

La sepsi: dalla patogenesi al trattamento

L. Gesualdo¹, P. Cirillo¹, S. Netti¹, D. Centone¹, A.F. Perego²

¹ Dipartimento di Scienze Biomediche e BIOAGROMED, Università di Foggia

² Struttura Complessa di Nefrologia, Dialisi e Trapianto, A.O. Niguarda Ca' Granda, Milano

Sepsis: from pathophysiology to treatment

Severe sepsis and septic shock are still associated with high mortality rates. To improve the outcome, multidisciplinary interactions and cooperation between basic, clinical and industrial researchers are mandatory to develop new artificial or biological devices for the treatment of septic syndrome and related systemic complications. In the future, the development and validation of new biomarkers, aimed at an early diagnosis of sepsis, and the rigorous monitoring of the most significant prognostic indicators, could contribute to better understanding of the mechanisms underlying septic syndrome as well as to the timely institution of potentially effective treatments. (G Ital Nefrol 2006; 23 (suppl 36): S74-8)

KEY WORDS: Sepsis, Cytokines, Genetic polymorphisms, Proteomics, Biosensors, Sorbents

PAROLE CHIAVE: Sepsis, Citochine, Polimorfismo genetico, Proteomica, Biosensori, Sorbenti

Introduzione

La sepsi è una delle più frequenti cause di morbilità e mortalità nel mondo (210.000 e 135.000 decessi/anno, rispettivamente, negli USA e in Europa) ed è definita come una risposta pro-infiammatoria e pro-coagulante all'infezione da patogeni (1, 2). Un'alterata produzione di mediatori pro- e anti-infiammatori svolge un ruolo patogenetico importante nella evoluzione clinica della sindrome settica. La sepsi, infatti, può regredire o evolvere in sepsi severa ed in *shock* settico. L'infezione in presenza di due o più elementi della risposta sistemica all'infiammazione (febbre, tachicardia, ecc.) indica che il paziente è affetto da sepsi (3-27 milioni di casi/anno nel mondo). L'insorgenza di disfunzione d'organo determina il passaggio allo stato di sepsi severa (2-18 milioni di casi/anno nel mondo) mentre la presenza di uno stato ipotensivo refrattario alla terapia indica che il paziente ha sviluppato uno *shock* settico (1-9 milioni di casi/anno nel mondo). L'alta mortalità nei diversi stadi della sepsi si traduce in circa 2.5-25 milioni di decessi/anno; pertanto, risultano auspicabili nuovi approcci terapeutici in grado di migliorarne la prognosi (1).

L'epidemiologia genetica (studio dell'interazione tra geni ed ambiente) suggerisce una forte influenza genetica sul-

l'outcome della sepsi (4, 5). La risposta settica è un classico esempio di come la genetica influenzi la risposta ad uno stimolo ambientale: l'infezione. Geni candidati per la sepsi sono stati identificati in quelli codificanti per le regioni di riconoscimento batterico (CD14, TLR4) e in quelli coinvolti nella risposta infiammatoria (TNF- α , TNF- β , IL-1 β , IL-6, IL-10) (6, 7). Numerosi studi caso-controllo associano polimorfismi di questi geni alla patogenesi ed all'outcome della sepsi, alla possibilità di sviluppare sepsi severa e MOF e alla morte da sepsi.

Una delle manifestazioni che caratterizza la risposta da sepsi e ne peggiora l'outcome è l'insorgenza di insulino-resistenza (IR) associata ad iperglicemia. I pazienti critici presentano insulino resistenza e iperglicemia e la severità di tale "diabete da stress" riflette il rischio di decesso (8, 9). Recentemente è stato dimostrato che l'uso di insulina migliora la prognosi dei pazienti critici. Van den Berghe et al (9) hanno dimostrato che la terapia intensiva con insulina (mantenimento dei livelli di glicemia tra 80 e 110 mg/dL) paragonata alla terapia convenzionale (glicemia tra 180 e 200 mg/dl) riduce la mortalità e morbilità da sepsi. La terapia intensiva con insulina, inoltre, riduce la frequenza di episodi di sepsi nel 46% dei casi e riduce il numero di decessi per danno multiorgano, indipendente da una storia

di diabete (10, 11). Il meccanismo protettivo svolto dall'insulina in corso di sepsi rimane sconosciuto. In letteratura non sono presenti studi di associazione genetica tra polimorfismi e severità e/o occorrenza di insulino-resistenza durante sepsi.

DNA chip per lo studio della suscettibilità genetica

Pertanto, la genetica potrebbe aiutare i clinici a far luce sulla variabilità individuale nella risposta alla sepsi e allo *shock* settico. Diversi geni candidati per la suscettibilità genetica alla sepsi sono stati localizzati sul cromosoma 6, nel cluster per gli antigeni leucocitari umani di classe III, tra cui quelli codificanti per i fattori TNF- α e TNF- β (12). Altri geni candidati per la suscettibilità alla sepsi sono il gene per il recettore antagonista dell'interleuchina 1 (IL-1), quelli che codificano per le heat *shock* protein, i geni per le interleuchine 6 e 10 e per i recettori TLR-4, TLR-2 e CD-14 (7). Nuovi geni candidati sia nella suscettibilità alla sepsi che all'insulino-resistenza potrebbero essere AHSG, codificante per la fetuina, APM1 codificante l'Adiponectina e RETN codificante la resistina (13-17). L'analisi simultanea di questi polimorfismi potrebbe facilitare l'identificazione dei soggetti con predisposizione alla sepsi e all'insulino-resistenza e spiegare il motivo per cui alcuni pazienti hanno un outcome peggiore rispetto ad altri. La tecnologia dei DNA chips permette di evidenziare rapidamente e contemporaneamente molti polimorfismi. In un singolo test è possibile definire la predisposizione di un paziente a diverse malattie e predire la risposta ad una terapia farmacologica. La caratterizzazione di centinaia di migliaia di polimorfismi permette di costruire una mappa individuale di SNP in grado di correlare il background genetico ad una precisa risposta clinica e farmacologica. La conoscenza del profilo genetico associato a suscettibilità alla sepsi e all'insulino resistenza aiuterebbe nella scelta della terapia e definirebbe la prognosi. Pertanto, è necessario sviluppare DNA chip per l'analisi contemporanea di diversi polimorfismi di geni coinvolti sia nell'insorgenza della sepsi che dell'insulino-resistenza.

In un recente lavoro, Rivers et al (18) hanno dimostrato che una precoce ed "aggressiva" terapia, mirata ad ottimizzare il precarico, postcarico e la contrattilità cardiaca in pazienti con sepsi severa e *shock* settico migliorava la probabilità di sopravvivenza. In questo studio, sono state utilizzate infusioni di colloide o cristalloide, agenti vasoattivi e trasfusioni di globuli rossi per migliorare l'ossigenazione. I parametri scelti per la valutazione di una adeguata ossigenazione erano la normalizzazione dei valori della saturazione di ossigeno, la concentrazione di lattati, il deficit di basi e il pH. Il gruppo dei pazienti trattati con terapia precoce ed intensiva riceveva più fluidi, un supporto inotropo e trasfusioni durante le prime

sei ore mentre i pazienti controllo ricevevano la terapia convenzionale. Durante l'intervallo tra la 7a e la 72a ora, i pazienti del gruppo di trattamento presentavano in media un'alta concentrazione di ossigeno venoso, bassa concentrazione di lattati, un basso valore di deficit di basi e un più alto valore di pH rispetto al gruppo controllo. La mortalità era del 30.5% nel gruppo trattato paragonato al 46.5% del gruppo controllo ($p=0.009$). In conclusione, l'intervento terapeutico precoce ripristinava il bilancio tra ossigeno distribuito e la richiesta di ossigeno, migliorando la sopravvivenza tra i pazienti con sepsi severa. L'uso di misurazioni obiettive, come la concentrazione di lattati, il deficit di basi, il pH e possibilmente la saturazione di ossigeno a livello centrale, nel *follow-up* dei pazienti in terapia rianimatoria risulta quindi necessaria per migliorare l'outcome. La contemporanea presenza di insufficienza renale acuta (IRA) incrementa il rischio di decesso in corso di sepsi severa (19, 20). Sebbene ci sia stato, nelle ultime tre decadi, un miglioramento nella cura di supporto e nell'innovazione delle terapie sostitutive, l'indice di mortalità di questi pazienti rimane ancora elevato, e tende ad aumentare per l'incremento dell'età media. Inoltre, la prevalenza di IRA in corso di sepsi varia dal 9 al 40% dei casi ed in uno studio prospettico è stato riportato che l'incidenza aumenta dal 19% nella sepsi, al 23% e 51%, rispettivamente, nella sepsi severa e nello *shock* settico. La terapia extracorporea dell'IRA in pazienti in terapia intensiva è molto utilizzata: membrane con un'alta permeabilità idraulica consentono un incremento dell'indice di ultrafiltrazione e la rimozione di soluti nel range di 5-50 kDa (21). I risultati di un recente studio clinico mostrano che in corso di IRA, la sopravvivenza dei pazienti può essere migliorata incrementando il numero di sedute di terapia sostitutiva. La terapia sostitutiva continua è diventata popolare nel trattamento dei pazienti critici caratterizzati da un'elevata instabilità emodinamica, elevato carico di fluidi per la necessità di dover utilizzare elevati volumi di agenti terapeutici e nutritivi (22, 23). A tal proposito, sono stati proposti approcci più specifici, come per esempio l'emofiltrazione ad alto volume e la plasmafiltrazione continua, tecniche in grado di rimuovere diversi mediatori, pro- e antinfiammatori, e di superare i limiti della terapia sostitutiva continua (bassi volumi di scambio e bassi coefficienti di rimozione di mediatori associati alla sepsi) (22, 23). Recentemente, l'efficacia dei sistemi di purificazione ematica per i pazienti critici in corso di sepsi è stata migliorata aggiungendo sistemi di adsorbimento non-selettivo su cartuccia (24-28). Studi effettuati con questa tecnica hanno riportato miglioramenti nell'emodinamica e nella sopravvivenza in modelli animali e umani in corso di sepsi. Sfortunatamente, ad oggi, questi sistemi non permettono il monitoraggio "on line" dei livelli di glucosio e lattato e non è ancora noto il completo profilo delle proteine adsorbite.

Biosensore per il monitoraggio “on-line” di glucosio e lattato nel plasma

Da quanto riportato, l'iperglicemia e l'aumento della concentrazione ematica del lattato sono correlate ad un aumento di mortalità del paziente settico (9, 10). Attualmente il glucosio ed il lattato sono monitorati ad intervalli non frequenti e l'intervento con infusione di insulina viene effettuato solo quando i livelli di glucosio superano i 200 mg/dL. La misura diretta on-line potrebbe offrire al medico il vantaggio di valutare gli andamenti in funzione dell'aumento dei livelli di glucosio e lattato, così come la possibilità di somministrare insulina per mantenere il glucosio entro un ben definito intervallo. Il rigido controllo del glucosio è stato associato ad una diminuzione della degenza nelle unità intensive e della mortalità. Questo monitoraggio necessita di dispositivi analitici affidabili dotati di veloci risposte e capaci di lavorare in condizioni operative *on-line*. Numerosi sforzi sono stati orientati dai ricercatori sulla realizzazione di biosensori, nuovi dispositivi analitici, in grado di monitorare in continuo il glucosio nel sangue (29-31). La finalità di questi sensori per il glucosio è di consentire una misura accurata della concentrazione del glucosio *in vivo*, che può essere usata come parametro per un sistema di allarme che rivela variazioni anomale della glicemia o come componente di un sistema chiuso di rilascio dell'insulina (32, 33), regolato dal segnale del sensore. Anche i biosensori per il lattato hanno ricevuto una grande attenzione dato che la concentrazione normale di riferimento del lattato nel sangue umano è tipicamente 1 ± 0.5 mmol/L e spesso aumenta in pazienti con sepsi (34, 35). Il lattato è stato proposto come marker immediato di un potenziale stato reversibile di deficienza energetica nei pazienti critici (36) ed esso può fornire ai clinici una finestra di opportunità per intervenire prontamente. I biosensori citati sono basati su sistemi enzimatici immobilizzati su membrana (37). I biosensori amperometrici basati su glucosio- e lattato-ossidasi, e film polimerici non-conduttori elettrosintetizzati, posseggono peculiari caratteristiche che ne permettono l'applicabilità a trasduttori “*screen-printed*”, ottenendo biosensori usa e getta anche in configurazione doppia. Questi dispositivi a basso costo possono rappresentare un utile strumento per un accurato monitoraggio simultaneo *on-line* di glucosio e lattato. Pertanto, un importante obiettivo della ricerca futura sarà l'ottimizzazione e l'applicazione di un biosensore alle linee ematiche di sistemi di emo- e emodia-filtrazione in grado di analizzare “*on-line*” i livelli di glicemia e lattato nel trattamento della sepsi severa.

Profili proteomici e cartucce di sorbente

Un altro importante aspetto da considerare durante il trattamento della sepsi è l'efficiente rimozione di citochine, tossine ed altri mediatori infiammatori dal plasma del

paziente settico. I pazienti con sepsi, infatti, presentano elevati livelli di mediatori pro- e anti-infiammatori. Attualmente, la purificazione del plasma del paziente può essere ottenuta con cartucce contenenti resine dedicate. Sebbene la resina abbia un'alta affinità per molte citochine ad azione infiammatoria, l'adsorbimento non è specifico e può portare anche alla rimozione di ormoni, peptidi ed importanti fattori di crescita. Di conseguenza un altro obiettivo della ricerca in futuro sarà la valutazione, con tecniche di proteomica, del profilo proteico di adsorbimento (proteine pro-infiammatorie vs anti-infiammatorie) di varie quantità e formulazioni di resina per la scelta della più efficiente. La *proteomica* è una nuova area scientifica, definita come “l'analisi sistematica di proteine in base alla loro identità, quantità e funzione”. Il rapido progresso della proteomica negli ultimi dieci anni è legato alla continua evoluzione della genomica, delle tecniche di separazione proteica e della spettrometria di massa (44-46). Negli ultimi anni, l'obiettivo principale della proteomica si è spostato dalla caratterizzazione delle proteine (*proteomica di espressione*) all'utilizzo delle informazioni sulle proteine per una migliore comprensione dei meccanismi fisiologici e patologici, alla ricerca di nuovi biomarker e nuovi target terapeutici. Infatti, il futuro di questa nuova area delle scienze è la *proteomica clinica*, ossia l'applicazione delle tecniche di proteomica al “letto del paziente”. Esistono varie tecniche di proteomica per identificare e confrontare l'espressione proteica, ciascuna con vantaggi e svantaggi. Il metodo più usato prevede l'uso dell'elettroforesi bidimensionale (2-DE) per la fase di separazione delle proteine, seguito dalla digestione triptica in gel delle proteine e dalla loro identificazione mediante la spettrometria di massa (MALDI-TOF-MS, LC-ESI-MS/MS).

Prototipi di rene bioartificiale

Attualmente il trattamento dell'insufficienza renale acuta (IRA) si avvale di membrane sintetiche che sostituiscono l'ultrafiltrazione glomerulare e la funzione tubulare, un approccio che non sostituisce le funzioni di trasporto, metaboliche ed endocrine delle cellule tubulari prossimali renali (PTC). L'emofiltrazione implementata con la terapia cellulare potrebbe migliorare la prognosi di pazienti affetti da IRA in corso di terapia intensiva. Pertanto, lo sviluppo di un rene bioartificiale, ingegnerizzato, contenente PTC renali potrebbe rappresentare un nuovo approccio terapeutico per il trattamento della sepsi severa con o senza IRA, in quanto fornirebbe sia i componenti biologici che sintetici al fine di ottimizzare la sostituzione del rene e migliorare l'outcome clinico. Humes et al hanno sviluppato un rene bioartificiale extracorporeo composto da un emofiltro convenzionale collegato ad un dispositivo contenente cellule renali in grado di sostituire le funzioni del tubulo renale (RAD) (47-49). Questi Autori hanno dimostrato che la combinazione

di un supporto sintetico per l'emofiltrazione con la terapia cellulare costituita da un supporto contenente cellule renali tubulari suine in un circuito di perfusione extracorporea sono in grado di ripristinare con successo la funzione renale compromessa di cani affetti da insufficienza renale acuta. Il RAD è una cartuccia per l'emofiltrazione contenente PTC umane coltivate in monostrato lungo la superficie interna di fibre capillari cave che forniscono uno scaffold poroso immunoprotettivo. Questo filtro funziona come un normale tubulo renale in grado di modificare la composizione dell'ultrafiltrato mediante processi di secrezione e di riassorbimento. In tal modo, le PTC del RAD sono in grado sia di esplicare le funzioni essenziali di trasporto, filtrazione e riassorbimento del tubulo renale sia di modulare diverse componenti del plasma (ad es., citochine, endotossine ed altri fattori proinfiammatori o vasoattivi) e, di conseguenza, concorrere al ripristino dell'omeostasi endocrina, metabolica ed immunologica del paziente settico.

Conclusioni

La sepsi è una patologia caratterizzata, ancora oggi, da una alta mortalità. Sulla base dei dati riportati si può pertanto affermare che, per il miglioramento dell'outcome di questa patologia, è necessario che l'integrazione delle diverse competenze (ricerca di base, clinica e industriale) debba portare allo sviluppo di nuovi strumenti per il monitoraggio "on-line" del paziente settico e di nuovi biofiltri renali, i cui rivoluzionari principi di funzionamento siano basati sull'integrazione di superfici polimeriche dalla poro-

sità controllata e cellule staminali renali polarizzate nonché alla scoperta di nuovi biomarker per la diagnosi precoce e il monitoraggio terapeutico.

Riassunto

La sepsi grave e lo shock settico sono tuttora associati a mortalità elevata. Al fine di migliorare la prognosi, un approccio multidisciplinare e la cooperazione tra ricerca di base, ricerca clinica e ricerca industriale è indispensabile per sviluppare nuovi dispositivi artificiali o biologici per il trattamento della sindrome settica e delle complicanze sistemiche ad essa correlate. In futuro, lo sviluppo e la validazione di nuovi biomarkers, finalizzati alla diagnosi precoce della sepsi ed al monitoraggio della sua evoluzione clinica, unitamente allo stretto controllo dei principali indici prognostici, potranno contribuire ad una migliore comprensione dei meccanismi patogenetici della sindrome settica ed alla tempestiva messa in atto di interventi terapeutici potenzialmente efficaci.

Indirizzo degli Autori:

Prof. Loreto Gesualdo

Struttura Complessa di Nefrologia, Dialisi e Trapianto
Azienda Ospedaliero-Universitaria "OO.RR."

Viale Pinto, 1

71100 Foggia

e-mail: l.gesualdo@unifg.it

Bibliografia

1. Richard PW. Treating Sepsis. *N Engl J Med* 2002; 347: 966-7.
2. Hotchkiss RS, Kar I. The Pathophysiology and Treatment of Sepsis. *N Engl J Med* 2003; 348: 138-50.
3. Tetta C, Bellomo R, D'Intini V, et al. Do circulating cytokines really matter in sepsis? *Kidney Int* 2003; 63 (Suppl 84): S69-71.
4. De Maio A, Torres MB, Reeves RH. Genetic determinants influencing the response to injury, inflammation, and sepsis. *Shock* 2005; 23: 11-7.
5. Arcaroli J, Fessler MB, Abraham E. Genetic polymorphisms and sepsis. *Shock* 2005; 24: 300-12.
6. Freeman BD, Buchman TG. Gene in a haystack: tumor necrosis factor polymorphisms and outcome in sepsis. *Crit Care Med* 2000; 28: 3090-1.
7. Nakada TA, Hirasawa H, Oda S, et al. Influence of toll-like receptor 4, CD14, tumor necrosis factor, and interleukin-10 gene polymorphisms on clinical outcome in Japanese critically ill patients. *J Surg Res* 2005; 129: 322-8.
8. Marik PE, Raghavan M. Stress-hyperglycemia, insulin and immunomodulation in sepsis. *Intensive Care Med* 2004; 30: 748-56.
9. Van den Berghe G. How does blood glucose control with insulin save lives in intensive care? *J Clin Invest* 2004; 114: 1187-95.
10. Van den Berghe G, Wouters PJ, Bouillon R, et al. Outcome benefit of intensive insulin therapy in the critically ill: insulin dose versus glycemic control. *Crit Care Med* 2003; 31: 359-66.
11. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001; 345: 1368-77.
12. Holmes CL, Russell JA, Walley KR. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy. *Chest* 2003; 124: 1103-15.
13. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996; 271: 665-8.
14. Srinivas PR, Wagner AS, Reddy LV, et al. Serum alpha 2-HS-glycoprotein is an inhibitor of the human insulin receptor at the tyrosine kinase level. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 1445-55.
15. Mathews ST, Singh GP, Ranalletta M, et al. Improved insulin sensitivity and resistance to weight gain in mice null for the Ahsg gene. *Diabetes* 2002; 51: 2450-8.
16. Menzaghi C, Ercolino T, Salvemini L, et al. Multigenic control of serum adiponectin levels: evidence for a role of the APM1 gene and a locus on 14q13. *Physiol Genomics* 2004; 19: 170-4.
17. Osawa H, Yamada K, Onuma H, et al. The G/G genotype of a resistin single-nucleotide polymorphism at -420 increases type 2 diabetes mellitus susceptibility by inducing promoter activity

- through specific binding of Sp1/3. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 678-86.
18. Rivers EP, Nguyen HB, Amponsah D. Sepsis: a landscape from the emergency department to the intensive care unit. *Crit Care Med* 2003; 31: 968-9.
 19. Thijs A, Thijs LG. Pathogenesis of renal failure in sepsis. *Kidney Int* 1998; 53 (Suppl 66): S34-7.
 20. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M et al. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA* 1995; 273: 117-23.
 21. Bellomo R, Ronco C. Indications and criteria for initiating renal replacement therapy in the intensive care unit. *Kidney Int* 1998; 53 (Suppl 66): S106-9.
 22. Kellum JA, Johnson JP, Kramer D, Palevsky P, Brady JJ, Pinsky MR. Diffusive vs. convective therapy: effects on mediators of inflammation in patient with severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 1998; 26: 1995-2000.
 23. Kielstein JT, Kretschmer U, Ernst T, et al. Efficacy and cardiovascular tolerability of extended dialysis in critically ill patients: a randomized controlled study. *Am J Kidney Dis* 2004; 43: 342-9.
 24. Formica M, Olivieri C, Livigni S, et al. Hemodynamic response to coupled plasmafiltration-adsorption in human septic shock. *Intensive Care Med* 2003; 29: 703-8.
 25. Bellomo R, Baldwin I, Cole L, Ronco C. Preliminary experience with high volume hemofiltration in human septic shock. *Kidney Int* 1998; 53 (Suppl 66): S182-5.
 26. Reeves JH, Butt WW, Shann F, et al. Continuous plasmafiltration in sepsis syndrome. *Plasmafiltration in Sepsis Study Group. Crit Care Med* 1999; 27: 2096-104.
 27. Tetta C, Gianotti L, Cavaillon JM, et al. Coupled plasma filtration-adsorption in a rabbit model of endotoxic shock. *Crit Care Med* 2000; 28: 1526-33.
 28. Ronco C, Brendolan A, Lonnemann G, et al. A pilot study of coupled plasma filtration with adsorption in septic shock. *Crit Care Med* 2002; 30: 1250-5.
 29. Bindra DS, Zhang Y, Wilson GS. Design and in vitro studies of a needle type glucose sensor for subcutaneous monitoring. *Anal Chem* 1991; 63: 1692-6.
 30. Claremont DJ, Penton C, Pickup JC. Potentially implantable ferrocene-mediated glucose sensor. *J Biomed Eng* 1986; 8: 272-4.
 31. Johnson KW, Mastrototaro JJ, Howey DC, et al. In vivo evaluation of an electroenzymatic glucose sensor implanted in subcutaneous tissue. *Biosensors Bioelectron* 1992; 7: 709-14.
 32. Reach G, Wilson GS. Can continuous glucose monitoring be used for the treatment of diabetes? *Anal Chem* 1992; 64: 381A-386A.
 33. Sternberg R, Barrau MB, Gangiotti L, et al. Study and development of multilayer needle-type enzyme-based glucose microsensors. *Biosensors* 1989; 4: 27-40.
 34. Meyerhoff C, Bischof F, Mennel FJ, Sternberg F, Bican J, Pfeiffer EF. On line continuous monitoring of blood in men by a wearable device based upon an enzymatic amperometric lactate sensor. *Biosensors Bioelectron* 1993; 8: 409-14.
 35. Hu Y, Zhang Y, Wilson GS. A needle-type enzyme-based lactate sensor for in vivo monitoring. *Anal Chim Acta* 1993; 281: 503-11.
 36. Valenza F, G. Aletti, Fossali T, et al. Lactate as a marker of energy failure in critically ill patients: hypothesis. *Crit Care Med* 2005; 9: 588-93.
 37. Moatti-Sirat D, Velho G, Reach G. Evaluating in vitro and in vivo the interference of acetaminophen on glucose detection by a needle type glucose sensor. *Biosensors Bioelectron* 1992; 7: 345-52.
 38. Palmisano F, Zambonin PG, Centonze D. Amperometric biosensors based on electrosynthesized polymeric films. *Fresenius J Anal Chem* 2000; 366: 586-601.
 39. Centonze D, Guerrieri A, Malitesta C, Palmisano F, Zambonin PG. Interference-free glucose sensor based on glucose oxidase immobilized in an overoxidized non-conducting polypyrrole film. *Fresenius J Anal Chem* 1992; 342: 729-33.
 40. Centonze D, Guerrieri A, Malitesta C, Palmisano F, Zambonin PG. An in situ electrosynthesized poly-o-phenylenediamine/glucose oxidase amperometric biosensor for flow injection determination of glucose in serum. *Ann Chim (Rome)* 1992; 82: 219-34.
 41. Palmisano F, Centonze D, Guerrieri A, Zambonin PG. An interference-free biosensor based on glucose-oxidase electrochemically immobilized in a non-conducting poly(pyrrole) film for continuous subcutaneous monitoring of glucose through microdialysis sampling. *Biosensors Bioelectron* 1993; 8: 393-9.
 42. Palmisano F, Quinto M, Rizzi R, Zambonin PG. Flow injection analysis of L-lactate in milk and yoghurt by on-line microdialysis and amperometric detection at a disposable biosensor. *Analyst* 2001; 126: 866-70.
 43. Quinto M, Koudelka-Hep M, Palmisano F. Enzyme modified microband electrodes: cross-talk effects and their elimination. *Analyst* 2001; 126: 1068-72.
 44. Peng J, Gygi SP. Proteomics: the move to mixtures. *J Mass Spectrom* 2001; 36: 1083-91.
 45. Thongboonkerd V. Proteomics in nephrology: current status and future directions. *Am J Nephrol* 2004; 24: 360-78.
 46. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989; 246: 64-71.
 47. Humes HD, MacKay SM, Funke AJ, Buffington DA. Tissue engineering of a bioartificial renal tubule assist device: in vitro transport and metabolic characteristics. *Kidney Int* 1999; 55: 2502-14.
 48. Humes HD, Weitzel WF, Bartlett RH, et al. Initial clinical results of the bioartificial kidney containing human cells in ICU patients with acute renal failure. *Kidney Int* 2004; 66: 1578-88.
 49. Humes HD, Buffington DA, MacKay SM, Funke AJ, Weitzel WF. Replacement of renal function in uremic animals with a tissue-engineered kidney. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 451-5.