



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Medicina Molecolare

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN: BIOMEDICINA

CURRICOLO: MEDICINA RIGENERATIVA

XXIX° CICLO

***ADEGUAMENTO DEL DOSAGGIO DEGLI ANTIBIOTICI NELLE
TERAPIE RENALI SOSTITUTIVE: USO DI MODELLI IN VITRO QUALE
STRUMENTO PREDITTIVO DELLA FARMACOCINETICA***

Tesi redatta con il contributo finanziario

dell'Associazione Amici del Rene di Vicenza ONLUS

Coordinatore: Ch.mo Prof. Stefano Piccolo

Supervisore: Ch.ma Prof.ssa Maria Teresa Conconi

Co-Supervisore: Ch.mo Prof. Claudio Ronco

Dottorando: Marco Sartori

“Una vita senza ricerca non è degna di essere vissuta”

(Socrate, 470 a.C. – 399 a.C.)

Al mio Maestro
Professor Claudio Ronco.

Essere il tuo allievo
è stata una scuola di vita

Alla Professoressa Mirella Zancato.

Grazie per avermi
condotto lungo la rotta

INDICE DEI CONTENUTI

ABBREVIAZIONI	VII
RIASSUNTO	XI
ABSTRACT	XIII

LO STATO DELL'ARTE

L'USO DEGLI ANTIBIOTICI

NELLE TERAPIE RENALI SOSTITUTIVE EXTRACORPOREE

Introduzione	1
--------------------	---

CAPITOLO 1

L'INSUFFICIENZA RENALE E

LE INFEZIONI BATTERICHE

1.1 L'insufficienza renale cronica: aspetti epidemiologici ed eziopatogenesi	3
1.1.1 La classificazione dell'insufficienza renale cronica	4
1.1.2 Le infezioni batteriche nei pazienti in emodialisi	5
1.2 L'insufficienza renale acuta aspetti epidemiologici ed eziopatogenesi.....	7
1.2.1 La classificazione dell'insufficienza renale acuta	8
1.2.2 Le infezioni batteriche nel paziente critico.....	9

CAPITOLO 2

LE ALTERAZIONI FARMACOCINETICHE

NELLE TERAPIE RENALI SOSTITUTIVE EXTRACORPOREE

2.1 Farmacocinetica e farmacodinamica nelle terapie renali sostitutive extracorporee intermittenti e continue	13
2.2 Principi e parametri tecnici delle terapie renali sostitutive extracorporee.....	15
2.2.1 Il trasporto dei soluti attraverso le membrane	15
2.2.2 L'emodialisi, l'emofiltrazione e l'emodiafiltrazione.....	18
2.2.3 L'emoperfusione.....	20
2.3 I fattori che influenzano la dializzabilità di un farmaco	21
2.3.1 Le proprietà chimico-fisiche e i parametri farmacocinetici.....	22
2.3.2 I parametri tecnici del trattamento extracorporeo.....	23
2.3.3 La fisiopatologia del paziente	27

CAPITOLO 3

SCOPO DELLA TESI

3.1 Obiettivi del progetto di ricerca	31
---	----

CAPITOLO 4

GLI ANTIBIOTICI OGGETTO DELLA SPERIMENTAZIONE:

ASPETTI FARMACEUTICI E FARMACOLOGICI

4.1 I glicopeptidi	33
--------------------------	----

4.1.1 La vancomicina.....	33
4.1.2 La teicoplanina.....	36
4.2 Gli aminoglicosidi.....	40
4.2.1 La gentamicina.....	40
4.2.2 La tobramicina	44
4.3 Il linezolid.....	48

CAPITOLO 5

MATERIALI E METODI

5.1 Il monitor e la cartuccia adsorbente per i modelli di emoperfusione.....	53
5.1.1 Il monitor prototipo Bellco	53
5.1.2 La cartuccia adsorbente Lixelle-35.....	55
5.2 Il monitor e il filtro per il modello di emofiltrazione	57
5.2.1 Il monitor carpediem.....	58
5.2.2 Il filtro in polisulfone.....	60
5.3 Il modello in vitro di emoperfusione diretta per la sperimentazione con i glicopeptidi	61
5.3.1 L'allestimento dei veicoli in soluzione fisiologica	61
5.3.2 Il circuito in vitro per l'emoperfusione e il campionamento	62
5.3.3 Il dosaggio dei campioni e l'analisi dei dati	63
5.4 Il modello in vitro di emoperfusione diretta per la sperimentazione con gli aminoglicosidi.....	65
5.4.1 L'allestimento dei veicoli in sangue umano	65

5.4.2 Il circuito in vitro per l'emoperfusione e il campionamento	67
5.4.3 Il dosaggio dei campioni e l'analisi dei dati	68
5.5 Lo screening test per la valutazione del legame competitivo tra teicoplanina e β 2-microglobulina sul polimero di cellulosa modificata	71
5.5.1 L'allestimento dei veicoli e della soluzione di β 2-microglobulina.....	72
5.5.2 Il disegno dello studio in vitro	73
5.5.3 Il dosaggio dei campioni e l'analisi dei dati	75
5.6 Il modello in vitro di emofiltrazione per la sperimentazione con il linezolid e la tobramicina.....	78
5.6.1 L'allestimento dei veicoli per la sperimentazione	79
5.6.2 Il circuito in vitro per l'emofiltrazione e il campionamento.....	80
5.6.3 Il dosaggio dei campioni e l'analisi dei dati	82

CAPITOLO 6

RISULTATI

6.1 La rimozione dei glicopeptidi durante l'emoperfusione diretta.....	87
6.2 La rimozione degli aminoglicosidi durante l'emoperfusione diretta.....	91
6.3 L'adsorbimento competitivo sul polimero di cellulosa modificata	95
6.4 La rimozione del linezolid e della tobramicina durante l'emofiltrazione.....	103

CAPITOLO 7

DISCUSSIONE

7.1 L'adsorbimento degli antibiotici nella tecnica dell'emoperfusione diretta ..	117
7.2 L'interazione farmaco-membrana nella tecnica dell'emofiltrazione.....	125

CAPITOLO 8

CONCLUSIONI

Approcci razionali per l'adeguamento delle dosi	133
APPENDICE	139
BIBLIOGRAFIA	145
RINGRAZIAMENTI.....	169

ABBREVIAZIONI

Å	Ångström
ADME	Assorbimento, Distribuzione, Metabolismo ed Eliminazione
ADQI	Acute Dialysis Quality Initiative
AKIN	Acute Kidney Injury Network
Alb	Albumina
BCP	Violetto di Bromocresolo
BLD	Blood Leakage Detector
CARPEDIEM	Cardio-Renal Pediatric Dialysis Emergency Machine
CL	Clearance
CPDA	Citrato-Fosfato-Destrosio-Adenina
CRRT	Continuous Renal Replacement Therapy
CV	Coefficiente di Variazione
CVC	Catetere Venoso Centrale
CVVH	Continuous Venovenous Hemofiltration
DHP	Emoperfusione Diretta
DRA	Dialysis-Related Amyloidosis
ESRD	End Stage Renal Disease
FAV	Fistola Artero-Venosa
fMET-tRNA	Complesso N-formilmetionina-Transfer RNA

FPIA	Fluorescence Polarization Immunoassay
GEN	Gentamicina
GISA	Glycopeptide-Intermediate Staphylococcus aureus
HCT	Ematocrito
HD	Emodialisi
HDF	Emodiafiltrazione
HF	Emofiltrazione
HP	Emoperfusione
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICMA	Immuno-Chemiluminometric Assay
ICU	Intensive Care Unit
IRA	Insufficienza Renale Acuta
IRC	Insufficienza Renale Cronica
LZD	Linezolid
MODS	Multi Organ Dysfunction Syndrome
MOF	Multi Organ Failure
MRSA	Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus
NaCl	Cloruro di Sodio
ORSA	Oxacillin-Resistant Staphylococcus aureus
PD	Farmacodinamica
PETINIA	Particle-Enhanced Turbidimetric Inhibition Immunoassay

PK	Farmacocinetica
PM	Peso Molecolare
Q _B	Flusso Sangue
Q _{UF}	Flusso Ultrafiltrato
RIFLE	Risk, Injury, Failure, Loss, and End-stage kidney disease
RRT	Renal Replacement Therapy
SIRS	Sindrome da Risposta Sistemica all'Infiammazione
t _{1/2}	Emivita
TEC	Teicoplanina
TOB	Tobramicina
tRNA	Transfer RNA
UV-Vis	Spettro UV-Visibile
VAN	Vancomicina
V _d	Volume di Distribuzione
VFG	Velocità di Filtrazione Glomerulare
VRE	Vancomycin-Resistant Enterococci
VRSA	Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus
β2-MG	β2-Microglobulina

Le abbreviazioni riguardanti le equazioni e i parametri d'analisi considerati nelle sperimentazioni sono riportate nell'appendice.

RIASSUNTO

L'adeguamento del dosaggio degli antimicrobici nei pazienti con insufficienza renale sottoposti a trattamento extracorporeo sostitutivo della funzionalità renale è un problema complesso e affrontato in maniera frammentaria in letteratura. Esso richiede delle basi solide e razionali su cui fondare il regime posologico del farmaco per ragioni di efficacia terapeutica, ma anche, più raramente, per evitare fenomeni di tossicità. Inoltre, quando ad essere sotto dosato è un antimicrobico, lo sviluppo di ceppi batterici resistenti rappresenta un ulteriore problema. Su queste premesse si è fondato il progetto di ricerca. L'obiettivo è stato quello di sviluppare dei modelli *in vitro* di emoperfusione (HP) ed emofiltrazione (HF) al fine di studiare la farmacocinetica extracorporea di antimicrobici, per i quali non esiste letteratura scientifica sufficiente in queste tipologie di trattamento dialitico. In particolare, il progetto è stato focalizzato sul fenomeno dell'adsorbimento degli antimicrobici su sorbenti e membrane durante la circolazione extracorporea, fenomeno scarsamente investigato in letteratura. Un primo modello *in vitro* di HP diretta (DHP) è stato messo a punto su un monitor prototipo (Bellco, R&D Electronic Division, Mirandola, Italia), per investigare sulla rimozione extracorporea dei glicopeptidi vancomicina (VAN) e teicoplanina (TEC), con la cartuccia adsorbente Lixelle S-35 (Kaneka Corporation, Osaka, Giappone). Quest'ultima è un dispositivo medico impiegato per la rimozione della β 2-microglobulina (β 2-MG), nei pazienti con insufficienza renale cronica (IRC) affetti da amiloidosi dialisi correlata (DRA). Gli esperimenti effettuati con la VAN e la TEC hanno evidenziato un elevato adsorbimento irreversibile dei glicopeptidi da parte della cartuccia Lixelle S-35. Durante i trattamenti di DHP con TEC, tutto l'antimicrobico introdotto nel sistema è stato rimosso dal circolo extracorporeo. Per tale ragione, in una fase successiva di studio, è stato sviluppato un tool *in vitro*, impiegando il polimero contenuto in Lixelle, per valutare il possibile fenomeno competitivo tra TEC e β 2-MG durante il processo di adsorbimento. Tale sperimentazione, non solo ha escluso il fenomeno competitivo tra i due composti, ma ha messo in luce che la β 2-MG favorisce l'adsorbimento della TEC sul polimero. Queste evidenze sperimentali indicano la necessità d'impiegare una dose supplementare per entrambi i glicopeptidi, quando la

cartuccia Lixelle S-35 viene utilizzata per il trattamento della DRA nei pazienti con IRC. Su questo filone di ricerca, un secondo modello *in vitro* di DHP, ottimizzato rispetto al precedente, è stato sviluppato per investigare sulla rimozione extracorporea degli aminoglicosidi gentamicina (GEN) e tobramicina (TOB), sempre con la cartuccia adsorbente Lixelle S-35 sul prototipo Bellco. Dalla sperimentazione condotta sulla GEN è emerso che una dose supplementare deve essere utilizzata anche per questo antimicrobico, dato l'adsorbimento irreversibile sul letto polimerico. Diversamente, la TOB dopo un rapido adsorbimento, è stata ridistribuita al circolo extracorporeo. Il fenomeno di adsorbimento reversibile, osservato per la TOB, suggerisce di monitorare le concentrazioni plasmatiche del farmaco quando viene impiegata la cartuccia Lixelle S-35, prima di considerare una dose supplementare di TOB. Per quanto riguarda il fenomeno dell'adsorbimento durante l'HF, è stato costruito un sistema *in vitro* miniaturizzato sul monitor CARPEDIEM (Cardio-Renal Pediatric Dialysis Emergency Machine; Bellco, Mirandola, Italia), con una membrana in polisulfone (Medisulfone; Medica, Medolla, Italia), per studiare la rimozione extracorporea del Linezolid (LZD) e della TOB. Nella sperimentazione con il LZD, il farmaco dopo un rapido adsorbimento sulla membrana, si è ridistribuito alla circolazione extracorporea con rebound delle concentrazioni plasmatiche. Il fenomeno osservato, peraltro non concluso, indica che per il LZD è necessario monitorare le concentrazioni plasmatiche prima di adeguare il dosaggio dell'antimicrobico nei pazienti con insufficienza renale acuta, sottoposti a trattamento di HF continua. Viceversa, lo schema posologico della TOB deve considerare la prescrizione dialitica, in termini di flusso di ultrafiltrazione impostato. Ciò è suggerito dal fatto che non è stato osservato un adsorbimento, sulla membrana, significativo ai fini clinici. Queste evidenze, riguardanti l'intimo meccanismo di rimozione extracorporea, dovrebbero essere prese in considerazione dal clinico unitamente alla fisiopatologia del paziente, in quanto la stessa può influenzare la farmacocinetica degli antimicrobici oggetto di questo progetto di ricerca.

ABSTRACT

Antimicrobial dosage adjustment for patients with acute or chronic kidney disease undergoing extracorporeal renal replacement therapy is a complex problem frequently under investigated for several drugs. In this setting, the rational approach for appropriate dosage regimen is fundamental, not only to achieve efficacy of pharmacological treatment, but also to avoid toxicity risks. In addition, when an antimicrobial agent is administered, it has to be taken into account the emergence of resistant pathogen microorganisms. The purpose of this research project was to set up an *in vitro* models of hemoperfusion (HP) and hemofiltration (HF) techniques in order to investigate antimicrobial removal during extracorporeal circulation. In particular, it focuses on drug adsorption by sorbent or membrane polymers, which is almost unexplored phenomenon reported in literature. The first *in vitro* model was set up in a direct HP (DHP) mode using a prototype dialysis machine (Bellco, R&D Electronic Division, Mirandola, Italy) with Lixelle S-35 cartridge (Kaneka Corporation, Osaka, Japan). This medical device is a sorbent developed for a selective removal of β 2-microglobulin (β 2-MG) in dialysis-related amyloidosis (DRA) of chronic kidney disease patients. The aim of the study was to investigate the vancomycin (VAN) and teicoplanin (TEC) adsorption removal by DHP with Lixelle S-35 cartridge. VAN and TEC experiments showed that the cartridge has a high adsorption capacity for both glycopeptides. In the case of TEC, the total mass introduced into the system was adsorbed by Lixelle polymer bed. Considering the high TEC adsorption rate, it was developed and performed an *in vitro* tool with Lixelle polymer in order to evaluate the possible competitive binding between TEC and β 2-MG during adsorption process. Based on these results, TEC and β 2-MG did not compete for binding sites of Lixelle polymer. On the contrary, β 2-MG seems to enhance the adsorption of TEC. These data suggest that a supplemental dose should be administered in DRA patients when Lixelle S-35 is used for both VAN and TEC. The second *in vitro* model was configured in DHP as previous system, but it was optimized as close as possible to *in vivo* conditions. The mock DHP treatments were performed to evaluate gentamicin (GEN) and tobramycin (TOB) adsorption removal by using Bellco prototype dialysis machine with Lixelle S-35 cartridge.

GEN was rapidly adsorbed onto polymer bed during experiments without antimicrobial release by the sorbent cartridge. GEN results indicated that a supplemental dose should be taken into account in DRA patients receiving DHP with Lixelle S-35. Conversely, TOB, after its rapid adsorption, was released into the extracorporeal circulation: the redistribution phenomenon occurred. Therapeutic drug monitoring (TDM) should be performed to measure TOB plasma levels before considering an supplemental dose when Lixelle S-35 is used. The antimicrobial adsorption phenomenon could also affect HF treatments and therefore hemofilter membranes. In this direction, it was set up an miniaturized *in vitro* system with CARPEDIEM dialysis machine (Cardio-Renal Pediatric Dialysis Emergency Machine; Bellco, Mirandola, Italy) using a polysulfone membrane (Medisulfone; Medica, Medolla, Italy). The HF *in vitro* model was used to study the antimicrobial drug removal of linezolid (LZD) and TOB. LZD HF treatments described a rebound phenomenon of its plasma levels. Indeed, the maximum LZD value adsorbed was observed at the beginning of the experiments, then it was partially released from polysulfone membrane. Although it is still unclear if LZD is completely released from the membrane, the redistribution phenomenon should be considered in patients with acute renal failure (ARF) undergoing continuous HF. The LZD dosage adjustment requires TDM as a tool for defining a potential supplemental dose. On the other side, the TOB adsorption phenomenon can be considered negligible related to the antimicrobial mass removed from the extracorporeal circulation. TOB was primarily cleared by convection during HF experiments. These findings indicate that TOB dose should be adjusted according to the ultrafiltration rate in ARF patients receiving continuous HF. The rationale approaches suggested for antimicrobial dosage the adjustment concern the intimate drug removal of specific extracorporeal techniques investigated by the present research project. In order to prescribe the optimal antimicrobial dosage regimen, clinicians must consider these experimental evidences in a relationship with patient's pathophysiology which also impacts on pharmacokinetic of drugs.

LO STATO DELL'ARTE

L'USO DEGLI ANTIBIOTICI

NELLE TERAPIE RENALI SOSTITUTIVE EXTRACORPOREE

Introduzione

Nei pazienti con insufficienza renale sottoposti a trattamento dialitico extracorporeo, il corretto uso degli antimicrobici rappresenta un problema complesso, in quanto richiede un approccio multidisciplinare, ma anche basi solide e razionali al fine di poter prescrivere un regime posologico corretto. Quando un antimicrobico viene somministrato a scopo terapeutico, il suo effetto farmacodinamico è il risultato del raggiungimento e del mantenimento di un'adeguata concentrazione libera di farmaco al sito d'azione. Questo risultato dipende da diversi processi farmacocinetici: assorbimento, distribuzione, metabolismo ed eliminazione. In tale contesto, la terapia renale sostitutiva extracorporea rappresenta una tappa addizionale della farmacocinetica dell'antimicrobico, che viene definita eliminazione extracorporea. Diverse sono infatti le tecniche dialitiche esistenti ed utilizzate in terapia extracorporea, sia continue sia intermittenti, impiegate per la gestione dei soluti come la creatinina e altre tossine uremiche, per il controllo del volume e dell'equilibrio acido-base e per i molti altri disordini da cui sono affetti questi pazienti. Queste differenti tipologie di trattamento influenzano il dosaggio dell'antimicrobico. Il clinico, al fine di poter prescrivere il corretto regime posologico di un antimicrobico deve considerare da un lato, il quadro infettivo da trattare e, dall'altro, l'impatto della terapia extracorporea sul trattamento farmacologico. Nei pazienti con insufficienza renale, sia cronica che acuta, l'applicazione del trattamento extracorporeo può alterare la clearance degli antimicrobici somministrati, in particolare di quei composti che vengono normalmente eliminati dal rene. Al fine di evitare un fallimento terapeutico, dovuto alla sottoesposizione al farmaco,

risulta necessaria una modifica della dose somministrata di antimicrobico, sia essa una dose da carico o una dose di mantenimento. In secondo luogo, la somministrazione di una dose corretta di antimicrobico è necessaria per non incorrere in una sovraesposizione al farmaco, con conseguente rischio di tossicità. Inoltre, l'impostazione di un corretto regime posologico dell'antimicrobico è di fondamentale importanza, non solo per l'esito clinico (assicurare l'efficacia ed evitare la tossicità), ma anche per prevenire lo sviluppo di ceppi microbici resistenti alla terapia. Fatte queste premesse, si può comprendere come la necessità di conoscere l'entità della rimozione dell'antimicrobico da parte delle terapie sostitutive della funzione renale sia un parametro irrinunciabile al fine di definire un regime posologico razionale. Poiché l'entità della rimozione dell'antimicrobico può variare in rapporto alla tecnica dialitica adottata e, più in particolare, ai meccanismi fisici di rimozione dei soluti (convezione, diffusione e adsorbimento), il progetto di ricerca sviluppato si è focalizzato sulla messa a punto di sistemi *in vitro*, per la valutazione dell'adeguamento del dosaggio degli antimicrobici nelle tecniche di emofiltrazione e di emoperfusione.

CAPITOLO 1

L'INSUFFICIENZA RENALE E LE INFEZIONI BATTERICHE

1.1. L'insufficienza renale cronica: aspetti epidemiologici ed eziopatogenesi

L'insufficienza renale cronica (IRC) è una patologia ad elevata prevalenza nella popolazione in generale, e per questo considerata un rilevante problema di salute pubblica. Il 13,1% della popolazione adulta negli Stati Uniti d'America rientra in uno dei 5 stadi dell'IRC (si veda paragrafo 1.1.1)¹. La prevalenza dell'IRC varia nei diversi Paesi: il minimo valore è stato osservato in Spagna (9,2%)² ed il massimo negli USA. La prevalenza dell'IRC aumenta sino al 15-30% negli anziani e supera il 50% nei soggetti affetti da malattie cardiovascolari e metaboliche. È atteso per i prossimi dieci anni il raddoppio dei pazienti nefropatici, dovuto alla crescente incidenza di ipertensione arteriosa, diabete mellito e sindrome metabolica³. Si stima, in tutto il mondo, che 1 persona su 10 sia portatore di un danno renale, anche se solo una parte di questi pazienti raggiungerà lo stadio di uremia in cui risulta necessario sostituire la funzione renale con la terapia sostitutiva. Nel mondo, si contano circa due milioni e mezzo di pazienti in dialisi cronica⁴. L'IRC è una condizione clinica causata da alterazione e insufficienza cronica della funzione renale escretoria e di regolazione (uremia). L'IRC può essere provocata da numerosi e spesso eterogenei eventi morbosi. Alcuni di essi, come le glomerulonefriti, interessano specificamente il rene, altri interessano il rene solo in quanto organo riccamente vascolarizzato e appartengono alla categoria dei fattori eziopatogenetici del danno vascolare sistemico. Dal punto di vista fisiopatologico, si possono distinguere: malattie tipicamente renali, nefroangiosclerosi e nefropatia diabetica, nefropatia ischemica da stenosi delle arterie renali. Ad ogni modo, la causa più comune di

insufficienza renale terminale è la nefropatia diabetica, seguita dalla nefroangiosclerosi ipertensiva e da diverse glomerulopatie primarie e secondarie⁵.

1.1.1. La classificazione dell'insufficienza renale cronica

La definizione e la stadiazione dell'IRC è stata proposta dalla National Kidney Foundation – Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF – KDOQI)⁶, poi modificata dalle linee guida KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes)⁷. Si definisce come IRC^{8,9} la condizione in cui sia presente da almeno tre mesi uno dei seguenti stati morbosi:

1) una riduzione della Velocità di Filtrazione Glomerulare (VFG) che sia al di sotto di 60 ml/min/1,73 m², stimata con formula MDRD (Modification of Diet in Renal Diseases) o CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration);

2) la presenza di un danno renale, anche in assenza di un VFG inferiore a 60 ml/min/1,73 m². Il danno renale dev'essere documentato da una biopsia renale, anamnesi di trapianto renale, oppure dalla presenza di marker ematici o urinari di danno renale, quali ad esempio proteinuria e/o alterazioni del sedimento urinario (ad es. presenza di microematuria/macroematuria non secondaria a patologie urologiche, cilindri ematici, leucocitari, o grassosi, corpi ovali grassosi, cilindri granulari e cellule epiteliali tubulari), alterazioni ai test di diagnostica per immagini del rene (ad es. ecografia, TAC, scintigrafia o RMN con reperto di rene policistico, idronefrosi, cicatrici, masse o stenosi dell'arteria renale).

La stadiazione dell'IRC prevede 5 stadi progressivi, valutati attraverso la VFG (**Figura 1.1**). La letteratura internazionale indica che nello stadio 3 si evidenzia una tendenza alla progressione più o meno rapida verso un deficit funzionale sempre maggiore (stadi 4 e 5), fino ad arrivare alla dialisi. Lo stadio 5 indica l'insufficienza renale terminale o uremia (ESRD: End Stage Renal Disease), che necessita di terapia sostitutiva della funzione renale (dialisi o trapianto). Una revisione della classificazione del KDOQI¹⁰ divide lo stadio 3 in due sottogruppi:

3a (VFG tra 59 e 45 ml/min/1,73 m²) e 3b (VFG tra 44 e 30 ml/min/1,73 m²). Lo stadio 3b dovrebbe essere controllato e trattato in maniera intensiva, rappresentando un gruppo di pazienti ad alto rischio di complicanze della malattia renale e della sua evoluzione verso gli stadi terminali¹¹. La stadiazione dell'IRC deve tenere conto sia del valore della VFG stimata, che della presenza di proteinuria/albuminuria. Va sottolineato, che i livelli più elevati di proteinuria si associano ad una progressione più veloce verso l'ESRD¹².

Figura 1.1. Classificazione dell'insufficienza renale cronica.

Stadio	Descrizione del danno renale	VFG [ml/min/1,73m²]
1	Funzione renale normale o aumentata	> 90
2	Lieve compromissione della funzione renale	89 – 60
3a	Compromissione moderata	59 – 45
3b	della funzione renale	44 – 30
4	Compromissione grave della funzione renale	29 – 15
5	Insufficienza renale terminale	< 15 (dialisi)

Legenda. VFG = velocità di filtrazione glomerulare.

1.1.2. Le infezioni batteriche nei pazienti in emodialisi

Il rischio di infezione nei pazienti sottoposti ad emodialisi è maggiore a causa dell'immunodeficienza legata all'insufficienza renale e all'esposizione di diversi microorganismi nosocomiali. È stato osservato che il rischio di infezione

aumenta con l'aumentare dell'età, in relazione alle comorbilità e al progressivo degrado dello stato di salute nel corso del tempo di questi pazienti¹³. Infatti, frequente è la comparsa di complicazioni che possono essere legate a diversi fattori. Tra queste, vanno annoverate le complicazioni dell'accesso vascolare, la disfunzione dei leucociti e/o del complemento provocata dal contatto sangue-membrana, il sovraccarico di ferro, l'esposizione a pirogeni e/o a microorganismi che possono contaminare i liquidi di dialisi o ancora, più raramente, l'insufficiente disinfezione degli apparecchi¹⁴. Dal punto di vista epidemiologico, le infezioni che rivestono maggiore importanza sotto il profilo clinico, riguardano il catetere venoso centrale (CVC), la fistola artero-venosa (FAV), il graft artero-venoso e le infezioni del sito operatorio. In particolare, le batteriemie associate agli accessi vascolari costituiscono la complicanza più frequente in emodialisi e sono causa dell'incremento di mortalità in questi pazienti. Si stima che la mortalità a seguito di batteriemie varia dal 12% al 25,9% in questi pazienti^{15,16}. Nonostante la letteratura corrente sia limitata, i dati evidenziano un rischio di batteriemia associato all'accesso vascolare più elevato in caso di utilizzo di un CVC che non nel caso di utilizzo di una FAV o di un graft artero-venoso. Per quanto riguarda il CVC non tunnellizzato, il tasso di infezione varia da 3,8 a 6,5 episodi ogni 1000 giorni di catetere, mentre scende nel caso di CVC tunnellizzato variando da 1,6 a 5,5 episodi ogni 1000 giorni di catetere. Per la FAV con supporto protesico, il tasso di infezione è di 0,2 episodi per anno per paziente, e scende nella FAV senza supporto protesico a 0,05 episodi per anno per paziente¹⁷. Inoltre, vanno ricordate le vie di contaminazione del CVC: via extra-luminale, a partire dalla pelle del paziente, oppure la via intraluminale, a partire dalle connessioni o, più raramente, tramite le soluzioni di perfusione. Nei cateteri tunnellizzati e non tunnellizzati, sono le connessioni la fonte di contaminazione principale¹⁸. Infine, nell'accesso vascolare o negli interventi chirurgici, la maggior parte delle infezioni batteriche sono precedute da una colonizzazione del paziente da parte di agenti patogeni. Tuttavia, solo alcuni fra i pazienti colonizzati svilupperanno più tardi un'infezione¹⁹.

1.2. L'insufficienza renale acuta: aspetti epidemiologici ed eziopatogenesi

L'insufficienza renale acuta (IRA) è una condizione rilevata nel 15% dei pazienti adulti ricoverati negli ospedali dei Paesi industrializzati²⁰. L'IRA è una patologia ad elevata prevalenza nei pazienti ospedalizzati, mentre l'IRA acquisita in comunità è un evento piuttosto raro²¹. A differenza dell'insufficienza renale terminale, in cui è necessario sempre un trattamento dialitico, il trattamento sostitutivo della funzione renale nell'IRA interessa circa il 40-50% dei soggetti²². Tuttavia, nei casi più gravi, l'IRA si presenta all'interno di un quadro clinico di disfunzione multiorgano (MOF: Multi Organ Failure o MODS: Multi Organ Dysfunction Syndrome) o in corso di sepsi, che necessariamente richiede un trattamento extracorporeo per supportare la funzione renale. In questi quadri patologici che accompagnano l'IRA, la mortalità può arrivare sino al 90% dei casi, mentre in caso di IRA isolata la mortalità è decisamente inferiore (23%)²³. Pertanto, anche se l'IRA è potenzialmente reversibile, essa mostra una mortalità importante, che è migliorata nel corso degli anni grazie all'introduzione e allo sviluppo tecnologico delle tecniche di trattamento extracorporeo per supportare la funzione renale. L'IRA è una condizione clinica associata a rapido, costante deterioramento della funzione renale, con o senza oliguria. Essa si sviluppa nel giro di ore oppure giorni. Dal punto di vista eziopatologico, possiamo distinguere tre tipologie di IRA, in funzione della sede anatomica coinvolta:

- IRA pre-renale o IRA funzionale (70% dei casi);
- IRA renale o IRA organica (25% dei casi);
- IRA post-renale o IRA ostruttiva (5% dei casi)²⁴.

Nell'IRA pre-renale, il parenchima renale è conservato tanto da definirla IRA funzionale. L'IRA pre-renale può essere determinata da qualsiasi causa che determina ipovolemia, come emorragie o perdite idrosaline effettive (ad es. nel paziente ustionato o con drenaggi). Altra causa che può determinare IRA pre-renale è una diminuzione della gittata cardiaca, come nel caso dell'infarto del miocardio acuto. Inoltre, possono essere coinvolte nel suo sviluppo cause emodinamiche sistemiche, quali la sepsi o l'insufficienza cortico-surrenalica.

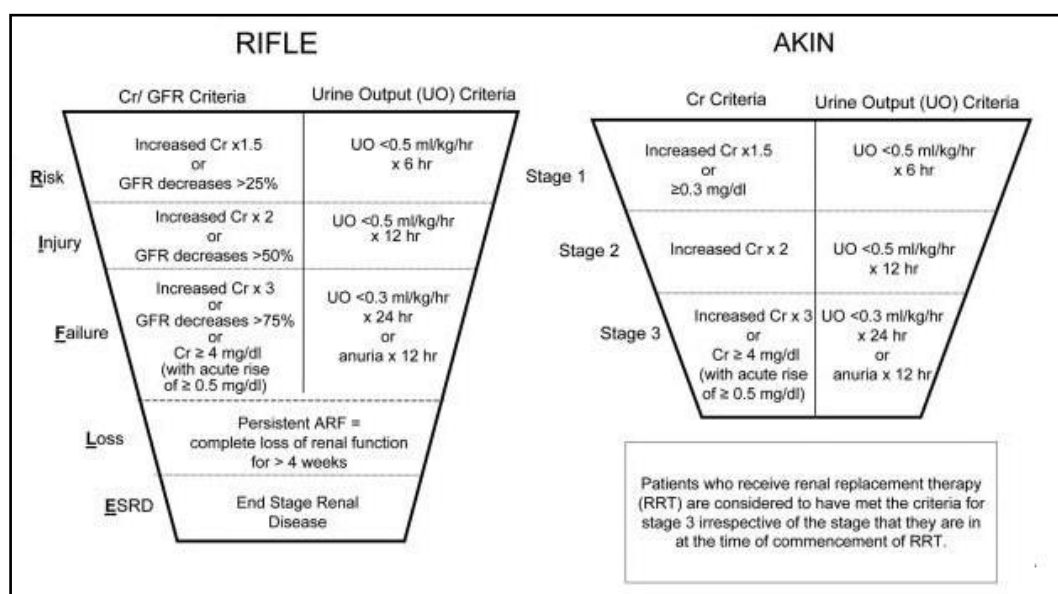
Altre cause possono riguardare specifici quadri emodinamici renali, quali la sindrome epatorenale e farmaci²⁵. Nell'IRA renale vi è un danno al parenchima a causa di un insulto. Tra le cause dell'IRA renale vi sono le glomerulonefriti primitive (ad es. post-infettive, la sindrome uremico emolitica), le alterazioni di natura istopatologica, come la necrosi tubulare acuta (ad es. da nefrotossine quali farmaci, mezzi di contrasto, metalli pesanti). L'IRA renale può essere anche determinata da cause vascolari, come la trombosi delle vene renali, oppure può essere conseguenza di nefriti interstiziali (ad es. da infezioni, da collagenopatie, da leucemie e da linfomi). Più raramente si può manifestare l'IRA post-renale per ostruzione completa delle vie renali. La causa più comune di IRA post-renale è l'ipertrofia prostatica o il carcinoma prostatico²⁶.

1.2.1. La classificazione dell'insufficienza renale acuta

Esistono più di 30 definizioni di IRA, la maggior parte è correlata alla variazione assoluta o relativa della creatinina sierica. Tuttavia, molti autori negano l'attendibilità della sola creatininemia come parametro di valutazione della funzione renale in pazienti instabili. Di conseguenza, nel 2004, per ottenere una definizione unanimemente accettata è stato creato un gruppo di lavoro (Acute Dialysis Quality Initiative o ADQI) che ha elaborato una definizione oggi accettata: i criteri RIFLE (Risk, Injury, Failure, Loss, and End-stage kidney disease)²⁷. Secondo questa iniziativa, alla variazione della creatinina sierica va correlata anche la riduzione della diuresi, come marcatore sensibile della disfunzione renale (**Figura 1.2**). La classificazione RIFLE soffre però di un grosso limite: essa si fonda sulla conoscenza del valore basale della creatininemia che spesso non è disponibile (in questo caso si suggerisce di calcolare la creatinina sierica basale a partire da un filtrato glomerulare). Successivamente, la definizione dell'IRA è stata ampliata e modificata dal gruppo di studio denominato Acute Kidney Injury Network (AKIN), che ha stabilito criteri più completi per definire l'IRA²⁸. Secondo questo gruppo di lavoro, l'IRA è definita come un incremento di creatininemia di almeno 0,3 mg/dL o del 150% dal valore basale, o da una diuresi inferiore a 0,5 ml/Kg/h per più di 6 ore. Contrariamente ai

criteri RIFLE, AKIN propone una classificazione dinamica. I cambiamenti devono avvenire entro 48 ore o meno. Dopo aver classificato secondo AKIN, l'attribuzione dello stadio è effettuata sulla base della variazione della creatinina e della diuresi, come nella classificazione RIFLE (stadio I – stadio III; si veda **Figura 1.2**). La necessità di terapia sostitutiva della funzione renale porta automaticamente il paziente allo stadio III. Malgrado la classificazione proposta da AKIN appaia promettente ed utile, essa richiede ancora conferme in studi prospettici.

Figura 1.2. Classificazione dell'insufficienza renale acuta secondo RIFLE e AKIN.



Legenda. Cr = clearance della creatinina; GFR = glomerular filtration rate (VFG); UO = urine output (diuresi conservata); ARF = acute renal failure (IRA).

1.2.2. Le infezioni batteriche nel paziente critico

I pazienti critici sono a maggior rischio di sviluppare infezioni e batteriemia per gli alterati meccanismi di difesa dell'ospite causate dalla malattia concomitante rapidamente progressiva, dalle spesso ripetute procedure invasive e dalla coesistente immunosoppressione, sia endogena che esogena (ad es. da farmaci). Il tasso di infezione nei pazienti, ricoverati in terapia intensiva (ICU):

Intensive Care Unit), è 5-10 maggiore rispetto agli altri reparti e le infezioni acquisite in ICU sono più del 20% delle infezioni nosocomiali²⁹. Si stima che il 45% dei pazienti in ICU hanno diagnosi di infezione confermata da indagine microbiologica³⁰. Il tipo più comune di infezione acquisito in area critica è la polmonite (46,9%), seguita dalle altre infezioni del tratto respiratorio inferiore (17,8%), del tratto urinario (17,8%) e le infezioni del torrente circolatorio (12%). I microorganismi appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* (34,4%), lo *Staphylococcus aureus* (30,1%) e lo *Pseudomonas aeruginosa* (28,7%) sono stati i patogeni più comuni associati con l'infezione³¹. Tuttavia, l'elemento maggiormente responsabile della gravità dell'infezione non è il microorganismo né la sede dell'infezione, ma piuttosto la risposta sistemica dell'ospite all'infezione (chiamata SIRS: Sindrome da Risposta Sistemica all'Infiammazione) che accompagna la sepsi. Inoltre, la gravità dell'infezione varia in funzione degli effetti sistemici della sepsi stessa. Come precedentemente discusso (si veda paragrafo 1.2), la sepsi può essere causa di IRA come evento isolato, o di IRA in un quadro clinico di MOF. In altri termini, la sepsi rappresenta un fattore di rischio per l'IRA. Infatti, il 35%-50% dei casi di IRA, sviluppati in ICU, sono attribuibili alla sepsi³²⁻³⁴. Da quanto appena esposto, si comprende quale sia la sostanziale differenza tra l'IRC e l'IRA in rapporto alle infezioni batteriche. Nell'IRC si può affermare che di per se è il trattamento extracorporeo (emodialisi), in tutte le sue procedure, a determinare il rischio di infezione, contrariamente nell'IRA è l'infezione che sta alla base a rappresentare un rischio per la patologia renale. Per definire la gravità dell'infezione ci si deve focalizzare sugli effetti sistemici della sepsi, che si traducono in:

- *sepsi* definita come un quadro clinico settico a cui si associa una disfunzione d'organo (ad es. da ipoperfusione);
- *shock settico* definito come stato settico associato ad ipotensione persistente, nonostante l'adeguato apporto di liquidi con ipoperfusione tissutale;
- *sindrome da disfunzione multiorganica o MODS*, caratterizzata dalla compromissione della funzione di più organi.

Si evince quindi quale sia l'elemento critico che definisce la gravità dell'infezione nel paziente critico: l'ipoperfusione tissutale. Quest'ultima condiziona la funzione degli organi, con una mortalità crescente in rapporto alla gravità dell'ipoperfusione³⁵. Va infine ricordato il tasso di mortalità della sepsi, esso infatti varia tra il 30% e il 60% come indicato dalle linee guida della Surviving Sepsis Campaign³⁶.

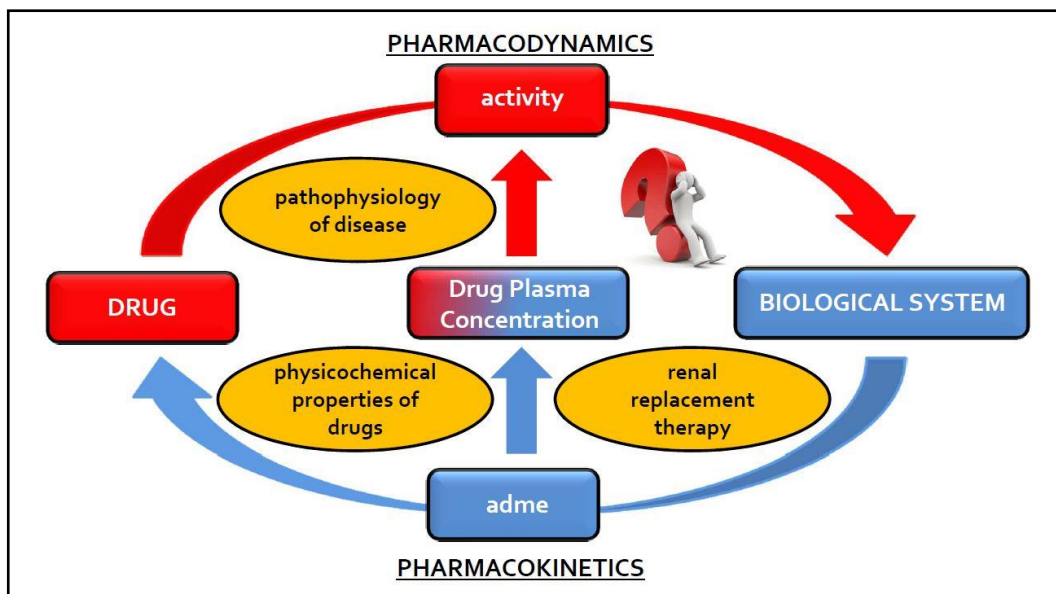
CAPITOLO 2

LE ALTERAZIONI FARMACOCINETICHE NELLE TERAPIE RENALI SOSTITUTIVE EXTRACORPOREE

2.1. Farmacocinetica e farmacodinamica nelle terapie renali sostitutive extracorporee intermittenti e continue

L'eliminazione dei farmaci per via extracorporea è un problema che si riscontra di frequente nei pazienti con IRC e nei pazienti con IRA in trattamento dialitico, sia esso intermittente (generalmente nell'IRC, raramente nell'IRA) o continuo (nell'IRA)³⁷. In queste circostanze, l'adeguamento del dosaggio di un farmaco dializzabile è un atto medico irrinunciabile, in quanto, in questi pazienti, un errato schema posologico può avere un duplice risvolto: un sovradosaggio con rischio di tossicità, o mancanza di efficacia per un dosaggio insufficiente³⁸. All'esito clinico infausto (tossicità o fallimento terapeutico), quando ad essere sotto dosato è un farmaco antimicrobico, il rischio è ancora maggiore non solo per il paziente, ma anche per la comunità, e ciò per il possibile sviluppo di ceppi microbici resistenti³⁹. L'approccio clinico per l'adeguamento del dosaggio di un farmaco, seppur diverso a seconda della terapia renale sostitutiva (intermittente o continua), si basa su dei principi fondamentali che prendono in considerazione le proprietà chimico-fisiche della molecola in relazione ai parametri farmacocinetici (PK), gli aspetti tecnici della procedura depurativa prescritta e la fisiopatologia del paziente. Indubbiamente, questi tre fattori influenzano l'effetto farmacodinamico (PD), poiché hanno delle ricadute sulla concentrazione plasmatica del farmaco che è direttamente correlata alla concentrazione dello stesso al sito d'azione⁴⁰ (**Figura 2.1**).

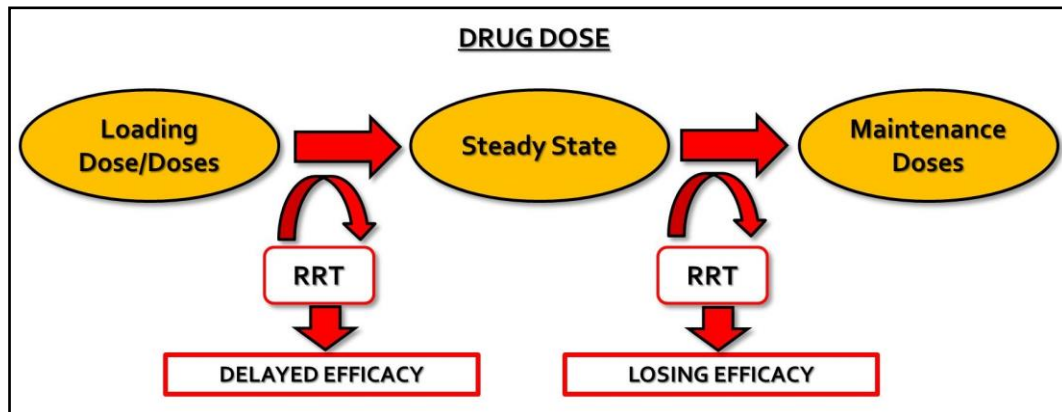
Figura 2.1. Fattori che influenzano la farmacocinetica e la farmacodinamica nei pazienti sottoposti a terapia renale sostitutiva extracorporea.



Legenda. adme = assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione.

Dal punto di vista puramente empirico, per far fronte all'eliminazione di un farmaco dializzabile, si rende generalmente necessaria una dose supplementare somministrata, durante (sempre nelle terapie continue, raramente nelle terapie intermittenti) o a seguito del trattamento depurativo (frequentemente nelle terapie intermittenti)^{41,42}. Tuttavia, questo approccio, anche se basato sulle poche e spesso contrastanti evidenze scientifiche riportate in letteratura e su una pratica clinica individualizzata spesso da centro a centro (se non da reparto a reparto), non tiene conto del profilo PK, e quindi della PD della molecola somministrata. Infatti, nell'ottica dei processi ADME, l'effetto della terapia dialitica sul trattamento farmacologico è diverso a seconda che la dose somministrata sia una dose da carico o una dose di mantenimento⁴³ (**Figura 2.2**). Nel primo caso (dose da carico), se il farmaco viene eliminato dal trattamento dialitico, il raggiungimento dello steady-state verrà posticipato e, di conseguenza, sarà posticipato anche l'effetto terapeutico ricercato. Nel secondo caso (dose di mantenimento), la concentrazione plasmatica può scendere al di sotto della concentrazione minima efficace, fenomeno frequente nelle terapie intermittenti ad alto potere depurativo.

Figura 2.2. Effetto della terapia renale sostitutiva extracorporea sulla dose del farmaco somministrato.



Legenda. RRT = renal replacement therapy (terapia renale sostitutiva extracorporea).

In ogni caso, per la dose di mantenimento, la concentrazione plasmatica scenderà al di sotto della concentrazione minima efficace se viene mantenuta costante la frequenza di somministrazione (dose e intervallo di somministrazione) nelle terapie continue quando il farmaco è soggetto all'eliminazione extracorporea. L'inevitabile risultato di tutto ciò è il fallimento terapeutico a causa della sottoesposizione del paziente al farmaco.

2.2. Principi e parametri tecnici delle terapie renali sostitutive extracorporee

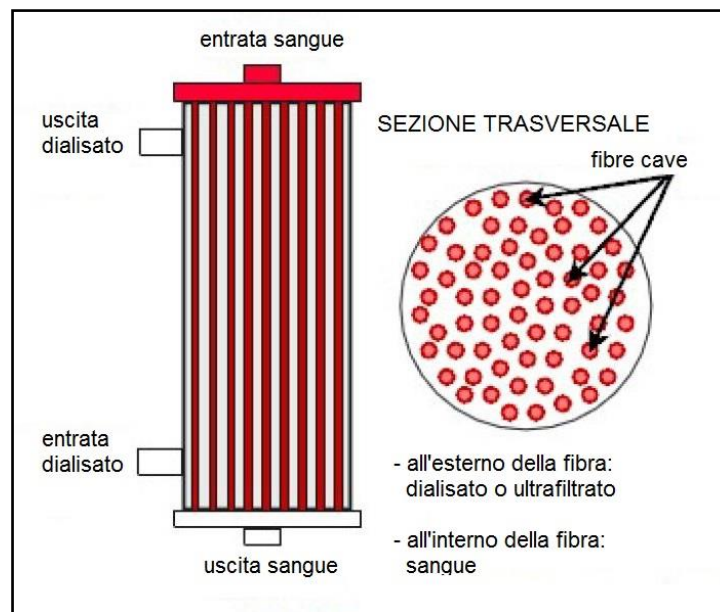
Sono di seguito descritti i principi base della terapia renale sostitutiva extracorporea, le principali modalità di trattamento e la tecnica dell'emoperfusione, al fine di comprendere il loro impatto nell'eliminazione extracorporea di un farmaco. I parametri specifici per ciascuna tecnica sono discussi successivamente per ogni sperimentazione.

2.2.1. Il trasporto dei soluti attraverso le membrane

Il trasporto delle sostanze, siano esse tossine uremiche o farmaci, attraverso le membrane semipermeabili a fibre cave dei filtri (o emodializzatori; **Figura 2.3**) utilizzati nelle terapie renali sostitutive extracorporee, dipende dalla differenza di

concentrazione delle sostanze ai due lati della membrana semipermeabile (lato sangue e lato dialisato), dalla pressione idrostatica del liquido da filtrare e dalla pressione osmotica delle sostanze in soluzione. Queste forze stanno alla base dei due processi fisici principali che guidano il trasporto dei soluti attraverso le membrane: diffusione e convezione. Nella diffusione, i soluti presenti nel sangue, o più precisamente nell'acqua plasmatica, si spostano secondo gradiente di concentrazione nel dialisato attraversando la membrana (**Figura 2.4a**). A questo processo possono prendere parte solo le molecole il cui diametro è più piccolo dei pori della membrana semipermeabile (cutoff di membrana). Il processo di penetrazione di una molecola attraverso la membrana, prende il nome di permeazione. Il trasporto diffusivo è il meccanismo di rimozione dei soluti nella tecnica dell'emodialisi. Nella convezione, i soluti presenti nell'acqua plasmatica attraversano la membrana in funzione del processo di ultrafiltrazione (**Figura 2.4b**).

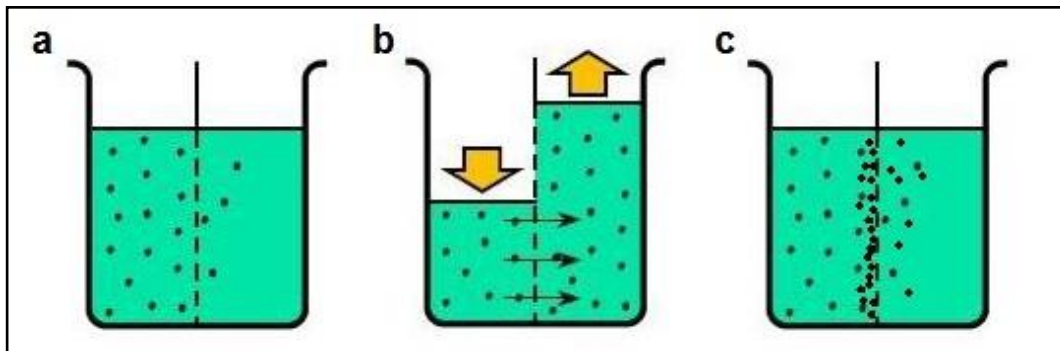
Figura 2.3. Emodializzatore (o filtro) a fibre cave.



Legenda. Nella sezione trasversale in rosso sono indicate le singole fibre all'interno delle quali circola il sangue da purificare.

L'ultrafiltrazione descrive il passaggio o trasporto del solvente (acqua plasmatica) da un lato all'altro della membrana, e conseguentemente l'acqua plasmatica trascina con sé i soluti in essa disciolti. Perché l'ultrafiltrazione si verifichi è necessario che vi sia una differenza di pressione idrostatica tra i due lati della membrana. Il trasporto convettivo è il meccanismo di rimozione dei soluti nella tecnica dell'emofiltrazione. Accanto a questi due processi fisici di trasporto dei soluti, vi è un altro fenomeno chimico-fisico che può influenzare la rimozione dei soluti dall'acqua plasmatica ed è il processo di adsorbimento. Nell'adsorbimento i soluti disciolti nell'acqua plasmatica vengono fissati per mezzo di interazioni chimico-fisiche (per es. forze di Van Der Waals, legami intermolecolari e/o di valenza) sulla superficie della membrana utilizzata per il trattamento extracorporeo (**Figura 2.4c**).

Figura 2.4. Meccanismi di trasporto dei soluti nelle terapie renali sostitutive extracorporee.



Legenda. In a: trasporto diffusivo; in b: trasporto convettivo; in c: fenomeno dell'adsorbimento.

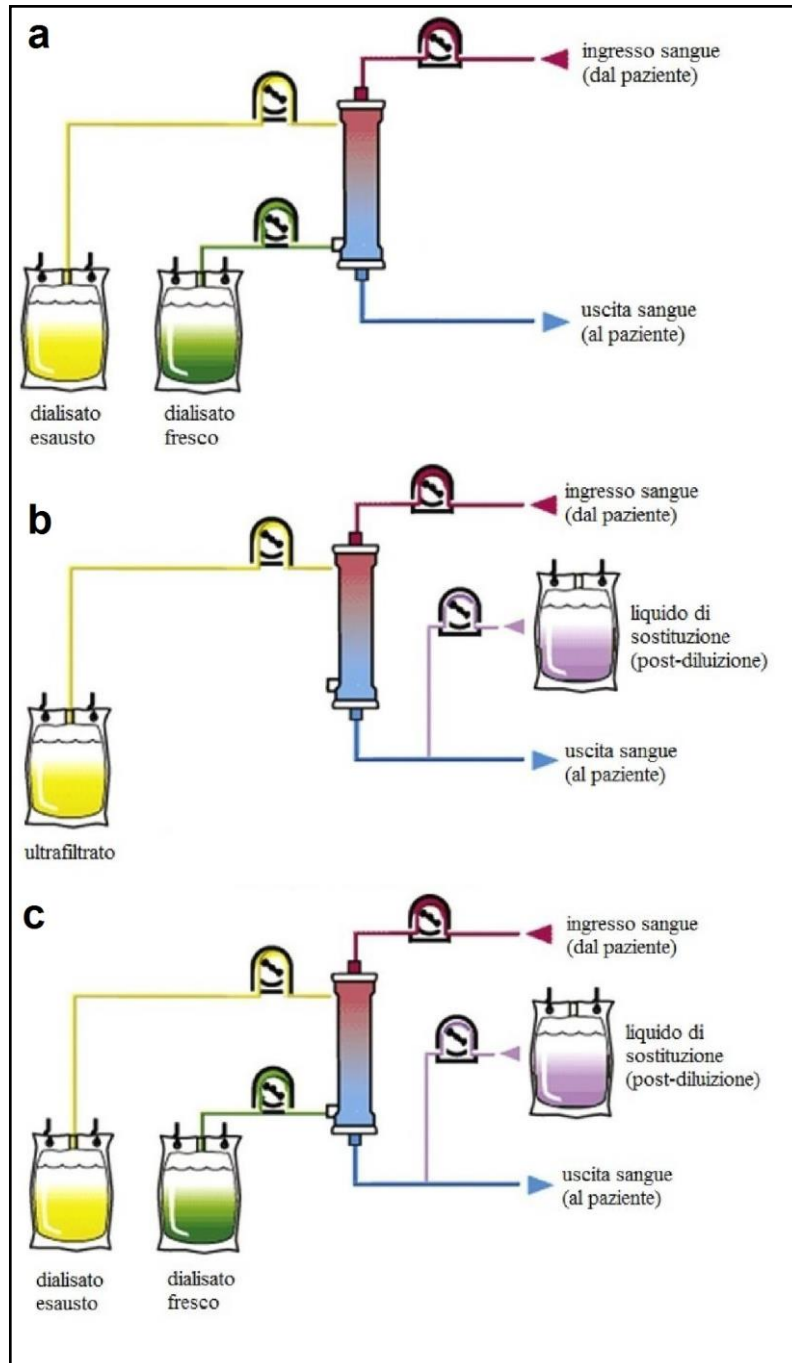
A differenza dei processi di trasporto del soluto (diffusione e convezione), l'adsorbimento è un fenomeno che tende a riguardare solamente le prime fasi del trattamento, se non addirittura i primi minuti, e può essere reversibile restituendo all'acqua plasmatica i soluti inizialmente adsorbiti. Tuttavia, oltre a presentarsi come meccanismo secondario e indesiderato, l'adsorbimento viene sfruttato per la rimozione di specifici soluti nelle tecniche di emoperfusione^{44,45}.

2.2.2. L'emodialisi, l'emofiltrazione e l'emodiafiltrazione

Attualmente, nonostante le numerose varianti, le terapie extracorporee sostitutive della funzione renale si basano su tre fondamentali tecniche: l'emodialisi (HD), l'emofiltrazione (HF) e l'emodiafiltrazione (HDF). Ai fini depurativi, queste tecniche impiegano i meccanismi di trasporto della diffusione (HD), convezione (HF) o diffusione e convezione accoppiate (HDF). La tecnica dell'HD è particolarmente efficace nella rimozione dei piccoli soluti. L'HD prevede l'impiego di un emodializzatore, in cui il sangue ed una soluzione di dialisi appropriata circolano all'interno di circuiti separati (il circuito ematico extracorporeo e il circuito del liquido di dialisi o dialisato) spinti da pompe peristaltiche dedicate, del dispositivo medico utilizzato per il trattamento extracorporeo (rene artificiale o monitor). Il sangue e il dialisato circolano contro-corrente o, meno frequentemente, co-corrente. La configurazione contro-corrente è in genere preferita perché il gradiente di concentrazione medio è mantenuto elevato per tutta la lunghezza del filtro. Viceversa, la configurazione co-corrente garantisce una migliore stabilità emodinamica del paziente ed un miglior controllo delle condizioni idrodinamiche all'interno del dializzatore (**Figura 2.5a**)⁴⁶. L'HF, fra i trattamenti renali sostitutivi extracorporei, rappresenta la migliore imitazione della funzione glomerulare, poiché l'allontanamento dei soluti avviene, come in fisiologia, senza discriminazione della taglia molecolare fino a cutoff della membrana. Nell'HF non viene utilizzato alcun fluido di dialisi perché si tratta di un trattamento di esclusiva ultrafiltrazione/convezione. In questa tecnica, attraverso un apposito circuito dedicato (circuito del liquido di sostituzione) ed una pompa peristaltica, viene infusa una soluzione sterile nel circuito ematico. Tale soluzione sostituisce l'acqua plasmatica eliminata e, in questo modo, si riduce la concentrazione dei soluti plasmatici. Il volume di soluzione infuso può sostituire totalmente o parzialmente il volume filtrato. La soluzione sterile di sostituzione può essere infusa pre-filtro (nella tecnica di pre-diluizione) o post-filtro (nella tecnica di post-diluizione). In HF vengono utilizzate membrane altamente permeabili. In termini di rimozione dei soluti, la modalità in post-diluizione è più efficiente di quella in pre-diluizione; tuttavia, è più facile che si

verifichi l'intasamento della membrana (fouling di membrana), a causa di una maggiore emoconcentrazione (Figura 2.5b)⁴⁷.

Figura 2.5. Tecniche di terapia renale sostitutiva extracorporea.



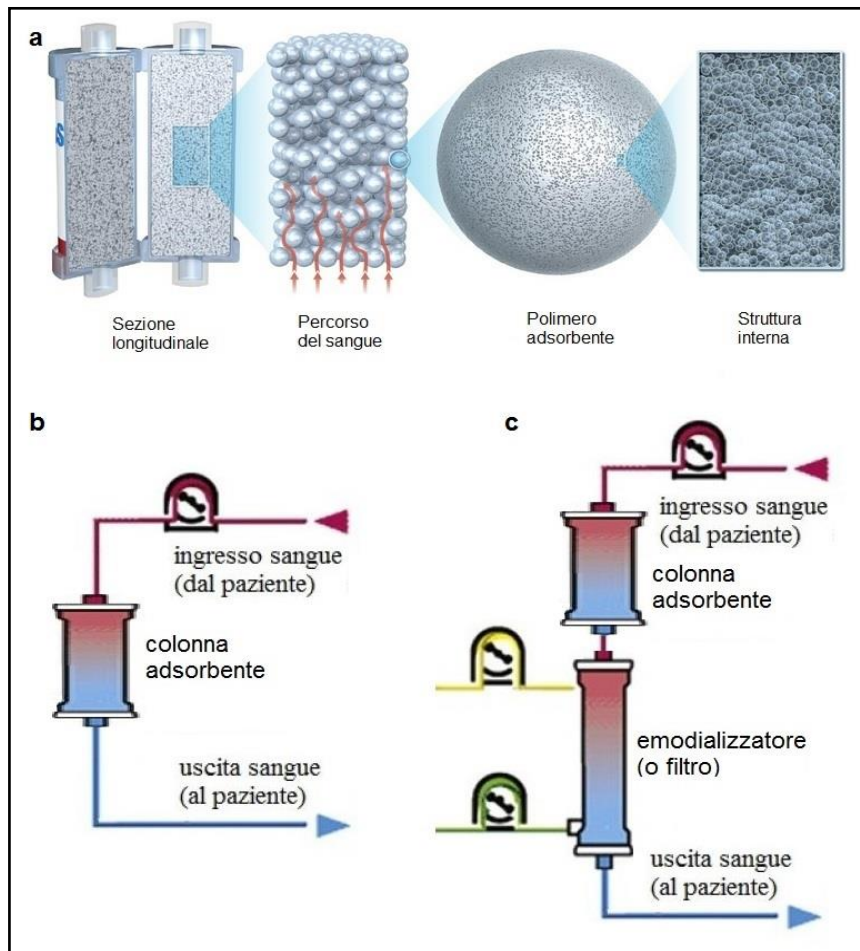
Legenda. In a: la tecnica dell'emodialisi; in b: la tecnica dell'emofiltrazione; in c: la tecnica dell'emodiafiltrazione.

L'HDF è una tecnica mista, basata sulla combinazione dei trattamenti diffusivi (HD) e convettivi (HF). Associando i due sistemi di trasporto dei soluti, l'HDF ottiene una migliore rimozione delle molecole a medio-alto peso molecolare, se paragonata all'HD, e di piccolo peso molecolare, se paragonata all'HF. Ad ogni modo, il trasferimento dei soluti da un lato all'altro della membrana non è dato dalla somma della diffusione e della convezione, in quanto per un dato soluto diffusibile come l'urea, la coesistenza dei due processi nella stessa membrana, provoca un'interferenza negativa. Anche l'HDF utilizza membrane altamente permeabili; un'adeguata infusione di soluzione di sostituzione sterile deve essere utilizzata per sostituire il volume rimosso, sia in pre- che in post-filtro (**Figura 2.5c**)⁴⁸.

2.2.3. L'emoperfusione

L'emoperfusione (HP) è una tecnica di trattamento extracorporeo in cui il sangue o il plasma, preventivamente separato dalla componente corpuscolata, viene fatto circolare all'interno di una colonna contenente specifici materiali chiamati adsorbenti (**Figura 2.6**). Gli adsorbenti sono generalmente dei materiali di natura polimerica, di forma granulare, sviluppati per adsorbire sulla loro superficie delle sostanze target. Infatti, la tecnica dell'HP viene utilizzata per rimuovere dal circolo sistemico specifiche sostanze, tossine o veleni per cui la colonna è stata sviluppata. Tra queste sostanze vi sono le citochine durante la sepsi, tossine uremiche o i mediatori di encefalopatia epatica, o prodotti proteici in corso di amiloidosi dialisi-correlata. L'utilizzo di queste colonne può essere accoppiato con altre tecniche di trattamento extracorporeo e, al loro interno, l'unico meccanismo di rimozione dei soluti è il processo di adsorbimento⁴⁹.

Figura 2.6. Colonna contenente materiale adsorbente e la tecnica dell'emoperfusione.



Legenda. In a: Struttura di una colonna adsorbente; in b: la tecnica dell'emoperfusione isolata; in c: la tecnica dell'emoperfusione accoppiata all'emodialisi.

2.3. I fattori che influenzano la dializzabilità di un farmaco

I fattori che influenzano la rimozione di un farmaco dal circolo sistemico in corso di terapia extracorporea possono riguardare le caratteristiche chimico-fisiche della molecola, le modalità di trattamento e la fisiopatologia del paziente. Tuttavia, nonostante questa classificazione teorica, nella pratica clinica non sempre è possibile distinguere quale dei tre fattori è determinante. Infatti, questi parametri devono essere presi in considerazione nel loro insieme e valutati per il loro contributo, al fine di un corretto adeguamento del dosaggio del farmaco nel paziente sottoposto a trattamento dialitico⁵⁰.

2.3.1. Le proprietà chimico-fisiche e i parametri farmacocinetici

A giocare un ruolo fondamentale nella rimozione di una molecola da parte del trattamento extracorporeo è innanzitutto il peso molecolare del farmaco (PM), posto in relazione con la dimensione dei pori della membrana (cutoff). Generalmente, si ritiene che per assunzione, i farmaci con PM inferiore a 500 Dalton (Da) possano attraversare la membrana per diffusione. Viceversa, molecole con PM maggiore a 500 Da difficilmente diffondono secondo il gradiente di concentrazione, ma attraversano la membrana per convezione⁵¹. Ne sono un esempio i glicopeptidi, vancomicina e teicoplanina, che hanno un PM superiore a 1400 Da e, di conseguenza, non vengono rimossi durante l'HD^{52,53}. Il PM è un parametro meno rilevante quando il processo di rimozione è l'adsorbimento. In HP possono essere rimossi farmaci con un PM che varia da 100 a 40000 Da. Infatti, a differenza delle altre tecniche di purificazione del sangue, l'HP non si basa su un meccanismo di trasporto dei soluti, ma sull'interazione diretta farmaco-adsorbente⁵⁴. Il secondo fattore che determina la rimozione per via extracorporea di un farmaco è il grado di legame con le proteine plasmatiche, tra cui innanzitutto l'albumina, ma anche α_1 -glicoproteina acida e proteine di trasporto specifiche (ad es. per corticosteroidi, estroprogestinici e ormoni tiroidei). Nei processi di trasporto dei soluti (diffusione e convezione), solamente la frazione libera del farmaco, non legata alle proteine plasmatiche, è in grado di attraversare la membrana. Inoltre, il legame con le proteine plasmatiche rappresenta un fattore limitante l'adsorbimento di un farmaco in funzione del grado di affinità di legame del farmaco stesso con le proteine del circolo sistemico. Ne consegue, che farmaci con un alto grado di legame con le proteine plasmatiche non vengano rimossi dai trattamenti extracorporei o vengano rimossi più lentamente, in quanto persiste un equilibrio tra la frazione libera e la frazione legata alle proteine stesse. In generale, si può affermare che farmaci con un legame superiore al 90% alle proteine plasmatiche (ad es. l'acido acetilsalicilico, la warfarina e gli anticonvulsivanti), non vengano eliminati durante il trattamento extracorporeo. Mentre farmaci con un legame inferiore al 50% alle proteine plasmatiche (la maggior parte degli antimicrobici), vengono rimossi durante il trattamento extracorporeo⁵⁵. Un altro parametro PK, che influenza la rimozione

extracorporea di un farmaco, è il volume di distribuzione (V_d). Il V_d riflette il distretto in cui un determinato farmaco è compartimentalizzato nell'organismo e varia a seconda delle caratteristiche chimico-fisiche della molecola. Va da sé che un farmaco, per essere rimosso da un trattamento extracorporeo, deve trovarsi distribuito principalmente nel circolo sistemico. Farmaci con un elevato valore di V_d si distribuiscono ampiamente ad organi e tessuti, di conseguenza la loro concentrazione plasmatica sarà bassa. Il principale fattore che contribuisce ad un'ampia distribuzione di un farmaco nell'organismo (V_d elevato) è la solubilità della molecola nei lipidi e il ridotto legame con le proteine plasmatiche. Più in generale, farmaci con un V_d superiore a 5 L/Kg, liposolubili, non essendo disponibili in circolo, sono eliminati dal trattamento extracorporeo solo in quantità minime (ad es. gli antidepressivi, la digossina). Mentre, farmaci con un V_d inferiore a 1 L/Kg, idrosolubili, trovandosi concentrati più in circolo che nei tessuti, sono facilmente eliminati dal trattamento extracorporeo (ad es. le beta-lattamine, gli aminoglicosidi)⁵⁰. Si ricorda infine che l'eliminazione extracorporea di un farmaco è un fenomeno da considerarsi clinicamente significativo, se il suo contributo alla clearance (CL) totale dell'organismo è di almeno il 25-30%. Per CL totale di un farmaco (CL plasmatica) s'intende la somma della CL renale e la CL non-renale. Infatti, se la CL non-renale (generalmente epatica) è di gran lunga maggiore della CL renale, l'effetto del trattamento extracorporeo (CL extracorporea) nei confronti dell'eliminazione del farmaco sarà trascurabile. In altri termini, il contributo della CL extracorporea dovrà incrementare la CL plasmatica di almeno un 25% per avere significato clinico⁵⁶.

2.3.2. I parametri tecnici del trattamento extracorporeo

Le caratteristiche della membrana a fibre cave o del materiale adsorbente, utilizzati nei trattamenti extracorporei, sono sicuramente il primo fattore che influenza la rimozione di un determinato farmaco. Le specifiche principali che determinano la performance di una membrana a fibre cave sono: il polimero di cui è costituita, la dimensione dei pori, l'area di scambio per i processi diffusivi e/o convettivi, la geometria della membrana. Analogamente, per quanto riguarda

l'adsorbente, la sua performance è determinata dal materiale di cui è costituito (carbone attivo o resina polimerica), dall'area o superficie utile al processo di adsorbimento e dalla forma delle sue particelle (irregolare o sferica)^{57,58}. Va da sé che i principi della rimozione (diffusione, convezione, diffusione-convezione ed adsorbimento) hanno un peso diverso nel determinare la CL extracorporea di un farmaco, e ciò in funzione della tipologia di trattamento adottato (HD, HF, HDF e HP). La rimozione del soluto in HD è basata sulla forza di diffusione per un gradiente di concentrazione. Molecole di grosse dimensioni hanno difficoltà nel passaggio attraverso la membrana, e la CL per diffusione si riduce all'aumentare del PM⁵⁹. L'influenza del PM sulla CL diffusiva dipende dalla permeabilità della membrana utilizzata: più permeabile è la membrana maggiore è la CL diffusiva. Generalmente, nelle tecniche continue vengono usate membrane a più alta permeabilità rispetto alle tecniche intermittenti. La CL diffusiva raggiunta con l'HD intermittente dipende dai relativi flussi sangue e dialisato, ma nell'HD continua il flusso del dialisato è sempre considerevolmente minore del flusso sangue. Una situazione questa, che determina un completo equilibrio tra il sangue e il dialisato. In particolare, il dialisato che fuoriesce dal filtro sarà saturo al 100% delle piccole, e facilmente diffusibili, molecole di soluto. La CL diffusiva dei piccoli soluti non legati alle proteine plasmatiche, come la creatinina, sarà quindi uguale al flusso del dialisato. Un aumento nel PM o nel flusso del dialisato darà un incremento della riduzione della saturazione del dialisato, poiché un più alto PM ridurrà la velocità di diffusione, mentre un maggior flusso dialisato ridurrà il tempo disponibile per la diffusione⁶⁰. La rimozione del soluto per convezione, usata nell'HF, non è influenzata dal PM fino al valore di cutoff della membrana. L'HF è una tecnica utilizzata soprattutto nelle terapie continue che impiega membrane altamente permeabili (high-flux) con un elevato valore di cutoff (40000-50000 Da). Se si considera che la maggior parte dei farmaci rientra nella categoria delle molecole a medio-basso PM, questo avrà uno scarso impatto nella capacità della membrana a trattenere un determinato farmaco. In questo caso, però, il passaggio dei farmaci può essere influenzato dall'interazione farmaco-membrana⁶¹. Un esempio di questo fenomeno sono le membrane in poliacrilonitrile, le quali possiedono un'elevata capacità di adsorbimento di

farmaci cationici. Infatti, è stato descritto in letteratura il legame degli aminoglicosidi a questo tipo di membrane⁶²⁻⁶⁴. Tuttavia, l'importanza clinica di questa evidenza non è chiara, in quanto il progressivo aumento della concentrazione di gentamicina nell'ultrafiltrato durante il trattamento indica la saturazione della capacità di legame della membrana⁶⁰. Un altro aspetto di questo fenomeno riguarda l'adsorbimento di proteine sulla superficie della membrana che progressivamente conduce alla riduzione della permeabilità della membrana stessa e della quota di filtrato prodotto^{65,66}. L'effetto dell'adsorbimento sulle membrane e la durata del trattamento extracorporeo, in funzione della rimozione dei farmaci, non è stato esaurientemente investigato in letteratura. Ad ogni modo, il principale fattore determinante il passaggio dei farmaci è la quota di legame proteico. Di conseguenza, per la maggior parte dei farmaci, soltanto la frazione non legata alle proteine plasmatiche è in grado di attraversare la membrana. La CL convettiva di piccoli soluti in forma libera, come la creatinina, eguaglia la velocità di filtrazione; ne consegue che per i farmaci la stessa sarà proporzionale alla frazione libera della molecola presente nell'acqua plasmatica. La reinusione del liquido di sostituzione inoltre aumenterà la CL convettiva, così come precedentemente precisato (si veda paragrafo 2.2.2). Nell'HDF valgo le stesse considerazioni fatte per l'HD e l'HF, anche se non è possibile discriminare il contributo dei due processi di trasporto (diffusione e convezione). Ci sono peraltro delle sostanziali differenze tra tecniche intermittenti e continue. Più precisamente, nelle tecniche intermittenti, considerati gli elevati flussi utilizzati (flusso sangue e flusso dialisato), i due meccanismi di trasporto dei soluti interferiscono tra loro. Nonostante ciò, l'HDF rimane più efficiente in termini di rimozione dei soluti a basso PM rispetto all'HD, e ad alto PM rispetto all'HF. Nell'HDF continua, invece, è stato dimostrato che non vi è nessuna interazione tra le componenti diffusive e convettive di clearance dell'urea. Di conseguenza, la CL totale extracorporea dell'urea è uguale alla somma della velocità del flusso del dialisato e dell'ultrafiltrato⁶⁷. Si rileva, comunque, che quando il PM aumenta, la diffusione diventa più difficile e la presenza di soluto derivato dalla convezione nel dialisato riduce il gradiente di concentrazione, ossia la forza necessaria per la diffusione⁶⁸. Un fenomeno, questo, che può abbassare ulteriormente la saturazione del

dialisato. Quanto ai parametri, inoltre, si evidenzia come questi cambino nella tecnica dell'HP in ragione della peculiarità del trattamento poiché basato sul processo di adsorbimento (che non è un meccanismo di trasporto del soluto). L'HP si realizza mediante contatto diretto tra il sangue e il materiale adsorbente. Si può quindi evincere come la natura del materiale utilizzato quale adsorbente giochi un ruolo di primaria importanza nella rimozione dei soluti compresi ovviamente i farmaci⁵⁸. I materiali possono essere di origine naturale oppure sintetica. Quanto ai primi, l'unico adsorbente che può essere impiegato è il carbone attivo, ottenuto da materie prime quali, ad esempio, la lignite, l'antracite o il petrolio. Il materiale di partenza viene attivato mediante ossidazione, in maniera tale da conferirgli un maggiore potere adsorbente. Il prodotto finito invece si presenta come una polvere fine, sulla cui superficie dei granuli sono presenti micropori e microcanali del diametro di 20-500 Angstrom (Å). All'interno di questi micropori e microcanali avviene il processo di selezione dei soluti, con una capacità adsorbente che può raggiungere molecole di dimensioni pari a 20000 Da. Il potere adsorbente del carbone attivo si manifesta nei confronti di sostanze idrofile, quindi è in grado di adsorbire farmaci idrosolubili come molti antimicrobici⁴⁵. Quanto ai materiali adsorbenti sintetici sono rappresentati da resine polimeriche. Solitamente, a differenza del carbone attivo, tali resine hanno maggiore affinità per soluti idrofobici e, di conseguenza, possono rimuovere farmaci lipofili. Il meccanismo di rimozione è analogo a quello del carbone attivo (micropori e microcanali) e si basa su legami deboli (ad. es. legami a ponte idrogeno e/o forze di Van Der Waals), oppure sullo scambio ionico. A differenza dell'adsorbente di origine naturale, le resine sintetiche possono rimuovere soluti sino a dimensioni pari a 40000 Da⁶⁹. Dal punto di vista tecnico, inoltre, l'HP è simile all'emodialisi intermittente in termini di tempo. La durata di una sessione di HP varia generalmente dalle due alle sei ore, a seconda delle specifiche indicazioni del dispositivo. Tuttavia, il massimo potere adsorbente si manifesta nella prime due ore, dopodiché il materiale adsorbente comincia ad essere saturo. Come precedentemente spiegato, l'HP è una tecnica in cui il dispositivo, ossia la colonna contenente il materiale adsorbente, è sviluppato per specifiche sostanze target. Ne deriva che l'HP spesso è più efficiente nella rimozione di soluti dal

circolo sistemico, rispetto alle altre tecniche extracorporee descritte⁴⁹. Ne è un esempio la rimozione della teofillina negli avvelenamenti, in quanto in HP è possibile raggiungere una estrazione della teofillina dal circolo sistemico pari al 99%, mentre con la tecnica dell'HD si può arrivare ad una rimozione pari appena al 50%⁵⁴. Le condizioni operative della tecnica di terapia extracorporea giocano un ruolo fondamentale nella rimozione di farmaci, in relazione alle caratteristiche del farmaco stesso. In generale, si può affermare che l'HP può rimuovere maggiori quantità di farmaco rispetto alle tecniche che si basano sul trasporto del soluto. Queste ultime vanno distinte in tecniche intermittenti e continue. Generalmente, infatti, le tecniche continue possono rimuovere più farmaco rispetto a quelle intermittenti, e ciò in ragione del loro carattere di continuità. Da ultimo, quanto al grado di efficienza rapportato al meccanismo di trasporto del soluto, si segnala in ordine decrescente l'HDF, l'HF e l'HD. L'efficienza nella rimozione del soluto, in caso di trattamento extracorporeo ha dunque delle ricadute sulla rimozione dei farmaci⁴³.

2.3.3. La fisiopatologia del paziente

L'eliminazione extracorporea di un farmaco mediante trattamento sostitutivo della funzione renale è influenzata dalla fisiopatologia del paziente, in quanto in grado di modificare in maniera importante la PK della molecola³⁸. Sotto tale profilo, un ruolo fondamentale è rappresentato innanzitutto dalla quota di proteine plasmatiche. Bisogna, infatti, considerare che solo la frazione di farmaco non legata alle proteine plasmatiche è soggetta ai processi trasporto attraverso la membrana (diffusione e/o convezione) e il legame proteico limita il processo di adsorbimento. In generale, questi pazienti, siano essi cronici (IRC) oppure acuti (IRA), possono presentare una condizione clinica con una quota ridotta di proteine ematiche, ad esempio, nel caso della sindrome nefrosica, in un quadro di MODS o, più semplicemente, in uno stato di cachessia⁷⁰⁻⁷². In questa situazione di ridotta quota di proteine circolanti, il rischio è di somministrare dosi inefficaci anche per farmaci che presentano un elevato legame con le proteine plasmatiche, poiché rapidamente eliminati durante il trattamento dialitico. A ciò si aggiunge la

circostanza secondo cui l'uremia inibisce il legame farmaco-proteico tra numerosi farmaci acidi e l'albumina attraverso un meccanismo peraltro non ancora descritto in letteratura (ad es. le cefalosporine, la furosemide, le penicilline, il fenobarbital, il warfarin). Di conseguenza, nel sangue uremico si verifica un incremento della frazione libera del farmaco che può andare incontro a due diversi destini⁷³. Nel caso in cui il farmaco venga eliminato immutato per via renale, e non sia dializzabile, l'aumento della frazione libera determina un effetto tossico (in funzione del farmaco). Diversamente, nel caso in cui il farmaco sia dializzabile, la riduzione della concentrazione plasmatica comporta una mancanza di efficacia, se somministrato in dose e frequenza di somministrazione usuali (da scheda tecnica). Si evidenzia, comunque, come questa situazione sia spesso complicata dalla polifarmaco-terapia, con conseguenti interazioni tra farmaci a livello del legame proteico (fenomeni di spiazzamento) e/o a livello metabolico. L'altro parametro PK che può essere influenzato dalla fisiopatologia del paziente è il V_d . Nel paziente con IRC sottoposto a dialisi intermittente (trisettimanale generalmente) si verifica una continua fluttuazione dell'acqua corporea che modifica il V_d del farmaco somministrato in funzione delle caratteristiche chimico-fisiche della molecola (si veda paragrafo 2.3.1). Questo fenomeno comporta una difficoltà nel raggiungimento dello steady-state del farmaco somministrato, con episodi di accumulo per incremento del V_d e di redistribuzione per effetto di trascinarsi durante il trattamento dialitico, soprattutto nelle tecniche convettive⁷⁴. Analogamente, nel paziente critico con IRA, si può verificare un incremento del V_d del farmaco come conseguenza della terapia parenterale (farmaci o nutrizione) somministrata durante la permanenza in ICU⁷⁵. Di conseguenza, come precedentemente discusso, farmaci con valori di V_d elevati, trovandosi principalmente distribuiti in organi e tessuti riccamente vascolarizzati, non verranno rimossi dal trattamento dialitico. Nell'ambito della fisiopatologia del paziente, inoltre, occorre sempre osservare la funzione renale residua (CL renale), poiché, se presente, concorre alla CL totale del farmaco, come già specificato⁷⁶. Vi sono poi una serie di situazioni specifiche che possono influenzare la PK di una molecola come un'ipoalbuminemia e/o un'iperbilirubinemia nell'insufficienza epatica, oppure un aumento della permeabilità vascolare nella

sepsi. Più in generale, si può affermare che tutti quei fattori fisiopatologici che determinano un aumento o una diminuzione della quota libera del farmaco nel circolo sistemico influenzano la dializzabilità della molecola.

CAPITOLO 3

SCOPO DELLA TESI

3.1. Obiettivi del progetto di ricerca

Lo scopo del progetto di ricerca è stato quello di sviluppare dei modelli *in vitro* per lo studio della PK extracorporea di farmaci antimicrobici per i quali non esiste ancora sufficiente letteratura scientifica che consenta di fare delle considerazioni razionali sul trattamento farmacologico dei pazienti con insufficienza renale (IRC o IRA) sottoposti a specifici trattamenti dialitici. In particolare, il progetto è stato focalizzato su due tipologie di trattamento extracorporeo: l'HP e l'HF. Per quanto riguarda la tecnica di HP, è stata studiata la CL extracorporea della teicoplanina, della vancomicina, della gentamicina e della tobramicina mediante l'impiego della cartuccia adsorbente Lixelle S-35 (Kaneka Corporation, Osaka, Giappone). Per questo obiettivo è stato messo a punto un modello *in vitro* di HP diretta su un monitor prototipo (Bellco, R&D Electronic Division, Mirandola, Italia). A seguire, sulla base delle evidenze sperimentali, in una seconda fase di studio, è stato sviluppato un tool *in vitro* per testare la competizione tra teicoplanina e β 2-microglobulina nel processo di adsorbimento sul polimero con cui viene riempita la cartuccia (Lixelle S-35). Va precisato, a tal proposito che la β 2-microglobulina è la molecola target per la quale Lixelle S-35 è stato sviluppato. L'interazione farmaco-polimero e il conseguente processo di adsorbimento sono state oggetto di studio anche in HF, quale fenomeno indesiderato durante il trattamento convettivo. Nella tecnica di HF è stata studiata la CL extracorporea del linezolid e della tobramicina, mediante l'impiego di un filtro miniaturizzato in polisulfone (Medica Group, Mirandola, Italia). Il modello *in vitro*, volto a mimare il trattamento di HF, è stato implementato sul monitor CARPEDIEM (Cardio-Renal Pediatric Dialysis Emergency Machine; Bellco, Mirandola, Italia). In ultima analisi, lo sviluppo e la messa a punto di questi modelli sperimentali sono stati effettuati al fine di

ottimizzare dei sistemi ad organi artificiali isolati che permettano di valutare l'eliminazione extracorporea degli antimicrobici e di farmaci in generale, quale tappa accessoria del processo ADME. Infatti, la conoscenza della CL extracorporea è un parametro solido e un dato oggettivo su cui il clinico si può basare per definire il regime posologico di un farmaco e, in particolare, di un antimicrobico in cui ogni variazione PK ha ricadute immediate non solo sull'efficacia o sulla tossicità, ma anche sullo sviluppo di ceppi microbici resistenti. Va infine ricordato che i sistemi ad organi isolati sono strumenti fondamentali della ricerca in ambito farmacologico per lo studio di tutte le tappe del processo ADME. In questo elaborato, sono state descritte e discusse le CL extracorporee legate al processo di adsorbimento o al trasporto convettivo degli antimicrobici sopra elencati e, in funzione dei limiti legati ai modelli *in vitro*, sono state proposte le possibili strategie di adeguamento razionale del dosaggio del farmaco, in corso di HP o di HF.

CAPITOLO 4

GLI ANTIBIOTICI OGGETTO DELLA SPERIMENTAZIONE:

ASPETTI FARMACEUTICI E FARMACOLOGICI

4.1. I glicopeptidi

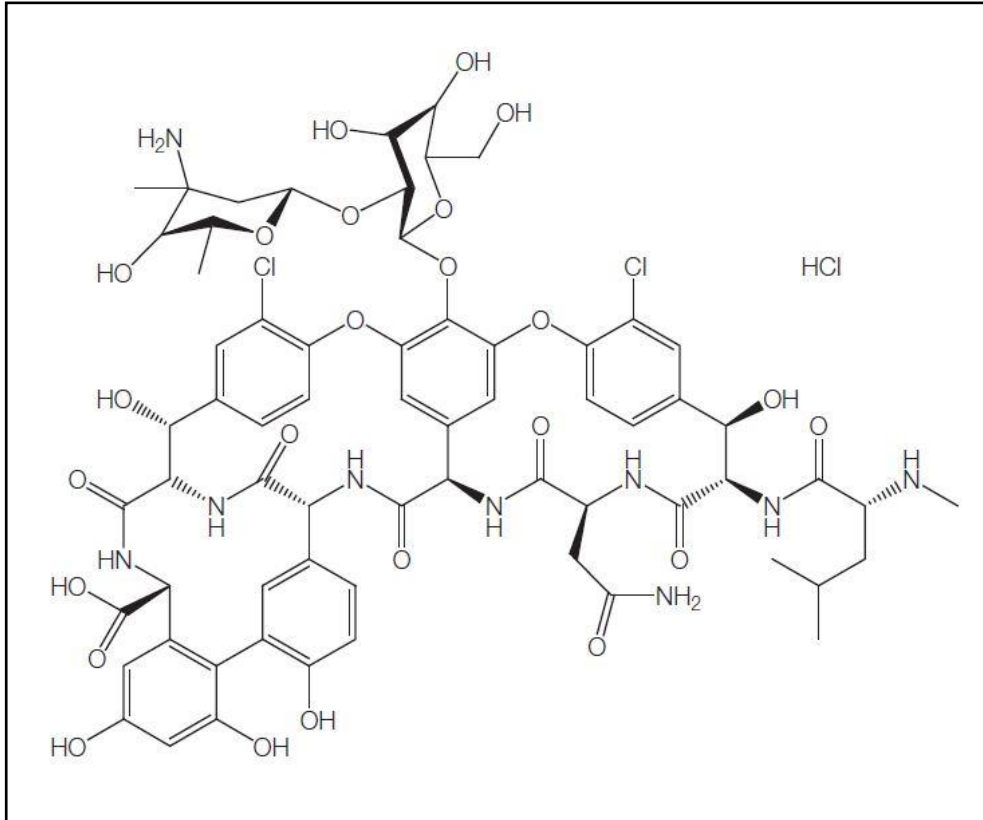
I glicopeptidi sono una classe di antimicrobici con struttura chimica complessa (peptidi macromolecolari ciclici), di PM elevato (superiore a 1400 Da). I due glicopeptidi usati nella pratica clinica (ne sono stati isolati circa 50) sono vancomicina (VAN) e teicoplanina (TEC). Queste molecole sono antimicrobici ad uso esclusivamente ospedaliero e a somministrazione parenterale, impiegati nel trattamento delle gravi infezioni generalmente causate da cocchi Gram-positivi resistenti ad altri antibiotici come, ad esempio, i beta-lattamici. I glicopeptidi sono antimicrobici di estrazione, solubili in acqua e fortemente tossici per i batteri, in quanto li attaccano sulla parete cellulare. Tuttavia, i batteri possono sviluppare resistenza verso questa classe di antimicrobici⁷⁷.

4.1.1. La vancomicina

La VAN è un complesso glicopeptidico antimicrobico prodotto dalla crescita di alcune specie di *Amycolatopsis orientalis* (*Nocardia orientalis*, *Streptomyces orientalis*) oppure ottenuto con altro mezzo adatto. Un disaccaride costituito da glucosio e dall'aminozucchero vancosamina è legato all'aminoacido centrale (fenilglicina) di una catena peptidica a sette componenti (**Figura 4.1**)⁷⁸. La VAN è un antimicrobico con azione prevalentemente battericida nei confronti di numerosi batteri Gram-positivi. Tra i ceppi sensibili all'antimicrobico vi sono gli stafilococchi, specie lo *Staphylococcus aureus* e lo *S. epidermidis* (inclusi i ceppi meticillino-resistenti); lo *Streptococcus pneumoniae*, lo *S. pyogenes* e alcuni

ceppi di streptococchi del gruppo B, ma anche gli streptococchi viridans e gli enterococchi, come l'*Enterococcus faecalis* e il *Clostridium difficile*⁷⁹.

Figura 4.1. Formula di struttura della vancomicina cloridrato e sua stereochimica.



La VAN agisce inibendo la formazione dei polimeri di peptidoglicano costituente la parete cellulare batterica e, più precisamente, si lega al terminale N-acil-D-alanil-D-alanina. Ne risulta che l'attività delle traspeptidasi, enzimi responsabili delle reticolazioni (legami crociati), rimane inibita, mentre le endopeptidasi "aprono" il peptidoglicano nei siti di biosintesi attiva, depolimerizzando la parete cellulare⁷⁸. La resistenza al farmaco viene acquisita attraverso plasmidi e si manifesta mediante la sostituzione della D-alanina ultima con un residuo di acido lattico. Questa modifica strutturale del peptidoglicano ha come conseguenza l'incapacità della VAN di legarsi al terminale N-acil-D-alanil-D-lattato. Costituiscono un esempio di questo meccanismo di resistenza gli Enterococchi vancomicina-resistenti (VRE: Vancomycin-Resistant Enterococci) e lo

Staphylococcus aureus vancomicina-resistente (VRSA: Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*)⁸⁰. La VAN trova principale indicazione nelle setticemie ed endocarditi sostenute da stafilococchi, in particolare da *Staphylococcus aureus* meticillina-resistente (MRSA: Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*), nelle endocarditi da enterococchi, nella colite pseudomembranosa da *Clostridium difficile*, nell'enterite da stafilococco e nelle altre infezioni sostenute da ceppi sensibili al farmaco⁸¹. La VAN è somministrata, nelle infezioni sistemiche, per infusione endovenosa lenta intermittente e nelle infezioni enteriche per via orale. Generalmente, nell'adulto la posologia prevede una dose per via parenterale di 500 mg ogni 6 ore, oppure di 1 g ogni 12 ore, mentre per via orale la dose varia da 125 a 500 mg ogni 6 ore⁸¹. La VAN ha un PM di 1485,73 Da ed è molto solubile in acqua. Dal punto di vista PK, la VAN ha una scarsissima biodisponibilità orale poiché difficilmente attraversa la mucosa intestinale, anche se aumenta in corso di infiammazione locale. Dopo l'infusione endovenosa, di almeno 60 minuti, di 1 g di antimicrobico si osservano delle concentrazioni plasmatiche di 60 mg/L immediatamente dopo il termine dell'infusione, di 25 mg/L dopo 2 ore e inferiori a 10 mg/L dopo 11 ore. La concentrazione plasmatica di picco varia da 20 a 40 mg/L, mentre la concentrazione di valle da 5 a 10 mg/L. La VAN si lega alle proteine plasmatiche per il 30-50%. La sua emivita ($t_{1/2}$) varia tra le 3 e le 13 ore, con una media di circa 6 ore. La VAN diffonde nei fluidi extracellulari, inclusi quelli pleurici, del pericardio, ascitici e sinoviali. Il suo V_d è di 0,6-0,3 L/Kg. Piccole quantità di farmaco si ritrovano nella bile. L'antimicrobico diffonde poco nel fluido cerebrospinale (anche quando le meningi sono infiammate non si raggiungono concentrazioni efficaci) ed attraversa la barriera placentare. La VAN passa attraverso la cavità peritoneale: circa il 60% di una dose intraperitoneale viene assorbita in 6 ore. Il farmaco viene metabolizzato molto poco (meno del 10%) ed è escreto nelle urine per filtrazione glomerulare, in forma immodificata per 80-90% entro le 24 ore. Ne risulta che la PK della VAN può essere alterata nelle situazioni che modificano la CL renale. Questa aumenta nei pazienti ustionati, mentre in quelli con insufficienza renale o ridotta funzionalità renale (neonati e anziani) risulta diminuita; in questi ultimi pazienti spesso è necessario un aggiustamento del dosaggio in funzione della CL della creatinina⁸². Il farmaco

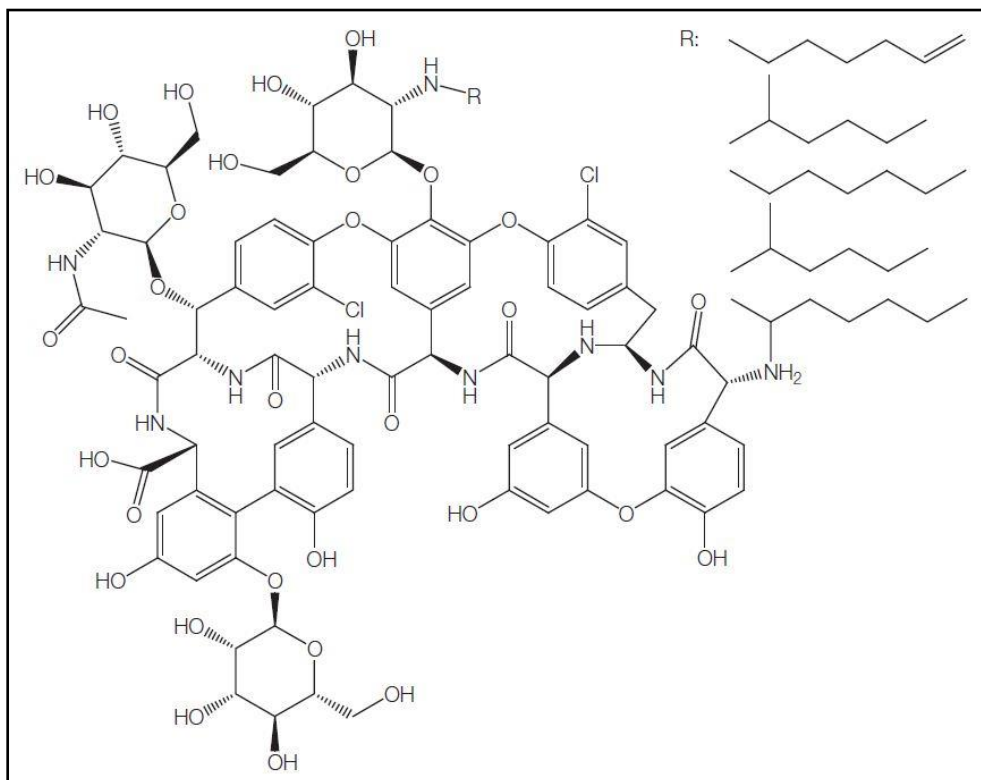
non viene rimosso dal circolo sistemico dall'HD a causa del suo elevato PM, mentre viene rimosso dai trattamenti di HF e di HDF⁵⁴. Attualmente non vi sono dati disponibili in letteratura in merito ai trattamenti di HP. Per quanto riguarda gli effetti indesiderati, la VAN per via sistemica è un farmaco poco maneggevole. La somministrazione endovenosa è spesso associata alla comparsa della sindrome red man o red neck, caratterizzata da eritema, arrossamento o rash nella zona compresa tra il viso e la parte superiore del torace e, talvolta, da ipotensione e sintomatologia dello shock. La VAN è nefrotossica e l'entità di questo effetto collaterale è correlabile alla dose. Tuttavia, la nefrotossicità è facilmente prevenibile con un appropriato controllo delle concentrazioni plasmatiche del farmaco e della funzionalità renale in corso di terapia. L'ototossicità, invece, si manifesta solamente ad alte dosi ed è un effetto collaterale raro. Quando viene somministrata per via orale, gli effetti collaterali più comuni sono la nausea, il vomito e la diarrea⁷⁷.

4.1.2. La teicoplanina

La TEC è un antimicrobico glicopeptidico ottenuto dalle colture di *Actinoplanes teichomycetus*. È una miscela di 6 composti strutturalmente correlati. Cinque di questi composti costituiscono la miscela chiamata TEC A2 (A2-1, A2-2, A2-3, A2-4 e A2-5); il sesto composto è un prodotto di idrolisi indicato come TEC A3 (**Figura 4.2**). I composti della serie A2 sono solubili in acqua ed hanno un PM comparabile che varia da 1877,70 a 1893,70 Da; ugualmente solubile in acqua è la TEC A3, ancorché presenti un PM inferiore pari a 1564,30 Da. I composti della miscela TEC A2 costituiscono il 90-95% del farmaco e differiscono solamente nella struttura acilica dell'acido grasso componente la porzione N-acil-glucosaminica della molecola. L'aglicone centrale costituisce il core della molecola ed è un eptapeptide lineare, composto da aminoacidi aromatici (idrofenilglicina) che formano una struttura tetraciclica. Ad esso sono legati: un α -D-mannosio, una N-acetil- β -D-glucosamina e cinque N-acil- β -D-glucosamine, in cui i residui acilici sono acidi grassi a 10 o 11 atomi di carbonio

(A2-1, A2-2, A2-3, A2-4 e A2-5). La TEC A3-1 manca del residuo acilico ed è più polare dei composti della serie A2⁸³.

Figura 4.2. Formula di struttura della teicoplanina A2 e sua stereochimica.



La TEC è un antimicrobico attivo contro la maggior parte dei cocci e dei bacilli Gram-positivi. I composti della serie A2 hanno attività antibatterica comparabile, mentre la TEC A3 risulta essere più attiva nei confronti degli Stafilococchi e meno attiva nei confronti degli Streptococchi e degli Enterococchi⁸⁴. Numerosi studi hanno messo in evidenza l'eccellente attività battericida della TEC contro lo *Staphylococcus aureus*, incluse le specie resistenti alla meticillina (MRSA) e oxacillina (ORSA: Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus*) e, in generale hanno appurato l'equivalenza della TEC in termini di spettro d'azione rispetto alla VAN. Anche gli Streptococchi mantengono un'elevata suscettibilità nei confronti della TEC così come altri batteri Gram-positivi quali il *Clostridium difficile*, il *Clostridium perfringens*, il *Propionibacterium acnes* e il *Corynebacterium jeikeium*⁸⁵. In particolare, il meccanismo d'azione della TEC si esplica con

l'inibizione della sintesi della parete batterica in maniera analoga alla VAN. Tale antimicrobico si lega al gruppo amminico terminale N-acil-D-alanil-D-alanina del precursore peptidoglicanico della parete cellulare, inibendo la reazione di transglicosilazione⁸². Analogamente a quanto avviene per la VAN, anche la resistenza alla TEC si manifesta con la modifica del terminale N-acil-D-alanil-D-alanina in N-acil-D-alanil-D-lattato ed è plasmide mediata. In questo caso, il ceppo microbico è resistente sia alla VAN che alla TEC. Esistono tuttavia ceppi sensibili alla TEC e resistenti alla VAN ancorché tale meccanismo non sia ancora stato chiarito⁸⁶. La TEC trova indicazione nelle endocarditi (in particolare in quelle sostenute da enterococchi e streptococchi), nelle setticemie da Gram-positivi di origine non cardiaca, nelle osteomieliti, nelle artriti settiche e nelle infezioni a carico dei tessuti molli e della cute⁸⁷. L'antimicrobico in questione viene somministrato per via endovenosa, iniezione o infusione, o per via intramuscolare. La dose iniziale da carico è di 400 mg o di 6 mg/Kg al giorno, seguita da 200 mg o da 3 mg/Kg al giorno per via endovenosa o intramuscolare. Nelle infezioni più gravi, si possono somministrare 400 mg per endovena ogni 12 ore per 3 volte e 400 mg al giorno come mantenimento⁸⁷. Per quanto riguarda la PK, analogamente a quanto avviene per la VAN, anche la TEC ha un assorbimento trascurabile quando viene somministrata per via orale. L'antimicrobico viene solitamente somministrato per via intravenosa (iniezione o infusione) e, a differenza della VAN, può essere somministrato per via intramuscolare. Dosi da carico somministrate ogni 12 ore sono necessarie per le prime 48 ore. In seguito alla somministrazione di una singola dose endovenosa di 3 mg/Kg, il picco di concentrazione plasmatica raggiunto è di 52 ± 22 mg/L dopo 5 minuti e di $20 \pm 23,5$ mg/L dopo 30 minuti. Il farmaco viene rapidamente assorbito sia per somministrazione intramuscolare che intraperitoneale. Nel primo caso, dopo l'iniezione di 3 mg/Kg, si raggiungono picchi di concentrazione nel plasma di 7 mg/L in 2 ore, con una biodisponibilità del 90,1%. La sua concentrazione plasmatica di picco è di 60 mg/L mentre la concentrazione di valle varia da 5 a 20 mg/L. La cinetica della TEC ha un andamento triesponenziale e il $t_{1/2}$ della fase terminale varia da 32 a 176 ore. Il V_d stimato per la TEC allo steady-state è compreso tra 0,90 e 1,6 L/Kg. Il farmaco è 50-100 volte più lipofilo della VAN e

penetra rapidamente nei tessuti dai quali viene poi ridistribuito nel sangue. La TEC si lega per almeno il 90% all'albumina plasmatica e, probabilmente con una percentuale altrettanto elevata alle proteine tissutali. La somministrazione di una dose singola di 400 mg produce concentrazioni terapeutiche efficaci nelle ossa, nel liquido di bolla entro 3 ore, nel fegato e nel pancreas entro 13 ore. Per raggiungere lo stesso scopo nel tessuto adiposo e nella cute è necessaria una dose maggiore. La TEC non penetra in maniera sufficiente né nel fluido cerebrospinale né nella bile. Al contrario, nei tessuti molli e nel fluido peritoneale il suo assorbimento è rapido. Il farmaco viene eliminato quasi completamente per filtrazione glomerulare. Lo stesso attraversa la placenta, ma viene escreto solo in minima parte nel latte materno. La biotrasformazione del farmaco è trascurabile e non dà origine ad alcun metabolita noto. La CL plasmatica della TEC passa da 19 ml/min negli individui sani, a 3 ml/min in presenza di insufficienza renale terminale. Di conseguenza, in questi pazienti spesso è necessario un aggiustamento del dosaggio in funzione della CL della creatinina. Si segnala, inoltre, come le epatopatie possano alterare la percentuale di farmaco legato alle proteine plasmatiche modificandone il profilo PK⁸⁵. Analogamente a quanto avviene per la VAN, anche la TEC non viene rimossa dal circolo sistemico dall'HD, poiché a causa del suo elevato PM è ostacolato il processo di diffusione⁵⁴. La stessa viene rimossa invece dai trattamenti in HF e HDF, per i quali vi sono evidenze che dimostrano come oltre al trasporto convettivo entra in gioco il fenomeno dell'adsorbimento in funzione del polimero di cui è costituita la membrana⁸⁸. Anche per la TEC non vi sono dati disponibili in letteratura in merito ai trattamenti di HP. Per quanto riguarda gli effetti indesiderati, l'anafilassi è l'unico effetto collaterale grave prodotto dal farmaco, anche se insorge molto raramente; altrettanto raramente si verifica ipersensibilità crociata con la VAN. Altre reazioni comprendono: disturbi gastrointestinali, trombocitopenia (specialmente a dosi elevate), leucopenia, eosinofilia, modificazioni degli enzimi epatici e, nella zona dell'iniezione, comparsa di dolori, eritema e tromboflebiti. Sono state riportate, inoltre, nefrotossicità e ototossicità, anche se con frequenza minore rispetto alla VAN⁷⁷.

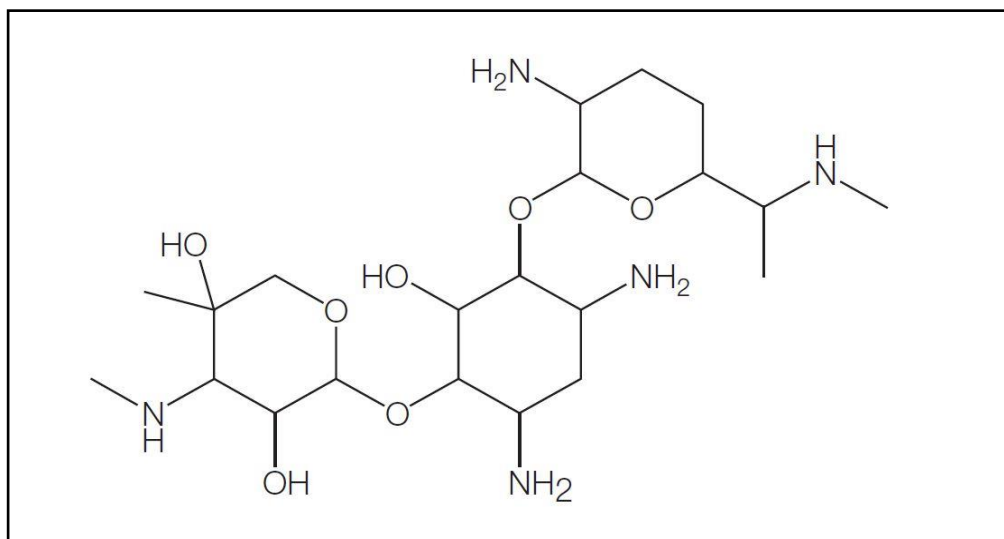
4.2. Gli aminoglicosidi

Gli aminoglicosidi sono una classe di antibiotici caratterizzati, dal punto di vista chimico, da aminosaccheri coniugati attraverso legami glucosidici ad un aminociclitolo. Sono antimicrobici idrosolubili, basici a medio-basso PM (inferiore ai 700 Da). La gentamicina (GEN) e la tobramicina (TOB) sono due aminoglicosidi utilizzati nelle infezioni ospedaliere. Trattasi di antimicrobici battericidi dotati di effetto post-antibiotico. Essi agiscono legandosi alla subunità 30S ribosomiale e, in questo modo, inibiscono la sintesi proteica. Seppur con delle differenze, gli aminoglicosidi sono attivi principalmente nei confronti dei batteri aerobi Gram-negativi, poiché il loro assorbimento all'interno della cellula batterica è ossigeno dipendente; essi penetrano nello spazio periplasmatico attraverso le porine. Gli stessi sono attivi solamente nei confronti di alcuni stafilococchi (a causa della difficoltà di attraversare la parete cellulare), mentre l'attività contro streptococchi e anaerobi è scarsa. Nonostante la loro efficacia, la resistenza agli aminoglicosidi non è un fenomeno raro e si può manifestare con diversi meccanismi. Tuttavia, da un punto di vista strutturale, la GEN e la TOB presentano minori siti di attacco per gli enzimi deputati alla loro inattivazione⁸⁹.

4.2.1. La gentamicina

La GEN è una miscela di sostanze antimicrobiche prodotte dal batterio *Micromonospora purpurea*. Il farmaco, reperibile commercialmente, è una miscela di tre solfati che possiedono simile attività antimicrobica: GEN C1, GEN C1a, GEN C2. Le tre specie chimiche appartengono ai derivati 4,6-disostituiti della 2-desossistreptamina (l'aminociclitolo) e differiscono tra loro per i sostituenti metilici legati alla purpurosamina. Da un punto di vista strutturale, alla 2-desossistreptamina è legata con legame 1-4 la purpurosamina e con legame 6-1 la garosamina (**Figura 4.3**). I tre solfati che costituiscono il farmaco sono molto solubili in acqua e hanno PM paragonabile (GEN C1: 575,66 Da; GEN C1a: 547,59 Da; GEN C2: 561,61 Da)⁷⁸.

Figura 4.3. Formula di struttura della gentamicina C1 (principale componente della miscela).



Come accennato in precedenza, l'azione battericida della GEN è legata all'inibizione della sintesi proteica. Tale aminoglicoside si lega alla subunità 30S del ribosoma batterico, inducendo un'alterata codifica del mRNA, che a sua volta è responsabile dell'incorporazione di aminoacidi errati nella catena polipeptidica in formazione⁷⁸. Per quanto riguarda lo spettro d'azione, la GEN è attiva soprattutto verso Gram-negativi aerobi, mentre possiede scarsa attività verso patogeni anaerobi obbligati e verso anaerobi-aerobi facoltativi in condizioni di anaerobiosi. In particolare, tra i Gram-negativi la GEN viene utilizzata per le infezioni sistemiche sostenute da *Pseudomonas aeruginosa*. Tuttavia, va sottolineato che la stessa ha una minore efficacia rispetto alla TOB nelle infezioni sostenute da questo Gram-negativo, poiché circa il 50% dei ceppi di *Pseudomonas* sono resistenti alla GEN, ma sensibili alla TOB. Oltre allo *Pseudomonas a.*, tra i ceppi di Gram-negativi sensibili alla GEN, vi sono le seguenti specie: *Brucella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Shigella spp.*, *Yersinia pestis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia spp.*, *Serratia marcescens*. Tra i batteri Gram-positivi, la GEN è attiva verso lo *Staphylococcus aureus*, lo *Staphylococcus epidermidis* e il *Listeria monocytogenes*⁹⁰. La resistenza al farmaco si può sviluppare con tre differenti meccanismi e viene acquisita dal microorganismo attraverso plasmidi. L'inattivazione enzimatica del farmaco è un meccanismo piuttosto comune di

resistenza ed è seguita dalla mutazione delle proteine bersaglio ribosomiali o dalla diminuzione della permeabilità cellulare batterica. La resistenza alla GEN si può manifestare altresì in maniera crociata con altri aminoglicosidi (TOB, kanamicina e neomicina). L'insorgenza di resistenza è più frequente in seguito a trattamenti di tipo locale piuttosto che sistemici⁹¹. L'aminoglicoside in questione trova indicazione nel trattamento degli stati settici, nella sepsi neonatale, nella meningite, nelle polmoniti, nelle infezioni del tratto urinario, nelle endocarditi batteriche (di solito in associazione con antibiotico penicillinico), nelle infezioni gravi del tratto gastrointestinale e biliare, nella chemioprolifassi precedente agli interventi chirurgici. Nelle infezioni da *Pseudomonas a.* la GEN va di solito somministrata in associazione ad un antimicrobico beta-lattamico⁹². Tale aminoglicoside può essere somministrato sia per via intramuscolare sia per via endovenosa. La posologia è la stessa, ma la somministrazione per via endovenosa è preferibile allorché non sia attuabile o consigliabile la somministrazione intramuscolo (ad es. nel paziente in stato di shock o che presenta gravi ustioni). La somministrazione per via intravenosa viene effettuata mediante infusione della durata di 1-2 ore. La posologia del farmaco, nel paziente con una funzionalità renale normale, è di 1 mg/Kg ogni 8 ore oppure di 1,5 mg/Kg ogni 12 ore. Se l'infezione risulta particolarmente grave, si possono somministrare sino a 5 mg/Kg al giorno in 3 o 4 dosi per i primi 2-3 giorni di terapia, per poi ridurre la posologia a 3 mg/Kg al giorno. Nel bambino la dose è di 2-2,5 mg/Kg ogni 8 ore, nel lattante è di 2,5 mg/Kg ogni 8 ore, nel prematuro e nel neonato è di 2,5-3 mg/Kg ogni 12 ore. L'adeguamento del dosaggio deve essere scelto tenendo in considerazione l'età, la funzionalità renale, il tipo e la gravità dell'infezione⁹². Per quanto riguarda il profilo PK della GEN, il farmaco è scarsamente assorbito a livello gastrointestinale, mentre è rapidamente assorbito in seguito a somministrazione parenterale. Dopo un'ora dalla somministrazione per via intramuscolare di una dose di 1 mg/Kg, si raggiunge un picco di concentrazione plasmatica pari a 4 mg/L. Delle concentrazioni simili si ottengono a seguito di somministrazione intravenosa. Sono comunque da tenere in considerazione variazioni individuali soprattutto nel paziente obeso, anemico, malnutrito, cirrotico e l'eventualità di ottenere concentrazioni plasmatiche più alte in pazienti

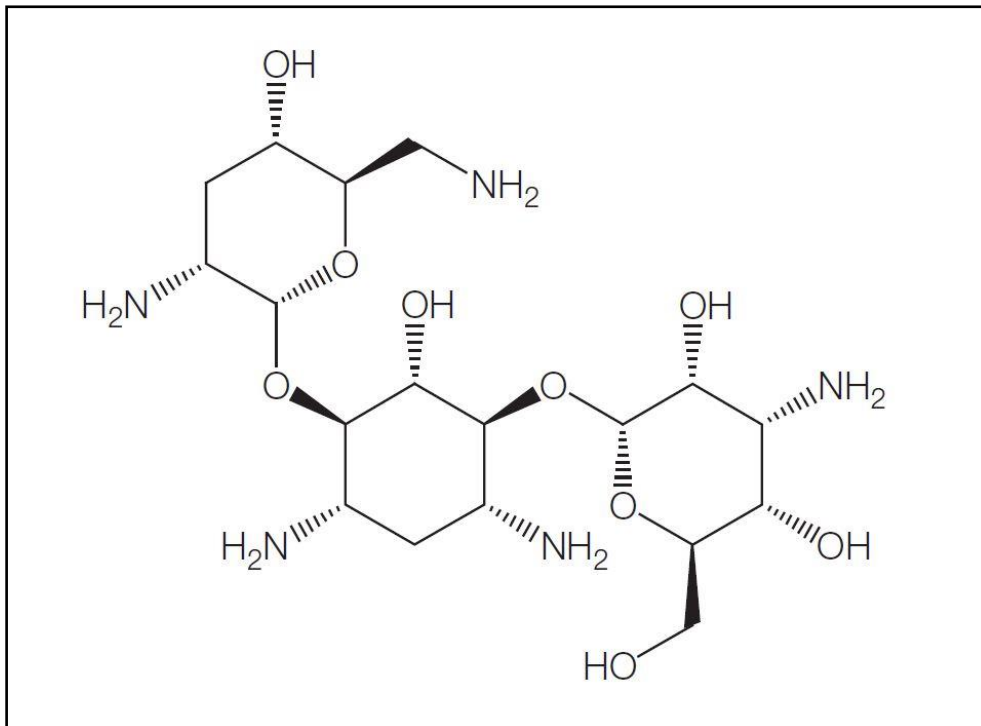
che presentano danno renale. Infatti, la sua concentrazione plasmatica di picco può variare da 5 a 12 mg/L, mentre la concentrazione di valle è inferiore 2 mg/L. Nell'adulto, il $t_{1/2}$ dell'antimicrobico varia da 1 a 4 ore, nel bambino è di circa 1 ora e nel neonato è di 2,5-3,5 ore. In caso di insufficienza renale, il valore può aumentare sino a 35 ore. Il legame del farmaco con le proteine plasmatiche è limitato (inferiore al 20%) e sono necessarie numerose somministrazioni prima di poter raggiungere lo steady-state. La GEN diffonde molto bene nei tessuti; le più alte concentrazioni di farmaco si riscontrano nel rene. Essa si distribuisce nei liquidi extracellulari con un V_d di 0,2 L/Kg. Raggiunge il cuore, il fegato, i muscoli e penetra nel liquido pleurico, sinoviale, peritoneale e nella perilinfia dell'orecchio interno. Il farmaco supera la barriera ematoencefalica solo in presenza di processi infiammatori, può attraversare la placenta e viene escreto nel latte, anche se in quantità non significative. Come gli altri aminoglicosidi, la GEN non viene metabolizzata e viene escreta imm modificata nelle urine per filtrazione glomerulare (più dell'80% della dose in 24 ore). Solo un 5% del farmaco è eliminato con la bile. In seguito all'accumulo nei tessuti (ad es. nel rene) e del lento rilascio da questi siti, la GEN si può trovare nel plasma e nelle urine anche 20 giorni dopo l'ultima somministrazione⁹³. A differenza dei glicopeptidi, la GEN viene rimossa dal circolo sistemico dall'HD dato il suo basso PM, tantoché si rende necessaria una dose supplementare post trattamento dialitico, a seconda della pratica clinica del centro dialisi⁹⁴. Viene rimossa anche dai trattamenti convettivi (HF) e convettivo-diffusivi (HDF), dato che l'eliminazione avviene fino a cutoff di membrana. Probabilmente, oltre al trasporto, si verifica il processo di adsorbimento come osservato per altri aminoglicosidi in membrane con carica di superficie negativa^{63,95}. Non vi sono invece dati in letteratura in merito ai trattamenti di HP diretta. Dal punto di vista degli effetti indesiderati, la GEN può manifestare ototossicità: il farmaco altera, infatti, la funzione vestibolare mentre più raramente viene interessato l'udito. Si tratta di un danno vestibolare di tipo irreversibile che si può manifestare non soltanto in seguito ad un trattamento sistemico, ma anche dopo applicazione di GEN per via topica su ampie aree di cute ustionata o su mucose. L'ototossicità si manifesta più facilmente nel paziente che presenta un danno renale, che abbia superato i 40 anni o, che sia stato trattato

precedentemente con farmaci ototossici. Concentrazioni plasmatiche superiori a 12 mg/L sono potenzialmente ototossiche. L'aminoglicoside in oggetto può causare inoltre nefrotossicità di tipo reversibile, può provocare un blocco neuromuscolare e depressione respiratoria. Il farmaco è responsabile di reazioni di ipersensibilità, mentre più raramente si possono manifestare disturbi a livello gastrointestinale e a carico del sistema emopoietico. In seguito a trattamento con GEN, infine, possono aumentare le transaminasi, la bilirubinemia e si possono manifestare disturbi visivi, confusione, depressione mentale e squilibri elettrolitici⁸⁹.

4.2.2. La tobramicina

La TOB è un aminoglicoside ottenuto da colture di *Streptomyces tenebrarius*. Questo actinomicete, fatto crescere in un mezzo di fermentazione appropriato, produce la nebramicina, un complesso di fattori basici idrosolubili che appartengono a un gruppo di antibiotici strutturalmente correlati (aminoglicosidici). Il fattore 6 del complesso della nebramicina (la TOB) ha dimostrato la più alta attività specifica e il più ampio spettro antimicrobico: non a caso è stato scelto per essere valutato nel campo della chemioterapia umana ed è attualmente impiegato in terapia. Dal punto di vista chimico, anche la TOB appartiene ai derivati 4,6-disostituiti della 2-desossistreptamina (l'aminociclitolo), alla quale sono legati la 3-D-Glucosammina e la nebrasammina, ed ha un PM di 467,64 Da (**Figura 4.4**)⁷⁸. La TOB ha azione battericida verso un ampio numero di batteri Gram-negativi. È simile alla maggior parte degli aminoglicosidi per quanto riguarda le proprietà farmacologiche e lo spettro di attività. Come illustrato in precedenza, la TOB è più attiva della GEN nei confronti dello *Pseudomonas aeruginosa*, ma meno efficace di quest'ultima contro il *Serratia marcescens*, gli stafilococchi e gli enterococchi. Inoltre, rispetto alla GEN, la TOB si è dimostrata meno nefrotossica⁹⁶. Il meccanismo d'azione della TOB è lo stesso degli altri composti aminoglicosidici: la molecola viene infatti trasportata attivamente attraverso la membrana cellulare batterica da un sistema ossigeno-dipendente.

Figura 4.4. Formula di struttura della tobramicina e sua stereochimica.



L'accumulo intracellulare dell'aminoglicoside in questione dipende da diversi fattori: dalla concentrazione di cationi divalenti quali Ca^{++} e Mg^{++} , dal pH e dalla tensione di ossigeno. La TOB, come gli altri aminoglicosidi, si lega irreversibilmente alla subunità ribosomiale 30S batterica bloccando la sintesi proteica, sia per inibizione del movimento del peptidil-tRNA, che per un aumento della frequenza degli errori di lettura del codice genetico, dovuti ad una non corretta interazione codone-anticodone⁹³. La farmaco-resistenza all'azione battericida della TOB può essere naturale o acquisita e riguarda sia i Gram-negativi che i Gram-positivi. La resistenza di un microorganismo alla TOB può essere dovuta a una diminuita permeabilità della parete batterica, ad alterazioni nel sito di legame ribosomiale o alla presenza di un fattore di resistenza plasmidomediata, che viene acquisito mediante coniugazione. La resistenza plasmidomediata consente ai batteri di modificare enzimaticamente il farmaco per acetilazione, fosforilazione o adenilazione e, può essere trasferita tra microorganismi della stessa specie o di specie differenti. Inoltre, la resistenza può essere crociata fra TOB e GEN, ma la maggior parte dei ceppi resistenti alla GEN

sono sensibili alla TOB⁹³. Il farmaco è indicato nei casi di setticemia sostenuta da Gram-negativi, soprattutto da *Pseudomonas aeruginosa*, come più volte ribadito. Lo stesso trova indicazione nel trattamento della sepsi in età pediatrica, delle infezioni del tratto respiratorio e delle infezioni del tratto urinario con la medesima efficacia della GEN. La TOB viene impiegata anche per le infezioni dell'apparato gastro-intestinale, del sistema nervoso centrale (nella meningite) sostenute da ceppi di microorganismi sensibili. Nel trattamento dell'endocardite da *Pseudomonas a.* la TOB è l'antibiotico di scelta, mentre è di seconda scelta nelle infezioni da *Escherichia Coli* e da stafilococco. Per quanto riguarda le indicazioni all'uso del farmaco, va ricordato che la TOB è utilizzata, anche per via topica, nelle infezioni oculari (ad es. blefariti, congiuntiviti e cheratiti)⁹⁷. La TOB viene inoltre somministrata per via sistemica come iniezione intramuscolare o per infusione endovenosa della durata di 20-60 minuti, dopo diluizione in 50-100 ml di soluzione fisiologica o di glucosata al 5%. L'aminoglicoside in questione viene impiegato solitamente come solfato e le sue dosi sono espresse in termini di base (1,5 g di solfato sono approssimativamente equivalenti a 1 g di TOB). Nell'adulto le dosi usuali di TOB variano da 3 mg/Kg/die a 5 mg/Kg/die, a seconda della gravità dell'infezione, tenendo anche conto dell'età del paziente e della sua funzionalità renale. Il trattamento non dovrebbe protrarsi per più di 7-10 giorni e dovrebbero essere evitate concentrazioni plasmatiche di valle inferiori a 2 mg/L e concentrazioni di picco superiori a 12 mg/L. Nel bambino e nel neonato le dosi sono aumentate: di 6-7,5 mg/Kg/die in 3-4 somministrazioni equivalenti, nel primo caso, mentre nel secondo caso possono raggiungere i 4 mg/Kg/die in due dosi equivalenti ogni 12 ore⁹⁷. Nei pazienti con insufficienza renale, dopo una dose da carico di 1 mg/Kg, il dosaggio successivo dovrebbe essere aggiustato o con dosi ridotte somministrate a intervalli di 8 ore, oppure con dosi normali somministrate a intervalli più lunghi (come per la GEN). Durante la terapia si dovrebbero monitorare le concentrazioni di TOB^{92,97}. Dal punto di vista PK, la TOB non viene assorbita dal tratto gastrointestinale e non subisce metabolismo pre-sistemico. Dopo somministrazione intramuscolare di 1 g di farmaco si raggiunge il picco delle concentrazioni plasmatiche di circa 4 mg/L in 30-90 minuti. Il $t_{1/2}$ è di 2-3 ore negli adulti con normale funzionalità renale. Il legame

dell'antimicrobico con le proteine plasmatiche è estremamente variabile da 0 a 30%, o più elevato. La TOB si distribuisce nei fluidi extracellulari con un V_d che varia da 0,22 a 0,60 L/Kg. La concentrazione di farmaco nella bile e nel liquido prostatico è bassa, mentre risulta adeguata nei fluidi peritoneale, pleurico e sinoviale (in presenza di infiammazione), e nelle secrezioni bronchiali. L'aminoglicoside in oggetto diffonde scarsamente attraverso la barriera ematoencefalica ed è necessaria l'instillazione intratecale per raggiungere concentrazioni adeguate a livello centrale. Può attraversare la placenta e accumularsi nei reni del feto; si ritrova nel latte materno in concentrazioni molto basse. La TOB viene eliminata come molecola imm modificata nelle urine fino al 90% entro 24 ore; di questa percentuale la maggior parte è escreta nelle prime 6 ore⁹³. Come per la GEN, la TOB viene rimossa dall'HD dato il suo basso PM. Infatti, durante l'high-flux HD vi sono evidenze che dimostrano come una dose supplementare, dopo 30 minuti di trattamento, consenta di mantenere la sua concentrazione di picco⁹⁸. In funzione del legame farmaco-proteico, l'aminoglicoside viene rimosso anche in HF nonostante, sulla base del tipo di membrana, si possa verificare il fenomeno dell'adsorbimento⁶⁴. Anche per la TOB, non vi sono dati in letteratura in merito ai trattamenti di HP diretta, se non quelli oggetto di questo elaborato. Dal punto di vista degli effetti collaterali, la TOB ha un profilo simile agli altri aminoglicosidi. Alla somministrazione parenterale di TOB possono seguire effetti locali quali: dolore nel sito di iniezione, flebite e reazioni cutanee. Possono verificarsi nausea, vomito, orticaria, rash maculopapulari e, più raramente, alterazioni nei valori degli enzimi epatici, dell'ematocrito e dell'emoglobina. In seguito all'impiego di TOB è stata riportata ototossicità, sia uditiva sia vestibolare: le alterazioni dell'udito sono irreversibili, solitamente bilaterali e possono essere parziali o totali. L'antibiotico si concentra principalmente nelle cellule della corteccia renale, producendo modificazioni nei tubuli prossimali in modo simile alla GEN. Lo stesso può causare insufficienza renale caratterizzata da escrezione di cilindri, oliguria, proteinuria e aumento progressivo dell'azotemia e della creatininemia. L'effetto nefrotossico si verifica principalmente nei pazienti che ricevono la TOB ad alte dosi e per periodi prolungati. Come con altri aminoglicosidi, deve essere tenuta in considerazione la

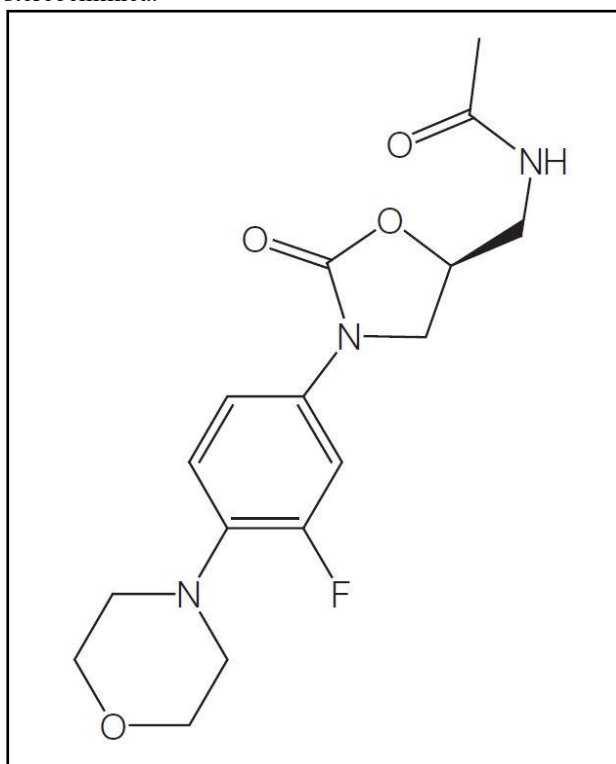
possibilità che si verifichi apnea prolungata o secondaria quando il farmaco viene somministrato a pazienti anestetizzati che ricevono anche bloccanti neuromuscolari; tale effetto può essere contrastato con la somministrazione di sali di calcio⁸⁹.

4.3. Il linezolid

Il linezolid (LZD) è un antimicrobico di sintesi, appartenente alla classe degli ossazolidinoni, a basso PM (337,35 Da) e solubile in acqua. Da un punto di vista strutturale, la molecola è caratterizzata dall'anello ossazolidinonico (2-ossazolidinone), a cui in C-5 è legata una porzione acetilaminometilica, mentre all'azoto si lega il 3-fluoro-4-morfolinofenile (**Figura 4.5**)⁹⁹. Il LZD è un inibitore della sintesi proteica del microorganismo. Esso si lega alla subunità 50S del ribosoma batterico sull'interfaccia con la subunità 30S. Il sito di legame è adiacente a quello della lincomicina e del cloramfenicolo con i quali, pertanto, esiste competizione. Si lega all'RNA ribosomiale 23S, ossia al centro peptil-transferasico, bloccando l'attività enzimatica dell'intero ribosoma. Ci sono evidenze che dimostrano come gli ossazolidinoni si leghino al sito P, impediscano il legame dell'fMet-tRNA al sito P e la traslocazione dal sito A al sito P bloccando altresì l'inizio della sintesi proteica¹⁰⁰. Il LZD è un antimicrobico batteriostatico che ad alti dosaggi agisce come battericida. Per quanto riguarda il suo spettro di attività, il farmaco è molto attivo nei confronti dei batteri Gram-positivi aerobi, compresi ceppi resistenti ad altri antimicrobici, ma poco attivo verso i Gram-negativi. Tra i Gram-positivi va sicuramente ricordato lo *Staphylococcus aureus*, incluse le specie resistenti MRSA e VRSA, ma anche quelli a resistenza intermedia ai glicopeptidi (GISA: Glycopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus*). La molecola risulta attiva altresì nei confronti degli stafilococchi coagulasi negativi, così come verso gli enterococchi, compresi l'*Enterococcus faecalis* e l'*Enterococcus faecium*, resistenti alla VAN, ossia i ceppi VRE. Sono sensibili al LZD lo *Streptococcus pneumoniae*, lo *Staphylococcus pyogenes* e gli streptococchi viridanti, compresi i ceppi resistenti alle penicilline e alle cefalosporine. Il farmaco è inoltre attivo sul *Bacillus spp.*,

Corynebacterium spp., *Listeria monocytogenes*, *Rhodococcus equi*. Alcuni anaerobi sono suscettibili come ad esempio: *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Peptostreptococcus spp.*, *Propionibacterium acnes*, *Bacteroides fragilis* e *Fusobacterium necrophorum*.

Figura 4.5. Formula di struttura del linezolid e sua stereochimica.



Di contro, il LZD è scarsamente attivo o inattivo sui microorganismi Gram-negativi, quali: *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Legionella pneumophila*, enterobacteriacee e *Pseudomonas aeruginosa*. Il farmaco presenta tuttavia un certo grado di attività su *Chlamydia spp.* e *Mycoplasma spp.* Lo stesso mostra invece una buona attività inibitoria su svariate specie di micobatteri, compreso il *Mycobacterium tuberculosis*, anche multiresistente, il *Mycobacterium avium* e i micobatteri a rapida crescita¹⁰¹. Quanto alla resistenza al LZD, si osserva come la stessa sia legata alla modifica a seguito di una mutazione all'RNA ribosomiale 23S, ossia del target dell'antibiotico, cosicché la molecola

non è più in grado di legarsi alla subunità 50S del microorganismo. Tale resistenza è stata osservata in *E. faecium*, *E. faecalis* e anche in alcuni ceppi di *Escherichia coli*. Sono stati inoltre isolati ceppi resistenti di *Staphylococcus aureus* e di *Streptococcus pneumoniae* in corso di terapia prolungata. Va infine ricordato, per quanto riguarda il fenomeno della farmaco-resistenza, che proprio per l'unicità del meccanismo d'azione del LZD, esso non mostra cross-resistenza con altri agenti antinfettivi^{101,102}. Il LZD è un farmaco ad uso ospedaliero o comunque impiegato nella continuità terapeutica ospedale-territorio e somministrato per via endovenosa o orale. Il farmaco trova indicazione nel trattamento della polmonite nosocomiale, della polmonite acquisita in comunità, delle infezioni della cute e dei tessuti molli complicate e non complicate, sostenute da ceppi sensibili¹⁰³. Dal punto di vista posologico, il LZD può essere somministrato per infusione, oppure per via orale in forma di compresse o granulato per sospensione orale. Peraltro, data la sua biodisponibilità per via orale, i pazienti che iniziano il trattamento per via parenterale possono successivamente passare alla formulazione orale senza alcuna modifica del dosaggio. Nell'adulto, sia per via orale che per via intravenosa, lo schema posologico prevede la somministrazione di 600 mg di LZD ogni 12 ore. Si evidenzia a tal proposito, che la durata del trattamento dipende dal tipo di microorganismo patogeno, dalla sede o sito d'infezione e dalla sua gravità, nonché dalla risposta clinica del paziente, ma in generale per le indicazioni autorizzate varia dai 10 ai 14 giorni. Non è richiesta una modifica del dosaggio nel paziente anziano, mentre nel bambino da 1 settimana a 12 anni di età, la somministrazione di 10 mg/Kg ogni 8 ore fornisce un'esposizione equivalente all'incirca a quella raggiunta negli adulti, con il dosaggio di 600 mg due volte al giorno. Nel neonato fino alla prima settimana di vita, la CL sistemica del LZD aumenta rapidamente. Quindi i neonati che ricevono 10 mg/Kg ogni 8 ore avranno dunque un'esposizione sistemica maggiore i primi giorni dopo il parto. In ogni caso, con questo regime posologico non si prevede un'eccessivo accumulo¹⁰³. Dal punto di vista PK, il LZD ha una biodisponibilità del 100% quando somministrato per via orale e il suo assorbimento non è alterato dalla presenza di cibo lungo tratto gastrointestinale. Dopo 1-2 ore dalla somministrazione di una singola dose di 600 mg per via

endovenosa, il picco della concentrazione plasmatica è di 13 mg/L, mentre allo steady-state, quando viene somministrato ogni 12 ore, è di 20 mg/L. Il suo $t_{1/2}$ varia da 4 a 6 ore e si lega alle proteine plasmatiche per il 30%. Il LZD si distribuisce ampiamente negli organi e tessuti riccamente vascolarizzati e nei fluidi extracellulari; il suo V_d è di 0,6-0,7 L/Kg¹⁰⁴. Le concentrazioni di LZD sono state determinate in diversi fluidi corporei. Il rapporto tra il LZD contenuto nella saliva e nel sudore rispetto a quello contenuto nel plasma è risultato rispettivamente di 1,2:1,0 e di 0,55:1,0. Il rapporto per il fluido di rivestimento epiteliale e le cellule alveolari del polmone, quando misurato alla concentrazione di picco in condizioni di steady-state, è risultato rispettivamente di 4,5:1,0 e di 0,15:1,0. Mentre, il rapporto tra il LZD contenuto nel liquido cerebrospinale sempre rispetto al plasma, dopo somministrazioni multiple e con meningi non infiammate, è stato alla concentrazione di picco di 0,7:1,0^{103,104}. Si osserva, inoltre, che il LZD viene metabolizzato per il 65% a livello epatico, mentre il restante 35% del farmaco viene eliminato immutato per filtrazione glomerulare. L'ossidazione epatica interessa principalmente l'anello morfolinico, con formazione prevalentemente di due derivati dell'acido carbossilico ad anello aperto: il metabolita acido aminoetossiacetico (PNU-142300) e il metabolita idrossietilglicinicico (PNU-142586). Si ritiene che il metabolita idrossietilglicinicico (PNU-142586), ovvero quello predominante nell'uomo, si formi attraverso un processo non enzimatico. Il metabolita acido aminoetossiacetico (PNU-142300) invece è meno abbondante. Sono stati caratterizzati anche altri metaboliti minori e tutti i metaboliti sono inattivi. In condizioni di steady-state, il LZD viene principalmente escreto nelle urine come PNU-142586 per il 40%, come farmaco immutato per il 30% e, come PNU-142300 per il 10% nei pazienti con funzionalità renale normale o insufficienza renale lieve-moderata. Nelle feci non si riscontra traccia del farmaco immutato, mentre circa il 6% e il 3% di ciascuna dose appare rispettivamente come PNU-142586 e come PNU-142300^{103,104}. Degna di nota è la circostanza secondo cui dopo singole dosi di 600 mg, si è verificato un incremento di 7-8 volte dell'esposizione ai due metaboliti primari del LZD nel plasma di pazienti con CL della creatinina inferiore a 30 ml/min. Non è stato tuttavia osservato un incremento dell'esposizione del farmaco

immodificato. È inoltre emerso un accumulo dei due metaboliti primari nei pazienti sottoposti ad HD. Il significato clinico di questi fenomeni rimane da chiarire e, pertanto, appare necessario un adeguamento del dosaggio post trattamento dialitico con una dose supplementare¹⁰³. Considerato il suo basso PM, è evidente altresì come la molecola venga rimossa dai trattamenti extracorporei convettivi (HF) e convettivo-diffusivi (HDF)¹⁰⁵. Non è stata invece sufficientemente indagata la possibilità di un suo adsorbimento sulla membrana. Di contro, non è richiesto alcun aggiustamento del dosaggio nei pazienti con insufficienza renale lieve-moderata o insufficienza epatica moderata¹⁰³. La PK del LZD non è stata inoltre valutata in pazienti con insufficienza epatica grave¹⁰⁴. Per quanto riguarda il profilo degli effetti collaterali, la maggior parte degli eventi avversi riportati sono di lieve o moderata entità, con reazioni gravi che si manifestano solamente in meno del 3% dei casi. Gli effetti collaterali più frequenti sono disturbi gastrointestinali (diarrea, nausea, vomito e alterazione del gusto) e cefalea. Anomalie lievi e transitorie dei test di funzionalità epatica con aumento delle transaminasi e/o della fosfatasi alcalina, possono verificarsi in più dell'1% dei pazienti. Eventi più rari sono invece le eruzioni cutanee, le dermatiti, il prurito e la sudorazione profusa. Gravi, ma non frequenti, sono gli effetti avversi che comprendono la mielosoppressione, la neuropatia periferica, la neuropatia ottica e l'acidosi lattica. Ad ogni modo, tali eventi avversi si verificano essenzialmente nei pazienti trattati per lungo tempo. In particolare, la mielosoppressione generale si verifica solo dopo più di due settimane di trattamento e aumenta con il perdurare del trattamento con il LZD. Essa si presenta più frequentemente in pazienti con insufficienza renale grave ed è reversibile con l'interruzione della terapia. Il monitoraggio settimanale dell'emocromo completo è raccomandato per tutti i pazienti in trattamento con LZD. Particolare attenzione deve essere posta infine ai pazienti con anemia o trombocitopenia preesistente, pazienti in terapia con farmaci che possono causare anemia o trombocitopenia, pazienti con grave insufficienza renale e pazienti in trattamento con il farmaco per più di 10-14 giorni^{82,104}.

CAPITOLO 5

MATERIALI E METODI

5.1. Il monitor e la cartuccia adsorbente per i modelli di emoperfusione

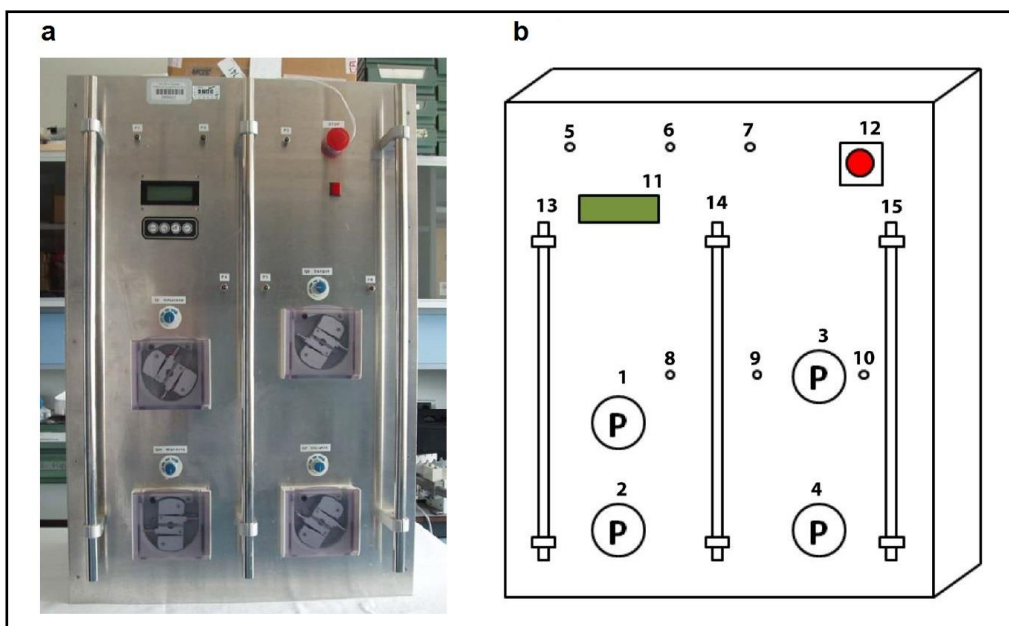
Per lo studio della CL extracorporea della TEC, della VAN, della GEN e dalla TOB mediante l'impiego della cartuccia adsorbente Lixelle S-35, sono stati messi a punto dei modelli *in vitro* di HP diretta su un monitor prototipo (Bellco, R&D Electronic Division, Mirandola, Italia). Tale prototipo è stato utilizzato anche per ottenere una soluzione concentrata di β 2-microglobulina (β 2-MG). Questa soluzione si è resa necessaria per lo screening test, per la valutazione del legame competitivo tra la TEC e la β 2-MG sul polimero di cellulosa modificata contenuto nella cartuccia Lixelle S-35 (si veda paragrafo 5.5.1). Nei successivi paragrafi, sono stati descritti il monitor prototipo e la cartuccia adsorbente Lixelle S-35.

5.1.1. Il monitor prototipo Bellco

Il monitor prototipo Bellco consta dei seguenti componenti (**Figura 5.1b**):

- quattro pompe peristaltiche, ciascuna regolata da un proprio potenziometro. In posizione 1 abbiamo la pompa per l'infusione, in posizione 2 la pompa dialisato, in posizione 3 la pompa sangue e in posizione 4 la pompa dell'ultrafiltrazione;
- sei trasduttori di pressione in posizione 5, 6, 7, 8, 9 e 10;
- l'interfaccia monitor in posizione 11;
- il pulsante di stop in posizione 12;
- tre supporti per il filtro e i pozzetti cattura bolle in posizione 13, 14 e 15.

Figura 5.1. Il monitor prototipo Bellco.



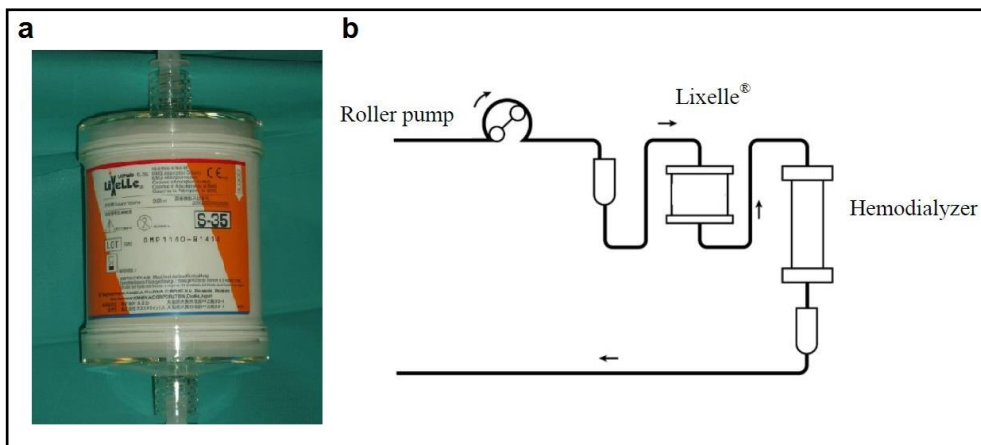
Legenda. In a: il prototipo utilizzato per le sperimentazioni; in b: lo schema dei componenti montati a bordo del prototipo.

Il software dell'interfaccia monitor è strutturato in vari menu che permettono di scegliere diverse metodiche, con differenti visualizzazioni dei parametri operativi. Per le sperimentazioni, il prototipo è stato impostato in modo tale da far lavorare le quattro pompe in maniera indipendente, garantendo la massima flessibilità nella gestione della macchina. Con questa impostazione (pompe peristaltiche indipendenti), dopo aver stabilito il diametro e la lunghezza delle linee, è stato possibile regolare il flusso per ogni pompa attraverso il loro potenziometro (in accordo con la legge Hagen-Poiseuille). Per le sperimentazioni, sono state utilizzate delle linee Bellco formula 2000 (Bellco, Mirandola, Italia), opportunamente adattate in lunghezza e con diametro interno di 8 mm. Nell'interfaccia monitor, la modalità di visualizzazione scelta ha consentito di osservare i flussi e le pressioni durante la sperimentazione.

5.1.2. La cartuccia adsorbente Lixelle S-35

La cartuccia adsorbente Lixelle S-35 è un dispositivo medico sviluppato per rimuovere selettivamente, attraverso l'HP diretta (DHP), la β 2-MG dal circolo sistemico (**Figura 5.2**)¹⁰⁶.

Figura 5.2. La cartuccia adsorbente Lixelle S-35 e il circuito di emoperfusione.

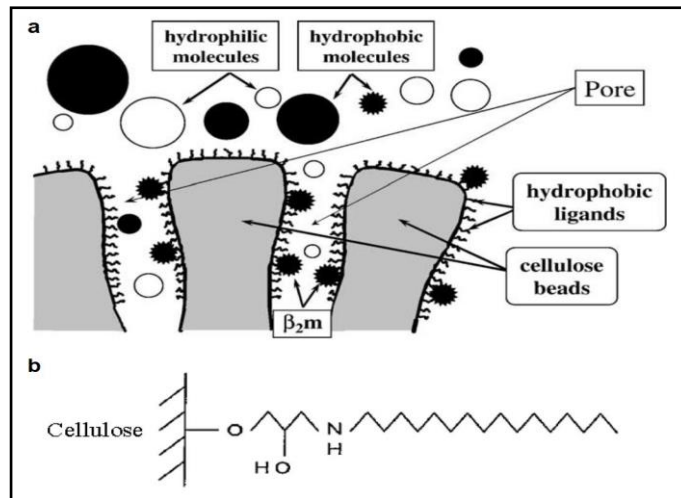


Legenda. In a: la cartuccia adsorbente Lixelle S-35; in b: lo schema del circuito extracorporeo del trattamento dialitico accoppiato all'emoperfusione diretta.

La β 2-MG è un polipeptide a catena singola con PM di 11600 Da presente sulla superficie delle cellule del sistema immunitario, come linfociti e macrofagi. Essa costituisce la catena leggera, a legame non covalente, degli antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I, ma è anche presente sulla superficie di molte altre cellule provviste di nucleo¹⁰⁷. La β 2-MG è il principale componente dei depositi di amiloide nell'amiloidosi dialisi-correlata (DRA: Dialysis-Related Amyloidosis). La DRA è una forma di amiloidosi secondaria, che si sviluppa come complicanza tardiva nei pazienti con IRC in trattamento dialitico extracorporeo¹⁰⁸. La DRA colpisce il 70% dei pazienti in dialisi da dieci anni, il 90% dei pazienti in dialisi da quindici anni e la totalità dei pazienti in dialisi da vent'anni¹⁰⁹. Nel soggetto sano, la normale concentrazione plasmatica di β 2-MG varia da 1 a 2,7 mg/L ed ha un tasso di generazione di circa 220 mg al giorno. In condizioni fisiologiche, la β 2-MG viene eliminata per via renale, ma nel paziente anurico sottoposto a trattamento dialitico, la sua eliminazione è severamente

ridotta, tanto da arrivare a concentrazioni circolanti della proteina di 15-20 mg/L e, spesso, anche oltre. In queste condizioni, la β 2-MG inizia ad accumularsi nei tessuti target, determinando il quadro patologico tipico dell'amiloidosi¹¹⁰. Le più comuni manifestazioni cliniche possono essere dolori articolari alla spalla e la sindrome del tunnel carpale. Tuttavia, l'accumulo di β 2-MG con formazione dei tipici depositi di amiloide avviene nelle giunture ossee, nei tendini, nelle fasce muscolari, nelle ossa, nel cuore, nel tratto gastrointestinale, nel polmone e nel fegato. Le modificazioni più comuni sono la formazione di cisti ossee che possono causare fratture, soprattutto delle ossa lunghe e, nei casi più gravi, anche paraplegia, quadriplegia ed addirittura la morte quando le fratture colpiscono la spina dorsale^{110,111}. Numerosi studi in letteratura hanno riportato l'efficacia della cartuccia adsorbente Lixelle nella rimozione della β 2-MG, con un miglioramento del quadro clinico dei pazienti affetti da DRA¹¹²⁻¹¹⁴. La cartuccia adsorbente è presente sul mercato in tre modelli, contenenti un volume diverso di polimero adsorbente: Lixelle S-15, Lixelle S-25 e Lixelle S-35 (contenenti rispettivamente 150, 250 e 350 ml di polimero)^{69,106,115}. Quest'ultimo modello è stato oggetto di studio e impiegato nell'allestimento dei sistemi *in vitro* per la valutazione della CL extracorporea degli antimicrobici precedentemente menzionati. La cartuccia Lixelle S-35 contiene 350 ml di polimero poroso sotto forma di particelle sferiche del diametro medio di 460 μ m. Il letto polimerico è costituito da cellulosa modificata con catene esadeciliche, che gli conferiscono la capacità di adsorbire molecole ad alto PM, attraverso interazioni di tipo idrofobico. In questo modo, il polimero è in grado di adsorbire e incorporare peptidi e proteine, come la β 2-MG all'interno dei pori del letto polimerico in un range di PM che varia da 4000 a 20000 Da^{69,106} (**Figura 5.3**). La capacità di rimozione della β 2-MG è di 1 g di proteina (β 2-MG) per ml di polimero, ed è stato osservato che la cartuccia Lixelle S-35 è in grado di rimuovere sino a 200-350 mg di β 2-MG per ogni sessione dialitica di 4 ore¹¹².

Figura 5.3. Meccanismo di rimozione della β_2 -microglobulina.



Legenda. In a: il meccanismo di rimozione del letto polimerico; in b: il ligando esadecilico del letto celluloso.

5.2. Il monitor e il filtro per il modello di emofiltrazione

Per lo studio della CL extracorporea convettiva del LZD e della TOB è stato messo a punto un modello *in vitro* di HF sul monitor CARPEDIEM (Cardio-Renal Pediatric Dialysis Emergency Machine; Bellco, Mirandola, Italia). CARPEDIEM è l'unico monitor attualmente disponibile ad uso clinico dedicato alla terapia sostitutiva renale di neonati e bambini, che consente di trattare soggetti con un peso corporeo compreso tra i 2 e i 10 Kg. Questi pazienti hanno un volume di sangue circolante compreso tra meno di 200 ml ed 1 L, ed un contenuto di acqua corporea totale variabile da 1 a 5 L¹¹⁶. Il dispositivo medico CARPEDIEM ha permesso di costruire un sistema *in vitro* miniaturizzato per l'HF. Ciò ha consentito di superare il limite della discrepanza tra il volume di sangue (o altro veicolo, ad es. soluzione fisiologica) nel quale sono dispersi i farmaci e le dimensioni del sistema *in vitro*. Infatti, in questi sistemi *in vitro* ad organi isolati, per studiare la cinetica extracorporea di farmaci ma anche di altre molecole, la quantità di sangue utilizzata è sempre al di sotto del litro e, quindi, non mima sicuramente il volume circolante di un uomo di 70 Kg (circa 5 L)¹¹⁷. Nei

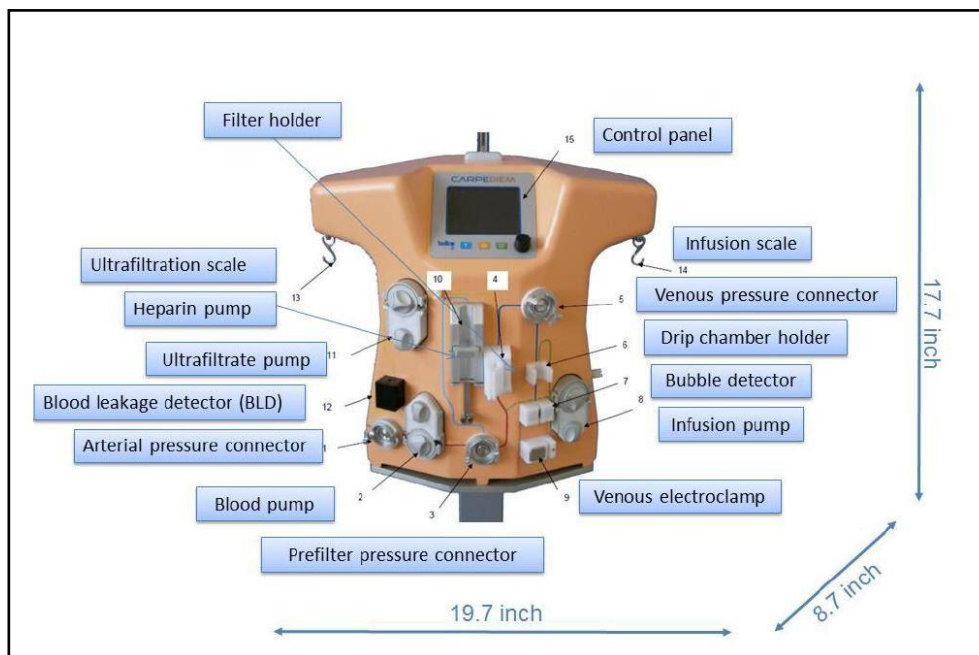
successivi paragrafi, sono stati descritti il monitor CARPEDIEM e il filtro utilizzato nella sperimentazione.

5.2.1. Il monitor carpediem

Il monitor CARPEDIEM consta dei seguenti componenti (**Figura 5.4**):

- tre pompe peristaltiche, ciascuna dotata di tre rulli in grado di garantire un'alta precisione dei flussi. In posizione 2 abbiamo la pompa sangue, in posizione 8 la pompa per l'infusione e in posizione 11 la pompa dell'ultrafiltrazione;
- tre trasduttori di pressione: in posizione 1 vi è il sensore pre-pompa sangue, in posizione 3 il sensore pre-filtro e in posizione 5 il sensore di pressione venosa;
- 2 bilance ad alta precisione (sensibilità 1 g): la bilancia per il liquido d'infusione (posizione 14) e la bilancia dell'ultrafiltrazione (posizione 13);
- in posizione 10 abbiamo la pompa per l'eparina e in posizione 4 il supporto per il filtro;
- il detector per la perdita di sangue (BLD), in caso di rottura del filtro, è in posizione 12, subito dopo la pompa dell'ultrafiltrazione;
- in sequenza, dopo il sensore di pressione venosa, abbiamo l'alloggiamento per il pozzetto cattura bolle (posizione 6), il sensore bolle d'aria (posizione 7) e l'elettro-pinza che chiude la linea venosa nel caso in cui vi sia aria nel circuito (posizione 9);
- l'interfaccia monitor è in posizione 15.

Figura 5.4. Il monitor CARPEDIEM.



Legenda. Dimensioni in centimetri: 50 L (19.7 inches) X 45 H (17.7 inches) X 23 P (8.7 inches); peso: 13 kg .

Considerati i suoi componenti, si può comprendere come CARPEDIEM sia un dispositivo dedicato esclusivamente ai trattamenti convettivi (HF). Dal punto di vista software, la macchina guida, passo dopo passo, ogni procedura: dall'inserimento delle linee, al priming del circuito/filtro, sino ai diversi controlli sui componenti che monta a bordo prima di cominciare il trattamento¹¹⁶. Queste procedure sono previste per tutti i dispositivi utilizzati per i trattamenti extracorporei, tuttavia, per la sperimentazione, si è operato in modalità tecnica del software, in modo da intervenire su ogni singolo componente in maniera indipendente dagli altri. La gestione della macchina in “modalità manuale” ha consentito, infatti, non solo un'ampia flessibilità nell'impostazione dei flussi, ma anche di configurare il circuito secondo protocollo (si veda paragrafo 5.6.2).

5.2.2. Il filtro in polisulfone

Per il monitor CARPEDIEM sono stati sviluppati tre circuiti pre-assemblati con filtri contenenti membrane in polisulfone (Medisulfone; Medica, Medolla, Italia). I tre circuiti differiscono tra loro principalmente per l'area superficiale della membrana del filtro, che può essere rispettivamente di 0,075, di 0,150, e di 0,250 m² (**Figura 5.5**).

Figura 5.5. Filtro in polisulfone.



Legenda. Area superficiale della membrana di 0,250 m².

Tutte e tre le tipologie di filtro presentano come materiale di potting il poliuretano, mentre l'housing è in policarbonato/copoliestere. Esse possono supportare un flusso massimo di 50 ml/min ed una pressione transmembrana di 500 mmHg. Il diametro interno di ciascuna fibra in polisulfone è di 250 µm, quello esterno di 350 µm, mentre lo spessore della fibra è di 50 µm. Il cutoff di membrana è di 50000 Da. Il circuito, utilizzato per l'allestimento del sistema *in vitro* per la sperimentazione, monta il filtro con membrana di 0,250 m² di superficie, conta 2500 fibre della lunghezza di 140 mm al suo interno ed ha un diametro dell'housing di 24 mm ed una lunghezza di 180 mm. Il volume di priming del filtro è di 19 ml¹¹⁸.

5.3. Il modello in vitro di emoperfusione diretta per la sperimentazione con i glicopeptidi

La sperimentazione per lo studio della CL extracorporea della VAN e della TEC ha previsto la messa a punto di un sistema *in vitro* che mimasse la tecnica di DHP, con l'impiego della cartuccia adsorbente Lixelle S-35, ma senza l'impiego di un dializzatore in serie. Come veicolo di dispersione dei due antimicrobici è stata utilizzata la soluzione fisiologica (NaCl 0,9% p/v) e i dosaggi dei campioni sono stati effettuati con dei test immunometrici. Tali scelte si sono rese necessarie al fine di poter studiare l'adsorbimento isolato dei due antimicrobici da parte della cartuccia adsorbente e l'interazione diretta farmaco-polimero.

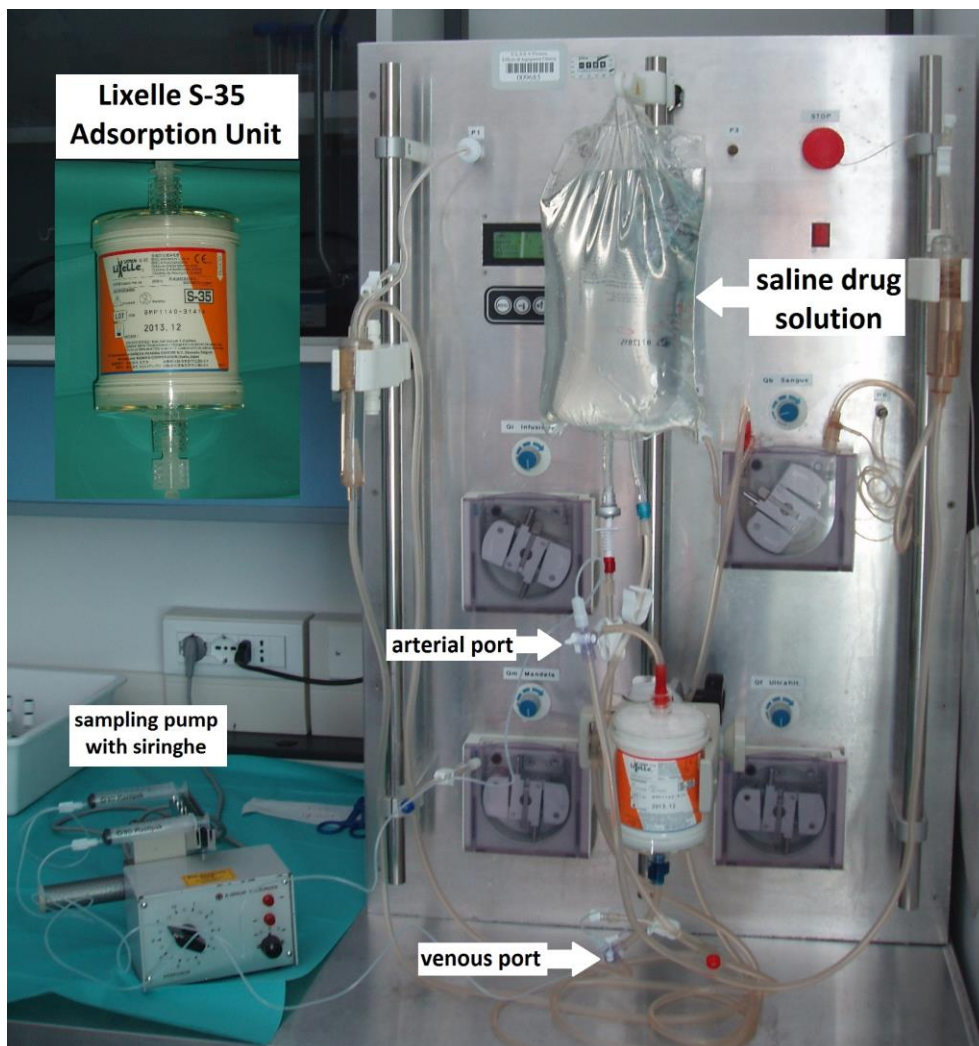
5.3.1. L'allestimento dei veicoli in soluzione fisiologica

Per la sperimentazione, sono state preparate sei sacche di soluzione NaCl 0,9% p/v per infusione parenterale (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germania) a titolo noto di ciascun antimicrobico, ciascuna del volume di 2000 ml (2055 ml effettivi). Tre di queste sacche sono state allestite per circolazione extracorporea con la VAN e tre per la TEC. Ciascuna sacca è stata preparata alla concentrazione di picco dell'antimicrobico e, più precisamente, di $46,08 \pm 0,81$ mg/L per la VAN e di $74,79 \pm 1,24$ mg/L per la TEC. Le concentrazioni di picco sono state scelte per avere una quantità, in termini di massa, di antimicrobico circolante adeguata alla dimensione della cartuccia (Lixelle S-35) e, quindi, del letto polimerico adsorbente. Come soluzioni madre per l'allestimento delle sacche sono state utilizzate le soluzioni iniettabili ricostituite delle forme farmaceutiche: VANCOTEX 500 mg polvere per soluzione per infusione e per soluzione orale (Pharmatex, Milano, Italia), TARGOSID 200 mg polvere e solvente per soluzione iniettabile/infusione o soluzione orale (Sanofi-Aventis, Milano, Italia), rispettivamente per la VAN e per la TEC.

5.3.2. Il circuito *in vitro* per l'emoperfusione e il campionamento

Il modello *in vitro* di DHP ha previsto un circuito chiuso, in cui la sacca contenente la soluzione dell'antimicrobico (VAN oppure TEC) è stata direttamente connessa alla cartuccia adsorbente Lixelle S-35 (Figura 5.6).

Figura 5.6. Configurazione del modello *in vitro* per l'emoperfusione diretta.



Legenda. Sampling pump with siringhe: pompa-siringa multicanale; arterial and venous ports: rubinetti a tre vie per il prelievo dei campioni rispettivamente arterioso e venoso; saline drug solution: soluzione dell'antimicrobico in sperimentazione.

Per la circolazione extracorporea della soluzione del farmaco, la pompa sangue del prototipo Bellco è stata impostata alla velocità di 250 ml/min (Q_B). Lungo la

linea arteriosa e la linea venosa sono stati introdotti, a ugual distanza dalla cartuccia, dei rubinetti a tre vie (Cair LGL, Civrieux-d'Azergues, Francia) per il prelievo dei campioni di soluzione dell'antimicrobico, durante la sperimentazione. Il prelievo dei campioni dalle linee arteriosa e venosa è stato realizzato in maniera simultanea, grazie all'impiego di una pompa-siringa multicanale (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germania). Le siringhe utilizzate per il prelievo, alloggiata sulla pompa multicanale, sono state connesse ai rubinetti a tre vie mediante delle linee per eparina. Per evitare turbolenze lungo il circuito, i prelievi sono stati effettuati lentamente, impostando la pompa multicanale alla velocità di 1,25 ml/min per 2 minuti totali di prelievo (2,5 ml per campione). Prima di ogni esperimento, è stato effettuato il priming del circuito con soluzione fisiologica eparinata, come da scheda tecnica del dispositivo Lixelle e, successivamente, questa soluzione è stata eliminata dal circuito stesso. Nella simulazione del trattamento di DHP, ciascuna soluzione dell'antimicrobico è stata fatta circolare per 120 minuti. I campioni della soluzione circolante sono stati raccolti a 0 (baseline sulla sacca), 10, 60 e 120 minuti, dall'inizio dell'esperimento, dalla linea arteriosa (Cin) e dalla linea venosa (Cout). Al termine di ogni esperimento, i campioni sono stati stoccati a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ sino al giorno dell'analisi.

5.3.3. Il dosaggio dei campioni e l'analisi dei dati

Il dosaggio dei campioni contenenti VAN è stato eseguito con il metodo VANC Flex[®] (Siemens Healthcare Diagnostics, Frimley, Camberley, UK), basato sulla tecnica di immunoinibizione turbidimetrica (PETINIA: Particle-Enhanced Turbidimetric Inhibition Immunoassay). La sensibilità di tale metodo è di 0,8 mg/L, la sua precisione inter-serie è di $\text{CV} \leq 4,0\%$ (testata su 2 livelli), mentre la precisione intra-serie è di $\text{CV} \leq 3,0\%$ (testata su 2 livelli), con un intervallo di misura di 0,8-50,0 mg/L. Il dosaggio dei campioni contenenti TEC è stato eseguito con il metodo INNOFLUOR[®] TEICOPLANIN ASSAY SYTEM (Seradyn, Indianapolis, IN, USA). Si tratta di un immunodosaggio a fluorescenza polarizzata (FPIA: Fluorescence Polarization Immunoassay) che si basa sul principio del legame competitivo. Per quanto riguarda i parametri tecnici, il

metodo ha una sensibilità di 1,7 mg/L, una precisione inter- ed intra-serie rispettivamente di $CV \leq 8,45\%$ e di $CV \leq 4,76\%$ (testate su 3 livelli), mentre l'intervallo di misura è di 1,7-100,0 mg/L. I risultati ottenuti dal dosaggio dei campioni di VAN e di TEC sono stati utilizzati per stimare la CL extracorporea di ciascun antimicrobico dovuta al processo di adsorbimento durante il trattamento di DHP. La quantità totale di ciascun farmaco adsorbita sul letto polimerico della cartuccia adsorbente ($M_{ADS_{total}}$) è stata calcolata mediante l'analisi del bilancio di massa (MBA : mass balance analysis) effettuata sulla massa libera circolante dell'antimicrobico, calcolata al tempo zero ($t=0$) e al termine dell'esperimento ($t=120$), come indicato nell'equazione 5.1.

$$M_{ADS_{total}} = MBA_{t=0} - MBA_{t=120} \quad [5.1]$$

$MBA_{t=0}$ e $MBA_{t=120}$ sono definite rispettivamente dalle equazioni 5.2 e 5.3. dove $C_{t=0}$ è la concentrazione del farmaco nella sacca prima di iniziare l'esperimento, mentre $C_{out_{t=120}}$ è la concentrazione in uscita alla cartuccia al termine dell'esperimento. Va precisato, inoltre, che $C_{out_{t=120}}$ può essere considerata rappresentativa della concentrazione in sacca, trattandosi di un sistema *in vitro* chiuso ricircolato. Analogamente, $V_{t=0}$ e $V_{t=120}$ sono i volumi della sacca rispettivamente prima e dopo l'esperimento. Il volume è stato considerato tempo dipendente per tenere conto dei campioni prelevati in arteria e in vena (2,5 ml per ciascun campione).

$$MBA_{t=0} = C_{t=0} \times V_{t=0} \quad [5.2]$$

$$MBA_{t=120} = C_{out_{t=120}} \times V_{t=120} \quad [5.3]$$

Inoltre, per valutare il trend di adsorbimento di ciascun antimicrobico, l'*MBA* sulla massa libera è stata calcolata anche per ogni intervallo di campionamento ($t=i$; dove i indica gli intervalli di 10 e 60 minuti), come indicato nelle equazioni 5.4 e 5.5.

$$M_{ADS_{t=i}} = MBA_{t=0} - MBA_{t=i} \quad [5.4]$$

$$MBA_{t=i} = Cout_{t=i} \times V_{t=i} \quad [5.5]$$

5.4. Il modello in vitro di emoperfusione diretta per la sperimentazione con gli aminoglicosidi

Lo studio delle CL extracorporee della GEN e della TOB mediante l'impiego della cartuccia adsorbente Lixelle S-35, si è basato sulla messa a punto di un sistema *in vitro* per DHP ottimizzato rispetto alla sperimentazione effettuata con i glicopeptidi. Queste modifiche, tra le quali innanzitutto il veicolo utilizzato per la dispersione degli antimicrobici, hanno avuto come obiettivo quello di mimare in maniera più fedele possibile il trattamento di HP operato *in vivo*. Tuttavia, per valutare il contributo della rimozione degli antimicrobici da parte della cartuccia Lixelle S-35 senza possibili fattori confondenti, il sistema *in vitro* non ha previsto l'impiego in serie di un emodializzatore. Come veicolo per la dispersione dei due antimicrobici è stato utilizzato del sangue umano, reso idoneo agli obiettivi della sperimentazione. Anche in questo caso, i dosaggi dei campioni raccolti sono stati effettuati con dei test immunometrici.

5.4.1. L'allestimento dei veicoli in sangue umano

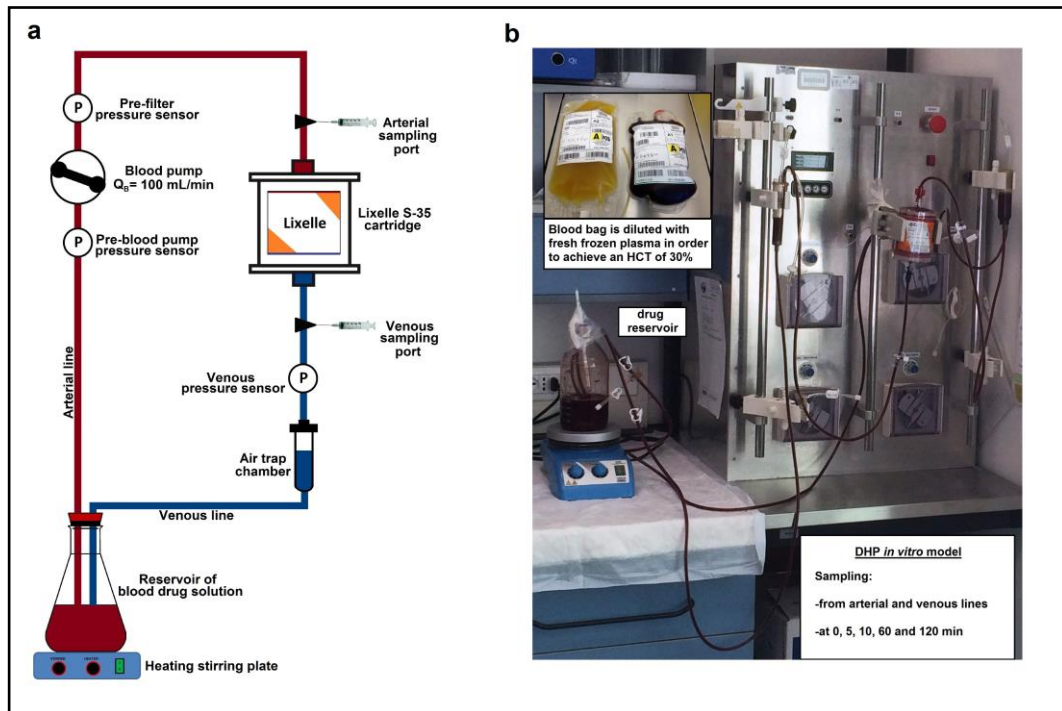
Per la sperimentazione sono state raccolte sei sacche di sangue intero umano (percentuale di ematocrito [HCT]: $42 \pm 2,37$; volume: $430,17 \pm 1,33$ ml) e sei sacche

di plasma umano (volume: $231,83 \pm 8,06$ ml). La raccolta del sangue intero e del plasma è stata effettuata dall'unità di medicina trasfusionale (ULSS 6, Ospedale San Bortolo, Vicenza, Italia) secondo la buona pratica clinica del centro e, sono stati rilasciati solamente dopo l'esito negativo dei controlli sierologici, previsti dal controllo qualità. Lo stoccaggio prima del rilascio del sangue intero è stato effettuato alla temperatura di $2-8$ °C, mentre lo stoccaggio del plasma è avvenuto a -20 °C. Quest'ultimo, plasma fresco congelato, è stato poi scongelato a temperatura controllata di $34-37$ °C (bagnomaria) prima dell'utilizzo. È stato utilizzato CPDA (Citrato-Fosfato-Destrosio-Adenina) come anticoagulante per le sacche di sangue intero. Le sacche sono state raccolte da volontari sani, che non assumevano alcun medicinale, i quali hanno preventivamente prestato il loro consenso alla sperimentazione. La preparazione del veicolo per ciascuna sperimentazione è stata effettuata diluendo il sangue intero con il plasma, fino ad ottenere un HCT del 30%. La diluizione è stata eseguita per aggiunta di plasma al sangue intero, miscelando la sacca per inversione lenta e misurando il valore di HCT raggiunto con un sistema di emogas-analisi (RAPIDPoint® 500, Siemens Healthcare, Milano, Italia) ed eventualmente correggendo la diluizione sino al valore desiderato. Questo valore di HCT è stato ricercato e ottenuto, allo scopo di avere delle ottimali caratteristiche reologiche del veicolo sangue, idonee alla circolazione extracorporea in corso della sperimentazione¹¹⁹. Una volta ottenuto il veicolo, sono stati diluiti nel sangue gli antimicrobici, utilizzando come soluzione madre le soluzioni iniettabili delle forme farmaceutiche: GENTAMICINA B. BRAUN 1 mg/ml soluzione per infusione (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germania), TOBRAMICINA IBI 100 mg/2 ml soluzione iniettabile (Istituto Biochimico Italiano Giovanni Lorenzini spa, Aprilia, Italia), rispettivamente per la GEN e per la TOB. Sono stati allestiti tre veicoli per la circolazione extracorporea con la GEN (HCT: $30,33 \pm 1,53$; $677,77 \pm 9,29$ ml) e tre per la TOB (HCT: $29,33 \pm 1,15$; $655,33 \pm 4,51$ ml). Ciascun veicolo è stato preparato alla concentrazione di picco dell'antimicrobico e, più precisamente, di $12,80 \pm 1,60$ mg/L per la GEN e di $11,30 \pm 0,30$ mg/L per la TOB.

5.4.2. Il circuito in vitro per l'emoperfusione e il campionamento

Il modello *in vitro* per la circolazione extracorporea è stato implementato sempre sul prototipo Bellco. Anche in questo caso, la DHP ha previsto un circuito chiuso con la cartuccia adsorbente Lixelle S-35 (Figura 5.7). A differenza della sperimentazione con i glicopeptidi, il veicolo contenente l'antimicrobico (GEN oppure TOB) è stato posto in un contenitore chiuso, con funzione di riserva del veicolo stesso.

Figura 5.7. Configurazione del modello *in vitro* per l'emoperfusione diretta modificato.



Legenda. In a: lo schema del circuito e i suoi componenti; in b: il modello in vitro utilizzato durante la sperimentazione.

All'interno del contenitore, la linea arteriosa pescava il sangue, mentre la linea venosa lo restituiva dopo la circolazione lungo il circuito e, quindi, dopo il passaggio attraverso la cartuccia Lixelle S-35. Inoltre, il veicolo è stato posto sotto agitazione durante tutta la sperimentazione, e mantenuto ad una temperatura costante di 37 °C. La pompa sangue per circolazione extracorporea, che muoveva il veicolo contenente l'antimicrobico all'interno del circuito, è stata impostata alla

velocità di 100 ml/min (Q_B). Per il prelievo dei campioni, durante la sperimentazione, sono stati utilizzati dei rubinetti a tre vie inseriti lungo le linee arteriosa e venosa, come nel modello di DHP precedentemente descritto per i glicopeptidi. Contrariamente alla sperimentazione con la VAN e la TEC, non è stato possibile utilizzare la pompa-siringa multicanale, a causa dell'elevata emolisi. Quest'ultima non ha reso possibile il dosaggio dei campioni con i metodi utilizzati. Pertanto, il prelievo dei campioni è stato effettuato manualmente, ma sempre lentamente e simultaneamente. Prima di ogni esperimento, è stato eseguito il priming del circuito con soluzione fisiologica eparinata, come da scheda tecnica del dispositivo Lixelle. Alla fine del priming, la soluzione eparinata è stata eliminata dal circuito. Ogni simulazione di trattamento di DHP ha avuto durata di 120 minuti. I campioni del veicolo circolante contenenti l'antimicrobico sono stati raccolti a 0 (baseline sulla riserva del veicolo), 5, 10, 60 e 120 minuti, dall'inizio dell'esperimento, dalla linea arteriosa ($C_{p_{in}}$) e dalla linea venosa ($C_{p_{out}}$). I campioni di GEN e di TOB sono stati centrifugati a 3500 giri per 10 minuti, e i plasmi stoccati a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ sino al giorno dell'analisi.

5.4.3. Il dosaggio dei campioni e l'analisi dei dati

La tecnica di immunoinibizione turbidimetrica (PETINIA: Particle-Enhanced Turbidimetric Inhibition Immunoassay) è stata utilizzata sia per il dosaggio dei campioni contenenti GEN, sia per il dosaggio dei campioni contenenti TOB. GENT Flex[®] e TOBR Flex[®] sono rispettivamente i metodi utilizzati per la GEN e la TOB (Siemens Healthcare Diagnostics, Frimley, Camberley, UK). Le prestazioni analitiche del metodo GENT Flex[®] sono: una sensibilità pari a 0,2 mg/L, la precisione inter- e intra-serie rispettivamente di $CV \leq 4,0\%$ e di $CV \leq 3,0\%$ (testata su 3 livelli), mentre l'intervallo di misura è di 0,2-12 mg/L. Il metodo TOBR Flex[®] invece presenta una sensibilità di 0,3 mg/L, una precisione inter-serie di $CV \leq 6,0\%$ e intra-serie di $CV \leq 5,0\%$, il suo intervallo di misura è di 0,3-12 mg/L. I risultati ottenuti dal dosaggio dei campioni di GEN e di TOB sono stati utilizzati per stimare il trend di adsorbimento (ADS_{trend}) di ciascun antimicrobico durante la simulazione di DHP, ovvero la loro CL extracorporea. È

stato inoltre definito il profilo cinetico di adsorbimento e di rilascio di ciascun farmaco mediante l'analisi del bilancio di massa (*MBA*), per ogni intervallo di campionamento. L'*ADS_{trend}* sul polimero di cellulosa modificata contenuta nel dispositivo Lixelle S-35 è stato calcolato mediante il rapporto tra le concentrazioni plasmatiche dell'antimicrobico in uscita (*C_{pout}*) e in entrata (*C_{p_{in}}*) alla cartuccia, per ogni intervallo di campionamento (equazione 5.6).

$$ADS_{trend} = \frac{C_{pout}}{C_{pin}} \quad [5.6]$$

La massa libera totale (*MBA*) di ciascun antimicrobico introdotto all'interno del sistema prima di iniziare l'esperimento ($t=0$: al tempo zero) è stata calcolata come indicato nell'equazione 5.7.

$$MBA_{t=0} = Cp \times Vp_{t=0} \quad [5.7]$$

C_p è la concentrazione della GEN o della TOB nel contenitore che funge da riserva del veicolo prima di iniziare il trattamento DHP; mentre, *V_{p_{t=0}}* è la frazione totale di plasma in volume del veicolo sangue, utilizzato per ogni esperimento. È stata considerata solamente la frazione plasmatica nel calcolo dell'*MBA*, poiché i test immunometrici utilizzati misurano gli aminoglicosidi nella matrice plasma, dove gli antimicrobici si distribuiscono. *V_{p_{t=0}}* è stato calcolato considerando il volume totale di sangue utilizzato, per ciascun esperimento, al tempo zero (*V_{b_{t=0}}*) e il suo HCT (equazione 5.8).

$$Vp_{t=0} = Vb_{t=0} \times \left(\frac{100 - \%HCT}{100} \right) \quad [5.8]$$

La massa libera (non adsorbita sul letto polimerico), durante il trattamento di DHP, è stata calcolata per ogni intervallo di campionamento ($t=i$; dove i indica gli intervalli di 5, 10, 60 e 120 minuti), come indicato nell'equazione 5.9.

$$MBA_{t=i} = Cp_{out\ t=i} \times (Vp_{t=0} - Vp_{samples}) \quad [5.9]$$

$Vp_{samples}$ è il volume di plasma dei campioni prelevati dalla linea arteriosa e dalla linea venosa durante l'esperimento. Più precisamente, l'equazione 5.9 considera il volume del veicolo, nel contenitore che funge da riserva, come tempo dipendente a causa dei campioni che sono stati prelevati durante il trattamento DHP. $Vp_{samples}$ è stato calcolato tenendo conto della percentuale di HCT del veicolo utilizzato per ciascun esperimento, come indicato nell'equazione 5.8. La massa adsorbita di ciascun antimicrobico ($M_{ADS_{t=i}}$; dove i indica gli intervalli di 5, 10, 60 e 120 minuti) è stata stimata per differenza tra la massa libera totale di GEN o TOB introdotta all'interno del sistema prima di iniziare l'esperimento ($MBA_{t=0}$), e la massa libera ad ogni specifico intervallo di campionamento ($MBA_{t=i}$), come mostra l'equazione 5.10.

$$M_{ADS_{t=i}} = MBA_{t=0} - MBA_{t=i} \quad [5.10]$$

Il profilo cinetico di adsorbimento e di rilascio di ciascun antimicrobico ($KTC_{profile}$) è stato calcolato mediante il rapporto tra la massa libera ($MBA_{t=i}$) e la massa adsorbita ($M_{ADS_{t=i}}$) per ogni intervallo di campionamento (equazione 5.11).

$$KTC_{profile} = \frac{M_{ADS_{t=i}}}{MBA_{t=i}} \quad [5.11]$$

La percentuale di adsorbimento ($\%ADS_{rate}$) della GEN e della TOB durante l'esperimento è stata calcolata come indicato nell'equazione 5.12.

$$\%ADS_{rate} = \frac{M_{ADS_{t=i}}}{MBA_{t=0}} \times 100 \quad [5.12]$$

5.5. Lo screening test per la valutazione del legame competitivo tra teicoplanina e β 2-microglobulina sul polimero di cellulosa modificata

Sulla base dei risultati ottenuti nella precedente sperimentazione con i glicopeptidi, si è optato di valutare la competizione nel processo di adsorbimento tra la TEC e la β 2-MG sul polimero di cellulosa modificata contenuto nella cartuccia Lixelle. Infatti, nel precedente studio con i glicopeptidi con il modello *in vitro* di circolazione extracorporea (DHP), è stata osservata un'elevata rimozione della TEC durante i trattamenti sperimentali. Questo elevato adsorbimento della TEC, oltre ad avere come risultato l'inefficacia del trattamento farmacologico, potrebbe causare interferenza nell'efficacia del dispositivo Lixelle S-35 qualora vi fosse competizione con la β 2-MG e quest'ultima non fosse adsorbita. Per valutare la competizione nel processo di adsorbimento tra TEC e β 2-MG sul polimero, è stato sviluppato uno screening test, il quale ha previsto una batteria di esperimenti sia in soluzione salina (NaCl 0,9% p/v) sia in plasma, utilizzando la sola resina contenuta nel dispositivo medico. Più precisamente, gli esperimenti hanno valutato l'adsorbimento della TEC in salina, l'adsorbimento della TEC in plasma, l'adsorbimento della β 2-MG in plasma e il modello di adsorbimento competitivo tra i due analiti (TEC e β 2-MG) in plasma. Di conseguenza, si può comprendere come il test messo a punto ha permesso di valutare anche il ruolo del legame farmaco-proteico della TEC in relazione al processo di adsorbimento. Quest'ultimo aspetto è stato un limite della sperimentazione con i glicopeptidi, in cui il veicolo utilizzato è stato la sola soluzione di NaCl 0,9% p/v. Il dosaggio dei campioni contenenti β 2-MG è stato effettuato con un test immunometrico, mentre i campioni contenenti TEC sono stati dosati per via cromatografica, mediante un

sistema HPLC (High Performance Liquid Chromatography) accoppiato ad un rivelatore UV-Vis. In questo caso, è stata dosata anche l'albumina (Alb) mediante un test colorimetrico.

5.5.1. L'allestimento dei veicoli e della soluzione di β 2-microglobulina

Per la sperimentazione sono stati preparati tre veicoli in soluzione NaCl 0,9% p/v e nove veicoli in plasma umano del volume di 210 ml ciascuno. Tutti i veicoli contenenti TEC sono stati allestiti alla concentrazione di valle del farmaco. La concentrazione di valle della TEC è stata scelta per avere una quantità di massa dell'antimicrobico proporzionale alla quantità di polimero impiegato nel test (si veda paragrafo 5.5.2). I veicoli contenenti β 2-MG sono stati preparati ad una concentrazione della proteina superiore a 10 mg/L, in modo da riprodurre delle concentrazioni patologiche tipiche di β 2-MG di un paziente affetto da DRA. Per la sperimentazione sono state raccolte e gestite nove sacche di plasma umano (volume di $232 \pm 5,96$ ml; Alb di $3,81 \pm 0,49$ g/dL), con le medesime modalità descritte nel paragrafo 5.4.1. Analogamente, è stata utilizzata una sacca di soluzione NaCl 0,9% p/v per infusione parenterale del volume di 2000 ml (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germania). Per l'allestimento dei veicoli contenenti la β 2-MG si è reso necessario preparare una soluzione concentrata della proteina da diluire nel plasma (si veda di seguito), ed è stato corretto il titolo dell'albumina plasmatica con dell'ALBITAL 200 g/l soluzione per infusione (Kedrion spa, Barga, Italia), in modo da raggiungere una concentrazione di 3 g/dL⁸⁸. Più precisamente, sono stati preparati i seguenti veicoli a concentrazione nota degli analiti (TEC o β 2-MG):

- tre veicoli in soluzione salina contenenti TEC in concentrazione di $25,26 \pm 1,87$ mg/L;
- tre veicoli in plasma umano (Alb: $3,44 \pm 0,14$ g/dL) contenenti TEC in concentrazione di $21,06 \pm 2,58$ mg/L;

- tre veicoli in plasma umano (Alb: $3,14 \pm 0,11$ g/dL) contenenti $\beta 2$ -MG in concentrazione di $14,38 \pm 0,30$ mg/L;
- tre veicoli in plasma umano (Alb: $3,01 \pm 0,05$ g/dL) contenenti TEC e $\beta 2$ -MG, rispettivamente in concentrazione di $26,25 \pm 2,66$ mg/L e di $14,09 \pm 0,65$ mg/L.

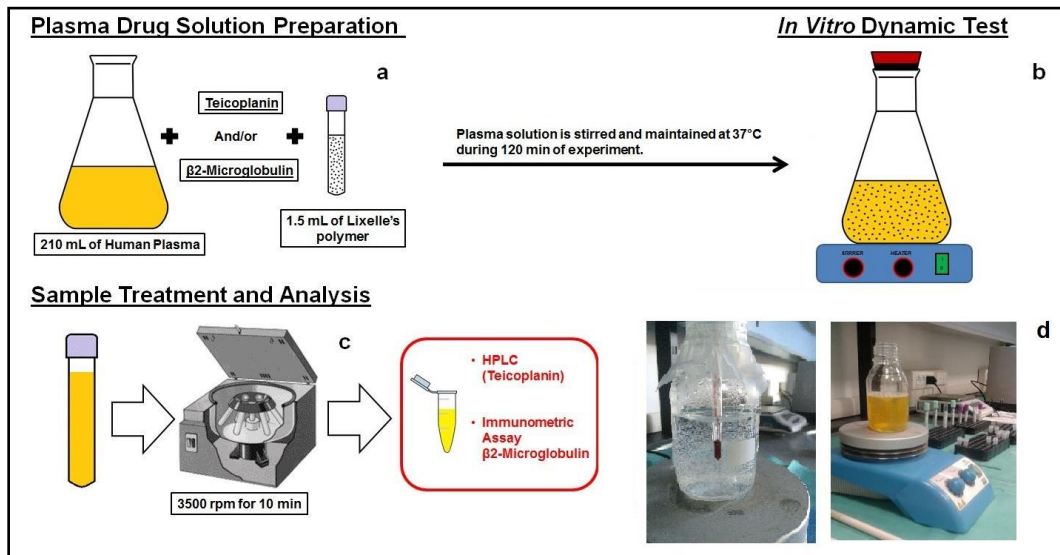
La soluzione concentrata di $\beta 2$ -MG è stata ottenuta mediante concentrazione dell'effluente di un trattamento extracorporeo *in vivo*. Per la raccolta dell'effluente è stato arruolato un paziente che ha dato il proprio consenso alla sperimentazione. Il paziente arruolato era in trattamento online HDF con una concentrazione plasmatica di $\beta 2$ -MG pari a 20,55 mg/L (il dosaggio della $\beta 2$ -MG è stato effettuato una settimana precedente alla raccolta dell'effluente). Sono stati raccolti 40 L di effluente durante un singolo trattamento. Questo effluente è stato successivamente concentrato mediante un trattamento di HF lenta di 7 ore, utilizzando un filtro low-flux in polisulfone (FX10, Fresenius Kabi, Bad Hamburg, Germania). Il trattamento prevedeva un Q_B di 300 ml/min, mentre il Q_{UF} (flusso ultrafiltrato) è stato mantenuto a 100 ml/min per le prime cinque ore e poi portato a 50 ml/min per le successive due ore. Il volume di effluente è stato ridotto da 40 L a 4 L: la concentrazione iniziale di $\beta 2$ -MG è salita da 1,81 mg/L a 20,90 mg/L. La soluzione di $\beta 2$ -MG è stata stoccata a 2-8 °C prima della sperimentazione.

5.5.2. Il disegno dello studio in vitro

Per quanto riguarda il disegno dello studio *in vitro*, lo screening test ha previsto quattro fasi distinte. Nella prima fase, sono stati utilizzati i tre veicoli contenenti TEC in soluzione salina, allo scopo di valutare l'interazione farmaco-polimero. In questo modo, si è voluto confermare quanto osservato nella sperimentazione con i glicopeptidi durante il trattamento di DHP con Lixelle S-35. Nella seconda fase, sono stati utilizzati i tre veicoli contenenti TEC in plasma, per indagare sul ruolo del legame proteico dell'antibiotico nel processo di adsorbimento sul polimero. In altri termini, si è voluto superare il limite della

precedente sperimentazione, per capire se la TEC ha maggiore affinità per la cellulosa modificata (contenuta in Lixelle) piuttosto che l'albumina, alla quale si lega per il 90%. Nella terza fase, sono stati utilizzati i tre veicoli di β 2-MG in plasma per valutare se nel test la proteina si lega al polimero come indicato in letteratura, ossia se ogni ml di cellulosa modificata è in grado di adsorbire 1 mg β 2-MG. Nella quarta ed ultima fase prevista dallo screening test, si è valutata la presenza o meno di competizione tra β 2-MG e TEC nel processo di adsorbimento sul polimero di cellulosa modificata. In questa fase, sono stati impiegati i tre veicoli contenenti sia la TEC che la β 2-MG. In ciascun test è stato messo a contatto il polimero, in sospensione nel veicolo, con gli analiti (TEC e/o β 2-MG) disciolti nel veicolo stesso e, altresì, è stata osservata la diminuzione della concentrazione dei soluti nel tempo ed il loro adsorbimento sul polimero (**Figura 5.8**).

Figura 5.8. Lo Screening test per la valutazione del legame competitivo tra teicoplanina e β 2-microglobulina.



Legenda. In a: la preparazione del plasma per il test; in b: le condizioni e i parametri dello screening test; in c: il trattamento dei campioni raccolti e il loro dosaggio; in d: il polimero in sospensione in soluzione salina durante l'esperimento e il plasma prima di portare in sospensione il polimero.

Il veicolo di 210 ml (soluzione salina o plasma) è stato posto in un contenitore sotto agitazione alla temperatura di 37 °C. Il test ha previsto un tempo di contatto di 120 minuti. La quantità di polimero posta in sospensione è stata di 1,5 ml, e il volume è stato calcolato in modo tale che il polimero fosse il reagente limitante in termini di massa. Il tempo del test è stato calcolato da quando il polimero è stato introdotto nel veicolo, sotto agitazione e riscaldamento. A questo punto, si sono prelevati i campioni (2 ml per prelievo). Il campionamento è stato effettuato a 0, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 20, 30, 60 e 120 minuti, utilizzando siringhe con ago da 30 Gauge, evitando di aspirare il polimero in sospensione. Appena effettuato il prelievo, ciascun campione è stato centrifugato (3500 giri, 10 minuti), per eliminare eventuali residui di polimero, e stoccato a -80 °C sino al giorno dell'analisi.

5.5.3. Il dosaggio dei campioni e l'analisi dei dati

Il dosaggio dei campioni contenenti TEC è stato effettuato mediante metodo HPLC-UV con separazione in condizioni isocratiche, in fase inversa. Il sistema cromatografico consiste in una pompa Jasco 880-PU e rivelatore UV-Vis Jasco 875-UV (Jasco, Easton, MD, USA), equipaggiato con un autocampionatore Bio-Rad AS-100 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) e software Varian Star Chromatography Workstation versione 6.30 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). La separazione è stata effettuata con la colonna analitica Kinetex RP18 (4,6 mm x 250 mm, granulometria 5 µm) munita di pre-colonna Kinetex, SecurityGuard (4,6 mm x 2,1 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA). Entrambe le colonne non sono state termostatate durante la separazione. La fase mobile isocratica era costituita da acetonitrile-acido trifluoroacetico 0,1% v/v, pH 1,8 (25:75 v/v); la fase mobile veniva filtrata a bassa pressione con membrana in nylon da 0,2 µm (Millipore, Bedford, MA, USA), prima dell'uso. Il flusso della fase mobile era di 1,0 ml/min e, la durata della corsa cromatografica di 30 minuti. La misura dell'assorbanza è stata effettuata a 220 nm. La preparazione del campione ha previsto un'estrazione liquido-liquido dal plasma della TEC (applicata anche per i campioni in soluzione salina in modo da avere dei dati

comparabili). L'estrazione ha previsto come prima fase l'aggiunta a 150 μL di campione di 360 μL di metanolo 80% v/v e una miscelazione con vortex per 30 secondi. Successivamente, il campione è stato centrifugato a 13000 giri per 10 minuti. Nella seconda fase, è stato prelevato il surnatante deproteinizzato (250 μL) e trasferito in una seconda provetta per centrifugarlo nuovamente a 13000 giri per 5 minuti. Nella terza ed ultima fase, 200 μL di surnatante prelevato è stato trasferito nella vial per l'analisi. Il volume iniettato in colonna è stato di 50 μL , e l'area del picco della TEC A2-2 ($t_R=12$ minuti) è stata utilizzata per determinare la concentrazione di TEC nel campione. Per quanto riguarda le prestazioni analitiche del metodo, la linearità testata è di 5,00 -100,00 mg/L con un R^2 di 0,9968 e un limite di quantificazione di 5,00 mg/L. La precisione inter- ed intra-serie è rispettivamente di $CV \leq 4,52\%$ e di $CV \leq 2,01\%$, entrambi testati su 3 livelli di concentrazione. La resa media dell'estrazione è di 91,06%, all'interno dell'intervallo di linearità. La β_2 -MG presente nei campioni è stata dosata con il metodo LIAISON β_2 -Microglobulin (DianSorin spa, Saluggia, Italia). Il metodo per la determinazione quantitativa della β_2 -MG si basa su un immunodosaggio competitivo in chemiluminescenza (ICMA: Immuno-Chemiluminometric Assay). Dal punto di vista analitico, la sensibilità del metodo è di 0,08 mg/L, mentre la sua precisione inter- ed intra-serie è rispettivamente di $CV \leq 5,9\%$ (testata su 4 livelli) e di $CV \leq 3,9\%$ (testata su 4 livelli). L'intervallo di misura è di 0,08-40,0 mg/L. Il dosaggio dell'Alb è stato eseguito con il metodo ALB Flex[®] (Siemens Healthcare Diagnostics, Frimley, Camberley, UK). Il dosaggio sfrutta il metodo colorimetrico del violetto di bromocresolo (BCP) che si lega all'Alb. La quantità di complesso Alb-BCP che si forma nella reazione è proporzionale alla quantità di Alb presente nel campione. Le prestazioni analitiche del metodo ALB Flex[®] sono: una sensibilità pari a 0,0 g/dL, la precisione inter- e intra-serie rispettivamente di $CV \leq 3,2\%$ e di $CV \leq 2,5\%$ (testata su 2 livelli), mentre l'intervallo di misura è di 0,0-8,0 g/dL. I risultati ottenuti dal dosaggio dei campioni contenenti TEC e/o β_2 -MG sono stati utilizzati per stimare l'adsorbimento nel tempo dei due analiti sul polimero di cellulosa modificata introdotto nel veicolo, mediante l'analisi del bilancio di massa (*MBA*), per ogni intervallo di campionamento. Prima di iniziare il test sperimentale ($t=0$: al tempo zero) la massa libera totale (*MBA*)

dell'antimicrobico o della β 2-MG, presente nel veicolo (soluzione salina o plasma), è stata calcolata come indicato nell'equazione 5.13.

$$MBA_{t=0} = C_{t=0} \times V_{t=0} \quad [5.13]$$

$C_{t=0}$ è la concentrazione della TEC o della β 2-MG nel veicolo prima di iniziare il test, ossia prima di portare in sospensione il polimero. Analogamente, $V_{t=0}$ è il volume totale del veicolo (soluzione salina o plasma) utilizzato per ogni esperimento (210 ml come precedentemente menzionato). La massa libera degli analiti durante il test (non adsorbita sul polimero in sospensione) è stata calcolata per ogni intervallo di campionamento ($t=i$; dove i indica gli intervalli di 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 20, 30, 60 e 120 minuti), come mostra l'equazione 5.14.

$$MBA_{t=i} = C_{t=i} \times (V_{t=0} - V_{samples}) \quad [5.14]$$

$V_{samples}$ è il volume di veicolo dei campioni prelevati durante l'esperimento. L'equazione 5.14 considera il volume del veicolo utilizzato nel test sperimentale come tempo dipendente. Infatti, il volume del veicolo nel quale è solubilizzata la TEC o/e β 2-MG diminuisce nel tempo per effetto del campionamento. La massa di ciascun analita adsorbito sul polimero in sospensione ($M_{ADS_{t=i}}$; dove i indica gli intervalli di 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 20, 30, 60 e 120 minuti) è stata stimata per differenza tra la massa libera totale ($MBA_{t=0}$), in soluzione nel veicolo prima di iniziare l'esperimento e, la massa libera ad ogni specifico intervallo di campionamento ($MBA_{t=i}$), come indica l'equazione 5.15.

$$M_{ADS_{t=i}} = MBA_{t=0} - MBA_{t=i} \quad [5.15]$$

Il profilo cinetico di adsorbimento della TEC o della β 2-MG ($K_{ADS_{profile}}$) è stato calcolato mediante il rapporto tra la massa adsorbita ad ogni specifico intervallo di campionamento e, la massa libera prima di iniziare l'esperimento ($MBA_{t=i}$) secondo l'equazione 5.16.

$$K_{ADS_{profile}} = \frac{M_{ADS_{t=i}}}{MBA_{t=0}} \quad [5.16]$$

Per descrivere il profilo cinetico di adsorbimento è stato utilizzato un modello di regressione logaritmica, dove ogni intervallo di campionamento calcolato su $K_{ADS_{profile}}$ è stato posto in funzione del tempo del test sperimentale. Inoltre, per ogni fase dello screening test è stato calcolato il delta concentrazione (ΔC), per differenza tra $C_{t=0}$ dell'analita considerato (TEC o β 2-MG) e $C_{t=120}$, in accordo con l'equazione 5.17.

$$\Delta C = C_{t=0} - C_{t=120} \quad [5.17]$$

5.6. Il modello in vitro di emofiltrazione per la sperimentazione con il linezolid e la tobramicina

La sperimentazione per lo studio della CL convettiva extracorporea del LZD e della TOB, ha previsto la messa a punto di un sistema *in vitro* volto a mimare un trattamento di HF, implementato sul monitor CARPEDIEM. Il trattamento di HF, operato in fase di sperimentazione, presentava una particolare configurazione che ha permesso al veicolo contenente l'antimicrobico di circolare in un sistema chiuso. Questa particolare configurazione, descritta nel paragrafo 5.6.2, ha consentito di valutare come la CL extracorporea degli antimicrobici può essere influenzata dal processo di adsorbimento del farmaco sulla membrana, quale fenomeno indesiderato durante il trattamento convettivo. Come veicolo per la

dispersione degli antimicrobici è stata utilizzata sia della soluzione fisiologica, per valutare la pura interazione farmaco-membrana, sia del sangue umano reso idoneo agli obiettivi della sperimentazione. Il dosaggio dei campioni contenenti LZD è stato effettuato mediante un sistema HPLC accoppiato ad un rivelatore UV-Vis, mentre il dosaggio dei campioni contenenti TOB è stato effettuato con un test immunometrico.

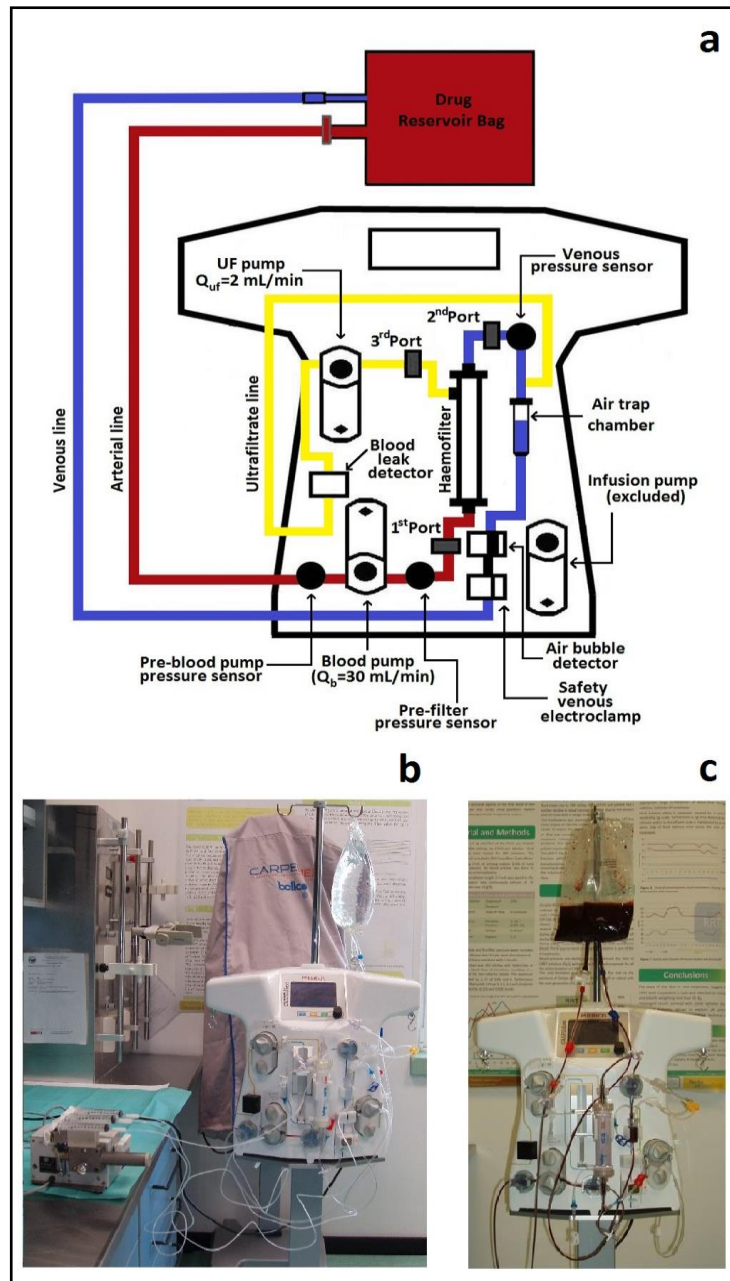
5.6.1. L'allestimento dei veicoli per la sperimentazione

Il procedimento di allestimento delle sacche in soluzione NaCl 0,9% p/v a titolo noto di ciascun antimicrobico è stato lo stesso di quello utilizzato per i glicopeptidi (si veda paragrafo 5.3.1). Sono state preparate per la sperimentazione tre sacche contenenti LZD e tre sacche contenenti TOB, del volume di 2000 ml (effettivi 2055 ml) ciascuna. Ogni sacca è stata preparata alla concentrazione di picco dell'antimicrobico: LZD $17,24 \pm 0,54$ mg/L e TOB $9,36 \pm 0,36$ mg/L. Come soluzione madre per l'allestimento delle sacche, sono state utilizzate le soluzioni iniettabili ricostituite della forme farmaceutiche: ZYVOXID 2 mg/ml soluzione per infusione (Pfizer, Latina, Italia), TOBRAMICINA IBI 100 mg/2 ml soluzione iniettabile (Istituto Biochimico Italiano Giovanni Lorenzini spa, Aprilia, Italia), rispettivamente per il LZD e per la TOB. Per la sperimentazione sono state raccolte e gestite sei sacche di sangue umano intero (HCT: $42,50 \pm 2,66$; $430,50 \pm 1,05$ ml) e sei di plasma umano ($234,50 \pm 3,94$ ml), con le medesime modalità descritte nel paragrafo 5.4.1. Come nello studio sugli aminoglicosidi e per le stesse finalità, il veicolo sangue umano è stato preparato per diluizione del sangue intero con il plasma, in modo da raggiungere un HCT del 30%. Una volta ottenuto il veicolo sangue umano, sono stati diluiti in esso gli antimicrobici utilizzando come soluzione madre le soluzioni iniettabili della forme farmaceutiche. Sono stati allestiti tre veicoli alla concentrazione di picco dell'antimicrobico per il LZD ($11,75 \pm 0,08$ mg/L; HCT: $29,67 \pm 0,58$; $552,67 \pm 7,02$ ml) e, tre veicoli per la TOB ($11,30 \pm 0,37$ mg/L; HCT: $28,33 \pm 2,31$; $509,33 \pm 37,01$ ml).

5.6.2. Il circuito in vitro per l'emofiltrazione e il campionamento

Il modello *in vitro* di HF ha previsto un circuito chiuso, dove la linea dell'ultrafiltrazione era direttamente connessa alla linea venosa, in modo tale che l'ultrafiltrato (soluzione fisiologica o acqua plasmatica) non fosse eliminato (**Figura 5.9**). In questo modo, la frazione filtrata del veicolo dell'antimicrobico ritornava, per mezzo della linea venosa, alla sacca con funzione di riserva della soluzione fisiologica o del sangue durante il trattamento. Dalla sacca, il veicolo raggiungeva nuovamente il filtro passando lungo la linea arteriosa. Si può quindi comprendere come la configurazione del modello *in vitro* di HF ha potuto garantire una concentrazione costante dell'antimicrobico senza perdite in termini di massa, fermo restando il fenomeno dell'adsorbimento del farmaco sulla membrana. Per i prelievi dei campioni, anche in questo caso, sono stati utilizzati dei rubinetti a tre vie, inseriti ad ugual distanza dal filtro nelle linee arteriosa, venosa e dell'ultrafiltrato. Va precisato che nella linea arteriosa il punto di prelievo è stato inserito dopo la pompa sangue, mentre nella linea dell'ultrafiltrato il rubinetto a tre vie è stato introdotto prima della pompa dell'ultrafiltrazione. Ciò ha consentito di avere dei campioni con concentrazioni rappresentative di ingresso al filtro (linea arteriosa) e di uscita in ultrafiltrazione. La pompa-siringa multicanale è stata utilizzata per i prelievi dei campioni quando il veicolo contenente l'antimicrobico era la soluzione NaCl 0,9% p/v. I prelievi sono stati effettuati, lentamente e simultaneamente, alla velocità di 1,25 ml/min per 2 minuti totali di prelievo, e ciò, per evitare turbolenze locali all'interno del circuito. Il campionamento, invece, è stato effettuato manualmente, ma sempre lentamente e simultaneamente, quando il veicolo contenente l'antimicrobico era sangue umano, e ciò, per evitare l'emolisi dei campioni. Prima di ogni esperimento, è stato effettuato il priming del sistema con soluzione fisiologica eparinata per 15 minuti, successivamente la soluzione è stata eliminata dal circuito. Ogni trattamento di HF *in vitro* è stato di 240 minuti. Il veicolo contenente l'antimicrobico (soluzione fisiologica o sangue umano) è stato fatto circolare all'interno del sistema con Q_B di 30 ml/min, mentre Q_{UF} è stato impostato alla velocità di 2 ml/min.

Figura 5.9. Configurazione del modello *in vitro* per l'emofiltrazione sul monitor carpediem.



Legenda. In a: lo schema del circuito, i suoi componenti e i parametri del trattamento; in b: il modello *in vitro* allestito con soluzione fisiologica; in c: il modello *in vitro* allestito con sangue.

Il campionamento dalle linee arteriosa, venosa e dell'ultrafiltrato è stato realizzato a 0, 10, 30, 60, 120 e 240 minuti, dall'inizio dell'esperimento. I campioni contenenti l'antimicrobico (LZD oppure TOB) sono stati stoccati a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, sino al

giorno dell'analisi. Prima di essere stoccati, i campioni in sangue umano sono stati centrifugati a 3500 giri per 10 minuti per ottenere il plasma.

5.6.3. Il dosaggio dei campioni e l'analisi dei dati

Il dosaggio dei campioni contenenti LZD è stato effettuato mediante un metodo HPLC-UV con separazione in condizioni isocratiche, in fase inversa. Il sistema cromatografico sul quale la metodica è stata implementata è l'Alliance 2695 (Waters, Milford, MA, USA). Il cromatografo è equipaggiato con un degasatore on-line e un sistema d'iniezione automatico con il piatto dei campioni termostato a 4 °C. Il sistema UV-Vis è un rivelatore a serie di diodi e il suo software di gestione e acquisizione dei dati è l'Empower versione 2.0. La separazione è stata effettuata con la colonna analitica, XTerra RP18 (4,6 mm x 150 mm, granulometria 3,5 µm; Waters), munita di pre-colonna XTerra RP18 (3,9 mm x 20 mm; granulometria 5 µm; Waters). Entrambe le colonne sono state termostatate durante la separazione (40 °C). La fase mobile isocratica era costituita da acetonitrile-tampone sodio fosfato, 10 mmol/L, pH 6,4 (22:78 v/v). La fase mobile è stata filtrata a bassa pressione con membrana in nylon da 0,2 µm (Millipore, Bedford, MA, USA), prima dell'uso. Il flusso della fase mobile era di 1,0 ml/min e la durata della corsa cromatografica di 12 minuti. La misura dell'assorbanza è stata effettuata a 255 nm. La preparazione del campione ha previsto un'estrazione liquido-liquido dal plasma del LZD (applicata anche per i campioni in soluzione salina per avere dei dati confrontabili con il plasma). L'estrazione ha previsto l'aggiunta a 150 µL di campione di 7,5 µL acido perclorico, una breve miscelazione con vortex e la centrifugazione del campione a 13000 giri per 10 minuti. Successivamente, si sono prelevati 130 µL di surnatante deproteinizzato, trasferito poi in una seconda provetta per essere nuovamente centrifugato a 13000 giri per 5 minuti. Infine, 100 µL di quest'ultimo surnatante sono stati trasferiti nella vial per l'analisi. Il volume di estratto iniettato in colonna è stato di 20 µL e l'area del picco è stata utilizzata per determinare la concentrazione del LZD nel campione. Per quanto riguarda le prestazioni analitiche del metodo, la linearità è di 0,05-30,00 mg/L, con un limite di

quantificazione di 0,05 mg/L. La resa dell'estrazione del LZD dal plasma è di 91,1% all'interno dell'intervallo di linearità. La precisione e l'accuratezza del metodo inter- ed intra-serie hanno mostrato entrambe un $CV \leq 3,00\%$ (le deviazioni sono state: da $-3,8\%$ a $4,9\%$ per l'inter-serie e da $-3,2\%$ a $4,7\%$ per l'intra-serie). Il dosaggio dei campioni contenenti TOB è stato effettuato con il metodo TOBR Flex[®], come per la sperimentazione con gli aminoglicosidi (si veda paragrafo 5.4.3). I risultati ottenuti dal dosaggio dei campioni di LZD e di TOB sono stati utilizzati per stimare il coefficiente di sieving (Sc), la clearance convettiva ($CL_{convective}$) e il flusso in massa convettivo ($J_{convective}$) ad ogni intervallo di campionamento per ciascun antimicrobico. Inoltre, è stato valutato il fenomeno di adsorbimento sulla membrana durante la simulazione del trattamento di HF, mediante l'analisi del bilancio di massa (MBA), la linearità dei delta per ogni intervallo di campionamento ($\Delta_{adsorption}$) tra i due veicoli di dispersione del farmaco e la percentuale di variazione della concentrazione iniziale di ciascun antimicrobico ($\% \Delta_{baseline}$) durante gli esperimenti con soluzione fisiologica e con sangue. Il Sc è stato calcolato in accordo con l'equazione 5.18.

$$Sc = \frac{2C_{uf}}{C_{in} + C_{out}} \quad [5.18]$$

C_{uf} è la concentrazione dell'antimicrobico (LZD o TOB) presente nell'ultrafiltrato, mentre C_{in} e C_{out} sono rispettivamente le concentrazioni dell'antimicrobico in entrata (linea arteriosa) e in uscita (linea venosa) al filtro. La $CL_{convective}$ di ciascun antimicrobico è stata stimata tenendo conto del Q_{UF} (si veda paragrafo 4.6.2) utilizzato durante il trattamento (equazione 5.19).

$$CL_{convective} = Sc \times Q_{UF} \quad [5.19]$$

Il $J_{convective}$ è stato calcolato considerando il Sc osservato, il flusso dell'ultrafiltrato previsto dal trattamento (Q_{UF}) e la concentrazione dell'antimicrobico ritrovata nell'ultrafiltrato (C_{uf}), come indicato nell'equazione 5.20.

$$J_{convective} = Sc \times Q_{UF} \times C_{uf} \quad [5.20]$$

La massa libera totale di ciascun antimicrobico presente nella sacca prima di iniziare l'esperimento è stata definita secondo le equazioni 5.21 e 5.22 (dove $S_{MBA_{t=0}}$ e $B_{MBA_{t=0}}$ sono rispettivamente la massa libera totale negli esperimenti in soluzione fisiologica e in sangue).

$$S_{MBA_{t=0}} = C_{S_{t=0}} \times V_{S_{t=0}} \quad [5.21]$$

$$B_{MBA_{t=0}} = C_{p_{t=0}} \times \left[V_{b_{t=0}} \times \left(\frac{100 - \%HCT}{100} \right) \right] \quad [5.22]$$

$C_{S_{t=0}}$ e $C_{p_{t=0}}$ sono le concentrazioni iniziali dell'antimicrobico prima di iniziare il trattamento, rispettivamente in soluzione salina e in plasma. Analogamente $V_{S_{t=0}}$ e $V_{b_{t=0}}$ sono i volumi iniziali, rispettivamente di soluzione salina e di sangue. Come si può notare dall'equazione 5.22, nel calcolo dell' MBA , è stata considerata solamente la frazione plasmatica, tenendo comunque conto dell'HCT del sangue allestito, e ciò, per le stesse considerazioni di cui alla sperimentazione con gli aminoglicosidi in DHP (si veda paragrafo 5.4.3). La massa libera degli antimicrobici durante il trattamento sperimentale di HF è stata calcolata per ogni intervallo di campionamento ($t=i$; dove i indica gli intervalli di 10, 30, 60, 120 e 240 minuti), considerando il volume tempo dipendente. Tale volume, infatti,

diminuiva nel corso degli esperimenti a causa del prelievo dei campioni (equazioni 5.23 e 5.24).

$$S_MBA_{t=i} = C_{s_{in_t=i}} \times (V_{S_{t=0}} - V_{S_{samples}}) \quad [5.23]$$

$$B_MBA_{t=i} = C_{p_{in_t=i}} \times \left[(V_{b_{t=0}} - V_{b_{samples}}) \times \left(\frac{100 - \%HCT}{100} \right) \right] \quad [5.24]$$

$S_MBA_{t=i}$ e $B_MBA_{t=i}$ sono le masse libere dell'antimicrobico, rispettivamente in soluzione salina e in sangue. $C_{s_{in_t=i}}$ è la concentrazione di antimicrobico in entrata al filtro al tempo i in soluzione salina, mentre $C_{p_{in_t=i}}$ è la concentrazione plasmatica in entrata al filtro al tempo i in sangue. $V_{S_{samples}}$ e $V_{b_{samples}}$ sono i volumi dei campioni prelevati nel corso dell'esperimento, rispettivamente in soluzione salina e in sangue. La massa adsorbita di ciascun antimicrobico sulla membrana, durante il trattamento sperimentale convettivo, è stata stimata per differenza tra la massa libera totale prima di iniziare l'HF ($S_MBA_{t=0}$ e $B_MBA_{t=0}$) e la massa libera ad ogni specifico intervallo di campionamento ($S_MBA_{t=i}$ e $B_MBA_{t=i}$), come indicato nelle equazioni 5.25 e 5.26.

$$SM_ADS_{t=i} = S_MBA_{t=0} - S_MBA_{t=i} \quad [5.25]$$

$$BM_ADS_{t=i} = B_MBA_{t=0} - B_MBA_{t=i} \quad [5.26]$$

$SM_ADS_{t=i}$ e $BM_ADS_{t=i}$ sono le masse di antimicrobico adsorbite negli esperimenti rispettivamente in soluzione salina e in sangue, al tempo i di campionamento. Il $\Delta adsorption$ tra i due veicoli di dispersione degli antimicrobici

(soluzione salina e sangue), al fine di correlare il profilo cinetico di adsorbimento-rilascio del farmaco dalla membrana, è stato calcolato come indicato nell'equazione 5.27 e descritto con un modello di regressione lineare dove ogni intervallo di campionamento, calcolato su $\Delta adsorption$, è stato posto in funzione del tempo sperimentale.

$$\Delta Adsorption = SM_ADS_{t=i} - BM_ADS_{t=i} \quad [5.27]$$

La percentuale di variazione della concentrazione iniziale dell'antimicrobico presente nella sacca, prima di iniziare l'esperimento ($\% \Delta C_{baseline}$), è stata calcolata in accordo con l'equazione 5.28.

$$\% \Delta C_{baseline} = \frac{C_{in_t=i}}{C_{baseline}} \times 100 \quad [5.28]$$

$C_{baseline}$ è la concentrazione di farmaco nella sacca (soluzione salina o sangue), immediatamente prima di iniziare il trattamento di HF, mentre $C_{in_t=i}$ è la concentrazione dell'antimicrobico in entrata al filtro ad uno specifico intervallo di campionamento i dell'esperimento fatto in soluzione salina o in sangue.

CAPITOLO 6

RISULTATI

6.1. La rimozione dei glicopeptidi durante l'emoperfusione diretta

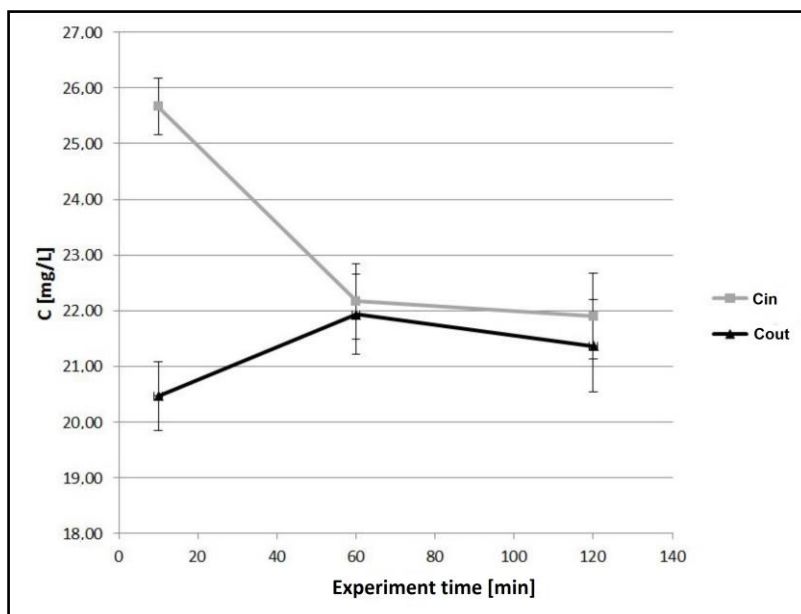
Durante i primi 10 minuti di trattamento, la concentrazione iniziale della VAN presente nella sacca (baseline: $C_{t=0}$) è diminuita in maniera considerevole (**Tabella 6.1**), indicando un repentino adsorbimento del farmaco sul letto polimerico della cartuccia. Tuttavia, il plateau del processo di adsorbimento è stato raggiunto dopo 60 minuti di esperimento, poiché, come si può osservare, le concentrazioni della VAN in arteria (C_{in}) e in vena (C_{out}) erano pressoché identiche (**Figura 6.1**).

Tabella 6.1. Concentrazioni della vancomicina.

Time [min]	Vancomycin (mg/L)	
	Cin	Cout
Baseline [0]	46.08±0.81	–
Time [10]	25.67±0.51	20.47±0.62
Time [60]	22.17±0.68	21.93±0.72
Time [120]	21.90±0.77	21.37±0.83

Legenda. Baseline è la concentrazione di vancomicina nella sacca prima di cominciare la sperimentazione; Time [min] indica ciascun intervallo di campionamento (0, 10, 60 e 120 minuti); Cin è la concentrazione di vancomicina in entrata alla cartuccia (linea arteriosa); Cout è la concentrazione di vancomicina in uscita dalla cartuccia (linea venosa).

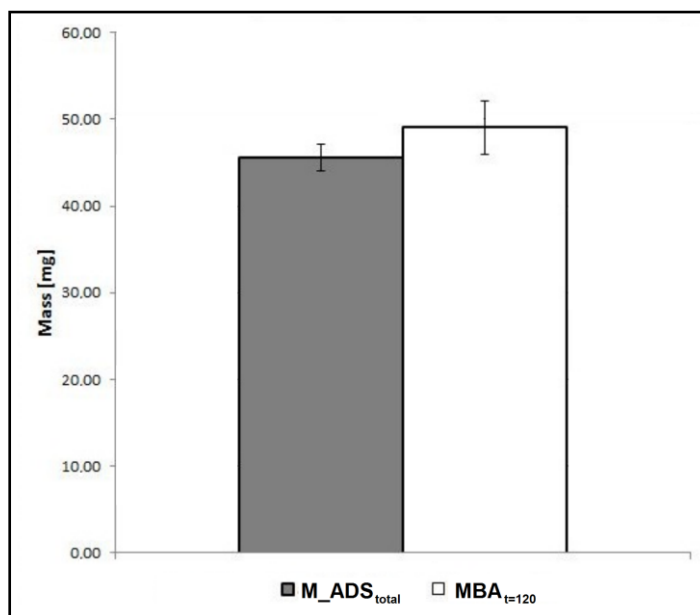
Figura 6.1. Andamento delle concentrazioni di vancomicina durante l'emoperfusione diretta.



Legenda. Cin è la concentrazione di vancomicina nella linea arteriosa (in entrata alla cartuccia); Cout è la concentrazione di vancomicina nella linea venosa (in uscita dalla cartuccia).

Dall'*MBA* si è potuto notare come la massa di VAN libera (non adsorbita) al termine del trattamento ($MBA_{t=120}$: $49,06 \pm 1,47$ mg) fosse circa metà di quella iniziale introdotta nel sistema ($MBA_{t=0}$: $94,74 \pm 1,63$ mg). Ciò suggerisce che $45,68 \pm 2,26$ mg di VAN ($M_{ADS_{total}}$) sono stati adsorbiti dalla cartuccia Lixelle S-35 (**Figura 6.2**). In altri termini, il dispositivo è stato in grado di adsorbire $0,13 \pm 0,01$ mg di VAN per ml di polimero in esso contenuto. Nei trattamenti effettuati per la TEC, la capacità della cartuccia Lixelle S-35 di adsorbire questo antimicrobico è stata maggiore rispetto alla VAN. Infatti, la concentrazione iniziale della TEC presente nella sacca è diminuita da $74,79 \pm 1,24$ mg/L (baseline: $C_{t=0}$) a $11,98 \pm 0,78$ mg/L ($C_{t=10}$) nei primi 10 minuti di esperimento. Successivamente, le concentrazioni della TEC in arteria (Cin) e in vena (Cout) erano al disotto di 1,7 mg/L, che è il valore di sensibilità del test immunometrico utilizzato (**Tabella 6.2**).

Figura 6.2. Bilancio di massa della vancomicina al termine dell'emoperfusione diretta.



Legenda. $M_{ADS_{total}}$ è la massa adsorbita sul polimero di vancomicina presente nel sistema dopo 120 minuti; $MBA_{t=120}$ è la massa libera di vancomicina presente nel sistema dopo 120 minuti.

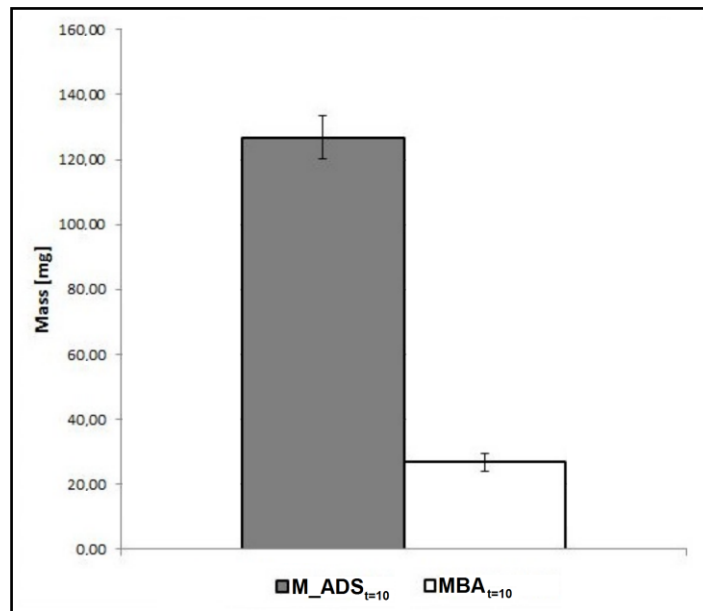
Tabella 6.2. Concentrazioni della teicoplanina.

Time [min]	Teicoplanin (mg/L)	
	Cin	Cout
Baseline [0]	74.79±1.24	—
Time [10]	11.98±0.78	LOD
Time [60]	LOD	LOD
Time [120]	LOD	LOD

Legenda. Baseline è la concentrazione di teicoplanina nella sacca prima di cominciare la sperimentazione; Time [min] indica ciascun intervallo di campionamento (0, 10, 60 e 120 minuti); Cin è la concentrazione di teicoplanina in entrata alla cartuccia (linea arteriosa); Cout è la concentrazione di teicoplanina in uscita dalla cartuccia (linea venosa); LOD è low limit of detection ossia il valore di concentrazione al disotto della sensibilità del metodo immunometrico utilizzato.

In altri termini, non è stata rilevata TEC nei campioni dopo 10 minuti di trattamento in uscita dalla cartuccia ($C_{out,t=10}$). La MBA effettuata sui 10 minuti, considerando la massa in entrata (**Figura 6.3**), mostra che la massa libera di TEC ($MBA_{t=10}$) era solamente di $26,83 \pm 1,77$ mg, a fronte di una massa di antimicrobico iniziale introdotta nel sistema di $153,59 \pm 2,55$ mg ($MBA_{t=0}$). Dopo i primi 10 minuti di DHP, dunque, sono stati adsorbiti sul letto polimerico ben $126,86 \pm 0,91$ ($M_{ADS_{t=10}}$) mg di TEC.

Figura 6.3. Bilancio di massa della teicoplanina a dieci minuti dall'inizio dell'emoperfusione diretta.



Legenda. $M_{ADS_{t=10}}$ è la massa adsorbita sul polimero di teicoplanina presente nel sistema dopo 10 minuti; $MBA_{t=10}$ è la massa libera di teicoplanina presente nel sistema dopo 10 minuti.

Sebbene non sia possibile indicare la capacità di adsorbimento assoluto del dispositivo, nei primi 10 minuti la cartuccia Lixelle S-35 è stata in grado di adsorbire $0,36 \pm 0,01$ mg di TEC per ml di polimero in essa contenuto.

6.2. La rimozione degli aminoglicosidi durante l'emoperfusione diretta

In entrambi gli esperimenti, sia con la GEN che con la TOB, la concentrazione plasmatica iniziale di baseline dell'antimicrobico è diminuita in maniera significativa durante i primi 5 minuti di trattamento di DHP (**Tabella 6.3**). Ciò significa che vi è stato un repentino processo di adsorbimento del farmaco sul letto polimerico della cartuccia Lixelle S-35.

Tabella 6.3. Concentrazioni della gentamicina e della tobramicina.

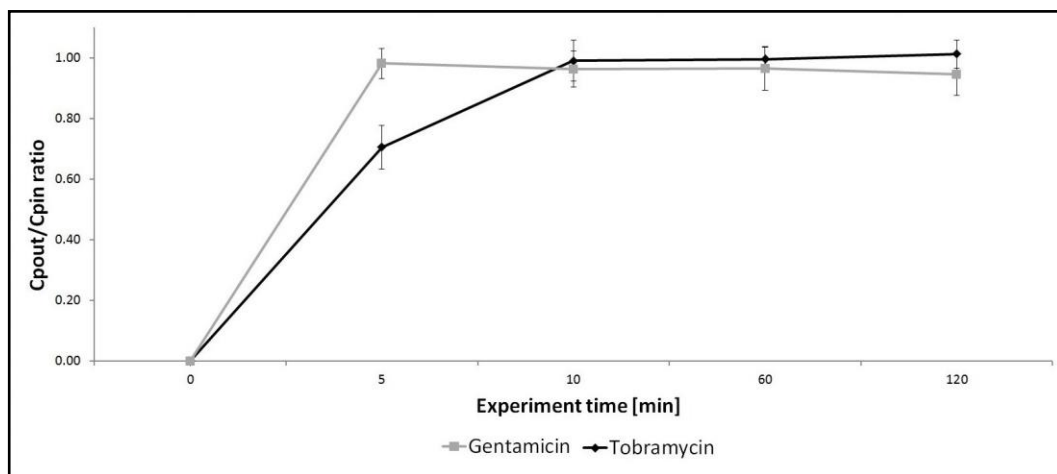
Time [min]	Gentamicin (mg/L)		Tobramycin (mg/L)	
	$C_{p_{in}}$	$C_{p_{out}}$	$C_{p_{in}}$	$C_{p_{out}}$
Baseline [0]	12.80±1.60	–	11.00±0.30	–
Time [5]	7.10±0.17	6.97±0.25	8.33±0.31	5.87±0.45
Time [10]	7.13±0.06	6.87±0.31	6.40±0.10	6.33±0.32
Time [60]	7.33±0.21	7.07±0.31	7.07±0.15	7.03±0.06
Time [120]	7.20±0.09	6.80±0.10	7.00±0.10	7.08±0.14

Legenda. Baseline è la concentrazione dell'antimicrobico presente nel contenitore che funge da riserva prima di cominciare la sperimentazione; Time [min] indica ciascun intervallo di campionamento (0, 5, 10, 60 e 120 minuti); $C_{p_{in}}$ è la concentrazione plasmatica dell'antimicrobico in entrata alla cartuccia (linea arteriosa); $C_{p_{out}}$ è la concentrazione plasmatica dell'antimicrobico in uscita dalla cartuccia (linea venosa).

Negli esperimenti con la GEN, le concentrazioni plasmatiche osservate nella linea arteriosa ($C_{p_{in}}$) e nella linea venosa ($C_{p_{out}}$) erano simili già dopo 5 minuti di DHP, e si sono mantenute tali per tutto il resto del trattamento. È emerso, dunque, non solo un rapido adsorbimento dell'antimicrobico, ma altresì una rapida conclusione del processo dimostrato dal raggiungimento del plateau. Un diverso comportamento si osservato negli esperimenti con la TOB. Infatti, nonostante il farmaco si sia legato velocemente al letto polimerico della cartuccia, il processo di

adsorbimento è terminato dopo 60 minuti di simulazione di DHP, come si può notare dalle concentrazioni Cp_{in} e Cp_{out} . Questa discrepanza nel loro trend di adsorbimento (ADS_{trend}) è ben visibile in **Figura 6.4**, dove il rapporto Cp_{out}/Cp_{in} della GEN cresce in maniera più rapida e raggiunge più velocemente il plateau rispetto al rapporto Cp_{out}/Cp_{in} della TOB.

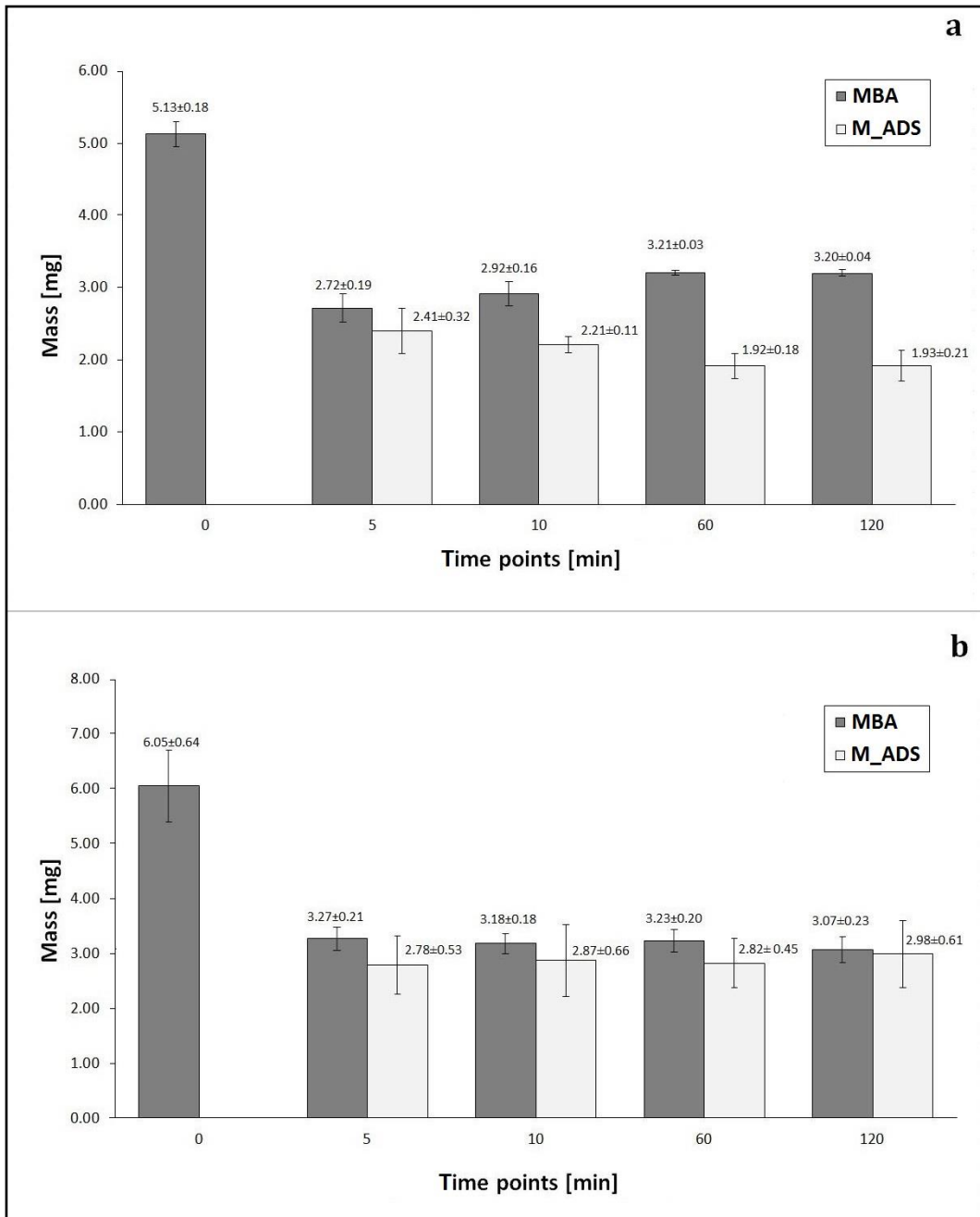
Figura 6.4. Trend di adsorbimento della gentamicina e della tobramicina durante l'emoperfusione diretta.



Legenda. Cp_{in} è la concentrazione plasmatica dell'antimicrobico in entrata alla cartuccia (linea arteriosa); Cp_{out} è la concentrazione plasmatica dell'antimicrobico in uscita dalla cartuccia (linea venosa).

Dall' MBA della GEN, si può notare come il suo adsorbimento sul letto polimerico aumenti durante gli esperimenti, raggiungendo il suo valore massimo ($M_{ADS_{t=120}}$: $2,98 \pm 0,61$ mg) alla fine dei trattamenti di DHP (**Figura 6.5b**). La massa totale di GEN rimasta nel sistema dopo 120 minuti di circolazione extracorporea è risultata circa la metà ($MBA_{t=120}$: $3,07 \pm 0,23$ mg) della massa presente nel contenitore che funge da riserva del veicolo, all'inizio dell'esperimento ($MBA_{t=0}$: $6,05 \pm 0,64$ mg). Diversamente, dall' MBA sulla TOB si è potuto osservare come l'adsorbimento massimo dell'antimicrobico ($M_{ADS_{t=5}}$: $2,41 \pm 0,32$ mg) è stato raggiunto dopo 5 minuti di trattamento, ed è diminuito nel corso di ciascun esperimento (**Figura 6.5a**).

Figura 6.5. Bilancio di massa della gentamicina e della tobramicina durante l'emoperfusione diretta.

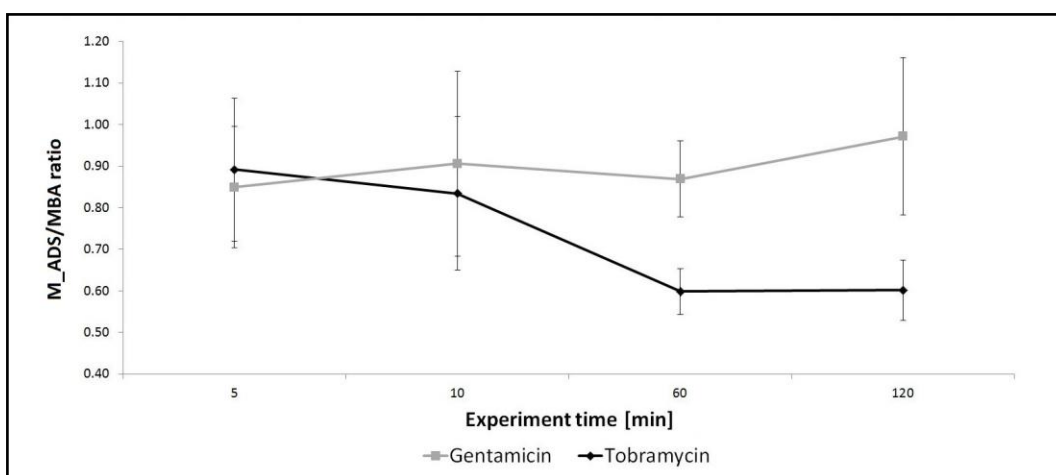


Legenda. In a: il bilancio di massa della tobramicina; in b: il bilancio di massa della gentamicina; *MBA* è la massa libera di antimicrobico circolante nel sistema; *M_ADS* è la massa di antimicrobico adsorbita sul polimero.

Ciò indica inequivocabilmente un rilascio della TOB adsorbita inizialmente dal letto polimerico della cartuccia. Infatti, solamente $1,93\pm0,21$ mg di TOB

($M_{ADS_{t=120}}$) sono rimasti adsorbiti all'interno del dispositivo al termine del trattamento DHP (120 minuti). Questa differenza di affinità e di comportamento nel processo di adsorbimento tra GEN e TOB è stata confermata anche dall'analisi del profilo cinetico di adsorbimento-rilascio di ciascun antimicrobico (**Figura 6.6**).

Figura 6.6. Profilo cinetico di adsorbimento-rilascio della gentamicina e della tobramicina durante l'emoperfusione diretta.



Legenda. *MBA* è la massa libera di antimicrobico circolante nel sistema; M_{ADS} è la massa di antimicrobico adsorbita sul polimero.

Il profilo cinetico della TOB diminuisce nel corso del trattamento DHP, mentre quello della GEN aumenta. Infatti, la percentuale di adsorbimento ($\%ADS_{rate}$) dei due antimicrobici è simile dopo 5 minuti di circolazione extracorporea, ma si scosta notevolmente a 120 minuti (**Tabella 6.4**).

Tabella 6.4. Percentuale di massa adsorbita di gentamicina e di tobramicina durante l'emoperfusione diretta.

Time [min]	Gentamicin	Tobramycin
	Percentage of Adsorption	
Time [0]	0.00	0.00
Time [5]	45.71	46.84
Time [10]	47.07	43.18
Time [60]	46.42	37.39
Time [120]	48.98	37.49

Legenda. Time [min] indica ciascun intervallo di campionamento (0, 5, 10, 60 e 120 minuti).

6.3. L'adsorbimento competitivo sul polimero di cellulosa modificata

Nella prima fase del test sperimentale, in cui la TEC era dispersa in soluzione salina, la concentrazione iniziale ($C_{t=0}$) dell'antimicrobico è diminuita in maniera significativa nel corso degli esperimenti (**Figura 6.7**), confermando quanto osservato nelle simulazioni di DHP effettuate nello studio con i glicopeptidi. La riduzione della $C_{t=0}$ della TEC è stata invece meno marcata quando il test è stato condotto in plasma. La TEC infatti, si lega per il 90% alle proteine plasmatiche ed in particolare all'Alb, di conseguenza il comportamento della TEC in plasma dimostra come il legame farmaco-proteico sia un fattore limitante l'adsorbimento sul polimero (**Tabella 6.5**). Diversamente, nei test condotti con la sola β 2-MG in plasma, si è osservata una riduzione della concentrazione iniziale da $14,38 \pm 0,30$ mg/L ($C_{t=0}$) a $10,23 \pm 0,59$ mg/L ($C_{t=120}$). Questa variazione significativa di $C_{t=0}$ è indicativa di un adsorbimento della β 2-MG sul polimero in sospensione maggiore rispetto ai test condotti con la TEC in plasma.

Figura 6.7. Andamento della concentrazione di teicoplanina durante il test sperimentale in soluzione salina.

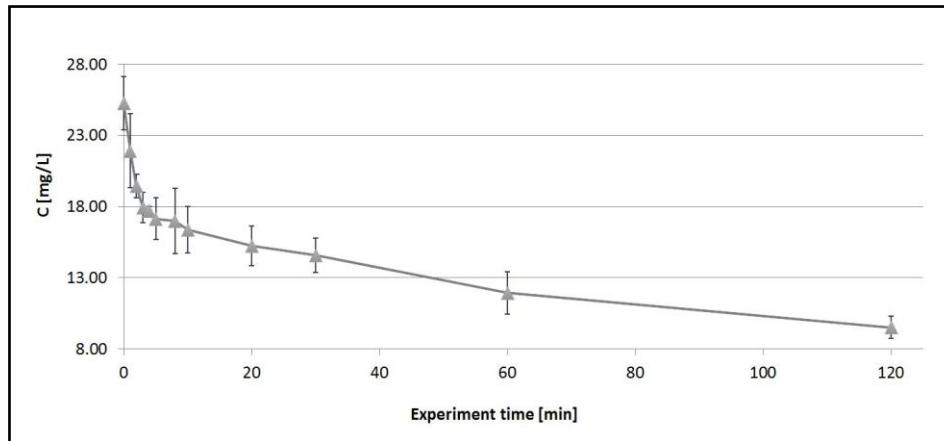


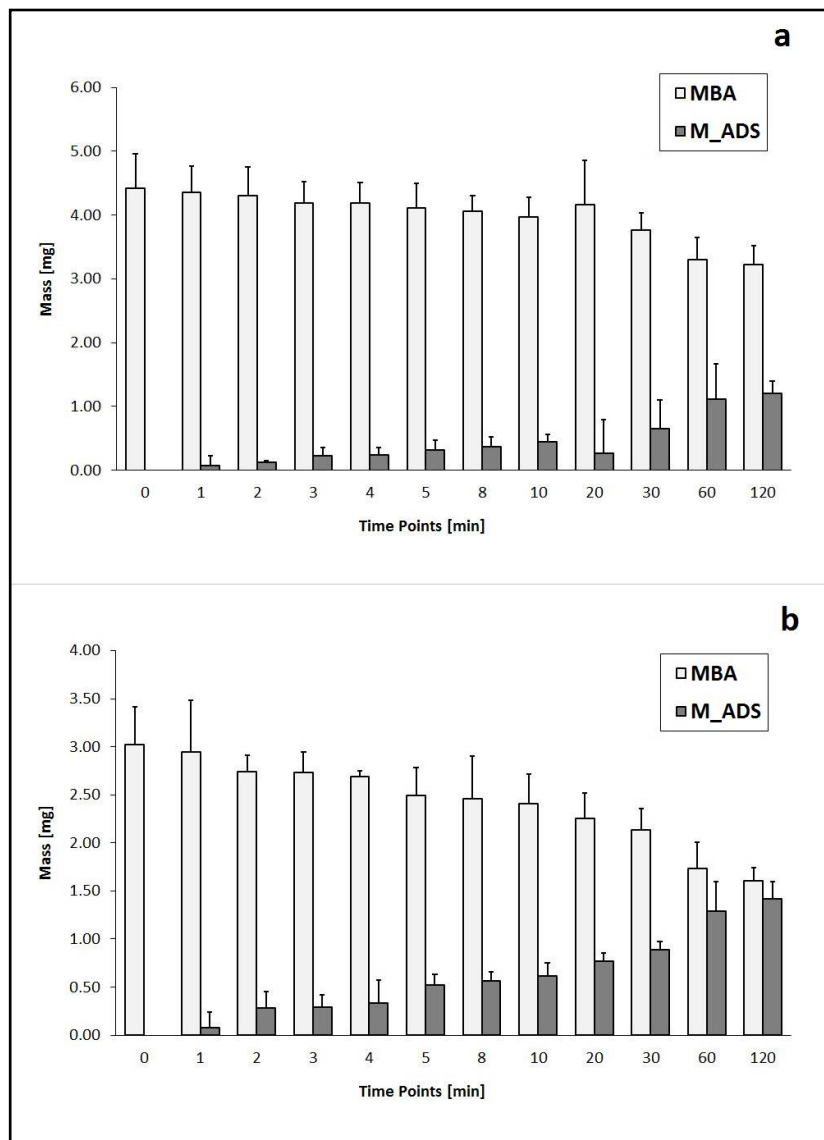
Tabella 6.5. Andamento delle concentrazioni durante i test sperimentali della teicoplanina in soluzione salina e in plasma e della β 2-microglobulina in plasma .

Time [min]	Teicoplanin		β 2-Microglobulin
	(mg/L)		(mg/L)
	Plasma	Saline	Plasma
Time [0]	21.06±2.58	25.26±1.87	14.38±0.30
Time [1]	20.85±2.03	21.92±2.59	14.36±0.60
Time [2]	20.52±2.24	19.46±0.84	13.71±0.62
Time [3]	20.50±1.71	17.94±1.05	14.00±0.34
Time [4]	19.02±1.74	17.70±0.31	14.14±0.98
Time [5]	19.19±2.09	17.15±1.47	13.50±0.27
Time [8]	19.55±1.39	17.00±2.19	13.66±0.23
Time [10]	19.69±1.78	16.38±1.63	13.75±0.52
Time [20]	19.48±4.11	15.23±1.39	13.25±0.15
Time [30]	19.82±1.66	14.56±1.20	12.94±0.22
Time [60]	18.65±2.14	11.94±1.48	10.83±1.79
Time [120]	18.01±1.95	9.52±0.78	10.23±0.59

Legenda. Time [min] indica ciascun intervallo di campionamento (0, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 20, 30, 60 e 120 minuti).

Infatti, dall'*MBA* effettuata sui test sperimentali condotti con la sola TEC in plasma e con la sola β 2-MG in plasma, si può notare come la quantità di antimicrobico adsorbita sulla cellulosa modificata al termine dell'esperimento sia inferiore rispetto a quella della proteina (β 2-MG). La massa libera totale di TEC nel veicolo plasma ha visto la progressiva diminuzione da $4,42 \pm 0,54$ mg ($MBA_{t=0}$) a $3,22 \pm 0,30$ mg ($MBA_{t=120}$), indicando un adsorbimento sul polimero di $1,20 \pm 0,21$ mg ($M_{ADS_{t=120}}$; **Figura 6.8a**).

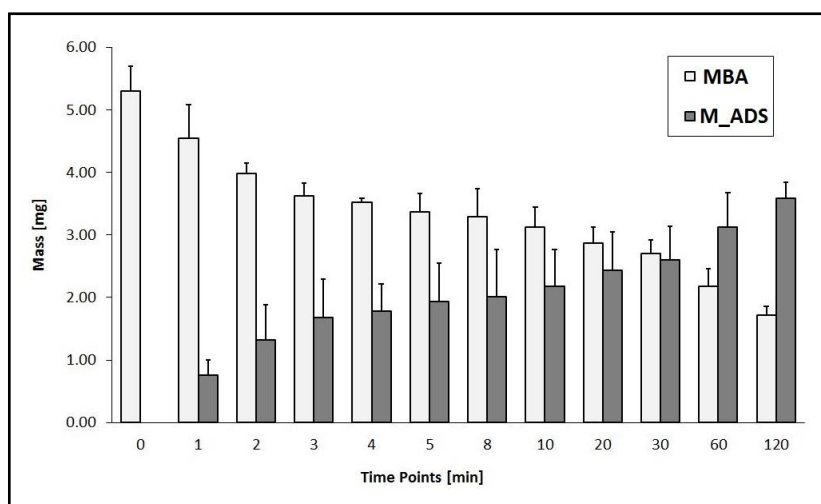
Figura 6.8. Bilancio di massa della teicoplanina e della β 2-microglobulina durante i test con plasma.



Legenda. In a: il bilancio di massa della teicoplanina; in b: il bilancio di massa della β 2-microglobulina; *MBA* è la massa libera dell'analita nel sistema; *M_ADS* è la massa dell'analita adsorbita sul polimero.

L'adsorbimento osservato al termine dell'esperimento della β 2-MG era di $1,42 \pm 0,18$ mg ($M_{ADS_{t=120}}$) con un decremento della massa libera iniziale da $3,02 \pm 0,06$ mg ($MBA_{t=0}$) a $1,60 \pm 0,12$ mg ($MBA_{t=120}$; **Figura 6.8b**). Inoltre, dall'*MBA* effettuata sugli esperimenti condotti con la TEC in soluzione salina, si è potuto notare come l'interazione diretta farmaco-polimero porti ad un adsorbimento maggiore dell'antimicrobico, rispetto a quanto avvenuto nei test effettuati utilizzando il plasma come veicolo per la dispersione del farmaco. In soluzione salina, la massa libera totale è diminuita da $5,31 \pm 0,39$ mg ($MBA_{t=0}$) a $1,72 \pm 0,14$ mg ($MBA_{t=120}$), con un adsorbimento di $3,59 \pm 0,26$ mg ($M_{ADS_{t=120}}$; **Figura 6.9**).

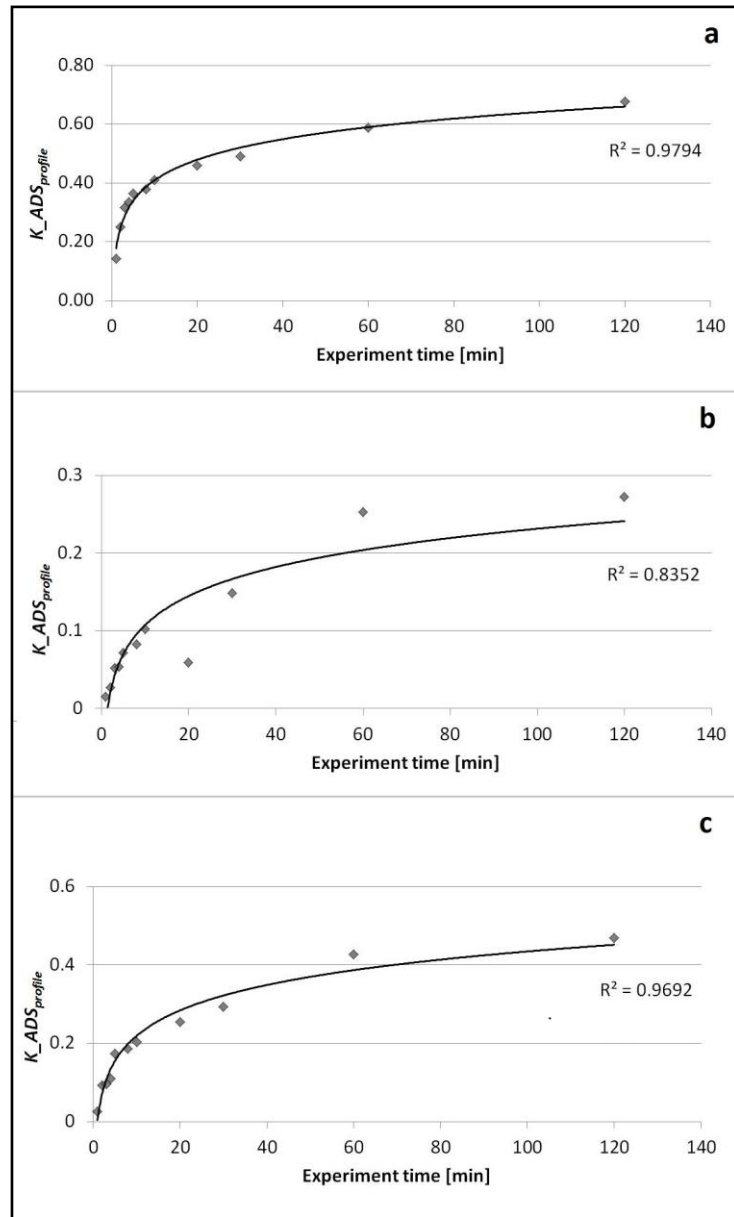
Figura 6.9. Bilancio di massa della teicoplanina durante il test con soluzione salina.



Legenda. *MBA* è la massa libera della teicoplanina nel sistema; *M_ADS* è la massa della teicoplanina adsorbita sul polimero.

Dall'analisi del profilo cinetico di adsorbimento degli analiti, si può osservare come in tutti e tre i test sperimentali (TEC in soluzione salina, TEC in plasma e β 2-MG in plasma) il processo di adsorbimento sul polimero a 120 minuti era concluso (**Figura 6.10**).

Figura 6.10. Profilo cinetico di adsorbimento degli analiti durante il test sperimentale.



Legenda. In a: la teicoplanina in soluzione salina; in b: la teicoplanina in plasma; in c: la β_2 -microglobulina in plasma.

Nella quarta ed ultima fase del test sperimentale, in cui erano dispersi entrambi gli analiti (TEC e β_2 -MG) in plasma, la concentrazione iniziale ($C_{t=0}$) di TEC è diminuita in maniera maggiore rispetto a quanto avvenuto negli esperimenti

condotti in presenza del solo antimicrobico in plasma. Per la β 2-MG, si è osservata, invece, una riduzione inferiore di $C_{t=0}$ (Tabella 6.6 e Tabella 6.7).

Tabella 6.6. Andamento delle concentrazioni durante i test sperimentali in plasma in presenza dei due analiti: teicoplanina e β 2-microglobulina.

Time [min]	Teicoplanin	β 2-Microglobulin
	(mg/L)	(mg/L)
Plasma		
Time [0]	26.25±2.66	14.09±0.65
Time [1]	26.17±2.91	14.18±0.15
Time [2]	25.84±2.31	13.78±0.68
Time [3]	25.30±2.76	13.67±0.41
Time [4]	25.77±2.51	13.89±0.49
Time [5]	24.63±2.98	14.11±0.76
Time [8]	24.86±2.61	13.93±0.36
Time [10]	24.25±2.91	13.57±0.41
Time [20]	23.21±3.16	12.94±0.43
Time [30]	23.89±2.57	12.76±0.63
Time [60]	22.04±2.47	11.85±0.28
Time [120]	22.29±2.23	10.41±0.66

Legenda. Time [min] indica ciascun intervallo di campionamento (0, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 20, 30, 60 e 120 minuti).

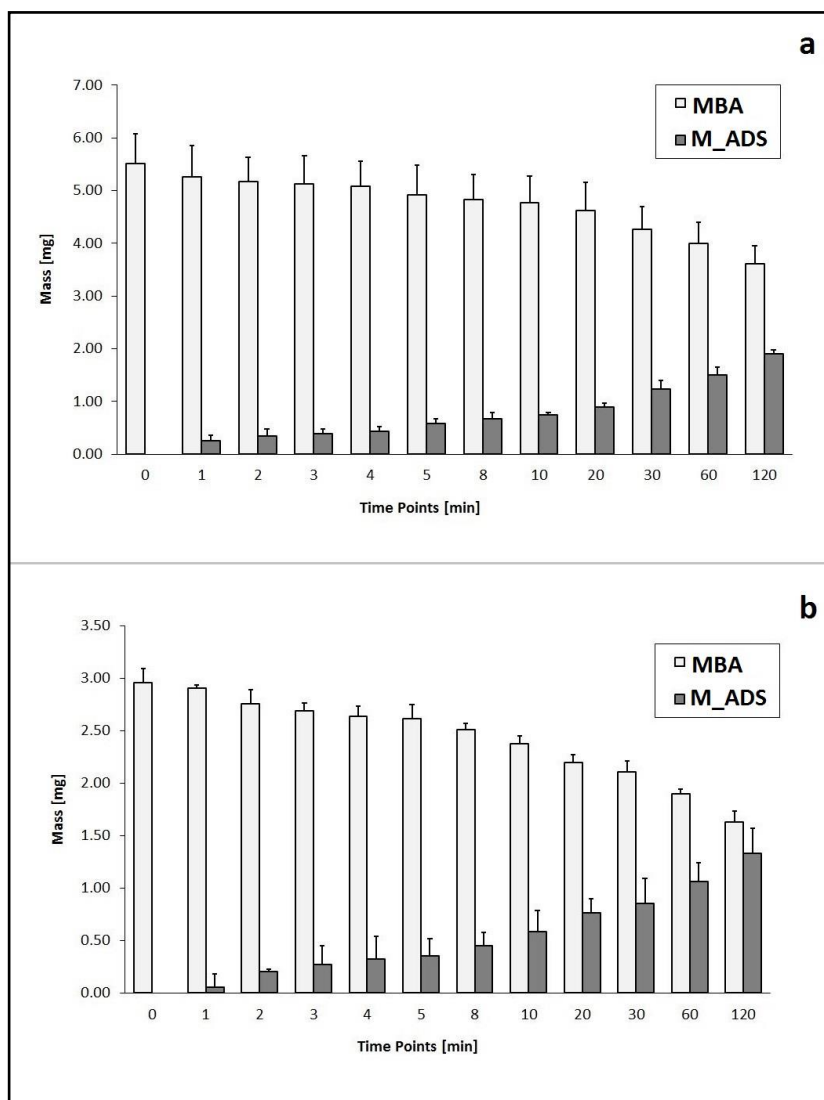
Tabella 6.7. Variazione della concentrazione iniziale della teicoplanina e della β 2-microglobulina nelle quattro fasi dello screening test.

Analyte- vehicle	$C_{t=0}$ [mg/L]	$C_{t=120}$ [mg/L]	ΔC [mg/L]	ADS [mg]
TEC-saline	25.26±1.87	9.52±0.78	15.75±1.12	3.59±0.26
TEC-plasma	21.06±2.58	18.01±1.95	3.06±1.24	1.20±0.21
β 2-MG-plasma	14.38±0.30	10.23±0.59	4.15±0.87	1.42±0.18
TEC-plasma (with β 2-MG)	26.25±2.66	22.29±2.23	3.97±0.47	1.90±0.22
β 2-MG-plasma (with TEC)	14.09±0.65	10.41±0.66	3.68±1.30	1.33±0.24

Legenda. $C_{t=0}$ e $C_{t=120}$ sono rispettivamente le concentrazioni iniziale e finale dell'analita nel test sperimentale; ΔC è la differenza tra $C_{t=0}$ e $C_{t=120}$.

Infatti, dall'*MBA* effettuata sulla TEC, si può notare come la quantità di antimicrobico adsorbita ($M_{ADS_{t=120}}$: 1,90±0,22 mg) sulla cellulosa modificata, sia maggiore rispetto a quanto avvenuto nei test sperimentali condotti disperdendo il solo farmaco in plasma ($M_{ADS_{t=120}}$: 1,20±0,21 mg). In questa fase dello screening test, la massa libera di TEC è diminuita da 5,51±0,56 mg ($MBA_{t=0}$) a 3,61±0,35 mg ($MBA_{t=120}$; **Figura 6.11a**). Contrariamente, si è osservata una riduzione minore della massa libera di β 2-MG rispetto a quando la proteina era dispersa in assenza TEC in plasma. La massa libera è diminuita da 2,96±0,14 mg ($MBA_{t=0}$) a 1,63±0,10 mg ($MBA_{t=120}$), indicando un adsorbimento di 1,33±0,24 mg ($M_{ADS_{t=120}}$; **Figura 6.11b**). Come precedentemente descritto, nei test condotti con la sola β 2-MG, l'adsorbimento sul polimero in sospensione è stato di 1,42±0,18 mg ($M_{ADS_{t=120}}$).

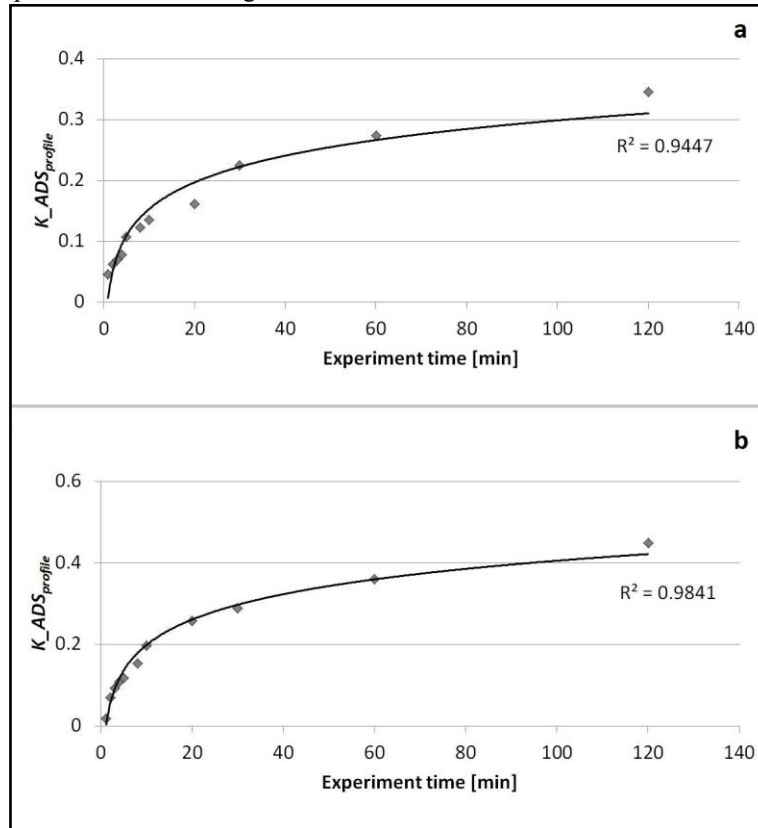
Figura 6.11. Bilancio di massa della teicoplanina e della β 2-microglobulina durante i test sperimentali in plasma in presenza di entrambi gli analiti.



Legenda. In a: il bilancio di massa della teicoplanina; in b: il bilancio di massa della β 2-microglobulina; *MBA* è la massa libera dell'analita nel sistema; *M_ADS* è la massa dell'analita adsorbita sul polimero.

Per quanto riguarda l'analisi del profilo cinetico di adsorbimento degli analiti, anche in questa fase dello screening test, sia la TEC sia la β 2-MG hanno saturato il polimero di cellulosa presente in sospensione nel plasma nei 120 minuti previsti dall'esperimento (**Figura 6.12**).

Figura 6.12. Profilo cinetico di adsorbimento della teicoplanina e della β 2-microglobulina durante i test sperimentali in plasma in presenza di entrambi gli analiti.

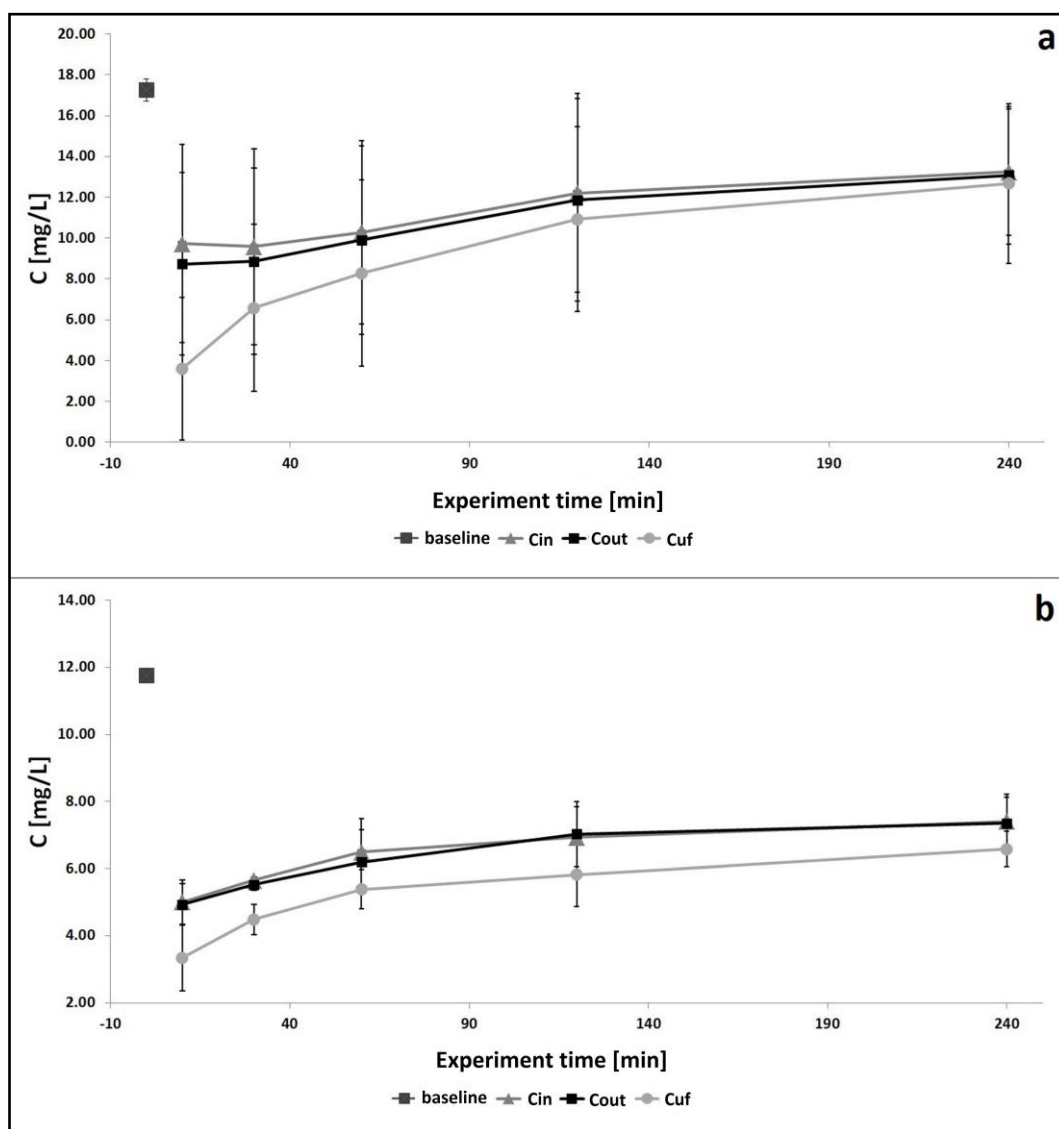


Legenda. In a: il profilo cinetico della teicoplanina; in b: il profilo cinetico della β 2-microglobulina.

6.4. La rimozione del linezolid e della tobramicina durante l'emofiltrazione

La concentrazione iniziale del LZD presente nella sacca ($C_{baseline}$) è diminuita repentinamente durante i primi 10 minuti di trattamento di HF, sia negli esperimenti in soluzione salina che negli esperimenti in sangue. Successivamente, le concentrazioni nella linea arteriosa (C_{in}), in quella venosa (C_{out}) e nella linea ultrafiltrato (C_{uf}) sono aumentate gradualmente. Questo andamento delle concentrazioni indicava che vi era stato un repentino adsorbimento dell'antimicrobico sulla membrana in polisulfone nei primi 10 minuti, seguito dal rilascio dell'LZD dalla membrana stessa. Tuttavia, la $C_{baseline}$ non è stata raggiunta nuovamente al termine dei 240 minuti previsti dal trattamento di HF sperimentale (**Figura 6.13**).

Figura 6.13. Andamento delle concentrazioni del linezolid durante l'emofiltrazione.



Legenda. In a: il trattamento sperimentale di emofiltrazione in soluzione salina; in b: il trattamento sperimentale di emofiltrazione in sangue; baseline è la concentrazione iniziale di linezolid presente nella sacca; C_{in} , C_{out} e C_{uf} sono rispettivamente le concentrazioni dell'antimicrobico in arteria, in vena e nell'ultrafiltrato.

Questo trend di adsorbimento-rilascio del farmaco sulla e dalla membrana è stato confermato dai valori di Sc osservati (**Tabella 6.8**). Al primo intervallo di campionamento (10 minuti), il valore di Sc era inferiore rispetto a quello predetto, sia in soluzione salina (Sc predetto 1,00), sia in sangue (Sc predetto 0,70). Ciò suggeriva che l'antimicrobico era rimasto parzialmente adsorbito sulla membrana

in polisulfone. Inoltre, nonostante i valori di Sc siano aumentati nel corso degli esperimenti (in soluzione salina e in sangue), essi non hanno mostrato di raggiungere e mantenere i valori predetti.

Tabella 6.8. Variazione del coefficiente di sieving del linezolid durante l'emofiltrazione.

Time [min]	Sieving Coefficient	
	Saline	Blood
10	0.35±0.20	0.66±0.13
30	0.69±0.09	0.77±0.14
60	0.81±0.12	0.81±0.11
120	0.91±0.05	0.82±0.13
240	0.95±0.07	0.91±0.12

Legenda. Time [min] indica ciascun intervallo di campionamento (10, 30, 60, 120 e 240 minuti).

L'analisi della $CL_{convective}$ indicava che il farmaco non passava in maniera completa attraverso la membrana al primo intervallo di campionamento (10 minuti). Tuttavia, a 240 minuti del trattamento sperimentale, la $CL_{convective}$ eguagliava il flusso dell'ultrafiltrato; questo comportamento è stato confermato anche dall'analisi del $J_{convective}$ (**Tabella 6.9**).

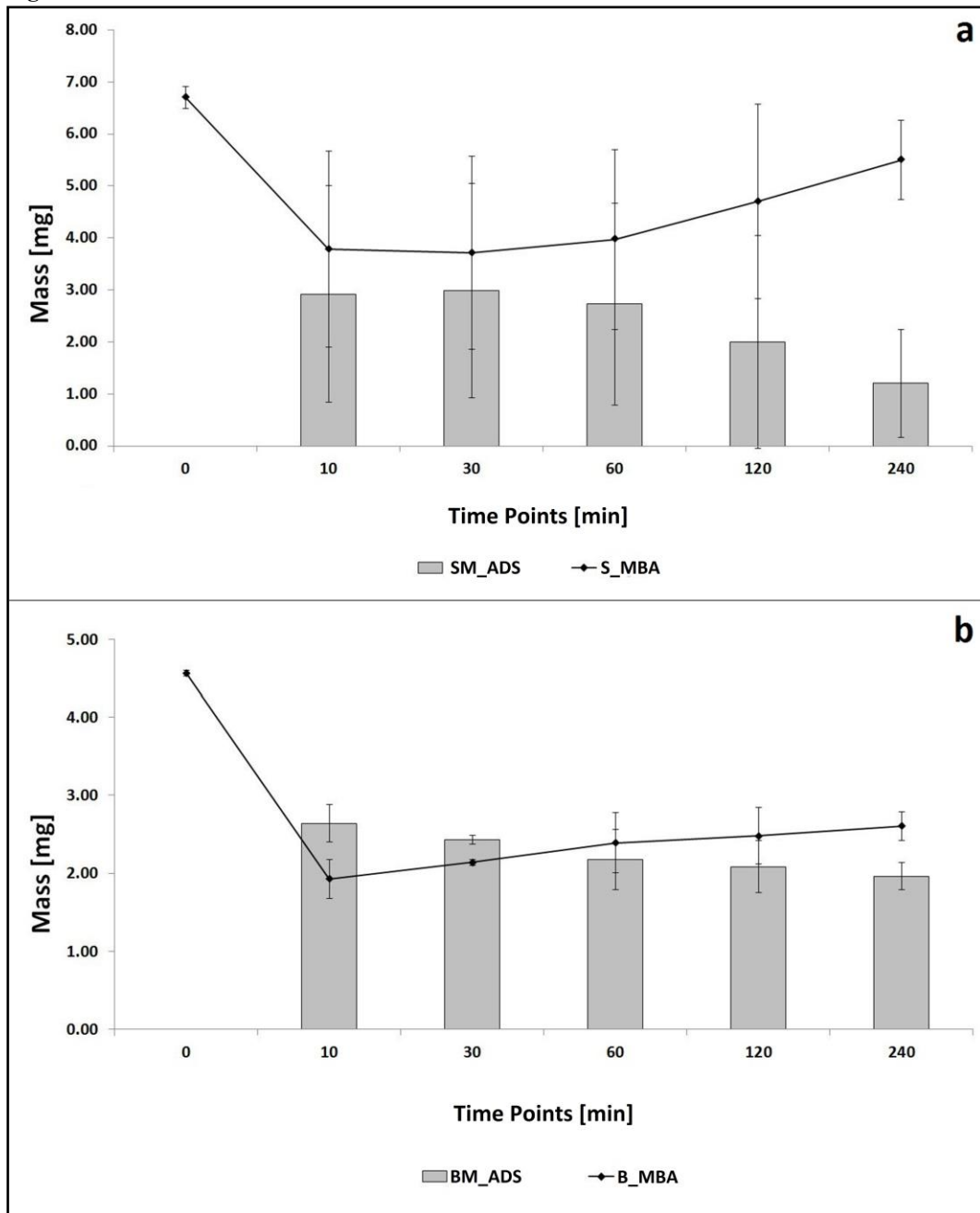
Tabella 6.9. Andamento della clearance convettiva e del flusso in massa del linezolid durante l'emofiltrazione.

Time [min]	10	30	60	120	240
$CL_{convective}$ (Saline)	0.69±0.39	1.39±0.17	1.61±0.24	1.81±0.10	1.90±0.15
$CL_{convective}$ (Blood)	1.33±0.25	1.54±0.29	1.62±0.22	1.64±0.27	1.82±0.25
$J_{convective}$ (Saline)	0.003±0.004	0.010±0.007	0.014±0.009	0.020±0.009	0.025±0.009
$J_{convective}$ (Blood)	0.005±0.002	0.007±0.002	0.009±0.001	0.010±0.003	0.012±0.003

Legenda. Time [min] indica ciascun intervallo di campionamento (10, 30, 60, 120 e 240 minuti); $CL_{convective}$ è la clearance convettiva in ml/min; $J_{convective}$ è il flusso in massa convettivo in mg/min.

Dall'analisi del bilancio di massa, si può osservare che l'adsorbimento massimo del LZD è stato di $2,92 \pm 2,08$ mg ($SM_{ADS_{t=10}}$) negli esperimenti in soluzione salina, mentre negli esperimenti in sangue l'adsorbimento massimo del farmaco è stato di $2,64 \pm 0,24$ mg ($BM_{ADS_{t=10}}$; **Figura 6.14**). Indipendentemente dal veicolo utilizzato per la dispersione del farmaco, l'adsorbimento massimo si è verificato dopo i primi 10 minuti. Il fenomeno di adsorbimento osservato è stato molto rapido e, successivamente, il LZD è stato rilasciato dalla membrana, tanto che a 240 minuti di trattamento di HF l'adsorbimento dell'antimicrobico sulla membrana era di $1,21 \pm 1,04$ mg ($SM_{ADS_{t=240}}$) e di $1,96 \pm 0,17$ mg ($BM_{ADS_{t=240}}$), rispettivamente per gli esperimenti condotti in soluzione salina e per gli esperimenti condotti in sangue.

Figura 6.14. Bilancio di massa del linezolid durante l'emofiltrazione.



Legenda. In a: il trattamento sperimentale di emofiltrazione in soluzione salina; in b: il trattamento sperimentale di emofiltrazione in sangue; *SM_ADS* e *BM_ADS* sono rispettivamente la massa di linezolid adsorbita in salina e in sangue; *S_MBA* e *B_MBA* sono rispettivamente la massa di linezolid libera in salina e in sangue.

La buona correlazione in termini di linearità di delta per $\Delta_{adsorption}$ tra gli esperimenti in salina e quelli in sangue, indicava un profilo cinetico di adsorbimento-rilascio del farmaco dalla membrana simile per i due veicoli. Il

trend cinetico infatti è supportato dalla percentuale di variazione della concentrazione iniziale dell'antimicrobico presente nella sacca prima di iniziare l'esperimento ($\% \Delta C_{baseline}$; **Tabella 6.10**).

Tabella 6.10. Andamento della massa adsorbita, della linearità dei delta e variazione percentuale della concentrazione iniziale di linezolid durante l'emofiltrazione.

Time [min]	10	30	60	120	240	R ²
<i>SM_ADS</i> [mg]	2.92±2.08	2.99±2.06	2.73±1.94	2.00±2.05	1.21±1.04	N.A.
<i>BM_ADS</i> [mg]	2.64±0.24	2.43±0.05	2.18±0.38	2.09±0.33	1.96±0.17	N.A.
$\Delta Adsorption$ [mg]	0.28	0.56	0.55	-0.09	-0.76	0.86
$\% \Delta C_{baseline} Saline$	43.55	44.42	40.31	29.14	23.24	N.A.
$\% \Delta C_{baseline} Blood$	57.40	51.87	44.73	40.95	36.95	N.A.

Legenda. *SM_ADS* e *BM_ADS* sono rispettivamente la massa di linezolid adsorbita in salina e in sangue; $\Delta adsorption$ è la differenza di adsorbimento tra i due veicoli; $\% \Delta C_{baseline}$ è la variazione percentuale della concentrazione iniziale di linezolid presente nella sacca; Time [min] indica ciascun intervallo di campionamento (10, 30, 60, 120 e 240 minuti).

Un diverso comportamento nel corso dei trattamenti sperimentali di HF in soluzione salina e in sangue è stato osservato per la TOB. Durante i primi 10 minuti degli esperimenti condotti in soluzione salina, le concentrazioni nelle linee arteriosa (C_{in}), venosa (C_{out}) e dell'ultrafiltrato (C_{uf}), indicavano un passaggio parziale dell'antimicrobico attraverso i pori della membrana (**Tabella 6.11**).

Tabella 6.11. Andamento delle concentrazioni della tobramicina durante l'emofiltrazione con soluzione salina.

Time [min]	Tobramycin (mg/L) Saline		
	C_{in}	C_{out}	C_{uf}
$C_{baseline}$	9.36±0.11		
Time [10]	8.43±1.90	6.49±0.66	3.75±0.70
Time [30]	8.61±1.01	8.36±0.80	7.83±0.12
Time [60]	8.93±1.80	7.63±1.12	8.60±1.01
Time [120]	9.14±1.65	8.66±0.94	8.11±0.99
Time [240]	7.54±0.23	9.30±0.60	9.34±0.22

Legenda. $C_{baseline}$ è la concentrazione iniziale di tobramicina presente nella sacca; C_{in} , C_{out} e C_{uf} sono rispettivamente le concentrazioni dell'antimicrobico in arteria, in vena e nell'ultrafiltrato; Time [min] indica ciascun intervallo di campionamento (10, 30, 60, 120 e 240 minuti).

Infatti, C_{in} era maggiore della concentrazione in uscita al filtro (C_{out}) e della concentrazione ritrovata nell'ultrafiltrato (C_{uf}). Ciò denotava un'interazione diretta tra la TOB e la membrana in polisulfone, data l'assenza di proteine plasmatiche in questa fase della sperimentazione. Nei successivi 30, 60 e 120 minuti di esperimento, le concentrazioni C_{in} , C_{out} e C_{uf} erano simili tra loro, ad eccezione dell'ultimo intervallo di campionamento (240 minuti), dove C_{out} e C_{uf} erano maggiori di C_{in} . Questo suggeriva un rilascio della TOB dalla membrana dopo un iniziale fenomeno di adsorbimento. Nei trattamenti di HF con sangue, le concentrazioni osservate nelle linee arteriosa (C_{in}), venosa (C_{out}) e dell'ultrafiltrato (C_{uf}) sono state simili durante tutta la durata degli esperimenti (Tabella 6.12). In questa fase dello studio, le C_{uf} si sono mantenute sempre inferiori rispetto alle concentrazioni C_{in} e C_{out} . Tuttavia, si può notare come la C_{uf} sia inferiore nel primo intervallo di campionamento (10 minuti) rispetto agli altri intervalli di campionamento considerati, indicando probabilmente una debole

interazione farmaco-membrana. Ad ogni modo, questo andamento delle concentrazioni è il risultato del legame farmaco-proteico della TOB nel veicolo sangue.

Tabella 6.12. Andamento delle concentrazioni della tobramicina durante l'emofiltrazione con sangue.

Time [min]	Tobramycin (mg/L) Blood		
	C_{in}	C_{out}	C_{uf}
$C_{baseline}$	11.30±0.37		
Time [10]	10.69±1.09	11.37±0.44	4.85±0.79
Time [30]	11.24±1.02	11.25±0.57	5.79±0.64
Time [60]	10.72±1.43	11.13±0.48	5.81±0.66
Time [120]	10.75±0.58	11.27±1.14	5.86±0.48
Time [240]	11.03±0.45	11.15±0.76	5.78±0.68

Legenda. $C_{baseline}$ è la concentrazione iniziale di tobramicina presente nella sacca; C_{in} , C_{out} e C_{uf} sono rispettivamente le concentrazioni dell'antimicrobico in arteria, in vena e nell'ultrafiltrato; Time [min] indica ciascun intervallo di campionamento (10, 30, 60, 120 e 240 minuti).

Questa discrepanza tra gli esperimenti in soluzione salina e in sangue è stata confermata anche dall'analisi del Sc della TOB (**Tabella 6.13**). Nei trattamenti con soluzione salina, infatti, il Sc aumentava progressivamente durante gli esperimenti, sino a raggiungere un valore superiore ad 1,00, indicando inequivocabilmente un rilascio della TOB dalla membrana in polisulfone. Diversamente, negli esperimenti con sangue, il Sc aumentava nei primi 30 minuti di trattamento, per poi raggiungere un plateau.

Tabella 6.13.Variazione del coefficiente di sieving della tobramicina durante l'emofiltrazione.

Time [min]	Sieving Coefficient	
	Saline	Blood
10	0.50±0.04	0.44±0.05
30	0.92±0.02	0.51±0.04
60	1.04±0.06	0.53±0.04
120	0.91±0.02	0.53±0.01
240	1.10±0.05	0.52±0.03

Legenda. Time [min] indica ciascun intervallo di campionamento (10, 30, 60, 120 e 240 minuti).

Il rilascio della TOB dalla membrana nei trattamenti di HF con soluzione salina, si evince anche dall'andamento della $CL_{convective}$ e del $J_{convective}$ (Tabella 6.14). Infatti, la $CL_{convective}$ della TOB aumenta durante l'HF, sino a superare il Q_{UF} (2 ml/min) utilizzato nel trattamento sperimentale all'ultimo intervallo di campionamento (240 minuti). Mentre, $J_{convective}$ aumenta da $0,004\pm 0,01$ mg/min (10 minuti) a $0,021\pm 0,021$ mg/min (240 minuti). Invece, nei trattamenti sperimentali con sangue, la $CL_{convective}$ e il $J_{convective}$ aumentano progressivamente sino a raggiungere un plateau.

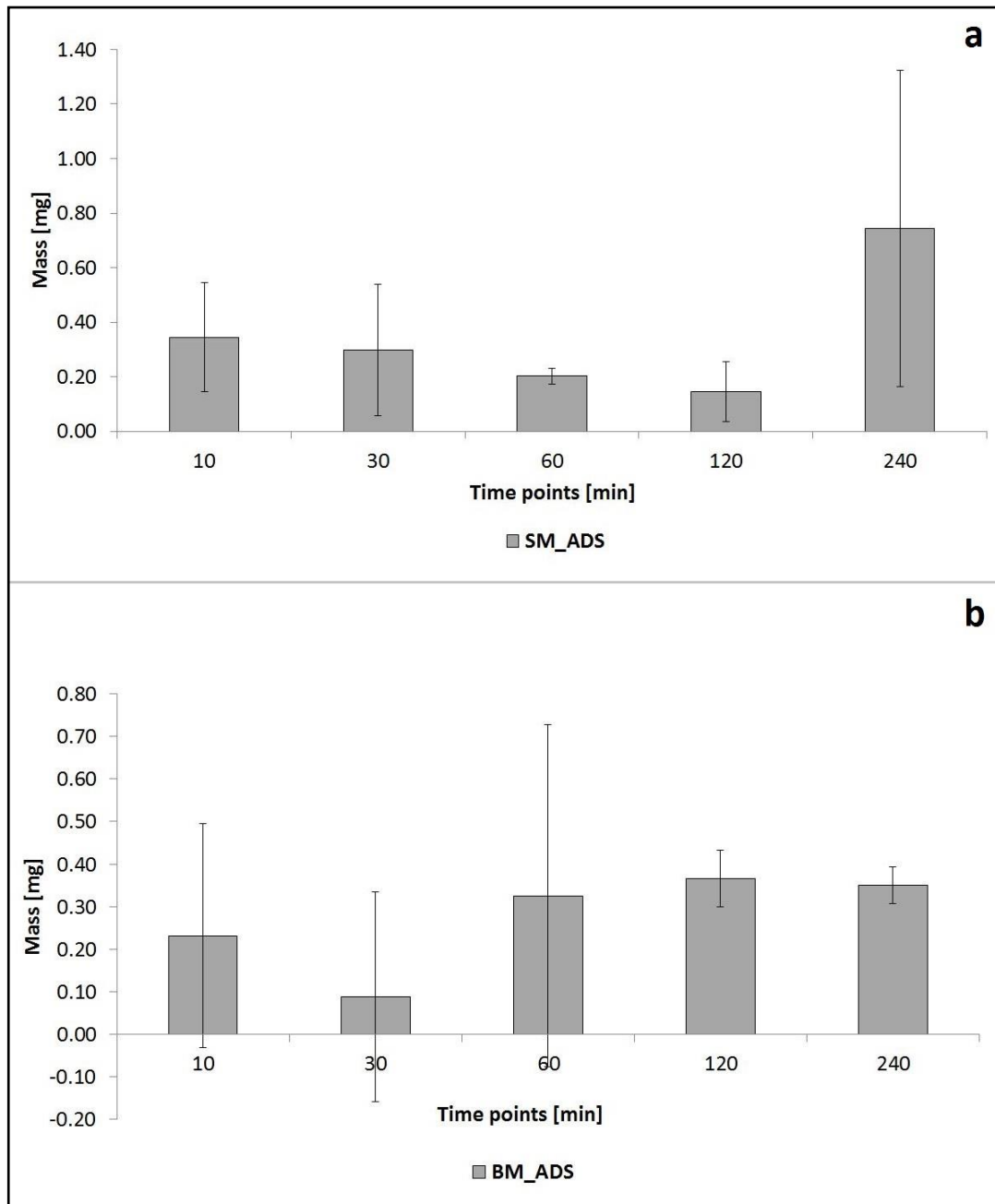
Tabella 6.14. Andamento della clearance convettiva e del flusso in massa della tobramicina durante l'emofiltrazione.

Time [min]	10	30	60	120	240
$CL_{convective}$ (Saline)	1.01±0.20	1.85±0.09	2.08±0.10	1.82±0.22	2.20±0.35
$CL_{convective}$ (Blood)	0.88±0.10	1.03±0.07	1.06±0.08	1.06±0.02	1.04±0.06
$J_{convective}$ (Saline)	0.004±0.001	0.014±0.06	0.018±0.011	0.015±0.008	0.021±0.021
$J_{convective}$ (Blood)	0.004±0.001	0.006±0.001	0.006±0.001	0.006±0.001	0.006±0.001

Legenda. Time [min] indica ciascun intervallo di campionamento (10, 30, 60, 120 e 240 minuti); $CL_{convective}$ è la clearance convettiva in ml/min; $J_{convective}$ è il flusso in massa convettivo in mg/min.

Dall'analisi del bilancio di massa, emerge che il massimo adsorbimento sulla membrana della TOB in soluzione salina è di $0,74 \pm 0,58$ mg ($SM_{ADS_{t=240}}$) a 240 minuti di trattamento: in ogni caso trattasi di un fenomeno reversibile, come mostrano gli altri intervalli di campionamento (**Figura 6.15a** e **Tabella 6.15**). Diversamente, negli esperimenti con sangue, il valore massimo di adsorbimento osservato si riscontra a 120 minuti di trattamento ($BM_{ADS_{t=120}}$). Tuttavia, si tratta di un plateau che viene raggiunto già a 60 minuti dall'inizio dell'esperimento (**Figura 6.15b** e **Tabella 6.15**).

Figura 6.15. Bilancio di massa della tobramicina durante l'emofiltrazione sulla massa adsorbita.

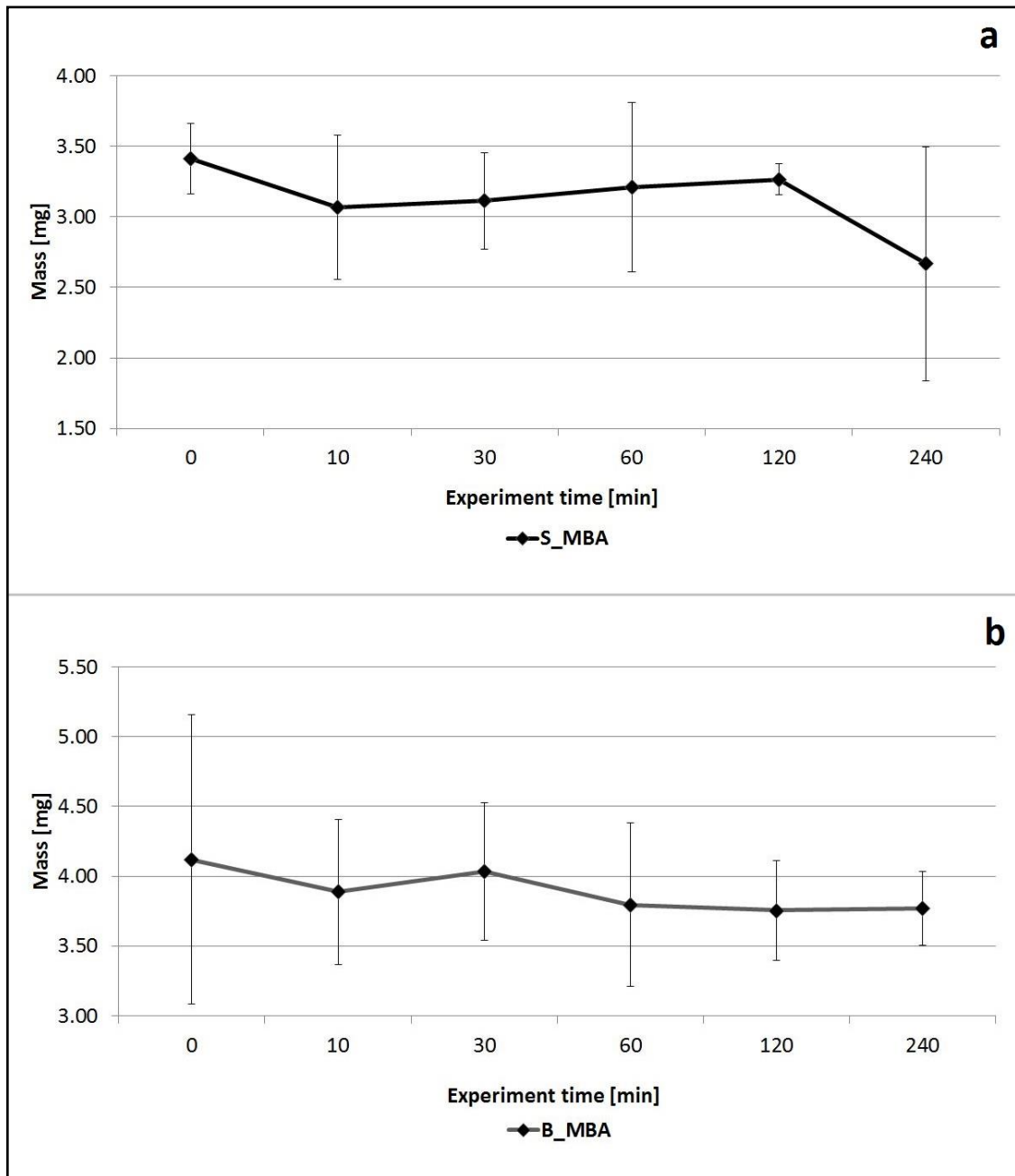


Legenda. In a: il trattamento sperimentale di emofiltrazione in soluzione salina; in b: il trattamento sperimentale di emofiltrazione in sangue; *SM_ADS* e *BM_ADS* sono rispettivamente la massa di tobramicina adsorbita in salina e in sangue.

Il comportamento diverso dell'antimicrobico durante l'HF nei due diversi veicoli di dispersione del farmaco (soluzione salina e sangue), si può osservare anche dalla variazione della massa libera di TOB circolante durante gli esperimenti

(Figura 6.16). In soluzione salina, la massa libera circolante diminuisce repentinamente a 240 minuti, viceversa in sangue essa raggiunge un plateau a 60 minuti.

Figura 6.16. Bilancio di massa della tobramicina durante l'emofiltrazione sulla massa libera.



Legenda. In a: il trattamento sperimentale di emofiltrazione in soluzione salina; in b: il trattamento sperimentale di emofiltrazione in sangue; S_MBA e B_MBA sono rispettivamente la massa di tobramicina libera in salina e in sangue.

Le cinetiche diverse della TOB durante il trattamento di HF in salina e in sangue sono peraltro confermate dalla mancanza di correlazione in termini di linearità di delta per $\Delta adsorption$, dove l' R^2 ottenuto è stato di 0,13. Ad ogni modo, il fenomeno di adsorbimento della TOB sulla membrana in polisulfone è stato di lieve entità, sia per gli esperimenti in salina che in sangue, come si può del resto notare dalla variazione della concentrazione iniziale dell'antimicrobico presente nella sacca prima di iniziare l'esperimento ($\% \Delta C_{baseline}$; **Tabella 6.15**).

Tabella 6.15. Andamento della massa adsorbita, della linearità dei delta e variazione percentuale della concentrazione iniziale di tobramicina durante l'emofiltrazione.

Time Points	10	30	60	120	240	R ²
<i>SM_ADS</i> [mg]	0.35±0.20	0.30±0.24	0.20±0.03	0.15±0.11	0.74±0.58	N.A.
<i>BM_ADS</i> [mg]	0.23±0.26	0.09±0.25	0.33±0.40	0.37±0.07	0.35±0.13	N.A.
$\Delta Adsorption$ [mg]	0.11	0.21	-0.12	-0.22	0.39	0.13
$\% \Delta C_{baseline}$ Saline	9.94	8.01	4.59	2.35	19.44	N.A.
$\% \Delta C_{baseline}$ Blood	5.40	0.53	5.13	4.87	2.39	N.A.

Legenda. *SM_ADS* e *BM_ADS* sono rispettivamente la massa di tobramicina adsorbita in salina e in sangue; $\Delta adsorption$ è la differenza di adsorbimento tra i due veicoli; $\% \Delta C_{baseline}$ è la variazione percentuale della concentrazione iniziale di tobramicina presente nella sacca; Time [min] indica ciascun intervallo di campionamento (10, 30, 60, 120 e 240 minuti).

CAPITOLO 7

DISCUSSIONE

7.1. L'adsorbimento degli antibiotici nella tecnica dell'emoperfusione diretta

Lo sviluppo tecnologico di diversi materiali adsorbenti e la loro applicazione clinica in specifici quadri patologici ha permesso la rimozione selettiva di sostanze target sulla base del principio di adsorbimento. Forze specifiche o non specifiche di natura chimico-fisica determinano il processo di adsorbimento, a seconda della natura del materiale adsorbente coinvolto⁵⁸. Il dispositivo medico Lixelle è stato sviluppato per adsorbire selettivamente la β 2-MG (PM: 11600 Da) grazie alla combinazione di interazioni idrofobiche e della dimensione dei pori di cui è dotato il polimero di cellulosa modificata. Il suo spettro di adsorbimento è stato studiato sia *in vitro* che *in vivo*, indicando che il dispositivo è in grado di adsorbire diverse sostanze oltre alla β 2-MG. Come descritto in precedenza, *in vitro* il letto polimerico di Lixelle ha dimostrato la capacità di rimuovere 1 mg per ml di polimero contenuto nella cartuccia¹⁰⁶. *In vivo*, è stata invece osservata una riduzione dei livelli plasmatici di β 2-MG del 74% già nel primo trattamento con Lixelle S-35 durante una metodica di HD standard in combinazione con un emodializzatore (la quota adsorbita di β 2-MG varia da 200 a 300 mg)¹¹². Oltre alla β 2-MG, Lixelle è in grado di adsorbire il lisozima e la proteina legante il retinolo, le quali presentano un PM rispettivamente di 14000 Da e 21000 Da¹²⁰. Oda et al hanno dimostrato la capacità di Lixelle di adsorbire anche composti a più alto PM. Nel loro studio sulla rimozione delle citochine, la cartuccia è stata in grado di rimuovere l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8 e il TNF- α . Il loro PM varia da 8000 Da per l'IL-8 a 55000 Da per il TNF- α ¹²¹. Sulla base di questi studi, si può comprendere come questo dispositivo abbia la capacità di adsorbire composti diversi, i quali hanno PM inferiore a quello dell'albumina plasmatica (69000 Da), poiché il cutoff medio dei suoi pori è di 60000 Da¹⁰⁶. Benché lo spettro di adsorbimento di Lixelle sia stato oggetto di studio per diversi composti, come riportato in letteratura,

rimane ancora da chiarire la sua capacità di adsorbimento nei confronti dei composti a medio-basso PM. Questa mancanza di evidenze su Lixelle, unita alla difficoltà del corretto uso degli antimicrobici nei pazienti con DRA sottoposti a trattamento di HP con questo dispositivo, ha guidato questi studi *in vitro* per definire la PK extracorporea della VAN e della TEC, quali composti a medio PM (>1400 Da) e della GEN e della TOB, quali composti a basso PM (<700 Da). Nonostante la VAN e la TEC abbiano un PM simile, questi due glicopeptidi hanno caratteristiche chimico-fisiche differenti¹²². Infatti, la VAN ha mostrato un diverso comportamento durante i trattamenti di DHP sperimentali rispetto alla TEC. Questo suggerisce che il meccanismo di esclusione, dovuto alla dimensione dei pori presenti sulla superficie della cellulosa modificata, non sia il principale meccanismo che determina la rimozione per adsorbimento degli antimicrobici oggetto di studio¹²⁰. Considerando il cutoff della cellulosa modificata contenuta nella cartuccia (60000 Da) di gran lunga più elevato rispetto al PM dei due glicopeptidi, si può ipotizzare un adsorbimento legato ad interazioni non specifiche farmaco-polimero^{106,123}. Il differente adsorbimento osservato negli esperimenti condotti con la VAN e la TEC potrebbe essere spiegato mediante la formazione di legami intermolecolari tra il farmaco e il letto polimerico della cartuccia, quali forze di Van Der Waals e/o legami a ponte idrogeno¹²⁴. Tuttavia, indipendentemente dalla quantità in termini di massa trattenuta in maniera irreversibile dalla cartuccia Lixelle S-35, il fenomeno di adsorbimento è stato repentino per entrambi gli antimicrobici. Il plateau di adsorbimento della VAN è stato raggiunto dopo 60 minuti di trattamento di DHP sperimentale. Inoltre, questo adsorbimento importante sul letto polimerico della cartuccia ha determinato il dimezzamento della concentrazione iniziale dell'antimicrobico presente nel sistema (da 46,08±0,81 mg/L a 22,17±0,68 mg/L). In questo studio, i trattamenti sperimentali di DHP sono stati condotti alla concentrazione di picco della VAN. A questa concentrazione dell'antimicrobico, l'adsorbimento sul polimero è stato di 45,68±2,26 mg. Come riportato nel lavoro pubblicato, questo valore di adsorbimento riscontrato alla concentrazione di picco della VAN corrisponde a più di quattro volte il valore della massa circolante che si avrebbe avuto effettuando gli esperimenti con la concentrazione di valle (la concentrazione

di valle della VAN è di 5-10 mg/L e corrisponde ad una massa di 10,20-20,55 mg)¹²⁵. In altri termini, se i trattamenti sperimentali fossero stati condotti alla concentrazione di valle, la VAN sarebbe stata completamente adsorbita dalla cartuccia Lixelle S-35. Inoltre, bisogna considerare che il dispositivo Lixelle *in vivo* viene utilizzato in combinazione con l'emodializzatore¹¹²; quindi, la quantità di VAN rimossa dal circolo sistemico risulterebbe essere la somma dell'antimicrobico adsorbito sulla cartuccia e quello eliminato dall'emodializzatore, fermo restando che composti con PM superiore a 500 Da difficilmente diffondono durante un trattamento di HD standard¹²⁶. In ogni caso, deve essere sempre tenuta presente la tipologia di trattamento extracorporeo a cui viene accoppiata la cartuccia. Sicuramente, in un trattamento di HDF, il quale peraltro utilizza membrane altamente permeabili ad alto cutoff, il trasporto convettivo rimuove il farmaco¹²⁷. Oltre a queste considerazioni sul trattamento dialitico, è chiaro che devono essere evitate concentrazioni subterapeutiche dell'antimicrobico per ragioni di efficacia e per evitare lo sviluppo di ceppi microbici resistenti^{128,129}. Per questa ragione, il fenomeno di adsorbimento osservato dovrebbe essere preso in considerazione dal clinico, quando la cartuccia Lixelle S-35 viene utilizzata durante il trattamento dialitico accoppiata con l'emodializzatore. Probabilmente, è necessaria una dose supplementare di farmaco prima o durante ogni sessione dialitica per mantenere le concentrazioni plasmatiche di VAN all'interno della finestra terapeutica, dato che il farmaco viene adsorbito irreversibilmente. Bisogna peraltro considerare che la VAN, come del resto anche la TEC, è un antimicrobico tempo dipendente, e di conseguenza, è fondamentale che i suoi livelli plasmatici non scendano al di sotto della concentrazione minima efficace, ossia il limite inferiore della finestra terapeutica¹³⁰. Delle considerazioni simili possono essere fatte per la TEC, la quale contrariamente alla VAN è stata completamente adsorbita in modo irreversibile dopo 10 minuti di trattamento sperimentale di DHP. Questo differente grado di adsorbimento tra VAN e TEC riflette il loro diverso V_d , il quale dipende dall'equilibrio idrolipofilo di ciascuna molecola. Infatti, la TEC è cinquanta volte più lipofila della VAN e il suo V_d (0,9-1,6 L/Kg) è di gran lunga maggiore di quello della VAN (0,3-0,6 L/Kg)^{131,132}. Nei trattamenti sperimentali

di DHP con la TEC, il modello *in vitro* si è comportato come un sistema bicompartimentale come conseguenza del V_d elevato dell'antimicrobico^{133,134}. Il primo compartimento ha compreso il circuito e la sacca che fungeva da riserva del farmaco, mentre il secondo compartimento era rappresentato dalla cartuccia Lixelle S-35. In questo sistema, il farmaco si è rapidamente distribuito nei due compartimenti e non è stato osservato alcun fenomeno di rebound della concentrazione, poiché il legame della TEC al letto polimerico si è mostrato irreversibile. In altri termini, la TEC è stata completamente rimossa dal compartimento principale (il circuito e la sacca) per adsorbimento nel secondo compartimento (la cartuccia Lixelle S-35). Dato l'elevato adsorbimento della TEC osservato, considerando la tossicità renale del farmaco e la mancanza di antidoti nel caso di sovradosaggio dell'antimicrobico, nel lavoro pubblicato si concludeva suggerendo che Lixelle S-35 può essere un'opportunità di trattamento in caso di sovradosaggio del farmaco^{125,135}. Ciò era suggerito anche dalla attuale letteratura sulla digossina, dove il dispositivo è stato usato con successo in un caso di avvelenamento con risoluzione del quadro clinico di cardiotossicità¹³⁶. Tuttavia, rimanevano due fondamentali limiti in questa sperimentazione, rappresentati dal veicolo utilizzato per la circolazione extracorporea (soluzione fisiologica: NaCl 0,9% p/v) e l'assenza della sostanza target (β 2-MG), per il quale la cartuccia Lixelle S-35 è stata sviluppata. Dagli studi di PK è infatti noto che la TEC si lega per circa il 90% alle proteine plasmatiche, prima fra tutte l'albumina¹³⁷. La presenza delle proteine plasmatiche nel veicolo utilizzato per la sperimentazione potrebbe dunque limitare il legame della TEC alla cellulosa modificata di Lixelle, e quindi, la quota di antimicrobico adsorbita. Inoltre, la competizione nel processo di adsorbimento tra la TEC e la β 2-MG, nel caso di una elevata rimozione dell'antimicrobico, avrebbe come conseguenza l'inefficacia sia del trattamento farmacologico, sia del dispositivo Lixelle. Quest'ultimo aspetto, poco investigato in letteratura nella tecnica dell'DHP, è stato il principale obiettivo per cui lo screening test è stato messo a punto^{138,139}. Per quanto riguarda il ruolo del legame proteico della TEC studiato nelle prime due fasi dello screening test, in soluzione salina si è potuto notare come effettivamente la TEC abbia un'elevata affinità per la cellulosa modificata. Ciò conferma i dati ottenuti nel trattamento sperimentale

di DHP. La quota totale adsorbita durante la prima fase dello screening test in soluzione salina ($3,59 \pm 0,26$ mg di TEC adsorbita per 1,5 ml di polimero) indicava che la cartuccia Lixelle S-35, durante la prima sperimentazione con il modello di DHP, non è stata saturata con l'antimicrobico, in quanto il polimero ha adsorbito $0,36 \pm 0,01$ mg di TEC per ml di cellulosa modificata¹²⁵. Invece, quando la TEC era dispersa in plasma, nella seconda fase del test, il legame della TEC alle proteine plasmatiche ha attenuato e reso meno pronto l'adsorbimento del farmaco sul polimero in sospensione nel veicolo. Questo comportamento era prevedibile sulla base di quanto già investigato in altri lavori presenti in letteratura, ancorché le relative sperimentazioni erano volte a valutare l'adsorbimento della TEC in altre tecniche extracorporee (HDF e HF) e su altre matrici polimeriche (polisulfone)^{88,140}. Tuttavia, anche in plasma nello screening test, si è osservata una quantità maggiore di TEC adsorbita sul polimero rispetto al trattamento di DHP ($1,20 \pm 0,21$ mg di TEC adsorbita per 1,5 ml di polimero), confermando nuovamente la circostanza secondo cui la cartuccia non era satura del farmaco nella sperimentazione iniziale. Tale evidenza supporta le considerazioni precedentemente fatte sulla probabile necessità di un adeguamento del dosaggio della TEC con una dose supplementare, prima o durante ogni trattamento dialitico, quando la cartuccia Lixelle S-35 viene utilizzata. Queste osservazioni sul dosaggio della TEC peraltro sono suffragate dai risultati ottenuti nella quarta fase dello screening test, dove è stato valutato il possibile fenomeno di competizione tra la TEC e la $\beta 2$ -MG nel processo di adsorbimento sul polimero. Infatti, se da un lato si è osservata un'attenuazione dell'adsorbimento della TEC tra gli esperimenti condotti in soluzione salina e in plasma, dall'altro, si è riscontrato un incremento di adsorbimento dell'antimicrobico in questa fase della sperimentazione ($1,90 \pm 0,22$ mg di TEC adsorbita per 1,5 ml di polimero). Questa evidenza sperimentale potrebbe essere spiegata con la seguente ipotesi: la presenza della $\beta 2$ -MG incrementa l'adsorbimento sulla matrice polimerica della TEC. Tale assunto può essere considerato verosimile, in quanto non vi è stata una variazione importante di adsorbimento della $\beta 2$ -MG tra i test in plasma, dove essa era dispersa in assenza di TEC, e i test dove erano dispersi entrambi gli analiti per valutare la competizione. In altri termini, non c'è competizione tra TEC e $\beta 2$ -MG

nel processo di adsorbimento sul polimero di cellulosa modificata. Contrariamente, la presenza di β 2-MG potrebbe avere un sinergismo positivo nel processo di adsorbimento della TEC. L'assenza di competizione tra l'antimicrobico e la β 2-MG indica che nel polimero non vi sono siti specifici per il legame di ciascun analita, ma il processo di adsorbimento avviene grazie a legami intermolecolari dovuti a forze deboli, come inizialmente ipotizzato^{106,125}. Questo fatto trova riscontro anche nella struttura chimica di Lixelle. Infatti, sono probabilmente le catene esadeciliche che guidano un'interazione lipofila per entrambe le molecole in funzione del loro coefficiente di ripartizione acqua-olio: TEC e β 2-MG sono entrambe lipofile, ma in misura diversa¹²⁰. Un altro fattore che presumibilmente ha concorso all'incremento di adsorbimento osservato per la TEC, potrebbe essere legato al cambiamento di composizione del gel proteico che si forma sulle particelle di polimero per la presenza della β 2-MG¹⁴¹⁻¹⁴³. Nonostante lo screening test abbia evidenziato il ruolo del legame proteico della TEC nell'attenuare l'adsorbimento dell'antimicrobico, non ha escluso la necessità di un adeguamento del dosaggio del farmaco. Piuttosto, esso ha messo in evidenza la necessità di valutare la capacità effettiva di adsorbimento, in termini di massa di TEC in presenza di β 2-MG, che la cartuccia Lixelle S-35 è in grado di rimuovere. Ad ogni modo, se l'assenza di competizione nel test da un lato suggerisce un adsorbimento maggiore di TEC, dall'altro, conferma l'efficacia del dispositivo Lixelle S-35 nel rimuovere la β 2-MG anche in presenza dell'antimicrobico. Infatti, sia nel test in plasma con la sola β 2-MG, che nel test in presenza della TEC, un millilitro e mezzo di polimero ha adsorbito rispettivamente $1,42 \pm 0,18$ mg e $1,33 \pm 0,24$ mg di proteina. Entrambi questi valori rispecchiano la capacità di adsorbimento della cartuccia Lixelle S-35¹¹². Considerato il limite legato al veicolo nello studio con i glicopeptidi, la sperimentazione con GEN e TOB è stata condotta con un modello *in vitro* di DHP ottimizzato (si veda paragrafo 5.4). Indipendentemente dal PM inferiore, dalle diverse caratteristiche chimico-fisiche e le proprietà PK, l'adsorbimento dei due aminoglicosidi dispersi in sangue è stato repentino come per i glicopeptidi dispersi in soluzione salina. Questa somiglianza di comportamento, sta presumibilmente ad indicare che il fenomeno di adsorbimento è legato principalmente all'interazione diretta farmaco-polimero; e

ciò, indipendentemente dal veicolo in cui i farmaci sono dispersi¹¹⁷. Tuttavia, la quantità in termini di massa adsorbita sia per la GEN che per la TOB, alla fine del trattamento sperimentale di DHP, era nettamente inferiore rispetto a quella osservata per i glicopeptidi (GEN adsorbita $2,98 \pm 0,61$ mg; TOB $1,93 \pm 0,21$ mg). Questa discrepanza è imputabile alle loro caratteristiche chimico-fisiche, prima ancora che al mezzo biologico nel quale gli antimicrobici sono stati dispersi (sangue). Infatti, sia la GEN che la TOB sono due antimicrobici fortemente idrofilici e, questo, sicuramente ostacola l'interazione con le catene esadeciliche lipofile della cellulosa modificata contenuta nella cartuccia Lixelle S-35^{91,106,144}. In questo caso, il meccanismo di esclusione dovuto alla dimensione dei pori presenti sulla superficie della cellulosa modificata è probabilmente il principale meccanismo che determina la rimozione dei due aminoglicosidi¹²⁰. Questi ultimi, avendo un basso PM ed essendo molto solubili in acqua, quasi sicuramente rimangono in soluzione nell'acqua di bulk presente nei micropori e microcanali del polimero^{69,145}. Il plateau di adsorbimento della GEN è stato raggiunto immediatamente dopo 5 minuti di trattamento di DHP sperimentale. In questo intervallo di campionamento, la concentrazione plasmatica dell'antimicrobico è diminuita da $12,80 \pm 1,60$ mg/L a $7,10 \pm 0,17$ mg/L e, successivamente, si è mantenuta costante durante tutto l'esperimento, indicando un adsorbimento irreversibile del farmaco sul letto polimerico. Considerando la riduzione della concentrazione plasmatica e la quantità di massa adsorbita, si potrebbe pensare, dal punto di vista clinico, che la rimozione dell'antimicrobico da parte della cartuccia Lixelle S-35 non sia significativa. In realtà, bisogna tener presente che ai fini sperimentali, è stata utilizzata la concentrazione di picco della GEN. Se fosse stata utilizzata la concentrazione di valle del farmaco (2 mg/L), tutto l'antimicrobico circolante sarebbe stato adsorbito^{93,125}. Inoltre la GEN, come gli altri aminoglicosidi (TOB compresa), manifesta la sua attività battericida in funzione della sua concentrazione plasmatica, in quanto è un antimicrobico concentrazione dipendente¹⁴⁶. Quindi è chiaro che la riduzione della concentrazione plasmatica del paziente è un aspetto ancora più critico. Come già menzionato per VAN, bisogna considerare che la cartuccia Lixelle S-35 viene utilizzata in serie con un emodializzatore¹¹². In quest'ultimo dispositivo, la GEN

può attraversare la membrana, sia per diffusione che per convezione, dato il suo basso PM e il suo ridotto legame con le proteine plasmatiche¹⁴⁷. Dunque, la rimozione del farmaco è la somma dell'antimicrobico adsorbito sulla cartuccia Lixelle S-35 e di quello eliminato per trasporto attraverso la membrana dall'emodializzatore. Probabilmente, anche in questo caso, è necessaria una dose supplementare di GEN, prima o durante ogni sessione dialitica, per mantenere le concentrazioni plasmatiche all'interno della finestra terapeutica e massimizzare la sua efficacia. Un comportamento diverso è stato osservato per la TOB durante i trattamenti sperimentali di DHP. Nonostante l'antimicrobico sia stato adsorbito repentinamente dalla cartuccia Lixelle, seppur con una cinetica differente rispetto alla GEN, successivamente è stato in parte rilasciato. Infatti, l'analisi del bilancio di massa mostrava un massimo di adsorbimento dopo 5 minuti dall'inizio del trattamento, per poi diminuire nel tempo durante l'esperimento, raggiungendo un plateau tra i 60 e 120 minuti. In questo caso, il sistema *in vitro* di DHP si è comportato sempre come un modello bicompartimentale, ma il secondo compartimento era una sede di accumulo temporanea del farmaco^{133,134}. La TOB si è rapidamente distribuita nel compartimento principale (circuito e contenitore di riserva del veicolo) e nella cartuccia Lixelle S-35 (compartimento secondario). Successivamente, dal letto polimerico è stata rilasciata al compartimento principale ritornando in circolo nel sistema. Questo fenomeno di rebound della massa di antimicrobico circolante riflette presumibilmente da un lato, il carattere di idrofilia della TOB e, dall'altro, la variabilità del legame farmaco-proteico della molecola. La TOB è una molecola basica con tre siti di ionizzazione, le cui pK_a sono 6,7, 8,3 e 9,9: ciò significa che la molecola è sicuramente ionizzata a pH fisiologico¹⁴⁸. Si spiega così il legame reversibile con il letto polimerico di Lixelle, dove la cellulosa è stata appositamente modificata con le catene esadeciliche per renderla più lipofila. Generalmente, come riportato in letteratura, gli aminoglicosidi e, quindi anche la TOB, vengono adsorbiti da membrane cariche negativamente: si tratta pertanto di legami ionici e non forze deboli (legami a ponte idrogeno o forze di Van Der Waals)^{63,64}. Inoltre, sulla base del meccanismo di adsorbimento proposto sulla selezione molecolare a livello dei pori (cutoff medio 60000 Da), è chiaro che solamente la frazione libera di TOB,

non legata alle proteine plasmatiche, può passare nello spazio di bulk del polimero^{69,145}. È altresì noto in letteratura, che tra gli aminoglicosidi, la TOB è l'antimicrobico che presenta la maggiore variabilità nel legame con le proteine plasmatiche¹⁴⁹⁻¹⁵¹. Nonostante l'adsorbimento della TOB sia stato inferiore a quello della GEN, dal punto di vista clinico si possono fare delle considerazioni simili alle precedenti. Infatti, anche la TOB viene eliminata per diffusione e/o convezione, a seconda della tecnica dialitica, dall'emodializzatore^{98,126,152}. Ne consegue che la quota di TOB rimossa dal circolo sistemico sarà la somma tra quella eliminata con il trattamento dialitico e quella adsorbita dalla cartuccia Lixelle S-35. Come osservato per la GEN, una riduzione importante della concentrazione di picco della TOB si è verificata durante il trattamento di DHP sperimentale. Questa diminuzione del livello plasmatico di TOB avrebbe portato la concentrazione dell'antimicrobico al di fuori del range terapeutico se gli esperimenti fossero stati effettuati al valore di valle¹²⁵. Presumibilmente, anche per TOB, è necessaria una dose supplementare prima o durante il trattamento dialitico. Tuttavia, considerando il fenomeno di rebound osservato, rimane da comprendere se il rilascio del farmaco dal letto polimerico è terminato a 120 minuti, benché sia stato osservato un plateau, sia delle concentrazioni plasmatiche che della massa. Bisogna però tener presente il limite sperimentale legato al tempo di trattamento previsto dal protocollo di 2 ore di circolazione extracorporea. Un trattamento di HD standard, infatti, dura in media 4 ore¹⁵³. Ad ogni modo, si evidenzia come i risultati di questa sperimentazione con la TOB suggeriscano di monitorare i livelli plasmatici dell'antimicrobico dopo ogni sessione dialitica, quando la cartuccia Lixelle S-35 viene utilizzata. Ciò consentirebbe al clinico di adeguare il dosaggio del farmaco in funzione della rimozione extracorporea dell'antimicrobico.

7.2. L'interazione farmaco-membrana nella tecnica dell'emofiltrazione

Oggi, l'appropriata prescrizione degli antimicrobici nel paziente critico con sepsi severa o shock settico si basa sull'attenta valutazione dei parametri PK del farmaco utilizzato in relazione alla fisiopatologia del paziente¹⁵⁴. Diversi sono i

fattori che possono influenzare i parametri PK in questi pazienti, come ad esempio le variazioni del V_d o della CL totale del farmaco¹⁵⁵. Inoltre, il paziente critico, come conseguenza del quadro settico, spesso sviluppa IRA, che determina la necessità di un supporto della funzione renale mediante un trattamento extracorporeo continuo, ossia una terapia CRRT (Continuous Renal Replacement Therapy)¹⁵⁶. Tra le CRRT, uno dei trattamenti spesso prescritto è l'emofiltrazione continua veno-venosa o CVVH (Continuous Venovenous Hemofiltration)¹⁵⁶. Trattasi di un trattamento di natura puramente convettiva, ovvero un trattamento di HF. In questo contesto, la CVVH rappresenta un ulteriore parametro PK che determina dei cambiamenti della concentrazione plasmatica di un antimicrobico idrofilo caratterizzato da basso PM, basso legame con le proteine plasmatiche e basso V_d ⁵⁰. Tutte queste caratteristiche sono delle peculiarità dei due antimicrobici oggetto di questa sperimentazione: LZD e TOB (si veda paragrafo 4.3 per il LZD e paragrafo 4.2.2 per la TOB). Ne consegue, che entrambi i farmaci possono essere potenzialmente rimossi dal circolo sistemico durante il trattamento di HF per effetto del trasporto convettivo. In ogni caso, rimane da chiarire, sia per il LZD che per la TOB, il ruolo dell'interazione farmaco-polimero con le membrane in polisulfone frequentemente utilizzate nei trattamenti CVVH¹⁵⁷. Dati limitati di letteratura sono disponibili sulla rimozione *in vivo* del LZD, durante i diversi trattamenti CRRT¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. Inoltre questi lavori, oltre a riportare differenti valori di CL extracorporea, suggeriscono che non è necessaria alcuna modifica dello schema posologico del LZD, durante i trattamenti CRRT oggetto di studio. Tuttavia, Shiraishi et al nel loro lavoro hanno sviluppato un screening test *in vitro*, in condizioni statiche, per valutare l'adsorbimento su diverse membrane di antimicrobici utilizzati nel trattamento delle infezioni sostenute da MRSA⁸⁸. I risultati di questo studio sono parzialmente in accordo con la sperimentazione presentata in questo elaborato, poiché hanno evidenziato una possibile interazione farmaco-membrana tra il LZD e il polisulfone, ancorché difetti una valutazione di questo fenomeno in condizioni dinamiche. Infatti, in questo studio *in vitro*, è stato valutato il profilo PK del LZD durante il trattamento di HF. Viceversa, non vi sono dati in letteratura che mettono in evidenza l'interazione farmaco-membrana durante l'HF con membrana in polisulfone per la TOB. Gli unici lavori che hanno

valutato il fenomeno di adsorbimento durante l'HF riguardano altri antimicrobici aminoglicosidici su membrane in poliacrilonitrile e poliammide^{63,95}. Le evidenze parziali in letteratura relative al LZD e la totale assenza di dati oggettivi sulla TOB, fattori che permettono di fare delle considerazioni razionali sul dosaggio di questi farmaci, hanno guidato questo studio *in vitro*, per definire la PK extracorporea di questi antimicrobici durante l'HF con membrana in polisulfone. Nei trattamenti di HF la rimozione di farmaco avviene fino a cutoff della membrana, in funzione del PM della molecola. Fermo restando che solo la frazione libera, non legata alle proteine, può attraversare la membrana per trasporto convettivo¹⁶¹. Nella sperimentazione con il LZD, il farmaco, nonostante il suo basso PM, se comparato al cutoff della membrana (50000 Da) e al suo basso legame farmaco-proteico, non ha attraversato completamente la membrana in polisulfone nei primi 10 minuti. Ciò indica un importante e repentino adsorbimento dell'antimicrobico sulla membrana, sia in soluzione salina che in sangue. Dal bilancio di massa, è emerso che questa quantità di LZD adsorbita sulla membrana è il massimo valore osservato durante i trattamenti di HF con i due veicoli. Successivamente, tale bilancio indicava che l'antimicrobico è stato rilasciato dalla membrana, con una riduzione progressiva della massa adsorbita durante gli esperimenti. Anche in questo caso, il modello *in vitro* di HF si è comportato come un sistema bicompartimentale, in maniera del tutto analoga a quanto osservato nei trattamenti di DHP con la TOB nella sperimentazione con gli aminoglicosidi (si veda paragrafo 7.1). La membrana si è dimostrata un compartimento di accumulo temporaneo del LZD, delineando un profilo cinetico di adsorbimento sul polisulfone e successivo rilascio del farmaco alla circolazione extracorporea^{133,134}. Questo adsorbimento reversibile dell'antimicrobico sulla membrana è sicuramente legato alla formazione di legami deboli, non covalenti, farmaco-membrana (legami a ponte idrogeno e/o forze di Van Der Waals)^{125,162}. Tale cinetica, riflette presumibilmente, da un lato, l'equilibrio idrolipofilo intrinseco del LZD e dall'altro, i parametri del trattamento di HF sperimentale. Infatti, nonostante il LZD sia classificato come antimicrobico idrofilo, di per sé la molecola presenta un coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua paragonabile ($X_{logP3} = 0,7$) a quello della TEC ($X_{logP3} = 0,3$); ed è noto che quest'ultimo

antimicrobico viene adsorbito in maniera irreversibile dalle membrane in polisulfone^{88,140,163}. Inoltre, dati i bassi flussi Q_B e Q_{UF} utilizzati durante i trattamenti sperimentali di HF, i tempi di contatto tra il farmaco ed il polimero risultano aumentati rispetto ad un trattamento *in vivo*⁴⁸. Tuttavia, il fenomeno di rebound delle concentrazioni, non si è concluso al termine dei trattamenti sperimentali, sia in soluzione salina che in sangue. Ciò è dimostrato dalle concentrazioni di LZD osservate nelle linee arteriosa, venosa e dell'ultrafiltrato durante gli esperimenti. Dopo i primi 10 minuti di trattamento di HF, le concentrazioni continuano ad aumentare senza raggiungere un plateau a 240 minuti, indicando che il LZD è rimasto parzialmente adsorbito sulla membrana in polisulfone. Il profilo cinetico di adsorbimento-rilascio dell'antimicrobico, sulla e dalla membrana, è stato simile per gli esperimenti condotti in soluzione salina e in sangue, come dimostra, del resto, la buona correlazione tra i delta di adsorbimento nei due veicoli ($R^2=0,86$). La sovrapposibilità dei profili cinetici indica probabilmente che il fenomeno di rebound osservato è imputabile principalmente ad una interazione farmaco-membrana, piuttosto che alla formazione di un cake proteico sulla superficie interna delle fibre cave del filtro^{164,165}. Infatti, il veicolo sangue ha causato solamente un incremento della variazione percentuale della concentrazione iniziale di antimicrobico presente nella sacca che fungeva da riserva, nell'analisi del $\% \Delta C_{baseline}$. Una possibile spiegazione a questo fenomeno è la seguente: se il LZD ha un legame proteico del 30%, la formazione del cake proteico, all'interno delle fibre cave, aumenta l'adsorbimento del farmaco e, quindi, risulta più marcato il fenomeno di rebound delle concentrazioni. Nei trattamenti sperimentali di HF, le concentrazioni iniziali dell'antimicrobico sono diminuite da $17,24 \pm 0,54$ mg/L a $9,73 \pm 4,85$ mg/L e da $11,75 \pm 0,08$ mg/L a $5,01 \pm 0,67$ mg/L, rispettivamente in soluzione salina e in sangue. Tali valori, rilevati dopo 10 minuti di esperimento, sono stati le maggiori variazioni osservate. Nonostante questo importante cambiamento delle concentrazioni, i livelli di LZD sono rimasti al di sopra dei 4 mg/L. Tale ultimo valore è l'attuale break point per le infezioni sostenute da MRSA e ciò significa che il LZD mantiene la sua efficacia contro questi ceppi batterici¹⁶⁶. Tuttavia, bisogna considerare che gli esperimenti sono stati condotti alla concentrazione di picco dell'antimicrobico. Se

fossero stati effettuati alle concentrazioni di valle del LZD, il suo livello plasmatico sarebbe sceso al di sotto dei 2 mg/L, ossia al di sotto del livello efficace per i ceppi Gram-positivi suscettibili^{125,167}. L'efficacia del trattamento con il LZD, è strettamente correlata alla sua concentrazione plasmatica, in quanto trattasi di antimicrobico tempo dipendente¹⁰². Ciò significa che una sottoesposizione del paziente al farmaco, si può verificare nel caso di un trattamento di HF come la CVVH. Rimane tuttavia da comprendere se il fenomeno di rilascio del LZD dalla membrana in polisulfone è completato. Sul punto sono sicuramente necessarie ulteriori indagini per meglio definire il fenomeno di ridistribuzione del farmaco (dalla membrana al circolo sistemico) prima di suggerire una dose supplementare all'inizio o durante un trattamento di HF, soprattutto nelle tecniche continue come la CVVH. Ad ogni modo, questa sperimentazione suggerisce che il monitoraggio delle concentrazioni plasmatiche del LZD è fondamentale durante i trattamenti di HF (ma anche di HDF) quando vengono utilizzati dei filtri in polisulfone. Questo per ragioni di efficacia terapeutica e per evitare lo sviluppo di ceppi resistenti al farmaco¹⁶⁸. Un altro aspetto degno di nota è la variazione del Sc osservato rispetto al predetto. Quest'ultimo, calcolato sulla base del legame farmaco-proteico dell'antimicrobico, è solitamente un parametro PK che viene utilizzato per predire la rimozione del farmaco nei trattamenti extracorporei basati sul trasporto convettivo¹⁶⁹. Durante i trattamenti di HF, il Sc osservato è risultato inferiore rispetto a quello predetto nei primi 10 minuti di esperimento, sia per il veicolo sangue che per la soluzione salina. Successivamente, il Sc osservato è aumentato progressivamente sino a superare quello predetto in sangue, ma non nella soluzione salina. Questo andamento del Sc , imputabile al fenomeno di ridistribuzione del farmaco dalla membrana, indica che il Sc predetto non può essere considerato un parametro PK affidabile per adeguare il dosaggio del LZD nei trattamenti di HF con membrana in polisulfone. Ciò è stato confermato anche dalla $CL_{convective}$ e dal $J_{convective}$. Un diverso comportamento è stato osservato, invece, tra gli esperimenti con la TOB, in soluzione salina e in sangue. Questa discrepanza è ben descritta dai risultati dei diversi parametri analizzati, oltre che dal confronto dei profili cinetici messi in correlazione per i delta di adsorbimento

tra i due veicoli di dispersione del farmaco nel tempo (R^2 0,13). Nei trattamenti sperimentali di HF operati in soluzione salina, la TOB ha mostrato un comportamento analogo a quello del LZD¹⁷⁰. Nei primi 10 minuti di HF, la TOB non ha attraversato completamente la membrana, nonostante il suo basso PM. Questo lo si evince dalla concentrazione osservata nella linea arteriosa, di gran lunga maggiore rispetto alle concentrazioni ricavate dalle linee venosa e dell'ultrafiltrato. Nei successivi intervalli di campionamento, più precisamente a 30, 60 e 120 minuti, le concentrazioni nelle linee si eguagliano. Infine, a 240 minuti di trattamento, le concentrazioni nella linea venosa e nell'ultrafiltrato, si fanno maggiori rispetto alla concentrazione in arteria. Questo andamento delle concentrazioni indica, inequivocabilmente, un adsorbimento iniziale della TOB sulla membrana, seguito dal suo rilascio (fenomeno rebound). Ciò è stato confermato innanzitutto dal bilancio di massa, ma anche dagli altri parametri sperimentali analizzati (Sc , $CL_{convective}$ e $J_{convective}$). L'interazione reversibile farmaco-membrana può essere spiegata con l'incapacità della TOB di formare un numero sufficiente di legami deboli (legami a ponte idrogeno e/o forze di Van Der Waals) con il polisulfone, tale da essere trattenuta^{125,162}. Come precedentemente discusso per la sperimentazione con gli aminoglicosidi in DHP (si veda paragrafo 7.1), la TOB è una molecola idrofila policationica che difficilmente interagisce con un polimero lipofilo come il polisulfone¹⁴⁸. Nei lavori di Tiam, Lam e Krofol, gli aminoglicosidi sono stati adsorbiti su membrane in poliacrilonitrile o poliammide, le quali mostrano rispettivamente un potenziale zeta di -70 ± 5 mV e -60 ± 4 mV, mentre il polisulfone ha un potenziale zeta di -5 ± 1 mV^{63,64,95,171}. Nei trattamenti di HF operanti in sangue, le concentrazioni osservate nelle linee arteriosa e venosa si sono mantenute simili durante tutto l'esperimento. Mentre le concentrazioni, nella linea dell'ultrafiltrato si sono mostrate inferiori rispetto a quelle osservate nelle altre due linee. Ciò si spiega con il legame farmaco-proteico della TOB, poiché solo la frazione di farmaco non legata alle proteine plasmatiche può attraversare la membrana per trasporto convettivo¹⁶¹. L'andamento delle concentrazioni nella linea dell'ultrafiltrato, ha evidenziato nel primo intervallo di campionamento (10 minuti) una concentrazione di poco inferiore rispetto ai livelli di TOB a 30, 60, 120 e 240 minuti. Questo trend della concentrazione

nell'ultrafiltrato, indicava un adsorbimento del farmaco sulla membrana, confermato dall'andamento del Sc . Infatti, quest'ultimo nei primi 10 minuti di trattamento era di $0,44 \pm 0,05$ e, successivamente, ha raggiunto un plateau mostrando i seguenti valori: $0,51 \pm 0,04$, $0,53 \pm 0,04$, $0,53 \pm 0,01$ e $0,52 \pm 0,03$. Tuttavia, dall'analisi del bilancio di massa è emerso che si trattava di un valore di adsorbimento sicuramente trascurabile dal punto di vista clinico. Infatti, la quota adsorbita sulla membrana in polisulfone, al termine del trattamento sperimentale di HF, era di $0,35 \pm 0,13$ mg, a fronte di una massa iniziale introdotta nel sistema di $4,12 \pm 1,04$ mg. Probabilmente, questo adsorbimento sul polisulfone è legato non tanto all'interazione diretta farmaco-polimero, ma piuttosto alla formazione del cake proteico sulla superficie interna delle fibre cave della membrana^{164,165}. In altri termini, se le proteine plasmatiche sono responsabili della formazione del cake proteico, la TOB legandosi ad esse si adsorbe sulla membrana. Questa cinetica differente osservata per la TOB, negli esperimenti con sangue, spiega come il veicolo salino sia poco attendibile per la costruzione di modelli *in vitro*, utili a definire l'eliminazione extracorporea di un farmaco, nonostante questo sia ampiamente accettato in letteratura¹¹⁷. Sulla base di quanto discusso e indipendentemente dagli esperimenti condotti con soluzione salina, questo studio suggerisce che la TOB, durante i trattamenti di HF, viene eliminata principalmente per trasporto convettivo, in funzione del suo legame farmaco-proteico^{50,56,169}. In questo caso, il Sc predetto può essere considerato un parametro PK affidabile per adeguare il dosaggio del TOB nei trattamenti di HF con membrana in polisulfone. Da ultimo, considerando il Sc osservato negli esperimenti con sangue e la $CL_{convective}$ che ne deriva, il dosaggio della TOB dovrebbe essere adeguato in funzione del Q_{UF} indicato nella prescrizione dialitica di quei pazienti sottoposti ad un trattamento di HF, come la CVVH.

CAPITOLO 8

CONCLUSIONI

Approcci razionali per l'adeguamento delle dosi

Il corretto e razionale adeguamento del dosaggio degli antimicrobici nelle terapie renali sostitutive, siano esse intermittenti o continue, richiede la comprensione delle caratteristiche di CL delle differenti tecniche dialitiche e la conoscenza delle proprietà chimico-fisiche della molecola in relazione ai parametri PK. La rimozione extracorporea di un farmaco, infatti, può essere ricavata da questi dati. Nell'intento di indagare su questi parametri, il progetto di ricerca presentato e discusso in questo elaborato, dimostra come l'uso di sistemi *in vitro* ad organi artificiali isolati permetta di valutare l'eliminazione extracorporea degli antimicrobici quale tappa accessoria del processo ADME. In questo contesto, tali modelli si configurano come strumenti preliminari essenziali per investigare sulle modifiche del profilo PK di un antimicrobico. Ciò consente l'acquisizione di nuove informazioni utili per un approccio clinico mirato a massimizzare l'efficacia del trattamento antibiotico e a prevenire lo sviluppo di ceppi resistenti ed effetti tossici del farmaco. Nell'ambito del progetto, sono stati sviluppati e ottimizzati dei sistemi *in vitro* di HP e di HF, allo scopo di indagare sul fenomeno dell'adsorbimento degli antimicrobici durante la circolazione extracorporea, fenomeno scarsamente investigato in letteratura. Inoltre, è stato messo a punto un tool *in vitro*, come test di screening, per valutare il fenomeno della competizione tra molecole nel processo di adsorbimento. Nelle fasi progettuali e nei protocolli di studio, particolare attenzione è stata posta sui parametri tecnici dei trattamenti e nell'allestimento dei veicoli per gli esperimenti. L'obiettivo è stato quello di ottenere dei risultati coerenti da poter trasporre *in vivo* quanto osservato *in vitro*, nell'ottica bench-to-bedside. Sulla base di questo approccio, il primo sistema *in vitro* di DHP ha evidenziato un'elevata capacità di rimozione dal circolo extracorporeo e, quindi, presumibilmente dal circolo sistemico *in vivo*, dei

glicopeptidi TEC e VAN da parte della cartuccia Lixelle S-35. In particolare, il polimero di cellulosa modificata contenuto nel dispositivo si è dimostrato capace di legare la TEC in misura maggiore rispetto alla VAN, durante la tecnica di DHP. Infatti, nel test di screening, l'adsorbimento osservato per la TEC ha indicato che nella sperimentazione in condizioni dinamiche (DHP), la cartuccia Lixelle S-35 non era satura dell'antimicrobico, nonostante il legame proteico del farmaco attenui il fenomeno di adsorbimento. Inoltre, non essendovi siti specifici di legame per la TEC e per la β 2-MG non vi è competizione tra i due composti, anzi, sembra che la presenza della proteina (β 2-MG) favorisca l'adsorbimento dell'antimicrobico. Il fenomeno di adsorbimento si è mostrato irreversibile sia per la TEC, sia per la VAN e, seppur in misura diversa, ha aumentato il loro V_d se si considera la cartuccia come un ulteriore compartimento dove il farmaco si deve distribuire una volta somministrato. Le evidenze sperimentali indicano che, quando la cartuccia Lixelle S-35 viene utilizzata per il trattamento della DRA nei pazienti con IRC, è necessario impiegare una dose supplementare per entrambi i glicopeptidi. La dose supplementare potrebbe essere somministrata immediatamente prima di iniziare il trattamento dialitico, nel caso in cui la concentrazione plasmatica dell'antimicrobico del paziente sia la concentrazione di valle. Ciò eviterebbe la diminuzione dei livelli plasmatici al di sotto del limite inferiore della finestra terapeutica, con conseguente sottoesposizione del paziente al farmaco (inefficacia del trattamento farmacologico). In alternativa, la dose supplementare dell'antimicrobico potrebbe essere somministrata durante il trattamento dialitico se il paziente presenta una concentrazione plasmatica di picco. È evidente che tale criterio si propone di evitare concentrazioni al di sopra del limite superiore della finestra terapeutica, ossia dei livelli plasmatici che metterebbero a rischio il paziente per i loro effetti indesiderati (tossicità del trattamento farmacologico). In altri termini, deve essere presa in considerazione la frequenza di somministrazione dell'antimicrobico, per poter somministrare al tempo opportuno la dose supplementare del farmaco. Fermo restando che i glicopeptidi sono antibiotici tempo dipendenti, l'obiettivo diviene, quindi, quello di mantenere la loro concentrazione plasmatica all'interno della finestra terapeutica. Secondo queste considerazioni, una dose supplementare, prima o

durante la sessione dialitica, dovrebbe essere somministrata anche per la GEN: questo è quanto è emerso dallo studio sugli aminoglicosidi utilizzando il secondo sistema *in vitro* di DHP ottimizzato. Dal punto di vista qualitativo, la GEN ha mostrato un profilo farmacocinetico di adsorbimento sovrapponibile a quello dei glicopeptidi: è stata rapidamente adsorbita in maniera irreversibile durante il trattamento di DHP. Tuttavia, sotto il profilo quantitativo, la quantità di massa di antimicrobico rimossa è risultata nettamente inferiore, se paragonata sia alla VAN sia alla TEC. Ciò riflette il carattere idrofilo che di fatto ha condizionato il fenomeno di adsorbimento sul polimero. In ogni caso, la quantità di GEN rimossa è comunque significativa ai fini clinici se si considera il suo intervallo terapeutico nettamente inferiore a quello dei due glicopeptidi oggetto di studio. La stessa è inoltre un antimicrobico concentrazione dipendente: i livelli plasmatici del farmaco devono essere quindi prossimi al picco per manifestare la sua attività battericida. Diverso è stato il comportamento della TOB, la quale dopo essere stata rapidamente adsorbita dalla cartuccia Lixelle S-35, è stata rilasciata. Probabilmente questa cinetica è imputabile, da un lato, alla maggior idrofilia della molecola e, dall'altro, alla variabilità del legame farmaco-proteico. Il fenomeno di ridistribuzione osservato suggerisce di monitorare le concentrazioni plasmatiche della TOB dopo il trattamento dialitico con Lixelle S-35 prima di considerare una dose supplementare del farmaco. Un tale approccio trova peraltro ragione se si considera la nefrotossicità della TOB. Le differenti cinetiche di interazione farmaco-polimero sottintendono, inoltre, dei diversi meccanismi di adsorbimento per i glicopeptidi e gli aminoglicosidi. Al di là delle ipotesi discusse, ciò che appare chiaro è che il meccanismo di esclusione molecolare del polimero (basato sul PM di una molecola in rapporto alle dimensioni), non può essere considerato predittivo ai fini della rimozione di un farmaco. Il fenomeno della ridistribuzione, come conseguenza del processo di adsorbimento, si è presentato anche per il LZD, nella sperimentazione con il sistema *in vitro* miniaturizzato di HF. Il profilo cinetico di adsorbimento-rilascio del farmaco in HF ha ostacolato il trasporto del LZD attraverso la membrana in polisulfone, con conseguente rebound delle concentrazioni plasmatiche dell'antimicrobico. Pertanto, si può dedurre che il *Sc* predetto non può essere considerato dal clinico un parametro PK attendibile per

stimare la rimozione del farmaco durante i trattamenti di HF. Nonostante le considerazioni fatte sulle concentrazioni di picco e di valle, rimane da chiarire se il fenomeno di rilascio del LZD dalla membrana in polisulfone è completato. Ciò è suggerito dal principale limite dello studio legato al tempo di simulazione del trattamento (240 minuti), in relazione al carattere di continuità della tecnica di HF, nei pazienti con IRA. Queste evidenze sperimentali non permettono di affermare la necessità di adeguare il dosaggio del LZD, nei pazienti sottoposti ad HF con membrana in polisulfone. Il razionale approccio, per una eventuale modifica dello schema posologico del LZD, dovrebbe essere basato sul monitoraggio delle concentrazioni plasmatiche durante l'HF. Ciò permette di comprendere se e per quanto tempo, la concentrazione plasmatica del farmaco scende al di sotto del limite inferiore della finestra terapeutica, dato che il LZD è un antimicrobico tempo dipendente. L'adsorbimento sulla membrana in polisulfone, durante il trattamento sperimentale di HF, può essere considerato trascurabile per la TOB. Questo comportamento dipende dalle caratteristiche chimico-fisiche della TOB, in quanto farmaco policationico che, a differenza del LZD, non è in grado di formare dei legami deboli (legami a ponte idrogeno e/o forze di Van Der Waals) con il polisulfone. In questo caso, il Sc predetto può essere considerato un parametro PK affidabile dal clinico per valutare la rimozione del farmaco durante l'HF. Sulla base delle evidenze sperimentali, inoltre, la TOB viene eliminata per trasporto convettivo in HF, in relazione al suo legame farmaco-proteico. Pertanto, l'adeguamento del dosaggio della TOB dovrebbe considerare la prescrizione dialitica, in termini di Q_{UF} , poiché dall'ultrafiltrazione dipende l'eliminazione della frazione libera del farmaco (non legata alle proteine plasmatiche) durante l'HF. In ogni caso, la dose o le dosi supplementari di TOB hanno l'obiettivo di massimizzare i suoi livelli plasmatici, poiché è un antimicrobico concentrazione dipendente. I risultati del progetto di ricerca presentati in questo elaborato, descrivono dunque le caratteristiche di CL extracorporea di antimicrobici comunemente utilizzati nei pazienti affetti da IRC ed IRA sottoposti a specifici trattamenti dialitici (HP e HF). Gli approcci suggeriti per l'adeguamento del dosaggio di ciascun antimicrobico, si basano sulle proprietà chimico-fisiche della molecola in relazione ai parametri PK e sugli aspetti tecnici specifici di ciascuna

procedura depurativa. Queste evidenze si inseriscono nel contesto clinico supportando il medico prescrittore che, chiarito l'intimo meccanismo di rimozione extracorporea, può focalizzare la sua attenzione sulla fisiopatologia del paziente. Quest'ultima, infatti, può modificare in maniera sostanziale la PK della molecola, pertanto deve essere attentamente valutata unitamente alle caratteristiche di CL extracorporea dell'antimicrobico.

APPENDICE

<i>Equazioni e Parametri Sperimentali di analisi</i>		
<i>Modello di emoperfusione diretta con i glicopeptidi</i>		
n.	Equazione	Descrizione
5.1	$M_{ADS_{total}} = MBA_{t=0} - MBA_{t=120}$	$M_{ADS_{total}}$ è la massa totale di antimicrobico adsorbita sul letto polimerico della cartuccia al termine dell'esperimento.
5.2	$MBA_{t=0} = C_{t=0} \times V_{t=0}$	$MBA_{t=0}$ è la massa totale di antimicrobico introdotta nel sistema al tempo zero ($t=0$). $C_{t=0}$ e $V_{t=0}$ sono, rispettivamente, la concentrazione dell'antimicrobico e il volume della soluzione del farmaco prima di iniziare l'esperimento.
5.3	$MBA_{t=120} = Cout_{t=120} \times V_{t=120}$	$MBA_{t=120}$ è la massa libera (non adsorbita) dell'antimicrobico al termine dell'esperimento (120 min). $Cout_{t=120}$ e $V_{t=120}$ sono, rispettivamente, la concentrazione dell'antimicrobico in uscita dalla cartuccia (linea venosa) e il volume della soluzione del farmaco al termine dell'esperimento (120 min).
5.4	$M_{ADS_{t=i}} = MBA_{t=0} - MBA_{t=i}$	$M_{ADS_{t=i}}$ è la massa di antimicrobico adsorbita sul letto polimerico della cartuccia al tempo i (dove i indica gli intervalli di 10 e 60 min).
5.5	$MBA_{t=i} = Cout_{t=i} \times V_{t=i}$	$MBA_{t=i}$ è la massa libera (non adsorbita) dell'antimicrobico al tempo i (dove i indica gli intervalli di 10 e 60 min). $Cout_{t=i}$ e $V_{t=i}$ sono, rispettivamente, la concentrazione dell'antimicrobico in uscita dalla cartuccia (linea venosa) e il volume di soluzione del farmaco al tempo i .

Modello di emoperfusione diretta con gli aminoglicosidi		
n.	Equazione	Descrizione
5.6	$ADS_{trend} = \frac{Cp_{out}}{Cp_{in}}$	<p>ADS_{trend} è il trend di adsorbimento dell'antimicrobico durante l'emoperfusione diretta.</p> <p>Cp_{in} e Cp_{out} sono, rispettivamente, le concentrazioni dell'antimicrobico in entrata (linea arteriosa) e in uscita (linea venosa) dalla cartuccia.</p>
5.7	$MBA_{t=0} = Cp \times Vp_{t=0}$	<p>$MBA_{t=0}$ è la massa totale di antimicrobico introdotta nel sistema al tempo zero ($t=0$).</p> <p>Cp è la concentrazione plasmatica dell'antimicrobico prima di iniziare l'esperimento.</p> <p>$Vp_{t=0}$ è la frazione totale di plasma in volume del veicolo sangue (dove è disperso l'antimicrobico) prima di iniziare l'esperimento.</p>
5.8	$Vp_{t=0} = Vb_{t=0} \times \left(\frac{100 - \%HCT}{100} \right)$	<p>$Vp_{t=0}$ è stato calcolato considerando il volume totale di sangue e il suo HCT.</p> <p>$Vb_{t=0}$ è il volume totale di sangue (dove è disperso l'antimicrobico) prima di iniziare l'esperimento.</p>
5.9	$MBA_{t=i} = Cp_{out\ t=i} \times (Vp_{t=0} - Vp_{samples})$	<p>$MBA_{t=i}$ è la massa libera (non adsorbita) dell'antimicrobico al tempo $t=i$ (dove i indica gli intervalli di 5, 10, 60 e 120 min).</p> <p>$Cp_{out\ t=i}$ è la concentrazione plasmatica dell'antimicrobico in uscita dalla cartuccia (linea venosa) al tempo i.</p> <p>$Vp_{samples}$ è il volume di plasma dei campioni prelevati durante l'esperimento.</p>
5.10	$M_ADS_{t=i} = MBA_{t=0} - MBA_{t=i}$	<p>$M_ADS_{t=i}$ è la massa di antimicrobico adsorbita sul letto polimerico della cartuccia al tempo i (dove i indica gli intervalli di 5, 10, 60 e 120 min).</p>

5.11	$KTC_{profile} = \frac{M_{ADS_{t=i}}}{MBA_{t=i}}$	$KTC_{profile}$ è il profilo cinetico di adsorbimento-rilascio dell'antimicrobico durante l'emoperfusione diretta.
5.12	$\%ADS_{rate} = \frac{M_{ADS_{t=i}}}{MBA_{t=0}} \times 100$	$\%ADS_{rate}$ è la percentuale di adsorbimento dell'antimicrobico durante l'emoperfusione diretta.
Screening test: valutazione del legame competitivo tra teicoplanina e $\beta 2$ -microglobulina		
n.	Equazione	Descrizione
5.13	$MBA_{t=0} = C_{t=0} \times V_{t=0}$	<p>$MBA_{t=0}$ è la massa libera totale dell'antimicrobico o della $\beta 2$-microglobulina presente nel veicolo (soluzione salina o plasma) al tempo zero ($t=0$).</p> <p>$C_{t=0}$ è la concentrazione plasmatica dell'antimicrobico o della $\beta 2$-microglobulina presente nel veicolo (soluzione salina o plasma) prima di iniziare l'esperimento ($t=0$).</p> <p>$V_{t=0}$ è il volume totale del veicolo (soluzione salina o plasma) utilizzato per ogni esperimento.</p>
5.14	$MBA_{t=i} = C_{t=i} \times (V_{t=0} - V_{samples})$	<p>$MBA_{t=i}$ è la massa libera (non adsorbita) dell'antimicrobico o della $\beta 2$-microglobulina al tempo i (dove i indica gli intervalli di 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 20, 30, 60 e 120 min).</p> <p>$C_{t=i}$ è la concentrazione plasmatica dell'antimicrobico o della $\beta 2$-microglobulina presente nel veicolo (soluzione salina o plasma) al tempo i.</p> <p>$V_{samples}$ è il volume di veicolo (soluzione salina o plasma) dei campioni prelevati durante l'esperimento.</p>
5.15	$M_{ADS_{t=i}} = MBA_{t=0} - MBA_{t=i}$	$M_{ADS_{t=i}}$ è la massa adsorbita dell'antimicrobico o della $\beta 2$ -microglobulina al tempo i (dove i indica gli intervalli di 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 20, 30, 60 e 120 min).
5.16	$K_{ADS_{profile}} = \frac{M_{ADS_{t=i}}}{MBA_{t=0}}$	$K_{ADS_{profile}}$ è il profilo cinetico di adsorbimento dell'antimicrobico o della $\beta 2$ -microglobulina durante l'esperimento.

5.17	$\Delta C = C_{t=0} - C_{t=120}$	ΔC è il delta concentrazione ottenuto per differenza tra la concentrazione iniziale ($C_{t=0}$) e finale ($C_{t=120}$) dell'antimicrobico o della $\beta 2$ -microglobulina nel test sperimentale.
<i>Modello di emofiltrazione con il linezolid e la tobramicina</i>		
n.	Equazione	Descrizione
5.18	$Sc = \frac{2C_{uf}}{C_{in} + C_{out}}$	<p>Sc è il coefficiente di sieving dell'antimicrobico osservato durante l'emofiltrazione.</p> <p>C_{uf} è la concentrazione dell'antimicrobico presente nell'ultrafiltrato.</p> <p>C_{in} e C_{out} sono, rispettivamente, le concentrazioni dell'antimicrobico in entrata (linea arteriosa) e in uscita (linea venosa) al filtro.</p>
5.19	$CL_{convective} = Sc \times Q_{UF}$	<p>$CL_{convective}$ è la clearance convettiva dell'antimicrobico osservata durante l'emofiltrazione.</p> <p>Q_{UF} è il flusso dell'ultrafiltrato utilizzato durante l'esperimento.</p>
5.20	$J_{convective} = Sc \times Q_{UF} \times C_{uf}$	$J_{convective}$ è il flusso in massa dell'antimicrobico osservato durante l'emofiltrazione.
5.21	$S_{MBA_{t=0}} = C_{S_{t=0}} \times V_{S_{t=0}}$	<p>$S_{MBA_{t=0}}$ è la massa libera totale dell'antimicrobico in soluzione salina introdotta nel sistema al tempo zero ($t=0$).</p> <p>$C_{S_{t=0}}$ è la concentrazione dell'antimicrobico in soluzione salina al $t=0$.</p> <p>$V_{S_{t=0}}$ è il volume totale di soluzione salina utilizzato per ogni esperimento al $t=0$.</p>

5.22	$B_MBA_{t=0} = Cp_{t=0} \times \left[Vb_{t=0} \times \left(\frac{100 - \%HCT}{100} \right) \right]$	<p>$B_MBA_{t=0}$ è la massa libera totale dell'antimicrobico in sangue introdotta nel sistema al tempo zero ($t=0$). $B_MBA_{t=0}$ è stato calcolato considerando il volume totale di sangue e il suo HCT.</p> <p>$Cp_{t=0}$ è la concentrazione plasmatica dell'antimicrobico al $t=0$.</p> <p>$Vb_{t=0}$ è il volume totale di sangue (dove è disperso l'antimicrobico) prima di iniziare l'esperimento.</p>
5.23	$S_MBA_{t=i} = Cs_{in,t=i} \times (Vs_{t=0} - Vs_{samples})$	<p>$S_MBA_{t=i}$ è la massa libera (non adsorbita) dell'antimicrobico in soluzione salina al tempo i (dove i indica gli intervalli di 10, 30, 60, 120 e 240 min).</p> <p>$Cs_{in,t=i}$ è la concentrazione dell'antimicrobico in soluzione salina in entrata al filtro (linea arteriosa) al tempo i.</p> <p>$Vs_{samples}$ è il volume di soluzione salina dei campioni prelevati durante l'esperimento.</p>
5.24	$B_MBA_{t=i} = Cp_{in,t=i} \times \left[(Vb_{t=0} - Vb_{samples}) \times \left(\frac{100 - \%HCT}{100} \right) \right]$	<p>$B_MBA_{t=i}$ è la massa libera (non adsorbita) dell'antimicrobico in sangue al tempo i (dove i indica gli intervalli di 10, 30, 60, 120 e 240 min). $B_MBA_{t=i}$ è stato calcolato considerando il volume totale di sangue e il suo HCT.</p> <p>$Cp_{in,t=i}$ è la concentrazione plasmatica dell'antimicrobico in entrata al filtro (linea arteriosa) al tempo i.</p> <p>$Vb_{samples}$ è il volume di sangue dei campioni prelevati durante l'esperimento.</p>
5.25	$SM_ADS_{t=i} = S_MBA_{t=0} - S_MBA_{t=i}$	<p>$SM_ADS_{t=i}$ è la massa di antimicrobico adsorbita in soluzione salina al tempo i (dove i indica gli intervalli di 10, 30, 60, 120 e 240 min).</p>
5.26	$BM_ADS_{t=i} = B_MBA_{t=0} - B_MBA_{t=i}$	<p>$BM_ADS_{t=i}$ è la massa di antimicrobico adsorbita in sangue al tempo i (dove i indica gli intervalli di 10, 30, 60, 120 e 240 min).</p>

5.27	$\Delta Adsorption = SM_ADS_{t=i} - BM_ADS_{t=i}$	<p>$\Delta Adsorption$ è la differenza tra la massa dell'antimicrobico adsorbita in soluzione salina ($SM_ADS_{t=i}$) e in sangue ($BM_ADS_{t=i}$) al tempo i (dove i indica gli intervalli di 10, 30, 60, 120 e 240 min).</p>
5.28	$\% \Delta C_{baseline} = \frac{C_{in,t=i}}{C_{baseline}} \times 100$	<p>$\% \Delta C_{baseline}$ è la variazione percentuale della concentrazione iniziale calcolata sia per gli esperimenti in soluzione salina che in sangue.</p> <p>$C_{in,t=i}$ è la concentrazione dell'antimicrobico in soluzione salina o in sangue in entrata al filtro (linea arteriosa) al tempo i (dove i indica gli intervalli di 10, 30, 60, 120 e 240 min).</p> <p>$C_{baseline}$ è la concentrazione dell'antimicrobico in soluzione salina o in sangue prima di iniziare l'esperimento al tempo zero ($t=0$).</p>

BIBLIOGRAFIA

1. Coresh J, Selvin E, Stevens LA, et al. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *Jama* 2007; **298**(17): 2038-47.
2. Otero A, de Francisco A, Gayoso P, Garcia F, Group ES. Prevalence of chronic renal disease in Spain: results of the EPIRCE study. *Nefrologia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia* 2010; **30**(1): 78-86.
3. El Nahas M. The global challenge of chronic kidney disease. *Kidney international* 2005; **68**(6): 2918-29.
4. Nasri H. World Kidney Day 2014; Chronic Kidney Disease and Aging: A Global Health Alert. *Iranian journal of public health* 2014; **43**(1): 126-7.
5. Joanne M, Bargman JM, Skorecki K. Malattia renale cronica. In: Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J. *Harrison principi di medicina interna*. 18^a ed. Milano, IT: CEA; **2012**: 2286-300.
6. National Kidney F. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation* 2002; **39**(2 Suppl 1): S1-266.
7. Wheeler DC, Becker GJ. Summary of KDIGO guideline. What do we really know about management of blood pressure in patients with chronic kidney disease? *Kidney international* 2013; **83**(3): 377-83.

8. Levey AS, Coresh J, Balk E, et al. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Annals of internal medicine* 2003; **139**(2): 137-47.
9. Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, et al. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney international* 2005; **67**(6): 2089-100.
10. Wanner C, Tonelli M. Kidney Disease: Improving Global Outcomes Lipid Guideline Development Work Group M. KDIGO Clinical Practice Guideline for Lipid Management in CKD: summary of recommendation statements and clinical approach to the patient. *Kidney international* 2014; **85**(6): 1303-9.
11. Levey AS, de Jong PE, Coresh J, et al. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney international* 2011; **80**(1): 17-28.
12. Levey AS, Stevens LA, Coresh J. Conceptual model of CKD: applications and implications. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation* 2009; **53**(3 Suppl 3): S4-16.
13. Dalrymple LS, Go AS. Epidemiology of acute infections among patients with chronic kidney disease. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN* 2008; **3**(5): 1487-93.
14. Collins AJ, Yee J. Infectious complications in patients with chronic kidney disease. *Advances in chronic kidney disease* 2006; **13**(3): 197-8.
15. Aslam N, Bernardini J, Fried L, Burr R, Piraino B. Comparison of infectious complications between incident hemodialysis and peritoneal dialysis

patients. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 2006; **1**(6): 1226-33.

16. Liu JW, Su YK, Liu CF, Chen JB. Nosocomial blood-stream infection in patients with end-stage renal disease: excess length of hospital stay, extra cost and attributable mortality. *The Journal of hospital infection* 2002; **50**(3): 224-7.

17. Saxena AK, Panhotra BR. Haemodialysis catheter-related bloodstream infections: current treatment options and strategies for prevention. *Swiss medical weekly* 2005; **135**(9-10): 127-38.

18. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *American journal of infection control* 1988; **16**(3): 128-40.

19. Jarvis WR. The epidemiology of colonization. *Infection control and hospital epidemiology* 1996; **17**(1): 47-52.

20. Uchino S, Bellomo R, Goldsmith D, Bates S, Ronco C. An assessment of the RIFLE criteria for acute renal failure in hospitalized patients. *Critical care medicine* 2006; **34**(7): 1913-7.

21. Sawhney S, Fluck N, Fraser SD, et al. KDIGO-based acute kidney injury criteria operate differently in hospitals and the community-findings from a large population cohort. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2016; **31**(6): 922-9.

22. Doyle JF, Forni LG. Acute kidney injury: short-term and long-term effects. *Critical care* 2016; **20**(1): 188.

23. Liano F, Junco E, Pascual J, Madero R, Verde E. The spectrum of acute renal failure in the intensive care unit compared with that seen in other settings. The Madrid Acute Renal Failure Study Group. *Kidney international Supplement* 1998; **66**: S16-24.
24. Zazzaro D, Ferrannini M, Vischini G, Splendiani G, Parravano M, Stuart S. Dialisi in area critica e nelle patologie extrarenali. In: Casciani CU, Cervelli V, De Angelis S, Splendiani G. *La dialisi: tecnica e clinica*. 1^a ed. Roma, IT: Società Editrice Universo; **2007**: 73-106.
25. Bellomo R, Bagshaw S, Langenberg C, Ronco C. Pre-renal azotemia: a flawed paradigm in critically ill septic patients? *Contributions to nephrology* 2007; **156**: 1-9.
26. Celotti F, Golin R. Le malattie del rene, dell'apparato urinario inferiore e della prostata. In: Celotti F. *Patologia generale e fisiopatologia*. 1^a ed. Napoli, IT: EdiSES; **2002**: 591-628.
27. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P, Acute Dialysis Quality Initiative workgroup. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Critical care* 2004; **8**(4): R204-12.
28. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Critical care* 2007; **11**(2): R31.
29. de Lalla F. Antibiotic therapy and microbiologic considerations in the intensive care unit. *Kidney international Supplement* 1998; **66**: S87-90.

30. Vincent JL. Microbial resistance: lessons from the EPIC study. European Prevalence of Infection. *Intensive care medicine* 2000; **26 Suppl 1**: S3-8.
31. Kuang D, Chionh CY, Ronco C. Adjustment of antimicrobial regimen in septic patients undergoing continuous renal replacement therapy in the intensive care unit. In: Ronco C, Bellomo R, Kellum JA. *Critical care nephrology*. 2nd ed. Philadelphia, PA: Elsevier; **2009**: 1441-53.
32. Fang JT, Tsai MH, Tian YC, et al. Outcome predictors and new score of critically ill cirrhotic patients with acute renal failure. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2008; **23**(6): 1961-9.
33. Oppert M, Engel C, Brunkhorst FM, et al. Acute renal failure in patients with severe sepsis and septic shock--a significant independent risk factor for mortality: results from the German Prevalence Study. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2008; **23**(3): 904-9.
34. Brivet FG, Kleinknecht DJ, Loirat P, Landais PJ. Acute renal failure in intensive care units--causes, outcome, and prognostic factors of hospital mortality; a prospective, multicenter study. French Study Group on Acute Renal Failure. *Critical care medicine* 1996; **24**(2): 192-8.
35. Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, et al. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama* 2016; **315**(8): 775-87.

36. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive care medicine* 2013; **39**(2): 165-228.
37. Matzke GR, Aronoff GR, Atkinson AJ, et al. Drug dosing consideration in patients with acute and chronic kidney disease-a clinical update from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney international* 2011; **80**(11): 1122-37.
38. Sime FB, Roberts MS, Roberts JA. Optimization of dosing regimens and dosing in special populations. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2015; **21**(10): 886-93.
39. Leuthner KD, Doern GV. Antimicrobial stewardship programs. *Journal of clinical microbiology* 2013; **51**(12): 3916-20.
40. Vossen MG, Thalhammer F. Effects of renal replacement therapy on antimicrobial therapy. *Current clinical pharmacology* 2013; **8**(1): 39-45.
41. Decker BS, Mueller BA, Sowinski KM. Drug dosing considerations in alternative hemodialysis. *Advances in chronic kidney disease* 2007; **14**(3): e17-26.
42. Schetz M. Drug dosing in continuous renal replacement therapy: general rules. *Current opinion in critical care* 2007; **13**(6): 645-51.
43. Pea F, Furlanut M. Principles of pharmacodynamics and pharmacokinetics of drugs used in extracorporeal therapies. In: Ronco C, Bellomo R, Kellum JA. *Critical care nephrology*. 2nd ed. Philadelphia, PA: Elsevier; **2009**: 1190-4.

44. Clark WR, Gao D, Ronco C. Membranes for dialysis. Composition, structure and function. *Contributions to nephrology* 2002; (137): 70-7.
45. Winchester JF. Sorbent hemoperfusion in end-stage renal disease: an in-depth review. *Advances in renal replacement therapy* 2002; **9**(1): 19-25.
46. Ikizler TA, Schulman G. Hemodialysis: techniques and prescription. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation* 2005; **46**(5): 976-81.
47. Nalesso F, Garzotto F, Ronco C. Technical aspects of extracorporeal ultrafiltration: mechanisms, monitoring and dedicated technology. *Contributions to nephrology* 2010; **164**: 199-208.
48. Ronco C, Cruz D. Hemodiafiltration history, technology, and clinical results. *Advances in chronic kidney disease* 2007; **14**(3): 231-43.
49. Lameire NH, De Vriese AS. Adsorption techniques and the use of sorbents. *Contributions to nephrology* 2001; (133): 140-53.
50. Pea F, Viale P, Pavan F, Furlanut M. Pharmacokinetic considerations for antimicrobial therapy in patients receiving renal replacement therapy. *Clinical pharmacokinetics* 2007; **46**(12): 997-1038.
51. Bohler J, Donauer J, Keller F. Pharmacokinetic principles during continuous renal replacement therapy: drugs and dosage. *Kidney international Supplement* 1999; (72): S24-8.
52. Neville LO, Baillod R, Grady D, Brumfitt W, Hamilton-Miller JM. Teicoplanin in patients with chronic renal failure on dialysis: microbiological and

pharmacokinetic aspects. *International journal of clinical pharmacology research* 1987; **7**(6): 485-90.

53. Launay-Vacher V, Izzedine H, Mercadal L, Deray G. Clinical review: use of vancomycin in haemodialysis patients. *Critical care* 2002; **6**(4): 313-6.

54. Harbord N, Gruber SJ, Feinfeld DA, Winchester JF. Hemodialysis, hemofiltration, and hemoperfusion in acute intoxication and poisoning. In: Ronco C, Bellomo R, Kellum JA. *Critical care nephrology*. 2nd ed. Philadelphia, PA: Elsevier; **2009**: 919-30.

55. Morabito S, Pistolesi V, Maggiore U, Fiaccadori E, Pierucci A. [Pharmacokinetics of antibiotics in continuous renal replacement therapies (CRRT)]. *Giornale italiano di nefrologia : organo ufficiale della Societa italiana di nefrologia* 2012; **29**(4): 425-44.

56. Choi G, Gomersall CD, Tian Q, Joynt GM, Freebairn R, Lipman J. Principles of antibacterial dosing in continuous renal replacement therapy. *Critical care medicine* 2009; **37**(7): 2268-82.

57. Mineshima M. The past, present and future of the dialyzer. *Contributions to nephrology* 2015; **185**: 8-14.

58. Abe T, Kato K, Fujioka T, Akizawa T. The blood compatibilities of blood purification membranes and other materials developed in Japan. *International journal of biomaterials* 2011; **2011**: 375390.

59. Golper TA, Marx MA. Drug dosing adjustments during continuous renal replacement therapies. *Kidney international Supplement* 1998; **66**: S165-8.

60. Kraft D, Lode H. Elimination of ampicillin and gentamicin by hemofiltration. *Klinische Wochenschrift* 1979; **57**(4): 195-6.
61. Reetze-Bonorden P, Bohler J, Keller E. Drug dosage in patients during continuous renal replacement therapy. Pharmacokinetic and therapeutic considerations. *Clinical pharmacokinetics* 1993; **24**(5): 362-79.
62. Rumpf KW, Rieger J, Ansorg R, Doht B, Scheler F. Binding of antibiotics by dialysis membranes and its clinical relevance. *Proceedings of the European Dialysis and Transplant Association European Dialysis and Transplant Association* 1977; **14**: 607-9.
63. Tian Q, Gomersall CD, Ip M, Tan PE, Joynt GM, Choi GY. Adsorption of amikacin, a significant mechanism of elimination by hemofiltration. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2008; **52**(3): 1009-13.
64. Kronfol NO, Lau AH, Barakat MM. Aminoglycoside binding to polyacrylonitrile hemofilter membranes during continuous hemofiltration. *ASAIO transactions / American Society for Artificial Internal Organs* 1987; **33**(3): 300-3.
65. Vincent HH, Akcahuseyin E, Vos MC, van Ittersum FJ, van Duyl WA, Schalekamp MA. Determinants of blood flow and ultrafiltration in continuous arteriovenous haemodiafiltration: theoretical predictions and laboratory and clinical observations. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 1990; **5**(12): 1031-7.
66. Akcahuseyin E, van Duyl WA, Vincent HH, Vos MC, Schalekamp MA. Continuous arterio-venous haemodiafiltration: hydraulic and diffusive permeability index of an AN-69 capillary haemofilter. *Medical & biological engineering & computing* 1998; **36**(1): 43-50.

67. Sigler MH, Teehan BP. Solute transport in continuous hemodialysis: a new treatment for acute renal failure. *Kidney international* 1987; **32**(4): 562-71.
68. Pallone TL, Petersen J. Continuous arteriovenous hemofiltration: an in vitro simulation and mathematical model. *Kidney international* 1988; **33**(3): 685-98.
69. Winchester FJ, Ronco C, Salsberg J, et al. Sorbent augmented dialysis system. In: Roco C, La Greca G. Hemodialysis technology. *Contrib Nephrol*, Vol 137. Basel, CH: Karger; **2002**: 170-180
70. Orth SR, Ritz E. The nephrotic syndrome. *The New England journal of medicine* 1998; **338**(17): 1202-11.
71. Poggesi I, Benedetti MS, Whomsley R, Le Lamer S, Molimard M, Watelet JB. Pharmacokinetics in special populations. *Drug metabolism reviews* 2009; **41**(3): 422-54.
72. Kuang D, Verbine A, Ronco C. Pharmacokinetics and antimicrobial dosing adjustment in critically ill patients during continuous renal replacement therapy. *Clinical nephrology* 2007; **67**(5): 267-84.
73. Vanholder R, De Smet R, Ringoir S. Factors influencing drug protein binding in patients with end stage renal failure. *European journal of clinical pharmacology* 1993; **44 Suppl 1**: S17-21.
74. Velenosi TJ, Urquhart BL. Pharmacokinetic considerations in chronic kidney disease and patients requiring dialysis. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 2014; **10**(8): 1131-43.

75. Roberts DJ, Hall RI. Drug absorption, distribution, metabolism and excretion considerations in critically ill adults. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 2013; **9**(9): 1067-84.
76. Wang AY, Lai KN. The importance of residual renal function in dialysis patients. *Kidney international* 2006; **69**(10): 1726-32.
77. Bassetti D. Gli antibiotici glicopeptidici e gli oxazolidinoni. In: Bassetti D. *Chemioterapici antinfettivi e loro impiego razionale*. 7^a ed. Milano, IT: Intramed Communications; **2001**: 231-8.
78. Mitscher LA. Antibiotici e antimicrobici. In: dall'Acqua S, Caffieri S, da Re P, Tarzia G. *Principi di chimica farmaceutica*. 3^a ed. Padova, IT: Piccin Nuova Libreria; **1998**; 874-921.
79. Gyssens IC. Vancomycin. In: Grayson ML, Crowe SM, McCarthy JS, Mills J, Mouton JW, Norrby SR, Paterson DL, Pfaller MA. *Kucers' the use of antibiotics*. 6th ed. Boca Raton, FL: CRC Press; **2010**: 569-76
80. Jones RN. Microbiological features of vancomycin in the 21st century: minimum inhibitory concentration creep, bactericidal/static activity, and applied breakpoints to predict clinical outcomes or detect resistant strains. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2006; **42 Suppl 1**: S13-24.
81. VANCOTEX: Riassunto delle Caratteristiche del Prodotto. Banca dati farmaci dell'Agenzia Italiana del Farmaco. Roma, IT; consultato il 7 settembre 2016. Disponibile all'indirizzo: https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_001282_034632_RCP.pdf&retry=0&sys=m0b113

82. MacDougall C, Chambers HF. Protein synthesis inhibitors and miscellaneous antibacterial agents. In: Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. *Goodman & Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics*. 12th ed. New York, NY: McGraw-Hill; **2011**: 1521-49.

83. Borghi A, Coronelli C, Faniuolo L, Allievi G, Pallanza R, Gallo GG. Teichomycins, new antibiotics from *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. IV. Separation and characterization of the components of teichomycin (teicoplanin). *The Journal of antibiotics* 1984; **37**(6): 615-20.

84. Malabarba A, Strazzolini P, Depaoli A, Landi M, Berti M, Cavalleri B. Teicoplanin, antibiotics from *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. VI. Chemical degradation: physico-chemical and biological properties of acid hydrolysis products. *The Journal of antibiotics* 1984; **37**(9): 988-99.

85. Gyssens IC. Tecoplanin. In: Grayson ML, Crowe SM, McCarthy JS, Mills J, Mouton JW, Norrby SR, Paterson DL, Pfaller MA. *Kucers' the use of antibiotics*. 6th ed. Boca Raton, FL: CRC Press; **2010**: 601-20.

86. Arthur M, Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1993; **37**(8): 1563-71.

87. TARGOSID: Riassunto delle Caratteristiche del Prodotto. Banca dati farmaci dell'Agenzia Italiana del Farmaco. Roma, IT; consultato il 7 settembre 2016. Disponibile all'indirizzo: https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_008055_026458_RCP.pdf&retry=0&sys=m0b113

88. Shiraishi Y, Okajima M, Sai Y, Miyamoto K, Inaba H. Elimination of teicoplanin by adsorption to the filter membrane during haemodiafiltration:

screening experiments for linezolid, teicoplanin and vancomycin followed by in vitro haemodiafiltration models for teicoplanin. *Anaesthesia and intensive care* 2012; **40**(3): 442-9.

89. Bassetti D. Gli aminoglicosidi. In: Bassetti D. *Chemioterapici antinfettivi e loro impiego razionale*. 7^a ed. Milano, IT: Intramed Communications; **2001**: 179-200.

90. Craig WA. Gentamicin. In: Grayson ML, Crowe SM, McCarthy JS, Mills J, Mouton JW, Norrby SR, Paterson DL, Pfaller MA. *Kucers' the use of antibiotics*. 6th ed. Boca Raton, FL: CRC Press; **2010**: 674-98.

91. Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clinical microbiology reviews* 2003; **16**(3): 430-50.

92. GENTAMICINA B. BRAUN: Riassunto delle Caratteristiche del Prodotto. Banca dati farmaci dell'Agenzia Italiana del Farmaco. Roma, IT; consultato il 7 settembre 2016. Disponibile all'indirizzo: https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_000718_038940_RCP.pdf&retry=0&sys=m0b113

93. MacDougall C, Chambers HF. Aminoglycosides. In: Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. *Goodman & Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics*. 12th ed. New York, NY: McGraw-Hill; **2011**: 1505-20.

94. O'Shea S, Duffull S, Johnson DW. Aminoglycosides in hemodialysis patients: is the current practice of post dialysis dosing appropriate? *Seminars in dialysis* 2009; **22**(3): 225-30.

95. Lam PKN, Tian Q, Ip M, Gomersall CD. In vitro adsorption of gentamicin and netilmicin by polyacrylonitrile and polyamide hemofiltration filters. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2010; **54**(2): 963-5.
96. Craig WA. Tobramycin. In: Grayson ML, Crowe SM, McCarthy JS, Mills J, Mouton JW, Norrby SR, Paterson DL, Pfaller MA. *Kucers' the use of antibiotics*. 6th ed. Boca Raton, FL: CRC Press; **2010**: 699-711.
97. TOBRAMICINA IBI: Riassunto delle Caratteristiche del Prodotto. Banca dati farmaci dell'Agenzia Italiana del Farmaco. Roma, IT; consultato il 7 settembre 2016. Disponibile all'indirizzo: https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_000555_033973_RCP.pdf&retry=0&sys=m0b113
98. Kamel Mohamed OH, Wahba IM, Watnick S, et al. Administration of tobramycin in the beginning of the hemodialysis session: a novel intradialytic dosing regimen. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 2007; **2**(4): 694-9.
99. Ford CW, Zurenko GE, Barbachyn MR. The discovery of linezolid, the first oxazolidinone antibacterial agent. *Current drug targets Infectious disorders* 2001; **1**(2): 181-99.
100. Bozdogan B, Appelbaum PC. Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. *International journal of antimicrobial agents* 2004; **23**(2): 113-9.
101. Howden BP. Linezolid. In: Grayson ML, Crowe SM, McCarthy JS, Mills J, Mouton JW, Norrby SR, Paterson DL, Pfaller MA. *Kucers' the use of antibiotics*. 6th ed. Boca Raton, FL: CRC Press; **2010**: 895-919.

102. Perry CM, Jarvis B. Linezolid: a review of its use in the management of serious gram-positive infections. *Drugs* 2001; **61**(4): 525-51.
103. ZIVOXID: Riassunto delle Caratteristiche del Prodotto. Banca dati farmaci dell'Agenzia Italiana del Farmaco. Roma, IT; consultato il 7 settembre 2016. Disponibile all'indirizzo: https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_001533_035410_RCP.pdf&retry=0&sys=m0b113
104. Riain UN, MacGowan AP. In: Finch RG, Greenwood D. *Antibiotic and Chemotherapy*. 9th ed. New York, NY: Elsevier; **2010**:301-5.
105. Roger C, Muller L, Wallis SC, et al. Population pharmacokinetics of linezolid in critically ill patients on renal replacement therapy: comparison of equal doses in continuous venovenous haemofiltration and continuous venovenous haemodiafiltration. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2016; **71**(2): 464-70.
106. Furuyoshi S, Nakatani M, Taman J, Kutsuki H, Takata S, Tani N. New adsorption column (Lixelle) to eliminate beta2-microglobulin for direct hemoperfusion. *Therapeutic apheresis: official journal of the International Society for Apheresis and the Japanese Society for Apheresis* 1998; **2**(1): 13-7.
107. Li L, Dong M, Wang XG. The Implication and Significance of Beta 2 Microglobulin: A Conservative Multifunctional Regulator. *Chinese medical journal* 2016; **129**(4): 448-55.
108. Stoppini M, Bellotti V. Systemic amyloidosis: lessons from beta2-microglobulin. *The Journal of biological chemistry* 2015; **290**(16): 9951-8.
109. Obici L, Merlini G. AA amyloidosis: basic knowledge, unmet needs and future treatments. *Swiss medical weekly* 2012; **142**: w13580.

110. Seldin DC, Skinner M. Amiloidosi. In: Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J. *Harrison principi di medicina interna*. 18^a ed. Milano, IT: CEA; **2012**: 936-41.
111. Saito A, Gejyo F. Current clinical aspects of dialysis-related amyloidosis in chronic dialysis patients. *Therapeutic apheresis and dialysis: official peer-reviewed journal of the International Society for Apheresis, the Japanese Society for Apheresis, the Japanese Society for Dialysis Therapy* 2006; **10**(4): 316-20.
112. Gejyo F, Kawaguchi Y, Hara S, et al. Arresting dialysis-related amyloidosis: a prospective multicenter controlled trial of direct hemoperfusion with a beta2-microglobulin adsorption column. *Artificial organs* 2004; **28**(4): 371-80.
113. Yamamoto Y, Hirawa N, Yamaguchi S, et al. Long-term efficacy and safety of the small-sized beta2-microglobulin adsorption column for dialysis-related amyloidosis. *Therapeutic apheresis and dialysis: official peer-reviewed journal of the International Society for Apheresis, the Japanese Society for Apheresis, the Japanese Society for Dialysis Therapy* 2011; **15**(5): 466-74.
114. Kuragano T, Inoue T, Yoh K, et al. Effectiveness of beta(2)-microglobulin adsorption column in treating dialysis-related amyloidosis: a multicenter study. *Blood purification* 2011; **32**(4): 317-22.
115. Hiyama E, Hyodo T, Kondo M, et al. Performance of the newer type (Lixelle Type S-15) on direct hemoperfusion beta-2-microglobulin adsorption column for dialysis-related amyloidosis. *Nephron* 2002; **92**(2): 501-2.
116. Ronco C, Garzotto F, Ricci Z. CA.R.PE.DI.E.M. (Cardio-Renal Pediatric Dialysis Emergency Machine): evolution of continuous renal replacement

therapies in infants. A personal journey. *Pediatric nephrology* 2012; **27**(8): 1203-11.

117. Churchwell MD. Use of an in vitro model of renal replacement therapy systems to estimate extracorporeal drug removal. *Journal of clinical pharmacology* 2012; **52**(1 Suppl): 35S-44S.

118. KIT PER EMOFILTRAZIONE E ULTRAFILTRAZIONE-CARPEDIEM: Scheda Tecnica. Bellco. Mirandola, IT; consultato il 11 settembre 2016. Disponibile all'indirizzo: https://keyzone.bellco.net/key_zone/mkt/FTP/files/ITALIANO/CRITICAL%20CARE/HF%20NEONATALE/DISPOSABLE/KIT/SCHEDA%20TECNICHE/SCHEDE%20TECNICA%20KIT%20PER%20CARPEDIEM%20REV03%20IT.pdf

119. Ronco C, Brendolan A, Crepaldi C, Gastaldon F, Levin NW. Flow distribution and cross filtration in hollow fiber hemodialyzers. *Contributions to nephrology* 2002; (137): 120-8.

120. Kutsuki H. beta(2)-Microglobulin-selective direct hemoperfusion column for the treatment of dialysis-related amyloidosis. *Biochimica et biophysica acta* 2005; **1753**(1): 141-5.

121. Oda S, Hirasawa H, Shiga H, et al. Cytokine adsorptive property of various adsorbents in immunoabsorption columns and a newly developed adsorbent: an in vitro study. *Blood purification* 2004; **22**(6): 530-6.

122. Parenti F. Glycopeptide antibiotics. *Journal of clinical pharmacology* 1988; **28**(2): 136-40.

123. Tsuchida K, Takemoto Y, Nakatani T, Nakamura T, Sugimura K, Yamamoto K. Adsorption of microorganism components by lixelle beads. *Artificial organs* 2000; **24**(7): 577-80.
124. Perego AF. Adsorption techniques: dialysis sorbents and membranes. *Blood purification* 2013; **35 Suppl 2**: 48-51.
125. Sartori M, Day S, De Rosa S, et al. Pharmacokinetic analysis of antibiotic adsorption (vancomycin and teicoplanin) by the Lixelle extracorporeal unit. *The International journal of artificial organs* 2015; **38**(1): 8-12.
126. Ronco C, Levin NW. Mechanisms of solute transport in extracorporeal therapies. *Contributions to nephrology* 2005; **149**: 10-7.
127. De Bock V, Verbeelen D, Maes V, Sennesael J. Pharmacokinetics of vancomycin in patients undergoing haemodialysis and haemofiltration. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 1989; **4**(7): 635-9.
128. Vandecasteele SJ, De Vriese AS. Recent changes in vancomycin use in renal failure. *Kidney international* 2010; **77**(9): 760-4.
129. Martin JH, Norris R, Barras M, et al. Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients: a consensus review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society Of Infectious Diseases Pharmacists. *The Clinical biochemist Reviews/ Australian Association of Clinical Biochemists* 2010; **31**(1): 21-4.

130. Craig WA. Basic pharmacodynamics of antibacterials with clinical applications to the use of beta-lactams, glycopeptides, and linezolid. *Infectious disease clinics of North America* 2003; **17**(3): 479-501.
131. Rybak MJ. The pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of vancomycin. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2006; **42 Suppl 1**: S35-9.
132. Wilson AP. Clinical pharmacokinetics of teicoplanin. *Clinical pharmacokinetics* 2000; **39**(3): 167-83.
133. Schneditz D, Daugirdas JT. Compartment effects in hemodialysis. *Seminars in dialysis* 2001; **14**(4): 271-7.
134. Kaufman AM, Schneditz D, Smye S, Polaschegg HD, Levin NW. Solute disequilibrium and multicompartment modeling. *Advances in renal replacement therapy* 1995; **2**(4): 319-29.
135. Cavalcanti AB, Goncalves AR, Almeida CS, Bugano DD, Silva E. Teicoplanin versus vancomycin for proven or suspected infection. *The Cochrane database of systematic reviews* **2010**; (6): CD007022.
136. Kaneko T, Kudo M, Okumura T, et al. Successful treatment of digoxin intoxication by haemoperfusion with specific columns for beta2-microglobulin-adsorption (Lixelle) in a maintenance haemodialysis patient. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2001; **16**(1): 195-6.
137. Del Favero A, Patoia L, Rosina R, et al. Pharmacokinetics and tolerability of teicoplanin in healthy volunteers after single increasing doses. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1991; **35**(12): 2551-7.

138. Gundermann KJ, Lie TS. Problems of competition in charcoal hemoperfusion for the treatment of intoxications. *Artificial organs* 1979; **3**(4): 346-9.
139. Katona BG, Siegel EG, Cluxton RJ. The new black magic: activated charcoal and new therapeutic uses. *The Journal of emergency medicine* 1987; **5**(1): 9-18.
140. Sartori M, Zaragoza JJ, Sharma A, Zancato M, Ronco C. Glycopeptide-specific drug-membrane interaction in continuous venovenous hemofiltration: an in vitro screening test. *Clinical nephrology* 2015; **84**(2): 120-2.
141. Clark WR, Macias WL, Molitoris BA, Wang NH. Membrane adsorption of beta 2-microglobulin: equilibrium and kinetic characterization. *Kidney international* 1994; **46**(4): 1140-6.
142. Francoise Gachon AM, Mallet J, Tridon A, Deteix P. Analysis of proteins eluted from hemodialysis membranes. *Journal of biomaterials science Polymer edition* 1991; **2**(4): 263-76.
143. Kim JC, Garzotto F, Cruz DN, et al. Enhancement of solute removal in a hollow-fiber hemodialyzer by mechanical vibration. *Blood purification* 2011; **31**(4): 227-34.
144. Forge A, Schacht J. Aminoglycoside antibiotics. *Audiology & neuro-otology* 2000; **5**(1): 3-22.
145. Ronco C, Bordonni V, Levin NW. Adsorbents: from basic structure to clinical application. *Contributions to nephrology* 2002; (137): 158-64.

146. Moore RD, Lietman PS, Smith CR. Clinical response to aminoglycoside therapy: importance of the ratio of peak concentration to minimal inhibitory concentration. *The Journal of infectious diseases* 1987; **155**(1): 93-9.
147. Nayak-Rao S. Aminoglycoside use in renal failure. *Indian journal of nephrology* 2010; **20**(3): 121-4.
148. Walter F, Vicens Q, Westhof E. Aminoglycoside-RNA interactions. *Current opinion in chemical biology* 1999; **3**(6): 694-704.
149. Bailey DN, Briggs JR. Gentamicin and tobramycin binding to human serum in vitro. *Journal of analytical toxicology* 2004; **28**(3): 187-9.
150. Gordon RC, Regamey C, Kirby WM. Serum protein binding of the aminoglycoside antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1972; **2**(3): 214-6.
151. Rosenkranz H, Scheer M, Scholtan W. Binding of aminoglycoside antibiotics to human serum proteins. III. Effect of experimental conditions. *Infection* 1978; **6**(2): 57-64.
152. Chuk AC, Saeed F, Kousar N, et al. Variable pharmacokinetics of extended interval tobramycin or gentamicin among critically ill patients undergoing continuous venovenous hemofiltration. *Clinical nephrology* 2015; **84**(4): 214-21.
153. Twardowski ZJ. Short, thrice-weekly hemodialysis is inadequate regardless of small molecule clearance. *The International journal of artificial organs* 2004; **27**(6): 452-66.

154. Preston SL. The importance of appropriate antimicrobial dosing: pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *The Annals of pharmacotherapy* 2004; **38**(9 Suppl): S14-8.
155. Blot SI, Pea F, Lipman J. The effect of pathophysiology on pharmacokinetics in the critically ill patient--concepts appraised by the example of antimicrobial agents. *Advanced drug delivery reviews* 2014; **77**: 3-11.
156. Godin M, Murray P, Mehta RL. Clinical approach to the patient with AKI and sepsis. *Seminars in nephrology* 2015; **35**(1): 12-22.
157. Stegmayr B, Ramlow W, Balogun RA. Beyond dialysis: current and emerging blood purification techniques. *Seminars in dialysis* 2012; **25**(2): 207-13.
158. Mauro LS, Peloquin CA, Schmude K, Assaly R, Malhotra D. Clearance of linezolid via continuous venovenous hemodiafiltration. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation* 2006; **47**(6): e83-6.
159. Kraft MD, Pasko DA, DePestel DD, Ellis JJ, Peloquin CA, Mueller BA. Linezolid clearance during continuous venovenous hemodiafiltration: a case report. *Pharmacotherapy* 2003; **23**(8): 1071-5.
160. Villa G, Cassetta MI, Tofani L, et al. Linezolid extracorporeal removal during haemodialysis with high cut-off membrane in critically ill patients. *International journal of antimicrobial agents* 2015; **46**(4): 465-8.
161. Golper TA. Update on drug sieving coefficients and dosing adjustments during continuous renal replacement therapies. *Contributions to nephrology* 2001; (132): 349-53.

162. Yamashita AC, Tomisawa N. Membrane materials for blood purification in critical care. *Contributions to nephrology* 2010; **166**: 112-8.
163. Nti-Addae KW, Guarino VR, Dalwadi G, Stella VJ. Determination of the permeability characteristics of two sulfenamide prodrugs of linezolid across Caco-2 cells. *Journal of pharmaceutical sciences* 2012; **101**(9): 3134-41.
164. Vaussenat F, Bosc JY, LeBlanc M, Canaud B. Data acquisition system for dialysis machines. A model for membrane hydraulic permeability. *ASAIO journal* 1997; **43**(6): 910-5.
165. Eloit S, De Wachter D, Vienken J, Pohlmeier R, Verdonck P. In vitro evaluation of the hydraulic permeability of polysulfone dialysers. *The International journal of artificial organs* 2002; **25**(3): 210-6.
166. Moise PA, Castro RS, Sul C, Forrest A, Sakoulas G. Relationship of linezolid minimum inhibitory concentration and time to bacterial eradication in treatment for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *The Annals of pharmacotherapy* 2008; **42**(4): 592-3.
167. Mendes RE, Hogan PA, Streit JM, Jones RN, Flamm RK. Zyvox(R) Annual Appraisal of Potency and Spectrum (ZAAPS) program: report of linezolid activity over 9 years (2004-12). *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2014; **69**(6): 1582-8.
168. Di Paolo A, Malacarne P, Guidotti E, Danesi R, Del Tacca M. Pharmacological issues of linezolid: an updated critical review. *Clinical pharmacokinetics* 2010; **49**(7): 439-47.

169. Choi G, Gomersall CD, Tian Q, Joynt GM, Li AM, Lipman J. Principles of antibacterial dosing in continuous renal replacement therapy. *Blood purification* 2010; **30**(3): 195-212.
170. Sartori M, Loregian A, Pagni S, et al. Kinetics of Linezolid in Continuous Renal Replacement Therapy: An In Vitro Study. *Therapeutic drug monitoring* 2016; **38**(5): 579-86.
171. Renaux JL, Thomas M, Crost T, Loughraieb N, Vantard G. Activation of the kallikrein-kinin system in hemodialysis: role of membrane electronegativity, blood dilution, and pH. *Kidney international* 1999; **55**(3): 1097-103.

RINGRAZIAMENTI

Al termine di questi tre anni di dottorato, ringrazio tutte le persone che mi hanno accompagnato in questo percorso permettendomi di raggiungere questo obiettivo.

Desidero ringraziare il Professor Claudio Ronco per avermi offerto il suo contributo teorico e metodologico durante tutte le fasi del mio lavoro di ricerca e per essersi sempre prodigato a far sì che potessi fare esperienze costruttive e utili alla mia crescita come dottore di ricerca.

Ringrazio, l'Associazione Amici del Rene di Vicenza il cui sostegno è stato fondamentale e senza il quale non sarebbe stato possibile intraprendere questo percorso.

Un sincero ringraziamento alla Professoressa Mirella Zancato per il suo appoggio nelle mie scelte e il tempo dedicatomi nell'attività di laboratorio durante tutti questi anni.

Ringrazio il Professor Stefano Piccolo e la Professoressa Maria Teresa Conconi per il loro attento monitoraggio e valutazione del mio lavoro e per l'eccellenza delle attività organizzate durante il Corso di Dottorato.

Ringrazio la Professoressa Arianna Loregian e la Dottoressa Valentina Gandin per avermi dato l'opportunità di frequentare i loro laboratori e avermi offerto spunti di riflessione indispensabili per il mio lavoro di ricerca.

Un particolare ringraziamento a tutti i colleghi dell'International Renal Research Institute of Vicenza (IRRIV) con cui ho condiviso impegni, preoccupazioni e frustrazioni, oltre che idee e appaganti soddisfazioni.

Ringrazio, inoltre, l'Ordine dei Farmacisti della Provincia di Vicenza e Federfarma Vicenza. Voglio ringraziare il Dottor Florindo Cracco, il Dottor Enrico Pietrogrande, il Dottor Vittorino Molini Ballici, il Dottor Alberto Fontanesi e la Dottoressa Marisa Tirapelle.

Ringrazio, infine, Giovanna per essere stata al mio fianco in questi ultimi mesi, Ketty per essere sempre stata presente, e la mia Famiglia per non avermi mai fatto mancare il suo sostegno senza il quale nulla sarebbe stato possibile.

