

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE MEDICHE GENERALI E SCIENZE  
DEI SERVIZI: PROGETTO N. 1 "MEDICINA MATERNO-INFANTILE E  
DELL'ETÀ EVOLUTIVA E FISIOPATOLOGIA DELLA SVILUPPO  
SESSUALE"

Ciclo XXV

**Settore Concorsuale di afferenza:** 06/G1 Pediatria Generale, Specialistica e  
Neuropsichiatria Infantile

**Settore Scientifico disciplinare** MED/38 Pediatria Generale e Specialistica

**Valutazione della funzione renale nei nati pretermine alla nascita e a  
medio termine**

**Presentata da:** Dott.ssa SILVIA VANDINI

**Coordinatore Dottorato**

Chiar.mo Prof. NICOLA RIZZO

**Relatore**

Chiar.mo Prof. GIACOMO FALDELLA

**Esame finale anno 2013**

## **Valutazione della funzione renale nei nati pretermine alla nascita e a medio termine**

### **Renal function at birth and at 2-4 years of age in infants born prematurely**

#### **ABSTRACT**

La nascita pretermine determina un'alterazione dei normali processi di maturazione dei vari organi ed apparati che durante la gravidanza fisiologica si completano durante le 38-40 settimane di vita intrauterina. Queste alterazioni sono alla base della mortalità e morbilità perinatale che condiziona la prognosi a breve termine di questa popolazione, ma possono determinare anche sequele a medio e lungo termine.

E' stato ampiamente documentato che la nefrogenesi si completa a 36 settimane di vita intrauterina e pertanto la nascita pretermine altera il decorso fisiologico di tale processo; a questa condizione di immaturità si sovrappongono i fattori patogeni che possono determinare danno renale acuto in epoca neonatale, a cui i pretermine sono in larga misura esposti.

Queste condizioni conducono ad un rischio di alterazioni della funzione renale di entità variabile in età infantile ed adulta.

Nel presente studio è stata studiata la funzione renale in 29 bambini di 2-4 anni di età, precedentemente sottoposti a valutazione della funzione renale alla nascita durante il ricovero in Terapia Intensiva Neonatale.

I dati raccolti hanno mostrato la presenza di alterazioni maggiori (sindrome nefrosica, riduzione di eGFR) in un ridotto numero di soggetti e alterazioni minori ed isolate (proteinuria di lieve entità, riduzione del riassorbimento tubulare del fosforo, pressione arteriosa tra il 90° e il 99° percentile per sesso ed altezza).

L'età di 2-4 anni, alla luce dei risultati ottenuti, può rappresentare un momento utile per effettuare una valutazione di screening di funzione renale in una popolazione a

rischio come i pretermine, con lo scopo di individuare i soggetti che richiedano una presa in carico specialistica ed un follow-up a lungo termine.

## INDICE

INTRODUZIONE.....	5
CAPITOLO 1	
SVILUPPO RENALE NEI NEONATI PRETERMINE.....	6
1.1 NEFROGENESI E DANNO RENALE ACUTO.....	6
1.2 FATTORI CHE INTERFERISCONO CON LO SVILUPPO DELLA FUNZIONE RENALE..	7
1.2.1 IPOTENSIONE.....	7
1.2.2 PERVIETA' DEL DOTTO ARTERIOSO DI BOTALLO.....	10
1.2.3 SINDROME DA DISTRESS RESPIRATORIO.....	13
1.2.4 SEPSI.....	14
1.2.5 FARMACI.....	15
1.2.6 IPOTERMIA.....	17
1.2.7 RIDOTTA NEFROGENESI.....	17
1.3 MARCATORI DI DANNO RENALE ACUTO E FUNZIONE RENALE IN EPOCA NEONATALE.....	18
1.3.1 CRITERI CLINICI.....	18
1.3.2 MARCATORI DI DANNO RENALE.....	19
1.3.3 ECOGRAFIA ED ECOCOLORDOPPLER.....	30
CAPITOLO 2	
FUNZIONE RENALE A MEDIO E LUNGO TERMINE NEI NATI PRETERMINE.....	33
2.1 EFFETTI PERSISTENTI DELLA PREMATURITA' SULLA NEFROGENESI.....	33
2.2 STUDI DI FOLLOW-UP.....	35
CAPITOLO 3	
PARTE SPERIMENTALE.....	38
3.1 MATERIALI E METODI.....	38
3.2 RISULTATI.....	42
3.3 DISCUSSIONE.....	49
3.4 CONCLUSIONI.....	52
BIBLIOGRAFIA.....	54

## **INTRODUZIONE**

La nascita pretermine determina un'alterazione dei normali processi di maturazione dei vari organi ed apparati che durante la gravidanza fisiologica si completano durante le 38-40 settimane di vita intrauterina. Queste alterazioni sono alla base della mortalità e morbilità perinatale che condiziona la prognosi a breve termine di questa popolazione, ma possono determinare anche sequele a medio e lungo termine.

E' stato ampiamente documentato che la nefrogenesi si completa a 36 settimane di vita intrauterina e pertanto la nascita pretermine altera il decorso fisiologico di tale processo; a questa condizione di immaturità si sovrappongono i fattori patogeni che possono determinare danno renale acuto in epoca neonatale, a cui i pretermine sono in larga misura esposti.

Queste condizioni conducono ad un rischio di alterazioni della funzione renale di entità variabile in età infantile ed adulta.

L'obiettivo del presente studio è investigare la funzione renale a medio termine in una coorte di neonati  $\leq 1500$  g e/o  $< 32$  settimane precedentemente sottoposti a valutazione della funzione e dello sviluppo renale alla nascita.

## **CAPITOLO 1**

### **SVILUPPO RENALE NEI NEONATI PRETERMINE**

#### **1.1 NEFROGENESI E DANNO RENALE ACUTO**

Il neonato pretermine presenta una funzione renale immatura in quanto la nefrogenesi è un processo continuo che si completa verso le 34-36 settimane di età gestazionale; ad una situazione di base già di per se deficitaria correlata alla nascita pretermine, i neonati pretermine sono soggetti a numerosi eventi patologici e ad interventi terapeutici che possono interferire con la maturazione post-natale del rene e determinare conseguenze a breve e lungo termine.

In epoca neonatale il rene presenta una fisiologica riduzione della filtrazione glomerulare (Glomerular Filtration Rate, GFR) conseguente ad un peculiare equilibrio di fattori vasocostrittori e vasodilatatori che condizionano l'emodinamica renale<sup>1,2</sup>. E' stato infatti osservato in un modello proposto da Rhodin et al.<sup>3</sup> che la filtrazione glomerulare aumenta progressivamente all'aumentare dell'età post-concezionale fino stabilizzarsi intorno alle 48 settimane.

Tra i meccanismi vasocostrittori, il principale meccanismo che regola il mantenimento di un'adeguata GFR agisce sull'arteriola glomerulare efferente attraverso un meccanismo mediato dal sistema renina-angiotensina-aldosterone che è particolarmente attivo durante il periodo perinatale e determina un'azione vasocostrittrice mediata dall'Angiotensina II. L'altro fattore vasocostrittore che agisce sul rene neonatale è l'endotelina, che è dosabile in livelli piuttosto elevati nei neonati a termine e pretermine.

Tali meccanismi vasocostrittori agiscono durante le prime settimane di vita in equilibrio con fattori vasodilatatori: peptide atriale natriuretico, bradichinina, prostaglandine e ossido nitrico (NO).

A seconda del meccanismo patogenetico, il danno renale acuto in epoca neonatale può essere pre-renale, renale o post-renale: nell'80% dei casi è dovuto a fattori pre-renali che compromettono la perfusione del parenchima di un rene altrimenti funzionante. La concomitante riduzione di GFR che si riscontra in epoca neonatale, sufficiente per mantenere la funzione renale nella norma in condizioni fisiologiche, limita la capacità del rene di adattarsi agli stress esogeni ed endogeni che possono verificarsi dopo la nascita nel neonato pretermine.

E' stato inoltre ipotizzato da alcuni autori<sup>2</sup> che in condizioni di disfunzione renale con o senza danno parenchimale si possa verificare la cosiddetta nefropatia vasomotoria (Vasomotor Nephropathy, VMNP). Essa è determinata da patologie che interferiscono con la perfusione dei vari organi tra cui il rene e dall'alterazione dei sistemi vasoregolatori. Per esempio, l'ipotensione determina un'attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone e del sistema nervoso simpatico, l'ipossia attiva il rilascio di endotelina, peptide atriale natriuretico e prostaglandine, mentre la sepsi determina un incremento dei livelli circolanti di endotelina e NO.

Queste alterazioni della regolazione vasomotoria e della perfusione renale sono spesso reversibili e si risolvono con il trattamento delle patologie concomitanti e la sospensione dei trattamenti nefrotossici. Tuttavia se tali alterazioni persistono per un periodo protratto il danno renale può diventare permanente e determinare sequele a medio e lungo termine.

## **1.2 FATTORI CHE INTERFERISCONO CON LO SVILUPPO DELLA FUNZIONE RENALE**

### **1.2.1 IPOTENSIONE**

Il neonato pretermine presenta un rischio elevato di ipotensione e bassa portata sistemica conseguente alla disfunzione dei processi che nel neonato a termine regolano l'emodinamica dopo il passaggio dall'ambiente intrauterino a quello

extrauterino. E' stato infatti osservato che nel 16-98% dei casi i neonati pretermine necessitano di terapia con inotropi durante le prime settimane di vita<sup>4,5</sup>.

L'ipotensione si riscontra più frequentemente nei primi giorni di vita; tra i fattori di rischio sono stati osservati la terapia steroidea materna, la ventilazione meccanica con pressioni elevate e la presenza di dotto di Botallo emodinamicamente significativo.

Subito dopo la nascita si verifica infatti tramite il forame ovale e il dotto di Botallo un ampio shunt prevalentemente sinistro-destro che incrementa il flusso ematico polmonare: tale iperafflusso polmonare può portare ad aumento del fabbisogno di ossigeno e riduzione della portata sistemica. Il miocardio del neonato pretermine, che presenta minor numero di mitocondri e quindi minori riserve energetiche, non riesce ad incrementare adeguatamente la propria funzione. Inoltre la funzione miocardica può essere ulteriormente compromessa da fattori esogeni come la ventilazione a pressione positiva e l'incremento del post-carico mediato da farmaci che incrementano le resistenze vascolari periferiche; questi fattori riducono ulteriormente la portata sistemica in un'epoca in cui il neonato è particolarmente sensibile all'ipossia. Infatti il rilascio di ossigeno ai vari organi dipende sia dal contenuto di ossigeno del sangue che dal flusso ematico, per cui l'ossigenazione dei vari organi ed apparati è compromessa sia in condizioni di bassa pressione, sia in condizioni in cui la pressione e quindi il flusso ematico agli organi è conservato, ma è presente una condizione di ipossia.

Per questo motivo la pressione arteriosa non rappresenta l'unico parametro utile per il monitoraggio dell'emodinamica neonatale e per l'adeguata gestione di eventuali terapie mirate a prevenire eventuali danni d'organo precoci. Tuttavia è un parametro che deve comunque essere monitorato quotidianamente nei neonati pretermine ed utilizzato insieme ad altri parametri nell'inquadramento generale del paziente critico.

Infatti la pressione arteriosa non può essere equiparata al flusso ematico sistemico, in quanto essa dipende, oltre che dalla portata sistemica, anche dalle resistenze vascolari periferiche. Pertanto il riscontro di una pressione arteriosa "normale" non esclude la



presenza di eventuale riduzione della perfusione sistemica ed il conseguente rischio di danno d'organo. Viceversa, esistono casi in cui il neonato presenta ipotensione con perfusione sistemica conservata, in cui è controverso se sia da preferire il ricorso alla terapia con isotropi o monitorare il neonato durante tale condizione di "ipotensione permissiva" senza ricorrere all'uso di farmaci vasomotori<sup>5</sup>.

La misurazione della pressione arteriosa viene effettuata nelle Terapie Intensive Neonatali con metodiche non invasive; i valori misurati sono comunemente interpretati secondo due diverse definizioni di ipotensione:

- Pressione arteriosa media  $< 30$  mmHg in neonati estremamente pretermine indipendentemente dall'età gestazionale<sup>6</sup>;
- Pressione arteriosa media  $<$  età gestazionale che correla approssimativamente con il 10° percentile per tale età gestazionale<sup>7</sup>. Tale definizione è stata approvata anche dalla British Association of Perinatal Medicine<sup>8</sup>.

In caso di ipotensione con compromissione della perfusione d'organo è opportuno sottoporre il neonato pretermine ad infusione di inotropi; i farmaci più comunemente utilizzati sono la dopamina e la dobutamina.

La dopamina agisce su recettori  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  e dopaminergici, mentre non determina vasodilatazione  $\beta_2$  mediata. L'effetto a livello miocardico  $\beta_1$ -mediato è 30-40 volte meno potente rispetto a quello di adrenalina e noradrenalina. Pertanto l'effetto principale è l'aumento delle resistenze vascolari periferiche mediato dai recettori  $\alpha_1$ , mentre non è dimostrabile che l'utilizzo di dopamina a basso dosaggio eserciti un effetto vasodilatatore selettivo a livello dei vasi renali per azione sui recettori dopaminergici; tale ipotesi infatti è confermata da studi effettuati su modelli animali, ma è tuttora controverso se possa essere applicata nella specie umana ed in particolare nel neonato.

### 1.2.2 PERVIETA' DEL DOTTO ARTERIOSO DI BOTALLO

Il dotto arterioso di Botallo mette in comunicazione l'arteria polmonare e l'aorta durante la vita fetale; dopo la nascita si realizza una progressiva caduta delle resistenze polmonari mediata dall'aumento della concentrazione di ossigeno e dalla diminuzione delle prostaglandine ad azione vasodilatatrice. In queste condizioni fisiologiche si osserva una chiusura spontanea del dotto entro le prime 48-72 ore di vita.

Nel neonato pretermine è molto frequente la pervietà del dotto di Botallo (PDA), conseguente alle peculiari caratteristiche anatomiche e fisiologiche del prematuro, quali una ridotta sensibilità all'azione vasocostrittrice dell'ossigeno arterioso e ad una prevalenza dell'attività rilassante mediata dalle prostaglandine, parzialmente riconducibile ad un'aumentata produzione di PGE<sub>2</sub> o ad una diminuita degradazione a livello polmonare.

L'incidenza di PDA è maggiore quanto minori sono il peso alla nascita e l'età gestazionale. Inoltre la pervietà del dotto dipende anche dalla presenza e dalla gravità del concomitante distress respiratorio. Infatti in caso di malattia polmonare severa si verifica un incremento delle prostaciline che giocano un ruolo importante per il mantenimento della pervietà del dotto.

In presenza di un dotto pervio dopo la nascita, quando le resistenze polmonari cadono al di sotto di quelle sistemiche, viene a svilupparsi attraverso il dotto stesso un flusso di sangue dall'aorta all'arteria polmonare, cioè uno shunt sinistro-destro che, in presenza di resistenze polmonari normali, è uno shunt continuo sisto-diastolico che determina un iperafflusso polmonare e un sovraccarico di volume a carico del cuore sinistro; tale situazione può evolvere verso un quadro di scompenso cardiaco sinistro con conseguente ridotto flusso ematico agli organi (encefalo, intestino, miocardio, reni) e ridotto trasporto di ossigeno ai tessuti.

Le conseguenze fisiopatologiche di uno shunt sinistro-destro a livello del dotto arterioso dipendono dall'entità dello shunt stesso e dalla capacità del neonato di compensare il sovraccarico di volume<sup>9</sup>.

I fattori principali che controllano l'entità dello shunt sinistro-destro in presenza di un dotto pervio sono tre: il diametro del dotto, la differenza di pressione tra l'aorta e l'arteria polmonare e le resistenze vascolari polmonare e sistemica.

Dopo la nascita le resistenze vascolari sistemiche sono alte, mentre quelle polmonari diminuiscono con l'inizio della ventilazione e la pressione arteriosa sistemica risulta è più alta rispetto a quella del circolo polmonare.

Nelle prime 12 ore di vita si osserva un pattern di tipo bidirezionale, destro-sinistro in sistole e sinistro-destro in diastole. Questo pattern è dovuto alle alte resistenze vascolari polmonari delle prime ore di vita. Nelle ore successive, fisiologicamente, le resistenze diminuiscono e lo shunt diventa sinistro-destro continuo ad alta velocità, assumendo le caratteristiche definite pattern restrittivo.

Se il dotto invece resta ampio mentre le resistenze polmonari decrescono, lo shunt inizialmente rimane bidirezionale, piccolo destro-sinistro e ampio sinistro-destro ("growing pattern") per poi trasformarsi in shunt puro sinistro-destro pulsatile, cioè maggiore in sistole e minore in diastole, dovuto al progressivo equilibrarsi di pressione aortica e polmonare conseguente al furto duttale; questo tipo di pattern è sempre patologico e legato ad uno shunt emodinamicamente significativo.

Le dimensioni del dotto sono un indicatore della significatività emodinamica del dotto: se il diametro del colletto del dotto risulta maggiore di 1,4mm/Kg a 19 ore di vita, è correlato a sintomatologia clinica con una sensibilità dell'81% ed una specificità dell'85%<sup>12</sup>. Inoltre la significatività emodinamica del dotto è espressa anche dalla dilatazione dell'atrio e del ventricolo sinistro. La dilatazione dell'atrio sinistro può essere semi-quantificata comparando il suo diametro con il diametro dell'arco aortico che invece non si modifica. E' considerato normale un rapporto che

varia tra 0.86/1 e 1.3/1 e lo ritiene indicativo della presenza di dotto arterioso pervio quando diventa  $> 1.3/1.4$ <sup>10</sup>.

Le modificazioni emodinamiche conseguenti al PDA sono dovute sostanzialmente a due fattori patogenetici: l'iperafflusso polmonare e la caduta delle resistenze del circolo polmonare con conseguente riduzione della perfusione sistemica.

L'iperafflusso polmonare può determinare peggioramento della funzionalità polmonare aumentando il rischio di complicanze respiratorie come la displasia broncopolmonare.

La riduzione della perfusione sistemica può determinare complicanze come l'enterocolite necrotizzante, l'insufficienza renale e l'emorragia intraventricolare.

La terapia del PDA è in prima istanza farmacologica; essa viene attuata con farmaci antinfiammatori non steroidei (indometacina e ibuprofene) che inibiscono la sintesi di prostaglandine e dei trombossani che tramite la loro azione vasodilatante mantengono la pervietà del dotto.

Tali farmaci presentano una dimostrata parità di efficacia nella chiusura del dotto arterioso; tuttavia numerosi studi comparativi hanno dimostrato una maggior sicurezza dell'utilizzo di Ibuprofene per la minor incidenza di effetti collaterali, in particolare a livello renale<sup>11</sup>.

L'ibuprofene pertanto è attualmente più utilizzato rispetto all'indometacina per la chiusura farmacologica del dotto di Botallo; tuttavia, avendo lo stesso meccanismo d'azione, presenta lo stesso tipo di effetti collaterali e quindi le stesse controindicazioni<sup>12,13</sup>.

In base all'epoca di inizio della terapia per la chiusura del dotto di Botallo la terapia può essere sintomatica, profilattica o pre-sintomatica.

La terapia sintomatica viene effettuata quando il dotto risulta già emodinamicamente significativo e si osservano i segni di tali alterazioni emodinamiche (soffio, tachicardia, aumento delle pressioni differenziali, ipotensione).

La terapia profilattica viene invece effettuata nelle prime 24 ore di vita, indipendentemente dalla presenza di sintomatologia specifica, ed è utilizzata

prevalentemente nei neonati estremamente prematuri dipendenti dalla ventilazione meccanica<sup>14</sup>.

La terapia pre-sintomatica è l'approccio attualmente preferito in molti centri ed è invece mirato a trovare un equilibrio tra i due livelli di terapia precedentemente descritti.

In caso di controindicazioni o mancata efficacia della terapia farmacologica, è possibile ricorrere alla legatura chirurgica del dotto di Botallo<sup>15</sup>.

Lo sviluppo di danno renale acuto in presenza di PDA nei neonati pretermine è dovuto sia alla patologia stessa che al suo trattamento.

Il dotto pervio può infatti determinare una condizione di ipovolemia relativa che a sua volta può essere causa di ipoperfusione e quindi di danno renale<sup>16,17</sup>. L'ipoperfusione renale così determinata provoca un incremento nella sintesi di prostaglandine vasodilatatrici nel tentativo di compensare gli effetti emodinamici del dotto. In questa condizione la somministrazione dei FANS riduce questo effetto di vasodilatazione e può quindi peggiorare temporaneamente la perfusione renale.

Pertanto attualmente sono in corso studi che hanno lo scopo di ridurre gli eventi avversi connessi alla somministrazione di ibuprofene ed indometacina attraverso l'aggiustamento dello schema di dosaggio sulla base di criteri clinici e laboratoristici dei diversi pazienti<sup>18</sup>.

### 1.2.3 SINDROME DA DISTRESS RESPIRATORIO

La sindrome da distress respiratorio costituisce una delle patologie più frequenti nel neonato pretermine, con una maggior frequenza nei soggetti di minor peso alla nascita (PN) ed età gestazionale (EG). Alla base di tale condizione è la ridotta sintesi di surfactante da parte degli pneumociti di tipo 2; il surfactante è la molecola costituita da fosfolipidi e lipoproteine che determina la normale compliance degli alveoli. La carenza di surfactante determina pertanto un aumento della compliance e quindi del lavoro respiratorio necessario per garantire la funzione alveolare.

L'aumento del lavoro respiratorio causa tachipnea ed impegno dei muscoli respiratori accessori; se il deficit di surfactante non viene corretto con la somministrazione di surfactante per via endotracheale il distress si complica con atelettasia, acidosi ed ipossiemia di grado variabile.

L'ipossiemia severa determina riduzione del flusso plasmatico renale (FPR), che può essere ulteriormente ridotto per effetto della vasocostrizione mediata dall'ipercapnia.

Le modalità di assistenza respiratoria utilizzate per il trattamento del distress possono determinare ulteriori effetti sull'emodinamica renale e sulla velocità di filtrazione glomerulare (VFG) in quanto possono causare riduzione del ritorno venoso e dell'output cardiaco attraverso l'aumento della pressione intratoracica, l'attivazione del sistema nervoso simpatico e l'incremento della secrezione di vasopressina.

Questi effetti sull'emodinamica e sulla funzione renale sono ovviamente correlati alla severità ed alla durata del distress respiratorio<sup>19,20</sup>.

#### 1.2.4 SEPSI

La sepsi rappresenta una delle complicanze più severe per il neonato pretermine; l'insorgenza può essere precoce, se si verifica nei primi giorni di vita in seguito alla trasmissione di un'infezione dalla madre al feto/neonato durante la gravidanza o al momento del parto, oppure tardiva, se si verifica dopo la prima settimana di vita (infezione nosocomiale) e si associa spesso alla presenza di cateteri venosi centrali o tubi endotracheali.

La sepsi può provocare ipotensione per l'effetto vasodilatatore di diversi mediatori rilasciati durante la risposta all'infezione da parte dell'organismo (citochine, callicreina, trombossano). L'ipotensione sistemica determina a sua volta compromissione della perfusione dei diversi organi ed apparati tra cui il rene.

Inoltre la terapia eziologica della sepsi si basa sulla somministrazione di farmaci antibatterici ed antimicotici che possono avere azione nefrotossica e quindi complicare il danno renale provocato dall'ipotensione e dall'ipoperfusione<sup>4,5</sup>.

### 1.2.5 FARMACI

L'esposizione a farmaci potenzialmente nefrotossici come alcuni agenti antinfettivi e i farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) a cui i neonati pretermine possono essere sottoposti in utero o in epoca neonatale può determinare un'azione dannosa sul rene.

La nefrotossicità da farmaci può essere mediata da vari meccanismi: vasocostrizione dei vasi intrarenali, necrosi tubulare acuta, nefrite interstiziale acuta e, più raramente, ostruzione tubulare. Inoltre il danno renale acuto può essere provocato indirettamente tramite rabdomiolisi<sup>21,22</sup>.

I FANS (indometacina e ibuprofene) sono comunemente usati per la chiusura farmacologica del dotto di Botallo nel neonato pretermine, attraverso un meccanismo mediato da inibizione della produzione degli endoperossidi e delle prostaglandine, che, attraverso l'azione vasodilatatrice, determinerebbero il mantenimento della pervietà del dotto.

L'indometacina può determinare una transitoria insufficienza renale a causa della riduzione delle prostaglandine, agiscono a livello renale determinando una vasodilatazione mediata dall'inibizione della vasopressina.

Alcuni autori hanno dimostrato che tale condizione di insufficienza renale è transitoria e la clearance della creatinina ritorna a valori normali nonostante il prolungamento della terapia fino a una settimana e la persistente inibizione delle prostaglandine<sup>12</sup>.

Per questo motivo, tra le controindicazioni all'utilizzo dell'indometacina nei neonati pretermine con PDA sono incluse le alterazioni degli indici di funzionalità renale: azoto ureico > 40mg/dl o creatininemia  $\geq 2,0$  mg/dl.

L'ibuprofene è un altro FANS che presenta la stessa efficacia dell'indometacina nella chiusura del dotto arterioso.

Per quanto riguarda gli effetti collaterali, è stato osservato che l'ibuprofene determina un minore decremento del flusso ematico cerebrale e renale, determinando con

minore frequenza oliguria e aumento della creatininemia. Tale differenza è attribuibile alla maggiore azione inibitoria dell'indometacina sulla cicloossigenasi 1 (COX1), che è coinvolta nella regolazione del flusso ematico renale, cerebrale e gastrointestinale<sup>22,13</sup>.

Per questo motivo nella maggior parte delle Terapie Intensive Neonatali l'ibuprofene rappresenta il farmaco di prima scelta per il trattamento del PDA nel pretermine.

Anche gli agenti antifettivi costituiscono una categoria di farmaci aventi potenziali effetti nefrotossici.

Gli aminoglicosidi (amikacina) e la vancomicina sono potenzialmente nefrotossici e la loro associazione potenzia tale nefrotossicità. Uno studio effettuato su una popolazione di extremely low birth weight (ELBW) infants (<1000 g) ha evidenziato in tutti soggetti trattati perdita renale di potassio, fosfato e calcio, e in alcuni casi ipofosfatemia ed un transitorio rialzo della creatinina sierica. Tali alterazioni hanno presentato risoluzione completa dopo 1-2 settimane dalla sospensione della terapia<sup>24</sup>.

Si può osservare un effetto nefrotossico anche con gli antibiotici beta-lattamici e derivati. Le cefalosporine di terza generazione sono tuttavia frequentemente utilizzate in età neonatale e sono ben tollerate per quanto concerne gli effetti renali<sup>22</sup>.

Inoltre i neonati pretermine, in particolare se sottoposti a lungo a ventilazione meccanica o a cateterizzazione venosa centrale, presentano un aumentato rischio di infezioni fungine sistemiche. Il principale agente antifungino utilizzato in questa popolazione è l'amfotericina B.

Tale farmaco tuttavia presenta frequentemente nefrotossicità, a causa della sua interazione con il colesterolo presente in elevata quantità a livello delle cellule tubulari renali e della sua azione vasocostrittrice che riduce il flusso renale; tali effetti possono essere attenuati utilizzando il farmaco in forma liposomiale (amfotericina B liposomiale), che ha mostrato minore tossicità a livello renale e minore incidenza di squilibri elettrolitici come l'ipopotassiemia<sup>25,26</sup>.



### 1.2.6 IPOTERMIA

Studi effettuati su animali hanno mostrato che la riduzione di grado moderato della temperatura corporea provoca vasocostrizione renale con conseguente rapido decremento della GFR. Pertanto si può ipotizzare che il mantenimento di un'adeguata temperatura corporea nel neonato sia necessario per il mantenimento della funzione renale<sup>2</sup>.

### 1.2.7 RIDOTTA NEFROGENESI

La maturazione del rene si realizza attraverso il complesso processo della nefrogenesi, che è controllato da fattori genetici ed ambientali a partire dal periodo preconcezionale fino alla 36° settimana di EG. Il numero totale di nefroni nell'uomo è mediamente 1 milione per rene, con una variabilità da 200.000 a oltre 2 milioni.

La riduzione del numero di nefroni può alterare la funzione renale in modo permanente e condurre allo sviluppo di ipertensione e, in alcune casistiche, allo sviluppo a distanza di patologie cardiovascolari e renali. Le dimensioni del rene e il numero di nefroni sono direttamente proporzionali al peso alla nascita; è stato osservato inoltre che soggetti nati pretermine o con ritardo di crescita intrauterino hanno maggior rischio di sviluppare patologie renali in età adulta<sup>27,28,29</sup>.

Vista la complessità del processo di nefrogenesi, è controverso se un ridotto numero di nefroni sia la sola conseguenza di alterazioni della circolazione materno-fetale; tuttavia è probabile che un ambiente intrauterino sfavorevole possa condurre ad alterazioni funzionali e strutturali tra cui alterata regolazione del sodio, potassio e cloro o attivazione aumentata del sistema renina-angiotensina-aldosterone e di altri sistemi vasoregolatori che possono influire sulla funzione renale a lungo termine.

## 1.3 MARCATORI DI DANNO RENALE ACUTO E FUNZIONE RENALE IN EPOCA NEONATALE

### 1.3.1 CRITERI CLINICI

La definizione di danno renale acuto (Acute Kidney Injury, AKI) è tuttora controversa; esistono infatti più di 30 definizioni, che rendono difficile la comparazione dei diversi studi.

Per ovviare a questa disomogeneità, è stata proposta dall'Acute Dialysis Qualitative Initiative Group un nuovo sistema di classificazione denominato RIFLE<sup>30</sup> (Bellomo et al., 2004).

L'acronimo (Risk for renal dysfunction, Injury to the kidney, Failure of the kidney function, Loss of the kidney function and End stage renal disease) ha lo scopo di stratificare i pazienti alla luce delle variazioni della creatininemia e alle modificazioni della diuresi.

Dai criteri proposti per la popolazione adulta sono stati ottenuti successivamente i criteri modificati che possono essere applicati alla popolazione pediatrica (pRIFLE); i criteri sono schematizzati nella tabella sottostante<sup>31</sup>.

	Estimated CCl	Urine output
Risk	eCCl decrease by 25%	<0.5 ml/kg/h for 8 h
Injury	eCCl decrease by 50%	<0.5 ml/kg/h for 16 h
Failure	eCCl decrease by 75% or eCCl <35 ml/min/1.73 m <sup>2</sup>	<0.3 ml/kg/h for 24 h or anuric for 12 h
Loss	Persistent failure >4 weeks	
End stage	End-stage renal disease (persistent failure >3 months)	

Tali criteri sono stati applicati in studi effettuati su pazienti ricoverati in reparti di Terapia Intensiva Pediatrica, utilizzando pertanto un campione di età variabile e quindi non applicabile in una popolazione peculiare come i neonati pretermine.

Considerando gli studi effettuati sui VLBW<sup>32,33,34,35</sup> si osserva che parametro clinico indicativo di danno renale maggiormente utilizzato è la diuresi < 1 ml/Kg/h. Tuttavia tale parametro risulta condizionato non soltanto dalla funzione renale, ma anche dallo stato di idratazione, dall'apporto quotidiano di liquidi, dalla volemia e da eventuali terapie concomitanti.

Inoltre in circa 1/3 dei casi di insufficienza renale acuta in epoca neonatale, in particolare in caso di asfissia, il quadro clinico è caratterizzato da diuresi normale e pertanto non valutabile con questo parametro<sup>36</sup>. Pertanto la valutazione quotidiana della diuresi deve essere integrata con altri marcatori di funzione renale.

### 1.3.2 MARCATORI DI DANNO RENALE

#### AZOTEMIA E CREATININA

Il marker laboratoristico più comunemente usato per la diagnosi del danno renale acuto nei pretermine è la creatinina sierica.

Gli studi effettuati su popolazioni di pretermine hanno identificato come cut-off per il danno renale acuto valori di creatinina plasmatica variabili da 1.2 a 1.6 mg/dl.

Tuttavia i valori di creatinina sono influenzati anche dall'età, dal sesso, dalla massa e dal metabolismo muscolare e dallo stato di idratazione.

Inoltre la creatinina sierica non aumenta fino a quando più del 50% della funzione renale è compromessa, mentre durante le modificazioni acute del filtrato glomerulare la creatininemia non è un indicatore accurato della funzione renale.

Nel neonato pretermine la creatinina sierica è un marcatore poco sensibile e specifico di danno renale, anche a causa dell'andamento peculiare che presenta dopo la nascita pretermine. E' stato infatti osservato in uno studio effettuato su neonati pretermine<sup>37</sup> che la creatinina sierica presenta un incremento durante le prime 48 ore di vita e che il valore massimo raggiunto è inversamente proporzionale al peso e all'età gestazionale. Successivamente si osserva un decremento dei livelli sierici di

creatinina che si verifica più tardivamente rispetto ai neonati a termine. E' stato ipotizzato che valori elevati di creatinina alla nascita siano dovuti ad elevati valori di creatinina materna e alla scarsa capacità del rene del neonato di eliminare il carico di creatinina di origine materna.

Non è stata riscontrata nessuna correlazione tra l'entità del picco di creatinina sierica e il punteggio di Apgar; è stato invece osservato un certo grado di correlazione con il Clinical Risk Index for Babies (CRIB) score.

La creatinina plasmatica riflette l'equilibrio tra la creatina muscolare e la clearance renale che avviene per filtrazione glomerulare. E' stato ipotizzato che l'aumento dei livelli sierici di creatinina nel neonato sia dovuto alla ridotta clearance causata dalla ridotta velocità di filtrazione glomerulare (GFR) e dal riassorbimento tubulare della creatinina.

Infatti è stato dimostrato<sup>38</sup> che la GFR aumenta progressivamente con l'età post-concezionale ed è più bassa nell'immediato periodo post-natale; inoltre la filtrazione glomerulare può essere in parte compromessa dalla presenza di distress respiratorio e dalla concomitante ventilazione meccanica che determinano le modificazioni emodinamiche sul rene precedentemente prescritte.

Il conseguimento di una progressiva normalizzazione della GFR risulta ritardato nel neonato pretermine in quanto la nefrogenesi raggiunge il completamento verso la 34°-36° settimana di età post-concezionale e possono essere presenti i fattori che interferiscono con lo sviluppo e la maturazione renale.

E' stato anche osservato in studi effettuati su modelli animali<sup>39</sup> che la creatinina non viene completamente escreta tramite la filtrazione glomerulare, ma si osserva un parziale riassorbimento a livello dei tubuli renali immaturi in epoca neonatale che tende progressivamente a scomparire nelle età successive.

Tale andamento è stato osservato in un gruppo di neonati pretermine<sup>40</sup> in assenza di segni clinici di danno renale.

Viste queste peculiari caratteristiche dei meccanismi di eliminazione della creatinina durante le prime settimane di vita del neonato pretermine, essa non può essere utilizzata come marcatore isolato di danno renale, sebbene possa essere utile nella gestione del bilancio idroelettrolitico e nella prescrizione delle terapie farmacologiche nei primi giorni di vita.

E' stato inoltre effettuato uno studio<sup>41</sup> per valutare la funzione renale in 83 neonati di EG  $\leq$  32 settimane in cui non sono state riscontrate differenze nei valori di creatinina sierica alla nascita nelle diverse fasce di EG, mentre durante la prima settimana di vita sono stati riscontrati valori significativamente maggiori nei soggetti con EG inferiori.

Il valore della creatinina sierica viene comunemente utilizzato nella pratica clinica per stimare la velocità di filtrazione glomerulare attraverso formule matematiche (estimated Glomerular Filtration Rate, eGFR).

La GFR (eGFR) stimata viene comunemente calcolata in età pediatrica con la formula di Schwartz<sup>42</sup>, utilizzando come costante 0,4 per i neonati pretermine e 0,45 per i neonati a termine:

$$GFR = \text{lunghezza}(cm) \times k / \text{creatinina sierica}.$$

E' stato osservato che eGFR presenta un progressivo incremento in tutti i neonati a partire dalla prima settimana di vita. La correlazione tra EG e GFR può essere spiegata con l'incremento progressivo del flusso plasmatico renale sostenuto dal parallelo aumento della pressione arteriosa sistemica e dalla riduzione delle resistenze vascolari renali, con il progressivo miglioramento della perfusione renale e con l'aumento numero di nefroni e della loro capacità di filtrazione.

L'azotemia presenta invece un andamento più variabile e presenta una correlazione meno chiara con la maturazione della funzione renale nel neonato<sup>37</sup>; inoltre è maggiormente influenzata dallo stato di idratazione, dallo stato catabolico e dall'apporto proteico. Per questo motivo è poco usata per il monitoraggio della

funzione renale del neonato pretermine e per individuare la presenza di un danno renale acuto.

Per tutti i motivi sopradescritti la creatinina non si può considerare un marcatore adeguato per la diagnosi di danno renale acuto; pertanto negli ultimi anni una grande attenzione è stata rivolta all'individuazione di marcatori precoci della funzione renale.

E' stato ipotizzato che questi biomarker possano essere utili anche per altri scopi<sup>43</sup>:

- identificare la sede del danno (tubulo prossimale, tubulo distale, interstizio, vasi);
- classificare dal punto di vista patogenetico il danno renale acuto (pre-renale, renale, post-renale);
- individuare l'eziologia del danno renale;
- predire l'outcome (durata e severità del danno renale, necessità di dialisi, durata dell'ospedalizzazione, mortalità).

I biomarkers più promettenti al momento attuale sono NGAL plasmatici e urinario, KIM- 1 urinario, Cistatina C plasmatica, IL-18 urinaria.

Nella tabella sottostante sono descritte le sensibilità dei diversi marcatori in differenti situazioni cliniche.

Biomarker Name	Sample Source	Cardiopulmonary Bypass (CPB)	Contrast Nephropathy	Sepsis or ICU Setting	Kidney Transplant (tx)
NGAL	Urine	2 hrs post-CPB	4 hrs postcontrast	48 hrs before AKI	12-24 hrs post-tx
IL-18	Urine	4-6 hrs post-CPB	Not tested	48 hrs before AKI	12-24 hrs post-tx
KIM-1	Urine	12-24 hrs post-CPB	Not tested	Not tested	Not tested
NGAL	Plasma	2 hrs post-CPB	2 hrs postcontrast	48 hrs before AKI	Not tested
Cystatin C	Plasma	12 hrs post-CPB <sup>b</sup>	8 hrs postcontrast	48 hrs before AKI	Variable

## NGAL

E' una proteina di peso molecolare di 25 KDa legata covalentemente alla gelatinasi dai neutrofili, che agisce come trasportatore del ferro nei vari tessuti<sup>44</sup>.

NGAL si trova in 2 distinti compartimenti: il pool sistemico e il pool renale. Nel pool sistemico NGAL è normalmente espressa a concentrazioni molto basse in diversi organi, nei neutrofili e nei macrofagi. L'espressione di NGAL è indotta da infezioni, infiammazione, ischemia e trasformazione neoplastica, che ne possono determinare un incremento.

L'espressione di NGAL risulta aumentata in corso di infezioni batteriche; tale aumento è probabilmente indotto in virtù della probabile azione batteriostatica che NGAL esercita interferendo con i meccanismi di trasporto del ferro necessari per la proliferazione batterica.

NGAL sierica è sottoposto a riassorbimento tubulare mediato dalla megalina; perciò una quota molto bassa (0,1-0,2%) è escreta nelle urine; questo meccanismo determina una scarsa interdipendenza tra pool plasmatico e pool renale.

NGAL urinario, che è rappresentativo del pool renale, è costituito da NGAL prodotto dalle cellule del tubulo renale e non filtrato.

E' stato osservato in modelli animali<sup>44,45</sup> che NGAL è prodotto dalle cellule del segmento sottile del tratto discendente dell'ansa di Henle e dei dotti collettori. In questo caso è stato ipotizzato che la sintesi di NGAL venga indotta in risposta ad un insulto ischemico in quanto, regolando il trasporto del ferro a livello del tubulo prossimale, potrebbe inibire l'apoptosi e quindi esercitare un ruolo protettivo.

E' stata inoltre formulata l'ipotesi che NGAL sintetizzato dalle cellule del tubulo prossimale sia soggetto a filtrazione glomerulare in virtù del basso peso molecolare e successivamente sia riassorbito a livello tubulare per endocitosi e concorra a formare il pool sierico di NGAL, mentre la quota prodotta a livello del tubulo distale sia escreta pressoché completamente a livello urinario.

E' stato osservato inoltre che NGAL riveste un ruolo importante nello sviluppo del rene: in studi effettuati su animali<sup>46,47</sup> è espresso a livello della gemma ureterica.

Inoltre attraverso il legame con il ferro promuove la trasformazione delle cellule mesenchimali in cellule epiteliali tubulari, esercitando un effetto promigratorio e inducendo la ramificazione delle cellule.

Numerosi studi hanno evidenziato che NGAL plasmatico ed urinario è un marcatore predittivo precoce di danno renale acuto in seguito ad interventi chirurgici come bypass cardiopolmonare<sup>48</sup>, trapianto renale<sup>49</sup>, nefropatia causata da somministrazione di mezzo di contrasto<sup>50</sup>, nefrite in corso di lupus eritematoso sistemico<sup>51</sup> e patologia renale cronica<sup>52</sup>.

Nella popolazione pediatrica, uno studio prospettico<sup>53</sup> è stato eseguito in un reparto di Terapia Intensiva Pediatrica su 140 pazienti di età compresa tra 1 mese e 21 anni determinando quotidianamente i livelli urinari di NGAL (uNGAL) e correlandoli con i livelli sierici di creatinina e con l'eventuale presenza di danno renale acuto quantificato con i criteri pRIFLE.

E' stato osservato che i livelli di uNGAL presentano un rialzo circa 48 ore prima che la creatinina sierica aumenti del 50%, risultando quindi un marker predittivo di danno renale in fase più precoce di quanto sia determinato dai marcatori "tradizionali", mentre è risultato meno utile per predire il decorso e la durata del danno renale.

In pazienti con sepsi, il rialzo dei valori urinari di NGAL è risultato maggiore, pur conservando il rapporto proporzionale con la gravità dell'insulto renale espresso con i criteri pRIFLE.

Inoltre in tale studio non è stato possibile valutare se l'andamento dei valori urinari di NGAL possa essere influenzato anche dall'eziologia sottostante al danno renale e pertanto possa essere utilizzato come marker in caso di danno renale da specifici agenti causali.

Sulla popolazione neonatale è stato eseguito uno studio prospettico<sup>32</sup>, effettuato su una popolazione di 20 neonati prematuri VLBW suddivisi in 4 fasce di peso alla nascita (<750 g, 751-1000 g, 1001-1250 g, 1251-1500 g) in cui NGAL è stato dosato su campioni di urine. E' stato osservato che NGAL urinario correla negativamente



con PN, in quanto nelle 2 fasce di PN inferiori i valori misurati sono significativamente maggiori rispetto a quelle di PN superiori. Visto il numero di pazienti arruolati, non è stato possibile determinare se i valori elevati di NGAL urinario siano condizionati da fattori di rischio per danno renale come a sepsi, PDA ed esposizione a farmaci nefrotossici.

E' stato inoltre valutata la possibile correlazione tra tale marcatore e il riscontro di oliguria o di creatinina sierica  $> 1,2$  mg/dl: è stato osservato che NGAL  $> 1$  deviazione standard (SD) rispetto alla media correla con oliguria con sensibilità 31% e specificità 90%, e con l'aumento della creatinina con sensibilità 29% e specificità 88%. Sono stati ipotizzati diversi fattori che possono spiegare tale riscontro di scarsa sensibilità, tra cui l'estrema variabilità dei valori di tale marcatore nei neonati pretermine e la limitata validità dei parametri oliguria e creatinina sierica per la diagnosi di danno renale in tale popolazione.

Un altro studio<sup>54,55</sup> ha determinato i valori urinari di NGAL su 50 neonati VLBW con decorso clinico non complicato e privo di fattori di rischio di danno renale per individuare i possibili valori di riferimento da utilizzare in questa categoria di pazienti che non possono essere confrontati con le altre casistiche di pazienti adulti o pediatrici. Il decorso clinico non complicato è stato definito con l'assenza delle seguenti condizioni: terapia materna in epoca prenatale con indometacina o ACE-inibitori; asfissia perinatale definita con EB  $> -10$  mmol/l nelle prime 12 ore di vita; emorragia intraventricolare (IVH) di III-IV grado; FiO<sub>2</sub>  $\geq 50\%$  nelle prime 48 ore di vita o necessità di ventilazione meccanica; sepsi diagnosticata clinicamente (sintomi clinici e terapia antibiotica per un periodo  $\geq 5$  giorni) o infezione documentata da esami colturali positivi (sangue, liquor, urine); enterocolite necrotizzante (diagnosticata con riscontro radiologico di pneumatosi intestinale); terapia con ibuprofene, indometacina o amfotericina B; interventi chirurgici; danno renale (nei neonati di EG  $\geq 27$  settimane, un aumento prolungato [48 ore] della creatinina sierica  $\geq 0,3$  mg/dl; nei neonati  $< 27$  settimane un aumento della creatinina sierica  $> 0,3$  nei

primi 4 giorni di vita o un aumento prolungato [48 ore] della creatinina sierica  $\geq 0,3$  mg/dl a partire dalla 5° giornata di vita); pervietà del dotto arterioso di Botallo che necessita di terapia.

In tale popolazione sono stati evidenziati mediana, 25°, 75° e 95° percentile e range rispettivamente 5 ng/ml, 2 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml e 2-150 ng/ml. Tali valori sono confrontabili i valori di riferimento ottenuti in altri studi su popolazioni pediatriche e su adulti. Tuttavia i criteri di inclusione non hanno compreso neonati con EG < 26 settimane o PN  $\leq 750$  g, per cui tali valori non possono essere applicati in queste fasce di PN ed EG, che risultano peraltro quelle più a rischio di danno renale.

E' stato osservato inoltre che la concentrazione di uNGAL si riduce dell'1,33% per ogni giorno di età postatale e del 17,8% per ogni settimana di età postconcezionale. I valori di uNGAL nei maschi sono risultati significativamente inferiori rispetto alle femmine. Tale differenza potrebbe essere spiegata con il fatto che nelle femmine la raccolta dei campioni di urine è maggiormente soggetta a contaminazione con feci e secrezioni vaginali che può causare riscontro di valori falsamente elevati di NGAL nelle urine.

Presso la Terapia Intensiva Neonatale del Policlinico S. Orsola-Malpighi è stato effettuato uno studio<sup>56</sup> su 44 neonati pretermine VLBW nei quali è stata riscontrata una correlazione tra NGAL urinario nei primi giorni di vita e lo sviluppo renale durante le prime settimane di vita: è stato infatti osservato che nei soggetti in cui i valori di creatinina sierica non presenta la fisiologica diminuzione dopo le prime 2-3 settimane di vita, i valori medi di NGAL urinario risultano più elevati rispetto al resto del campione. Inoltre il cut-off di 100 ng/ml è risultato un utile predittore di alterata maturazione della funzione renale dopo la nascita pretermine, con sensibilità 100% e specificità 67%.

Inoltre è stato osservato<sup>57</sup> da uno studio condotto su 52 neonati pretermine che i valori sierici di NGAL alla nascita correlano significativamente con lo sviluppo di displasia broncopolmonare (BPD).

Uno studio effettuato per individuare i marcatori indicativi di significatività emodinamica del dotto di Botallo<sup>58</sup> ha documentato che NGAL urinario presenta una correlazione significativa con la presenza di dotto di Botallo che necessita di chiusura farmacologica o chirurgica.

In uno studio recente<sup>59</sup> effettuato su 26 VLBW è stato riscontrato che i valori di NGAL urinario risultano più elevati nei soggetti che nei giorni successivi avrebbero manifestato un quadro di sepsi, con o senza interessamento renale, ma con incremento più accentuato nel gruppo con sepsi associata a danno renale acuto.

Per quanto riguarda l'impiego di NGAL per il follow-up in pazienti con danno renale cronico, è stato effettuato uno studio<sup>52</sup> su 45 pazienti in età pediatrica affetti da insufficienza renale cronica in cui sono stati misurati NGAL sierico, cistatina C sierica, VFG misurata e VFG stimata, osservando che in tale popolazione NGAL è dosabile nel siero e correla con la cistatina C sierica e con la VFG misurata e stimata, NGAL sierico e cistatina C sono utili nella stadiazione dell'insufficienza renale cronica e infine che per i pazienti con più bassi livelli di VFG NGAL sierico risulta maggiormente correlato alla VFG misurata rispetto alla cistatina C e pertanto si può ipotizzare che sia un marcatore utilizzabile anche per il follow-up a distanza dei pazienti con insufficienza renale cronica, oltre che come indicatore di danno renale acuto.

## KIM-1

KIM-1 (Kidney Injury Molecule 1) è una proteina tubulare transmembrana di cui non è nota la funzione. È stato osservato che in campioni bioptici renali e campioni di urine di soggetti con diversi tipi di patologie renali caratterizzate da proteinuria, infiammazione e fibrosi essa presenta valori significativamente più elevati rispetto ai controlli non affetti da patologia renale<sup>60</sup>.

Indipendentemente dall'eziologia, l'espressione di KIM-1 è risultata significativamente associata alla patologia glomerulare e al danno renale interstiziale.

Considerando gli indici di funzionalità renale, l'espressione di KIM-1 è risultata correlata positivamente alla creatinina sierica e negativamente alla clearance della creatinina e alla GFR. Non è stata riscontrata correlazione tra KIM-1 e proteinuria.

In età pediatrica è stata osservata<sup>61</sup> una correlazione tra elevati livelli di KIM-1 e l'insorgenza di danno tubulare conseguente al deposito di urati post-radioterapia e chemioterapia.

Recentemente<sup>59</sup> è stato osservato in uno studio condotto su 48 neonati prematuri che il dosaggio di KIM-1 è predittivo di danno renale acuto con sensibilità 73.3% e specificità 76.9%.

## CISTATINA C

La cistatina C è una proteina plasmatica relativamente stabile che è spesso utilizzata per il monitoraggio della funzione renale. I livelli sierici di tale molecola possono essere tuttavia influenzati da fattori che interferiscono con il metabolismo proteico come la funzione tiroidea e la terapia con corticosteroidi.

E' stato osservato<sup>62</sup> che la cistatina C sierica in pazienti con insufficienza renale acuta correla con la creatinina sierica e con la GFR e pertanto può essere utilizzato come marcatore di danno renale acuto.

Uno studio effettuato su pazienti in età pediatrica in reparti di Terapia Intensiva<sup>63</sup> ha evidenziato che la cistatina C e la  $\beta$ 2-microglobulina, essendo proteine a basso peso molecolare escrete esclusivamente per filtrazione glomerulare, rappresentano marcatori attendibili di compromissione della GFR e risultano meno influenzati da fattori extrarenali rispetto alla creatinina.

Inoltre<sup>64,65</sup> sono stati determinati i livelli plasmatici di cistatina C in un campione di neonati pretermine, ma non è ancora definito se l'utilizzo di tale marcatore sia da preferire a quello della creatinina sierica in questa categoria di pazienti.

Sono stati proposti<sup>66</sup> come valori di riferimento per l'età pediatrica valori pari a 0.59–1.97 mg/l in bambini < 1 anno e valori sovrapponibili a quelli utilizzati in età adulta (0.51–0.98 mg/l) dopo il primo anno di vita.

I valori di riferimento per la cistatina C nel neonato a termine e pretermine sono stati proposti in uno studio condotto su 88 neonati<sup>67</sup>: 1,41 per i pretermine tra le 28 e le 32 settimane, 1,22 per i pretermine 33-36 settimane e 1,21 per i neonati a termine.

Uno studio recente effettuato su 28 neonati pretermine<sup>68</sup> ha evidenziato che la cistatina C risulta più elevata nei soggetti con distress respiratorio associato a danno renale acuto e pertanto potrebbe essere utilizzata per il monitoraggio della funzione renale nelle Terapie Intensive Neonatali.

La cistatina C può essere infine utilizzata per stimare la filtrazione glomerulare attraverso una formula matematica<sup>69</sup>:  $\log(GFR)=1.962+[1.123*\log(1/Cystatin\ C)]$ .

Questa determinazione della GFR è stata adottata in alcuni studi condotti su popolazioni in età pediatrica<sup>70,71</sup>.

## INTERLEUCHINA 18

Interleukina-18 (IL-18) è una citochina pro-infiammatoria, la cui sintesi è indotta a livello del tubulo prossimale che può essere dosata nelle urine in seguito ad un insulto di tipo ischemico, come confermato da studi su modelli animali<sup>72</sup>.

Sono stati successivamente effettuati studi in cui i livelli urinari di IL-18 risultavano elevati in soggetti con evidente danno renale acuto<sup>73</sup> e in cui tale aumento era indotto più precocemente rispetto a quello della creatinina sierica in pazienti con sindrome da distress respiratorio che sviluppavano insufficienza renale acuta<sup>74</sup>.

Per quanto riguarda l'età pediatrica, è stato effettuato uno studio su una popolazione di bambini sottoposti a intervento cardiocirurgico<sup>75</sup>, in cui è stato osservato che NGAL urinario e IL-18 presentano un incremento nei soggetti con danno renale acuto più precoce rispetto alla creatinina sierica, ed uno studio<sup>75</sup> effettuato in Terapia

Intensiva Pediatrica in cui il rialzo di IL-18 urinaria precede quello della creatinina ed è predittivo della severità del danno renale acuto.

Pertanto anche IL-18 può essere utilizzabile nella diagnosi precoce del danno renale acuto; tuttavia è stato ipotizzato<sup>76</sup> che l'espressione di tale molecola possa essere influenzata da numerose variabili come endotossinemia, alterazioni del sistema immunitario e tossicità da farmaci.

### 1.2.3 ECOGRAFIA ED ECOCOLORDOPPLER

L'ecografia renale viene eseguita di routine nel neonato con insufficienza renale acuta. Nei primi 6 mesi di vita la corticale del rene mostra un'ecogenicità uguale o maggiore rispetto al fegato e alla milza, mentre nelle età successive appare ipoecogena rispetto a tali organi. Tale aspetto è dovuto alla maggiore concentrazione e al maggior volume cellulare dei glomeruli.

L'ecografia è utile per diagnosticare anomalie strutturali del rene come malformazioni, lesioni parenchimali, patologie cistiche e patologie ostruttive delle vie escretrici. Inoltre in corso di infezioni fungine da *C. Albicans* si possono riscontrare iperecogenicità del parenchima renale, ascessi e bezoari fungini<sup>77</sup>.

Inoltre attraverso l'utilizzo del color-doppler, lo studio ecografico renale permette di identificare alterazioni come stenosi dell'arteria renale, trombosi della vena renale, complicanze successive all'esecuzione di biopsia renale, variazioni del flusso renale durante stati infiammatori acuti e cronici, patologie ostruttive e non ostruttive delle vie escretrici.

La metodica dell'eco-color-doppler consente inoltre di misurare diversi parametri utili per la valutazione dell'emodinamica renale, tra cui l'indice di pulsatilità (PI), calcolato come  $(\text{picco di flusso sistolico} - \text{picco di flusso diastolico})/\text{picco di flusso medio}$ , e l'indice resistivo (RI), calcolato come  $(\text{picco di flusso sistolico} - \text{picco di flusso diastolico})/\text{picco di flusso sistolico}$ . L'indice resistivo è il parametro emodinamico maggiormente utilizzato nel neonato.

E' stato osservato che un indice resistivo  $< 0,7$  può essere considerato indice di normali resistenze vascolari renali nell'adulto. Tuttavia è stato osservato<sup>78</sup> che i neonati possono avere un indice resistivo dell'arteria renale fino a 0,9, mentre i bambini di età inferiore ad 1 anno hanno generalmente un RI tra 0,6 e 0,8 e quelli di età  $\geq 1$  anno hanno un RI tra 0,5 e 0,7.

Pertanto il *cut-off* di 0,7 per individuare un aumento delle resistenze vascolari renali in età adulta risulta applicabile soltanto in pazienti pediatriche di età  $> 1$  anno<sup>79</sup>, mentre durante i primi mesi di vita si verificano modificazioni emodinamiche peculiari che si riflettono in tali differenze di parametri emodinamici<sup>80</sup>. Nonostante la filtrazione glomerulare abbia inizio a partire dalla 9°-12° settimana di gestazione, i reni non hanno un ruolo significativo nell'eliminazione di metaboliti e nel bilancio idroelettrolitico. La funzione renale fetale risulta limitata almeno parzialmente dall'ostruzione dell'afflusso di sangue ai glomeruli causata dal turgore delle cellule epitelioidi dell'apparato iuxtaglomerulare delle arteriole afferenti. Alla nascita tale situazione scompare determinando aumento del flusso ematico a livello delle arteriole afferenti e dando quindi inizio alla funzione renale.

Il progressivo aumento del flusso ematico renale è quindi attribuibile al parallelo decremento progressivo delle resistenze vascolari renali e coincide con il decremento dell'indice resistivo medio.

Nel neonato pretermine le fisiologiche modificazioni emodinamiche che determinano la progressiva maturazione della funzione renale possono essere influenzate anche dal parto prematuro, da patologie associate (PDA, distress respiratorio) e da interventi terapeutici (ventilazione meccanica, somministrazione di surfactante, terapia per la chiusura del dotto di Botallo). Uno studio effettuato su 14 neonati pretermine<sup>81</sup> ha evidenziato che a livello dell'arteria renale il flusso sistolico aumenta durante la prima settimana di vita, mentre il flusso diastolico rimane pressoché invariato; l'indice resistivo aumenta progressivamente con l'aumento dell'età post-natale, probabilmente in seguito all'aumento del flusso sistolico.

L'indice resistivo è stato inoltre utilizzato per valutare gli effetti emodinamici del dotto di Botallo nel neonato pretermine e può essere utile per definire le scelte terapeutiche. Infatti è stato osservato<sup>82</sup> che un  $RI > 1$  è suggestivo della presenza di dotto di Botallo emodinamicamente significativo (diametro  $>1,5$  mm). Tale correlazione si spiega con il fatto che un dotto ampio determina un'inversione del flusso durante la diastole che porta ad una caduta di flusso diastolico a carico di vari organi periferici tra cui il rene.



## **CAPITOLO 2**

### **LA FUNZIONE RENALE A MEDIO E LUNGO TERMINE NEI NEONATI PRETERMINE**

#### **2.1 EFFETTI PERSISTENTI DELLA PREMATURITA' SULLA NEFROGENESI**

La nascita pretermine influenza lo sviluppo e la maturazione del rene dal momento che la nefrogenesi si completa verso le 34-36 settimane. La nascita prima della 34<sup>°</sup> settimana interrompe il processo di nefrogenesi e determina anche l'esposizione del rene agli eventi patogeni in epoca neonatale descritti nel capitolo precedente, che oltre a provocare un danno renale acuto possono causare modificazioni morfologiche e funzionali permanenti che possono coinvolgere le diverse strutture del rene<sup>83</sup>.

Queste alterazioni funzionali nelle età successive possono avere ripercussioni sullo stato di salute anche in età adulta, in cui si osserva negli ex pretermine una maggior incidenza di insufficienza renale cronica ed ipertensione.

Numerosi autori hanno documentato che la prematurità ed il basso peso alla nascita determinano una riduzione permanente del numero di nefroni e delle dimensioni del rene<sup>84,85</sup>. Tale dato è stato confermato anche da studi autoptici in cui è stata riscontrata una forte correlazione tra peso alla nascita e numero di glomeruli<sup>86</sup>.

La riduzione della massa renale in seguito alla nascita pretermine (oligonefropatia del pretermine) è diventata successivamente oggetto di studi di follow-up su coorti di pretermine per individuare precocemente i soggetti a rischio e mettere in atto ove possibile interventi di prevenzione<sup>87,88</sup>.

Tale riduzione del numero di glomeruli si traduce, secondo l'ipotesi di Brenner, in un'iperfiltrazione compensatoria messa in atto dai glomeruli funzionanti che a lungo termine determina ipertensione, proteinuria che possono danneggiare progressivamente il parenchima renale fino all'insufficienza renale cronica. E' stato anche ipotizzato che questa interdipendenza tra funzione renale e regolazione della

pressione arteriosa determini un incremento del rischio cardiovascolare nei soggetti con ridotto numero di nefroni per qualsiasi causa congenita o acquisita che abbia interferito con la nefrogenesi<sup>89,90,91,92,93</sup>.

La filtrazione glomerulare (GFR) alla nascita risulta notevolmente ridotta rispetto all'età adulta, aumentando progressivamente da 30 ml/min/1,73m<sup>2</sup> a 120 ml/min/1,73m<sup>2</sup> a causa del progressivo aumento della superficie filtrante<sup>3</sup>. Tale riduzione della GFR alla nascita risulta ancora più marcata nel pretermine, in cui il numero di nefroni è ridotto rispetto ai neonati a termine e possono coesistere altri fattori di rischio (ipotensione, farmaci, PDA).

Il tubulo prossimale svolge la funzione di riassorbire diverse sostanze filtrate a livello glomerulare (aminoacidi, bicarbonati, glucosio) attraverso meccanismi di trasporto attivo e passivo. Questi sistemi di trasporto sono immaturi nel neonato pretermine; la riduzione del riassorbimento di queste sostanze può determinare acidosi metabolica, glicosuria; viceversa, il sistema di riassorbimento tubulare del fosforo è più attivo nel neonato rispetto all'adulto e può pertanto condurre ad iperfosforemia.

Il dotto collettore è invece responsabile della regolazione della sodiemia e della potassiemia: l'immaturità di questi sistemi di trasporto fa sì che nel neonato pretermine si osservi frequentemente iperpotassiemia.

Infine il rene del neonato, in particolare del neonato pretermine, presenta una ridotta capacità di diluire e concentrare le urine in risposta all'apporto di fluidi. Tale capacità tende a raggiungere i livelli dell'età adulta dopo i 2 anni di vita.

Oltre alla prematurità, è stato osservato che il ritardo di crescita intrauterino può alterare la maturazione del rene, interferendo con la nefrogenesi e determinando una riduzione delle dimensioni del rene rispetto ai valori di riferimento<sup>94</sup>.

## 2.2 STUDI DI FOLLOW-UP

Esistono in letteratura diversi studi in cui sono state esaminate la funzionalità renale e la pressione arteriosa nei soggetti nati pretermine a diverse età.

Il follow-up a 18 anni di 20 ELBW che avevano presentato in epoca neonatale insufficienza renale acuta ha evidenziato la presenza di alterazioni come proteinuria, nefrocalcinosi, ipertensione nefrovascolare ed insufficienza renale cronica<sup>95</sup>. Tra i fattori di rischio predittivi di danno renale in età giovanile-adulta sono stati identificati ad 1 anno di vita ProtU/CreatU>0,6, creatinina sierica > 0,6 mg/dl e BMI >85° percentile.

Uno studio effettuato su 143 bambini con PN < 1000 g ed EG < 30 settimane<sup>96</sup> valutati in follow-up all'età media di 7,6 anni ha evidenziato che i pretermine hanno valori medi di pressione diastolica maggiori e reni di dimensioni inferiori se confrontati con i coetanei nati a termine. Sono stati inoltre individuati alterazioni asintomatiche come microalbuminuria, ipercalciuria e nefrocalcinosi. E' stato osservato che il ritardo di crescita intrauterino ed extrauterino determina una riduzione della GFR, mentre la presenza di displasia broncopolmonare si associa ad una maggior incidenza di microalbuminuria.

Il ritardo di crescita intrauterino è risultato un fattore di rischio per riduzione della GFR anche in uno studio prospettico effettuato su una popolazione norvegese di 7457 soggetti tra i 20 e i 30 anni di età<sup>97</sup>. Infatti l'odds ratio per GFR< 100 ml/min è risultato 1,66 (95% CI 1,16-2,37) nei soggetti con SDS score per il peso alla nascita compreso tra -1,3 e -2 e 2.40 (95% CI, 1.46 to 3.94) nei soggetti con SDS score per il peso alla nascita < -2.

Un altro studio<sup>71</sup> ha analizzato attraverso misurazione della pressione arteriosa e calcolo del GFR con la formula che utilizza la cistatina C<sup>69</sup> a 1, 2 e 3 anni di età di un gruppo di 120 neonati VLBW, osservando che la GFR aumenta progressivamente mentre la cistatina C si riduce. Inoltre i soggetti con minori PN ed EG con elevata pressione arteriosa ad un anno di età presentavano GFR più alta ad un anno e più

bassa a 3 anni rispetto ai coetanei non ipertesi. Questo dato è stato spiegato con l'ipotesi dell'iperfiltrazione compensatoria attiva nel primo anno di vita che successivamente può determinare un deterioramento della funzione renale.

Uno studio condotto su 69 VLBW controllati in follow-up all'età media di 5,7 anni<sup>98</sup> ha evidenziato come alterazioni della funzione renale soltanto una maggiore escrezione renale di  $\alpha$ 1-microglobulina e dimensioni del rene inferiori dei soggetti con peso alla nascita < 1000 g.

Anche il follow-up a lungo termine ha confermato che la nascita pretermine costituisce un fattore di rischio per alterazioni a carico del rene: uno studio effettuato su 422 pretermine (< 32 settimane) a 19 anni di età ha documentato che, seppur in presenza di funzione renale nella norma per tutti i soggetti, il basso peso alla nascita ed il ritardo di crescita intrauterino sono correlati a valori più elevati di creatinina (e di conseguenza riduzione di eGFR)<sup>99</sup>.

In una coorte di 40 ELBW valutati in follow-up in età scolare<sup>100</sup>, è stato osservato che rispetto ai controlli i pretermine presentavano maggiori valori di creatinina e ridotta GFR, ed un incremento di eliminazione renale di calcio e fosforo con riduzione del riassorbimento tubulare dei fosfati (TRP), pur in presenza di equivalenti dimensioni renali e valori di pressione sistolica e diastolica.

Diversamente dai precedenti, uno studio effettuato su pretermine (< 32 settimane) e coetanei nati termine AGA e SGA all'età di 9-12 anni non ha evidenziato differenze di GFR calcolata con la formula di Schwartz e di proteinuria; è stata invece osservata una differenza significativa di volume renale che tuttavia si annullava correggendo i risultati per sesso, età e superficie corporea<sup>101</sup>.

Esistono inoltre numerosi studi su popolazioni di pretermine in età infantile<sup>102,103,104</sup>, adolescenza<sup>105</sup> ed età adulta<sup>106,107,108,109</sup> in cui sono stati riscontrati valori di pressione arteriosa maggiori rispetto ai coetanei nati a termine.

Inoltre uno studio retrospettivo<sup>110</sup> che ha preso in esame i dati neonatali di 435 bambini con insufficienza renale cronica dovuta a diverse eziologie ha riscontrato una

maggior incidenza di prematurità e ritardo di crescita intrauterino nei soggetti con nefropatie congenite ed acquisite.

## CAPITOLO 3

### PARTE SPERIMENTALE

#### 3.1 MATERIALI E METODI

Sono stati arruolati i neonati pretermine di peso  $\leq 1500$  g ricoverati alla nascita presso la Terapia Intensiva Neonatale dal 1/09/2008 al 31/08/2009 e sottoposti in epoca neonatale a valutazione della funzione renale attraverso il dosaggio di urea, creatinina, NGAL urinario (UNGAL), NGAL sierico (SNGAL) e KIM-1.

Successivamente 29 neonati arruolati nel precedente studio sono stati sottoposti a valutazione a medio termine della funzione renale.

#### Periodo neonatale

I dati neonatali considerati includevano età gestazionale, peso alla nascita e alla dimissione con calcolo dell' SDS score attraverso le IneS Charts<sup>111,112</sup>, Apgar score a 1' e 5', durata in giorni di assistenza respiratoria, incidenza delle principali complicanze

Tra le terapie utilizzate durante il ricovero, sono stati calcolati i giorni di terapia con amine vasoattive (dopamina e dobutamina), amikacina, vancomicina, amfotericina B. Sono stati inoltre raccolti i dati sul dotto di Botallo misurati tra le 24 e le 72 ore di vita: calibro del dotto (corretto per il peso in mm/Kg), rapporto tra atrio sinistro ed aorta (LA/AO) e necessità di terapia farmacologica con ibuprofene o indometacina o di intervento chirurgico.

Per quanto riguarda i parametri clinici ed emodinamici di funzione renale sono stati registrati la presenza durante il ricovero di ipotensione (considerata come pressione arteriosa media inferiore all'età gestazionale, secondo il criterio proposto dalla British Association of Perinatal Medicine)<sup>8</sup>, di rialzo della creatinina sierica al di sopra di 1,2 mg/dl, di diuresi  $< 1$  ml/Kg/h e di mancata diminuzione della creatinina sierica

durante le prime settimane di vita rispetto alla nascita (Impaired Renal Function, IRF).

Alla dimissione sono stati registrati peso e relativo z-score, alimentazione, età post-concezionale e durata del ricovero in giorni.

Il dosaggio di UNGAL, SNGAL e KIM-1 è stato effettuato a 24-72 ore di vita in 44 neonati di cui 2 deceduti, mentre il dosaggio della creatinina plasmatica è stato effettuato a 24-72 ore di vita, a 5-7 giorni, a 15-21 giorni e successivamente quando clinicamente indicato in base alle condizioni cliniche del neonato.

Il dosaggio della creatinina è stato effettuato presso il Laboratorio Centralizzato del Policlinico S.Orsola-Malpighi.

Per quanto riguarda il dosaggio di NGAL e KIM-1, sieri e le urine sono stati conservati a 4° C e centrifugati entro 24 ore dalla raccolta .

I campioni di sangue sono stati centrifugati a 2500 rpm per 15 minuti, ed il siero è stato congelato a -20°C fino al momento dell'analisi. I campioni di urine sono stati sottoposti a centrifugazione a 1500 rpm per 10 minuti e il sopranatante è stato congelato a -20°C fino al momento dell'analisi.

Per il dosaggio di NGAL in entrambi i fluidi biologici e KIM-1 è stato usato il test immunoenzimatico ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Tale saggio si effettua su una piastra da 96 pozzetti utilizzando uno specifico anticorpo monoclonale precedentemente adeso ad essi. Per calcolare la concentrazione di campioni in studio, si ricorre all'utilizzo di standard che consentono la costruzione di una curva di riferimento. Dopo l'aggiunta di standard e di campione nei rispettivi pozzetti, la piastra è stata lasciata in incubazione; dopo 3-4 lavaggi con un tampone si è aggiunto un secondo anticorpo specifico legato a biotina. Successivamente è stato aggiunto un enzima coniugato a streptavidina, capace di legare la biotina. Dopo altri 3-4 lavaggi per eliminare tutti gli anticorpi rimasti in sospensione, è stato aggiunto un substrato specifico per l'enzima.

A questo punto si realizza una reazione capace di sviluppare un'intensità di colore proporzionata alla quantità di analita legatosi nel primo passaggio; dopo l'aggiunta di una "soluzione di stop" è stata eseguita la lettura di tale reazione colorimetrica tramite un lettore per micropiastre DV 990 BV5UV (GVD, Roma, Italia) misurando l'assorbanza a 450 nm.

### Follow-up

29 bambini valutati alla nascita secondo il protocollo precedentemente descritto hanno aderito al follow up a medio termine presso il Day-Hospital della Neonatologia del Policlinico S.Orsola-Malpighi nell'anno 2012.

Ogni soggetto è stato sottoposto a:

- prelievo ematico per urea, creatinina, cistatina C, cloro, calcio, fosforo, EGA, GOT, GPT, acido urico, magnesio, potassio, sodio inviato presso il Laboratorio Centralizzato del Policlinico;
- esame urine con determinazione di beta2-microglobulina, microalbuminuria, proteinuria, creatininuria, osmolarità urinaria, elettroliti (sodio, fosforo, potassio, magnesio), glicosuria, lisozima inviato presso il Laboratorio Centralizzato del Policlinico;
- invio di un campione di sangue (1 ml in provetta da biochimico) e di un campione di urine (almeno 1 ml) presso il Laboratorio di Nefrologia (prof. La Manna) per determinazione di NGAL, U-NGAL,
- misurazione dei parametri antropometrici e collocazione secondo i percentili (Gairdner e Pearson<sup>113</sup>);
- misurazione pressione arteriosa con determinazione del percentile per altezza e sesso (The Fourth Report on the Diagnosis, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure in Children and Adolescents, National High Blood Pressure



Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescents<sup>114</sup>)

- eco reni e vie urinarie con misurazione di:
  - lunghezza massima rilevata ai due poli renali con calcolo del percentile per altezza secondo i criteri di Dinkel et al., 1985<sup>115</sup>;
  - larghezza;
  - spessore della corticale;
  - valutazione delle vie urinarie per determinare la presenza di pielectasia o dilatazione degli ureteri.

La misurazione della filtrazione glomerulare stimata (eGFR) è stata calcolata con la formula di Schwartz per l'età pediatrica:  $0,55 \times \text{altezza in cm} / \text{creatinina sierica in mg/dl}^{1,73}$ .

I valori di GFR così determinati sono stati considerati nella norma se  $> 100 \text{ ml/min/1,73m}^2$ .

Con i dati laboratoristici ottenuti sono stati inoltre calcolati il riassorbimento tubulare del fosforo (TRP) utilizzando la formula  $1 - ((\text{fosforo } U \times \text{creatinina } P) / (\text{fosforo } P \times \text{creatinina } U))$  e considerando nella norma i valori  $> 80\%$ <sup>116</sup> e la frazione di eiezione del sodio (FENa) con la formula  $(\text{sodio } U \times \text{creatinina } P) / (\text{sodio } P \times \text{creatinina } U)$  e considerando nella norma valori  $< 1\%$ <sup>117</sup>.

Il rapporto proteinuria/creatininuria è stato considerato nella norma se  $< 0,2$  e in range nefrosico se  $> 2$ .

I parametri antropometrici sono stati analizzati con “Anthropometric Calculator for normal children 0–20 years of age” (current version: 2012/10/26), basato sulle “US Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2000 growth charts” (disponibili online at <http://www.cdc.gov/growthcharts/>).

L'analisi statistica è stata effettuata con correlazioni di Pearson per variabili continue (MS Excel 2007), considerando significativo il valore di  $r > 0,3$ , chi-square per il

confronto tra le incidenze di variabili dicotomiche e t-test e per il confronto tra medie (Graph Pad).

### 3.2 RISULTATI

Sono stati valutati in follow up 29 bambini di età compresa tra 2 anni e ½ e 4 anni (17 femmine e 12 maschi). I dati neonatali dei 29 soggetti relativi al periodo dalla nascita alla dimissione sono riassunti in tabella 1:

PN	Media±DS 979,3±350,5 g (range 380-1525 g)
EG	Media±DS 28,4±2,8 settimane (range 23-32)
SGA	7/29 (24%)
Surfactante	20/29 (68%)
Ventilazione meccanica	15/29 (51%) durata 1-125 giorni (mediana 12)
CPAP	27/29 (93%)
Sepsi	5/29 (17%)
Oliguria	8/29 (27%)
Creatinina > 1,2 mg/dl	8/29 (27%)
IRF	4/29 (13%)
Ipotensione	10/29 (34%)
Dialisi peritoneale	1/29 (3%)
Terapia con dopamina	16/29 (55%) (range 2-67 gg, mediana 8)
Terapia con dobutamina	9/29 (31%) (range 1-20 gg, mediana 4)
Terapia con vancomicina	9/29 (31%) (range 2-35 gg, mediana 7)
Terapia con amfotericina B liposomiale	1/29 (3%)
Terapia con amikacina	22/29 (75%) (media±DS 8±7gg, range 2-33)
Terapia con diuretici per BPD	13/29 (45%)
BPD a 28 giorni	15/29 (52%)
BPD a 36 settimane	5/29 (17%)
IVH	4/29 (14%) (grado I-II)
LPV	2/29 (6%)

NEC	6/29 (12%) (2 con perforazione)
ROP	9/29 (31%) 3 I grado, 4 II grado, 2 III grado
PDA	18/29 (62%) PDA emodinamicamente significativo 14/29 (48%) Chiusura con ibuprofene 11 casi Chiusura con indometacina 2 casi Chiusura chirurgica 2 casi
S-NGAL > 100 ng/ml	Giorno 1 11/24 (46%) Giorno 5 7/18 (39%) Giorno 14 8/22 (36%)
U-NGAL > 100 ng/ml	Giorno 1 10/23 (43%) Giorno 5 7/17 (29%) Giorno 14 7/21 (33%)
Dimissione	Durata media ricovero 92±59 gg, range 33-263 EPC media alla dimissione 39±4,7 range 34-52 settimane Peso alla dimissione media 2110±426 g range 1670-3285 g

Tabella 1 Dati neonatali

Tutti i soggetti sono stati valutati periodicamente per il follow-up della prematurità presso il Day-Hospital della Neonatologia in cui sono stati sottoposti a monitoraggio dei parametri antropometrici e dello sviluppo neurosensoriale.

La valutazione della funzione renale è stata effettuata all'età media di 3,4±0.4 anni. In tale occasione il prelievo ematico è stato effettuato in 27/29 soggetti, la raccolta delle urine in 23/29 soggetti e l'ecografia in 26/29. La misurazione della pressione arteriosa è stata effettuata in 27/29 soggetti per la scarsa compliance dei pazienti che ha reso impossibile la misurazione in 2 casi.

I risultati complessivi dei controlli effettuati sono schematizzati di seguito:

#### Esami ematici

- Urea media 31±7.9 mg/dl

- Creatinina media  $0.4 \pm 0.11$  (range 0,3-0,75) con riscontro di creatinina  $> 0,6$  mg/dl in 2/27 (7,4%)
- Cistatina C media  $0.86 \pm 0.1$  (0,64-1,25)
- eGFR  $134 \pm 29$  ml/min/ $1,73m^2$  con riscontro di valori patologici ( $< 100$  ml/min/ $1,73m^2$ ) in 2/27 (7,4%)
- Elettroliti, acido urico, EGA: nella norma per tutti i soggetti
- S-NGAL  $0.997 \pm 0.67$  ng/ml

### Urine

- B<sub>2</sub> microglobulina assente in tutti i soggetti
- Microalbumina assente in tutti i soggetti
- Proteinuria 60-290 mg/die con rapporto ProtU/CreatU  $> 0,2$  in 9/23 (39%), di cui 1 soggetto con proteinuria in range nefrosico confermata in più controlli consecutivi e ricoverato in Nefrologia Pediatrica per essere sottoposto a terapia steroidea)
- Lisozima assente in tutti i soggetti
- Glicosuria assente in tutti i soggetti
- FENa nella norma ( $< 1\%$ ) in tutti i soggetti
- TRP  $< 80\%$  in 2/23 soggetti (8,7%)
- U-NGAL range 0-0.705 ng/ml, mediana 0.0775 ng/ml

La valutazione ecografica ha evidenziato per il rene destro 13 soggetti con misure al di sotto del 50° percentile per altezza e per il rene sinistro 12 soggetti con misure al di sotto del 50° percentile, ma tutti i controlli hanno mostrato reni nel range di normalità.

La pressione sistolica è risultata  $\geq 90^\circ$  percentile in 15 soggetti, pari al 58% del campione (2 tra il 90° e il 95° percentile e 11 tra il 95° e il 99°).

Dopo la valutazione, ai soggetti con alterazioni di GFR, rapporto proteinuria/creatininuria  $> 0,2$  o pressione arteriosa  $> 95^\circ$  percentile è stato

programmato controllo a distanza di 6-12 mesi degli esami e controllo della PA ed esame urine una volta all'anno.

2 soggetti sono stati invece presi in carico dalla Nefrologia Pediatrica del Policlinico S.Orsola-Malpighi:

- 1 bambino con sindrome nefrosica
- 1 bambina nata a 23 settimane di EG e sottoposta in epoca neonatale a dialisi peritoneale che alla nostra valutazione ha presentato alterazioni borderline della pressione e rapporto proteinuria/creatininuria > 0.2.

I dati antropometrici misurati in occasione del follow up sono risultati:

- z-score per il peso: media  $-1.39 \pm 1.22$  (range -3-0.81) con 15 soggetti con z-score < 1,28 (10° percentile);
- z-score per altezza:  $-0.83 \pm 1.01$  (range -3-0.77) con 10 soggetti con z-score < 1,28 (10° percentile);
- BMI medio  $14.4 \pm 1.4$  (range 11.8-16.4) con z-score medio  $-1.23 \pm 1.39$  (-4.33-0.47) con 11 soggetti al di sotto del 10° percentile e nessuno sovrappeso (>85° percentile).

E' stata osservata una correlazione significativa tra valori di eGFR e lo z-score per il peso alla nascita ( $r=0.4$ ,  $p 0.039$ ) e lo z-score per il peso a 3 mesi di età corretta ( $r =0,45$ ,  $p 0.01$ ), mentre la correlazione non è stata osservata per EG, PN, età post-concezionale (EPC) alla dimissione, peso alla dimissione, z-score per il peso alla dimissione e durata del ricovero (tabella 2, figure 1 e 2).

Variabile correlata con eGFR	r di Pearson	p
PN	0.11	0.58
EG	-0.17	0.39
z-score peso nascita	0.40	0.03
GG ricovero	-0.14	0.48
EPC dimissione	-0.28	0.15
Peso dimissione	-0.01	0.96
z-score peso dimissione	0.24	0.22
z-score peso 3 mesi EC	0.45	0.01
z-score peso al follow up	0.22	0.27
z-score altezza al follow up	0.14	0.48
BMI al follow up	0.31	0.11
z-score BMI al follow up	0.23	0.24

Tabella 2 Correlazione (r di Pearson) tra GFR e variabili neonatali

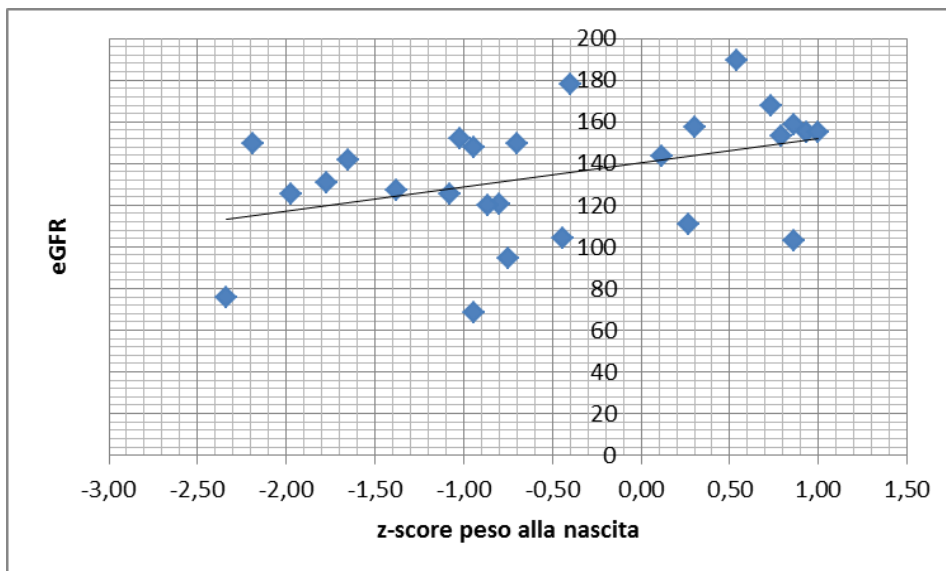


Fig. 1 Correlazione tra eGFR e z-score per il peso alla nascita

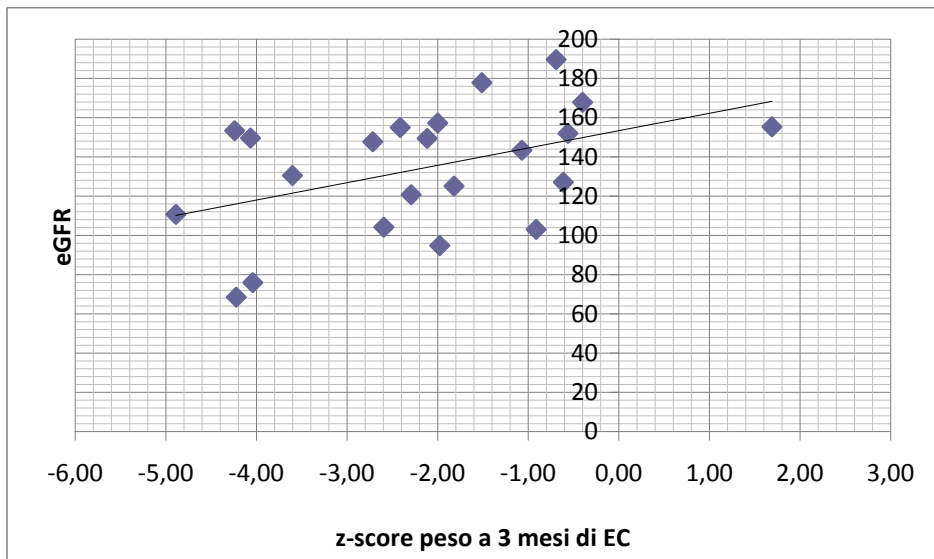


Fig. 2 Correlazione tra eGFR e z-score per il peso a 3 mesi di età corretta

Il valore di eGFR non risulta correlato alle dimensione del rene misurato ecograficamente. La lunghezza dei reni risulta invece correlata significativamente per entrambi i reni a z-score per il peso alla nascita, alla dimissione, a 3 mesi di EC e al follow-up, e durata del ricovero. (tabella 3).

Variabile correlata con lunghezza rene dx	r	p	Variabile correlata con lunghezza rene sn	r di Pearson	p
PN	0.42	0.03	PN	0.35	0.07
EG	0.34	0.08	EG	0.3	0.12
z-score peso nascita	0.36	0.03	z-score peso nascita	0.18	0.36
GG ricovero	-0.72	<0.0001	GG ricovero	-0.58	0.001
EPC dimissione	-0.72	<0.0001	EPC dimissione	-0.37	0.06
Peso dimissione	-0.07	0.64	Peso dimissione	0.14	0.48
z-score peso dimissione	0.64	<0.001	z-score peso dimissione	0.49	0.009
z-score peso 3 mesi EC	0.44	0.02	z-score peso 3 mesi EC	0.48	0.01
z-score peso al follow up	-0.47	0.01	z-score peso al follow up	0.4	0.04
z-score altezza al follow up	0.37	0.06	z-score altezza al follow up	0.38	0.05
BMI al follow up	0.4	0.04	BMI al follow up	0.09	0.65
z-score BMI al follow up	0.43	0.02	z-score BMI al follow up	0.16	0.42

Tabella 3 Correlazione tra fattori neonatali e post-natali e lunghezza dei reni

In base al riscontro di proteinuria e di ipertensione sistolica il campione è stato quindi suddiviso in 2 gruppi confrontando le variabili neonatali e post- neonatali.

Confrontando i 9 soggetti con proteinuria con i 17 senza proteinuria, è stata osservata una differenza significativa nella durata della terapia con amikacina ( $13 \pm 10$  vs  $5 \pm 2.4$  giorni,  $p=0.009$ ) e durata del ricovero ( $134 \pm 88$  giorni vs  $69 \pm 27$ ,  $p=0.008$ ).

Per quanto riguarda il confronto tra i 15 soggetti con ipertensione e gli 11 senza ipertensione, è stata osservata una maggiore incidenza di PN < 10° percentile vicina alla significatività (33% vs 0,  $p=0.05$ ) ed una differenza significativa nella durata media della terapia con dopamina ( $27 \pm 26$  vs  $9 \pm 7.6$  giorni,  $p=0.03$ ).

I valori medi di GFR sono risultati significativamente inferiori nel gruppo con ipertensione ( $128 \pm 29$  vs  $150 \pm 23$  ml/min/1,73m<sup>2</sup>,  $p=0.03$ ).



Inoltre il BMI medio dei soggetti ipertesi è risultato inferiore a quello dei soggetti non ipertesi ( $14 \pm 1.54$  vs  $15 \pm 0.93$ ,  $p=0.04$ ).

### 3.3 DISCUSSIONE

La valutazione della funzione renale effettuata a medio termine in una coorte di 29 neonati di PN  $\leq 1500$  g e/o EG  $< 32$  settimane ha evidenziato la presenza di alterazioni funzionali nel 69% dei soggetti e sindrome nefrosica in 1 soggetto (3.4%). Se si esclude un caso di sindrome nefrosica all'esordio che ha necessitato di ricovero per la terapia specifica, in tutti gli altri soggetti sono state individuate soltanto alterazioni funzionali asintomatiche ed isolate (riduzione del riassorbimento tubulare del fosforo, proteinuria/creatininuria  $> 0.2$ , pressione sistolica  $\geq 90^{\circ}$  percentile e riduzione di eGFR) riscontrate anche negli studi presentati in letteratura.

Infatti una riduzione della filtrazione glomerulare correlata alla presenza di ritardo di crescita intrauterino (IUGR) è stato documentato anche da Keijzer-Veen<sup>99</sup> in una coorte di 422 ex-pretermine a 19 anni di età.

Un altro studio effettuato su un campione in età scolare<sup>101</sup> ha evidenziato che i valori di GFR non risultavano alterati rispetto ai controlli nati a termine, mentre le dimensioni del rene risultavano inferiori nei pretermine e negli SGA con una correlazione statisticamente significativa con il peso alla nascita.

Nel nostro campione non è stato possibile effettuare un'analisi multivariata per il ridotto numero di soggetti con  $GFR < 100$  ml/min/1,73m<sup>2</sup> (2 casi); tuttavia la correlazione di Pearson tra eGFR e parametri antropometrici ha evidenziato una relazione significativa tra la filtrazione glomerulare e lo z-score per il peso alla nascita e a 3 mesi di età corretta, confermando che il ritardo di crescita sia intrauterino che extrauterino rappresenta un fattore di rischio per alterazione dello sviluppo renale già all'età di 2-4 anni, confermando i risultati effettuati su coorti in età scolare-adulta<sup>99, 118</sup>.

Inoltre le dimensioni del rene, pur rientrando tutte nei range di normalità secondo i percentili in base all'altezza, risultano correlate significativamente al ritardo di crescita intra- ed extrauterino espresso come z-score del peso alla nascita, alla dimissione, a 3 mesi di età corretta e a 2-4 anni, e al numero di giorni di ricovero che si può considerare un indicatore della gravità complessiva del neonato.

Le alterazioni funzionali riscontrate nella nostra popolazione (proteinuria, alterazione del riassorbimento tubulare del fosforo) sono analoghe a quelle documentate in letteratura per le età successive<sup>99,100</sup>.

Tra i fattori di rischio per proteinuria nel nostro campione sono stati individuati soltanto la durata della terapia con amikacina, di cui è documentata l'azione nefrotossica che oltre ad essere potenzialmente causa di insufficienza renale acuta potrebbe essere la causa delle alterazioni strutturali alla base della proteinuria, e la durata complessiva del ricovero che rappresenta un indicatore complessivo della morbilità neonatale.

Visto il ridotto numero di soggetti con riduzione del TRP (2 casi), non è stato possibile effettuare un'analisi statistica per identificare i fattori di rischio per tale alterazione, sebbene si tratti di 2 soggetti di EG 25 e 26 settimane con severa displasia broncopolmonare (BPD) che ha necessitato di terapia diuretica protratta. I neonati pretermine presentano nei primi mesi di vita un aumentato rischio di osteopenia con alterazioni del metabolismo calcio-fosforo; tale rischio aumenta in caso di terapia protratta con diuretici e corticosteroidi che viene effettuata nelle forme più severe di displasia broncopolmonare. Inoltre la displasia broncopolmonare è una patologia ad eziologia multifattoriale in cui le lesioni polmonari sono determinate anche da disregolazione dei mediatori di vasocostrizione e vasodilatazione e da alterazione del bilancio idrico<sup>119</sup>, con una possibile interdipendenza tra apparato respiratorio e rene. Nel nostro campione era stata inoltre osservata in epoca neonatale una elevata incidenza di NGAL > 100 ng/ml nei soggetti con BPD trattata con diuretici rispetto al resto del campione (57% vs 28%, p=0.04).

Il riscontro di alterazioni del riassorbimento tubulare del fosforo a 2-4 anni di vita, pur in presenza di valori normali di calcemia e fosforemia, proprio in 2 soggetti con broncodisplasia che in epoca neonatale erano stati sottoposti a tali terapie fa ipotizzare che le alterazioni funzionali osservate in epoca neonatale possano protrarsi anche nella prima infanzia o nelle età successive<sup>100</sup>.

Analogamente non è possibile effettuare analisi statistiche sul caso isolato di sindrome nefrosica, relativamente al quale sarebbe opportuno approfondire attraverso un ampliamento del campione se si tratta di un reperto del tutto occasionale o se tale patologia abbia una maggior incidenza negli ex pretermine rispetto alla popolazione generale, in cui la sindrome nefrosica ha un'incidenza annua variabile nelle diverse popolazioni da 1.15 a 16.6 su 100.000<sup>120</sup>.

L'analisi della prognosi dei soggetti con insufficienza renale acuta, come effettuata da Abitbol et al.<sup>95</sup> è stata effettuabile nel nostro campione solo per l'unico caso che ha necessitato di dialisi peritoneale durante il ricovero in Terapia Intensiva Neonatale: si tratta di una bambina estremamente pretermine (EG 23 settimane, PN 380 g) che all'età di 3 anni e ½ ha presentato funzione renale nella norma e rapporto proteinuria/creatininuria 0.26 e che verrà sottoposta a monitoraggio della funzione renale una volta all'anno.

Per quanto riguarda i valori di NGAL sierico ed urinario misurati al controllo di follow-up, sono stati riscontrati valori nella norma in tutti i soggetti (tutti inferiori al 25° percentile rispetto ai valori di riferimento neonatali proposti da Parravicini et al.<sup>54</sup>): tale dato fa ipotizzare, nonostante non esistano valori di riferimento specifici per le popolazioni pediatriche, che non siano presenti danni renali a livello del compartimento tubulo-interstiziale.

La misurazione della pressione arteriosa è risultata in parte condizionata dalla non completa compliance dei pazienti, a differenza degli altri studi effettuati su popolazioni di pazienti di età maggiori e quindi completamente collaboranti.

Il riscontro di valori di pressione sistolica  $\geq 90^{\circ}$  percentile per altezza durante i primi anni di vita conferma il dato osservato da Duncan et al.<sup>103</sup> in ex-pretermine di età  $\leq 3$  anni e da numerosi autori che hanno effettuato studi in coorti di adolescenti e giovani adulti nati pretermine<sup>105,106,107,108,109</sup>.

La maggior incidenza di ritardo di crescita alla nascita nei soggetti ipertesi rispetto a quelli normotesi conferma l'ipotesi che alterazioni di crescita e sviluppo durante la nefrogenesi determina alterazioni morfologiche e funzionali che possono influenzare i sistemi di regolazione della pressione arteriosa. Inoltre è stato osservato che i soggetti che hanno sviluppato ipertensione a 2-4 anni di età hanno presentato in epoca neonatale alterazioni pressorie ed emodinamiche tali da richiedere infusione più prolungata di dopamina: queste alterazioni potrebbero essere correlate a alterazioni persistenti della regolazione della pressione attivi a livello renale.

### **3.4 CONCLUSIONI**

I nati pretermine presentano un aumentato rischio di alterazioni della funzione renale e della regolazione della pressione arteriosa sia precoce, in epoca neonatale, che durante le età successive.

I dati relativi al follow-up a medio termine di una coorte di ex-pretermine hanno mostrato la presenza sia di patologie renali (sindrome nefrosica) che di alterazioni subcliniche di alcuni parametri di funzione renale (riduzione di eGFR, riduzione di TRP, pre-ipertensione e proteinuria di modesta entità).

Questi risultati suggeriscono che l'età di 3-4 anni può rappresentare un momento utile per effettuare uno screening di funzionalità renale in questa popolazione a rischio, al fine di identificare i soggetti che fin dalla prima infanzia richiedano una presa in carico specialistica per proseguire il monitoraggio ed identificare precocemente eventuali situazioni che potrebbero beneficiare di un intervento terapeutico.

La correlazione tra i dati neonatali e le alterazioni osservate sottolineano l'importanza dell'accrescimento pre- e post-natale sulla maturazione della funzione renale e

suggerisce l'utilità di eventuali studi su coorti più numerose per identificare in maniera più precisa i fattori di rischio precoci che interferiscono con la nefrogenesi. L'utilizzo di marcatori di funzione renale come NGAL sierico ed urinario, che in epoca neonatale si era rivelato utile per l'individuazione di soggetti con alterata maturazione della funzione renale, in età infantile non ha mostrato alterazioni significative.

## Bibliografia

1. Drukker A, Guignard JP. Renal aspects of the term and preterm infant: a selective update. *Curr Opin Pediatr*. 2002 Apr;14(2):175-82.
2. Tóth-Heyn P, Drukker A, Guignard JP. The stressed neonatal kidney: from pathophysiology to clinical management of neonatal vasomotor nephropathy. *Pediatr Nephrol*. 2000 Mar;14(3):227-39.
3. Rhodin MM, Anderson BJ, Peters AM, Coulthard MG, Wilkins B, Cole M, Chatelut E, Grubb A, Veal GJ, Keir MJ, Holford NH. Human renal function maturation: a quantitative description using weight and postmenstrual age. *Pediatr Nephrol*. 2009 Jan;24(1):67-76.
4. Kluckow M. Low systemic blood flow and pathophysiology of the preterm transitional circulation. *Early Hum Dev*. 2005 May;81(5):429-37.
5. Barrington KJ. Hypotension and shock in the preterm infant. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2008 Feb;13(1):16-23.
6. Miall-Allen VM, de Vries LS, Whitelaw AG. Mean arterial blood pressure and neonatal cerebral lesions. *Arch Dis Child*. 1987 Oct;62(10):1068-9.
7. Hegyi T, Carbone MT, Anwar M, Ostfeld B, Hiatt M, Koons A, et al. Blood pressure ranges in premature infants: I. The first hours of life. *J Pediatr* 1994;124:627– 33.
8. Development of audit measures and guidelines for good practice in the management of neonatal respiratory distress syndrome: report of a joint working group of the British Association of Perinatal Medicine and the research unit of the Royal College of Physicians. *Arch Dis Child* 1992; 67:1221–7.
9. Giliberti P, De Leonibus C, Giordano L, Giliberti P. The physiopathology of the patent ductus arteriosus. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2009 Aug 27:1-4.

10. Iyer P, Evans N. Re-evaluation of the left atrial to aortic root ratio as a marker of patent ductus arteriosus. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1994 Mar;70(2):F112-7.
11. Ohlsson A, Walia R, Shah S. Ibuprofen for the treatment of patent ductus arteriosus in preterm and/or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008 Jan 23;(1):CD003481.
12. Pai VB, Sakadjian A., Puthoff TD. Ibuprofen lysine for the prevention and treatment of patent ductus arteriosus. *Pharmacotherapy* 2008 Sep; 28 (9): 1162-82.
13. Sekar KC, Corff KE. Treatment of patent ductus arteriosus: indomethacin or ibuprofen? *J. Perinatol* 2008 May; 28 Suppl.1: S60-2.
14. Varvarigou A., Bardin C.L., Beharry K., Chemtob S., Papageorgiou A., Aranda J.V. Early ibuprofen administration to prevent patent ductus arteriosus in premature newborn infants. *JAMA* 1996; 275: 539
15. Little DC, Pratt TC, Blalock SE, Krauss DR, Cooney DR, Custer MD. Patent ductus arteriosus in micropreemies and full-term infants: the relative merits of surgical ligation versus indomethacin treatment. *J Pediatr Surg.* 2003 Mar;38(3):492-6.
16. Antonucci R, Fanos V. NSAIDs, prostaglandins and the neonatal kidney. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2009 Aug 20:1-4.
17. McCurnin D, Seidner S, Chang LY, Waleh N, Ikegami M, Petershack J, Yoder B, Giavedoni L, Albertine KH, Dahl MJ, Wang ZM, Clyman RI. Ibuprofen-induced patent ductus arteriosus closure: physiologic, histologic, and biochemical effects on the premature lung. *Pediatrics.* 2008 May;121(5):945-56.
18. Hirt D, Van Overmeire B, Treluyer JM, Langhendries JP, Marguglio A, Eisinger MJ, Schepens P, Urien S. An optimized ibuprofen dosing scheme for preterm neonates with patent ductus arteriosus, based on a population

- pharmacokinetic and pharmacodynamic study. *Br J Clin Pharmacol*. 2008 May;65(5):629-36.
19. Otukesh H, Hoseini R, Hooman N, Chalian M, Chalian H, Tabarroki A. Prognosis of acute renal failure in children. *Pediatr Nephrol*. 2006 Dec;21(12):1873-8.
  20. Cuzzolin L, Fanos V, Pinna B, di Marzio M, Perin M, Tramontozzi P, Tonetto P, Cataldi L. Postnatal renal function in preterm newborns: a role of diseases, drugs and therapeutic interventions. *Pediatr Nephrol*. 2006 Jul;21(7):931-8.
  21. Patzer L. Nephrotoxicity as a cause of acute kidney injury in children. *Pediatr Nephrol*. 2008 Dec;23(12):2159-73.
  22. Fanos V, Cataldi L. Antibacterial-induced nephrotoxicity in the newborn. *Drug Saf*. 1999 Mar;20(3):245-67.
  23. Su BH, Lin HC, Chiu HY, Hsieh HY, Chen HH, Tsai YC. Comparison of ibuprofen and indometacin for early-targeted treatment of patent ductus arteriosus in extremely premature infants: a randomised controlled trial. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2008 Mar;93(2):F94-9.
  24. Giapros VI, Papadimitriou FK, Andronikou SK. Tubular disorders in low birth weight neonates after prolonged antibiotic treatment. *Neonatology*. 2007;91(2):140-4.
  25. Weitkamp JH, Poets CF, Sievers R, Musswessels E, Groneck P, Thomas P, Bartmann P. Candida infection in very low birth-weight infants: outcome and nephrotoxicity of treatment with liposomal amphotericin B (AmBisome). *Infection*. 1998 Jan-Feb;26(1):11-5.
  26. Jeon GW, Koo SH, Lee JH, Hwang JH, Kim SS, Lee EK, Chang W, Chang YS, Park WS. A comparison of AmBisome to amphotericin B for treatment of systemic candidiasis in very low birth weight infants. *Yonsei Med J*. 2007 Aug 31;48(4):619-26.



27. Abitbol CL, Bauer CR, Montané B, Chandar J, Duara S, Zilleruelo G. Long-term follow-up of extremely low birth weight infants with neonatal renal failure. *Pediatr Nephrol*. 2003 Sep;18(9):887-93.
28. Dötsch J, Plank C, Amann K, Ingelfinger J. The implications of fetal programming of glomerular number and renal function. *J Mol Med*. 2009 Sep;87(9):841-8.
29. White SL, Perkovic V, Cass A, Chang CL, Poulter NR, Spector T, Haysom L, Craig JC, Salmi IA, Chadban SJ, Huxley RR. Is low birth weight an antecedent of CKD in later life? A systematic review of observational studies. *Am J Kidney Dis*. 2009 Aug;54(2):248-61.
30. Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Defining and classifying acute renal failure: from advocacy to consensus and validation of the RIFLE criteria. *Intensive Care Med*. 2007 Mar;33(3):409-13.
31. Akcan-Arikan A, Zappitelli M, Loftis LL, Washburn KK, Jefferson LS, Goldstein SL. Modified RIFLE criteria in critically ill children with acute kidney injury. *Kidney Int*. 2007 May;71(10):1028-35.
32. Lavery AP, Meinen-Derr JK, Anderson E, Ma Q, Bennett MR, Devarajan P, Schibler KR. Urinary NGAL in premature infants. *Pediatr Res*. 2008 Oct;64(4):423-8.
33. Csaicsich D, Russo-Schlaff N, Messerschmidt A, Weninger M, Pollak A, Aufricht C. Renal failure, comorbidity and mortality in preterm infants. *Wien Klin Wochenschr*. 2008;120(5-6):153-7
34. Choker G, Gouyon JB. Diagnosis of acute renal failure in very preterm infants. *Biol Neonate*. 2004;86(3):212-6.
35. Mathur NB, Agarwal HS, Maria A. Acute renal failure in neonatal sepsis. *Indian J Pediatr*. 2006 Jun;73(6):499-502.
36. Subramanian S, Agarwal R, Deorari AK, Paul VK, Bagga A. Acute renal failure in neonates. *Indian J Pediatr*. 2008 Apr;75(4):385-91.

37. Miall LS, Henderson MJ, Turner AJ, Brownlee KG, Brocklebank JT, Newell SJ, Allgar VL. Plasma creatinine rises dramatically in the first 48 hours of life in preterm infants. *Pediatrics*. 1999 Dec;104(6):e76.
38. Coulthard MG, Hey EN, Ruddock V. Creatinine and urea clearances compared to inulin clearance in preterm and mature babies. *Early Hum Dev*. 1985 May;11(1):11-9.
39. Matos P, Duarte-Silva M, Drukker A, Guignard JP. Creatinine reabsorption by the newborn rabbit kidney. *Pediatr Res*. 1998 Nov;44(5):639-41.
40. Guignard JP, Drukker A. Why do newborn infants have a high plasma creatinine? *Pediatrics*. 1999 Apr;103(4):e49.
41. Gallini F, Maggio L, Romagnoli C, Marrocco G, Tortorolo G. Progression of renal function in preterm neonates with gestational age < or = 32 weeks. *Pediatr Nephrol*. 2000 Nov;15(1-2):119-24.
42. Schwartz GJ, Haycock GB, Edelmann CM Jr, Spitzer A. A simple estimate of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinine. *Pediatrics*. 1976 Aug;58(2):259-63.
43. Devarajan P. Emerging urinary biomarkers in the diagnosis of acute kidney injury. *Expert Opin Med Diagn*. 2008 Apr;2(4):387-398.
44. Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY, Kalandadze A, Cohen DJ, Devarajan P, Barasch J. Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Feb;18(2):407-13.
45. Schmidt-Ott KM, Mori K, Kalandadze A, Li JY, Paragas N, Nicholas T, Devarajan P, Barasch J. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin-mediated iron traffic in kidney epithelia. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006 Jul;15(4):442-9.
46. Yang J, Mori K, Li JY, Barasch J. Iron, lipocalin and kidney epithelia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285: F9-18.

47. Yang J, Blum A, Novak T, Levinson R, Lai E, Barasch J. An epithelial precursor is regulated by the ureteric bud and by the renal stroma. *Dev Biol* 2002; 246: 296-310
48. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, Ruff SM, Zahedi K, Shao M, Bean J, Mori K, Barasch J, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet*. 2005 Apr 2-8;365(9466):1231-8.
49. Parikh CR, Mishra J, Thiessen-Philbrook H, Dursun B, Ma Q, Kelly C, Dent C, Devarajan P, Edelstein CL. Urinary IL-18 is an early predictive biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. *Kidney Int*. 2006 Jul;70(1):199-203.
50. Hirsch R, Dent C, Pfriem H, Allen J, Beekman RH 3rd, Ma Q, Dastrala S, Bennett M, Mitsnefes M, Devarajan P. NGAL is an early predictive biomarker of contrast-induced nephropathy in children. *Pediatr Nephrol*. 2007 Dec;22(12):2089-95.
51. Brunner HI, Mueller M, Rutherford C, Passo MH, Witte D, Grom A, Mishra J, Devarajan P. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of nephritis in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2006 Aug;54(8):2577-84.
52. Mitsnefes MM, Kathman TS, Mishra J, Kartal J, Khoury PR, Nickolas TL, Barasch J, Devarajan P. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of renal function in children with chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2007 Jan;22(1):101-8.
53. Zappitelli M, Washburn KK, Arikan AA, Loftis L, Ma Q, Devarajan P, Parikh CR, Goldstein SL. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin is an early marker of acute kidney injury in critically ill children: a prospective cohort study. *Crit Care*. 2007;11(4):R84.

54. Parravicini E, Lorenz JM, Nemerofsky SL, O'Rourke M, Barasch J, Bateman D. Reference range of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in very low-birth-weight infants: preliminary data. *Am J Perinatol.* 2009 Jun;26(6):437-40.
55. Huynh TK, Bateman DA, Parravicini E, Lorenz JM, Nemerofsky SL, Sise ME, Bowman TM, Polesana E, Barasch JM. Reference Values of Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in Very Low Birth Weight Infants. *Pediatr Res.* 2009 Aug 12.
56. La Manna G, Galletti S, Capelli I, Vandini S, Nisi K, Aquilano G, Mancini R, Carretta E, Montini G, Faldella G, Stefoni S. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin at birth predicts early renal function in very low birth weight infants. *Pediatr Res.* 2011 Oct;70(4):379-83
57. Inoue H, Ohga S, Kusuda T, Kitajima J, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Honjo S, Hara T. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a predictor of the development of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. *Early Hum Dev.* 2013 Jan 16.
58. Tosse V, Pillekamp F, Verde P, Hadzik B, Sabir H, Mayatepek E, Hoehn T. Urinary NT-proBNP, NGAL, and H-FABP may predict hemodynamic relevance of patent ductus arteriosus in very low birth weight infants. *Neonatology.* 2012;101(4):260-6.
59. Genc G, Avci B, Aygun C, Ozkaya O, Kucukoduk S. Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in Septic Preterm Babies: A Preliminary Study. *Am J Perinatol.* 2012 Dec 31
60. van Timmeren MM, van den Heuvel MC, Bailly V, Bakker SJ, van Goor H, Stegeman CA. Tubular kidney injury molecule-1 (KIM-1) in human renal disease. *J Pathol.* 2007 Jun;212(2):209-17.

61. Nepal M, Bock GH, Sehic AM, Schultz MF, Zhang PL. Kidney injury molecule-1 expression identifies proximal tubular injury in urate nephropathy. *Ann Clin Lab Sci.* 2008 Summer;38(3):210-4.
62. Tarif N, Alwakeel JS, Mitwalli AH, Durdana H, Memon NA, Askar A, Chaudhary AR, Isnani AC. Serum cystatin C as a marker of renal function in patients with acute renal failure. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2008 Nov;19(6):918-23.
63. Herrero-Morín JD, Málaga S, Fernández N, Rey C, Diéguez MA, Solís G, Concha A, Medina A. Cystatin C and beta2-microglobulin: markers of glomerular filtration in critically ill children. *Crit Care.* 2007;11(3):R59.
64. Treiber M, Pecovnik-Balon B, Gorenjak M. Cystatin C versus creatinine as a marker of glomerular filtration rate in the newborn. *Wien Klin Wochenschr.* 2006;118 Suppl 2:66-70.
65. Armanji D, Yurdakök M, Canpolat FE, Korkmaz A, Yiğit S, Tekinalp G. Determination of reference values for plasma cystatin C and comparison with creatinine in premature infants. *Pediatr Nephrol.* 2008 Nov;23(11):2081-3.
66. Finney H, Newman DJ, Thakkar H, Fell JM, Price CP. Reference ranges for plasma cystatin C and creatinine measurements in premature infants, neonates, and older children. *Arch Dis Child.* 2000 Jan;82(1):71-5.
67. Dorum S, Silfeler I, Dorum BA, Silfeler DB, Canbak Y, Say A. Reference values of serum cystatin-C for full-term and preterm neonates in Istanbul. *Indian J Pediatr.* 2012 Aug;79(8):1037-42.
68. Elmas AT, Tabel Y, Elmas ON. Serum cystatin C predicts acute kidney injury in preterm neonates with respiratory distress syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2013 Mar;28(3):477-84.
69. Filler G, Lepage N. Should the Schwartz formula for estimation of GFR be replaced by cystatin C formula? *Pediatr Nephrol.* 2003 Oct;18(10):981-5.

70. Frankfurt JA, Duncan AF, Heyne RJ, Rosenfeld CR. Renal function and systolic blood pressure in very-low-birth-weight infants 1-3 years of age. *Pediatr Nephrol*. 2012 Dec;27(12):2285-91.
71. Andersen TB, Eskild-Jensen A, Frøkiaer J, Brøchner-Mortensen J. Measuring glomerular filtration rate in children; can cystatin C replace established methods? A review. *Pediatr Nephrol*. 2009 May;24(5):929-41.
72. Melnikov VY, Ecdar T, Fantuzzi G, Siegmund B, Lucia MS, Dinarello CA, Schrier RW, Edelstein CL. Impaired IL-18 processing protects caspase-1-deficient mice from ischemic acute renal failure. *J Clin Invest*. 2001 May;107(9):1145-52.
73. Parikh CR, Jani A, Melnikov VY, Faubel S, Edelstein CL. Urinary interleukin-18 is a marker of human acute tubular necrosis. *Am J Kidney Dis*. 2004 Mar;43(3):405-14.
74. Parikh CR, Abraham E, Ancukiewicz M, Edelstein CL. Urine IL-18 is an early diagnostic marker for acute kidney injury and predicts mortality in the intensive care unit. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Oct;16(10):3046-52. Epub 2005 Sep 7.
75. Washburn KK, Zappitelli M, Arikian AA, Loftis L, Yalavarthy R, Parikh CR, Edelstein CL, Goldstein SL. Urinary interleukin-18 is an acute kidney injury biomarker in critically ill children. *Nephrol Dial Transplant*. 2008 Feb;23(2):566-72.
76. Leslie JA, Meldrum KK. The role of interleukin-18 in renal injury. *J Surg Res*. 2008 Mar;145(1):170-5.
77. Mercado-Deane MG, Beeson JE, John SD. US of renal insufficiency in neonates. *Radiographics*. 2002 Nov-Dec;22(6):1429-38.
78. Chavhan GB, Parra DA, Mann A, Navarro OM. Normal Doppler spectral waveforms of major pediatric vessels: specific patterns. *Radiographics*. 2008 May-Jun;28(3):691-706.

79. Bude RO, DiPietro MA, Platt JF, Rubin JM, Miesowicz S, Lundquist C. Age dependency of the renal resistive index in healthy children. *Radiology*. 1992 Aug;184(2):469-73.
80. Murat A, Akarsu S, Ozdemir H, Yildirim H, Kalender O. Renal resistive index in healthy children. *Eur J Radiol*. 2005 Jan;53(1):67-71.
81. Cleary GM, Higgins ST, Merton DA, Cullen JA, Gottlieb RP, Baumgart S. Developmental changes in renal artery blood flow velocity during the first three weeks of life in preterm neonates. *J Pediatr*. 1996 Aug;129(2):251-7.
82. Armstrong DL, Teele RL, Kuschel CA, Harding JE. The use of renal Doppler ultrasonography to diagnose patent ductus arteriosus in preterm infants. *J Ultrasound Med*. 2001 Sep;20(9):1005-10.
83. Quigley R. Developmental changes in renal function. *Curr Opin Pediatr*. 2012 Apr;24(2):184-90.
84. Luyckx VA, Brenner BM. The clinical importance of nephron mass. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Jun;21(6):898-910.
85. Mañalich R, Reyes L, Herrera M, Melendi C, Fundora I. Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: a histomorphometric study. *Kidney Int*. 2000 Aug;58(2):770-3.
86. Hughson M, Farris AB 3rd, Douglas-Denton R, Hoy WE, Bertram JF. Glomerular number and size in autopsy kidneys: the relationship to birth weight. *Kidney Int*. 2003 Jun;63(6):2113-22.
87. Kandasamy Y, Smith R, Wright IM, Lumbers ER. Relationships between glomerular filtration rate and kidney volume in low-birth-weight neonates. *J Nephrol*. 2012 Oct 3:0.
88. Bagby SP. Developmental origins of renal disease: should nephron protection begin at birth? *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009 Jan;4(1):10-3.
89. Schreuder MF. Safety in glomerular numbers. *Pediatr Nephrol*. 2012. Oct;27(10):1881-7. doi: 10.1007/s00467-012-2169-x. Epub 2012 Apr 25.

90. Gubhaju L, Sutherland MR, Black MJ. Preterm birth and the kidney: implications for long-term renal health. *Reprod Sci.* 2011 Apr;18(4):322-33.
91. Simeoni U, Ligi I, Buffat C, Boubred F. Adverse consequences of accelerated neonatal growth: cardiovascular and renal issues. *Pediatr Nephrol.* 2011 Apr;26(4):493-508.
92. Baum M. Role of the kidney in the prenatal and early postnatal programming of hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010 Feb;298(2):F235-47.
93. Zandi-Nejad K, Luyckx VA, Brenner BM. Adult hypertension and kidney disease: the role of fetal programming. *Hypertension.* 2006 Mar;47(3):502-8.
94. Dötsch J, Plank C, Amann K, Ingelfinger J. The implications of fetal programming of glomerular number and renal function. *J Mol Med (Berl).* 2009 Sep;87(9):841-8.
95. Abitbol CL, Bauer CR, Montané B, Chandar J, Duara S, Zilleruelo G. Long-term follow-up of extremely low birth weight infants with neonatal renal failure. *Pediatr Nephrol.* 2003 Sep;18(9):887-93.
96. Bacchetta J, Harambat J, Guy B, Putet G, Cochat P, Dubourg L. [Long term renal outcome of children born preterm: a regular follow-up is needed]. *Arch Pediatre* 2009 Sep;16 Suppl 1:S42-8
97. Hallan S, Euser AM, Irgens LM, Finken MJ, Holmen J, Dekker FW. Effect of intrauterine growth restriction on kidney function at young adult age: the Nord Trøndelag Health (HUNT 2) Study. *Am J Kidney Dis.* 2008 Jan;51(1):10-20.
98. Zaffanello M, Brugnara M, Bruno C, Franchi B, Talamini G, Guidi G, Cataldi L, Biban P, Mella R, Fanos V. Renal function and volume of infants born with a very low birth-weight: a preliminary cross-sectional study. *Acta Paediatr.* 2010;99(8):1192-8.
99. Keijzer-Veen MG, Schrevel M, Finken MJ, Dekker FW, Nauta J, Hille ET, Frölich M, van der Heijden BJ; Dutch POPS-19 Collaborative Study Group. Microalbuminuria and lower glomerular filtration rate at young adult age in



- subjects born very premature and after intrauterine growth retardation. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Sep;16(9):2762-8.
100. Rodríguez-Soriano J, Aguirre M, Oliveros R, Vallo A. Long-term renal follow-up of extremely low birth weight infants. *Pediatr Nephrol*. 2005 May;20(5):579-84.
  101. Rakow A, Johansson S, Legnevall L, Sevastik R, Celsi G, Norman M, Vanpée M. Renal volume and function in school-age children born preterm or small for gestational age. *Pediatr Nephrol*. 2008 Aug;23(8):1309-15.
  102. Duncan AF, Rosenfeld CR, Morgan JS, Ahmad N, Heyne RJ. Interrater reliability and effect of state on blood pressure measurements in infants 1 to 3 years of age. *Pediatrics*. 2008 Sep;122(3):e590-4.
  103. Duncan AF, Heyne RJ, Morgan JS, Ahmad N, Rosenfeld CR. Elevated systolic blood pressure in preterm very-low-birth-weight infants  $\leq 3$  years of life. *Pediatr Nephrol*. 2011 Jul;26(7):1115-21.
  104. McEniery CM, Bolton CE, Fawke J, Hennessy E, Stocks J, Wilkinson IB, Cockcroft JR, Marlow N. Cardiovascular consequences of extreme prematurity: the EPICure study. *J Hypertens*. 2011 Jul;29(7):1367-73.
  105. Pharoah PO, Stevenson CJ, West CR. Association of blood pressure in adolescence with birthweight. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 1998 Sep;79(2):F114-8.
  106. Hack M, Schluchter M, Cartar L, Rahman M. Blood pressure among very low birth weight (<1.5 kg) young adults. *Pediatr Res*. 2005 Oct;58(4):677-84.
  107. Hovi P, Andersson S, Räikkönen K, Strang-Karlsson S, Järvenpää AL, Eriksson JG, Pesonen AK, Heinonen K, Pyhälä R, Kajantie E. Ambulatory blood pressure in young adults with very low birth weight. *J Pediatr*. 2010 Jan;156(1):54-59.e1.

108. Dalziel SR, Parag V, Rodgers A, Harding JE. Cardiovascular risk factors at age 30 following pre-term birth. *Int J Epidemiol*. 2007 Aug;36(4):907-15.
109. Keijzer-Veen MG, Dülger A, Dekker FW, Nauta J, van der Heijden BJ. Very preterm birth is a risk factor for increased systolic blood pressure at a young adult age. *Pediatr Nephrol*. 2010 Mar;25(3):509-16.
110. Franke D, Völker S, Haase S, Pavicic L, Querfeld U, Ehrich JH, Zivicnjak M. Prematurity, small for gestational age and perinatal parameters in children with congenital, hereditary and acquired chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2010 Dec;25(12):3918-24.
111. Bertino E, Spada E, Occhi L, Coscia A, Giuliani F, Gagliardi L, Gilli G, Bona G, Fabris C, De Curtis M, Milani S. Neonatal Anthropometric Charts: The Italian neonatal study compared with other European studies. *JPGN*, 2010; 51: 353-361
112. Cole TJ, Green PJ: Smoothing reference centile curves: the LMS method and penalized likelihood. *Stat Med*, 1992; 11: 1305-19
113. Gairdner D, Pearson J. Revised Gairdner-Pearson growth charts. *Arch Dis Child* 1985;60:12
114. National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescents. The fourth report on the diagnosis, evaluation, and treatment of high blood pressure in children and adolescents. *Pediatrics*. 2004 Aug;114(2 Suppl 4th Report):555-76.
115. Dinkel E, Ertel M, Dittrich M, Peters H, Berres M, Schulte-Wissermann H. Kidney size in childhood. Sonographical growth charts for kidney length and volume. *Pediatr Radiol*. 1985;15(1):38-43.
116. NORDIN BE, FRASER R. Assessment of urinary phosphate excretion. *Lancet*. 1960 Apr 30;1(7131):947-51.
117. Steiner RW. Interpreting the fractional excretion of sodium. *Am J Med*. 1984 Oct;77(4):699-702.

118. Bacchetta J, Cochat P. [What about the long-term renal outcome of premature babies?]. *Arch Pediatr*. 2008 Jul;15(7):1212-22.
119. Baraldi E, Filippone M. Chronic lung disease after premature birth. *N Engl J Med*. 2007 Nov 8;357(19):1946-55.
120. El Bakkali L, Rodrigues Pereira R, Kuik DJ, Ket JC, van Wijk JA. Nephrotic syndrome in The Netherlands: a population-based cohort study and a review of the literature. *Pediatr Nephrol*. 2011 Aug;26(8):1241-6.