

BIOFILTRI E BIOSENSORI

G.S. Netti, D. Centonze, L. Gesualdo

Bioagromed, Università degli Studi, Foggia

Biofilters and biosensors

Sepsis is the leading cause of morbidity and mortality in intensive care units (ICU). Acute renal failure (ARF) is a common condition, affecting approximately 5% of all hospitalized patients and up to 20% of critically ill patients. The combination of ARF and sepsis is associated with 75% mortality. Hyperglycemia and an increase in plasma lactate concentration are markers of poor prognosis in patients with sepsis; they often precede the onset of multiple organ dysfunction and ARF. Direct online measurement by means of amperometric biosensors would allow the early detection of increasing levels of both glucose and lactate, as well as the possibility to maintain glucose within a well-defined range. Current standards of care in ARF require synthetic membranes that substitute the small solute clearance function of the renal glomerulus, but they do not replace the transport, metabolic and endocrine functions of the renal proximal tubule cells. The application of cell therapy to the successful process of hemofiltration may therefore improve the poor prognosis of patients with ARF in the ICU. An extracorporeal bioartificial kidney consisting of a conventional hemofilter connected to a renal tubule assist device has demonstrated both in animal models of ARF and in phase I/II clinical trials its ability to successfully replace the filtration, transport, metabolic, and endocrine functions of the kidney. To improve the outcome of septic patients with ARF, multidisciplinary interactions and cooperation between basic, clinical and industrial researchers are mandatory; the development of new artificial or biological devices may allow online monitoring of biological parameters and better treatment of septic syndrome and related systemic complications. (G Ital Nefrol 2007; 24: (Suppl. S40) S87-93)

Conflict of interest: None

KEY WORDS:

Artificial biofilter,
Amperometric
biosensors,
Acute renal failure,
Insulin resistance,
Sepsis

PAROLE CHIAVE:

Biofiltro
artificiale,
Biosensori
amperometrici,
Insufficienza
Renale Acuta,
Insulino-resistenza,
Sepsi

✉ Indirizzo degli Autori:

Prof. Loreto Gesualdo
Struttura Complessa di Nefrologia,
Dialisi e Trapianto
Azienda Ospedaliero-Universitaria
"OO.RR."
Viale Pinto, 1
71100 Foggia
e-mail: l.gesualdo@unifg.it

INTRODUZIONE

La risposta fisiologica dell'organismo alle infezioni consiste in un complesso processo finalizzato alla localizzazione ed al controllo delle infezioni batteriche ed all'avvio della riparazione dei tessuti lesi. Questo processo infiammatorio è normalmente associato all'attivazione di fagociti circolanti e residenti ed alla produzione di mediatori pro-infiammatori ed anti-infiammatori. La sepsi si instaura quando la risposta infiammatoria alle infezioni diviene generalizzata e coinvolge tessuti sani distanti dal sito iniziale di danno o di infezione (1).

La diagnosi clinica di sepsi richiede la dimostrazione di una infezione associata alla presenza di almeno

due dei quattro segni clinico-laboratoristici che caratterizzano la sindrome da risposta infiammatoria sistemica (*Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS*) (1), ovvero:

- Temperatura corporea $>38^{\circ}\text{C}$ o $<36^{\circ}\text{C}$;
- Tachicardia (frequenza cardiaca >90 battiti/minuto);
- Frequenza respiratoria >20 atti/min o $\text{PaCO}_2 <32$ mmHg;
- Leucocitosi (>12.000 cellule/ mm^3) o Leucopenia (<4000 cellule/ mm^3) o presenza di Leucociti immaturi $>10\%$.

La sepsi, inoltre, può evolvere nei quadri ben più gravi di sepsi severa, quando è presente una disfunzione d'organo, e di shock settico, caratterizzato da

uno stato ipotensivo refrattario alla terapia.

A tutt'oggi, nonostante le diverse strategie terapeutiche sperimentate, la sepsi continua a costituire un'importante causa di morbidità e mortalità nel mondo (210000 e 135000 decessi/anno, rispettivamente, negli USA e in Europa) (2, 3) e pertanto sono auspicabili nuovi approcci terapeutici in grado di migliorarne la prognosi (2).

L'insufficienza renale acuta (IRA) si riscontra in circa il 5% di tutti i pazienti ospedalizzati, mentre è presente nel 20% di tutti i pazienti degenti nelle unità di terapia intensiva, superando il 51% nei pazienti con *shock* settico e con emocoltura positiva (4). Inoltre, la combinazione di IRA e di sepsi si associa a tassi di mortalità pari al 75%, nettamente superiori se confrontati con il 45% di mortalità che si riscontra nei pazienti affetti da sola IRA (5). Questa prognosi così severa persiste nonostante il fatto che il rene sia stato il primo organo per il quale si sia resa disponibile una efficace terapia sostitutiva. Recentemente sono stati compiuti sostanziali progressi nella comprensione dei meccanismi patogenetici dell'IRA associata alla sepsi, mentre sono in corso di svolgimento studi di nuovi interventi con la possibilità di attenuare o anche di prevenire questa condizione.

Diverse sono le problematiche oggetto di studio in questo campo e la ricerca scientifica può dare un apporto fondamentale nell'affrontare quattro tematiche fondamentali:

1. la caratterizzazione di uno *status* di suscettibilità genetica allo sviluppo di una sepsi;
2. l'ottimizzazione del monitoraggio dei parametri critici;
3. l'individuazione di *biomarkers* e di specifici profili d'espressione proteica (siero, urine, ultrafiltrato, ecc.);
4. il miglioramento della terapia sostitutiva.

SUSCETTIBILITÀ GENETICA ALLA SEPSI E SVILUPPO DI DNA CHIP

Studi di epidemiologia genetica, definibile come l'interazione tra geni ed ambiente, hanno dimostrato che l'instaurarsi di un quadro settico, nonché l'*outcome* stesso della sepsi possono essere fortemente influenzati dalla genetica (6, 7). In numerosi studi caso-controllo è stata evidenziata, infatti, un'associazione tra insorgenza della sepsi e polimorfismi di geni codificanti per le regioni di riconoscimento batterico (CD14, TLR4) e di geni coinvolti nella risposta infiammatoria (TNF- α , TNF- β , IL-1 β , IL-6, IL-10) (8, 9). Polimorfismi di questi stessi geni sono stati, inoltre, correlati con l'evoluzione della sepsi verso forme più severe o verso la morte.

L'insorgenza di insulino-resistenza associata ad iperglicemia costituisce una delle manifestazioni che caratterizzano la risposta alla sepsi e ne peggiorano l'*outcome*: i pazienti che sviluppano questa sorta di "diabete da stress" hanno, infatti, un più elevato rischio di decesso. Recentemente è stato dimostrato come la terapia intensiva con insulina migliori la prognosi dei pazienti critici: il mantenimento dei livelli di glicemia tra 80 e 110 mg/dL, infatti, se paragonata alla terapia convenzionale (glicemia tra 180 e 200 mg/dL), riduce significativamente la mortalità e morbidità da sepsi (10). La terapia con insulina, inoltre, diminuisce la frequenza di episodi di sepsi nel 46% dei casi e riduce il numero di decessi per danno multiorgano; tale risultato non è influenzato da un'anamnesi positiva per diabete mellito (11, 12). Il meccanismo protettivo svolto dall'insulina in corso di sepsi è a tutt'oggi sconosciuto: in letteratura, infatti, non sono presenti studi di associazione genetica tra polimorfismi e insorgenza e/o severità di insulino-resistenza durante la sepsi.

Pertanto, ulteriori studi genetici potrebbero spiegare la variabilità individuale nella risposta alla sepsi e allo *shock* settico. Diversi geni candidati per la suscettibilità genetica alla sepsi sono stati localizzati sul cromosoma 6, nel *cluster* per gli antigeni leucocitari umani di classe III, tra cui quelli codificanti per i fattori TNF- α e TNF- β (13). Altri geni candidati per la suscettibilità alla sepsi sono il gene per il recettore antagonista dell'interleuchina 1 (IL-1), quelli che codificano per le *heat shock proteins*, i geni per le interleuchine 6 e 10 e per i recettori TLR-4, TLR-2 e CD-14 (9). Si ritiene che i geni AHSR (codificante per la Fetuina), APM1 (codificante l'Adiponectina) e RETN (codificante la Resistina) possano essere candidati per la suscettibilità alla sepsi e all'insulino-resistenza (14-18). L'analisi simultanea di questi polimorfismi potrebbe facilitare l'identificazione dei soggetti predisposti a sviluppare sepsi ed insulino-resistenza e spiegare perché alcuni pazienti abbiano un *outcome* peggiore rispetto ad altri. La tecnologia dei *DNA chips* può consentire di evidenziare rapidamente e contemporaneamente molti polimorfismi, definendo in un singolo test la suscettibilità di un paziente a sviluppare diverse malattie, nonché la responsività ad una terapia farmacologica. La caratterizzazione di centinaia di migliaia di polimorfismi permette di costruire una mappa individuale di *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) in grado di correlare il *background* genetico ad una precisa risposta clinica e farmacologica. La definizione della suscettibilità genetica del singolo paziente a sviluppare sepsi ed insulino-resistenza, dunque, consentirebbe di personalizzare la terapia farmacologica e di predire meglio la prognosi.

MONITORAGGIO ONLINE DI GLUCOSIO E LATTATO NEL PLASMA

In un recente lavoro è stato dimostrato che una terapia precoce ed "aggressiva", mirante ad ottimizzare il precarico, il postcarico e la contrattilità cardiaca in pazienti affetti da sepsi severa e shock settico migliora la probabilità di sopravvivenza (19). In questo studio i pazienti sono stati trattati con infusioni di colloide o cristalloide, agenti vasoattivi e trasfusioni di globuli rossi per migliorare l'ossigenazione. La valutazione di una adeguata ossigenazione è stata eseguita monitorando parametri quali la saturazione di ossigeno, la concentrazione di lattati, il deficit di basi ed il pH. Il gruppo dei pazienti trattati con terapia precoce ed intensiva ha ricevuto più fluidi, un supporto inotropo e trasfusioni durante le prime sei ore mentre i pazienti controllo hanno ricevuto la terapia convenzionale. Durante l'intervallo tra la 7^a e la 72^a ora, i pazienti del gruppo di trattamento hanno presentato in media un'alta concentrazione di ossigeno venoso, una bassa concentrazione di lattati, un basso valore di deficit di basi e un più alto valore di pH rispetto al gruppo controllo. La mortalità era del 30.5% nel gruppo trattato, mentre nel gruppo di controllo era pari al 46.5% ($p=0.009$). Questo studio ha dimostrato che l'intervento terapeutico precoce è in grado di ripristinare il bilancio tra ossigeno distribuito e richiesta di ossigeno, migliorando la sopravvivenza dei pazienti con sepsi severa. Il ricorso a misurazioni obiettive, come la concentrazione dei lattati, il deficit di basi, il pH e possibilmente la saturazione di ossigeno a livello centrale, risulta quindi molto utile nel *follow-up* dei pazienti in terapia rianimatoria per migliorarne il *management* terapeutico e, di conseguenza, l'*outcome*.

L'insorgenza di IRA in un paziente settico ne peggiora nettamente la prognosi *quoad vitam* (20, 21). Sebbene nelle ultime tre decadi ci sia stato un costante miglioramento nelle terapie di supporto e nell'innovazione delle terapie sostitutive della funzione renale, i tassi di mortalità di questi pazienti restano ancora elevati e tendono ad aumentare con l'aumentare dell'età media. Inoltre, la prevalenza di IRA in corso di sepsi oscilla dal 9 al 40% dei casi ed in uno studio prospettico è stato riportato che l'incidenza aumenta dal 19% nella sepsi, al 23% e 51%, rispettivamente, nella sepsi severa e nello shock settico. Il ricorso alla terapia extracorporea dell'IRA in pazienti in terapia intensiva è frequente e l'utilizzo di membrane con un'alta permeabilità idraulica consente un incremento dell'indice di ultrafiltrazione e la rimozione di soluti nel range di 5-50 kDa (22). Un recente studio clinico ha dimostrato che in corso di IRA la sopravvivenza dei pazienti può essere migliorata incrementando il numero di sedute di terapia sostitutiva. La terapia sostitutiva continua è

diventata routinaria nel trattamento dei pazienti critici caratterizzati da un'elevata instabilità emodinamica e si avvale di un elevato carico di fluidi per la necessità di utilizzare elevati volumi di agenti terapeutici e nutritivi (23, 24). A tal proposito, sono stati proposti approcci più specifici, come per esempio l'emofiltrazione ad alto volume e la plasmafiltrazione continua. Queste tecniche sono in grado di rimuovere diversi mediatori, pro- ed anti-infiammatori, e di superare i limiti della terapia sostitutiva continua (bassi volumi di scambio e bassi coefficienti di rimozione di mediatori associati alla sepsi) (23, 24). Recentemente, l'efficacia dei sistemi di purificazione ematica per i pazienti critici in corso di sepsi è stata migliorata aggiungendo sistemi di adsorbimento non-selettivo su cartuccia (25-29). Studi effettuati con questa tecnica hanno riportato miglioramenti nell'emodinamica e nella sopravvivenza in modelli animali di sepsi. Sfortunatamente, ad oggi, questi sistemi non permettono il monitoraggio *online* dei livelli di glucosio e di lattato e non è ancora noto il completo profilo delle proteine adsorbite.

Da quanto riportato in letteratura, l'iperglicemia e l'aumento della concentrazione ematica del lattato, sono correlate ad un aumento di mortalità del paziente settico (10, 11).

In questo tipo di pazienti, ad esempio, è frequente il riscontro di iperglicemia e, contemporaneamente, di uno *status* di insulino-resistenza, anche quando in precedenza l'omeostasi glucidica era risultata normale (11). I pazienti critici vanno incontro a variazioni metaboliche dovute a vari tipi di stress (ad esempio, trauma chirurgico o sepsi) che si manifestano con una secrezione di ormoni tipici dello stress (cortisolo, catecolamine), ormone della crescita e glucagone. Questo fenomeno determina, inoltre, un aumento della gluconeogenesi. A tutto ciò può associarsi un incremento dei processi di glicolisi anaerobia con conseguente aumento della produzione del lattato, a cui può seguire l'instaurarsi di uno stato di acidosi metabolica, pericoloso per la vita del paziente. Pertanto appare chiaro come il monitoraggio rapido del glucosio e del lattato sia essenziale per il *management* clinico e terapeutico dei pazienti critici.

Attualmente il glucosio ed il lattato sono monitorati ad intervalli non frequenti e la terapia con insulina viene effettuata solo quando i livelli di glucosio superano i 200 mg/dL. La possibilità di disporre di una misura diretta *online* potrebbe offrire al medico il vantaggio di una valutazione in tempo reale delle oscillazioni dei livelli di glucosio e lattato, così come la possibilità di somministrare insulina per mantenere il glucosio entro un ben definito intervallo. È stato dimostrato che il rigido controllo del glucosio è associato ad una diminuzione della degenza nelle unità intensive e della mortalità. Questo monitoraggio, tuttavia, necessi-

ta di dispositivi analitici affidabili dotati di veloci risposte e capaci di lavorare in condizioni operative *online*. A tal fine la ricerca scientifica ha cominciato a rendere disponibili dei dispositivi analitici in grado di valutare in continuo i livelli di glucosio nel sangue, i biosensori (30-32). Questi sensori per il glucosio misurano accuratamente la concentrazione del glucosio *in vivo* e potrebbero trovare un'immediata applicabilità clinica in quanto possono essere inseriti in un sistema di allarme che riveli variazioni anomale della glicemia, oppure come componenti di un sistema chiuso di rilascio dell'insulina (33, 34), regolato dal segnale del sensore. Anche i biosensori per il lattato sono stati oggetto di grande attenzione, poiché la concentrazione del lattato, che in condizioni fisiologiche è pari ad 1.0 ± 0.5 mmol/L, spesso aumenta in pazienti con sepsi (35, 36). Il lattato è stato proposto come *marker* immediato di un potenziale stato reversibile di deficienza energetica nei pazienti critici (37) e la sua misurazione in continuo può fornire ai clinici una finestra di opportunità per intervenire prontamente.

I biosensori per il glucosio e per il lattato sono basati su sistemi enzimatici immobilizzati su membrana: in particolare, si tratta degli enzimi glucosio-ossidasi e lattato-ossidasi ancorati su trasduttori di platino (che consente la rilevazione amperometrica dell' H_2O_2 generata) e protetti da una membrana (acetato di cellulosa o Nafion). Una membrana protettiva esterna (ad esempio, il poliuretano) consente di prevenire il rilascio dell'enzima, di migliorare la biocompatibilità del sensore e di estendere l'intervallo lineare di risposta. Il maggiore svantaggio è costituito dalle interferenze faradiche residue causate dai composti elettroattivi endogeni (ad esempio, l'ascorbato) e/o esogeni (ad esempio, l'acetamminofene). Recentemente è stato dimostrato che se l'interferenza dell'ascorbato può essere efficientemente rimossa, l'acetamminofene introduce un errore inaccettabile (38), sia *in vitro* sia *in vivo*. Inoltre, questa metodologia non può essere facilmente usata per la produzione su scala industriale di dispositivi "usa e getta" a basso costo.

Recentemente questo tipo di biosensori amperometrici è stato implementato, sostituendo il supporto di platino con film polimerici non-conduttori elettrosintetizzati (39). Questa nuova generazione di biosensori possiede peculiari caratteristiche ovvero:

- un controllo elettrochimico della deposizione del film permselectivo;
- più veloci tempi di risposta;
- un'efficiente eliminazione degli interferenti elettroattivi;
- una marcata riduzione degli effetti di avvelenamento.

Benché questa tecnologia possieda tutte le qualità

necessarie per la costruzione di un sensore miniaturizzato per un impianto sottocutaneo diretto, è stato anche descritto un approccio indiretto mediante fibra da microdialisi come sistema di campionamento per la determinazione mediante iniezioni in flusso di glucosio e lattato in campioni non-diluiti di siero ed il monitoraggio in continuo ed *in vivo* del glucosio (40, 41). La tecnologia proposta può essere facilmente applicata a trasduttori *screen-printed* (42, 43), ottenendo biosensori "usa e getta" anche in configurazione doppia. Questi dispositivi a basso costo possono rappresentare un utile strumento per un accurato monitoraggio simultaneo *online* di glucosio e lattato, ad esempio in sistemi *Coupled Plasma Filtration Adsorption* (CPFA).

Pertanto, un importante obiettivo della ricerca futura potrà essere l'ottimizzazione e l'applicazione di un biosensore alle linee ematiche di sistemi di emofiltrazione ed emodiafiltrazione in grado di analizzare *online* i livelli di glicemia e lattato nel trattamento della sepsi severa.

STUDIO DEI PROFILI DI ESPRESSIONE PROTEICA MEDIANTE TECNICHE DI PROTEOMICA

Un altro importante aspetto da considerare durante il trattamento della sepsi è l'efficienza di rimozione delle citochine, delle endotossine e di altri mediatori infiammatori dal plasma del paziente settico. I pazienti con sepsi, infatti, presentano elevati livelli di mediatori pro e anti-infiammatori. Attualmente la purificazione del plasma del paziente può essere ottenuta con cartucce contenenti resine dedicate. Sebbene la resina abbia un'alta affinità per molte citochine ad azione infiammatoria, l'adsorbimento non è specifico e può portare anche alla rimozione di ormoni, peptidi ed importanti fattori di crescita. Di conseguenza il ricorso a tecniche di analisi proteomica potrebbe permettere una valutazione più accurata del profilo proteico di adsorbimento (proteine pro-infiammatorie vs anti-infiammatorie) di diverse formulazioni di resina, consentendo la scelta della più efficiente. La proteomica è una nuova area scientifica, definita come "l'analisi sistematica di proteine in base alla loro identità, quantità e funzione". Il rapido progresso di questa disciplina negli ultimi dieci anni è stato reso possibile dalla continua evoluzione della genomica, delle tecniche di separazione proteica e della spettrometria di massa (44-46). Negli ultimi anni, l'obiettivo principale della proteomica si è spostato dalla caratterizzazione delle proteine (proteomica di espressione) all'utilizzo delle informazioni ottenute sulle proteine per una migliore comprensione dei meccanismi fisiologici e patologici, alla ricerca di

nuovi *biomarker* e nuovi target terapeutici. Infatti, il futuro di questa nuova area delle scienze è considerata la proteomica clinica, ossia l'applicazione delle tecniche di proteomica al "letto del paziente". Esistono varie tecniche di proteomica per identificare e confrontare l'espressione proteica, ciascuna con vantaggi e svantaggi. Il metodo più usato prevede l'impiego dell'elettroforesi bidimensionale (2-DE) per la fase di separazione delle proteine, seguito dalla digestione enzimatica in gel delle proteine e dalla loro identificazione mediante la spettrometria di massa (MALDI-TOF-MS, nano-LC-ESI-MS/MS).

PROTOTIPI DI RENE BIOARTIFICIALE

Attualmente il trattamento dell'IRA si avvale di membrane sintetiche che sostituiscono l'ultrafiltrazione glomerulare. Tale approccio però non sostituisce le funzioni di trasporto, metaboliche ed endocrine delle cellule tubulari prossimali renali. L'emofiltrazione implementata con la terapia cellulare potrebbe, pertanto, migliorare la prognosi di pazienti affetti da IRA in corso di terapia intensiva. Lo sviluppo di un rene bioartificiale ingegnerizzato contenente cellule tubulari prossimali renali potrebbe rappresentare un nuovo approccio terapeutico per il trattamento della sepsi in corso di IRA, in quanto fornirebbe sia i componenti biologici che sintetici in grado di sostituire efficacemente la funzione renale e di migliorare l'*outcome* clinico. Humes et al. hanno sviluppato un rene bioartificiale extracorporeo composto da un emofiltro convenzionale collegato ad un dispositivo contenente cellule renali in grado di sostituire le funzioni del tubulo renale (*Renal Assist Device*, RAD) (47). Questi Autori hanno dimostrato che la combinazione di un supporto sintetico per l'emofiltrazione con la terapia cellulare, che si avvale di un supporto contenente cellule renali tubulari suine in un circuito di perfusione extracorporea, è in grado di ripristinare con successo la funzione renale compromessa di cani affetti da insufficienza renale acuta (47). Gli stessi ricercatori hanno messo a punto un dispositivo utilizzabile per la terapia sull'uomo. Questo biofiltro artificiale è costituito da una cartuccia per l'emofiltrazione, contenete 10^9 cellule tubulari umane coltivate in monostrato lungo la superficie interna di fibre capillari cave che forniscono uno *scaffold* poroso immunoprotettivo. Questo dispositivo funziona come un normale tubulo renale in grado di modificare la composizione dell'ultrafiltrato mediante processi di secrezione e di riassorbimento. L'ultrafiltrato derivato dall'emofiltro è convogliato nel comparto luminale (interno) del RAD, mentre il sangue "post-filtrazione" defluisce nello spazio extracapillare

del RAD stesso (47). In tal modo, le cellule tubulari renali del RAD non sono solo in grado di esplicare le funzioni essenziali di trasporto, filtrazione e riassorbimento del tubulo renale, ma, essendo sensibili anche alle diverse componenti del plasma (ad esempio, citochine, endotossine ed altri fattori proinfiammatori o vasoattivi), possono concorrere al ripristino dell'omeostasi endocrina, metabolica ed immunologica del paziente uremico mediante il rilascio di molecole solubili nel plasma. Il RAD ha dimostrato di poter esplicare tutte queste attività, se inserito in un circuito extracorporeo per il trattamento di animali uremici (47). Questo approccio potrebbe migliorare le terapie attualmente utilizzate per il trattamento di pazienti con IRA, in quanto il RAD potrebbe ripristinare la funzione metabolica renale e l'equilibrio delle citochine in questi pazienti. Infatti, è stato dimostrato che il RAD è in grado di migliorare lo *shock* endotossinico e batterico negli animali uremici, modificando i livelli di citochine, migliorando la pressione arteriosa e mantenendo una buona frazione di eiezione a livello cardiaco (47).

Dopo le iniziali esperienze sull'animale (48), questo prototipo di rene bioartificiale è stato utilizzato anche in uno studio pilota di fase I/II su pazienti con IRA, disfunzione multi-organo e sepsi (49). Dieci pazienti sono stati trattati con il RAD per 24 ore; la sopravvivenza a 30 giorni è stata di 6 pazienti sui 10 trattati, a fronte di una mortalità media calcolata sullo score in ingresso pari all'85%. Il sistema si è mantenuto vitale ed efficiente durante tutto il tempo del trattamento e si è osservata una caduta dei livelli plasmatici di IL-6, G-CSF e IL-10 (49). Analoghe esperienze sono in corso di studio da parte di un gruppo Giapponese (50).

CONCLUSIONI

La sepsi è una patologia caratterizzata, ancora oggi, da un'alta mortalità. Sulla base di quanto riportato si può pertanto affermare che, il miglioramento dell'*outcome* dei pazienti settici con IRA potrà essere conseguito soltanto con l'integrazione di diverse competenze (ricerca di base, clinica e industriale) che potranno consentire lo sviluppo di nuovi strumenti per ottimizzare sia il monitoraggio *online* dei parametri critici sia l'efficienza di depurazione.

DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

RIASSUNTO

La sepsi è una patologia caratterizzata a tutt'oggi da un'elevata mortalità. L'insufficienza renale acuta (IRA), che si riscontra in circa il 5% di tutti i pazienti ospedalizzati, supera il 20% nei pazienti degenti nelle unità di terapia intensiva e, qualora insorga nei pazienti affetti da sepsi, si associa a tassi di mortalità superiori al 75%.

Una condizione che si associa ad aumento della mortalità dei pazienti settici è l'iperglicemia, spesso accompagnata all'incremento della concentrazione ematica del lattato. In questo caso il ricorso a supporti tecnologicamente avanzati, come i biosensori amperometrici, potrebbe offrire al medico la possibilità di valutare rapidamente le variazioni dei livelli di glucosio e lattato, consentendo una rapida correzione anche nel corso di trattamenti dialitici extracorporei.

Il trattamento dell'IRA in corso di sepsi ad oggi si avvale di membrane sintetiche che sostituiscono l'ultrafiltrazione glomerulare. Tale approccio, però, non sostituisce le funzioni di trasporto, metaboliche ed endocrine

delle cellule tubulari prossimali renali. L'emofiltrazione implementata con la terapia cellulare potrebbe, pertanto, migliorare la prognosi di pazienti affetti da IRA in terapia intensiva. Recentemente sono stati sviluppati prototipi di rene bioartificiale extracorporeo composti da un emofiltro convenzionale collegato ad un dispositivo contenente cellule renali in grado di sostituire le funzioni del tubulo renale. Tali dispositivi hanno dimostrato, sia in modelli animali di IRA, che in trials clinici di fase I/II, di esplicitare le funzioni essenziali di trasporto, filtrazione e riassorbimento del tubulo renale e di modulare diverse componenti del plasma (ad es., citochine, endotossine ed altri fattori proinfiammatori o vasoattivi), concorrendo di conseguenza al ripristino dell'omeostasi endocrina, metabolica ed immunologica del paziente settico.

Il miglioramento dell'outcome dei pazienti settici con IRA, quindi, potrà essere conseguito solo dall'integrazione di diverse competenze (ricerca di base, clinica ed industriale) che potranno consentire lo sviluppo di nuovi strumenti che ottimizzino sia il monitoraggio on-line dei parametri critici sia l'efficienza di depurazione.

BIBLIOGRAFIA

1. ACCP. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20 (6): 864-74.
2. Wenzel RP. Treating sepsis. *N Engl J Med* 2002; 347: 966-7.
3. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; 348: 138-50.
4. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA* 1995; 273: 117-23.
5. Neveu H, Kleinknecht D, Brivet F, Loirat P, Landais P. Prognostic factors in acute renal failure due to sepsis. Results of a prospective multicentre study. The French Study Group on Acute Renal Failure. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11: 293-9.
6. De Maio A, Torres MB, Reeves RH. Genetic determinants influencing the response to injury, inflammation, and sepsis. *Shock* 2005; 23: 11-7.
7. Arcaroli J, Fessler MB, Abraham E. Genetic polymorphisms and sepsis. *Shock* 2005; 24: 300-12.
8. Freeman BD, Buchman TG. Gene in a haystack: tumor necrosis factor polymorphisms and outcome in sepsis. *Crit Care Med* 2000; 28: 3090-1.
9. Nakada TA, Hirasawa H, Oda S, et al. Influence of toll-like receptor 4, CD14, tumor necrosis factor, and interleukine-10 gene polymorphisms on clinical outcome in Japanese critically ill patients. *J Surg Res* 2005; 129: 322-8.
10. Van den Berghe G. How does blood glucose control with insulin save lives in intensive care? *J Clin Invest* 2004; 114: 1187-95.
11. Van den Berghe G, Wouters PJ, Bouillon R, et al. Outcome benefit of intensive insulin therapy in the critically ill: Insulin dose versus glycemic control. *Crit Care Med* 2003; 31: 359-66.
12. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001; 345: 1368-77.
13. Holmes CL, Russell JA, Walley KR. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy. *Chest* 2003; 124: 1103-15.
14. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996; 271: 665-8.
15. Srinivas PR, Wagner AS, Reddy LV, et al. Serum alpha 2-HS-glycoprotein is an inhibitor of the human insulin receptor at the tyrosine kinase level. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 1445-55.
16. Mathews ST, Singh GP, Ranalletta M, et al. Improved insulin sensitivity and resistance to weight gain in mice null for the Ahsg gene. *Diabetes* 2002; 51: 2450-8.
17. Menzagh C, Ercolino T, Salvemini L, et al. Multigenic control of serum adiponectin levels: evidence for a role of the APM1 gene and a locus on 14q13. *Physiol Genomics* 2004; 19: 170-4.
18. Osawa H, Yamada K, Onuma H, et al. The G/G genotype of a resistin single-nucleotide polymorphism at -420 increases type 2 diabetes mellitus susceptibility by inducing promoter activity through specific binding of Sp1/3. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 678-86.
19. Rivers EP, Nguyen HB, Amponsah D. Sepsis: a landscape from the emergency department to the intensive care unit. *Crit Care Med* 2003; 31: 968-9.
20. Thijs A, Thijs LG. Pathogenesis of renal failure in sepsis. *Kidney Int Suppl* 1998; 66: S34-7.
21. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA* 1995; 273: 117-23.
22. Bellomo R, Ronco C. Indications and criteria for initiating renal replacement therapy in the intensive care unit.

- Kidney Int Suppl 1998; 66: S106-9.
23. Kellum JA, Johnson JP, Kramer D, Palevsky P, Brady JJ, Pinsky MR. Diffusive vs. convective therapy: effects on mediators of inflammation in patient with severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 1998; 26: 1995-2000.
 24. Kielstein JT, Kretschmer U, Ernst T, et al. Efficacy and cardiovascular tolerability of extended dialysis in critically ill patients: a randomized controlled study. *Am J Kidney Dis* 2004; 43: 342-9.
 25. Formica M, Olivieri C, Livigni S, et al. Hemodynamic response to coupled plasmafiltration-adsorption in human septic shock. *Intensive Care Med* 2003; 29: 703-8.
 26. Bellomo R, Baldwin I, Cole L, Ronco C. Preliminary experience with high-volume hemofiltration in human septic shock. *Kidney Int Suppl* 1998; 66: S182-5.
 27. Reeves JH, Butt WW, Shann F, et al. Continuous plasmafiltration in sepsis syndrome. *Plasmafiltration in Sepsis Study Group. Crit Care Med* 1999; 27: 2096-104.
 28. Tetta C, Gianotti L, Cavaiillon JM, et al. Coupled plasma filtration-adsorption in a rabbit model of endotoxic shock. *Crit Care Med* 2000; 28: 1526-33.
 29. Ronco C, Brendolan A, Lonnemann G, et al. A pilot study of coupled plasma filtration with adsorption in septic shock. *Crit Care Med* 2002; 30: 1250-5.
 30. Bindra DS, Zhang Y, Wilson GS, et al. Design and in vitro studies of a needle-type glucose sensor for subcutaneous monitoring. *Anal Chem* 1991; 63: 1692-6.
 31. Claremont DJ, Penton C, Pickup JC. Potentially-implantable, ferrocene-mediated glucose sensor. *J Biomed Eng* 1986; 8: 272-4.
 32. Johnson KW, Mastrototaro JJ, Howey DC, et al. In vivo evaluation of an electroenzymatic glucose sensor implanted in subcutaneous tissue. *Biosens Bioelectron* 1992; 7: 709-14.
 33. Reach G, Wilson GS. Can continuous glucose monitoring be used for the treatment of diabetes. *Anal Chem* 1992; 64: A381-6.
 34. Sternberg R, Barrau MB, Gangiotti L, et al. Study and development of multilayer needle-type enzyme-based glucose microsensors. *Biosensors* 1989; 4: 27-40.
 35. Meyerhoff C, Bischof F, Mennel FJ, Sternberg F, Bican J, Pfeiffer EF. On line continuous monitoring of blood lactate in men by a wearable device based upon an enzymatic amperometric lactate sensor. *Biosens Bioelectron* 1993; 8: 409-14.
 36. Hu Y, Zhang Y, Wilson GS. A needle-type enzyme-based lactate sensor for in vivo monitoring. *Anal Chim Acta* 1993; 281: 503-11.
 37. Valenza F, Aletti G, Fossali T, et al. Lactate as a marker of energy failure in critically ill patients: hypothesis. *Crit Care* 2005; 9: 588-93.
 38. Moatti-Sirat D, Velho G, Reach G. Evaluating in vitro and in vivo the interference of ascorbate and acetaminophen on glucose detection by a needle-type glucose sensor. *Biosens Bioelectron* 1992; 7: 345-52.
 39. Palmisano F, Zambonin PG, Centonze D. Amperometric biosensors based on electrosynthesised polymeric films. *Fresenius J Anal Chem* 2000; 366: 586-601.
 40. Palmisano F, Centonze D, Zambonin PG. An in situ electrosynthesized amperometric biosensor based on lactate oxidase immobilized in a poly-o-phenylenediamine film: determination of lactate in serum by flow injection analysis. *Biosens Bioelectron* 1994; 9: 471-9.
 41. Palmisano F, Zambonin PG, Centonze D, Quinto M. A disposable, reagentless, third-generation glucose biosensor based on overoxidized poly(pyrrole)/tetrathiafulvalene-tetracyanoquinodimethane composite. *Anal Chem* 2002; 74: 5913-8.
 42. Guerrieri A, Monaci L, Quinto M, Palmisano F. A disposable amperometric biosensor for rapid screening of anticholinesterase activity in soil extracts. *Analyst* 2002; 127: 5-7.
 43. Palmisano F, Quinto M, Rizzi R, Zambonin PG. Flow injection analysis of L-lactate in milk and yoghurt by on-line microdialysis and amperometric detection at a disposable biosensor. *Analyst* 2001; 126: 866-70.
 44. Peng J, Gygi SP. Proteomics: the move to mixtures. *J Mass Spectrom* 2001; 36: 1083-91.
 45. Thongboonkerd V. Proteomics in nephrology: current status and future directions. *Am J Nephrol* 2004; 24: 360-78.
 46. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989; 246: 64-71.
 47. Humes HD, Buffington DA, MacKay SM, Funke AJ, Weitzel WF. Replacement of renal function in uremic animals with a tissue-engineered kidney. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 451-5.
 48. Humes HD, Buffington DA, Lou L, et al. Cell therapy with a tissue-engineered kidney reduces the multiple-organ consequences of septic shock. *Crit Care Med* 2003; 31: 2421-8.
 49. Humes HD, Weitzel WF, Bartlett RH, et al. Initial clinical results of the bioartificial kidney containing human cells in ICU patients with acute renal failure. *Kidney Int* 2004; 66: 1578-88.
 50. Saito A. Research into the development of a wearable bioartificial kidney with a continuous hemofilter and a bioartificial tubule device using tubular epithelial cells. *Artif Organs* 2004; 28: 58-63.