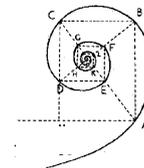




Università degli Studi di Milano

Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare e Traslazionale



CICLO XXXIII
ANNO ACCADEMICO 2019/2020

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA
SSD MED-49

**Studio dell'effetto della supplementazione di curcumina in pazienti
affetti da Insufficienza Renale Cronica**

DOTTORANDA: Paola De Simone

Matricola n. R1192

TUTORE: Prof. ssa Paola Signorelli

CO-TUTORE: Prof. ssa Laura Soldati

COORDINATORE DEL DOTTORATO: Prof. Michele Samaja

SOMMARIO

Introduzione. La definizione di Insufficienza Renale Cronica (IRC) è stata elaborata nel 2012 dalla *Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)* ed è associata alla presenza di anomalie nella struttura e nella funzione del rene che persistono per almeno 3 mesi determinando implicazioni sulla salute del paziente. L'identificazione delle prime alterazioni nella funzione renale, le variazioni nella composizione corporea e dello stato nutrizionale nei pazienti nefropatici, sono alla base della corretta diagnosi della patologia renale cronica.

Scopo. Lo scopo dello studio è stato quello di comprendere l'interazione tra lo stato nutrizionale ed infiammatorio nei pazienti con IRC. In particolare lo studio si propone di indagare l'azione della supplementazione di curcumina per 3 o 6 mesi con particolare attenzione nei confronti dei marcatori di infiammazione e dei cambiamenti del microbioma intestinale.

Popolazione e Metodi. È stato effettuato uno studio d'intervento presso l'Ospedale San Paolo di Milano su una popolazione composta da 24 pazienti con IRC in terapia conservativa ai quali è stata somministrata curcumina per 3 e 6 mesi di trattamento.

Sono stati valutati gli esami ematochimici per la valutazione della funzione renale, lo stato nutrizionale è stato valutato attraverso l'analisi della composizione corporea (BMI, circonferenza della vita e esame bioimpedenzometrico), mentre, l'inserimento dei diari alimentari dei 3 giorni sono stati analizzati mediante il software *EphoodTM*, per poter effettuare l'analisi bromatologica dell'introito alimentare.

Per valutare lo stato infiammatorio dei pazienti sono stati raccolti campioni ematici ed analizzate le citochine infiammatorie (ELISA).

Sono state inoltre raccolte le feci dei pazienti per poter analizzare il microbioma dei pazienti durante il progredire della patologia e la somministrazione di curcumina.

Risultati. L'analisi della composizione corporea ha mostrato una riduzione della massa grassa ($p\text{-value} < 0,0001$), e un miglioramento della massa magra e una lieve diminuzione del BMI dal tempo T0 al tempo T1, e anche tra il tempo T1 e il tempo T2.

I parametri ematochimici rimangono entro i range di normalità per l'intera durata dello studio, questo è indice di una buona compensazione della malattia, sia dal punto di vista farmacologico che dietetico.

Dall'analisi delle citochine pro-infiammatorie a livello sierico è emerso che i livelli di *CCL2* si sono ridotti in maniera statisticamente significativa e dopo sei mesi di trattamento si sono ridotti anche i valori *IFN- γ* e *IL-4* che conferma l'effetto antinfiammatorio della supplementazione di curcumina, descritto ampiamente anche nella letteratura scientifica.

Dall'analisi del microbiota intestinale non ci sono stati dati statisticamente significativi.

Dall'analisi dell' α -diversità, il gruppo controllo ha mostrato una condizione di disbiosi più elevata rispetto al gruppo con IRC, legata probabilmente alle patologie correlate all'anzianità del nostro gruppo controllo.

Conclusioni. L'aumento dell'incidenza dell'IRC è legato soprattutto all'invecchiamento generale della popolazione e al conseguente invecchiamento del rene, insieme alla presenza di altre patologie: malattie cardiovascolari, obesità e sindrome metabolica. L'età media elevata della nostra popolazione (71 anni) ha messo in evidenza i limiti dello studio che avrebbero contribuito a determinare la bassa compliance riscontrata nell'assunzione di curcumina e la bassa motivazione nel proseguire lo studio per l'intera durata dello studio. Per comprendere meglio i dati ottenuti dall'analisi tassonomica del microbiota intestinale, sono in corso studi che mirano a mettere in relazione l'intake nutrizionale con le caratteristiche della composizione del microbiota del paziente con IRC.

ABSTRACT

Introduction. The definition of Chronic Kidney Disease (CKD) was developed in 2012 by Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) and is associated with the presence of abnormalities in the structure and function of the kidney that persist for at least 3 months with implications for health of the patient. The identification of the first alterations in renal function, changes in body composition and nutritional status in renal patients, are the basis for the correct diagnosis of Chronic Kidney Disease.

Aim. The aim of the study was to understand the interaction between nutritional and inflammatory status in CKD patients. In particular, the study aims to investigate the action of curcumin supplementation for 3 or 6 months with particular attention to inflammation markers and changes in the intestinal microbiome.

Population and Methods. An intervention study was carried out at the San Paolo Hospital in Milan on a population of 24 patients with CKD in conservative therapy who were administered curcumin for 3 and 6 months of treatment. The blood chemistry tests for the evaluation of renal function were evaluated, the nutritional status was evaluated through the analysis of the body composition (BMI, waist circumference and bioimpedance analysis), while, the insertion of the 3-day food diaries were analyzed by means of the EPhood™ software, in order to carry out the bromatological analysis of food intake. Blood samples were collected and inflammatory cytokines analyzed (ELISA) to assess the patients' inflammatory status. Patient feces were also collected in order to analyze the patients' microbiome during the progression of the disease and the administration of curcumin.

Results. Body composition analysis showed a reduction in fat mass (p -value <0.0001), and an improvement in lean mass and a slight decrease in BMI from time T0 to time T1, and also between time T1 and time T2. The blood chemistry parameters remain within the normal range for the entire duration of the study, this is an indication of a good compensation of the disease, both from a pharmacological and dietary point of view. From the analysis of pro-inflammatory cytokines at serum level, it emerged that the levels of CCL2 were statistically significantly reduced and after six months of treatment the IFN- γ and IL-4 values also decreased, confirming the anti-inflammatory effect of curcumin supplementation, also described extensively in the scientific literature. From the analysis of the intestinal microbiota there were no statistically significant data. From the α -diversity analysis, the control group showed a higher dysbiosis condition than the group with CKD, probably linked to pathologies related to the age of our control group.

Conclusions. The increase in the incidence of CKD is mainly linked to the general aging of the population and the consequent aging of the kidney, together with the presence of other diseases: cardiovascular diseases, obesity and metabolic syndrome. The high average age of our population (71 years) highlighted the

limitations of the study that would have helped to determine the low compliance found in the intake of curcumin and the low motivation in continuing the study for the entire duration of the study. To better understand the data obtained from the taxonomic analysis of the intestinal microbiota, studies are underway that aim to relate the nutritional intake with the characteristics of the microbiota composition of the patient with CKD.

ABBREVIAZIONI

ACR	Albumin-to-cratinine ratio	1,25 (OH)2 D 1,25	dihydroxy Vitamin D
AER	Albumin excretion rate	1,25 (OH)2 D 3	Calcitriol
ASST	Azienda socio sanitaria territoriale	25 (OH) D	25-hydroxy Vitamin D
BCM	Body composition monitor	AKT	Protein Kinase B
BIA	Analisi bioimpedenziometrica	ALP	Alkaline Phosphatase
BMI	Body mass index	BMD	Bone Mass Density
Ca	Calcio	BMI	Body Mass Index
CARHES	Cardiovascular risk in renal patients of the health examination survey	CAPD	Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis
CDC	Centers for disease control and prevention	CCPD	Continuous Cyclic Peritoneal Dialysis
CKD-EPI	Chronic kidney disease epidemiology collaboration	CKD	Chronic Kidney Disease
COX-2	Ciclossigenasi 2	CKD-EPI	Chronic Kidney Disease Epidemiology collaboration equation
CTRL	Controlli	CRP	C-Reactive Protein
DASH	Dietary approaches to stop hypertension	CVD	Cardiovascular Disease
ECW	Extra-cellular water	DCM	Dilated Cardiomyopathy
EDTA	Acido etilendiamminotetracetico	DGC	Dystrophic-Glycoprotein Complex
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	DPP-4	dipeptidyl peptidase 4
ESRD	End-stage renal disease	DXA	Dual wavelength X-ray Absorptiometry
FC	Fosfatidilcolina	eGFR	estimated Glomerular Filtration Rate
GFR	Glomerular filtration rate	ESRD	End-Stage Rena Disease
Hb	Emoglobina	FFA	Free Fatty Acids
HDL	High density lipoprotein	FGF-23	Fibroblast Growth Factor-23
ICW	Intra-cellular water	FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
IL-1	Interleuchina 1	GFR	Glomerular Filtration Rate
IL-1 β	Interleuchina 1 beta	GLP-1	Glucagon Like Peptide-1
IL-4	Interleuchina 4	GLP-1R	Glucagon Like Peptide-1 Receptor
IL-6	Interleuchina 6	GPCR	G-protein-coupled receptor
IL-8	Interleuchina 8	GPR	G-protein Receptor
IL-12	Interleuchina 12	HDL	High Density Lipoprotein
IL-18	Interleuchina 18	IPA	Ingenuity Pathway Analysis

IFN-γ	Interferone gamma	IRC	Insufficienza Renale Cronica
iNOS	Ossido nitrico sintasi inducibile	IRS-1	Insulin Receptor Substrate-1
IRC	Insufficienza renale cronica	KAU severity	Kaupilla calcification score
IS	Indossil-solfato	LDL	Low Density Lipoprotein
ISRNM	International society of renal nutrition and metabolism	LVH	Left Ventricular Hypertrophy
K	Potassio	MAF	Minor Allele Frequency
KDIGO	Kidney disease: improving global outcomes	MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
KDOQI	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative	NaPi2a, b, c	Sodium/Phosphate Cotransporters
KHA-CARI	Kidney health australia – caring for australasians with renal impairment	PANTHER	Protein Analysis THrough Evolutionary Relationships
LARN	Livelli di assunzione di riferimento di nutrienti ed energia per la popolazione italiana	PEW	Protein-Energy Wasting
LDL	Low density lipoprotein	PI3K	Phosphatidyl Inositol 3-Kinase
LPD	Low protein diet	PiT-1, -2	Sodium-dependent Phosphate Transporter
LTM	Lean total mass	PTH	Parathyroid Hormone or Parathormone
MAP	Multianalyte Profiling	PTHr-1	Parathyroid Hormone Receptor-1
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1	SGCD	Sarcoglycan Delta
MCV	Volume corpuscolare medio	SLC	Solute Carriers
MDRD	Modification of diet in renal diseases	SNP	Single Nucleotide Polymorphism
MPE	Malnutrizione proteico-energetica	SOST	Sclerostin Gene
Na	Sodio	T2DM	Type 2 Diabetes Mellitus
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	TGF-β	Transforming Growth Factor- β
NGS	Next Generation Sequencing	TNF-α	Tumor Necrosis Factor- α
NK	Natural killer	VC	Vascular Calcification
NKF	National kidney foundation	VEP	Variant Effect Predictor
NKDEP	National kidney disease education program		
P	Fosforo		
PCS	P-cresolo solfato		
PTH	Ormone paratiroideo		

RAAS	Renin–angiotensin–aldosterone system
SCFA	Short-chain fatty acids
SIBIOC	Società italiana di biochimica clinica
SIMEL	Società italiana di medicina di laboratorio
SIN	Società italiana di nefrologia
SVLPD	Supplemented very low protein diet
T0	Tempo 0
T1	Tempo 1
T2	Tempo 2
TBW	Total body water
TG	Trigliceridi
TGF-β	Transforming growth factor beta
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha
USRDS	United States renal data system
VFG	Velocità di filtrazione glomerulare

INDICE

SOMMARIO	I
ABSTRACT	III
ABBREVIAZIONI	V
INTRODUZIONE	1
L'INSUFFICIENZA RENALE CRONICA	1
<i>Definizione e stadiazione</i>	1
<i>Eziologia</i>	6
<i>Epidemiologia</i>	9
<i>Terapia nutrizionale nel paziente con IRC</i>	10
STRESS OSSIDATIVO E INFIAMMAZIONE	27
IL MICROBIOTA INTESTINALE	30
LA CURCUMINA	37
<i>Struttura, biodisponibilità e funzione</i>	37
<i>Curcumina e insufficienza renale cronica</i>	40
SCOPO DELLO STUDIO	42
MATERIALI E METODI	43
POPOLAZIONE	43
ANALISI ANTROPOMETRICA	44
ANALISI DELLA COMPOSIZIONE CORPOREA	47
ANAMNESI ALIMENTARE	50
<i>Ephood™</i>	50
FUNZIONALITÀ' RENALE	51
MERIVA®	52
PROTOCOLLO SPERIMENTALE	53
<i>Pazienti con insufficienza renale cronica</i>	53
<i>Gruppo controllo</i>	55
<i>Gestione dei campioni fecali</i>	55
VALUTAZIONE DELLO STATO INFIAMMATOARIO	56
ANALISI DELLE TOSSINE UREMICHE	57
ANALISI DEL MICROBIOTA INTESTINALE	59
ANALISI STATISTICA	60
RISULTATI E DISCUSSIONE	62
POPOLAZIONE CON INSUFFICIENZA RENALE CRONICA	62
POPOLAZIONE CONTROLLO	65

POPOLAZIONE CON IRC AI TEMPI T0, T1 E T2	68
<i>Confronto tra popolazione con IRC al tempo T0 e il gruppo controllo</i>	72
<i>Confronto tra la popolazione con IRC al tempo T0 e al tempo T1</i>	75
<i>Confronto tra la popolazione con IRC al tempo T0 e al tempo T2</i>	77
<i>Confronto tra la popolazione con IRC al tempo T2 e il gruppo controllo</i>	79
CONFRONTO DELLO STATO INFIAMMATORIO TRA TEMPI T0 E T1 E TEMPI T1 E T2	81
EFFETTO DELLA CURCUMINA SULLE TOSSINE UREMICHE.....	85
ANALISI DEL MICROBIOTA INTESTINALE.....	88
<i>Phyla.....</i>	89
<i>Famiglie.....</i>	93
<i>Indice di Shannon</i>	99
CONCLUSIONI	102
ALLEGATI.....	106
ALLEGATO 1	106
BIBLIOGRAFIA.....	124
RESEARCH INTEGRITY DECLARATION.....	150

INTRODUZIONE

L'Insufficienza Renale Cronica

Definizione e stadiazione

La definizione di Insufficienza Renale Cronica (IRC) è stata elaborata nel 2012 dalla *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KDIGO) ed è associata alla presenza di anomalie nella struttura e nella funzione del rene che persistono per almeno 3 mesi determinando implicazioni sulla salute del paziente.¹

L'alterazione della funzione del rene avviene sia in senso emuntorio che in senso omeostatico, determinando difficoltà durante l'eliminazione di alcune sostanze:

- Azoto → iperazotemia;
- Fosforo → iperparatiroidismo secondario;
- Cloruro di sodio (NaCl) → ipertensione arteriosa ed edemi;
- Idrogenioni → acidosi metabolica;
- Acqua → iper/ipoosmolarità.²

Attraverso diverse valutazioni del filtrato glomerulare, è possibile evidenziarne una graduale diminuzione di esso nell'arco di tre mesi e definire in tal modo la cronicità della patologia.

L'IRC è associata ad un aumento del rischio di malattie cardiovascolari, della malattia renale terminale oltre che ad un aumento della mortalità; tuttavia si presenta spesso asintomatica fino agli stadi più avanzati.³

Secondo le linee guida del documento KDIGO del 2012, per effettuare una diagnosi di IRC è necessario che il paziente presenti, per più di tre mesi, velocità di filtrazione glomerulare inferiore a $60\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ e uno o più tra i seguenti criteri:

- Albuminuria (AER $\geq 30\text{mg}/24$ ore; ACR $\geq 30\text{mg}/\text{g}$ o $\geq 3\text{mg}/\text{mmol}$);
- Anormalità nel sedimento urinario;
- Anormalità elettrolitiche dovute a disordini tubulari;
- Anormalità nell'istologia;
- Anormalità strutturali identificate tramite tecniche di imaging;
- Storia di trapianto renale.

La **Velocità di Filtrazione Glomerulare** (VFG), che nell'IRC tende a diminuire progressivamente, è considerato il miglior indice per valutare la funzionalità renale. Il valore normale di VFG negli adulti di entrambi i sessi è di circa $125\text{ ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$. Valori inferiori a $60\text{ ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ per un periodo superiore ai tre mesi indicano la presenza di malattia renale cronica.

La metodica più corretta per misurare il filtrato glomerulare si avvale della clearance della creatinina, tuttavia un sistema di rilevazione più diretto che evita i frequenti errori nella raccolta delle urine, si basa su formule che stimano il GFR (estimated GFR o eGFR) prescindendo dal dato urinario. Le due più utilizzate sono la MDRD (1999) e la CKD-EPI (2009), entrambe basate su quattro parametri: creatinemia, età, sesso ed etnia.

La formula CKD-EPI però, permette di ottenere risultati maggiormente accurati rispetto alla MDRD, tenendo conto degli stessi parametri.⁴

L'**albuminuria** indica la presenza di albumina nelle urine. L'escrezione dell'albumina nelle urine rappresenta il primo marcatore di danno glomerulare. Le persone con una presenza cronica di piccole quantità misurabili di albumina nell'urina hanno un rischio aumentato di sviluppare una disfunzione renale progressiva. Recenti studi hanno infatti dimostrato che l'albuminuria, oltre a rispecchiare il danno renale, è implicata nel pathway causale della progressione della malattia renale.⁵

Anomalie nel sedimento urinario quali presenza di cellule, microrganismi o cristalli possono indicare un danno renale.

Anomalie istologiche e strutturali identificate tramite biopsia e tecniche di imaging, se persistono per un periodo superiore a tre mesi sono riconducibili ad un danno renale.

Le **anomalie elettrolitiche** Alterazioni elettrolitiche e altre anomalie tubulo-correlate conseguenti ad alterazioni nella secrezione o nel riassorbimento tubulare.

Trapianto renale: i pazienti sottoposti a questa procedura presentano anomalie alla biopsia.

Il grado di rischio associato all'IRC, si valuta prendendo in considerazione due parametri: la velocità di filtrazione glomerulare (VFG, o Glomerular Filtration Rate, GFR), che si misura in ml/min/1,73m² e l'albuminuria, che si utilizza per misurare il rapporto

albumina/creatinina (Albumine Creatinine Ratio, ACR), il quale si misura in mg/g o mg/mmol.

Il calcolo della velocità di filtrazione glomerulare permette di ottenere una suddivisione in 5 gradi di gravità crescente (da G1 a G5) (tabella 1) mentre l'albuminuria una suddivisione in 3 categorie, anch'esse di gravità crescente (da A1 a A3) (tabella 2).

Tab.1: Stadiazione dell'IRC secondo i diversi range di velocità di filtrazione glomerulare

Categoria VFG	VFG (ml/min/1,73m²)	Descrizione
G1	≥ 90	Normale o alta
G2	60-89	Diminuzione lieve
G3a	45-59	Diminuzione da lieve a moderata
G3b	30-44	Diminuzione da moderata a severa
G4	15-29	Diminuzione severa
G5	< 15	Insufficienza renale

Tab.2: Stadiazione dell'IRC secondo i diversi range del rapporto albumina/creatinina nelle urine.

Categoria	mg/mmol	mg/g	Descrizione
ACR			
A1	<3	<30	Da normale a lievemente aumentato
A2	3-30	30-300	Moderatamente aumentato
A3	>30	>300	Severamente aumentato

Dalla combinazione di questi due parametri si può ottenere una classificazione più complessa, illustrata dalla Figura 1.

Prognosis of CKD by GFR and Albuminuria Categories: KDIGO 2012

				Persistent albuminuria categories Description and range		
				A1	A2	A3
				Normal to mildly increased	Moderately increased	Severely increased
				<30 mg/g <3 mg/mmol	30-300 mg/g 3-30 mg/mmol	>300 mg/g >30 mg/mmol
GFR categories (ml/min/1.73 m ²) Description and range	G1	Normal or high	≥90			
	G2	Mildly decreased	60-89			
	G3a	Mildly to moderately decreased	45-59			
	G3b	Moderately to severely decreased	30-44			
	G4	Severely decreased	15-29			
	G5	Kidney failure	<15			

Fig. 1: Prognosi di IRC in base alle classi di VFG e ACR: KDIGO 2012. Verde: rischio basso (in assenza di altri marcatori di patologia renale, si esclude la IRC); giallo: rischio moderatamente aumentato; arancione: rischio elevato; rosso: rischio molto elevato.

Negli stadi più avanzati dell'insufficienza renale cronica si assiste ad una condizione clinica definita come sindrome uremica che determina una riduzione significativa della capacità emuntoria dei reni, alterazioni chimiche a carico dei fluidi organici e la comparsa di un insieme di sintomi tipici come stanchezza, nausea, vomito, mancanza di appetito, sudorazione, pallore, difficoltà respiratorie, ipertensione, gonfiore degli arti inferiori, disturbi della sensibilità, prurito e, talvolta, stato convulsivo e coma.

Eziologia

I fattori di rischio correlati all'insufficienza renale cronica sono numerosi:

L'**ipertensione** è riconosciuta da molto tempo come un fattore di rischio per l'IRC e per la malattia renale cronica avanzata (ESRD, *End Stage Renal Disease*).

Il rene è un organo molto vascolarizzato ed è pertanto esposto a molti agenti circolanti potenzialmente nocivi ed inoltre risente in maniera importante delle variazioni pressorie, che possono rendere i capillari del glomerulo più vulnerabili al danno emodinamico.⁶ L'ipertensione, infatti, è uno dei principali fattori di rischio per lo sviluppo di IRC e insieme al diabete, rappresenta il principale meccanismo fisiopatologico dell'IRC nei paesi del mondo maggiormente sviluppati.

Il **diabete mellito** è uno dei principali meccanismi fisiopatologici dell'IRC e secondo i dati americani dell'USRDS (*United States Renal Data System*), la metà dei pazienti con ESRD è affetto da nefropatia diabetica.

Il principale danno renale provocato dal diabete è quello che si verifica nei piccoli vasi sanguigni ed è riscontrabile precocemente dalla presenza di proteinuria.⁷⁻⁹

L'esposizione prolungata a **neurotossine** (alcool, analgesici e droghe) e a metalli pesanti è correlata all'insorgenza dell'IRC⁷.

Il **danno renale acuto** è un fattore predisponente allo sviluppo di IRC. I dati del 2009 dell'USRDS riportano che adulti con presenza di danno renale acuto durante un periodo di ospedalizzazione presentano un rischio 10 volte più elevato di sviluppare ESRD nei 10 mesi successivi rispetto ai pazienti che non sono stati esposti a questo evento.⁷

Altre **patologie renali** possono predisporre allo sviluppo dell'IRC:

- Pielonefrite: infezione a carico dei calici e della pelvi renale;
- Malattia renale policistica: una patologia ereditaria caratterizzata dalla formazione di cisti nel rene che con conseguente aumento di dimensione dell'organo e progressiva perdita della sua funzione;
- Nefropatie congenite ed ereditarie: sindrome di Alport che comporta una progressiva perdita di funzione dell'organo;
- Glomerulonefriti: infiammazione dei glomeruli renali;
- Ostruzione cronica delle vie escretrici: causata spesso da ipertrofia prostatica benigna e calcoli renali.

Oggi, uno dei fattori di rischio maggiormente associato allo sviluppo dell'IRC è rappresentato dall'obesità che può contribuire alla patogenesi del danno renale attraverso alcuni meccanismi: infiammazione, stress ossidativo, disfunzione endoteliale, stato protrombotico, ipervolemia, aumento della tensione intracapillare del glomerulo e diminuzione della densità dei podociti. Inoltre, un indice di massa corporea (BMI, Body Mass Index) elevato e legato ad un eccesso di grasso a livello addominale è associato a maggiore rischio¹⁰; diversi studi, infatti, hanno evidenziato l'associazione tra elevato rapporto vita-fianchi e valori inferiori di VFG.^{7,9}

Il **basso peso alla nascita** potrebbe determinare uno sviluppo di un numero minore di nefroni con conseguente aumento della pressione intraglomerulare, iperfiltrazione nei nefroni presenti, diminuzione del VFG e aumento del ACR.⁷

Il **fumo** di sigaretta può aumentare il rischio di sviluppare IRC attraverso un aumento dello stato proinfiammatorio, stress ossidativo, shift protrombotico, disfunzione endoteliale, glomerulosclerosi e atrofia tubulare.^{7,8}

Ci sono inoltre alcuni fattori legati alla genetica (storia familiare), al sesso maschile, all'età avanzata e all'etnia afro-americana che sono indipendentemente associati allo sviluppo dell'IRC.^{7,8}

L'evento iniziale associato all'insorgenza dell'IRC, a prescindere da quale sia la causa iniziale, è rappresentato da una riduzione importante del numero dei nefroni funzionanti. In seguito a ciò si

ha un'iniziale iperfiltrazione adattativa e ipertrofia glomerulare con aumento della VFG per singolo nefrone, iperproduzione di fattori di crescita e citochine proinfiammatorie, che contribuiscono ulteriormente alle modifiche strutturali tubulo-interstiziali e glomerulari. Questi meccanismi, che inizialmente provvedono a ristabilire il funzionamento del rene, con il tempo determinano una sclerosi della popolazione di nefroni funzionali.^{9,11}

Epidemiologia

Dal 2008 la Società Italiana di Nefrologia ha iniziato uno studio per valutare la diffusione dell'IRC nella popolazione italiana e delle complicanze ad essa associata: lo studio CARHES (CARDiovascular Risk in Renal patients of the Health Examination Survey). Per questo studio sono stati selezionati individui di età compresa tra i 35 e i 79 anni che rappresentano la popolazione italiana.¹²

In base ai dati fino ad ora raccolti, la prevalenza della malattia renale cronica è dell'8,1% negli uomini e del 7,8% nelle donne, e non ci sarebbero differenze significative tra le macro-aree geografiche. In accordo con queste percentuali ci sarebbero 2,5-3 milioni di individui affetti da malattia renale cronica in Italia che presenterebbero, inoltre, una maggiore prevalenza di ipertensione, diabete e obesità.

Nel 2016 è stato condotto uno studio internazionale di meta-analisi su 100 studi e 112 popolazioni diverse che ha riportato una prevalenza di IRC del 13,4% considerando i soggetti affetti dallo stadio 1 allo stadio 5 e del 10,6% considerando i soggetti affetti dallo stadio 3 allo stadio 5.¹³

Lo studio condotto dall'USRDS ha rivelato che negli Stati Uniti d'America, alla data del 31 dicembre 2016, erano registrati 726.331 casi di ESRD, con un aumento del 3,0% dall'anno precedente e dell'86,00% a partire dal 2000. Sarebbero stati, dunque, raggiunti i 2161 casi per milione.

Questo trend in aumento è significativo sia per il numero crescente dei casi, ma anche per l'aumentata sopravvivenza dei pazienti affetti dalla patologia, come supportato dai dati relativi alla mortalità raccolti nello stesso studio.¹⁴

Inoltre, i dati della CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) riportano che il 15% degli adulti statunitensi risulterebbe affetto da IRC che 9 pazienti su 10 non sarebbe a conoscenza della propria condizione. L'IRC risulta più frequente nei soggetti oltre i 65 anni (38%) rispetto ai soggetti di età compresa tra i 45 e i 64 anni (13%) o tra i 18 e i 44 anni (7%). Inoltre, questa patologia risulterebbe più frequente nelle donne (15%) che negli uomini (12%) e nei neri ispanici (16%) rispetto ai bianchi non ispanici (13%) o agli asiatici non ispanici (12%).¹⁵

Terapia nutrizionale nel paziente con IRC

Fin dai primi stadi di IRC, la "normalizzazione" dell'intake dietetico di energia, proteine, sodio, potassio e fosforo gioca un ruolo cruciale per la protezione renale.

In particolare, per quanto riguarda la restrizione proteica, l'entità dipende dal livello della funzione renale residua.¹⁶ L'approccio dietetico utilizzato nei pazienti con IRC segue diverse Linee Guida di riferimento. Le Linee Guida KDIGO del 2012 riportano di ridurre

l'apporto proteico a 0,8g/kg di peso corporeo (PC)/die per quanto riguarda i pazienti con VFG<30ml/min (stadi G4 e G5), il consumo di sodio ridotto a non più di 2g/die corrispondente a 5g/die di cloruro di sodio.¹Le Linee Guida della Società Italiana di Nefrologia (SIN) fanno riferimento ad una dieta che fornisca un apporto proteico di 0,7g/kgPC/die e almeno 35 Kcal/kgPC/die per i soggetti di età < 60 anni, raggiungibile attraverso assunzione di carboidrati e grassi (rispettivamente il 60% e il 30% dell'energia totale). L'apporto di potassio non prevede restrizioni per i pazienti con VFG> 10ml/min/1,73m².Per i pazienti con IRC medio-grave (VFG<15ml/min/1,73m² e creatininemia>4 mg/dl) sarebbe consigliata una dieta fortemente ipoproteica (0,3g/kg/die) con supplemento di chetoanaloghi ed aminoacidi essenziali e cheto analoghi, ipofosforica (0,5mg/kg PC/die), povera di colesterolo e con un contenuto di potassio medio-alto (0.8-0.9 mEq/kg PC/die).¹⁷In tabella 3 sono riportate le raccomandazioni del Consensus Statement riguardanti le indicazioni specifiche per ogni stadio (1, 2, 3a, 3b, 4, 5) per quanto riguarda gli apporti proteici adeguati e l'eventuale necessità di supplementazione con aminoacidi essenziali o chetoanaloghi. Per il sodio e il fosforo vengono fornite restrizioni solo a partire dallo stadio 3b. L'apporto energetico consigliato è sempre di almeno 30-35kcal/kg PC/die.¹⁸Il consensus document relativo alla terapia dietetica nutrizionale per IRC in fase avanzata pubblicato Nel 2018 sul Giornale Italiano di Nefrologia raccomanda di mantenere il fosforo al di sotto dei 700 mg/die a partire dai primi stadi della patologia.¹⁹

Tab.3¹⁸: Schema terapeutico per la restrizione proteica, di sodio e fosforo per pazienti con IRC non diabetici.

Stadio	GFR o VFG (ml/min/1,73m ²)	Proteine (g/kg PC/die)	Na (g/die)	P (mg/die)	Supplementazioni aminoacidi e cheto analoghi
1	≥ 90	0,8 (=RDA*)	-	-	Non richieste
2	60-89	0,8 (=RDA)	-	-	Non richieste
3	45-59 30-44	0,8 (=RDA) 0,6/0,7	- < 2	- < 800**	Non richieste Opzionale: 1 compressa/5kg PC/die***
4	15-29	0,6 0,3/0,4	< 2 <2	< 800** < 800**	Opzionale: 1 compressa/5kg PC/die*** 1 compressa/5kg PC/die
5	<10-15 (no dialisi)	0,3/0,4	< 2	< 800**	1 compressa/5kg PC/die

*RDA=Recommended daily allowance;** 5-7mg/kg PC/die; ***Dipendentemente dal valore biologico delle proteine della dieta.

Proteine.Già dal XIX vi era la consapevolezza che la sindrome uremica derivasse dall'accumulo di molecole e tossine provenienti dal catabolismo delle proteine esogene ma solo in seguito negli anni '60 è stata suggerita una dieta povera di proteine come terapia da utilizzare nelle fasi avanzate dell'IRC.²⁰

La restrizione proteica è caratterizzata da un intake inferiore a quello definito dalla quantità raccomandata giornalmente (*Recommended daily allowance*, RDA) che risulta essere di 0,8-1,0g/kg PC/die 8-1,0g/kg PC/die .²¹

La **Low Protein Diet (LPD)** prevede una restrizione proteica di 0,6g di proteine/kg PC/die. Le proteine in questo regime dietetico devono derivare per più della metà da alimenti ad elevato valore biologico come carne, pesce e albume ed è necessario fornire un'adeguata quota energetica di almeno 30-35kcal/kg/die attraverso un corretto apporto di lipidi (35%) per lo più di origine vegetale e carboidrati corrispondenti (55%). Per restare in questo apporto proteico è necessario che il paziente utilizzi dei prodotti a proteici. La LPD risulta anche povera in fosforo (600-800mg/die), sodio (2-3g/die), potassio e calcio (il quale va supplementato nella quantità di 400-800mg/die). Il soddisfacimento del paziente e la difficoltà nel seguire questo regime alimentare rappresenta uno dei punti critici della LPD, per questo motivo è importante richiedere l'ausilio di programmi di educazione, con piani dietetici personalizzati formulati da personale esperto^{21,22}. Un trial randomizzato su più di 400 individui affetti da IRC seguiti per 30 mesi ha dimostrato come la malnutrizione sia estremamente rara (<1%) in pazienti che seguono una LPD²³. La LPD presenta diversi aspetti positivi che vanno dal controllo dei sintomi della sindrome uremica alla riduzione della proteinuria,²⁴ effetto coadiuvato anche da: terapia con inibitori del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS), controllo dell'acidosi metabolica, riduzione della fosforemia, riduzione del rischio per iperparatiroidismo secondario e migliori outcome cardiovascolari legati a riduzione del rischio aterosclerotico e di calcificazioni ectopiche²⁵. Inizialmente dal *Modification of Diet in Renal Diseases study* (MDRD) è emerso che la restrizione proteica della LPD non avesse alcun effetto benefico per il miglioramento dei pazienti IRC

^{26,27}. Un'analisi successiva dei dati ha evidenziato come una riduzione proteica di 0,2g/kg PC/die potesse determinare un miglioramento del declino della VFG di 1,15 ml/min/1,73 m²/anno, oltre a ridurre il rischio di morte.^{25,28} Nella tabella 4 sono indicati dei consigli per la scelta degli alimenti.

Tab.4: consigli per la scelta degli alimenti nella LPD²¹.

Cereali	Possono essere sostituiti completamente o in parte dai prodotti a proteici
Carne/pesce	Devono essere presenti tutti i giorni, poiché rappresentano la principale fonte di proteine ad alto valore biologico. Il consumo di carni processate non è raccomandato, soprattutto per il contenuto di sale aggiunto e di fosfati aggiunti come conservanti.
Uova	Si consiglia in particolare il consumo dell'albume, poiché ricco di proteine ad alto valore biologico e con contenuto di fosforo non significativo.
Oli e grassi	Preferire l'olio extravergine di oliva.
Vegetali	Importante variare tra i vari tipi di frutta e verdura per il contenuto in minerali e vitamine, ma fare attenzione al contenuto di potassio: in alcuni casi può essere necessaria una riduzione.

La **LPD vegetariana** come dimostrato da diversi studi sarebbe sufficiente per mantenere un buono stato nutrizionale, senza modificare negativamente la composizione corporea²⁹.

In uno studio cross-sectional condotto nel 2018 su 100 pazienti (40 latte-ovo-vegetariani e 60 onnivori) si è visto che non ci sarebbero differenze significative per quanto riguarda gli indici di funzione renale (VGF, creatinemia, albuminuria, ect.)³⁰. Tuttavia, il livello di fosforemia risulta significativamente inferiore nei pazienti con dieta

latto-ovo-vegetariana, come già confermato da un altro studio condotto nel 2011, secondo il quale anche i livelli di paratormone erano risultati inferiori³¹.

Sono stati riportati risultati positivi sulla VFG e sulla proteinuria relativi alla dieta vegetariana³² che suggeriscono come la qualità proteica sia più importante della quantità per quanto riguarda il controllo della fosforemia. Questo perché la presenza dei fitati negli alimenti di origine vegetale riduce la biodisponibilità di fosforo perché riduce l'assorbimento intestinale³³.

Purtroppo i diversi studi esistenti non mettono in evidenza risultati sufficienti ed omogenei per quanto concerne gli indici di funzionalità renale per i due tipi di approcci dietetici³⁴⁻³⁶

La dieta **LPD vegana** (0,7g di proteine/kg/die) prevede principalmente il consumo di cereali e legumi^{37,38}.

La **Supplemented Very Low Protein Diet** (SVLPD) viene utilizzata per i pazienti affetti da IRC avanzata e consiste in un'ulteriore restrizione proteica (0,3-0,4g/kg PC/die), al quale vanno obbligatoriamente supplementati quotidianamente aminoacidi essenziali e chetoanaloghi, affinché questo regime dietetico possa essere compatibile con la salute^{39,40}.

La SVLPD sembrerebbe efficace nel miglioramento dei sintomi uremici ritardando l'inizio della terapia sostitutiva; sembrerebbe più efficace della LPD nel controllo dei fattori di rischio cardiovascolare e disordini metabolici⁴¹ come l'ipertensione⁴², la dislipidemia⁴³, l'anemia⁴⁴, la fosforemia e il metabolismo calcio-fosforo⁴⁵, la proteinuria⁴⁶, l'iperparatiroidismo secondario e l'acidosi metabolica.⁴⁷

Purtroppo fattori come la scarsa aderenza, l'età, il diabete e le complicanze cardiovascolari non permettono la riduzione del rischio di morte renale⁴⁸. Studi clinici effettuati su pazienti selezionati, ben nutriti, con poche comorbidità e con una buona aderenza al piano, hanno dimostrato come la SVLPD sia efficiente nel ridurre la perdita della funzione renale⁴⁹.

Nella tabella 5 sono indicati gli alimenti consentiti e vietati nella SVLPD.

Tab. 5: Alimenti consentiti e vietati nella SVLPD

Alimenti consentiti	Alimenti da evitare
Alimenti aproteici: pasta, pane, biscotti, grissini, etc.	Carne, pesce, carni processate ed affettati
Cereali: riso, mais, grano saraceno	Uova
Verdura cotta o cruda	Latte e latticini
Frutta fresca o sciroppata*	Frutta secca
Marmellata, zucchero, miele*	Pasta, pane, biscotti, grissini comuni
Burro, olio di oliva, margarine vegetali	Estratti di carne
Spezie ed erbe	Bevande zuccherate, in particolare quelle a base di cola

* da evitare in caso di diabete

Aminoacidi essenziali e cheto analoghi. Per evitare che la riduzione proteica nella dieta comporti rischi per la salute e per lo stato nutrizionale è fondamentale l'integrazione con aminoacidi essenziali e cheto analoghi. Gli aminoacidi essenziali sono aminoacidi che non possono essere prodotti dall'organismo e dunque è necessario che vengano introdotti con la dieta⁵⁰, ma la forte restrizione proteica, come nel caso della SVLPD, esclude le proteine ad alto valore biologico, e pertanto è fondamentale

supportare tale carenza con un'integrazione di essi. I chetoanaloghi, invece, sono dei composti analoghi agli aminoacidi, ma privati del gruppo azotato, essi si trasformano nei loro corrispondenti nel circolo sanguigno, prelevando l'azoto ed evitando che si accumuli nell'organismo. Attualmente in commercio si trovano in due formulazioni, Ketosteril e Alfa Kappa: ogni compressa contiene gli aminoacidi L-lisina, L-treonina, L-tirosina, L-istidina, L-triptofano e gli α -chetoanaloghi di valina, leucina, isoleucina, fenilalanina e metionina. La posologia raccomandata è quella di 1 compressa/5kg di peso corporeo/die, che corrisponde a 0,1g/kg di peso corporeo/die¹⁸.

Prodotti aproteici. I prodotti aproteici sono classificati dall'Unione Europea come alimenti ai fini medici speciali; essi vanno a sostituire tutti gli alimenti con un quantitativo non trascurabile di proteine, come pane, pasta, biscotti, prodotti da forno e latte, apportando un quantitativo proteico minore all'1% del totale.

Oltre al minor apporto proteico, questi alimenti presentano anche un basso contenuto di fosforo e di potassio che li rendono specifici per la gestione nutrizionale del paziente con IRC.

Inoltre, il contenuto di grassi leggermente superiore a quelli normali, contribuisce ad aumentare l'intake energetico, importante per assicurare al paziente uno stato nutrizionale ottimale⁵¹. Purtroppo, per quanto concerne il quantitativo di sodio, per questi prodotti risulta più elevato rispetto a quelli classici.

Oggi l'industria lavora continuamente alla ricerca di soluzioni che possano portare a risultati organolettici migliori e più soddisfacenti⁵²,

ma risulta riprodurre il gusto e la consistenza degli alimenti convenzionali.

Nella tabella 6 è messo a confronto il contenuto di proteine, fosforo, potassio e sodio dei prodotti convenzionali e di alcuni prodotti aproteici su 100g di prodotto.

Tab.6: Confronto del contenuto di proteine, fosforo, potassio e sodio in prodotti convenzionali e in prodotti aproteici per 100g di alimento.

	Proteine (g)	P (mg)	K (mg)	Na (mg)
Pasta comune ⁵³	10,8	165	160	5
Pasta Aproten ⁵⁴	<0,6	<40	<30	<30
Pasta Amino ⁵⁵	0,5	20	20	20
Pasta Flavis ⁵⁶	0,5	20	11	30
Pane comune ⁵³	8,1	100	161	665
Pane Aproten ⁵⁴	<0,6	25,7	40,2	172
Pane Amino ⁵⁵	0,8	40	47	138
Pane Flavis ⁵⁶	0,5	24	69	140
Biscotti frollini comuni ⁵³	7,4	85	110	275
Biscotti frollini Aproten ⁵⁴	<0,6	<40	<30	<30
Biscotti frollini Amino ⁵⁵	0,7	-	45	70
Biscotti frollini Flavis ⁵⁶	0,7	39	37	30

Sodio. Secondo le linee guida KDIGO del 2012 l'assunzione giornaliera di sodio non dovrebbe superare 2g/die, ovvero 5g di NaCl/die¹.

Dallo stadio 3 in poi, nei pazienti IRC, l'escrezione di sodio inizia ad essere compromessa, pertanto è essenziale ridurre l'assunzione di sale.

Un'elevata intake giornaliera di sodio indurrebbe l'aumento della pressione arteriosa, della proteinuria, dell'iperfiltrazione glomerulare e attenuerebbe la risposta alla terapia con bloccanti RASS^{1,57,58}.

Uno studio di follow-up condotto su oltre 3000 individui e durato 14 anni ha associato in modo indipendente l'assunzione di sodio ad un declino dell'eGFR $\geq 30\%$ ⁵⁹.

Lo studio *Dietary Approaches to Stop Hypertension* (DASH), ha mostrato come la riduzione dell'apporto di sodio a 1 o 0.6 – 1.0 g/die riduca rispettivamente la pressione sanguigna sistolica di 7.1 e 11.5 mmHg⁶⁰.

I regimi dietetici che prevedono una riduzione del consumo di sale sono raccomandate per la prevenire l'ipertensione e il rischio cardiovascolare⁶¹, ma non ci sono evidenze scientifiche che riportano il ridotto contenuto di sodio con l'IRC.

Fosforo.L'assunzione del fosforo è strettamente associato alla dieta proteica, infatti con un regime nutrizionale come la LPD e la SVLPD si aggirerebbe rispettivamente intorno ai 500-600mg/die e 300-400mg/die²². Questi valori rientrano pertanto nell'intake di fosforo raccomandato dal Consensus del 2012, di 800mg/die, per i pazienti IRC dallo stadio 3 allo stadio 5¹⁸.I pazienti con IRC perdono progressivamente la capacità di eliminare il fosforo attraverso l'urina, pertanto è essenziale controllarne l'assunzione per evitare che livelli elevati rappresentino un danno per la salute.

L'aumento della fosforemia associata alla diminuzione sierica di calcitriolo, per una ridotta attività di idrossilazione renale sulla 25-OH vitamina D, determinano un aumento dei livelli di PTH, al fine di diminuire la fosforemia e di aumentare la calcio che non potrà però essere assorbito a livello intestinale a causa della mancanza della vitamina D attiva. A causa dell'inefficace eliminazione del fosforo da parte del rene, si avranno importanti ripercussioni anche sulla salute

dell'osso, che sarà danneggiato gravemente a causa della continua perdita di calcio^{22,62-64}.

Negli ultimi studi si è visto come l'accumulo di fosforo nelle arterie determini effetti indesiderati legati ad un aumento del rischio di mortalità cardiovascolare^{22,62-64}.

Inoltre livelli elevati di fosforo possono essere anche un fattore di rischio per lo sviluppo di IRC e possono essere determinanti sulla velocità di progressione della malattia⁶⁵⁻⁶⁹.

Oltre a ridurre il fosforo assunto con la dieta, con la restrizione proteica, esistono alcune strategie da insegnare al paziente con IRC. E' importante educare il paziente che il fosforo lo ritroviamo come additivo negli alimenti, sotto forma di acido fosforico, fosfati o polifosfati con delle etichette denominate con sigle: da E338 a E343, da E450 a E458, da E540 a E542 e E544 e E545⁷⁰.

Inoltre è importante sapere che l'assorbimento del fosforo risulta inferiore per il fosforo contenuto negli alimenti di origine vegetale, superiore per quelli di origine animale e massimo per il fosforo presente sotto forma di additivo (quasi 100%).

Per ridurre l'intake di fosforo, un metodo essenziale è rappresentato dalla bollitura degli alimenti che lo contengono; Jones et al.⁷¹ hanno mostrato come la sua concentrazione diminuisca del 51%, 48% e 38% rispettivamente in verdure, legumi e carne.

Nella figura 2 è rappresentata la piramide del fosforo, costruita tenendo conto del fosforo naturalmente contenuto negli alimenti, di quello aggiunto come additivo e della sua biodisponibilità.



Fig.2: La piramide del fosforo. Gli alimenti sono distribuiti su sei livelli a seconda del contenuto di fosforo, della sua biodisponibilità e del rapporto fosforo-proteine. Il contenuto di fosforo aumenta proseguendo verso la cima della piramide, con un contenuto minimo nell'area verde e un contenuto massimo nell'area rossa.

La piramide è costruita su 6 livelli, con dei colori che, dalla base alla punta, variano dal verde al rosso.

Primo livello: prodotti a proteici, olio d'oliva e grassi vegetali, burro, zucchero o con bassa biodisponibilità come frutta e verdura. Include anche l'albume dell'uovo, con un rapporto fosforo-proteine molto favorevole e proteine ad alto valore biologico.

Secondo livello: alimenti di origine vegetale più ricchi in fosforo ma anche in fitati, quindi con bassa biodisponibilità come pane bianco, pasta, riso, cornflakes o legumi. E' suggerito di assumerne 2-3 porzioni/die.

Terzo livello: alimenti di origine animale come agnello, coniglio, prosciutto, pollame, latte e yogurt e pesci come trota, tonno, merluzzo, nasello, sogliola. E' suggerita 1 porzione/die.

Quarto livello: alimenti con rapporto fosforo-proteine elevato, come tacchino, frattaglie (fegato, cervello), gamberetti, calamari, salmone e formaggi molli. L'assunzione suggerita è di una porzione/settimana.

Quinto livello: alimenti con rapporto fosforo-proteine elevato come noci, tuorlo e formaggi stagionati. L'assunzione suggerita è di 2-3 porzioni/mese.

Sesto livello: alimenti che contengono additivi a base di fosforo, come bevande zuccherate, in particolare a base di cola, carne processata, formaggi processati, latte condensato, dolci confezionati⁷².

Potassio: l'iperkaliemia è un'anomalia elettrolitica che si presenta frequentemente nei pazienti con una diminuita funzione renale, soprattutto verso gli stadi più avanzati della malattia. L'iperkaliemia, che è frequente nei pazienti con perdita della funzione renale, può rappresentare un'emergenza medica perchè causa di morte cardiaca improvvisa⁷³. Nei primi stadi di IRC un elevato intake di potassio non è sufficiente per provocare iperkaliemia^{74,75}. La National Kidney Foundation (NKF) non suggerisce, per i pazienti con IRC dallo stadio 1 allo stadio 5, una restrizione del potassio dietetico (90-120 mmol), a meno che non sia presente iperkaliemia⁷⁶. Una recente review suggerisce un intake di 4,7g/die negli stadi iniziali, se in assenza di rischio di iperkaliemia, e una restrizione a 2-3g/die (51-77 mmol/die) in caso di concentrazioni sieriche di potassio (sK) >5,3 mEq/l.⁷⁷

Il tratto gastrointestinale svolge un ruolo importante nell'omeostasi del potassio: viene assorbito per il 90% a livello del duodeno e del digiuno e circa 10 mmol/die vengono eliminate tramite le feci. Una condizione di stipsi potrebbe favorire un aumentato assorbimento di potassio e contribuire allo sviluppo dell'iperkaliemia in pazienti con IRC⁷⁸; pertanto, oltre al ridotto apporto dietetico di potassio, è importante consumare una buona dose di fibre, quali verdura, frutta e legumi che facilitano il transito intestinale.

E' importante, inoltre, scegliere frutta con basso contenuto di potassio come mele, pere, fragole e susine ed evitare la frutta secca, la frutta disidratata e i semi. Per ridurre il contenuto di potassio in verdura, legumi e patate, invece, è molto utile bollire due volte questi alimenti eliminando l'acqua di cottura e ridurre in tal modo il contenuto di potassio del 60-80%⁷¹.

Acqua. Nei pazienti con IRC, specialmente negli stadi più avanzati, l'eccesso di liquidi dovuto alla riduzione dell'escrezione del sodio ed ad un inappropriato riassorbimento è associato a ipertensione, scompenso cardiaco congestizio, ipertrofia ventricolare sinistra ed edema⁷⁹. Le Linee Guida KHA-CARI del 2013 raccomandano di mantenere fino allo stadio 4 un introito di liquidi intorno ai 2-2,5 L/die, compresa la quota derivante dai cibi, con eventuali adattamenti caso per caso⁸⁰. Tuttavia, quando la VFG scende invece sotto ai 10-15 ml/min, una restrizione di sodio e liquidi è necessaria per controllare la pressione arteriosa e lo sviluppo di edemi; può essere utile anche l'utilizzo di diuretici per evitare le complicanze descritte⁸¹.

Fibre. A causa dell'elevato contenuto di potassio in frutta e verdura a molti pazienti con IRC viene consigliato di assumerne in quantità limitate, con conseguente riduzione dell'apporto di fibre. Tuttavia, evidenze scientifiche suggeriscono di scongiurare l'utilizzo di fibre in questi pazienti al fine di indirizzare il metabolismo del microbiota intestinale verso la via saccarolitica e di diminuire le tossine uremiche che vengono prodotte dalla via proteolitica^{82,83}. Oltre a ciò, le fibre aumentano velocità di transito intestinale, effetto desiderabile nell'IRC, in quanto un transito ridotto è associato a disbiosi intestinali, che influiscono negativamente sui sintomi uremici del paziente e sul bilancio elettrolitico⁸⁴.

In uno studio recente si è vista un'associazione tra elevati livelli di proteina C reattiva, marker infiammatorio, e aumentata mortalità nei pazienti con IRC che assumevano una scarsa quantità di fibre⁸⁵.

Lipidi e Carboidrati. Le varie Linee Guida disponibili raccomandano un'assunzione calorica di almeno 30-35 kcal/kg PC/die, raggiungibili introducendo carboidrati e grassi in quantità sufficienti alla copertura del fabbisogno e rispettivamente 55-65% e 30-35% delle calorie totali. Per quanto riguarda i lipidi in particolare, si preferirà l'utilizzo di olio extravergine d'oliva come condimento per tutte le pietanze; il colesterolo alimentare non deve superare i 300 mg/die ma con le limitazione delle porzioni dei secondi piatti e dei derivati del latte, generalmente si ottengono riduzioni di grassi saturi e di colesterolo anche inferiori a quelle indicate.

Per quanto riguarda i carboidrati, invece, è importante preferire quelli complessi e limitare gli zuccheri semplici. Per coprire in maniera

ottimale il fabbisogno di carboidrati senza rischiare di eccedere nella quota proteica e permettere di dare la precedenza alle proteine ad alto valore biologico, è essenziale il consumo di prodotti aproteici⁸⁶⁻⁸⁸.

Malnutrizione proteico-energetica. La malnutrizione proteico-energetica (MPE) è stata definita nel 2008 dall'International Society of Renal Nutrition and Metabolism (ISRNM) come la diminuzione delle riserve proteiche e delle riserve energetiche dell'organismo che porta a perdita di massa muscolare e massa grassa e a cachessia. La cachessia rappresenta una grave forma di MPE associata a disordini fisiologici, psicologici e immunologici⁸⁹.

La MPE nell'IRC è il risultato di molti fattori che non sono solo associati ad una riduzione dell'intake di nutrienti, quali processi infiammatori, malattie acute che provocano catabolismo⁹⁰, acidosi metabolica⁹¹ e disordini endocrini, come resistenza all'azione di ormoni anabolici, iperglucagonemia e ipertiroidismo⁹².

Un insieme di esperti ha definito che sono quattro le categorie a cui far riferimento per la diagnosi di MPE: criteri biochimici, massa corporea, massa muscolare e intake dietetico. Nella tabella 7 sono indicati i criteri diagnostici a cui fare riferimento: deve essere presente almeno un criterio per tre delle quattro categorie totali rivalutato almeno tre volte e a distanza di 2-4 settimane^{89,93}.

Tab. 7: Criteri per la diagnosi clinica di malnutrizione proteico-energetica in pazienti con IRC

Parametri biochimici	Albumina sierica < 3,8 g/dl ^a Prealbumina sierica (transiretina) < 30 mg/dl (solo per pazienti in dialisi) ^a Colesterolo sierico < 100 mg/dl ^a
BMI	BMI (in assenza di edema) < 23 kg/m ^{2b} Perdita di peso non intenzionale nel tempo: 5% in tre mesi o 10% in 6 mesi Massa grassa totale < 10%
Massa muscolare	Riduzione del 5% della massa muscolare in 3 mesi o del 10% in 6 mesi Ridotta circonferenza del braccio ^c (riduzione >10% in relazione al 50°p.cle della popolazione di riferimento) Creatinine appearance ^d
Intake dietetico	Intake proteico non intenzionalmente basso <0,8 g/kg/die per almeno 3 mesi in pazienti in dialisi o <0,6 g/kg/die per pazienti da stadio 2 a 5 Intake energetico non intenzionalmente basso <25 kcal/kg/die per almeno 2 mesi

^aNon valido per grandi perdite anomale di proteine attraverso il tratto urinario o gastrointestinale malattie del fegato, terapia con farmaci ipocolesterolemizzanti^bUn BMI più basso può essere favorevole in alcune popolazioni dell'Asia

^cMisurata da un professionista esperto

^dInfluenzata sia dalla massa muscolare che dall'assunzione di carne

Il catabolismo proteico e il bilancio azotato nell'IRC sono strettamente legati all'intake energetico. Infatti, in carenza di calorie provenienti da carboidrati e lipidi, si instaura un bilancio energetico negativo che accelera il catabolismo proteico⁹⁴. E' fondamentale, pertanto, educare il paziente ad ottimizzare il bilancio energetico e dunque il bilancio azotato per avere un riscontro positivo sulla malattia in generale.

Stress ossidativo e infiammazione

Per stress ossidativo si intende uno squilibrio tra produzione e degradazione di specie reattive dell'ossigeno (Reactive Oxygen Species, ROS), che può determinare l'ossidazione di molecole biologiche con conseguente danno tissutale.⁹⁵

Nei pazienti con IRC si assiste ad un aumento plasmatico dei marcatori ossidativi⁹⁶ che determinano l'instaurarsi di uno stato pro-ossidante che sembra essere presente già agli inizi della patologia⁹⁷.

Le cause che predispongono allo sviluppo dello stato pro-ossidativo sono molteplici (figura 3); in particolare due tossine uremiche: l'*indossil solfato* e il *p-cresolo solfato*, vengono analizzate in questo lavoro di tesi.

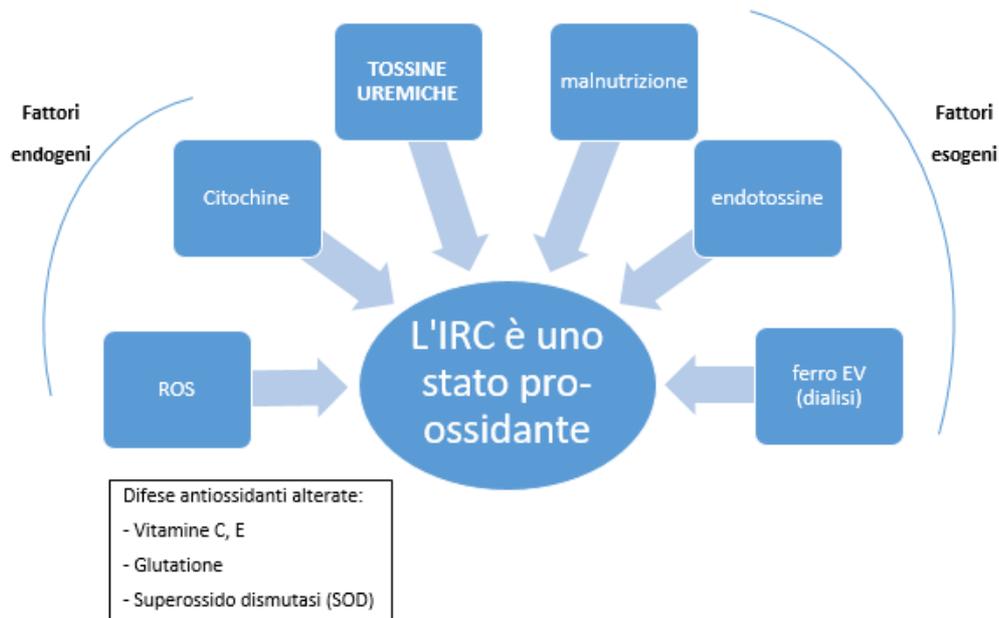


Fig. 3: Fattori implicati nello sviluppo di uno stato pro-ossidante nell'IRC. I fattori possono essere suddivisi in fattori endogeni e in fattori esogeni.

Nell'IRC, le tossine uremiche prodotte dai batteri intestinali, non riescono ad essere eliminate dai reni; esse si accumulano nel plasma, si legano ad alcune proteine come l'albumina, rendendone ancor più difficile l'eliminazione⁹⁸.

Queste molecole rendono più severi i sintomi della sindrome uremica e aggravano le condizioni patologiche per il paziente con IRC.

L'indossil solfato (IS) deriva dall'indolo, prodotto ad opera del microbiota intestinale come metabolita del triptofano che deriva dalle proteine alimentari, per poi essere metabolizzato. La produzione di IS sembra essere determinante nella progressione del danno renale, a causa del suo effetto pro-infiammatorio e dell'effetto sull'aumento dell'espressione di citochine pro-fibrotiche⁹⁹. Oltre a ciò, questa

tossina è legata allo sviluppo di complicanze cardiovascolari e rappresenta un marker di rischio di mortalità cardiovascolare^{100,101}.

L'IS risulta correlato a diverse disfunzioni endoteliali, ad ispessimento delle pareti delle arterie ed a calcificazioni aortiche¹⁰²⁻¹⁰⁴; questo avviene in quanto questa tossina è in grado di inibire la proliferazione e la riparazione delle cellule endoteliali producendo radicali liberi nelle stesse cellule^{105,98,106-108}.

Il microbiota intestinale, a partire dagli aminoacidi tirosina e fenilalanina, produce il p-cresolo che, nell'intestino, reagisce con un gruppo solfato e si trasforma in p-cresolo solfato (PCS).

Nel plasma, il PCS è correlato a diverse condizioni cliniche, quali aumento della mortalità¹⁰⁹, aumento di mortalità cardiovascolare in pazienti dializzati^{109,110}. E' stato dimostrato che il PCS determina danno a livello delle cellule tubulari e stress ossidativo attraverso l'attivazione della NADPH ossidasi¹⁰⁸.

E' associato, come l'IS, ad aumento di fibrosi, perdita della funzione renale e progressione della malattia⁹⁹; esso è legato anche a disfunzione adipocitaria, causando ridistribuzioni lipidiche ectopiche e lipotossicità⁹⁸.

Queste tossine uremiche provocano aumento dello stress ossidativo in generale, ma anche aumento della permeabilità della barriera intestinale che favorisce la traslocazione di questi prodotti tossici nel plasma, aumentando ulteriormente lo stato infiammatorio e pro-ossidativo e determinando un vero e proprio circolo vizioso^{98,106-108}.

Il Microbiota intestinale

La popolazione microbica che entra a far parte del microbiota intestinale è composta da circa 100 trilioni di batteri con un genoma di 150 volte più ampio di quello umano che comprende oltre tre milioni di geni. Tra i batteri che colonizzano l'intestino, 50 phyla sono conosciuti¹⁰⁷; il progetto *Human Microbiome Project* ha identificato fino ad oggi il 30% dei batteri che fanno parte del microbiota intestinale^{111,112}.

Il microbiota intestinale costituisce un vero e proprio ecosistema con un potenziale metabolico sovrapponibile a quello epatico.

I batteri sono più abbondanti e variabili nelle parti prossimali e distali dell'intestino: i batteri proteolitici, come i *Bacteroides*, li ritroviamo nella parte più distale; quelli saccarolitici si trovano nel colon prossimale. La localizzazione distale dei batteri proteolitici minimizza l'esposizione alle tossine generata dalla proteolisi^{106,107}.

Nella figura 4 è possibile visualizzare come è distribuita la popolazione batterica nei diversi distretti intestinali.

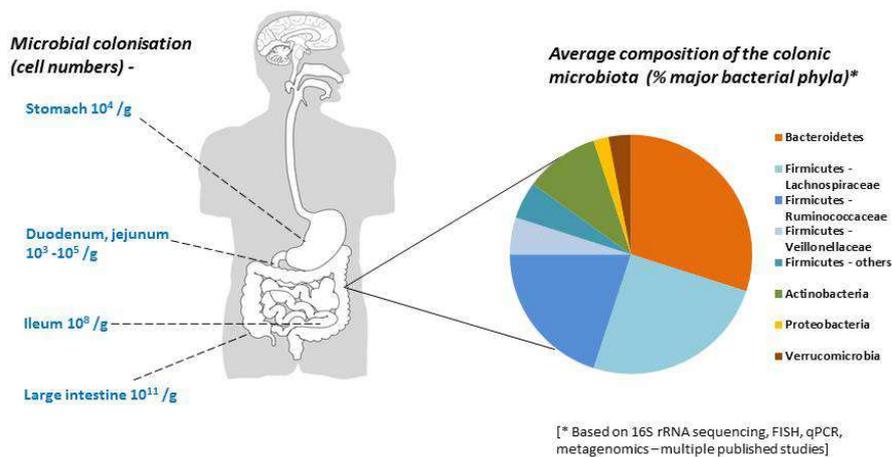


Fig.4¹¹³: distribuzione luminale dei phyla microbici dominanti nelle differenti regioni del tratto gastrointestinale umano.

Il grafico a torta rappresenta nello specifico la composizione del microbiota residente nel colon.

Il microbiota intestinale risulta influenzato già al momento della nascita, in modo particolare il parto influenza il suo sviluppo: un parto vaginale porterà alla formazione di una popolazione batterica composta prevalentemente da lactobacilli^{114,115}; un parto cesareo, determinerà la formazione di un microbiota intestinale popolato da anaerobi facoltativi e *Clostridi*^{115,116}. Oltre al parto, i microrganismi che provengono dal microbiota fecale e dall'ambiente circostante influenzeranno la colonizzazione batterica¹¹⁷. Nel primo anno di vita il microbiota intestinale presenterà un'enorme varietà microbica e rappresenterà un ecosistema dinamico in continua mutazione, per poi stabilizzarsi dopo 2-3 anni di vita con la dominazione dei *Bifidobacteria*; la popolazione batterica si amplierà e diversificherà ulteriormente con l'età adulta con la presenza di *Firmicutes* e

*Actinobacteria*¹⁰⁶. Dopo i 65 anni il microbiota intestinale sarà invece rappresentato soprattutto da *Bacteroides* e *Clostridi*¹¹⁵.

In figura 5 è illustrata la variazione delle popolazioni batteriche del microbiota intestinale in rapporto all'età.

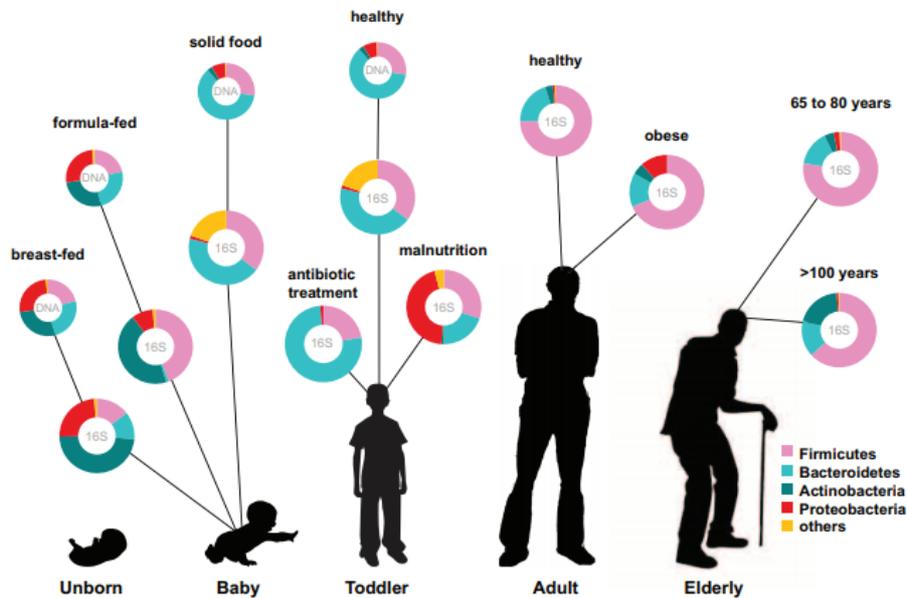


Fig.5¹¹⁸: Variazione della composizione del microbiota intestinale in relazione all'età. Il microbiota presenta sostanziali differenze nel neonato, nel bambino, nell'adulto e nell'anziano.

La dieta, già nei primi anni di vita, influenza la composizione del microbiota intestinale; infatti nei bambini che vengono allattati al seno la popolazione microbica sarà rappresentata prevalentemente da *Bifidobacteria* ed in numero minore da microrganismi anaerobi^{119,120}. Dopo i primi anni di vita, invece, una dieta ricca di frutta, verdura e fibre predispone ad un microbiota intestinale ricco e vario nell'adulto¹¹⁵. In particolar modo, una dieta di questo tipo si associa alla presenza di un maggior numero di *Firmicutes*, in grado

di metabolizzare i carboidrati non digeriti; questi batteri, invece, diminuiscono se si segue una dieta prevalentemente fatta di alimenti di origine animale, a favore dei batteri bile-tolleranti. In uno studio è stato visto come questi cambiamenti avvengano nel giro di quattro giorni e questo dimostra come variazioni nella dieta abbiano un impatto immediato sul microbiota intestinale¹²¹.

Anche nelle diverse aree geografiche, la diversità nella composizione del microbiota intestinale sono associate alle diverse abitudini alimentari¹²²⁻¹²⁴.

Recentemente si è osservato come la somministrazione di antibiotici, oltre a provocare una riduzione della quantità e della varietà microbica intestinale¹²³, paradossalmente alla loro funzione di eliminare i batteri, possano bloccare alcuni meccanismi tra le diverse specie del microbiota implicati nell'esclusione competitiva dei microrganismi patogeni.

I probiotici e i prebiotici, invece, possono essere d'ausilio nel ripristinare e riequilibrare la flora batterica intestinale. I probiotici, sono microrganismi vivi che, se somministrati in quantità adeguate, possono portare benefici alla salute; mentre i prebiotici sono parti di alimenti o alimenti che contengono oligosaccaridi non digeribili in grado di promuovere selettivamente la crescita e/o attività di uno o più batteri già presenti nel tratto intestinale o assunti contestualmente al prebiotico^{123,125}.

Le funzioni del microbiota intestinale sono quelle di un vero e proprio organo metabolico e comprendono nutrizione, regolazione immunitaria e infiammazione sistemica.

Nel microbiota intestinale sono presenti gli enzimi che trasformano i polisaccaridi complessi della dieta, che non possono essere digeriti e assorbiti come monosaccaridi nel tenue, in acidi grassi a corta catena (Short-Chain Fatty Acids, SCFA): acido acetico, propionico e butirrico, i primi due assorbiti nella circolazione portale e il terzo viene utilizzato dalle cellule del colon come fonte di energia. Gli SCFA che vengono trasportati al fegato vengono utilizzati per produrre lipidi e dalla loro digestione si può ottenere circa il 10% del totale dell'energia che si assume tramite la dieta¹¹².

La presenza di questi acidi grassi nel sangue gioca un ruolo importante anche sul sistema immunitario dell'ospite, infatti sono meno rappresentati in pazienti con infiammazioni croniche^{112,126}.

Un ruolo fondamentale del microbiota intestinale è legato alla di alcune vitamine che l'ospite non sarebbe in grado di produrre autonomamente. Alcuni batteri producono vitamina B12, folati, vitamina K, riboflavina, biotina, acido nicotinico, acido pantotenico, piridossina e tiamina^{115,127,128}.

Gli SCFA partecipano alla risposta infiammatoria: influenzano la produzione di citochine con un forte impatto sulle funzioni e il mantenimento della barriera intestinale e sulla proliferazione epiteliale^{115,129}. Gli SCFA, infine, regolano la differenziazione, il reclutamento e l'attivazione di neutrofili, macrofagi e linfociti¹³⁰.

Normalmente, il microbiota intestinale è caratterizzato da uno stato di coesistenza armonica tra le parti, definito *simbiosi*. In condizioni patologiche si assiste ad una condizione definita *disbiosi*, che descrive uno stato in cui la flora batterica intestinale subisce

modifiche qualitative e quantitative nella sua attività e distribuzione¹³¹.

Già da tempo si è a conoscenza che esiste una relazione bidirezionale tra intestino e cervello e diversi approcci sperimentali, prevalentemente su animali, hanno messo in evidenza l'effetto modulatore del microbiota intestinale sull'asse intestino-cervello^{132,133}: esso sarebbe implicato nello sviluppo di comportamenti ansiosi¹³⁴⁻¹³⁶, di comportamenti depressivi¹³⁷, nella risposta allo stress^{138,139} e nel comportamento alimentare¹³³. In questa rete di comunicazioni il cervello influenza i movimenti intestinali e le funzioni sensoriale e secretiva, mentre i segnali viscerali dell'intestino influenzano la funzione del cervello. Ad esempio, il nervo vago gioca un ruolo importante nella trasmissione del segnale; inoltre, la sua attivazione sembrerebbe avere un effetto antinfiammatorio¹⁴⁰.

Studi sull'uomo hanno evidenziato come l'analisi del microbiota intestinale possa rappresentare la base per un target terapeutico volto al trattamento di pazienti con elevata risposta allo stress associata a disbiosi intestinale¹⁴¹.

Nei pazienti con IRC vengono ad instaurarsi diversi meccanismi, come il rallentato transito intestinale, la ridotta capacità digestiva e la secrezione di ammoniaca e di urea nell'intestino, che determinano una condizione generale di disbiosi.

Il transito intestinale viene rallentato a causa di un'insufficiente assunzione di fibre che determina stipsi, per la scarsa attività fisica, a causa dell'utilizzo di farmaci chelanti del fosforo e per altre patologie coesistenti come il diabete e le malattie cardiache¹⁴².

Nei pazienti con IRC avanzata i livelli sierici di acido urico sono più elevati e le famiglie batteriche che posseggono enzimi come ureasi, uricasi ed enzimi che sintetizzano fenoli e indoli tendono a proliferare, a sfavore dei batteri saccarolitici che producono SCFA¹⁴³, favorendo anche la formazione delle tossine uremiche, le quali contribuiscono allo sviluppo della disbiosi.

La disbiosi intestinale, nei pazienti con IRC, è aggravata dalla riduzione dei *Bifidobacteria* per la minore assunzione di fibre, il frequente uso di antibiotici e i supplementi orali o intravenosi di ferro^{107,144}.

Tutti questi meccanismi determinano un danno alle *tight junctions* con conseguente aumento della permeabilità intestinale, traslocazione dei prodotti batterici attraverso la barriera intestinale, con conseguente attivazione della risposta immunitaria. Quanto accade spiegherebbe la condizione di infiammazione sistemica generale che causa peggioramento dell'IRC e problematiche cardiovascolari¹⁴⁵.

Da diversi studi emerge l'importanza della dieta SVLPD, che con il suo alto contenuto di fibre permette di ridurre dal 35 al 72% i livelli di indossil-solfato e di oltre il 50% quelli del p-cresolo^{146,147}, questo potrebbe parzialmente riequilibrare la flora batterica intestinale riportando il microbiota intestinale in condizioni fisiologiche e più sane¹³⁰.

La Curcumina

Struttura, biodisponibilità e funzione

La curcumina, pianta scientificamente conosciuta come *Curcuma longa*, appartiene alla famiglia delle Zingiberaceae. Dalla radice e dal rizoma della pianta si ottiene la comune polvere dal colore giallo, utilizzata in tutto il mondo sia come spezia che per le sue proprietà medicali.

La curcumina ($C_{21}H_{20}O_6$) è un polifenolo liposolubile caratterizzata dalla presenza di un gruppo metossile ($-OCH_3$) su entrambi gli anelli aromatici (Figura 6), che sembrerebbero essere correlati con gli effetti positivi sulla salute.¹⁴⁸⁻¹⁵⁰

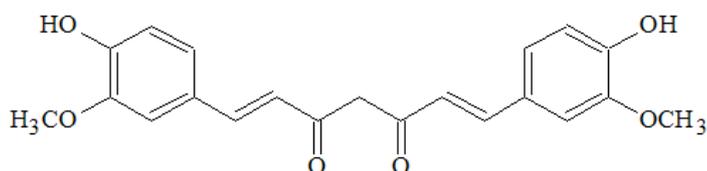


Fig. 6: Struttura molecolare della curcumina.

L'attività biologica della curcumina è legata alla sua biodisponibilità che è determinata dal suo assorbimento e dal suo metabolismo, che avvengono nell'intestino e nel fegato.

Da diversi studi condotti sia sui topi che sull'uomo emerge che la biodisponibilità della curcumina somministrata per via orale è piuttosto bassa¹⁵¹⁻¹⁵³, sia per lo scarso assorbimento a livello intestinale che per il rapido metabolismo epatico¹⁵⁴, seguito dall'eliminazione del principio attivo attraverso le feci.

Sembrerebbe che grandi quantità di curcumina, nell'ordine del grammo¹⁵⁴⁻¹⁵⁶, possano essere ritrovate nel plasma entro 1-2 ore dall'assunzione, momento di massima concentrazione¹⁵⁵. Questo accade perchè la curcumina non è idrosolubile; la massima concentrazione riscontrata nel plasma è di 3228.0±1408.2 ng/ml dopo aver somministrato 410 mg di curcumina racchiusa in micelle liquide^{157,158}.

Nel 1989, in seguito all'osservazione della forte affinità di legame esistente tra i polifenoli e i fosfolipidi si comprese che alcuni principi attivi potessero essere somministrati sotto forma di fitosoma per aumentarne la biodisponibilità.

Questa tecnologia è stata brevettata per coniugare sostanze fitochimiche a fosfolipidi, al fine di ottenere complessi molecolari lipidici compatibili per aumentare l'assorbimento e la biodisponibilità del principio attivo¹⁵⁹. La fosfatidilcolina (FC) nel tratto digerente protegge la miscela di curcuminoidi dalla digestione idrolitica e migliora anche la diffusione della sostanza lipofila nell'intestino tenue¹⁵⁹. I legami covalenti che si instaurano tra la FC e la curcumina donano stabilità alla struttura che si forma: il gruppo funzionale della curcumina si lega alla testa polare della FC, rendendola in tal modo solubile^{159,160}.

Diversi studi hanno evidenziato che, somministrando un polifenolo sotto forma di fitosoma, la concentrazione plasmatica aumenta di 2-6 volte¹⁶⁰. In uno studio effettuato sui ratti, è stato visto che somministrando 340 mg di curcumina con il fitosoma la concentrazione era cinque volte maggiore nel plasma rispetto all'utilizzo del solo principio libero^{159,161}. Un altro studio ha messo in

relazione l'assorbimento di una miscela curcuminoide standardizzata con quello di curcumina fitosomica (Meriva): l'assorbimento della seconda è risultato 29 volte maggiore rispetto alla miscela non fitosomica^{159,162}.

Le proprietà strutturali della curcumina determinano il suo potere antiossidante: essa è in grado di inibire l'attività di sostanze ossidanti, quali il radicale superossido, il perossido di idrogeno e l'ossido nitrico^{148,163}.

Altri studi invece, effettuati su animali, hanno evidenziato la sua capacità di potenziare l'attività di enzimi come la catalasi, la superossido dismutasi, e la glutatione perossidasi¹⁴⁸.

Anche studi effettuati sull'uomo, hanno evidenziato un'associazione positiva tra l'uso della curcumina e la riduzione dei radicali liberi circolanti, oltre alla protezione dal loro effetto^{160,164-166}.

Il suo ruolo protettivo nei confronti dei radicali liberi su diversi organi, come il rene, il cervello, il cuore, il fegato, il polmone, la pelle e il sistema immunitario è stato evidenziato in studi condotti su animali^{167,168}. Inoltre, anche il DNA risulterebbe protetto dallo stress ossidativo e questo comporterebbe una riduzione di mutazioni e danni genetici¹⁶⁰.

Oltre alla funzione antiossidante, la curcumina è in grado di diminuire l'infiammazione interagendo con diversi processi infiammatori^{148,165,169,170} modulando l'espressione di alcuni geni coinvolti in questi meccanismi. La produzione di ROS è correlata con la modulazione dell'espressione di NF- κ B (*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) e TNF- α (*Tumor Necrosis Factor*), molecole alla base della cascata infiammatoria. La

curcumina, interagendo direttamente con queste molecole, avrebbe un ruolo nella riduzione di questo processo pro-infiammatorio^{148,171,172}. Studi *in vitro*, vedono l'azione della curcumina coinvolta nella riduzione di alcune citochine infiammatorie, quali le interleuchina, IL-1 e IL-6, alcune chemochine ed enzimi infiammatori come la ciclossigenasi 2 (COX-2) e l'ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS).^{148,173,174}

Curcumina e insufficienza renale cronica

Gli studi clinici esistenti, anche se in numero limitato, mostrano risultati positivi sull'utilizzo della curcumina in pazienti con IRC. In generale, la supplementazione di curcumina utilizzata risulta di 500mg al giorno, corrispondente a 22,1 mg di curcumina, per un periodo di due mesi¹⁷⁵.

Nel 2011, in uno studio clinico è stato osservato l'effetto della curcumina sui livelli sierici e urinari di TGF- β , IL-8 e TNF- α e di proteinuria in 40 pazienti diabetici con IRC. L'utilizzo di 500 mg al giorno è risultata efficace nel ridurre i livelli plasmatici di TGF- β , IL-8 e di proteinuria. In seguito, è stato valutato l'effetto della supplementazione di *Curcuma longa* e *Boswellia serrata* per 8 settimane su 16 pazienti con IRC non dializzati che ha determinato una riduzione dei livelli di IL-6 nel gruppo trattato rispetto al gruppo di controllo, ma non si è visto nessun effetto su TNF- α , glutatione perossidasi e proteina C reattiva¹⁷⁶.

Uno studio prospettico randomizzato su 50 pazienti in emodialisi a cui veniva somministrata curcumina (500mg di curcumina 3 volte/die, corrispondente a 22,1mg di curcumina 3 volte/die), ha rilevato un

aumento degli enzimi antiossidanti come catalasi, glutatione perossidasi e glutatione reduttasi¹⁷⁷.

Un altro studio, che ha utilizzato la stessa posologia nella somministrazione di curcumina, condotto su 16 pazienti ha evidenziato un miglioramento nei livelli sierici di prostaglandina E₂¹⁷⁸.

In un trial clinico randomizzato, controllato in doppio cieco con placebo, il trattamento con curcumina non ha migliorato la proteinuria, la VFG o il profilo lipidico, ma ha mostrato effetti positivi sulla capacità antiossidante in pazienti diabetici e con proteinuria¹⁷⁹.

Per quanto riguarda l'azione della curcumina sul profilo lipidico, è stato dimostrato, in uno studio, che essa riduce i livelli plasmatici di colesterolo, ma i meccanismi sono ancora poco chiari e controversi¹⁸⁰. La curcumina sarebbe anche in grado di modulare le HDL, riducendo le malattie cardiovascolari nei pazienti con IRC¹⁸¹.

La possibilità di utilizzare la curcumina come terapia adiuvante per i pazienti con IRC è legata allo stato infiammatorio generale e allo stress ossidativo caratteristici di tale patologia.

E' necessario che vengano effettuati altri studi per valutare la dose e la durata adeguata per la supplementazione di curcumina, oltre che per comprendere e verificare l'efficacia e la sicurezza a lungo termine in tutti gli stadi dell'IRC¹⁷⁵.

SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo dello studio è quello di comprendere l'interazione esistente tra stato nutrizionale e infiammatorio nei pazienti con IRC. In modo particolare, lo studio si propone di valutare l'effetto dell'integrazione nutrizionale con curcumina per 3 e 6 mesi di assunzione sullo stato infiammatorio dei pazienti con IRC.

MATERIALI E METODI

Popolazione

La popolazione di questo studio è composta da 24 soggetti, scelti tra i pazienti affetti da insufficienza renale cronica (stadi 3a, 3b e 4, definiti secondo i valori di GFR delle linee guida KDOQI) in terapia conservativa che frequentano l'ambulatorio di Nefrologia e Dialisi dell'Azienda Socio Sanitaria Territoriale (A.S.S.T.) Santi Paolo e Carlo, reclutati dal febbraio 2018 al febbraio 2019.

Tutti i soggetti arruolati hanno valori di VFG compresi tra i 15 e i 45 ml/min/1.73m².

Per poter partecipare allo studio i pazienti dovevano soddisfare i seguenti criteri di inclusione:

- Età compresa fra i 18 e 90 anni;
- Etnia caucasica;
- Pazienti in IRC stadio 3, 4, 5 e non dializzati;
- Assenza di infezioni croniche;
- Assenza di neoplasia attiva;
- Assenza di vasculiti, malattie autoimmuni o infiammatorie acute;
- Assenza di patologie gastro-intestinali;
- Assenza di demenza;
- Assenza di gravidanza;
- Assenza di terapie steroidee.

Ogni paziente ha firmato il consenso informato e l'autorizzazione al trattamento dei dati personali a scopo di ricerca.

Il gruppo dei controlli, costituito da 20 soggetti, è stato reclutato nei mesi di maggio e giugno 2019 presso il reparto di Oculistica dell'Azienda Socio Sanitaria Territoriale (A.S.S.T.) Santi Paolo e Carlo – presidio San Paolo.

Per poter partecipare allo studio i pazienti dovevano soddisfare i seguenti criteri di inclusione:

- Età compresa fra i 18 e 99 anni;
- Assenza di patologie renali;
- Assenza di infezioni croniche;
- Assenza di neoplasia attiva;
- Assenza di vasculiti, malattie autoimmuni o infiammatorie acute;
- Assenza di patologie gastro-intestinali;
- Assenza di demenza;
- Assenza di gravidanza;
- Assenza di trattamento con antibiotico nei due mesi precedenti;
- Assenza di terapie steroidee.

Ogni paziente ha firmato il consenso informato e l'autorizzazione al trattamento dei dati personali a scopo di ricerca.

Analisi antropometrica

I parametri antropometrici presi in considerazione in questo studio sono stati:

- Peso (kg);
- Statura (m);
- Circonferenza della vita (cm);
- BMI (kg/m²).

Il peso è stato misurato utilizzando le bilance in dotazione all'ospedale, in particolare sono state utilizzate bilance meccaniche a colonna con visualizzazione a contrappeso e con precisione pari a 0,1 kg. Il paziente veniva fatto salire sulla bilancia senza calzature e con la biancheria intima.

La statura invece è stata misurata per mezzo di uno stadiometro, strumento costituito da una barra verticale graduata, con precisione di 1 mm e una verticale scorrevole da portare a contatto con il capo del paziente. Anche in questo caso il soggetto è senza calzature e con la biancheria intima, in modo tale da poterne verificare la corretta posizione. I piedi poggiano su una superficie piana e formano un angolo di 60° mantenendo uniti i calcagni, il peso deve essere ugualmente distribuito su entrambi gli arti inferiori, mentre quelli superiori pendono lungo i fianchi. La testa deve essere orientata verso il piano di Francoforte e, infine, natiche e scapole devono essere a contatto con la barra verticale.

La circonferenza della vita è stata misurata attraverso un apposito nastro metrico, strumento anelastico e flessibile, con precisione di 1 mm. La misurazione viene effettuata prendendo come riferimento il punto medio tra il margine inferiore dell'arcata costale e il margine superiore della cresta iliaca e ponendo il metro direttamente a contatto con la pelle, senza che si interponga alcun indumento e mantenendolo su un piano orizzontale. La misurazione è eseguita con il soggetto in stazione eretta, raccomandando di mantenere la muscolatura addominale rilassata (in seguito ad una normale espirazione). I piedi sono uniti e gli arti superiori pendono lungo i fianchi.

La figura 7 illustra la rilevazione corretta delle misure antropometriche precedentemente descritte.

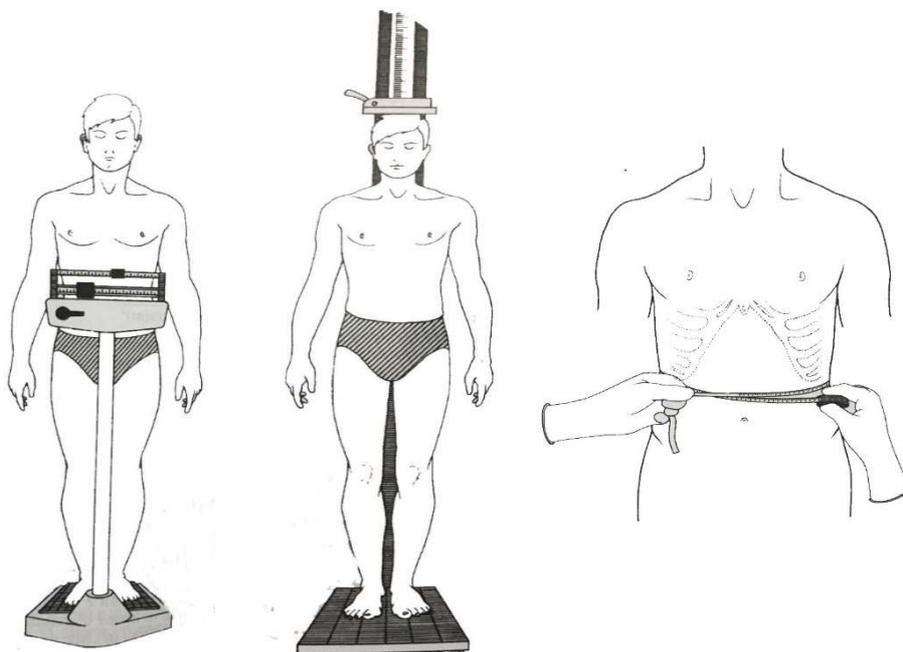


Fig. 7¹⁸²: Rappresentazione della rilevazione corretta di peso, altezza e circonferenza vita rispettivamente

Il BMI (Body Mass Index) è stato calcolato dividendo il peso del soggetto in kg per la sua altezza in metri elevata al quadrato. Il risultato di questa formula permette di classificare i soggetti come illustrato nella tabella 8.

Tab.8: Classificazione dei soggetti secondo il valore di BMI.

BMI (kg/m ²)	Classe
< 18,49	Sottopeso
18.5 - 24,9	Normopeso
25 - 29,9	Sovrappeso
30 - 34,9	Obesità di I grado
35 - 39,9	Obesità di II grado
> 40	Obesità di III grado

Il BMI permette di classificare i soggetti nelle classi sottopeso, normopeso, sovrappeso, obesità di I grado, obesità di II grado, obesità di III grado.

Analisi della composizione corporea

La valutazione della composizione corporea dei pazienti dello studio è stata condotta per mezzo del bioimpedenziometro BCM, *Body Composition Monitor* della *Fresenius Medical Care* in dotazione all'Unità Operativa di Nefrologia e Dialisi dell'Ospedale.

Questa apparecchiatura consente di effettuare una misurazione non invasiva, rapida, indolore, affidabile e ripetibile dei parametri qualitativi che descrivono la composizione corporea, l'idratazione e lo stato nutrizionale del paziente. L'analisi bioimpedenziometrica (BIA) consiste nell'applicazione di una corrente alternata di bassa

intensità ed alta frequenza che, attraversando il corpo del soggetto, permette di ottenere i valori di resistenza e reattanza elettriche dai quali viene ricavato il valore di impedenza dei tessuti⁵⁰.

I dati così raccolti vengono elaborati dal software in dati clinici utili alla valutazione della composizione corporea del paziente.

Questo metodo di misurazione necessita che il soggetto sia posto in posizione supina con gli arti inferiori abdotti di 45° e quelli superiori di 30°, al fine di evitare contatti tra gli arti e con il tronco. Il paziente può tenere tutti gli indumenti, purché sopra mano e piede destri e si privi di tutti gli oggetti metallici a diretto contatto con la pelle (orologio, gioielli, occhiali, etc.). Per effettuare la misurazione ci si serve di quattro elettrodi (2 iniettori e 2 sensori) che verranno così posizionati:

- Elettrodo iniettore A: estremità distale del 3° metacarpo;
- Elettrodo sensore A: tra le prominenze di radio e ulna del polso;
- Elettrodo iniettore B: estremità distale del 3° metatarso;
- Elettrodo sensore B: tra il malleolo mediale e laterale della caviglia.

Il cavo in dotazione con il bioimpedenziometro è costituito da due terminazioni che presentano due connettori a coccodrillo, uno di colore rosso (iniettore) e uno di colore nero (sensore) che devono essere applicati sui rispettivi elettrodi facendo in modo che il cavo non venga a contatto con il corpo del paziente, come rappresentato dalla figura 8.

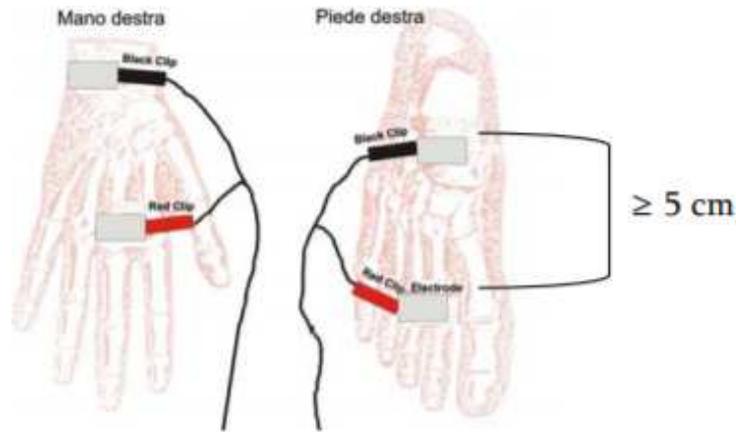


Fig. 8: Applicazione corretta degli elettrodi su mano e piede per l'esecuzione dell'analisi bioimpedenziometrica.

Prima di procedere alla misurazione, lo strumento richiede alcuni parametri del paziente: data di nascita, sesso, peso e statura.

Il tempo di misurazione varia dai 20 secondi al minuto, al termine del quale avviene il salvataggio dei risultati su una chip-card che verrà successivamente letta tramite un apposito *reader* collegato ad un computer.

I parametri calcolati dallo strumento sono i seguenti:

- Acqua corporea totale (TBW);
- Acqua extracellulare (ECW);
- Acqua intracellulare (ICW);
- Massa del tessuto magro (LTM);
- % del tessuto magro (% LTM);
- Massa lipidica totale (FAT);
- % del tessuto lipidico (% FAT).

Anamnesi alimentare

Per effettuare la stima dei consumi alimentari è stato utilizzato un diario alimentare di tre giorni fornito al paziente durante l'arruolamento e da compilare a casa.

Durante la visita nutrizionale il nutrizionista, con l'aiuto dell'atlante fotografico Scotti-Bassani per la stima delle porzioni assunte, analizza il diario e, attraverso domande mirate, procede con la verifica delle informazioni in esso riportate.

Il diario alimentare dei 3 giorni è un metodo di indagine nutrizionale validato in letteratura che prevede la registrazione di tutti gli alimenti e le bevande consumate nell'arco della giornata durante un periodo di tempo di 3 giorni di cui 2 lavorativi ed uno festivo [Allegato I].

Ephood™

ePhood – electronic Phenotypes & Omics on Diet™ è una piattaforma online nata con l'obiettivo di controllare i pazienti dal punto di vista nutrizionale, clinico, genetico e dello stile di vita attraverso consigli e raccomandazioni specifici e volti a promuovere uno stile di vita sano.

Questo software web-based permette di creare gruppi di studio composti da più pazienti, dei quali si possono aggiungere informazioni anagrafiche, genetiche, nutrizionali e d'interesse clinico. Il software si basa sul database alimentare dell'Istituto Europeo di Oncologia (IEO) e contiene 1570 porzioni, 830 alimenti e 40 nutrienti. Inoltre, è presente anche la possibilità di inserirvi delle ricette già composte, che possono essere opportunamente modificate dal

ricercatore stesso sia per quanto riguarda le quantità che per quanto riguarda gli ingredienti, in modo tale da riportare in maniera corretta e veritiera ciò che è stato effettivamente consumato dal paziente.

Per il nostro studio ci siamo serviti del software ePhood al fine di ottenere una valutazione precisa ed accurata dell'assunzione di micro- e macronutrienti tenendo conto delle informazioni riportate, e verificate, sul diario alimentare dei 3 giorni.

Funzionalità' renale

La valutazione della funzionalità renale è stata effettuata considerando i più recenti esami ematochimici effettuati dal paziente e portati in visione ai nefrologi il giorno della visita.

I valori ematici considerati per lo studio sono stati:

- Creatininemia (mg/dl);
- Azotemia (mg/dl);
- Sodiemia (mEq/l);
- Kalemia (mEq/l);
- Calcemia (mg/dl);
- Fosforemia (mg/dl);
- Colesterolo LDL (mg/dl);
- Colesterolo HDL (mg/dl);
- Trigliceridi (mg/dl).

Il valore della creatininemia è stato utilizzato per il calcolo della VFG attraverso la formula CKD-EPI.

Gli stessi valori ematochimici sono stati presi in considerazione anche per il gruppo dei controlli, per i quali è stato posto un valore

accettabile di creatininemia tale da fornire un valore di VFG > 60ml/min/1,73².

Gli esami delle urine invece sono stati effettuati solamente per i pazienti con IRC e sono stati valutati i seguenti parametri:

- pH urine;
- Peso specifico (PS) urine.

Meriva[®]

Meriva[®] è una formulazione brevettata di curcumina di Indena S.p.A. La formulazione è caratterizzata dalla presenza di curcumina e lecitina di soia in un rapporto 1:2, alla quale vengono aggiunte anche due parti di cellulosa microcristallina per aumentare la fluidità, con un totale contenuto di curcumina corrispondente al 20% del prodotto.

Meriva[®] si basa sulla strategia Phytosome[®] di Indena, la quale ha lo scopo di migliorare la biodisponibilità di composti come i polifenoli e gli acidi triterpenici, che sono normalmente caratterizzati da scarsa solubilità sia in acqua che in solventi organici. La curcumina, come la maggior parte dei composti fenolici dietetici, è poco solubile sia in acqua che in solventi oleosi, ma presenta dei gruppi polari che possono interagire per mezzo di legami idrogeno e interazioni polari con dei gruppi complementari, come le teste polari dei fosfolipidi. Dunque, la lecitina di soia, che possiede una testa altamente polarizzata, con la carica negativa sul gruppo fosfato e la carica positiva sul gruppo ammonio della colina, può essere formulata con una grande varietà di composti fenolici scarsamente solubili, inclusa la curcumina. I composti fenolici come la curcumina, mostrano un'alta affinità per le membrane biologiche e, una volta formulati con

fosfolipidi, risultano inclusi in una matrice lipidica che può favorire il rapido scambio di fosfolipidi tra le membrane biologiche e i fluidi extracellulari, trasportandoli all'interno delle membrane biologiche e aumentandone la captazione cellulare.¹⁸³

La comparazione di studi di farmacocinetica ha messo in evidenza come Meriva® aumenti la biodisponibilità di curcumina di circa 30 volte.¹⁸⁴

La dose consigliata per la supplementazione è di 1g/die.¹⁸⁴

Protocollo sperimentale

Pazienti con insufficienza renale cronica

Il protocollo sperimentale prevede, oltre al momento del reclutamento, tre visite nutrizionali a distanza di tre mesi l'una dall'altra, corrispondenti al tempo 0, al tempo 1 e al tempo 2 (T0, T1, T2), per un totale di 6 mesi.

Al momento del reclutamento ad ogni paziente viene consegnato:

- Il diario alimentare dei 3 giorni [ALLEGATO 1];
- La provetta per la raccolta del campione fecale;
- Il foglio con le istruzioni;
- Il consenso informato.

Si prevede inoltre a fissare la data della prima visita nutrizionale (T0) durante la quale il paziente consegnerà:

- Il diario alimentare dei 3 giorni, dettagliatamente compilato;
- Il campione di feci della mattina (o del giorno precedente: in caso conservare in freezer), raccolto subito dopo i 3 giorni di compilazione del diario;

- Gli esami ematochimici e delle urine più recenti;
- Il consenso informato firmato.

La nutrizionista si occuperà di:

- Compilare l'anamnesi nutrizionale (eventuali precisazioni sul diario alimentare tramite l'utilizzo dell'Atlante Scotti-Bassani) e registrare peso, altezza, circonferenza vita;
- Effettuare la BIA;
- Fornire dei consigli nutrizionali inerenti alla patologia e alla condizione specifica del paziente.

L'infermiera del reparto si occuperà di effettuare un prelievo ematico, nello specifico:

- 1 provetta per la raccolta del siero (tappo rosso);
- 3 provette per la raccolta del plasma (tappo madreperla).

Durante la prima visita nutrizionale verrà consegnata al paziente l'integrazione di curcuma, ovvero l'integratore Meriva della ditta Indena a base di curcuma in compresse. Tali compresse saranno da assumere con un po' di acqua, una compressa al mattino e una alla sera per 3 mesi.

Al termine di questi 3 mesi verrà condotta una seconda visita nutrizionale (T1), seguendo le stesse procedure della visita nutrizionale T0, al termine della quale si programmerà la terza visita nutrizionale (T2).

Gruppo controllo

Al momento del reclutamento ad ogni paziente viene consegnato:

- Il diario alimentare dei 3 giorni;
- La provetta per la raccolta del campione fecale;
- Il foglio con le istruzioni;
- Il consenso informato.

Si provvede inoltre a fissare la data della visita nutrizionale, durante la quale il paziente consegnerà:

- Diario alimentare dei 3 giorni, dettagliatamente compilato;
- Campione di feci della mattina (o del giorno precedente: in caso conservare in freezer), raccolto subito dopo i 3 giorni di compilazione del diario;
- Gli esami ematochimici più recenti;
- Il consenso informato firmato.

La nutrizionista si occuperà di:

- Compilare l'anamnesi nutrizionale (eventuali precisazioni sul diario alimentare tramite l'utilizzo dell'Atlante Scotti-Bassani) e registrare peso, altezza, circonferenza vita;
- Effettuare la BIA;

Gestione dei campioni fecali

A seguito della visita nutrizionale, nel laboratorio di Nefrologia e Nutrizione, si effettueranno:

- Stoccaggio dei campioni fecali nel freezer -20°C, indicando in modo chiaro codice paziente e tempo di raccolta;

- In un secondo momento: divisione del campione fecale in 5 aliquote da circa 200mg (da 190 a 210 mg) sotto cappa chimica e stoccaggio sempre nel freezer -20°C raccogliendoli negli appositi contenitori con griglia.

Valutazione dello stato infiammatorio

A seguito della visita nutrizionale la provetta contenente siero ed EDTA e le tre provette contenenti il plasma vengono conservate in attesa di essere centrifugate. Al termine dell'operazione di centrifuga e di aliquotazione si ottiene quanto descritto di seguito:

- Dal campione contenente siero e EDTA si ottengono quattro provette denominate OX che verranno utilizzate per la valutazione dello stress ossidativo;
- Dal campione contenente plasma si ottengono due provette denominate INF che verranno utilizzate per la valutazione dello stato infiammatorio e due provette denominate METAB per lo studio metabolomico.

Su ognuna delle provette ottenute vengono indicati il codice del paziente e il tempo della visita (T0, T1, T2).

Per quanto concerne la valutazione dello stato infiammatorio è stata approfondita la ricerca di IL-1 β , IL-12, IL-6, MCP-1, TNF α e IFN γ . Per fare ciò è stato utilizzato il metodo ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assays*), un tipo di test immunologico utile per quantificare il livello di un target specifico (antigene) all'interno di un campione, utilizzando uno o più anticorpi a cui è legato un enzima. Tali enzimi sono necessari alla catalizzazione delle reazioni i cui

prodotti sono colori rilevati dallo spettrofotometro, mediante la lettura calorimetrica.¹⁸⁵

Per svolgere questa analisi è stato impiegato il kit *Fluorokine® Multianalyte Profiling* (MAP) e infine è stato utilizzato l'analizzatore *Luminex® 200* per la determinazione quantitativa simultanea di più citochine umane nel plasma.

Analisi delle tossine uremiche

Per il dosaggio e l'analisi delle tossine uremiche è stata utilizzata la tecnica di cromatografia liquida con spettrometro di massa (LC-MS/MS). La LC-MS/MS è un moderno metodo di analisi capace di rilevare e quantificare le sostanze a livello di tracce. Questa tecnica offre molti vantaggi: è sensibile, efficiente e adatta a numerose applicazioni.

Nel presente studio sono state analizzate le concentrazioni di p-cresil solfato e indossil solfato presenti nel plasma dei soggetti in esame.

Le tossine uremiche sono state estratte dai campioni di plasma: prima è stata determinata la quantità totale di tossine uremiche, successivamente sono state determinate quelle libere circolanti a livello plasmatico.

- Concentrazione totale

A 100 µl di plasma sono stati aggiunti 25 µl di IS (Indoxyl 13C6 solfato 5025 µM) a cui è seguita una deproteinizzazione con 300 µl di acido formico allo 0.1% in acetonitrile. Dopo la centrifugazione (5 min, 13400 rpm), 60 µl dell'estratto pulito sono stati diluiti con 100 µl di tampone di formiato di ammonio (5mM) e 10 µl iniettati nell'apparecchio LC-MS/MS.

- Concentrazione della frazione libera

A 200 µl di plasma sono stati aggiunti 50 µl di IS (Indoxyl 13C6 solfato 5 µM in tampone di formiato di ammonio 25 mM) e successivamente centrifugati in un Vivaspin 500 30K MWCO PES per 25 minuti a 12000 rpm. L'estratto privo di proteine (200 µl) è stato prelevato in una fiala e 10 µl iniettati nell'apparecchio LC-MS/MS.

- Sistema LS-MC/MC

Il sistema analitico è costituito da un sistema HPLC Dionex 3000 UltiMate (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) accoppiato ad uno spettrometro di massa tandem AB Sciex 3200 QTRAP (Sciex, Milano, Italia) che funziona con modalità ESI negativa. I parametri dello strumento erano: CUR 30, GS1 40, GS2 50, tensione capillare - 4,5 kV e temperatura della sorgente 550 °C. La separazione cromatografica è stata ottenuta su una colonna di fluoro-fenile 1,7 µm 2,1x100 mm di Acquity UPLC CSH (Waters, USA) utilizzando come fase mobile formiato di ammonio 5 mM + 0,01% di acido formico e acetonitrile. Il programma di eluzione (%B) era 0-4 min 20-50%, 4-4,5 50-20% mantenuto fino a 10 min. La portata era di 0,35 ml/min, la colonna e la temperatura dell'autocampionatore erano 30 °C e 10 °C.

Analisi del microbiota intestinale

Per poter effettuare la valutazione del microbiota intestinale è stato prima necessario estrarne il DNA dai campioni fecali consegnati dai pazienti ad ogni visita nutrizionale.

Da ogni campione sono stati pesati tramite bilancia analitica, precedentemente tarata, circa 200 mg di feci, trasferiti in provette da centrifughe e stoccati e tenuti a -20°C. Successivamente si è provveduto all'estrazione del DNA dai campioni fecali, utilizzando il kit *PSP® Spin Stool DNA*, progettato per la purificazione rapida ed efficiente del DNA genomico e microbico da campioni di feci umane o animali freschi e congelati fino a 200 mg.

Dopo aver estratto il DNA da campione fecale, si è proceduto nella quantificazione al NanoDrop, attraverso *NanoPhotometer® NP80*. Il NanoDrop è uno spettrofotometro che permette la quantificazione dei campioni.

Su una tabella Excel sono stati riportati i seguenti parametri:

- ng/µl, che indica la concentrazione e deve essere >50,00 ng/µl;
- Assorbanza 260/280, che indica la presenza di reagenti e proteine e deve essere circa 2000;
- Assorbanza 260/230, che indica la presenza di carboidrati complessi e deve essere maggiore di 2000.

Le assorbanze rappresentano la qualità dei campioni estratti e purificati.

Il sequenziamento del genoma batterico intestinale è stato eseguito tramite la *Next Generation Sequencing (NGS)*, utilizzando il *16S™ Metagenomics Kit*. Questo kit è stato progettato per analisi rapide di campioni polibatterici ed è in grado di analizzare popolazioni

microbiche miste sequenziando 7 (V2, V3, V4, V6, V7, V8 e V9) delle 9 regioni ipervariabili del rRNA 16S batterico.

I frammenti amplificati vengono sequenziati tramite *Ion PGMTM Systems (ThermoFisher Scientific)*, successivamente analizzati tramite *Ion ReporterTM software*.

Per tale procedimento è stato utilizzato il protocollo fornito dalla ThermoFisher Scientific.¹⁸⁶

Analisi statistica

I risultati che sono riportati nel prossimo capitolo sono stati ottenuti attraverso i dati raccolti che successivamente sono stati sottoposti ad analisi di tipo statistico. Tutte le variabili prese in considerazione sono di carattere quantitativo e vengono riportate con valore medio \pm deviazione standard.

Per la descrittiva della popolazione in studio ai tempi T_0 , T_1 e T_2 è stato utilizzato il test di Normalità *Shapiro-Wilk W test for normal data*. Per il confronto tra gli esami ematochimici, antropometrici e bioimmediometrici della popolazione con IRC e il gruppo controllo sono stati eseguiti i test *Paired Ttest* per i dati parametrici e *Wilcoxon signed-rank test* per i dati non parametrici.

L'analisi delle citochine infiammatorie è stata eseguita tramite *Wilcoxon matched-pairs signed rank test (paired)* e *Mann-Whitney test (unpaired)*.

Per determinare le differenze di perossidazione lipidica dei tre momenti nella popolazione in studio sono stati utilizzati i test *Paired Ttest* e *One Way ANOVA*.

L'analisi delle tossine uremiche indossil solfato e p-cresil solfato nella popolazione in esame ai tempi T_0 , T_1 e T_2 è stata effettuata con il test statistico *One Way ANOVA*.

Per i dati relativi al microbiota intestinale è stato utilizzato il test statistico *One Way ANOVA* e *Tukey's Multiple Comparisons Test*.

Gli introiti alimentari sono stati confrontati attraverso il test *One Way ANOVA*.

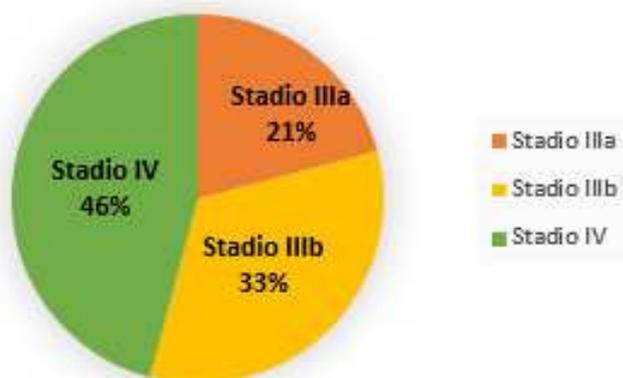
RISULTATI E DISCUSSIONE

Popolazione con insufficienza renale cronica

La popolazione arruolata per lo studio è composta da 24 pazienti (58% maschi e 42% femmine) con IRC a partire dallo stadio IIIa fino allo stadio IV e tutti sottoposti a terapia conservativa presso l'Azienda Socio Sanitaria Territoriale (A.S.S.T.) Santi Paolo e Carlo di Milano.

In figura 9 è possibile vedere come è distribuita la popolazione arruolata in base allo stadio di IRC: 21% con IRC allo stadio allo stadio IIIa, 33% allo stadio IIIb e 46% allo stadio IV.

Fig.9: *Distribuzione della malattia renale (da stadio IIIa a stadio IV) nella popolazione in studio.*



I parametri ematochimici mostrati in tabella 9, che consentono al nefrologo di valutare la funzionalità renale del paziente, sono quelli di una popolazione di pazienti IRC in terapia conservativa; in accordo con quanto atteso per i pazienti con insufficienza renale cronica, la

VFG diminuisce, mentre la creatininemia e l'azotemia aumentano rispetto ai range di riferimento per i pazienti sani.

Grazie alla terapia farmacologica utilizzata nei pazienti con l'IRC i valori ematici di sodio, potassio, fosforo e calcio risultano contenuti nei range di normalità; il valore del potassio ($4,59 \text{ mEq/l} \pm 0,66 \text{ mEq/l}$) è spostato invece verso il limite superiore del range di riferimento. Per mantenere questo valore basso è importante fornire ai pazienti dei consigli nutrizionali per ridurre l'intake di potassio, non riducendo tuttavia il consumo di fibre per evitare spiacevoli condizioni di stipsi con successivo aumento del suo assorbimento. I pazienti con IRC della nostra popolazione in esame presentano livelli plasmatici di trigliceridi e di colesterolo LDL e HDL nella norma, in quanto la metà dei soggetti assume un trattamento farmacologico con statine, che ne riducono i livelli ematici.

Tab. 9: Parametri presi in considerazione per la valutazione della funzionalità renale dei pazienti con IRC durante la visita nefrologica. I dati riportati nella tabella sono relativi al tempo T0.

	Media \pm Dev. St.	Range osservati	Range di riferimento
Età	71 \pm 12,07	[27 – 87]	
Sesso	M: 58% (n=14/24) F: 42% (n=10/24)	-	-
Creatininemia (mg/dl)	2,15 \pm 0,79	[1,26 - 4,14]	[0,66-1,25]
VFG (ml/min/1,73m²)	32,28 \pm 11,10	[17,40 - 52,80]	> 60,00
Azotemia (mg/dl)	61,33 \pm 29,42	[30,00 – 102,00]	[22,00 – 46,00]
Sodio (mEq/l)	141,81 \pm 2,74	[135,70 - 145,60]	[135,00 – 145,00]

Potassio (mEq/)	4,59 ± 0,66	[2,33 - 5,44]	[3,60 -5,20]
Fosforo (mg/dl)	3,72 ± 0,74	[2,70 - 5,53]	[2,50 - 4,50]
Calcio (mg/dl)	9,61 ± 0,46	[8,80 - 10,40]	[8,40 -10,20]
Trigliceridi (mg/dl)	122,14 ± 40,80	[41,00– 172,00]	< 150: normale 150-200: leggermente alto > 200: alto
Colesterolo LDL (mg/dl)	128,00	-	Desiderabile < 130,00
Colesterolo HDL (mg/dl)	49,00 ± 19,51	[24,00– 83,00]	[40,00 -150,00]

Dai risultati mostrati in tabella 10, si può notare una condizione generale di sovrappeso, confermata dall'indice di BMI medio della popolazione che risulta di 27,19 kg/m². A causa dei disordini metabolici dei pazienti con IRC, potremmo aspettarci una condizione di sottopeso e malnutrizione nella popolazione in esame, tuttavia studi recenti condotti su una popolazione con IRC hanno mostrato un BMI medio di 27,19 kg/m², in linea con la popolazione oggetto del mio studio.¹⁸⁷

Inoltre, come mostrato in tabella 10, il valore medio percentuale di massa grassa (FAT%) e gli elevati valori di circonferenza vita, confermano la condizione di sovrappeso della popolazione. Valori elevati di circonferenza vita (≥102 cm negli uomini e ≥88 cm nelle donne) comportano un aumento del grasso viscerale che sono dei fattori determinanti di rischio cardiovascolare e metabolico; queste condizioni risultano particolarmente in aumento nei pazienti con IRC. In particolar modo, si nota un valore medio di 102,9 cm ±10,6 cm negli uomini e di 96,6 cm ± 16,5 cm nelle donne.

Inoltre, si rileva che il 38% (n=9/24) dei pazienti della popolazione esaminata è diabetica, e ciò è in relazione al sovrappeso¹⁸⁸.

E' noto che il 65% dei pazienti con IRC è in una condizione di obesità che si evince dall'aumento della percentuale di massa grassa ottenuto attraverso la bioimpedenziometria; inoltre si evidenzia una riduzione di massa muscolare nel 22-44% dei pazienti associata a sarcopenia, condizioni che spesso coesistono.¹⁸⁹

Tab. 10: Parametri antropometrici e bioimpedenziometrici dei pazienti con IRC rilevati durante la visita nutrizionale. I dati riportati nella tabella sono relativi al tempo T0.

	Media ± Dev. St.	Range osservati
Peso (kg)	74,98 ± 13,36	[50,00 – 101,00]
Altezza (m)	1,66 ± 0,06	[1,54 – 1,79]
BMI (kg/m ²)	27,19 ± 5,42	[19,20 - 38,01]
Circonferenza vita (cm)	100,52 ± 13,86	[68,00 – 122,00]
TBW (l)	36,74 ± 5,86	[23,30 – 46,80]
ECW (l)	17,47 ± 3,09	[10,70 – 23,50]
ICW (l)	19,35 ± 3,48	[12,50 – 26,00]
LTM (%)	52,80 ± 9,63	[30,30 – 71,60]
LTM (kg)	39,07 ± 7,70	[24,9 – 51,4]
FAT (%)	32,75 ± 7,16	[18,10 – 50,10]
FAT (kg)	25,03 ± 8,43	[10,4 – 45,6]

Popolazione controllo

La popolazione di controllo è formata da 20 pazienti sani reclutati dal reparto di Oculistica dell'Ospedale San Paolo di Milano (60% maschi e 40% femmine).

In tabella 11 sono mostrati i parametri ematochimici che abbiamo raccolto.

L'età media dei pazienti è di $73 \pm 8,56$ anni, pertanto la VFG è al di sotto del valore di normalità ($80 \pm 12,16$ mL/min/1,73m²) in quanto nella fase di senescenza la funzione renale diminuisce fisiologicamente.

Tab. 11: Età, sesso, parametri ematochimici rilevati nella popolazione controllo.

	Media \pm Dev. St.	Range osservati	Range di riferimento
Età	73 \pm 8,56	[52-90]	-
Sesso	M: 60% (n=12/20) F: 40% (n=8/20)	-	-
Creatininemia (mg/dl)	0,85 \pm 0,19	[0,60-1,18]	[0,66-1,25]
VFG (ml/min/1,73m²)	81,05 \pm 12,68	[58,00-100,00]	> 60,00
Azotemia (mg/dl)	48,30	-	[22,00 – 46,00]
Sodio (mEq/l)	140,65 \pm 3,22	[137,00-151,00]	[135,00 – 145,00]
Potassio (mEq)	4,64 \pm 0,49	[4,00-5,50]	[3,60 -5,20]
Trigliceridi (mg/dl)	127,17 \pm 74,93	[67,00-270,00]	< 150: normale 150-200: leggermente alto > 200: alto
Colesterolo LDL (mg/dl)	105,00	105,00	Desiderabile <130
Colesterolo HDL (mg/dl)	51,33 \pm 19,02	[31,00-83,00]	[40,00 -150,00]

Per quanto concerne i dati antropometrici e bioimpedenziometrici (tabella12) si evince una condizione di sovrappeso evidenziata da un BMI medio di $26,1 \pm 4,77 \text{ kg/m}^2$. Questa situazione è associata ad un consumo eccessivo di grassi e zuccheri semplici, e ad un aumento della sedentarietà; infatti oltre 22 milioni e 400 mila, pari al 38,1% della popolazione non pratica attività fisica.¹⁹⁰

Si può affermare, pertanto, che popolazione di controllo è sovrapponibile a quella con IRC in termini di età, peso, altezza e BMI.

Tuttavia rispetto ai pazienti con IRC, che hanno ricevuto consigli nutrizionali, la popolazione di controllo ha seguito un regime alimentare libero.

Tab. 12: Parametri antropometrici e bioimpedenziometrici rilevati nella popolazione controllo.

	Media \pm Dev. St.	Range osservati
Peso (kg)	73,5 \pm 14,2	[47,8-104,0]
Altezza (m)	1,67 \pm 0,11	[1,46 -1,89]
BMI (kg/m^2)	26,10 \pm 4,77	[18,5-34,0]
Circonferenzavita (cm)	99,10 \pm 13,10	[71,0 - 118,0]
TBW (l)	36,90 \pm 7,80	[22,6-50,4]
ECW (l)	17,50 \pm 3,70	[11,0-23,1]
ICW (l)	19,40 \pm 4,20	[11,7-27,4]
LTM (%)	54,80 \pm 12,20	[36,8-88,4]
LTM (kg)	39,90 \pm 10,30	[23,1-58,4]
FAT (%)	31,20 \pm 9,90	[4,0-45,9]
FAT (kg)	23,20 \pm 9,30	[2,6-36,7]

Popolazione con IRC ai tempi T0, T1 e T2

Utilizzando il Test di Normalità *Shapiro-Wilk W test for normal data* si è ottenuto un'analisi descrittiva per mettere a confronto i pazienti con IRC all'inizio dello studio (T0), dopo 3 mesi (T1) e dopo 6 mesi (T2) di supplementazione con curcuma.

Dal tempo T0, T1 e T2 il numero dei pazienti si riduce rispettivamente di 24, 21 e 11 persone arruolate, con una percentuale di abbandono del 12,5% tra il tempo T0 e il tempo T1 e del 54% tra il tempo T0 e il tempo T2. Il motivo risiede principalmente nella tipologia della popolazione, rappresentata da pazienti di età media di $73 \pm 8,56$ anni e con diverse comorbidità e difficoltà deambulatorie. Questo ha influenzato la compliance dei pazienti nel portare a termine l'impegno semestrale richiesto dal nostro studio.

Nelle tabelle 13 e 14 è sono descritti i dati ottenuti dagli esami ematochimici, i dati antropometrici e bioimpedenziometrici.

Tab. 13: Analisi descrittiva degli esami ematochimici della popolazione con IRC ai tempi T0, T1 e T2.

	NUMERO POPOLAZIONE	MEDIA DEVIAZIONE STANDARD	RANGE OSSERVATI	P-VALUE
CREATININA [MG/L] T0	24	2,15 ± 0,79	[1,26 – 4,14]	0,00879
CREATININA [MG/L] T1	21	2,26 ± 0,89	[1,20 – 3,96]	0,01585
CREATININA [MG/L] T2	11	1,93 ± 0,61	[1,20 – 3,25]	ns
VFG [ML/MIN/1,73M ²] t0	24	32,29 ± 11,10	[17,40 – 52,80]	ns
VFG [ML/MIN/1,73M ²]	21	33,01 ± 15,23	[12,00 – 69,00]	ns

t1				
VFG [ML/MIN/1,73M ²]	11	34,48 ± 11,94	[19,00 – 57,90]	ns
t2				
AZOTEMIA [MG/L] T0	6	61,33 ± 29,42	[30,00 – 102,00]	ns
AZOTEMIA [MG/L] T1	4	47,50 ± 16,52	[30,00 – 67,00]	ns
AZOTEMIA [MG/L] T2	nd	nd	Nd	-
NA [MEQ/L] t0	20	141,81 ± 2,74	[135,70 -145,60]	0,00295
NA [MEQ/L] t1	17	141,83 ± 2,80	[138,10 – 146,50]	ns
NA [MEQ/L] t2	9	142,39 ± 2,02	[139,00 – 145,40]	0,00295
K [MEQ/L] T0	21	4,59 ± 0,66	[2,33 – 5,44]	0,00132
K [MEQ/L] T1	19	4,59 ± 0,48	[3,77 – 5,69]	ns
K [MEQ/L] T2	10	4,63 ± 0,36	[4,19 – 5,44]	ns
P [MG/DL] t0	20	3,72 ± 0,74	[2,70 – 5,53]	ns
P [MG/DL] t1	15	3,91 ± 1,60	[2,70 – 9,36]	0,00003
P [MG/DL] t2	9	4,11 ± 2,02	[3,00 – 9,36]	0,00006
CA [MG/DL] T0	20	9,61 ± 0,46	[8,80 – 10,40]	ns
CA [MG/DL] T1	15	9,60 ± 0,44	[8,50 – 10,25]	ns
CA [MG/DL] T2	8	9,44 ± 0,26	[9,00 – 9,86]	ns
TG [MG/DL] T0	7	122,14 ± 40,80	[41,00 – 172,00]	ns

TG [MG/DL] T1	7	122,43 ± 31,52	[66,00 – 171,00]	ns
TG [MG/DL] T2	nd	nd	nd	-
LDL [MG/DL] t0	nd	nd	nd	-
LDL [MG/DL] t1	3	63,67 ± 48,21	[36-128]	ns
LDL [MG/DL] t2	nd	nd	nd	-
HDL [MG/DL] t0	6	49,00 ± 19,51	[24,00 – 83,00]	ns
HDL [MG/DL] t1	6	39,83 ± 13,24	[24,00 – 60,00]	ns
HDL [MG/DL] t2	3	39,67 ± 10,12	[28,00 – 46,00]	ns

Tab. 14: Analisi descrittiva dei valori antropometrici e bioimpedenziometrici della popolazione con IRC ai tempi T0, T1 e T2

	NUMERO POPOLAZIONE	MEDIA E DEVIAZIONE STANDARD	RANGE OSSERVATI	P- VALUE
PESO (KG) T0	24	74,98 ± 13,36	[50,00 – 101,00]	ns
PESO (KG) T1	20	75,36 ± 12,00	[49,00 – 98,00]	ns
PESO (KG) T2	11	75,91 ± 10,23	[61,00 – 90,00]	ns
ALTEZZA (M)	24	1,66 ± 0,06	[1,54 – 1,79]	ns
BMI (KG/M ²) t0	24	27,19 ± 5,42	[19,20 – 38,01]	ns
BMI (KG/M ²) t1	20	27,47 ± 5,03	[19,14 – 36,89]	ns
BMI (KG/M ²) t2	11	28,06 ± 5,02	[19,92 – 35,84]	ns
CIRCONFERENZA VITA (CM) T0	21	100,52 ± 13,86	[68,00 – 122,00]	ns

CIRCONFERENZA VITA (CM) T1	19	101,61 ± 11,92	[70,00 – 117,00]	ns
CIRCONFERENZA VITA (CM) T2	11	99,05 ± 13,50	[70,00 – 116,00]	ns
TBW (L) t0	24	36,74 ± 5,86	[23,30 – 46,80]	ns
TBW (L) t1	19	37,98 ± 5,37	[24,90 – 49,60]	ns
TBW (L) t2	10	40,23 ± 7,79	[32,40 – 57,40]	ns
ECW (L) T0	24	17,47 ± 3,03	[10,70 – 23,50]	ns
ECW (L) T1	19	17,94 ± 2,59	[12,00 – 23,80]	ns
ECW (L) T2	10	17,62 ± 2,44	[14,20 – 22,20]	ns
ICW (L) t0	24	19,35 ± 3,48	[12,50 – 26,00]	ns
ICW (L) t1	19	20,07 ± 3,26	[13,00 – 25,80]	ns
ICW (L) t2	10	22,60 ± 7,70	[15,80 – 42,70]	0,00063
LTM (%) T0	24	52,79 ± 9,62	[30,30 – 71,60]	ns
LTM (%) T1	19	55,78 ± 11,71	[31,00 – 75,30]	ns
LTM (%) T2	9	55,34 ± 14,11	[31,10 – 77,50]	ns
LTM (KG) T0	24	39,07 ± 7,70	[24,90 – 51,40]	ns
LTM (KG) T1	19	41,34 ± 8,31	[26,70 – 55,90]	ns
LTM (KG) T2	9	41,82 ± 9,41	[26,40 – 62,80]	ns
FAT (%) t0	24	32,75 ± 7,16	[18,10 – 50,10]	ns
FAT (%) t1	19	30,56 ± 8,11	[16,60 – 48,00]	ns

Fat (%) t2	9	31,26 ± 10,39	[15,20 – 49,30]	ns
FAT (KG) T0	24	25,03 ± 8,43	[10,40 – 45,60]	ns
FAT (KG) t1	19	23,55 ± 9,11	[9,90 – 47,10]	ns
fat (KG) t2	9	24,57 ± 10,20	[12,30 ± 41,90]	ns

Confronto tra popolazione con IRC al tempo T0 e il gruppo controllo

Nella tabella 15 viene messa in relazione la differenza tra gli esami ematochimici della popolazione con IRC al tempo T0 e il gruppo controllo, eseguito tramite *Paired T test* per i dati parametrici e *Wilcoxon signed-rank test* per i dati non parametrici. Dai dati emerge che vi è significatività statistica (p-value < 0,0001) per quanto riguarda i valori di creatininemia e di VFG, che sono rispettivamente più bassi e più alti per la popolazione controllo rispetto a quella con IRC. I dati confermano chiaramente la presenza di malattia renale nel gruppo con IRC rispetto al gruppo di controllo. Confrontando i livelli di azotemia, Na, K, TG e HDL, non vi è significatività statistica, in quanto i nostri pazienti con IRC compensano bene sia con il trattamento farmacologico che con i consigli dietetici. I lipidi plasmatici, invece, sono mantenuti nel range di riferimento dalla terapia ipocolesterolemizzante a base di statine, seguita dal 50% della popolazione.

Tab. 15: Confronto tra gli esami ematochimici della popolazione con IRC al tempo T0 e del gruppo controllo

	POPOLAZIONE T0 (N=24)	RANGE OSSERVATI	POPOLAZIONE CONTROLLO (N=20)	RANGE OSSERVATI	P- VALUE
CREATININA [MG/L]	2,15 ± 0,79	[1,26 - 4,14]	0,85 ± 0,19	[0,60-1,18]	< 0,0001
VFG[ML /MIN/1,73M ²]	32,28 ± 11,10	[17,40 - 52,80]	81,05 ± 12,68	[58,00- 100,00]	< 0,0001
AZOTEMIA [MG/L]	61,33 ± 29,42	[30,00 – 102,00]	48,30	48,30	NS
NA [MEQ/L]	141,81 ± 2,74	[135,70 - 145,60]	140,65 ± 3,22	[137,00- 151,00]	NS
K [MEQ/L]	4,59 ± 0,66	[2,33 - 5,44]	4,64 ± 0,49	[4,00-5,50]	NS
TG[MG/DL]	122,14 ± 40,80	[41,00– 172,00]	127,17 ± 74,93	[67,00- 270,00]	NS
LDL [MG/DL]	Nd	nd	nd	nd	-
HDL [MG/DL]	49,00 ± 19,51	[24,00– 83,00]	51,33 ± 19,02	[31,00- 83,00]	NS

La tabella 16 mette a confronto i valori antropometrici e bioimpedenziometrici della popolazione con IRC al tempo T0 e il gruppo controllo eseguito tramite *Paired T test* per i dati parametrici e *Wilcoxon signed-rank test* per i dati non parametrici. Non ci sono differenza da quest'analisi.

Dati presenti in letteratura evidenziano una riduzione della massa grassa e un aumento dell'acqua corporea totale negli individui con IRC rispetto ad un gruppo controllo.

L'iperidratazione, presente in IRC anche in assenza di edema visibile, è probabilmente legata ad un aumento del rapporto tra acqua extracellulare e acqua intracellulare, ed è evidente anche quando la funzionalità renale è ancora elevata¹⁹¹. Il gruppo dei nostri

pazienti con IRC presentano una percentuale di acqua totale corrispondente al 49% del peso corporeo, sovrapponibile a quella del gruppo controllo corrispondente al 50%. Bisogna considerare che in un adulto sano, il rapporto tra acqua extracellulare (ECW) e acqua intracellulare (ICW) è di 1:2: questo valore non si evidenzia nei nostri pazienti con IRC (ECW/ICW = 0,9), con un rapporto a favore dell'acqua extracellulare, ma neanche nel gruppo controllo (ECW/ICW = 0,9), pertanto non è emersa nessuna differenza statisticamente significativa tra i due gruppi. Tuttavia, bisogna tener presente che il gruppo controllo è rappresentato da soggetti anziani che molto probabilmente hanno altre patologie coesistenti, come l'ipertensione.

Tab. 16: Confronto tra i valori antropometrici e bioimpedenziometrici della popolazione con IRC al tempo T0 e del gruppo controllo

	Popolazione IRC T0 (n=24)	Range osservati	Popolazione controllo (n=20)	Range osservati	P-value
Peso (kg)	74,98 ± 13,36	[50,00 – 101,00]	73,5 ± 14,2	[47,8-104,0]	Ns
Altezza (m)	1,66 ± 0,06	[1,54 – 1,79]	1,67 ± 0,11	[1,46-1,89]	Ns
BMI (kg/m ²)	27,19 ± 5,42	[19,20 - 38,01]	26,1 ± 4,77	[18,50 -34,00]	Ns
Circonferenza vita (cm)	100,52 ± 13,86	[68,00 – 122,00]	99,10±13,10	[71,00 - 118,00]	Ns
TBW (l)	36,74 ± 5,86	[23,30 – 46,80]	36,90± 7,80	[22,60 -50,40]	Ns
ECW (l)	17,47 ± 3,09	[10,70 – 23,50]	17,50± 3,70	[11,00 -23,10]	Ns
ICW (l)	19,35 ± 3,48	[12,50 – 26,00]	19,40± 4,20	[11,70 -27,40]	Ns
LTM (%)	52,80 ± 9,63	[30,30 – 71,60]	54,80± 12,20	[36,80 -88,40]	Ns
LTM (kg)	39,07 ± 7,70	[24,90 – 51,40]	39,90 ± 10,30	[23,10 -58,40]	Ns
FAT (%)	32,75 ± 7,16	[18,10 – 50,10]	31,20± 9,90	[4,00 -45,90]	Ns

FAT (kg)	25,03 ± 8,43	[10,40 – 45,60]	23,20± 9,30	[2,60 -36,70]	Ns
----------	--------------	-----------------	-------------	---------------	----

Confronto tra la popolazione con IRC al tempo T0 e al tempo T1

La tabella 17 confronta gli esami ematochimici della popolazione con IRC al tempo T0 e al tempo T1 eseguito tramite *Paired T test* per i dati parametrici e *Wilcoxon signed-rank test* per i dati non parametrici. Non emerge alcuna differenza significativa dopo tre mesi. I risultati potrebbero dipendere da una buona compensazione della malattia, sia dal punto di vista nefrologico che dal punto di vista dietetico.

Tab. 17: Confronto tra gli esami ematochimici della popolazione con IRC al tempo T0 e al tempo T1

	POPOLAZIONE E T0 (N=21)	RANGE OSSERVATI	POPOLAZIONE E T1 (N=21)	RANGE OSSERVATI	P- VALU E
CREATININA [MG/L]	2,22 ± 0,82	[1,42 – 4,14]	2,25 ± 0,88	[1,20 – 3,96]	NS
VFG [ML/MIN/1,73M ²]	31,57 ± 11,66	[17,40 ± 52,80]	33,01 ± 15,23	[12,00 – 69,00]	NS
AZOTEMIA [MG/L]	45,00 ± 18,24	[30,00 – 102,00]	47,50 ± 16,05	[30,00 – 67,00]	NS
NA [MEQ/L]	141,74 ± 2,86	[135,70 – 145,60]	141,83 ± 2,27	[138,10 – 146,50]	NS
K [MEQ/L]	4,53 ± 0,69	[2,33 – 5,44]	4,59 ± 0,48	[3,77 – 5,69]	NS
P [MG/DL]	3,74 ± 0,78	[2,70 ± 5,53]	3,91 ± 1,60	[2,70 – 9,36]	NS
CA [MG/DL]	9,55 ± 0,41	[8,80 – 10,25]	9,60 ± 0,44	[8,50 – 10,25]	NS
TG [MG/DL]	140,75 ± 24,02	[114,00 – 172,00]	122,43 ± 31,52	[66,00– 171,00]	NS

LDL [MG/DL]	Nd	nd	nd	nd	-
HDL[MG/DL]	42,20 ± 11,37	[24,00 – 54,00]	39,83 ± 13,24	[24,00–60,00]	NS

In tabella 18 sono descritti i valori antropometrici e bioimpedenziometrici della popolazione con IRC al tempo T0 e al tempo T1 eseguito tramite *Paired T test* per i dati parametrici e *Wilcoxon signed-rank test* per i dati non parametrici. Dai dati emerge una riduzione significativa della massa grassa (p-value < 0,0001), mostrato sia dal valore espresso in percentuale (FAT % 33,50 ± 7,21 vs 30,56 ± 8,11) che dal valore espresso in kg (FAT kg 26,31 ± 8,45 vs 23,55 ± 9,11). Tuttavia, dal valore di BMI di 27,47 ± 5,02, si evince che la popolazione risulta ancora in sovrappeso. Dalla tabella si può inoltre notare un trend di miglioramento della composizione corporea in termini di aumento della massa magra e una lieve diminuzione del valore di BMI. Questi dati sono in linea con quanto si evince dalla letteratura, per quanto concerne il ruolo protettivo della massa muscolare in relazione alla prognosi della patologia, che presenta outcome negativi in caso di sarcopenia.¹⁹²

Pertanto, nei primi tre mesi, grazie alla supplementazione di curcuma ed al counseling nutrizionale, i pazienti hanno mostrato effetti positivi in termini di una significativa riduzione della massa grassa ed un trend in aumento della massa magra.

In letteratura non sono presenti dati relativi a cambiamenti nella composizione corporea in pazienti con IRC supplementati con curcuma.

Tab. 18: Confronto tra i valori antropometrici e bioimpedenziometrici della popolazione con IRC al tempo T0 e al tempo T1

	POPOLAZIONE NE T0 (N=21)	RANGE OSSERVATI	POPOLAZIONE NE T1 (N=21)	RANGE OSSERVATI	P- VALU E
PESO (KG)	76,96 ± 11,77	[50,0 – 101,0]	75,36 ± 12,00	[49,00 – 98,00]	Ns
BMI (KG/M ²)	28,09 ± 5,16	[19,43 – 38,01]	27,47 ± 5,02	[19,14 – 36,89]	Ns
CIRCONFERENZA VITA (CM)	102,56 ± 13,10	[68,0 – 120,0]	101,60 ± 11,92	[70,00 – 117,00]	Ns
TBW (L)	37,37 ± 5,13	[23,30 – 44,60]	37,98 ± 5,37	[24,90 – 49,60]	Ns
ECW (L)	17,74 ± 2,74	[10,70 – 23,50]	17,94 ± 2,66	[12,00 – 23,80]	Ns
ICW (L)	19,62 ± 3,17	[12,50 – 26,00]	22,07 ± 3,26	[13,00 – 25,80]	Ns
LTM (%)	51,95 ± 9,69	[30,30 – 71,60]	55,78 ± 11,71	[31,00 – 75,30]	Ns
LTM (KG)	39,58 ± 7,54	[24,90 – 51,40]	41,34 ± 8,30	[26,70 – 55,90]	Ns
FAT (%)	33,50 ± 7,21	[18,10 – 50,10]	30,56 ± 8,11	[16,60 – 48,00]	< 0,0001
FAT (KG)	26,31 ± 8,45	[10,40 – 45,60]	23,55 ± 9,11	[9,90 – 47,10]	< 0,0001

Confronto tra la popolazione con IRC al tempo T0 e al tempo T2

La tabella 19 e la tabella 20 mettono a confronto, rispettivamente, gli esami ematochimici, e i valori antropometrici e bioimpedenziometrici al tempo T0 e al tempo T2 della popolazione con IRC, eseguiti tramite *Paired T test* per i dati parametrici e *Wilcoxon signed-rank test* per i dati non parametrici. Non sono state rilevate differenze statisticamente significative. I dati, tuttavia si possono valutare

positivamente poiché i parametri sono rimasti all'interno dei range di riferimento senza nessun peggioramento. Si può osservare un trend in diminuzione della massa grassa e in aumento della massa magra. Pertanto, sembrerebbe che i pazienti della nostra popolazione abbiano beneficiato, anche nel secondo semestre, della supplementazione di curcuma e dei consigli nutrizionali forniti durante la visita migliorando la loro composizione corporea.

Tab. 19: Confronto tra gli esami ematochimici della popolazione con IRC al tempo T0 e al tempo T2

	POPOLAZIONE E T0 (N=11)	RANGE OSSERVATI	POPOLAZIONE E T2 (N=11)	RANGE OSSERVATI	P- VALU E
CREATININA [MG/L]	1,98 ± 0,55	[2,98 – 1,42]	1,93 ± 0,61	[1,20 – 3,25]	NS
VFG [ML/MIN/1,73M ²]	34,17 ± 11,22	[21,9 – 52,8]	34,48 ± 11,94	[19,00 – 57,90]	NS
AZOTEMIA [MG/L]	nd	Nd	nd	nd	-
NA [MEQ/L]	141,89 ± 1,84	[139 – 144,1]	142,39 ± 2,02	[139,00 – 145,40]	NS
K [MEQ/L]	4,69 ± 0,48	[3,83 – 5,44]	4,63 ± 0,36	[4,19 – 5,44]	NS
P [MD/DL]	3,66 ± 0,84	[3,00 – 5,53]	4,10 ± 2,02	[3,00 – 9,36]	NS
CA [MG/DL]	9,54 ± 0,41	[9,3 – 10,23]	9,44 ± 0,26	[9,00 – 9,86]	NS
TG[MG/DL]	nd	Nd	nd	nd	-
LDL [MG/DL]	nd	Nd	nd	nd	-
HDL[MG/DL]	nd	Nd	nd	nd	-

Tab. 20: Confronto tra i valori antropometrici e bioimpedenziometrici della popolazione IRC al tempo T0 e al tempo T2

	POPOLAZIONE NE T0 (N=11)	RANGE OSSERVATI	POPOLAZIONE NE T2 (N=11)	RANGE OSSERVATI	P- VALU E
PESO (KG)	76,14 ± 11,50	[57,5 – 91,0]	75,91 ± 10,23	[61,00 – 90,00]	Ns
BMI (KG/M ²)	28,18 ± 5,63	[19,43 – 35,55]	28,05 ± 5,02	[19,91 – 35,84]	Ns
CIRCONFERENZA VITA (CM)	98,00 ± 14,39	[68,0 – 116,0]	99,04 ± 13,50	[70,00 – 116,00]	Ns
TBW (L)	36,91 ± 3,20	[32,90 – 42,30]	40,23 ± 7,79	[32,40 – 57,40]	Ns
ECW (L)	17,73 ± 2,50	[16,90 – 23,50]	17,62 ± 2,60	[14,20 – 22,20]	Ns
ICW (L)	19,25 ± 1,54	[16,70 – 22,80]	22,60 ± 7,70	[15,80 – 42,70]	Ns
LTM (%)	51,13 ± 13,24	[30,30 – 71,60]	55,34 ± 14,11	[31,10 – 77,50]	Ns
LTM (KG)	38,86 ± 5,48	[27,60 – 48,40]	41,82 ± 9,41	[26,40 – 62,80]	Ns
FAT (%)	33,89 ± 9,87	[18,10 – 50,10]	31,26 ± 10,39	[15,20 – 49,30]	Ns
FAT (KG)	27,11 ± 10,80	[12,3 – 45,6]	24,57 ± 10,20	[12,30 – 41,90]	Ns

Confronto tra la popolazione con IRC al tempo T2 e il gruppo controllo

La tabella 21 confronta gli esami ematochimici della popolazione con IRC al tempo T2 e il gruppo controllo eseguito tramite *Paired T test* per i dati parametrici e *Wilcoxon signed-rank test* per i dati non parametrici.

Anche in questo caso è emersa una significatività statistica (p-value < 0,0001) per valori di creatininemia e VFG, rispettivamente più alti e più bassi nel gruppo con IRC.

Emerge anche come i livelli di sodio siano più elevati, ma comunue nei range di riferimento, con una significatività statistica (p-value = 0,0295) nel gruppo con IRC.

Questo dato mette in evidenza quanto sia importante nei pazienti con IRC la prescrizione di una dieta iposodica, per controllare la pressione arteriosa e rallentare la progressione della patologia renale; infatti, l'eccesso di sodio può agire indipendentemente da altri fattori, riducendo, ad esempio la VFG.

Tab. 21: Confronto tra gli esami ematochimici della popolazione con IRC al tempo T2 e del gruppo controllo

	POPOLAZIONE IRC T2 (N=12)	RANGE OSSERVATI	POPOLAZIONE CONTROLLO (N=20)	RANGE OSSERVATI	P-VALUE
CREATININA [MG/L]	1,93 ± 0,61	[1,20 – 3,25]	0,85 ± 0,19	[0,60-1,18]	<0,0001
VFG [ML/MIN/1,73M ²]	34,48 ± 11,94	[19,00 – 57,90]	81,05 ± 12,68	[58,00-100,00]	<0,0001
AZOTEMIA [MG/L]	nd	Nd	Nd	nd	-
NA [MEQ/L]	142,39 ± 2,02	[139,00 – 145,40]	140,65 ± 3,22	[137,00-151,00]	0,0295
K [MEQ/L]	4,63 ± 0,36	[4,19 – 5,44]	4,64 ± 0,49	[4,00-5,50]	NS
TG [MG/DL]	144,00 ± 38,18	[117,00– 171,00]	127,17 ± 74,93	[67,00-270,00]	NS
LDL [MG/DL]	nd	nd	nd	nd	-
HDL [MG/DL]	39,67 ± 10,12	[28,00– 46,00]	51,33 ± 19,02	[31,00-83,00]	NS

Nella tabella 22 è riportato il confronto tra i valori antropometrici e bioimpedenziometrici della popolazione con IRC al tempo T2 e il gruppo controllo eseguito tramite *Paired T test* per i dati parametrici

e *Wilcoxon signed-rank test* per i dati non parametrici. Non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra i due gruppi. Nell'arco dei sei mesi, dunque, i parametri relativi alla composizione corporea sono rimasti simili a quelli del gruppo controllo.

Tab. 22: Confronto tra i valori antropometrici e bioimpedenziometrici della popolazione con IRC al tempo T2 e del gruppo controllo

	POPOLAZIONE T2 (N=12)	RANGE OSSERVATI	POPOLAZIONE CONTROLLO	RANGE OSSERVATI	P- VALUE
PESO (KG)	75,91 ± 10,23	[61,00 – 90,00]	73,5 ± 14,2	[47,8-104,0]	ns
ALTEZZA (M)	1,66 ± 0,06	1,54 – 1,79	1,67 ± 0,11	[1,46-1,89]	ns
BMI (KG/M ²)	28,05 ± 5,02	[19,91 – 35,84]	26,1 ± 4,77	[18,5-34,0]	ns
CIRCONFERENZA VITA (CM)	99,04 ± 13,50	[70,00 – 116,00]	99,10 ± 13,10	[71,0 – 118,0]	Ns
TBW (L)	40,23 ± 7,79	[32,40 – 57,40]	36,9 ± 7,8	[22,6-50,4]	Ns
ECW (L)	17,62 ± 2,60	[14,20 – 22,20]	17,5 ± 3,7	[11,0-23,1]	Ns
ICW (L)	22,60 ± 7,70	[15,80 – 42,70]	19,4 ± 4,2	[11,7-27,4]	Ns
LTM (%)	55,34 ± 14,11	[31,10 – 77,50]	54,8 ± 12,2	[36,8-88,4]	Ns
LTM (KG)	41,82 ± 9,41	[26,40 – 62,80]	39,9 ± 10,3	[23,1-58,4]	Ns
FAT (%)	31,26 ± 10,39	[15,20 – 49,30]	31,2 ± 9,9	[4,0-45,9]	Ns
FAT (KG)	24,57 ± 10,20	[12,30 – 41,90]	23,2 ± 9,3	[2,6-36,7]	Ns

Confronto dello stato infiammatorio tra tempi T0 e T1 e tempi T1 e T2

Nelle tabelle 23 e 24 è mostrato il confronto dello stato infiammatorio tra i tempi T0 e T1 (n = 21) e i tempi T0 e T2 (n = 11), mentre la distribuzione delle citochine è rappresentata nelle immagini 10 e 11. Si può notare che, tra il tempo T0 e il tempo T1, si ha una riduzione statisticamente significativa della concentrazione di CCL-2 da 105,28 FI ± 56,83 FI a 87,74 FI ± 50,26 FI (p-value = 0,0127). Per quanto

riguarda le citochine IL-1 β , IL-6, IL-18, IL-12p70 e TNF- α non sono emerse differenze significative.

La **CCL2** o MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) è una citochina proinfiammatoria implicata in alcune patologie quali la sclerosi multipla, l'artrite reumatoide, il diabete insulino-resistente e l'aterosclerosi. Questa citochina è implicata, nel processo di aterosclerosi, richiamando i macrofagi nelle cellule endoteliali e contribuendo alla formazione della placca aterosclerotica, condizione predisponente allo sviluppo di altre patologie cardiovascolari, comorbidità e cause di aumento della mortalità tipiche dei pazienti con IRC.^{193,194}

In una review del 2010 è riportato che la concentrazione ematica di CCL2 aumenta nei pazienti con IRC¹⁹³ ; in modelli murini, è stato dimostrato l'effetto della curcuma nel migliorare e proteggere la funzione renale poichè determina una riduzione dell'espressione genica di tale citochina.^{175,195,196}

Inoltre, riduzioni dei livelli plasmatici di CCL2, sono stati evidenziati, in seguito a supplementazione con curcuma, in ratti con obesità associata a diabete insulino-resistente^{197,198} ed in pazienti con sindrome metabolica¹⁹⁹.

Tutto ciò è conforme alla riduzione significativa (da 105,28 FI \pm 56,83 FI a 87,74 FI \pm 50,26 FI) della citochina CCL2 nella nostra popolazione tra il tempo T0 e il tempo T1.

Invece, per quanto riguarda il confronto tra il tempo T0 e il tempo T2, si evidenzia una riduzione significativa delle citochine INF- γ (*interferone gamma*) da 14,65 FI \pm 1,46 FI a 13,91 FI \pm 1,57 FI (p-

value = 0,0352) e IL-4 (*interleuchina 4*) da 14,49 FI \pm 1,03 FI a 13,69 FI \pm 1,23 FI (p-value = 0,0156).

L'**IFN- γ** è una citochina con un importante ruolo nell'omeostasi tissutale, nella risposta immunitaria e infiammatoria ed è in grado di attivare i macrofagi per avviare una risposta pro-infiammatoria e provocare resistenza macrofagica ai fattori antinfiammatori.²⁰⁰

In alcuni studi condotti sui topi si è visto che le cellule NK (*natural killer*) sono coinvolte nello sviluppo del danno renale che sta alla base dell'IRC producendo principalmente IFN- γ . Uno studio condotto nel 2017, effettuando un'analisi biotica di tessuto renale fibrotico e tessuto renale sano ha evidenziato un aumento di cellule NK e di IFN- γ nel tessuto renale fibrotico. Un ulteriore studio ha mostrato un aumento di IFN- γ in pazienti diabetici con IRC rispetto a pazienti diabetici senza IRC.^{201,202}

Inoltre, uno studio del 2014, ha evidenziato un coinvolgimento dell'IFN- γ nel determinare un'alterata riparazione e sostituzione delle cellule tubulari danneggiate, aspetto che contribuisce alla perdita nefrotica nell'IRC.²⁰³

Non sono presenti studi sull'uomo che correlano l'effetto della supplementazione di curcumina nell'uomo sui livelli di IFN- γ , ma è stata osservata una riduzione in sperimentazioni su animali.^{198,204}

L'**IL-4** è una citochina correlata principalmente nella patogenesi dell'asma, patologia con un'importante componente infiammatoria in modelli animali e nella modulazione delle IgE.^{205,206} In seguito alla somministrazione di curcumina, in alcune studi, è stata dimostrata una riduzione di questa citochina in ratti con congiuntivite allergica e con cancro.^{207,208} Una riduzione di IL-4 è stata evidenziata anche in

un trial condotto su un gruppo di 37 individui obesi, in cui sono stati somministrati curcuminoidi (500mg 2 volte/die) e piperina, per aumentarne la biodisponibilità, per quattro settimane, seguite da due settimane di wash out in cui è stata sospesa la somministrazione e da altre 4 settimane in cui è stata ripresa.²⁰⁹ Nel nostro studio la riduzione della concentrazione plasmatica di IL-4 dal tempo T0 al tempo T2 (14,49 FI \pm 1,03FI vs 13,69 FI \pm 1,23 FI; p-value= 0,0156) è pertanto in linea con i dati presenti in letteratura.

Tab 23: Confronto dei livelli di citochine al tempo T0 e al tempo T1

Analita (FI)	T0 (media +/- dev. Std)	T1 (media +/- dev. Std)	p-value
CCL-2	105,28 \pm 56,83	87,74 \pm 50,26	0.0127
IL-1b	9,49 \pm 0,68	9,53 \pm 0,55	Ns
IL-6	16,69 \pm 5,43	21,54 \pm 10,39	ns*
IL-18	107,83 \pm 33,73	103,95 \pm 28,07	Ns
IFN-γ	14,27 \pm 1,50	14,27 \pm 1,12	ns*
IL-4	13,97 \pm 1,06	13,66 \pm 0,85	Ns
IL-12p70	14,67 \pm 1,70	14,60 \pm 1,04	Ns
TNF-a	19,31 \pm 2,73	18,71 \pm 2,30	Ns

*20 campioni, eliminato un outlier

Tab 24: Confronto dei livelli di citochine al tempo T0 e al tempo T2

Analita (FI)	T0 (media +/- dev. Std)	T2 (media +/- dev. Std)	p-value
CCL-2	106,69 \pm 60,35	112,67 \pm 75,83	Ns
IL-1b	9,87 \pm 0,65	9,71 \pm 0,59	Ns
IL-6	20,97 \pm 6,13	23,13 \pm 8,92	ns*
IL-18	93,99 \pm 25,85	99,59 \pm 27,63	ns*
IFN-γ	14,65 \pm 1,46	13,91 \pm 1,57	0.0352*
IL-4	14,49 \pm 1,03	13,69 \pm 1,23	0.0156
IL-12p70	14,92 \pm 1,70	14,60 \pm 1,04	Ns
TNF-a	19,11 \pm 3,32	19,11 \pm 2,32	Ns

*10 campioni, eliminato un outlier

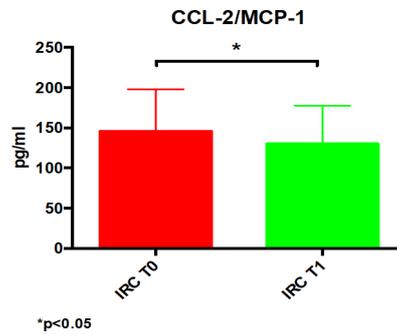


Fig. 10: Distribuzione della citochina CCL2 nella popolazione con IRC al tempo T0 e al tempo T1.

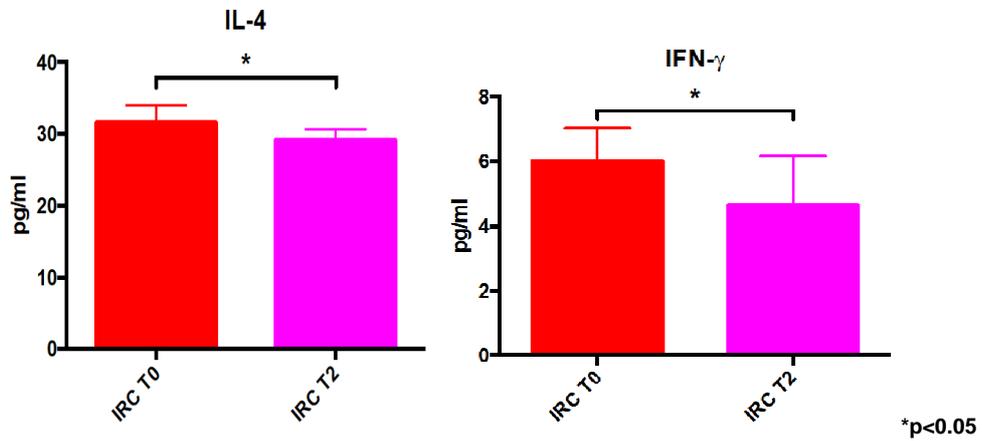


Fig. 11: Distribuzione delle citochine IFN- γ e IL-4 nella popolazione con IRC al tempo T0 e al tempo T2.

Effetto della curcumina sulle tossine uremiche

A causa della perdita progressiva di funzionalità renale, nei pazienti a cui è stata diagnosticata insufficienza renale, le tossine uremiche si

accumulano a livello plasmatico e raggiungono concentrazioni molto elevate. Questi composti tossici sono un vero pericolo per l'organismo poiché conducono ad uno stato di stress ossidativo, disbiosi e aumentano il rischio di mortalità. Le analisi condotte durante lo studio includono anche il dosaggio delle tossine uremiche, attraverso la tecnica di cromatografia liquida con spettrometro di massa (LC-MS/MS). Sono state esaminate le concentrazioni plasmatiche delle due principali tossine che contribuiscono alla progressione della malattia: indossil solfato e p-cresil solfato tra i pazienti della popolazione in esame ai tempi T₀, T₁ e T₂. Di seguito due tabelle riassuntive delle concentrazioni osservate.

Tabella 25. Valori plasmatici di indossil solfato nella popolazione in studio ai tempi T₀, T₁ e T₂.

Indossil Solfato (IS)	Media ± SDT T₀	Media ± SDT T₁	Media ± SDT T₂
Totale (µM)	18,50 ±12,00	22,70 ±19,44	17,10 ±10,87
Free (µM)	8,10 ±6,92	12,00 ±10,36	6,30 ±5,28
Ratio (%)	43,36±26,72	51,48±28,64	37,42±31,85

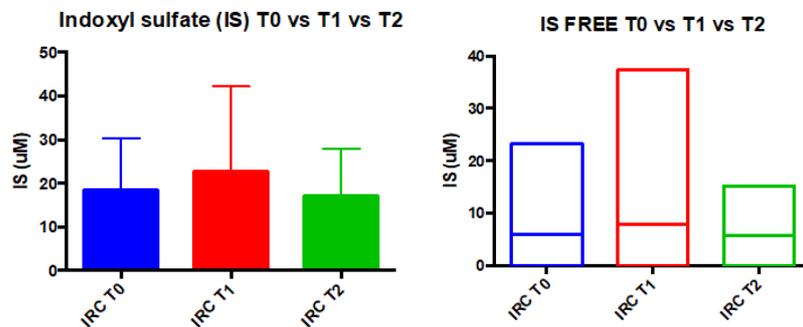
Tabella 26. Valori plasmatici di p-cresil solfato nella popolazione in studio ai tempi T₀, T₁ e T₂.

P-cresil solfato (PCS)	Media ± SDT T₀	Media ± SDT T₁	Media ± SDT T₂
Totale (µM)	262,90 ±200,19	240,19±166,67	229,10±144,95
Free (µM)	14,00 ±17,75	13,02±16,06	9,13±8,98

Ratio (%)	3,91±3,02	4,47±4,82	3,72±2,45
------------------	-----------	-----------	-----------

L'indossil solfato (IS) e il p-cresil solfato (PCS), prodotti dai microrganismi del colon a partire dagli amminoacidi alimentari, sono direttamente responsabili della progressione della malattia renale e dell'aumento del rischio cardiovascolare. Infatti, essi alimentano diversi processi all'interno del nostro organismo che coinvolgono il sistema cardiovascolare: inducono disfunzione endoteliale, aumentano la sintesi di collagene e sono implicati nella calcificazione vascolare. Oltre a ciò, in elevate concentrazioni sono in grado di scatenare la risposta infiammatoria e favoriscono la produzione di ROS. A livello del tessuto renale, IS e PCS portano allo sviluppo di fibrosi tubulo-interstiziale e danno renale.

Da questa prima analisi condotta sulle tossine uremiche, non ci sono stati dei risultati statisticamente significativi dovuti all'azione della curcumina sui livelli di IS e PCS.



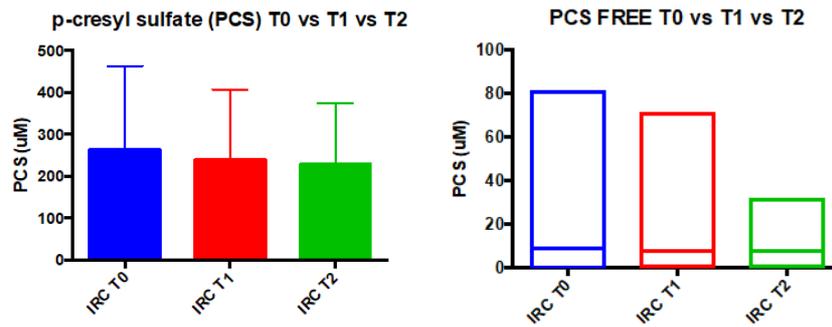


Figura 12. Confronto del dosaggio plasmatico di indossil solfato (IS) e p-cresil solfato (PCS) totali e liberi nella popolazione in studio ai tempi T₀(IRC T0), T₁(IRC T1), T₂(IRC T2).

Ciò su cui è bene soffermarsi è il fatto che, come non c'è una diminuzione, non si verifica nemmeno un trend di aumento, che solitamente è visibile al progredire della malattia verso gli stadi più avanzati. Questo dato conferma, insieme agli esami ematochimici, una stabilità positiva della patologia che non mostra peggioramenti.

Analisi del microbiota intestinale

Nei pazienti con IRC, già dai primi stadi della patologia, si manifesta uno stato di alterazione della flora batterica intestinale nota come disbiosi.

Pertanto, per comprendere meglio questo fenomeno, sono stati utilizzati i campioni fecali dei pazienti con IRC e del gruppo controllo ed è stata effettuata l'analisi del microbiota intestinale. In particolar modo, abbiamo analizzato la distribuzione dei phyla batterici e delle famiglie batteriche confrontando i dati dei tre tempi T0, T1 e T2, tra di loro e con quelli del gruppo controllo.

Inseguito, calcolando l'indice di Shannon, è stato possibile analizzare l' α -diversità del microbiota intestinale della popolazione con IRC ai tre tempi, T0, T1 e T2, relativi allo studio e al gruppo di controllo.

Phyla

Per quanto riguarda i phyla *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria*, l'analisi statistica non ha evidenziato nessuna relazione statisticamente significativa, sia tra il gruppo IRC e il gruppo controllo, sia tra i tre tempi T0, T1 e T2.

L'immagine 13 rappresenta la distribuzione dei phyla nel gruppo controllo e nella popolazione IRC ai diversi tempi dello studio.

In tabella 27 è mostrata l'analisi statistica effettuata tramite *Ordinary one-way ANOVA* e *Tukey's Multiple Comparisons Test*, mentre l'immagine 14 mostra i grafici relativi all'analisi effettuata.

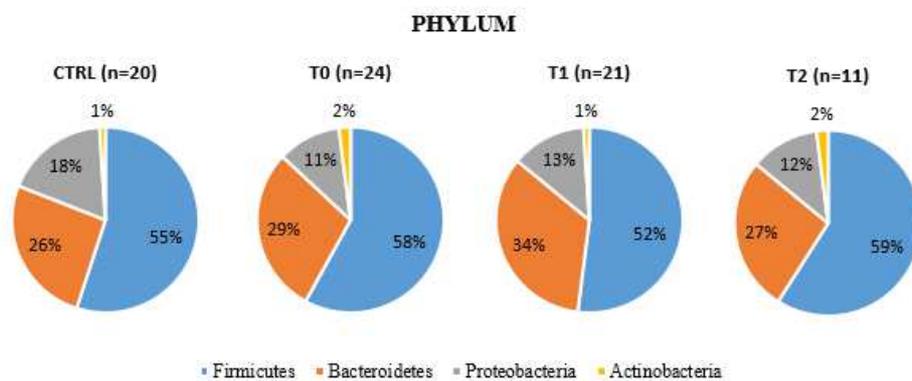


Fig. 13: Distribuzione percentuale dei diversi Phyla nel gruppo controllo e nel gruppo IRC nei tre tempi T0, T1, T2

Tab 27 Confronto dell'abbondanza dei Phyla batterici tra gruppo controllo e gruppo con IRC e tra i tempi T0, T1 e T2.

Phyla	CTRL (n=20)	IRC T0 (n=24)	IRC T1 (n=21)	IRC T2 (n=11)	p-value
Firmicutes	54,83 ± 19,37	58,25 ± 15,61	52,10 ± 12,36	58,46 ± 17,71	n.s.
Bacteroidetes	25,84 ± 13,74	28,63 ± 13,82	33,56 ± 10,56	27,23 ± 14,76	n.s.
Proteobacteria	18,06 ± 21,27	10,54 ± 11,48	12,78 ± 13,48	12,23 ± 16,85	n.s.
Actinobacteria	1,09 ± 1,24	2,18 ± 2,60	1,35 ± 1,32	1,95 ± 2,53	n.s.

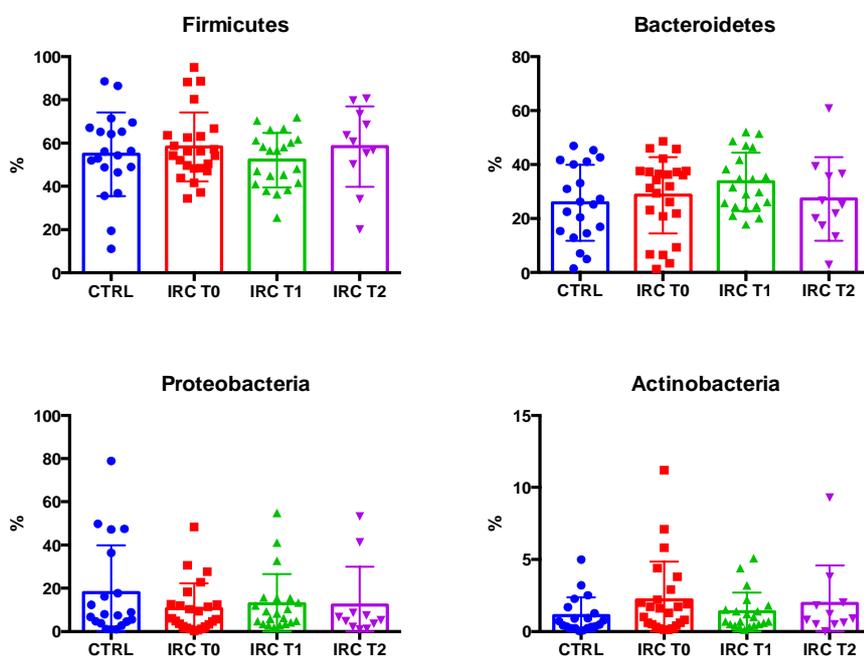


Fig 14: Distribuzione dei phyla batterici nel gruppo controllo e nella popolazione con IRC ai tempi T0, T1 e T2

Tra i tre tempi, abbiamo individuato delle differenze statisticamente significative per tutti i phyla presi in esame solo per quanto riguarda i singoli pazienti, ma i risultati ottenuti non sono sovrapponibili tra i vari pazienti. E' importante sottolineare che nel nostro campione di pazienti esiste una grande variabilità inter-individuale che potrebbe avere influenzato questi risultati. Nella tabella 28 è riportata l'analisi statistica (*RM One-way ANOVA e Tukey's test* per comparazioni multiple), mentre l'immagine 15 rappresenta la distribuzione intra-individuale dei Phyla batterici.

Tab 28: Confronto dell'abbondanza dei Phyla batterici a livello intra-individuale tra il tempo T0, T1 e T2.

Phyla	IRC T0 (n=11)	IRC T1 (n=11)	IRC T2 (n=11)	p-value
Firmicutes	58,25 ± 15,61	52,10 ± 12,36	58,46 ± 17,71	0,009
Bacteroidetes	28,63 ± 13,82	33,56 ± 10,56	27,23 ± 14,76	0,012
Proteobacteria	10,54 ± 11,48	12,78 ± 13,48	12,23 ± 16,85	0,0019
Actinobacteria	2,18 ± 2,60	1,35 ± 1,32	1,95 ± 2,53	0,0274

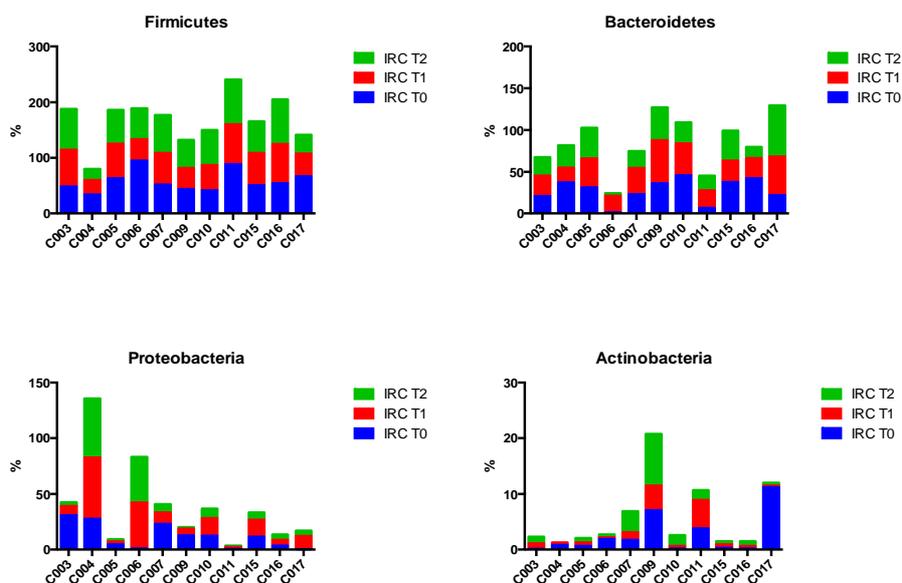


Fig. 15: Distribuzione intra-individuale dei phyla batterici nei pazienti con IRC. I differenti colori blu, rosso e verde rappresentano rispettivamente il tempo T0, T1 e T2.

In letteratura è noto che i pazienti con IRC presentano un aumento dell'abbondanza del phylum *Bacteroidetes* e una riduzione del phylum *Firmicutes* rispetto alla popolazione generale della stessa età.²¹⁰

Inoltre, è stato rilevato anche un aumento dei phyla *Bacteroidetes* (42,32%) e *Proteobacteria* (9,74%) e una diminuzione di *Firmicutes* (46,4%) nel microbiota intestinale di pazienti con IRC rispetto alla popolazione di controllo, in cui si rileva il 4,4% di *Proteobacteria*, il 26,79% di *Bacteroidetes* e il 67,23% di *Firmicutes*.^{144,210,211}

Una riduzione di *Firmicutes* e un aumento di *Bacteroidetes*, in generale, possono essere associati ad un regime alimentare povero

di grassi, invece un aumento dei *Proteobacteria* è associato ad una condizione di disbiosi e disordini metabolici.^{211,212}

Nella popolazione oggetto del nostro studio si può osservare un trend in diminuzione dei *Firmicutes* e un trend in aumento dei *Bacteroidetes* tra il tempo T0 e il tempo T1, mentre tra il tempo T1 e il tempo T2 si assiste ad un aumento dei *Firmicutes* e ad una diminuzione dei *Bacteroidetes*, riportando i valori simili a quelli del tempo T0. Bisognerebbe comprendere se, dai diari alimentari dei tre giorni da noi forniti, vi siano modifiche nell'apporto dietetico di grassi. I *Proteobacteria*, invece, aumentano tra il tempo T0 e il tempo T1 e diminuiscono poco tra il tempo T1 e il tempo T2.

Si potrebbe pensare che l'iniziale aumento di questo phylum sia associato alla condizione patologica dei pazienti, mentre la successiva diminuzione sia correlata ad un effetto positivo della supplementazione di curcuma, visibile dopo sei mesi: una somministrazione prolungata oltre i sei mesi potrebbe darci informazioni aggiuntive.

Famiglie

La tabella 29 e i grafici relativi nell'immagine 16 mostrano l'analisi statistica (*Ordinary one-way ANOVA* e *Tukey's Multiple Comparisons Test*) delle famiglie *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Prevotellaceae*, *Bacteroidaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Rikenellaceae*, *Veillonellaceae*, *Streptococcaceae*, *Acidaminococcaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Desulfovibrionaceae* e

Coriobacteriaceae che non ha mostrato nessuna relazione statisticamente significativa, sia tra il gruppo IRC e il gruppo controllo, sia tra i tre tempi T0, T1 e T2.

Si può notare che, dal grafico nella figura 16, la famiglia delle *Prevotellaceae*, si presenta con un trend in aumento tra i tempi T0, T1 e T2.

In letteratura, confrontando i pazienti con IRC e i pazienti sani, si evidenzia una diminuzione delle *Prevotellaceae* per il gruppo con patologia.¹⁴³

Le *Prevotellaceae* sono batteri che producono il butirrato dalla fermentazione dei carboidrati complessi. Il butirrato è un acido grasso a catena corta riscontrabile in individui che seguono una dieta ricca di fibre, le quali spesso risultano invece ridotte nella dieta per IRC.¹⁴³

Possiamo quindi ipotizzare che i pazienti con IRC abbiano aumentato il loro consumo di fibre nella dieta, come da noi consigliato, per poter prevenire la stipsi, spostando il metabolismo del microbiota intestinale verso la via saccarolitica, a sfavore della via protolitica che porta alla produzione di tossine uremiche, nemiche per la progressione della patologia.

I dati presenti in letteratura sull'effetto della supplementazione con curcumina mostrano una riduzione dell'abbondanza di *Prevotellaceae* nei topi, mentre non ci sono ancora dati sull'uomo.²¹³

Tab 29: Confronto dell'abbondanza delle famiglie batteriche tra gruppo controllo e gruppo con IRC e tra i tempi T0, T1 e T2.

Famiglia batterica	CTRL (n=20)	IRC T0 (n=24)	IRC T1 (n=21)	IRC T2 (n=11)	p-value
Lachnospiraceae	23,08 ± 10,87	22,12 ± 9,61	21,21 ± 8,77	22,36 ± 13,07	n.s.
Ruminococcaceae	15,77 ± 10,25	17,45 ± 10,31	15,54 ± 8,46	17,99 ± 7,93	n.s.
Prevotellaceae	1,85 ± 4,27	5,00 ± 8,07	8,96 ± 12,30	10,03 ± 16,74	n.s.
Bacteroidaceae	16,35 ± 12,10	13,28 ± 9,54	14,60 ± 8,59	9,27 ± 6,39	n.s.
Enterobacteriaceae	0,07 ± 0,10	8,62 ± 11,44	9,63 ± 13,48	10,01 ± 17,47	n.s.
Porphyromonadaceae	3,14 ± 2,61	3,44 ± 2,10	3,84 ± 2,11	3,45 ± 3,53	n.s.
Rikenellaceae	2,27 ± 3,54	3,50 ± 3,70	2,26 ± 1,77	2,03 ± 1,83	n.s.
Veillonellaceae	3,14 ± 7,07	2,10 ± 2,57	1,60 ± 2,13	2,81 ± 2,44	n.s.
Streptococcaceae	0,58 ± 0,76	1,94 ± 2,72	1,83 ± 2,80	1,25 ± 1,42	n.s.
Acidaminococcaceae	1,35 ± 2,11	1,12 ± 1,63	1,32 ± 2,14	0,37 ± 0,53	n.s.
Bifidobacteriaceae	0,58 ± 0,82	1,18 ± 1,59	0,72 ± 1,02	1,17 ± 2,38	n.s.
Lactobacillaceae	0,10 ± 0,16	0,19 ± 0,28	0,13 ± 0,21	0,36 ± 0,67	n.s.
Erysipelotrichaceae	0,78 ± 1,44	1,44 ± 2,18	1,14 ± 1,24	0,74 ± 0,63	n.s.
Desulfovibrionaceae	0,63 ± 0,69	0,60 ± 0,57	0,99 ± 0,91	0,83 ± 1,05	n.s.
Coriobacteriaceae	0,50 ± 0,99	0,89 ± 1,01	0,55 ± 0,48	0,75 ± 0,87	n.s.

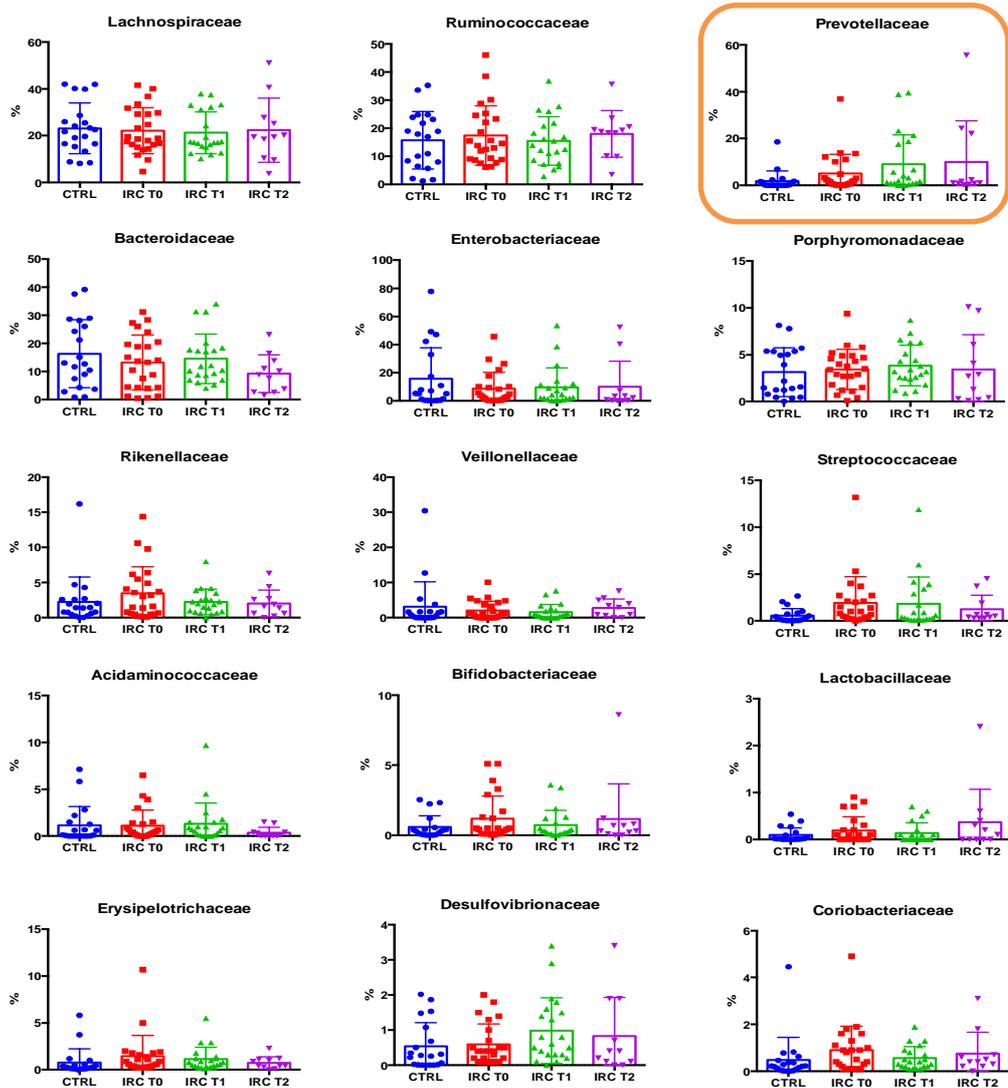


Fig 16: Distribuzione delle famiglie batteriche nel gruppo controllo e nella popolazione con IRC ai tempi T0, T1 e T2. In evidenza, nel riquadro, il grafico relativo alla famiglia delle Prevotellaceae

Si sono osservate delle differenze statisticamente significative tra i tre tempi a livello individuale per le famiglie *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Prevotellaceae* e *Bacteroidaceae*, ma anche in questo caso i cambiamenti non sono sovrapponibili tra i vari pazienti e non interpretabili in maniera uniforme. La tabella 30 mostra il riassunto dell'indagine statistica (RM One-way ANOVA e Tukey's test per comparazioni multiple, mentre l'immagine 17 mostra i grafici rappresentanti la distribuzione intra-individuale delle famiglie batteriche.

Tab30: Confronto dell'abbondanza delle famiglie batteriche a livello intra-individuale tra il tempo T0, T1 e T2.

Famiglia batterica	IRC T0 (n=11)	IRC T1 (n=11)	IRC T2 (n=11)	p-value
<i>Lachnospiraceae</i>	22,12 ± 9,61	21,21 ± 8,77	22,36 ± 13,07	0,0002
<i>Ruminococcaceae</i>	17,45 ± 10,31	15,54 ± 8,46	17,99 ± 7,93	n.s.
<i>Prevotellaceae</i>	5,00 ± 8,07	8,96 ± 12,30	10,03 ± 16,74	0,0009
<i>Bacteroidaceae</i>	13,28 ± 9,54	14,60 ± 8,59	9,27 ± 6,39	0,0089
<i>Enterobacteriaceae</i>	8,62 ± 11,44	9,63 ± 13,48	10,01 ± 17,47	0,0005
<i>Porphyromonadaceae</i>	3,44 ± 2,10	3,84 ± 2,11	3,45 ± 3,53	n.s.
<i>Rikenellaceae</i>	3,50 ± 3,70	2,26 ± 1,77	2,03 ± 1,83	n.s.
<i>Veillonellaceae</i>	2,10 ± 2,57	1,60 ± 2,13	2,81 ± 2,44	n.s.
<i>Streptococcaceae</i>	1,94 ± 2,72	1,83 ± 2,80	1,25 ± 1,42	n.s.
<i>Acidaminococcaceae</i>	1,12 ± 1,63	1,32 ± 2,14	0,37 ± 0,53	n.s.
<i>Bifidobacteriaceae</i>	1,18 ± 1,59	0,72 ± 1,02	1,17 ± 2,38	n.s.
<i>Lactobacillaceae</i>	0,19 ± 0,28	0,13 ± 0,21	0,36 ± 0,67	n.s.
<i>Erysipelotrichaceae</i>	1,44 ± 2,18	1,14 ± 1,24	0,74 ± 0,63	n.s.
<i>Desulfovibrionaceae</i>	0,60 ± 0,57	0,99 ± 0,91	0,83 ± 1,05	n.s.

Coriobacteriaceae	0,89 ± 1,01	0,55 ± 0,48	0,75 ± 0,87	n.s.
--------------------------	-------------	-------------	-------------	------

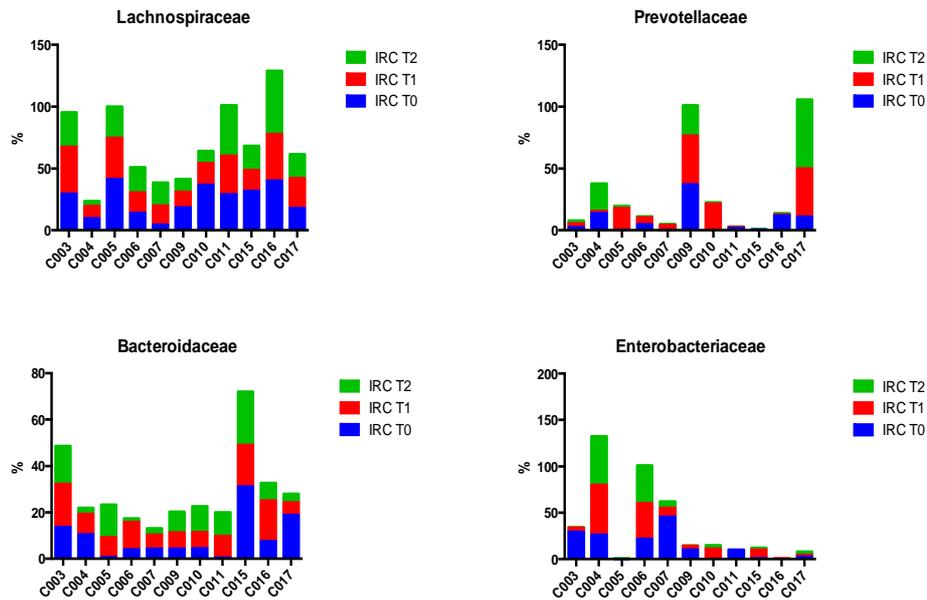


Fig. 17: Distribuzione intra-individuale delle famiglie batteriche nei pazienti con IRC. I differenti colori blu, rosso e verde rappresentano rispettivamente il tempo T0, T1 e T2

In letteratura si evidenzia una diminuzione di *Lactobacillaceae*, *Bifidobacteriaceae* e *Prevotellaceae*¹⁴⁴ ed aumento di *Enterobacteriaceae* in pazienti con IRC.^{144,214}

La famiglia delle *Lactobacillaceae* sono coinvolte nella degradazione della mucina, garantendo l'integrità funzionale della mucosa intestinale; le *Bifidobacteriaceae* contribuiscono alla fermentazione dei substrati non digeriti producendo butirrato e sono anche legate al mantenimento dell'omeostasi intestinale e alla protezione della barriera intestinale.²¹⁵⁻²¹⁷ Per quanto riguarda invece le

Enterobacteriaceae sono correlate ad un aumento dello stato infiammatorio e ad un maggior grado di disbiosi.^{144,214}

Dai nostri risultati si evince una riduzione di *Lactobacillaceae* e di *Bifidobacteriaceae* tra il tempo T0 e il tempo T1 ed un trend in aumento dal tempo T1 al tempo T2. Invece, per quanto riguarda le *Enterobacteriaceae* sono in aumento dal tempo T0 al tempo T2, tuttavia l'aumento dal tempo T1 al tempo T2 è minore rispetto ai primi tre mesi. Sarebbe interessante verificare l'effetto della supplementazione di curcuma sull'andamento di queste famiglie per un periodo più lungo per valutare l'eventuale effetto positivo sull'equilibrio e l'omeostasi del microbiota intestinale.

Indice di Shannon

L'indice di Shannon rappresenta l' α -diversità, ovvero la diversità di specie all'interno del campione. L'Indice di Shannon è una metrica che pondera il numero di specie in base ai loro dati di uniformità relativa. I valori di questo indice risultano tipicamente compresi tra 1,5 e 4, raramente maggiore a 5. L'indice di Shannon, aumenta all'aumentare della ricchezza e della regolarità della comunità.²¹⁸

Le analisi statistiche (*One-way ANOVA* e *Tukey's Multiple Comparisons Test*) per l'indice di Shannon hanno evidenziato una significatività comparando la popolazione controllo e IRC T0 (p-value = 0,0183) e tra la popolazione controllo e IRC T1 (p-value = 0,0385) a livello di famiglia. In tabella 29 e nell'immagine 17 sono riportati e rappresentati i dati di questa analisi statistica.

Il valore ottimale dell'indice di Shannon che indica una buona α -diversità è intorno a 3,5; i nostri dati evidenziano un indice di Shannon inferiore nei controlli rispetto alla popolazione con IRC, indicando un maggiore stato di disbiosi nella popolazione di controllo (2,78), rispetto alla popolazione IRC T0 (3,16) e T1 (3,15). Anche mettendo a confronto la popolazione dei controlli con quella IRC T2, l'indice di Shannon al tempo T2 (2,97) risulta maggiore di quello dei controlli; tuttavia questo dato non è statisticamente significativo.

Dalle ipotesi da noi effettuate, ci si aspettava di rilevare un minor indice di Shannon per la popolazione IRC, dal momento che la disbiosi intestinale è una conseguenza della patologia. Tuttavia, bisogna tener presente che la popolazione controllo ha un'età media di 73 anni e, la presenza di altre patologie, seppur differenti da quella renale, potrebbero incidere sulla composizione del microbiota intestinale.

Abbiamo poi confrontato IRC T0 vs IRC T2 ed è emerso che vi è una diminuzione dell'indice di Shannon medio nell'arco dei sei mesi (da 3,16 a 2,97), che risulta in disaccordo con i dati precedentemente analizzati. La condizione di disbiosi della popolazione con IRC dal tempo T0 al tempo T2, conferma l'alterazione del microbiota intestinale tipica dei pazienti con malattia renale cronica.

Tab. 31: Turkey's multiple comparisons test per la comparazione degli indici di Shannon tra le diverse popolazioni T0, T1, T2 e controllo

	Media 1	Media 2	Diff. medie	p-value
CTRL vs. IRC T0	2,78	3,16	-0,3783	0,0183
CTRL vs. IRC T1	2,78	3,15	-0,37	0,0385
CTRL vs. IRC T2	2,78	2,97	-0,1927	n.s.
IRC T0 vs. IRC T1	3,16	3,15	0,008333	n.s.
IRC T0 vs. IRC T2	3,16	2,97	0,1856	n.s.
IRC T1 vs. IRC T2	3,15	2,97	0,1773	n.s.

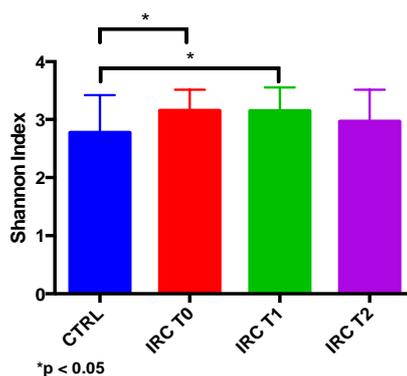


Fig. 18: Analisi dell'indice di Shannon nella popolazione IRC T0, T1, T2 e controllo.

CONCLUSIONI

In questo studio abbiamo studiato la correlazione tra lo stato nutrizionale, infiammatorio e la composizione del microbiota intestinale nei pazienti con IRC. Utilizzando la supplementazione con curcuma, in modo particolare per 3 o 6 mesi di assunzione, abbiamo valutato i possibili effetti di questo integratore alimentare sui marcatori infiammatori e sul microbiota intestinale.

Nello studio sono stati arruolati in totale 24 pazienti con insufficienza renale cronica (dallo stadio IIIa allo stadio IV) e 20 soggetti controllo che non presentavano patologie renali. I 24 pazienti con IRC hanno assunto una formulazione brevettata di curcumina di Indena S.p.A., per un periodo di 6 mesi.

I parametri d'interesse del nostro studio sono stati valutati sia all'inizio dello studio (T0), momento in cui i pazienti non assumono la curcumina, dopo tre mesi di trattamento con curcumina (T1) ed infine dopo sei mesi (T2) dello stesso trattamento con l'integratore.

La popolazione con patologia renale e quella utilizzata come controllo sono omogenee per età, sesso, peso, altezza e BMI. In modo particolare, sia la popolazione con IRC che quella di controllo sono in sovrappeso.

In letteratura si evidenzia un rischio di mortalità per patologie cardiovascolari maggiore in pazienti con IRC con valori di BMI corrispondenti a condizioni di sovrappeso, obesità di I grado e

obesità di II grado, rispetto a valori compresi tra 18,5 kg/m² e 24,9 kg/m².²¹⁹

L'analisi bioimpedenziometrica, relativa alla composizione corporea, ha mostrato una riduzione della massa grassa (p-value < 0,0001), oltre che un miglioramento in termini di aumento della massa magra e una lieve diminuzione del BMI dal tempo T0 al tempo T1, e anche tra il tempo T1 e il tempo T2.

La tendenza di questi dati risulta positiva in quanto la letteratura riporta come una buona percentuale di massa magra sia associata ad una riduzione della mortalità, mentre una sua deplezione sia legata a prognosi più negative.

Per quanto riguarda l'analisi dei parametri ematochimici, nonostante un aumento del valore della sodiemia (p-value = 0,0295) tra il gruppo con IRC al tempo T2 e il gruppo controllo, possiamo affermare che tutti i parametri ematochimici relativi a Na, P, K e Ca rimangono entro i range di normalità per l'intera durata dello studio.

Questi dati sono indice di una buona compensazione della malattia, sia dal punto di vista farmacologico che dietetico; infatti, i pazienti con IRC hanno ricevuto indicazioni personalizzate relative alla gestione dietetica della patologia a seconda del proprio stadio di progressione.

I valori di trigliceridi, HDL e LDL sono sempre risultati nella norma, infatti il 50% dei pazienti in esame assume una terapia ipocolesterolemizzante.

In questo studio abbiamo valutato il fenomeno alla base della malattia renale cronica, ovvero l'infiammazione. Sono state valutate, quindi, le concentrazioni di citochine pro-infiammatorie a livello

sierico (CCL2, IL-1 β , IL-6, IL-18, IFN- γ , IL-4, IL-12p70, TNF- α) ed è emerso che, dopo tre mesi di trattamento, i livelli di CCL2 si sono ridotti in maniera statisticamente significativa (p-value = 0,0127), mentre dopo sei mesi di trattamento si sono ridotti in modo statisticamente significativo anche i valori di IFN- γ (p-value = 0,0352) e IL-4 (p-value = 0,0156), e questo ci consente di confermare l'ipotesi dell'effetto antinfiammatorio della supplementazione di curcumina, descritto ampiamente anche nella letteratura scientifica.

L'analisi effettuata sulle tossine uremiche, che si accumulano nel paziente con IRC e determinano stress ossidativo e disbiosi, non ha mostrato risultati statisticamente significativi della curcumina sui livelli di IS e PCS; tuttavia le tossine uremiche restano stabili durante tutto il progredire della patologia renale. Bisogna valutare se questo effetto positivo potrebbe essere determinato dall'utilizzo dell'integratore alimentare oggetto dello studio.

Essendo il paziente con malattia renale cronica caratterizzato da una condizione di disbiosi, è stato studiato il microbiota intestinale della nostra popolazione con IRC, attraverso analisi semi-quantitativa del sequenziamento dell'RNA ribosomiale 16S (rRNA).

Sono state condotte analisi sia a livello dei phylum che delle famiglie; sono stati confrontati i tre tempi T0, T1 e T2 tra di loro e con il gruppo controllo. Dalle analisi, non non ci sono stati dati statisticamente significativi, ma abbiamo osservato un trend in aumento delle *Prevotellaceae*, che si associa ad un buon consumo di fibre da parte della popolazione con IRC, probabilmente attenta ai nostri consigli nutrizionali. Abbiamo evidenziato, inoltre, trend potenzialmente positivi per quanto riguarda l'abbondanza delle altre famiglie:

Lactobacillaceae, *Bifidobacteriaceae* e *Enterobacteriaceae*. In particolar modo si è visto un aumento delle *Lactobacillaceae* e *Bifidobacteriaceae*, legato ad un maggiore stato di equilibrio microbico intestinale, dal tempo T0 al tempo T2 ed una diminuzione nella velocità di aumento delle *Enterobacteriaceae*, legato invece ad uno stato di disbiosi, tra il tempo T1 e il tempo T2.

L'analisi dell' α -diversità effettuata comparando gli indici di Shannon ottenuti per le popolazioni in esame (p -value = 0,0385), mostrano risultati statisticamente significativi comparando il gruppo controllo e il gruppo T0 (p -value=0,0183) e anche il gruppo controllo e il gruppo T2. Inaspettatamente, il gruppo controllo ha mostrato una condizione di disbiosi più elevata rispetto al gruppo con IRC, legata probabilmente alle patologie correlate all'anzianità del nostro gruppo controllo.

L'aumento dell'incidenza dell'IRC è legato soprattutto all'invecchiamento generale della popolazione e al conseguente invecchiamento del rene, insieme alla presenza di altre patologie: malattie cardiovascolari, obesità e sindrome metabolica. L'età media elevata della nostra popolazione (71 anni) ha messo in evidenza i limiti dello studio che avrebbero contribuito a determinare la bassa compliance riscontrata nell'assunzione di curcumina e la bassa motivazione nel proseguire lo studio per l'intera durata dello studio. Infatti, la percentuale di abbandono del 54% tra il tempo T0 e il tempo T2 ha contribuito ad abbassare ulteriormente la numerosità del campione. Per comprendere meglio i dati ottenuti dall'analisi tassonomica del microbiota intestinale, sono in corso studi che mirano a mettere in relazione l'intake nutrizionale con le

caratteristiche della composizione del microbiota del paziente con IRC. Questi studi potrebbero spiegarci meglio il trend in aumento delle *Prevotellaceae*, precedentemente citato, e altri cambiamenti nell'abbondanza dei *Firmicutes* e dei *Bacteroidetes* tra i tre tempi, oltre che confermare l'attenzione da noi ipotizzata prestata dai pazienti con IRC nei confronti della dieta.

ALLEGATI

ALLEGATO 1

DIARIO DEI CONSUMI ALIMENTARI

Nome _____ Cognome _____ Sesso M
F

Indirizzo

Tel.

Luogo _____ di _____ Nascita _____

Età _____ Peso _____ Altezza _____

Data consegna diario _____

Numero cartella _____

DATA RACCOLTA FECI:

Istruzioni per la compilazione del diario

Il diario deve essere compilato per 3 giorni non consecutivi di cui 2 feriali e 1 festivo.

Gentile Signore, cortese Signora, chiediamo la sua preziosa collaborazione nel compilare il diario alimentare qui allegato. Il diario è stato previsto per 3 giorni così da tenere conto anche dell'alimentazione del week-end. In esso è necessario riportare tutto ciò che viene consumato (alimenti e bevande). Le consigliamo di tenerlo sempre con se e di compilarlo appena possibile per non dimenticare nessun alimento (dovrebbe infatti essere compilato immediatamente dopo il consumo di cibo).

Il diario è diviso in occasioni alimentari (colazione, spuntino di metà mattina, pranzo, merenda, cena, dopo cena); questo con lo scopo di aiutarla a ricordare ciò che ha consumato nel caso in cui non abbia potuto trascrivere gli alimenti al momento del consumo.

E' fondamentale specificare il tipo e la quantità del cibo o della bevanda consumata pesando le porzioni e riportando la grammatura nell'apposito spazio riservato (indicare se il peso è riferito all'alimento crudo o cotto, se possibile meglio pesare tutto a crudo).

Non dimenticare di riportare sul diario i "fuori pasto" quali caramelle, cioccolatini, gelati, ghiaccioli, aperitivi, dolci e snack di vario genere.

Al momento della consegna lo rileggeremo insieme e nel caso avesse riscontrato qualche difficoltà nella quantificazione di alcuni alimenti, cercheremo di risolverla.

Istruzioni necessarie per una corretta compilazione del diario alimentare

1. Registrare i cibi e le bevande con il loro nome abituale;
2. Precisare se il cibo è fresco, in scatola, congelato, essiccato, condensato, evaporato, affumicato, sott'olio, sott'aceto... e se viene consumato crudo bollito, arrostito, fritto, alla griglia etc..
3. Precisare ogni altra informazione utile per determinare il valore nutritivo di ogni cibo consumato (ad esempio indicare il nome commerciale del cibo e delle bevande)
4. Registrare separatamente su ogni rigo il cibo consumato;

2. **SPUNTINO** Luogo di consumo

Descrizione alimenti

Peso in gr o porzione

(indicare anche quantità di zucchero o dolcificante)

3. **PRANZO** Luogo di consumo

Descrizione alimenti

Peso in gr o porzione

Pane

Primo piatto

Secondo piatto

Contorno

Frutta e/o dessert

Bevande

Caffé sì no Zucchero _____
Dolcificante _____

4. **MERENDA** Luogo _____ di _____ consumo

Descrizione alimenti

Peso in gr o porzione

(indicare anche quantità di zucchero o dolcificante)

5. **CENA** Luogo di consumo

Descrizione alimenti

Peso in gr o porzione

Pane

Primo piatto

Secondo piatto

Contorno

Frutta e/o dessert

Bevande

Caffé sì no Zucchero _____
Dolcificante _____

6. **DOPO CENA** Luogo di consumo

Descrizione alimenti

Peso in gr o porzione

(indicare anche quantità di zucchero o dolcificante)

2° GIORNO

Data e giorno della settimana: ____/

____/____

7. COLAZIONE

Luogo di consumo

Descrizione alimenti

Peso in gr o porzione

(indicare anche quantità di zucchero o dolcificante)

8. **SPUNTINO** Luogo di consumo

Descrizione alimenti

Peso in gr o porzione

(indicare anche quantità di zucchero o dolcificante)

<hr/>	<hr/>
<hr/>	<hr/>
<hr/>	<hr/>

9. **PRANZO** Luogo di consumo

Descrizione alimenti

Peso in gr o porzione

Pane

<hr/>	<hr/>
<hr/>	<hr/>
<hr/>	<hr/>

Primo piatto

<hr/>	<hr/>
<hr/>	<hr/>
<hr/>	<hr/>

Secondo piatto

Contorno

Frutta e/o dessert

Bevande

Caffé sì no Zucchero _____
Dolcificante _____

10. **MERENDA** Luogo di consumo

Contorno

Frutta e/o dessert

Bevande

Caffé sì no Zucchero _____
Dolcificante _____

12. **DOPO CENA** Luogo di consumo

Descrizione alimenti

Peso in gr o porzione

(indicare anche quantità di zucchero o dolcificante)

14. **SPUNTINO** Luogo di consumo

Descrizione alimenti

Peso in gr o porzione

(indicare anche quantità di zucchero o dolcificante)

15. **PRANZO** Luogo di consumo

Descrizione alimenti

Peso in gr o porzione

Pane

Primo piatto

Secondo piatto

Contorno

Frutta e/o dessert

Bevande

Caffé sì no Zucchero _____
Dolcificante _____

16. **MERENDA** Luogo di consumo

Descrizione alimenti
Peso in gr o porzione

(indicare anche quantità di zucchero o dolcificante)

_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

17. **CENA** Luogo di consumo

Descrizione alimenti	
Peso in gr o porzione	
Pane	
_____	_____
_____	_____
_____	_____
Primo piatto	
_____	_____
_____	_____
_____	_____
Secondo piatto	
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Contorno

Frutta e/o dessert

Bevande

Caffé sì no Zucchero _____
Dolcificante _____

18. **DOPO CENA** Luogo di consumo

Descrizione alimenti

Peso in gr o porzione

(indicare anche quantità di zucchero o dolcificante)

BIBLIOGRAFIA

1. KDIGO. Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int. Suppl.***3**, 1–150 (2012).
2. Fondazione italiana del rene. Perché una dieta nell'insufficienza renale cronica? (2006).
3. Fink, H. a. *et al.* Chronic Kidney Disease Stages 1 – 3: Screening , Monitoring , and Treatment. *Comp. Eff. Rev.* (2012).
4. Raccomandazioni SIN-SIBIOC e SIMEL per la valutazione del filtrato glomerulare su stime della concentrazione della creatinina plasmatica. Available at: <http://www.nephromeet.com/web/procedure/documenti.cfm?p=raccomandazioni>.
5. Heerspink, H. J. L. & Gansevoort, R. T. Albuminuria Is an appropriate therapeutic target in patients with CKD: The pro view.

- Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* (2015). doi:10.2215/CJN.11511114
6. Matovinović, M. S. 1. Pathophysiology and Classification of Kidney Diseases. *EJIFCC***20**, 2–11 (2009).
 7. Kazancioğlu, R. Risk factors for chronic kidney disease: An update. in *Kidney International Supplements* (2013). doi:10.1038/kisup.2013.79
 8. Yamagata, K. *et al.* Risk factors for chronic kidney disease in a community-based population: A 10-year follow-up study. *Kidney Int.* (2007). doi:10.1038/sj.ki.5002017
 9. Yerram, P., Karuparthi, P. R., Hesemann, L., Horst, J. & Whaley-Connell, A. Chronic kidney disease and cardiovascular risk. *Journal of the American Society of Hypertension* (2007). doi:10.1016/j.jash.2007.01.010
 10. Kwakernaak, A. J., Zelle, D. M., Bakker, S. J. L. & Navis, G. Central Body Fat Distribution Associates with Unfavorable Renal Hemodynamics Independent of Body Mass Index. *J. Am. Soc. Nephrol.***24**, 987–994 (2013).
 11. Kasper D, Braunwald E, Fauci A, Hauser S, L. D. & J., J. *HARRISON Principi di medicina interna.* (2005).
 12. Protocollo studio CARHES. Available at: http://documenti.sinitaly.org/wp-content/uploads/sites/7/2017/03/STUDIO_CARHES_SIN.pdf?x64712
 13. Hill, N. R. *et al.* Global prevalence of chronic kidney disease - A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* (2016). doi:10.1371/journal.pone.0158765
 14. 2018 USRDS ANNUAL DATA REPORT. Available at:

https://www.usrds.org/2018/download/v2_c01_IncPrev_18_usrds.pdf

15. CDC: Chronic Kidney Disease in the United States, 2019. Available at: <https://www.cdc.gov/kidneydisease/publications-resources/2019-national-facts.html>.
16. Cupisti, A. *et al.* Nutrition and physical activity in CKD patients. *Kidney and Blood Pressure Research* (2014). doi:10.1159/000355784
17. Società Italiana di Nefrologia. Linee Guida per la terapia conservativa dell'insufficienza renale cronica (SIN 2003). (2003). Available at: http://documenti.sinitaly.org/wp-content/uploads/sites/7/2017/03/2003_LG_terapiaIRC.pdf?x64712.
18. Aparicio, M. *et al.* Keto Acid Therapy in Predialysis Chronic Kidney Disease Patients: Final Consensus. *J. Ren. Nutr.* (2012). doi:10.1053/j.jrn.2011.09.006
19. Cupisti, A. *et al.* Nutritional treatment of advanced CKD: twenty consensus statements. *J. Nephrol.* (2018). doi:10.1007/s40620-018-0497-z
20. Giovannetti, S. & Maggiore, Q. A LOW-NITROGEN DIET WITH PROTEINS OF HIGH BIOLOGICAL VALUE FOR SEVERE CHRONIC URÆMIA. *Lancet* (1964). doi:10.1016/S0140-6736(64)91919-1
21. D'Alessandro, C. *et al.* 'Dietaly': Practical issues for the nutritional management of CKD patients in Italy. *BMC Nephrol.* (2016). doi:10.1186/s12882-016-0296-5
22. Bellizzi, V. *et al.* Low-protein diets for chronic kidney disease patients: The Italian experience. *BMC Nephrol.* (2016).

doi:10.1186/s12882-016-0280-0

23. Cianciaruso, B. *et al.* Effect of a Low- Versus Moderate-Protein Diet on Progression of CKD: Follow-up of a Randomized Controlled Trial. *Am. J. Kidney Dis.* (2009). doi:10.1053/j.ajkd.2009.07.021
24. Riccio, E., Di Nuzzi, A. & Pisani, A. Nutritional treatment in chronic kidney disease: the concept of nephroprotection. *Clinical and Experimental Nephrology***19**, 161–167 (2015).
25. Jee Ko, G., Obi, Y., Tortorici, A. R. & Kalantar-Zadeh, K. Dietary protein intake and chronic kidney disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care***20**, 77–85 (2017).
26. Filipowicz, R. & Beddhu, S. Optimal Nutrition for Predialysis Chronic Kidney Disease. *Advances in Chronic Kidney Disease***20**, 175–180 (2013).
27. Klahr, S. *et al.* The effects of dietary protein restriction and blood-pressure control on the progression of chronic renal disease. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *N Engl J Med* (1994). doi:10.1056/NEJM199403313301301
28. Levey, A. S. *et al.* Dietary Protein Restriction and the Progression of Chronic Renal Disease: What Have All of the Results of the MDRD Study Shown? *J. Am. Soc. Nephrol.* (1999).
29. Gluba-Brzózka, A., Franczyk, B. & Rysz, J. Vegetarian diet in chronic kidney disease—A friend or foe. *Nutrients***9**, (2017).
30. Chang, C. Y., Chang, H. R., Lin, H. C. & Chang, H. H. Comparison of Renal Function and Other Predictors in Lacto–Ovo Vegetarians and Omnivores With Chronic Kidney Disease. *J. Am. Coll. Nutr.* (2018). doi:10.1080/07315724.2018.1424588
31. S.M., M. *et al.* Vegetarian compared with meat dietary protein source

- and phosphorus homeostasis in chronic kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **6**, 257–264 (2011).
32. Kontessis, P. *et al.* Renal, metabolic and hormonal responses to ingestion of animal and vegetable proteins. *Kidney Int.* (1990). doi:10.1038/ki.1990.178
 33. Pagenkemper, J. Planning a vegetarian renal diet. *J. Ren. Nutr.* (1995). doi:10.1016/1051-2276(95)90009-8
 34. Teixeira, S. R. *et al.* Isolated Soy Protein Consumption Reduces Urinary Albumin Excretion and Improves the Serum Lipid Profile in Men with Type 2 Diabetes Mellitus and Nephropathy. *J. Nutr.* (2018). doi:10.1093/jn/134.8.1874
 35. Teixeira, S. R. *et al.* Isolated soy protein consumption reduces urinary albumin excretion and improves the serum lipid profile in men with type 2 diabetes mellitus and nephropathy. *J. Nutr.* (2004). doi:10.1093/jn/134.8.1874
 36. Azadbakht, L. & Esmailzadeh, A. Soy-Protein Consumption and Kidney-Related Biomarkers Among Type 2 Diabetics: A Crossover, Randomized Clinical Trial. *J. Ren. Nutr.* (2009). doi:10.1053/j.jrn.2009.06.002
 37. Cupisti, A., Morelli, E., Meola, M., Barsotti, M. & Barsotti, G. Vegetarian diet alternated with conventional low-protein diet for patients with chronic renal failure. *J. Ren. Nutr.* (2002). doi:10.1053/jren.2002.29595
 38. Piccoli, G. B. *et al.* Low-protein diets in CKD: How can we achieve them? A narrative, pragmatic review. *Clinical Kidney Journal* **8**, 61–70 (2015).
 39. Shah, A. P., Kalantar-Zadeh, K. & Kopple, J. D. Is There a Role for

Ketoacid Supplements in the Management of CKD? *Am. J. Kidney Dis.***65**, 659–673 (2015).

40. Aparicio, M. *et al.* Do Ketoanalogues Still Have a Role in Delaying Dialysis Initiation in CKD Predialysis Patients? *Semin. Dial.* (2013). doi:10.1111/sdi.12132
41. Garneata, L. & Mircescu, G. Effect of Low-Protein Diet Supplemented With Keto Acids on Progression of Chronic Kidney Disease. *Journal of Renal Nutrition***23**, 210–213 (2013).
42. Bellizzi, V. *et al.* Very low protein diet supplemented with ketoanalogs improves blood pressure control in chronic kidney disease. *Kidney Int.***71**, 245–251 (2007).
43. Bernard, S., Fouque, D., Laville, M. & Zech, P. Effects of Low-Protein Diet Supplemented with Ketoacids on Plasma Lipids in Adult Chronic Renal Failure. *Miner. Electrolyte Metab.***22**, (1996).
44. Di Iorio, B. R. *et al.* Supplemented very low protein diet ameliorates responsiveness to erythropoietin in chronic renal failure. *Kidney Int.***64**, 1822–1828 (2003).
45. Bagros, P., Malvy, D., Maingourd, C., Pengloan, J. & Nivet, H. Effects of Severe Protein Restriction with Ketoanalogues in Advanced Renal Failure. *J. Am. Coll. Nutr.***18**, 481–486 (1999).
46. Chauveau, P., Combe, C., Rigalleau, V., Vendrely, B. & Aparicio, M. Restricted Protein Diet Is Associated With Decrease in Proteinuria: Consequences on the Progression of Renal Failure. *J. Ren. Nutr.***17**, 250–257 (2007).
47. Bellizzi, V., Calella, P., Carrero, J. J. & Fouque, D. Very low-protein diet to postpone renal failure: Pathophysiology and clinical applications in chronic kidney disease. *Chronic Dis. Transl.*

Med.(2018). doi:10.1016/j.cdtm.2018.01.003

48. Bellizzi, V. *et al.* SP292EFFECT OF VERY LOW-PROTEIN DIET VERSUS STANDARD LOW-PROTEIN DIET ON RENAL DEATH IN PATIENTS WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE: A PRAGMATIC, RANDOMIZED, CONTROLLED, MULTICENTER TRIAL. *Nephrol. Dial. Transplant.***30**, iii476–iii476 (2017).
49. Garneata, L., Stancu, A., Dragomir, D., Stefan, G. & Mircescu, G. Ketoanalogue-Supplemented Vegetarian Very Low-Protein Diet and CKD Progression. *J. Am. Soc. Nephrol.***27**, 2164–2176 (2016).
50. Costantini, Cannella & Tomassi. *Alimentazione e Nutrizione Umana*. (Il Pensiero Scientifico Editore, 2016).
51. D'Alessandro, C. *et al.* Dietary protein restriction for renal patients: Don't forget protein-free foods. *J. Ren. Nutr.* (2013). doi:10.1053/j.jrn.2012.12.006
52. Fuad, T. & Prabhasankar, P. Role of ingredients in pasta product quality: A review on recent developments. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* (2010). doi:10.1080/10408390903001693
53. BDA-V1-2015-3 IEO.
54. Prodotti aprotici Aprotin. Available at: <https://www.efarma.com/aprotin.html>.
55. Prodotti aprotici Aminò. Available at: <https://www.lloydsfarmacia.it/marchi/aminò.html>.
56. Prodotti aprotici Flavis. Available at: <https://www.flavis.com/it/i-prodotti>.
57. Krikken, J. A., Laverman, G. U. & Navis, G. Benefits of dietary sodium restriction in the management of chronic kidney disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* (2009).

doi:10.1097/MNH.0b013e3283312fc8

58. Humalda, J. K. & Navis, G. Dietary sodium restriction: A neglected therapeutic opportunity in chronic kidney disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension***23**, 533–540 (2014).
59. Lin, J., Hu, F. B. & Curhan, G. C. Associations of diet with albuminuria and kidney function decline. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* (2010). doi:10.2215/CJN.08001109
60. Hollenberg, N. K. Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the dietary approaches to stop hypertension (DASH) diet: Editor's comments. *Current Hypertension Reports* (2001). doi:10.1007/s11906-001-0052-4
61. Becker, G. J. *et al.* Kidney disease: Improving global outcomes (KDIGO) blood pressure work group. KDIGO clinical practice guideline for the management of blood pressure in chronic kidney disease. *Kidney International Supplements* (2012). doi:10.1038/kisup.2012.46
62. Nadkarni, G. N. & Uribarri, J. Phosphorus and the Kidney: What Is Known and What Is Needed. *Adv. Nutr.* (2014). doi:10.3945/an.113.004655
63. Webster, A. C., Nagler, E. V., Morton, R. L. & Masson, P. Chronic Kidney Disease. *The Lancet* (2017). doi:10.1016/S0140-6736(16)32064-5
64. KDIGO 2017 Clinical Practice Guideline Update for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease—Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). Available at: <https://kdigo.org/wp-content/uploads/2017/02/2017-KDIGO-CKD-MBD-GL-Update.pdf>.

65. O'Seaghdha, C. M., Hwang, S. J., Muntner, P., Melamed, M. L. & Fox, C. S. Serum phosphorus predicts incident chronic kidney disease and end-stage renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* (2011). doi:10.1093/ndt/gfq808
66. Schwarz, S., Trivedi, B. K., Kalantar-Zadeh, K. & Kovesdy, C. P. Association of disorders in mineral metabolism with progression of chronic kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* (2006). doi:10.2215/CJN.02101205
67. Zoccali, C. *et al.* Phosphate May Promote CKD Progression and Attenuate Renoprotective Effect of ACE Inhibition. *J. Am. Soc. Nephrol.* (2011). doi:10.1681/asn.2011020175
68. Chue, C. D. *et al.* Serum phosphate but not pulse wave velocity predicts decline in renal function in patients with early chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* (2011). doi:10.1093/ndt/gfq787
69. Norris, K. C. *et al.* Baseline Predictors of Renal Disease Progression in the African American Study of Hypertension and Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* (2006). doi:10.1681/asn.2005101101
70. Benini, O., D'Alessandro, C., Gianfaldoni, D. & Cupisti, A. Extra-Phosphate Load From Food Additives in Commonly Eaten Foods: A Real and Insidious Danger for Renal Patients. *J. Ren. Nutr.***21**, 303–308 (2011).
71. Jones, W. Lou. Demineralization of a wide variety of foods for the renal patient. *J. Ren. Nutr.***11**, 90–96 (2001).
72. D'Alessandro, C., Piccoli, G. B. & Cupisti, A. The 'phosphorus pyramid': A visual tool for dietary phosphate management in dialysis and CKD patients. *BMC Nephrol.* (2015). doi:10.1186/1471-2369-16-9

73. Kovesdy, C. P. *et al.* Serum and dialysate potassium concentrations and survival in hemodialysis patients. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* (2007). doi:10.2215/CJN.04451206
74. De Nicola, L., Di Lullo, L., Paoletti, E., Cupisti, A. & Bianchi, S. Chronic hyperkalemia in non-dialysis CKD: controversial issues in nephrology practice. *Journal of Nephrology* (2018). doi:10.1007/s40620-018-0502-6
75. Cupisti, A., Kovesdy, C. P., D'Alessandro, C. & Kalantar-Zadeh, K. Dietary approach to recurrent or chronic hyperkalaemia in patients with decreased kidney function. *Nutrients* (2018). doi:10.3390/nu10030261
76. K/DOQI. National Kidney Foundation; Clinical practice guidelines for nutrition in chronic renal failure. *Am. J. Kidney Dis.* (2000).
77. Kalantar-Zadeh, K. & Fouque, D. Nutritional Management of Chronic Kidney Disease. *N. Engl. J. Med.* (2017). doi:10.1056/nejmra1700312
78. Agarwal, R., Afzalpurkar, R. & Fordtran, J. S. Pathophysiology of potassium absorption and secretion by the human intestine. *Gastroenterology* (1994). doi:10.1016/0016-5085(94)90184-8
79. Wenzel, U. O., Hebert, L. A., Stahl, R. A. K. & Krenz, I. My doctor said I should drink a lot! Recommendations for fluid intake in patients with chronic kidney disease. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN* (2006). doi:10.2215/CJN.01140905
80. Chan, A. M. & Johnson, D. Modification of lifestyle and nutrition interventions for management of early chronic kidney disease. *Cari Guidel.* 1–50 (2012).
81. Elia, M., Ljungqvist, O., Stratton, R. J. & Lanham-New, S. A.

- Nutrizione clinica*. (2018).
82. Salmean, Y. A. *et al.* Foods With Added Fiber Lower Serum Creatinine Levels in Patients With Chronic Kidney Disease. *J. Ren. Nutr.* (2013). doi:10.1053/j.jrn.2012.04.002
 83. Angelis, M. De *et al.* Effect of whole-grain barley on the human fecal microbiota and metabolome. *Appl. Environ. Microbiol.* (2015). doi:10.1128/AEM.02507-15
 84. Cupisti, A. *et al.* Non-traditional aspects of renal diets: Focus on fiber, alkali and Vitamin K1 intake. *Nutrients* (2017). doi:10.3390/nu9050444
 85. Krishnamurthy, V. M. R. *et al.* High dietary fiber intake is associated with decreased inflammation and all-cause mortality in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int.* (2012). doi:10.1038/ki.2011.355
 86. Toigo, G. *et al.* Expert working group report on nutrition in adult patients with renal insufficiency (part 1 of 2). *Clin. Nutr.* (2000). doi:10.1054/clnu.1999.0130
 87. Riccardi, Pacioni, Giacco & Rivellese. *Manuale di Nutrizione Applicata*. (2017).
 88. SINU. *LARN Livelli di Assunzione di Riferimento di Nutrienti ed Energia per la popolazione italiana*. (2014).
 89. Fouque, D. *et al.* A proposed nomenclature and diagnostic criteria for protein-energy wasting in acute and chronic kidney disease. in *Kidney International* **73**, 391–398 (Nature Publishing Group, 2008).
 90. Grodstein, G. P., Blumenkrantz, M. J. & Kopple, J. D. Nutritional and metabolic response to catabolic stress in uremia. *Am. J. Clin. Nutr.* (1980).
 91. Kalantar-Zadeh, K., Mehrotra, R., Fouque, D. & Kopple, J. D.

- Metabolic acidosis and malnutrition-inflammation complex syndrome in chronic renal failure. *Seminars in Dialysis* (2004). doi:10.1111/j.0894-0959.2004.17606.x
92. Kopple, J. D., Cianciaruso, B. & Massry, S. G. Does Parathyroid Hormone Cause Protein Wasting? in (2015). doi:10.1159/000384963
 93. Obi, Y., Qader, H., Kovesdy, C. P. & Kalantar-Zadeh, K. Latest consensus and update on protein-energy wasting in chronic kidney disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* (2015). doi:10.1097/MCO.0000000000000171
 94. Zha, Y. & Qian, Q. Protein nutrition and malnutrition in CKD and ESRD. *Nutrients***9**, (2017).
 95. Fujii, H., Nakai, K. & Fukagawa, M. Role of Oxidative Stress and Indoxyl Sulfate in Progression of Cardiovascular Disease in Chronic Kidney Disease. *Ther. Apher. Dial.***15**, 125–128 (2011).
 96. Massy, Z. A., Stenvinkel, P. & Drueke, T. B. The role of oxidative stress in chronic kidney disease. *Semin. Dial.***22**, 405–408 (2009).
 97. Oberg, B. P. *et al.* Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int.* (2004). doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00465.x
 98. Stockler-Pinto, M. B., Fouque, D., Soulage, C. O., Croze, M. & Mafra, D. Indoxyl Sulfate and p-Cresyl Sulfate in Chronic Kidney Disease. Could These Toxins Modulate the Antioxidant Nrf2-Keap1 Pathway? *J. Ren. Nutr.***24**, 286–291 (2014).
 99. Mutsaers, H. A. M., Stribos, E. G. D., Glorieux, G., Vanholder, R. & Olinga, P. Chronic Kidney Disease and Fibrosis: The Role of Uremic Retention Solutes. *Front. Med.***2**, (2015).
 100. Shimazu, S. *et al.* Association Between Indoxyl Sulfate and Cardiac

Dysfunction and Prognosis in Patients With Dilated Cardiomyopathy. *Circ. J.* **77**, 390–396 (2012).

101. Lin, C. J. *et al.* Indoxyl Sulfate Predicts Cardiovascular Disease and Renal Function Deterioration in Advanced Chronic Kidney Disease. *Arch. Med. Res.* (2012). doi:10.1016/j.arcmed.2012.08.002
102. Barreto, F. C. *et al.* Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* (2009). doi:10.2215/CJN.03980609
103. Dou, L. *et al.* The uremic solute indoxyl sulfate induces oxidative stress in endothelial cells. *J. Thromb. Haemost.* **5**, 1302–1308 (2007).
104. Adijiang, A., Goto, S., Uramoto, S., Nishijima, F. & Niwa, T. Indoxyl sulphate promotes aortic calcification with expression of osteoblast-specific proteins in hypertensive rats. *Nephrol. Dial. Transplant.* (2008). doi:10.1093/ndt/gfm861
105. Dou, L. *et al.* The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair. *Kidney Int.* (2004). doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00399.x
106. Cigarran Guldris, S., González Parra, E. & Cases Amenós, A. Microbiota intestinal en la enfermedad renal crónica. *Nefrologia* (2017). doi:10.1016/j.nefro.2016.05.008
107. Wing, M. R., Patel, S. S., Ramezani, A. & Raj, D. S. Gut microbiome in chronic kidney disease. *Experimental Physiology* (2016). doi:10.1113/EP085283
108. Carlo, B., Libutti, P., Teutonico, A. & Carlo, L. TOSSINE UREMICHE: IL CASO DEI “PROTEIN-BOUND COMPOUNDS”. *G. Ital. di Nefrol.* **27**, 498–507 (2010).
109. Liabeuf, S. *et al.* Free p-cresylsulphate is a predictor of mortality in

- patients at different stages of chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* (2010). doi:10.1093/ndt/gfp592
110. Meijers, B. K. I. *et al.* Free p-cresol is associated with cardiovascular disease in hemodialysis patients. *Kidney Int.* (2008). doi:10.1038/ki.2008.31
 111. Peterson, J. *et al.* The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.* (2009). doi:10.1101/gr.096651.109
 112. Yamashiro, Y. Gut Microbiota in Health and Disease. *Annals of Nutrition and Metabolism* (2018). doi:10.1159/000481627
 113. Role of microbe in carbohydrates digestion. Available at: <https://fstjournal.org/features/29-1/carbohydrate-digestion#>.
 114. Avershina, E. *et al.* Major faecal microbiota shifts in composition and diversity with age in a geographically restricted cohort of mothers and their children. *FEMS Microbiol. Ecol.* (2014). doi:10.1111/1574-6941.12223
 115. Thursby, E. & Juge, N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem. J.* (2017). doi:10.1042/bcj20160510
 116. Jakobsson, H. E. *et al.* Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by Caesarean section. *Gut* (2014). doi:10.1136/gutjnl-2012-303249
 117. Dominguez-Bello, M. G. *et al.* Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2010). doi:10.1073/pnas.1002601107
 118. Ottman, N., Smidt, H., de Vos, W. M. & Belzer, C. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Frontiers in*

cellular and infection microbiology (2012).
doi:10.3389/fcimb.2012.00104

119. Bezirtzoglou, E., Tsiotsias, A. & Welling, G. W. Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anaerobe***17**, 478–482 (2011).
120. Yu, Z. T. *et al.* The principal fucosylated oligosaccharides of human milk exhibit prebiotic properties on cultured infant microbiota. *Glycobiology***23**, 169–177 (2013).
121. David, L. A. *et al.* Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* (2014). doi:10.1038/nature12820
122. De Filippo, C. *et al.* Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2010). doi:10.1073/pnas.1005963107
123. Jandhyala, S. M. *et al.* Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* (2015). doi:10.3748/wjg.v21.i29.8787
124. Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K. & Knight, R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature***489**, 220–230 (2012).
125. Ministero della Salute. Linee Guida su probiotici e Prebiotici. (2018). Available at: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1016_allegato.pdf.
126. Scheppach, W. Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut* (1994). doi:10.1136/gut.35.1_suppl.s35
127. LeBlanc, J. G. *et al.* Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective. *Current Opinion in Biotechnology***24**, 160–168 (2013).
128. Hill, M. J. Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. in

- European Journal of Cancer Prevention* (1997).
doi:10.1097/00008469-199703001-00009
129. Morrison, D. J. & Preston, T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* (2016). doi:10.1080/19490976.2015.1134082
 130. Di Iorio, B. R. *et al.* Urea and impairment of the Gut-Kidney axis in Chronic Kidney Disease. *G. Ital. Nefrol.***34**, (2017).
 131. Holzapfel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U. & Huis In'T Veld, J. H. J. Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* (1998). doi:10.1016/S0168-1605(98)00044-0
 132. Foster, J. A. & McVey Neufeld, K. A. Gut-brain axis: How the microbiome influences anxiety and depression. *Trends in Neurosciences* (2013). doi:10.1016/j.tins.2013.01.005
 133. Mayer, E. A., Tillisch, K. & Gupta, A. Gut/brain axis and the microbiota. *Journal of Clinical Investigation* (2015). doi:10.1172/JCI76304
 134. Heijtz, R. D. *et al.* Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2011). doi:10.1073/pnas.1010529108
 135. Neufeld, K. M., Kang, N., Bienenstock, J. & Foster, J. A. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterol. Motil.* (2011). doi:10.1111/j.1365-2982.2010.01620.x
 136. Crumeyrolle-Arias, M. *et al.* Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* (2014). doi:10.1016/j.psyneuen.2014.01.014

137. Desbonnet, L., Garrett, L., Clarke, G., Bienenstock, J. & Dinan, T. G. The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat. *J. Psychiatr. Res.* (2008). doi:10.1016/j.jpsychires.2008.03.009
138. Bravo, J. A. *et al.* Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2011). doi:10.1073/pnas.1102999108
139. Sudo, N. *et al.* Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J. Physiol.* (2004). doi:10.1113/jphysiol.2004.063388
140. Wang, H. X. & Wang, Y. P. Gut microbiota-brain axis. *Chinese Medical Journal* (2016). doi:10.4103/0366-6999.190667
141. Bienenstock, J., Kunze, W. & Forsythe, P. Microbiota and the gut-brain axis. *Nutr. Rev.* (2015). doi:10.1093/nutrit/nuv019
142. Wu, M. J. *et al.* Colonic transit time in long-term dialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* (2004). doi:10.1053/j.ajkd.2004.04.048
143. Wong, J. *et al.* Expansion of urease- and uricase-containing, indole- and p-cresol-forming and contraction of short-chain fatty acid-producing intestinal microbiota in ESRD. *Am. J. Nephrol.* (2014). doi:10.1159/000360010
144. Ramezani, A. & Raj, D. S. The Gut Microbiome, Kidney Disease, and Targeted Interventions. *J. Am. Soc. Nephrol.* (2014). doi:10.1681/asn.2013080905
145. Al Khodor, S. & Shatat, I. F. Gut microbiome and kidney disease: a bidirectional relationship. *Pediatric Nephrology* (2017). doi:10.1007/s00467-016-3392-7

146. Marzocco, S. *et al.* Very low protein diet reduces indoxyl sulfate levels in chronic kidney disease. *Blood Purif.* (2013). doi:10.1159/000346628
147. M.T., R. *et al.* Very low protein diet reduces serum levels of indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate in chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* (2017). doi:10.1093/ndt/gfx148
148. Pulido-Moran, M., Moreno-Fernandez, J., Ramirez-Tortosa, C. & Ramirez-Tortosa, M. C. Curcumin and health. *Molecules* (2016). doi:10.3390/molecules21030264
149. Kocaadam, B. & Şanlıer, N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* (2017). doi:10.1080/10408398.2015.1077195
150. Esatbeyoglu, T. *et al.* Curcumin-from molecule to biological function. *Angewandte Chemie - International Edition* (2012). doi:10.1002/anie.201107724
151. Wahlström, B. & Blennow, G. A Study on the Fate of Curcumin in the Rat. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh).* (1978). doi:10.1111/j.1600-0773.1978.tb02240.x
152. Ravindranath, V. & Chandrasekhara, N. Absorption and tissue distribution of curcumin in rats. *Toxicology* (1980). doi:10.1016/0300-483X(80)90122-5
153. Suresh, D. & Srinivasan, K. Tissue distribution & elimination of capsaicin, piperine & curcumin following oral intake in rats. *Indian J. Med. Res.* (2010).
154. Shoba, G. *et al.* Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med.* (1998). doi:10.1055/s-2006-957450

155. Chen, A. L. *et al.* Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res.* (2001).
156. Vareed, S. K. *et al.* Pharmacokinetics of curcumin conjugate metabolites in healthy human subjects. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* (2008). doi:10.1158/1055-9965.EPI-07-2693
157. Schiborr, C. *et al.* The oral bioavailability of curcumin from micronized powder and liquid micelles is significantly increased in healthy humans and differs between sexes. *Mol. Nutr. Food Res.* (2014). doi:10.1002/mnfr.201300724
158. Purpura, M. *et al.* Analysis of different innovative formulations of curcumin for improved relative oral bioavailability in human subjects. *Eur. J. Nutr.***57**, 929–938 (2018).
159. Mirzaei, H. *et al.* Phytosomal curcumin: A review of pharmacokinetic, experimental and clinical studies. *Biomedicine and Pharmacotherapy***85**, 102–112 (2017).
160. Kidd, P. M. Bioavailability and activity of phytosome complexes from botanical polyphenols: The silymarin, curcumin, green tea, and grape seed extracts. *Alternative Medicine Review***14**, 226–246 (2009).
161. Marczylo, T. H. *et al.* Comparison of systemic availability of curcumin with that of curcumin formulated with phosphatidylcholine. *Cancer Chemother. Pharmacol.* (2007). doi:10.1007/s00280-006-0355-x
162. Cuomo, J. *et al.* Comparative absorption of a standardized curcuminoid mixture and its lecithin formulation. *J. Nat. Prod.* (2011). doi:10.1021/np1007262
163. Joe, B. & Lokesh, B. R. Role of capsaicin, curcumin and dietary n - 3 fatty acids in lowering the generation of reactive oxygen species in

- rat peritoneal macrophages. *BBA - Mol. Cell Res.* (1994). doi:10.1016/0167-4889(94)90198-8
164. Strimpakos, A. S. & Sharma, R. A. Curcumin: Preventive and Therapeutic Properties in Laboratory Studies and Clinical Trials. *Antioxid. Redox Signal.***10**, 511–546 (2008).
165. Jurenka, J. S. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: A review of preclinical and clinical research. *Alternative Medicine Review***14**, 141–153 (2009).
166. Soni, K. B. & Kuttan, R. Effect of oral curcumin administration on serum peroxides and cholesterol levels in human volunteers. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* (1992).
167. Venkatesan, N., Punithavathi, D. & Arumugam, V. Curcumin prevents adriamycin nephrotoxicity in rats. *Br. J. Pharmacol.* (2000). doi:10.1038/sj.bjp.0703067
168. Hatcher, H., Planalp, R., Cho, J., Torti, F. M. & Torti, S. V. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials. *Cellular and Molecular Life Sciences* (2008). doi:10.1007/s00018-008-7452-4
169. Aggarwal, B. B. & Harikumar, K. B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (2009). doi:10.1016/j.biocel.2008.06.010
170. Recio, M. C., Andújar, I. & Ríos, J. L. Anti-Inflammatory Agents from Plants: Progress and Potential. *Curr. Med. Chem.* (2012).
171. Gupta, S. C. *et al.* Downregulation of tumor necrosis factor and other proinflammatory biomarkers by polyphenols. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (2014). doi:10.1016/j.abb.2014.06.006

172. Singh, S. & Aggarwal, B. B. Activation of transcription factor NF- κ B is suppressed by curcumin (diferulolylmethane). *J. Biol. Chem.***270**, 24995–25000 (1995).
173. Cho, J. W., Lee, K. S. & Kim, C. W. Curcumin attenuates the expression of IL-1 β , IL-6, and TNF- α as well as cyclin E in TNF- α -treated HaCaT cells; NF- κ B and MAPKs as potential upstream targets. *Int. J. Mol. Med.* (2007).
174. Jin, C. Y., Lee, J. D., Park, C., Choi, Y. H. & Kim, G. Y. Curcumin attenuates the release of pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *Acta Pharmacol. Sin.* (2007). doi:10.1111/j.1745-7254.2007.00651.x
175. de Almeida Alvarenga, L. *et al.* Curcumin - A promising nutritional strategy for chronic kidney disease patients. *Journal of Functional Foods***40**, 715–721 (2018).
176. J.J., M. *et al.* The use of an anti-inflammatory supplement in patients with chronic kidney disease. *J. Complement. Integr. Med.***10**, (2013).
177. Pakfetrat, M., Akmal, M., Malekmakan, L., Dabaghimanesh, M. & Khorsand, M. Role of turmeric in oxidative modulation in end-stage renal disease patients. *Hemodial. Int.* (2015). doi:10.1111/hdi.12204
178. Shelmadine, B. D. *et al.* A Pilot Study to Examine the Effects of an Anti-inflammatory Supplement on Eicosanoid Derivatives in Patients with Chronic Kidney Disease. *J. Altern. Complement. Med.* (2017). doi:10.1089/acm.2016.0007
179. Jiménez-Osorio, A. S. *et al.* The effect of dietary supplementation with curcumin on redox status and Nrf2 activation in patients with nondiabetic or diabetic proteinuric chronic kidney disease: A pilot study. *J. Ren. Nutr.* (2016). doi:10.1053/j.jrn.2016.01.013

180. Cicero, A. F. G. *et al.* Lipid-lowering nutraceuticals in clinical practice: Position paper from an International Lipid Expert Panel. *Nutr. Rev.* (2017). doi:10.1093/nutrit/nux047
181. Ganjali, S. *et al.* Effects of curcumin on HDL functionality. *Pharmacological Research* (2017). doi:10.1016/j.phrs.2017.02.008
182. Bedogni, G. & Cecchetto, G. *Manuale ANDID di valutazione dello stato nutrizionale.* (Società Editrice Universo, 2009).
183. Phytosome.info. Available at: http://www.indena.com/pdf/meriva_int.pdf.
184. Meriva Curcumin Phytosome. Available at: http://www.indena.com/pdf/meriva_ss_int.pdf.
185. biotechne ELISA Guide. Available at: <https://resources.rndsystems.com/images/site/rnd-systems-elisa-guide-br3.pdf>.
186. Thermo Fisher Scientific. Ion 16S Metagenomics Kit. (2015). Available at: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0010799_Ion_16S_Metagenomics_UG.pdf.
187. De Nicola, L. *et al.* Global approach to cardiovascular risk in chronic kidney disease: Reality and opportunities for intervention. *Kidney Int.* (2006). doi:10.1038/sj.ki.5000085
188. Maric-Bilkan, C. Obesity and Diabetic Kidney Disease. *Medical Clinics of North America* (2013). doi:10.1016/j.mcna.2012.10.010
189. Johansen, K. L. & Lee, C. Body composition in chronic kidney disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* (2015). doi:10.1097/MNH.0000000000000120
190. ISTAT. Risoluzioni 7-00025 (D'Arrando) e 7-00052 (Siani) Iniziative

volte a disincentivare il consumo di zuccheri e di grassi. s.l.: XII Commissione (Affari sociali) Camera dei Deputati Roma, 26 settembre 2018. Available at: <https://www.istat.it/it/files//2018/10/A-Audizione-Istat-XII-Commissione-26-sett-2018.pdf>.

191. Bellizzi, V. *et al.* Early changes in bioelectrical estimates of body composition in chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* (2006). doi:10.1681/ASN.2005070756
192. Lin, T. Y., Peng, C. H., Hung, S. C. & Tarng, D. C. Body composition is associated with clinical outcomes in patients with non-dialysis-dependent chronic kidney disease. *Kidney Int.* (2018). doi:10.1016/j.kint.2017.08.025
193. Pawlak, K., Kowalewska, A., Mysliwiec, M. & Pawlak, D. 3-hydroxyanthranilic acid is independently associated with monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) and macrophage inflammatory protein-1 β (CCL4) in patients with chronic kidney disease. *Clin. Biochem.* (2010). doi:10.1016/j.clinbiochem.2010.06.008
194. Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S. & Sawaya, B. E. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. *Journal of Interferon and Cytokine Research* (2009). doi:10.1089/jir.2008.0027
195. Jacob, A. *et al.* Curcumin alleviates immune-complex-mediated glomerulonephritis in factor-H-deficient mice. *Immunology***139**, 328–337 (2013).
196. Zhong, F., Chen, H., Han, L., Jin, Y. & Wang, W. Curcumin attenuates lipopolysaccharide-induced renal inflammation. *Biol. Pharm. Bull.* (2011). doi:10.1248/bpb.34.226
197. Abe, Y., Hashimoto, S. & Horie, T. Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood

- monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacol. Res.***39**, 41–47 (1999).
198. Bereswill, S. *et al.* Anti-inflammatory effects of Resveratrol, Curcumin and Simvastatin in acute small intestinal inflammation. *PLoS One* (2010). doi:10.1371/journal.pone.0015099
 199. Hewlings, S. & Kalman, D. Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health. *Foods* (2017). doi:10.3390/foods6100092
 200. Ivashkiv, L. B. IFN γ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* (2018). doi:10.1038/s41577-018-0029-z
 201. Law, B. M. P. *et al.* Interferon- γ production by tubulointerstitial human CD56bright natural killer cells contributes to renal fibrosis and chronic kidney disease progression. *Kidney Int.* (2017). doi:10.1016/j.kint.2017.02.006
 202. Almquist, T., Jacobson, S. H., Mobarrez, F., Näsman, P. & Hjemdahl, P. Lipid-lowering treatment and inflammatory mediators in diabetes and chronic kidney disease. *Eur. J. Clin. Invest.* (2014). doi:10.1111/eci.12230
 203. García-Sánchez, O., López-Novoa, J. M. & López-Hernández, F. J. Interferon- γ ; Reduces the Proliferation of Primed Human Renal Tubular Cells. *Nephron Extra* (2014). doi:10.1159/000353587
 204. Villegas, I., Sánchez-Fidalgo, S. & De La Lastra, C. A. Chemopreventive effect of dietary curcumin on inflammation-induced colorectal carcinogenesis in mice. *Mol. Nutr. Food Res.* (2011). doi:10.1002/mnfr.201000225
 205. Gour, N. & Wills-Karp, M. IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease. *Cytokine***75**, 68–78 (2015).

206. Schuijs, M. J., Willart, M. A., Hammad, H. & Lambrecht, B. N. Cytokine targets in airway inflammation. *Current Opinion in Pharmacology***13**, 351–361 (2013).
207. Chung, S. H., Choi, S. H., Choi, J. A., Chuck, R. S. & Joo, C. K. Curcumin suppresses ovalbumin-induced allergic conjunctivitis. *Mol. Vis.* (2012).
208. Babaei, E. *et al.* Dendrosomal curcumin significantly suppresses cancer cell proliferation in vitro and in vivo. *Int. Immunopharmacol.***12**, 226–234 (2012).
209. Ganjali, S. *et al.* Investigation of the effects of curcumin on serum cytokines in obese individuals: A randomized controlled trial. *Sci. World J.***2014**, (2014).
210. Lun, H. *et al.* Altered gut microbiota and microbial biomarkers associated with chronic kidney disease. *Microbiologyopen* (2019). doi:10.1002/mbo3.678
211. Shin, N. R., Whon, T. W. & Bae, J. W. Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends in Biotechnology* (2015). doi:10.1016/j.tibtech.2015.06.011
212. Zhang, M. & Yang, X. J. Effects of a high fat diet on intestinal microbiota and gastrointestinal diseases. *World Journal of Gastroenterology* (2016). doi:10.3748/wjg.v22.i40.8905
213. Shen, L., Liu, L. & Ji, H.-F. Regulative effects of curcumin spice administration on gut microbiota and its pharmacological implications. *Food Nutr. Res.* (2017). doi:10.1080/16546628.2017.1361780
214. Zeng, M. Y., Inohara, N. & Nuñez, G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunology* (2017).

doi:10.1038/mi.2016.75

215. Turpin, W., Humblot, C., Noordine, M. L., Thomas, M. & Guyot, J. P. Lactobacillaceae and cell adhesion: Genomic and functional screening. *PLoS One* (2012). doi:10.1371/journal.pone.0038034
216. Becker, A. A., Hesta, M., Hollants, J., Janssens, G. P. & Huys, G. Phylogenetic analysis of faecal microbiota from captive cheetahs reveals underrepresentation of Bacteroidetes and Bifidobacteriaceae. *BMC Microbiol.* (2014). doi:10.1186/1471-2180-14-43
217. Xiao, S. *et al.* A gut microbiota-targeted dietary intervention for amelioration of chronic inflammation underlying metabolic syndrome. *FEMS Microbiol. Ecol.* (2014). doi:10.1111/1574-6941.12228
218. Jost, L. Partitioning diversity into independent alpha and beta components. *Ecology* (2007). doi:10.1890/06-1736.1
219. Navaneethan, S. D., Schold, J. D., Arrigain, S., Kirwan, J. P. & Nally, J. V. Body mass index and causes of death in chronic kidney disease. *Kidney Int.* (2016). doi:10.1016/j.kint.2015.12.002

RESEARCH INTEGRITY declaration

Results reported in this work comply with the four fundamental principles of research integrity of The European Code of Conduct for Research Integrity (ALLEA, Berlin, 2018):

- Reliability in ensuring the quality of research, reflected in the design, the methodology, the analysis and the use of resources;
- Honesty in developing, undertaking, reviewing, reporting and communicating research in a transparent, fair, full and unbiased way;
- Respect for colleagues, research participants, society, ecosystems, cultural heritage and the environment;
- **Accountability for the research from idea to publication, for its management and organization, for training, supervision**