

LA QUANTIFICAZIONE PRATICA DELL'EFFICIENZA DIALITICA PER LE MEDIE MOLECOLE IN DIALISI E NELLE TECNICHE CONVETTIVE E MISTE

F.G. Casino, T. Lopez

Unità Operativa di Nefrologia e Dialisi, Ospedale Madonna delle Grazie, Matera

Quantifying dialysis efficiency for Middle Molecules in Haemodialysis and in Convective and Mixed Techniques

In contrast to the negative results of the primary analysis, secondary analyses of the HEMO study do support the clinical importance of middle molecule removal. This is in agreement with the findings of large observational studies showing an improvement in mortality and morbidity in dialysis patients treated with high-flux hemodialysis or convective techniques as compared to low-flux hemodialysis. For practical assessment of middle molecule removal, we suggest using the Kt/V of $\beta 2$ -microglobulin ($Kt/V_{\beta 2-m}$) with a reference (adequate) value of ≥ 0.66 , which was the average value for the high-flux arm in the HEMO study. For patients on low-flux hemodialysis, where $Kt/V_{\beta 2-m}$ cannot reliably be assessed, we suggest using the Kt/V of vitamin B12 (Kt/V_{B12}), with a reference (adequate) value of ≥ 0.74 , adapted from the findings of the Case Mix Adequacy Study (AJKD 1999). To simplify the routine assessment of these indices, two nomograms are introduced: the first allows to estimate $Kt/V_{\beta 2-m}$ from the post- to pre-dialysis $\beta 2$ -microglobulin concentration ratio, the second allows to estimate the diffusion dialysis clearance of vitamin B12 from the in vitro dialyzer KoA_{B12} and actual plasma water flow rate. While waiting for specific trials addressing the issue of dialysis adequacy related to middle molecule removal, clinical experience with the middle molecule indices could provide further quantitative tools for dialysis prescription and favor an increase in dialysis time (or frequency) and/or the use of high-flux hemodialysis and convective techniques. (G Ital Nefrol 2008; 25: 66-75)

Conflict of interest: None

KEY WORDS:

$\beta 2$ -microglobulin,
Dialysis
adequacy,
Middle
Molecules,
Vitamin B12

PAROLE CHIAVE:

Adeguatezza
dialitica,
 $\beta 2$ -microglobulina,
Medie Molecole,
Vitamina B12

✉ Indirizzo degli Autori:

Dr. Francesco G. Casino
U.O. di Nefrologia e Dialisi
Ospedale Madonna delle Grazie
C. da Cattedra Ambulante
75100 Matera
e-mail: asl4.dialisi@regione.basilicata.it

INTRODUZIONE

La quantificazione dell'efficienza dialitica si basa sui comuni principi di farmaco-cinetica applicati a specifici soluti ritenuti tossici (tossine uremiche) o *marker* di tossine aventi caratteristiche fisico-chimiche simili (1-4).

Come è noto, il soluto più usato per quantificare la dialisi è l'urea. Le ragioni di tale successo sono diverse: l'urea, oltre ad essere un *marker* delle tossine a basso peso molecolare, può permettere la stima della velocità del catabolismo proteico. Un altro aspetto non trascurabile è la semplicità e l'accuratezza della misura analitica dell'urea. Infine, il profilo della concentrazione ematica dell'urea, sia durante la dialisi sia nel periodo interdialitico, può essere descritto da un modello cinetico relativamente semplice (UKM) (1-4). Tuttavia, fin dai primi anni '70, diversi Autori hanno criticato la scelta

dell'urea come soluto di riferimento per la quantificazione dialitica, a causa della sua scarsa tossicità intrinseca, sostenendo la necessità di rimuovere piuttosto soluti certamente tossici e di maggior peso molecolare. In tale contesto, un indice di adeguatezza dialitica basato sulla depurazione delle cosiddette medie molecole (MM) fu suggerito in base all'osservazione che la neuropatia era meno frequente in pazienti con Creatinina Clearance (CrCl) ≥ 3 mL/min (5). In particolare, come *marker* delle MM fu scelta la Vitamina B12 (1355 Da) e la sua clearance dialitica (K_{B12}), fu equiparata alla CrCl renale. In accordo, l'indice dialitico (ID_{B12}) fu ritenuto adeguato se la somma totale dei litri depurati con la dialisi e con la CrCl renale nella settimana era almeno pari a 30 L (3 mL/min \times 10080 min), normalizzata per la superficie corporea (5). È importante notare che le membrane allora disponibili avevano una bassa permeabilità alle MM

TABELLA I - PRINCIPALI TOSSINE UREMICHE INDIVIDUATE DALL'EUTOX WORK GROUP (11)

Piccole molecole idrosolubili	P.M. (Daltons)	Piccole molecole legate alle proteine	P.M. (Daltons)	Medie Molecole	P.M. (Daltons)
Ac. Guanidinoacetico	117	Ac. Indolacetico	175	Adrenomedullina	5279
Ac. Guanidinopropionico	131	Ac. Ippurico	179	β 2-microglobulina	11800
Ac. Guanidinosuccinico	175	CMPF*	240	β -Endorfina	3465
ADMA	202	Deoxiglucosone	162	Catene leggere k	25000
Alcool Benzilico	108	Fenolo	94	Catene leggere λ .	25000
Creatinina	113	Idrochinone	110	Fattore D compl.	23400
Guanidina	59	Metilgliossale	72	Interleuchina-1 β	32000
Malondialdeide	71	NCarbossimetilisina	204	Interleuchina-6	24500
Metilguanidina	73	Omocisteina	135	Leptina	16000
Mioinositolo	180	P-cresolo	108	Neuropeptide Y	9000
Urea	60	Putrescina	88	PTH	9000
Ac. Urico	168	Spermidina	145	Pept. Natriur. atr.	3000
Xantina	152	Spermina	202	TNF- α	26000

Nota: * CPMF= acido carbossi-metil-propionil-furanopropionico

e, quindi, avevano una K_{B12} bassa e non sensibile all'aumento del flusso ematico (Q_b); al contrario, la *clearance* dialitica dell'urea aumentava con il Q_b . Pertanto, l'unico modo per aumentare la rimozione di MM era l'aumento della superficie della membrana e/o della durata della seduta di emodialisi (HD). Per tale motivo (e per le difficoltà di misurare e modellare la Vitamina B12), nel *National Cooperative Dialysis Study* (NCDS) (6, 7), il primo *trial* specificamente diretto a testare la relativa superiorità dell'urea o delle MM, furono definiti 2 gruppi di pazienti, uno con seduta breve (bassa rimozione di MM) e uno con seduta lunga (alta rimozione di MM). Inoltre, in ognuno di questi 2 gruppi furono creati 2 gruppi: uno con BUN basso (alta rimozione di urea) e l'altro con BUN alto (bassa rimozione di urea). Se i risultati (di morbilità) fossero stati significativamente migliori nei gruppi con sedute lunghe, sarebbe stata provata la superiorità delle MM. Purtroppo, i risultati del gruppo con sedute lunghe furono migliori di quello con sedute brevi, ma non in modo significativo (7), probabilmente per le piccole dimensioni del campione e anche per problemi di interpretazione del significato e dei limiti del "P" statistico, come recentemente rivisto da Ravani e Andrulli (8). Invece risultarono significativamente migliori i risultati nei pazienti nei gruppi con elevata depurazione delle piccole molecole (BUN basso), rispetto a quelli con BUN alto (7). Ciò determinò la scomparsa di ID_{B12} dalla letteratura e l'affermazione dell'urea, con la successiva introduzione del Kt/V dell'urea (9), che si è ormai imposto come indice più diffuso dell'adeguatezza dialitica (10).

Tuttavia, le critiche al NCDS e soprattutto il persistere di tassi elevati di mortalità e morbilità nei pazienti

in dialisi convenzionale, anche in presenza di livelli ritenuti adeguati di Kt/V , hanno sempre costituito uno stimolo a cercare di modellare la dialisi utilizzando anche altri soluti realmente tossici, nella speranza che ciò si traducesse in un miglioramento dell'outcome clinico. Come riassunto in una recente *review* della *European Uremic Toxin Work Group* (EUTox) (11), nel corso degli anni la ricerca continua delle tossine uremiche ha portato all'individuazione di numerose sostanze che: 1) presentano una concentrazione aumentata in corso di uremia; 2) sperimentalmente possono indurre alterazioni tipiche dell'uremia; 3) possono essere più o meno facilmente rimosse dalla dialisi. La maggior parte di queste tossine sono associate al metabolismo proteico ed hanno un basso peso molecolare (p.m.) <500 Daltons (Da), ma ci sono anche molecole con p.m. nel range tra 500 e 12000 D, ed altre con un peso ancora maggiore. In sintesi, le sostanze individuate come responsabili di alterazioni uremiche sono state classificate in 3 gruppi: 1) piccoli composti idrosolubili, con p.m. <500 Da, (N=45); 2) soluti legati alle proteine (N=25); 3) Medie Molecole, con p.m. >500 Da, (N=22). Alcune delle principali tossine sono riportate in Tabella I. Da notare che la classificazione dell'EUTox *group* si riferisce ai soli composti organici, per cui a queste tossine vanno aggiunte altre sostanze inorganiche tossiche che si accumulano nel paziente uremico, come, per esempio, il potassio ed il fosfato e la stessa acqua. La conclusione finale dell'EUTox *work group* è stata la seguente: "la concentrazione dei soluti ritenuti in corso di uremia varia in un ampio range da ng/L a g/L. Le concentrazioni delle MM sono quelle relativa-

mente più basse. Un gran numero di molecole sono legate alle proteine e/o sono nel *range* delle MM. Molte di esse sono tossiche e sono caratterizzate da un ampio *range* del rapporto CU/CN, cioè tra le concentrazioni nell'uremia (CU) ed i valori normali (CN). Pertanto, la ritenzione uremica è un problema complesso che riguarda un numero molto maggiore di soluti piuttosto che le solite urea e creatinina" (11).

Tali conclusioni chiaramente invitano ad allargare lo spettro dei soluti da rimuovere con la dialisi. Incidentalmente, l'allargamento dello spettro dei soluti da rimuovere è ora almeno in parte già possibile proprio perché la ricerca sulle tossine di maggior peso molecolare ha portato allo sviluppo di nuove membrane sintetiche più permeabili (e biocompatibili) e delle tecniche convettive (emofiltrazione, HF) e miste (emodiafiltrazione, HDF), nonché della produzione *on-line* di liquidi ultrapuri (12); inoltre si stanno sviluppando nuove metodiche di adsorbimento selettivo (13).

Le membrane convenzionali rimuovono facilmente le piccole molecole idrosolubili, come l'urea (60 Da), la creatinina (113 Da), vari composti guanidinici (63-175 Da) e la dimetil argininina asimmetrica (ADMA) (202 Da) (14), e anche la frazione libera di piccoli soluti legati alle proteine, come la pentosidina (379 Da) (15). D'altra parte, la dialisi ad alto flusso con membrane molto permeabili fornisce una sostanziale rimozione di molecole più grandi, come per esempio i piccoli peptidi AGE (<12 kDa) (16). Tuttavia solo le tecniche convettive (HF o HDF), soprattutto con la produzione *on-line* dei liquidi di sostituzione, che consente elevati volumi di scambio, permettono un ulteriore aumento della rimozione ed un allargamento dello spettro dei soluti uremici rimossi (17, 18).

Poiché i composti medio-molecolari riportati in Tabella I hanno tutti un ruolo importante o sono in qualche modo associati ad alcune delle più frequenti complicanze e cause di morte nei pazienti in HD, come l'amiloidosi dialitica, la malattia cardiovascolare, l'iperparatiroidismo, l'infiammazione e la malnutrizione, la loro aumentata rimozione potrebbe prevenire o ritardare la comparsa delle complicanze. In effetti, è stato confermato che i pazienti in HD con membrana *high-flux* (19) o in HF/HDF (20) hanno livelli significativamente più bassi di β_2 -m e ciò si associa ad un ridotta incidenza della sindrome del tunnel carpale e dell'amiloidosi. Inoltre, sembrerebbe che, a parità di Kt/V dell'urea, le membrane *high-flux* consentano di ridurre la dose di eritropoietina e ciò potrebbe essere attribuito all'aumentata rimozione di soluti di medio e alto peso molecolare (21-24); tuttavia, ciò non è stato confermato in altri studi, in cui i pazienti erano adeguatamente dializzati e non avevano carenze di ferro e vitamine (25, 26). L'aspetto più importante, però, è la possibilità che le membrane ad alto flusso e soprattutto le

tecniche convettive agiscano favorevolmente sui fattori di rischio della malattia cardiovascolare, che rimane la più comune causa di morbilità e mortalità nel paziente nefropatico (27). In effetti molte MM, come Leptina, interleukine, TNF- α , ecc., sono associate al tipico quadro di malnutrizione-infiammazione-aterosclerosi (28, 29), e l'aumento della loro rimozione dovrebbe avere un effetto clinico favorevole. Infine, anche l'aumentata rimozione di fosforo ottenibile con l'HDF (17, 18), dovrebbe contribuire a migliorare il profilo di rischio cardiovascolare (30). A completamento dei dati sopra riportati, diversi studi osservazionali (31-33) hanno ottenuto una riduzione della mortalità con l'uso delle membrane ad alto flusso e/o delle tecniche convettive. Anche se non è sempre facile dissociare l'effetto dell'alto flusso da quello della migliore biocompatibilità delle membrane sintetiche, in uno di questi studi (31), la stima della rimozione delle MM basata sui valori della K_{B12} , ha mostrato una correlazione inversa tra i litri totali depurati (TCV_{B12}) per seduta e la mortalità: il rischio di morte posto pari a 1 con $TCV_{B12} = 10$ L/seduta (cioè = 30 L/settimana in ritmo trisettimanale, ovvero, $ID_{B12} = 1$), diventava 0.79 con $TCV = 16$ L e 0.62 con $TCV=26$ L, a parità di Kt/V dell'urea. Sulla base di questo quadro di insieme, il gruppo di lavoro delle Linee Guida Europee (EBPG) sull'adeguatezza in HD ha suggerito l'utilità di aumentare la rimozione delle MM, usando non solo membrane ad alto flusso, ma anche le tecniche convettive o sedute più lunghe o più frequenti. Inoltre, lo stesso gruppo di lavoro, sulla base di considerazioni teoriche e pratiche, ha scelto la β_2 -microglobulina (β_2 -m) come *marker* delle MM (34). In modo del tutto inatteso, l'analisi primaria dell'*HEMO study* (35), l'unico studio prospettico randomizzato specificamente finalizzato a valutare l'effetto dell'aumento della dose di dialisi e dell'uso di membrane ad alto flusso sulla mortalità nei pazienti in HD, non ha trovato differenze statisticamente significative né per la dose né per il flusso. In particolare, il flusso è stato valutato in base alla clearance dialitica della β_2 -m (K_{β_2-m}), misurata cinematicamente (36); l'alto flusso richiedeva $K_{\beta_2-m} > 20$ mL/min; i due bracci del flusso avevano i seguenti valori di K_{β_2-m} : 3.4 ± 7.2 mL/min (basso flusso) e 33.7 ± 11.4 mL/min (alto flusso); la riduzione della mortalità nel braccio ad alto flusso era pari all'8%, ma non era statisticamente significativa: rischio relativo (RR) 0.92, intervallo di confidenza (IC95%) 0.8-1.06. A parte i valori relativamente vicini delle K_{β_2-m} nei due bracci del flusso, e alcune critiche metodologiche (37), che possono almeno in parte inficiare le conclusioni generali all'*HEMO study*, c'è da osservare che nel braccio ad alto flusso c'era una significativa riduzione (del 20%) del rischio di eventi cardiaci, rispetto al braccio a basso flusso (35, 38): RR 0.80, IC95% 0.65-0.99 per la morte cardiaca e RR 0.87, IC95% 0.76-

1.00, per l'*outcome* composito di prima ospedalizzazione per cause cardiache o morte cardiaca. Inoltre l'effetto della dialisi ad alto flusso sulla mortalità globale sembrava variare in funzione del periodo trascorso in dialisi prima dell'arruolamento nello studio, essendoci una riduzione statisticamente significativa (del 32%), solo nel gruppo con maggiore anzianità dialitica (>3.7 anni): RR 0.68, IC95% 0.53-0.86 (35, 38). Nella stessa direzione, cioè a favore dell'utilità della β 2-m come *marker* delle MM e come potenziale guida per l'adeguatezza dialitica, un'ulteriore analisi dell'*HEMO Study* ha dimostrato che i livelli sierici di β 2-m sono importanti predittori della mortalità nei pazienti in dialisi (39). In particolare, i principali determinanti dei livelli sierici di β 2-m erano la *clearance* renale residua dell'urea (K_{ru}) e la $K_{\beta 2-m}$. Inoltre, la razza nera e gli anni di dialisi al momento dell'ingresso nello studio correlavano positivamente con i livelli sierici di β 2-m, mentre l'età, il diabete, l'albuminemia e l'indice di massa corporea (BMI) correlavano negativamente. Utilizzando i modelli tempo-dipendenti della regressione di Cox, i livelli sierici medi cumulativi della β 2-m, ma non la $K_{\beta 2-m}$, erano associati alla mortalità globale: RR=1.11 per ogni aumento di 10 mg/dL della β 2-m; IC95% 1.05-1.19, $P<0.001$), dopo aggiustamento per K_{ru} e per la durata di dialisi all'inizio studio.

A conclusione di questa rassegna, bisogna comunque riconoscere che, nonostante i numerosi dati a favore dei trattamenti ad alto flusso e, soprattutto, dei trattamenti convettivi, solo un ampio studio randomizzato potrà fornire la prova definitiva dell'utilità clinica di tali trattamenti. In attesa di un tale studio, però, non si possono trascurare i risultati ottenuti finora e può essere utile estendere i parametri di adeguatezza dialitica al di là del semplice Kt/V dell'urea, cercando di introdurre nella pratica routinaria la quantificazione almeno dei più semplici indici di rimozione delle MM.

TEST DI VERIFICA

1) Qual è la classificazione attuale (EUTox) delle tossine uremiche?

- piccole molecole; 2) medie molecole; 3) grandi molecole
- 1) piccole molecole; 2) molecole legate alle proteine
- 1) piccoli soluti idrosolubili; 2) soluti legati alle proteine; 3) medie molecole
- 1) piccole molecole; 2) medie molecole.

2) Qual è il limite inferiore per le Medie Molecole, secondo la nuova classificazione?

- 200 Daltons
- 300 Daltons

- 400 Daltons
- 500 Daltons
- 2000 Daltons.

3) Quale dei seguenti soluti non appartiene al gruppo delle Medie Molecole?

- β 2-microglobulina
- Paratormone
- Leptina
- Interleuchina-6
- Omocisteina.

4) Qual è il vantaggio sicuramente documentato offerto dalla dialisi ad alto flusso e dalle tecniche convettive o miste (HDF/HF)?

- Miglioramento della mortalità
- Miglioramento della morbilità cardiovascolare
- Miglioramento dell'anemia
- Miglioramento dell'amiloidosi associata alla dialisi.

La risposta corretta alle domande sarà disponibile sul sito internet www.sin-italy.org/gin e in questo numero del giornale cartaceo dopo il Notiziario SIN

QUANTIFICAZIONE PRATICA DEGLI INDICI DI RIMOZIONE DELLE MM

β 2-microglobulina

C'è ormai consenso che la β 2-m (11800 Da) è il soluto raccomandato come *marker* delle MM (34, 35). Il comportamento di questo soluto, sebbene sia chiaramente di tipo multicompartmentale, con un significativo *rebound* post-dialitico e un'importante *clearance extrarenale*, almeno per scopi clinici, come mostrato dall'*HEMO Study* (35), può essere sufficientemente descritto da un modello cinetico monocompartmentale semplificato (36). Quest'ultimo è molto simile al modello standard dell'urea (4), essendo *single-pool* con volume variabile, ma, per evitare il calcolo iterativo ed il modeling sull'intera settimana, ignora la generazione intradialitica di β 2-m e la sua *clearance* extradialitica. Come illustrato in appendice, queste semplificazioni rendono possibile il calcolo della *clearance* dialitica media della seduta ($K_{\beta 2-m}$) con l'equazione 1a, che richiede i seguenti dati: durata della seduta (t), perdita di peso (UF) durante la seduta, concentrazione sierica della β 2-m all'inizio (C_{pre}) e alla fine della seduta (C_{post}), volume di distribuzione di β 2-m ($V_{\beta 2-m}$). Quest'ultimo corrisponde al volume extracellulare, e può essere stimato come 1/3 del volume dell'urea (V_u) (36).

A questo punto, è importante osservare che, analogamente a quanto avviene per la cinetica per l'urea (40), se il clinico è interessato alla misura di $Kt/V_{\beta 2-m}$ piuttosto che della sola $K_{\beta 2-m}$, non è necessario disporre di un valore accurato di $V_{\beta 2-m}$, ma è sufficiente utilizzare un valore realistico: infatti, l'errore di $V_{\beta 2-m}$ induce un proporzionale errore nella stima di $K_{\beta 2-m}$, sicché il rapporto tra i due parametri e, quindi, $Kt/V_{\beta 2-m}$, rimane sufficientemente costante. Alcuni esempi riportati in appendice mostrano che, assumendo V_u pari al 50% del peso corporeo a fine dialisi, errori di V_u nell'ordine del $\pm 20\%$ si traducono in errori di $Kt/V_{\beta 2-m}$ intorno al $\pm 5\%$. È importante osservare che, assumendo V_u come frazione del peso finale, si può dimostrare che il calcolo di $Kt/V_{\beta 2-m}$ è funzione di 2 soli fattori: il rapporto C_{post}/C_{pre} e il rapporto UF/Peso finale (UF/PF). Su questa base, è possibile disegnare una famiglia di curve che esprimono la relazione tra $Kt/V_{\beta 2-m}$ e C_{post}/C_{pre} per livelli discreti di UF/PF (Fig. 1): ciò permette una stima immediata di $Kt/V_{\beta 2-m}$ in base ai valori attuali di questi due parametri. Nell'esempio in Figura 1 si vede che ad un $C_{post}/C_{pre} = 0.5$ con UF/PF = 4% corrisponde $Kt/V_{\beta 2-m} = 1$.

Come livello di adeguata rimozione delle MM, si potrebbe almeno provvisoriamente considerare il valore medio di $Kt/V_{\beta 2-m}$ ottenuto nel braccio ad alto flusso dell'*HEMO Study*, che era 0.66 (38, 39). Ovviamente, valori simili sono ottenibili solo in HD con membrane ad alto flusso, e valori ancora più alti sono raggiungibili solo in HDF o in HF. Nello stesso studio i valori medi dei pazienti nel braccio a basso flusso avevano un valore medio di $Kt/V_{\beta 2-m}$ intorno allo zero, con molti valori individuali negativi (38, 39), a documentare che il modello cinetico monocompartimentale utilizzato, in questi casi, non è molto realistico. Ciò, tra l'altro, può spingere alla ricerca di qualche altro *marker* di MM di minor peso molecolare, da utilizzare almeno per valutare l'adeguata rimozione delle MM più piccole non solo nella dialisi convenzionale, ma anche nelle metodiche ad alti flussi.

TEST DI VERIFICA

5) Con quali mezzi è possibile aumentare la rimozione delle medie molecole?

- Membrane ad alto flusso
- Tecniche convettive o miste
- Sedute dialitiche più lunghe
- Sedute dialitiche più frequenti
- Tutti i precedenti.

6) In base a quale valore della clearance dialitica della $\beta 2-m$ è stato definito l'alto flusso nell'*HEMO Study*?

- ≥ 10 mL/min

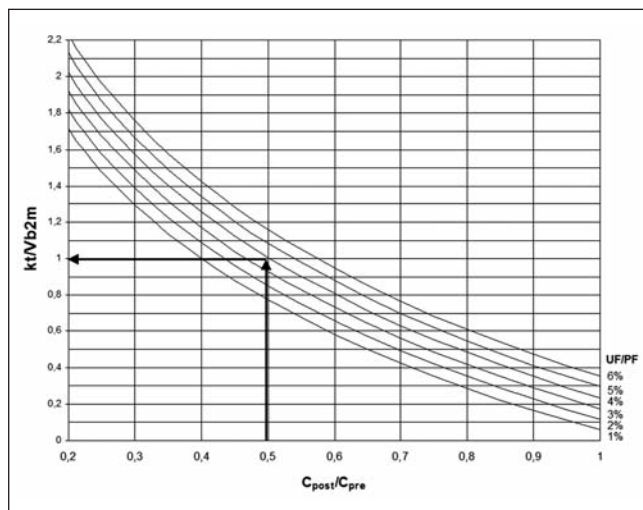


Fig. 1 - Relazione tra $Kt/V_{\beta 2-m}$ e rapporto C_{post}/C_{pre} della $\beta 2$ -microglobulina a vari livelli del rapporto ultrafiltrazione/peso finale (UF/PF). Nell'esempio in Figura, seguendo le linee in grassetto si vede che ad un $C_{post}/C_{pre} = 0.5$ con UF/PF = 4% corrisponde $Kt/V_{\beta 2-m} = 1$.

- ≥ 20 mL/min
- ≥ 30 mL/min
- ≥ 40 mL/min.

7) Qual è il peso molecolare della $\beta 2$ -microglobulina?

- 11800 Daltons
- 13800 Daltons
- 15000 Daltons
- 25000 Daltons.

Vitamina B12

La Vitamina B12 (1355 Da) è stato il primo soluto ad essere utilizzato come *marker* delle MM e la sua *clearance* dialitica (K_{B12}) è alla base dell'indice di Babb (ID_{B12}) (5). Purtroppo, questo soluto, oltre a non essere una tossina e a non essere facilmente misurabile, ha un forte legame proteico che impedisce di misurare la sua K dialitica (K_{B12}) *in vivo* (41). Al contrario, la K_{B12} *in vitro* viene valutata (e riportata) sistematicamente da tutte le Ditte costruttrici di dializzatori e ciò permette di calcolare il prodotto Permeabilità per Area (KoA) della Vitamina B12 (KoA_{B12}) che, a sua volta, può permettere il calcolo della K_{B12} virtuale *in vivo* (ipotizzando l'assenza di legame proteico). Per superare il problema del legame proteico, Clark et al. (41) hanno suggerito di sostituire la Vitamina B12, come *marker* di MM, con la Vancomicina, che ha un p.m. molto simile, ma un basso legame proteico. Tuttavia, anche la

Vancomicina non è una vera tossina e non è di facile misurazione. D'altra parte, Leypoldt et al. (36) hanno mostrato che la K_{B12} virtuale *in vivo*, o meglio il Volume totale depurato nell'intera seduta (TCV_{B12}), è un predittore di mortalità indipendente dal Kt/V dell'urea. Inoltre, l'uso del Kt/V della Vitamina B12 (Kt/V_{B12}) è stato suggerito come indice di adeguatezza dialitica, in aggiunta al classico Kt/V dell'urea, senza nessun costo aggiuntivo (42, 45).

Come illustrato in appendice, la K_{B12} totale, può essere calcolata utilizzando la formula di Jaffrin, che alla componente diffusiva (KdO_{B12}) aggiunge una componente convettiva pari al 43% del flusso di ultrafiltrazione totale (Q_{uf}) (36, 43). Tale formula è stata utilizzata da Leypoldt et al. solo in pazienti in HD (36), però, almeno per l'urea e per la Vitamina B12 è stata utilizzata anche in HDF (42). In effetti, confrontando i risultati ottenuti con questa formula con quelli ottenuti con formule (molto più complesse) specifiche per l'HDF (44), non si osservano differenze apprezzabili per l'urea, mentre c'è un errore clinicamente accettabile (inferiore al 10%) per la Vitamina B12 (dati personali, non pubblicati).

La clearance diffusiva (KdO) della Vitamina B12 si calcola con la formula classica (3, 36), però, come descritto in dettaglio in appendice, è possibile ottenere una stima approssimata usando un metodo grafico. In effetti, KdO_{B12} dipende da 3 fattori: il flusso in acqua plasmatica (Q_{pw}), il flusso del dialisato (Q_d) e il KoA_{B12} , però fissando Q_d al solito valore di 500 mL/min, è possibile disegnare una famiglia di curve che esprimono la relazione tra KdO_{B12} e Q_{pw} per livelli discreti di KoA_{B12} (Fig. 2). L'esempio illustrato in Figura 2 mostra che con $Q_{pw} = 200$ mL/min e $KoA_{B12} = 250$ mL/min si ha $KdO_{B12} = 130$ mL/min. Lo stesso esempio può essere interpretato per stimare che ad un valore di KdO_{B12} pari a 130 mL/min, misurato *in vitro* (dalla Ditta costruttrice) con un flusso acquoso di 200 mL/min, corrisponde $KoA_{B12} = 250$ mL/min. Questo aspetto è importante perché le Ditte riportano solitamente il valore della clearance *in vitro*, ma non il KoA , che invece serve, come visto sopra, per stimare la clearance diffusiva *in vivo*.

Come già detto, la clearance totale (K_{B12}) si ottiene sommando $KdO_{B12} + 0.43 Q_{uf}$, e il TCV_{B12} viene calcolato moltiplicando K_{B12} per la durata della seduta. Infine il Kt/V_{B12} corrisponde al rapporto tra TCV_{B12} e il Volume dell'urea (44). Poiché il Kt/V_{B12} così calcolato rappresenta solo un modo per rapportare TCV_{B12} alle dimensioni del paziente, è utile che insieme al valore di Kt/V_{B12} sia riportato anche il valore di TCV_{B12} o di V_u .

Infine, come obiettivo della prescrizione, si potrebbe scegliere almeno un TCV di 16 L, ottenibile facilmente in HD convenzionale (42) e che nello studio di Leypoldt et al. era associato ad una riduzione della mortalità

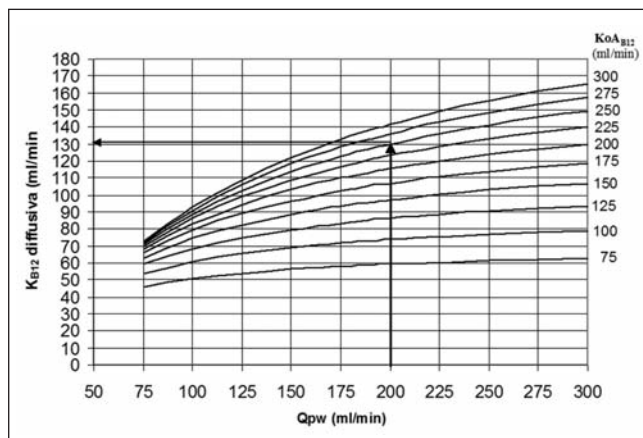


Fig. 2 - Relazione tra flusso di acqua plasmatica (Q_{pw}) e clearance diffusiva della Vitamina B12 (KdO_{B12}), a vari livelli di KoA_{B12} e a Q_d di 500 mL/min. Nota: Il valore di KdO_{B12} si ottiene dalla proiezione sull'asse Y del punto di intersezione tra la linea verticale in origine dal valore di Q_{pw} e la curva di KdO_{B12} associata al valore del KoA_{B12} del filtro utilizzato. Nell'esempio in Figura ad un $Q_{pw} = 200$ mL/min con $KoA_{B12} = 250$ mL/min, corrisponde $KdO_{B12} = 130$ mL/min (linee in grassetto).

pari al 21%, ma è chiaramente preferibile un TCV di 26 L, che era associato ad una riduzione del 38% (41). Assumendo, un $V_u = V_{B12}$ di 35 L, i sopra-riportati valori di TCV corrisponderebbero a Kt/V_{B12} pari a $16/35 = 0.46$ e $26/35 = 0.74$.

VALUTAZIONE DELL'ADEGUAZZA DIALITICA ALLARGATA ALLE MEDIE MOLECOLE

Poiché è molto probabile che anche la rimozione delle medie molecole sia importante per migliorare l'elevata mortalità e morbilità dialitica, sarebbe utile introdurre nella pratica clinica anche altri indici quantitativi di adeguatezza dialitica, in aggiunta al Kt/V dell'urea. Il marker di riferimento è chiaramente la β_2 -m e l'indice associato potrebbe essere K_{β_2-m} , o meglio, Kt/V_{β_2-m} , che tiene conto anche della durata (t) della seduta e delle dimensioni (V) del paziente. Considerando che nel braccio ad alto flusso dell'HEMO Study il Kt/V_{β_2-m} in media era pari a 0.66, si potrebbe scegliere questo come valore provvisorio di riferimento, pur sapendo che valori ben superiori possono essere ottenuti in HDF/HF. D'altra parte, non ha nessun significato misurare K_{β_2-m} e Kt/V_{β_2-m} pazienti in HD con membrane a basso flusso, perché si otterrebbero valori intorno allo zero, o addirittura negativi. Almeno in questi pazienti si potrebbe usare però il valore virtuale di Kt/V_{B12} , con i due valori di riferimento ricavati dal lavoro di Leypoldt et al. (36): 0.46 (minimo) e 0.74 (ottimale, per HD). Anche in questo caso, valori più elevati sono facilmente ottenibili in HDF e HF.

Paziente N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sesso	F	M	M	F	M	M	M	M	F	M
Peso Inizio (g)	39000	69100	72500	73100	68500	55900	74900	66000	53100	57000
Peso Fine (g)	36500	66000	68700	69000	65500	53000	71000	65500	51800	56500
Durata Seduta (min)	240	240	240	240	240	240	240	240	210	240
Flusso ematico effettivo (ml/min)	246	276	271	278	276	278	292	279	200	279
Flusso del dialisato (ml/min)	500	500	500	500	800	500	500	500	500	500
Trattamento	HD	HD	HD	AFB	HDF-OL	HD	HD	HD	HD	HD
Filtro	F6HPS	F8HPS	F10HPS	Nephral500	HF80S	F10HPS	F10HPS	F10HPS	Polyflux21	F10HPS
KoA-B12	122	171	230	233	273	230	230	230	203	230
Infusione post-filtro (L/seduta)	0	0	0	7300	15800	0	0	0	0	0
Ematocrito (%)	25	38	38	38	41	33	36	38	41	35
Azoto Ureico Inizio (mg/dl)	59	86	69	103	102	73	82	73	106	78
Azoto Ureico Fine (mg/dl)	10	22	16	25	23	14	23	12	29	18
Beta2-m Inizio (mg/L)	61,2	64,6	51,4	37,9	30	45,2	40,9	33,5	27,8	22,9
Beta2-m Fine (mg/L)	72,4	62,6	62,6	14,6	7,7	59,3	53,6	31	27,7	26,4
Diuresi (ml/die)	0	0	0	0	0	650	450	1100	1250	1950
Clearance renale dell'urea (ml/min)						1	1,5	2,2	2,2	3
Output										
Flusso in acqua plasm. (ml/min): Eq. 5	173	161	158	162	153	175	176	163	111	170
Velocità della perdita di peso (ml/min)	10,4	12,9	15,8	17,1	12,5	12,1	16,3	2,1	6,2	2,1
Velocità di ultrafiltrazione totale (ml/min)	10,4	12,9	15,8	47,5	78,3	12,1	16,3	2,1	6,2	2,1
Volume dell'Urea (50% Peso fine, ml)	18250	33000	34350	34500	32750	26500	35500	32750	25900	28250
Volume extracellulare (Vu/3, ml)	6083	11000	11450	11500	10917	8833	11833	10917	8633	9417
K-Beta2m (ml/min): Eq. 1	5,3	14,6	4,9	70,5	82,5	0,5	0,8	5,7	6,3	-3,6
K-B12 diffusiva (ml/min): Eq. 4	82	98	113	115	122	118	118	114	89	116
K-B12 totale (ml/min): Eq. 3	86	104	120	135	156	123	125	115	92	117
Kt/V urea (Eq. Daugirdas)	2,22	1,64	1,79	1,74	1,79	1,56	1,56	2,05	1,48	1,64
TCV-B12 (L/seduta)	20,8	24,9	28,8	32,5	37,4	29,6	30,0	27,6	19,2	28,1
Kt/V-B12	1,14	0,75	0,84	0,94	1,14	1,12	0,84	0,84	0,74	0,99
Kt/V-Beta2m	0,21	0,32	0,10	1,47	1,81	0,01	0,02	0,13	0,15	-0,09

Fig. 3 - Esempi di calcolo degli indici di adeguatezza dialitica in 10 pazienti reali.

Nella Figura 3 sono riportati alcuni esempi pratici di valutazione simultanea di Kt/V *single-pool* dell'urea, della Vitamina B12 e della β 2-m, ottenuti durante un normale studio cinetico mensile. Come si vede, gli unici dati aggiunti al solito *set di input*, sono costituiti essenzialmente dai valori di KoA_{B12} dei dializzatori utilizzati e dai valori pre- e post-dialitici di β 2-m. Tutti i pazienti usavano membrane sintetiche, per lo più ad ampia superficie, ma a basso flusso, tranne 1 paziente in AFB (n. 4) e 1 in HDF-OL (n. 5). I calcoli sono stati eseguiti usando opportunamente le equazioni riportate in appendice, tuttavia valori simili di $Kt/V_{\beta 2-m}$ si possono ottenere immediatamente usando la Figura per i pazienti n. 4 e 5 (i soli con $C_{post}/C_{pre} < 1$). Al contrario, con la Figura 2 possono essere rapidamente stimati i valori di KdO_{B12} per tutti i pazienti. Nei primi 5 pazienti, che sono stati ordinati per valori crescenti di KoA_{B12} , si nota un progressivo aumento di K_{B12} , con valori di Kt/V_{B12} tutti maggiori del proposto *target* (0.76). Come prevedibile, solo in due pazienti, (n. 4 in AFB e n. 5 in HDF-OL) il $Kt/V_{\beta 2-m}$ era "adeguato", anzi era molto maggiore del *target* proposto (0.66), e, in effetti, solo in questi pazienti si osservano valori sierici predialitici

relativamente bassi di β 2-m, con una loro netta riduzione a fine dialisi. Nei primi 3 pazienti, invece, a fine dialisi si osserva un netto incremento dei valori sierici di β 2-m, essenzialmente dovuto all'emoconcentrazione. Nei restanti 5 pazienti, ordinati per valori crescenti della funzione renale residua sono stati ottenuti valori adeguati di Kt/V_{B12} , anche senza tener conto del contributo renale. In questi pazienti si osservano i valori sierici più bassi di β 2-m, che mostrano anche una prevedibile correlazione inversa con la funzione renale. Anche in questi pazienti si nota però l'aumento finale di β 2-m, sia pure di minore entità rispetto agli altri pazienti esaminati.

CONCLUSIONE

Anche in assenza di prove conclusive, molti dati della letteratura sono a favore dell'importanza di rimuovere anche le MM. La quantificazione di questi nuovi indici è facilmente implementabile nella pratica clinica, soprattutto grazie ai grafici riportati nelle Figure 1 e 2, e il loro uso può portare ad una miglio-

re prescrizione dialitica "ad ampio spettro", dalle piccole alle medie molecole. I risultati auspicabili immediati sono una maggiore valorizzazione delle sedute lunghe (o frequenti) e delle membrane più ampie/o permeabili in emodialisi, ma anche una maggiore diffusione delle tecniche convettive o miste, con il fine di un miglioramento della mortalità e morbilità dialitica, nel lungo termine.

TEST DI VERIFICA

8) Qual è lo spazio di distribuzione della $\beta 2$ -microglobulina?

- Acqua corporea totale
- Volume extracellulare
- Volume intracellulare
- Volume plasmatico.

9) Sulla base dei dati dell'*HEMO Study*, quale potrebbe essere il valore minimo adeguato di Kt/V della $\beta 2$ -microglobulina?

- 0.50
- 0.60
- 0.66
- 0.76
- 1.0.

10) Quale delle seguenti affermazioni è vera?

- Nei pazienti in dialisi con membrane a basso flusso, solitamente, i livelli sierici pre-dialitici di $\beta 2$ -m sono elevati
- Nei pazienti in dialisi con membrane a basso flusso, i livelli sierici di $\beta 2$ -m a fine dialisi sono più elevati di quelli iniziali
- In corso di emodiafiltrazione si osservano livelli sierici pre-dialitici di $\beta 2$ -m relativamente bassi
- Livelli sierici pre-dialitici di $\beta 2$ -m relativamente bassi in un paziente in dialisi con membrane a basso flusso possono indicare la presenza di una apprezzabile funzione renale residua
- Tutte le precedenti.

APPENDICE

CALCOLO DELLA CLEARANCE E DEL Kt/V DELLA $\beta 2$ -M

L'equazione presentata da Leypoldt et al. (36) ed utilizzata nell'*HEMO Study* è la seguente:

$$K_{\beta 2-m} = QF \times [1 - \log(C_{post}/C_{pre}) / \log(1 + QF \times t/V_{\beta 2-m})] \quad \text{Eq. 1a}$$

dove QF è la perdita di peso netta (UF), calcolata

dalla differenza tra peso iniziale e peso finale (PF), divisa per la durata (t) della seduta; C_{post} e C_{pre} rappresentano la concentrazione sierica di $\beta 2$ -m alla fine e all'inizio della seduta, rispettivamente; $V_{\beta 2-m}$ è il volume di distribuzione di $\beta 2$ -m, che viene assunto pari al volume extracellulare, ovvero pari ad 1/3 del volume dell'urea (V_u).

Come esempio pratico, considerando i seguenti dati reali di un paziente in trattamento con HDF e con i seguenti dati: PF = 70 kg, UF = 3 kg, t=240 min, C_{pre} = 30 mg/L, C_{post} = 7.7 mg/L, V_u = 35000 mL, ovvero $V_{\beta 2-m} = 11666.7$ mL, l'equazione 1a fornisce $K_{\beta 2-m} = 86.8$ mL/min, con un corrispondente $Kt/V_{\beta 2-m} = 1.79$. Ipotizzando un errore del + 20% nella stima di V_u , ovvero $V_u = 60\% PF = 42000$ mL, si ottiene $V_{\beta 2-m} = 14000$ mL (+ 20%), $K_{\beta 2-m} = 100$ mL/min (+ 15%), $Kt/V_{\beta 2-m} = 1.72$ (- 4%). Ipotizzando invece un errore di - 20% nella stima di V_u , si ottiene $K_{\beta 2-m} = 73.5$ mL/min (- 15%), $Kt/V_{\beta 2-m} = 1.89$ (+ 6%). Essendo clinicamente accettabile un range di errore compreso tra - 4% e + 6%, in assenza di un valore misurato di V_u si può proporre l'uso routinario di $V_{\beta 2-m} = 0.17 PF$ ($\approx 50/3$). Pertanto, l'equazione 1a può essere così riscritta:

$$K_{\beta 2-m} = QF \times [1 - \log(C_{post}/C_{pre}) / \log(1 + UF/ 0.17 PF)] \quad \text{Eq. 1b}$$

Moltiplicando i due termini dell'equazione 1b per $t/0.17PF$ e semplificando si ottiene:

$$Kt/V_{\beta 2-m} = UF/0.17 PF \times [1 - \log(C_{post}/C_{pre}) / \log(1 + UF/ 0.17 PF)] \quad \text{Eq. 2}$$

L'equazione 2 svela che $Kt/V_{\beta 2-m}$ dipende da 2 sole variabili: C_{post}/C_{pre} e UF/PF . Ciò permette di usare l'equazione 2 per disegnare una famiglia di curve che descrivono la relazione tra $Kt/V_{\beta 2-m}$ e C_{post}/C_{pre} per vari livelli di UF/PF . Il grafico riportato in Figura 1 mostra che per stimare $Kt/V_{\beta 2-m}$ è sufficiente misurare solo C_{post} , C_{pre} , UF e PF.

CALCOLO DELLA CLEARANCE E DEL Kt/V DELLA VITAMINA B12

La clearance totale (diffusiva + convettiva) della Vitamina B-12 può essere calcolata con la seguente equazione (36):

$$K_{B12} = Kd_{0_{B12}} + 0.43 Q_{uf} \quad \text{Eq. 3}$$

in cui $Kd_{0_{B12}}$ (mL/min) è la clearance puramente diffusiva e Q_{uf} (mL/min) è la velocità di ultrafiltrazione totale (perdita di peso + liquidi reinfusione).

$Kd_{0_{B12}}$ può essere calcolata a partire dal prodotto permeabilità per area KoA_{B12} misurato *in vitro* e sostituendo Q_b con il flusso in acqua plasmatica (Q_{pw}) nella formula classica che calcola K in funzione di KoA (3):

$$KdO_{B12} = Qpw (1 - \exp z) / (Qpw/Qd - \exp z) \quad \text{Eq. 4}$$

in cui, Qd è il flusso del dialisato (mL/min) e $z = KoA_{B12} \times (1/Qpw - 1/Qd)$.

Qpw può essere calcolato con la formula classica (3), in funzione del flusso ematico (Qb) e dell'emato crito (Hct):

$$Qpw = Qb (1 - Hct/100) \times 0.94 \quad \text{Eq. 5}$$

L'analisi dell'equazione 4 mostra che KdO_{B12} dipende da 3 variabili: Qpw, KoA_{B12} e Qd. Fissando Qd al solito valore di 500 mL/min, è possibile disegnare una famiglia di curve che descrivono la relazione tra KdO_{B12} e Qpw per vari livelli di KoA_{B12} (Fig. 2). Usando la stessa metodologia descritta in Figura 1, l'esempio riportato in Figura 2 mostra che ad un Qpw di 200 mL/min con $KoA_{B12} = 250$ mL/min corrisponde KdO_{B12} di circa 130 mL/min. La Figura 2 può essere anche usato in modalità inversa, per calcolare il KoA_{B12} di un dializzatore di cui si conoscono i valori della clearance misurata *in vitro*. Lo stesso esempio precedente, infatti, può essere interpretato per affermare che in presenza di $KdO_{B12} = 130$ mL/min, ottenuta *in vitro* con un Qb (acquoso) di 200 mL/min, il KoA_{B12} è circa 250 mL/min.

In accordo con Leypoldt et al. (31), il volume totale depurato (Litri/seduta) è dato da K_{B12} per la durata (t) della seduta:

$$TCV_{B12} = K_{B12} \times t/1000 \quad \text{Eq. 6}$$

Assumendo $V_{B12} = Vu$ (41), si può calcolare il valore virtuale di Kt/V_{B12} :

$$Kt/V_{B12} = K_{B12} \times t/V_{B12} \quad \text{Eq. 7}$$

Si deve osservare che Kt/V_{B12} non è un vero parametro cinetico, ma rappresenta solo un modo per riportare TCV_{B12} alle dimensioni del paziente.

RIASSUNTO

Anche se l'analisi primaria dell'HEMO Study non ha fornito l'attesa conferma dell'importanza della rimozione dialitica delle medie molecole (MM), alcune analisi secondarie dello stesso studio sono in linea con i risultati favorevoli sulla mortalità e morbilità dialitica ottenuti con le membrane ad alto flusso e/o le tecniche convettive in diversi importanti studi osservazionali. Per valutare l'efficienza della rimozione delle MM si può usare il Kt/V della $\beta 2$ -microglobulina ($Kt/V_{\beta 2-m}$), utilizzato nell'HEMO Study, scegliendo come valore di riferimento ≥ 0.66 , che è la media ottenuta nel braccio ad alto flusso. Poiché tale indice non è utilizzabile nei pazienti in dialisi con membrane a basso flusso, in questi casi può essere utile misurare il Kt/V della Vitamina B12 (Kt/V_{B12}), scegliendo come valore di riferimento ≥ 0.74 , sulla base dei risultati del Case Mix Adequacy Study (AJKD 1999). Al fine di semplificare la misura routinaria di questi indici, sono riportati due nuovi nomogrammi: il primo permette la stima di $Kt/V_{\beta 2-m}$ in funzione del rapporto tra le concentrazioni post e predialitica della $\beta 2$ -microglobulina, e il secondo permette di stimare la clearance dialitica diffusiva della Vitamina B12, in funzione del KoA_{B12} in vitro del filtro e del flusso attuale in acqua plasmatica. In attesa di studi specifici, necessari per stabilire la reale utilità della rimozione delle MM e i relativi target di adeguatezza, l'approccio suggerito fornisce strumenti ulteriori per ottimizzare la prescrizione dialitica su base quantitativa, con un più chiaro orientamento verso l'aumento della durata (o della frequenza) delle sedute, e/o la maggior diffusione delle membrane ad alto flusso e delle tecniche convettive.

DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

BIBLIOGRAFIA

1. Sargent JA, Gotch FA. The analysis of concentration dependence of uremic lesions in clinical studies. *Kidney Int Suppl* 1975; 7: S35-44.
2. Gotch FA. Hemodialysis: technical and kinetic considerations. In: Brenner M, Rector FC, ed. *The kidney*. Philadelphia: Saunders Co., 1976; 1672-83.
3. Sargent JA, Gotch FA. Principles and biophysics of dialysis. In: Drukker W, Parsons FM, Maher JEd, eds. *Replacement of renal function by dialysis*. The Hague, Martinus Nijhoff 1978; 38-68.
4. Sargent JA, Gotch FA. Mathematic modeling of dialysis therapy. *Kidney Int Suppl* 1980; 18: S2-10.
5. Babb AL, Strand MJ, Uvelli DA, Milutinovic J, Scribner BH. Quantitative description of dialysis treatment: a dialysis index. *Kidney Int Suppl* 1975; (2): 23-9.
6. Lowrie EG, Sargent JA. A clinical example of pharmacokinetic and metabolic modelling: the quantitative and individualized prescription of dialysis therapy. *Kidney Int* 1980; 18: S11-6.
7. Lowrie EG, Laird NM, Parker TF, Sargent JA. Effect of the hemodialysis prescription on patient morbidity: report from the National Cooperative Dialysis Study. *N Engl J Med* 1981; 305 (20): 1176-81.
8. Ravani P, Andrulli S. Guida al corretto uso della P e degli Intervalli di Confidenza nella letteratura e presentazione dei risultati di uno studio clinico. *G Ital Nefrol* 2006; 5: 490-501.
9. Gotch FA, Sargent JA. A mechanistic analysis of the National Cooperative Dialysis Study (NCDS). *Kidney Int* 1985; 28: 526-34.

10. Hemodialysis Adequacy 2006 Work Group. Clinical practice guidelines for hemodialysis adequacy, update 2006. *Am J Kidney Dis* 2006 Jul; 48 (Suppl. 1): S2-90.
11. Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, et al. Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int* 2003; 63: 1934-43.
12. Locatelli F, Di Filippo S, Manzoni C. Removal of small and middle molecules by convective techniques. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15 (Suppl. 2): 37-44.
13. Gejyo F, Kawaguchi Y, Hara S, et al. Arresting dialysis-related amyloidosis: a prospective multicenter controlled trial of direct hemoperfusion with a β 2-microglobulin adsorption column. *Artif Organs* 2004; 28: 371-80.
14. MacAllister RJ, Rambašek MH, Vallance P, Williams D, Hoffman KH, Ritz E. Concentration of dimethyl-arginine in the plasma of patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11: 2449-52.
15. Miyata T, Ueda Y, Yoshida A, et al. Clearance of pentosidine, an advanced glycation end product by different modalities of renal replacement therapy. *Kidney Int* 1997; 51: 880-7.
16. Gendermann A, Lemke HD, Nothdurft A, et al. Low-molecular but not high-molecular advanced glycation end products (AGEs) are removed by high-flux dialysis. *Clin Nephrol* 2000; 54: 1645-50.
17. Pedrini LA, De Cristofaro V. On-line mixed hemodiafiltration with a feedback for ultrafiltration control: effect on middle-molecule removal. *Kidney Int* 2003; 64 (4): 1505-13.
18. Feliciani A, Riva MA, Zerbi S, et al. New strategies in Haemodiafiltration (HDF): prospective comparative analysis between on-line mixed HDF and mid-dilution HDF. *Nephrol Dial Transplant* 2007; doi:10.1093/ndt/gfm023
19. Koda Y, Nishi S, Miyazaki S, et al. Switch from conventional to high-flux membrane reduces the risk of carpal tunnel syndrome and mortality of hemodialysis patients. *Kidney Int* 1997; 52: 1096-101.
20. Locatelli F, Marcelli D, Conte F, Limido A, Malberti F, Spotti D. Comparison of mortality in ESRD patients on convective and diffusive extracorporeal treatments. The Registro Lombardo Dialisi e Trapianto. *Kidney Int* 1999; 55: 286-93.
21. Ayli D, Ayli M, Azak A, et al. The effect of high-flux hemodialysis on renal anemia. *J Nephrol* 2004; 17: 701-6.
22. Bonforte G, Grillo P, Zerbi S, Surian M. Improvement of anemia in hemodialysis patients treated by hemodiafiltration with high-volume on-line-prepared substitution fluid. *Blood Purif* 2002; 20: 357-63.
23. Lin CL, Huang CC, Yu CC, et al. Improved iron utilization and reduced erythropoietin resistance by on-line hemodiafiltration. *Blood Purif* 2002; 20: 349-56.
24. Vaslaki L, Major L, Berta K, et al. On-line haemodiafiltration versus haemodialysis: stable haematocrit with less erythropoietin and improvement of other relevant blood parameters. *Blood Purif* 2006; 24: 163-73.
25. Locatelli F, Andrulli S, Pecchini F, et al. Effect of high-flux dialysis on the anaemia of haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1399-409.
26. Basile C, Giordano R, Montanaro A, et al. Effect of acetate-free biofiltration on the anaemia of haemodialysis patients: a prospective cross-over study. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1914-9.
27. Luke RG. Chronic renal: a vasculopathic state. *N Engl J Med* 1998; 339: 841-3.
28. Stenvinkel P, Heinburger O, Paultre F, et al. Strong associations between malnutrition, inflammation and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int* 1999; 55: 1899-911.
29. Wanner C, Bahner U, Mattern R, Lang D, Passlick-Deetjen J. Effect of dialysis flux and membrane material on dyslipidaemia and inflammation in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2004. Zehnder C, Gutzwiller JP, Renggli K. Hemodiafiltration, a new treatment option for hyperphosphatemia in hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 1999; 52: 152-9.
30. Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW, Port FK. Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study. *Am J Kidney Dis* 1998; 31: 607-17.
31. Leypoldt JK, Cheung AK, Carroll CE, et al. Effect of dialysis membranes and middle molecule removal on chronic hemodialysis patient survival. *Am J Kidney Dis* 1999; 33: 349-55.
32. Woods HF, Nandakumar M. Improved outcome for haemodialysis patients treated with high-flux membranes. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15 (Suppl. 1): 36-42.
33. Canaud B, Bragg-Gresham JL, Marshall MR, et al. Mortality risk for patients receiving haemodiafiltration versus haemodialysis: European results from the DOPPS. *Kidney Int* 2006; 69: 2087-93.
34. Tattersall J, Martin-Malo A, Pedrini L, et al. European Best Practice Guidelines For Haemodialysis. EBPG guideline on dialysis strategies. *Nephrol Dial Transplant* 2007 22: ii5-ii21; doi:10.1093/ndt/gfm0220
35. Eknoyan G, Beck GJ, Cheung AK, et al. Effect of dialysis dose and membrane flux on mortality and morbidity in maintenance hemodialysis patients: Primary results of the HEMO study. *N Engl J Med* 2002; 347: 2010-9.
36. Leypoldt JK, Cheung AK, Deeter RB. Single compartment model for evaluating β 2-microglobulin clearance during hemodialysis. *ASAIO J* 1997; 43: 904-9.
37. Locatelli F. How will the Results of the HEMO Study Impact Dialysis Practice? *Semin Dial* 2003; 16: 20-1.
38. Cheung AK, Levin NW, Greene T, et al. Effects of high-flux hemodialysis on clinical outcomes: results of the HEMO study. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 3251-63.
39. Cheung AK, Rocco MV, Yan G, et al. Serum β 2-microglobulin Levels Predict Mortality in Dialysis Patients: Results of the HEMO Study. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 546-55.
40. Casino FG, Basile C, Gaudiano V, Lopez T. A modified Algorithm of the single pool urea kinetic model. *Nephrol Dial Transplant* 1990; 5: 214-9.
41. Clark WR, Leypoldt JK, Henderson LW, et al. Quantifying the effect of change in the hemodialysis prescription on effective solute removal with a mathematical model. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 601-9.
42. Casino FG, Mostacci SD, Santarsia G, Lopez T. La clearance della vitamina B12 in emodialisi ed emodiafiltrazione. *G Ital Nefrol* 2004; 21: S217-2.
43. Jaffrin MY. Convective mass transfer in hemodialysis. *Artif Organs* 1995; 19: 1162-71.
44. Werynski A, Waniewski J. Theoretical description of mass transport in medical membrane devices. *Artificial Organs* 1995; 19: 420-7.
45. Casino F. Is Kt/V urea a satisfactory measure for dosing the newer dialysis regimens? *Semin Dial* 2001; 14: 18-21.