



# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

**Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova**

Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E  
SPERIMENTALI

INDIRIZZO: SCIENZE NEFROLOGICHE

CICLO XXI°

**FORMULE DI STIMA DEL GFR E COMPOSIZIONE DELLA MASSA  
CORPOREA: POTENZIALITA' E LIMITI**

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Antonio Tiengo

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Giovanni Gambaro

**Dottorando :** Dott. Cataldo Abaterusso

## **INDICE**

RIASSUNTO	pag. 1
ABSTRACT	pag. 6
INTRODUZIONE	pag. 12
SCOPO	pag. 43
SOGGETTI E METODI	pag. 44
RISULTATI	pag. 53
DISCUSSIONE	pag. 70
CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE	pag. 89
BIBLIOGRAFIA	pag. 92

## **I. RIASSUNTO**

### **Premessa**

Le malattie renali sono in crescente aumento e le previsioni per il futuro in termini di prevalenza, incidenza e costi sanitari sono allarmanti. L'accurata determinazione della funzione renale rappresenta un indispensabile strumento per l'identificazione precoce del danno e della progressione delle malattie renali e per nonché per l'adeguamento della posologia di molti farmaci. L'invecchiamento, inoltre, insieme alle modificazioni morfo-funzionali di organi ed apparati, si accompagna anche ad un progressivo declino della funzione renale. La misura della velocità di filtrazione glomerulare (GFR) è il test più accurato per evidenziare una disfunzione renale, tuttavia la complessità dei metodi ed i costi rendono non proponibili tali metodiche nella pratica clinica. Le linee guida internazionali raccomandano l'impiego di formule, generalmente basate sull'impiego della creatinina sierica, per la stima del GFR (eGFR) e la stratificazione del rischio cardiovascolare nei pazienti con malattie renali croniche (Chronic Kidney Disease, CKD). È noto che le formule di eGFR "creatinine-based" risultano spesso poco accurate specialmente in determinate categorie di soggetti: anziani, donne, malnutriti, obesi, obesi-sarcopenici. I limiti sono da ricercare nella scarsa sensibilità della creatinina a segnalare l'iniziale declino del GFR, nella inesatta stima della massa magra in alcune categorie di soggetti e, infine, nei problemi analitici legati alla standardizzazione, non ancora ottimale, del dosaggio della creatininemia.

Da alcuni anni crescente interesse ha suscitato l'utilizzo della la Cistatina C come marker endogeno di GFR.

## **Scopo.**

In questo lavoro sono presentati i risultati di due Studi, il primo prospettico e il secondo trasversale.

Studio I (prospettico): lo scopo è stato quello di valutare prospetticamente, in una coorte di anziani sani, le relazioni tra la funzionalità renale, determinata attraverso l'impiego di due marcatori endogeni come creatininemia e cistatina C e l'applicazione di alcune comuni e meno comuni formule di stima del GFR, e le modificazioni della composizione corporea.

Studio II (trasversale): scopo del secondo studio è stato quello di valutare l'impatto della composizione corporea sulla capacità delle formule di predire l'iniziale declino del GFR in una coorte di soggetti adulti e di valutare possibili regressori in grado di implementare l'accuratezza delle stesse. Inoltre valutare il miglior metodo di indicizzazione del GFR misurato (mGFR).

## **Soggetti e Metodi**

Sono stati arruolati soggetti anziani (Studio I) e adulti (Studio II) di ambo i sessi previo consenso informato scritto. Entrambi gli Studi hanno ottenuto l'approvazione del Comitato Etico di Verona. I criteri di inclusione ed esclusione sono in sintesi riportate di seguito, Tutti i soggetti sono stati sottoposti a determinazione delle misure antropometriche, della composizione corporea mediante Dual energy X-ray Absorptiometry (DXA), esame di bioimpedenza, esami biumorali di routine, misura del valore plasmatico di Cistatina C (CyC).

Studio I: Sono stati arruolati e seguiti prospetticamente soggetti anziani di ambo i sessi in buone condizioni di salute, non istituzionalizzati e in assenza di patologie croniche debilitanti. Erano esclusi dallo studio soggetti con insufficienza renale

(creatininemia >1.4 mg/dl per i maschi, >1.2 mg/dl per le femmine). I parametri antropometrici, la composizione corporea, l'anamnesi alimentare ed esami bioumorali di routine sono stati determinati annualmente per un follow-up mediano di 5 anni. L'eGFR è stato determinato mediante l'applicazione di cinque formule (Cockcroft-Gault, Virga, MDRD, Taylor, Hoek) che utilizzano la creatininemia o la cistatina C come marcatori endogeni di GFR.

Studio II: Sono stati arruolati, consecutivamente, soggetti adulti con malattia renale cronica CKD I-II stadio e creatininemia <2mg/dl nel maschio e <1,8mg/dl nella femmina. Tutti i pazienti sono stati sottoposti, inoltre, alla misurazione del filtrato glomerulare (mGFR) con la tecnica della clearance plasmatica dello Ioxolo. L'eGFR è stato ricavato con le stesse formule usate nello Studio I.

## **Risultati**

Studio I: Lo studio I è stato condotto in una coorte di 91 donne con età all'inizio dello studio di  $71.9 \pm 2.4$  anni e BMI di  $26.34 \pm 4.44$  Kg/m<sup>2</sup> e 62 uomini di età di  $72.5 \pm 2.29$  anni e BMI di  $27.01 \pm 3.39$  Kg/m<sup>2</sup>. Al termine dei 5 anni di follow-up si è osservata in entrambi i sessi, fatto però più evidente nei maschi, una riduzione della massa magra totale ed appendicolare in assenza di significative modificazioni dello stato nutrizionale. I valori di creatininemia sono risultati ridotti in proporzione maggiore rispetto alla variazione di composizione corporea (variazione percentuale media annua di creatinina e massa magra: -1.4% vs -0.5%, rispettivamente). Al contrario la cistatina C è risultata in aumento in entrambi i sessi. La variazione del valore della cistatina C è risultata indipendente dalla variazione di massa magra ed età. Soltanto la formula di Hoek (*cistatin C-based*) rispetto alle altre formule (*creatinine-based*) analizzate, ha decritto il

declino del GFR come atteso nel fisiologico processo di invecchiamento di un soggetto sano

Studio II: Lo Studio II è stato condotto in una coorte di 83 soggetti (34 femmine).

Il valore della creatininemia risultava (media±SD) 1.19±0.39 mg/dL (creatininemia 1.27±0.39 e 1.08±0.37, rispettivamente nei maschi e nelle femmine). Il BMI era distribuito uniformemente (circa 30%) per normopeso, sovrappeso e obesità. Il GFR misurato è risultato in media 73.9±25.9 ml/min/1.73m<sup>2</sup> con range compreso tra 23-137.7 ml/min per 1.73m<sup>2</sup>.

L'accuratezza delle varie formule è stata definita come prevalenza dei soggetti con differenza percentuale tra eGFR e mGFR ( $100 \times [eGFR - mGFR] / mGFR$ ) entro il 15% e 30% del GFR reale. La formula di Virga si mostra leggermente superiore alle altre nella previsione di eGFR <15% del valore reale in una maggiore percentuale di soggetti (52% vs 46% vs 42% vs 35% vs 45%, rispettivamente Vir vs CG vs MDRD vs MCQ vs Tay). Invece sia CG che MDRD risultano superiori alle altre riuscendo a prevedere il valore di eGFR <30% rispetto al reale, nel 80 e 89% dei pazienti, rispettivamente.

Utilizzando modelli matematici di regressione lineare multipla è stato possibile dedurre quota di produzione di creatinina individuale (CrPROD in mg/min), determinata attraverso un modello matematico è risultato: Cr-PROD: 0.89±0.31 mg/min (Cr-PROD: 1.04±0.28 e 0.67±0.21 mg/min, rispettivamente nel sesso maschile e nel sesso femminile). Attraverso l'analisi di regressione lineare a variabili multiple è stato possibile stimare CrPROD essendo nota la LBM ovvero le sole misure antropometriche con le seguenti funzioni:

$$1) \text{ Cr-prod} = 0.9821 + 0.03842 * (\text{Lean-app in Kg} - 25).$$

Intercetta ( $\pm$ SE)  $0.9821 \pm 0.04$ , coefficiente ( $\pm$ SE) per (Lean-app in Kg-25)  $0.03842$ ;  $p < 0.0001$ . In altri termini, ad esempio, un soggetto medio con 25 kg di massa magra appendicolare dovrebbe produrre ca. 1mg/min di creatinina pari a circa 1.44 g/die.

$$2) \text{Cr-PROD} = -0.366115 + (0.28081 \text{ se maschio}) - (0.00275 * \text{Circ-addome in cm}) + 0.042854 * \text{Circ-braccio (in cm)}$$

Sesso maschile: coefficiente( $\pm$ SE)  $0.28081 \pm 0.04$ ,  $p < 0.0001$ ; Circ-add: coefficiente( $\pm$ SE)  $-0.00275 \pm 0.002$ ,  $p = 0.05$ ; Circ-braccio: coefficiente( $\pm$ SE)  $0.042854 \pm 0.008$ ,  $p < 0.0001$ .

## **Conclusioni**

Il semplice dosaggio della creatininemia non è in grado di individuare con sufficiente accuratezza lo stadio funzionale CKD in un ampissima quota della popolazione. Questo studio conferma la grande variabilità e la scarsa accuratezza delle principali formule per la stima del GFR, soprattutto nei pazienti con iniziale decurtazione della funzionale renale, obesità e sesso femminile. La recente formula di Virga, non ancora validata in ampie casistiche, ha mostrato una buona accuratezza, paragonabile alla formula MDRD, anche per GFR intorno alla normalità e con buona performance per la predizione di eGFR  $< 15\%$  di errore rispetto al valore reale.

La valutazione attraverso misurazioni dirette della LBM e la correzione del GFR per questo dato hanno evidenziato una relazione molto superiore rispetto ai parametri surrogati di composizione corporea, come l'età, il peso, l'altezza. La stima della quota di produzione della creatinina è possibile, sebbene i dati siano ancora preliminari, attraverso semplici e ripetibili determinazioni antropometriche dirette che non richiedono il ricorso a costose tecniche diagnostiche.

Nonostante la popolazione esaminata sia esigua, l'ipotesi che l'incertezza nella corretta definizione quantitativa della massa magra, da cui origina la creatinina di ogni soggetto, sia il principale determinante del *bias* delle formule è stato confermato in questo studio.

Sarà necessario verificare con ulteriori studi se l'espansione del numero e della complessità clinica dei soggetti studiati possa consentire l'elaborazione di un modello matematico più preciso ed affidabile per la stima del GFR nelle fasi iniziali delle nefropatie.

## **ABSTRACT**

### **Background**

Prevalence of chronic kidney diseases is increasing as well as projections in terms of prevalence, incidence and dedicated economical budget. An accurate determination of renal function is a central tool in the early diagnosis of the renal damage and its progression, as well as in customizing drug regimens.

Further to morphological and functional modifications in a number of organs and apparatus, the ageing process is associated with the progressive decline in renal function. Determination of the glomerular filtration rate (GFR) is the most accurate test to disclose a renal dysfunction; however, due to its complexity and costs, this technique cannot be used routinely. International guidelines recommend the use of formulae (mostly serum creatinine-based) for GFR estimation (eGFR) and for stratification of the cardiovascular risk in patients with Chronic Kidney Disease (CKD).

That "creatinine-based" eGFR formulae are not accurate in elderly people, in females, malnourished, or obese, or sarcopenic-obese patients is well known. This

is due to the lack of sensibility of serum creatinine in the very initial reduction of GFR, in the rough estimation of the lean body mass by formulae in some categories of individuals and eventually in the lack of standardization of the assay for serum creatinine. The interest in using of Cystatin C as an endogenous marker of GFR has much increased recently.

### **Aim**

The present manuscript reports results from a prospective study and a cross-sectional investigation.

Prospective study. In a cohort of elderly, healthy people the relationship between renal function and modifications in body composition was evaluated. Renal function was estimated by two endogenous markers (serum creatinine and Cystatin C) and applying more or less common formulae for estimating GFR.

Cross-sectional study: the effect of body composition on the performance of formulae in predicting the early decline of GFR in a cohort of adults was investigated. The implementation of the analysis with other parameters to improve the performance was also investigated.

### **Subjects and Methods**

Elderly (prospective study) and adult (cross-sectional study) people of both genders have been enrolled after obtaining informed consent. Both studies were approved by the Institutional Ethical Committee. Inclusion and exclusion criteria are shortly reported below. In all the following determinations were performed: anthropometric measurements, body composition by Dual energy X-ray

Absorptiometry (DXA), bioimpedence, routine biochemistry, serum Cystatin C concentration (CyC).

Prospective study: Elderly, healthy and non-institutionalized subjects of both genders were recruited. Individuals with renal failure (serum creatinine >1.4 mg/dl in males, >1.2 mg/dl in females) were ruled out. Anthropometric measurements, body composition, nutritional enquiry and routine biochemistry were performed yearly during a 5 yrs follow-up. Estimated GFR was determined by 5 different formulae (Cockcroft-Gault, Virga, MDRD, Taylor, Hoek), either creatinine- or Cystatin C-based.

Cross-sectional study: CKD 1 and 2 adult patients of both genders were enrolled consecutively. Serum creatinine had to be <2mg/dl in males and <1.8mg/dl in females. All patients underwent GFR measurement (mGFR) by the Iohexol plasmatic clearance. Using the same formulae of above, eGFR was also estimated.

## **Results**

Prospective study: 91 females who at the beginning of the study were  $71.9 \pm 2.4$  yrs old, and had BMI  $26.34 \pm 4.44$  Kg/m<sup>2</sup> and 62 males ( $72.5 \pm 2.29$  yrs and BMI  $27.01 \pm 3.39$  Kg/ m<sup>2</sup>) were followed-up. After 5 yrs follow-up, a decrease in the lean body mass (total and appendicular) was observed in both genders, but particularly in males, without any modification of the nutritional state. At the end of follow-up serum creatinine was reduced proportionally reduced more than the decrease of lean body mass (percent variation of serum creatinine and lean mass was -1.4% vs -0.5% per year, respectively).

On the contrary, Cystatin C increased in both genders. Variations in serum Cystatin C were independent from lean mass changes and age. Only the Hoek's

formula (*Cystatin C-based*), at odds with the other formulae (all *creatinine-based*), disclosed the physiological decrease of GFR awaited with ageing.

Cross sectional study: It was carried out in a cohort of 83 subjects (34 females). Serum creatinine was on average (mean±SD) 1.19±0.39 mg/dL, (serum creatinine 1.27±0.39 and 1.08±0.37 mg/dL, male and female, respectively). BMI was almost uniformly distributed among normal, overweight and obese (approx. 30% each). Measured GFR was 73.9±25.9 ml/min/1.73m<sup>2</sup> (range 23-137.7 ml/min/1.73m<sup>2</sup>). The accuracy of different formulae, calculated by the prevalence of subjects having a percent difference between eGFR and mGFR (100 x [eGFR-mGFR]/mGFR) in 15% of the true GFR, disclosed a good predictive value in reference to the Virga (52% ). The accuracy of C-G and MDRD formulae were better than other for predicting eGFR <30% of true value (80 and 89%, respectively), confirming previous reports.

By the use of mathematical models of multiple linear regression it was possible to estimate the individual creatinine production rate (CrPROD in mg/min), which was 0.89±0.31 mg/min (Cr-PROD: 1.04±0.28 and 0.67±0.21 mg/min, in male and female gender, respectively).. In particular, CrPROD was estimated considering LBM, or anthropometric measurements only as variables by the following equations:

$$1) \text{ Cr-prod} = 0.9821 + 0.03842 * (\text{Lean-app in Kg} - 25).$$

Intercept (±SE) 0.9821±0.04, coefficient (±SE) per (Lean-app in Kg-25): 0.03842, (p<0.0001). In other words, as an example, a normal individual with an appendicular lean mass of 25 Kg should produce approx. 1mg/min creatinine, that is 1.44 g/24 hrs.

$$2) \text{ Cr-PROD} = -0.366115 + (0.28081 \text{ if male}) - (0.00275 * \text{Circ-abdomen in cm}) \\ + 0.042854 * \text{Circ-arm (in cm)}$$

Male gender: coefficient( $\pm$ SE)  $0.280811\pm 0.04$ , ( $p<0.0001$ ); Circ-abd: coefficient( $\pm$ SE)  $-0.00275\pm 0.002$ , ( $p=0.05$ ); Circ-arm: coefficient( $\pm$ SE)  $0.042854\pm 0.008$ , ( $p<0.0001$ ).

## **Conclusions**

### Perspective study

During the aging process, serum creatinine loses its ability to predict renal function partly because of the lean body mass reduction. Thus, creatinine-based eGFR formulae are less accurate in the elder, and may lead to a paradoxical, apparent increase in GFR. Lean mass reduction, earlier in males, is associated with a proportionally higher decrease in the synthetical and metabolical muscle activity.

Our findings suggest that Cystatin C is particularly useful in the evaluation of renal function in elderly people because it is independent on age-related modifications in body composition.

### Cross sectional study

Serum creatinine alone is not capable to disclose in a sufficient accurate way the early renal damage in CKD. The present study confirms the large variability and low accuracy of the more frequently used formulae for GFR estimation, particularly in patients with initial reduction in GFR, in obesity and in the feminine gender. The recently proposed Virga's formula, although not yet validated in large case populations, has shown a good performance in detecting mild, initial reduction of GFR with an error  $<15\%$  of the true value of measured GFR. The estimation of the creatinine production rate seems to be possible by the use of simple, and repeatable direct anthropometric measurements that do not need any expensive diagnostic method.

Albeit the relatively modest number of investigated subjects in both studies, present data suggest that uncertainty in the quantitative and quali-quantitative estimation of lean mass in adults (cross-sectional study) and in elderly (perspective study), respectively, is the major biasing factor in the estimation of GFR. The hypothesis raised by the Prospective study, if experimentally confirmed, suggests that elderly-dedicated formulae for GFR estimation needs to be developed, similarly to those used in children.

## II. INTRODUZIONE

### 1 RICONOSCIMENTO DELLE MALATTIE RENALI

Nel corso degli ultimi anni si sono moltiplicati gli studi relativi al progressivo incremento dell'incidenza e della prevalenza nei Paesi occidentali dei pazienti uremici che necessitano di un trattamento sostitutivo renale. E' stato stimato che entro il 2030 più di 2 milioni di persone negli Stati Uniti avranno bisogno di un trattamento dialitico o di un trapianto per insufficienza renale in fase terminale [1]. Attualmente, circa 19 milioni di adulti negli Stati Uniti sono nello stadio iniziale della malattia [2], definito come o diminuzione del GFR al di sotto di 60 ml per minuto per 1,73 m<sup>2</sup> di superficie corporea o presenza di danno renale, indipendentemente dalla causa, per 3 o più mesi (Tab.I) [3].

**Tab.I** Stadi della malattia renale cronica (CKD), Prevalenza negli Stati Uniti nel 2000, Indicazioni per il riconoscimento, la valutazione e il trattamento stadio-specifico della malattia.

Stadio di CKD	Descrizione	GFR (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	Riconoscimento, Valutazione e Trattamento	Preval. %	Preval. n° Casi (milioni)
1	Danno renale con funzione renale normale o ridotta	>90	Diagnosi e trattamento. Trattamento delle condizioni coesistenti. Rallentare la regressione. Rischio CVD	2,8	5,6
2	Danno renale con lieve riduzione del GFR	60-89	Stima della progressione	2,8	5,7
3	Moderata riduzione del GFR	30-59	Valutazione e trattamento complicanze	3,7	7,4
4	Severa riduzione del GFR	15-29	Rivolgersi ad un nefrologo e prendere in considerazione la terapia sostitutiva	0,1	0,30
5	Uremia (?)	<15	Terapia Sostitutiva o Trapianto	0,2	0,30

Le previsioni per i prossimi 20 anni parlano quindi di un problema “epidemico” con costi sociali e sanitari preoccupanti. Numerosi sforzi vengono rivolti, pertanto, alla conoscenza dei meccanismi molecolari e dei fattori clinici della progressione delle nefropatie croniche verso l’uremia. I fattori di rischio di nefropatia cronica includono un’età superiore ai 60 anni, l’ipertensione arteriosa, il diabete, le malattie cardiovascolari e la familiarità per malattie renali. I fattori comorbidi che si associano alla nefropatia, come per esempio l’ipertensione, l’anemia, la malnutrizione, l’iperparatiroidismo secondario, insorgono abbastanza precocemente con la riduzione del filtrato glomerulare [3]. Una riduzione del filtrato glomerulare (GFR) inferiore già a  $60 \text{ ml/min/1.73m}^2$  è associato ad un rischio di progressione della nefropatia e di morte per cause cardiovascolari in maniera inversamente proporzionale al grado di “nefropatia” (Chronic Kidney Disease - CKD stadio 1-5) [3,4]. E’ noto, inoltre, che dopo i cinquanta anni, la velocità di filtrazione glomerulare (GFR) subisce un continuo declino di circa  $1 \text{ ml/min/anno}$  nella popolazione sana. Nel corso di alcune patologie con coinvolgimento renale, quali il diabete per esempio, il declino del GFR è stimato essere intorno a di  $4-8 \text{ ml/min/anno}$  o più. L’importanza della definizione del grado di insufficienza renale diviene ancora più importante nella popolazione anziana, nella quale l’adeguamento della posologia dei farmaci (soprattutto quelli nefrotossici o con ridotta finestra terapeutica) è necessaria per un loro buon uso nella pratica clinica. Inoltre, numerosi studi dimostrano l’impatto negativo dell’insufficienza renale acuta (Acute Kidney Injury, AKI), da qualsiasi causa, sulla mortalità nei soggetti anziani ospedalizzati.

Negli stadi iniziali di insufficienza renale cronica, i pazienti mostrano pochi e sfumati segni e sintomi, per questo i test per lo screening e la diagnosi divengono fondamentali in nefrologia.. Un test ideale dovrebbe essere in grado di

riconoscere anomalie abbastanza precocemente da consentire un pronto avvio del trattamento terapeutico volto a risolvere il problema o a prevenire la progressione del danno renale. Una volta riconosciuta la malattia renale e iniziata la terapia è importante poter valutare la progressione del danno e la risposta al trattamento per pianificare l'ulteriore strategia terapeutica

Un'accurata determinazione del GFR può fornire utili informazioni nel follow-up del decorso clinico della malattia. Infatti le linee guida redatte dalla National Kidney Foundation's Kidney Disease and Outcomes Quality Initiative (K/DOQI) hanno definito gli stadi delle malattie renali croniche proprio in base al GFR [3].

## **2 MISURAZIONE DEL FILTRATO GLOMERULARE**

Il tasso di filtrazione glomerulare è tradizionalmente misurato come clearance renale di una particolare sostanza, o marker, dal sangue. La clearance di una sostanza è il rapporto fra la quota di sostanza rimossa dal sangue e la sua concentrazione media nel plasma nell'intervallo di tempo preso in considerazione. La clearance è espressa in moli o peso della sostanza per il volume per il tempo. Può anche essere definita come il volume di plasma depurato di una certa sostanza nell'unità di tempo.

In determinate condizioni, la misura della concentrazione di una sostanza sia nelle urine che nel plasma permette di ottenere un accurato valore di GFR. Infatti se si assume che una sostanza non sia sottoposta a meccanismi di eliminazione extrarenali, di riassorbimento o secrezione tubulare, allora il GFR può essere calcolato come:

$$\text{GFR} = \text{UV/PT}$$

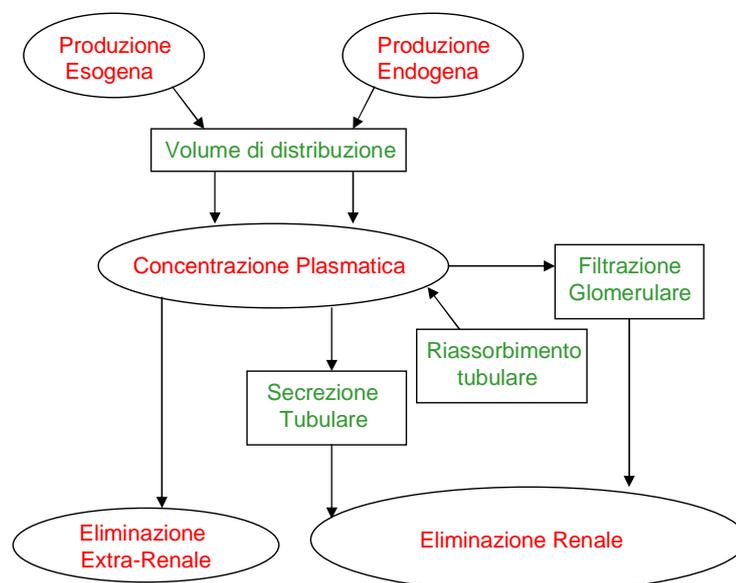
dove U è la concentrazione urinaria, V è il volume delle urine e P è la media della concentrazione plasmatica nel tempo T di raccolta delle urine. Sfortunatamente la secrezione tubulare, il riassorbimento di una data sostanza o entrambi spesso portano alla sovra- o sottostima del reale valore di filtrazione glomerulare.

In altri specifici casi la concentrazione plasmatica di una sostanza può essere completamente dipendente dalla clearance renale e può darci una misura accurata di GFR. Quando la quantità di sostanza aggiunta al plasma da fonti esogene e/o endogene è costante e quando non ci sia eliminazione extrarenale, riassorbimento e secrezione tubulare, il GFR è uguale all'inverso della concentrazione plasmatica del marker moltiplicato per una costante:

$$\text{GFR} = k * 1/[\text{X}]$$

dove [X] è la concentrazione plasmatica media della sostanza in esame e k è la costante di eliminazione.

Questa costante è la quantità escreta con la filtrazione glomerulare che in condizioni di stabilità deve uguagliare la quota aggiunta al plasma. In altre parole in queste condizioni  $UV/T$  è uguale ad una costante C, così che il  $\text{GFR} = C/P$  e perciò il GFR diviene inversamente proporzionale a P. (Fig. 1)



**Figura 1.** *Meccanismi che influenzano le relazioni fra un indicatore utilizzato per la misurazione del GFR e il reale GFR.* Quando la secrezione e il riassorbimento di una sostanza sono nulli e la concentrazione plasmatica è costante, il GFR è uguale al rapporto fra la quota eliminata dal rene e la concentrazione plasmatica. Se inoltre la somma fra la produzione esogena ed endogena è costante e uguale alla quota di eliminazione extrarenale allora l'eliminazione renale sarà anch'essa costante e inversamente proporzionale alla concentrazione del marker nel plasma.

Da quanto detto possiamo delineare le caratteristiche di un marcatore ideale di filtrazione glomerulare. Schematicamente esse sono:

1) produzione costante; 2) innocuo; 3) comodo o facile da somministrare; 4) rapidamente diffusibile nello spazio extracellulare; 5) non legato a proteine e liberamente filtrato; 6) non sottoposto a riassorbimento e secrezione tubulare; 7) non eliminato per via extrarenale o degradato; 8) le misurazioni accurate e riproducibili; 9) non interferisce con altri componenti; 10) economico; 11) non influenzi il filtrato glomerulare.

Il marker ideale di filtrazione glomerulare deve ancora essere identificato. In ogni caso il gold standard dovrebbe rispettare le caratteristiche sopra elencate ed i metodi utilizzati attualmente dovrebbero confrontarsi con esso. Questi ultimi non sono mai fedeli a tutti i principi perciò la scelta di uno rispetto all'altro è di solito frutto di un compromesso fra accuratezza e praticità. Inoltre ogni scelta deve prendere in considerazione la situazione clinica e cercare di ottenere il massimo numero di informazioni al minimo costo.

## 2.1 MARCATORI ENDOGENI DI GFR

### CREATININA SIERICA

La Creatinina è un prodotto metabolico della creatina e della fosfocreatina, derivanti entrambi dal compartimento muscolare. Ne consegue che la creatinina è

direttamente correlata alla massa muscolare e che subisce scarse variazioni giornaliere [5]. Nonostante ciò la sua produzione può modificarsi nel tempo se consideriamo periodi più lunghi nei quali si verificano importanti cambiamenti nella composizione corporea [6]. La variabilità fisiologica intra e interindividuale di tale parametro rende difficile la sua interpretazione (Tabella II). Differenze sono associate al genere, al sesso, all'età e sono anch'esse attribuibili alla diversa massa muscolare [7]. Anche l'apporto dietetico è una fonte di variabilità; la creatina derivata dalla carne ingerita è convertita in creatinina e può determinare aumenti anche fino al 30 per cento della totale escrezione di essa. [8]. La conversione della creatina in creatinina avviene con la cottura e visto che la creatinina viene rapidamente assorbita dal tratto gastrointestinale, l'ingestione di carne cotta può determinare un rapido incremento dei suoi valori plasmatici. [9].

**Tabella II.** *Fattori che influenzano la concentrazione di creatinina. Gli effetti sono dovuti alla variazione nella massa muscolare che condiziona la produzione di creatinina.*

Fattori	Effetti sulla Creatinina Sierica
Età	Riduzione
Sesso femminile	Riduzione
Razza o etnia <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nera</li> <li>• Caucasica</li> <li>• Asiatica</li> </ul>	Aumento Riduzione Riduzione
Struttura Corporea <ul style="list-style-type: none"> <li>• Muscolare</li> <li>• Amputazione</li> <li>• Obesità</li> </ul>	Aumento Riduzione Nessun cambiamento
Malattie Croniche <ul style="list-style-type: none"> <li>• Malnutrizione, Infiammazione</li> <li>• Malattie neuromuscolari</li> </ul>	Riduzione Riduzione
Alimentazione <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dieta vegetariana</li> <li>• Ingestione di carne cotta</li> </ul>	Riduzione Aumento

La creatinina è una sostanza a basso peso molecolare (113 D), non si lega alle proteine plasmatiche ed è liberamente filtrata dai glomeruli renali. E' stato

dimostrato esservi anche una modesta, ma non trascurabile, quota di secrezione da parte del tubulo renale. L'entità di tale fenomeno varia nel tempo e fra i diversi individui ed è inoltre un processo saturabile bloccato da alcuni farmaci come la Cimetidina, il Trimethoprim, Pyrimethamina e Dapsone. Di particolare rilievo è anche il fatto che la proporzione di creatinina escreta dovuta alla secrezione tubulare aumenta con la riduzione della funzione renale [10]; ciò ha importanti implicazioni cliniche poiché il GFR può diminuire più rapidamente rispetto alla variazione della creatinina sierica e della clearance della creatinina che potrebbero perciò sovrastimare tale parametro. E' stato osservato esservi anche una piccola quota di eliminazione extrarenale che compare per bassi livelli di GFR, e pare essere legata alla degradazione della creatinina da parte dei batteri intestinali e quindi essere influenzata dall'uso di antibiotici [11].

Vi sono diverse metodiche di misurazione della creatinina [12], quello più utilizzato è il metodo di Jaffè [13] che ha subito successive modifiche: questo metodo prevede il legame della creatinina con i picrati alcalini e il dosaggio di essa con metodi colorimetrici. Esiste però un elevato numero di sostanze che possono interferire con la misurazione della creatinina: glucosio, fruttosio, piruvato, acetoacetato, acido urico, acido ascorbico, bilirubina e proteine plasmatiche possono fornire infatti falsi valori di creatininemia poiché vengono erroneamente misurati come cromogeni [14]. Valori bassi o normali di tali sostanze solitamente non interferiscono con le misurazioni in maniera significativa, ma in condizioni patologiche in cui vi sia un eccesso di tali composti si può avere un'importante interferenza; questo succede ad esempio nei pazienti diabetici in chetoacidosi o nei soggetti trattati con cefalosporine o ancora nell'ittero [14,15]. E' stato però osservato che il contributo di tali cromogeni non-creatinina è molto maggiore nei soggetti con normali valori di creatinina rispetto a

quelli con insufficienza renale ormai avanzata [16]. Diverse modifiche sono state introdotte nell'originale metodica di Jaffè per rimuovere le interferenze di queste sostanze [17] come, ad esempio, la deproteinizzazione, l'utilizzo di resine, la misurazione della positività dei cromogeni prima e dopo la distruzione della creatinina da parte di batteri e la tecnica dialitica. A causa della grande variabilità fra i limiti superiori dei valori di creatininemia riportati dai diversi laboratori si è giunti, dopo progressive modifiche dell'originale metodica, ad una nuova tecnica che utilizza ancora la reazione di Jaffè, ma separa tramite particolari accorgimenti la creatinina dai cromogeni non-creatinina e impedisce almeno in parte le normali interferenze generate da essi [18]. Il National Kidney Education Program ha iniziato un programma di standardizzazione della creatinina con lo scopo di minimizzare le differenze sistematiche fra i vari laboratori, utilizzando una creatinina standard di riferimento misurata al National Institute for Standards and Technology (NIST) [11].

La creatinina sierica è probabilmente il metodo di misurazione del GFR più ampiamente usato e questo è dovuto principalmente alla praticità e al basso costo. Sfortunatamente però tale parametro è poco sensibile anche qualora vi siano sostanziali riduzioni del GFR. È stato infatti osservato che è necessario che vi sia una riduzione del 50% del filtrato glomerulare affinché i valori di creatininemia comincino ad innalzarsi [19]. Questa soglia, che sottintende spesso una prognosi negativa di mancata reversibilità, sacrifica sicuramente la possibilità di informazioni più fini di variabilità fisiologica della filtrazione renale nelle varie condizioni di vita, quali per esempio: l'invecchiamento fisiologico; le diverse condizioni di circolo durante lo sforzo fisico massimale o l'allettamento; il sovraccarico funzionale per il metabolismo renale di sostanze esogene come i farmaci e così via. Ad esempio in un uomo di 50 anni l'aumento della creatinina

da 1mg/dl a 2mg/dl riflette una riduzione del filtrato glomerulare di circa 46 ml/min/1,73m<sup>2</sup>, invece un successivo aumento da 2mg/ml a 3mg/ml riflette un declino di 14 ml/min/1,73m<sup>2</sup>. E' proprio nella nefropatia incipiente che la creatinina sierica diviene un tipo di misura inappropriato [20].

Oltre a questo, la corretta interpretazione della creatinina sierica nella pratica clinica è resa problematica dal fatto che dovrebbe essere considerata in relazione alla massa muscolare la quale però varia a seconda dell'età, del sesso ed in un stesso individuo può subire importanti riduzioni in brevi periodi in particolari condizioni cliniche [21]. Ad esempio nei pazienti trapiantati spesso è difficile che tale valore sia attendibile poiché sono sottoposti a terapia steroidea la quale è responsabile di un netto declino della componente muscolare [22]. Oltre a questo, è necessario sempre ricordare, da una parte, che la componente secretiva nell'escrezione urinaria della creatinina aumenta con il declino della funzionalità renale, dall'altra, che possono esservi interferenze da farmaci o altre molecole nella misurazione analitica.

#### CLEARANCE della CREATININA

La misurazione della clearance della creatinina permette di ovviare ad alcuni dei problemi relativi alla misurazione della creatinina plasmatica come ad esempio le differenze nel tasso di produzione dovute alla diversa massa muscolare e la porzione di eliminazione extrarenale. Nonostante questo l'attendibilità di tale misura è comunque notevolmente ridotta a causa di alcune variabili che non possono essere definite con precisione.

Una di queste variabili è la secrezione della creatinina che inevitabilmente ci fornisce una sovrastima. E' stato però osservato che tale errore è ridotto qualora le concentrazioni sieriche ed urinarie di creatinina siano entrambe misurate con il

metodo di Jaffè [23]. Infatti mentre nel plasma i costituenti cromogeni non creatinina posso rendere ragione di valori falsamente elevati di creatininemia, nelle urine questo non avviene perché questi composti non creano interferenze. Di conseguenza, per quanto appena detto, con tale misurazione otterremo valori di clearance falsamente bassi. Alcuni studi hanno dimostrato che questo errore tende ad equilibrare quello dovuto alla secrezione della creatinina e che il risultato finale pare essere più vicino al reale valore di GFR [23,24]. E' doveroso però osservare che i due errori sono indipendenti e che la somma di essi può anche generare un errore di grandezza maggiore.

Un altro fattore che può contribuire all'imprecisione di tale misurazione è il prolungato stoccaggio delle urine che può perturbare la misurazione dei livelli di creatininemia. Le alte temperature e il basso pH delle urine accrescono infatti la conversione della creatina in creatinina. E' stato infatti dimostrato che la conservazione delle urine in condizioni non appropriate per più di 24 ore determina un aumento del 20% dei livelli di creatinina nelle urine [25].

La secrezione tubulare della creatinina essendo soggetta ad ampia variabilità individuale e interindividuale non consente l'utilizzo di un fattore di correzione costante; inoltre essa aumenta con il diminuire della funzionalità renale rendendola perciò inappropriata nel determinare un corretto valore di GFR in pazienti con malattia renale [26].

Infine come per tutte le misure di clearance rimane il problema della completa raccolta delle urine che risulta difficile per molti e che accresce l'imprecisione del valore di questo parametro, come già detto in precedenza. Inoltre nel calcolo di tale misura è necessario considerare un valore medio fra i livelli di creatininemia all'inizio e alla fine dell'esame per ottenere un corretto valore di clearance; nella pratica clinica questo non viene fatto perchè ci si affida ad un valore istantaneo

derivante da un singolo prelievo plasmatici, ma la concentrazione di creatinina può in realtà variare nelle 24 ore soprattutto a causa della dieta e dell'attività fisica [27]. Il tasso di variazione giornaliera dei livelli di creatinina è infatti approssimativamente dell' 8% [28].

## CISTATINA C

La Cistatina C è una proteina basica a basso peso molecolare (13kD) a singola catena aminoacidica la cui sequenza è stata determinata all'inizio degli anni 80. In seguito la cistatina C è stata identificata quale inibitore delle proteasi della cisteina per la sua somiglianza con la cistatina del pollo con la quale presenta analogia per il 44% della sua sequenza. [29-33]

Negli ultimi 20 anni sono state identificate almeno 11 forme umane di inibitori delle proteasi della cisteina .

La sola cistatina C sembra essere prodotta da tutte le cellule umane nucleate. Studi di immunochimica e di Northern blot su tessuti umani e su linee cellulari hanno dimostrato come la cistatina C o il suo mRNA sia presente in tutte le cellule studiate [34]. La determinazione della struttura del gene umano della cistatina C e del suo promotore hanno evidenziato come il gene sia un *house keeping gene*, ciò ad indicare una produzione costante da parte di tutte le cellule nucleate [34]. La presenza di una sequenza leader idrofobica nella pre-cistatina C indica che la proteina viene normalmente secreta [34,35] Studi clinici sui livelli sierici di cistatina C su larghe coorti di pazienti non hanno dimostrato correlazioni tra i livelli sierici e alcuna condizione fisiopatologica ad esclusione di quelle che coinvolgono il filtrato glomerulare, ciò ad indicare una secrezione costante da parte della maggioranza di tutti i tessuti umani [35,36].

Alcuni fattori risultano in grado di alterare la produzione di cistatina C tra cui elevate dosi di glucocorticoidi che ne aumenterebbero la secrezione [37] ma, sembra che piccole e medie dosi non la modifichino[38]. La disfunzione tiroidea anche lieve interferisce con il livello della cistatinemia: i livelli di cistatina C sono più bassi nell'ipotiroidismo e più alti nell'ipertiroidismo se confrontati con lo stato eutiroideo [38].

Piccole proteine a basso peso molecolare sono state proposte quali marcatori di filtrato glomerulare per la loro capacità di essere filtrate attraverso la normale membrana glomerulare; in un rene normofunzionante queste piccole proteine vengono però completamente riassorbite e degradate dalle cellule del tubulo prossimale. Al contrario, studi sulla cistatina C umana hanno dimostrato che la clearance renale plasmatica della cistatina C è il 94% della clearance renale calcolata tramite la clearance della Cr<sup>51</sup>EDTA e che la cistatina C è liberamente filtrata dal glomerulo. Circa il 99% della cistatina C filtrata è degradata nelle cellule tubulari. Studi di immunoistochimica e Northern Blot su reni umani hanno confermato la normale degradazione della cistatina C umana dalle cellule del tubulo prossimale dopo il suo passaggio attraverso la membrana glomerulare. Per queste sue proprietà la cistatina C sembra avere alcuni vantaggi rispetto alla creatininemia e secondo alcuni autori è indipendente dalla massa muscolare, sesso ed età. [40-41]. Date queste caratteristiche di sua produzione ubiquitaria, la cistatina C viene considerata un marker ideale di filtrazione glomerulare

La cistatina C è stata quindi proposta come marcatore di GFR potenzialmente superiore alla creatininemia perché la sua produzione non sarebbe influenzata dall'età [42], sesso [43] e composizione corporea [44]. Una metanalisi di 46 studi trasversali, comprensivi di adulti e bambini, suggerisce la superiorità della

cistatina C rispetto alla creatinina plasmatica ed alle formule basate su creatinina ed altri predittori di massa muscolare (età, sesso, peso, altezza) nella stima del GFR [36]. Anche in soggetti diabetici (sia di tipo 1 che di tipo 2) la cistatina C viene considerata, in aggiunta alla microalbuminuria, un marker precoce di danno renale [45] e risulta essere in longitudinale, un miglior predittore della riduzione di GFR rispetto alle già citate formule. [46].

Recenti studi longitudinali [47] hanno inoltre evidenziato come elevati valori di cistatina C, creatinina e bassi valori di filtrato glomerulare al basale, siano associati ad un aumentato rischio di insufficienza renale e morte per malattie cardiovascolari: l'associazione con la cistatina C sembra essere la più forte, confermata da un importante studio su 4637 anziani dove la sola cistatina C risultava essere un forte predittore del rischio di morte per causa cardiovascolare, migliore della creatinina [47].

## **2.2 MARCATORI ESOGENI DI GFR**

### **INULINA**

L'inulina è considerata il gold standard fra i marcatori esogeni di GFR, a causa però della scarsa disponibilità e dei costi elevati il suo utilizzo è stato abbandonato nella pratica clinica.

L'inulina è un polimero del fruttosio, è inerte e non è legata alle proteine plasmatiche; si distribuisce nei liquidi extracellulari, è liberamente filtrata dai glomeruli e non è né riassorbita né secreta dai tubuli renali [48]. Viene dosata nelle urine e nel plasma con diversi saggi colorimetrici, che risultano però molto dispendiosi in ordine di tempo e perciò sono stati sostituiti dall'uso di autoanalizzatori. Il glucosio può interferire con tali dosaggi perciò bisogna

prestare particolare attenzione o ricorrere a determinati accorgimenti qualora i pazienti mostrino elevati livelli glicemici, soprattutto quando questi subiscano importanti variazioni durante l'esecuzione del test di misurazione del GFR.

Il metodo della clearance renale dell'inulina per misurare il GFR fu sviluppato da Homer Smith nel 1951 [49]. Negli anni numerosi ricercatori hanno adottato tale tecnica che è stata modificata solo in minima parte. Generalmente le misurazioni vengono fatte in condizioni standard. I pazienti sono studiati la mattina dopo una notte di digiuno. Una quantità di acqua compresa fra 10 e 15 ml per kg di peso corporeo viene somministrata per via orale prima dell'infusione dell'inulina e durante lo svolgimento del test per mantenere un flusso urinario costante di almeno 4 ml/min. Viene poi somministrata una dose di partenza di inulina seguita da un'infusione continua per mantenerne i livelli plasmatici costanti. Una volta raggiunta una condizione di stabilità, vengono eseguite diverse raccolte urinarie a precisi intervalli di tempo (circa ogni 30 min); per aumentare la puntualità di tali raccolte sarebbe quindi auspicabile la cateterizzazione. Contemporaneamente vengono eseguiti prelievi plasmatici seriatati per valutare i livelli di inulinemia.

La Clearance dell'inulina viene così calcolata dai livelli plasmatici (valore medio nell'intervallo di tempo), dalla concentrazione urinaria e dal flusso urinario.

La misurazione della clearance renale presenta però numerosi inconvenienti. La cateterizzazione della vescica, ad esempio, è associata ad alcuni rischi e non è accettata da tutti i pazienti. Tuttavia la clearance misurata senza ricorrere a tale procedura risulta spesso imprecisa a causa di possibili perdite spontanee e di incompleto svuotamento, ad esempio in pazienti con prostatismo o con vescica neurologica. Elevati volumi urinari probabilmente aiutano a ridurre gli effetti del ristagno urinario, ma l'introito idrico eccessivo e continuo risulta comunque problematico e sconcertante per il paziente. Oltre a questo deve essere inserita

anche una cannula endovenosa alimentata ad infusione costante, che contribuisce ad arrecare disagio al paziente. Perciò, nonostante la sua accuratezza, tale metodica è eccessivamente sconveniente ed indaginosa.

Per ovviare al problema della raccolta urinaria Nosslin nel 1965 propose una tecnica di clearance plasmatica dell'inulina dimostrando la possibilità di valutare la clearance di sostanze ad escrezione renale in base al loro decadimento plasmatico secondo un modello bicompartimentale. Il rapporto tra la dose iniettata e l'area complessiva della concentrazione plasmatica della sostanza nel tempo dava la misura della velocità di filtrazione glomerulare [50]. Tale metodica può essere attuata sia mediante un'infusione continua sia mediante l'iniezione di un singolo bolo di inulina. Con il primo metodo se, durante l'infusione continua, sia il volume di distribuzione che i livelli plasmatici di inulina sono costanti, il tasso di infusione deve eguagliare quello di eliminazione. La clearance dell'inulina diviene quindi il rapporto fra il tasso di velocità di infusione e la concentrazione plasmatica. Sono stati osservati alti livelli di correlazione fra questa tecnica e quella della clearance urinaria [51]. È vero però che mantenere tassi costanti di infusione risulta problematico e questa tecnica viene quindi poco utilizzata. La tecnica del singolo bolo di inulina verrà discussa più avanti.

Da quanto detto appare chiaro che numerosi problemi limitano l'uso di questa sostanza come marker di GFR e da questo è dipeso l'abbandono del suo utilizzo.

## CLEARANCE PLASMATICA DI MARCATORI ESOGENI

### *Markers radioisotopici, mezzi di contrasto radiologici e modelli matematici*

Per la misurazione della clearance plasmatica o renale possono essere utilizzate alcune sostanze legate a marcatori radioattivi o in alternativa mezzi di contrasto

inerti. La stima del GFR mediante la clearance plasmatica eseguita con l'iniezione di un bolo intravenoso di una sostanza è molto comoda ed è quindi stata utilizzata molto più spesso della clearance renale con l'infusione continua. Anche la tecnica della clearance renale usando una singola iniezione in un bolo è molto complessa e diviene quindi spesso impraticabile.

I modelli matematici utilizzati per descrivere la clearance plasmatica si basano sul fatto che il volume di distribuzione e l'escrezione renale siano costanti nel tempo e che non vi sia eliminazione extrarenale.

Nel campo della farmacocinetica sono utilizzati diversi modelli matematici per descrivere la distribuzione di una sostanza nell'organismo e la sua eliminazione. Per seguire la variazione della concentrazione plasmatica di una sostanza dopo l'iniezione intravascolare in bolo, l'organismo viene diviso in vari compartimenti e il fenomeno può essere quindi descritto mediante modelli matematici mono-, bi- o tri-compartimentali [52, 53].

Immediatamente dopo l'iniezione intravenosa di un bolo di sostanza la concentrazione plasmatica rapidamente sale raggiungendo un picco di concentrazione; ad esso fa seguito una caduta esponenziale della concentrazione che è dovuta principalmente a due fenomeni: 1) diluizione, perchè la sostanza si distribuisce nel plasma circolante 2) diffusione nel compartimento extravascolare. E' noto infatti che l'acqua costituisce il 60% del peso corporeo e che  $\frac{2}{3}$  sono intracellulari e  $\frac{1}{3}$  extracellulari, di questo compartimento fanno parte i liquidi interstiziali e intravascolari che ne rappresentano rispettivamente  $\frac{3}{4}$  e  $\frac{1}{4}$ . Durante la diffusione delle sostanze dal plasma allo spazio extravascolare, c'è un concomitante spostamento di acqua e molecole nel senso opposto così che lentamente viene raggiunto l'equilibrio. All' equilibrio c'è una concentrazione simile di mezzo di contrasto nel compartimento vascolare ed extravascolare .

Inoltre sebbene la sostanza venga continuamente eliminata attraverso i reni e perciò la sua concentrazione plasmatica scenda, contemporaneamente c'è una netta diffusione di molecole dal compartimento extravascolare a quello vascolare. Un completo equilibrio è di solito raggiunto in 2 h, se la funzione renale è normale, altrimenti possono essere necessarie 3 o più ore.

La curva di scomparsa di una sostanza nel plasma può essere quindi descritta mediante 3 modelli matematici a seconda di quanti compartimenti di distribuzione si vanno a considerare (Fig. 2).

Modello monocompartimentale:

In questo modello, ideato da T. Brochner-Mortensen [54], il plasma è descritto come un compartimento in cui la sostanza si è già uniformemente distribuita alla fine dell'iniezione del bolo. La concentrazione teoricamente uniforme della sostanza viene indicata con il valore di  $I$  mg/ml e al tempo  $t$  (minuti dopo l'infusione della sostanza) la concentrazione del marker nel compartimento plasmatico è descritta come  $C_{comp} = I_1 e^{-bt}$ , dove  $b$  è il tasso di eliminazione costante della sostanza. L'integrale quindi di tale funzione  $I_1/b$  rappresenta l'area sotto la curva (AUC) e descrive la velocità di filtrazione glomerulare. Questo sistema è un modello semplificato in cui si assume che il plasma non abbia comunicazione con gli altri spazi extravascolari. È però evidente che l'AUC ottenuto è molto minore dell'area sotto la curva della concentrazione reale e perciò si avrà una sovrastima della clearance o GFR soprattutto nei soggetti con iperfiltrazione glomerulare.

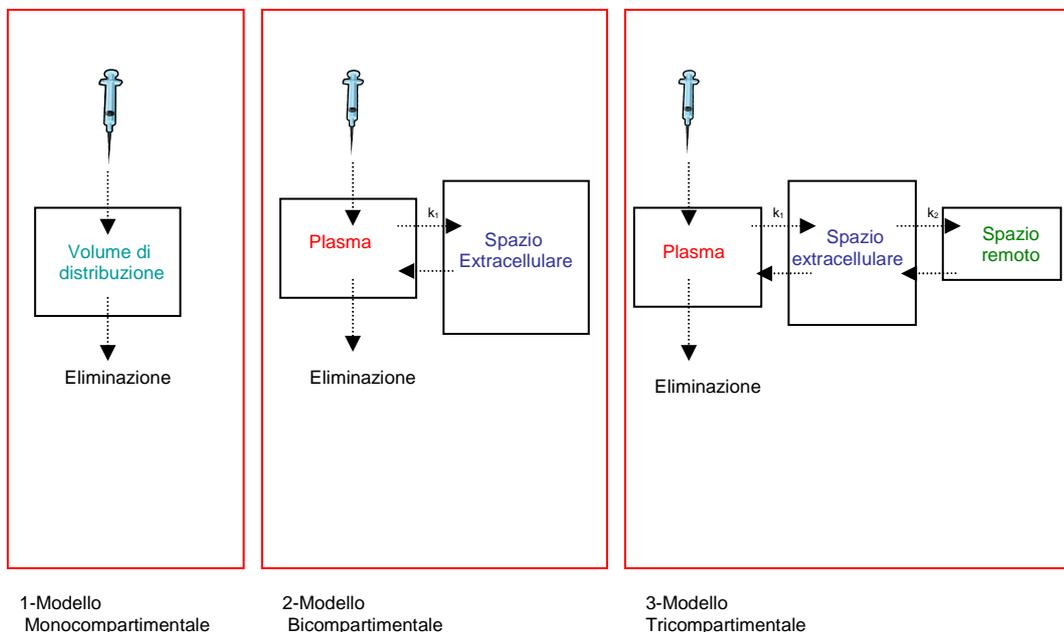
Modello bicompartimentale:

In questo modello si assume che immediatamente dopo l'iniezione della sostanza essa si distribuisca in un compartimento centrale (plasma) e in uno periferico (spazio extravascolare). La rapida discesa della concentrazione dopo il picco è

quindi dovuta sia al passaggio di sostanza nel compartimento extravascolare sia alla filtrazione glomerulare, fino a che viene raggiunto un equilibrio. In questo modello la curva è descritta dalla somma di due funzioni esponenziali con differenti tassi di eliminazione. La concentrazione del marker quindi al tempo  $t$  sarà  $C(t) = I_1 e^{-b_1 t} + I_2 e^{-b_2 t}$ . Questo modello più complesso tiene però conto anche della prima porzione della curva che ci dà informazioni importanti per la precisa valutazione del filtrato glomerulare.

Modello tricompartmentale:

In questo modello si tiene conto non solo della comunicazione fra lo spazio intravascolare e interstiziale, ma anche fra lo spazio extracellulare e i compartimenti remoti (es. intracellulare, spazio cefalorachidiano). La concentrazione del marker al tempo  $t$  è quindi data dalla somma di 3 funzioni esponenziali ( $C(t) = I_1 e^{-b_1 t} + I_2 e^{-b_2 t} + I_3 e^{-b_3 t}$ ).



**Figura 2.** Confronto dei modelli matematici per descrivere la curva di scomparsa di una sostanza iniettata nel sangue. Nel primo modello si assume che il plasma non sia in comunicazione con gli altri compartimenti. Nel secondo si osserva la comunicazione con uno spazio extravascolare e nel terzo con un ulteriore spazio remoto. E' da sottolineare come la velocità di passaggio delle molecole dal

plasma allo spazio extravascolare e viceversa sia di entità diversa da quella del passaggio da quest'ultimo allo spazio remoto, essendo questa molto inferiore.

### *IOEXOLO*

Allo scopo di evitare l'utilizzo di composti radioattivi sono state sviluppate delle tecniche capaci di rilevare con precisione anche bassi livelli di composti iodati nelle urine. Questo ha così permesso l'utilizzo di agenti contrastografici non radiomarcati, i quali pur essendo inerti sono ricchi di iodio. I mezzi contrastografici utilizzati sono a basso peso molecolare (da 600 a 1600 D), non si legano alle proteine plasmatiche e vengono eliminati principalmente attraverso la filtrazione glomerulare. Il dosaggio mediante l'utilizzo di HPLC può essere eseguito per misurare i livelli di Iotalamato sodico e di Ioexolo [55]. La sensibilità di tale metodica permette di usare una quantità molto bassa di questi marker che possono anche essere somministrati per via sottocutanea. L'HPLC è però una metodica molto costosa, richiede molto tempo ed è particolarmente laboriosa. Per questo è stata proposta una nuova tecnica che utilizza la fluorescenza a raggi X per rilevare anche basse concentrazioni di composti iodati e che è stata applicata nella valutazione della clearance dello Ioexolo.

L'utilizzo dello Ioexolo (p.m. 821 D) per misurare il GFR si va estendendo, probabilmente a causa della bassa incidenza di effetti avversi che è attribuibile alla bassa osmolarità e alle caratteristiche non ioniche della molecola. Lo iohexolo è eliminato esclusivamente dal rene [56-58] in circa 12 o 24h . La clearance extrarenale dello ioexolo non supera i 2 ml/min per 1,73 m<sup>2</sup>. La clearance plasmatica dello ioexolo è comparabile a quella ottenuta con altri marker radioattivi e con l'inulina [59, 60]. Il gruppo di Remuzzi dell'Istituto "Mario Negri" di Bergamo, ha infatti dimostrato l'appropriatezza dello ioexolo come

marker di GFR confrontandolo sia con l'inulina che con l'EDTA Iotalamato [61]. Una dose maggiore di 30 ml di ioexolo è necessaria se i campioni vengono dosati con la tecnica a radiofluorescenza, anche se la dose viene ridotta nei pazienti con funzionalità renale compromessa. Una dose anche inferiore a 5 ml è sufficiente se sono utilizzati saggi più sensibili come l'HPLC. Questa tecnica appare estremamente sicura e priva di rischi, essendo lo ioexolo un mezzo di contrasto non ionico, tanto che anche nei pazienti diabetici ad alto rischio, con marcata riduzione della funzionalità renale, la nefrotossicità di queste sostanze è stata osservata solo per dosi superiori a quelle normalmente utilizzate nella valutazione del GFR. Anche l'incidenza di effetti avversi extrarenali derivanti da dosi più elevate di mezzi di contrasto non ionici usati nelle procedure radiologiche è bassa. Bisogna però sottolineare come tutte queste metodiche che prevedono la somministrazione di agenti radiomarcanti o meno sono associati ad un rischio di reazioni allergiche in risposta all'infusione. Nonostante tale rischio sia molto basso, nessuna di queste sostanze va somministrata a soggetti allergici a composti iodati.

### **3 NORMALIZZAZIONE DEL GFR**

#### **3.1- Body Surface Area (BSA)**

La misurazione del GFR solitamente si adatta meglio al monitoraggio della progressione della malattia rispetto al riconoscimento e alla diagnosi per due principali ragioni: la prima è il costo e la complessità di tali procedure, il secondo è che l'ampissima variabilità fisiologica dei valori di GFR nella popolazione sana rende difficile stabilire quale sia il range di normalità nel singolo paziente.

Un gran numero di ricercatori ha cercato di normalizzare il GFR in una popolazione che non avesse una malattia renale nota. Per diversi anni la superficie corporea è stata utilizzata come parametro di normalizzazione del GFR. Di solito infatti il GFR è espresso in relazione alla superficie corporea (Body Surface Area, BSA). E' stato però osservato che l'adozione di una formula matematica di regressione consente una indicizzazione più accurata del GFR rispetto alla superficie corporea [62]. Il rationale del procedimento di normalizzazione per BSA sta nel fatto che il peso dei reni ed il metabolismo basale sono proporzionali alla superficie corporea negli individui normali di differente età e stazza [63]. In generale, per calcolare la superficie corporea si ricorre alla nota formula di Dubois and Dubois che utilizza l'altezza e il peso [64]. Però tale formula risulta poco accurata sia nella fasce estreme di età della popolazione così come nei soggetti obesi.

### **3.2- Alternative alla BSA: ECV, LBM**

E' stato quindi proposto di utilizzare il volume del liquido extracellulare per normalizzare il GFR [65] poiché, come già descritto, la funzione del rene mira al mantenimento dell'omeostasi dei liquidi corporei. La normalizzazione del GFR per questo ultimo parametro, però, produce risultati molto simili a quella effettuata secondo BSA, dal momento che il volume del liquido extracellulare (ECV) ed il volume plasmatico sono strettamente correlati alla superficie corporea, così come le dimensioni dei reni e dei glomeruli .

Il volume plasmatico e quello extracellulare, oltre che il tasso metabolico basale, possono essere più accuratamente predetti misurando la quota di massa magra piuttosto che la sola superficie corporea [66]. Per tale motivo diversi Autori

ipotizzano che la massa magra (Lean Body Mass, LBM) potrebbe essere teoricamente un miglior indicatore per normalizzare il GFR nell'adulto. Tuttavia fino a quando questo non sarà indiscutibilmente dimostrato, il semplice calcolo della BSA resterà, senza dubbio, il più conveniente metodo di standardizzazione del GFR.

Nonostante la variabilità del GFR nel soggetto normale possa essere, in parte, compensata con l'indicizzazione per BSA, non si può trascurare l'effetto di diversi fattori che contribuiscono a questa variabilità. E' noto il declino del GFR con l'età, ma ciò avviene con diversa rapidità in condizioni cliniche differenti. Inoltre, fisiologicamente, l'apporto dietetico di proteine animali, l'apporto salino, l'introito idrico, la postura e le normali variazioni giornaliere possono influenzare la determinazione del GFR nei diversi individui [67]. Nelle donne la fase del ciclo mestruale può essere un fattore aggiuntivo di variabilità fisiologica [68].

Il concetto della riserva funzionale renale fu introdotto per dimostrare un GFR più elevato dopo un carico orale di proteine [69]. Questo ha creato una certa confusione fra il concetto di aumentata funzione, dovuta ai cambiamenti strutturali dopo una riduzione nella massa renale, e un aumento in acuto di GFR di natura funzionale (ad es. dopo un carico proteico). Pertanto, al fine di ridurre la variabilità fisiologica fra i diversi individui, alcuni Autori hanno proposto che la misurazione fosse fatta dopo una manovra acuta che massimizzasse il GFR. Ad esempio utilizzando il carico proteico si potrebbe ridurre la variazione del GFR legato alle fluttuazioni fisiologiche. La scarsità dei dati che dimostrino il sicuro vantaggio di queste manovre e l'ulteriore complicazione e costo della misurazione del GFR rende di fatto non proponibile tali accorgimenti.

## 4 FORMULE PER LA STIMA DEL GFR

La necessità della raccolta urinaria rimane il principale limite della misurazione della clearance della creatinina. Così diverse proposte sono state fatte riguardo a formule matematiche che potessero trasformare o correggere il valore della creatininemia in modo che si avvicinasse il più possibile al reale valore del GFR.

In condizioni ideali il GFR dovrebbe essere uguale all'inverso della creatinina moltiplicato per un tasso costante di escrezione della creatinina ( $GFR = 1/Cr \cdot k$ ), così che la variazione dell'inverso della creatinina dovrebbe essere direttamente proporzionale ai cambiamenti del GFR. In ogni caso i cambiamenti nella produzione, nel tasso di eliminazione extrarenale e nella secrezione tubulare della creatinina possono rendere impreciso il valore dell'inverso della creatinina.

Il limite dell'utilizzo del valore di creatininemia nelle varie formule di stima del GFR è dovuta alla variabilità nel tasso di produzione fra i diversi pazienti e nel paziente stesso. Le variazioni della creatinina dovute all'età e al sesso e, a loro volta correlate alla diversa componente muscolare, sono state misurate e incorporate nelle formule come fattore di correzione.

La formula più utilizzata è quella di Cockcroft and Gault [70] la quale riduce la variabilità nei valori di stima del GFR mediante la creatininemia in una popolazione di uomini e donne di differenti classi di età. Bisogna però sottolineare il fatto che tale formula non tiene conto della differenza nella produzione della creatinina in individui della stessa età e dello stesso sesso o anche nello stesso individuo nel tempo [70, 72]. Questa formula sistematicamente sovrastima il GFR in individui che sono obesi o edematosi [72]. Inoltre non tiene conto dell'eliminazione extrarenale, della componente secretiva o della inaccuratezza nella misurazione di laboratorio della creatinina. In ogni caso per la

sua semplicità e per la disponibilità dei parametri richiesti rimane ancora ampiamente usata e permette di ovviare alla raccolta delle urine delle 24h per il calcolo della clearance.

Il GFR non è mai stato misurato con maggiore accuratezza in una ampia popolazione come nel Modification of Diet in Renal Disease Study (MDRD) [73]. I ricercatori partendo dalla misurazione del GFR con radioisotopi hanno derivato una formula di stima del GFR che si avvale di semplici variabili cliniche e laboratoristiche. Essi hanno studiato soggetti randomicamente selezionati dalla popolazione e poi hanno testato la formula sui rimanenti soggetti. Una di queste formule si avvale solo di valori laboratoristici come creatinina, urea, albumina e caratteristiche dei pazienti quali sesso, età, razza ed è in grado di predire il 90.3% della variabilità del GFR misurato con <sup>125</sup>I-Iotalamato. Una formula semplificata (4 variabili) è stata derivata ed utilizza esclusivamente il valore della creatinina, l'età, la razza e il sesso e mostra una buona correlazione con il GFR misurato. Levey e coll. [74] hanno raccomandato però di non utilizzare immediatamente questa formula in pazienti con normofunzione renale, con diabete di tipo 1, nelle persone anziane e nei trapiantati di rene, poiché tali sottogruppi non sono stati inclusi nel campione di popolazione considerato nello studio. Infatti il limite delle formule di regressione derivate per la stima del GFR è quello di essere applicabile con precisione solo nella popolazione studiata. Infatti, per la scarsa prevalenza di pazienti diabetici e di soggetti di razza asiatica, oppure di soggetti con GFR normale, ulteriori studi hanno dimostrato che la formula presenta per tali sottogruppi gradi di in accuratezza maggiori [75-78]. In ogni caso le linee guida della National Kidney Foundation's K/DOQI e le linee guida europee (European Best Practice Guidelines Export Group on Hemodialysis) considerano l'equazione MDRD una reale misura di GFR negli adulti. Anche nei soggetti con nefropatia

cronica del trapianto, la formula MDRD può costituire un valido strumento per il monitoraggio della funzione dell'organo trapiantato.

In Letteratura sono attualmente disponibili oltre una decina di formule per la stima del GFR e, nel corso degli ultimi anni, altre sono state proposte.

Una nuova formula è stata proposta dal gruppo della Mayo Clinic [79] basata sui risultati ottenuti da una popolazione di 320 soggetti sani e con CKD. Le variabili considerate in questa formula sono età, sesso e creatinina sierica..

Più recentemente Taylor e Coll hanno pubblicato [80] uno studio sulla stima del GFR mediante la misurazione della lean mass e della creatininemia. La formula matematica per la stima del GFR che gli Autori propongono, nasce però dalla valutazione di una troppo esigua popolazione (soltanto 10 soggetti) perché si traggano delle conclusioni definitive in termini di accuratezza e precisione della metodica. Il GFR stimato con la formula proposta da Taylor è stato confrontato con il GFR misurato con la tecnica della clearance plasmatica dell'<sup>125</sup>I-Iotalamato con un eccellente coefficiente di correlazione ( $R= 0.97$ ).

Virga e coll. [81] hanno pubblicato nel 2007 un ulteriore studio sulla determinazione della stima del GFR partendo dalla clearance della creatinina misurata in una popolazione di 530 soggetti del Nord Est dell'Italia. I dati di funzione renale sono poi stati confrontati con quelli derivanti dalla misurazione del GFR con metodica della clearance plasmatica dello ioexolo in 229 soggetti confrontabili per sesso ed età. La formula matematica di regressione proposta da Virga è stata quindi validata nella popolazione di controllo con GFR misurato. Anche in questo caso la correlazione tra la stima del GFR e il dato misurato è risultato soddisfacente ( $R= 0.856$ ) anche rispetto alle formule MDRD semplificata e Cockcroft and Gault .

## **5 ANZIANO E FUNZIONALITA' RENALE**

Il filtrato glomerulare si riduce con l'età di circa  $1 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}/1.73 \text{ m}^2$  per anno oltre i 40 anni e la riduzione accelera dopo i 65 anni. Nella pratica clinica i livelli sierici di creatinina sono comunemente usati per stimare la filtrazione glomerulare, ma nell'anziano ciò non può venir applicato in quanto a causa della riduzione della massa muscolare e malnutrizione, la misura della creatinina plasmatica può portare ad una sovrastima del filtrato glomerulare. Nell'anziano le concentrazioni di cistatina C risultano essere un marker migliore di alterata funzionalità renale, intesa come riduzione del GFR, rispetto ai valori di creatinina quando quest'ultima rimane ancora nel range di normalità; in particolare risulta sensibile per variazioni di GFR modeste tra i 60 e i 90 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>]. La stima della prevalenza del peggioramento della funzionalità renale nell'anziano varia considerevolmente in rapporto alle formule predittive usate [82, 83] e in questo caso la cistatina C potrebbe essere una valida alternativa.

In alternativa la clearance della creatinina, calcolata dalla creatinina urinaria, il volume urinario e la creatinina sierica, richiede la raccolta urinaria delle 24 ore che spesso, soprattutto nell'anziano, può risultare difficile ed imprecisa. e formule predittive sopra descritte sovrastimano il GFR [83] e questo può portare ad errori clinici soprattutto nell'aggiustamento del dosaggio di farmaci come antibiotici aminoglicosidici e glicopeptidici eliminati preferenzialmente a livello renale.

## **6 INVECCHIAMENTO E COMPOSIZIONE CORPOREA**

L'invecchiamento si associa ad importanti modificazioni della composizione corporea: in entrambi i sessi si assiste a graduale decremento della massa

muscolare, incremento di quella adiposa e redistribuzione del tessuto adiposo, con localizzazione prevalentemente a livello viscerale [84-87].

Tali affermazioni sembrano emerse chiaramente dalle analisi trasversali del Baltimora Longitudinal Study of Aging, in cui si è osservato che la quantità del grasso corporeo, valutato con la misurazione di più pliche cutanee, tende ad incrementare progressivamente dai 40 anni in poi sia negli uomini che nelle donne, riducendosi solo in età molto avanzata [88]. L'invecchiamento si associa, inoltre, in entrambi i sessi a redistribuzione centripeta del grasso corporeo, con riduzione del rapporto tra tessuto adiposo sottocutaneo e viscerale addominale, a favore di quest'ultimo [89-91].

Nella persona anziana si assiste, inoltre, a modificazioni della massa magra che si manifestano con progressiva riduzione della forza muscolare e della massa muscolare scheletrica. Questo declino fisiologico, definito "Sarcopenia" (dal greco "sarcos" = muscolo e "penia" = carenza), si ipotizza essere associato ad aumentato rischio di disabilità e mortalità. [92-95]

Con l'invecchiamento si verificano inoltre anche modificazioni qualitative della massa muscolare. La massa muscolare scheletrica rappresenta il principale componente del Fat-Free Mass (FFM). Quest'ultimo consiste di componenti chimici di vario tipo (proteine, acqua, sali minerali), distribuiti tra massa muscolare (BCM = Body Cell Mass), fluido extracellulare (ECF = Extracellular Fluid) e solidi extracellulari (ECS = Extracellular Solid). Il rapporto BCM/FFM risulta influenzato principalmente dall'età, dalla massa magra e dal sesso [96]. Con l'invecchiamento la BCM si riduce maggiormente rispetto alla FFM, mentre l'ECF aumenta [97].

Nel muscolo di un soggetto anziano diminuiscono sia l'area trasversale che il numero di fibre che lo compongono, mentre si assiste ad incremento

compensatorio del grasso e del connettivo intermuscolare [98]. Si verificano atrofia della fibre muscolari tipo II (fibre veloci), aumento percentuale delle fibre tipo I (fibre lente, ricche in contenuto lipidico) e diminuita sintesi di proteine strutturali e di enzimi ossidativi mitocondriali [99].

In un ampio campione di popolazione di soggetti di entrambi i sessi, tra 70 e 79 anni, è stato inoltre dimostrato che l'invecchiamento si associa ad infiltrazione lipidica progressiva del compartimento muscolare [95] e a significativa riduzione sia della forza muscolare degli arti inferiori che della performance fisica.

L'associazione di sarcopenia e di obesità, entrambi modificazioni osservabili nell'invecchiamento, ha portato all'identificazione recente di una entità nota come obesità sarcopenica. Muscolo e massa grassa sono strettamente interconnessi da un punto di vista patogenetico in un circolo vizioso secondo il quale sarcopenia e obesità si potenziano vicendevolmente massimizzando, nell'anziano, gli effetti su disabilità/fragilità, morbilità e mortalità [96].

## **7 APPLICAZIONI CLINICHE**

Nella scelta di un test clinico per la valutazione della funzione renale è necessario valutare una serie di fattori come l'accuratezza, la precisione, la prevalenza attesa di risultati anomali, ma anche il costo, la sicurezza e la praticità. Inoltre deve essere ben chiaro l'obiettivo clinico che si vuole raggiungere scegliendo un test più sensibile ed accurato rispetto ad un altro. In generale più accurato e preciso è un test, più risulta costoso ed indaginoso.

Nessun singolo test è in realtà adatto ad ogni tipo di condizione clinica; la cosa migliore sarebbe individuare il più preciso e accurato test per rispondere ad ogni

particolare quesito. Nella pratica clinica i test per la misurazione del GFR sono usati nello screening delle malattie renali, nel valutare la progressione di una malattia, nel determinare la risposta ad una data terapia e quindi formulare una specifica e precoce prognosi, nel confermare la necessità di un trattamento sostitutivo con la dialisi o trapianto, nella stima della clearance renale di uno specifico farmaco e nella personalizzazione del relativo dosaggio.

Nella Ricerca Clinica il test per la misurazione del GFR deve poter misurare differenze, anche sottili, che nella pratica clinica quotidiana possono essere considerate trascurabili, tra due o più gruppi sperimentali. Sebbene non siano disponibili dati precisi è probabile che tutt'oggi non esista un test ideale per riconoscere una malattia renale allo stadio iniziale o intermedio nella popolazione generale. Nondimeno c'è la necessità di identificare dei test che permettano di valutare con precisione stadi da moderati a marcati di insufficienza renale. Il costo e la laboriosità della determinazione della clearance della creatinina e dell'utilizzo dei radioisotopi rende queste metodiche impraticabili. Così, spesso si ricorre alla creatinina sierica per identificare la presenza di un danno renale, come, ad esempio, nell'identificare quei pazienti che hanno un più elevato rischio di sviluppare un'insufficienza renale da mezzo di contrasto. A differenza dei soggetti in cui è improbabile ci sia un deficit della funzionalità renale, in quegli individui che sono ad alto rischio di malattia renale è giustificato il ricorso a test più costosi ed accurati. Per esempio la prevalenza delle disfunzioni renali nei pazienti con LES e ipocomplementemia potrebbe essere sufficiente a giustificare l'utilizzo di indagini più accurate e costose per la precoce identificazione del coinvolgimento renale e la conseguente necessità di una terapia più aggressiva o di ulteriori indagini diagnostiche. In maniera simile l'alta incidenza di rigetto

acuto o cronico nei pazienti trapiantati potrebbe richiedere l'utilizzo di alcuni test molto costosi di misura del GFR.

Molti sforzi sono stati fatti per definire un metodo per la misurazione della progressione delle CKD. È stato osservato che le variazioni dell'inverso della creatinina nel tempo sembrano seguire in maniera fedele la progressione del danno [101]. Cambiamenti nella funzionalità renale stimati mediante l'andamento nel tempo dell'inverso della creatinina possono differire sostanzialmente rispetto alla stima del GFR con i radioisotopi [102]. La correlazione con il GFR misurato e la clearance della creatinina si è dimostrato non essere migliore, se non addirittura peggiore dell'inverso della creatinina. Di conseguenza, poiché le modificazioni spontanee dell'inverso della creatinina sono frequenti, questo parametro non può essere considerato un buon indice per determinare la rapidità di progressione della nefropatia cronica. La comparazione della quota di declino nel tempo in due o più gruppi sperimentali è divenuto il metodo più pratico ed efficace per lo studio della prevenzione e/o progressione delle malattie renali nei *trials* di intervento. In tali condizioni costi e disagi sono considerati aspetti di secondaria importanza rispetto ad accuratezza e precisione della misurazione del GFR. Per questo motivo il ricorso alla determinazione del GFR con radioisotopi rappresenta pressoché la regola nelle condizioni sperimentali. Infatti la determinazione della quota di declino del GFR rispetto al raddoppio della creatininemia (vecchio surrogato della progressione del danno renale) permette di risparmiare molto tempo nell'identificazione dei fattori di protezione o di rischio per la progressione delle nefropatie. Tuttavia anche in condizioni sperimentali, quando si studino vaste popolazioni con decine di migliaia di soggetti, il ricorso alla determinazione del GFR con metodiche costose, sebbene accurate e precise, non risulta più praticabile. Nello Studio MDRD, i ricercatori sono riusciti a

dimostrare una ottima correlazione tra il GFR stimato con una formula di regressione che considera parametri bioumorali (creatinina, albumina e urea sieriche, urea urinaria) oltre al sesso, razza ed età, rispetto al GFR misurato con la metodica radioisotopica ( $^{125}\text{I}$ -Iotalamato) in oltre 1500 pazienti.

La variabilità legata alla misurazione della creatinina sierica nei vari laboratori a causa delle differenti metodiche in uso è stata identificata come un parametro di primaria importanza nell'errore della stima del GFR quando si ricorre all'uso delle formule. Infatti, le modifiche e la calibrazione dei metodi di misurazione della creatininemia possono avere un effetto importante in termini di accuratezza della predizione della funzione renale. Coresh e coll. pertanto hanno analizzato i sieri congelati provenienti dai pazienti partecipanti a due ampi studi di popolazione quali il MDRD Study ed il Third National Health and Nutrition Examination Survey III (NHANES III) evidenziando una sostanziale eterogeneità nella calibrazione della creatinina sierica tra i vari laboratori nell'arco di tempo coperto dai due Studi [103]. Questi errori nella calibrazione diventano più importanti quanto maggiore risultava il GFR. Tali osservazioni hanno indotto gli sperimentatori a ricercare ed auspicare la più diffusa adozione di parametri di calibrazione universalmente accettati per il dosaggio della creatinina sierica.

### III SCOPO

In questo lavoro sono presentati i risultati di due Studi, il primo prospettico e il secondo trasversale.

Studio I (prospettico): valutare attraverso un' analisi prospettica, con un follow-up di 5 anni, le relazioni tra le relazioni tra i due principali marcatori endogeni di GFR (creatinina e cistatina C) e la variazione di alcuni parametri antropometrici e di composizione corporea in una popolazione di soggetti anziani, di entrambi i sessi, non fumatori, non istituzionalizzati ed in buone condizioni di salute generale.

Studio II (trasversale): scopo dello studio trasversale è stato quello di verificare:

- 1) le *performances* di alcune formule di eGFR, rispetto ad un gold standard, in una coorte di pazienti di ambo i sessi, affetti da nefropatia cronica e GFR in un range inizialmente ridotto o prossimo alla normofunzione renale.
- 2) le relazioni esistenti tra produzione di creatinina, massa muscolare, misure antropometriche e parametri demografici
- 3) la possibilità di proporre un modello alternativo di predizione del GFR a partire da semplici variabili antropometriche, facilmente misurabili nella pratica clinica, e dati di laboratorio.

## **IV- SOGGETTI E METODI**

### **1. SOGGETTI**

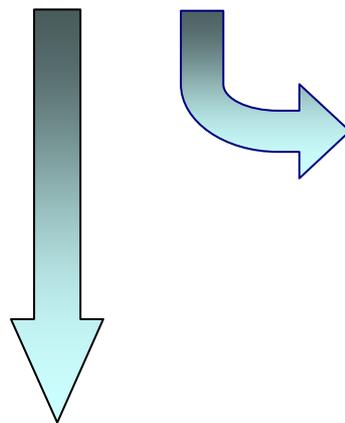
#### Studio I (prospettico)

Lo studio è stato condotto dalla Clinica Geriatrica dell'Università di Verona in una popolazione di soggetti maschi e femmine di età compresa tra 65 e 74 anni, non istituzionalizzati, selezionati dalle liste di 11 Medici di Medicina Generale nella città di Verona, in modo da ottenere una buona rappresentatività geografica della città. Scopo iniziale dello studio era stato quello di valutare prospetticamente le variazioni della composizione corporea nel processo di invecchiamento in una coorte di soggetti anziani "well-fit". Tutti i soggetti arruolati nello studio erano in grado di camminare per 800 metri senza difficoltà, non presentavano significativi deficit cognitivi, valutati mediante Mini-Mental State Examination (MMSE>24), e avevano mantenuto il peso stabile nei 6 mesi precedenti. Nessuno dei soggetti svolgeva regolare attività fisica più di una volta alla settimana durante lo studio. I criteri di esclusione comprendevano: insufficienza renale, diabete, osteoartrite, scompenso cardiaco (classe NYHA 2 o superiori), BPCO moderata o severa (definita secondo documentazione clinica), perdita di peso maggiore del 5% nell'anno precedente.

Un totale di 97 maschi con BMI  $27.2 \pm 3.4$  kg/m<sup>2</sup> e 177 femmine con BMI  $26.4 \pm 4.4$  kg/m<sup>2</sup> sono stati sottoposti a DXA, valutazione variabili antropometriche all'inizio dello studio e dopo 5 anni di follow-up. I dati presentati in questa tesi si riferiscono solo ai rimanenti 153 soggetti, 62 maschi e 91 femmine, la cui valutazione dei parametri antropometrici, di composizione corporea e performance fisica è risultata completa nelle varie fasi di studio.

	Maschi (n=97)	Femmine (n=177)
Età (media ± DS)	71.7 ± 2.2	71.6 ± 2.3
BMI (media ± DS)	27.2 ± 3.4	26.4 ± 4.4

**ALL'INIZIO DELLO STUDIO**



	Maschi	Femmine
Morti	9	13
Rifiuto a partecipare nel corso del follow up	26	73

	Maschi (n=62)	Femmine (n=91)
Età (media ± DS)	76.95 ± 2.23	76.87 ± 2.2
BMI (media ± DS)	26.94 ± 3.1	26.67 ± 4.5

**DOPO 5 ANNI DI FOLLOW-UP**

*Figura 3. Disegno dello studio*

## Studio II (prospettico)

I Pazienti afferenti alla Div. Clinicizzata di Nefrologia, Ospedale Civile Maggiore di Verona, rispondenti ai criteri di inclusione nello Studio e che non presentassero le controindicazioni specificamente indicate (Tabella III), sono stati consecutivamente arruolati previo un consenso informato scritto. I Pazienti, ai quali era esplicitamente spiegato il carattere sperimentale dello Studio unitamente ai rischi e vantaggi delle metodiche impiegate, hanno espresso liberamente la volontà di sottoporsi a tale protocollo. Lo studio ha ottenuto l'autorizzazione del Comitato Etico di Verona.

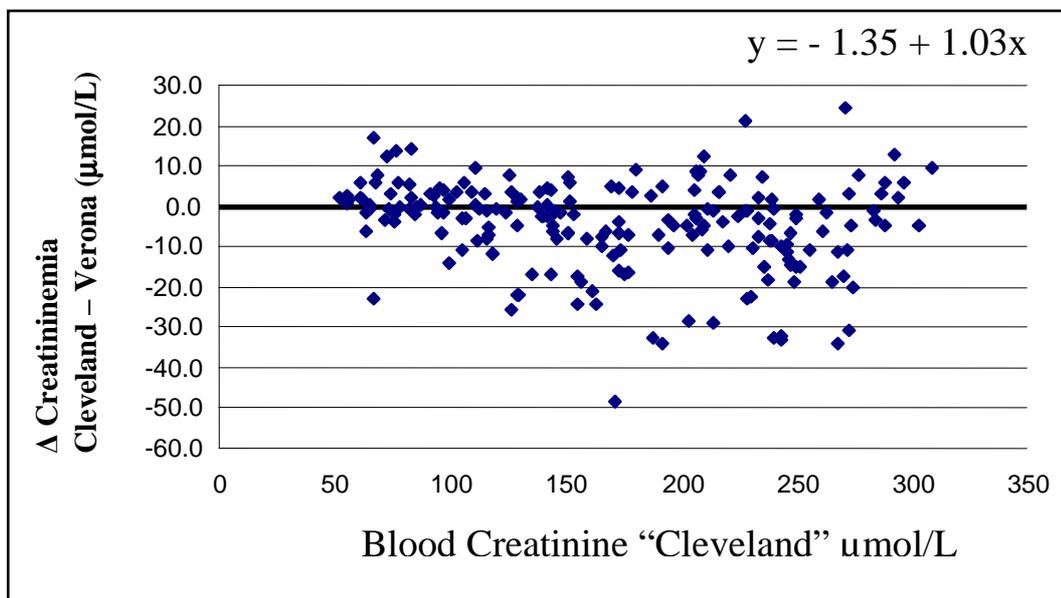
### **Criteri di inclusione ed esclusione**

**Tabella III.** *Criteri di inclusione e di esclusione .*

<b>CRITERI di INCLUSIONE</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Pazienti con età &gt; 18 anni di ambo i sessi</li><li>• Creatininemia <math>\leq 2</math> mg/dL per i maschi e Creatininemia <math>\leq 1.8</math> mg/dL per le femmine</li><li>• Proteinuria <math>\leq 3</math> g/die oppure proteinuria <math>\leq 200</math> mg/dl</li><li>• Consenso informato scritto</li></ul>
<b>CRITERI di ESCLUSIONE</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Allergia comprovata o anamnestica ai m.d.c. radiologici e/o allo iodio e/o a farmaci e/o diatesi allergica in genere</li><li>• Scompenso cardiaco congestizio (NYHA III-IV)</li><li>• IMA <math>\leq 6</math> mesi;</li><li>• Neoplasia tiroidea in corso di trattamento radioterapico o condizione di ipertiroidismo</li><li>• Stato febbrile da qualsiasi causa</li><li>• Terapia antibiotica a prevalente eliminazione renale</li><li>• Stati di disidratazione da qualsiasi causa</li><li>• Variazione della eventuale terapia diuretica da meno di 2 settimane</li><li>• Uropatia ostruttiva</li><li>• Epatopatia cirrotica scompensata</li><li>• Gravidanza in atto</li><li>• Indagine radiografica con impiego di m.d.c. eseguita da meno 1 settimana</li></ul>

## **2 DETERMINAZIONI ANALITICHE DI LABORATORIO**

I parametri bioumorali di routine sono stati determinati nel corso della degenza. I prelievi ematici sono stati eseguiti dopo un digiuno di 12h e analizzati presso il Laboratorio Analisi dell'Ospedale Maggiore di Verona con metodiche automatizzate. In particolare la determinazione della creatininemia è stata effettuata mediante la metodica di Jaffè (Dimension RXL, Dode, Boehring). Il valore della creatinina sierica rilevata dal Laboratorio di Verona era stato precedentemente confrontato e calibrato con i risultati delle determinazioni eseguite presso il Laboratorio di Cleveland (USA) nel siero di 200 soggetti di ambo i sessi e con ampio range di creatininemia. I risultati delle correlazioni, relativi ai test di validazioni dello Studio INCIPE (Fig. 4) [Trial in corso, dati non pubblicati], sono riportati nella Figura seguente:



**Figura 4.** Confronto fra i valori di creatininemia riportati dal laboratorio di Cleveland (USA) e quello di Verona. La differenza media per tutte le classi di creatininemia era di  $-4,6 \mu\text{mol/L}$  ( $-2,2\%$ ), per range compresi fra  $75\text{-}100 \mu\text{mol/L}$  era di  $-0,3 \mu\text{mol/L}$  ( $-0,3\%$ ) e per range compresi fra  $100\text{-}125 \mu\text{mol/L}$  era di  $-1,8 \mu\text{mol/L}$  ( $-1,0\%$ ).

La CyC è stata determinata in campioni di siero eparinato prelevati nella stessa giornata della determinazione del mGFR, presso il Laboratorio Analisi dell'Ospedale Maggiore di Verona. La misurazione è stata eseguita con il metodo immunonefelometrico (kit N Latex CystatinC) mediante analizzatore BN ProSpec (DadeBerhing, Leusden, The Netherlands).

### **3 MISURA DEL GFR**

La procedura per la determinazione della velocità di filtrazione glomerulare (GFR) mediante la metodica della clearance plasmatica dell'ioexolo è stata effettuata al mattino alle ore 8.00, a digiuno. Un ago-cannula (18 o 20G) è stato posizionato in una vena antecubitale per prelievi ematici per il dosaggio dell'ioexolo. Al tempo 0 è stata somministrata una dose di Ioexolo (Ominipaque 300 ®) di 5 cc + 5 cc di acqua sterile per iniezioni endovenose, in 2m'. Il campionamento ematico per la determinazione della curva plasmatica dell'ioexolo prevede un prelievo di 3 cc (per campione) nei tempi 0, +15, +30, +60, +90, +120, +150, +180, +240, +300. Dopo il prelievo +60, il paziente è stato libero di alimentarsi. Al termine dell'esame è stata rimossa l'agocannula e i campioni di plasma sono stati conservati in frigorifero a -80°C in attesa della determinazione in HPLC c/o il Laboratorio Analisi del Policlinico di Verona.

Le metodiche adottate per la manipolazione dei campioni plasmatici e la determinazione mediante HPLC dello ioexolo sono riportati in letteratura [104].

### **4 STIMA DEL GFR**

Tra le numerose formule per la stima del GFR, sono state considerate in questo Studio le cinque formula indicate nella Tab III dell'Introduzione. Oltre alle note

formule MDRD, Cockcroft and Gault (CG) e Mayo Clinic Quadratic (MCQ), sono state incluse nella valutazione, la formula di Virga (che richiama la CG) studiata in una popolazione italiana residente in Veneto; e la formula di Taylor (Tay) poiché include variabili di composizione corporea misurate nei nostri pazienti (Tab IV).. Infine, per lo Studio Prospettico è stata inclusa la formula di Hoek “cystatin C-based” [105]

**Tabella IV.** Formule Matematiche per la stima del GFR.

Cockcroft and Gault	$Cl_{cr} = [(140 - \text{età}) \times \text{peso ideale} (\times 0,85 \text{ se femmina})] / 72 \times S_{cr}$
MDRD- equazione semplificata	$GFR = 186 \times S_{cr}^{-1,154} \times \text{età}^{-0,203} \times (1,212 \text{ se razza nera})$ (0,742 se femmina)
Mayo Clinic quadratic equation	$GFR = [1,911 + (5,249/S_{cr} - 2,114/S_{cr}^2) - 0,00686 \times \text{età(anni)} - (0,205 \text{ se femmina})]$
Virga equation	$Cl_{cr} = [69,4 - (0,59 \times \text{età}) + 0,79 \times BW] / S_{cr} - 3$ (se maschio) $Cl_{cr} = [57,3 - (0,37 \times \text{età}) + 0,51 \times BW] / S_{cr} - 2,9$ (se femmina)
Taylor equation	$GFR = (2,4 \times LM) - (0,75 \times LM \times S_{cr})$

## 5- MISURE ANTROPOMETRICHE

Ogni paziente è stato attentamente studiato dal punto di vista antropometrico mediante la misurazione del peso corporeo, dell'altezza e delle circonferenze dei vari distretti corporei ( addome, coscia, gamba, braccio).

Il peso corporeo è stato valutato dopo aver spogliato degli indumenti pesanti e delle scarpe ogni partecipante, con un'approssimazione di 0.1 kg (Salus Scale, Milano) .La misurazione dell'altezza è stata eseguita mediante l'utilizzo di uno stadiometro, con un'approssimazione di 0.5 cm (Salus Stadiometer, Milano).

L'indice di massa corporea (BMI) è stato calcolato come rapporto tra peso ed altezza al quadrato (Kg/m<sup>2</sup>).

Le misurazioni delle circonferenze corporee sono state registrate con l'uso di un nastro metrico non estensibile e seguendo punti di repere. Le determinazioni antropometriche sono state eseguite, in cieco, da due operatori esperti e i risultati utilizzati come medie delle misurazioni.

- *Circonferenza Addominale*

Con il soggetto in piedi e l'esaminatore alla sua destra, si individua la porzione prossimale del femore per localizzare la cresta iliaca di destra. Appena al di sopra della porzione superiore della cresta iliaca di destra viene tracciato un segno orizzontale che poi viene incrociato con un tratto verticale corrispondente alla linea ascellare media. La fettuccia metrica viene posizionata in corrispondenza di un piano orizzontale intorno all'addome a livello del punto individuato e segnato sulla parte destra del tronco. Il piano su cui giace il nastro è parallelo al pavimento e la fettuccia metrica viene posizionata senza comprimere l'addome. La misurazione viene effettuata ad una respirazione minima normale.

- *Circonferenza Coscia*

Il repere per la misurazione della circonferenza media delle coscia al è stato determinato in condizione di flessione di 90° del ginocchio. La misurazione è stata rilevata in posizione di ortostatismo, i calcagni distanziati di almeno 10 cm ed il peso distribuito su entrambi i piedi. La fettuccia metrica è stata posta orizzontalmente intorno alla coscia a livello del punto medio fra la piega inguinale, facilmente individuabile con le gambe flesse sulle anche, e il margine prossimale della patella.

- *Circonferenza Polpaccio*

Il soggetto era posto seduto sul letto con gli arti inferiori in posizione declive oppure in piedi con i talloni distanziati di circa 20 cm e il peso

equamente distribuito sulle due gambe. La fettuccia metrica è stata posta orizzontalmente attorno al polpaccio per localizzare la circonferenza massima in un piano perpendicolare all'asse principale della gamba. Negli anziani la circonferenza del polpaccio è stata misurata in posizione supina e il ginocchio sinistro flesso a 90°.

- *Circonferenza Braccio*

Al soggetto in piedi e con le braccia abbandonate liberamente ai lati del tronco si individuano il punto di repere in corrispondenza del punto medio del braccio, il gomito del paziente è flesso di 90 gradi con il palmo che guarda in alto. E' quindi necessario individuare il margine laterale dell'acromion palpando la superficie superiore del processo spinoso della scapola e segnare il punto medio fra esso e il gomito. Il nastro misuratore deve essere posto perpendicolarmente all'asse principale del braccio.

## **6. DENSITOMETRIA TOTAL BODY**

La determinazione della composizione corporea è stata ottenuta mediante esame di Densitometria a raggi X (Dual Energy X-ray Absorptiometry- DEXA) c/o la Radiologia del Padiglione Geriatrico dell'Ospedale Maggiore di Verona. Nello studio da noi condotto, per la misurazione del grasso corporeo totale (FM) e della massa muscolare (FFM), è stato impiegato il DEXA Hologic QDR4500 con il software di analisi versione 8.21 (Waltam, USA).L'esposizione radiante risulta inferiore a 8 Sv ed il tempo di misurazione totale è pari a 6 minuti.

Il grasso corporeo e la massa muscolare sono stati valutati in Kg.

Tutte le scansioni sono state esaminate e valutate da un singolo operatore.

## V- ANALISI STATISTICA

Le variabili continue sono espresse come medie  $\pm$ SD e/o mediane.

Le correlazioni lineari (univariate) sono state effettuate tra i vari parametri antropometrici e di composizione corporea.

Il confronto tra mGFR e i risultati delle varie formule di stima dell'eGFR è stato eseguito con il metodo grafico modificato proposto da Bland e Altman.

L'errore medio (difference.mean) =  $\Sigma(\text{eGFR} - \text{mGFR})/n$ , dove  $n$  rappresenta il numero di GFR eseguiti, è un indice di *bias* (polarizzazione). La sua deviazione standard (difference.SD) quantifica la dispersione interindividuale delle formule di predizione e sta alla base del calcolo degli intervalli di confidenza al 95% (95% CI) riportati nei grafici di Bland-Altman [106] con limiti pari a  $\text{media} \pm 2\text{SD}$ . In altri termini, nei grafici le linee tratteggiate si riferiscono ai limiti di confidenza superiori e inferiori (upper.agreement.limit = difference.mean + 2SD e lower.agreement.limit = difference.mean - 2SD).

La dispersione dei valori di eGFR è calcolata come mediana della differenza assoluta  $|\text{eGFR} - \text{mGFR}|$  e la forza predittiva di ogni formula è stata determinata con il coefficiente di correlazione lineare di Pearson ( $r$ ).

L'errore standard della media (difference.se) quantifica la precisione con cui è nota la differenza media, considerata come variabile aleatoria, il cui intervallo di confidenza al 95% è pari a  $\pm 2\text{SE}$ .

L'errore percentuale assoluto medio (difference.abs% 0 100\*  $\Sigma |\text{eGFR} - \text{mGFR}| / \text{mGFR}/n$ ) è un indice di accuratezza che riassume meglio la capacità predittiva delle varie formule in quanto non dipende da sovra- e sottostime e dal livello di mGFR.

L'accuratezza percentuale relativa, definita come percentuale dei pazienti la cui stima del GFR rientrava entro il 15, 30 e 50% al di sopra o al di sotto del mGFR, è stata calcolata per tutte le sei formule di stima indicate.

In tutti i test l'ipotesi è stata considerata nulla con il two-tailed  $\alpha < 0.05$ .

Modelli di regressione lineare multipla con scarto dei minimi quadrati sono stati utilizzati per la produzione delle formule di stima della quota di produzione della creatinina da variabili antropometriche e di composizione corporea.

L'analisi statistica è stata eseguita presso l'Istituto di Bioingegneria del CNR di Padova.

## **VI- RISULTATI**

### **RISULTATI STUDIO I (prospettico)**

Lo studio è stato condotto in una popolazione di 91 donne, con età basale di  $71.87 \pm 2.4$  anni e BMI di  $26.34 \pm 4.44$  Kg/m<sup>2</sup> e 62 uomini con età basale di  $72.51 \pm 2.29$  anni e BMI di  $27.01 \pm 3.39$  Kg/ m<sup>2</sup>.

Le modificazioni dei parametri antropometrici e di composizione corporea nel corso del follow up sono descritti in tabella V per le donne e in tabella VI per gli uomini.

Nel sesso femminile, a fronte di un modesto aumento di peso, del resto non significativo, si osserva un aumento statisticamente significativo dopo 5 anni dell'indice di massa corporea ( $p < 0.05$ ) e della circonferenza della vita ( $p < 0.01$ ) con una riduzione significativa della massa muscolare totale ( $p < 0.01$ ), muscolare appendicolare ( $p < 0.001$ ) e aumento della massa grassa, non significativo.

Negli uomini si osserva, come per le donne, la perdita statisticamente significativa di massa magra sia totale che appendicolare ( $p < 0.001$ ) senza variazioni della massa grassa, del peso corporeo, del BMI e della circonferenza vita.

Nelle popolazioni dei 2 sessi abbiamo osservato dopo 5 anni (vedi Tabelle VII e VIII) un modesto aumento di glicemia non significativo con riduzione di insulinemia a digiuno anch'essa non statisticamente significativa. Riduzione significativa dell'albuminemia sia nei maschi che nelle femmine ( $p < 0.001$ ).

**Tabella V.** *Modificazione dei parametri antropometrici e di composizione corporea nei soggetti di sesso femminile durante il periodo di osservazione ( basale e dopo follow-up di 5 anni ).*

<b>Femmine</b> ( $n = 91$ )	Media $\pm$ DS (basale)	Media $\pm$ DS (follow-up 5 anni)	p
Età (anni)	71.87 $\pm$ 2.4	76.87 $\pm$ 2.2	<0.001
Peso (kg)	63.65 $\pm$ 10.78	63.84 $\pm$ 10.95	N.S.
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.34 $\pm$ 4.43	26.67 $\pm$ 4.59	<0.05
Altezza (m)	1.55 $\pm$ 0.060	1.54 $\pm$ 0.0644	<0.005
Circonferenza vita (cm)	82.84 $\pm$ 10.46	84.75 $\pm$ 10.78	<0.01
FFM (Kg) <sup>°</sup>	34.74 $\pm$ 4.08	34.23 $\pm$ 4.38	<0.01
FFM App (Kg) <sup>°</sup>	13.32 $\pm$ 1.98	12.86 $\pm$ 2.00	<0.001
FM (Kg) <sup>°</sup>	25.87 $\pm$ 8.18	26.07 $\pm$ 8.86	N.S.

FFM, massa magra; FFM App, massa magra appendicolare; FM, massa grassa;

<sup>°</sup>Valutato mediante metodica DXA.

**Tabella VI.** *Modificazione dei parametri antropometrici e di composizione corporea nei soggetti di sesso maschile durante il periodo di osservazione ( basale e dopo follow-up di 5 anni ).*

<b>Maschi</b> ( n = 62 )	Media ± DS (basale)	Media ± DS (follow-up 5 anni)	p
Età (anni)	72.51 ± 2.3	76.95 ± 2.3	<0.001
Peso (kg)	78.11 ± 11.12	77.75 ± 10.72	N.S.
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.01 ± 3.4	26.94 ± 3.17	N.S.
Altezza (m)	1.70 ± 0.08	1.70 ± 0.08	N.S.
Circonferenza vita (cm)	95.91 ± 9.19	96.24 ± 9.07	N.S.
FFM (Kg) <sup>°</sup>	52.18 ± 5.70	50.25 ± 5.69	<0.001
FFM App (Kg) <sup>°</sup>	21.12 ± 2.74	19.93 ± 2.70	<0.001
FM (Kg) <sup>°</sup>	21.71 ± 6.89	21.80 ± 7.15	N.S.

FFM, massa magra; FFM App, massa magra appendicolare; FM, massa grassa;  
<sup>°</sup> Valutato mediante metodica DXA.

A fronte di una riduzione in entrambi i sessi di creatinina sierica (p 0.081 nelle donne e 0.002 negli uomini), non si sono osservate variazioni statisticamente significative nel dosaggio dell'urea in uomini e donne e acido urico nelle donne. Riduzione di acido urico nel sesso maschile (p<0.005). Nel campione studiato, in entrambi i sessi, si osserva un aumento significativo di cistatina C (p<0.001).

Una correlazione statisticamente significativa è stata individuata tra hsPCR e cistatina C (p<0.05) nei due sessi nel corso del follow-up.

Nel corso del follow-up (vedi tab. IXa e IXb) non si è evidenziata una modifica sostanziale dello stile alimentare nell'intera coorte. In particolare non sono variati

in modo significativo l'introito calorico, la quantità di proteine totali (inserire media..) e animali, e la quota lipidica. In entrambi i sessi si è osservato, invece, un aumento significativo dell'introito di proteine vegetali ( $p < 0.01$  nelle donne e  $< 0.05$  nei maschi) ed di carboidrati ( $p < 0.05$ , per entrambi i sessi)

La stima del GFR (eGFR) sono indicate nelle tabelle X e XI: di queste solo la formula di Hoek, nel corso del follow up, mostra una riduzione statisticamente significativa in entrambi i sessi ( $p < 0.001$ ). Nelle femmine si riduce l' eGFR con la formula di Cockcroft-Gault e con la formula di Taylor, peraltro non significativamente; con le formule di Virga e con l'MDRD nel sesso femminile l'eGFR apparentemente aumenta sebbene in modo non significativo. Anche nei maschi, dopo 5 anni, viene descritto un apparente aumento dell' eGFR che risulta statisticamente significativo per le formule di Virga e MDRD (rispettivamente  $p < 0.01$  e  $p < 0.05$ ), mentre non raggiunge la significatività statistica per le formule di Cockcroft-Gault e di Taylor. I Grafici 1 e 2 mostrano il decorso nel tempo del eGFR medio con le varie formule.

La cistatina C inoltre non correla in nessun modo con le variabili di composizione corporea (massa magra, massa magra appendicolare e massa grassa) come mostrato nella Figura 4; al contrario, nella Figura 5, viene mostrata la correlazione significativa di creatinina con massa magra totale.

E' stata infine effettuata una analisi matematica della variazione percentuale annua delle due variabili correlate (creatinina e della massa magra totale) considerando cumulativamente tutti i soggetti del campione studiato. La variazione percentuale media per anno della creatinina è risultata  $-1.4\%$  , mentre la variazione percentuale media della massa magra è risultata  $-0.5\%$

**Tabella VII.** Modificazione dei parametri laboratoristici nei soggetti di sesso femminile durante il periodo di osservazione ( basale e dopo follow-up di 5 anni ).

<b>Femmine</b> ( n = 91 )	Media ± DS (basale)	Media ± DS (follow-up 5 anni)	p
glicemia (mmol/L)	5.45 ± 1.68	5.66 ± 0.98	N.S.
insulina (mUI/mL)	11.41 ± 18.01	8.86 ± 4.66	N.S.
creatinina (umol/L)	79.32 ± 15.50	76.95 ± 16.31	N.S.
cistatina C (mg/L)	1.31 ± 0.17	1.42 ± 0.22	<0.001
urea (mmol/L)	6.19 ± 1.55	6.26 ± 1.5	N.S.
acido urico (mmol/L)	0.27 ± 0.06	0.27 ± 0.06	N.S.
colesterolo totale (mmol/L)	5.89 ± 0.88	6.12 ± 0.92	<0.05
colesterolo HDL (mmol/L)	1.36 ± 0.23	1.60 ± 0.30	<0.001
trigliceridi (mmol/L)	1.42 ± 0.33	1.29 ± 0.50	<0.05
albumina (g/L)	43.85 ± 3.06	40.92 ± 2.62	<0.001

**Tabella VIII.** Modificazione dei parametri laboratoristici nei soggetti di sesso maschile durante il periodo di osservazione ( basale e dopo follow-up di 5 anni ).

<b>Maschi</b> ( n = 62 )	Media ± DS (basale)	Media ± DS (follow-up 5 anni)	p
glicemia (mmol/L)	5.99 ± 1.32	6.25 ± 1.51	N.S.
insulina (mUI/mL)	11.73 ± 12.50	9.80 ± 5.03	N.S.
creatinina (umol/L)	101.90 ± 17.47	93.85 ± 20.21	<0.005
cistatina C (mg/L)	1.29 ± 0.19	1.44 ± 0.24	<0.001
urea (mmol/L)	6.87 ± 1.36	6.75 ± 1.52	N.S.
acido urico (mmol/L)	0.34 ± 0.06	0.31 ± 0.06	<0.005
colesterolo totale (mmol/L)	5.49 ± 1.03	5.40 ± 1.0	N.S.
colesterolo HDL (mmol/L)	1.23 ± 0.22	1.3 ± 0.30	<0.05
trigliceridi (mmol/L)	1.52 ± 0.66	1.30 ± 0.63	<0.01
albumina (g/L)	46.19 ± 4.57	41.43 ± 2.80	<0.001

**Tabella IXa** Modificazione delle abitudini alimentari nei soggetti di sesso femminile ( basale e dopo follow-up di 5 anni ).

<b>Femmine</b> ( n = 91 )	Media ± DS (basale)	Media ± DS (follow-up 5 anni)	p
Calorie (Kcal)	1639 ± 415.3	1642 ± 417.1	N.S.
Proteine (g)	61.3 ± 19.2	60.07 ± 20.9	NS
Proteine animali (g)	38.6 ± 18.3	38.1 ± 19.5	N.S.
Proteine veget. (g)	21.3 ± 6.8	23.0 ± 5.5	<0.01
Lipidi (g)	56.5 ± 19.7	55.2 ± 20.3	NS
Carboidrati (g)	204.5 ± 61.7	210.5 ± 60.0	<0.05

**Tabella IXb** Modificazione delle abitudini alimentari nei soggetti di sesso maschile ( basale e dopo follow-up di 5 anni ).

<b>Maschi</b> ( n = 62 )	Media ± DS (basale)	Media ± DS (follow-up 5 anni)	p
Calorie (Kcal)	2218 ± 499	2190 ± 492	N.S.
Proteine (g)	78.3 ± 23.8	77.9 ± 23.5	N.S.
Proteine animali (g)	48.5 ± 23.3	46.6 ± 24.0	0.04.
Proteine veget. (g)	28.0 ± 6.7	29.7 ± 6.2	<0.05
Lipidi (g)	68.5 ± 22.4	68.0 ± 21.9	NS
Carboidrati (g)	256.8 ± 63.1	249.5 ± 66.0	<0.05

**Tabella X.** Confronto tra formule di stima del filtrato glomerulare nei soggetti di sesso femminile ( basale e dopo follow-up di 5 anni ).

<b>Femmine</b> ( n = 91 )	Media ± DS (basale)	Media ± DS (follow-up 5 anni)	p
formula di Cockcroft-Gault	54.46 ± 11.12	52.76 ± 12.10	N.S.
formula di Virga	64.39 ± 11.87	65.32 ± 13.85	N.S.
MDRD formula	53.25 ± 9.73	53.48 ± 11.55	N.S.
formula di Hoek	58.13 ± 8.11	53.52 ± 8.45	<0.001
formula di Taylor	56.58 ± 8.70	56.56 ± 9.03	N.S.

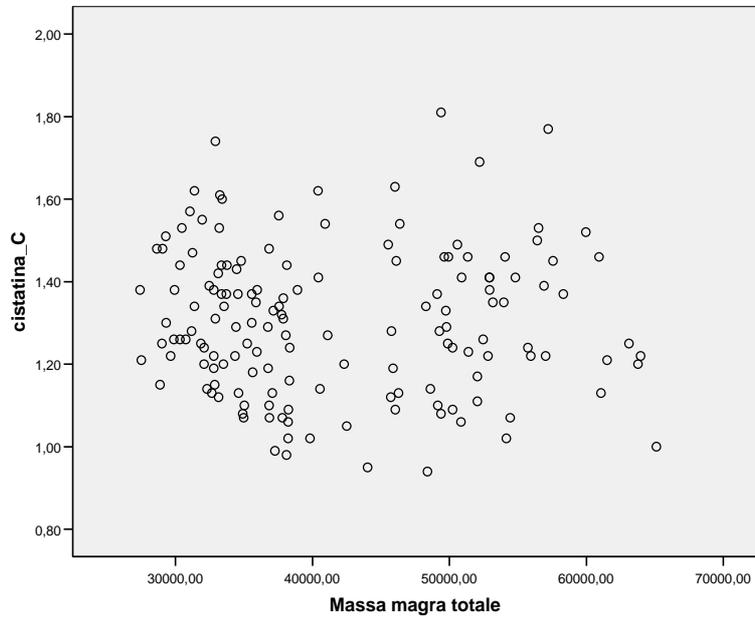
**Tabella XI.** Confronto tra formule di stima del filtrato glomerulare nei soggetti di sesso maschile ( basale e dopo follow-up di 5 anni ).

<b>Maschi</b> ( n = 62 )	Media ± DS (basale)	Media ± DS (follow-up 5 anni)	p
formula di Cockcroft-Gault	51.77 ± 9.96	53.09 ± 11.40	N.S.
formula di Virga	59.89 ± 11.14	64.07 ± 13.68	<0.01
MDRD formula	53.82 ± 9.27	57.07 ± 12.28	<0.05
formula di Hoek	59.01 ± 8.38	52.78 ± 8.38	<0.001
formula di Taylor	73.44 ± 12.15	74.38 ± 11.90	N.S.

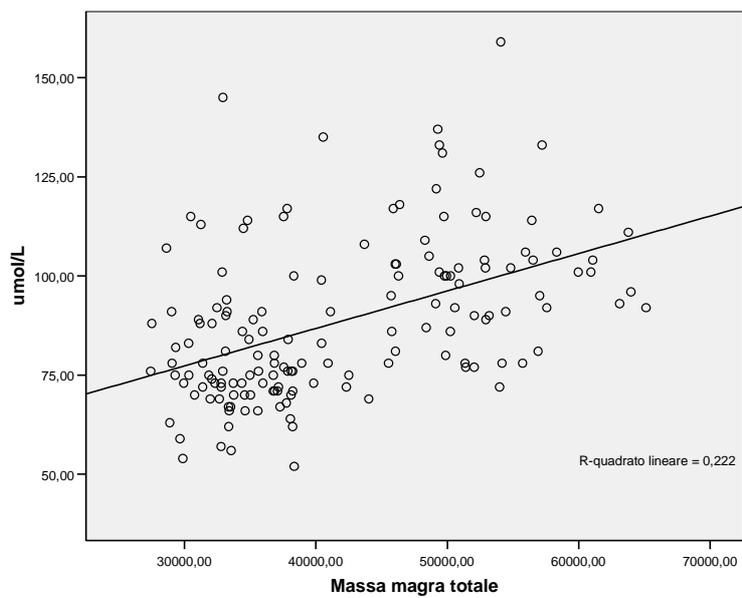
La cistatina C inoltre, in entrambi i sessi, correla significativamente con le formule predittive di GFR di Cockcroft-Gault, Virga, MDRD e di Taylor, quest'ultima solo per le donne. La cistatina C correla significativamente in uomini e donne (p<0.05) con il logaritmo della hsPCR.

Anche la creatinina correla con tutte le formule predittive del GFR, con urea e acido urico, ma non con la hsPCR.

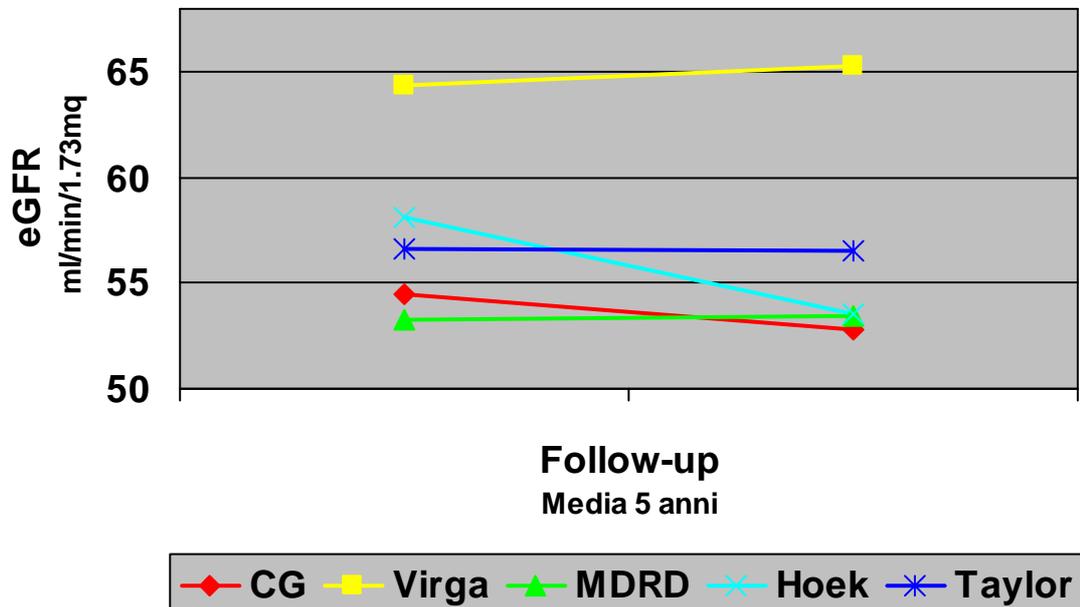
**Figura 4:** Correlazione tra concentrazioni di cistatina C e massa magra totale.



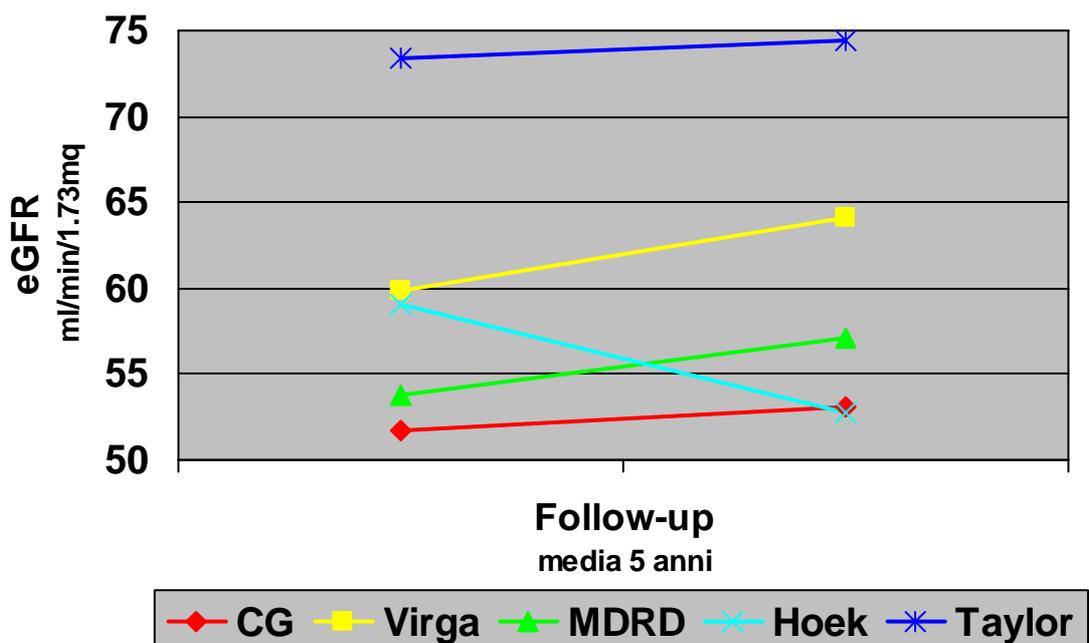
**Figura 5:** Correlazione tra concentrazioni sieriche di creatinina e massa magra totale



**Grafico 1:** Confronto tra formule di stima del filtrato glomerulare nei soggetti di sesso femminile (basale e dopo follow-up di 5 anni).



**Grafico 2:** Confronto tra formule di stima del filtrato glomerulare nei soggetti di sesso maschile (basale e dopo follow-up di 5 anni).



## RISULTATI STUDIO II (trasversale)

### 1- Popolazione

Tra i pazienti ricoverati nella Divisione Nefrologica dell'Ospedale Maggiore di Verona dal Marzo al Luglio 2007, sono stati arruolati consecutivamente, previo consenso informato scritto, complessivamente 83 soggetti di ambo i sessi (60% maschi). Le caratteristiche cliniche dei pazienti ed i risultati degli esami di laboratorio e strumentali sono riportate nella Tabella XII.

**Tabella XII.** *Caratteristiche cliniche e laboratoristiche dei pazienti arruolati.*

<b>Variabili</b>	<b>Soggetti, n=84</b>		
	Popolazione	Maschi	Femmine
Genere, M/F		49	35
Razza, caucasica/nera		46/3	35/0
Età, anni	49.1±18.3	46.0±16.5	53.5±20.0
Peso corporeo, Kg	77.3±16.6	81.5±15.8	71.2±16.0
BMI	27.1±5.5	26.9±5.2	27.3±6.0
Lean Mass Tot, Kg	51.8±10.8	57.6±8.5	43.3±7.8
Lean Mass appendic., Kg	22.7±6.2	26.1±5.4	17.7±5.1
Creatinina sierica, mg/dL	1.19±0.39	1.27±0.39	1.08±0,37
Ioexolo GFR, ml/min/1.73mq	73.9±25.9	77.9±26.1	68.0±25.9

I valori sono espressi come media±SD

L'etiologia della nefropatia era costituita da nefropatia ipertensiva (n=21), glomerulonefrite cronica (n=28), rene solitario (n=3), rene policistico (n=4), nefropatia diabetica (n=1), anomalie urinarie isolate (n=1). Nessun paziente presentava edema clinicamente evidente.

Trentotto pazienti presentavano ipertensione arteriosa con durata media 11.8±9.7 anni, (range 1-32 anni), 29 dei quali in trattamento con ACE-Inibitore. La diagnosi di Diabete Mellito di tipo 2 era presente in 8 soggetti con durata media di

malattia di  $11.8 \pm 10.8$  anni (range 2-32 anni). Il valore della creatininemia risultava in media  $1.19 \pm 0.4$  mg/dL con range 0.4-2.1mg/dL.

## **2- Misurazioni antropometriche**

I pazienti presentavano un ampio range di peso corporeo e di BMI (peso in Kg/altezza<sup>2</sup> in m) (Tab. V). Il BMI risultava in media 27.1 (range 17.9-45.9). La prevalenza dei pazienti in sovrappeso, definito come  $25 \leq \text{BMI} \leq 29.9$  era pari al 40.7%, mentre quella dei pazienti con obesità, definita da  $\text{BMI} > 30$ , era pari al 33.3%. Il 26% circa dei soggetti presentava  $\text{BMI} < 25$ .

Le circonferenze dell'addome, coscia, gamba e braccio, misurate con nastro metrico inestensibile in doppio cieco, venivano riportate come medie in centimetri. La media [ $\pm$ SD] della circonferenza dell'addome, coscia, gamba e braccio risultava  $94.4 \pm 16.0$ ,  $50.8 \pm 5.4$ ,  $37.5 \pm 3.8$ ,  $32.3 \pm 4.0$  cm, rispettivamente. Le misure antropometriche risultavano, come atteso, significativamente differenti nei due sessi in relazione alla differente distribuzione della massa adiposa. I risultati delle misurazioni antropometriche sono stati, quindi, utilizzati come variabili dipendenti nelle correlazioni (r di Pearson) con il BMI e come covariate insieme a sesso, peso, altezza ed età nelle formule di regressione multipla per la predizione della quota di produzione della creatinina.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti alla determinazione della composizione corporea mediante DEXA ed i parametri espressi in Kg, sono stati inseriti nel database. In particolare sono stati riportati i parametri riguardanti la misurazione della massa magra (FFM-BMC) totale (corporea) (LBM-tot) e appendicolare (somma della massa magra muscolare degli arti) (LBM-app). La Total-Mass rappresenta la somma delle tre componenti (massa magra muscolare + massa grassa + massa ossea).

La Total-Mass risultava in media  $76.2 \text{ Kg} \pm 16.0$ .; LBM-tot risultava in media  $51.8 \pm 10.8 \text{ Kg}$ .; la massa muscolare appendicolare (LBM-app) risultava in media  $22.8 \pm 6.1 \text{ Kg}$ . Le misurazioni riguardanti la percentuale di massa grassa totale e appendicolare e la componente ossea non sono state riportate poiché la loro valutazione esula dagli obiettivi dello studio. Le misure quantitative (esprese come medie e/o mediane) dei componenti della costituzione corporea sono poi state utilizzate come covariate nelle formule di regressione per la stima della quota di produzione giornaliera della creatinina.

Come atteso, nella popolazione studiata, sia LBM-tot (media $\pm$ SD:  $57.6 \pm 8.5$  vs  $43.4 \pm 7.8$ ;  $p=0.001$ ) che LBM-app (media $\pm$ SD:  $26.1 \pm 4.2$  vs  $17.7 \pm 5.1$ ;  $p<0.001$ ) risultavano significativamente più rappresentate nel sesso maschile vs il sesso femminile. Si deve ricordare, tuttavia, che il sesso maschile era maggiormente rappresentato nella nostra popolazione in ragione di circa 1.5:1 rispetto al sesso femminile. La LBM-tot e l'età, considerata come variabile indipendente continua, evidenziavano solo una tendenza alla correlazione inversa che, però, non raggiungeva la significatività statistica ( $R^2=0.032$ ;  $r: -0.179$ ;  $p=0.34$ ).

### **3- GFR misurato (Clearance plasmatica di ioexolo)**

Il GFR è stato misurato con metodica della clearance plasmatica dell'ioexolo, normalizzato per superficie corporea calcolata secondo la formula di Dubois and Dubois [64] ed espresso in  $\text{ml/min}/1.73\text{m}^2$ . Come illustrato nella Tabella XII il GFR misurato è risultato in media  $73.9 \pm 25.9 \text{ ml/min}/1.73\text{m}^2$  con un ampio range compreso tra valori al limite inferiore della classe CKD III e valori ai limiti inferiori dell'iperfiltrazione glomerulare (range del GFR 23-137.6  $\text{ml/min}$  per  $1.73\text{m}^2$ ). Il GFR misurato (mGFR) con la clearance plasmatica dello ioexolo è

stato assunto come misurazione di riferimento nel confronto con i risultati delle varie formule di stima del GFR (eGFR).

#### **4- Comparazione delle formule per la stima del GFR**

Per tutti i pazienti è stato calcolato il valore stimato del GFR mediante 5 equazioni già pubblicate in letteratura da Cockcroft and Gault (CG) [70], Levey A et al (MDRD) [118], Virga et al. (Virga) [81], Mayo Clinic (MCQ) [79], Taylor et al. (TAY) [80]. (Tabella XIII).

**Tabella XIII.** *Confronto fra il GFR calcolato con le diverse formule.*

Diff.mean = errore medio in ml/min/1.73m<sup>2</sup>;

Diff.sd = deviazione standard di Diff.mean;

Diff.se = Errore standard di Diff.mean;

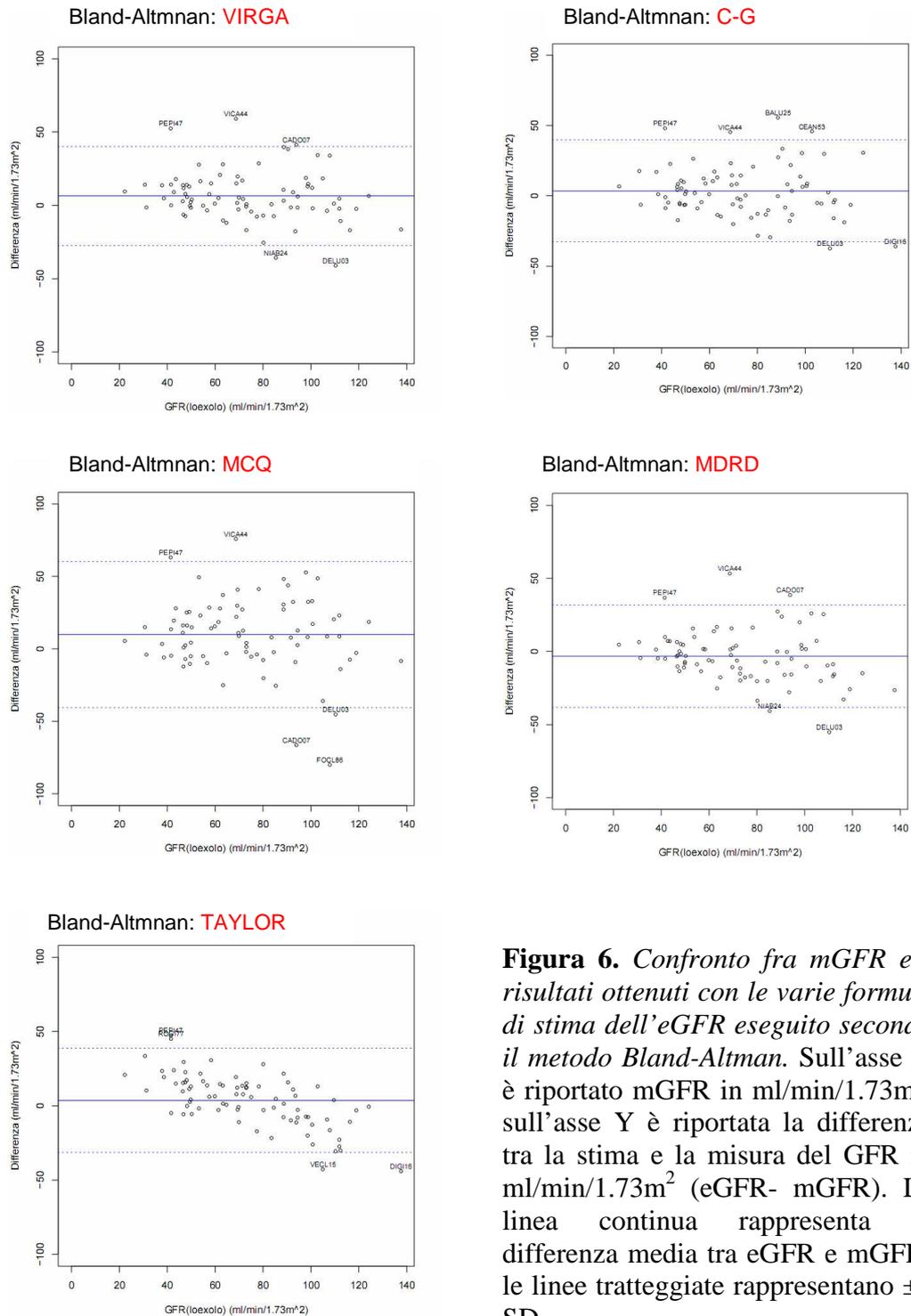
Upper.agreem.limit e Lower.agreem.limiti = limiti di confidenza 95% superiore ed inferiore 2SD della Diff.mean;

Diff.absperc = differenza assoluta percentuale di eGFR da mGFR.

	Virga	CG	MDRD	MCQ	TAY
<b>Diff.mean</b>	6,39	3,50	-3,269	9,91	3,65
<b>Diff.sd</b>	16,94	18,11	17,57	25,17	17,57
<b>Diff.se</b>	1,87	2,00	1,94	2,78	1,94
<b>Diff.absperc</b>	19,19	19,97	18,31	29,25	23,17
<b>upper.agreem.limit</b>	40,26	39,73	31,89	90,25	38,79
<b>lower.agreem.limit</b>	-27,48	-32,72	-38,41	-40,44	-31,48
<b>agreem.limit.se</b>	3,24	3,46	3,36	4,81	3,36

Il confronto tra mGFR e i risultati delle varie formule di stima dell'eGFR è stato eseguito con il metodo grafico modificato proposto da Bland e Altman. Il mGFR, metodo di riferimento, è riportato sull'asse X in maniera da consentire il confronto tra i vari grafici. I valori numerici dei confronti statistici, riportati nella

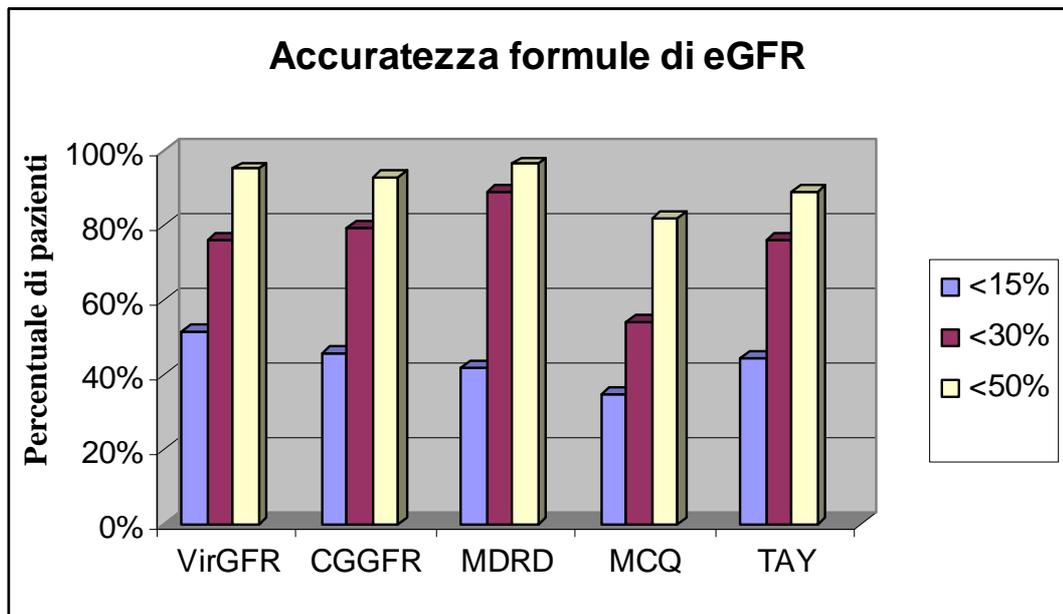
Tabella XIII, non ne risultano alterati poiché si basano sull'errore di predizione definito come eGFR-mGFR (Fig. 6).



**Figura 6.** Confronto fra mGFR e i risultati ottenuti con le varie formule di stima dell'eGFR eseguito secondo il metodo Bland-Altman. Sull'asse X è riportato mGFR in ml/min/1.73m<sup>2</sup>; sull'asse Y è riportata la differenza tra la stima e la misura del GFR in ml/min/1.73m<sup>2</sup> (eGFR- mGFR). La linea continua rappresenta la differenza media tra eGFR e mGFR; le linee tratteggiate rappresentano  $\pm 2$  SD.

Nel seguente grafico sono riportati i valori dell'accuratezza relativa percentuale delle varie formule di stima del GFR (Fig. 7).

**Figura 7.** Confronto fra l'accuratezza relativa delle varie formule di determinazione del GFR.



### **5- Calcolo e stima della quota di produzione di Creatinina**

La formula del GFR può essere definita anche come segue:

$$GFR = (1/Cr) * k$$

essendo  $k$  un parametro individuale che comprende, nello stato stazionario, sia la quota di produzione (esogena ed endogena) di creatinina che l'eventuale eliminazione tubulare ed extra-renale. In considerazione del fatto che la popolazione analizzata si trovava per definizione in steady-state per quanto riguarda composizione corporea, stato di idratazione, dieta e valori bioumorali, la

quota di eliminazione extrarenale della creatinina è stata considerata trascurabile. Pertanto, essendo noti il GFR (mGFR) e il valore della creatininemia, è stata calcolata (mGFR non normalizzato in ml/min \* S-creatinina in mg/dL) la quota individuale di produzione della creatinina (Cr-PROD) espressa in mg/min. Nella nostra popolazione Cr-PROD è risultata  $0.899 \pm 0.31$  mg/min [0.896] (media $\pm$ SD; [mediana]).

Le correlazioni fra produzione di creatinina, BMI, dati antropometrici e di composizione corporea sono riportate nelle Tabelle XIV-XVI.

**Tabella XIV .Correlazione Cr-PROD e composizione corporea ( r )**

	Lean-tot	Lean-app	Mass-tot
Cr-PROD	0.74	0.78	0.94

$P < 0.001$

**Tabella XV. Correlazioni tra BMI e Produzione di Creatinina (Cr -PROD) e tra BMI e composizione corporea valutata con la DEXA. La Cr PROD è stata determinata come descritto in precedenza.**

	Cr PROD	Lean Tot	Lean App
BMI (r)	0.395	0.692	0.501
p	0.031	0.0001	0.005

**Tabella XVI. Correlazione Cr-PROD e BMI vs. misure antropometriche ( r ).**

	Circ-addome	Circ-coscia	Circ-gamba	Circ-braccio
Cr-PROD	0.30°	0.69^	0.51^	0.71*
BMI	0.95**	0.69^	0.81*	0.85*

$N.S.$ ;  $p < 0.05^{\circ}$ ,  $p < 0.01^*$ ,  $p < 0.001^{**}$ .

Correlando le produzioni individuali di creatinina con le varie masse della composizione corporea misurate con la DEXA e scartando le componenti non

significative, abbiamo evidenziato come l'unico regressore significativo sia rappresentato dalla massa magra appendicolare (Lean-app). La stima di Cr-PROD emersa dalla formula di regressione lineare risulta quindi:

$$\text{Cr-prod} = 0.9821 + 0.03842 * (\text{Lean-app in Kg} - 25).$$

Intercetta ( $\pm$ SE)  $0.9821 \pm 0.04$ , coefficiente ( $\pm$ SE) per (Lean-app in Kg-25)  $0.03842$ ;  $p < 0.0001$ .

In altri termini, ad esempio, un soggetto medio con 25 kg di massa magra appendicolare dovrebbe produrre ca. 1mg/min di creatinina pari a circa 1.44 g/die.

Abbiamo infine ipotizzato che si possa stimare la Cr-PROD a partire da covariate surrogate per la composizione corporea (sesso, età, peso e misure antropometriche). Pertanto, attraverso una regressione multiple-steps ed eliminando progressivamente in modo automatico le covariate non significative, siamo giunti alla seguente formula:

$$\begin{aligned} \text{Cr-PROD} = & -0.366115 + (0.28081 \text{ se maschio}) - (0.00275 * \text{Circ-addome in cm}) \\ & + 0.042854 * \text{Circ-braccio (in cm)} \end{aligned}$$

Sesso maschile: coefficiente( $\pm$ SE)  $0.28081 \pm 0.04$ ,  $p < 0.0001$ ; Circ-add: coefficiente( $\pm$ SE)  $-0.00275 \pm 0.002$ ,  $p = 0.05$ ; Circ-braccio: coefficiente( $\pm$ SE)  $0.042854 \pm 0.008$ ,  $p < 0.0001$ .

SE residuo 0.203 su 77 gradi di libertà ( $R^2 = 0.60$ ). Statistica  $F_{(4-77 \text{ DF})} 28.39$ ,  $p < 0.00001$ .

## VII-DISCUSSIONE

La determinazione della funzione renale rappresenta un indispensabile strumento per l'identificazione precoce e per il monitoraggio delle malattie renali. Purtroppo le tecniche di misurazione del GFR che utilizzano marcatori esogeni come l'inulina, le sostanze marcate con radioisotopi e i mezzi di contrasto radiologici, ancorché precise ed accurate, risultano ancora molto indaginose, dispendiose in termini di tempo e costi, generalmente disagiati per il paziente e non proponibili nella pratica clinica quotidiana. Per tutti questi motivi, il ricorso a metodiche di misurazione del GFR con l'utilizzo di marcatori esogeni è riservato alla sola area di sperimentazione clinica. Nel corso degli ultimi 25 anni, numerosi ricercatori hanno proposto alcuni modelli matematici per la stima del GFR che potessero ridurre la variabilità dell'errore intraindividuale ed interindividuale insita nei marcatori endogeni tra i quali, la creatinina è senz'altro il più utilizzato.

### STUDIO I

Negli ultimi anni nuovi marcatori endogeni si sono affacciati sulla scena dell'impiego clinico. La Cistatina C, per esempio, presenta caratteristiche tali da proporsi come una valida, per alcuni Autori migliore, alternativa all'impiego della creatinina. Questo studio longitudinale con follow-up di 5 anni in un campione di soggetti anziani sani ha dimostrato riduzione significativa di massa muscolare totale, appendicolare in entrambi i sessi senza modificazioni significative di massa grassa.

I valori di creatininemia si sono ridotti durante il periodo di follow-up verosimilmente in relazione alla riduzione dei livelli di massa magra, mentre quelli di cistatina C sono aumentati significativamente in entrambi i sessi.

Le formule di stima del GFR, nel nostro studio, hanno dato risultati discordanti; l'unica che sembra realmente stimare il declino del GFR di circa  $1 \text{ ml/min/1.73m}^2$  per anno come atteso, è la formula di Hoek.

I nostri risultati, che dimostrano una riduzione della massa magra totale ed appendicolare, confermano precedenti studi trasversali e longitudinali [107-110], suggerendo di considerare la perdita di massa magra come un fisiologico processo legato all'invecchiamento.

La prevedibile riduzione dei valori di creatininemia, in base alla riduzione della massa magra, è stato confermato dal risultato della maggior riduzione della massa magra nel sesso maschile (2 Kg) rispetto alla perdita misurata nel sesso femminile (0.5 Kg). Tuttavia l'analisi della variazione percentuale media annua del valore della creatininemia e della massa magra totale, considerati i soggetti di ambo i sessi cumulativamente, indica una significativa sproporzione tra la riduzione della massa muscolare (-0.5% annuo) rispetto alla riduzione della creatininemia (-1.4% annuo). In altre parole, l'invecchiamento determinerebbe attraverso il descritto processo di sarcopenia, più precocemente nel maschio rispetto alla femmina, una riduzione non solo quantitativa, ma anche "qualitativa" della massa magra.

Non sono presenti in letteratura studi longitudinali che descrivano variazioni della cistatina C correlati all'invecchiamento; parallelamente tutte le ricerche che ne hanno descritto caratteristiche fisico-chimiche e funzionali, ne sottolineano l'indipendenza dall'età [40,41, 45, 111].

Uno studio di popolazione (99) ha descritto i valori medi di cistatina C per classi di età:  $0.75 \pm 0.089 \text{ mg/L}$  per i ragazzi dai 4-19 anni,  $0.74 \pm 0.10 \text{ mg/L}$  tra i 20-59 anni e  $0.83 \pm 0.0103 \text{ mg/L}$  per soggetti con età >60 anni. Tale studio descriveva l'incremento di cistatina C oltre i 60 anni di età sia negli uomini che nelle donne probabilmente dovuto al solo fisiologico declino del GFR. Nella nostra

popolazione di studio cistatina C risulta significativamente aumentata in maschi e donne dopo 5 anni di follow-up con valori medi all'inizio dello studio di circa 1.3 mg/L. Non è presente in letteratura un riferimento che possa associare determinati valori di cistatina C ad un definito valore di GFR misurato (mGFR).

L'altra caratteristica essenziale della cistatina C, confermata anche nel nostro campione di studio, è la sua indipendenza dalla massa muscolare [41]. Numerosi Autori, infatti, hanno bene evidenziato la scarsa o nulla correlazione tra cistatina C e BMI o massa magra [40, 111].

Un solo studio eseguito in 77 persone di età  $65.1 \pm 11.9$  anni e con malattia renale cronica, ha finora confutato questa affermazione dimostrando che la correzione delle formule di regressione che utilizzano la cistatina C con i parametri di composizione corporea e/o antropometrici, fornisce un ulteriore, ma lieve, miglioramento della capacità di predizione del GFR [112]. Attraverso un modello matematico di regressione multipla, gli Autori dimostrano infatti che la varianza del GFR spiegato dalla cistatina C è  $R^2=0.546$ ;  $p=0.003$ , mentre l'inserimento della massa magra nella formula di regressione migliora la predizione del GFR di circa il 16% ( $R^2=0.649$ ,  $F_{2,74}=68.401$ ;  $p<0.001$ ).

Una recente metanalisi di 46 studi, che hanno utilizzato la cistatina C quale semplice ed accurato marker di GFR, ne ha confermato la superiorità di accuratezza rispetto alla creatininemia.

L'unico studio che, in modo prospettico, ha analizzato la relazione tra mGFR e cistatina C è stato eseguito da Perkins e coll. [45] in 30 pazienti diabetici. Tale studio ha confermato l'esistenza di forte correlazione ( $R=0.67$ ) tra cistatina C e mGFR a tutti i livelli di declino della funzionalità renale.

Nella casistica del nostro studio la cistatina C misurata all'inizio dello studio è risultata correlare significativamente con hsPCR in entrambi i sessi. Tale risultato

conferma precedenti osservazioni di Keller e coll [113] i quali hanno osservato la presenza di associazione lineare tra cistatina C e marker di infiammazione quali PCR, IL-6, TNF $\alpha$  e recettori solubili 1 e 2 del TNF nella popolazione di anziani con GFR ancora conservato del Health Aging and Body Composition Study (ABC Study).

A partire dalla terza-quarta decade di vita è nota una progressiva riduzione del GFR pari a circa 1ml/min/1.73 m<sup>2</sup> per anno: con l'ivecchiamento, una riduzione della clearance della creatinina di tale entità è stata descritta anche nel Baltimora Longitudinal Study on Aging

La formula di Cockcroft and Gault, applicata ai soggetti del nostro studio, ha dimostrato un decremento medio del GFR pari a -1.7 ml/min/1.72m<sup>2</sup>, nell'arco dei 5 anni del follow-up, nelle donne ed un aumento medio pari a 1.3 ml/min/1.72m<sup>2</sup> negli uomini.

La formula di Cockcroft and Gault è facilmente applicabile nella pratica clinica, ma numerosi studi hanno dimostrato che la forza di predizione di questa, come di altre meno diffuse formule di stima, si riduce sensibilmente quando applicate a pazienti con caratteristiche differenti rispettoa quelle della popolazione sperimentale studiata. Inoltre, è noto che tutte le formule di stima del GFR presentano accuratezza scarsa proprio nella fase di esordio del declino della funzione renale.

Nel 1976 Cockcroft e Gault pubblicarono il loro studio [70] su un campione di 249 soggetti maschi di età compresa tra 18-92 anni e con un range di clearance della creatinina misurato tra 11ml/min e valori normali. Inserendo in un diagramma le medie delle escrezioni urinarie giornaliere di creatinina calcolate come u-Cr/kg per ogni gruppo di età verso l'età media di ogni decade, gli Autori derivarono la seguente formula di regressione e attraverso una semplice

conversione matematica ottennero pertanto la stima della clearance della creatinina per i soggetti maschi. In considerazione, poi, della minore massa corporea delle femmine, proposero di correggere la formula di predizione per il sesso femminile con fattore di correzione pari al 85% della formula per i soggetti di sesso maschile. E' stato dimostrato che C-G può sovrastimare il GFR per valori ridotti di funzione renale oppure nei soggetti giovani, nei soggetti con sovrappeso od obesi e nelle donne [114,115] e sottostimare i valori alti di GFR [116]. Questa formula, come anche la MDRD, non appare adeguata allo scopo di monitorare nel tempo piccole variazioni di funzionalità individuale anche perché presenta coefficienti di variazione ben superiori al 10%. Infatti il gruppo dell'Istituto "Mario Negri" di Bergamo [117] ha riportato che la percentuale di valori di  $CV_{GFR}$  entro  $\pm 10\%$  varia dal 20 al 45% a seconda delle formule utilizzate.

La formula MDRD è stata proposta da Levey e coll. nell'ambito del MDRD Study [74] mediante la misurazione del GFR con la clearance dell' $^{125}I$ -Iotalamato in una popolazione suddivisa in un *training group* (1070 casi) e un *validation group* (558 casi). Diverse equazioni (6 variabili) sono state sviluppate attraverso modelli di regressione delle caratteristiche del *training group*, ma la formula semplificata a 4 variabili (creatinina sierica, età, sesso e razza) è divenuta la più diffusa formula di stima del GFR [118] tanto da essere suggerita dalle Linee Guida internazionali come strumento per la stadiazione delle nefropatie. Da sottolineare nuovamente come nel campione di popolazione del MDRD furono esclusi i soggetti di età geriatrica.

La formula a 4 variabili del MDRD descrive nella popolazione del nostro studio un aumento dei valori del GFR nel corso dei 5 anni del follow-up.

Diversi Autori hanno indicato che formula MDRD presenta un vario grado di inaccuratezza sottostimando in maniera evidente il GFR ai valori alti [114,115, 116, 119 ], nei soggetti di sesso femminile, negli obesi.

Applicando la formula di Virga normalizzata per superficie corporea ai 153 anziani del nostro studio, si è osservata stabilità del GFR nelle donne e un suo apparente incremento negli uomini nel follow-up a 5 anni. Virga e coll. avevano validato tale formula per la stima della clearance della creatinina in un campione di 530 pazienti del Veneto orientale con vario grado di danno renale (creatinina media  $2.66 \pm 2.61$  mg/dl, range 0.50-15.4; clearance della creatina media  $55.2 \pm 38.2$  ml/min, range 2.1-144) [81]. La correlazione tra la formula di Virga e il GFR misurato con la clearance plasmatica di ioexolo è risultata ottima ( $r=0.856$ ). La formula di Virga, similmente a C-G, predice la clearance della creatinina, ma distingue due diversi modelli di regressione per la stima del GFR nel maschio e nella femmina. Anche qui l'ampia variabilità del danno renale tra i soggetti dello studio rende tale formula inadatta al nostro campione di anziani sani.

Pochi studi hanno direttamente esaminato la relazione tra GFR, creatininemia e composizione corporea intesa come quantificazione della massa magra (Lean Body Mass) o, ancora meglio, della massa muscolare. In effetti tutte le formule basate sulla creatininemia includono parametri che sono indirettamente espressione di massa muscolare (l'età, il sesso), ma l'evoluzione principale di queste formule di stima, cioè la sostituzione di parametri surrogati di massa corporea, con le misure dirette di massa muscolare è stata compiuta solo da Donadio et al [120] e più recentemente da Taylor et al [80]. Donadio e coll hanno dimostrato di essere in grado di predire il GFR con un alto grado di accuratezza impiegando una formula che include la creatinina urinaria, creatinina sierica e massa muscolare misurata con analisi bioimpedenziometrica. Va peraltro

segnalato che gli Autori non hanno potuto fornire una formula per predire il GFR che possa essere generalizzata. L'accuratezza della tecnica bioimpedenziometrica nella determinazione di LBM è controversa e non da tutti accettata. L'esame bioimpedenziometrico è, infatti, un ottimo predittore dell'acqua corporea totale e, indirettamente, della Fat Free Mass. Piccoli errori nel posizionamento degli elettrodi sulla cute, lo stato di idratazione cutaneo e differenze di etnia possono inficiare una corretta valutazione di FFM con uno scarto da 2.5 a 6 Kg.

Taylor e coll. partendo da questi presupposti, hanno proposto una nuova formula per la predizione del GFR partendo, però, da una più esatta misurazione della LBM effettuata mediante DEXA. Lo studio è stato effettuato su soli 10 pazienti la cui composizione corporea è stata misurata attraverso un esame DEXA [70]. La nuova formula di regressione per la stima del GFR attraverso la determinazione della LBM e la creatininemia ha il vantaggio di non necessitare di variabili surrogate per la stima della massa muscolare. La correlazione lineare tra il GFR stimato con la formula proposta da Taylor rispetto al mGFR, determinato con clearance del  $^{125}\text{I}$ -Iotalamato, è risultata soddisfacente ( $r=0.95$ ;  $p<0.0001$ ). Un limite significativo di questo lavoro sta, tuttavia, nel campione troppo limitato di casi. Nel nostro studio la formula di Taylor non è risultata in grado di descrivere variazioni significative del GFR, risultando un filtrato stabile nelle donne e in lieve incremento negli uomini.

Nel nostro studio abbiamo inoltre considerato la formula più nota utilizzata nei soggetti adulti che contenesse la cistatina C. Krediet et coll. [105] che hanno sostituito la creatininemia con un diverso marcatore di filtrazione glomerulare, un marcatore endogeno la cui produzione non dipende dalla massa muscolare e dalla composizione corporea. Tale formula ha descritto nella nostra casistica una riduzione del GFR di circa  $4.61 \text{ ml/min/1.73m}^2$  nelle donne, e  $6.23$

ml/min/1.73m<sup>2</sup> negli uomini dopo 5 anni di follow-up, in linea con i risultati attesi dovuti al fisiologico invecchiamento. Tali risultati sembrano confermare precedenti studi che hanno usato formule basate sulla cistatina C, predicendo il GFR in modo più accurato rispetto a quelle contenenti la creatinina [46, 47].

La variabilità delle popolazioni usate nello studio delle diverse formule di stima del GFR e il fatto che nessuna delle formule è stata condotta in coorti di pazienti con valori di creatinina vicini alla normalità e/o con GFR solo marginalmente ridotto, come nella coorte dei soggetti di questo studio, può spiegare la variabilità di stima del GFR atteso. I risultati del nostro studio sottolineando l'indipendenza della cistatina C da sesso, età e composizione corporea, ed il suo significativo aumento dopo 5 anni di follow-up, ci portano a proporre la cistatina C e la formula di Hoek come validi strumenti di funzionalità renale quando la creatininemia rientra ancora nei limiti di norma.

Il nostro campione di soggetti comprende anziani in buono stato di salute, senza storia di malattia renale acuta o cronica, con stile alimentare sostanzialmente costante e con valori di creatininemia nel range di normalità. Nonostante ciò e nonostante non siano state riscontrate differenze significative nell'alimentazione dei soggetti della nostra coorte di anziani, è stata registrata una riduzione della massa magra in proporzione maggiore nel maschio rispetto alla donna. Tale fenomeno di iniziale sarcopenia, correlabile all'invecchiamento, sembrerebbe pertanto più precoce nel soggetto di sesso maschile rispetto ai soggetti di sesso femminile insorgendo tra i 70-75 anni in media. D'altro canto la riduzione della creatininemia è risultata proporzionalmente maggiore rispetto alla sola riduzione quantitativa della massa magra. Questa osservazione, sebbene non quantificata con metodo sperimentale, introduce l'ipotesi che le modificazioni che il processo

di invecchiamento induce nella struttura muscolare non sono esclusivamente e semplicisticamente riconducibili alla riduzione della massa. Rispetto ai soggetti più giovani, valutati per esempio nello Studio II trasversale, i soggetti dello Studio I presentano, nel corso del follow-up modificazioni del muscolo in termini non solo quantitativi ma anche qualitativi, ad esempio in termini di capacità di produzione di creatinina.

Recentemente è emerso un certo interesse riguardo ad un punto ritenuto cruciale nell'insorgenza della sarcopenia dell'anziano: cioè se l'apporto dietetico di proteine sia realmente sufficiente [121]. Campbell e coll. hanno studiato l'effetto dell'età sull'Estimated Average Requirement (EAR) e la Recommended Dietary Allowance (RDA) in due gruppi di soggetti giovani (21-46 anni) e anziani (63-81 anni) sani [122]. I risultati di questo studio short-term sul bilancio azotato ha evidenziato che la richiesta proteica dietetica e la razione adeguata di proteine non è differente nei giovani rispetto agli anziani (richiesta proteica:  $0.61 \pm 0.14$  g/Kg/d vs  $0.58 \pm 0.12$  g/Kg/d, rispettivamente; razione proteica stimata:  $0.85 \pm 0.21$  g/Kg/d per entrambi i gruppi) e che razione proteica adeguata non differisce statisticamente dalla RDA ( $0.80$  g/Kg/d). Altri Autori hanno invece studiato l'effetto di diete short-term con alto apporto proteico ( $3$ g/Kg/d vs  $1.5$ g/Kg/d) in soggetti giovani ( $24 \pm 1$  anni) ed anziani ( $70 \pm 2$  anni) sani [123]. Il risultato di questo studio indica che aumentare l'introito proteico aumenta il bilancio azotato in entrambi i gruppi e non potenzia la sintesi proteica, ma l'impiego post-assorbitivo delle proteine come energia. Inoltre il GFR dei soggetti anziani, già ridotto rispetto a quello dei giovani, non aumenta come in questi ultimi favorendo, quindi l'incremento degli effetti catabolici post-assorbitivi.

Infine, i dati di questo studio, sebbene in maniera indiretta, consentono di affermare che le variazioni della composizione corporea osservate nel corso

dell'invecchiamento consistono non soltanto in una riduzione della massa muscolare, ma anche in una più marcata variazione della "qualità" del muscolo. Tale processo di invecchiamento sembra più precoce nei soggetti di sesso maschile rispetto alle donne del nostro campione, che ricordiamo, all'arruolamento presentavano la stessa età. Dati sperimentali nell'animale confermano che le modificazioni strutturali e funzionali, che avvengono del muscolo nell'invecchiamento, derivano da complesse e non ancora completamente note variazioni della attività mitocondriale e della ridotta sintesi di proteine "nobili" rispetto all'incremento delle proteine di sostegno come collagene e proteine della matrice extracellulare [124, 125].

Le modificazioni strutturali, ultrastrutturali e funzionali che il processo di invecchiamento produce nella massa magra non sono ancora completamente note. L'indeterminazione della capacità di "produzione" di creatina e quindi di creatinina associata alla difficoltosa stima della reale quantità massa magra di un soggetto anziano, per quanto sin qui descritto, sottolineano l'inaffidabilità della creatininemia come marcatore di GFR in questa categoria di soggetti.

#### *Limitazioni dello studio*

Una limitazione potrebbe derivare dalla scarsa numerosità della popolazione in esame, nonché dal fatto che i soggetti selezionati erano tutti in buone condizioni di salute all'inizio dello studio e quindi i presenti risultati potrebbero non essere rappresentativi di una popolazione geriatrica normale.

Una seconda limitazione è a breve durata del follow up che potrebbe aver limitato le osservazioni prospettiche delle variabili laboratoristiche prese in esame.

La mancanza di un gold standard di riferimento per la misura del GFR nel campione di anziani analizzato ha inoltre impedito, inoltre, di verificare la

precisione e l'accuratezza delle varie formule di stima analizzate applicabili nella pratica clinica.

La mancata conservazione di campioni della raccolta urinaria delle 24h non ha consentito la possibilità di confronto delle formule di stima con la misura della clearance della creatinina e una più attendibile misura del bilancio azotato.

#### STUDIO II (trasversale)

La precisione dei metodi di misura di GFR basati sulla clearance plasmatica di un qualsiasi marcatore esogeno è in genere buona con circa  $CV_{GFR} = 2\%$  di variabilità statistica [53]. Tale precisione è adeguata a rilevare una variabilità intra-individuale su tempi brevi dell'ordine del 3-5% [53]. Altrettanto non si può dire delle formule di stima del GFR (Cockcroft and Gault, MDRD, etc.) che utilizzano la concentrazione plasmatica della creatinina e parametri antropometrici o demografici quali variabili surrogate della massa muscolare. Tutte queste formule non appaiono adeguate allo scopo di monitorare nel tempo piccole variazioni di funzionalità individuale in quanto si discostano dalle misure di GFR con clearance plasmatica con coefficienti di variazione ben superiori al 10%. Infatti il gruppo "Mario Negri" di Bergamo[117] ha riportato che la percentuale di valori di  $CV_{GFR}$  entro  $\pm 10\%$  varia dal 20 al 45% a seconda delle formule utilizzate. Inoltre, una comune critica rivolta alle formule Cockcroft and Gault (C-G) e MDRD è che non vengano adeguatamente presi in considerazione il sesso dei soggetti, che determina differenze principalmente per la massa muscolare, a cui è legata la produzione di creatinina, e le variazioni della massa muscolare con l'età.

Le formule di eGFR, e tra queste la formula C-G e MDRD rappresentano i più diffusi strumenti oggi impiegati in clinica per la determinazione della funzione renale. Numerosi studi dimostrano, però, che la forza di predizione di queste, come di altre meno diffuse formule, si riduce anche sensibilmente quando si cerca di applicarle a pazienti con caratteristiche differenti rispetto a quelle della popolazione sperimentale studiata. Inoltre, come dimostrato di seguito, pressoché tutte le formula di eGFR presentano una accuratezza scarsa proprio nella fase di esordio del declino della funzione renale.

Nel 1976 Cockcroft e Gault pubblicarono il loro studio [70] su un campione di 249 soggetti maschi di età compresa tra 18-92 anni e con un range di clearance della creatinina misurato tra 11ml/min e valori normali. Inserendo in un diagramma le medie delle escrezioni urinarie giornaliere di creatinina calcolate come u-Cr/kg per ogni gruppo di età verso l'età media di ogni decade, gli Autori derivarono la seguente formula di regressione:

$$24h \text{ uCr/kg (mg/kg)} = 28 - (0,2 * \text{età in anni})$$

Attraverso una semplice conversione matematica ottennero pertanto la stima della clearance della creatinina per i soggetti maschi. La formula di predizione per il sesso femminile fu ottenuta correggendo quella per i maschi moltiplicata per un fattore 0.85 in considerazione della minore massa magra delle femmine.

La formula MDRD semplificata a 4 variabili, proposta da Levey e coll. nell'ambito del MDRD Study [118] è divenuta la più diffusa formula di stima del GFR [118] tanto da essere suggerita dalle Linee Guida internazionali come strumento per la stadiazione delle nefropatie.

E' stato dimostrato che C-G può sovrastimare il GFR per valori ridotti di funzione renale oppure nei soggetti giovani, nei soggetti con sovrappeso od obesi e nelle donne [114, 115] e sottostimare i valori alti di GFR [116]. D'altro canto,

diversi Autori hanno indicato come anche la formula MDRD presenti un vario grado di in accuratezza, sottostimando in maniera evidente il GFR ai valori alti [114, 116], nei soggetti di sesso femminile, negli obesi.

Gli unici lavori di confronto tra C-G e MDRD con il GFR misurato con la clearance plasmatica dell'ioexolo, utilizzata nel nostro studio, confermano questi riscontri: C-G risultava relativamente più accurata in soggetti con modesta o minima riduzione della funzione renale, laddove MDRD presentava una migliore performance nei soggetti con trapianto renale e insufficienza renale [117]. Un relativo vantaggio della MDRD rispetto alla C-G consiste nel fatto che, per questa ultima, l'errore relativo (*bias*) è direttamente correlato al BMI, portando quindi tanto alla sovrastima del GFR degli obesi quanto alla sottostima del GFR dei pazienti sottopeso .

Recentemente Virga e coll. hanno proposto una nuova formula per la stima della clearance della creatinina studiando 530 pazienti del Veneto con vario grado di danno renale (creatinina media  $2.66 \pm 2.61$  mg/dl, range 0.50-15.4; clearance della creatina media  $55.2 \pm 38.2$  ml/min, range 2.1-144) [81]. La correlazione tra la formula di Virga e il mGFR con la clearance plasmatica di ioexolo è risultata ottima ( $r=0.856$ ). La formula di Virga, similmente a C-G, predice la clearance della creatinina, ma distingue due diversi modelli di regressione per la stima del GFR nel maschio e nella femmina. Questa soluzione, rispetto a quella proposta per la stima della clearance della creatinina con C-G per le donne che suggerisce una riduzione del 15% della stima del maschio, apporta un sensibile miglioramento nelle performance (errore % medio  $+ 2.3 \pm 28.3$  vs  $+ 5.2 \pm 30.1$  vs  $- 11.4 \pm 25.9$ ,  $p < 0.0005$ , rispettivamente GFR<sub>Virga</sub> vs GFR<sub>CG</sub> vs GFR<sub>MDRD</sub>). Anche lo studio di Virga conferma la costante sottostima del GFR da parte di MDRD in entrambi i sessi.

Infine, il Gruppo della Mayo Clinic ha sviluppato una nuova formula (Mayo Clinic Quadratic – MCQ-) basata su dati relativi a 320 soggetti con funzione normale o ridotta [116]. La formula, che restituisce la stima del GFR in ml/min/1.73m<sup>2</sup>, è costruita su tre variabili delle quali una, la creatinina, è elevata al quadrato (sesso, età in anni e creatinina in mg/dL).

Cirillo e coll. hanno confrontato le performance di accuratezza e precisione della GFR<sub>CG</sub>, GFR<sub>MCQ</sub> e GFR<sub>MDRD</sub> rispetto al mGFR misurato con clearance dell'inulina, in 380 soggetti di ambo i sessi con ampio range di età (18-88 anni) e funzione renale (media mGFR 75.9 ml/min/1.73m<sup>2</sup>, range 8.2-158.8; creatininemia media 1 mg/dL, range 0.51-9.02) [119]. Gli Autori concludono che la variabilità della predizione del GFR evidenziata dalle tre formule dipende da sesso, età e BMI; inoltre la precisione è lievemente maggiore per GFR<sub>MDRD</sub> rispetto a GFR<sub>CG</sub> ai bassi livelli di GFR, ma simile per i valori non ridotti; la GFR<sub>MCQ</sub> risulta la formula meno precisa. I risultati quindi suggeriscono che l'accuratezza della predizione del GFR tende a ridursi nei soggetti anziani, negli obesi con GFR<sub>CG</sub> e per funzione renale solo lievemente ridotta con GFR<sub>MDRD</sub>. Il lavoro di Cirillo e coll. non aveva previsto la determinazione diretta della composizione corporea mediante esame DXA dei soggetti studiati. I risultati di questi autori comunque, individuano nel BMI, un indicatore surrogato ed impreciso di composizione corporea, una importante fattore per il potenziamento dell'accuratezza delle formule. In realtà, come dimostrato da altri autori e da noi in questo studio, il BMI è piuttosto un indicatore di "adiposità" che di massa magra.

Pochi studi hanno direttamente esaminato la relazione tra GFR, creatininemia e composizione corporea intesa come quantificazione della massa magra (Lean Body Mass) o, ancora meglio, della massa muscolare. In effetti tutte le formule

basate sulla creatininemia includono parametri che sono indirettamente espressione di massa muscolare (l'età, il sesso), ma l'evoluzione principale di queste formule di stima, cioè la sostituzione di parametri surrogati di massa corporea, con le misure dirette di massa muscolare è stata compiuta solo da Donadio e coll. [120] e più recentemente da Taylor e coll.

Per poter confrontare l'accuratezza dei vari eGFR abbiamo utilizzato un grafico di Bland Altman modificato, dove sull'asse X è stato riportato il GFR di riferimento e non la media con il eGFR testato  $([eGFR+mGFR]/2)$ .

L'accuratezza delle formule valutata mediante la differenza percentuale in valore assoluto (Tab. XIII) si è dimostrata migliore per MDRD (18.31%), ma altrettanto buona sia per la formula di Virga (19.19%) e per TAY (19.20%) che per CG (19.97%).

Abbiamo quindi verificato l'accuratezza relativa  $( |(eGFR-mGFR)/mGFR|*100 )$  delle varie formule di stima del GFR attraverso la percentuale di pazienti il cui eGFR risultasse entro il 15, 30 e 50% al di sopra o al di sotto del mGFR. Anche in questo buone performances nella previsione accurata dell' eGFR spettano alla formula di Virga (52% di pazienti ricadevano entro il 15% di errore percentuale assoluto) seguita dalla C-G e dalla formula di Taylor (rispettivamente 47 e 45% dei pazienti con errore percentuale assoluto <15%). Quando si consideri un margine più ampio dell'errore percentuale assoluto della stima del GFR (<30%) la migliore performance è a carico di MDRD (83% dei pazienti) contro performances lievemente minori di CG e Virga ( 80% e 77%, rispettivamente).

Un lavoro pubblicato recentemente nel J Am Soc Nephrol [126] ha verificato le performance della MDRD in una vasta (5504 pz) e varia popolazione di pazienti che ha partecipato a dieci studi sperimentali o di popolazione nel corso dell'ultimo decennio. Questa popolazione comprende un più robusto numero di

soggetti con diabete di tipo 1 e 2, donatori di rene e soggetti con classi minori di CKD, non adeguatamente rappresentati nell'originario studio MDRD da cui sono state derivate le formule di stima del GFR. Rispetto ai pazienti dello studio MDRD, i pazienti raccolti nel database comune presentavano un mGFR più alto ( $79.9 \pm 25.9$  vs  $40 \pm 21$  ml/min/1.73m<sup>2</sup>), ma età ( $49 \pm 18$  vs  $51 \pm 13$  anni) e BMI simili. Per quanto riguarda il BMI i pazienti del database comune presentavano in circa pari proporzioni normo-, sovrappeso ed obesità (26, 40, 34%). I risultati di questo studio sono sovrapponibili ai dati riscontrati nel nostro piccolo campione di casi. La formula MDRD presenta il minor bias e la maggiore precisione per mGFR < 60 ml/min/1.73m<sup>2</sup>, sottostima il mGFR tra 60-119 ml/min/1.73m<sup>2</sup> e sovrastima mGFR per valori > 120 ml/min/1.73m<sup>2</sup>. L'accuratezza, considerata come errore relativo percentuale entro il 30% del mGFR, è circa sovrapponibile nelle due classi di eGFR (< 60 o ≥ 60 ml/min/1.73m<sup>2</sup>) (83%), ma inferiore a quella riscontrata nello studio MDRD (90%).

Sebbene estremamente limitati ed ancora preliminari, i nostri dati confermano quanto riportato in letteratura relativamente alla scarsa precisione ed accuratezza della MDRD nella diagnosi precoce di nefropatia inquadrabile nelle prime due classi CKD. Le ipotesi costantemente avanzate dai vari Autori per spiegare la scarsa accuratezza per i valori elevati di GFR consistono principalmente nella difficoltà di definire una sicura calibrazione della creatinina, ma soprattutto nella variabilità della massa muscolare e della dieta che più marcatamente interferiscono nella produzione di creatinina individuale. Le variabili surrogate per la stima della massa magra, di volta in volta introdotte nelle varie formule, si sono manifestate per la maggior parte insoddisfacenti.

Per tale motivo, l'ulteriore valutazione dei dati raccolti dalla nostra casistica ha avuto lo scopo di quantificare la massa muscolare con la metodica DXA. I dati di

correlazione multivariata evidenziano come la massa muscolare, da cui viene prodotta la creatinina endogena giornaliera, si correla direttamente con la circonferenza del braccio, della gamba, ma molto scarsamente con altri parametri antropometrici di comune impiego in clinica, come il BMI e la circonferenza addome. In particolare questi ultimi parametri risultano essenzialmente espressione della massa grassa (Fat-tot). I dati del nostro studio evidenziano una scadente correlazione del BMI sia con la massa magra totale corporea che con quella degli arti e con la quota di produzione della creatinina individuale.

Stimando, quindi, trascurabile la quota di escrezione extrarenale in virtù dello stato stazionario in cui si trovavano i pazienti e per i livelli di GFR lontani dalla grave insufficienza renale, la quota di produzione di creatinina è stata derivata attraverso una semplice formula matematica dalla relazione:

$GFR = 1/Cr * k$  (dove k equivale alla produzione di creatinina in mg/min).

E' evidente che una stima, la più precisa possibile, di k, cioè della produzione endogena di creatinina e in ultima analisi di LBM potrebbe consentire di migliorare la performance delle formule di stima del GFR. Applicando modelli matematici di regressione lineare e scartando le componenti della composizione corporea non statisticamente significative abbiamo evidenziato che il più forte predittore di massa muscolare fonte della creatinina è la massa muscolare degli arti (appendicolare) ( $R^2=0.601$ ;  $P<0.0001$ ). Singolarmente anche variabili importanti come quelle demografiche (età, sesso, etnia), il peso e l'altezza non sono risultate significative a dimostrazione che tutte possono soltanto contribuire con peso differente alla stima della massa magra. L'età, considerata come variabile continua è risultata correlata in maniera inversa alla quota di produzione della creatinina, sebbene con una debole significatività ( $p= 0,027$ ). Sicuramente

l'esiguo numero dei casi studiati e la prevalenza del sesso maschile tra i soggetti con meno di 60 anni rappresentano un limite per questa valutazione.

Abbiamo, infine, ipotizzato di poter stimare la massa muscolare di un soggetto attraverso semplici misure antropometriche senza il ricorso a determinazioni strumentali. La correlazione di regressione che lega la produzione di creatinina alle misure antropometriche e alle variabili demografiche, escludendo di volta in volta quelle non statisticamente significative, ha infine mostrato una stretta relazione solo con il sesso maschile, la circonferenza del braccio e quella dell'addome nella formula:

$$\text{Cr-PROD} = -0.366115 + (0.28081 \text{ se maschio}) - (0.00275 * \text{Circ-addome in cm}) \\ + 0.042854 * \text{Circ-braccio (in cm)}$$

La formula di regressione risulta significativa ( $R^2=0.780$ ;  $P<0.0001$ ).

La nota differenza per sesso della LBM è stata confermata in questo studio. Si noti che la formula riporta tra i regressori, e con alta significatività statistica ( $0,042854*\text{circ.braccio}$ ;  $p<0,0001$ ;  $-0,00275*\text{circ.addome}$ ,  $p=0,05$ ), anche la circonferenza dell'addome che abbiamo dimostrato essere un più forte predittore della massa magra. Il coefficiente di regressione della circ. addome ha però un valore negativo. Pertanto, nella formula, la quota di massa lipidica comunque compresa nella misura della circonferenza del braccio, verrebbe "corretta" dalla sottrazione della frazione della circ.addome.

Con una casistica ancora così limitata non è nostra ambizione quella di proporre una formula per stimare il GFR alternativa a quelle, numerose, disponibili in letteratura e validate in ampie popolazioni. Le formule per la stima della produzione della creatinina hanno costituito giusto un modello per testare le nostre ipotesi circa la predizione della massa magra e della relativa quota di produzione di creatinina. Similmente alla originaria formula MDRD e C-G,

nessuna delle altre formule per la stima del GFR è stata condotta in coorti di pazienti con valori di creatinina vicini alla normalità e con GFR solo marginalmente ridotto. Ciò spiega uno dei principali motivi per il quale nessuna delle formule testate sia particolarmente accurata e precisa nel range di funzione renale appena al di sotto della normalità scelto nel nostro studio. Una seconda ragione è il problema della corretta calibrazione della creatininemia, in uso nei Laboratori di Cleveland, ancora non universalmente accettata. Il terzo motivo sta nel fatto che, perché le formule di stima possano accuratamente predire il GFR, la creatinina dovrebbe essere considerata un marker ideale di filtrazione glomerulare, quando è a tutti noto che ciò non risponde alla realtà. L'incertezza nella definizione quantitativa della massa magra (muscolare), soprattutto in determinate categorie di soggetti (obesi, anziani, sesso femminile), costituisce un ulteriore importante limite nella predizione accurata del GFR. Come dimostrato dai recenti studi, questi fattori rivestono maggiore importanza nella scarsa accuratezza delle formule per i valori alti di GFR. Lim W e coll. hanno verificato che con l'aggiustamento per LBM, calcolato con formula di Zasadny KR ( $[0.9 * (\text{altezza in cm} - 152) + (50 \text{ se maschio}, 45.5 \text{ se femmina})]$ ), il miglioramento della accuratezza di molte delle formule note in letteratura è in realtà piuttosto modesto ( $R^2=0.25-0.30$ ) in una coorte di soggetti con normofunzione renale [127]. Nello stesso studio emerge che C-G corretta per LBM fornisce una stima più vicina al mGFR ( $^{99}\text{Tc DPTA}$ ), ma non tanto accurata da rimpiazzare le metodiche con radionuclidi.

Ulteriori studi in un campione più vasto di soggetti e con casistica più complessa, saranno necessari per la validazione di questa oppure per la proposta di una nuova e più accurata formula di stima del GFR.

*Limitazioni dello Studio II.*

I limiti di questo studio consistono essenzialmente costituiti nella limitazione del campione di casi e nel disomogeneo bilanciamento tra maschi e femmine. Un secondo limite consiste nella differente calibrazione del dosaggio della creatinina rispetto agli standards utilizzati dal Laboratorio di Cleveland dove la formula MDRD è stata generata. La correzione della calibrazione effettuata attraverso la verifica di uno stesso campione di sieri dosati sia nel Laboratorio di Verona che a Cleveland ha consentito una certa, ma non assoluta, riduzione dell'errore analitico. Ciò nonostante i risultati confermano l'ipotesi dell'importanza della determinazione della massa muscolare per la stima più accurata della produzione individuale di creatinina. Le formule di verifica delle ipotesi escludono, per il momento, il contributo di parametri demografici e antropometrici classici nella predizione della massa muscolare ad eccezione del sesso maschile. A causa della scarsità del campione, la correlazione inversa tra la LBM e l'età, nota dalla letteratura, non è stata qui confermata con significatività statistica ma solo come tendenza. Migliori i risultati della correlazione tra quota di produzione di creatinina ed età considerata per fascia (<60 o >60 anni).

## **VIII-CONCLUSIONI**

STUDIO I Prospettico. La determinazione della funzione renale rappresenta un indispensabile strumento per l'identificazione precoce e per il monitoraggio delle malattie renali, soprattutto nell'anziano risulta essere uno strumento indispensabile nella comune pratica clinica per l'aggiustamento terapeutico di farmaci e l'indicazione ad esami radiologici con mezzi di contrasto. Troppo indaginose e costose le tecniche invasive che usano sostanze marcate con radioisotopi e i mezzi di contrasto radiologici. La sola determinazione della

creatininemia è un indicatore inaffidabile del eGFR nei soggetti anziani sani, obesi, malnutriti, con recenti e rapide variazioni del peso corporeo, in stato anasarcatco e con sindrome nefrosica e nei sarcopenici obesi. Soprattutto negli anziani sani e con funzionalità renale ancora conservata risultano inapplicabili le formule matematiche di stima del GFR “creatinine-based”. La riduzione della massa magra, più precoce nel maschio, si accompagna ad una riduzione proporzionalmente maggiore dell’attività sintetico-metabolica del muscolo.

I nostri risultati suggeriscono una specifica utilità della cistatina C nella valutazione della funzionalità renale nell’anziano sottolineando la sua indipendenza dalle modificazioni della composizione corporea età-correlate. Le ipotesi formulate in questo studio, se confermate da dati sperimentali, suggeriscono la necessità di adottare formule di stima del GFR “dedicate” alle persone anziane proprio come già in uso per i bambini.

STUDIO II Trasversale. Questo studio conferma la grande variabilità e la scarsa accuratezza delle principali formule per la stima del GFR, ampiamente usate in clinica e fortemente promosse dalle Linee Guida internazionali, soprattutto nei pazienti con iniziale decurtazione della funzionalità renale, obesità, età avanzata o giovanile e sesso femminile. I limiti dell’accuratezza delle formule di stima, verificate in questo lavoro, consistono nella sostanziale differenza che esiste tra le caratteristiche della popolazione sulle quali è stata costruita la formula e quelle della popolazione oggetto del nostro studio (etnia, età, GFR, patologie associate, dieta, etc.). L’accuratezza delle formule di stima del GFR più diffuse (MDRD, MCQ, C-G) si riduce sensibilmente quando si applica a soggetti con lieve decurtazione del GFR.

L'ipotesi che l'incertezza nella corretta definizione quantitativa della massa magra, da cui origina la creatinina di ogni soggetto, sia il principale determinante del bias delle formule è stato confermato in questo studio. La valutazione attraverso misurazioni dirette della LBM e la correzione del GFR per questo dato ha evidenziato una relazione molto superiore rispetto ai parametri surrogati di composizione corporea come l'età, il peso, l'altezza. La stima della quota di produzione della creatinina è possibile, sebbene i dati siano ancora preliminari, attraverso semplici e ripetibili determinazioni antropometriche dirette che non richiedono il ricorso a costose tecniche diagnostiche.

La società scientifica nefrologica sta impiegando notevoli energie al fine di correggere i maggiori bias che interferiscono con una accurata valutazione del GFR (standardizzazione del dosaggio della creatininemia e verifica e validazione delle formule di stima del filtrato). Il semplice dosaggio della creatininemia non è in grado di individuare con sufficiente accuratezza lo stadio funzionale CKD in un ampissima quota della popolazione. Pertanto, non può essere più giustificata da parte del Medico una valutazione approssimativa e "intuitiva" della funzione renale sulla base del semplice dosaggio della creatininemia. Allo stato attuale, però, le formule più diffuse per la stima del GFR, sebbene molto migliori della creatininemia di per sé, presentano un grado di inaccuratezza maggiore proprio negli stadi iniziali delle malattie renali. Ciò richiede quindi uno sforzo educativo sull'importanza della interpretazione clinica dei risultati per le conseguenze connesse alle scelte terapeutiche nel singolo paziente (ad esempio chemioterapia, antibioticotera, ipoglicemizzanti orali, anticoagulanti, etc), se non per le valutazioni prettamente prognostiche e/o di valutazione del rischio globale a medio e lungo termine.

## IX- BIBLIOGRAFIA

- 1-Renal data system. *2005 annual data report: atlas of end-stage renal disease in the united states*. Bethesda, Md.: National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2005.
- 2-Coresh J, Bird-Holt D, Astor BC, et al. *Chronic Kidney disease awareness, prevalence, and trends among U.S. adults, 1999 to 2000*. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:180-8.
- 3-National Kidney Foundation. *K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification*. *Am J Kidney Dis* 2002;39:suppl 1:S1-S266.
- 4- Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu C. *Chronic kidney disease and the risk of death, cardiovascular events, and hospitalization*. *N Engl J Med* 2004; 351: 1296-305.
- 5- Heymsfield SB, Arteaga C, McManus C, et al.: *Measurement of muscle mass in humans: validity of the 24-hour urinary creatinine method*. *Am J Clin Nutr* 37: 478-494, 1983.
- 6- Horber FF, Scheidegger J, Frey FJ: *Overestimation of renal function in glucocorticoid treated patients*. *Eur J Clin Pharmacol* 28: 537-541, 1985.
- 7- James GD, Sealey JE, Alderman M, et al: *A longitudinal study of urinary creatinine and creatinine clearance in normal subjects: Race, sex, and age differences*. *Am J Hypertens* 1:124-131, 1988.
- 8- Lew SQ, Bosch JP: *Effect of diet on creatinine clearance and excretion in young and elderly healthy subjects and patients with renal disease*. *J Am Soc Nephrol* 2:856-865, 1991.
- 9- Mayersohn M, Conrad KA, Achari R: *The influence of a cooked meat meal on creatinine plasma concentration and creatinine clearance*. *Br J Clin Pharmacol* 15:227-230, 1983.
- 10- Shemesh O., Golbetz H., Kriss JP, Myers BD: *Limitations of creatinine as a filtration marker in a glomerulopathic patients*. *Kidney Int* 1985;28: 830-838.
- 11- Lesley A. Stevens, Andrew S. Levey: *Clinical implications of Glomerular Filtration Rate (GFR) Estimating Equations*. *Nephrology Rounds* 2006; Vol.4 Issue2.
- 12- Bonsnes RW, Taussky HH: *On the colorimetric determination of creatinine by Jaffè reaction*. *J Biol Chem* 1945;158:581-591.

- 13- Jaffè M: *Über den Niederschlag welchen pikrinsäure in normalen Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins*. Z Physiol Chem. 1886;10:391-400
- 14- Young DS: *Effects of drugs on clinical laboratory tests*, 3<sup>rd</sup> ed Washington DC, American Association of clinical Chemistry Press, 1990, pp3-128.
- 15- Kroll MH, Hagenhuber C, Elin RJ: *Reaction of picrate with creatinine and cepha antibiotics*. Clin Chem 1984;30:1664-1666.
- 16- Doolan PD, Alpen EL, Theil GB: *A Clinical appraisal of the plasma concentration and endogenous clearance of creatinine*. Am J Med 1962; 32: 65-79.
- 17- Fabiny DL, Ertingshausen G: *Automated reaction-rate method for determination of serum creatinine with the Centrifichem*. Clin Chem 1971;17: 696-700.
- 18- Gerard SK, Khayam-Bashi H: *Characterization of creatinine error in ketotic patients: A prospective comparison of alkaline picrate methods with an enzymatic method*. Am J Clin Pathol 1985;84:659-664
- 19- Hood B, Attman P, Ahlmèn J, Jagenburg R: *Renal hemodynamics and limitations of creatinine clearance in determining filtration rate in glomerular disease*. Scand J Urol Nephrol 1971;5:154-161.
- 20- Lesley A. Stevens, Josef Coresh, Tom Greene, Andrei S. Levey: *Assessing Kidney Function – Measured and Estimated Glomerular Filtration Rate*. N Engl J Med 2006; 354: 2473-83
- 21- James GD, Sealey JE, Alderman M, et al: *A longitudinal study of urinary creatinine and creatinine clearance in normal subjects: Race, sex, and age differences*. Am J Hypertens 1988;1:124-131.
- 22- Horber FF, Scheidegger J, Frey FJ: *Overestimation of renal function in glucocorticoid treated patients*. Eur J Clin Pharmacol 1985;28: 537-541.
- 23- Brod J, Sirota JH: *The renal clearance of endogenous "creatinine" in man*. J Clin Invest 1948; 27:645-654.
- 24- Bauer JH, Brooks CS, Burch RN: *Renal function studies in man with advanced renal insufficiency*. Am J Kidney Dis 1982;2:30-35.
- 25- Fuller NJ, Elia M: *Factors influencing the production of creatinine: Implications for determination of urinary creatinine and creatine in man*. Clin Chim Acta 1988;175:199-210.
- 26- Carrie BJ, Golbetz HV, Michaels AS, Myers BD: *Creatinine: An inadequate filtration marker in glomerular diseases*. Am J Med 1980;69: 177-182.

- 27- Pasternack A, Kuhlback B: *Diurnal variations of serum and urine creatine and creatinine*. Scand J Clin Lab Invest 1971;27: 1-7.
- 28- Rosano TG, Brown HH: *Analytical and biological variability of serum creatinine and creatinine clearance: Implications for clinical interpretation*. Clin Chem 1982; 28: 2330-2331.
- 29- Simonsen O, Grubb A, Thysell H: *The blood serum concentration of cystatin C ( gamma-trace) as a measure of the glomerular filtration rate*. Scand J Clin Lab Invest 1985;45: 97-101.
- 30- Barrett AJ, Davies ME, Grubb A. *The place of human gamma-trace (cystatin C) amongst the cysteine proteinase inhibitors*. Biochem Biophys Res Commun 1984;120:631– 6.
- 31- Brzin J, Popovic T, Turk V, Borchart U, Machleidt W. *Human cystatin, a new protein inhibitor of cysteine proteinases*. Biochem Biophys Res Commun 1984;118:103– 9.
- 32-
- 32- Schwabe C, Anastasi A, Crow H, McDonald JK, Barrett AJ. *Cystatin Amino acid sequence and possible secondary structure*. Biochem J 1984;217:813–7.
- 33- Turk V, Brzin J, Longer M, et al. *Protein inhibitors of cysteine proteinases: III. Amino-acid sequence of cystatin from chicken egg white*. Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 1983;364:1487 – 96.
- 34- Abrahamson M, Olafsson I, Palsdottir A, et al. *Structure and expression of the human cystatin C gene*. Biochem J 1990;268: 287– 294.
- 35- Grubb AO. *Cystatin C—Properties and use as diagnostic marker*. Adv Clin Chem 2000;35:63–99.
- 36- Dharnidharka VR, Kwon C, Stevens G. *Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta-analysis*. Am J Kidney Dis 2002;40:221– 6.
- 37- Risch L, Herklotz R, Blumberg A, Huber AR. *Effects of glucocorticoid immunosuppression on serum cystatin C concentrations in renal transplant patients*. Clin Chem 2001;47:2055–9.
- 38- Fricker M, Wiesli P, Brandle M, Schwegler B, Schmid C. *Impact of thyroid dysfunction on serum cystatin C*. Kidney Int 2003;63: 1944– 1947.
- 39- Wiesli P, Schwegler B, Spinass GA, Schmid C. *Serum cystatin C is sensitive to small changes in thyroid function*. Clin Chim Acta 2003;338:87–90.
- 40- Dharnidharka VR, Kwon C, Stevens G. *Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta-analysis*. Am. J. Kidney Dis. 2002;40:221-226.

- 41- Tanaka A, Suemaru K, Araki H. *A new approach for evaluating renal function and its practical application*. J. Pharm. Sc. 2007; Sep 8.
- 42- Finney H, Newman DJ, Thakkar H et al *Reference ranges for plasma cystatin C and creatinine measurements in premature infants, neonates, and older children*. Arch Dis Child 82:71–75, 2000.
- 43- Norlund L, Fex G, Lanke J: *Reference intervals for the glomerular filtration rate and cell-proliferation markers: serum cystatin C and serum beta 2-microglobulin/cystatin C-ratio*. Scand J Clin Lab Invest 57:463–470, 1997.
- 44- Vinge E, Lindergard B, Nilsson-Ehle P, Grubb A: *Relationships among serum cystatin C, serum creatinine, lean tissue mass and glomerular filtration rate in healthy adults*. Scand J Clin Lab Invest 59:587–592, 1999.
- 45- Pucci L, Triscornia S, Lucchesi D, Fotino C, Pellegrini G, Pardini E, Miccoli R, Del Prato S, Penno G: *Cystatin C and estimates of renal function: searching for a better measure of kidney function in diabetic patients*. Clin Biochem 2007; 53 (3) 480-8.
- 45- Perkins BA, Nelson R, Ostrander B, Blouch K, Krolewski A, Myers B, Warram J. *Detection of renal function decline in patients with diabetes and normal or elevated GFR by serial measurements of serum cystatin C concentration: results of a 4 years follow-up study*. J Am Soc Nephrol 2005; 216: 1404-12.
- 46- Menon V, Shlipak MG, Wang X, Coresh J, Green T, Stevens L, Kusek JW, Beck GJ, Collins AJ, Levey AS, Sarnak MJ. *Cystatin C as a risk factor for outcome in chronic kidney disease*. An Intern Med 2007; 147: 19-27.
- 47- Shlipak MG, Sarnak MJ, Katz R, Fried LS, Selinger SL, Newman AB, Siscovick DS, Stehman-Breen C. *Cystatin C and the risk of death and cardiovascular events among elderly persons*. N Engl J Med 2005; 352 (20): 2049-60.
- 48- Levey AS: *Measurement of renal function in chronic renal disease*. Kidney Int 1990;38:167-184
- 49- Smith HW, Goldring W, Chasis H: *The measurement of tubular excretory mass, effective blood flow and filtration rate in the normal human kidney*. J Clin Invest 1938;17:263-278.
- 50- Nosslin, B.: *Determination of clearance and distribution volume with the single injection technique*. Acta med scan. Suppl 1965;442:97.
- 51- Schnurr E, Lahme W, Küppers H: *Measurement of renal clearance of inulin and PAH in the steady state without urine collection*. Clin Nephrol 1980;13:26-29.
- 52- Frennby B., Sterner G. : *Contrast media as marker of GFR*. Eur Radiol. 2002;12:475-484 .

- 53- Sambataro, M., Thomaseth, K., Pacini, G., Robaudo, C., Carraro, A., Bruseghin, M., Brocco, E., Abaterusso, C., DeFerrari, G., Fioretto, P., Maioli, M., Tonolo, G.C., Crepaldi, G., and Nosadini, R. *Plasma clearance rate of <sup>51</sup>Cr-EDTA provides a precise and convenient technique for measurement of glomerular filtration rate in diabetic humans.* J Am Soc Nephrol 1996;7:118-127.
- 54- Broecker-Mortensen, J.: *A simple method for determination of glomerular filtration rate.* Scan. J. Clin Lab. Invest 1972;30, 271-274.
- 55- Prueksaritanont T, Chen ML, Chiou WL : *Simple and micro high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of p-aminohippuric acid and iothalamate in biological fluids.* J Chromatogr 1984;306:89-97.
- 56- O'Reilly PH, Brooman PJC, Martin PJ, et al.: *Accuracy and reproducibility of a new contrast clearance method for the determination of glomerular filtration rate.* BMJ 1986;293:234-236.
- 57- Schwartz GJ, Furth S., Cole SR, Warady B., Muñoz A.: *Glomerular Filtration Rate via plasma iothalamate disappearance: pilot study for chronic Kidney disease in children.* Kidney Int 2006; 69,2070-2077.
- 58- Stake G, Monn E, Rootwelt K, Monclair T: *The clearance of iothalamate as a measure of the glomerular filtration rate in children with chronic renal failure.* Scand J Clin Lab Invest 1991;51:729-734.
- 59- Brown SCW, O'Reilly PH: *Ioethalamate clearance for the determination of glomerular filtration rate in clinical practice: Evidence for a new gold standard.* J Urol 1991;146:675-679.
- 60- Gaspari F, Perico N, Matalone M, et al.: *Precision of plasma clearance of iothalamate for estimation of GFR in patients with renal disease.* J Am Soc Nephrol 1998;9:310-313.
- 61- Gaspari F., Perico N., Ruggenti P., Mosconi L., Amucastegui C.S., Guerini E., et al. *Plasma clearance of nonradioactive iothalamate as a measure of glomerular filtration rate* J Am Soc Nephrol 1995; 6:257-263.
- 62- Turner ST, Reilly SL: *Fallacy of indexing renal and systemic hemodynamic measurement for body surface area.* Am J Physiol 1995;268: R978-R988.
- 63- McCance RA, Widdowson EM: *The correct physiological basis on which to compare infant and adult renal function.* Lancet 1952; 2:860-862.
- 64- Du Bois D, Du Bois EF: *A formula to estimate the approximate surface area if height and weight are known.* Arch Intern Med 1916;17:863-871.
- 65- Peters AM, Allison H, Ussov WY: *Simultaneous measurement of extracellular fluid distribution and renal function with a single injection of <sup>99m</sup>Tc DTPA.* Nephrol Dial Transplant 1995;10:1829-1833.

- 66- Boer P: *Estimated lean body mass as an index for normalization of body fluid volumes in humans*. Am J Physiol 1984;247: F632-F636.
- 67- Wesson LG Jr: *Renal hemodynamics in physiological states*. In physiology of the Human Kidney. New York, Grune & Stratton, 1969, pp96-154.
- 68- Van Beek E, Houben AJHM, van Es PN, et al.: *Peripheral haemodynamics of renal function in relation to the menstrual cycle*. Clin Sci 1996;91: 163-168.
- 69- Zuccalà A, Zucchelli P: *Use and misure of the renal functional reserve concept in clinical nephrology*. Nephrol Dial Transplant 1990;5:410-417.
- 70- Cockcroft DW, Gault MH: *Prediction of creatinine clearance from serum creatinine*. Nephron 1976;16:31-41.
- 71- Taylor GO, Bamgboye EA, Oyediran ABOO, Longe O: *Serum Creatinine and prediction formulae for creatinine clearance*. Afr J Med Sci 1982;11:175-181.
- 72- Rolin HA III, Hall PM, Wei R: *Inaccuracy of estimated creatinine clearance for prediction of iothalamate glomerular filtration rate*. Am J Kidney Dis 1984;4: 48-54.
- 73- Klahr S, Levey AS, Beck GJ, et al. : *The effects of dietary protein restriction and blood-pressure control on the progression of chronic renal disease*. N Engl J Med 1994;330:877-884.
- 74- Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, et al. : *A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: A new prediction equation . Modification of Diet in Renal Disease Study Group*. Ann Intern Med 1999;130: 461-470.
- 75- Norden G, Björck S, Granerus G, Nyberg G: *Estimation of renal function in diabetic nephropathy: Comparison of five methods*. Nephron 1987;47:36-42.
- 76- Waz WR, Feld LG, Quattrin T: *Serum creatinine height, and weight do not predict glomerular filtration rate in children with IDDM*. Diabetes Care 1993;16: 1067-1070.
- 77- Li Zuo, Ying-Chun Ma, Yu-Hong Zhou, Mei Wang, Guo-Bin Xu, Hai-Yan Wang: *Application of GFR- Estimating Equations in Chinese Patients With Chronic Kidney Disease*. Am J Kidney Dis, Vol 45, No3, 2005:pp 463-472.
- 78- Stoves J, Lindley EJ, Barnfield MC, et al.: *MDRD equation estimates of glomerular filtration rate in potential living kidney donors and renal transplant recipients with impaired graft function*. Nephrol Dial Transplant 2002;17: 2036-2037.

- 79- Rule AD., Larson T S., Bergstralh EJ et al.: *Using Serum Creatinine to estimatee Glomerular filtration rate: Accuracy in good health and in Chronic Kidney Disease*. Ann Intern Med. 2004;141:929-937.
- 80- Taylor TP, Wang W, Shrayyef MZ, De Anna C., Hutchison FN, Gadegbeku CA: *Glomerular filtration rate can be accurately predicted using lean mass measured by dual-energy X-ray absorptiometry*. Nephrol Dial Transplant 2006;21:84-87.
- 81- Virga G, Gaspari F., Thomaseth K, Cara M., Mastrosimone R., Rossi V.: *A new equation for estimating renal function using Age, Body Weight and serum creatinine*. Nephron Clin Pract 2007;105: c43-c53.
- 82- Fliser D, Ritz E. *Serum cystatin C concentration as a marker of renal dysfunction in the elderly*. Am. J Kidney Dis. 2001 Jan; 37 (1): 79-83.
- 83- Wasen E, Isoaho R, Mattila K, Vahlberg T, Kivela SL, Irjala K. *Estimation of glomerular filtration rate in the elderly: a comparison of creatinine-based formulae with serum cystatin C*. J Inter Med. 2004 Jul; 256 (1): 70-8.
- 84- Zamboni M, Armellini F, Harris T, Turcato E, Micciolo R, Bergamo-Andreis IA, Bosello O. *Effects of age on body fat distribution and cardiovascular risk factors in women*. Am J Clin Nutr 1997; 66: 111-115.
- 85- Zamboni M, Turcato E, Santana H, Maggi S, Harris T, Pietrobelli A, Heymsfield SB, Micciolo R, Bosello O. *The relationship between body composition and physical performance in older women*. J Am Geriatr Soc 1999.
- 86- Kehayas J, Fiatarone MA, Zhuang H, Roubenoff R. *Total body potassium and body fat: relevance to aging*. Am J Cl Nutr 1997; 66: 904-910
- 87- Baumgartner RN, Stauber PM, Mc Hugh D, Koehler KM, Garry PJ. *Crosssectional age differences in body composition in person 60+ years of age*. J Gerontol Med Sci 1995; 50(6): 307-316.
- 88- Zamboni M, Armellini F, Muller D, Sorkin J, Turcato E, Andres R, Bosello O. *Methodological and clinical aspects of subcutaneous fat distribution*. In: Angel A, Anderson H, Bouchard C, Lau D, Leiter L, Mendelson R (eds). Progress in obesity research: 7. Jhon Libbey, London, Paris, Rome, 1996, pp 145-150
- 89- Enzi G, Gasparo M, Bianchetti PR, Fiore D, Semisa M, Zurlo F. *Subcutaneous and visceral fat distribution according to sex, age and overweight, evaluated by computed tomography*. Am J Clin Nutr 1986; 44: 739-746.
- 90- Borkan G, Hulth D, Gerzof S, Robbins A, Silbert C. *Age changes in body composition revealed by computed tomography*. J Gerontology 1983; 38: 673.
- 91- Kuk JL, Lee SJ, Heymsfield SB, Ross R. *Waist circumference and abdominal adipose tissue distribution: influence of age and sex*. Am J Clin Nutr 2005; 81: 1330-1334.

- 92- Dutta C. *Significance of sarcopenia in the elderly*. Am Soc Nutr Sci 1997; 992S-993S.
- 93- Roubenoff RN, Hughes VA. *Sarcopenia: current concepts*. J Gerontol 2000; 55(12): M716-M724.
- 94- Visser M, Langlois J, Guralnik JM, Cauley JA, Kronmal RA, Robbins J, Williamson JD, Harris TB. *High body fatness, but not low fat-free mass, predicts disability in older men and women: the cardiovascular Health Study*. Am J Clin Nutr. 1998; 68: 584-590.
- 95- Visser M, Kritchevsky SB, Goodpaster BH, Newmann AB, Nvitt M, Stamm E, Harris TB. *Leg muscle mass and composition in relation to lower extremity performance in men and women aged 70 to 79: the Health, Aging and Body Composition Study*. J Am Geriatr Soc 2002; 50: 897-904.
- 96- Gallagher D, Visser M, Wang Z, Harris TB, Pierson RN Jr, Heymsfield SB. *Metabolically active component of fat-free mass: influence of age, adiposity and gender*. Metabolism 1996; 45(8):992-997.
- 97- St-Onge MP, Wang J, Shen W, Wang ZM, Allison DB, Heshka S, Pierson RN Jr, Heymsfield. *Dual-energy X-ray absorptiometry measured lean soft tissue mass: different relation to body cell mass across the adult life span*. J Gerontology 2004; 59(8): 796-800.
- 98- Lexell J. *Human aging, muscle mass and fiber type composition*. J Gerontology SerA 1995; 50A: 11-16.
- 99- Sreekumaran N. *Age-related changes in muscle*. Mayo Clin Proc 2000; 75(suppl): S14-S18.
- 100- Zamboni M, Mazzali G, Fantin F, Rossi A, Di Francesco V. *Sarcopenic obesity: a new category of obesity in the elderly*. Nutr Metab Cardiovascular Dis 2008; 18: 388-395.
- 101- Oksa H, Pasternack A, Luomala M, Sirviö M: *Progression of chronic renal failure*. Nephron 1986;35:31-34.
- 102- Kirschbaum BB: *Analysis of reciprocal creatinine plots in renal failure*. Am J Med Sci 1986;29:401-404.
- 103- Coresh J, Astor BC, McQuillan G, et al. : *Calibration and random variation of the serum assay as critical elements of using equations to estimate glomerular filtration rate*. Am J Kidney Dis 2002;39: 920-929.
- 104- Gaspari F., Ferrari S, Stucchi N, Centemeri E, Carrara F, Pellegrino M, et al.: *Performance of different prediction equations for estimating renal function in Kidney transplantation*. Am J Transplant 2004; 4:1826-1835.

- 105- Hoek FJ, Kemperman FAW, Krediet RT. *A comparison between cystatin C plasma creatinine and the Cockcroft and Gault formula for the estimation of glomerular filtration rate.* Nephrol Dial Transpl 2003; 18: 2024-31.
- 106- Bland JM, Altman DG: *Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement.* Lancet 1986;i; 307-310.
- 107- Baumgartner RN, Stauber PM, McHugh D, Koehler KM et al. *Cross-sectional age differences in body composition in persons 60+ years of age.* J Gerontol Med Sci 1995; 50: 307-16.
- 108- Forbes GB. *Longitudinal change in adult fat free mass: influence of body weight.* Am J Clin Nutr 1999; 70: 1025-31.
- 109- Pollock MI, Mengelkoch LJ, Graves JE et al. *Twenty-year follow-up of aerobic power and body composition of older track athletes.* J Appl Physiol 1997; 82:1508-16.
- 110- Zamboni M, Zoico E, Scartezzini T et al. *Body composition changes in stable weight elderly subjects: the effect of sex.* Aging Clin Exp Res 2003; 15:321-7.
- 111- Filler G, Bökenkamp A, Hofmann, Le Bricon T., et al.: *Cystatin C as a marker of GFR: history, indication, and future research.* Clinical Biochemistry 2005; 38:1-8.
- 112- Macdonald, Martora S., Jibani M., Roberts G., et al.: *GFR Estimation using Cystatin C Is not independent of Body Composition.* Am J Kidney Dis 2006; 48 (5):712-19.
- 113- Keller CR, Odden MC, Fried LF et al. *Kidney function and markers of inflammation in elderly persons without chronic kidney disease: the Health Aging and Body Composition Study.* Kidney Int 2007; 71: 239-44.
- 114- Poggio ED, Wang X, Greene T, Van Lente F, Hall PM: *Performance of the modification of diet in renal disease and Cockcroft-Gault equations in the estimation of GFR in health and in chronic kidney disease.* J Am Soc Nephrol 2005;16:459-466.
- 115- Froissart M, Rossert J, Jacquot C, Paillard M, Houillier P: *Predictive performance of the modification of diet in renal disease and Cockcroft-Gault equations for estimating renal function.* J Am Soc Nephrol 2005;16: 763-773.
- 116- Rule AD, Gussak HM, Pond GR, Bergstralh EJ, Stegall MD, Cosio FG, Larson TS: *Measured and estimated GFR in healthy potential kidney donors.* Am J Kidney Dis 2004;43:112-119.
- 117- Gaspari F, Ferrari S, Stucchi N, Centemeri E, Carrara F, Pellegrino M, et al.: *Performance of different prediction equations for estimating renal function in Kidney transplantation.* Am J Transplant 2004; 4:1826-1835.

- 118- Levey AS, Greene T, Kusek JW, Beck GJ: *A simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine (abstract)*. J Am Soc Nephrol 2000;11: A0828.
- 119- Cirillo M, Anastasio P, De Santo NG: *Relation of gender, age, and body mass index to errors in predicted kidney function*. Nephrol Dial Transplant 2005; 20:1791-1798.
- 120- Donadio C, Annalisa L, Tramonti G, Bianchi C.: *Creatinine clearance predicted from body cell mass is a good indicator of renal function*. Kidney int 1997; [Suppl 63]: S166-S168.
- 121- Millward DJ. *Sufficient protein for our elders?* Am J Clin Nutr 2008; 88:1187-8.
- 122- Campbell WW, Craig AJ, McCabe JP, Carnell NS. *Dietary protein requirements of younger and older adults*. Am J Clin Nutr 2008; 88: 1322-9.
- 123- Walrand S, Short KR, Bigelow ML, Sweat AJ, Hutson SM, Nair KS. *Functional impact of high protein intake on healthy elderly people*. Am J Physiol Endocrinol Metab 2008; 295: E921-E928.
- 124- Chabi B, Ljubicic V, Menzies KJ, Huang JH, Saleem A, Hood DA *Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle*. Aging Cell. 2008 Jan;7(1):2-12.
- 125- Ryall JG, Schertzer JD, Lynch GS. *Cellular and molecular mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and weakness*. Biogerontology. 2008; 9(4):213-28.
- 126- Stevens LA, Coresh J, Feldman HI, Greene T, Lash JP, Nelson RG, Rahman M, Deysler AE, Zang Y, Schmid CH, Levey AS.: *Evaluation of the Modification of Diet in renal Disease Study equation in a large, diverse population*. J Am Soc Nephrol 2007; 18:2749-57.
- 127- Lim WH, Lim EEM, McDonald S.: *Lean body mass-adjusted Cockcroft and Gault formula improves the estimation of glomerular filtration rate in subjects with normal-range serum creatinine*. Nephrology 2006; 11: 250-6