



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA XXIX Ciclo

Curriculum:

SCIENZE BIOMEDICHE

***OTTIMIZZAZIONE DELL'APPORTO PROTEICO NELLA
NUTRIZIONE DEL NEONATO PRETERMINE***

Dottoranda:

Dott.ssa Azzurra Pignotti

Relatore:

Prof. Virgilio P. Carnielli

Triennio 2013-2016

Sommario

1.INTRODUZIONE.....	4
STATO NUTRIZIONALE DEL NEONATO PRETERMINE E COMPENSO METABOLICO	4
1.2 APPORTO DEI NUTRIENTI IN NUTRIZIONE PARENTERALE.....	6
1.3 VALUTAZIONE DEI SINGOLI COMPONENTI.....	7
1.3.1 GLUCOSIO	7
1.3.2 LIPIDI.....	7
1.3.3 AMMINOACIDI	8
1.3.4 ENERGIA.....	9
1.3.5 PROTEINE.....	16
1.3.6 ALTRI COMPONENTI NUTRIZIONALI.....	20
2. STUDI SUL METABOLISMO AMMINOACIDICO NEI PRETERMINE PER OTTIMIZZARE LA CRESCITA	21
2.1 L'INTAKE DI AMMINOACIDI NEI NEONATI PRETERMINE.....	23
2.2.1 IL RUOLO GLI AMMINOACIDI FUNZIONALI DURANTE LA CRESCITA.....	25
2.2.2 SOMMINISTRAZIONE PRECOCE (EAA) DEGLI AMMINOACIDI NEI NEONATI PRETERMINE	29
2.2.3 L'UTILIZZO DI AMMINOACIDI ACETILATI NELLE MISCELE AMMINOACIDICHE: N-ACETIL-TIROSINA (NAT) E N-ACETIL-CISTEINA (NAC).....	31
2.2.4 LA SUPPLEMENTAZIONE DI GLUTAMMINA NEI PRETERMINE ELBW	33
2.2.5 REGOLAZIONE DELLA PROTEOLISI NEI NEOANTI PRETERMINE ELBW	34
2.2.6 LO SCREENING NEONATALE E IL PROFILO AMMINOACIDICO.....	36
2.2.5 L'ACIDOSI METABOLICA NEL PRETERMINE	40
3. LA BIOSINTESI DELL'UREA.....	42
3.1 L'UREA COME MARKER NEONATALE DEL CATABOLISMO PROTEICO	44
3.2 POSSIBILE CINETICA DELL'UREA NEI NEONATI IN NUTRIZIONE PARENTERALE	45
OBIETTIVO DELLA TESI.....	47
5.MATERIALI E METODI	49
5.1 DISEGNO SPERIMENTALE	49
5.2 CARATTERISTICHE DEI NEONATI PRETERMINE.....	50
5.3 RISCHIO-BENEFICIO	52
5.4 LE SOLUZIONI AMMINOACIDICHE INFUSE: PRIMENE 10% E TROPHAMINE6%.....	53
5.5 RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI	55
5.6 METODI ANALITICI E STRUMENTALI DI LABORATORIO.....	56
5.6.1 DETERMINAZIONE DEI TRIGLICERIDI (TG) MEDIANTE KIT.....	58
5.6.2 DETERMINAZIONE DELL'UREA PLASMATICA ED URINARIA MEDIANTE KIT	59
5.7 LA SPETTROMETRIA DI MASSA.....	61

ANALISI STATISTICA	63
6.RISULTATI.....	64
6.1 ANALISI DELL' AMMINOACIDOGRAMMA.....	64
6.2 UREA URINARIA E PLASMATICA NELLE DUE SOLUZIONI AMMINOACIDICHE	68
6.3 TOLLERANZA METABOLICA ALLE DUE MISCELE AMMINOACIDICHE.....	70
6.4 ANALISI DEI TRIGLICERIDI RISPETTO ALLE DUE MISCELE AMMINOACIDICHE.....	71
6.5 CRESCITA E MISURE ANTROPOMETRICHE DEI NEONATI INCLUSI NELLO STUDIO	72
7. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	75
BIBLIOGRAFIA	78

1.INTRODUZIONE

STATO NUTRIZIONALE DEL NEONATO PRETERMINE E COMPENSO METABOLICO

Oggi la ricerca pone sempre di più il paziente al centro, tra il laboratorio e la clinica, e grazie alle tecnologie di ultima generazione, che consentono di monitorare una quantità enorme di dati, è possibile valutare lo stato metabolico del paziente da tutti i punti di vista, soprattutto di quelli critici, considerando le caratteristiche del singolo, sulla base del nuovo concetto di “medicina personalizzata”. La realizzazione di un adeguato supporto nutrizionale è fondamentale nel trattamento del neonato pretermine, in quanto, riducendo gli effetti dell’ipermetabolismo e del catabolismo, conseguente ad un evento acuto, viene favorita la guarigione e quindi migliora la prognosi della malattia. È quindi molto importante mettere in atto un precoce programma nutrizionale, destinato a pazienti con una degenza prolungata, poiché la malnutrizione può favorire l’aumento della morbilità e della mortalità. Il rischio di malnutrizione consiste più frequentemente in un ridotto apporto di calorie e nutrienti rispetto ai reali fabbisogni del paziente (*Mirabile et al., 2014*). D’altra parte, non dobbiamo dimenticare che esiste il rischio opposto, cioè quello di una somministrazione eccessiva di calorie, soprattutto sotto forma di carboidrati, che può portare ad un aggravamento delle condizioni del paziente dal punto di vista sia respiratorio che della funzionalità epatica. Un’anamnesi accurata del neonato pretermine, soprattutto di quello di peso estremamente basso (Extremely Low Birth Weight, ELBW), all’ingresso della terapia intensiva ci permette di inquadrare il suo stato nutrizionale. È importante avere informazioni prima o durante il ricovero, sulla capacità di alimentarsi, sulla funzionalità dell’apparato gastroenterico, su eventuali patologie, o sintomi, che possono interferire con l’alimentazione, su allergie o intolleranze, manifestazioni cliniche o analisi di laboratorio che indichino un eventuale deficit o un eccesso di nutrienti. Questa valutazione è utile per individuare gli obiettivi nutrizionali, che comprendono le adeguate richieste idriche, proteiche, caloriche e dei micronutrienti, la modalità di nutrizione, i target di trattamento e i parametri clinici e laboratoristici da monitorizzare. La modalità del monitoraggio nutrizionale e la periodica rivalutazione dovrebbero essere stabilite in base al decorso clinico del paziente ed alla velocità con la quale si vogliono raggiungere gli obiettivi stabiliti. La valutazione dello stato nutrizionale si basa sui fattori di seguito elencati:

1. Parametri antropometrici
2. Albumina
3. Pre albumina
4. Transferrina
5. Metil istidina urinaria

6. Parametri immunologici

7. Bilancio azotato

I parametri antropometrici sono in grado di fornire solo dati empirici come ad esempio peso corporeo, rapporto altezza/peso, circonferenze (cranica). Invece tra i parametri bioumoral, l'albumina è responsabile dell'80% dell'attività colloidale-osmotica del plasma; essa svolge un ruolo chiave nel trasporto di molecole con grande importanza funzionale: bilirubina, acidi grassi, ormoni e farmaci. Essa rappresenta la principale riserva di aminoacidi e contribuisce, in condizioni di emergenza, a mantenere l'omeostasi di proteine viscerali. I livelli plasmatici di albumina circolante sono soggetti a variazioni quantitative dipendenti da stress, da nefropatie o da epatopatie, ma avendo un'emivita molto lunga (20 gg), rappresenta un marker nutrizionale poco attendibile. Ad essa vengono infatti preferiti i dosaggi della pre albumina. I parametri immunologici determinano lo stato di malnutrizione che si associa ad una depressione del sistema immunitario (es: riduzione totale dei linfociti, riduzione delle IgG), e quindi ad una maggiore predisposizione a contrarre infezioni. Per quanto concerne il bilancio azotato, la correttezza dell'apporto calorico nutrizionale, in termini di anabolismo o catabolismo proteico, va valutata attraverso il rapporto tra l'introduzione di substrato azotato e la perdita di cataboliti azotati. Questa misurazione si può perfezionare determinando la quantità di azoto urinario escreto, avendo così una precisa valutazione sull'utilizzo dei substrati. Tale metodo permette di individuare se il paziente è in fase ipermetabolica o ipometabolica e, di conseguenza, consente di stabilire l'adeguata quantità di calorie da somministrare. In tal modo si evita di andare incontro all'overfeeding o all'underfeeding. Si deve, comunque tener presente che il neonato in terapia intensiva è sedato, la sua attività fisica è minima, soprattutto se è sottoposto a ventilazione meccanica, ed inoltre l'accrescimento è fermo a causa del processo catabolico in atto. Per fornire al piccolo paziente una nutrizione adeguata in tal periodo si deve raggiungere un compromesso con altre esigenze che si presentano in questa fase critica quali la necessità di attuare una fluidorestrizione, le interruzioni dell'alimentazione dovute a ripetuti tentativi di estubazione o a esecuzione di esami radiologici e le complicanze dovute alle intolleranze gastrointestinali. Per far fronte a queste difficoltà è necessario utilizzare la nutrizione parenterale ad una concentrazione maggiore, somministrare farmaci a concentrazioni più alte ed utilizzare formule enterali a bassa osmolarità.

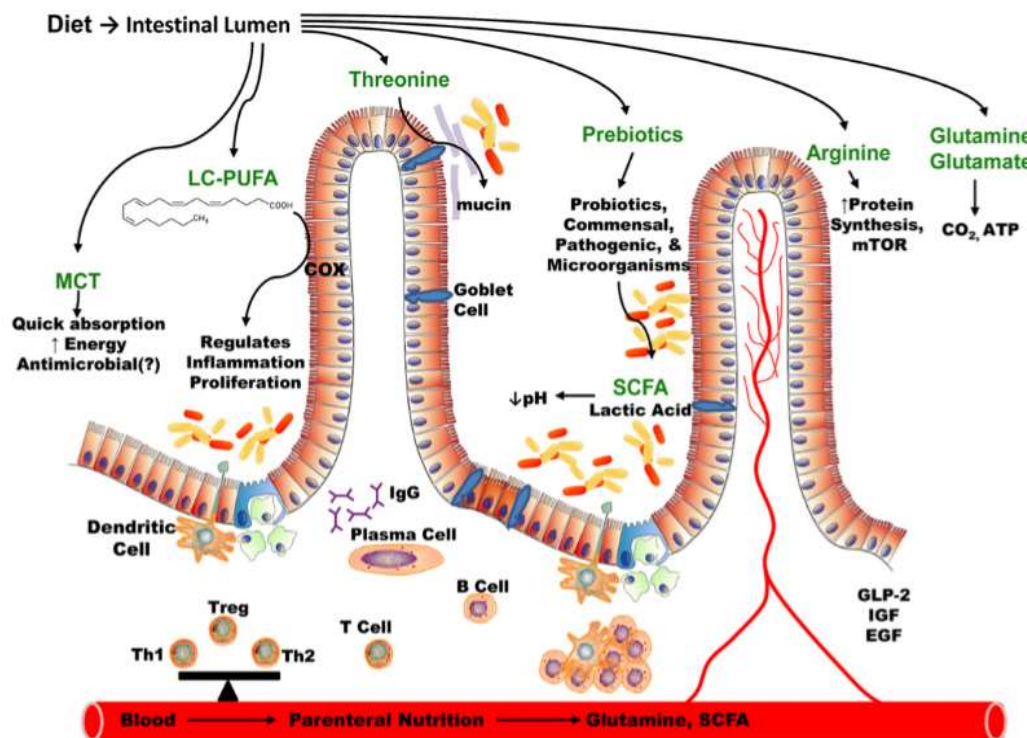


Figura 1. Macronutrienti, prebiotici, amminoacidi e fattori di crescita nel lume intestinale durante la digestione, ed immunologia della mucosa durante la crescita e lo sviluppo; COX, cyclooxygenase; EGF, epidermal growth factor; GLP-2, glucagon-like peptide 2; IGF, insulin-like growth factor; LC-PUFA, long-chain PUFA; MCT, medium-chain triglycerides; mTOR, mammalian target of rapamycin; Th1, T helper type 1 cells; Th2, T helper type 2 cells; Treg, regulatory T cells. (Jacobi et al., 2012).

1.2 APPORTO DEI NUTRIENTI IN NUTRIZIONE PARENTERALE

Una nutrizione per via parenterale (Parenteral Nutrition, PN) deve essere intrapresa quando l'accesso al tratto gastrointestinale è impedito per motivi di tipo anatomico e/o funzionale, e si presume che tale situazione sia di durata sufficiente a compromettere lo stato di nutrizione del paziente. In ambito neonatale due condizioni cliniche indicano l'esecuzione di una PN parziale o totale: la prematurità estrema e la sindrome respiratoria grave. Nel neonato di peso estremamente basso (ELBW) si deve considerare che la situazione metabolica è profondamente diversa da quella fetale. Nel feto all'inizio del III trimestre il metabolismo energetico è scarsamente dipendente dai lipidi, e lo diventa gradualmente man mano che si avvicina il termine della gestazione. L'apporto nutrizionale durante la PN è fornito da preparati disponibili in commercio che comprendono tutti i nutrienti idrosolubili e liposolubili miscelabili nelle infusioni della parenterale.

1.3 VALUTAZIONE DEI SINGOLI COMPONENTI

1.3.1 GLUCOSIO

Il glucosio è il principale carboidrato impiegato per via parenterale, viene utilizzato da tutte le cellule dell'organismo ed è indispensabile per alcune di esse quali cellule cerebrali, globuli rossi, globuli bianchi e per la corticale renale. Introdotto per via venosa, segue 3 vie metaboliche:

1. Trasformazioni in glicogeno epatico e muscolare
2. Trasformazioni in lipidi
3. Ossidazione endocellulare in glucosio-6-fosfato, mediante l'enzima esochinasi, da cui prendono origine la via glicolitica ed il ciclo di Krebs

Il glucosio viene fornito a bassa concentrazione di insulina, ad una velocità che riflette l'utilizzo dell'energia. L'utilizzo del glucosio non deve superare i 6-8 mg/kg/min onde evitare iperglicemia con glicosuria.

1.3.2 LIPIDI

Nel neonato ELBW, i lipidi sono una fonte significativa di energia; essi rappresentano una componente indispensabile per la dieta in quanto coprono il 25-30 % delle richieste energetiche e sono in grado di fornire più del doppio di energia rispetto ai carboidrati. Le emulsioni lipidiche a base di oli vegetali, oltre a prevenire il deficit di acidi grassi essenziali, rappresentano una fonte energetica concentrata e sono somministrabili anche per via periferica grazie alla loro isoosmolarità con il plasma. Wrettlind nel 1975 fu il primo a formulare l'emulsione a base di oli di semi di soia (Intralipid al 10-20%), utilizzata nella NP con un potere calorico molto elevato di circa 9 Kcal/g. L'uso di emulsioni al 20% invece che al 10% porta a concentrazioni plasmatiche più basse di fosfolipidi, colesterolo e trigliceridi. Questa emulsione possiede un effetto risparmiatore di proteine per il suo elevato contenuto calorico; le caratteristiche morfologiche delle particelle lipidiche contenute nell'Intralipid sono sovrapponibili a quelle dei chilomicroni. La rottura delle particelle in emulsione, consente la liberazione dei trigliceridi, che a loro volta vengono scissi in glicerolo ed acidi grassi liberi. La posologia deve essere stabilita e modulata in base alla capacità del neonato di eliminare i lipidi somministrati. La clearance delle emulsioni lipidiche si riduce nel danno epatico grave, nell'ostruzione delle vie biliari, nella sindrome nefrosica, nell'iperlipidemia, nel diabete e

nell'insufficienza polmonare grave. Tutte le predette condizioni rappresentano controindicazioni all'infusione di tale miscela lipidica, per cui deve essere utilizzata con estrema cautela nei pazienti settici e con alterazioni del metabolismo lipidico. Possono verificarsi aumenti delle transaminasi, della fosfatasi alcalina e della bilirubina dopo sei settimane di infusione. Tutti i valori possono essere modificati sospendendo o diminuendo la dose per qualche giorno. Nella NP destinata all'età neonatale è opportuno ricordare anche la possibilità di utilizzare miscele lipidiche costituite al 50% da trigliceridi a catena media (MCT), formati da acidi grassi con un numero di atomi di carbonio compreso tra 6-12, ed al 50% da trigliceridi a catena lunga (LCT), formati da acidi grassi con un numero di atomi di carbonio superiori a 12. I vantaggi di tali miscele sono riconducibili all'associazione degli LCT ricchi di acidi grassi essenziali, con gli MCT, caratterizzati da un'ossidazione più facile e veloce, da una più immediata produzione di energia e scarsa incidenza sul sistema reticolo-endoteliale. Il loro utilizzo con apporti inferiori a 3 g/Kg/die non produce incremento della chetogenesi e della termogenesi e può essere consigliato anche nella prematurità.

1.3.3 AMINOACIDI

Durante l'accrescimento le entrate di azoto superano le perdite, vi è pertanto un bilancio di azoto positivo, in quanto la sintesi proteica supera la scissione. In ogni età tuttavia si apprezzano perdite proteiche nelle urine e nelle feci, compensate mediante la sintesi di nuove proteine a partire da un pool di aminoacidi. Una parte dell'introduzione amminoacidica giornaliera è perciò dedicata al recupero delle perdite. In condizioni di scarso apporto calorico o di aumentato catabolismo, le proteine e gli aminoacidi strutturali devono assumersi la funzione energetica. Si instaura un equilibrio di azoto negativo se vi è carenza di un aminoacido essenziale, in quanto tale mancanza rende impossibile la sintesi di determinate proteine; gli altri aminoacidi implicati vengono deaminati come azoto in eccesso, escreto come urea. Le soluzioni utilizzate in PN contengono aminoacidi essenziali e non essenziali, in rapporti variabili, in base alle esigenze ed all'età del paziente. Nel pretermine e nel neonato a termine vengono utilizzate due soluzioni per infusione di aminoacidi il Trophmine 6% e il Primene 10% (Baxter S.p.A.). L'obiettivo del trattamento nutrizionale dei neonati è fornire un sufficiente apporto amminoacidico e calorico per la sintesi proteica e la crescita. La determinazione del bilancio azotato, il controllo del peso e del bilancio idroelettrolitico sono i metodi di elezione per stabilire il fabbisogno individuale di proteine. Normalmente gli aminoacidi vengono miscelati con soluzioni ipertoniche di glucosio, elettroliti e lipidi ed integrate con fosfati, calcio e magnesio. L'apporto giornaliero di aminoacidi e glucosio va incrementato gradualmente, fino al raggiungimento della dose ottimale, con frequenti controlli laboratoristici (glicemia, emocromo, bilancio azotato, emogasanalisi e ammoniemia). L'iperammoniemia è di particolare importanza nei neonati poiché per

difetti metabolici genetici è talvolta associata a ritardo mentale. Anche la funzione epatica, se immatura, può causare iperammoniemia. Particolare attenzione richiedono alcune peculiari condizioni, come le anomalie del metabolismo amminoacidico. Le possibili complicanze sono: acidosi metabolica, ipofosfatemia, alcalosi metabolica, aumento degli enzimi epatici, iperammoniemia e aumento del Blood Urea Nitrogen (BUN). La somministrazione di aminoacidi essenziali può determinare iperammoniemia nei neonati di basso peso gestazionale. Sono disponibili in commercio due formulazioni specifiche per pazienti affetti da epatopatie: una contiene L-aminoacidi con concentrazioni inferiori di aminoacidi aromatici e maggiori di aminoacidi ramificati, l'altra costituita solo da aminoacidi ramificati.

1.3.4 ENERGIA

Soddisfare i fabbisogni energetici è l'obiettivo fondamentale di una terapia nutrizionale parenterale, per impedire sia la depauperazione delle scorte caloriche endogene, rappresentate dal glicogeno e dai grassi, sia l'ossidazione delle proteine endogene (catabolismo), che verrebbero utilizzate a scopo calorico una volta esaurite le scorte energetiche. Quest'ultima condizione, che è da considerare patologica dopo la nascita, è in realtà una condizione fisiologica durante la vita fetale, in cui il metabolismo energetico fetale nel terzo trimestre di gravidanza si basa non tanto sull'apporto di grassi, quanto per una quota sul glucosio di origine placentare, il cui apporto riflette esclusivamente il quantitativo utilizzato a scopo energetico, e per una quota sull'ossidazione dell'eccedenza dell'apporto amminoacidico placentare, doppio rispetto alle strette necessità di accrescimento proteico, e che quindi contribuisce in modo significativo alla produzione di energia fetale. Si consideri la possibilità di somministrazioni substrati diversi per qualità e quantità. L'altro scopo che si prefigge la PN è quello di fornire un apporto di calorie non proteiche, proporzionale all'apporto proteico, tale da permettere di ottenere una ritenzione azotata con formazione di nuovi tessuti (massa magra) ed il deposito di energia sotto forma principalmente di grassi. Le calorie richieste da un neonato prematuro sono definite dall'American Academy of Pediatrics. Ai fini di un computo parenterale va ricordato che le voci relative all'azione dinamica specifica del cibo ed alle perdite fecali non debbono essere computate per i pazienti in PN. Come è stato premesso, vi è uno stretto legame tra energia e proteine, in quanto fornire calorie non proteiche da sole non soddisferebbe al requisito fondamentale di evitarne l'ossidazione. Il "link" tra energia e proteine considerato fino ad ora ottimale per il neonato a termine è di 150 Kcal/kg/die per grammo di azoto, pari a 6,25 grammi di aminoacidi. In realtà per il neonato pretermine quanto più diminuisce l'età gestazionale tanto più mancano sicure informazioni analoghe, in quanto il metabolismo dell'ELBW è caratterizzato sia da un maggior rapporto sintesi/catabolismo

proteico, fattori entrambi dipendenti dall'energia, sia da un maggior rapporto sintesi/catabolismo proteico. La spesa energetica per la crescita è pari a 4,9 Kcal/g di tessuto guadagnato, ripartita tra energia necessaria alla deposizione di tessuto grasso e tessuto proteico. Per ogni grammo di tessuto grasso depositato vengono spese come costo metabolico 1,6 Kcal mentre 7,9 Kcal vengono depositate come energia. Per ogni grammo di tessuto proteico depositato vengono invece spese come costo metabolico 10 Kcal, mentre solo 4 Kcal sono depositate come energia. Risulta evidente come la deposizione di proteine abbia un alto costo metabolico rispetto al grasso, giustificato dall'alto turnover proteico. Circa il 20% dell'energia utilizzata per il metabolismo basale viene utilizzata per il metabolismo proteico. Essa è pari a circa 4-5 Kcal per ogni grammo di proteine depositate e serve a coprire la quota di energia depositata. Il limite superiore di apporto proteico stimato per raggiungere il "gold standard" della ritenzione azotata con i rapporti calorici precedentemente indicati per un ELBW di peso compreso tra 700 e 1000 g è di 3,85 g/kg/die e potrebbe essere leggermente più alto per i neonati di peso inferiore a 700g. Va ricordato inoltre che nel feto la placenta pompa attivamente aminoacidi ad età gestazionali paragonabili a quelle degli ELBW che giungono nei reparti di Terapia Intensiva Neonatale. Siccome la produzione di urea avviene come conseguenza dell'ossidazione degli aminoacidi, il reperimento di un incremento nella concentrazione dell'azoto ureico ematico (BUN) potrebbe essere indice di un'effettiva utilizzazione degli aminoacidi come supplemento di energia, più che di intolleranza al carico proteico. Nella pratica clinica con la PN è possibile iniziare la prevenzione del catabolismo proteico, soprattutto nel neonato con patologia, introducendo fin dal primo giorno di vita gli aminoacidi nelle soluzioni parenterali. È accertato che ciò migliora anche la tolleranza glucidica del neonato. L'American Academy of Pediatrics suggerisce gli apporti necessari per raggiungere l'obiettivo sopracitato, 80-85 Kcal/kg/die con 2,7 - 3,5 g/Kg/die di proteine. A più alti apporti non corrisponde una maggior crescita.

1.3.4.1 ENERGIA E BILANCIO AZOTATO IN NEONATI ELBW

Nel corso degli ultimi anni sono stati riportati molti studi riguardanti l'equilibrio metabolico nei neonati prematuri alimentati con latte materno o con formule per pretermine, ma pochi di essi interessano i neonati con un peso alla nascita molto basso (<1250 grammi), gli ELBW (*De Curtis et al., 1987*). Questi neonati sono i più vulnerabili alle carenze nutrizionali, più è immaturo lo sviluppo del metabolismo, e più è alta la probabilità che essi soffrano di una crescita ridotta e che vadano incontro ad altre conseguenze dovute a scarsa nutrizione. In un altro studio sono stati randomizzati otto bambini alimentati con latte materno e otto sono stati alimentati con una formula pretermine (Pre-Aptamil Milupa ltd). Utilizzando la regressione multipla, è stato scoperto che la conservazione di energia non ha influenzato la correlazione tra l'assunzione di azoto e la ritenzione di azoto, sia con latte materno o con la formula, o quando si utilizzavano i dati combinati. Il tasso medio di ritenzione di azoto nei neonati nutriti con formula era 377 mg/kg/die, che era simile al tasso di accumulazione dell'azoto fetale compreso tra le 28 e 32 settimane di gestazione circa 350 mg/kg/die. Inoltre la conservazione dell'energia era più alta nei neonati alimentati con Pre-Aptamil. È stata trovata una correlazione lineare positiva tra la ritenzione di azoto e la ritenzione di energia. Il bilancio azotato negli adulti è rapidamente influenzato dalla quantità di energia nella dieta, e diversi studi nei neonati a basso peso alla nascita hanno dimostrato che la correzione di steatorrea, o di una maggiore assunzione di energia, può migliorare la ritenzione di azoto. Questi dati, pertanto, confermano recenti osservazioni sull'aumento di peso nei neonati alimentati con latte umano integrato con proteine, rispetto a quelli in cui il latte è stato integrato solo con energia sotto forma di trigliceridi a catena media (MCT). L'energia nel latte materno espresso non pastorizzato e nelle formule per i pretermine è generalmente molto ben assorbita da parte dei neonati con peso alla nascita molto basso, e può essere che l'energia non sia sempre il fattore limitante della crescita, come si creda sia. Per questi motivi, il deficit proteico sembra essere l'unica causa del problema relativo alla scarsa crescita. Recentemente è stata descritta una relazione matematica quantitativa tra i cambiamenti della composizione corporea e i tassi di ossidazione dei macronutrienti giornalieri necessari per generare questi cambiamenti. Da questa relazione è emerso che l'assunzione di cibo e la dinamica della spesa energetica durante l'overfeeding adulta e l'underfeeding possono essere utilizzati per il calcolo delle dinamiche longitudinali della "whole body" e dell'ossidazione dei macronutrienti. I risultati dello studio presente in letteratura (*Jordan et al., 2008*) suggeriscono che si può calcolare la spesa energetica, in relazione ai tassi di ossidazione dei macronutrienti, alla composizione corporea, all'assunzione di cibo e al dispendio energetico nei bambini in crescita. È stato usato un modello matematico per integrare gli stessi dati nel tempo e per calcolare il consumo di energia, il dispendio energetico totale, prendendo in considerazione i tassi osservati di deposizione di tessuto grasso e

magro. Il modello matematico creato ha garantito che i “destini” dei macronutrienti venivano contabilizzati in modo continuativo nel tempo. Possiamo quindi dire, grazie a questo algoritmo, che esiste una coordinazione dinamica nel bilancio dei macronutrienti durante la crescita del neonato.

1.3.4.2 IL BILANCIO AZOTATO NEL NEONATO PRETERMINE

In condizioni di equilibrio metabolico, esiste una stretta relazione fra le proteine introdotte con la dieta, catabolismo proteico e urea generata. Quest’ultima non viene solo prodotta dall’organismo attraverso il catabolismo delle proteine, ma deriva anche dall’ammonio riassorbito dall’intestino attraverso il circolo portale. Il bilancio azotato è un indice chimico clinico ottenuto mediante la differenza tra azoto introdotto e azoto eliminato o perso. Questa definizione risulta essere un po’ troppo generalizzata; sono stati proposti in letteratura vari modelli cinetici per il calcolo del bilancio azotato, che trovano applicazione in questo campo, in quanto alcuni di essi consentono di predire la concentrazione dell’urea in funzione della quantità di proteine prescritte nella dieta. Dal punto di vista fisico, si tratta di un vero e proprio bilancio di materia. Tenendo presente che le proteine contengono il 16% di azoto (100 g di proteine/16 g di azoto= 6,25), possiamo ottenere la corrispondente quantità di proteine in grammi, moltiplicando i grammi di azoto per 6,25. Viceversa, sapendo quanti grammi di proteine ci sono all’interno di un determinato alimento, possiamo ricavare l’azoto introdotto dividendo per 6,25. L’azoto viene perso anche attraverso le feci, le urine, il sudore, la cute, le unghie, e la somma di queste uscite deve essere sottratta dal quantitativo ingerito sotto forma di un valore fisso che per gli adulti è di 3 g/L e per i neonati di 0,2 g/L. In particolare nel calcolo del bilancio azotato si sottraggono alle entrate proteiche assunte con dieta (amminoacidi, PN, ecc) le uscite che equivalgono alla diuresi nelle 24h; si deve tener conto dell’azoto ureico urinario (UUN), dell’azoto ureico non urinario (NUN), dell’azoto proteico urinario (APO) e delle variazioni del pool azotato (ΔN) che sono approssimate come detto a 3 g/L nell’adulto e a 0,2 g/L nel neonato. In situazioni patologiche si possono avere altre perdite di azoto ad esempio con il vomito, drenaggio, fistole ed ustioni. In generale il bilancio azotato si calcola come mostrato nell’equazione sottostante:

$$\text{BILANCIO AZOTATO} = N_{\text{totale}} - [(UUN + NUN + APU)] \pm \Delta N$$

dove l’azoto ureico urinario (UUN) si ottiene moltiplicando l’urea urinaria per 0,46 ed è il 75% dell’azoto urinario totale. Il restante 25% è azoto non ureico (NUN) ovvero creatinina, amminoacidi,

proteine a basso peso molecolare. L'azoto ureico corrisponde all'azoto presente nella molecola dell'urea e si può quantificare in 28/60 g di peso di una mole di urea, che corrisponde a circa il 50% dell'azoto totale; esso si calcola dividendo la concentrazione di urea per 2,14 mg/dL e viene chiamato azoto ureico o BUN (Blood Urea Nitrogen):

$$\text{BUN} = [\text{urea}] / 2.14$$

ovvero il rapporto tra il peso molecolare dell'urea e dell'azoto ureico. La quantità di proteine assunte con la dieta dipende quindi dal bilancio azotato. Oltre alle entrate e alle uscite di azoto, dobbiamo considerare anche la ritenzione proteica e le variazioni del pool dell'urea, che può essere più o meno espanso, in base all'aumento dell'urea e alla disidratazione del paziente che va corretta con il calo ponderale giornaliero. Per cui dopo aver ottenuto l'equivalente ureico proteico, si corregge per la perdita fissa di azoto non ureico e per l'espansione del pool dell'urea. Tale operazione si ottiene sottraendo dapprima le perdite fisse, come detto in precedenza, e poi al valore ottenuto di ritenzione apparente, si sottrae ancora un valore fisso di 0,54 g/L per ottenere la ritenzione corretta di proteine ossidate che non vengono calcolate nell'escrezione. Ad ogni grammo di proteine ossidate corrispondono 4,6 mmol/L di urea, quindi se l'urea aumenta di 20 mg/dl in 24h, bisogna correggere per l'espansione del pool urinario considerando anche le proteine ossidate non calcolate; otteniamo così la ritenzione proteica corretta per l'espansione del pool dell'urea. In generale possiamo dire che "equilibrio" nel bilancio azotato significa che l'azoto assunto con la dieta giornalmente deve bilanciare quello perso, ovvero:

$$N_{in} = N_{out}$$

Nel paziente sano il bilancio è nullo; in caso di malattia o malnutrizione, a causa del catabolismo proteico, che dipende da sostanze note come citochine infiammatorie, diventa negativo:

$$N_{in} < N_{out}$$

Durante la crescita e negli sportivi che seguono una alimentazione controllata il bilancio tende ad essere positivo, poiché l'organismo è in fase di sintesi proteica al livello tissutale:

$$N_{in} > N_{out}$$

Per mantenere un bilancio dell'azoto nullo o tendente al positivo, un soggetto sano adulto deve assumere 0,75-1 g di proteine per Kg/die secondo le indicazioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS). Nei neonati, specialmente in quelli gravemente pretermine ELBW, la determinazione del bilancio azotato, è uno dei parametri più importanti che si deve prendere in considerazione per stabilire il fabbisogno di proteine individuale. Per garantire un apporto proteico ai neonati le indicazioni pediatriche raccomandano 2,5-3,5 g/Kg/die. In condizioni di scarso apporto calorico o aumentato catabolismo, le proteine e gli aminoacidi strutturali devono assumere la funzione energetica, con una diversione della sintesi proteica di entità proporzionale dell'evento stressogeno. Si instaura quindi così un bilancio negativo; ugualmente, la carenza di un aminoacido essenziale, rende impossibile la sintesi di determinate proteine e gli altri aminoacidi implicati nel processo, essi vengono deaminati come azoto in eccesso, escreto dall'organismo come urea. Il fabbisogno di azoto deve inoltre rispettare alcuni range prestabiliti e l'aumento dello stesso deve avvenire attraverso step di 0,025-0,05 g/Kg/die; le Kcal specifiche per ogni paziente sono determinate dai metodi di calorimetria indiretta (BEE, Basal Energy Expendure, Harris-Benedict), ma dipendono anche dall'attività fisica (riposo, allettato sveglio e deambulante), dalla dieta e dalle patologie. Per calcolare il dispendio energetico totale si deve considerare un fattore stressogeno alla volta. I principali fattori di stress sono la malnutrizione, la tolleranza metabolica, la chirurgia elettiva, le spesi e i traumi. La tolleranza metabolica in termini di carboidrati, lipidi e proteine, è di grande interesse nella neonatologia in quanto spesso le miscele amminoacidiche infuse durante la PN portano all'acidosi metabolica. Per contrastare tale problema si tiene conto dell'indice SBE (Standard Base Excess), ovvero della presenza di basi nel sangue, per lo più di HCO_3 . Se tale valore diventa negativo vuol dire che c'è carenza di basi e quindi il soggetto presenta acidosi metabolica. Oltre alla tolleranza agli amminoacidi, non meno importante è quella ai carboidrati e lipidi; si parla infatti anche di carenze di acidi grassi essenziali EFA o AGE (Essential Fatty Acids) tra cui ω -3 e ω -6. Per tutti questi motivi, le soluzioni utilizzate in PN per i neonati pretermine contengono aminoacidi essenziali e non essenziali in rapporti variabili, in base all'età e alle esigenze del paziente. Inoltre alle soluzioni vengono aggiunti fosfati, e la positivizzazione del bilancio azotato è data dal sistema "Dual Energy System" che utilizza contemporaneamente come fonte di energia sia il glucosio che i lipidi sotto forma di emulsioni lipidiche; non è infatti necessaria la gluconeogenesi, viene già fornita sufficiente energia per attivare l'inizio della sintesi proteica, un processo endoergonico che richiede energia e la

demolizione dell'ATP. Anche l'aggiunta del fruttosio 1,6-difosfato positivizza il bilancio azotato, poiché tale substrato si inserisce nella via glicolitica e ne aumenta la velocità, favorendo il recupero metabolico del paziente attraverso un migliore utilizzo del carico calorico. Nella **Figura 2** sottostante è riportato un grafico dell'intake di amminoacidi in g/Kg/die contro il bilancio azotato in mg/Kg/die che mostra le differenti correlazioni riportate in letteratura di diversi studi metabolici durante i primi giorni di vita del neonato pretermine.

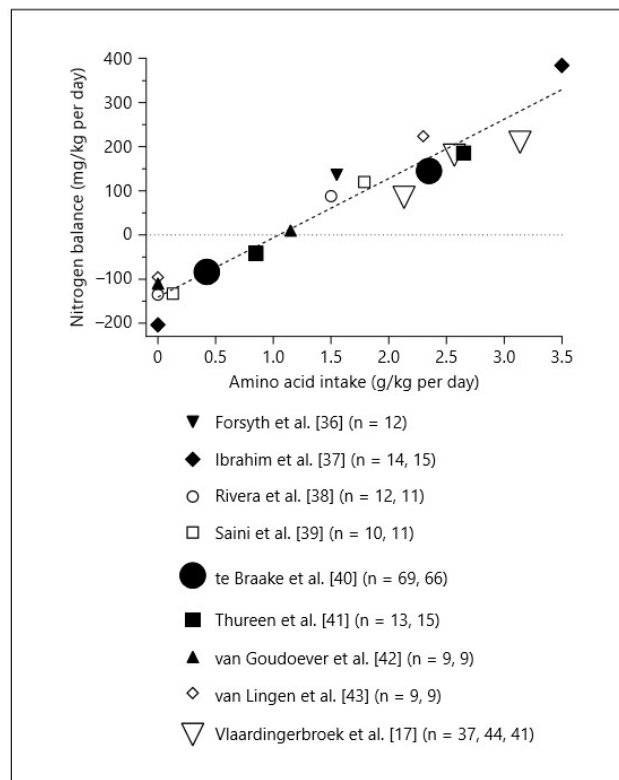


Figura 2. Le differenti correlazioni tra l'intake di amminoacidi e il bilancio azotato presenti in letteratura; la differente misura della grandezza dei simboli rappresenta il numero dei neonati inclusi nello studio (Van den Akker et al., 2016).

1.3.5 PROTEINE

Le proteine sono le maggiori componenti strutturali e funzionali delle cellule del corpo e derivano dall'unione di più catene di aminoacidi legate insieme da un legame peptidico. L'apporto proteico al livello nutrizionale cambia in base alle esigenze del singolo paziente, e soprattutto nei soggetti ospedalizzati come nel caso dei neonati pretermine. Le difficoltà nella valutazione dei fabbisogni proteici sono determinate dalla mancanza di una definizione univocamente accettata degli scopi della terapia nutrizionale in questi pazienti. È stato spesso suggerito di attribuire il ruolo di gruppo di controllo al feto in utero o al neonato pretermine alimentato con latte materno, ma entrambi questi modelli hanno differenti substrati biologici. Il feto è sottoposto a cambiamenti fisiologici molto maggiori rispetto al neonato pretermine, mentre il neonato pretermine alimentato con latte materno presenta generalmente un incremento ponderale ridotto e quindi non paragonabile al feto di pari età post-concezionale. Resta inoltre da sottolineare il fatto che le indicazioni della letteratura in materia di apporti proteici tendono a prestare scarsa attenzione ai singoli componenti delle proteine, ovvero agli aminoacidi. Nonostante sia stato definito, per ogni aminoacido essenziale, l'apporto necessario a mantenere un bilancio azotato equilibrato nell'adulto, e una normale crescita con bilancio azotato positivo nel bambino, non si hanno informazioni analoghe per quanto riguarda il neonato estremamente grave VLBW. Il principale obiettivo della somministrazione di aminoacidi per via parenterale nel pretermine è quello di evitare l'utilizzo delle proteine strutturali dell'organismo a scopo energetico, con distruzione netta di massa magra, e di permettere una ritenzione azotata positiva, rispettando il corretto rapporto fra calorie e proteine: ciò si ottiene fornendo 1 g di azoto ogni 150 Kcal (1 g di azoto è contenuto in 6,25 g di aminoacidi, perciò tale rapporto equivale a circa 1 g di proteine ogni 25 Kcal fornite). La prevenzione del catabolismo proteico è particolarmente importante nel pretermine, specie se affetto da patologia, per il quale è indicato un apporto di aminoacidi per via parenterale fin dal primo giorno di vita, che permette inoltre una maggior tolleranza al glucosio, specie nel neonato ELBW. È stato stimato che nel neonato in nutrizione enterale l'apporto di 480 mg/Kg/die di azoto, sufficiente a riprodurre una ritenzione azotata simile a quella del feto, si raggiunge fornendo 3.5-4 g/Kg/die di aminoacidi con 120 Kcal/Kg/die non proteiche. In corso di NP tale obiettivo si raggiunge con 80-90 Kcal/Kg/die non proteiche e con 2.5-3.2 g/Kg/die di aminoacidi. Il secondo obiettivo è evitare il rischio di sovradosaggio; è perciò consigliabile non eccedere apporti di 3.5 g/Kg/die che pongono il neonato a rischio di iperammoniemia, acidosi metabolica, iperaminoacidemia, coma isosmolare, colestasi e riduzione del Q.I. Tuttavia occorre tenere presente che in corso di stress (sepsi, ustioni, traumi, interventi chirurgici) il fabbisogno proteico aumenta in misura considerevole. Il terzo obiettivo è quello di fornire al pretermine proteine adeguate da un punto di vista qualitativo. La risposta del neonato alla

somministrazione di quantità differenti di proteine si evidenzia a livello di crescita, di risposta biochimica e di outcome neurologico. La crescita del pretermine alimentato con differenti tipi e quantità di proteine è tuttora oggetto di studio; le conoscenze attuali permettono di affermare comunque che il neonato pretermine ha fabbisogni proteici più elevati rispetto al neonato a termine. Tuttavia il parametro della crescita è troppo poco specifico quale marker della risposta alla somministrazione delle proteine, mentre riflette la composizione globale del tipo di alimentazione utilizzata. Il dosaggio delle proteine plasmatiche, dell'albumina e dell'azotemia riflettono in modo molto più preciso e specifico l'adeguatezza quantitativa degli apporti proteici. Il profilo aminoacidico plasmatico infine è un marker ancora più specifico e preciso dell'adeguatezza quantitativa ma soprattutto qualitativa degli apporti proteici. Viene quindi ribadita la necessità di modificare l'approccio classico nella valutazione dei fabbisogni proteici (basato sulla crescita e sul bilancio azotato) per puntare su studi che valutino le funzioni ed il metabolismo dei singoli aminoacidi (anche in considerazione delle importanti interazioni degli aminoacidi con la maturazione delle vie metaboliche e biochimiche dell'organismo, specie a livello del sistema nervoso centrale). Nel neonato pretermine oltre agli otto aminoacidi essenziali per l'uomo (valina, isoleucina, leucina, treonina, metionina, triptofano, fenilalanina e lisina) sono essenziali anche istidina, cisteina, tirosina e taurina, che devono quindi essere supplementati per nutrizioni parenterali di lunga durata. Per quanto concerne la scelta del prodotto da utilizzare, le soluzioni di aminoacidi cristallini sono sicuramente da preferirsi agli idrolisati proteici in quanto presentano minore rischio di iperammoniemia (per la presenza di adeguate quantità di arginina), maggiore flessibilità nella variazione della composizione e permettono una migliore ritenzione azotata. Dal 1986 è disponibile una miscela di aminoacidi cristallini Trophamine 6% opportunamente prodotta per soddisfare le esigenze del neonato: tale miscela è stata costituita sulla base di un calcolo matematico al fine di produrre un amminoacidogramma plasmatico simile a quello di un neonato sano a termine di 30 giorni di vita alimentato al seno due ore dopo il pasto. Caratteristica della miscela è la costituzione per il 60% con aminoacidi essenziali. La quota di aminoacidi non essenziali è equilibrata e costituita da acido aspartico e glutammico (e non da elevate dosi di glicina, come in altre miscele). È inoltre presente N-acetil-tirosina (unica forma solubile della tirosina) e taurina (molecola osmoprotettrice cerebrale ed extracerebrale il cui deficit è stato associato ad anomalie dello sviluppo retinico). La miscela non contiene cisteina, estremamente labile in soluzione acquosa, che può comunque essere aggiunta estemporaneamente sotto forma di cisteina cloridrato. Una promettente novità nel campo degli apporti amminoacidici in neonatologia è rappresentata somministrazione di glutamina in corso di nutrizione parenterale. La glutamina è l'aminoacido libero più diffuso nell'organismo: nei fluidi extracellulari costituisce il 25% degli aminoacidi liberi e raggiunge il 60% nel muscolo scheletrico.

La glutammina agisce non solo come precursore per la sintesi proteica, ma anche quale metabolita intermedio in numerosi processi metabolici: è un precursore nella sintesi di purine, pirimidine, nucleotidi e amino zuccheri, è il più importante substrato per la ammoniogenesi renale e perciò prende parte nella regolazione del bilancio acido-base. Essendo l'aminoacido quantitativamente maggiore in circolo, la glutammina svolge il ruolo di carrier di azoto tra i tessuti; per la sua diversificata partecipazione nelle reazioni di transaminazione la glutammina può essere considerata come il vero regolatore della omeostasi degli aminoacidi. La glutammina rappresenta un importante substrato metabolico per le cellule del tratto gastrointestinale; studi recenti hanno messo in evidenza che tutte le cellule rapidamente proliferanti (comprese quelle del sistema immunitario) dipendono strettamente dalla presenza di glutammina. Il principale organo di captazione della glutammina è l'intestino: la glutammina è essenziale per il mantenimento del metabolismo, della struttura e della funzione degli enterociti. È stato dimostrato che regimi nutrizionali parenterali non supplementati con glutammina portano ad un aumento della permeabilità della mucosa gastrointestinale, con possibile aumento della traslocazione batterica ed aumentato rischio di enterocolite necrotizzante e sepsi. L'uso routinario della glutammina come substrato nutrizionale è stato per lungo tempo ostacolato dall'instabilità della molecola (specie durante i procedimenti di sterilizzazione) e della sua limitata solubilità. La ricerca di substrati alternativi ha portato alla produzione di un dipeptide sintetico stabile ed altamente solubile, la L-alanil-L-glutammina. Gli studi eseguiti su questa molecola hanno evidenziato che dopo somministrazione parenterale la L-alanil-L-glutammina viene rapidamente rimossa dal plasma senza accumulo nei tessuti e con irrilevante perdita urinaria. Un considerevole attività idrolasica intra ed extracellulare permette l'idrolisi del legame del dipeptide con liberazione di alanina e glutammina che si rendono disponibili per la sintesi proteica e/o per la produzione di energia. È stato dimostrato che l'attività idrolasica è efficiente anche nel neonato, sia a termine che pretermine. I trials clinici su pazienti adulti condotti negli ultimi 10 anni hanno dimostrato i seguenti effetti della supplementazione con glutammina in pazienti ipercatabolici e/o malnutriti: aumento di spessore, contenuto proteico e contenuto di DNA della mucosa intestinale riduzione dei fenomeni di traslocazione batterica, dell'atrofia della mucosa intestinale, degli effetti collaterali dell'enterocoliteriduzione di steatosi epatica e di atrofia pancreatica mantenimento della riserva epatica di glutatione e del pool intracellulare di glutammina:

- miglioramento dello status immunitario;
- riduzione di infezioni aumentata sintesi proteica;
- aumentata ritenzione azotata;

-riduzione della durata del ricovero;

In neonatologia vi sono al momento pochi dati sull'uso della glutammina; tuttavia gli studi isotopici e clinici disponibili permettono di ipotizzare nel neonato VLBW un ruolo della glutammina nella prevenzione delle infezioni, nella promozione della maturazione e del mantenimento dell'integrità anatomica della mucosa gastrointestinale con migliorata tolleranza alla nutrizione enterale, nel mantenimento della funzione immunitaria, nella promozione della maturazione del tessuto polmonare, nella protezione delle cellule polmonari dal danno da radicali liberi, nella riduzione della durata della degenza. Inoltre non si sono osservati effetti tossici della somministrazione parenterale di glutammina (a concentrazioni pari al 20% dell'apporto amminoacidico totale) in neonati pretermine VLBW.

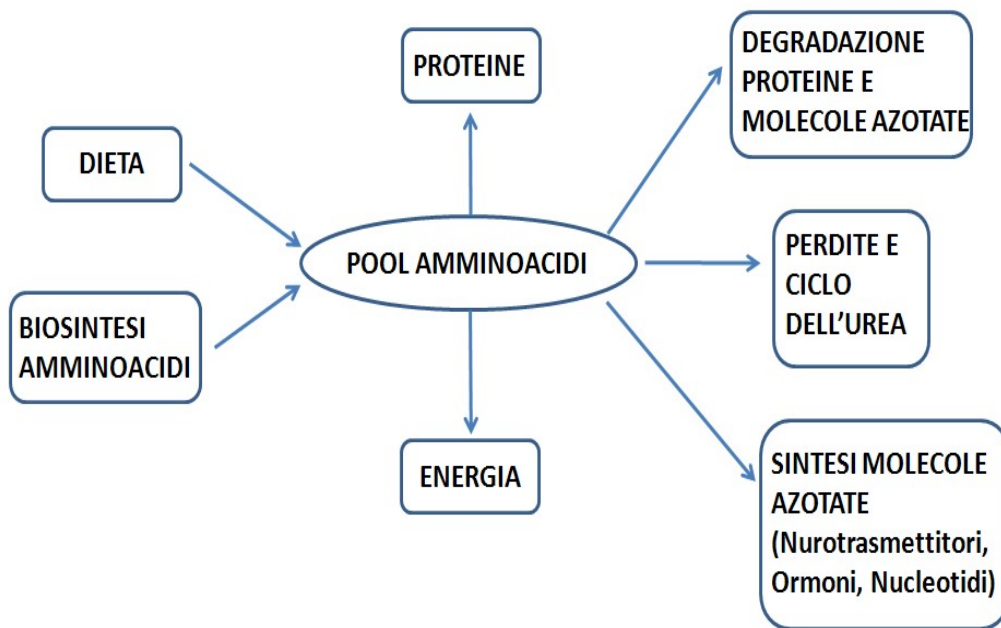


Figura 3. Schema del metabolismo del pool degli amminoacidi

1.3.6 ALTRI COMPONENTI NUTRIZIONALI

Per l'apporto nutrizionale completo del neonato pretermine, la NP necessita di altri elementi contenuti in maniera bilanciata che ottimizzino la crescita del paziente; uno di questi è il fruttosio 1,6 –difosfato che integrato nella NP migliora il controllo dei livelli glicemici e riduce la necessità di insulina. Tale substrato si inserisce nella via glicolitica e ne induce un incremento di velocità, mediante la sua demolizione aumenta la produzione di ATP, positivizza il bilancio azotato e favorisce il recupero metabolico del paziente attraverso un miglior utilizzo del carico calorico. Un altro componente importante è la carnitina che viene aggiunta alle miscele per metabolizzare più velocemente il contenuto di acidi grassi. Considerando che la beta ossidazione degli acidi grassi porta alla produzione di molecole di acetil-coenzimaA (acetil-CoA) a livello mitocondriale, è necessaria la presenza di un carrier che trasporti l'acetilCoA all'interno del mitocondrio affinché si abbia l'attivazione degli acidi grassi. Tale funzione è svolta appunto dalla carnitina. Sono fondamentali anche le vitamine: quelle liposolubili vengono aggiunte attraverso una formulazione pediatrica chiamata Vitalipid che le contiene in maniera bilanciata e quelle idrosolubili, aggiunte in forma liofilizzata. Infine, per quanto concerne gli oligoelementi multipli, esistono formulazioni pediatriche bilanciate comprensive di cloruro rame, cloruro di zinco, manganese, selenio, fluoruro e ioduro di potassio. Particolare attenzione va riservata nella somministrazione di rame e manganese nei pazienti affetti da colestasi in quanto questi elementi vengono escreti per via biliare.

2. STUDI SUL METABOLISMO AMMINOACIDICO NEI PRETERMINE PER OTTIMIZZARE LA CRESCITA

Gli aminoacidi sono uno dei principali elementi costitutivi per la crescita fetale e neonatale. Sia da studi umani che ovini, sappiamo che gli aminoacidi non sono utilizzati solo per la sintesi proteica nel feto, ma essi sono anche ossidati in larga misura. Grazie agli studi degli ultimi anni è migliorato l'equilibrio di azoto nei neonati prematuri, ma i presupposti necessitano di essere migliorati prima di concludere che la politica nutrizionale è oggi ottimale per questi pazienti critici (*Van den Akker et al., 2016*). Il metabolismo degli aminoacidi può essere studiato con vari metodi. Gli studi sul bilancio azotato sono preziosi e relativamente facili da eseguire in grandi gruppi di pazienti, ma forniscono solo informazioni sulla quantità di azoto trattenuto o escreto. Questi studi di solito includono l'utilizzo della sintesi proteica, l'ossidazione o idrossilazione. Nell'uomo vi sono indicazioni che gli aminoacidi sono ossidati, come risulta dalle concentrazioni di ammoniaca e urea superiori nell'arteria ombelicale rispetto alla vena (*Chien et al., 1993*) sono stati i primi a quantificare l'ossidazione di un singolo aminoacido nel feto umano a termine con tecniche di isotopi stabili. Essi hanno dimostrato che un terzo di tutta la leucina trasportata è stata ossidata dal feto per produrre energia. Combinando le cinetiche di fenilalanina fetale, con dati da leucina fetale e il metabolismo della valina, è stato teorizzato che i tassi di ossidazione di questi amminoacidi ramificati erano probabilmente ancora più elevato di quanto si pensava, quasi il 40% e il 60% di assorbimento totale rispettivamente. In primo luogo, questi studi fetali umani sono limitati al momento appena prima del taglio cesareo elettivo intorno al termine della gestazione e, in secondo luogo, non tutti gli aminoacidi sono stati studiati, il che esclude calcoli diretti dell'assorbimento fetale degli aminoacidi totali. Dalla letteratura sappiamo che è generalmente raccomandato per iniziare la nutrizione, somministrare aminoacidi precocemente subito dopo la nascita, insieme al glucosio. L'introduzione rapida concomitante dei lipidi parenterale è sostenuta, ma sembra spesso essere ritardata o somministrata solo in piccole quantità nelle prime 24-48 ore dopo la nascita. Senza tutto ciò servirebbero abbastanza calorie per sostenere la sintesi proteica che ha un'elevata esigenza energetica; così gli aminoacidi hanno teoricamente più probabilità di essere o impilati, portando ad un aumento delle concentrazioni nel plasma o intracellulare, oppure ossidati, producendo energia, ma anche sprecando prodotti come l'ammoniaca che deve essere convertita poi in urea. Mentre l'ossidazione degli aminoacidi durante i primi anni di vita è geneticamente probabilmente fisiologica, come è anche misurata in feti, i suoi prodotti di scarto non vengono assorbiti dalla placenta più dopo la nascita prematura. Le concentrazioni di urea sono più frequentemente misurate anche se l'interpretazione è difficile in quanto non si sa se i livelli superiori spesso visti sono nocivi o no. Le diverse soluzioni endovenose hanno la loro composizione basata sull'abbinamento teorico di concentrazioni di aminoacidi che possono essere trovati sia nel sangue

del cordone ombelicale sia nei neonati a termine allattati al seno. Pertanto, per migliorare la qualità nutrizionale, le esigenze specifiche di tutti gli aminoacidi (essenziali) e non sono ancora da determinare. Si può misurare il tasso di ossidazione di un aminoacido indicatore etichettato in un range di intake di un altro aminoacido che viene testato come “gold standard”. La ricerca della nutrizione neonatale negli ultimi decenni si è focalizzata principalmente sui primi giorni (1,3 e 5) o settimane di vita, o sulla fase stabile quando i neonati sono completamente nutriti per via enterale. Nonostante tutto quanto detto sopra, vari studi riguardanti diverse assunzioni di somministrazione parenterale di aminoacidi nei neonati prematuri convertono in un rapporto lineare con equilibrio di azoto. Gli aminoacidi, i mattoni che costituiscono le proteine sono i componenti più importanti per raggiungere una ottimale crescita neonatale. La quantità da somministrare è tuttavia difficile da generalizzare. Il loro metabolismo non può essere considerato separatamente, ma deve essere interpretato insieme agli altri macro e micronutrienti, considerando anche le condizioni cliniche e le patologie che potrebbero essere in atto. Purtroppo, solo pochi di questi fattori sono stati ad oggi svelati. Acquisendo maggiori conoscenze sia sulla fisiologia, sia sulla patologia fetale che neonatale, potremmo essere in grado di ottimizzare ulteriormente la crescita e l'esito funzionale di queste importanti molecole organiche nei neonati prematuri. Gli elevati fabbisogni proteici dei neonati prematuri durante le prime settimane di vita postnatale sono una questione ormai chiara. Questi neonati aumentano la massa e le proteine rapidamente durante le prime settimane di crescita postnatale e richiedono un rapporto proteina/energia molto più alto di neonati a termine. Le assunzioni di proteine consigliate sono 3,5-4,0 g/kg al giorno. Il fabbisogno proteico dei neonati con basso peso alla nascita (LBW) a 24-32 settimane di gestazione sono alti come 3,5-4,0 g/100 kcal e può essere soddisfatto solo se il latte materno è arricchito con fortificatori di latte umano. Il fabbisogno proteico dei neonati LBW, in particolare neonati con peso alla nascita molto basso ELBW, sono difficili da soddisfare. (*Haschke et al., 2016*) Se i neonati LBW ricevono il latte materno, sono urgentemente necessari migliori strategie di fortificazione. Al contrario, la maggior parte dei neonati alimentati artificialmente ricevono ancora troppe proteine, il che può portare a una rapida crescita durante l'infanzia e un aumento del rischio di obesità in età avanzata. Gli studi clinici in letteratura hanno confermato che l'alimentazione con formule a basso contenuto proteico rallentano la crescita dei neonati. Biomarkers come (IGF-1 o insulina) nei neonati nutriti con formule a basso contenuto proteico sono inferiori a quelli nei neonati nutriti con formule ad alto contenuto proteico. Le misurazioni della composizione corporea indicano adeguati tassi di accrescimento nei neonati alimentati con proteine di 1,6 g/100 kcal tra i 3 ei 6 mesi di età. I dati presenti in letteratura indicano che potrebbero esserci differenze di “programming” metabolico nei neonati che sono stati alimentati con formule ad alta o bassa quantità di proteine.

2.1 L'INTAKE DI AMMINOACIDI NEI NEONATI PRETERMINE

Gli aminoacidi sono quindi i costituenti fondamentali delle proteine. Essi svolgono funzioni fisiologiche di grande rilevanza clinica, ma ad oggi molti meccanismi di azione dei singoli aminoacidi all'interno del corpo risultano ancora sconosciuti. In biochimica gli aminoacidi si dividono in tre categorie principali: essenziali (EAA), non essenziali (NEAA) e semi-essenziali (SEAA), (*Burattini et al, 2016*). Quelli essenziali sono aminoacidi che non vengono sintetizzati in modo endogeno, e che quindi necessitano di essere aggiunti nelle soluzioni parenterali o di essere acquisiti attraverso una dieta; i non essenziali vengono sintetizzati da altri aminoacidi o dai loro precursori. I semi essenziali invece, sono anch'essi sintetizzati da altri aminoacidi o da precursori, ma non in tutte le circostanze. Nei neonati pretermine ad esempio non tutti gli enzimi deputati alla sintesi sono attivi ed altri hanno una limitata attività di sintesi, come la cisteina. Negli ultimi anni, la nozione di aminoacidi essenziali è cambiata e si è focalizzata meglio su concetti di nuova acquisizione quali la velocità di crescita neonatale e il bilancio azotato. Molti aminoacidi classificati come non essenziali sono risultati invece avere funzioni biologiche, fisiologiche e farmacologiche importanti. Studi in letteratura hanno dimostrato che in utero molti aminoacidi vengono trasportati al feto grazie ad un trasporto attivo ATP o sodio-dipendente, e che allo stesso tempo avviene uno scambio amminoacidico: in base alla funzione che ricoprono nella cellula alcuni vengono trasportati dentro ed altri fuori, indicando quindi che utilizzano come risorsa l'energia. Per tutti questi motivi, le soluzioni amminoacidiche infuse in parenterale contengono aminoacidi specifici per i neonati pretermine, in quanto essi hanno un intestino immaturo e per bypassare questo "gap" le richieste in termini di intake proteico sono maggiori. Inoltre gli aminoacidi hanno una velocità di sintesi differente l'uno dall'altro e nella somministrazione parenterale se in "overfeeding" o "underfeeding" possono compromettere a lungo termine il neurosviluppo. Sono raccomandati almeno 30-40 Kcal/g di aminoacidi per garantire l'utilizzo degli stessi per la crescita. Dalla letteratura possiamo evincere che una precoce somministrazione amminoacidica appena dopo la nascita porta ad un bilancio azotato positivo ed è quindi associata ad una maggiore crescita che è "l'outcome" di maggiore interesse soprattutto nel caso degli ELBW. Altri come (*Van de Akker et al, 2016*) sostengono che non ci sono differenze nella crescita, ma dopo due anni si può avere un vantaggio sullo sviluppo neuronale in chi ha ricevuto precocemente gli aminoacidi rispetto a chi riceve solo ed esclusivamente il glucosio. In un altro studio *Van Goudoever (1993)* ha confrontato nove pretermine ai quali sono stati somministrati glucosio ed aminoacidi ed un gruppo da nove pazienti che prendeva solo il glucosio; l'unica differenza notevole era data dalla determinazione del bilancio azotato che risultava più positivamente quando venivano aggiunti gli aminoacidi fin da subito alle soluzioni. Questo, faceva sì che veniva ridotta la perdita di massa proteica che diminuiva la crescita del paziente. L'effetto metabolico dell'urea, che viene preso

in considerazione come marker di crescita neonatale, è solitamente correlato positivamente con la somministrazione di aminoacidi; la “simulazione” della condizione intrauterina, gli elevati livelli di urea plasmatica nel sangue e l’intake amminoacidico non hanno aumentato l’incidenza della acidosi metabolica. Studi recenti hanno dimostrato che bassi intake proteici di 30 Kcal/Kg/die portano ad un bilancio positivo e che per garantire un outcome positivo, l’intake minimo di aminoacidi raccomandato è di 1,5 g/Kg/die fino ad un massimo di 4 g/Kg/die. In uno studio randomizzato nel nostro reparto, (*Burattini et al, 2016*) hanno osservato che l’intake di aminoacidi equivalente a 2,5 g/Kg/die (standard) contro un alto intake di 4 g/Kg/die nei primi dieci giorni di vita non ha portato ad un aumento della crescita a lungo termine *Blanco et al (2011)* trovano in uno studio simile una riduzione della iperpotassemia o iperkalemia e allo stesso modo uno sviluppo neuronale invariato anche dopo due anni di follow-up. Si può quindi sostenere che elevate dosi di aminoacidi squilibrino il bilancio elettrolitico e minerale. I dati che provengono dai primi studi pilota sembrano quindi non avvelare la tesi secondo la quale ci sarebbero benefici sulla precoce assunzione di aminoacidi. In futuro, nuove strategie dovranno quindi essere prese in considerazione per migliorare la qualità delle soluzioni amminoacidiche, oltrepassando così il problema della scarsa crescita dei pretermine di peso estremamente basso ELBW.

Essential (EAA)	Nonessential (NEAA)	Semi-essenziali (SEAA)
Istidina	Alanina	Arginina
Isoleucina	Acido Aspartico	Cisteina
Leucina	Asparagina	Glicina
Lisina	Acido Glutammico	Prolina
Metionina	Glutamina	Taurina
Fenilalanina	Serina	Tirosina
Treonina		
Triptofano		
Valina		

Tabella 1. Amminoacidi Essenziali (EAA), non essenziali (NEAA) e semi-essenziali (SEAA)

2.2.1 IL RUOLO GLI AMMINOACIDI FUNZIONALI DURANTE LA CRESCITA

Gli aminoacidi (AA) sono stati tradizionalmente classificati come nutrizionalmente “essenziali” (EAA) o “non essenziali” (NEAA) per gli animali e gli esseri umani sulla base del bilancio di azoto o della crescita, come detto anche in precedenza. Un elemento chiave di questa classificazione è che tutti gli aminoacidi non essenziali si presume siano stati sintetizzati in modo adeguato nel corpo come substrati per soddisfare le esigenze per la sintesi proteica. Purtroppo, i ruoli nutritivi degli aminoacidi in nutrizione e metabolismo sono stati a lungo ignorati. Tali limitazioni concettuali non sono state riconosciute fino a recenti scoperte secondo cui la glutammina nella dieta è necessaria per l'integrità della mucosa intestinale ed è necessaria arginina nella dieta per la crescita e la sopravvivenza neonatale embrionale. Alcuni dei NEAA tradizionalmente classificati (ad esempio glutammina, glutammato, e arginina) svolgono un ruolo importante nella regolazione dell'espressione genica, nella segnalazione cellulare, nelle risposte antiossidanti, e nell'immunità. Inoltre, glutammato, glutammina e aspartato sono importanti carburanti metabolici per l'intestino tenue e, insieme alla glicina, regolano la funzione neurologica (Wu, 2010). Tra gli aminoacidi essenziali (EAA), molta enfasi è stata posta sulla leucina e sul triptofano che modula le funzioni neurologiche e immunologiche attraverso molteplici metaboliti, tra cui la serotonina e melatonina. Negli ultimi anni, una parte preponderante della letteratura si sta avvicinando ad un nuovo concetto di aminoacidi

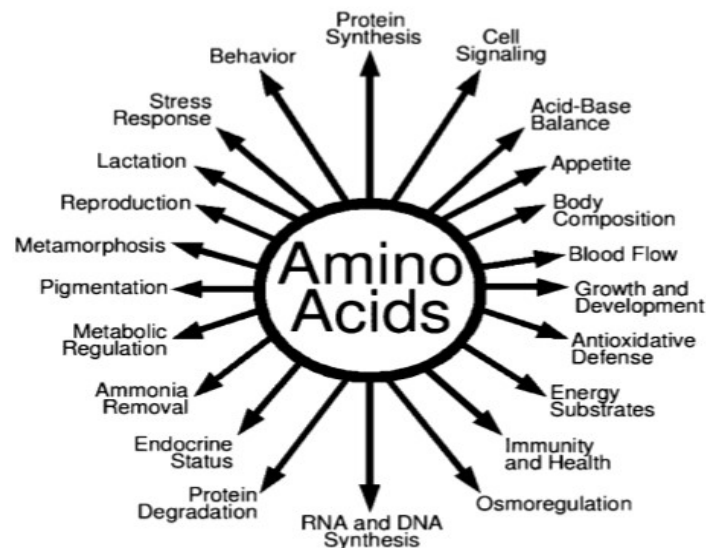


Figura 4. Ruoli degli AA in nutrizione e l'omeostasi del corpo intero. Oltre a servire come mattoni per le proteine, gli AA hanno molteplici funzioni di regolazione nelle cellule. Questi nutrienti sono cruciali per la crescita, lo sviluppo e la salute degli animali e degli esseri umani (Wu, 2010).

funzionali, che sono definiti come quegli amminoacidi che regolano le vie metaboliche fondamentali per migliorare la salute, la sopravvivenza, la crescita, lo sviluppo, l'allattamento, e la riproduzione degli organismi. Sia NEAA che gli EAA devono essere considerati nel concetto classico di "proteine ideali" per massimizzare accrescimento, proteine e ottimizzare la salute negli animali e nell'uomo. Il concetto nuovo di AA funzionali (FAA, Functional Amino Acids), definisce gli FAA come quegli AA che regolano le vie metaboliche chiave per migliorare la salute, la sopravvivenza, crescita, sviluppo, allattamento, e riproduzione degli organismi. Una carenza di un FAA (sia EAA o NEAA) danneggia non solo la sintesi proteica, ma anche l'omeostasi totale del corpo. Il latte è tradizionalmente pensato per provvedere all'apporto di tutti gli AA ai neonati. Il metabolismo per la sintesi di arginina, glutammina, glutammato e prolina e alanina è ormai ben documentato, ed è stato ampiamente dimostrato che questi amminoacidi hanno un importante significato nutrizionale e fisiologico. Attualmente, il metabolismo per la sintesi della glicina è in gran parte sconosciuto. Il catabolismo di EEA è necessario per la sintesi di NEAA in cellule e tessuto-specifici. In primo luogo, il catabolismo di glutammina, glutammato e aspartato fornisce la maggior parte della ATP per mantenere l'integrità e la funzionalità dell'intestino. In secondo luogo, poiché i livelli elevati di glutammina, glutammato e aspartato nel plasma esercitano un effetto neurotossico, il loro vasto catabolismo a carico dell'intestino tenue, è essenziale per la sopravvivenza degli organismi. Terzo, trasformazioni di AA nell'intestino svolgono un ruolo importante nella regolazione della sintesi endogena di NEAA (citrullina, arginina, prolina, alanina) e modulando la disponibilità di AA alimentare ai tessuti extraintestinali. C'è un equilibrio dinamico tra AA liberi e AA legati alle proteine del corpo. Le concentrazioni di AA liberi individuali nel plasma e nelle cellule vanno da 0,01-1 a 0,05-20 mmol/L, rispettivamente, a seconda della specie, fase di sviluppo, e tipo di cellule. Ad esempio, le concentrazioni epatiche di arginina nei mammiferi sono generalmente <0,1 mmol/l ma svolgono un ruolo essenziale nella disintossicazione di ammoniaca tramite il ciclo dell'urea. Inoltre, anche se le concentrazioni di triptofano sono molto inferiori alle concentrazioni di valina in tutti i tipi cellulari,

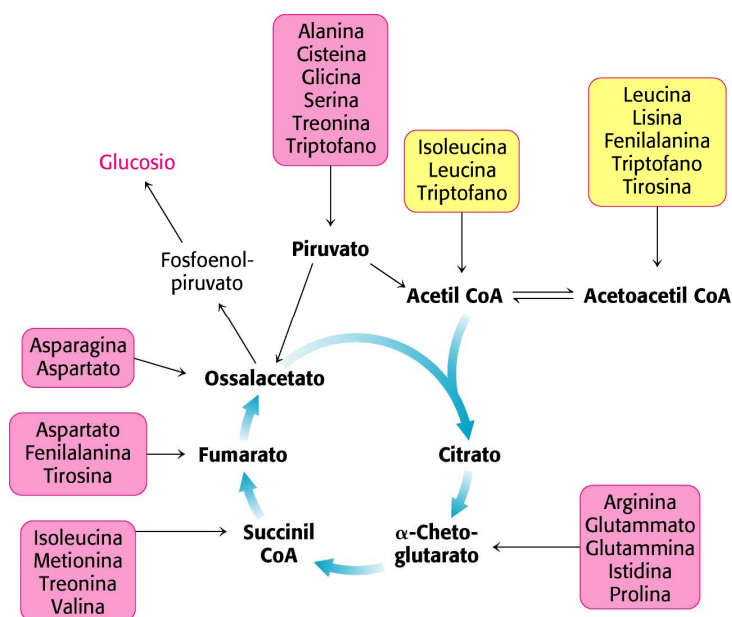
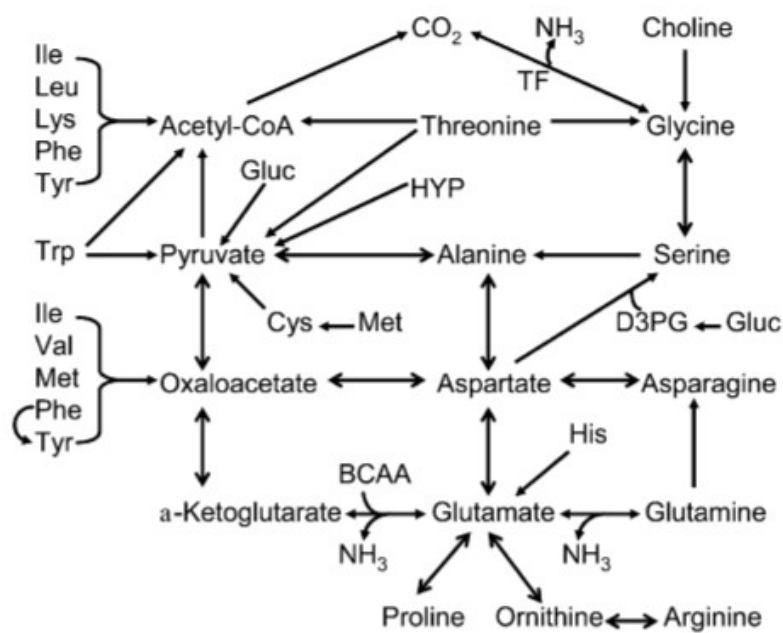


Figura 5. Le principali vie metaboliche di sintesi degli amminoacidi

Il triptofano ha ruoli più versatili rispetto alla valina nel corpo. La classificazione tradizionale degli AA come nutrizionalmente essenziali o non essenziali ha quindi importanti limitazioni concettuali

nella nutrizione proteica. Particolarmente, la glutammina e l'arginina, svolgono un ruolo importante nella regolazione dell'espressione genica sia a livello trascrizionale che traduzionale. Inoltre alcuni NEAA partecipino alla segnalazione cellulare via mTOR, AMPK, chinasi extracellulare segnale-dipendente, Jun chinasi e mitogeno-activated protein chinasi. Tra gli EEA, molta importanza è stata posta sulla leucina, che attiva mTOR per stimolare la sintesi proteica e inibire la proteolisi, e sul triptofano che modula le funzioni neurologiche e immunologiche attraverso molteplici metaboliti, tra cui la serotonina e melatonina. In altre parole, sia EAA che NEAA dovrebbero essere presi in considerazione per le formulazioni di diete equilibrate per massimizzare la performance di crescita, per prevenire ritardi nella crescita e le malattie croniche e metaboliche e infine l'ottimizzazione delle funzioni immunitarie e riproduttive.

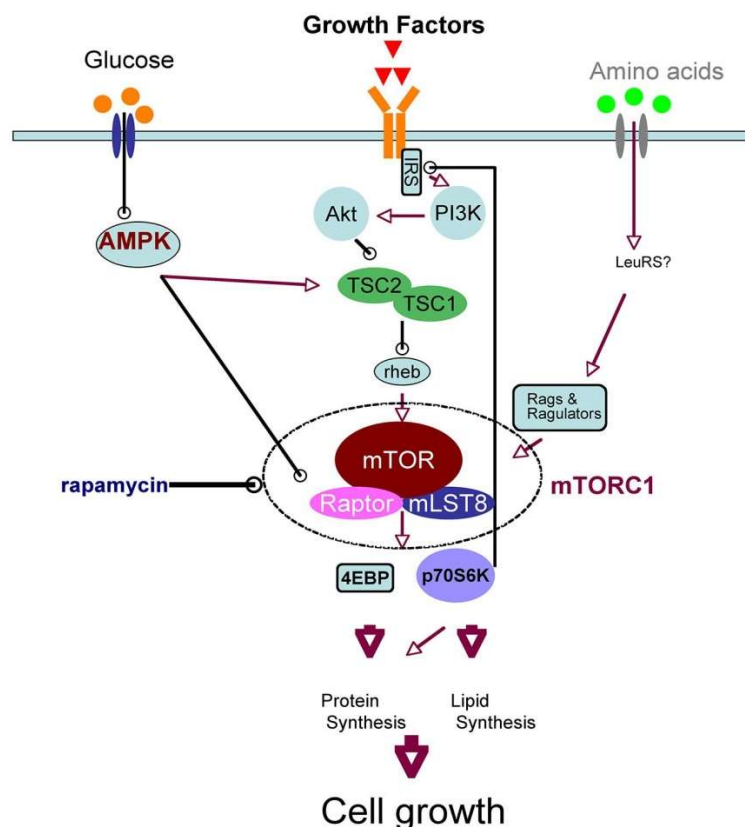


Figura 6 . La segnalazione cellulare protein-chinasica “via mTOR” (mammalian Target of rapamycin).

2.2.2 SOMMINISTRAZIONE PRECOCE (EAA) DEGLI AMMINOACIDI NEI NEONATI PRETERMINE

I neonati prematuri, soprattutto i nati con peso inferiore a 1250 g, mostrano spesso una crescita lenta generale dopo la nascita, e la mancanza di un supporto nutrizionale precoce può essere un elemento importante. È stata testata l'ipotesi che la somministrazione precoce di aminoacidi, entro le prime ore di vita, per i neonati nati con un peso inferiore a 1250 g sarebbe associato ad un minor numero di neonati che avevano meno del 10 ° percentile a 36 settimane di età post-concettuale rispetto ai bambini che hanno ricevuto aminoacidi dopo le prime 24 ore di vita, quindi tardivamente (*Valentine et al., 2009*). L'obiettivo dell'integrazione precoce di aminoacidi (EAA) è quello di fornire al neonato pretermine per via endovenosa un substrato che promuova subito la deposizione di proteine e garantisca un aumento della massa magra che porti alla crescita fetale. Recentemente, è diventato evidente che l'apporto di proteine di 3 g kg^{-1} al giorno iniziando dal primo giorno di vita è sicuro ed è associato a concentrazioni di aminoacidi plasmatici simili a quelle dei feti al secondo e terzo trimestre. Proteine somministrate a basse dosi come $1,5 \text{ g kg}^{-1}$ al giorno, hanno portato ad un bilancio di azoto neutro/positivo nella maggior parte dei bambini ma, massimizzando le proteine in modo da fornire 3 g kg^{-1} al giorno a partire da subito dopo il parto, si è visto migliorava ulteriormente la deposizione delle stesse che è essenziale per la crescita precoce. Nel presente studio, è stata testata l'ipotesi che la somministrazione "early" precoce <24 ore di vita di nutrizione parenterale EAA sarebbe associata alla miglior crescita nei neonati prematuri rispetto ai bambini in cui è stata ritardata l'integrazione di aminoacidi > 24 h di vita (LAA). L'integrazione con EAA e LAA aveva una composizione identica Trophamine (B. Braun, Bethlehem, PA, USA) con destrosio. La variabile primaria era il tempo di somministrazione. I neonati che ricevono hanno ricevuto 3 g kg^{-1} al giorno di aminoacidi e glucosio somministrato a $6 \text{ a } 8 \text{ kg mg}^{-1}$ in terapia intensiva subito dopo il parto. Entro 24 ore, il carico di glucosio è stato aumentato e l'emulsione lipidica è stata aggiunta per fornire 90 kcal^{-1} al giorno. Nessun aumento anormale dell'azoto urico plasmatico o complicazioni erano associate alla nuova pratica. Nessun neonato è stato eliminato dallo studio per intolleranza. L'ipotesi era che questo intervento nutrizionale era associato ad un maggiore aumento di peso e diminuzione del deficit di crescita tipico nella terapia intensiva neonatale. È interessante notare che una maggiore incidenza di BPD (Bronco Displasia Polmonare) è stata osservata nel gruppo EEA che, poiché la BPD è associato a guadagni di peso più lenti, avrebbe dovuto smussare i guadagni di peso nel nostro gruppo EAA. Un'altra osservazione interessante era che i bambini nei gruppi EAA con brevi periodi di somministrazione di TPN hanno raggiunto la piena alimentazione enterale in anticipo, pur essendo più piccoli e più giovani. L'iniziazione al latte, il metodo, l'avanzamento e il tipo di alimentazione possono influenzare la tolleranza. L'uso di EEA aumenta la mobilità gastrointestinale e riduce l'intolleranza all'alimentazione. Forse attraverso risposte neuronali o omerali. Invece il gruppo

ricevente gli LAA ha realmente la più alta incidenza di ritardo della crescita. L'effetto biologico della più piccola differenza osservata nel guadagno di peso tra i gruppi EAA e LAA è sconosciuta, ma può essere importante per l'associazione tra le velocità di guadagno di peso e gli esiti dello sviluppo neurologico. L'approccio ottimale per determinare gli effetti dell'intervento EAA sarebbe un approccio controllato randomizzato, tuttavia, si è visto che ci sono i benefici dell'integrazione di EAA; il peso può essere utilizzato come una buona misura di adeguatezza nutrizionale. Inoltre, sono necessarie misure più sofisticate di bilancio azotato, di crescita, di stimolazione ormonale e di composizione corporea per definire i meccanismi di apporto di nutrienti nella crescita del neonato pretermine. In sintesi, è stata dimostrata un'associazione tra somministrazione di EEA e minor deficit di crescita rispetto ai neonati a cui sono stati somministrati aminoacidi tardivamente. Ulteriori studi per determinare gli effetti della somministrazione EAA sulla cinetica di proteine e valutazione degli interventi nutrizionali ancora più aggressivi verranno eseguiti in futuro. Sono stati effettuati studi continuativi (2h) sul bilancio azotato e sull'energia spesa per un periodo di 10 giorni in due gruppi di neonati prematuri collegati a respiratori, con peso ed età gestazionale comparabili. In un gruppo (n=10) una fonte di aminoacidi parenterale (Vamin 9) è stata somministrata entro 24 ore dalla nascita, e nell'altro gruppo (n=11) non è stata avviata la miscela amminoacidica prima delle 72 ore (*Saini et al., 1989*). Non si sono osservate differenze da 7-10 giorni. L'introduzione precoce di aminoacidi migliora quindi lo stato nutrizionale dei neonati prematuri malati. Tutti i neonati nel gruppo "Late" (LAA) erano in bilancio azotato negativo durante le prime 72 ore di vita con un bilancio medio negativo (SEM) di -133 (23) mg/kg /die, rispetto al gruppo "Early" (EAA) che ha mantenuto 120 (6) mg/kg/giorno. Dopo il terzo giorno di vita non vi era alcuna differenza nella ritenzione di azoto tra i due gruppi. L'aumento in lunghezza, circonferenza occipito-frontale della testa e il cambiamento totale del peso corporeo erano simili in entrambe i gruppi. L'aminoacidogramma plasmatico a 5 giorni di età era disponibile solo per nove neonati nel gruppo E, e per sette nel gruppo L. Un'elevata concentrazione di fenilalanina (superiore a 300 $\mu\text{mol/l}$) è stata trovata in due neonati nel gruppo E ed in nessuno nel gruppo L. Cinque bambini nel gruppo E, e quattro nel gruppo L, di riferimento di laboratorio per i neonati. In questo studio i neonati del gruppo ad introduzione tardiva avevano un significativo bilancio azotato negativo fino a che è stato introdotto l'azoto per via endovenosa al terzo giorno. Il saldo negativo medio di -133 mg/kg/giorno è equivalente a una perdita di 0-849 g/kg giorno di proteine del corpo, o 2-5 g di proteine nei primi 3 giorni dopo la nascita. Le proteine totali di un neonato che pesa 1000 g, è di circa 85 g, e quindi supponendo che la perdita di azoto totale (proteine) rappresenta il vero catabolismo tissutale, allora questo rappresenta una perdita cumulativa media di 3% delle proteine del corpo ogni giorno. I neonati del primo gruppo, invece, avevano invece un bilancio azotato positivo dal primo giorno dell'età postnatale. L'aumento delle concentrazioni di

fenilalanina e tirosina è stato osservato in alcuni bambini in entrambi i gruppi. Anomalie nell'aminoacidogramma plasmatico, in particolare l'aumento delle concentrazioni di fenilalanina, sono state trovate nei neonati prematuri a cui è somministrato Vamin come soluzione amminoacidica. Non è stato osservato nessun problema metabolico a breve termine o altre complicanze, ma le implicazioni a lungo termine sono ancora sconosciute. L'introduzione delle soluzioni parenterali più recenti come appunto il Trophamin 6% e il Primene 10% potrebbero impedire queste anomalie. Se il latte materno o le proteine somministrate al feto è il modello di origine nutrizionale ideale per questi bambini, questo resta ancora da esplorare. Lo studio riportato in letteratura dimostra che l'introduzione precoce di una fonte di aminoacidi per via endovenosa permette difatti un bilancio positivo di azoto nei primi giorni di vita nei neonati prematuri o malati collegati al respiratore che non possono essere alimentati per via enterale e sono in nutrizione parenterale totale.

2.2.3 L'UTILIZZO DI AMMINOACIDI ACETILATI NELLE MISCELE AMMINOACIDICHE: N-ACETIL-TIROSINA (NAT) E N-ACETIL-CISTEINA (NAC)

Tirosina e cisteina sono aminoacidi che si pensa siano essenziali per i neonati prematuri. Questi aminoacidi hanno una bassa stabilità (cisteina) o solubilità (tirosina) e quindi sono di solito presenti solo in piccole quantità nelle soluzioni amminoacidiche. L'acetilazione, come modificazione post-traduzionale, migliora la stabilità e solubilità di aminoacidi, facilitando una maggiore stabilità nella soluzione. In letteratura è stato fatto un confronto tra tre soluzioni amminoacidiche disponibili in commercio; Aminovenos-N-pad 10%, Varninolact 6,5% e il Primene 10%, somministrate a 20 neonati con peso alla nascita molto basso ELBW ed in nutrizione parenterale totale postnatale dal giorno due in avanti. Aminovenos-N-pad 10% contiene tirosina acetilata (NAT, N-acetil-tirosina) e cisteina acetilata (NAC, N-acetil-cisteina), le altre soluzioni non contengono aminoacidi acetilati e differiscono per la quantità di tirosina e cisteina aggiunta. Al settimo giorno postnatale, sono stati misurati gli aminoacidi nel plasma, unitamente all'escrezione urinaria di aminoacidi e l'escrezione di azoto totale. Il 38% della dose di N-acetil-L-tirosina (NAT) e il 53% della dose di N-acetil-L-cisteina (NAC) è stata escreta nelle urine. I livelli plasmatici di NAT (331 ± 74 l'mol /L) e NAC (18 ± 29 l'mol/L) erano superiori di tirosina (105 ± 108 l'mol/L) e cistina (11 ± 9 mol /L), rispettivamente. Abbiamo trovato una correlazione lineare di cistina plasmatica con l'apporto di cisteina ($r = 0,75$, $p = 0,01$), ma non con NAC (*Van Goudoever, 1993*). Una grande porzione di aminoacidi acetilati somministrati per via parenterale è escreta nelle urine nella prima settimana di vita, nei neonati pretermine, con livelli plasmatici di aminoacidi acetilati più alti rispetto ad aminoacidi de acetilati. Esistono controversie riguardo la quantità e le modalità di somministrazione di aminoacidi come tirosina e cistina nelle soluzioni amminoacidiche pediatriche. Entrambi gli aminoacidi sono

considerati essenziali nel periodo neonatale, ma hanno una bassa solubilità (tirosina) o bassa stabilità (cisteina). Lo scopo dello studio è stato quello di confrontare tre diverse soluzioni di aminoacidi dosando gli aminoacidi plasmatici nei neonati pretermine a 7 giorni in corso di nutrizione parenterale totale. Le soluzioni di aminoacidi differenziano soprattutto nella quantità e nella modalità di somministrazione di tirosina e cistina. Particolare attenzione viene data a questi due aminoacidi. L'apporto amminoacidico totale ed energetico non era statisticamente differente tra i tre gruppi, anche se l'apporto energetico tendeva ad essere inferiore nel gruppo Vaminolact 6,5% rispetto al Aminoven6 gruppo 10% e il gruppo Primene 10%. Ci sono anche differenze di pH, eccesso di basi o bilirubina totale, e non era diversa la quantità di bicarbonato somministrato durante la prima settimana di vita o negli ultimi due giorni prima dello studio. La ritenzione di azoto, calcolata sottraendo l'escrezione urinaria di azoto totale dall'intake di azoto, non ha rivelato differenze tra i gruppi e non è stata trovata alcuna relazione tra la quantità di aminoacido escreto nelle urine e a livello plasmatico per la maggior parte degli aminoacidi, oltre il 95% della dose è stata mantenuta, anche se i livelli plasmatici sono stati a volte al di sopra del range di riferimento. La glicina è stata l'unico aminoacido, di cui più del 5% della dose è stata escreta nelle urine. Un alto livello plasmatico di un aminoacido potrebbe essere causato da un eccessivo apporto o di un tasso di utilizzo basso di quell'amminoacido. Una terza opzione potrebbe essere un aumento del rilascio di AA da proteine del corpo derivanti da una ripartizione ad alto contenuto proteico. Un livello plasmatico basso di un aminoacido può provenire da un intake insufficiente o un alto tasso di utilizzo. È tuttavia difficile determinare livelli anormali per i neonati pretermine. Non c'è un "golden standard" di riferimento per l'interpretazione dei livelli amminoacidici. Le tre soluzioni di aminoacidi testate differivano nella modalità e nell'ammontare di somministrazione di cisteina. La cisteina somministrata come cisteina HCl influenzava l'omeostasi acido-base. La tirosina è un aminoacido semi essenziale per un neonato pretermine ed ha una bassa solubilità. Non esistono dati riguardanti gli effetti potenzialmente nocivi quando gli amminoacidi acetilati sono al di sopra dei livelli normali, per la tirosina. La tirosinanemia, tuttavia, è associata ad effetti negativi a lungo termine. Dal momento che una percentuale relativamente alta di NAT e NAC è stata escreta nelle urine, si può ipotizzare che la deacetilazione di questi substrati non è ottimale. NAC viene utilizzato come agente mucolitico e come terapia per intossicazione da paracetamolo, con risultati soddisfacenti. È stato riportato invece che il NAT è efficientemente utilizzato nei topi. L'efficienza negli umani è ancora oggetto di discussione. Studi in letteratura mostrano che il 40-50% dell'AA acetilato somministrato viene escreto nelle urine da parte dei neonati prematuri. I livelli plasmatici di cistina rimangono molto al di sotto del range di riferimento quando l'assunzione consiste di N-acetil-L-cisteina a basse quantità; c'è quindi una relazione lineare tra l'assunzione di cisteina, ma non N-acetil-L-cisteina, e la concentrazione plasmatica di cistina.

2.2.4 LA SUPPLEMENTAZIONE DI GLUTAMMINA NEI PRETERMINE ELBW

La biosintesi endogena della glutammina può essere insufficiente per le esigenze del tessuto in stati di stress metabolico (*Tubman et al., 2008*). Prove in adulti hanno suggerito che la supplementazione di glutammina migliora gli esiti clinici degli adulti in condizioni critiche. È stato suggerito da dati presenti in letteratura che la l'integrazione di glutammina può beneficiare neonati prematuri, in particolare per i neonati con peso molto basso alla nascita ELBW. L'integrazione di glutammina non ha un effetto statisticamente significativo sulla mortalità. L'unico studio che ha esaminato i risultati a lungo termine non ha trovato differenze statisticamente significative in varie valutazioni di sviluppo neurologico a 18 mesi di età corretta. L'integrazione di glutammina non ha un effetto statisticamente significativo su altre patologie neonatali tra cui l'infezione invasiva, enterocolite necrotizzante (NEC), il tempo per raggiungere la piena nutrizione enterale, o la durata della degenza ospedaliera. L'integrazione di glutammina non conferisce benefici ai neonati pretermine. La glutammina è un nutriente importante per la crescita e lo sviluppo. La glutammina può essere particolarmente importante nel favorire il recupero da malattia gravi. Questo lavoro si è basato su diversi studi clinici controllati randomizzati ben condotti che hanno valutato l'impatto della fornitura di glutammina in più per i neonati prematuri. Questi studi non hanno trovato alcuna prova che l'integrazione di glutammina abbia influenzato il rischio di morte, gravi infezioni, complicazioni gastrointestinali gravi, o lo sviluppi avversi a lungo termine. La glutammina è l'amminoacido più importante nel plasma e nei muscoli, nell'uomo. In modelli animali sperimentali la glutammina è stata associata ad una riduzione del danno della mucosa, con un miglioramento dell'equilibrio di azoto, tassi più bassi di sepsi e un miglioramento della sopravvivenza (*Klimberg et al., 1990; Rombeau 1990*). In queste situazioni l'integrazione di glutammina probabilmente fornisce energia supplementare per l'aumento della divisione cellulare e la proliferazione vista in risposta al danno gastrointestinale. In studi negli esseri umani adulti, la glutammina ha dimostrato di attenuare l'atrofia dell'intestino a digiuno (*O'Dwyer et al., 1989*), di mantenere i livelli di ATP nelle cellule ossidanti feriti (*Hinshaw et al., 1990*), e di preservare la cellularità immunitaria gastrointestinale per l'alimentazione parenterale prolungata (*Alverdy et al., 1992*). La glutammina nella parenterale negli adulti è ben tollerata metabolicamente e sembra non avere effetti tossici. La glutammina è abbondante nel latte umano, ma presente solo in livelli molto più bassi di latte artificiale e non è presente in soluzioni standard per la nutrizione parenterale, nemmeno nelle più recenti. Tenuto conto delle conclusioni di cui sopra negli adulti, è ragionevole ipotizzare che l'integrazione di glutammina nei neonati prematuri ELBW potrebbe migliorare l'integrità della mucosa gastrointestinale; questo potrebbe migliorare la tolleranza

verso l'alimentazione enterale, la crescita e lo sviluppo, e in definitiva ridurre la degenza ospedaliera. Il miglioramento della funzione della barriera gastrointestinale e della produzione di linfociti potrebbe ridurre il tasso di sepsi o enterocolite necrotizzante a esordio tardivo, e quindi ridurre la mortalità e gli esiti negativi sullo sviluppo neurologico. L'integrazione di glutammina non influenza i risultati dello sviluppo neurologico a lungo termine. Nessuna evidenza di un effetto sul tasso di infezione invasiva, sull'incidenza di enterocolite necrotizzante, o su uno dei parametri di alimentazione o di crescita misurati, è stata trovata. L'integrazione di glutammina potrebbe essere utile nella fase di recupero di queste malattie, quando i neonati sono gravemente compromessi metabolicamente e la disponibilità di glutammina è limitante per la riparazione dei tessuti (*Grover et al., 2007*). Inoltre, molti dei neonati che partecipano a studi ciechi non possono essere veramente glutammina-deficiente come quelli che hanno ricevuto glutammina dal latte materno, o glutammato ricevuto dal latte o la nutrizione parenterale. Può essere opportuno mettere a fuoco lo sforzo della ricerca sulla valutazione degli effetti della supplementazione di glutammina nei neonati prematuri ELBW con gravi patologie gastrointestinali.

2.2.5 REGOLAZIONE DELLA PROTEOLISI NEI NEOANTI PRETERMINE ELBW

Gli aminoacidi nella nutrizione parenterale sono efficaci per aumentare la sintesi proteica nei neonati estremamente prematuri ELBW, e questo potrebbe portare ad un miglioramento del bilancio proteico (*Denne, 2016*). Gli aminoacidi potenzialmente sono importanti regolatori della proteolisi, e la capacità degli aminoacidi, somministrati per via endovenosa, a sopprimere la proteolisi è stata valutata nei neonati a termine. Nei neonati a termine sani, infusi gradualmente con aminoacidi per via endovenosa si aveva una soppressione della proteolisi dose-dipendente. I neonati prematuri, invece, dimostravano resistenza alle variazioni di proteolisi in risposta alla somministrazione endovenosa di aminoacidi. I neonati prematuri clinicamente stabili (<32 settimane di gestazione) sono stati studiati nella prima settimana di vita con l'uso di un protocollo identico a quello usato nello studio dei bambini a termine. In contrasto con quelli a termine, i tassi di proteolisi sono invariati in risposta alla infusione graduale di aminoacidi per via endovenosa. Anche quando gli aminoacidi sono forniti insieme con lipidi e il glucosio in quantità sufficiente a sostenere la crescita; i tassi complessivi di proteolisi in neonati estremamente prematuri ELBW (<26 settimane di gestazione) e prematuri (<32 settimane di gestazione) sono poco influenzati. Glutammina, cisteina e tirosina erano fino a poco tempo fa assenti dalle soluzioni neonatali di aminoacidi. La cisteina può essere aggiunta alla soluzione sotto forma di L-cisteina o N-acetil-cisteina; la tirosina può essere fornita come N-acetil-tirosina in alcuni prodotti

amminoacidici. Tuttavia, a causa della biodisponibilità limitata, N-acetil-tirosina sembra essere una fonte povera di tirosina. *Kalhan et al* hanno valutato l'effetto di glutammina supplementare sulla proteolisi complessiva nei neonati prematuri, e hanno mostrato una significativa riduzione degli indici corporei di proteolisi quando la glutammina veniva aggiunta alla nutrizione parenterale. Alcuni dati preliminari suggeriscono che l'aggiunta di cisteina in forma isomerica può ridurre la proteolisi e migliorare l'accrescimento proteico nei neonati estremamente prematuri ELBW. Altri studi hanno suggerito che la cisteina può aumentare la sintesi proteica nei neonati prematuri (*Burattini et al, 2016*). Poiché la tirosina può essere un amminoacido limitante nelle soluzioni attuali, esaminare l'effetto di una forma più biodisponibile di tirosina sulla proteolisi generale e di accrescimento delle proteine in bambini prematuri sarà un'importante area di ricerca futura. È chiaro che l'utilizzo precoce dell'amminoacido risulta in un aumento significativo della sintesi proteica e migliora il bilancio proteico, anche somministrando un intake di basso potere calorico. I neonati prematuri riceventi 3g aminoacidi $\text{kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ avevano anche, in modo significativo, un bilancio proteico di leucina più positivo. Altri studi in neonati pretermine hanno prodotto risultati simili e nessuna conseguenza metabolica negativa è stata osservata con la somministrazione anticipata di aminoacidi. Sembra che ci sia una relazione lineare tra assunzione di aminoacidi e accrescimento. La somministrazione anticipata di quantità sufficienti di amminoacidi a neonati prematuri è ben lontana dall'essere una pratica universale nelle unità di terapia intensiva neonatale, (*Zello et al 2003*) hanno dimostrato che esiste una correlazione lineare tra il bilancio proteico e l'assunzione di proteine nei neonati prematuri che consumano un apporto calorico fisso; questi studi sono stati condotti ad assunzione di proteine che vanno da 1 al 3,5 $\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$. Recentemente, (*Cooke et al. 2006*) hanno riportato una relazione positiva significativa tra l'assunzione di proteine ed il bilancio di proteine a più alte assunzioni di proteine (3,4-6,2 $\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$). In uno studio crossover, i neonati prematuri sono stati randomizzati a ricevere miscele standard con un contenuto proteico di 3 g per 100 kcal o miscele ad alto contenuto proteico 3,6 g per 100 kcal. L'aumento di peso e di accrescimento proteico sono risultati significativamente maggiori quando i neonati ricevevano miscele ad elevato contenuto proteico. In sintesi, la somministrazione precoce di aminoacidi per via endovenosa a 3 $\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ può migliorare in modo significativo l'accrescimento proteico con risultante crescita nei neonati ELBW, e i dati disponibili in letteratura supportano sia la sicurezza a breve termine per gli indici metabolici sia la sicurezza a lungo termine attraverso la prima infanzia. I neonati prematuri sembrano essere resistenti all'effetto anti-proteolitico della nutrizione parenterale. Il contenuto proteico delle formule pretermine attuali sembra essere inadeguato per i neonati estremamente prematuri ELBW, ed uno studio che valuta l'effetto in questa popolazione di una formula ad alto contenuto proteico potrebbe fornirci delle delucidazioni maggiori sull'ottimizzazione della crescita

2.2.6 LO SCREENING NEONATALE E IL PROFILO AMINOACIDICO

Lo screening neonatale è stato introdotto negli anni 60' per la diagnosi della fenilchetonuria, e poi successivamente è stato utilizzato anche per altre patologie. Alla fine degli anni 90' l'utilizzo della spettrometria massa (MS/MS) ha permesso l'identificazione di malattie relative al metabolismo intermedio, in particolare aminoacidopatie, organicoacidurie e difetti di ossidazione degli acidi grassi. In seguito, tale approccio è stato esteso a molti programmi di screening neonatale. La tandem-mass MS/MS permette la diagnosi e il trattamento di un gran numero di malattie metaboliche, difetti del ciclo dell'urea e difetti degli aminoacidi in tutti i neonati. Tale procedura analitica ha un grande valore nella diagnosi di laboratorio in quanto permette di identificare patologie senza una sintomatologia clinica e che portano a problematiche di carattere sociale e psicologico importanti e complesse in ambito familiare. Tutt'oggi è il dato biochimico laboratoristico a guidare lo screening neonatale, e sono a disposizione protocolli e linee guida per quanto riguarda i test confirmatori ed il follow-up. La regione Toscana è stata la prima in Italia a mettere in atto questo tipo di approccio analitico. All'Ospedale Meyer di Firenze, il Laboratorio di Screening Neonatale diretto dal Prof.re Giancarlo La Marca ha effettuato lo screening per più di 40 errori congeniti del metabolismo su tutti i neonati, scoprendo anche nuovi biomarkers diagnostici capaci di individuare altri disordini metabolici. Tali disordini metabolici sono stati identificati contemporaneamente mediante il dosaggio dei aminoacidi e acilcarnitine e del succinilacetone su una singola goccia di sangue. Il neonato affetto non appare chiaramente malato alla nascita. I sintomi infatti, appaiono in forma acuta dopo il primo anno di vita ed in alcuni casi la sintomatologia è apparsa in età adulta. Lo scompenso metabolico acuto può portare a complicanze gravi e a lungo termine spesso a morte. La capacità di identificare precocemente i neonati affetti prima dell'insorgenza dei sintomi può migliorare la prognosi della maggior parte dei pazienti. Le patologie diagnosticabili mediante screening neonatale sono per legge in Italia:

-Fenilchetonuria (PKU);

-Ipotiroidismo;

-Fibrosi cistica

Le patologie facoltative sono:

-Galattosemia;

- Deficit di biotinidasi
- Malattie delle urine a sciroppo d'acero;
- Sindrome adrenogenitale;
- Talassemie;

I programmi di screening estesi in “tandem mass” comprendono anche:

- Aminoacidopatie (citrullinemie, argininemia, tirosinemie, omocistinuria);
- Organicoacidurie (Acidemia propionica, Acidemia metilmalonica);
- Difetti della ossidazione degli acidi grassi a livello mitocondriale tra cui la deidrogenasi degli acil-CoA a catena media (MCAD), a catena lunga (VLCAD) e a catena corta idrossilata (SCHAD);
- Disordini lisosomiali (Mucopolisaccaridosi di tipo I, II e IV);
- Alcuni difetti del ciclo dell'urea (Ornitina transcarbamilasi, OCT)

Errori congeniti di sintesi dell'urea portano ad un accumulo di ammoniaca nel sangue e nel cervello, e ciò risulta in alti tassi di mortalità e disabilità dello sviluppo neurologico. In letteratura attualmente uno studio di *Krivitzky et al (2009)* si propone di caratterizzare il funzionamento cognitivo, adattabile, emotivo e comportamentale dei neonati con disturbi del ciclo dell'urea (UCDs). I risultati indicano che i bambini che si presentano con insorgenza neonatale hanno esito più basso di quelli che si presentano più avanti durante l'infanzia di sviluppare queste patologie. I disturbi del ciclo dell'urea (UCDs) comprendono carenze in uno qualsiasi dei sei enzimi e di due proteine di trasporto coinvolte nella biosintesi della molecola. I disturbi specifici sono: carenza di N-acetilglutammato Sintasi (NAGS), deficit di Carbamilfosfatica sintetasi (CPSI), deficit di ornitina transcarbamilasi (OTC), carenza di Argininosuccinate sintetasi (AS) (Citrullinemia), carenza di Argininosuccinate liasi (AL), carenza di Arginase (ARG), Argininemia, Iperornitinemia, iperammoniemia, la sindrome di omocitrullinuria (HHH) o (mitocondriale deficit-ORNT carrier ornitina), e Citrullinemia tipo II. Sulla base di casi clinici l'incidenza combinata stimata per tutti UCDs andava da 1 a 8.200 a 1 su 30.000 (*George F. Hoffman, 2012 Krivitzky et al., 2009*). Difetti nella sintesi di urea portano ad un accumulo di ammoniaca nel sangue e nel cervello e clinicamente si presentano come episodi ricorrenti di

iperammoniemia manifestata con vomito, letargia e coma. I neonati con deficit enzimatici completi (diverse argininemia) comunemente presentano nel periodo neonatale coma da iperammoniemica. La mortalità nel periodo neonatale per i difetti del ciclo dell'urea (deficit di OTC e carenza CPSI) è stata riportata avvicinarsi al 50%. Il pilastro della farmacologia prevede l'utilizzo di una terapia con via alternativa (fenilbutirrato-Buphenyl) per contenere l'azoto, in combinazione con la supplementazione di aminoacidi modificati quali L-citrullina o L-arginina. In sintesi, i neonati con UCDs presentano una vasta gamma di esiti cognitivi. I bambini con malattia insorgente neonatale hanno una maggiore probabilità di avere una disabilità intellettiva, che diventa ancora più evidente con l'aumentare dell'età. Tuttavia, anche i bambini con insorgenza tardiva, dimostrano evidenza di difficoltà neurocognitive e comportamentali, soprattutto negli aspetti del funzionamento esecutivo. Un obiettivo di analisi futuro potrebbe essere quello di esaminare il profilo neuropsicologico più ampio di questa popolazione e di identificare markers diagnostici predittivi che possono prevedere il loro esito. In modo simile, i difetti enzimatici coinvolti nel metabolismo degli aminoacidi spesso portano all'accumulo di sostanze tossiche con un danno organico. Gli organi più colpiti sono cervello, rene e fegato. I quadri clinici dipendono dal deficit prodotto e dalla tolleranza della tossicità del metabolita accumulato. Tali difetti insorgono spesso in occasione dell'elevato catabolismo proteico durante il periodo neonatale e nel lattante anche nella fase di passaggio a pasti più ricchi di proteine che si alternano ad intervalli di digiuno prolungato. Per questi motivi, soprattutto nel pretermine grave ELBW è di fondamentale importanza ottimizzare la nutrizione parenterale tenendo conto non solo delle caratteristiche del paziente, ma anche del bilancio azotato, dell'apporto proteico giornaliero e delle diverse miscele amminoacidiche che si trovano in commercio. Le amminoacidopatie neonatali possono essere diagnosticate mediante la determinazione del profilo amminoacidico che si esegue attraverso l'HPLC mediante colonna con resina a scambio ionico, che rivela gli aminoacidi separati mediante una reazione di derivatizzazione. Tale profilo è un indice chimico dato dal rapporto tra la quantità di un dato aminoacido in un grammo della proteina in esame e la quantità dello aminoacido in un grammo della proteina di riferimento. Gli aminoacidi da considerare come riferimento nella nutrizione parenterale del neonato pretermine sono:

- la *taurina*, che deriva dalla cisteina ed è fondamentale per lo sviluppo della retina e del cervello;
- la *tirosina* e la *cisteina* che vengono aggiunte alle miscele amminoacidiche in forme isomeriche e acetilate;
- l'*arginina* che è essenziale per la vasodilatazione endoteliale;
- la *glicina* che è un precursore del glutamato e funge da inibitore dei neurotrasmettitori;

-la *prolina* che deriva dal glutammato e promuove il turnover e l'accrescimento dei tessuti;

-la *glutamina* che da recenti studi sembra migliori la mucosa del tratto gastrointestinale, la crescita e lo sviluppo dei pretermine di peso estremamente basso ELBW;

Sono da tenere in considerazione anche i BCCA (Branched Chain Amino Acids), aminoacidi a catena ramificata: la *valina*, l'*isoleucina* e la *leucina*; questi aminoacidi in condizioni di stress vengono utilizzati metabolicamente in concomitanza con carboidrati e grassi, sopperendo ad eventuali deficit nutrizionali. La velocità di sintesi aminoacidica, in caso di prematurità, a volte non è sufficiente al fabbisogno nutrizionale e ciò può aggravare la condizione patologica. Questi aminoacidi sono singolarmente richiesti nella supplementazione delle miscele aminoacidiche per i neonati pretermine, ma ancora oggi esistono informazioni limitate sulla biodisponibilità e sulla preparazione farmacologica di queste miscele intravenose. È da considerare che, sebbene singolarmente rari, i disordini metabolici congeniti nel loro insieme hanno una incidenza di un nuovo caso ogni duemila nuovi nati. Uno dei più grossi problemi riguarda il contenimento dei test falsi positivi. Per ovviare a questo problema sono stati sviluppati dei test secondari effettuati sempre sul cartoncino di sangue che confermavano o smentivano il test di screening primario. Nel prossimo futuro il pannello di screening neonatale verrà allargato anche a patologie importanti come la SCID ed altre malattie di accumulo lisosomiale, di cui ad oggi è disponibile per il loro riconoscimento analitico la procedura in spettrometria di massa da campione di sangue essiccato. È quindi sicuramente indispensabile per chi si occupa di screening di malattie metaboliche continuare a supportare l'introduzione di nuovi test secondari e scoprire nuovi biomarcatori specifici che possano migliorare il valore predittivo dei test di prim'ordine, riducendo così anche lo stress familiare ai genitori per i valori positivi allo screening.

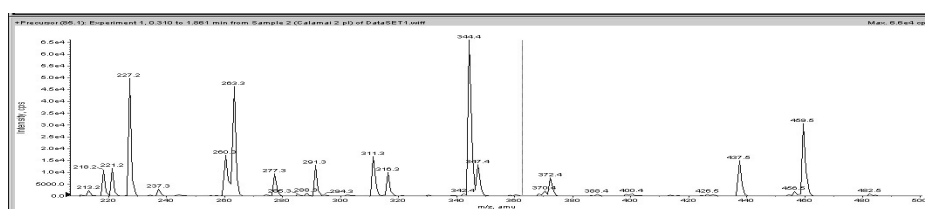


Figura 7. Cromatogramma di un profilo aminoacido ottenuto mediante MS/MS (tandem mass)

2.2.5 L'ACIDOSI METABOLICA NEL PRETERMINE

L'acidosi metabolica è una forma di acidosi dovuta a primitiva riduzione della concentrazione corporea di bicarbonati. Tale patologia si diagnostica quando il pH del sangue è inferiore a 7,30 con una bassa concentrazione di ioni bicarbonato ed una pressione dell'anidride carbonica (PCO₂) normale o bassa (*Manzo et al., 2011*). Come anche l'acidosi respiratoria, è un disturbo dell'equilibrio acido-base caratterizzato da una tendenza alla riduzione del pH del plasma sanguigno e degli altri liquidi corporei. L'aggettivo "metabolica" differenzia questa forma da quella respiratoria, che è dovuta ad una ridotta eliminazione dell'anidride carbonica. L'acidosi metabolica può svilupparsi attraverso tre meccanismi:

- 1- Eccessivo accumulo di un acido non volatile (gli acidi volatili, come l'anidride carbonica, sono infatti eliminati dai polmoni);
- 2- Perdita di alcali non volatili, come il bicarbonato;
- 3- Ridotta capacità dei reni di eliminare gli acidi.

I neonati pretermine sono predisposti spesso ad ipossia, freddo, stress, ipoperfusione con conseguente accumulo di acidi non carbonici nel sangue. La coesistenza di immaturità della funzione renale con inadeguata escrezione di ioni idrogeno e una bassa soglia di riassorbimento di bicarbonato rende questi neonati particolarmente soggetti al rischio di sviluppare acidosi metabolica. La terapia intensiva neonatale si propone di ottimizzare la perfusione degli organi, l'ossigenazione, di trattare le cause sottostanti come infezioni, e di mantenere i principali parametri vitali, tra cui l'equilibrio acido-base, in un range fisiologico. L'acidosi metabolica nei neonati pretermine è stata associata allo sviluppo di emorragia periventricolare, leucomalacia periventricolare e complicanze neurologiche a lungo termine in neonati con peso alla nascita molto basso ELBW. Lo sviluppo di emorragia intraventricolare è stata associata alle fluttuazioni della velocità del flusso arterioso cerebrale, la resistenza vascolare cerebrale diminuisce nei neonati a termine con acidosi metabolica nella prima settimana di vita e il basso pH arterioso è associato ad un aumento della velocità di flusso di sangue

dell'arteria cerebrale in neonati con peso alla nascita molto basso. Una revisione sistematica sull'uso di albumina nella rianimazione di pazienti critici di tutti i gruppi di età, ha dimostrato in letteratura un aumento statisticamente significativo dei tassi di mortalità per coloro che ricevevano albumina rispetto ai controlli. Il bicarbonato di sodio (4, 2% o 2, 1%) è una sostanza iperosmolare; si può però avere perdita di autoregolazione vascolare cerebrale, riduzione del flusso ematico cerebrale e cambiamenti acuti nel pH del liquido cerebrospinale. I dati osservazionali presenti in letteratura hanno suggerito che il trattamento con bicarbonato di sodio nel primo giorno di vita nei neonati pretermine è associato ad un'alta incidenza di emorragia intra-ventricolare nei neonati di peso molto basso ELBW. I dati della letteratura degli ultimi trent'anni dimostrano come l'infusione di bicarbonato di sodio, rispetto a nessun trattamento, nell'acidosi metabolica nei neonati pretermine non abbia alcun beneficio, viceversa espone ad un rischio aumentato di sviluppare emorragia intraventricolare. Sarebbe quindi opportuno evitare l'uso di bicarbonato di sodio nei neonati pretermine con acidosi metabolica; ma l'uso del bicarbonato di sodio per via endovenosa è ancora controverso, ed è considerato da alcuni molto inutile e persino dannoso. L'entità dell'acidosi metabolica può essere rilevata grazie all'emogasanalisi (EGA), che fornisce i valori della pressione parziale dell'ossigeno (O_2), della anidride carbonica (CO_2), dei bicarbonati (HCO_3) e dell'eccesso di basi (SBE, Standard Base Excess). La tolleranza metabolica in termini di carboidrati, lipidi e proteine, è di grande interesse in neonatologia in quanto spesso le miscele amminoacidiche infuse durante la PN portano all'acidosi metabolica. Per contrastare tale problema si tiene conto dell'indice SBE, ovvero della presenza di basi nel sangue, per lo più di HCO_3 . Se tale valore diventa negativo vuol dire che c'è carenza di basi e quindi il soggetto presenta acidosi metabolica. I valori di tensione dei gas forniscono un'indicazione sull'efficienza degli scambi gassosi e i parametri dell'equilibrio acido-base indicano la situazione metabolica. A seconda della sede del prelievo (arterioso, capillare o venoso) si modificheranno i valori di O_2 e CO_2 , ma non l'equilibrio acido-base. Il trattamento dell'acidosi metabolica neonatale consiste in una generica terapia di supporto ed in misure specifiche da attuare sulle cause di ipotermia, ipossia, disturbi elettrolitici, che di solito correggono la patologia, ma molti neonati richiedono anche un supporto ventilatorio.

3. LA BIOSINTESI DELL'UREA

La prima tappa del catabolismo degli amminoacidi consiste nel distacco del gruppo amminico come ammoniaca nella reazione catalizzata dalla glutammico deidrogenasi, un enzima molto abbondante nei mitocondri. Questo enzima è importante perché rappresenta l'unico sistema efficiente di deaminazione di un amminoacido; tutti gli altri amminoacidi perdono il gruppo amminico prevalentemente trasferendolo sull'acido α -chetoglutarico attraverso reazioni di transaminazione, producendo acido glutammico. Pertanto l'acido α -chetoglutarico rappresenta lo stelo dell'imbuto su cui convergono i gruppi amminici di tutti gli altri amminoacidi per la loro liberazione sotto forma di ammoniaca dall'acido glutammico così prodotto. La costante di equilibrio della reazione catalizzata dalla glutammico deidrogenasi è piuttosto bassa; ciò significa che anche la presenza di piccole quantità di ammoniaca libera fa decorrere la reazione in senso inverso generando acido glutammico da acido α -chetoglutarico. Ciò impoverirebbe la cellula di questo fondamentale intermedio metabolico, in particolare del ciclo dell'acido citrico, riducendo di molto la produzione di energia, una condizione cui sono particolarmente sensibili le cellule nervose. Questo è il motivo dell'elevata tossicità dell'ammoniaca per gli organismi superiori e quindi della necessità dell'evoluzione di sistemi efficienti per la sua pronta eliminazione o trasformazione in molecole meno tossiche (detossificazione) da eliminare successivamente. Dunque, gli organismi devono neutralizzare l'ammoniaca non appena questa è stata prodotta. A seconda della forma in cui eliminano l'azoto degli amminoacidi, gli animali vengono classificati come ammoniotelici, uricotelici o ureotelici. Negli animali ureotelici, tra cui l'uomo, l'ammoniaca prodotta viene inattivata in vari modi, per esempio attraverso la sintesi della glutammina per reazione con l'acido glutammico catalizzata dall'enzima glutammina sintetasi. Questa reazione è molto importante perché rifornisce l'organismo di glutammina, l'amminoacido maggiormente utilizzato dal corpo a scopi biosintetici (basi puriniche e pirimidiniche, amminozuccheri). L'ammoniaca presente nelle urine contribuisce a ridurre l'acidità (pH 5,5–6,0). Tuttavia la maggior parte dell'ammoniaca liberata nel catabolismo degli amminoacidi viene neutralizzata per trasformazione in urea, che rappresenta il principale prodotto finale del metabolismo azotato. Data la notevole tossicità dell'ammoniaca, la conversione di questa in urea, che avviene nel fegato, rappresenta un processo biochimico di estrema importanza e assai dispendioso in termini energetici, come si può notare dalla stechiometria della reazione complessiva:



La trasformazione dell'ammoniaca in urea avviene attraverso una serie ciclica di reazioni che prendono il nome di "ciclo dell'urea" in cui il primo reagente e il prodotto ultimo sono rappresentati dalla stessa molecola. Queste reazioni, che avvengono in parte nei mitocondri e in parte nel citoplasma delle cellule epatiche, rappresentano una tappa importante per la biochimica, essendo stata questa la prima via metabolica completamente chiarita (1932). Per poter entrare nel ciclo dell'urea, l'ammoniaca deve essere attivata per trasformazione in un composto ad alta energia di idrolisi: il carbamilfosfato, un intermedio metabolico essenziale in quanto partecipa anche alla biosintesi delle basi azotate pirimidiniche. La biosintesi del carbamilfosfato utilizzato per la produzione dell'urea avviene nei mitocondri ed è catalizzata dall'enzima carbamilfosfato sintetasi I, la proteina mitocondriale più abbondante, il cui effettore allosterico positivo è l'acido N-acetilglutammico. Le reazioni del ciclo dell'urea sono localizzate in parte nei mitocondri e in parte nel citosol. Il ciclo ha inizio dentro i mitocondri con la reazione tra carbamilfosfato e una molecola di ornitina, l'accettore che viene rigenerato al termine di ogni ciclo, per dare citrullina; questa, grazie a uno specifico sistema di trasporto presente nella membrana mitocondriale interna, passa nel citoplasma, dove va incontro alle ulteriori trasformazioni del ciclo. Il secondo dei due atomi di azoto dell'urea è fornito da una molecola di acido aspartico, che può averla ricevuta da altri amminoacidi per transaminazione sull'acido ossalacetico, un altro importante accettore di gruppi amminici. Questa reazione richiede la rottura di due legami fosforici ad alta energia di una terza molecola di ATP. Data l'importanza fisiologica del ciclo dell'urea, il blocco a livello di una qualsiasi delle sue reazioni è incompatibile con la vita per i gravi danni al sistema nervoso che provoca il conseguente accumulo di ammoniaca. Una anomalia meno drastica del ciclo porta invariabilmente all'aumento della quantità di ammoniaca presente nel sangue, chiamata iperammoniemia, con danni più limitati al sistema nervoso e con la possibilità di un parziale miglioramento limitando al massimo l'apporto di proteine. Infatti il flusso degli atomi di azoto attraverso il ciclo dell'urea varia con la composizione della dieta, e un massiccio contenuto di proteine costringe le cellule a metabolizzare pesantemente queste ultime con una massiccia produzione di ammoniaca e quindi di urea. Una condizione simile si verifica nel digiuno protratto, quando l'organismo è costretto a degradare le proteine muscolari per fornire glucosio ed energia soprattutto al cervello. La situazione opposta si verifica in individui sottoposti a diete povere di proteine. In tutte queste condizioni, l'aumentata o diminuita attività del ciclo dell'urea è assicurata da una regolazione a lungo termine che si traduce nell'aumento o nella riduzione della velocità di espressione dei geni che codificano gli enzimi del ciclo stesso e la carbamilfosfato sintetasi I. Possiamo quindi dire che la molecola dell'urea può essere un indicatore di metabolismo proteico da tenere in considerazione nella ottimizzazione delle diete e in particolar modo dell'apporto proteico delle parenterali di adulti e neonati con problemi metabolici come ad esempio la scarsa crescita.

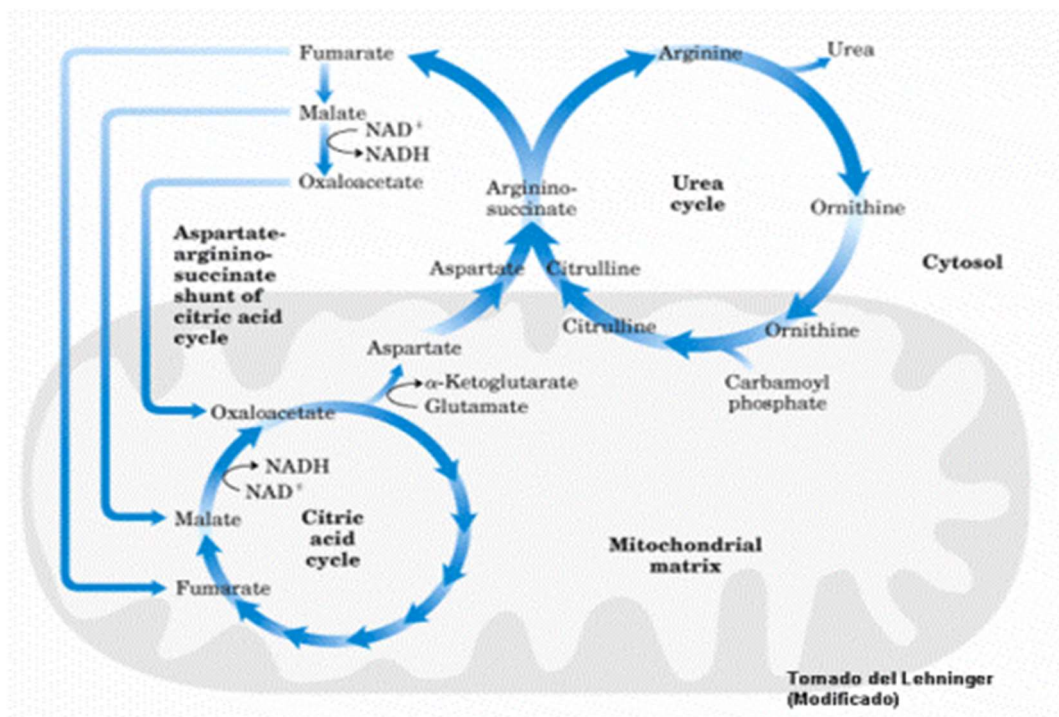


Figura 8. Il ciclo dell'urea

3.1 L'UREA COME MARKER NEONATALE DEL CATABOLISMO PROTEICO

Come già detto in precedenza, il tasso di produzione di urea dal corpo misura il tasso di catabolismo degli aminoacidi. Questo determina quanto bene vengono metabolizzate le proteine assunte con la nutrizione parenterale totale per la crescita. Il rapporto tra energia e proteine fornite dalla PN governa il tasso di catabolismo proteico, che aumenta quando a basso consumo di energia, i livelli di proteine previsti sono alti, al fine di soddisfare il fabbisogno energetico del neonato (Ali Akn et al., 2011). La PN con una inappropriata composizione amminoacidica per uso neonatale, può produrre solo elevati livelli di fenilalanina nel plasma quando vengono somministrati meno di 30 kcal/g di aminoacidi. In letteratura è stato confermato che una PN ad alta quantità di calcio, non aumenta il catabolismo proteico e produce una crescita normale, mentre una PN standard, aumenta il catabolismo proteico compromettendo la crescita (Ridout et al., 2004). In letteratura è stato descritto che l'escrezione di azoto ureico non era aumentata con l'aumentare dell'assunzione di azoto tramite la PN nei neonati di peso superiore alla media e al di sotto delle 30 settimane gestazionali. La PN contenente meno di 30 kcal/g aminoacidi dalla nascita non aumenta il catabolismo proteico e fornisce proteine sufficienti ad una crescita normale, mentre la PN che fornisce 25 kcal/g aminoacidi aumenta il catabolismo proteico

soddisfando così il fabbisogno energetico del neonato, che però rimane comunque con il problema della scarsa crescita; la PN a basso apporto proteico ed energetico aumenta catabolismo proteico (*Watson et al. 1980*). I neonati con crescita limitata hanno invece tassi più bassi di produzione di urea che non aumentano con l'età gestazionale. I neonati con nessuna restrizione alla loro crescita hanno tassi più alti di produzione di urea. Questo è in linea con i tassi più elevati di turnover proteico necessari per la crescita, considerando che i tassi bassi permettono di conservare le risorse disponibili nei neonati a crescita limitata. Un'altra correlazione con l'urea come quella di marker del catabolismo proteico è stata osservata in letteratura da (*Aiken, 2013*) sulla iperkaliemia. Senza liquidi per via parenterale, l'iperpotassemia o iperkaliemia si sviluppa rapidamente nei neonati con alti tassi di catabolismo proteico. Le infusioni di glucosio parenterale riducono il catabolismo proteico e l'iperkaliemia con il bilancio complessivo. Gli studi mostrano una stretta relazione tra la ritenzione di azoto e potassio. La produzione di urea per i neonati prematuri malati è stata misurata nel 1980 attraverso la raccolta di tutte le urine, correggendo il cambiamento dell'urea plasmatica per il cambiamento di peso; si è visto che la produzione di urea è diminuita dopo 48 ore quando la PN forniva 28 Kcal/g di aminoacidi. Ancora una volta, questo studio ha rilevato una stretta relazione tra il catabolismo delle proteine e il potassio intracellulare. Questo proteine catabolizzate sarebbero altrimenti utilizzate per la crescita. Il rapporto tra energia per proteine fornite dalla PN governa il tasso di catabolismo proteico, che aumenta quando a basso consumo energetico aumentano le proteine richieste, al fine di soddisfare il fabbisogno energetico del bambino. Lo scopo di questo studio era di esaminare come la crescita dei neonati alla nascita influenza il catabolismo proteico e quindi la ritenzione dei minerali dalla PN, con il particolare scopo di chiarire come questo influenza le richieste di potassio e fosfati. Questa informazione è di vitale importanza per evitare ipercalcemia quando si fornisce calcio sufficiente in PN per le esigenze dei neonati prematuri. Gli studi presenti fino ad oggi mostrano che l'escrezione di urea nelle urine è di facile determinazione, è accurata, e può essere misurata su spot di urina. Queste analisi potrebbero essere di grande valore prognostico e potrebbero nel futuro aiutare a prevenire i ritardi di crescita postnatale, soprattutto in molti neonati prematuri.

3.2 POSSIBILE CINETICA DELL'UREA NEI NEONATI IN NUTRIZIONE PARENTERALE

Nei neonati ed adulti il processo in cui l'azoto ureico viene recuperato nell'intestino inferiore attraverso l'attività metabolica della microflora del colon e svolge un ruolo centrale nel processo di contenimento dal corpo per variazioni di intake delle proteine. La dieta normale per il neonato è il latte materno e l'urea comprende una proporzione significativa (circa il 15%) di azoto nel latte materno (*Wheeler et al. 1993*). Il controllo del processo attraverso il quale viene recuperato l'azoto

ureico non è ancor chiaro, ma è direttamente associato all'attività metabolica della microflora del colon. L'impressione che la capacità di recuperare l'urea gioca un ruolo fondamentale nella capacità del corpo di far fronte ad una limitata disponibilità di proteine nella dieta è stata rafforzata dalla constatazione che negli adulti il sistema di recupero fallisce poiché il bilancio di azoto diventa negativo. In letteratura si è esplorato il modello di recupero dell'urea nei neonati che non avevano mai avuto un'assunzione orale di cibo e venivano mantenuti in nutrizione parenterale totale nel periodo postoperatorio perché la normale flora residente nel colon non avrebbe avuto la possibilità di stabilirsi in assenza di un normale intake dall'alimentazione. Le proteine ingerite sono rese disponibili per il metabolismo, come gli amminoacidi, e si mescolano con il pool corporeo di aminoacidi che derivano anche dalla degradazione delle proteine. Le misurazioni delle cinetiche dell'urea, calcolate utilizzando il modello di (*Wheeler, et al 1993*), mostrano che solo la metà dell'urea prodotta era escreta nell'urina e che l'altra metà veniva recuperata e messa a disposizione per il metabolismo. I neonati hanno una flora gastrointestinale metabolicamente funzionale ed in grado di interagire con il metabolismo dell'ospite. Come nei neonati più grandi e negli adulti, il processo di recupero dell'azoto ureico sembra essere sensibile all'assunzione di sostanze nutritive e dalla richiesta metabolica dell'ospite da un'età molto precoce. Le grandi quantità di azoto che si muovono attraverso la via di recupero insieme ai dati che suggeriscono che la sintesi batterica di aminoacidi essenziale così come gli aminoacidi non essenziali da azoto ureico potrebbero essere disponibili per l'host in quantità funzionalmente significative. Negli adulti in materia di nutrizione parenterale totale il recupero di azoto ureico è stata rafforzato, ma resta ancora dubbio. Ulteriori studi di cinetica nei neonati e negli adulti in PN potrebbero fortificare questo studio e chiarire il meccanismo.

OBIETTIVO DELLA TESI

La crescita rappresenta un importante outcome nella cura dei neonati pretermine. Tuttavia è ancora oggetto di studio quale sia lo schema nutrizionale più adeguato per sostenere la crescita di questa tipologia di pazienti, in particolare dei neonati di peso molto basso alla nascita (ELBW). I bambini ELBW ricevono nutrizione parenterale (PN) nelle prime 3 settimane di vita, come parte delle cure cliniche di routine. L'ottimale composizione della PN da somministrare ai pazienti, sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo è tutt'ora oggetto di dibattito. Inizialmente, gli schemi nutrizionali per la PN del paziente ELBW prevedevano l'introduzione dapprima dei carboidrati in associazione a piccole quantità di aminoacidi; solo successivamente sono stati introdotti i lipidi, nel corso della prima settimana di vita (*Rose et al. 1993*). Inoltre i pazienti ricevevano spesso carboidrati e lipidi in elevate quantità, maggiori rispetto all'apporto di proteine; in questa maniera il più alto apporto di energia non proteica avrebbe potuto risultare più favorevole per il metabolismo del pretermine riducendo l'ossidazione proteica, l'incidenza di acidosi metabolica (*Braake et al. 2005; Burattini et al. 2013*) e l'iperazotemia e riducendo le elevate concentrazioni plasmatiche di aminoacidi riscontrabili in corso di nutrizione parenterale. (*Thureen et al., 2003; Ibrahim et al. 2004; Vlaardingerbroek et al., 2013*).

Il nostro obiettivo principale in questo lavoro di tesi è stato quello di confrontare gli outcome nutrizionali nelle due diverse miscele amminoacidiche, Primene 10% e Trophamine 6% (Baxter S.p.A.) nei neonati pretermine, per comprendere meglio il metabolismo proteico di questi piccoli pazienti critici, cercando di individuare la soluzione amminoacidica meglio tollerata. Il secondo obiettivo è stato quello di valutare l'incidenza di acidosi metabolica neonatale, il profilo amminoacidico plasmatico in corso di PN con le due differenti miscele amminoacidiche, il bilancio azotato in corso di PN nei neonati pretermine, la velocità di crescita dalla nascita ai 28 gg di vita e a 36 settimane di età postmestruale. Questo è stato fatto sempre cercando di minimizzare il dolore ai pazienti stessi, eseguendo le determinazioni di laboratorio nei giorni che non interferivano con la routine clinica o in concomitanza della stessa, al fine di evitare disordini in reparto e senza creare problemi di gestione del lavoro del personale infermieristico. Gli aminoacidi sono gli ingredienti chiave della nutrizione parenterale poiché promuovono l'anabolismo e/o il catabolismo cellulare e il normale sviluppo cellulare, e sono collegati molto spesso a patologie che portano a ritardi nello sviluppo neurologico; per questi motivi, la loro somministrazione precoce o tardiva è una questione ancora controversa, come si evince dalla letteratura. I neonati pretermine, presentano infatti numerosi problemi metabolici legati alla loro immaturità gastrointestinale tra cui un deficit di crescita postnatale nelle prime settimane di vita che deve essere colmato ed hanno per questo una ridotta tolleranza alimentare, che può portare a gravi patologie associate a volte a complicanze irreversibili

soprattutto in quei neonati pretermine di basso peso estremamente basso (ELBW). Proprio per questo spesso la nutrizione è spesso fornita per via endovenosa (PN) in modo tale da poter monitorare gli apporti proteici, glucidici e lipidici che sono necessari per la crescita, senza però sovraccaricare l'intestino. Anche se i progressi in neonatologia hanno migliorato le possibilità di monitoraggio dei principali componenti nutrizionali, garantendo il più possibile una stabilità metabolica, producendo meno acidosi, e abbassando il valore dell'urea plasmatica, resta ancora da chiarire la sicurezza e la tollerabilità delle miscele (*Kashyap et al., 1994; Saini et al., 1989*). Migliorando la qualità degli aminoacidi che vengono aggiunti alle soluzioni infuse in PN si può cercare di bypassare, almeno parzialmente, il gap della scarsa crescita di una piccola parte dei neonati pretermine ELBW (*Thureen et al., 2003; Van Goudoever et al., 1995*).

5.MATERIALI E METODI

5.1 DISEGNO SPERIMENTALE

Lo studio prospettico randomizzato svolto in questo lavoro di tesi è stato approvato dalla “Azienda Ospedaliero Universitaria Ospedali Riuniti di Ancona”, ed è stato svolto all’interno del reparto di “Terapia Intensiva di Neonatologia” (TIN) dell’Ospedale G. Salesi, nella medesima città. Il campionamento è stato eseguito dopo aver ottenuto il consenso informato da parte dei genitori o dei tutori legali in ottemperanza delle leggi vigenti, grazie alla collaborazione dello staff medico ed infermieristico del reparto della TIN. Un altro centro coinvolto in questo studio, oltre alla TIN del Salesi, è stato il presidio ospedaliero di Fano, precisamente il reparto della neuropsichiatria infantile dell’Ospedale Santa Croce, che fa parte degli “Ospedali Riuniti Marche Nord”, diretto dalla Dott.ssa Vera Stoppioni. Lo studio ha avuto inizio nel Luglio 2014. La prima operazione che è stata effettuata, è stata quella di delineare le modalità di campionamento, nel rispetto dei criteri etici, garantendo la minor invasività possibile ai pazienti coinvolti. Successivamente sono stati individuati i pazienti arruolabili allo studio e sono state stabilite le modalità di iniziazione ed i volumi dei campioni biologici, plasma ed urina, in modo tale che fossero adatti alle diagnosi di laboratorio alle quali dovevano essere poi sottoposti. I pazienti che non sono stati considerati nello studio e quindi esclusi, avevano gravi malformazioni congenite, e anomalie congenite del metabolismo, in cui i valori biochimici clinici potevano interferire con i valori considerati “normali” nella routine di laboratorio. Il campionamento e la randomizzazione si sono conclusi nel Maggio 2016. La randomizzazione è stata eseguita dalla Farmacia Ospedaliera del presidio G. Salesi di Ancona, secondo delle regole stabilite in precedenza; in seguito, i pazienti coinvolti, sono stati inseriti nello studio in base alla diversa emulsione lipidica utilizzata in parenterale ed in base alla differente soluzione amminoacidica che era stata randomizzata per ogni singolo neonato, Primene 10% o Trophamine 6%.

5.2 CARATTERISTICHE DEI NEONATI PRETERMINE

I pazienti reclutati saranno quelli nati di peso compreso tra i 500 e i 1249 g, che di routine ricevono PN nel reparto di Neonatologia. Le due soluzioni amminoacidiche che verranno somministrate sono quelle che attualmente vengono acquistate secondo la Gara Ospedaliera dalla Farmacia degli Ospedali Riuniti di Ancona per la PN di qualsiasi paziente ricoverato, pretermine o pediatrico. Allo scopo di questo studio, i pazienti verranno randomizzati a ricevere una delle due soluzioni amminoacidiche in PN. La randomizzazione è stata effettuata dalla farmacia del Salesi grazie alla Dr.ssa Pompilio. La popolazione iniziale randomizzata per le due miscele Primene 10% e Trophamine 6% era inizialmente di 200 pazienti. I neonati malformati sono stati esclusi in un secondo momento dallo studio, perché non Successivamente, considerando i criteri di inclusione dei neonati pretermine randomizzati nello studio, con un peso (W) alla nascita compreso tra 500 a 1249 grammi e una età gestazionale (EG) sotto le 32 settimane, è stato analizzato un sottogruppo di circa 80 neonati, con caratteristiche cliniche sono simili tra di loro. I neonati sono stati avviati alla nutrizione parenterale (PN) contenente glucosio, aminoacidi e lipidi dopo circa 1 ora dalla nascita, secondo le linee guida della terapia intensiva neonatale. Gli aminoacidi sono stati aggiunti “precocemente” alle PN secondo i protocolli sperimentati negli ultimi anni; in letteratura infatti, l’aggiunta precoce “early” (EAA) di aminoacidi è stata valutata positivamente contro quella tardiva “late” (LAA). Le soluzioni amminoacidiche utilizzate in reparto sono Trophamine 6% e Primene 10% (Baxter S.p.A.). Esse differiscono nella composizione chimico-fisica come mostrato nella tabella sottostante. I campioni di sangue da noi utilizzati sono stati raccolti in concomitanza con quelli utilizzati per i normali esami di routine, insieme all’urina, prelevata lo stesso giorno a partire da 24h dalla prescrizione medica. Il prelievo di sangue è stato eseguito piccando il tallone del neonato e raccolto tramite un capillare di 125 ul di volume, contenente EDTA, ogni settimana fino alla data di dimissione del ricovero. Il campionamento è stato eseguito durante le analisi di routine per evitare ulteriori sofferenze nei neonati ed eventuali disordini in reparto. Alcuni prelievi di sangue non sono stati raccolti nei giorni prefissati solo quando lo stato clinico dello stesso lo impediva. I campioni appena prelevati, sono stati centrifugati immediatamente a 3000 g per 10 minuti ed infine sono stati stoccati a -20°C. Le urine sono state raccolte inserendo un piccolo sacchetto di plastica al livello dei genitali maschili e/o femminili, facendo in modo che l’urina non si mischiasse con le feci; se questo accadeva, i campioni di urina misti a feci non venivano accettati in laboratorio, in quanto le feci interferiscono con il kit utilizzato. In alcuni casi, l’urina è stata raccolta con il cotone idrofilo del reparto, e successivamente grazie ad una siringa sterile, è stata prelevata l’urina imbevuta nel cotone. È stato valutato, attraverso prove di laboratorio, che il cotone non interferiva nei saggi diagnostici, dimostrando così che si poteva prelevare urina anche con questo metodo meno invasivo e meno doloroso per il paziente. Non è stato

eseguito alcun prelievo aggiuntivo nei pazienti arruolati. All'interno del gruppo di pazienti prescelti, è stato arruolato un ulteriore sotto gruppo di 30 pazienti randomizzati per le due soluzioni aminoacidiche: 15 con Trophamine6% (Baxter S.p.A) e 15 con Primene10%. (Baxter S.p.A.). Il plasma di questi pazienti veniva raccolto dalla vena ombelicale il 7 giorno dalla nascita, prima che quest'ultima venisse sfilata; il plasma risultante, dei neonati arruolati, è stato deproteneizzato con l'acido solfosalicilico al 10%, consegnatoci dall'Ospedale Santa Croce di Fano per eseguire il profilo aminoacidico plasmatico in Cromatografia su resina a scambio ionico (IC). Degli stessi neonati sono stati recuperati, sempre a Fano, gli screening neonatali analizzati attraverso il dosaggio delle Acilcarnitine e il Succinilacetone su spot di sangue intero mediante LC-ESI-MS/MS. Di seguito sono riportati i criteri di inclusione e di esclusione per il reclutamento dei pazienti

Criteri di inclusione:

- ✓ Neonati pretermine di peso neonatale compreso tra 500 e 1249 g
- ✓ Avvio della nutrizione parenterale entro 24 ore dalla nascita
- ✓ Consenso informato del legale rappresentante alla partecipazione allo studio

Criteri di esclusione:

- ✓ Outborn trasferiti oltre le 24 ore
- ✓ Peso neonatale < 500 g o > 1249 g
- ✓ NEC, qualsiasi chirurgia
- ✓ Sindrome/malattia metabolica
- ✓ Malformazioni congenite con ridotta aspettativa di vita
- ✓ Ritiro del consenso

Altri criteri:

1. Metabolismo:

- ✓ Urea plasmatica e urinaria settimanale dalla nascita a 28 gg di vita.
- ✓ Incidenza di acidosi metabolica nel periodo di studio (espressa come numero di pazienti con pH ematico < 7.25 e SBE > -7.5).

- ✓ Numero di episodi di acidosi metabolica per paziente nel periodo di studio.
- ✓ Incidenza di perdita renale di bicarbonati (espressa come numero di pazienti con pH urinario > 5 e/o Na⁺ urinario > 40 mEq/l).
- ✓ Durata della terapia con bicarbonati endovena.
- ✓ Profilo degli aminoacidi plasmatici a 7 giorni di vita (aminoacidogramma).

2.Crescita:

- ✓ Calo massimo ponderale
- ✓ Giorni di vita al calo massimo ponderale.
- ✓ Giorni dalla nascita al recupero del peso neonatale (NADIR)
- ✓ Parametri antropometrici (peso, lunghezza, circonferenza cranica) alla nascita e a 36 settimane di vita;
- ✓ Velocità di crescita di peso, lunghezza e circonferenza cranica settimanale nel periodo di studio.

5.3 RISCHIO-BENEFICIO

Non è noto quale sia la PN migliore per il neonato pretermine, non solo da un punto di vista quantitativo, ma anche qualitativo, al fine di ottimizzare la tolleranza in corso di PN e la crescita del paziente pretermine. Non vi saranno reali benefici nella partecipazione allo studio per il momento. Se una delle due soluzioni amminoacidiche dovesse risultare migliore in termini di tolleranza metabolica (minor incidenza di acidosi metabolica e quindi minor consumo di bicarbonati) o di crescita per i pazienti arruolati, si prediligerà in futuro l'utilizzo della soluzione più "vantaggiosa" per PN del neonato pretermine. Non ci sono rischi aggiuntivi per i pazienti arruolati (le due miscele sono già in uso nell'Azienda Ospedaliera e nel reparto di Neonatologia). Il paziente non dovrà sopportare un dolore aggiuntivo, in quanto come detto in precedenza i prelievi vengono comunque eseguiti rimanendo in linea con la routine del reparto, né un rischio/costo aggiuntivo, in quanto le analisi verranno svolte da un laboratorio esterno alla clinica, in modo da non inficiare le pratiche di analisi laboratoristiche giornalmente svolte. La quantità di sangue prelevato è da considerarsi irrisoria in confronto a quanto avviene per le cure routinarie.

5.4 LE SOLUZIONI AMINOACIDICHE INFUSE: PRIMENE 10% E TROPHAMINE 6%

Per quanto concerne la qualità delle miscele aminoacidiche in commercio, negli anni '90 sono state elaborate nuove e specifiche soluzioni pediatriche con alti apporti di aminoacidi essenziali/non essenziali adatti per i neonati di basso peso e tali da ottenere un aminoacidogramma plasmatico molto simile a quello di neonati a termine sani di 30 giorni allattati al seno due ore dopo il pasto (*Heird et al., 1987; Heird et al., 1988*). Studi condotti sulla popolazione dei pazienti pretermine hanno mostrato negli anni come le miscele aminoacidiche a disposizione, pur non determinando concentrazioni plasmatiche “tossiche” per nessuno degli aminoacidi in esse contenuto, fossero comunque sub ottimali nell’apporto di alcuni aminoacidi, quali la glutammina, la taurina, la cisteina (*Lourenco et al., 2002; Poindexter et al., 2003; Soghier et al., 2006; Laine et al., 1991*). In particolare la taurina è un aminoacido essenziale per il neonato pretermine, e svolge un ruolo determinante nel processo di coniugazione degli acidi biliari e nella prevenzione della colestasi, ha effetti anti aritmici/inotropi/cronotropi, è un neuro modulatore del sistema nervoso centrale, è importante per lo sviluppo retinico, ha effetti endocrini/metabolici e possiede proprietà antiossidanti e antiinfiammatorie. La cisteina è un aminoacido semi-essenziale, è precursore del glutatione (attività antiossidante); la sua aggiunta nella PN permette la riduzione dell’apporto di metionina, limitando potenziali effetti epatotossici e acidifica la soluzione, aumentando la solubilità di calcio e fosforo, potenzialmente migliorando la mineralizzazione ossea del pretermine. I neonati prematuri della Terapia Intensiva Neonatale (TIN) dell’Ospedale G. Salesi di Ancona sono stati randomizzati per un periodo di due anni circa a ricevere per infusione due soluzioni amminoacidiche differenti nella composizione farmacologica: Primene 10% e Trophamine 6% (TPH), Baxter S.p.A. Le caratteristiche delle miscele sono di seguito riportate:

<i>TROPHAMINE 6% (Baxter S.p.A.)</i>	<i>PRIMENE 10% (Baxter S.p.A.)</i>
9,3 g/L di azoto totale e 525 mOsm/l;	15 g/L di azoto totale e 790 mOsm/l;
pH 5-7 con Acido Acetico	pH 5-6,5 con Acido Malico
Aminoacidi 60 g/L	Aminoacidi 100 g/L

Lisina Acetato 6,9 g/L, L-Tirosina 0,4 g/L eN-acetil-Tirosina 1,2 g/L	L- isomer (Ornithine Monohydrochloride) 2,49 g
5 mEq/L di sodio, < 3 mEq/L di cloro, 55 mEq/L di acetati, 58 mEq/L di proteine	Cloruri 19,0 mMol/L
S ₀₂ < 1,0 g	Densità 1,033 g/ml

Le due soluzioni infuse in nutrizione parenterale contengono AA essenziali, semi-essenziali e non-essenziali in concentrazioni differenti ed hanno quindi una “compliance” farmacologica ancora poco conosciuta. Secondo una analisi della forma farmaceutica e dei singoli aminoacidi possiamo dire che il contenuto di azoto è più basso nel TPH con 9,30 g/L contro i 15 g/L del Primene10%; stesso discorso vale per gli amminoacidi totali contenuti in 1000 ml di soluzione, nel TPH ne troviamo 60 g/L, nel Primene100 g/L. Per quanto riguarda i singoli aminoacidi possiamo osservare che la taurina, è maggiore nel Primene e circa quattro volte minore nel TPH; la tirosina al contrario, risulta di circa tre volte maggiore nel TPH rispetto al Primene. Un'altra interessante caratteristica che possiamo notare è la presenza rilevante degli aminoacidi a catena ramificata quali la leucina nel Primene, di contro, il TPH contiene aminoacidi acetilati come la N-acetil-Tirosina in quantità di 1,2 g/L e una dose pari quasi al 7 g/L di lisina acetato, proveniente dall'acido acetico, precursore del bicarbonato. Entrambe le soluzioni hanno un pH intorno a 6,5-7 e sono acidificate con acido acetico il Trophamine e con acido malico il Primene.

	Primene 10% (Baxter)	Trophamine 6% (Baxter)
Essential (EAA)		
Isoleucina	0.670	0.490
Leucina	1.000	0.840
Lisina	1.100	0.490
Metionina	0.240	0.200
Fenilalanina	0.420	0.290
Treonina	0.370	0.250
Triptofano	0.200	0.120
Valina	0.760	0.470
Semi-essenziali (SEAA)		
Cisteina	0.189	0.020
Istidina	0.290	0.290
Taurina	0.060	0.015
Tirosina	0.045	0.140
Arginina	0.840	0.730
Prolina	0.300	0.410
Nonessential (NEAA)		
Alanina	0.800	0.320
Acido Aspartico	0.600	0.190
Acido Glutammico	1.000	0.300
Glicina	0.400	0.220
Serina	0.400	0.230
Orinitina	0.318	

Tabella 2. Contenuto di amminoacidi (AA g/100 ml) nelle soluzioni per la nutrizione parenterale.

5.5 RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Abbiamo raccolto 0,125 mL di sangue in capillari in EDTA al settimo giorno dalla nascita dei neonati pretermine e poi ad ogni complisettimana, quando la PN era la principale fonte nutrizionale, mentre quella enterale era minima. Il prelievo da plasma capillare è innovativo e permette di avere una quantità di campione comunque valida per i dosaggi eseguiti con “micrometodi” ma allo stesso tempo ne ricava un vantaggio anche il paziente perché tale prelievo è meno doloroso e meno invasivo. Con la stessa procedura, è stata raccolta l’urina, in una quantità variabile contenuta all’interno di eppendorf dal volume di 1,5-2 ml. Il sangue e l’urina raccolti nello stesso giorno in reparto, sono stati utilizzati per i dosaggi di parametri biochimici-clinici quali urea plasmatica, urea urinaria e trigliceridi (TG) mediante kit diagnostici di laboratorio. Il kit per i TG ci è stato fornito da un’azienda locale marchigiana, la “Chema Diagnostica” di Monsano, in provincia di Ancona e quello per l’urea da una ditta tedesca la “BIOTREND” Chemikalien GmbH. In un sottogruppo di 30 neonati pretermine è stato eseguito in concomitanza con quello del 7 giorno, un secondo prelievo di sangue da vena ombelicale, di 0,5 mL. Il sangue capillare è stato immediatamente centrifugato a 3000 g per 10 minuti stoccato a -20 °C; i prelievi di sangue da vena ombelicale hanno invece subito una deproteinizzazione, un processo differente dagli altri; la provetta contenente il sangue è stata centrifugata a 2800 g per 5 minuti, il sovrinatante è stato successivamente trasferito in un’altra provetta, nella quale è stata

aggiunta la stessa quantità di acido solfosalicilico (SSA), così da avere un rapporto 1:1 in una diluizione 1:2. Infine è stata centrifugata nuovamente la provetta e la parte liquida sovrastante al pellet di scarto è stata trasferita in una terza eppendorf di stoccaggio e congelata al -20°C, pronta per l'analisi. Questi campioni sono stati poi trasportati all'Ospedale Santa Croce di Fano e sono stati analizzati 0,200 mL degli stessi in Cromatografia a scambio ionico (IC) per ottenere il profilo aminoacidico. L'urina è stata raccolta con il sacchetto plastificato e/o con il cotone idrofilo e conservata direttamente a -20 °C.

5.6 METODI ANALITICI E STRUMENTALI DI LABORATORIO

Sono stati utilizzati kit diagnostici di laboratorio che hanno permesso attraverso l'utilizzo di micrometodi, ovvero dosare i parametri biochimici clinici come l'urea plasmatica ed urinaria e i trigliceridi plasmatici. I metodi utilizzati hanno l'obiettivo di non interferire nella pratica diagnostica e di minimizzare il dolore provocato dal prelievo, utilizzando una quantità piccola di campione durante l'analisi. Inoltre, questi metodi sono caratterizzati dalla precisione, dalla accuratezza e dalla facilità d'uso e permettono quindi in poco tempo di ottenere risultati riproducibili. I kit utilizzati si basano su saggi colorimetrici, e prevedono tutti l'utilizzo dello spettrofotometro, uno strumento che misura l'intensità luminosa in funzione della lunghezza d'onda della radiazione luminosa. Lo spettrofotometro che è stato usato per le determinazioni analitiche è un "Multiskan GO" della Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) riportato in **Figura 9**, che lavora nello spettro del visibile (400-700 nm), con una singola porta per le cuvette monouso in polistirolo ottico (macro e/o micro), e un "carrier" "(out or in), automatizzato per le micropiastre da 96 pozzetti e per quelle da 384; quindi può essere utilizzato anche per metodi che non prevedono l'uso delle cuvette. Il design dello strumento è molto minimale; lo spettrofotometro è collegato ad un computer che controlla lo strumento attraverso un software specifico. L'elevata tecnologia che lo contraddistingue permette a questo dispositivo di svolgere funzioni automatizzate in modalità "multitasking" tra le quali lo shake dei campioni, le curve di cinetica e l'incubazione ad una temperatura ben precisa, scelta dall'operatore, grazie ad un sensore interno di rilevazione (10-45°C); la temperatura "standard" alla quale di solito lavora lo strumento è di 37°C. Ovviamente, durante tutto il processo di analisi, per evitare problemi di funzionamento e per avere un risultato eccellente, è buona norma seguire sempre le Good Laboratory Practices (GLP). La validazione dei metodi da utilizzare è di facile intuizione e per semplificare il processo di analisi, è munito di una porta USB per memorizzare i dati ottenuti. È possibile inoltre misurare uno un campione impostando due o più lunghezze d'onda. Il principio fondamentale su cui si basa la

determinazione spettrofotometrica segue la legge di Lamber-Beer secondo la quale l'assorbanza misurata in Optical Density (O.D) è direttamente proporzionale alla concentrazione della soluzione contenuta nella campione:

LEGGE DI LAMBER-BEER

$$A = \varepsilon l C$$

dove “ ε ” misurata in O.D. rappresenta l’assorbanza che è indipendente dalla temperatura, e dipendente dalla lunghezza d’onda e dal tipo di solvente; “ l ” è il cammino ottico, ovvero lo spessore della soluzione contenuta nella cuvetta e attraversato dalla luce, misurato in cm e infine “ C ” è la concentrazione della soluzione misurata in mol/L. Tale relazione empirica descrive i fenomeni di assorbimento di radiazioni elettromagnetiche, alla base della spettrofotometria.



Figura 9. Spettrofotometro “Multiskan GO”, Thermo Scientific

5.6.1 DETERMINAZIONE DEI TRIGLICERIDI (TG) MEDIANTE KIT

Il kit per il dosaggio dei trigliceridi “TR F-400 CH” (4X100), Chema Diagnostica (Monsano, AN, IT), è in grado di misurare i trigliceridi plasmatici con solo 10 ul di campione. Viene infatti utilizzata una piccola quantità di campione, minimizzando così il dolore al neonato, e allo stesso tempo viene garantito un risultato preciso e riproducibile nel tempo. Nella nutrizione umana, i trigliceridi sono gli esteri del glicerolo prevalenti, costituiscono circa il 95% del grasso di deposito tissutale e vengono depositati nel duodeno e nell'ileo prossimale; mediante l'azione della lipasi e degli acidi biliari, vengono idrolizzati a glicerolo ed acidi grassi. Il glicerolo libero è potenzialmente una fonte di errore e può aumentare in caso di una elevata presenza di trigliceridi o campioni non freschi o in pazienti che assumono il glicerolo come veicolo di farmaci. Dopo l'assorbimento, vengono risintetizzati nelle cellule epiteliali e combinati con il colesterolo ed apolipoproteine formano i chilomicroni, che raggiungono la vena giugulare grazie al sistema linfatico. La determinazione dei TG fa parte degli studi metabolici delle alterazioni lipidiche. Il metodo enzimatico utilizzato si basa sulla attività enzimatica della glicerolo-chinasi e glicerolo fosfato ossidasi, producendo il perossido di idrogeno; quest'ultimo reagendo con il TOPS e 4-amminopterina in presenza di perossidasi, forma un composto colorato in viola che viene assorbito a 546 nm. Il procedimento per la determinazione dei TG consiste nel preparare una reazione chimica in cui si aggiunge 1 mL di reagente, fornito dalla ditta, ai campioni incogniti, all'acqua e allo standard, anch'esso fornito; si pipetta dentro ogni eppendorf 10 ul di campione, sia esso siero o plasma, acqua o standard e dopo aver vortexato la miscela si incuba il tutto in un bagnetto a 37°C per 5 minuti. A questo punto si legge contro il bianco, l'assorbanza del campione (A_x) e quella dello standard (A_s) allo spettrofotometro “Multiskan GO” della Thermo Scientific. Infine si calcolano i mg/dL di TG contenuti nel campione secondo una semplice equazione:

$$TG \text{ mg/dL} = A_x/A_s * 200 \text{ (valore standard)}$$

L'intervallo di riferimento auspicabile è <200 mg/dL (2,26 mmol/L). Ogni laboratorio dovrebbe stabilire i propri intervalli di riferimento in relazione alla propria popolazione. La linearità del test arriva fino a 1000 mg/dL e la sensibilità del metodo permette di discriminare valori fino a 0,69 mg/dL. L'unico limite del kit è dato da alcune interferenze che sono verificabili in presenza di emoglobina (< 150 mg/dL) e bilirubina (<18 mg/dL). Il coefficiente di variazione (cv%) ha un valore pari al 3%. Le interferenze possono essere date anche da materiale da laboratorio non sterilizzato o da dispositivi di protezione dell'operatore.

5.6.2 DETERMINAZIONE DELL'UREA PLASMATICA ED URINARIA MEDIANTE KIT

Il kit per il dosaggio dell'urea della BIOTREND Chemikalien GmbH (Technologiezentrum Koln, Germany), è in grado di dosare l'urea utilizzando un'infima quantità di campione pari a 5 uL sia di plasma che di urine. Questo micrometodo è applicabile anche ad altri liquidi biologici come gli aspirati bronco alveolari (BAL), anche se in questo caso il campione viene misurato più diluito e la quantità usata è di 50 uL. L'urea è la molecola di eccellenza prodotta nel fegato e secreta nei reni. È considerata il maggior prodotto del catabolismo proteico sia nell'uomo che negli animali. La sua determinazione è importante per stabilire la funzionalità renale; elevati livelli di urea indicano nefriti ed altre malattie associate al fegato, diabete e insufficienza epatica, che può derivare da una terapia parenterale con eccesso di fluidi. L'urea è una molecola con massa paria 60,06 g/mol, è un composto chimico solido e cristallino incolore avente la formula chimica $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$. Nella fase cristallina è planare, in fase gassosa è piramidale ed allo stato solido ogni ossigeno è legato ad altre due molecole con un legame idrogeno, per questo è altamente solubile in acqua, può reagire con alcoli, formare clatrati e produrre acidi barbiturici se legata agli esteri dell'acido malonico; viene rilasciata nel sangue e gli amminoacidi che non vengono utilizzati per la sintesi proteica, vengono ossidati e perdono il gruppo amminico per azione delle transaminasi. Altre reazioni cataboliche portano alla sintesi di prodotti azotati e ammoniaci. L'accumulo di questi prodotti e il conseguente aumento della concentrazione di azoto nel citoplasma può portare il pH cellulare a valori tossici. Di conseguenza l'azoto di scarto viene convertito in urea, che costituisce un composto "sicuro" per trasportare l'azoto senza rischi. Attraverso la circolazione sanguigna l'urea raggiunge i reni, dove viene escreta come componente dell'urina. Una piccola quantità di urea è presente anche nel mestruo, sulla cute dei pazienti e nella saliva. La presenza fisiologica di urea nel sangue della specie umana va da circa 18 a 40 mg/dl, ma i valori variano in funzione dell'età del soggetto. La determinazione dell'urea nel siero umano o degli animali è nota impropriamente come azotemia. In realtà la molecola che viene determinata è l'urea dalla quale viene poi ricavato attraverso un calcolo stechiometrico il valore del cosiddetto B.U.N. (Blood Urea Nitrogen, o azoto ureico). L'azoto ureico contribuisce per il 28-60% al peso della molecola, ed è quindi uguale a circa la metà della concentrazione plasmatica dell'urea. Il termine "uremia" dovrebbe essere inteso come il valore misurato di urea nel sangue, ma è diventato nome comune dell'insufficienza renale terminale. Il valore chiamato B.U.N. è utilizzato soprattutto nei paesi anglosassoni per indicare il livello di azotemia, e si calcola dividendo il valore di urea espresso in mg/dl per 2,14. I valori fisiologici nella specie umana sono circa 9–20 mg/dl. L'urea viene utilizzata inoltre nell'Urea breath test per dimostrare la presenza di *Helicobacter pylori*, batterio che provoca disturbi cronici come la gastrite cronica. Molteplici sono quindi le funzioni svolte da tale molecola, ma quella principale è di essere il prodotto finale del catabolismo proteico. Le misure

dell'urea plasmatica ed urinaria contribuiscono inoltre a definire il “Nitrogen Balance” (Bilancio Azotato) che è un parametro chimico clinico ottenuto mediante la differenza tra azoto introdotto e azoto eliminato o perso; esso consente quindi di valutare in modo indiretto lo “stato catabolico” di un soggetto, poiché tramite questo calcolo è possibile determinare sia le perdite proteiche che la quantità di proteine che sono state utilizzate per la sintesi proteica. Per tali motivi, sono state analizzate le uree plasmatiche e urinarie dei neonati pretermine: i campioni di urina e sangue intero capillare sono stati prescritti al complissettimana per ciascun paziente partecipante allo studio di tipo randomizzato. Il kit della BIOTREND Chemikalien GmbH utilizzato per l'analisi dell'urea si chiama “QuantiChrom Urea Assay Kit DIUR 100 e si basa sulla determinazione colorimetrica quantitativa dell'urea attraverso l'utilizzo dello spettrofotometro “Multiskan GO” (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Il saggio spettrofotometrico è di semplice utilizzo, la “shelf life” del kit da quando viene aperto è di 12 mesi e viene conservato a -20°C. Il kit è composto da due reagenti A e B e dallo standard dell'urea; quest'ultimo viene diluito a concentrazioni crescenti in modo tale da avere una retta di calibrazione dello standard che ci permette di interpolare i nostri risultati contro l'assorbanza, ricavando così il valore dell'analisi in mg/dL. L' R^2 della curva di regressione deve quanto più possibile essere vicino allo 0,999. Per prima cosa si equilibrano tutti i reagenti a temperatura ambiente, e si mescolano i reagenti A e B in egual volume (1:1) in base al numero di campioni che utilizziamo per l'analisi; questo composto così formato è attivo per un tempo limitato di circa 20 minuti. In seguito si allestisce la reazione utilizzando le 96-well plate, in modo tale da analizzare contemporaneamente molti campioni. Il campione viene analizzato trasferendone 5 uL dello stesso nella piastra in una sequenza ben precisa: bianco (acqua milli Q) 5 uL, standard 5 uL (50mg/dL) e campioni 5 uL in duplicato. Il sangue o siero viene determinato senza essere diluito, l'urina viene diluita di 50 volte in acqua milli Q prima dell'analisi. I campioni che contengono basse concentrazioni di urea quali BAL (aspirati bronco alveolari) o tessuti/estratti cellulari, vengono traferiti in piastra utilizzandone 50 uL, ciò vale anche per il bianco e per lo standard che quindi vengono inseriti in piastra con un volume di 50 ul; lo standard viene precedentemente diluito in acqua milli Q e dalla concentrazione di 50 mg/dL si arriva ad avere una concentrazione pari a 5 mg/dL. A questo punto si aggiungono 200 uL del reattivo “A+B” preparato, e si applica alla piastra uno “shake” di pochi secondi in modo tale da mixare i reagenti al campione. Infine, si incuba la piastra a 37°C per 20 minuti (50 minuti per i campioni con basse concentrazioni di urea) e si legge l'O.D. a 520 nm o a 430 nm. Questi step vengono eseguiti in modo automatico dallo spettrofotometro, impostando le operazioni nel seguente modo:

a) “Layout” si evidenziano gli spot nei quali viene trasferito il campione, nominandoli come blank, standard, calibrator e unknown;
b) “Carrier OUT”, il carrello per la piastra esce dallo strumento;
c) “Pausa” di 5 secondi per inserire la piastra nel carrello;
d) “Carrier IN”, dopo aver inserito la piastra, il carrello rientra;
e) “Shake” per 5 secondi a velocità media;
f) “Incubazione” a 37°C per 20-50’;
g) “Lettura” dell’O.D spettrofotometrica a 430 (520 nm).

Il calcolo per la determinazione della concentrazione dell’urea mg/dL nei campioni è:

$$UREA (mg/dL) = (OD_{sample} - OD_{blank}) / (OD_{standard} - OD_{blank}) * n * (STD)$$

Per la conversione a BUN (mg/dL) basta moltiplicare il valore per 2,14. Consideriamo che 1 mg/dL di urea equivale a 167 MM, 0.001% o 10 ppm. Al termine della seduta spettrofotometrica si apre un pannello dove compaiono i risultati; è possibile salvare tali risultati ed esportarli su un foglio Excel per eseguire i calcoli e determinare la quantità di urea presente nei campioni.

5.7 LA SPETTROMETRIA DI MASSA

La spettrometria di massa è una tecnica analitica utilizzata sia per l’identificazione di sostanze sconosciute, sia per l’analisi di tracce e residui di sostanze note. Viene comunemente usata in combinazione con tecniche separative, quali la gascromatografia (GC), la cromatografia in fase liquida ad alta pressione (HPLC) e la cromatografia a scambio ionico (IC). Il principio su cui si basa la spettrometria di massa è la possibilità di separare una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica (m/z); tale miscela è ottenuta ionizzando le molecole del campione. La ionizzazione può

essere ottenuta in diversi modi e, a seconda della metodica utilizzata, si possono avere ionizzazioni più o meno efficaci. Le tecniche di ionizzazione più comuni sono l'impatto elettronico (EI), la ionizzazione chimica (CI) e la ionizzazione elettrospray (ESI). L'impatto elettronico sfrutta l'interazione tra elettroni generati da un filamento di Tungsteno o Renio ed il campione che si trova in fase gassosa. L'urto tra elettrone e molecola fa sì che si abbia la ionizzazione, anche se ciò dipende da tutta una serie di fattori che qui non verranno descritti. La ionizzazione chimica, invece, è una tecnica di ionizzazione più efficiente. Si basa sull'interazione tra le molecole del campione ed un gas (metano, isobutano); anche in questo caso l'urto fra le molecole fa sì che si abbia ionizzazione, solo che con un'efficienza più alta rispetto all'impatto elettronico. Anche qui la ionizzazione dipende comunque da diversi fattori che non verranno approfonditi. L'elettrospray (ESI) viene utilizzato come metodo di ionizzazione nel caso di interfacciamento con HPLC o IC. Le molecole, una volta ionizzate, sono instabili e si frammentano in ioni più leggeri secondo schemi tipici in funzione della loro struttura chimica. Questi frammenti successivamente alla loro formazione, verranno rivelati tramite dei detector. I detector che vengono utilizzati nella spettrometria di massa sono numerosi, e si basano su principi chimici e fisici differenti. Solitamente i più utilizzati sono i quadrupoli, per questioni di natura economica, facilità di utilizzo e soprattutto per le ottime prestazioni che garantiscono. Essi sono costituiti da quattro barre metalliche (in realtà possono essere anche sei, otto, con conseguente cambiamento del nome in esapoli o ottapoli) all'interno delle quali gli ioni risentono di una serie di potenziali (potenziale di offset, potenziale continuo e potenziale alternato) che ne determinano un moto a spirale. Per poter rivelare gli ioni, è necessario stabilizzarli scegliendo opportunamente i valori dei potenziali sopracitati, così che possano essere rivelati in maniera sequenziale. Però in realtà questa dinamica di rivelazione costituisce un grande limite per questo tipo di analizzatore in quanto gran parte del segnale analitico viene perso. Se si vuole lavorare con un tipo di rivelazione integrale, si può ricorrere all'utilizzo di un'altra tipologia di detector, ossia alla trappola ionica, che si basa su principi teorici non molto diversi dal quadrupolo anche se dal punto di vista delle dinamiche fisiche che avvengono all'interno dello strumento la situazione è completamente diversa rispetto al quadrupolo. Infatti qui gli ioni vengono "intrappolati" e si ha una rivelazione integrale. Oltre alla trappola ionica vi sono anche altri analizzatori che garantiscono una rivelazione integrale, come ad esempio il TOF, che però trova un utilizzo meno diffuso, per diversi motivi, anche di natura economica, rispetto ai quadrupoli. Altro rilevatore che nell'ultimo decennio ha trovato grande applicazione, soprattutto in ambiti quali la metabolomica e la proteomica, è l'Orbitrap. Con questo tipo di rilevatore, così come per il TOF sopra citato, si è in grado di raggiungere delle risoluzioni (intese come precisione sul valore della massa di un determinato composto) altissime, che permettono di distinguere rapporti m/z che differiscono alla quarta cifra decimale. Le informazioni

derivanti dalla spettrometria di massa sono leggibili tramite lo spettro di massa, che è un diagramma che riporta l'abbondanza relativa di ogni ione in funzione del rapporto massa/carica, ed è tipico di ogni composto in quanto direttamente correlato alla sua struttura chimica ed alle condizioni di ionizzazione cui è stato sottoposto. Nel presente lavoro di tesi, il profilo amminoacidico è stato valutato utilizzando la cromatografia a scambio ionico accoppiata alla spettrometria di massa “tandem” (IC-MS/MS). Invece, per quanto concerne gli screening neonatali, essi sono stati eseguiti ricorrendo alla cromatografia liquida con ionizzazione elettrospray accoppiata alla spettrometria di massa “tandem” (LC-ESI-MS/MS). Queste determinazioni analitiche sono state effettuate all’Ospedale Santa Croce di Fano presso il presidio ospedaliero della neuropsichiatria infantile diretto dalla Dott.ssa Vera Stoppioni, unico centro regionale che si occupa di screening neonatale.

ANALISI STATISTICA

Tutti i dati ottenuti sono stati espressi come $media \pm SD$ e sono stati analizzati mediante t-test ed ANOVA a una via per misure ripetute. È stato utilizzato il t-test per dati appaiati per evidenziare eventuali differenze significative all’interno dei gruppi. Un valore di $P < 0,05$ è stato considerato significativo. Una semplice regressione lineare è stata utilizzata per studiare le correlazioni tra le variabili. Tutte le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando SPSS (v. 15.0, SPSS, Inc, Chicago, Illinois) e Microsoft Corp Redmond (v. 2010, Washington). Nei grafici e negli istogrammi presentati sono state graficate le barre dell’errore standard di ogni singola concentrazione media amminoacidica. Inoltre, è stata eseguita un’analisi statistica dell’urea plasmatica ed urinaria derivante dalle due popolazioni di campioni trattate con le due soluzioni amminoacidiche differenti. Prima di ogni analisi statistica abbiamo osservato se le due popolazioni prese in esame avevano una distribuzione normale dei dati tramite il test di Shapiro-Wilk, che è il test più potente per la verifica della normalità. Il p-value associato a tale test deve essere superiore a 0,05 per entrambe le popolazioni. Successivamente, accettata l’ipotesi di normalità, è stato eseguito il t-test e il risultato che emerge nell’output, è associato al test di Levene, deve avere un p-value maggiore di 0,05. I valori antropometrici relativi alla crescita dei neonati inclusi nello studio sono stati analizzati mediante l’analisi della correlazione lineari tra due variabili. Abbiamo quindi confrontato i valori medi di urea urinaria e plasmatica con il calo ponderale dalla nascita, la circonferenza cranica e la lunghezza, espresse in cm, dalla nascita fino alla 36a settimane di vita. I risultati ottenuti sono stati espressi attraverso l’indice di correlazione di Pearson, che esprime il grado di relazione tra due variabili.

6.RISULTATI

6.1 ANALISI DELL' AMMINOACIDOGRAMMA

Sulla base dei profili plasmatici amminoacidici ottenuti mediante cromatografia a scambio ionico accoppiata alla spettrometria di massa “tandem” (IC-MS/MS), sono stati riportati in Excel gli istogrammi che rappresentano la concentrazione media espressa in $\mu\text{mol/L}$ degli amminocidi più importanti richiesti nella preparazione delle due miscele amminoacidiche tra cui la taurina, la cisteina, la tirosina, la tirosina, la glutammina, la prolina, la glicina, e degli amminoacidi ramificati (Branched Chain Amino Acids, BCCA) quali la leucina isoleucina e valina. Negli istogrammi sotto riportati le medie e le deviazioni standard sono espresse come barre dell'errore per ciascun amminoacido, la concentrazione sull'asse delle ordinate è invece espressa in $\mu\text{mol/l}$, **Tabella 3**.

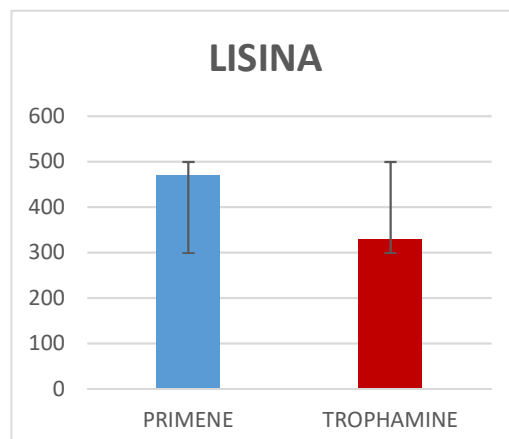
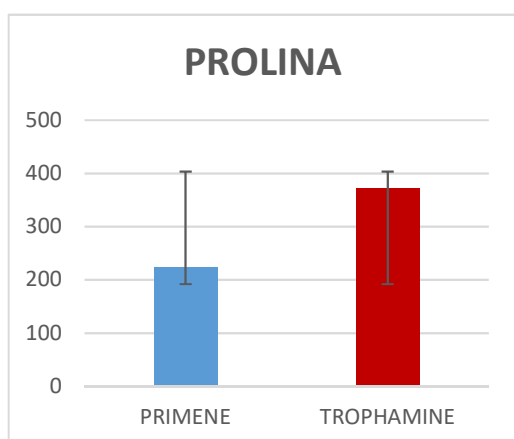
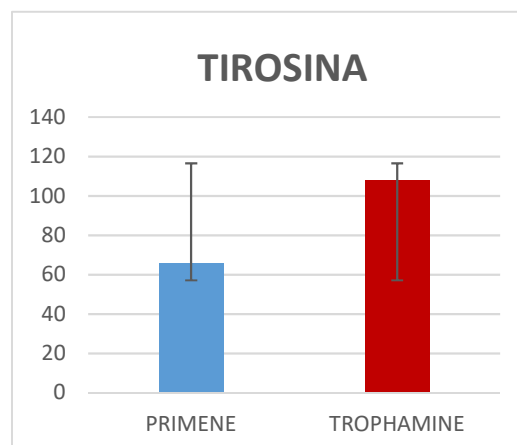
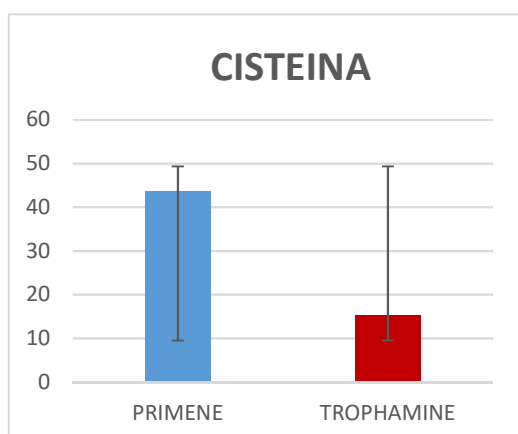


Tabella 3. Livelli plasmatici degli *amminoacidi statisticamente differenti* ($\mu\text{mol/l}$) a seconda della miscela amminoacidica infusa ($\text{media}\pm\text{SD}$).

AA plasmatici	int. Rif. 0-1mese $\mu\text{mol/l}$ (IC)
TAURINA	tr-120
ACIDO ASPARTICO	tr-160
IDROSSIPROLINA	tr-50
TREONINA	55-135
SERINA	115-355
ACIDO GLUTAMMICO	55-255
GLUTAMINA	480-900
PROLINA	120-620
GLICINA	105-445
ALANINA	195-675
GLICINA	105-445
ALANINA	195-675
VALINA	120-560
CISTINA	15-35
METIONINA	16-46
ISOLEUCINA	35-175
LEUCINA	90-290
TIROSINA	50-190
FENILALANINA	30-110
ORNITINA	50-190
LISINA	70-350

Tabella 3.1 Range di riferimento degli amminoacidi (AA) plasmatici da 0-1 mese in $\mu\text{mol/l}$ (IC).

Da una prima analisi emerge che l'unico aminoacido statisticamente significativo tra le due miscele utilizzate è la cisteina che è il precursore della taurina e del glutatione, la sua sintesi sembra essere ridotta, e questo potrebbe essere dovuto ad una bassa attività dell'enzima cistationasi nei neonati pretermine, che determina la scissione della cistationina in cisteina ed omoserina. La cisteina è un aminoacido fondamentale che positivizza il bilancio azotato se aggiunto in quantità di 25-50 mg/Kg/die alle soluzioni parenterali (*Burattini et al, 2016*); molte soluzioni che si trovano in commercio contengono una piccola quantità di cisteina oppure contengono un enantiomero della stessa, la L-cisteina, che come gruppo laterale reca un tiolo, o il derivato N-acetilico della cisteina NAC, usato in medicina per la sua elevata stabilità nelle soluzioni. Il Primene 10% contiene circa

Amminoacido ($\mu\text{mol/L}$)	[AA] Primene (n=15)	[AA] Trophamine (n=15)	p-value
ALANINA	431,6 \pm 35,16	385,21 \pm 50,72	0,46
ARGININA	167,13 \pm 20,92	175,08 \pm 28,73	0,83
CISTEINA	43,53 \pm 4,32	15,33 \pm 2,12	0,00
FENILALANINA	116,67 \pm 6,57	133,86 \pm 15,47	0,32
GLICINA	506,80 \pm 36,47	472,14 \pm 50,81	0,59
GLUTAMMINA	589,47 \pm 31,68	538,73 \pm 38,03	0,31
ISOLEUCINA	148,80 \pm 17,89	175,29 \pm 37,51	0,53
LEUCINA	242,27 \pm 23,92	260,31 \pm 38,41	0,69
LISINA	470,00 \pm 45,85	328,36 \pm 47,30	0,04
PROLINA	223,20 \pm 12,37	372,57 \pm 46,54	0,007
TAURINA	298,27 \pm 35,65	290,53 \pm 45,28	0,89
TIROSINA	65,80 \pm 11,04	107,85 \pm 18,04	0,05
VALINA	405,73 \pm 26,85	362,43 \pm 50,18	0,46

Tabella 4. Profili amminoacidici plasmatici ($\mu\text{mol/l}$) a seconda della miscela amminoacidica infusa (media \pm SD).

10 volte la L-cisteina rispetto al Trophamine 6%, ma la media della concentrazione plasmatica che si osserva al settimo giorno dalla nascita è di circa tre volte superiore a quella del Primene 10%. Questo dato preliminare è in linea con quanto detto in precedenza secondo cui l'enzima che lo metabolizza è poco attivo nei neonati ELBW, per cui possiamo ipotizzare che la dose di cisteina aggiunta al Primene di 1,89 g/L per 100 g/L di soluzione è elevata e non viene totalmente metabolizzata dal fegato dei neonati prematuri. Inoltre abbiamo riscontrato un'elevata concentrazione di arginina, glicina e isoleucina che risultano fuori range per entrambi i gruppi trattati: l'arginina ha una concentrazione media di 170 $\mu\text{mol/L}$, elevata rispetto al "cut off" di normalità che è di 129 $\mu\text{mol/L}$ e la glicina ha una concentrazione media di 489 $\mu\text{mol/L}$, un valore "border line", se consideriamo che l'intervallo di riferimento arriva a 445 $\mu\text{mol/L}$; l'isoleucina ha invece una media per entrambi i gruppi maggiore di 200 $\mu\text{mol/L}$, e anche questo dato risulta elevato rispetto al range di riferimento che arriva ad un massimo di 175 $\mu\text{mol/L}$. Inoltre le concentrazioni della prolina, della tirosina e della fenilalanina risultano più elevate nel gruppo di neonati che ha assunto Trophamine 6% rispetto ai pazienti trattati con il Primene 10%, e questi dati correlano in modo lineare con la quantità presente nelle miscele di

elezione; infatti il Trophamine 6% contiene circa 1,13 g/L in più di tirosina rispetto al Primene 10% e di conseguenza anche la fenilalanina che deriva da quest'ultima ha una concentrazione plasmatica maggiore rispetto all'altra miscela. Ricordiamo che la tirosina è aggiunta alla miscela in forma acetilata così come la cisteina. Allo stesso modo si comporta la prolina, che è presente nel Trophamine con 2,3 g/L di più rispetto che nel Primene. Invece, la cisteina e la lisina risultano maggiormente rappresentate nel Primene. Anche questi dati correlano in modo lineare con la quantità amminoacidica maggiore presente nelle soluzioni: infatti la lisina risulta aggiunta in quantità doppia rispetto all'altra miscela e la cisteina nel Trophamine è maggiore rispetto alla concentrazione della stessa nel Primene. La lisina è uno degli amminoacidi più abbondanti nei tessuti fetali e quello più abbondante nel latte materno, quindi è considerato un amminoacido limitante nella miscela Trophamine (*Sáenz de Pipaón et al., 2004*), **Tabella 4**. Possiamo quindi dire che una larga porzione di amminoacidi nei neonati che assumono PN subiscono nella prima settimana di vita un turn over proteico elevato se vengono somministrate le due soluzioni Primene e Trophamine. Abbiamo inoltre calcolato la somma espressa in mg/dl di tutti gli amminoacidi di ogni singolo paziente inclusi nello studio e dall'ANOVA tra la somma degli amminoacidi totali e l'apporto proteico è emerso che non ci sono differenze significative tra i due gruppi analizzati, (p-value=0,5-0,3). Possiamo dire che il pattern amminoacidico delle soluzioni parenterali è quindi variabile, e non esiste ancora in commercio una miscela amminoacidica disegnata specificatamente per i neonati prematuri. L'amminoacidogramma dei neonati trattati con Tophamine risulta avere valori più elevati di quello del Primene, ma dall'analisi statistica i due gruppi non sembrano essere differenti, **Tabella 5**. Per quanto riguarda l'urea plasmatica al giorno 7 dalla nascita, abbiamo osservato che non ci sono differenze statisticamente significative (p-value= 0,22) tra il gruppo a cui è stato somministrato il Primene rispetto al Trophamine.

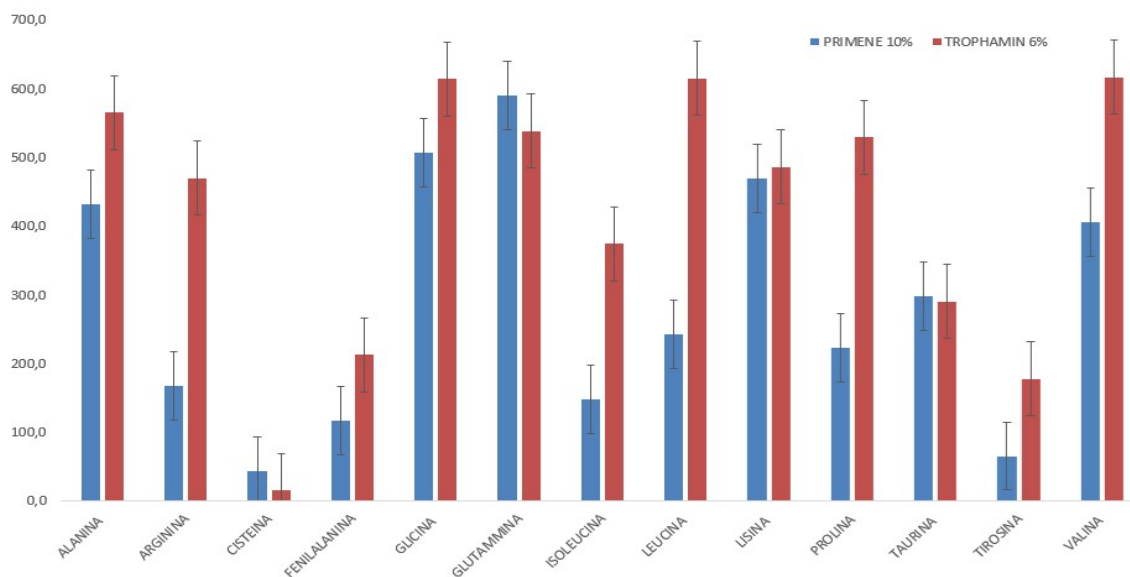


Tabella 5. Confronto dei livelli plasmatici (medie±SD) dei singoli amminoacidi dei neonati in PN randomizzati a ricevere Primene 10% (in blu) e Trophamine 6% (in rosso) a parità di apporto proteico.

6.2 UREA URINARIA E PLASMATICA NELLE DUE SOLUZIONI AMMINOACIDICHE

Non è stata osservata nessuna differenza significativa (p -value= 0,44) nell'urea urinaria analizzata al giorno 7 ± 1 tra i due gruppi di pazienti (totale, $n^\circ = 82$) randomizzati per le due miscele amminoacidiche di cui $n^\circ = 41$, Primene e $n^\circ = 41$, Trophamine. L'urea urinaria è stata espressa in mg/dl ed è risultata leggermente più elevata l'urea urinaria dei pazienti trattati con Trophamine rispetto all'urea ottenuta dalla somministrazione del Primene, **Tabella 6**. Dall'analisi statistica delle uree urinarie attraverso ANOVA rispetto all'apporto proteico non abbiamo riscontrato nessuna differenza tra le due miscele Primene e Trophamine (p -value=0,53;0,15). Per quanto riguarda invece l'energia utilizzata, sembra che questo parametro influenza l'outcome metabolico del neonato; abbiamo infatti osservato una lieve differenza (p -value= 0,05) nel gruppo di neonati trattati con Trophamine rispetto all'energia somministrata a quelli che hanno ricevuto Primene (p -value= 0,15). I dati sono stati espressi in Media±SD.

	<i>Primene (n=41)</i>	<i>Trophamine (n=41)</i>	<i>p-value</i>
Urea urinaria (mg/dl)	111±3,4	116±4,3	0,44

Tabella 6. Concentrazioni di urea urinarie in mg/dl (medie±SD) dei neonati trattati con Primene e Trophamine.

Uguualmente al giorno 7±1 sono state analizzate le uree plasmatiche degli 82 pazienti inclusi nello studio. Non è stata osservata nessuna differenza statisticamente significativa (p-value= 0,15) nell'urea plasmatica tra i due gruppi. Anche in questo caso l'urea plasmatica del Trophamine risulta più elevata di quella del Primene. Dall'analisi statistica delle uree plasmatiche mediante ANOVA rispetto alla variabile dell'apporto proteico non abbiamo riscontrato nessuna differenza tra le due miscele Primene e Trophamine (p-value=0,18;0,34), **Tabella 7.** Per quanto riguarda invece l'energia utilizzata, anche in questo caso abbiamo osservato una differenza, sia nel gruppo del Primene (p-value=0,015), sia nel gruppo del Trophamine (p-value= 0,046). I dati sono anche in questa analisi sono stati espressi in Media±SD.

	<i>Primene (n=41)</i>	<i>Trophamine (n=41)</i>	<i>p-value</i>
Urea plasmatica (mg/dl)	35,9±4,7	45,6±4,6	0,15

Tabella 7. Concentrazioni di urea plasmatica in mg/dl (medie±SD) dei neonati trattati con Primene e Trophamine.

Successivamente, abbiamo considerato il primo mese di vita del neonato pretermine. In questo caso abbiamo però analizzato un sottogruppo di neonati n°= 62, dei quali abbiamo recuperato i campioni. Di solito nei primi 21 giorni il neonato è in PN; abbiamo quindi recuperato i capillari settimanali e le urine settimanalmente fino ad arrivare a 28 giorni totali, **Tabella 8.** Dall'analisi statistica delle uree urinarie e plasmatiche nei primi 28 giorni di vita non abbiamo riscontrato nessuna differenza tra i due gruppi di pazienti presi in esame Primene verso Trophmine (p-value= 0,12;0,59). Allo stesso modo

tra l'urea urinaria e plasmatica dei due gruppi è risultata in entrambi i casi più elevata nel Trophamine rispetto al Primene, dato che è in linea, come avevamo osservato, nei primi 7 giorni.

	PRIMENE (n=31)	TROPHAMINE (n=31)	p-value
Urea Urinaria (mg/dl)	114±9,6	118±14,1	0,12
Urea Plasmatica (mg/dl)	33±20,6	41,9±19,3	0,59

Tabella 8. Concentrazioni di urea plasmatica ed urinaria in mg/dl (medie±SD) a 28 gg dalla nascita dei neonati trattati con Primene e Trophamine.

Infine, abbiamo misurato le uree plasmatiche del cordone ombelicale dei pazienti al giorno 0, ed abbiamo confrontato le uree ottenute al giorno 0 rispetto al giorno 7 dalla nascita, **Tabella 9**. Dei 79 pazienti confrontati mediante t test, non abbiamo riscontrato nessuna differenza (p-value= 0,12); l'urea relativa ai 7 giorni è risultata più alta rispetto alla nascita; la variabilità data dalla deviazione standard è risultata maggiore dopo 7 giorni dalla nascita, questo perché il neonato fino a 7 giorni viene alimentato attraverso la PN, che viene calcolata in base alle caratteristiche del paziente stesso, rispettando i suoi bisogni primari, rispetto all'urea al giorno 0 che è meno sensibile alle variazioni della dieta materna dalla quale il neonato era stato alimentato fino a quel momento.

	Sangue cordone (n=79)	7 gg (n=79)	p-value
Urea plasmatica (mg/dl)	42,3±18,6	48,6±30,6	0,12

Tabella 9. Evoluzione dell'urea plasmatica in mg/dl (medie±SD) nella prima settimana di vita.

6.3 TOLLERANZA METABOLICA ALLE DUE MISCELE AMMINOACIDICHE

Per quanto riguarda la tolleranza metabolica alle due miscele, abbiamo valutato l'incidenza di acidosi metabolica neonatale degli 82 pazienti inclusi nello studio. Dal totale, ne sono risultati 65 con il problema di Acidosi Metabolica e 53 di essi sono stati trattati con bicarbonati. Sono stati esclusi 3/53 pazienti, in quanto non sono stati rintracciati i dati delle cartelle relativi alla terapia. Abbiamo analizzato quindi 50 neonati di cui n°= 25 per il Primene e n°= 25 per il Trophamine, **Tabella 10**.

Abbiamo calcolato la durata dell'acidosi metabolica per le due miscele amminoacidiche, ed abbiamo osservato che non ci sono differenze statisticamente significative tra i due gruppi (p-value= 0,35); le Medie±SD del Primene rispetto al Trophamine sono di 8,04 e 6,08 giorni. La durata dell'acidosi metabolica è maggiore per il Primene. Inoltre abbiamo recuperato i dati relativi alla dose iniziale e alla dose massima della terapia con bicarbonato per il Primene e per il Trophamine; anche in questo caso non abbiamo trovato differenze tra i due gruppi (p-value= 0,53;0,13). Tutti i calcoli sono stati eseguiti in relazione al peso giornaliero del neonato. Per quanto riguarda il bisogno di incremento dalla dose iniziale, abbiamo osservato che dei pazienti trattati con Trophamine il 44% (11/25) hanno avuto bisogno di una dose maggiore, mentre per il Primene solo il 20% dei pazienti (5/25) l'hanno ricevuta.

	PRIMENE	TROPHAMINE	p-value
Trattamento con bicarbonato (n, %)	25 (38,4%)	25 (38,4%)	---
Durata Terapia Bicarbonato (gg)	8.4 ±2.3	6.1 ±0.7	0.35
Dose Iniziale (mEq/Kg/die)	2.9 ±0.2	2.4 ±0.2	0.53
Dose Massima (mEq/Kg/die)	3.1±1.2	2.8±1.5	0.13
Bisogno di Incremento (n, %)	5 (20%)	11 (44%)	0.13

Tabella 10. Acidosi metabolica dei neonati trattati con Primene o Trophamine. I dati sono stati espressi come (medie±SD) o in % secondo il tipo di variabile.

6.4 ANALISI DEI TRIGLICERIDI RISPETTO ALLE DUE MISCELE AMMINOACIDICHE

Abbiamo misurato i trigliceridi (TG) espressi in mg/dl dei pazienti randomizzati (n°=82). Considerando come variabile il peso alla nascita espresso in grammi dei pazienti abbiamo diviso i neonati in due gruppi: W(g)<1000 (n°=41) e 1000<W(g)<1500 (n°=41). Dall'analisi statistica dei trigliceridi dei due gruppi di neonati è emersa una differenza statisticamente significativa (p-value= 0,00); i neonati con un peso compreso tra 1000 g e 1500 g hanno i trigliceridi più bassi rispetto a quelli di peso <1000 g. I dati sono stati espressi in medie±DS, **Tabella 11.**

	Weight<1000 g (n=41)	1000<Weight<1500 g (n=41)	p-value
Trigliceridi (mg/dl)	145,6±6,9	84,8±3,8	0,00

Tabella 11. Valori plasmatici (medie±SD) dei TG (mg/dl) tra i neonati di peso $W < 1000$ g, e peso $1000 < W < 1500$ g.

Inoltre sono stati dosati i TG a 7 e 42 giorni di un sottogruppo di neonati $n^{\circ}=31$ randomizzati per le miscele amminoacidiche, $n^{\circ}=16$ per il Primene e $n^{\circ}=15$ per il Trophamine. Entrambi i t-test per i 7 e 42 giorni non sono risultati statisticamente significativi (p-value= 0,25-0,31), **Tabella 12.** A 7 giorni i TG dei pazienti con Trophamine erano più elevati, mentre a 42 giorni le medie tra i due gruppi si eguagliavano. Infine abbiamo analizzato i TG rispetto all'energia elevata o standard, ed anche in questo caso non abbiamo riscontrato nessuna differenza significativa (p-value=0,13).

	PRIMENE (n=16)	TROPHAMINE (n=15)	p-value
TG 7gg (mg/dl)	92,7±8,3	115,7±17,6	0,25
TG 42gg (mg/dl)	140,5±15,9	116,8±16,0	0,31

Tabella 12. TG (mg/dl) a 7 e 42 giorni (medie±SD), tra i neonati che hanno assunto Primene o Trophamine

6.5 CRESCITA E MISURE ANTROPOMETRICHE DEI NEONATI INCLUSI NELLO STUDIO

Un neonato prematuro, è un bambino nato prima del termine della gravidanza, ovvero prima del completamento della 37a settimana di gestazione. La nascita prematura determina la brusca

interruzione della maturazione degli organi, degli apparati e delle competenze che il bambino deve possedere per poter crescere. Il bambino prematuro nasce quindi con organi non ancora completamente formati e, di conseguenza, non in grado di funzionare correttamente e/o in maniera autonoma. Per tale motivo la durata della gravidanza, espressa in termini di età gestazionale (EG), e il peso espresso in g/Kg/die alla nascita sono importanti nel determinare le condizioni di benessere e crescita del bambino: nascere alle più basse età gestazionali e con basso peso si associa infatti più facilmente a una maggiore difficoltà di adattamento al mondo esterno. Un bambino nato prematuro ha ritmi di crescita diversi da quelli di un neonato che è arrivato alla fine della gestazione. Per valutare la sua crescita occorre quindi innanzitutto identificare la sua età “corretta”. In base a questo dato, i medici possono inserire il neonato prematuro in determinate curve o tabelle di crescita calcolate in base al peso alla nascita e al sesso del bambino. Oltre all’età gestazionale (EG) e al peso, le variabili prese in considerazione nella crescita sono la velocità di crescita di peso, il calo massimo ponderale, i giorni di vita al calo massimo ponderale, i giorni dalla nascita al recupero del peso neonatale (NADIR), la lunghezza e la circonferenza cranica, quest’ultime espresse in cm per settimana dalla nascita; per i neonati pretermine si valutano questi parametri fino alla 36a settimana di età gestazionale, ovvero prima del completamento della 37a settimana, come se fosse nato a termine. Alcuni di questi parametri auxologici riflettono anche l’importanza del patrimonio genetico, altri quella del sesso, altri ancora quelli della “costituzione”, e tutti sono più o meno condizionati in maniera determinante dalla durata e/o dall’andamento della gravidanza. Inoltre, dobbiamo considerare anche il calo ponderale del neonato, un fenomeno fisiologico dotato di grande variabilità individuale, tipico anche dei neonati a termine. I pretermine, durante i primi giorni di vita, tendono a perdere il 5-10% del peso alla nascita e molto spesso i valori ponderali più bassi si registrano in coincidenza ad un modesto rialzo termico, imputabile nella maggior parte dei casi alla disidratazione. La disidratazione è ricondotta alla perdita di liquidi attraverso la cute e l’apparato respiratorio ed è tipica dell’età neonatale precoce; altri fattori implicati nel calo ponderale sono l’emissione di urine, il dosaggio dell’urea. Il recupero ponderale, nei giorni successivi, dipende dalla nutrizione; il peso tenderà ad aumentare in base alla capacità di alimentarsi e alla relativa crescita. Per tutti questi motivi abbiamo valutato la crescita dei pazienti inclusi nello studio randomizzato. Sono stati estratti dal Software ingegneristico di reparto “Notools” i dati relativi ai parametri antropometrici dei neonati. Di fondamentale importanza è anche lo Z-score, una misura statistica che valuta di quante Deviazioni Standard si discosta il valore trovato dalla Deviazione Standard media. I dati che abbiamo ottenuto sono stati successivamente rielaborati utilizzando il linguaggio di calcolo MATLAB. Abbiamo osservato se era presente una relazione tra le variabili (urea-circonferenza cranica, urea-lunghezza, urea-peso), ovvero se i valori di urea correlavano con una certa regolarità con i valori della seconda

variabile presa in considerazione (peso o lunghezza o circonferenza cranica). Dai dati analizzati, n°= 55, è emerso che non c'è una correlazione statistica tra le grandezze considerate. Il grado di correlazione fra due variabili è stato espresso mediante il coefficiente di correlazione di Pearson (*r*-ab) **Tabella 13**; ovviamente un indice di correlazione pari a zero indica un'assenza di correlazione.

n=55 (Urea Urinaria mg/dl)	<i>r</i>	p-value
<i>Calo ponderale (Kg/g/die)</i>	0.0344	0.8033
<i>Incremento in circonferenza cranica (cm/wk)</i>	-0.0281	0.8386
<i>Incremento in lunghezza (cm/wk)</i>	-0.0545	0.6927

n=55 (Urea Plasmatica mg/dl)	<i>r</i>	p-value
<i>Calo ponderale (Kg/g/die)</i>	0.1885	0.1681
<i>Incremento in circonferenza cranica (cm/wk)</i>	-0.0771	0.5757
<i>Incremento in lunghezza (cm/wk)</i>	0.5295	0.0866

Tabella 13. *Correlazione (Pearson) tra i livelli (medie±SD) delle uree urinarie e plasmatiche (mg/dl) con i parametri della crescita dalla nascita fino a 36 settimane di età corretta (incremento in circonferenza cranica, incremento in lunghezza e calo ponderale).*

7. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La funzione biologica dell'urea, dalla sua scoperta da H. Rouelle nel 1773 nell'urina umana, come sostanza attraverso la quale vengono eliminati i prodotti azotati del metabolismo proteico era già nota fin dai tempi evoluzionistici, quando vennero identificati i mammiferi, tra cui anche l'uomo, come organismi ureotelici, ovvero produttori di urea, ad eccezione degli uccelli e di alcuni tetrapodi. Oltre alla sua filogenesi, l'urea è stata studiata da un punto di vista fisico-chimico e metabolico nel tempo, e sono noti in letteratura la sua fisiologia, i suoi utilizzi commerciali e le sue funzioni. Fino a poco tempo fa in medicina non si conosceva molto di questa molecola. Negli ultimi anni è stata studiata anche in ambito pediatrico, o meglio neonatale, e molti studi presenti in letteratura hanno dimostrato la funzione dell'urea come marker del catabolismo proteico (*Ali Akin et al., 2011*). Attraverso questo lavoro abbiamo potuto studiare l'importanza dell'urea come indicatore del catabolismo proteico durante la crescita neonatale, soprattutto dei neonati gravemente pretermine ELBW. Essa infatti sembra essere influenzata da fattori antropometrici e potrebbe fungere, per le sue correlazioni, da predittore del metabolismo proteico. Altri studi ancora devono confermare questa ipotesi, che sembra essere presa in considerazione nella letteratura della nutrizione neonatale. La crescita del neonato rappresenta un importante outcome nella cura del neonato pretermine, tuttavia non si conosce ancora ad oggi quale sia lo schema nutrizionale più adeguato per sostenere la crescita di questi pazienti che sono ancora immaturi dal punto di vista intestinale e non solo, soprattutto per quelli gravemente pretermine ELBW. La composizione ottimale della PN da somministrare ai neonati pretermine è ancora oggi oggetto di dibattito. Per questo motivo, abbiamo deciso di confrontare l'outcome nutrizionale dato da due differenti miscele amminoacidiche, Primene 10% e Trophamine 6% (Baxter S.p.A.). I dati fino ad ora raccolti sull'urea plasmatica ed urinaria entro i primi 28 giorni di vita in questo studio pilota, non sembrano mostrare differenze statisticamente significative tra i due gruppi di pazienti che hanno assunto una delle due miscele amminoacidiche. Considerando la media e la deviazione standard dei due gruppi di neonati risulta inoltre che l'urea urinaria non differisce, mentre per quanto riguarda quella plasmatica, possiamo osservare che il gruppo di pazienti che assume la miscela Trophamine presenta dei valori medi poco più alti rispetto al Primene; ma questo dato è ancora preliminare e per vedere una differenza statistica più significativa dovremmo studiare una popolazione più ampia di pazienti. Oltre a valutare l'utilizzo di una miscela piuttosto che dell'altra, abbiamo preso in considerazione anche la differente quantità di intake proteico somministrato secondo le linee guida pediatriche, con alte proteine equivalente a 3,5 gr/Kg/die, o basse proteine equivalente a 2,5 gr/Kg/die. Anche in questo caso non abbiamo trovato differenze statistiche significative. L'unico parametro che sembra risultare statisticamente significativo nella nutrizione PN neonatale è la differente energia, alta o standard, impiegata nella somministrazione delle miscele

amminoacidiche. L'energia infatti sembra influenzare in modo abbastanza significativo (**Tabella 6 e Tabella 7**), i valori di urea urinaria del gruppo che assume Trophamine rispetto al gruppo a cui è stato somministrato il Primene. La stessa cosa accade nel caso dell'urea plasmatica, ma questa volta troviamo una correlazione positiva sia tra i due gruppi, che all'interno del gruppo di neonati che assumono il Primene contro il Trophamine. Se viene aumentata l'energia, si avrà una ossidazione proteica più bassa e quindi di conseguenza l'urea risulterà più bassa; viceversa se diamo meno energia, si avrà un'ossidazione maggiore con una urea più elevata. Questi dati sono in linea con quanto riportato in letteratura (*De Curtis et al., 1987*). Inoltre, abbiamo valutato anche altri parametri metabolici di interesse in nutrizione neonatale, tra cui, l'incidenza di acidosi metabolica neonatale, il profilo aminoacidico plasmatico in corso di PN utilizzando due differenti miscele amminoacidiche, il bilancio azotato in corso di PN, la velocità di crescita dalla nascita ai 28 gg di vita e a 36 settimane di età postmestruale, e i parametri relativi alla crescita dei neonati. Per quanto riguarda l'amminoacidogramma, abbiamo osservato che il pattern amminoacidico delle soluzioni parenterali è variabile. Gli unici amminoacidi che sono statisticamente significativi tra i due gruppi sono la cisteina, la lisina, la prolina e la tirosina, **Tabella 4**; questi dati correlano in modo lineare con la quantità amminoacidica maggiore presente nelle soluzioni. Una larga porzione di amminoacidi nei neonati che assumono PN subiscono nella prima settimana di vita un turn over proteico elevato se vengono somministrate le due soluzioni Primene o Trophamine (*Sáenz de Pipaón et al, 2004*). Il neonato pretermine per avere una crescita adeguata deve avere un bilancio azotato positivo, deve incorporare la PN, e quindi metabolizzare nel miglior modo possibile l'intake proteico senza ne eccedere nell'apporto e andare incontro all'overfeeding, e quindi all'acidosi metabolica, né metabolizzando poche proteine e quindi andando verso l'underfeeding, una condizione secondo la quale la crescita sarebbe rallentata o addirittura bloccata. L'obiettivo principale della ricerca in nutrizione neonatale rimane quello di cercare il giusto equilibrio tra la qualità degli amminoacidi e la quantità degli stessi da incorporare nelle soluzioni amminoacidiche. Essendo le due miscele piuttosto simili negli outcome nutrizionali, possiamo affermare che ancora oggi bisogna capire e studiare quali sono i trigger che stimolano l'anabolismo proteico; non esiste ancora in commercio una miscela amminoacidica disegnata specificatamente per i neonati prematuri. Gli aminoacidi sono i mattoni sui quali si costruisce un'ottimale crescita del neonato pretermine, poiché promuovono l'anabolismo e/o il catabolismo proteico e il normale sviluppo cellulare, e sono collegati molto spesso a patologie che portano a ritardi nello sviluppo neurologico. I neonati pretermine, presentano infatti numerosi problemi metabolici legati alla loro immaturità gastrointestinale tra cui un deficit di crescita postnatale nelle prime settimane di vita che deve essere colmato ed hanno per questo una ridotta tolleranza alimentare, che può portare a gravi patologie associate a volte a complicanze irreversibili

soprattutto in quei neonati pretermine di basso peso estremamente basso (ELBW). Proprio per questo spesso la nutrizione è spesso fornita per via endovenosa attraverso la PN in modo tale da poter monitorare gli apporti proteici, glucidici e lipidici che sono necessari per la crescita, senza però sovraccaricare l'intestino. Anche se i progressi in neonatologia hanno migliorato le possibilità di monitoraggio dei principali componenti nutrizionali, garantendo il più possibile una stabilità metabolica, producendo meno acidosi, e abbassando il valore dell'urea plasmatica, resta ancora da chiarire la sicurezza e la tollerabilità delle miscele (*Kashyap et al. 1994; Saini et al., 1989*). Migliorando la qualità degli aminoacidi che vengono aggiunti alle soluzioni infuse in PN si può cercare di bypassare, almeno parzialmente, il gap della scarsa crescita di una piccola parte dei neonati pretermine ELBW. (*Thureen et al., 2003; Van Goudoever et al., 1995*). Studi futuri su una popolazione più ampia di pazienti potrebbero dimostrare una correlazione non solo con l'apporto proteico, ma anche con la perdita di peso e con il peso neonatale per poter affermare che questi indicatori possono essere considerati dei predittori del catabolismo proteico. Avere informazioni aggiuntive sulla crescita del neonato pretermine (parametri antropometrici, velocità di crescita, peso, lunghezza, circonferenza cranica ecc) ci possono aiutare a monitorare la crescita ed ottimizzare l'apporto proteico giornaliero, soprattutto nel caso di neonati ELBW. Per cercare di garantire una crescita migliore a questi piccoli pazienti, nel nostro reparto di Terapia Intensiva Neonatale, dell'Ospedale Salesi di Ancona, abbiamo appena iniziato a studiare la crescita attraverso la stimolazione mediante attività fisica, la densitometria ossea, grazie ad uno strumento di ultima generazione (DBM sonic BP, Bone Profile) che ci fornirà i valori della velocità di trasmissione del segnale e della velocità del suono nell'osso metacarpale. Ricerche future potranno fornirci anche questi tipi di outcome metabolici in modo tale da avere maggior informazioni sulla crescita dei neonati pretermine. Per il momento, possiamo dire che i neonati pretermine del nostro reparto non sembrano essere troppo sensibili al cambiamento dei parametri metabolici all'interno di un range di valori considerati buoni.

BIBLIOGRAFIA

1. Mirabile L., Baroncini S. (2014). *Rianimazione in età pediatrica*, Springer. Capitolo 4
2. Jacobi S.K., Odle J. (2012). Nutritional Factors Influencing Intestinal Health of the Neonate, *American Society for Nutrition*, 3, 687–696.
3. De Curtis M., O.G. Broke. (1987). Energy and nitrogen balances in very low birthweight infants, *Archives of Disease in Childhood*, 62, 830-832.
4. Jordan P.N., Hall D.K. (2008). Dynamic coordination of macronutrient balance during infant growth: insights from a mathematical model 1 ,2 ,3, *The America Journal of Clinical Nutrition*, 87(3), 692-703.
5. Van den Akker C.H.P., Van Goudoever J.B. (2016). Defining Protein Requirements of Preterm Infants by Using Metabolic Studies in Fetuses and Preterm Infants, *Protein in the Feeding of Preterm Infants*, 86, 139-149.
6. Chien P.F., Smith K., Watt P.W., Scrimgeour C.M., Taylor D.J., Rennie M.J. (1993). Protein turnover in the human fetus studied at term using stable isotope tracer amino acids, *American Journal of Physiology*, 265, 31–35.
7. Haschke F., Grathwohl D., Haiden N. (2016). Metabolic Programming: Effects of Early Nutrition on Growth, Metabolism and Body Composition, *Protein in the Feeding of Term Infants*, 86, 87–95.
8. Burattini I., Bellagamba M.P., D'Ascenzo R., Biagetti C., Carnielli V.P. (2016). Amino Acid Intake in Preterm Infants, *Protein in the Feeding of Preterm Infants*, 86, 151–160.
9. Van Goudoever J.B. (1993). Nitrogen Metabolism In Preterm Infants. *Erasmus University Rotterdam*.
10. Blanco C.L., Gong A.K., Green B.K., Falck A., Schoolfield J., Liechty E.A. (2011). Early changes in plasma amino acid concentrations during aggressive nutritional therapy in extremely low birth weight infants. *Journal of Pediatrics*, 158, 543–548.
11. Wu G. (2010). Functional Amino Acids in Growth, Reproduction, and Health, *Advances in Nutrition*, 1, 31–37.
12. Valentine C.J., Fernandez S., Rogers L.K., Gulati P., Hayes J., Lore P., Puthoff T., Dumm M., Jones A., Collins K., Curtiss J., Hutson K., Clark K., Welty S.E. (2009). Early amino-acid administration improves preterm infant weight, *Journal of Perinatology*, 29, 428–432.
13. Saini J., Macmahon P., Morgan J.B., Kovar I.Z. (1989). Early parenteral feeding of amino acids, *Archives of Disease in Childhood*, 64, 1362-1366.

14. Tubman R.T.R.J., Thompson S., McGuire W. (2008). Glutamine supplementation to prevent morbidity and mortality in preterm infants, *The Cochrane Library*, 4.
15. Klimberg V.S., Salloum R.M., Kasper M., Plumley D.A., Dolson D.J., Hautamaki R.D., Mendenhall W.R., Bova F.C., Bland K.I., Copeland E.M., Souba W.W. (1990). Oral glutamine accelerates healing of the small intestine and improves outcome after whole abdominal radiation, *Archives of Surgery*, 125, 1040–1045.
16. Rombeau J.L. (1990). A review of the effects of glutamine-enriched diets on experimentally induced enterocolitis, *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 14, 100–105.
17. O'Dwyer S.T., Smith R.J., Hwang T.L., Wilmore D.W. (1989). Maintenance of small bowel mucosa with glutamine enriched parenteral nutrition, *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 13, 579–585.
18. Hinshaw D.B., Burger J.M. (1990). Protective effect of glutamine on endothelial cell ATP in oxidant injury, *Journal of Surgical Research*, 49, 222–227.
19. Alverdy J.A., Aoyo E., Weiss-Carrington P., Burke D.A. (1992). The effect of glutamine-enriched TPN on gut immune cellularity, *Journal of Surgical Research*, 52, 34–38.
20. Grover Z., Tubman R., McGuire W. (2007). Glutamine supplementation for young infants with severe gastrointestinal disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1.
21. Denne S.C. (2007). Regulation of proteolysis and optimal protein accretion in extremely premature newborns, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(suppl), 621S–624S.
22. Zello G.A., Menendez C.E., Rafii M., Clarke R., Wykes L.J., Ball R.O., Pencharz P.B. (2003). Minimum protein intake for the preterm neonate determined by protein and amino acid kinetics, *Pediatric Research*, 53, 338–344.
23. Cooke R., Embleton N., Rigo J., Carrie A., Haschke F., Ziegler E. (2006). High protein pre-term infant formula: effect on nutrient balance, metabolic status and growth, *Pediatric Research*, 59, 265–270.
24. Krivitzky L., Babikian T., Lee H., Thomas N.H., Burk-Paull K.L., Batshaw M.L. (2009). Intellectual, Adaptive, and Behavioral Functioning in Children with Urea Cycle Disorders, *Pediatric Research*, 66, 96-101.
25. Hoffmann George F., Johannes Zschocke, *Vademecum Metabolicum, Diagnosi e terapia delle malattie metaboliche ereditarie* (2012). *Milupa metabolics, Nutricia*, Edizione 2012.
26. Manzo V., D'Angelo G., Cusumano E., Manfrida M., Quartarone G., Barberi I., Gitto E. (2011). Treatment with sodium bicarbonate in premature infants with metabolic acidosis: benefits and adverse effects, *Italian Journal of Genetic and Pediatric Immunology*.

27. Ali Akın M., Akın L., Sarıcı D., Yılmaz I., Balkanlı S., Kurtoğlu S. (2011). Follow-Up During Early Infancy of Newborns Diagnosed with Subcutaneous Fat Necrosis, *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*, 3(4), 216-218.
28. Ridout E., Melara D., Rottinghaus S., Thureen P.J. (2004). Blood Urea Nitrogen Concentration as a Marker of Amino-Acid Intolerance in Neonates with Birthweight Less than 1250 g, *Journal of Perinatology*, 25, 130–133.
29. Watson P.E., Watson I.D., Batt R. (1980). Total body water volumes for adult males and females estimated from simple anthropometric measurements, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 33, 27-39.
30. Aiken C.G.A. (2013). Determinants of Urea Production and Mineral Retention in Parenterally Fed Preterm Infants, *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7(8), 1655-1658.
31. Wheeler R.A., Griffiths D.M., Jackson A.A. (1993). Urea kinetics in neonates receiving total parenteral nutrition, *Archives of Disease in Childhood*, 69, 24-27.
32. Rose J, Gibbons K, Carlson SE, Koo W.W.K. (1993). Nutrient needs of the preterm infant, *Nutrition in Clinical Practice*, 8, 226-232.
33. te Braake F.W., van den Akker C.H., Wattimena D.J., Huijmans J.G., van Goudoever J.B. (2005). Amino acid administration to premature infants directly after birth. *Journal of Pediatrics*, 147,457-461.
34. Burattini I., Bellagamba M.P., Spagnoli C., D'Ascenzo R., Mazzoni N., Peretti A., Cogo P.E., Carnielli V.P. (2013). Targeting 2.5 versus 4 g/kg/day of amino acids for extremely low birth weight infants: a randomized clinical trial. *Journal of Pediatrics*, 163,1278-1282 e1.
35. Thureen P.J., Melara D., Fennessey P.V., Hay W.W. Jr. (2003). Effect of low versus high intravenous amino acid intake on very low birth weight infants in the early neonatal period, *Pediatric Research*, 53, 24-32.
36. Ibrahim H.M., Jeroudi M.A., Baier R.J., Dhanireddy R., Krouskop R.W. (2004). Aggressive early total parental nutrition in low-birth-weight infants, *Journal of Perinatology*, 24, 482-486.
37. Vlaardingerbroek H., Vermeulen M.J., Rook D., van den Akker C.H., Dorst K., Wattimena J.L., Vermes A., Schierbeek H., van Goudoever J.B. (2013). Safety and efficacy of early parenteral lipid and high-dose amino acid administration to very low birth weight infants. *Journal of Pediatrics*, 163, 638-644 e1-5.
38. Kashyap S., Schulze K.F., Ramakrishnan R., Dell R.B., Heird W.C. (1994). Evaluation of a mathematical model for predicting the relationship between protein and energy intakes of low

- birth-weight infants and the rate and composition of weight gain, *Pediatric Research*, 35,704-712.
39. Van Goudoever J.B., Colen T., Wattimena J.L., Huijmans J.G., Carnielli V.P., Sauer P.J. (1995). Immediate commencement of amino acid supplementation in preterm infants: effect on serum amino acid concentrations and protein kinetics on the first day of life, *Journal of Pediatrics*, 127, 458-465.
 40. Heird W.C., Dell R.B., Helms R.A., Greene H.L., Ament M.E., Karna P., Storm M.C. (1987). Amino acid mixture designed to maintain normal plasma amino acid patterns in infants and children requiring parenteral nutrition, *Pediatrics*, 80, 401-408.
 41. Heird W.C., Hay W., Helms R.A., Storm M.C., Kashyap S., Dell R.B. (1988). Pediatric parenteral amino acid mixture in low birth weight infants, *Pediatrics*, 81, 41-50.
 42. Lourenco R., Camilo M.E. (2002). Taurine: a conditionally essential amino acid in humans? An overview in health and disease, *Nutricion Hospitalaria*, 17, 262-270.
 43. Poindexter B.B., Ehrenkranz R.A., Stoll B.J., Koch M.A., Wright L.L., Oh W., Papile L.A., Bauer C.R., Carlo W.A., Donovan E.F., Fanaroff A.A., Korones S.B., Laptook A.R., Shankaran S., Stevenson D.K., Tyson J.E., Lemons J.A. (2003). Effect of parenteral glutamine supplementation on plasma amino acid concentrations in extremely low-birth-weight infants, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 737-743.
 44. Soghier L.M., Brion L.P. (2006). Cysteine, cystine or N-acetylcysteine supplementation in parenterally fed neonates, *The Cochrane Database of Systematic Reviews*.
 45. Laine L., Shulman R.J., Pitre D., Lifschitz C.H., Adams J. (1991). Cysteine usage increases the need for acetate in neonates who receive total parenteral nutrition, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 54, 565-567.
 46. Sáenz de Pipaón M., Quero J., Wattimena D.J.L., Sauer P.J.J. (2005). Effect of Two Amino Acid Solutions on Leucine Turnover in Preterm Infants, *Biology of Neonat*, 87, 236–241.