

La carbamilazione proteica: cos'è e perché interessa al nefrologo

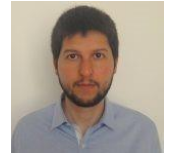
In depth review

Emanuele De Simone¹, Lucia Di Micco¹, Gaetano La Manna², Biagio Raffaele Di Iorio³

¹ UOC Nefrologia, Ospedale Moscati, Avellino

² Cattedra di Nefrologia, Università Alma Mater Studiorum – Policlinico Sant'Orsola Bologna

³ UOC Nefrologia Ospedale Landolfi, Solofra (AV)



Emanuele
De Simone

Corrispondenza a:

Dott. Emanuele De Simone

UOC Nefrologia, Ospedale Moscati, Avellino

e-mail: ema.desimone@gmail.com

ABSTRACT

La dissociazione dell'urea rappresenta una fonte primaria di carbamilazione proteica all'interno del nostro organismo. E' noto dagli anni '70 che questo fenomeno possa avere ripercussioni in campo clinico e terapeutico. Nei decenni passati un grande interesse è stato posto circa il potenziale valore diagnostico della carbamilazione proteica nei pazienti uremici. Negli ultimi anni è cresciuto soprattutto l'interesse riguardo alla sua possibile patogenicità cardiovascolare che potrebbe spiegare, almeno in parte, l'aumentato rischio cardiovascolare nei pazienti uremici. La terapia nutrizionale, le supplementazioni di aminoacidi e regimi dialitici intensivi rappresentano alcune delle armi terapeutiche che sono state testate per contrastare questo fenomeno nei nostri pazienti.

PAROLE CHIAVE: carbamilazione proteica, urea, insufficienza renale cronica

ABSTRACT

Spontaneous urea dissociation in water solution is a prominent source of protein carbamylation in our body. Protein carbamylation is a well-known phenomenon since early seventies. Some years ago, much interest in the diagnostic power of carbamylated protein arose. Recently the target of the researches focused on its potential cardiovascular pathogenicity. Some authors claimed that this could be a reason for higher cardiovascular mortality in uremic patients. Nutritional therapy, amino acids supplementation and intensive dialysis regimen are some of the therapeutic tools tested to lower the carbamylation burst in this population.

KEYWORDS : protein carbamylation, urea, chronic kidney disease

Biochimica del cianato e della carbamilazione

Il cianato (acido cianico) è una molecola che deriva dalla dissociazione spontanea in soluzione acquosa dell'urea; la reazione completa porta alla produzione di cianato e ammoniaca e in vitro tale reazione è spostata dalla parte della formazione dell'urea per oltre il 99% (1). Il cianato, dunque, è un composto azotato che si produce fisiologicamente nel nostro organismo, ma solo in piccole quantità e si pone spontaneamente in equilibrio col suo isomero più reattivo isocianato.

La concentrazione plasmatica in individui sani di isocianato è di circa 50 nmol/L (1), un valore che, tuttavia, è circa mille volte inferiore rispetto a quanto previsto dai parametri cinetici di decomposizione dell'urea. La stessa osservazione è stata fatta nei pazienti uremici, dove la concentrazione di isocianato rilevata era sì aumentata (140 nmol/l), ma comunque di gran lunga inferiore a quanto atteso (2). La spiegazione di questo fenomeno è che, poiché come detto l'acido isocianico è molto reattivo, parte di questo composto viene consumato come substrato di altre reazioni chimiche. In particolare il cianato è in grado di cedere il gruppo "carbamoile" (-CONH₂) ad una molecola organica e questa reazione è generalmente indicata con il nome di carbamilazione. In realtà il termine chimico più appropriato, e raccomandato dalla "International Union of Pure and Applied Chemistry", sarebbe carbamoilazione (3), ma nella gran parte della letteratura scientifica è utilizzato il primotermine.

L'isocianato può reagire con gruppi aminici, tiolici, carbossilici e fenolici, ma non con i gruppi ossidrilici (4); i gruppi amminici, in particolare, legano in maniera covalente e irreversibile l'acido isocianico. La reazione di carbamilazione può interessare il gruppo amminico degli amminoacidi liberi o la catena laterale di alcuni amminoacidi (come la lisina) incatenati in peptidi. In quest'ultimo caso si realizza la carbamilazione proteica, un fenomeno chimico di modificazione post-traduzionale delle proteine, che fa parte di un gruppo di reazioni non enzimatiche coinvolte nell'invecchiamento molecolare proteico (come, ad esempio, glicazione, ossidazione, carbonilazione, acetilazione, ecc). Queste modificazioni post-traduzionali sono tutte caratterizzate dalla formazione di legami covalenti e irreversibili con le proteine; i prodotti di queste reazioni sono indicati globalmente con la dizione di "Post-Translational Modification-Derived Products" (PTMDPs) (5, 6). I PTMDPs possono trasformarsi in proteine anomale con un alterato funzionamento biologico, soprattutto se si determinano errori del ripiegamento tridimensionale. Le proteine a più lunga emivita, avendo a disposizione un maggior tempo di contatto per le reazioni non enzimatiche, sono quelle più facilmente coinvolte in questo tipo di processi. I PTMDPs possono anche essere sfruttati in clinica a scopo diagnostico, come ad esempio accade per l'emoglobina glicata A1c (HbA1c) che è da molto tempo comunemente impiegata per il follow up del diabete mellito (7).

Sorgenti di carbamilazione e metodiche di misurazione

La dissociazione dell'urea, come accennato prima, rappresenta una sorgente di cianato e quindi di carbamilazione, ma non è l'unica. Un importante lavoro pubblicato su Nature Medicine nel 2007 ha evidenziato che le mieloperossidasi (MPO), gli enzimi presenti nei neutrofilo e nei macrofagi, sono in grado di carbamilarne dei substrati in presenza di tiocianato e perossido di idrogeno nei siti di infiammazione (8). Questa osservazione ha fatto notevolmente crescere l'interesse circa il ruolo della carbamilazione proteica, dal momento che questo meccanismo non è da considerarsi specifico solo dei pazienti uremici ma è condiviso anche dal più grande insieme dei pazienti con infiammazione cronica. Nello stesso lavoro si osservava che, se il tiocianato è normalmente presente nel plasma derivante da alcuni alimenti (in particolare verdure e mandorle), i suoi valori plasmatici sono sensibilmente aumentati nei fumatori. Ciò suggerisce che la carbamilazione

proteica possa essere un link che unisce fumatori e uremici per quanto riguarda il rischio cardiovascolare, come vedremo tra poco.

Per valutare quantitativamente la presenza di substrati carbammati è necessario fare delle misurazioni dirette. Sono disponibili numerose metodiche con queste finalità, la più utilizzata prevede la misurazione dell'omocitrullina, una molecola che deriva dalla carbamillazione della lisina. E' possibile con la "stable-isotope-dilution high performance liquid chromatography" (HPLC) associata alla "tandem mass spectrometry" (MS/MS), misurare la quota di omocitrullina legata a proteine, dopo idrolisi acida delle proteine stesse. In questa maniera si ottiene una misura attendibile dell'intera quota del cosiddetto "carbamylation burst" (8, 9). Altre metodiche utilizzate misurano specifiche proteine carbammate, come emoglobina, albumina, LDL. L'emoglobina carbammatata (cHb), ad esempio, è stata utilizzata come marker di carbamillazione e, sebbene sia meno accurata dell'omocitrullina, diversi studi ne hanno dimostrato delle potenziali utilità come marker dei livelli ematici di urea (9). Uno studio ha valutato i livelli di cHb in pazienti ricoverati per insufficienza renale acuta (IRA) con creatinina superiore a 5,7 mg/dl e pazienti con valori di creatinina simili ma noti per avere insufficienza renale cronica (IRC) in fase di stabilità. I risultati dello studio hanno evidenziato come i livelli di cHb fossero chiaramente più alti nel gruppo di pazienti affetti da IRC, riflettendo il diverso tempo di esposizione agli alti valori di urea. Inoltre nel gruppo di pazienti con IRA, quelli che avevano mostrato di avere delle riacutizzazioni di IRC, e quindi presentavano una componente cronica di riduzione della funzione renale, avevano valori più alti di cHb rispetto agli altri. L'analisi statistica dei risultati indicava come non solo la cHb avesse un potenziale di predittività positiva e una specificità molto elevata nella discriminazione tra danno acuto e danno cronico, ma che fosse anche utile nel fornire informazioni circa la componente di cronicità del danno in corso di IRA (10). Un altro studio ha confermato questi risultati evidenziando come la cHb rappresenti non solo una discriminante tra IRA e IRC ma anche un indizio per "datare" l'insorgenza dell'IRA. Si è osservato, infatti, che la cHb incrementava, come atteso, con il trascorrere del tempo di esposizione ad alti valori di urea plasmatica, e quindi forniva informazioni sulla durata dell'IRA (11). Inoltre nel paziente emodializzato, dove i livelli di urea oscillano con le sedute emodialitiche, la cHb rappresenta un marker fedele dei livelli di urea medi cui il paziente è esposto (12).

Esempi di effetti biologici della carbamillazione proteica

Negli anni '70 l'urea fu utilizzata come agente terapeutico nell'anemia falciforme. In questa malattia la presenza di una mutazione genetica puntiforme determina una sostituzione amminoacidica (acido glutammico con valina) in un punto della catena beta dell'emoglobina. Ciò comporta una precipitazione in fibrille dell'emoglobina all'interno del globulo rosso con conseguente alterazione morfologica delle emazie, la cosiddetta falcizzazione. Sperimentalmente l'urea era in grado di prevenire e addirittura invertire questo processo di falcizzazione e uno dei meccanismi d'azione proposti fu la carbamillazione dell'emoglobina S da parte dell'isocianato derivante dall'urea (13, 14). Per questo motivo, successivamente, fu suggerito di utilizzare direttamente il sodio cianato come agente terapeutico (15). Tuttavia questa molecola manifestò numerosi effetti collaterali, tra cui lo sviluppo di cataratta e neuropatia periferica (14). Si è chiarito in seguito che la cataratta era secondaria alla carbamillazione del α -cristallina, cui conseguiva l'opacamento del cristallino. Oggi è noto che le modificazioni post-traduzionali delle proteine, tra cui la carbamillazione, contribuiscono in modo sostanziale allo sviluppo della cataratta correlata all'invecchiamento (16).

Negli anni successivi diversi studi hanno osservato come la carbamillazione interferisse con l'attività enzimatica ed ormonale delle proteine. Ad esempio l'insulina carbammatata ha un'affinità

consistentemente ridotta per il proprio recettore (17, 18), mentre l'eritropoietina (EPO) carbamidata, in vitro, perde la capacità di stimolare la produzione di globuli rossi (19). A questo proposito è stato osservato che dopo 3 mesi dall'inizio del trattamento emodialitico i livelli di albumina carbamidata (cAlb) correlavano positivamente con la resistenza all'eritropoietina (EPO), calcolate come EPO resistance index (20).

E' stato anche proposto che la carbamidazione possa essere coinvolta nella patogenesi della malattia di Alzheimer, essendo in grado di promuovere l'associazione in polimeri della proteina tau (21).

Una recente e importante acquisizione è stata anche fatta nel campo della patogenesi dell'artrite reumatoide, dove la carbamidazione della lisina ad omocitrullina nel tessuto sinoviale è risultata in grado di indurre una risposta infiammatoria T-mediata molto più spiccata della citrullinazione dell'arginina, nonostante gli anticorpi anti proteine citrullinate siano tra i marker principali di questa patologia. In base a queste osservazioni anticorpi contro le proteine carbamidate sono stati evidenziati in molti pazienti affetti da questa patologia (22).

Un'altra interessante segnalazione riguarda l'amiloidosi secondaria a malattie infiammatorie croniche, una patologia in cui è ancora necessario chiarire quali fattori favoriscano la deposizione del materiale proteico, essendo questo fenomeno non costante in tutti i pazienti. E' stato notato in un recente studio che la carbamidazione nella regione N-terminale della proteina SAA murina ne aumenta notevolmente le proprietà amiloidogeniche in colture cellulari e pertanto questo fenomeno potrebbe giocare un ruolo anche in vivo (23).

Carbamidazione proteica come fattore di rischio cardiovascolare

Uno degli aspetti più interessanti della carbamidazione proteica è quello che riguarda la sua associazione con le malattie cardiovascolari. Secondo alcuni autori la carbamidazione potrebbe fornire almeno una parte della risposta sul perché aumenti il rischio cardiovascolare negli uremici, a parità di fattori di rischio tradizionali (24).

Negli anni recenti le osservazioni sul ruolo delle MPO nei siti flogistici, come detto in precedenza, ha indotto a pensare che la carbamidazione proteica possa giocare un ruolo più ampio, ad esempio nei fumatori, ed ha aumentato l'interesse anche da parte di chi non si occupa nello specifico di malattia renale cronica.

Studi sperimentali

Uno dei meccanismi più studiati riguarda la carbamidazione delle lipoproteine, in particolare il potenziale ruolo pro-aterogeno delle LDL carbamidate (cLDL). E' noto che l'aterogenesi è un fenomeno complesso in cui giocano un ruolo fondamentale: il danno endoteliale, l'infiltrazione di macrofagi e cellule infiammatorie, la modificazione delle apolipoproteine, in particolare delle LDL, la proliferazione delle cellule muscolari lisce con produzione di matrice extra-cellulare; le cLDL sembra possano essere implicate in vari di questi processi. E' stato evidenziato, in vitro, che le cLDL perdono affinità rispetto alle LDL normali (nLDL) per il recettore presente sui fibroblasti (25) e ciò ridurrebbe la clearance plasmatica di queste lipoproteine come è stato dimostrato nel plasma di coniglio (26). Uno studio ha dimostrato come, in vitro, le cLDL ma non le nLDL siano in grado di indurre danno su endociti di coronarie umani e di stimolare la proliferazione delle cellule muscolari lisce della parete vascolare (27), due degli eventi chiave dell'aterosclerosi. Questi fenomeni sono comuni anche ad altre LDL modificate come quelle ossidate e glicosilate. Le cLDL, inoltre, inducono disfunzione endoteliale attraverso l'espressione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) per attivazione

della NADPH-Ossidasi, in questo modo si riduce la biodisponibilità del monossido d'azoto (NO) essenziale per la funzione endoteliale (28). Le cLDL sono anche in grado di legare il recettore scavengers dei macrofagi, altro evento significativo nell'aterosclerosi (29, 30).

Non solo le cLDL ma anche la carbamilazione delle HDL sembra poter giocare un ruolo nell'aterosclerosi. Le HDL carbamilate (cHDL) sono risultate tossiche per le cellule endoteliali (31) e non attivano altrettanto efficacemente la LCAT (lecitina-colesterolo acetil transfersasi) che è uno dei principali enzimi attraverso cui le HDL attivano dei pathway antinfiammatori (9, 32). La carbamilazione delle HDL riduce anche l'efflusso di colesterolo dalla cellula; a ciò consegue sperimentalmente l'accumulo di colesterolo e la formazione di gocce lipidiche all'interno dei macrofagi (32); inoltre le cHDL sono state rinvenute all'interno di lesioni aterosclerotiche nell'uomo (32).

Infine la carbamilazione del collagene presente nella matrice extracellulare ne stimola il rimodellamento attraverso l'attivazione dei monociti; questi, rilasciando la metalloproteinasi-9, inducono riassorbimento della matrice e ciò può favorire la rottura delle placche aterosclerotiche (33).

Studi clinici

La concentrazione plasmatica di cLDL, come atteso, è effettivamente maggiore nei pazienti emodializzati rispetto ai controlli sani (27), ma quale sia il valore clinico di questo dato è la domanda cui hanno tentato di rispondere alcuni studi. In un lavoro condotto su 96 pazienti con IRC (eGFR medio 35 ml/min) gli sperimentatori hanno diviso la popolazione in esame in due metà rispetto al valore mediano delle cLDL e, dopo un follow up di quasi 5 anni, hanno notato che gli eventi cardiovascolari e la mortalità erano significativamente più alti nel gruppo con maggiori livelli di cLDL (28). In un altro studio su due popolazioni di complessivamente 1000 pazienti è stato osservato come il carico di carbamilazione proteica fosse un potente predittore di eventi cardiovascolari, anche dopo aggiustamento per tutti i fattori di confondimento(8). Questi dati sono stati confermati in uno studio apparso su JASN e condotto su 347 pazienti in emodialisi cronica; dopo 5 anni di follow up i pazienti appartenenti ai due terzili più alti per livelli di carbamilazione avevano una mortalità cardiovascolare sensibilmente più alta, anche dopo aggiustamento per tutti i fattori di confondimento (34).

Le più importanti casistiche in questo ambito derivano da sottoanalisi di due trials: il "Die Deutsche Diabetes Dialyse Studie (4D study)" e l'ARMORR study. Il 4D study era stato disegnato per investigare la riduzione di rischio cardiovascolare associata alla terapia ipocolesterolemizzante con atorvastatina in una popolazione di 1161 pazienti affetti da diabete mellito ed in trattamento dialitico. La sottoanalisi, dopo un follow up di 4 anni, ha dimostrato che i pazienti con valori più elevati di cAlb presentavano un aumento sia della mortalità globale che di morte cardiaca improvvisa e per scompenso cardiaco congestizio (35). Sorprendentemente non c'era però correlazione con lo stroke e l'infarto del miocardio, come sarebbe stato lecito attendersi. Nello stesso studio è stato osservato che sebbene l'analisi complessiva del 4D study non avesse evidenziato vantaggi dell'abbassamento del colesterolo con atorvastatina nella popolazione in esame (il colesterolo in questi pazienti presenta il tipico effetto "U"), effetti vantaggiosi erano presenti nei pazienti appartenenti al terzile più basso per livelli di cAlb. Gli autori hanno ipotizzato che la carbamilazione delle LDL possa essere un meccanismo che disperde i vantaggi della terapia ipocolesterolemizzante in questa popolazione (35).

La sottoanalisi dell'ARMORR study (disegnato per investigare i markers predittivi di mortalità in 187 pazienti in emodialisi) ha confermato che i pazienti con i livelli di cAlb più elevati presentavano

un notevole incremento del tasso di mortalità ad 1 anno, anche dopo gli opportuni aggiustamenti. E' interessante notare come i markers tradizionali dell'efficacia dialitica collegati all'urea (urea, urea reduction rate e Kt/V) non abbiano dimostrato alcun valore prognostico a differenza della cAlb (36).

La carbamilazione proteica come target di terapia

A questo punto il passo successivo è domandarsi cosa succede agli outcomes cardiovascolari e alla mortalità se un intervento terapeutico mira a ridurre il carico di proteine carbamilate. Uno studio ha osservato che nei pazienti in cui si raggiunge una riduzione del 25% dei livelli basali di cAlb si associa un decremento della massa del ventricolo sinistro ed un incremento dei valori di albumina totali (37). Il dato sull'albumina sierica è interessante e suggerisce l'ipotesi che la carbamilazione degli amminoacidi liberi contribuisca allo stato di malnutrizione che colpisce parte della popolazione di dializzati perché sottrae questi amminoacidi alla possibilità di essere utilizzati per la sintesi proteica. I pazienti in emodialisi presentano livelli plasmatici elevati di amminoacidi carbammati, con valori che possono essere addirittura superiori a quelli degli amminoacidi liberi normali (38), i quali a loro volta sono comunque ridotti rispetto ai controlli (39); in questo bilancio è necessario considerare che un ruolo può essere giocato dal trattamento emodialitico che è gravato di una certa rimozione di amminoacidi. Il trattamento dialitico, tuttavia, rimuove anche gli amminoacidi carbammati e ciò potrebbe favorire i processi anabolici a patto che gli amminoacidi liberi siano opportunamente rimpiazzati. Se questi invece scarseggiano la formazione di cAlb è maggiore perché sono presenti meno substrati da carbammatizzare (40). A questo proposito si è ipotizzato che la somministrazione di amminoacidi liberi possa fungere da bersaglio del processo di carbamilazione, prevenendo la carbamilazione di substrati proteici più nobili; inoltre le supplementazioni potrebbero fornire un supporto nutritivo al paziente che, com'è emerso da studi condotti su larghe coorti di pazienti in emodialisi, è in grado di ridurre la mortalità (41). Sperimentalmente la supplementazione di amminoacidi, quali cisteina e istidina, si è rivelata in grado di ridurre la carbamilazione delle proteine (36) ed un recente trial ha confermato in vivo questi dati. Per 8 settimane 23 pazienti incidenti in emodialisi sono stati trattati con amminoacidi per via endovenosa e si è osservata una riduzione di cAlb del 15% rispetto al gruppo di controllo (42).

Un'altra strategia terapeutica punta ad agire sull'efficacia dialitica in quanto una maggiore rimozione dell'urea può ridurre la disponibilità di cianato per la carbamilazione. Un recente trial, condotto su 33 pazienti emodializzati, ha dimostrato che nel braccio di trattamento sottoposto a sedute emodialitiche intensive di 7-8 ore 3 volte alla settimana, era presente una significativa riduzione dei livelli di cAlb dopo 1 anno (43). La combinazione di dialisi intensiva e supplementazioni con amminoacidi potrebbe rappresentare un approccio ottimale per abbattere il carbamylation burst.

Infine è recentissima la dimostrazione che la terapia nutrizionale è efficace nel ridurre il carico di carbamilazione proteica nei pazienti in IRC. Un regime dietetico definito Very Low Protein Diet (VLPD), caratterizzato da introito proteico di sole proteine vegetali 0,3-5 g/Kg di peso corporeo/die insieme ad una miscela di chetonaloghi, è stato testato in uno studio cross over su 60 pazienti contro la dieta libera (Free Diet FD 1 gr di proteine /Kg di peso/die) e la dieta mediterranea (MD 0,7-0,8 gr di prot/Kg di peso/die). La VLPD, inducendo il consumo di urea per la sintesi di amminoacidi essenziali, ha consentito di raggiungere livelli di urea plasmatica molto ridotti con conseguente notevole riduzione dell'omocitrullina. Questo studio ha così suggerito un ulteriore potenziale vantaggio di un'appropriata terapia nutrizionale nel paziente nefropatico, da sommare a benefici più consolidati, come quelli sul metabolismo del fosforo e sull'equilibrio acido-base (44).

Conclusioni

Attraverso questa review abbiamo provato ad illustrare i molti campi di interesse che la carbamilazione proteica ha suscitato nel mondo della ricerca nefrologica. Ovviamente negli ultimi anni l'interesse si è focalizzato sull'aspetto cardiovascolare del problema; anche perché è comprensibile che individuare nuovi fattori di rischio cardiovascolari modificabili nella popolazione uremica sarebbe di fondamentale importanza.

Un altro aspetto interessante è che queste osservazioni sulla carbamilazione proteica aggiungono un altro capitolo sulla diatriba circa la tossicità dell'urea. Forse troppo precocemente si è pensato di derubricare l'urea a semplice marker dialitico, in realtà sta diventando opinione comune che non tanto l'urea in sé, ma i suoi effetti "indiretti" (come la carbamilazione proteica e l'alterazione del microbiota) siano molto dannosi per i pazienti nefropatici.

BIBLIOGRAFIA

1. Stark GR, Stein WH, Moore S. Reactions of the cyanate present in aqueous urea with amino acids and proteins. *J Biol Chem* 1960; 235: 3177–81.
2. Nilsson, L., Lundquist, P., Kågedal, B. & Larsson, R. Plasma cyanate concentrations in chronic renal failure. *Clin. Chem* 1996; 42, 482–483
3. IUPAC, Commission on Nomenclature of Organic Chemistry. Specific classes of compounds: R-5.7.8 amides, imides, and hydrazides. http://www.acdlabs.com/iupac/nomenclature/93/r93_543.htm
4. Stark GR. Modification of proteins with cyanate. *Methods Enzymol* 1967; 11:590–4.
5. Jaisson S, Gillery P. Evaluation of nonenzymatic posttranslational modification-derived products as biomarkers of molecular aging of proteins. *Clin Chem* 2010; 56: 1401–12.
6. Jaisson S, Pietrement C, Gillery P. Carbamylation-Derived Products: Bioactive Compounds and Potential Biomarkers in Chronic Renal Failure and Atherosclerosis. *Clin Chem*. 2011 Nov;57(11):1499-505.
7. Little RR, Sacks DB. HbA1c: how do we measure it and what does it mean? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2009;16:113–8.
8. Wang Z, Nicholls SJ, Rodriguez ER, Kummu O, Horkko S, Barnard J, et al. Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. *Nat Med* 2007;13:1176–84.
9. Delanghe, S., Delanghe, J. R., Speeckaert, R., Van Biesen, W., & Speeckaert, M. M. (2017). Mechanisms and consequences of carbamoylation. *Nat Rev Nephrol*. 2017 Sep;13(9):580-593.
10. Davenport A. et al. Differentiation of acute from chronic renal impairment by detection of carbamylated haemoglobin. *Lancet*. 1993 Jun 26;341(8861):1614-7.
11. Wynckel A et al. Kinetics of carbamylated haemoglobin in acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2000 Aug;15(8):1183-8.
12. Hasuike Y et al. Carbamylated hemoglobin as a therapeutic marker in hemodialysis. *Nephron*. 2002 Jun;91(2):228-34.
13. Nigen AM, Njikam N, Lee CK, Manning JM. Studies on the mechanism of action of cyanate in sickle cell disease. Oxygen affinity and gelling properties of hemoglobin S carbamylated on specific chains. *J Biol Chem* 1974; 249:6611–6.
14. Agbai, O. Antisickling effect of dietary thiocyanate in prophylactic control of sickle cell anemia. *J. Nat. Med. Assoc.* 1986; 78(11): 1053–56.
15. Deiderich, D. A., et al. Hematologic and clinical responses in patients with sickle cell anemia after chronic extracorporeal red cell carbamylation. *J Clin Invest*. 1976 Sep;58(3):642-53.
16. Harding JJ. Viewing molecular mechanisms of ageing through a lens. *Ageing Res Rev* 2002;1: 465–79
17. Veronese FM, Piszkievicz D, Smith EL. Inactivation of bovine glutamate dehydrogenase by carbamyl phosphate and cyanate. *J Biol Chem* 1972; 247:754–9.
18. Oimomi M, Hatanaka H, Yoshimura Y, Yokono K, Baba S, Taketomi Y. Carbamylation of insulin and its biological activity. *Nephron* 1987;46:63–6.
19. Mun KC, Golper TA. Impaired biological activity of erythropoietin by cyanate carbamylation. *Blood Purif*. 2000;18(1):13-7.
20. Kalim S. et al. Carbamylation of serum albumin and erythropoietin resistance in end stage kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013 Nov;8(11):1927-34.
21. Farias G, Gonzalez-Billaut C, Maccioni RB. Immunological characterization of epitopes on tau of Alzheimer's type and chemically modified tau. *Mol Cell Biochem* 1997;168:59–66.
22. Mydel P, Wang Z, Brissler M, Hellvard A, Dahlberg LE, Hazen SL, Bokarewa M. Carbamylation-dependent activation of T cells: a novel mechanism in the pathogenesis of autoimmune arthritis. *J Immunol* 2010; 184: 6882–90.
23. Kluge-Beckerman B. et al. Carbamylation of the amino-terminal residue (Gly1) of mouse serum amyloid A promotes amyloid formation in a cell culture model. *FEBS Lett*. 2016 Dec;590(23):4296-4307.
24. Velasquez MT, Ramezani A, Raj DS. Urea and protein carbamylation in ESRD: surrogate markers or partners in crime? *Kidney Int*. 2015 Jun;87(6):1092-4.
25. Weisgraber Kh, Innerarity T, Mahley Rw: Role of lysine residues of plasma lipoproteins in high affinity binding to cell surface receptors on human fibroblasts. *J Biol Chem* 253:9053–9062, 1978
26. Horkko S, Savolainen Mj, Kervinen K, et al. Carbamylation-induced alterations in low-density lipoprotein metabolism. *Kidney Int* 41:1175–1181, 1992
27. Ok E, et al. Carbamylated low-density lipoprotein induces death of endothelial cells: a link to atherosclerosis in patients with kidney disease. *Kidney Int*. 2005 Jul;68(1):173-8.
28. Speer T, et al. Carbamylated low-density lipoprotein induces endothelial dysfunction. *Eur Heart J*. 2014 Nov 14;35(43):3021-32.
29. Apostolov EO, Shah SV, Ray D, Basnakian AG. Scavenger receptors of endothelial cells mediate the uptake and cellular proatherogenic effects of carbamylated LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Oct;29(10):1622-30.
30. Kalim S et al. Protein carbamylation in kidney disease: pathogenesis and clinical implications. *Am J*

- Kidney Dis. 2014 Nov;64(5):793-803.
31. Sirpal S. Myeloperoxidase-mediated lipoprotein carbamylation as a mechanistic pathway for atherosclerotic vascular disease. *Clin Sci (Lond)*. 2009 May;116(9):681-95.
 32. Holzer M et al. Protein carbamylation renders high-density lipoprotein dysfunctional. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Jun 15;14(12):2337-46.
 33. Garnotel R et al. Enhanced activation of and increased production of matrix metalloproteinase-9 by human blood monocytes upon adhering to carbamylated collagen. *FEBS Lett*. 2004 Apr 9;563(1-3):13-6.
 34. Koeth RA et al. Protein carbamylation predicts mortality in ESRD. *J Am Soc Nephrol*. 2013 Apr;24(5):853-61.
 35. Drechsler C et al. Protein carbamylation is associated with heart failure and mortality in diabetic patients with end-stage renal disease. *Kidney Int*. 2015 Jun;87(6):1201-8.
 36. Berg AH et al. Carbamylation of serum albumin as a risk factor for mortality in patients with kidney failure. *Sci Transl Med*. 2013 Mar 6;5(175):175ra29.
 37. Kalim S et al. Longitudinal Changes in Protein Carbamylation and Mortality Risk after Initiation of Hemodialysis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016 Oct 7;11(10):1809-1816.
 38. Kraus LM et al. Essential carbamoyl-amino acids formed in vivo in patients with end-stage renal disease managed by continuous ambulatory peritoneal dialysis: isolation, identification, and quantitation. *J Lab Clin Med*. 1998 May;131(5):425-31.
 39. Duranton F et al. Plasma and urinary amino acid metabolomic profiling in patients with different levels of kidney function. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014 Jan;9(1):37-45.
 40. Kraus LM, Kraus AP Jr. Carbamoylation of amino acids and proteins in uremia. *Kidney Int Suppl*. 2001 Feb;78:S102-7.
 41. Weiner DE et al. Oral intradialytic nutritional supplement use and mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 2014 Feb;63(2):276-85.
 42. Kalim S et al. The Effects of Parenteral Amino Acid Therapy on Protein Carbamylation in Maintenance Hemodialysis Patients. *J Ren Nutr*. 2015 Jul;25(4):388-92.
 43. Perl J et al. Reduction of carbamylated albumin by extended hemodialysis. *Hemodial Int*. 2016 Oct;20(4):510-521.
 44. Di Iorio BR, Marzocco S, Bellasi A, De Simone E, Dal Piaz F, Rocchetti MT, Cosola C, Di Micco L, Gesualdo L. Nutritional therapy reduces protein carbamylation through urea lowering in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2017 Jul 11.