulo prossimale tramite *riassorbimento*, che, si verifica spesso con sostanze che sono particolarmente utili per l'organismo, quali elettroliti, amminoacidi, peptidi, glucosio e acqua. Tale processo ha sede in diversi segmenti (e con modalità differenti) sia dei tubuli

prossimali e distali che dell'ansa di Henle. Infatti, all'interno del tubulo prossimale sono presenti un maggior numero di microvilli rispetto al tubulo contornato distale o al dotto collettore, di conseguenza risulterà un riassorbimento maggiore e obbligatorio nel tubulo prossimale rispetto al distale, per il quale si parla di riassorbimento facoltativo. Il meccanismo di recupero delle sostanze può avvenire passivamente (cioè senza dispendio energetico e senza limiti quantitativi temporali) o attivamente (sfruttando energia sotto forma di ATP e con limite quantitativo nel tempo); in quest'ultimo caso, una volta raggiunta la concentrazione massima richiesta (saturazione), la sostanza non sarà più riassorbita ma verrà espulsa dal rene attraverso l'urina.

1.3c Secrezione

Alcuni metaboliti sono secreti nel tubulo dai capillari peritubulari attraverso il processo di secrezione (H^+ , $(NH_4)HCO_3$ e ioni). La secrezione del potassio avviene per semplice diffusione del catione intracellulare lungo i gradienti di concentrazione e quelli elettrici, fino al lume tubulare. Sebbene parte di esso possa tornare indietro ed essere riassorbito, ci sono due fattori che favoriscono il movimento del catione nel liquido intraluminale: la concentrazione K^+ nel liquido intraluminale è bassa, l'aumento del flusso tubulare distale, perciò, mantiene le basse concentrazioni intraluminali di potassio, stimolandone la secrezione. Inoltre, le cellule principali, situate nel dotto collettore, presentano un canale per il sodio, che ne determina così il riassorbimento dal lume tubulare. Dunque si crea un potenziale elettrico intraluminale negativo, che favorisce il passaggio del potassio dalle cellule al lume. Inoltre anche l'aldosterone stimola la secrezione di potassio attraverso un incremento dell'attività della pompa Na/K/ATPasi e della permeabilità della membrana cellulare luminale al sodio. La secrezione dei protoni comporta invece l'assorbimento e la nuova sintesi di bicarbonato, tramite una pompa ATPasi protonica (*Tisher CC, 2000*).

A questo punto, le urine passano dai reni ai calici renali, e da qui, alla pelvi renale per poi raggiungere gli ureteri, che, dotati di muscolatura liscia, spingono l'urina verso la vescica e la espellono (*Srivastata, 2002*).

1.4 Composizione delle urine

La composizione delle urine appare piuttosto varia tra gli individui ed correlata non solo alle possibili patologie del soggetto ma anche al sesso, all'età e alla dieta. Ad ogni modo, in un soggetto sano le urine non contengono glucosio, amminoacidi e proteine. Circa il 95% della composizione è rappresentata da acqua, mentre la percentuale restante deriva da una sommatoria di componenti: urea, azoto, creatinina, e altre sostanze in quantità minore come sali minerali, elettroliti, acido urico, ammoniaca, pigmenti, ormoni o eventuali metaboliti di farmaci (Brunzel, 2013).

Il pH dell'urina oscilla tra 4,6 a 8,0 e dipende dalla dieta e dalla condizione di salute dell'organismo (patologie, trattamenti farmacologici). Esso riflette l'abilità renale nel mantenere una normale concentrazione di ioni idrogeno nel plasma e nei liquidi extracellulari. Tale risultato viene ottenuto principalmente tramite il riassorbimento di sodio e la secrezione di ioni idrogeno ed ammonio da parte dei tubuli renali.

La quantità di urina escreta nell'unità di tempo (24h) è definita diuresi. Un individuo adulto e normopeso ha una diuresi intorno a 1000-1800 ml, dipendente da molteplici fattori (quali l'età, il peso, una maggiore predilezione per l'ingestione di alimenti solidi o liquidi, condizioni climatiche, utilizzo di diuretici). In caso di alterazioni quantitative della diuresi si parlerà di: *oliguria*, mostra una condizione patologica in quanto la diuresi risulta inferiore a 400ml/die, quantità minima affinché i soluti presenti possano essere eliminati correttamente dall'organismo, *poliuria*, il quantitativo espulso di urina supera i 3L a causa di un incremento di escrezione obbligata o ad un mal funzionamento in termini di riassorbimento tubulare, *anuria*, la diuresi è inferiore a 100ml/die.

I fattori che influenzano la produzione delle urine sono molteplici. Possibili disturbi alla minzione si manifestano nei soggetti con più di 50 anni soprattutto durante la menopausa (squilibri ormonali) e l'andropausa (ipertrofia prostatica). Oltre alla natura fisiologica ci sono molti altri elementi in grado di favorire o meno la produzione di urina:

- utilizzo di farmaci (diuretici, aumentano la minzione) antidepressivi o antistaminici (ostacolano la produzione di urina);
- abuso di bevande a basso contenuto di sodio, tè, caffè, tisane dall'effetto diuretico
- malattie e traumi

- stato di idratazione dell'organismo poiché il rene tende al mantenimento dell'equilibrio idroelettrolitico.

1.5 Parametri di funzionalità renale

1.5a Flusso ematico renale (FER)

Circa un quinto della gittata cardiaca arriva ai reni, il che si traduce in una velocità di flusso ematico renale (FER) pari a circa 1.200 ml/min e in una velocità di flusso plasmatico renale (FPR) di circa 600ml/min. Il FER è modulato da diversi ormoni circolatori e fattori autocrini come trombossani, endotelina, e angiotensina.

1.5b Velocità di filtrazione glomerulare (VFG)

Stimare la velocità di filtrazione glomerulare è molto importante in quanto le sue variazioni possono essere indice di patologie renali.

Con la sigla VFG si intende: Il volume di liquido filtrato nell'unità di tempo, il cui valore medio è di 120-125 ml/min, pari a circa 180 litri al giorno. Di questa quantità circa 178.5 L di liquido vengono riassorbiti giornalmente dopo la filtrazione. Dall'equazione di Starling abbiamo che :

$$VGF = K_f (P - \Pi)$$

La VFG dipende dalla:

- *pressione netta di ultrafiltrazione*, risultante dal bilancio tra le forze idrostatiche e colloidale-osmotiche agenti attraverso le barriere di filtrazione;
- *Coefficiente di ultrafiltrazione* ($K_f = \text{permeabilità} \times \text{superficie filtrante}$), nel rene 400 volte superiore a quello degli altri distretti vascolari; dove la superficie filtrante equivale all'area della superficie dei capillari disponibili per la filtrazione, e la permeabilità all'interfaccia che separa i capillari dalla capsula del Bowman;

- una riduzione del numero di capillari glomerulari funzionanti
- una riduzione della permeabilità dei capillari glomerulari funzionanti, ad esempio per processi infettivi che ne sovvertono la struttura
- un aumento del liquido contenuto nella capsula di Bowman, ad esempio per la presenza di ostruzioni urinarie
- un aumento della pressione colloidale-osmotica del sangue
- una riduzione della pressione idrostatica del sangue che scorre nei capillari glomerulari

1.5c Autoregolazione del flusso ematico renale e della velocità di filtrazione glomerulare

Il *FER* e la *VFG* sono tenuti a livelli costanti nonostante la pressione arteriosa possa variare ampiamente da 70 a 180 mm Hg. Questo grazie al meccanismo di autoregolazione renale che si articola in:

- meccanismo miogeno: l'incremento della pressione di perfusione renale induce lo stiramento delle cellule muscolari lisce delle arteriole efferenti, e la conseguente costrizione dell'arteriola afferente, ostacolando così la trasmissione della pressione elevata ai capillari glomerulari;
- Feed-back tubulo glomerulare: l'incremento della pressione arteriosa causa in principio un aumento di *VGF* e di conseguenza del carico di cloruro di sodio a livello della macula densa del tubulo distale, la quale invia il segnale all'arteriola afferente, inducendone la vasocostrizione (*Jarad, 2009*).

1.5d Calcolo del filtrato glomerulare e il concetto di clearance

Per calcolare un indice di filtrazione glomerulare (*FG*), sarà utile introdurre il concetto di *clearance*. Per il principio di conservazione della materia la differenza tra la quantità di sostanza *A* che entra nel rene attraverso l'arteria renale e quella che ne esce attraverso la vena renale rappresenta la quantità di sostanza escreta dal rene, come bilancio dei tre processi di filtrazione, riassorbimento e secrezione. Pertanto la velocità di escrezione di *A* da parte del rene è data dal prodotto tra la concentrazione urinaria (U_A) e il volume di urine prodotto nell'unità di tempo (V). La velocità di escrezione di *A* sarà proporzionale al

prodotto della concentrazione plasmatica (P_A) per la velocità di rimozione di A dal plasma (C_A).

$$P_A \times C_A = U_A \times V ; \quad C_A = (U_A \times V) / P_A$$

CLEARANCE

Perciò la clearance non è altro che la quantità di plasma depurato completamente dalla sostanza in esame nell'unità di tempo. Tale concetto è possibile applicarlo, in generale, per qualsiasi sostanza introdotta nell'organismo. Esistono però sostanze particolari, la cui clearance è sfruttata per la valutazione della VGF e FPR (flusso plasmatico renale) ad esempio *Pai* e *inulina*.

Quindi per stimare la filtrazione glomerulare si può utilizzare un indicatore in grado di essere filtrato, ma non secreto o riassorbito; una sostanza cioè che si conservi (la quantità rilevata nelle urine corrisponderà a quella filtrata dal rene). Di largo impiego in ambito clinico è la creatinina sierica, un metabolita della creatina prodotto nei muscoli. Essa è prodotta in maniera costante dall'organismo non è riassorbita, ma è in parte secreta; essa dunque, dà una idea della filtrazione glomerulare, sovrastimandola di circa il 20% a causa della secrezione. La creatininemia normalmente ha un valore di 1,0 mg/dl (0,8/1,3 mg/dl nell'uomo, 0,6/1,1mg/dl nella donna); se la filtrazione glomerulare si dimezza, l'indice di creatinina raddoppia e viceversa. L'aumento della creatininemia indica una riduzione della funzionalità renale. Da notare che i valori di creatininemia superano il limite superiore del range di normalità solo quando la filtrazione glomerulare è ridotta di almeno la metà. (*Brenner, 1991*).

Il test di funzionalità renale, e l'esame delle urine sono metodi poco invasivi che consentono di valutare una o più possibili patologie renali. Il modo più semplice per avere un'idea della VGF, come sopra descritto, è il *dosaggio della creatina*, anche se l'ottenimento di valori compresi nell'intervallo di normalità necessariamente non esclude la possibilità di un malfunzionamento renale. Infatti in un paziente la cui creatinina aumenti da 0,6 a 1,3 mg /dl, comporterà una riduzione della VGF del 50%, anche se i valori della creatinina rientrano perfettamente nell'intervallo di normalità. Anche alcuni

farmaci, come cimetidina trimetoprim, amiloride possono causare una falsa elevazione di creatinina sierica. Un altro modo per avere una misura funzionalità renale è rappresentato dalla formula Cockcroft-Gault, in cui si utilizza il livello di creatinina sierica correlato all'età al sesso e al peso corporeo dell'individuo. Altre formule, derivate dallo studio MDRD (modification of the diet in renal disease), stimano il valore del VFG da creatininemia (e, o cistatinemia), età e sesso. Un secondo parametro d'importanza è la *valutazione dell'azotemia*. L'urea è uno dei principali metaboliti escreti con l'urina ma è anche una sostanza che viene riassorbita lungo il tubulo, in caso di aumentato riassorbimento di sodio o deplezione di volume, aumenta il riassorbimento passivo dell'urea di conseguenza l'azotemia può variare in base allo stato di idratazione, ma comunque la sua clearance è sempre minore del filtrato glomerulare, mentre quella della creatinina sovrastima il VFG. La media tra le due clearances, in particolare in soggetti con ridotta funzione renale, corrisponde al valore del VFG. *L'escrezione frazionale del sodio*, risulta utile per la diagnosi differenziale dell'insufficienza renale acuta (IRA), infatti un'escrezione frazionale di sodio inferiore all'1% è indice di insufficienza renale acuta pre-renale, o IRA indotta da radio-contrasto (*Shah, 1995*). Nella diagnosi delle nefropatie è utile anche la semplice analisi delle urine (valutando pH, contenuto proteico, emoglobina, corpi chetonici) ponendo attenzione anche al colore (variabile da trasparente a giallo intenso) tenendo presente che, in alcune patologie o trattamenti farmacologici, è possibile osservare uno spiccato cambiamento cromatico; oppure effettuando l'esame microscopico del sedimento al fine di individuare elementi cellulari, cristalli, cilindri e microrganismi.

2. L'insufficienza renale acuta

2.1 Definizione, Epidemiologia, classificazione

L'insufficienza renale acuta (IRA), in inglese “*acute kidney injury*” o “*AKI*”, è una sindrome che si può generalmente definire come un improvviso deterioramento della funzionalità renale, osservabile entro le 48 ore, e che si manifesta con un aumento di ritenzione di scorie azotate e creatinina sierica, ovvero *iperazotemia* e *ipercreatininemia*, con o senza oliguria. Mentre solo il 5% di pazienti richiedono una terapia renale sostitutiva, anche i gradi più lievi di AKI sono stati associati ad un significativo aumento di morbilità e mortalità sia negli adulti che nei bambini, rafforzandone l'importanza clinica.

Da circa 30 anni gran parte delle manifestazioni di IRA si sono osservate maggiormente nei reparti di terapia intensiva. Ciò riflette un cambiamento dell'epidemiologia di IRA: se originariamente veniva attribuita ad una malattia renale o a nefrotossicità, adesso, riscontrando un aumento massiccio di IRA nei pazienti ospedalizzati in terapia intensiva, si preferisce inserire questa patologia nel contesto di disfunzione multi organo. L'insufficienza renale acuta secondaria agli interventi di chirurgia cardiaca, al trattamento di tumori del sangue e tumori di organi solidi è una particolare caratteristica del moderno spettro patologico che affligge anche l'ambiente pediatrico. È questa crescente gravità e complessità della malattia che probabilmente ha contribuito ad innalzare il tasso di mortalità da IRA, associata a chirurgia maggiore, al 50% nei bambini che richiedono terapia renale sostitutiva. Nonostante i progressi della medicina infatti si registra un numero crescente di bambini che sopravvivono al danno renale, ma che come complicanza dell'IRA sviluppano insufficienza renale cronica (*Goldfarb, 2009*). Per quanto riguarda l'adulto, si stima che il 15% dei ricoverati in ospedale nei paesi sviluppati, sviluppa IRA, e con particolare frequenza, gli anziani. Nel Regno Unito l'incidenza nella popolazione risulta 486-630 per milione di abitanti, a seconda della definizione. (*Thomas M 2013*).

La patologia, (nota un tempo come 'danno renale acuto' o ARF) rientra tra le più importanti complicanze osservate nei pazienti ospedalizzati, è per questo che generalmente viene associata ad un alto tasso di morbilità, mortalità, soprattutto quando è richiesta la dialisi. Tuttavia, la definizione universale di IRA rimane ancora oggi molto enigmatica e oggetto di dibattito, non solo per quanto riguarda la sua incidenza (che va da 1 a 31%) e la

mortalità (che varia tra il 19 e il 83%), ma anche per quanto riguarda il trattamento e la prevenzione. Poiché lo strumento più potente per migliorare l'esito di IRA è la prevenzione, la definizione dovrebbe raggiungere una sensibilità il più possibile elevata, per poter consentire di individuare i pazienti che sono a rischio di sviluppare insufficienza renale, da quelli con IRA già consolidata a quelli con danno renale acuto accertato (ARF). Nasce così dalle più accreditate società nefrologiche l'Acute Kidney Injury Network (AKIN), rete di collaborazione indipendente composta da esperti selezionati dai gruppi e dalle società partecipanti per rappresentare sia la loro area di competenza che la loro organizzazione promotrice. Lo scopo di AKIN è quello di facilitare collaborazioni internazionali per garantire progressi nel campo dell'Acute Kidney Injury (IRA) e ottenere i migliori risultati per i pazienti affetti o a rischio di insufficienza renale acuta.

Ci sono molteplici fattori di rischio che inducono, sia singolarmente che nel loro insieme ad una maggior probabilità di contrarre IRA, l'età, il ricovero ospedaliero (soprattutto se in terapia intensiva), malattie del distretto circolatorio, diabete, ipertensione, insufficienza cardiaca ed epatica, obesità.

L'IRA si può classificare attraverso:

-criterio R.I.F.L.E; (evidenzia il rischio di mortalità)

- criterio AKIN;

Un gruppo di esperti appartenenti all' ADQI (Acute Dialysis Quality Initiative) ha messo a punto la classificazione RIFLE di IRA.

L'acronimo RIFLE definisce tre gradi di gravità crescente della malattia (rischio, lesioni, e il fallimento, rispettivamente, R, I, e F) e due variabili (perdita e stadio terminale della malattia renale, rispettivamente, L ed E). (*Tabella I*). Una caratteristica unica del concetto RIFLE è che la previsione dei tre gradi di gravità della disfunzione renale avviene sulla base del cambiamento dei livelli di creatinina sierica e del volume di diuresi, riflettendosi con variazioni di GFR. I dati hanno il vantaggio di fornire elementi diagnostici per la fase in cui il danno renale ancora può essere impedito (rischio), quello in cui il rene è già stato danneggiato (lesione), e quello in cui è stabilita insufficienza renale (fallimento).

Tabella I : Criterio rifle

| | |
|---|--|
| Risk (rischio [di AKI]) | Aumento della creatinina di 1,5 volte; riduzione VGF del 25% riduzione diuresi < di 0,5 ml/kg per oltre 6 ore; |
| Injury (danno [renale]) | raddoppio della creatinina, riduzione del VFG del 50% riduzione della diuresi a meno di 0,5 ml/kg per oltre 12 ore; |
| Failure (malfunzionamento [dei reni]) | Aumento di 3 volte della creatina riduzione del VFG del 75% riduzione della diuresi a meno di 0,5 ml/kg per oltre 24 ore (oliguria) o anuria per 12 ore; |
| Loss (perdita [di funzione renale]) | perdita completa della funzione renale che richiede terapia sostitutiva, dialisi, per circa 4 settimane; |
| End-stage kidney disease (insufficienza renale terminale) | uremia cioè perdita completa della funzione renale che richiede terapia sostitutiva (dialisi) per più di tre mesi; |

Ad un più alto valore RIFLE corrisponde un più alto indice di mortalità. Nel caso in cui la creatininemia e la diuresi indichino due diversi livelli di gravità, lo stadio è indicato dalla funzione maggiormente compromessa (Wlodzimirow, 2012).

Il criterio AKIN (stabilito dall' omonimo gruppo di studio denominato "Acute Kidney Injury Network (AKIN)) riconosce l'insufficienza renale acuta quando in 48 ore la concentrazione di creatinemia aumenta di oltre il 50%, (> 0,3 mg/dl), o vi è una riduzione della diuresi al di sotto di 0,5 ml/kg per più di sei ore (questi due parametri sono identici a quelli del RIFLE). Sono previsti tre livelli di crescente gravità:

Tabella II : Criterio akin

| | |
|--|---|
| stadio1 (corrisponde al rischio del criterio RIFLE) | Aumento creatinemia > 1,5 volte o 0,3 mg/dl; riduzione diuresi < 0.5ml/kg/hr per 6ore; |
| stadio2 (corrisponde al danno renale del RIFLE) | Aumento doppio di creatinemia; riduzione diuresi < 0.5 ml /kg per 12 ore; |
| stadio3 (corrispondente al malfunzionamento renale di RIFLE) | Aumento creatinemia > 4mg/dl; riduzione diuresi < 0.3 ml/kg per 24 ore; |

Le differenze sostanziali tra i due criteri è che nel concetto AKIN non compaiono le ultime due fasi presenti in RIFLE, ed è stato completamente eliminato lo studio sui valori di VGF, inoltre, la misurazione della creatinemia si effettua entro le 48 ore, in contrasto con l'intervallo maggiore di tempo consentito in RIFLE. Altro importante concetto nella AKIN è l'uso di una creatinina di riferimento per la diagnosi sulla base di due prelievi di creatinina sierica (entro un periodo di 48 ore), per la valutazione della creatinina basale del paziente. (La creatinina di riferimento corrisponderà al più basso dei valori ottenuti.)

Molti studi hanno già validato i criteri di classificazione RIFLE e AKIN sopra citati, dimostrando che la situazione clinica del paziente peggiora con la severità dell'insufficienza renale acuta (IRA). La produzione di urina è incluso come criterio diagnostico in entrambi i sistemi di classificazione RIFLE e AKIN; tuttavia pochissimi studi attualmente hanno indagato e cercato di validare questo criterio che rimane ad ora di

validità solo in associazione al valore di creatinina. Benché sia riconosciuto che lo stato di idratazione, l'uso di diuretici e le condizioni emodinamiche possono influenzare il volume di urine prodotte e che IRA, può manifestarsi con livelli normali di produzione di urine, l'ADQI (Acute Dialysis Quality Initiative) ha deciso che una diminuzione nell'Urine Output (UO) possa essere un marker rilevante e sensibile per la detenzione, la diagnosi o la prognosi di disfunzioni renali (*Kellum et al, 2013*).

2.2 Diagnosi

La patogenesi del danno renale può essere utilizzata per classificare l'IRA come prerenale, renale intrinseca, o postrenale. (*Tabella III*)

L'iter iniziale include una storia del paziente per identificare l'uso di farmaci nefrotossici o malattie sistemiche che potrebbero causare scarsa perfusione renale o compromettere direttamente la funzione renale. L'esame obiettivo dovrebbe valutare lo stato del volume intravascolare e identificare eruzioni cutanee indicative di malattie sistemiche. Le analisi iniziali di laboratorio dovrebbero includere la misurazione del livello di creatinina sierica, emocromo, esame delle urine, e l'escrezione frazionale di sodio. L'ecografia dei reni deve essere effettuata nella maggior parte dei pazienti, in particolare negli uomini più anziani, per escludere una probabile ostruzione. Infine la biopsia renale, poco sfruttata per la diagnosi di IRA nei pazienti di terapia intensiva, ma molto utile per il riconoscimento della malattia quando si sviluppa al di fuori dell'ambiente ospedaliero. L'approccio terapeutico per danno renale acuto comporta la reintegrazione dei liquidi, l'evitare l'utilizzo di farmaci nefrotossici, l'esposizione a mezzi di contrasto, e la correzione degli squilibri elettrolitici. La terapia sostitutiva renale (dialisi) è indicato per iperkaliemia refrattaria; sovraccarico di volume; acidosi intrattabile; encefalopatia uremica, pericardite, pleurite e la rimozione di alcune tossine.

Tabella III: Patogenesi di IRA

| | |
|------------|--|
| Prerenale | Colpisce all'incirca il 50-80% nei casi di IRA. L'oliguria (diuresi < 400 ml/die) è riconducibile ad una GFR ridotta e ad un maggior riassorbimento di sodio e di acqua, normali risposte all'alterazione del volume sanguigno circolante (volemia). L'inadeguata perfusione renale è il risultato di una deplezione del volume extracellulare o di una patologia cardiaca. |
| Renale | Solitamente è associata ad ischemia renale prolungata (emorragia, intervento chirurgico), a una nefrotossina, a nefrite tubulo-interstiziale acuta o glomerulonefrite acuta. Sembrano imputabili a questa forma di IRA una marcata riduzione del flusso sanguigno renale e della permeabilità glomerulare. Questi fattori sono interdipendenti, ma non sono necessariamente presenti in ogni paziente; inoltre, variano da paziente a paziente e talvolta persino nello stesso paziente. |
| Postrenale | E' responsabile di circa il 5-10% dei casi di IRA. L'ostruzione dello sbocco vescicale è probabilmente la causa più frequente di un arresto improvviso e spesso totale dell'emissione di urina nei pazienti adulti. Questo tipo IRA può scaturire da diverse patologie quali: l'iperplasia prostatica benigna, la neoplasia della prostata o della cervice e le malattie retroperitoneali. Per provocare uremia, devono essere ostruite entrambe le vie escrettrici renali o una sola in un paziente monorene. Le cause di ostruzione intraluminale, meno frequente, sono attribuibili a calcolosi renale bilaterale, necrosi papillare, coaguli ematici e carcinoma vescicale; le cause extraluminale comprendono fibrosi retroperitoneale, neoplasia coloretale e altre neoplasie. Nei bambini, sono possibili cause i difetti congeniti che provocano ostruzione delle vie escrettrici renali e urinaria. |

L'IRA può talvolta sfociare in insufficienza renale cronica (IRC). In passato errori di valutazione hanno portato ad una diagnosi sbagliata, classificando l'insufficienza renale acuta come IRC. Nasce quindi l'esigenza di diversificare le due patologie evidenziandone il più possibile le caratteristiche, in modo tale da permetterne una netta distinzione. (Tabella IV).

Il riconoscimento dei fattori di rischio (ad esempio, l'età avanzata, sepsi, ipovolemia / shock, cardiocirurgia, l'infusione di mezzi di contrasto, il diabete mellito, preesistente malattia renale cronica, insufficienza cardiaca, insufficienza epatica) è importante ai fini diagnostici. Approcci di squadra per la prevenzione, una diagnosi precoce e l'attacco terapeutico aggressivo sono fondamentali per migliorare gli esiti della malattia (Mahboob Rahman et al, 2012) (Tabella V).

(Tabella IV) Differenze tra insufficienza renale acuta e insufficienza renale cronica

| Caratteristiche | IRA | IRC |
|-------------------------------|---|---|
| Storia pregressa | Funzione renale normale | Azotemia e creatininemia elevate |
| Dimensioni renali | Normali | Piccole ad eccezione dei casi di mieloma multiplo, diabete, amiloidosi e rene policistico |
| Radiografia ossea | Nessuna evidenza di osteodistrofia renale | Possibile evidenza di osteodistrofia renale |
| Emoglobina/ Ematocrito | Possibile anemia; livello normale di emoglobina, in un paziente con iperazotemia avanzata, è indice potenziale di IRA | Frequente anemia |

(Tabella V) Sintomi e fattori di rischio dell'insufficienza renale acuta

| | |
|---------------------------|--|
| Sintomi | feci sanguinolente, alito cattivo, movimenti lenti, gonfiore generalizzato (ritenzione di liquidi), stanchezza, dolore tra le costole e le anche tremore della mano, lividi, cambiamenti dello stato mentale o stato d'animo, diminuzione dell'appetito, diminuzione della sensibilità, soprattutto alle mani o ai piedi, sanguinamento prolungato, convulsioni, nausea, vomito, pressione sanguigna elevata |
| Fattori di rischio | l'età avanzata, sepsi, ipovolemia / shock, cardiocirurgia, l'infusione di mezzi di contrasto, il diabete mellito, preesistente malattia renale cronica, insufficienza cardiaca, insufficienza epatica. |

2.3 Cause specifiche di insufficienza renale acuta

2.3a Nefrotossine esogene

Tra le neurotossine esogene sono stati descritti i *Mezzi di contrasto radiologico*. Dati sperimentali suggeriscono una patogenesi legata ad una vasocostrizione arteriolare renale (mediata dall'endotelina-1) con conseguente ischemia midollare e nefrotossicità diretta associata alla liberazione di radicali liberi dell'ossigeno. Anche se l'aumento della concentrazione di creatinina sierica è transitorio nella maggior parte dei casi, l'IRA indotta da contrasto ionico può portare a un aumento della morbilità e mortalità nelle popolazioni a rischio. Il criterio di oliguria non si applica per i molti casi di AKI da contrasto perché i pazienti sono trattati con liquidi (soluzione fisiologica) per via endovenosa prima e dopo la terapia con l'obiettivo di aumentare la produzione di urina periprocedurale. L'incidenza di questa particolare forma patologica è di circa il 2%. Nei pazienti che hanno sia la malattia renale cronica (CKD) (definita come velocità di filtrazione glomerulare stimata [eGFR] <60 mL / min / 1,73 m²) che diabete mellito aumenta del 50% la probabilità. (Stanley Goldfarb 2009). Altra fonte di nefrotossicità è rappresentata dal gruppo degli *Aminoglicosidi*: L'IRA indotta da neomicina, tobramicina, gentamicina ed altre sostanze appartenenti a questa classe di composti colpisce circa il 10% degli individui che ne sono soggetti a somministrazione. Solitamente si riscontra un aumento dei livelli di creatina nell'arco di una settimana dall'utilizzo. La scomparsa della malattia raramente necessita

di dialisi assistita in quanto risulta lieve e non oligurica. Studi condotti sull' insufficienza renale acuta derivante da trattamento con gentamicina per la cura di infezioni neonatali, riscontrano un elevato contenuto di creatinina e marcatori biologici nelle urine dei neonati dopo l'uso del farmaco.(DJansen 2011). L'IRA da antiinfiammatori non steroidei (FANS) si manifesta con maggior incidenza nei soggetti anziani o nei pazienti ipovolemici, dove le prostaglandine (PG) vasodilatanti sintetizzate dal rene (PGE2 e PGI2) giocano un ruolo importante nel mantenere il flusso della midollare renale, modulando a livello dell'arteriola afferente e dei vasa recta l'effetto vasoconstrictore dell'angiotensina. Il blocco della ciclossigenasi (COX) può portare all'inibizione di questo meccanismo, ridurre il flusso renale e causare un aumento della ritenzione di sodio. La somministrazione di FANS può causare una brusca riduzione della perfusione renale e nei casi più gravi arrivare alla comparsa di insufficienza renale acuta. Questa può manifestarsi, nel paziente predisposto, anche per una singola assunzione del FANS e di solito è dose-dipendente. Uno studio recente ha mostrato che nei pazienti di età > 65 anni l'assunzione di ibuprofene aumenta del 58% il rischio di insufficienza renale acuta; il rischio è tanto maggiore quanto più lunga è l'emivita del farmaco impiegato, perché una lunga emivita comporta un mancato recupero della funzione renale al momento della somministrazione della dose seguente. (Moroni 2003). Le caratteristiche dell'IRA da Ace-inibitori sono descritte con la perdita dell' autoregolazione del flusso ematico renale e della velocità di filtrazione glomerulare. Probabilmente l'insorgenza della malattia deriva da molteplici fattori come l'avanzare dell'età e il numero crescente delle prescrizioni mediche di questa classe medicinale. Si attesta che .in Inghilterra, una maggiore prescrizione di ACE inibitori e Aras (antagonisti del recettore dell' angiotensina) spiegherebbe circa il 15% dei ricoveri ospedalieri da IRA tra il 2007 e il 2011 (Laurie A, 2013). Il danno renale acuto è una complicanza ben riconosciuta e dose dipendente dall'uso di *cisplatino* nella cura di molti carcinomi. L'ipomagnesiemia dovuta alla perdita a livello renale del magnesio colpisce circa il 50% dei pazienti. Dagli esami i livelli di creatinina e azotemia risultano elevati e nell'urina possono essere rintracciati glucosio e piccole quantità di proteine,indicativi di una disfunzione tubulare prossimale. Il meccanismo di azione del cisplatino non è ancora stato pienamente compreso. Recenti studi hanno dimostrato che l'infiammazione, danni da stress ossidativo, e apoptosi probabilmente stanno alla base della sua nefrotossicità. I flavonoidi influenzano la funzione delle cellule di base come la crescita, la differenziazione e l'apoptosi, a causa della loro attività antiradicalica, per questo,la quercetina, flavonoide

naturale presente in alta concentrazione di frutta e verdura (come mele, cipolle, patate, broccoli, tè, soia, rosso, vino.) viene utilizzata per gli effetti citoprotettivi nella prevenzione dell'IRA. (Masahiro Kusumoto 2001). Infine, anche la *tossicità da glicole etilenico* può indurre IRA. L'assunzione di glicole etilenico comporterebbe un'insufficienza renale acuta a causa della deposizione di cristalli di ossalato a livello tubolare. La diagnosi da intossicazione si basa sulla storia dell'ingestione, esami clinici che rilevano alto gap anionico, acidosi metabolica, alta gap osmolale, e un livello sierico di glicole etilenico osservabile a 4 ore dall'ingestione. Esso viene ossidato dall'alcol deidrogenasi a glicol aldeide, che viene poi rapidamente ossidata a glicolato. I suoi metaboliti attivi (glicolato, ossalato, e altri acidi tossici) possono causare lesioni renale acuta, ipocalcemia, danni al sistema nervoso centrale e dei nervi cranici, e l'instabilità cardiovascolare. L'emivita di eliminazione di glicole etilenico senza trattamento è da 3 a 8 ore. Tuttavia, a seconda delle tempistiche di arrivo in ospedale, il divario osmolale può diventare normale, creando così un quadro clinico confusionale per il medico curante. L'emodialisi è una terapia risolutiva molto efficace e corregge l'acidosi metabolica (German, 2013).

2.3b Nefrotossine endogene

La *Rabdomiolisi* è una sindrome caratterizzata dalla disintegrazione della muscolatura striata e la perdita di componenti intracellulari muscolari nel sangue e nelle urine. Essa si traduce in disturbi elettrolitici e un aumento dei livelli proteici, come la creatina chinasi (CK) e mioglobina nei fluidi corporei, contribuendo a una condizione pericolosa per la vita, insufficienza renale acuta fulminante. La capacità di prevedere il danno renale acuto indotto da rabdomiolisi è fondamentale, perché si pensa essere una delle principali cause di aki in terapia intensiva (in circa 25%). La fisiopatologia della rabdomiolisi IRA-indotta si imputa principalmente alla mioglobina, che può causare disfunzione renale da citotossicità diretta renale dopo aver raggiunto i tubuli, causando vasocostrizione e ostruzione tubulare. CK è il marcatore più comunemente usato per guidare la diagnosi e la terapia nella pratica clinica quotidiana, in quanto la sua emivita risulta maggiore rispetto alla mioglobina (El-Abdellanti, 2013). Si attesta che la *Sindrome epatorenale* possa, come complicanza, scatenare insufficienza renale acuta. Essa si manifesterebbe in pazienti con funzioni epatiche gravemente compromesse. Molto simile all'insufficienza pre-renale, si

distingue da questa in quanto il paziente che ne è affetto non risponde alla terapia del reintegro dei volumi. Solitamente si sviluppa nei pazienti affetti da cirrosi, e può insorgere nel giro di qualche mese o poche settimane in concomitanza ad una grave iperazotemia e oliguria (Mancini, 2012). L'insufficienza renale acuta è una malattia che può essere indotta sia in gravidanza che nel *post-partum*, pertanto si inserisce nel contesto di situazioni molto diverse. Si tratta di condizioni severe e associate ad elevata morbilità e mortalità sia materna che fetale, con rischio di sequele permanenti.

Le anomalie fisiopatologiche di maggiore frequenza sono:

- Vasocostrizione
- Attivazione e consumo di piastrine
- Emolisi intravascolare microangiopatica
- Trombosi del microcircolo
- Disfunzione endoteliale
- Ridotta perfusione tissutale

Sono malattie generali, con coinvolgimento multi-sistemico: oltre al rene, gli organi coinvolti sono il fegato, il cervello, il polmone, il cuore e il pancreas. Sono indispensabili per la diagnosi differenziale oltre agli esami di laboratorio, l'anamnesi patologica della paziente, l'accurato esame del contesto clinico in cui si è sviluppato il quadro, il rapporto della malattia con la gravidanza stessa, in particolare l'epoca gestazionale in cui la malattia si è sviluppata, la presenza o meno di preeclampsia e la compromissione della circolazione utero-placentare (Ganesan, 2011).

2.4 L'utilizzo di nuovi biomarker nella diagnosi della malattia

Per molti anni la diagnosi dell'insufficienza renale acuta è stata basata sulla valutazione dei livelli di creatinina nel sangue, composti azotati e oliguria. Molti fattori, spesso non in correlazione con la patologia, (nel caso della creatinina l'attività muscolare, il peso corporeo, l'età e il sesso), possono però falsarne la stima, modificandone così la concentrazione, e compromettere una diagnosi corretta. Di seguito, sono elencati i marker e i test clinici convenzionali utilizzati nella diagnostica della malattia, mettendone in evidenza le proprie caratteristiche ed i propri limiti che sono stati riscontrati nel tempo (Prowle, 2011; Basu, 2010).

(Tabella VI) Marker e test convenzionali per la diagnosi di IRA

| Marker/ test | Caratteristiche | Limiti |
|--------------------------|---|--|
| Creatinina | Molecola del peso di 113 kDa. La clearance della creatinina è comunemente utilizzata come indicatore della GFR e la concentrazione sierica della molecola gode di una relazione inversa con la GFR stessa: se questa diminuisce, indice di una diminuzione delle funzione renale, la creatinina nel sangue aumenta e viceversa. | Differenze nell'età, nel sesso, dieta posso influire molto sulle concentrazioni basali della proteina, ugualmente questa variabilità può essere determinata da stati patologici (es. rabdomiolisi) e terapie farmacologiche determinandone fenomeni di incremento, transitorio e reversibile. Il tempo necessario affinché la creatinina si accumuli nel sangue con valori da risultare diagnostici è molto lungo. |
| Microalbuminuria | Marcatore di disfunzione endoteliale predittivo di IRA da sepsi in terapia intensiva circa 30 mg/die. | |
| Volume di diuresi | obiettività, facilità di utilizzo, monitorato attraverso catetere | nessuno |

| | | |
|-----------------|--|--|
| Urea | Molecola di 60 kDa, solubile in acqua, derivante dal metabolismo delle proteine. L'accumulo di urea predispone a effetti metabolici, biochimici e fisiopatologici avversi, poiché si incrementa lo stress ossidativo; si ha alterazione del co-transportatore $\text{Na}^+ / \text{K}^+ / \text{Cl}^-$ con conseguente regolazione del potassio e dell'acqua intracellulare ed infine alterazioni dell'apparato immunitario. L'urea, è legata al GFR da un rapporto inverso, se l'urea sierica aumenta vuol dire che la GFR è diminuita; | La sua produzione e la sua concentrazione possono variare in funzione dell'apporto dietetico di proteine, ma anche di stati critici del paziente, e terapie farmacologiche prolungate soprattutto a base di corticosteroidi. La clearance dell'urea non è costante: si stima che un 40-50 % dell'urea filtrata è riassorbita e che in condizioni di decremento del volume circolante sanguigno, a livello del tubulo renale, aumenta il riassorbimento di Na^+ e H_2O che ne stimola un ulteriore riassorbimento; sottostimandone il GFR. Quindi non è comunque attendibile, per tempi e concentrazioni, come indicatore della fase "acuta" del danno renale. |
| Oliguria | L'oliguria è definita come una produzione di urina inferiore 0,5 ml/kg/h per sei ore consecutive in bambini e adulti. Nei pazienti gravemente malati, l'oliguria spesso è un segno di danno renale acuto che precede l'aumento della creatinina nel sangue e richiede l'attenzione e la cura immediata. | Il danno renale acuto non è sempre presente con fenomeni di oliguria: l'insufficienza renale acuta non-oligurica si verifica nel 28-45% dei pazienti in terapia intensiva. Tuttavia, l'oliguria può rappresentare non solo una malattia renale intrinseca (necrosi tubulare acuta), ma anche una risposta normale del rene a una diminuzione extracellulare di volume. |

La necessità di affinare tecniche accurate per la determinazione dell' insufficienza renale acuta, ha portato la ricerca scientifica a condurre studi approfonditi al fine di individuare nuovi marcatori sensibili e specifici, plasmatici ed urinari, responsabili di IRA, utili alla diagnosi precoce della malattia.

Nella ricerca di nuovi marcatori, è sconsigliata l'identificazione di parametri ematici in quanto soggetti a variazione non sempre strettamente dipendente da danno renale (ipoperfusione, deplezione, volemia); al contrario, si prediligono metaboliti e proteine perché direttamente correlati con fenomeni patogenetici che provocano danno renale. Tra le proteine stesse, è preferibile focalizzare l'attenzione su quelle urinarie dall'attività non enzimatica (il loro incremento avviene per effetto citopatico in seguito a danno e hanno un peso molecolare piuttosto basso, quindi possono essere filtrate liberamente dal glomerulo, come ad esempio la cistatina c).

La scoperta di un nuovo marcatore biologico richiede un protocollo per la validazione, che consiste nel superamento di 5 fasi critiche :

- 1) in primo luogo deve essere condotto uno studio sperimentale che dimostri l'effettiva espressione o modificazione del marcatore nella patologia di interesse nei modelli animali, solitamente ratti;
- 2) identificare un metodo affidabile e riproducibile per quantificare il biomarker in campioni urinari;
- 3) test clinici per rilevare il marcatore nei pazienti affetti , e possibilità del suo utilizzo nella diagnosi precoce;
- 4) determinazione su larga scala delle proprietà del biomarker: specificità e sensibilità;
- 5) screening della popolazione con il nuovo marcatore durante il trattamento, l'evoluzione l'esito finale della malattia. (*Siew et al, 2011*).

Negli ultimi anni, la disponibilità di innovative tecniche di genomica e proteomica, ha permesso l'identificazione di più di venti molecole, la cui concentrazione risulta modificata durante IRA; tra queste molecole ne sono state isolate alcune, considerate probabili marcatori, per poterne effettuare un'analisi dettagliata:

- NGAL (neutrophyl gelatinose-associated lipocalin -2);
- KIM-1 (kidney injury molecule-1);
- CISTATINA C (CYC o cystatin c);
- IL-18 (interleuchina -18);
- NAG (N-acetyl-β-D-glucosaminidase);
- L-FABP (liver fatty- acid binding protein);
- HSP 70 (heat shock protein).

2.4a NGAL

Il biomarker NGAL o lipocaina 2 è una piccola proteina appartenente alla famiglia delle lipocaine dal peso di 25 kDa, espressa in minima percentuale nei tessuti umani, stomaco, colon, epitelio cellulare e tubulo prossimale renale. In particolare, si attribuisce alle cellule del tubulo renale una sovra espressione di questa sostanza in condizioni di stress o danno ischemico. Compare in diverse forme di IRA: indotta da terapia intensiva; da cardiocirurgia; nefropatia da mezzi da contrasto; ritardata funzione renale post trapianto renale. Mori et al. (2005) osservarono un aumento di concentrazione di NGAL nel plasma e nelle urine, rispettivamente di 10 e 100 volte maggiore in paziente sofferenti di IRA in terapia intensiva; ciò indusse a ipotizzarne una sovra-espressione in concomitanza di episodi di danno renale acuto. L'aumento di NGAL in plasma e urine in un gruppo di bambini, che avevano sviluppato IRA, dopo un intervallo di 2/6 ore dall'intervento di cardiocirurgia, rispetto all'aumento di creatinina registrato dopo 1/3 giorni, suggerì l'importanza di NGAL come marcatore diagnostico. Alla biopsia questi reni mostravano un accumulo di proteina a livello dei tubuli corticali. Purtroppo, non è possibile riconoscere NGAL come marcatore specifico della patologia, in quanto la sua concentrazione risulta elevata anche in casi clinici di non IRA (Ronco, 2014).

2.4b CISTATINA C

Recentemente, il siero CYC ha dimostrato di rilevare IRA prima di creatinina sierica in pazienti critici. CYC è una proteina basica non glicosilata del peso di 13 kDa e un membro della superfamiglia di inibitori della proteasi- cisteina. È prodotto da tutte le cellule nucleate e non ha affetti sulla massa muscolare (a differenza della creatinina). CYC viene escreta per filtrazione glomerulare, poi subisce essenzialmente completo riassorbimento tubulare e catabolismo (senza secrezione), in modo da non trovarsi in quantità significative nelle urine. Questo è in accordo con le recenti scoperte che dimostrano che i livelli elevati di urinaria CYC riflettono una disfunzione tubulare e la malattia tubulo-interstiziale. Nell'esperimento, ipotizzarono che le concentrazioni di CYC nel plasma (un marcatore GFR) e urine (un marcatore danno tubulare prossimale) fossero i primi biomarcatori di danno renale acuto dopo chirurgia cardiaca, precedenti agli aumenti significativi plasmatici di creatinina. In effetti dai dati risultò che i livelli plasmatici di

CYC aumentavano 1-2 giorni prima della creatinina plasmatica nei pazienti che sviluppavano IRA dopo cardio chirurgia ma anche in una varietà di altre patologie, tra cui nefropatia da radiocontrasto IRA nei pazienti di terapia intensiva. In questo studio, si appurò inoltre che la disfunzione renale dopo chirurgia cardiaca è associata anche all'aumento urinario di concentrazioni di CYC (*Lagos-Arevalo, 2014*). È stato suggerito che la CYC potrebbe predire il rischio di sviluppare la malattia renale cronica, segnalando in tal modo uno stato di disfunzione renale 'preclinica'. Gli studi hanno anche indagato sull'abilità di CYC come marker della funzione renale nella regolazione del dosaggio dei farmaci. Sono stati segnalati livelli di CYC alterati in pazienti con cancro, disfunzione tiroidea e terapia con glucocorticoidi. Altre analisi hanno trovato che i livelli sono influenzati da fumo di sigaretta e dalla presenza di proteina C-reattiva. Infine la CYC sembra aumentare nell'HIV, specialmente nei casi dove si evolve una disfunzione renale. Il ruolo della CYC nel monitoraggio di GFR in gravidanza rimane a oggi di dubbia discussione. Nonostante i livelli di CYC, nella diagnosi precoce di IRA compaiano giorni prima rispetto a quelli della creatinina, non è possibile affermare la specificità di questo marcatore, visto il suo coinvolgimento con le patologie sopra citate.

2.4c NAG

Il biomarker NAG (N-acetil- β -D-glucosaminidasi) è un enzima lisosomiale contenuto in abbondanza nell'epitelio tubulare renale ed è collegato con il degrado dei mucopolisaccaridi e glicoproteine. Il NAG ha un elevato peso molecolare relativo di 130/140 kDa, il che non permette la sua filtrazione attraverso la membrana basale glomerulare. Pertanto, la sua escrezione urinaria è relativamente costante con modifiche minime diurne. NAG è stabile contro le variazioni di pH e temperatura. Il NAG si presenta in diversi isoenzimi, e le due principali forme sono presenti nei reni e nel fegato. L'urina nei soggetti umani sani, contiene piccole quantità di NAG, con un rapporto tra le due forme isoenzimatiche A e B di 4: 1. Nei pazienti con danno tubulare a livello renale e insufficienza renale interstiziale, l'attività totale a livello urinario di NAG è elevata, in particolare, la sua forma B, con conseguente cambiamento del rapporto A: B. Si riconosce che il NAG nelle urine aumenta in vari casi di malattie renali, dopo un'operazione al rene e anche nelle urine e siero di pazienti diabetici. Nel campo degli esperimenti clinici e su animali, la misura di NAG ha attratto particolare interesse in connessione con la diagnosi

di varie malattie renali ed anche come indicatore sensibile e affidabile nell'analisi delle nefrotossicità della funzione renale (*Liangos, 2006*). Rispetto a CYC, NAG risulta quindi essere un biomarker migliore, sicuramente per la valutazione di una possibile neuropatologia, anche se non è possibile affermare la sua specificità nella diagnosi di IRA.

2.4d KIM – 1

La glicoproteina di membrana KIM-1 (Kidney molecule 1) è poco rilevabile nel tessuto renale sano, ma espressa a livelli molto elevati nelle cellule epiteliali del tubulo prossimale nei reni umani dopo ischemica o lesioni indotte da tossicità (es cisplatino). Sembra che la sua funzione sia quella far riconoscere alle cellule epiteliali le cellule morte per fagocitarle, e liberare così il tubulo da possibili ostruzioni. La sua presenza nelle urine è altamente specifica per danno renale; infatti in nessun altro organo è stata osservata una variazione significativa di KIM-1 tale da poter influenzare l'escrezione renale. Essa dimostra maggior sensibilità di rispetto ad azotemia e creatinina come marcatore di IRA indotta da agenti nefrotossici e per IRA post trapianto renale. Inoltre è ritenuta un parametro discriminante per insufficienza renale acuta rispetto all'insufficienza renale cronica. Infine, il suo comportamento nell'uomo rispecchia quello osservato nei modelli animali e quindi il suo impiego risulta oggetto di interesse in campo farmaceutico per lo sviluppo di nuovi farmaci (*Ostermann et al, 2012*).

2.4e IL-18

L'Interleuchina-18 è una citochina proinfiammatoria di 18 kDa che viene rilasciata in risposta di danno ai tubuli renali. Sulla base di esperimenti condotti su ratti e successivamente umani, IL-18 si propone come marcatore diagnostico di IRA, nelle urine. I livelli urinari di IL-18 si ritrovano elevati in corso di IRA ma in assenza di infezioni del tratto urinario, sindrome nefritica o danno prerenale. Quindi, IL-18 mostra una specificità ed una sensibilità maggiore del 90% per la diagnosi di danno renale in atto; restando un valido indizio nella diagnosi differenziale tra i vari sottotipi di danno renale. Una serie di studi hanno dimostrato come anche i livelli di IL-18, oltre alla proteina NGAL, siano altamente predittivi sul decorso e sulla prognosi del danno renale acuto, con un largo

anticipo (fino a 24- 48 ore prima) rispetto alle concentrazioni sieriche di creatinina (*Ramirez-Sandoval, 2014*).

2.4f L-FABP

Le proteine leganti acidi grassi sono una famiglia di piccole proteine citoplasmatiche che legano gli acidi grassi a lunga catena. L-FABP, è una proteina di 14 kDa espressa nelle cellule epiteliali del tubulo prossimale che promuove il metabolismo degli acidi grassi liberi a lunga catena. Il gene L-FABP è sensibile ad uno stress ipossico, che si verifica nel contesto di danno renale ischemia-riperfusion. Di conseguenza, l'escrezione urinaria di L-FABP riflette lo stress delle cellule epiteliali del tubulo prossimale, correlato alla gravità della lesione ischemica tubolare. Le prestazioni a livello urinario di L-FABP come marker precoce di IRA ha mostrato risultati promettenti in diversi contesti clinici. Per valutare in modo sistematico le caratteristiche prestazionali di L-FABP per la diagnosi precoce e la prognosi di danno renale acuto, è stata condotta un'analisi che dimostra che in coorti ospedalieri di pazienti a rischio per IRA, la misurazione urinaria di L-FABP, fornisce una buona discriminazione per la diagnosi di IRA e la previsione del fabbisogno di dialisi e di mortalità ospedaliera (*Paweena, 2012*). Il danno renale acuto è una delle principali complicanze della chirurgia da bypass cardiaco. Esaminato i livelli proteici di L-FABP nelle urine di 40 pazienti pediatrici prima e dopo l'intervento chirurgico da bypass cardiopolmonare è stato rilevato un aumento dei livelli di L-FABP (su escrezione di creatinina) di circa 94 e 45 volte maggiore in 4 e 12 ore, dopo l'intervento chirurgico nei 21 pazienti che avevano sviluppato IRA (confermando l'identità di LFABP con analisi Western Blot). L'esperimento mostra che i livelli di L-FABP urinari rappresentano un biomarcatore precoce sensibile e predittivo di danno renale acuto dopo chirurgia cardiaca.

2.4g HSP70

La “Heat Shock Protein” dal peso di circa 70 kDa indica una famiglia di proteine espresse ubiquitariamente ed importanti per il ripiegamento proteico. Le proteine HSP70 infatti aiutano le altre proteine nascenti a raggiungere la struttura spaziale definitiva ed preservano la cellula da eventuali fattori di stress, quali ad esempio il calore. HSP70 sembra essere “overespressa” in molti tumori (es. alcune forme di melanoma) e “under espressa” in altri tipi di tumore. Questo è dovuto principalmente al fatto che essa è in grado di controllare la stabilità di molte proteine, e suoi valori alterati possono facilmente alterare i meccanismi mitogenici ed apoptotici, inducendo così lo sviluppo di forme tumorali. Recentemente studi approfonditi hanno evidenziato l’attività di HSP70 come marcatore predittivo di insufficienza renale acuta, sia nel siero che nelle urine. In un modello sperimentale di IRA, *Bobadilla et al.* trovarono che HSP70 rispecchiava la maggior parte delle caratteristiche specifiche che un biomarker ideale dovrebbe avere: non-invasivo, facilmente rilevabile, per poter individuare precocemente IRA, capace di diversificare il danno renale in base alla gravità ed ad un eventuale recupero, e di essere uno strumento capace di monitorare l’efficacia terapeutica farmacologica. Inoltre, i livelli di HSP70 urinari risultavano indici migliori, per rilevare insufficienza renale acuta indotta da ischemia, rispetto ad altri marcatori (NGAL urinario, KIM-1 e IL-18), sia nel modello animale che nell’umano. HSP70 può essere un utile strumento per la diagnosi precoce IRA nei pazienti ricoverati in terapia intensiva o ad alto rischio di sviluppare danno renale, come i pazienti sottoposti a chirurgia cardiaca, trapianto renale o in trattamento da nefrotossine. La diagnosi opportuna di IRA consentirebbe al medico di effettuare un adeguato e tempestivo intervento farmacologico ai fini della sopravvivenza del paziente ed evitare lo stadio terminale della malattia renale (*Bobadilla, 2011*).

3. HSP 70 “Heat shock protein”

Le proteine che mantengono la loro conformazione funzionale e che evitano l'aggregazione di proteine non native, sono particolarmente importanti per la sopravvivenza della cellula in condizioni di stress. Queste proteine appartenenti alla famiglia delle HSP furono descritte per la prima volta negli anni '60 in cellule di *Drosophila melanogaster* (comunemente conosciuto come moscerino della frutta). Un campione di questo modello fu incubato ad una temperatura più alta del normale e osservando al microscopio i cromosomi, fu osservata un'elevata attività trascrizionale di qualche proteina sconosciuta (Pratt et al, 2003). Questa attivazione trascrizionale scatenata dal calore fu definita "Heat Shock Response" e le proteine espresse in questa risposta furono chiamate "Heat Shock Proteins" (HSPs).

Tabella VII: Fattori che inducono l'espressione di Hsp

| | |
|---------------------------|---|
| Fattori ambientali | Esposizione ai metalli; Inquinanti organici; Cambiamenti di temperatura; Ipossia / anossia; Esposizione radiazioni ultraviolette. |
| Stati patologici | Infezioni virali, Febbre; Infiammazioni; Ischemia; Lesioni da ossidanti; Neoplasie. |
| Fattori cellulari normali | Ciclo di divisione cellulare; Fattori di crescita, sviluppo e differenziamento. |

Le heat shock proteins sono tuttavia espresse costitutivamente, infatti molte di queste proteine sono “chaperoni molecolari” coinvolti in normali processi biochimici, in quanto, non solo legano e stabilizzano le proteine negli stadi intermedi del folding (ripiegamento) assicurandone la corretta conformazione, ma intervengono nella traslocazione cellulare attraverso le membrane, nell’assemblaggio e nella degradazione delle proteine. Non deve quindi sorprendere che le Hsp siano presenti in una ampia varietà di organismi, a partire dai batteri fino ad arrivare all’uomo. In condizioni di stress si pensa che esse siano over-espresse o che addirittura vengano indotte delle isoforme particolari. (HSP72 è la forma di HSP70 indotta da stress. Valori molto elevati sono prodotti in situazioni di ipertermia, stress ossidativo, alterazioni della forza ionica o del pH.)

Gli chaperoni molecolari rappresentano quindi le principali componenti che contribuiscono a mantenere invariata l’omeostasi cellulare sia in condizioni fisiologiche di crescita e sia durante condizioni avverse.

3.1 Nomenclatura e principali caratteristiche

Le heat shock proteins sono divise in due grandi gruppi: quelle ad alto peso molecolare e basso peso molecolare.

- ATP-indipendenti, generalmente sono le hsp a basso peso molecolare;
- ATP-dipendenti, ad alto peso molecolare vengono suddivise in ulteriormente in :
 - Hsp60,
 - Hsp70 (Hsp70, Hsc70, Grp78,...),
 - Hsp90 (Hsp90 α , Hsp90 β) ,
 - Hsp100.

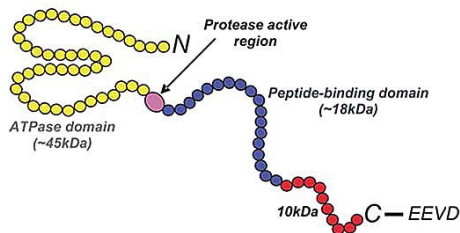
Queste proteine sono chaperone molecolari ATP-dipendenti e richiedono la presenza di cofattori detti co-chaperone, che regolano l’affinità di legame tra le hsp e l’ADP o ATP, tra questi: *Hsp40, Hop, Hip, Bag1* (Mayer, 2004).

3.2 Struttura Hsp70

Tutte le HSP70 hanno tre principali domini funzionali:

- Un dominio ATPasico al N-terminale (circa 40 kDa), in grado di legare ed idrolizzare ATP. Questo dominio ha funzione regolativa in quanto lo scambio tra ATP e ADP induce un cambio conformazionale regolativo negli altri due domini.
- Un dominio legante il substrato, che contiene un solco che ha affinità per residui amminoacidici neutri e idrofobici.
- Un dominio C-terminale (circa 20 kDa), con struttura ad alfa-elica che funziona come un "coperchio" per il legame del substrato. (*vedi fig 1.*)

Poichè le Hsp70 sono localizzate nel citosol, nel reticolo endoplasmatico, nei mitocondri e nei plastidi, nei precursori dei membri destinati ad essere trasportati all'interno di tali organelli, è presente, all'estremità N-terminale, un peptide di transito con una sequenza variabile. Per molte Hsp70, la presenza di un sub dominio al C-terminale di circa 5kDa, è indispensabile per consentire l'interazione con i propri co-chaperoni.



Quando una proteina HSP70 è legata all'ATP, il "coperchio" è aperto, i peptidi si legano e vengono rilasciati in maniera veloce. Quando le proteine HSP70 sono legate all'ADP il "coperchio" è chiuso, ed i peptidi sono saldamente legati al sito di legame del substrato.

Fig 1. Section Sports and Rehabilitation Medicine, Department of Cardiology, University of Ulm, Ulm, Germany [Frontiers in Bioscience 11, 2802-2827, September 1, 2006].

3.3 Ciclo hsp 70

Quando non interagisce con un peptide, la HSP70 è generalmente legata all'ATP. L'attività ATPasica è molto debole così che l'idrolisi spontanea non avviene per diversi minuti. Quando una proteina nascente emerge dal ribosoma, il dominio di legame del substrato riconosce sequenze di residui amminoacidici-idrofobici ed interagisce con essi. Questa interazione spontanea è reversibile, e nello stato legato all'ATP, HSP70 può legare e rilasciare i peptidi in maniera piuttosto libera e veloce. La presenza del peptide legato, stimola l'attività ATPasica. Nello stato legato ad ADP, la tasca di legame del peptide si chiude, trattenendo strettamente il peptide che vi si era legato. Ad aumentare l'attività ATPasica sono preposte anche una famiglia di proteine chiamate co-chaperonine, tra cui HSP40 negli eucarioti e DnaJ nei procarioti. Queste incrementano di vari ordini di grandezza la velocità di idrolisi dell'ATP da parte di HSP70 in presenza di un peptide interagente. Legandosi strettamente alle sequenze peptidiche nascenti, HSP70 previene anomale aggregazioni e conformazioni che le renderebbero non funzionali. Una volta che la sequenza peptidica è stata ripiegata dallo chaperone Hsp70, un fattore di scambio nucleotidico (BAG-1) stimola il rilascio dell'ADP ed il legame di nuova ATP, aprendo il sito di legame e permettendo il rilascio della proteina. A questo punto il suo ripiegamento può continuare autonomamente, oppure la proteina può essere trasferita ad altri chaperoni. (vedi fig 2).

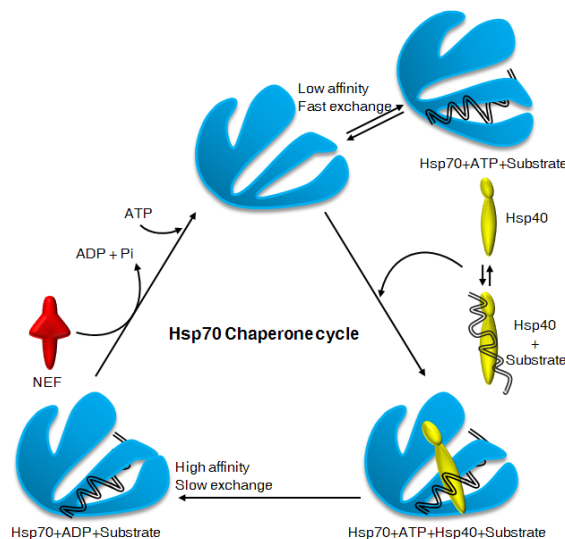


Fig 2: ciclo hsp70

Il sito che lega l'ATP, presente nel dominio all'N-terminale, è situato alla base di una sacca profonda posizionata tra i due lobi strutturali. Il dominio che lega il peptide contiene un subdominio β -sandwich dove risiede la sacca che lega il peptide, e i residui che rivestono la sacca, interagiscono con il tratto idrofobico esposto delle catene polipeptidiche unfolded. Un'estensione ad α -elica, presente al C-terminale, funge da porta per intrappolare il peptide legato nella sacca di legame, tale meccanismo consente di mantenere i complessi per un lungo tempo (*Zhu et al, 1996*). Il legame con l'ATP provoca un movimento conformazionale all'interno del dominio dell'ATPasi che viene trasdotto al dominio che lega il peptide, con conseguente apertura della sacca di legame mediante il sollevamento della porta ad α -elica. In seguito a tale arrangiamento strutturale aperto, il legame e il rilascio del peptide può avvenire rapidamente. L'idrolisi dell'ATP, provoca la chiusura della porta sulla sacca di legame, intrappolando il peptide legato (*Zhu et al, 1996*).

3.4 Meccanismo Regolazione HSP

HSP, sembra coinvolto anche nel trasferimento di certe proteine alla membrana, attraverso il loro temporaneo trattenimento in una forma parzialmente ripiegata. Le forme di stress comportano danneggiamenti del normale ripiegamento di numerose proteine (comportano cioè denaturazione). Una proteina parzialmente denaturata espone più facilmente i suoi residui idrofobici (normalmente rinchiusi nel core proteico protetto dall'acqua) e questi residui sono proprio sito di legame delle proteine Hsp70, che legandovisi, evitano ulteriore denaturazione o aggregazione e favoriscono la rinaturazione. Infine, HSP70 sembra essere capace di partecipare alla rimozione di proteine danneggiate o difettive in cui il ripiegamento non è possibile. Essa può legare e presentare la proteina anomala al fattore CHIP (Carboxyl-terminus of Hsp70 Interacting Protein), che è una ubiquitina-ligasi, garantendo l'inserimento di una etichetta di ubiquitina sulla proteina danneggiata, che verrà così riconosciuta e distrutta (*Krivoruchko, 2010*).

3.5 Meccanismo induttivo di HSP

Nel caso di risposta a stress cellulare, l'attivazione della trascrizione dei geni 'heat shock' è mediata dal fattore HSF1 (Heat Shock Factor 1), che riconosce e lega all'interno dei loro promotori, specifiche sequenze dette HSE (heat shock elements). HSF1, nella sua forma monomerica inattiva, è localizzato nel citoplasma, ma in seguito a segnali stimolatori va incontro ad omo-trimerizzazione, seguita da fosforilazioni in particolari 10 serine, e migra al nucleo. HSF1 contiene un dominio regolatore che presenta siti specifici per fosforilazioni seriniche, costitutive ed inducibili, che modulano l'attività del fattore di trascrizione. (Ad esempio HSF1 è negativamente regolato dalle fosforilazioni in serina 307, 303 e 363; mentre sembra avere una regolazione di tipo positivo, la fosforilazione in serina 230). Ad oggi, i siti specifici coinvolti nell'attivazione di HSF1 sono ancora scarsamente noti. (fig 3).

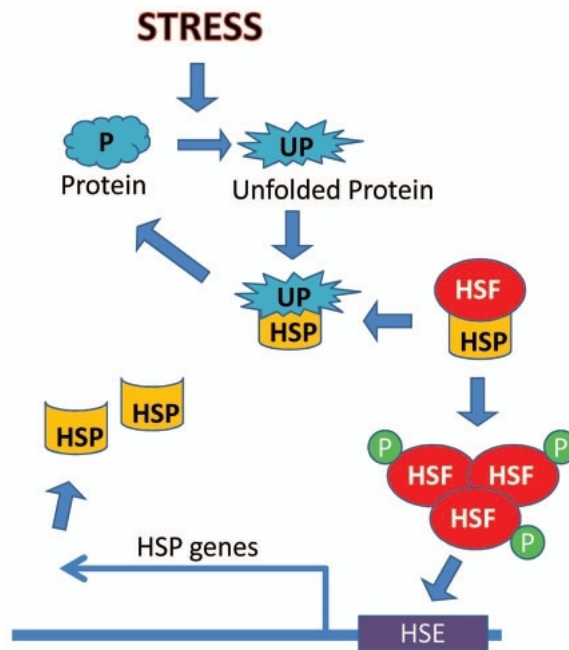


Fig 3: Meccanismo induttivo di HSP

(<http://pdslab.biochem.iisc.ernet.in/hspir/hsp70.php>)

3.6 HSP70 e IRA in terapia intensiva

Lesioni renali associate a condizioni di Ischemia / riperfusione (I / R) sono le principali cause di danno renale acuto in reni nativi e trapiantati (*Friedewald et al, 2004*). L'IRA si verifica in circa il 5% dei pazienti ricoverati in ospedale, ma raggiunge elevate percentuali, 40-60%, nell'ambito della terapia intensiva (ICU). Nonostante i miglioramenti tecnici di assistenza clinica e lo sviluppo di strategie preventive, l'incidenza di IRA è aumentata in modo significativo negli ultimi 15 anni a causa dell'invecchiamento della popolazione e delle malattie in crescente manifestazione, come obesità, diabete e ipertensione. Dunque, malgrado gli sforzi e i progressi nello sviluppo di nuove terapie, il tasso di mortalità rimane tra il 40 e l'80%, soprattutto perché gli strumenti attualmente utilizzati per la diagnosi precoce di danno renale acuto non sono sufficientemente sensibili o specifici. È ben noto che, durante la malattia, diversi meccanismi sono attivati per compensare il danno cellulare risultante; uno di questi meccanismi di compensazione è "l'up-regulation" di proteine da shock termico (Hsp), che aiutano a ripristinare l'omeostasi cellulare. La sottofamiglia HSP70, in particolare, promuove l'espressione dell'isoforma HSP72 in risposta a stress cellulare. Diversi studi hanno dimostrato che HSP72 è osservabile in tubuli danneggiati dopo insulto renale ischemico e tossico (*Molinas et al, 2010 Zhipeng et al, 2006*). Da qui derivò l'ipotesi che, il livello di HSP72 urinario avrebbe potuto soddisfare il ruolo di biomarcatore precoce per individuare, monitorare e / o diversificare la gravità del danno renale in caso di IRA. Le prestazioni di HSP72 come biomarcatore sensibile per rilevare i diversi gradi di danno renale e di recupero, in soggetti ICU è stata confermata tramite analisi istopatologia e da diversi studi sperimentali, effettuati in primis su ratti e successivamente sull'uomo. Per quanto riguarda il modello animale, sono stati indotti in cinque gruppi di ratti vari periodi di ischemia renale bilaterale (da 10 a 60 min); tutti i ratti sono stati studiati dopo 24 ore di riperfusione. Come previsto, la disfunzione renale peggiore è stata osservata negli animali sottoposti a 60 min di ischemia bilaterale, con un aumento evidente dei livelli urinari di HSP72, misurati tramite test ELISA. L'entità del danno tubulare è stata anche rilevata al microscopio ottico. Sezioni di rene di ratto sottoposti a diversi periodi di ischemia, hanno mostrato una dilatazione del lume e un distacco cellulare dalle membrane basali tubolari, rafforzando l'ipotesi che un aumento progressivo di danno tubulare fosse proporzionale al periodo di ischemia provocata. Anche i livelli di HSP72 mRNA erano significativamente aumentati già dopo 10 min di ischemia bilaterale. La massima espressione di HSP72 è stata osservata nel

gruppo con grave danno tubulare (60 min), circa 30 volte maggiore rispetto ai livelli di controllo. Questi risultati mostrano che HSP72 viene gradualmente aumentata rispetto all'intensità del danno renale. Inoltre, questi dati sperimentali sono stati confermati negli esseri umani che hanno sofferto di IRA. Un aumento significativo urinario HSP72 è stato validato in pazienti con diagnosi di IRA anche 48 ore prima di SCr, rivelando che HSP72 è un biomarcatore promettente sia per la diagnosi precoce e la stratificazione di IRA, anche nel modello umano. Prelevando campioni di urina in pazienti gravi di terapia intensiva (ventilazione meccanica, insufficienze multi-organo, chirurgia maggiore), che avevano sviluppato IRA, e confrontandoli con quelli di donatori sani, è stata effettuata una stima dei livelli di HSP 72 sia con Western Blot che con test ELISA. HSP72 nei soggetti sani risultò praticamente impercettibile, al contrario, i pazienti manifestanti IRA clinica, esibivano un brusco aumento della proteina. In particolare, nei pazienti di IRA deceduti durante il ricovero, si osservò un aumento massiccio di HSP72. A questo proposito, questa proteina potrebbe anche servire come biomarker di morte associata all'insufficienza renale acuta. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per valutare la questione (*Han et al, 2009*; *Yamamoto et al, 2007*).

4. Il test ELISA

ELISA è l'acronimo dell'espressione Enzyme Linked Immunosorbent Assay, una tecnica di analisi immunoenzimatica utilizzata per rilevare la presenza di un dato antigene in un campione, o per misurare la concentrazione di anticorpi nel campione in esame (si analizza il plasma sanguigno per esempio nel test per l'AIDS). L'analisi tramite ELISA, unisce la specificità della reazione antigene-anticorpo (reazione immunologica) con la sensibilità di un dosaggio spettrofotometrico di un enzima (fosfatasi alcalina, perossidasi etc.). La sostanza da rilevare può essere un antigene appartenente ad un patogeno oppure una molecola più piccola, aptene. Nell'ambito dei vari metodi immunoenzimatici, la denominazione ELISA si riferisce esclusivamente ai sistemi in fase eterogenea, sistemi in cui anticorpi o antigeni sono adsorbiti o legati ad un substrato solido. L'Antigene è una molecola che può legarsi ad una specifica immunoglobulina, grazie ad una struttura specifica detta epitopo. Una singola molecola di antigene può contenere diversi epitopi riconosciuti da anticorpi differenti. L'anticorpo (o immunoglobulina) è una glicoproteina del siero con una peculiare struttura quaternaria che le conferisce una forma a "Y". È costituito da una regione costante, comune a tutte le immunoglobuline appartenenti allo stesso isotipo, e una regione variabile che contiene invece il sito di combinazione con l'antigene e che è quindi variabile a seconda della specificità dell'anticorpo per un dato antigene. L'ELISA ha una elevata selettività nei confronti degli analiti da determinare. La tecnica si basa sul fatto che, con adatti procedimenti, è possibile coniugare gli anticorpi di un siero con alcuni enzimi (perossidasi, fosfatasi alcalina, beta-galattosidasi) senza alterarne la capacità di combinazione con gli antigeni corrispondenti. Nei formati commerciali le reazioni vengono, di norma, eseguite all'interno di pozzetti di polivinile o polistirene (micropiastre da 12 strip da 8 pozzetti ciascuna per un totale di 96 pozzetti) su cui sono adesi, a seconda dei casi, gli anticorpi specifici per l'antigene di interesse o l'antigene stesso. All'interno dei pozzetti vengono incubati i campioni da analizzare (plasma, siero, urina, omogenati tissutali, latte etc.) e gli opportuni reagenti intervallati da lavaggi volti a rimuovere i materiali in eccesso. Infine, si aggiunge il substrato che dà origine ad un complesso colorato. Ci sono diversi varianti del test ELISA, che si differenziano secondo il componente che si vuole rilevare. Nel test diretto viene determinata la presenza dell'antigene, in quello indiretto, la presenza di anticorpi contro l'antigene. Il saggio può essere *competitivo* o *non competitivo*. L'ELISA non competitivo

diretto si effettua secondo diverse metodiche: semplice e sandwich. I saggi tipo sandwich sono generalmente utilizzati per la ricerca di molecole ad alto peso molecolare, come ad esempio, le proteine. Quando invece gli antigeni sono molecole a basso peso molecolare, come nel caso della ricerca di residui di farmaci o ormoni, i saggi sono sempre di tipo competitivo. Per i test competitivi, maggiore è la concentrazione di antigene, minore sarà il numero di immunocomplessi rilevabili per cui, esiste una proporzionalità inversa tra il segnale registrato (assorbanza) e concentrazione.

Nell'ELISA competitivo di tipo diretto l'anticorpo specifico per l'analita è adsorbito sulla superficie dei pozzetti della micropiastra. Il campione in esame, nel quale si deve determinare la presenza dell'analita (antigene libero), e una quantità prefissata di coniugato (antigene legato all'enzima) vengono depositati nei vari pozzetti. Durante la fase di incubazione, l'antigene coniugato compete con l'antigene libero, eventualmente presente nel campione, per i siti di legame degli anticorpi adesi nei pozzetti. Quindi, il materiale non reagito viene rimosso grazie ad opportuni lavaggi e la quantità di analita coniugato, legata dagli anticorpi immobilizzati, è quantificata mediante l'aggiunta di un substrato che forma un prodotto colorato. La reazione viene arrestata mediante l'aggiunta di una soluzione acida (stop solution) e la lettura spettrofotometrica è effettuata a 450 nm (giallo).

Nell'ELISA competitivo di tipo indiretto è l'analita (antigene, X), generalmente legato ad una proteina carrier come l'albumina di siero bovino, ad essere adsorbito sulla superficie dei pozzetti. Il campione viene addizionato nei pozzetti e successivamente si aggiunge una quantità prefissata di anticorpo specifico per l'analita. Durante la fase di incubazione, gli anticorpi in soluzione si ripartiscono tra l'analita libero (X), eventualmente presente nel campione in analisi, e l'analita immobilizzato sulla superficie solida del pozzetto. Tutto ciò che non ha reagito durante l'incubazione viene successivamente rimosso mediante lavaggi e la quantità di anticorpo legato all'analita specifico nel pozzetto viene quantificata mediante aggiunta di un secondo anticorpo enzima-coniugato che si lega al primo. In seguito ad una seconda fase di incubazione e ai lavaggi, si aggiunge il substrato, si arresta la reazione e si procede alla lettura. Anche in questo caso, la quantità di colore sviluppatosi risulterà inversamente proporzionale alla quantità di analita libero nel campione. Sempre nei saggi competitivi di tipo indiretto, in alcuni casi, nella superficie dei pozzetti sono adesi, invece che gli antigeni, degli anticorpi in grado di legare anticorpi anti-antigene (X). Durante l'esecuzione del test, si aggiunge la soluzione contenente gli anticorpi anti-

antigene che si legano agli anticorpi adesi. Con l'aggiunta simultanea del coniugato e del campione (in cui può essere eventualmente presente l'analita libero (X) si origina la reazione di competizione per i siti anticorpali già vista sopra. Si procede infine ai lavaggi e all'aggiunta del substrato. La reazione viene arrestata mediante una soluzione acida (stop solution), che muta il colore da blu a giallo e la lettura spettrofotometrica è effettuato a 450nm.

Scopo della tesi

Lo scopo di questa tesi è la validazione di marcatori biologici, di nuova generazione, plasmatici ed urinari capaci di fornire una diagnosi di IRA sviluppata in pazienti ospedalizzati dopo interventi di chirurgia maggiore. Lo studio è stato condotto in collaborazione con la scuola di specializzazione in nefrologia e con i reparti di chirurgia colo-rettale e di terapia intensiva dell'AOUP di Pisa. Per valutare se l'aumento dei marcatori espressi, in particolare della proteina HSP 70, rilevasse un principio di danno renale acuto, in accordo con la letteratura scientifica, si sono analizzati sieri e urine appartenenti a pazienti ricoverati in terapia intensiva dopo interventi di chirurgia maggiore, a carico del fegato. Il dosaggio dell'HSP70 è stato effettuato tramite test ELISA, diluendo il siero in rapporto 1:4, contrariamente alle urine che sono state utilizzate non diluite. In previsione di ciò, è stata esaminata, come controllo negativo, una popolazione di "sani", (con questo termine si fa riferimento ad una popolazione che non presenta IRA accertata), ed una popolazione con insufficienza renale cronica conclamata, per confermare l'assenza del marcatore d'interesse in questi soggetti. Avendo ottenuto risultati soddisfacenti, è stato proseguito lo studio con le indagini successive. Quindi sono stati analizzati gruppi di pazienti sottoposti a chirurgia maggiore di entrambi i sessi e con età differente, prelevando vari campioni, rispettivamente di sieri e urine, nei diversi giorni di degenza ospedaliera. Nello specifico, i prelievi sono stati effettuati il giorno prima dell'intervento, il giorno stesso dell'operazione e i successivi 4 post- operatori. Sono stati analizzati i dati relativi all'HSP70 e ad altri marcatori plasmatici ed urinari di interesse nefrologico e si sono costruiti dei grafici in modo da definire l'andamento (profilo) del marker nelle giornate pre- e post- operatorie.

Pazienti e Metodi

1.1 Pazienti

I valori normali (Range di riferimento) plasmatici ed urinari di HSP 70 sono stati ottenuti dalla misura in campioni di plasma e di urine di 100 individui (50 maschi e 50 femmine) apparentemente sani, donatori di sangue, senza anamnesi di malattie renali con un età media di 36 anni per gli uomini e 38 anni per le donne, come riportato in *tabella VIII*. Sono stati inoltre esaminati, come controllo negativo, 12 pazienti (7 maschi e 5 femmine) con insufficienza renale cronica (creatininemia 0,98-5,7 m=2,1; GFR 12,5-76,0 m 42,6). Successivamente, prelevando campioni di plasma e siero negli stessi individui, è stata misurata la concentrazione di HSP70 e creatininemia, calcolandone la media con SD.

Tabella VIII “Valori normali” in 100 donatori di sangue e in 12 nefropatici cronici

| Sesso | Numero pazienti | Range età anni | Età media ± SD | HSP70 plasma ± SD | HSP70 urine ± SD |
|------------------------|------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Maschi | 50 | 19-60 | 36 ± 11 | 0,075 ± 0,655 | 0,092 ± 0,348 |
| Femmine | 50 | 18-59 | 38 ± 12 | 0,073 ± 0,554 | 0,071 ± 0,308 |
| Nefropatici cronici | 12 | 25-81 | 52,4±18,2 | 0 | 0,034 ± 0,211 |

Per quanto riguarda lo studio sui pazienti, sono stati selezionati individui sottoposti a chirurgia maggiore per resezione epatica (27 uomini e 6 donne). I principali dati antropometrici dei pazienti sono riportati nella *tabella IX*. Per ogni soggetto è stato annotata: età, altezza, peso, indice di massa corporea (BMI), livelli di creatininemia basale e clearance della creatinina, calcolandone la media con SD.

Tabella IX “Dati antropometrici dei pazienti”

| Pazienti | Range | Media ± 2SD |
|------------------------|--------------|--------------------|
| Età (anni) | 36 – 84 | 64 ± 25 |
| Altezza (metri) | 1,37 – 1,86 | 1,70 ± 0,20 |
| Peso (Kg) | 45,5 – 131 | 82,1 ± 29,4 |

| | | |
|--|-------------|----------------|
| BMI | 22,9 – 42,3 | 82,1 ± 29,4 |
| Creatininemia basale (mg/dl) | 0,58 – 1,53 | 0,92 ± 0,50 |
| Clearance della creatinina (ml/min) | 3,7 – 796,9 | 131,23 ± 50,52 |

Nella *Tabella X* sono elencate le patologie che i pazienti presentavano al momento del ricovero ospedaliero prima dell'intervento chirurgico. Come descritto, la maggior parte delle patologie è rappresentata da metastasi multiple e resezione di noduli epatici metastatici.

Tabella X: Valutazione patologie al momento del ricovero

| Malattie di base | N° totale (33) |
|------------------------------------|-----------------------|
| <i>Metastasi multiple epatiche</i> | <i>10</i> |
| <i>Carcinoma epatico primitivo</i> | <i>2</i> |
| <i>Resezione nodulo epatico</i> | <i>8</i> |
| <i>Metastasi singola</i> | <i>3</i> |
| <i>Lesioni epatiche</i> | <i>1</i> |
| <i>Adenocarcinoma</i> | <i>1</i> |
| <i>Epatetctomia allargata</i> | <i>1</i> |
| <i>Colangiocarcinoma</i> | <i>2</i> |
| <i>Policistosi epatica</i> | <i>2</i> |
| <i>Litiasi intraepatica</i> | <i>1</i> |
| <i>Noduli epatici</i> | <i>3</i> |

La durata media dell'intervento era di circa 692 minuti (range 210- 1380 min) e presentava una deviazione standard di 325,94.

Il protocollo di studio prevede che per ogni paziente sottoposto ad intervento chirurgico di resezione epatica sia fatto un prelievo di plasma e urina il giorno prima dell'intervento (giorno -1, basale), il giorno dell'intervento (intraoperatorio) e i successivi 4 giorni successivi all'intervento (1°, 2°, 3° e 4° giorno post-operatorio). Su ogni campione sono stati dosati gli analiti di interesse nefrologico ed epatico.


1.2 Metodi


1.2a Dosaggio di HSP70


Il rilevamento di HSP70 nei campioni di siero e urine è stato effettuato tramite Hsp70 High Sensitivity kit ELISA (Enzo® Life Sciences, New York, USA). Il kit HSP 70 è caratterizzato da una specificità per Hsp70 umana del 100%, da una sensibilità (o limite di rilevazione) di 0,09 ng / mL. (Vedi fig 4).

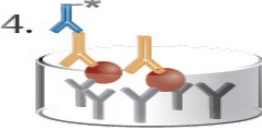
Principio del kit:


Figura 4: Principio del kit

- 

1. I campioni e gli standard vengono aggiunti a pozzetti rivestiti con un anticorpo monoclonale specifico per Hsp70. La piastra viene quindi incubata a temperatura ambiente;
- 

2. La piastra viene lavata, in modo tale da eliminare i residui e lasciare Hsp70 sul fondo del pozzetto. Quindi viene aggiunta per ogni pozzetto una soluzione di anticorpo policlonale specifico per Hsp70 che si lega specificatamente all'antigene. La piastra viene nuovamente incubata e lavata per rimuovere l'anticorpo in eccesso;
- 

3. Una soluzione di anticorpo secondario coniugato con perossidasi viene aggiunta a ciascun pozzetto, e incubata;
- 

4. Dopo lavaggio si procede con l'aggiunta di un substrato. La soluzione appare blu;
- 

5. L'aggiunta di una soluzione di stop, conferisce una colorazione gialla; Si effettua la lettura a 450 nm in un lettore per piastre (Wallac Victor² 1420 Multilabeled Counter, PerkinElmer). La quantità di segnale è direttamente proporzionale alla concentrazione di Hsp70 nel campione.

Il Kit comprende i seguenti materiali:

- Tampone del saggio 50 mL, soluzione salina Fosfato- tamponata contenente BSA e detergente;
- Hsp70 (10 ug / mL) 25 uL;
- Micropiastra da 96 pozzetti sui quali è stato depositato un anticorpo monoclonale di topo specifico per Hsp70;
- Tampone di lavaggio concentrato 20x (Wash Buffer) 100 ml, contenente detergenti salini;
- Anticorpo policlonale di coniglio ad alta sensibilità per Hsp70, 10 mL (soluzione gialla);
- IgG anti-coniglio di capra coniugato a perossidasi di rafano Hsp70, 10 mL (soluzione blu);
- substrato TMB (3,3', 5,5' tetrametilbenzidina) e perossido di idrogeno, 10 mL;
- Stop Solution (1N acido cloridrico in acqua), 10 mL;
- Adesivi copri-piastra.

Preparazione dei reagenti:

1. Tampone di lavaggio

Si prepara il tampone di lavaggio diluendo 50 ml del tampone concentrato in dotazione con 950 ml di acqua deionizzata. Questo può essere conservato a temperatura ambiente fino alla scadenza del kit, o per 3 mesi;

2. Standard: 125 ng / mL Hsp70 (eppendorf A)

Si pipettano 395 uL di tampone del saggio in una eppendorf e si aggiungono 5 uL della soluzione di Hsp70 “vortexando” delicatamente.

3. Hsp70 Curva Standard

Il tampone così come lo standard ed i campioni diluiti devono essere tenuti in ghiaccio e utilizzati entro 60 minuti dalla preparazione per ottenere prestazioni ottimali;

Si contrassegnano 7 eppendorf con le sigle S1 a S7 e si pipettano 900 ul del tampone del saggio nel tubo S1 e 500 ul nelle eppendorf da S2 fino ad S7. Si aggiungono 100 ul dello

Standard in S1 (vortexando delicatamente). Si aggiungono 500 ul di S1 in S2 vortexando delicatamente e si continua questo per tutte le eppendorf come nello schema: (vedi fig 5).

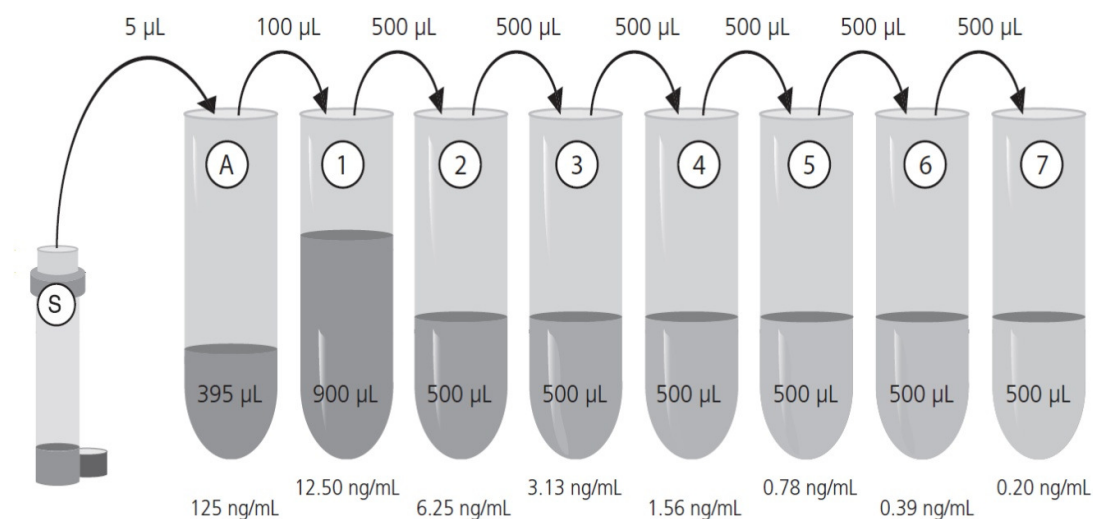


Fig 5: Diluizioni seriali

Preparazione dei campioni:

Si scongelano lentamente i campioni prima del test. Per quanto riguarda le urine non è necessario effettuare diluizione del campione, invece, per i sieri è necessario applicare una diluizione 1:4.

Procedura del test

1. Si pipettano 100 ul di Standard (da S1 a S7) nei relativi pozzetti.
3. Si pipettano 100 ul dei campioni nei pozzetti rimanenti.
4. Si sigilla la piastra che viene incubata in agitazione per 2 ore a temperatura ambiente 25°C. Il processo di agitazione viene effettuato su una piastra o agitatore a orbitale adattato ad una velocità di 350 rpm.
5. Si svuota il contenuto dei pozzetti e si lava con 400 ul di tampone di lavaggio per ogni pozzetto ripetendo 3 volte per un totale di 4 lavaggi. Dopo l'ultimo lavaggio, si svuota e con l'aiuto di carta assorbente si sbatte la piastra più volte per rimuovere qualsiasi residuo del tampone di lavaggio.

6. Si pipettano 100 ul di anticorpo primario (giallo) in ciascun pozzetto.
7. Si sigilla la piastra e si incubare per 1 ora a temperatura ambiente.
8. Si lava come sopra (punto 5).
9. Si aggiungono 100 ul di anticorpo secondario coniugato all'enzima (blu) a ciascun pozzetto.
10. Si sigilla la piastra e si incuba per 1 ora a temperatura ambiente.
11. Si lava come sopra (punto 5).
12. Si pipettano 100 ul di soluzione substrato in ogni pozzetto.
13. Si incuba per 30 minuti a temperatura ambiente.
14. Si aggiungono 100 ul di soluzione di stop in tutti i pozzetti.
15. Si procedere alla lettura della densità ottica a 450 nm con il lettore di piastre (Wallack).

Calcolo dei risultati

Per calcolare la concentrazione di Hsp70 nei campioni si sottrae il valore del bianco dal valore di ogni standard e campione. Quindi si calcola l'equazione lineare della retta e il coefficiente di regressione lineare. Tramite un'interpolazione si calcola quindi la concentrazione incognita dei campioni. Per calcolare la concentrazione di HSP nel siero si moltiplica il risultato per il fattore di diluizione.

1.2b Dosaggio di altri biomarker

I dosaggi di chimica clinica sono stati effettuati presso i Laboratori Analisi dell'AOUP. Prelevando diversi campioni di plasma e urine di tutti i pazienti facenti parte dello studio, nel giorno prima dell'intervento, nel giorno stesso e nei 4 giorni successivi all'operazione, è stata valutata la concentrazione dei seguenti biomarker: LDH, GGT, albuminuria, creatininemia, clearance creatinina, cistatina c, β trace, β 2 microglobulina, NGAL, HSP70 bilirubina e pseudocolinaesterasi. Per ogni biomarker è stata calcolata la concentrazione media (relativa ai 33 pazienti) e la deviazione standard. Nello specifico, le concentrazioni urinarie sono state normalizzate con i valori di creatinuria (espressa in grammi).

Risultati

1.1a Dosaggio ELISA HSP70

L'equazione lineare della retta ottenuta tramite kit ELISA risulta $y = 0,2347x + 0,0248$ e un coefficiente di regressione lineare $R^2 = 0,9983$ (vedi fig 6).

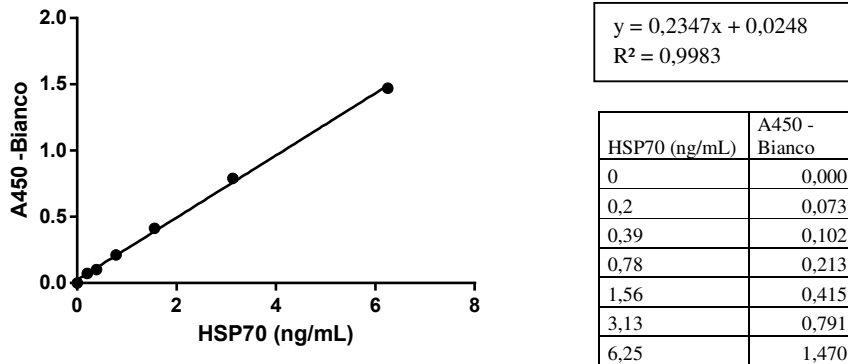


Figura 6: Regressione lineare della concentrazione di HSP 70 in funzione dell'assorbanza a 450 nm

1.1b Pazienti

Per determinare se HSP70 è un biomarcatore sensibile per rilevare IRA negli esseri umani, i livelli di questa proteina sono stati valutati con kit ELISA nel plasma e nelle urine di soggetti normali e con insufficienza renale cronica dichiarata, rispetto ai pazienti che hanno sviluppato IRA in terapia intensiva. IRA è stata definita come un aumento SCr di almeno 0,3 mg / dL, o diuresi $\leq 0,5$ ml /kg/h per oltre 6 h. La tabella sottostante illustra le caratteristiche generali e la funzione renale di 100 donatori sani (50 maschi e 50 femmine) e 12 malati cronici. I dati analizzati di HSP70 sia nel plasma che nelle urine dei soggetti facenti parte del controllo negativo (sani m + f , e cronici), mostrano chiaramente come i livelli medi della proteina siano impercettibili sia valutandoli nel complesso (m+f) che nel singolo gruppo (solo maschi, solo femmine, solo malati cronici). Lo stesso si può dedurre dai valori normali di creatinemia media con SD elencati in tabella XI.

Tabella XI: Valori di HP 70 e creatininemia in Sani e Nefropatici cronici

| | HSP70 plasmatica range (ng/ml) | HSP70 urinaria range (ng/ml) | Creatininemia range (mg/dl) | HSP70 plasmatica media \pm SD | HSP70 urinaria media \pm SD | Creatininemia media \pm SD |
|--------------------------------|---|---|--|---|---|--|
| Sani m+f | 0 – 1,92 | 0 – 0,88 | 0,55 – 1,28 | 0,074 \pm 0,604 | 0,082 \pm 0,348 | 0,846 \pm 0,145 |
| Sani m | 0 – 1,92 | 0 – 0,47 | 0,78 – 1,28 | 0,075 \pm 0,655 | 0,092 \pm 0,348 | 0,948 \pm 0,119 |
| Sani f | 0 – 1,73 | 0 – 0,47 | 0,55- 0,98 | 0,073 \pm 0,554 | 0,071 \pm 0,308 | 0,745 \pm 0,087 |
| Nefropatici Cronici | 0 | 0 – 0,047 | 0,98-5,7 | 0 | 0,034 \pm 0,211 | 2,1 \pm 1,8 |

Per quanto riguarda la valutazione dei marcatori biologici nei pazienti sottoposti ad intervento chirurgico, è stato interessante rapportare le concentrazioni medie dei marker in ogni giornata (media giornaliera dell'intera coorte) con i valori medi basali dei marcatori corrispondenti al giorno prima dell'operazione (-1).

Tutti i risultati riportati in tabella XII e nei rispettivi grafici (fig da 7 (a, b) a 16 (a, b)) sono presentati come media \pm SD. Mediante t test sono state notate delle differenze significative tra i giorni di ricovero. La significatività statistica è stata definita come “*p* -value <0,05.

Tabella XII: Valutazione plasmatica e urinaria dei marcatori durante la degenza ospedaliera

| Tempo | Basale | Intraoperatotrio | 1° giorno | 2° Giorno | 3° giorno | 4° giorno |
|------------------------------------|-------------------|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| Biomarker | Media ± Sd | Media ± sd | Media ± Sd | Media ± Sd | Media ± Sd | Media ± sd |
| LDH urine, U/L | 53,44 ± 36,22 | 82,59 ± 62,39 | 108,53 ± 112,55 | 100,84 ± 74,55 | 83,28 ± 36,70 | 112,04 ± 125,46 |
| γGT urine U/L | 39,35 ± 37,03 | 80,07 ± 50,91 | 259,75 ± 408,55 | 170,00 ± 213,37 | 143,67 ± 143,75 | 302,47 ± 871,68 |
| Albuminuria mg/L | 33,03 ± 65,23 | 259,15 ± 471,56 | 51,70 ± 59,60 | 42,70 ± 37,64 | 80,27 ± 94,81 | 90,13 ± 93,33 |
| Pseudocolinesterasi, U/ml | 7463,29 ± 1587,28 | 5727,35 ± 1558,7 | 4223,70± 1066,61 | 3967,57± 958,01 | 3800,00± 970,79 | 3902,77± 996,64 |
| Bilirubina totale, mg/dl | 0,62 ± 0,40 | 1,03 ± 0,79 | 1,57 ± 1,29 | 1,87 ± 2,85 | 1,70 ± 2,34 | 1,68 ± 2,16 |
| Clearance creatinina, ml/min | 121,51 ± 59,86 | ND | 154,67 ± 118,93 | 159,62 ± 88,74 | 174,01 ± 127,12 | 169,32 ± 167,27 |
| Creatininemia, mg/dl | 0,92 ± 0,25 | 0,79 ± 0,23 | 0,92 ± 0,31 | 0,94 ± 0,66 | 0,96 ± 0,88 | 1,02 ± 0,94 |
| βtrace plasma, mg/L | 0,75 ± 0,27 | 0,61± 0,35 | 0,57 ± 0,25 | 0,68 ± 0,40 | 0,64 ± 0,40 | 0,63 ± 0,38 |
| βtrace urine, mg/g creat | 3,77 ± 2,63 | 5,86 ± 5,57 | 15,80 ± 20,93 | 9,20 ± 5,36 | 8,92 ± 7,25 | 6,28 ± 4,68 |
| β2microglobulina plasma, mg/L | 2321,67± 848,70 | 1825,16± 672,52 | 2051,43± 852,32 | 2400,38± 1326,22 | 2575,36± 1785,73 | 2576,92± 1575,94 |
| β2microglobulina urine, mg/g creat | 66,51 ± 127,17 | 3555,10± 8085,77 | 16218,27 ± 21879,22 | 24966,21 ± 54685,63 | 12282,70 ± 21508,50 | 6288,62 ± 15015,25 |
| CistatinaC plasma, mg/L | 0,86± 0,34 | 0,56 ± 0,27 | 0,65± 0,31 | 0,80± 0,38 | 0,82± 0,52 | 0,83± 0,52 |
| CistatinaC urine, mg/g creat | 0,04± 0,02 | 0,11± 0,11 | 0,56± 1,18 | 0,59± 0,98 | 0,60± 1,25 | 0,27± 0,63 |
| NGAL plasma, ng/ml | 173,53± 249,97 | 110,11± 60,97 | 162,91± 120,30 | 150,08± 139,41 | 154,75± 178,05 | 124,19± 81,37 |
| NGAL urine, ng/g creat | 33,32± 48,27 | 25,18± 26,07 | 193,65± 485,74 | 84,77± 130,19 | 118,29± 259,61 | 50,44± 36,81 |
| HSP70 plasma, ng/ml | 0,42± 0,65 | 0,56± 0,80 | 1,06± 2,22 | 1,85± 3,92 | 1,35± 4,04 | 0,81± 1,54 |
| HSP70 urine, ng/g creat | 0,74± 0,84 | 0,81± 0,41 | 2,38± 3,43 | 0,62± 0,66 | 0,83± 1,77 | 0,59± 0,88 |

Nei grafici seguenti è riportata la concentrazione media dell'analita nei giorni di ospedalizzazione. Gli asterischi indicano il grado di significatività: * $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ e *** $p < 0,0001$.

L'Hsp70 nelle urine aumenta significativamente nel giorno +1 di circa 4 volte rispetto al suo valore basale; la proteina a livello plasmatico presenta un picco al giorno +1, ma non risulta significativo, in entrambi i grafici però risulta evidente che il suo andamento una volta raggiunto l'apice decresce progressivamente, tornando ai valori basali, come se una sua minor espressione fosse indice di una fase di recupero del paziente.

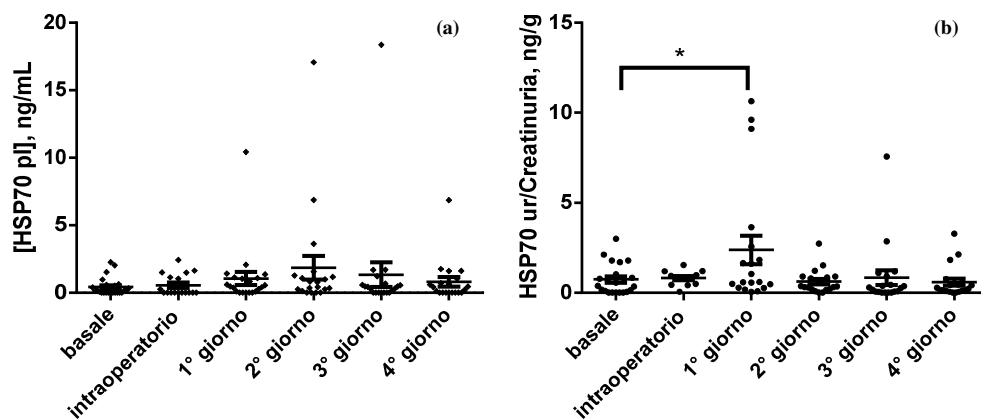


Figura 7: Andamento di HSP 70 nel plasma (a) e nelle urine (b)

Risulta interessante il livello particolarmente elevato nei due pazienti deceduti, in questo senso, HSP70 potrebbe risultare un parametro di valutazione importante per diagnosticare l'evento di mortalità; tutt'oggi non è stata ancora confermata questa teoria. (vedi fig7 a,b).

L'NGAL nelle urine normalizzato su g di creatinuria aumenta nel giorno +1 rispetto ai valori basali ma i valori non risultano significativi; mentre i livelli di NGAL plasmatici non risultano evidenziare particolari differenze (restano costanti indistintamente durante il periodo di ricovero). (vedi fig8 a,b).

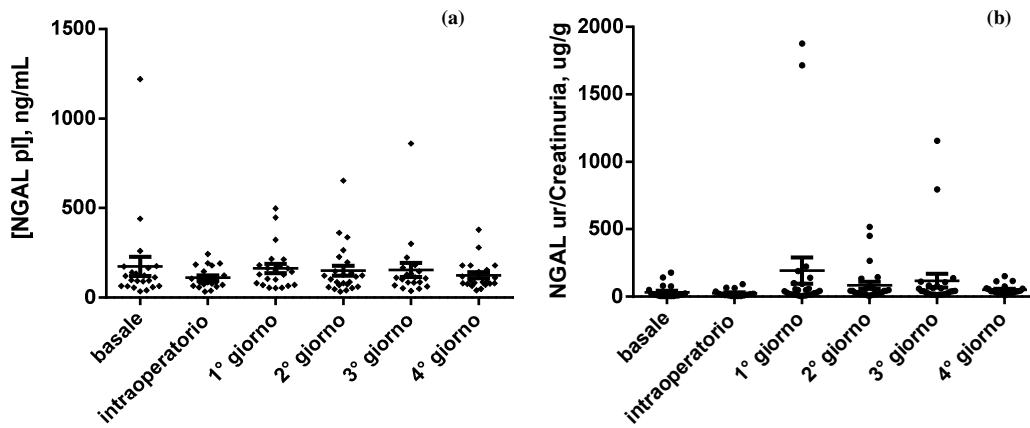


Fig8: Andamento NGAL nel plasma (a) e nelle urine (b)

La microalbuminuria presenta un aumento significativo di 7 volte nell'intraoperatorio (giorno 0) e di 3 volte nel giorno +4 rispetto a quella basale (-1) (vedi fig9).

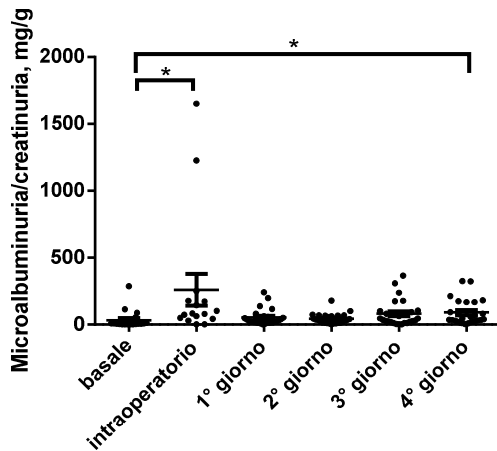


Fig9: Andamento microalbuminuria

Nel profilo della cistatina C plasmatica si osservano due differenze significative al giorno 0 e al giorno +1, più interessante risulta la variazione nelle urine, il valore basale aumenta rispettivamente di 14, 15 e 16 volte rispettivamente ai giorni +1,+2,+3. (vedi fig10 a, b).

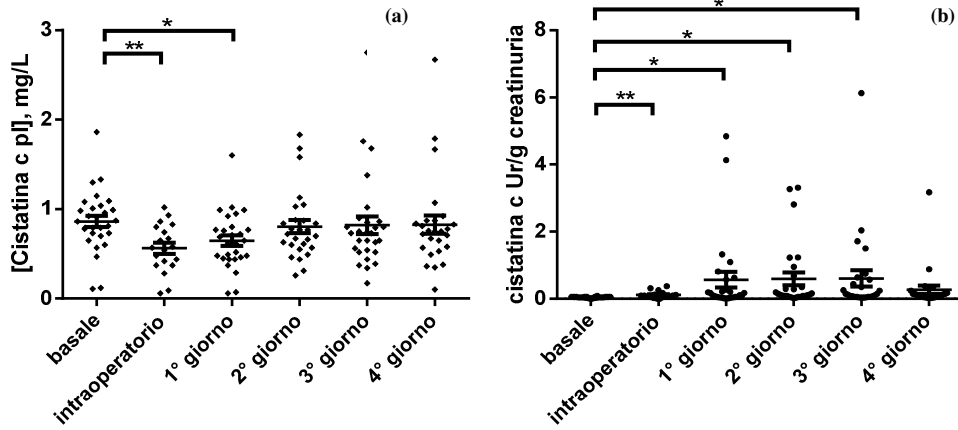


Fig10 : Andamento cistatina c nel plasma (a) e nelle urine (b)

La β trace plasmatica presenta una riduzione significativa rispetto al valore basale nel giorno +1. Nelle urine si osservano quattro eventi significativi dal giorno +1 al giorno +4 la concentrazione aumenta per poi diminuire progressivamente, restando comunque maggiore rispetto al -1. (vedi fig11 a, b).

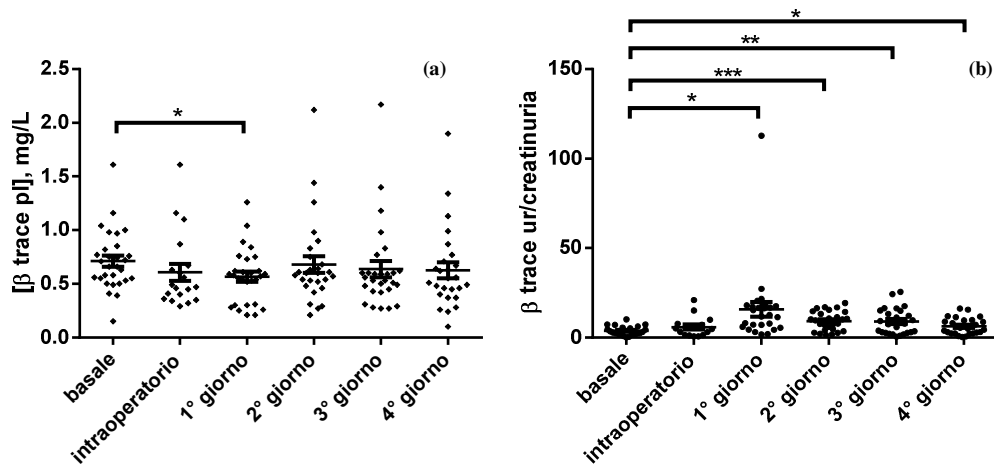


Fig11 : Andamento β trace nel plasma (a) e nelle urine (b)

Le γ gt aumentano nel plasma significativamente in tutto il periodo di ospedalizzazione rispetto al giorno -1. Nelle urine aumenta nell'intervallo giornaliero che va dall'intraoperatorio al giorno +4, anche se i valori risultano significativi rispetto alla concentrazione basale solo nei giorni 0, +1, +2, +3. (vedi fig12 a, b).

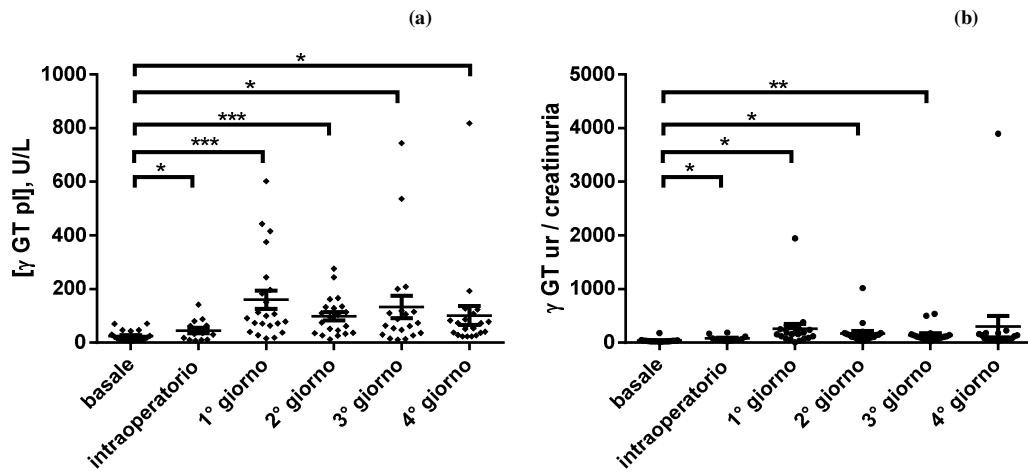


Fig12 : Andamento γ gt nel plasma (a) e nelle urine (b)

L'Ldh risulta aumentare in modo significativo in relazione al giorno (-1) nelle giornate post operatorie (+2) e (+3). (vedi fig13).

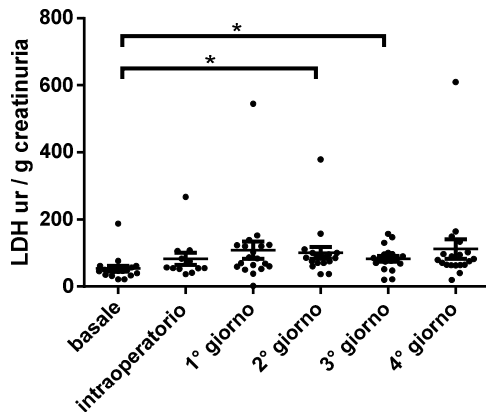


Fig 13: Andamento LDH nelle urine

Le β_2 microglobuline nel plasma diminuiscono rispetto al basale nel giorno 0 di 1,5 volte; nelle urine, aumentano significativamente dal giorno 0 al +4, con un picco evidente tra i giorni +1 e +2 dove la concentrazione risulta rispettivamente 245 e 378 volte maggiore. Nei giorni a seguire decrescono quantitativamente ma restano comunque di 4 volte superiore rispetto al giorno -1. (vedi fig14 a, b).

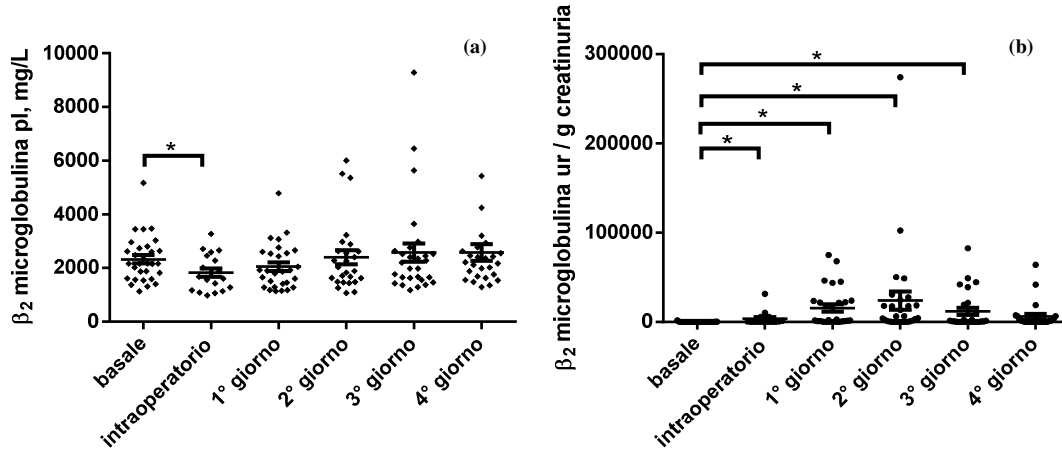


Fig14 : Andamento β_2 microglobulina nel plasma (a) e nelle urine (b)

La creatininemia e clearance creatinina, non evidenziano particolari differenze significative in riferimento ai valori basali analizzati. (vedi fig15 a, b).

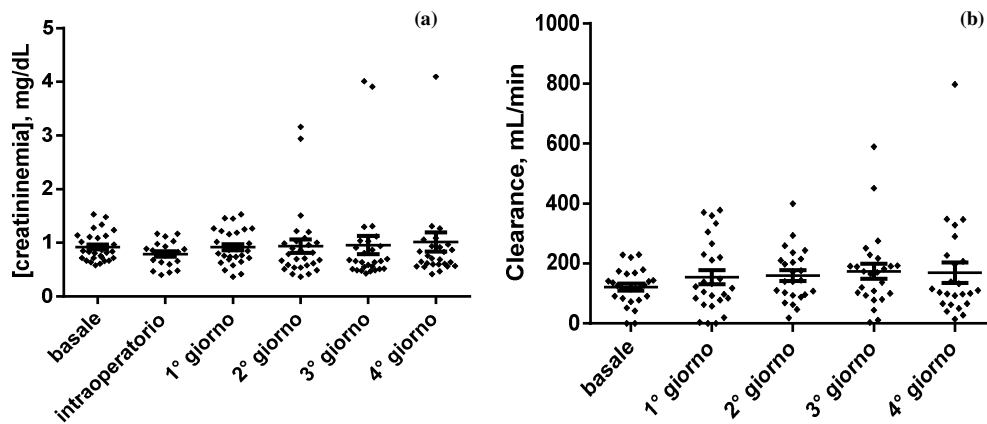


Fig15 : Andamento della creatininemia (a) e clearance (b) della creatinina

Sono stati inoltre presi in considerazione due marker di massa (Pseudocolinaesterasi) e funzione (Bilirubina) epatica. In particolare i dati analizzati evidenziano che la Bilirubina aumenta nelle urine significativamente dal giorno 0 al +4 in riferimento ai livelli basali, e la Pseudocolinaesterasi diminuisce in maniera significativa in tutte le giornate operatorie rispetto al -1. (vedi fig16 a, b).

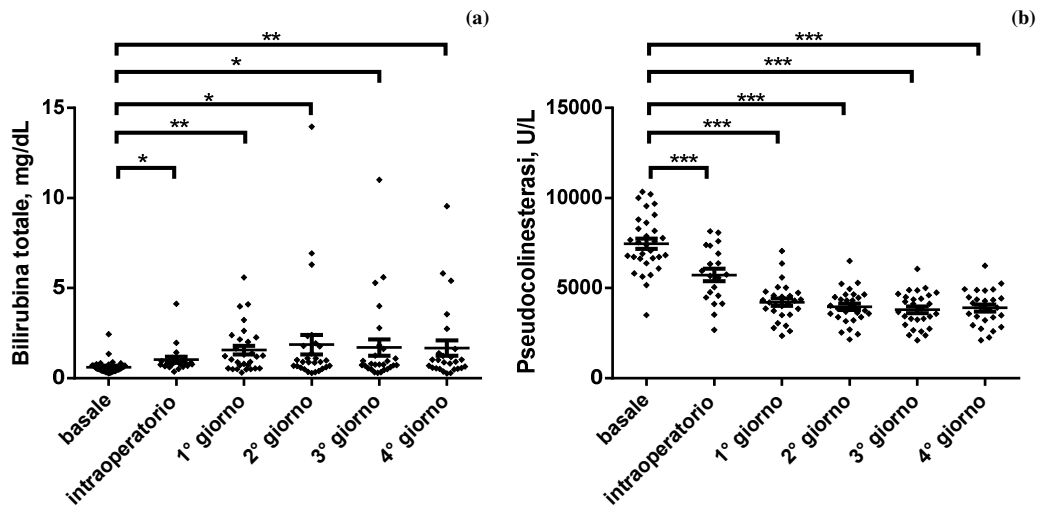


Fig16 : Andamento della bilirubina totale e della pseudocolinaesterasi

Discussione e Conclusioni

In generale in letteratura (Bobadilla, 2011) si osserva che nel periodo di ospedalizzazione la disfunzione renale è caratterizzata da una graduale riduzione della clearance della creatinina mentre aumentano i livelli di proteinuria e della maggior parte dei marcatori analizzati, specialmente tra i giorni 0 e +1. In contrasto con la bibliografia, nei dati sopra citati non si evidenzia una riduzione della clearance della creatinina, probabilmente perché questi soggetti presentano patologie pregresse e differenti che possono portare ad un alterazione finale dei risultati. I livelli di HSP70 plasmatici ed urinari sembrano invece rispecchiare quelli proposti dalla letteratura odierna. Come mostrano le tabelle precedenti le analisi condotte sulle urine mostrano una sensibilità maggiore nel rilevamento della proteina, rispetto a quelle effettuate su plasma. Le concentrazioni di HSP70 risultano crescenti nei primi giorni di ricovero, aumentando notevolmente nei pazienti più gravi, e diminuendo in quelli in fase di recupero. Tutto questo porta a confermare la specificità e la sensibilità di HSP70 per la diagnosi del danno renale acuto, per la valutazione del recupero dei pazienti dopo chirurgia maggiore e probabilmente anche come biomarker di mortalità.

Differentemente NGAL, le cui concentrazioni aumentano indistintamente durante il periodo dell'ospedalizzazione sia nel plasma che nelle urine, non risulta essere un marcatore specifico di danno renale acuto, soprattutto per quanto riguarda la classificazione

del danno renale e una possibile valutazione di recupero, ed i dati ottenuti corrispondono a quelli presenti nelle bibliografie. L'albuminuria si conferma un marcatore predittivo di IRA, come descritto precedentemente. La cistatina C aumenta sensibilmente rispetto ai valori basali, ma la letteratura non accerta la specificità del marcatore in IRA, certamente resta un parametro importante da valutare per poter perfezionare al meglio la diagnosi.

In conclusione, sebbene lo sviluppo in ambito medico e scientifico degli ultimi anni abbia portato alla scoperta di nuovi marcatori biologici, gli elementi a oggi disponibili per effettuare una corretta e precoce diagnosi dell'IRA in terapia intensiva restano insufficienti. La maggior parte dei marker analizzati mostra un ruolo importante nella diagnosi della patologia ma non la specificità richiesta per una diagnosi precoce del danno renale acuto nei pazienti dopo chirurgia maggiore, in quanto risultano espressi anche in altre patologie. Tra questi, l'unico ad essersi distinto per la specificità sembra essere la proteina HSP70, sia negli esperimenti effettuati sui ratti che sull'uomo, soprattutto nella valutazione urinaria.

Bibliografia

Barrera J, Pérez VR, Cortés-González C, Cervantes M, Gamba G, Morales-Buenrostro L, Bobadilla N. *Hsp72 is an early and sensitive biomarker to detect acute kidney injury*. EMBO Molecular Medicine (2011).

Basu S, Bhattacharya M, Chatterjee T, Todi S and Majumdar A. *Significant microalbuminuria, on admission to the ICU, may indicate AKI in patients with sepsis*. AMRI Hospitals, Kolkata, India Jadavpur University, Kolkata, India (2010).

Berne RM, Levy M, Koeppen M, Bruce A. Stanton. *Principi di Fisiologia*. Milano: Ambrosiana; (2000) p:178-199.

Bobadilla N. *Hsp72 is an early and sensitive biomarker to detect acute kidney injury*. EMBO Molecular Medicine (2011).

Brenner BM, Floyd CR. *The kidney*. 4st Ed. Minnesota: Saunders; (1991).

Brunzel NA. *Fundamentals of Urine and Body Fluid Analysis*. 3rd Ed. Philadelphia: Saunders; (2013) sez 7:p:109-148.

El-Abdellati E, Eyselbergs M, Sirimsi H, Van Hoof V, Wouters K, Verbrugghe W, Jorens P. *An observational study on rhabdomyolysis in the intensive care unit. Exploring its risk factors and main complication: acute kidney injury*. Annals of Intensive Care (2013); (3):8.

Fogo A, Cohen HA, Colvin R, Jennette L, Charles E. Alpers. *Fundamentals of renal pathology*. 2nd Ed. Heilderberg new York Dordrecht London: Springer Science & Business Media; (2013) p:3-17.

Friedewald JJ, Rabb H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney Int* (2004); 66(2):486-91.

Ganesan C, Maynard SE. *Acute kidney injury in pregnancy: the thrombotic microangiopathies*. *Usa JNephrol* (2011); 24(05): 554-563.

German T, Hernandez T, Tarek A, Blandon J, Meza A T, Bilbao JE. *Acute kidney injury with oxalate deposition in a patient with a high anion gap metabolic acidosis and a normal osmolal gap*. *J Nephropathology* (2013); 2(2): 139-143.

Goldfarb S, MD, Peter A, McCollough MD, MPH, Dermott JM, MD, Gay S, MD. *Contrast-Induced Acute Kidney Injury: Specialty-Specific Protocols for Interventional Radiology, Diagnostic Computed Tomography Radiology, and Interventional Cardiology*. *Mayo Clin. Proc* (2009); 84(2):170-179.

Han WK, Wagener G, Zhu Y, Wang S, Lee HT. *Urinary biomarkers in the early detection of acute kidney injury after cardiac surgery*. *Clin J Am Soc Nephrol* (2009); 4(5):873-82.

Jansen D, Heemskerk S, Koster-Kamphuis L, Bouw TB, Heijst AF, Pickkers P. *Radboud Urine biomarkers for gentamicin-induced acute kidney injury in the neonatal ICU*. *J Netherlands Critical Care* (2011); (15):(1):106.

Jarad G, Miner JH. *Update on the glomerular filtration barrier*. *Current Opinion in Nephrology & Hypertension* (2009); 18(3):226-232.

Kellum J, Lameire N. *Diagnosis, evaluation, and management of acute kidney injury: a KDIGO summary*. *J Critical Care* (2013); 17:204.

Krivoruchko A, Storey KB. *Forever young: mechanisms of natural anoxia tolerance and potential links to longevity*. *Oxid Med Cell Longev* (2010); 3(3):186-98.

Kusumoto M, Kamobayashi H, Sato D, Komori M, Yoshimura M, Akinobu H, Yukimasa K, Kimio T, Hideyuki S. *Alleviation of cisplatin-induced acute kidney injury using phytochemical polyphenols is accompanied by reduced accumulation of indoxyl sulfate in rats*. *Japanese Society of Nephrology* (2011).

Lagos-Arevalo P , Palijan A, Vertullo L, Devarajan P, Bennett MR, Sabbisetti V, Bonventre JV, Qing M, Gottesman RD, Zappitelli M. *Cystatin C in acute kidney injury diagnosis: early biomarker or alternative to serum creatinine?* *Pediatr Nephrol* (2010); 30:665–676.

Landman JC, Kelly R. *Atlante di anatomia fisiopatologia e clinica: apparato urinario*. Vol V. 2° Ed. Milano: Edra Masson; (2007) sez 1:p11-16.

Laurie A, Tomlinson L, Gary AA, Afzal N, Chaudhry C, Tomson R, Wilkinson IA, Roland MO. *ACE Inhibitor and Angiotensin Receptor-II Antagonist Prescribing and Hospital Admissions with Acute Kidney Injury: A Longitudinal Ecological Study*. *Journal pone plos one* (2013).

Liangos O, Perianayagam MC, Vaidya VS, Han KW, Wald R, Tighiouart H, MacKinnon VR, Lijun L, Vaidyanathapuram M, Balakrishnan S, Brian JG, Pereira J, Bonventre V, Bertrand L, Jaber N. *Urinary N-Acetyl- β -(D)-Glucosaminidase Activity and Kidney Injury Molecule-1 Level Are Associated with Adverse Outcomes in Acute Renal Failure*. *J of Nephrology* (2006).

Mahboob R, MD, Fariha S, MD, Smith MC, MD. *Acute Kidney Injury: A Guide to Diagnosis and Management*. *American Academy Family Physicians* (2012); (86):(7): 631-639.

Mancini E. *La sindrome epatorenale*. *J Ital Nefrol* (2012); 29 (5): 563-578.

Mayer MP and Bukau B. *Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism*. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci* (2005); 62:670–684.

Molinas SM, Rosso M, Wayllace NZ, Pagotto MA, Pisani GB, Monasterolo LA, Trumper L. *Heat shock protein 70 induction and its urinary excretion in a model of acetaminophen nephrotoxicity*. *Pediatr Nephrol* (2010); 25(7):1245-53.

Monetti N, Fanti S, Lopci E. *Compendio di diagnostica medico nucleare*. Bologna: Esculapio; (2013) p: 98-107.

Mori K, Lee HT, Rapaport D, Drexler IR, Foster K, Yang J, Schmidt-Ott KM, Chen X, Li JY, Weiss S, Mishra J, Cheema FH, Markowiz G, Suganami T, Sawai K, Mukoyama M, Kunis C, D'Agati V, Devarajan P, Baracshi J. *Endocytic delivery of lipocain- siderophore ion complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury*. J Clin Invest (2005); (115): 610-621.

Moroni F, Modesti PA, Burberi F. *Le nefropatie da farmaci*. Ann Ital Med Int (2003); (18):(3).

Ostermann M, Philips BJ and Forni LG. *Clinical review: Biomarkers of acute kidney injury: where are we now?* J Critical Care (2012); 16:233.

Paweena S, MD, Siribamrungwong M, MD, Doi K, MD, Noiri E, MD, PhD, Terrin N, Bertrand LJ, MD. *Performance of Urinary Liver-Type Fatty Acid-Binding Protein in Acute Kidney Injury: A Meta-analysis*. American Journal of Kidney Diseases (2013); (61) (3): 430-439.

Pratt WB and Toft D. *Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery*. Exp. Biol. Med (2003); (228):111-133.

Prowle JR, Yan-Lun L, Licari E, Bagshaw SM, Moritoki E, Haase M, Haase A, Fielitz J, Kellum A, Cruz D, Ronco C, Tsutsui K, Shigehiko U and Bellomo R. *Oliguria as predictive biomarker of acute kidney injury in critically ill patients*. J Critical Care (2011); (15):172.

Ramirez-Sandoval JC, Barrera J, Simacans P, Correa-Rotter R, Bobadilla N, Morales Buenrostro L. *Tubular urinary biomarkers do not identify aetiology of acute kidney injury in kidney transplant recipients* Asian Pacific Society of Nephrology (2014); (19): 352-358.

Ronco C, Legrand M, Goldstein S, Hur M, Tran N, Howell CE, Cantaluppi V, Cruz DN, Damman K, Bagshaw SM, Di Somma S, Lewington A. *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin: Ready for Routine Clinical Use? An International Perspective*. *Blood Purification* (2014); 37: 271–285.

Saladin, Kenneth. *Human anatomy*. 2nd Ed. Philippine: Rex Bookstore; (2007). pp: 109-122.

Shas SV. *Acute renal failure*. *The Principles and Practice of Nephrology*, 2nd ed. St Louis: Mosby Year Book; (1995). pp 544-594.

Siew ED, Ware LB, Ikizler TA. *Biological markers of acute kidney injury*. *J Am Soc Nephrol* (2011); (22): 810-820.

Srivastava M, Talwar L. *Textbook of biochemistry and human biology*. 3rd Ed. New delhi: Phi; (2002).

Tisher CC. *Structure and function of the kidney: Glomerular filtration, renal blood flow, and their control*. *Textbook of Medicine*, 21st ed. Philadelphia: WB Saunders, 2000, pp 532-539.

Thomans M, Fthouth S. *Acute kidney injury: summary of Nice guidance*. *Acute kidney injury guideline development group BMJ* (2013); 347.

Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA. *Campbell-Walsh Urology*. Vol I. 9th Ed. Philadelphia: Saunders; (2007):p 24.

Wlodzimirow A, Kama A, Abu H, Slabbekoorn M, Roberts AM, Chamuleau F, Schultz MJ, Bouman SC. *A comparison of RIFLE with and without urine output criteria for acute kidney injury in critically ill patients*. *J Critical Care* (2012); (16):(200): 18.

Yamamoto T, Noiri E, Ono Y, Doi K, Negishi K, Kamijo A, Kimura K, Fujita T, Kinukawa T, Taniguchi H, Nakamura K, Goto M, Shinozaki N, Ohshima S, Sugaya T. *Renal L-type fatty acid-binding protein in acute ischemic injury*. J Am Soc Nephrol (2007); 18(11):2894-902.

Zhipeng W, Li L, Qibing M, Linna L, Yuhua R, Rong Z. *Increased expression of heat shock protein (HSP)72 in a human proximal tubular cell line (HK-2) with gentamicin-induced injury*. J Toxicol Sci (2006); 31(1):61-70.

Zhu X, Zhao X, Burkholder WF, Gragerov A, Ogata CM, Gottesman ME, Hendrickson WA. *Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK*. Science (1996); 272:1606–1614.

Sitografia

<http://pdslab.biochem.iisc.ernet.in/hspir/hsp70.php>