



TOSSINE UREMICHE: IL CASO DEI "PROTEIN-BOUND COMPOUNDS"

Carlo Basile, Pasquale Libutti, Annalisa Teutonico, Carlo Lomonte

Unità Operativa Complessa di Nefrologia e Dialisi, Ente Ecclesiastico, Ospedale Generale Regionale "F. Miulli", Acquaviva delle Fonti (BA)

Uremic toxins: the case of protein-bound compounds

Uremic retention solutes, if biologically or biochemically active, are called "uremic toxins." The retention of these solutes has a negative impact on many functions of the organism, particularly the cardiovascular system. The classification which is applied today is based on the kinetic behavior of the uremic retention solutes during dialysis: 1) small water-soluble molecules (<500 Daltons); 2) middle molecules (>500 Daltons); 3) protein-bound compounds. The latter are the object of the present review. The most important among them are p-cresol, p-cresyl sulfate, homocysteine, phenols, and indoles. No interventional studies are currently available that show the effect of an improvement in the removal of protein-bound compounds on patient outcomes, simply because most of the alternative dialysis strategies proposed so far are not superior to standard dialysis in removing protein-bound compounds. The question as to how to improve the removal of these solutes therefore remains unanswered. Alternative strategies might include adsorption therapies, either administered orally or during the extracorporeal treatment. In conclusion, the uremic syndrome is a complex clinical entity which involves a large number of retention solutes, many more than the small water-soluble molecules. Dialysis strategies should therefore aim to remove not only urea but also retention solutes, mainly because middle and protein-bound molecules appear to be correlated more frequently with deleterious biological, biochemical and clinical effects.

Conflict of interest: None

KEY WORDS:

Hemodialysis, EUTox Work Group, Protein-bound compounds, Uremic syndrome, Uremic toxin

PAROLE CHIAVE:

Emodialisi, EUTox Work Group, Protein-bound compounds, Sindrome uremica, Tossina uremica

✉ Indirizzo degli Autori:

Dr. Carlo Basile
Via C. Battisti 192
74100 Taranto
e-mail: basile.miulli@libero.it

INTRODUZIONE

I pazienti affetti da insufficienza renale cronica (IRC) soffrono di una perdita progressiva della funzione renale, per la quale i reni perdono la loro capacità di rimuovere composti potenzialmente tossici dal sangue nelle urine, risultando nel loro accumulo nell'organismo (1, 2). Come risultato del loro accumulo, questi composti sono chiamati "soluti di ritenzione uremica"; se essi sono biologicamente/biochimicamente attivi, sono chiamati "tossine uremiche". L'accumulo di tali composti ha un impatto negativo su molte funzioni dell'organismo, in particolare sul sistema cardiovascolare (3, 4). Vi sono soluti di ritenzione che, pur non essendo considerati tossici, possono ugualmente suscitare interesse come utili *markers* di altri composti tossici.

CARATTERISTICHE DELLE TOSSINE UREMICHE

Solo alcuni dei soluti di ritenzione uremica si conformano pienamente ad una vera definizione di tossina uremica. Perché un soluto di ritenzione possa essere accettato come vera tossina uremica, dovrebbe soddisfare le seguenti condizioni (1):

- 1) Esso dovrebbe essere identificato chimicamente, ed un'accurata analisi quantitativa dovrebbe essere possibile nei liquidi biologici.
- 2) I suoi livelli corporei e plasmatici dovrebbero essere più elevati nei soggetti uremici che nei non uremici.
- 3) Elevate concentrazioni dovrebbero essere correlate a specifiche disfunzioni uremiche e/o a sintomi che diminuiscono o scompaiono quando la con-

centrazione è ridotta.

- 4) L'attività biologica, conformemente alle alterazioni cliniche osservate in congiunzione con la sindrome uremica, dovrebbe essere provata in studi *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*.
- 5) Le concentrazioni in questi studi dovrebbero conformarsi a quelle trovate nei liquidi corporei o nei tessuti dei pazienti uremici.

Ovviamente, solo alcuni dei soluti di ritenzione uremica si conformano pienamente alla definizione di tossina uremica. Il problema maggiore in questa area di ricerca è che molti dei composti con un potenziale biologico presunto o provato sono difficili da rimuovere con la dialisi convenzionale a causa del loro peso molecolare e/o come conseguenza del loro *protein binding*. Come risultato, la condizione 3 sopra enunciata è particolarmente difficile da corroborare.

CLASSIFICAZIONE DELLE TOSSINE UREMICHE

L'idea di classificare le tossine uremiche nasce dal bisogno di semplificare e strutturare il complesso quadro della "sindrome uremica", soprattutto nell'ottica di adottare approcci terapeutici più razionali, organizzati ed adeguati.

Prima di procedere alla classificazione delle tossine uremiche, ci sembra opportuno ricordare qui alcune sostanze inorganiche, che, pur non essendo tossine uremiche nel senso specifico del termine, lo sono di fatto dal punto di vista clinico. Esse sono:

- l'acqua: il conseguimento di uno stato normale di idratazione è uno degli obiettivi fondamentali della terapia dialitica; un anormale stato di idratazione è stato correlato ad ipertensione arteriosa, ipotensione associata alla dialisi, ed altri sintomi e segni quali edema polmonare e periferico, scompenso cardiaco, ipertrofia ventricolare sinistra, ed altri eventi cardiovascolari avversi. Un recente articolo dimostra che lo stato di idratazione è un predittore importante ed indipendente di mortalità nei pazienti emodializzati, secondo solo alla presenza di diabete (5);
- il sale, il "*neglected silent killer*" nella definizione di Shaldon e Vienken (6): come recitano le *National Kidney Foundation K/DOQI Clinical Practice Guidelines*, "...moderating one's sodium intake is a small price for a patient with CKD to pay if one wishes to avoid the devastating effects of relentless excess sodium and water accumulation on morbidity and mortality" (7);
- il fosfato: è noto che l'iperfosfatemia è associata con un rischio aumentato di morte nei pazienti emodializzati (8). Il rischio di morte aumenta progressivamente per valori di fosfatemia crescente,

fino a raddoppiare per valori di fosfatemia ≥ 9.0 mg/dL (8).

L'identificazione, classificazione, caratterizzazione, determinazione analitica e valutazione biologica dei soluti di ritenzione dell'uremia sono compiti precipi dell'*European Uremic Toxin (EUTox) Work Group*, il cui sito web è www.uremic-toxins.org.

Esso è un gruppo di lavoro sia dell'European Society of Artificial Organs che della *European Renal Association - European Dialysis Transplant Association* (1, 2).

Il sistema di classificazione applicato oggi è ispirato dal comportamento dei soluti di ritenzione uremica durante la terapia dialitica. Le tossine uremiche possono essere suddivise in 3 gruppi maggiori in base alle loro caratteristiche chimiche e fisiche che influenzano la rimozione dei soluti da parte della dialisi o strategie correlate:

- 1) Composti idrosolubili, di peso molecolare (pm) <500 Daltons (Da), *non protein-bound*. I prototipi sono l'urea e la creatinina, che sono rimossi facilmente da qualunque strategia dialitica. I composti di questo gruppo non hanno necessariamente una marcata attività tossica (Tab. I).
- 2) Composti di più elevato pm (>500 Da), le cosiddette medie molecole. Il prototipo è la β_2 -microglobulina. Queste molecole possono essere rimosse da strategie dialitiche che impiegano membrane a più elevata porosità. Molti composti di questo gruppo sono peptidi che influenzano numerosi sistemi dell'organismo. Alcune delle medie molecole più grosse hanno un pm >15.000 Da e sono talora chiamate proteine di basso peso molecolare, benché tutti i peptidi, anche quelli molto più piccoli di 15.000 Da, semanticamente e chimicamente rientrano nella qualifica di proteine di piccolo pm (Tab. II).
- 3) Composti liposolubili e/o *protein-bound*. La maggior parte dei soluti di questo gruppo ha un basso pm, ma alcuni hanno caratteristiche da medie molecole, come la leptina e la proteina legante il retinolo. Prototipi sono i fenoli e gli indoli. Questi composti sono di difficile rimozione da parte della maggior parte delle tecniche dialitiche attualmente disponibili. La loro rimozione dipende largamente dall'equilibrio tra le frazioni libere e legate. Per questi soluti, tecniche adsorbitive potrebbero essere più efficaci. Molti dei composti di questo gruppo hanno attività tossica (Tab. III).

In sintesi, nel 2003 l'*EUTox Work Group* generò una classificazione dei soluti di ritenzione uremica noti in quel momento, identificando 90 composti (2): 45 soluti idrosolubili di basso peso molecolare, 25 *protein-bound compounds* e 22 medie molecole. Due di queste molecole, leptina e proteina legante il retinolo, sono *protein-bound compounds*, ma hanno un peso

molecolare che si conforma a quello delle medie molecole. Dei 90 soluti, 68 avevano un pm <500 Da, 22 un pm >500 Da, 12 un pm >12.000 Da. Le concentrazioni plasmatiche variavano da ng/L (per esempio la metionin-encefalina) a g/L (per esempio l'urea) (Tabb. I, II e III) (1, 2).

TEST DI VERIFICA

1) L'attuale classificazione dell'EUTox Work Group è basata su:

- Comportamento dei soluti di ritenzione uremica durante la dialisi
- Caratteristiche di adsorbimento dei soluti di ritenzione uremica
- Pathways metaboliche dei soluti di ritenzione uremica
- Risposta specifica degli organi bersaglio all'azione dei soluti di ritenzione uremica
- Esclusivamente in base al peso molecolare dei soluti di ritenzione uremica.

2) Quali sono i principali gruppi di tossine uremiche?

- Soluti idrosolubili di piccolo peso molecolare
- Medie molecole
- Protein-bound compounds
- Tutti i precedenti
- Nessuno dei precedenti.

3) Quale delle affermazioni seguenti è vera per la β_2 -microglobulina?

- Ha un peso molecolare >500 Daltons
- Non è protein-bound
- È rimossa più facilmente dalle membrane più permeabili durante la dialisi
- Tutte le precedenti
- Nessuna delle precedenti.

Tuttavia, si può ipotizzare che, se nuove strategie preventive o terapeutiche emergeranno nel futuro, altri sistemi di classificazione potranno diventare ugualmente appropriati. Essi potrebbero essere ispirati da strategie alternative di rimozione, da terapie farmacologiche che intercettino vie metaboliche attivate o bloccate dalle tossine uremiche o da meccanismi fisiopatologici delle tossine uremiche. Un sistema alternativo potrebbe essere quello di classificare i soluti di ritenzione uremica in base alla loro origine, cioè, metabolismo endogeno, metabolismo microbico ed apporto esogeno (9). Ovviamente, la maggioranza di questi soluti origina dal metabolismo endogeno. Tuttavia, viene sempre più riconosciuto che un sottogruppo importante di soluti di ritenzione uremica origina dal metabolismo proteico dei batteri nel

grosso intestino. Sono stati identificati parecchi soluti di ritenzione uremica di origine batterica che hanno effetti tossici *in vitro* e che possono contribuire *in vivo* alla progressione della IRC ed alla mortalità nei pazienti uremici. Pertanto, il metabolismo batterico ed i suoi metaboliti sono *targets* terapeutici razionali nella IRC (9). Esistono due vie terapeutiche principali: 1) interventi che modulano la crescita batterica, come i probiotici, i prebiotici e le modificazioni dietetiche; 2) adsorbenti, che legano i soluti di ritenzione uremica nell'intestino allo scopo di ridurre il loro adsorbimento da parte dell'ospite (9). I probiotici ed i prebiotici si sono dimostrati in grado di modificare la flora microbica intestinale e così di fornire un beneficio clinico negli individui sani; questo, tuttavia, non è stato studiato pienamente nell'IRC (9). Bloccare l'adsorbimento di carboidrati nell'intestino tenue attraverso inibitori dell' α -glucosidasi come l'acarbiosio, può aiutare a modificare la disponibilità del nutriente, che porta a minore fermentazione proteica tossica nel colon (9). Il secondo approccio è quello di limitare l'adsorbimento intestinale dei soluti di ritenzione uremica: ciò può essere ottenuto riducendo la disponibilità dei metaboliti microbici generati attraverso l'adsorbimento su superfici ad alta affinità. Lo AST-120 (*Kremezin*; *Kureha Chemical Industry*, Tokio, Giappone) è un adsorbente somministrato per os che consiste di particelle di carbone sferiche del diametro di 0.2-0.4 mm. È in grado di adsorbire quantità significative di vari composti organici nel grosso intestino, come l'indossil solfato, il p-cresolo e gli *advanced glycation end products* derivati dal cibo (9). Il sevelamer idrocloruro (*Renagel*; *Genzyme*; Cambridge, USA), un chelante del fosfato, è un altro adsorbente potenzialmente utile: infatti, è in grado di legare soluti di ritenzione uremica *in vitro*, quali l'indolo ed il p-cresolo (9).

Questa rassegna è dedicata esclusivamente ai *protein-bound compounds*.

I PROTEIN-BOUND COMPOUNDS

La tossicità uremica colpisce quasi tutti i sistemi dell'organismo. Almeno 5 studi suggeriscono una correlazione tra la concentrazione dei soluti di ritenzione uremica *protein-bound* e parametri di *outcomes* clinici (10-14). Focalizzando la nostra attenzione sul sistema cardiovascolare, l'EUTox Work Group conclude che la maggior parte delle molecole coinvolte nel danno vascolare erano *protein-bound* e/o medie molecole (Tab. IV) (15).

TABELLA I - SOLUTI LIBERI IDROSOLUBILI DI PICCOLO PESO MOLECOLARE (pm) (N = 45)

Soluto	C _N	C _U	C _{MAX}	pm	Gruppo
1-metiladenosina µg/L	17.1±5.1	104.0±56.2	216.4	281	Ribonucleosidi
1-metilguanossina µg/L	13.7±16.9	41.6±23.8	89.2	297	Ribonucleosidi
1- metilinosina µg/L	13.5±3.9	620.4±203.4	1027.2	282	Ribonucleosidi
Dimetilarginina asimmetrica mg/L	0.2±0.06	1.6±1.2	7.3	202	Guanidine
Acido α-cheto-δ-guanidinovalerico µg/L	<30.2	-	140.4	151	Guanidine
α-N-acetilarginina µg/L	18.1±24.8	328.3±142.6	4580.0	216	Guanidine
Arab(in)itolo mg/L	<0.6	15.0±9.0	33.0	152	Polioli
Acido arginico µg/L	<77.0	80.5±56.0	197.8	175	Guanidine
Benzilalcol mg/L	-	27.0±50.7	187.9	108	
Acido β-guanidinopropionico µg/L	<3.3	28.8±18.3	65.4	131	Guanidine
β-lipotropina ng/L	<55.3	67.2	108.8	461	Peptici
Creatina mg/L	9.7±3.3	134.0±30.3	235.8	131	Guanidine
Creatinina mg/L	<12.0	136.0±46.0	240.0	113	Guanidine
Citidina µg/L	<468.0	683.3±287.8	1263.6	234	Purine
Dimetilglicina µg/L	<381.1	576.8	1040.3	103	
Eritritolo mg/L	<0.7	9.8±14.0	37.0	122	Polioli
Acido γ-guanidinobutirrico µg/L	<3.6	33.3±16.0	1750.0	145	Guanidine
Guanidina µg/L	<11.8	172.9±83.8	800.0	59	Guanidine
Acido guanidinoacetico µg/L	222.3±79.6	383.8±143.9	693.8	117	Guanidine
Acido guanidinosuccinico mg/L	0.03±0.01	6.5±3.4	47.0	175	Guanidine
Ipoxantina mg/L	1.5±0.5	2.0±1.6	5.3	136	Purine
Malondialdeide µg/L	257.7±81.7	428.8±170.4	769.6	71	
Mannitolo mg/L	<1.3	26.0±25.0	76.0	182	Polioli
Metilguanidina µg/L	<7.3	773.8±508.8	1820.0	73	Guanidine
Mioinositolo mg/L	<10.0	94.0±69.0	232.0	180	Polioli
N ² ,N ² -dimetilguanossina µg/L	9.0±4.7	236.4±89.7	415.8	311	Ribonucleosidi
N ⁴ -acetilcitidina µg/L	57.0±17.1	159.6±30.8	221.2	285	Ribonucleosidi
N ⁶ -metiladenosina µg/L	18.5±8.4	70.3±53.3	176.9	281	Ribonucleosidi
N ⁶ -treonilcarbamiladenosina µg/L	35.5±27.2	378.0±151.2	680.4	378	Ribonucleosidi
Acido orotico mg/L	0.5±1.4	6.7±16.0	38.7	174	Pirimidine
Orotidina mg/L	1.2±1.6	20.2±13.5	47.2	288	Pirimidine
Ossalato mg/L	0.3±0.1	4.9±1.4	7.6	90	
Fenilacetilglutamina mg/L	<4.7	53.3±44.7	120.6	264	
Pseudouridina mg/L	0.5±5.8	13.1±21.4	86.6	244	Ribonucleosidi
Dimetilarginina simmetrica µg/L	76.1±21.0	640.3±212.1	1232.2	202	Guanidine
Sorbitolo mg/L	<0.4	3.1±2.1	7.3	182	Polioli
Taurociamina µg/L	<52.2	-	121.8	174	Guanidine
Treitolo µg/L	<319.6	990.0±920.0	5697.4	122	Polioli
Timina mg/L	-	2.8±4.2	11.2	126	Pirimidine
Gracile µg/L	<224.0	252.0±154.6	448.0	112	Purine
Urea g/L	<0.4	2.3±1.1	4.6	60	
Acido urico mg/L	<67.2	83.4±44.5	146.7	168	Purine
Uridina mg/L	1.5±1.3	9.8±11.4	32.6	244	Pirimidine
Xantina mg/L	0.5±1.4	1.5±0.8	3.0	152	Purine
Xantosina µg/L	23.9±12.8	96.6±62.9	222.4	284	Ribonucleosidi

Abbreviazioni: C_N: concentrazione normale; C_U: concentrazione uremica media/mediana; C_{MAX}: concentrazione uremica massimale.

TABELLA II - MEDIE MOLECOLE (N = 22)

Soluto	C _N	C _U	C _{MAX}	pm	Gruppo
Adrenomedullina ng/L	13.2±4.6	41.8±19.7	81.2	5729	Peptidi
Peptide natriuretico atriale ng/L	28.0±12.2	202.0±117.3	436.6	3080	Peptidi
β ₂ -microglobulina mg/L	<2.0	55.0±7.9	100.0	11818	Peptidi
β-endorfina ng/L	<173.3	301.5	492.2	3465	Peptidi
Colecistochinina ng/L	<20.0	45.9±32.3	131.5	3866	Peptidi
Proteina delle Clara cell (CC16) mg/L	<0.1	3.3±2.0	12.5	15800	Peptidi
Fattore D del complemento mg/L	1.9±0.5	19.8±4.1	26.0	23750	
Cistatina C mg/L	<1.6	11.8±3.0	20.0	13300	Peptidi
Proteina I inibente la degranulazione µg/L	321.7±59.7	713.7±390.0	1631.4	14100	Peptidi
Peptide induttore del sonno delta µg/L	-	1.5±0.9	3.3	848	Peptidi
Endotelina ng/L	20.8±3.8	63.0±33.2	129.4	4283	Peptidi
Acido ialuronico µg/L	<124.0	215.0±257.0	1843.0	25000	Peptidi
Interleuchina 1β ng/L	<160.0	428.0±134.0	1700.0	32000	Citochine
Interleuchina 6 ng/L	13.3±3.1	92.3±117.9	328.1	24500	Citochine
Catena leggera Ig-k mg/L	34.0±15.0	70.0±60.9	287.0	25000	Peptidi
Catena leggera Ig-λ mg/L	31.0±11.2	87.0±60.9	328.0	25000	Peptidi
Leptina µg/L *	8.4±6.7	72.0±60.6	490.0	16000	Peptidi
Metionina-encefalina ng/L	<18.3	32.2	75.5	555	Peptidi
Neuropeptide ng/L	<80.0	64.9±25.5	115.9	4272	Peptidi
Ormone paratiroideo µg/L	<0.06	1.2±0.6	2.4	9225	Peptidi
Proteina legante il retinolo mg/L *	<80	192.0±78.0	369.2	21200	Peptidi
Tumor necrosis factor-α ng/L	13.3±3.0	114.0±147.0	408.0	26000	Citochine

Abbreviazioni: C_N: concentrazione normale; C_U: concentrazione uremica media/mediana; C_{MAX}: concentrazione uremica massima. * Medie molecole che sono allo stesso tempo protein-bound.

TEST DI VERIFICA

4) Quale può essere la concentrazione plasmatica delle tossine uremiche?

- g/L
- mg/L
- µmoli/L
- ng/L
- Tutte le precedenti
- Nessuna delle precedenti.

5) Quale delle affermazioni seguenti è vera?

- Tutte le tossine uremiche sono *protein-bound*
- Tutte le tossine uremiche hanno un peso molecolare >500 Daltons
- Tutti i soluti di ritenzione uremica sono tossici
- Tutte le precedenti
- Nessuna delle precedenti.

6) Quale delle affermazioni seguenti è vera per i *protein-bound compounds*?

- Hanno un peso molecolare >500 Daltons

- Sono generalmente non tossici
- Vengono rimossi più facilmente dalla dialisi *high-flux* rispetto alla dialisi standard
- Tutte le precedenti
- Nessuna delle precedenti.

7) I soluti *protein-bound* sono coinvolti soprattutto nel determinismo di patologie dei seguenti organi o sistemi (è ammessa una sola risposta):

- Ossa
- Neuromuscolare
- Endocrino
- Vascolare
- Emopoietico.

Le molecole *protein-bound* di maggiore rilevanza sono:

p-cresolo e p-cresilsolfato

Il p-cresolo, un fenolo con peso molecolare di soli 108 Da, è stato considerato il prototipo delle tossine uremiche *protein-bound lipofile*. Esso è un prodotto ter-

TABELLA III - PROTEIN-BOUND COMPOUNDS (N = 25)

Soluto	C _N	C _U	C _{MAX}	pm	Gruppo
A2-metossiresorcinolo µg/L	-	19.6±81.2	322.0	140	Fenoli
3-deossiglucosone mg/L	0.3±0.1	1.7±1.0	3.5	162	AGE
CMPF mg/L	7.7±3.3	61.0±16.5	94.0	240	
Fruttosolisina mg/L	-	58.1±10.8	79.7	308	AGE
Gliossale µg/L	67.0±20.0	221.0±28.0	277.0	58	AGE
Acido ippurico mg/L	<5.0	247.0±112.0	471.0	179	Ippurati
Omocisteina mg/L	<1.7	8.1±1.6	26.4	135	
Idrochinone µg/L	-	50.6±84.7	286.0	110	Fenoli
Acido indolo-3-acetico µg/L	17.5±17.5	875.0±560.0	9076.9	175	Indoli
Indossil solfato mg/L	0.6±5.4	53.0±91.5	236.0	251	Indoli
Chinurenina µg/L	<391	686.4±178.9	952.6	208	Indoli
Acido chinurenico mg/L	<1.0	-	9.5	189	Indoli
Leptina µg/L *	8.4±6.7	72.0±60.6	490.0	16000	Peptidi
Melatonina ng/L	26.5±7.1	175.8±130.2	436.2	126	Indoli
Metilgliossale µg/L	47.0±12.0	110.0±18.0	146.0	72	AGE
N-(carbossimetil)lisina mg/L	1.1±0.3	4.3±1.3	6.9	204	AGE
p-cresolo mg/L	0.6±1.0	20.1±10.3	40.7	108	Fenoli
Pentosidina µg/L	51.6±18.8	896.0±448.0	2964.0	342	AGE
Fenolo mg/L	0.6±0.2	2.7±3.9	10.5	94	Fenoli
Acido p-OHippurico mg/L	-	18.3±6.6	31.5	195	Ippurati
Putrescina µg/L	21.1±7.9	77.4±27.3	132.0	88	Poliamine
Acido chinolinico mg/L	0.1±0.05	1.5±0.9	3.3	167	Indoli
Proteina legante il retinolo mg/L *	<80	192.0±78.0	369.2	21200	Peptidi
Spermidina µg/L	-	97.2±45.0	187.2	145	Poliamine
Spermina µg/L	-	18.2±16.2	66.7	202	Poliamine

Abbreviazioni: C_N: concentrazione normale; C_U: concentrazione uremica media/mediana; C_{MAX}: concentrazione uremica massimale; CMPF: acido 3-carbossi-4-metil-5-propil-2-furanpropionico.

* Medie molecole che sono allo stesso tempo protein-bound.

minale del catabolismo proteico, prodotto dai batteri intestinali che metabolizzano tiroxina e fenilalanina (16). Le concentrazioni plasmatiche di p-cresolo sono state correlate in parecchi studi a parametri di *outcome* clinico, come la frequenza delle ospedalizzazioni (particolarmente per infezioni) (10), sintomi clinici della sindrome uremica (12), mortalità (11) e mortalità cardiovascolare (17). Vi è scarsità di dati circa gli effetti biochimici dei composti coniugati. Molto recentemente è stato dimostrato che il p-cresilsolfato libero, e non quello totale, è un predittore di mortalità nei pazienti affetti da IRC (14). In uno studio è stato dimostrato che il p-cresilsolfato stimola l'attività leucocitaria di base, di fatto sottolineando un effetto pro-infiammatorio, mentre il composto madre, il p-cresolo, inibisce es-

senzialmente la funzione leucocitaria attivata (18). A causa del loro forte legame proteico, la loro rimozione attraverso la dialisi tradizionale è ridotta (19, 20). La dialisi *high-flux* non ha effetti benefici sulla rimozione di queste tossine rispetto alla dialisi *low-flux* (19, 21). Tuttavia, il p-cresolo è rimosso meglio con la dialisi *high-flux* che con la dialisi peritoneale (22). Applicando la combinazione di separazione frazionata del plasma ed adsorbimento, la rimozione di p-cresolo è marcatamente aumentata, una strategia usata correntemente come fegato artificiale (*Prometheus*[®], *Fresenius Medical Care*, Germania) (23). Questo studio ha il merito di dimostrare che l'adsorbimento può diventare un'opzione importante nella rimozione di questo tipo di composti.

TABELLA IV - TOSSINE UREMICHE CON UN IMPATTO POTENZIALE SUL SISTEMA VASCOLARE

Tossina uremica	Leucociti	Cellule endoteliali	Cellule muscolari lisce	Piastrine
Advanced glycation end products	x	x	x	
Advanced oxidation protein products	x	x		
AGE- β_2 -microglobulina	x			
Angiogenina DIP I	x			
β_2 -microglobulina	x	x	x	
Fattore D del complemento	x			
Citochine	x	x	x	x
Omocisteina	x	x	x	
Catene leggere Ig	x			
Leptina	x	x		x
Acido ossalico		x		
Frammenti α del fibrinogeno				x
Tutti			x	
Guanidine	x			
Indossil solfato		x		
p-cresilsolfato	x			
Acido fenilacetico		x		

Per quanto riguarda le strategie convettive, le emodiafiltrazioni postdiluzionali e prediluzionali non differiscono per quanto riguarda la rimozione di p-cresolo (24).

OMOCISTEINA

L'omocisteina è un aminoacido contenente zolfo, prodotto dalla demetilazione della metionina. La sua ritenzione nell'uremia porta all'accumulo intracellulare di S-adenosil omocisteina, un composto estremamente tossico che compete con la S-adenosil metionina, e inibisce le metiltransferasi (25). I pazienti affetti da IRC hanno livelli sierici di omocisteina totale superiori da 2 a 4 volte ai livelli sierici dei soggetti normali. La iperomocisteinemia moderata è un fattore di rischio indipendente di malattia cardiovascolare nella popolazione generale ed è un fattore di rischio cardiovascolare prevalente nei pazienti affetti da IRC (26, 27). L'omocisteina aumenta la proliferazione delle cellule muscolari lisce, una delle maggiori caratteristiche dell'aterosclerosi (28). Essa altera anche diverse funzioni anticoagulanti della parete vascolare, portando ad aumentata trombogenicità (29). I livelli sierici di omocisteina possono essere ridotti in maniera moderata dalla somministrazione di acido folico, vitamina B6 e/o vitamina B12 (30). Una prova clinica diretta del

beneficio della diminuzione dei livelli sierici di omocisteina nell'uremia non è ancora disponibile. Inoltre, bassi piuttosto che alti livelli di omocisteina sono stati associati ad *outcomes* negativi in 2 grossi studi osservazionali (31, 32). Gli eventi vascolari non furono ridotti in 2 grossi studi randomizzati controllati che ridussero in maniera efficace i livelli sierici di omocisteina per mezzo dell'acido folico e delle vitamine B (33, 34). Si ritiene che la rimozione dialitica dell'omocisteina sia scarsa al pari delle altre tossine *protein-bound*. La dialisi con una membrana dialitica estremamente aperta ("*superflux*"), tuttavia, fu in grado di diminuire le concentrazioni sieriche di omocisteina, probabilmente attraverso una modificazione del metabolismo, piuttosto che per un effetto diretto di rimozione (35).

INDOLI

L'indossil solfato è metabolizzato dal fegato dall'indolo, che è prodotto dalla flora intestinale come metabolita del triptofano. L'indossil solfato può giocare un ruolo nella disfunzione endoteliale dell'uremia inibendo la proliferazione e la riparazione delle cellule endoteliali (36), mentre induce una produzione significativa di radicali liberi nelle cellule endoteliali (37). È stato suggerito che l'indossil solfato gioca un ruolo nella calcificazione aortica (38). Molto recentemente

è stato riportato che l'indossil solfato ha un ruolo significativo nella patologia vascolare e nella più elevata mortalità osservate nei pazienti affetti da IRC (13). La rimozione degli indoli *protein-bound* è ridotta durante la dialisi (19). Nell'emodialisi convenzionale, la membrana di triacetato *superflux* fu superiore alla membrana di triacetato di cellulosa *low flux* per quanto riguarda la rimozione di indossil solfato (39). In un gruppo di pazienti affetti da IRC, ma non in dialisi, l'adsorbente AST-120 (Kremezin) diminuì l'indossil solfato in una maniera dose-dipendente, ma non dimostrò alcun beneficio sulla riduzione della funzione renale, probabilmente a causa del breve periodo di osservazione (40).

Ad oggi non esistono studi di intervento sull'effetto del miglioramento della rimozione dei *protein-bound compounds* sull'*outcome*, semplicemente perché la maggior parte delle strategie dialitiche alternative non è superiore alla emodialisi standard nella loro capacità di rimozione delle molecole *protein-bound*. L'emodialisi *high-flux* non ha un impatto significativo sulla concentrazione dei soluti *protein-bound* rispetto all'emodialisi standard (19). Il nostro gruppo ha effettuato uno studio per valutare la rimozione dei soluti *protein-bound* nell'emodialisi prolungata con bicarbonato (8 ore) e nell'emodialisi standard con bicarbonato (4 ore) (41). In questo studio abbiamo investigato l'effetto isolato del fattore tempo sulla rimozione e sulla cinetica di 4 soluti *protein-bound*: l'omocisteina (pm: 135 Da, protein binding ~ 50%), l'acido ippurico (pm: 179.2 Da, protein binding ~ 90%), l'acido indolo-3-acetico (pm: 175.2 Da, protein binding ~ 85%) e l'indossil solfato (pm: 212.1 Da, protein binding ~ 80%) (41). Furono determinati la rimozione totale dei soluti, i volumi totali depurati ("cleared") (*clearance**tempo) e le frazioni di estrazione del dializzatore (*clearance*/flusso ematico). Non fu osservata alcuna differenza statisticamente significativa nei 3 parametri studiati nel confronto tra le dialisi di 8 ore e quelle di 4 ore (41). I nostri dati non sono inattesi, in quanto va tenuto debito conto della forza del *protein binding* di queste molecole nel plasma. Uno studio recentissimo che ha confrontato la rimozione dei *protein-bound compounds* nell'emodialisi e nell'emodiafiltrazione post-diluzionale, ha mostrato che la rimozione di queste sostanze è governata principalmente dalla diffusione (42). In realtà, un altro studio recente aveva mostrato che l'aumento del coefficiente dell'area del mass transfer del dializzatore e del flusso del dialisato, avevano un effetto positivo sulle *clearances* dei soluti *protein-bound* (43). I dati di Krieter et al. (42), confermano precedenti studi *in vitro* sull'emofiltrazione e sull'emodiafiltrazione continua veno-venosa, che suggeriscono che l'aumento della rimozione delle tossine *protein-bound* attraverso un aumento della convezione è irrilevante (44). I dati di Krieter et al. (42)

confliggono con quelli di un *trial* precedente, che ha riportato una rimozione del p-cresolo (sia libero che coniugato) lievemente superiore con i trattamenti convettivi, ivi inclusa l'emodiafiltrazione post-diluzionale (21), che, in definitiva, rimane la più efficiente strategia dialitica convettiva per la rimozione dei *protein-bound compounds* (45). Le ragioni di queste discrepanze sono ampiamente discusse nell'articolo di Krieter et al. (42). Così, rimane irrisolta la domanda, come migliorare la *clearance* di questi soluti di ritenzione uremica? Strategie alternative promettono di essere forme di terapia più efficienti. Esse potrebbero comprendere terapie di adsorbimento, applicate sia oralmente (46, 47) o durante la terapia extracorporea (23, 48), che interagiscono con i *protein-bound compounds* o con i loro precursori, e tecniche in grado di alterare la forza del *protein binding* di queste molecole nel plasma.

TEST DI VERIFICA

8) Quale soluto è stato considerato il prototipo delle tossine uremiche *protein-bound lipofile*?

- p-cresolo
- Omocisteina
- Indossil solfato
- Acido ippurico
- Acido indolo-3-acetico.

9) A quali parametri di *outcome* clinico sono state associate le concentrazioni plasmatiche di p-cresolo?

- Frequenza delle ospedalizzazioni (particolarmente per infezioni)
- Sintomi clinici della sindrome uremica
- Mortalità
- Mortalità cardiovascolare
- Tutti i precedenti
- Nessuno dei precedenti.

10) Quali delle seguenti strategie potrebbe rivelarsi più utile per migliorare la rimozione dei soluti *protein-bound*? (è ammessa una sola risposta):

- Emodialisi *high-flux*
- Adsorbimento orale o legato alla seduta emodialitica
- Emofiltrazione
- Emodiafiltrazione *online*
- Emodialisi lunga.

CONCLUSIONI

Alla luce del fatto che la dialisi rimane la principale strategia terapeutica per contrastare l'impatto clinico delle molecole di ritenzione uremica, specialmente negli stadi avanzati di IRC, l'approccio più pratico appare quello della suddivisione dei soluti uremici in: 1)

composti idrosolubili di piccolo pm; 2) medie molecole; 3) soluti *protein-bound*.

La sindrome uremica è una condizione complessa che interessa un gran numero di soluti di ritenzione molto più numerosi dei soluti idrosolubili di piccolo pm. Quindi, noi dovremmo essere consapevoli di questo nell'interpretare il valore dell'urea e creatinina come *markers* di ritenzione uremica e realizzare che vi sono più giocatori nell'uremia che le sole urea e creatinina. Similmente, le strategie di rimozione dovrebbero mirare alla rimozione non solo dell'urea, soprattutto perché le medie molecole e i composti *protein-bound* sembrano essere correlati ad effetti deleteri biologici, biochimici e clinici.

RIASSUNTO

I soluti di ritenzione uremica, se biologicamente/biochimicamente attivi, sono chiamati "tossine uremiche". L'accumulo di tali composti ha un impatto negativo su molte funzioni dell'organismo, in particolare sul sistema cardiovascolare. Alla luce del fatto che la dialisi rimane la principale strategia terapeutica per contrastare l'impatto clinico delle molecole di ritenzione uremica, l'approccio più pratico appare quello della suddivisione dei soluti uremici in: 1) composti idrosolubili di piccolo peso

molecolare (<500 Daltons); 2) medie molecole (>500 Daltons); 3) soluti protein-bound. Questa rassegna è dedicata esclusivamente ai protein-bound compounds. Quelli di maggiore rilevanza sono il p-cresolo il p-cresil-solfato, l'omocisteina, i fenoli e gli indoli. Ad oggi non esistono studi di intervento sull'effetto del miglioramento della rimozione dei protein-bound compounds sull'outcome, semplicemente perché la maggior parte delle strategie dialitiche alternative proposte non è superiore alla emodialisi standard nella capacità di rimozione delle molecole protein-bound. Così, rimane aperta la questione su come migliorare la rimozione di questi soluti. Strategie alternative potrebbero comprendere terapie adsorbitive, applicate sia oralmente che durante la terapia extracorporea. In conclusione, la sindrome uremica è una condizione clinica complessa che interessa un gran numero di soluti di ritenzione molto più numerosi dei soluti idrosolubili di piccolo peso molecolare. Pertanto, le strategie dialitiche dovrebbero mirare alla rimozione non solo dell'urea, soprattutto perché le medie molecole e i composti protein-bound sembrano essere maggiormente correlati ad effetti deleteri biologici, biochimici e clinici.

DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

BIBLIOGRAFIA

1. Vanholder R, Glorieux G, De Smet R, Lameire N. European Uremic Toxin Work Group. New insights in uremic toxins. *Kidney Int Suppl* 2003; (84): S6-10.
2. Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, et al. European Uremic Toxin Work Group (EUTox). Review on uremic toxins: classification, concentration and interindividual variability. *Kidney Int* 2003; 63: 1934-43.
3. Vanholder R, Massy Z, Argilés A, Spasovski G, Verbeke F, Lameire N. European Uremic Toxin Work Group. Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 1048-56.
4. Van Biesen W, De Bacquer D, Verbeke F, Delanghe J, Lameire N, Vanholder R. The glomerular filtration rate in an apparently healthy population and its relation with cardiovascular mortality during 10 years. *Eur Heart J* 2007; 28: 478-83.
5. Wizemann V, Wabel P, Chamney P, et al. The mortality risk of overhydration in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 1574-9.
6. Shaldon S, Vienken J. Salt, the neglected silent killer. *Semin Dial* 2009; 22: 264-6.
7. Depner T, Daugirdas J, Goldstein S, et al. Clinical practice guidelines for hemodialysis adequacy guideline 5: control of volume and blood pressure. *Am J Kidney Dis* 2006; (Suppl. 1): S33-9.
8. Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, Ofsthun N, Lowrie EG, Chertow GM. Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 2208-18.
9. Evenepoel P, Meijers BK, Bammens BR, Verbeke K. Uremic toxins originating from colonic microbial metabolism. *Kidney Int Suppl* 2009; (114): S12-9.
10. De Smet R, Van Kaer J, Van Vlem B, et al. Toxicity of free p-cresol: a prospective and cross-sectional analysis. *Clin Chem* 2003; 49: 470-8.
11. Bammens B, Evenepoel P, Keuleers H, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Free serum concentrations of the protein-bound solute p-cresol predict mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2006; 69: 1081-7.
12. Bammens B, Evenepoel P, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Removal of middle molecules and of protein-bound solutes by peritoneal dialysis and relation with uremic symptoms. *Kidney Int* 2003; 64: 2238-43.
13. Barreto FC, Barreto DV, Liabeuf S, et al. European Uremic Toxin Work Group (EUTox). Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4: 1551-8.
14. Liabeuf S, Barreto DV, Barreto FC, et al. European Uremic Toxin Work Group (EUTox). Free p-cresylsulphate is a predictor of mortality in patients at different stages of chronic kidney

- disease. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25: 1183-91.
15. Vanholder R, Argilés A, Baumeister U, et al. Uremic toxicity: present state of the art. *Int J Artif Organs* 2001; 24: 695-725.
 16. De Smet R, Glorieux G, Hsu C, Vanholder R. p-cresol and uric acid: two old uremic toxins revisited. *Kidney Int Suppl* 1997; 62: S8-11.
 17. Meijers BK, Bammens B, De Moor B, Verbeke K, Vanrenterghem Y, Evenepoel P. Free p-cresol is associated with cardiovascular disease in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2008; 73: 1174-80.
 18. Schepers E, Meert N, Glorieux G, Goeman J, Van der Eycken J, Vanholder R. p-cresylsulphate, the main in vivo metabolite of p-cresol, activates leucocyte free radical production. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 592-6.
 19. Lesaffer G, De Smet R, Lameire N, Dhondt A, Duym P, Vanholder R. Intradialytic removal of protein-bound uraemic toxins: role of solute characteristics and of dialyser membrane. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 50-7.
 20. Martinez AW, Recht NS, Hostetter TH, Meyer TW. Removal of p-cresol sulfate by hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 3430-6.
 21. Bammens B, Evenepoel P, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Removal of the protein-bound solute p-cresol by convective transport: a randomized crossover study. *Am J Kidney Dis* 2004; 44: 278-85.
 22. Evenepoel P, Bammens B, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Superior dialytic clearance of beta(2)-microglobulin and p-cresol by high-flux hemodialysis as compared to peritoneal dialysis. *Kidney Int* 2006; 70: 794-9.
 23. Meijers BK, Weber V, Bammens B, et al. Removal of the uremic retention solute p-cresol using fractionated plasma separation and adsorption. *Artif Organs* 2008; 32: 214-9.
 24. Meert N, Eloit S, Waterloos MA, et al. Effective removal of protein-bound uraemic solutes by different convective strategies: a prospective trial. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 562-70.
 25. Perna AF, Ingrosso D, De Santo NG, Galletti P, Zappia V. Mechanism of erythrocyte accumulation of methylation inhibitor S-adenosylhomocysteine in uremia. *Kidney Int* 1995 47: 247-53.
 26. Clarke R, Daly L, Robinson K, et al. Hyperhomocystinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 1149-55.
 27. Bostom AG, Shemin D, Lapane KL, et al. Hyperhomocysteinemia and traditional cardiovascular disease risk factors in end-stage renal disease patients on dialysis: a case-control study. *Atherosclerosis* 1995; 114: 93-103.
 28. Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M, et al. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 6369-73.
 29. Harpel PC, Zhang X, Borth W. Homocysteine and hemostasis: pathogenic mechanisms predisposing to thrombosis. *J Nutr* 1996; 126 (4 Suppl.): S1285-9.
 30. Ubbink JB, Vermaak WJ, van der Merwe A, Becker PJ. Vitamin B-12, vitamin B-6, and folate nutritional status in men with hyperhomocysteinemia. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 47-53.
 31. Kalantar-Zadeh K, Block G, Humphreys MH, McAllister CJ, Kopple JD. A low, rather than a high, total plasma homocysteine is an indicator of poor outcome in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 442-53.
 32. Busch M, Franke S, Müller A, et al. Potential cardiovascular risk factors in chronic kidney disease: AGEs, total homocysteine and metabolites, and the C-reactive protein. *Kidney Int* 2004; 66: 338-47.
 33. Jamison RL, Hartigan P, Kaufman JS, et al. Veterans Affairs Site Investigators. Effect of homocysteine lowering on mortality and vascular disease in advanced chronic kidney disease and end-stage renal disease: a randomized controlled trial. *JAMA* 2007; 298: 1163-70.
 34. Mann JF, Sheridan P, McQueen MJ, et al. HOPE-2 Investigators. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in people with chronic kidney disease--results of the renal Hope-2 study. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 645-53.
 35. De Vriese AS, Langlois M, Bernard D, et al. Effect of dialyser membrane pore size on plasma homocysteine levels in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 2596-600.
 36. Dou L, Bertrand E, Cerini C, et al. The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair. *Kidney Int* 2004; 65: 442-51.
 37. Dou L, Jourde-Chiche N, Faure V, et al. The uremic solute indoxyl sulfate induces oxidative stress in endothelial cells. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1302-8.
 38. Adijugha A, Goto S, Uramoto S, Nishijima F, Niwa T. Indoxyl sulphate promotes aortic calcification with expression of osteoblast-specific proteins in hypertensive rats. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 1892-901.
 39. De Smet R, Dhondt A, Eloit S, Galli F, Waterloos MA, Vanholder R. Effect of the super-flux cellulose triacetate dialyser membrane on the removal of non-protein-bound and protein-bound uraemic solutes. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 2006-12.
 40. Schulman G, Agarwal R, Acharya M, Berl T, Blumenthal S, Kopyt N. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study of AST-120 (Kremezin) in patients with moderate to severe CKD. *Am J Kidney Dis* 2006; 47: 565-77.
 41. Basile C, Libutti P, Di Turo AL, et al. Removal of uraemic retention solutes in standard bicarbonate haemodialysis and long-hour slow-flow bicarbonate haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2010; doi: 10.1093/ndt/gfq543.
 42. Krieter DH, Hackl A, Rodriguez A, et al. Protein-bound uraemic toxin removal in haemodialysis and post-dilution haemodiafiltration. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25: 212-8.
 43. Luo FJ, Patel KP, Marquez IO, Plummer NS, Hostetter TH, Meyer TW. Effect of increasing dialyzer mass transfer area coefficient and dialysate flow on clearance of protein-bound solutes: a pilot crossover trial. *Am J Kidney Dis* 2009; 53: 1042-9.
 44. Meyer TW, Walther JL, Pagtalunan ME, et al. The clearance of protein-bound solutes by hemofiltration and hemodiafiltration. *Kidney Int* 2005; 68: 867-77.
 45. Meert N, Eloit S, Waterloos MA, et al. Effective removal of protein-bound uraemic solutes by different convective strategies: a prospective trial. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 562-70.
 46. Shimoishi K, Anraku M, Kitamura K, et al. An oral adsorbent, AST-120 protects against the progression of oxidative stress by reducing the accumulation of indoxyl sulfate in the systemic circulation in renal failure. *Pharm Res* 2007; 24: 1283-9.
 47. Evenepoel P, Bammens B, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Acarbose treatment lowers generation and serum concentrations of the protein-bound solute p-cresol: a pilot study. *Kidney Int* 2006; 70: 192-8.
 48. Meyer TW, Peattie JW, Miller JD, et al. Increasing the clearance of protein-bound solutes by addition of a sorbent to the dialysate. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 868-74.