



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Pediatria Salus Pueri

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA DELLO SVILUPPO E SCIENZE
DELLA PROGRAMMAZIONE
INDIRIZZO MALATTIE RARE: GENETICA, BIOLOGA E BIOCHIMICA
CICLO XXIV

Analisi quantitativa delle dimetilarginine (ADMA ed SDMA) e degli aminoacidi strutturalmente correlati mediante UPLC-ESI-MS/MS nella diagnosi e prognosi di patologie NO-dipendenti correlate allo stress ossidativo nell'adulto e nel bambino.

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Giorgio Perilongo

Supervisore: Dr. Giuseppe Giordano

Dottoranda : Dr.ssa Iole Maria Di Gangi

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT.....	5
1. INTRODUZIONE.....	9
1.1. Specie radicali ossidanti e loro vie di produzione.....	9
1.2. Principali effetti delle specie radicali ossidanti.....	11
1.2.1. Effetto diretto sulle molecole biologiche.....	11
1.2.2. Effetto indiretto sulle vie di segnalazione	12
1.3. Ossido nitrico sintetasi (NOSs)	12
1.3.1. Reazioni catalizzate dalla NOS	13
1.4. L'ossido di azoto	15
1.4.1. Ruolo dell'NO nell'omeostasi e nella morte cellulare.....	16
1.4.2. Ruolo dell'NO nel sistema cardio-vascolare	16
1.4.3. Ruolo dell'NO come mediatore biochimico e radicale di difesa.....	18
1.4.4. Inibizione della produzione di NO.....	18
1.5. L'arginina e i suoi analoghi metilati.....	19
1.6. ADMA.....	22
1.6.1. La via metabolica dell'ADMA e il ruolo del DDAH	23
1.7. Patologie dell'adulto indotte da stress ossidativo.....	24
1.7.1. Ruolo dell'ADMA nelle diverse patologie.....	24
1.8. Patologie del neonato e del bambino indotte da stress ossidativo.....	28
1.8.1. Patologie legate alla prematurità e possibile ruolo dell'ADMA.....	28
1.8.2. Ruolo dell'ADMA nelle patologie respiratorie	30
1.8.3. Il condensato dell'aria espirata (EBC).....	32
1.8.4. Raccolta dell'EBC	33
1.8.5. Contenuto dell'EBC.....	33
1.9. Metodi analitici per il dosaggio dell'ADMA	34
1.9.1. Metodi ELISA.....	36
1.9.2. Metodi GC-MS/MS	36
1.9.3. Metodi LC-MS o LC-MS/MS.....	37
1.10. Il sistema UPLC	39
1.10.1. Caratteristiche della colonna per UPLC	41
1.11. Lo spettrometro di massa.....	42
1.12. Uso di uno standard marcato con isotopi stabili.....	45
2. SCOPO	47
3. MATERIALI E METODI	49
3.1. Soggetti arruolati nello studio	49

3.1.1. Studio sulla popolazione adulta con diverse patologie	49
3.1.2. Studio sui neonati prematuri	50
3.1.3. Studio sull'EBC di bambini affetti da malattie respiratorie	53
3.1.3.1. Raccolta del condensato dell'aria espirata	53
3.2. Reagenti	54
3.2.1. Sintesi dello standard marcato: N ^G ,N ^G -[² H ₆]-dimetil-L-arginina	54
3.3. Preparazione e analisi dei campioni	56
3.3.1. Preparazione dei campioni di plasma	56
3.3.2. Analisi dei campioni di plasma	56
3.3.2.1. Elaborazione statistica	57
3.3.3. Preparazione dei campioni di EBC	58
3.3.4. Analisi dei campioni di EBC	58
3.3.4.1. Analisi statistica dei dati sull'EBC	59
3.3.4.2. Riproducibilità sui campioni di EBC	59
3.4. Le curve di calibrazione	59
3.4.1. Curve di calibrazione preparate su plasma	60
3.4.2. Curve di calibrazione preparate su EBC	60
3.5. Analisi quantitativa in spettrometria di massa tandem	63
3.5.1. L'analisi in MRM	63
4. RISULTATI	67
4.1. Dati quantitativi ottenuti su plasma con metodo UPLC/MS/MS	67
4.1.1. Studio su soggetti sani e con diverse patologie	67
4.1.2. Studio sui neonati prematuri	72
4.2. Messa a punto e validazione del metodo di analisi su EBC	73
4.2.1. Valutazione delle interferenze	77
4.3. Studio sull'EBC di bambini affetti da malattie respiratorie	78
4.3.1. Valutazione dei livelli di ADMA nell'EBC	78
4.3.2. Confronto fra i gruppi dei soggetti asmatici e sani	80
5. DISCUSSIONE	83
5.1. Considerazioni sullo studio in ambito neonatale	83
5.2. Considerazioni sui dati ottenuti da soggetti in età adulta	86
5.3. Considerazioni sulle donne in gravidanza normale e affette da pre-eclampsia	88
5.4. Considerazioni sullo studio nei bambini asmatici	90
6. CONCLUSIONI	95
7. BIBLIOGRAFIA	97
7. ABBREVIAZIONI	106

RIASSUNTO

Presupposti: L'ADMA, dimetilarginina asimmetrica, è un analogo metilato dell'aminoacido arginina. Essa viene prodotta all'interno delle cellule attraverso processi di metilazione di catene polipeptidiche e rilasciata in circolo dopo proteolisi. L'ADMA compete con l'arginina, precursore necessario per la sintesi dell'ossido nitrico, per il legame con l'enzima ossido nitrico sintetasi (NOS), inibendone così la sintesi. L'NO è il più potente vasodilatatore conosciuto, che svolge un ruolo chiave, agendo sul sistema endoteliale, nel mantenimento di una grande varietà di meccanismi omeostatici del nostro organismo. È noto da tempo che l'ADMA, per inibizione della produzione di NO, è coinvolta nella patogenesi delle principali disfunzioni indotte da stress ossidativo NO-dipendente a livello cardiovascolare, renale e recentemente anche nell'ambito delle malattie respiratorie come l'asma e la fibrosi cistica, in quanto contribuisce ad aggravare lo stato infiammatorio e l'iperreattività delle vie aeree.

Analizzando i dati riportati in letteratura, si è notato che non vi sono studi longitudinali sulle concentrazioni di ADMA in età neonatale, sia nei soggetti a termine che in quelli prematuri, né sono stati ad oggi dosati i livelli di ADMA nel condensato dell'aria espirata, che si ritiene essere un biofluido la cui composizione riflette quella del liquido di superficie delle vie aeree, oltre ad essere caratterizzato dalla non invasività e la semplicità nell'esecuzione della metodica di prelievo.

Scopo dello studio: il presente lavoro ha avuto in primo luogo lo scopo di sviluppare un metodo in UPLC-ESI-MS/MS per il dosaggio dell'ADMA per poi applicarlo su una popolazione di adulti sani al fine di verificare la validità della metodica, confermando alcuni dati esistenti in letteratura. Si è poi passati all'applicazione su soggetti adulti affetti da diverse patologie (iperglicemia, cardiopatie, pre-eclampsia) per verificarne le concentrazioni per un'applicabilità in ambito clinico, in una seconda fase è stata presa in considerazione la popolazione pediatrica, determinando in maniera longitudinale la concentrazione sierica di ADMA e delle altre arginine metilate (SDMA, NMMA) in un gruppo di neonati a termine in prima e terza giornata di vita e in un gruppo di neonati pretermine di peso neonatale estremamente basso (< 1000 g - ELBW) durante il primo mese di vita.

Per quanto riguarda lo studio delle malattie respiratorie lo scopo è stato quello di valutare se l'ADMA era dosabile nel condensato dell'aria espirata in bambini affetti da asma in buon controllo, con o senza terapia, confrontati con un gruppo di bambini sani e verificare la riproducibilità della metodica di analisi dell'ADMA sull'EBC.

Materiali e metodi: La determinazione quantitativa è stata effettuata attraverso una separazione cromatografica in UPLC e analisi dei campioni mediante uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo. Le caratteristiche del metodo sono costituite dall'utilizzo di quantità esigue di campione, elevata specificità e sensibilità strumentale.

Per poter ricavare i valori di riferimento della popolazione adulta sono stati arruolati 36 soggetti sani (18 uomini e 18 donne di età media pari a 36.5 anni) come

gruppo di controllo rispetto a pazienti con infarto miocardico (20 soggetti di cui 10 uomini e 10 donne di età media pari a 75.5 anni) e diabete di tipo II insulino resistente (30 soggetti di cui 16 uomini e 14 donne di età media pari a 71 anni). Lo studio sulle donne in gravidanza ha previsto l'arruolamento di 15 donne affette da pre-eclampsia confrontate con 15 donne in gravidanza normale (età media 32 anni per entrambi i gruppi). L'applicazione in ambito pediatrico ha infine coinvolto un gruppo di 31 neonati di peso estremamente basso alla nascita (ELBW <1000 grammi) rispetto al gruppo di controllo di 30 neonati sani a termine, e un gruppo di 29 bambini asmatici di età compresa tra 5,8 e 16,3 anni confrontati con i relativi controlli sani (62 bambini di età compresa tra 5,1 e 15,4 anni), di cui è stato raccolto il condensato dell'aria espirata.

Risultati: I valori dei diversi metaboliti ottenuti sui soggetti adulti sani hanno confermato i dati riportati in letteratura, mentre nei soggetti cardiopatici le concentrazioni di ADMA ed SDMA sono state rispettivamente pari a $0.89 \pm 0.17 \mu\text{M}$ e $0.72 \pm 0.26 \mu\text{M}$, risultando entrambi significativamente più alti rispetto ai controlli sani ($p < 0.05$), a differenza invece dei soggetti iperglicemici che hanno mostrato livelli significativamente inferiori ($p = 0.002$) di ADMA ($0.47 \pm 0.13 \mu\text{M}$) rispetto ai relativi controlli, ma nessuna differenza nelle concentrazioni di SDMA.

Il confronto tra donne gravide sane e con pre-eclampsia, ha invece evidenziato che la concentrazione di ADMA al momento del ricovero è stata significativamente più bassa nelle gravide ipertese rispetto alle gravide normotese ($p = 0.006$), contrariamente a quanto riportato in letteratura, mentre a 30 giorni di distanza dal parto la situazione si è invertita. Nel gruppo dei neonati a termine, l'ADMA in prima giornata è risultata estremamente elevata, all'incirca 2-3 volte maggiore rispetto agli adulti. La sua concentrazione è diminuita rapidamente, riducendosi già del 25% in terza giornata di vita. Nei soggetti pretermine di peso estremamente basso il dosaggio di ADMA è risultato sensibilmente più basso rispetto ai neonati a termine senza variazioni nel tempo. Considerando insieme i due gruppi di neonati, è presente una correlazione significativa tra valori di ADMA in prima ed in terza giornata e l'età gestazionale, nonché il peso neonatale.

Lo studio condotto sull'EBC ha, infine dimostrato che è possibile misurare l'ADMA nel condensato con una buona riproducibilità intrasoggetto a distanza di 24 ore. I valori di ADMA nei bambini asmatici (mediana 2,17 [1,15-3,19] $\mu\text{mol/mL}$) sono risultati significativamente più elevati rispetto a quelli dei bambini sani (mediana 1,1 [0,7-1,5] $\mu\text{mol/mL}$, $p < 0,001$) evidenziando anche una significativa correlazione dei livelli di questo metabolita con il dosaggio dei farmaci corticosteroidi inalatori ICS ($p = 0,005$; $r = 0,406$) assunti dai soggetti asmatici.

Conclusioni: Il metodo sviluppato in questo studio soddisfa i requisiti analitici di precisione, riproducibilità, specificità, sensibilità e recupero analitico indispensabili per l'impiego in ambito clinico. Esso inoltre può essere facilmente automatizzabile e adatto per il suo impiego su larga scala consentendo l'applicazione in qualità di metodo diagnostico nell'ambito delle patologie da stress ossidativo e disfunzione endoteliale e delle malattie cardiovascolari.

L'uso di una quantità esigua di campione, inoltre ne suggerisce l'impiego per lo studio delle diverse patologie del neonato come la sepsi, l'ipertensione polmonare e lo scompenso cardiaco. Infine, essendo questo il primo studio che dimostra la fattibilità del dosaggio dell'ADMA e dei biomarker di stress ossidativo nel condensato dell'aria espirata, ottenendo risultati concordanti con lavori precedenti che dimostravano un aumento di ADMA nell'asma in altre matrici biologiche, ci sono i presupposti per estendere la casistica per confermare il suo possibile ruolo come biomarker nell'infiammazione asmatica e come possibile target di nuovi approcci farmacologici.

ABSTRACT

Background: Asymmetric dimethylarginine (ADMA), an endogenous nitric oxide (NO) formation inhibitor, has emerged as a promising biomarker of NO-associated endothelial dysfunction in cardiovascular diseases as well in chronic renal failure and pre-eclampsia but only recently this amino acid was associated also to the pathogenesis of some respiratory diseases, such as asthma and cystic fibrosis. Although ADMA is an established marker of endothelial dysfunction in adults its biological relevance in the pediatric age is still unclear. Theoretically, due to its interference with nitric oxide (NO) production, ADMA might be involved in the pathogenesis of several disorders originating early in life. Interest has been specially focused on its potential role in neonatal lung biology, as NO is a critical regulator of lung morphogenesis and homeostasis. ADMA has been indicated as a mediator of the physiologically high pulmonary vascular resistance during fetal life, and implicated in the pathogenesis of persistent pulmonary hypertension of the newborn.

Thus, there is considerable demand for a specific, sensitive and rapid method for ADMA and related metabolites for quantitative determination in biological fluids of adults with NO related disorders and preterm newborn involving in clinical study for diagnosis of cardiovascular and pulmonary diseases. The interest in potentially fundamental role of this metabolite, in basic and clinical research, led to the development of numerous analytical methods for the quantitative determination of ADMA and dimethylarginines in biological systems, notably plasma, serum and urine, but not, at the moment, in exhaled breath condensate (EBC), which is a potential rich source for countless biomarkers that can provide valuable information about respiratory as well as systemic diseases. EBC is obtained as breath exhaled from the lungs into a cooled collecting device, thereby condensing the vapor and aerosolized droplets emerging with the breath.

Quantification of ADMA and related metabolites was made by several methods based on HPLC, coupled with fluorescence and mass spectrometric methods such as LC-MS/MS and GC-MS, capillary electrophoresis and ELISA.

Moreover to apply the method in pediatric clinical research is very important to have a small volume of sample used for analysis, especially for plasma and serum.

Objectives: The aim of this thesis was to develop and validate a method for simultaneous determination of arginine, ADMA, SDMA, NMMA, homo-arginine and citrulline in plasma samples of healthy adults and patients with different pathologies such as hyperglycemia, heart diseases and pre-eclampsia, and in plasma and serum of term and preterm newborns.

To evaluate if ADMA is detectable in exhaled breath condensate of asthmatic and healthy children, we developed an alternative technique that can enhance our UPLC/MS/MS method in term of sensitivity using large injection volumes enriched

online in a trap column that would compensate for the possible dilution effects in EBC samples.

Methods: The method was characterized by simple and rapid preparation, short time analysis, accurate quantification on different biological matrices (plasma, serum and EBC) using stable isotope labeled internal standard and very low amount of sample by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography (UPLC) run coupled with electrospray ionization (ESI) in the positive mode tandem mass spectrometry detection.

We measured circulating ADMA and related compounds concentrations in a group of very premature newborns at birth and during the first week of life.

We enrolled different type of pathologic populations versus normal populations: adult control group was constituted of 36 healthy subject (18 males and 18 females, medium age 36.5 years) and 15 women in normal pregnancy (medium age of 32 years); and pathologic population was constituted of 15 women with pre-eclamptic pregnancy (medium age of 32 years), 20 subjects with heart diseases (10 males and 10 females, medium age of 75.5 years) and 30 hyperglycemic patients (16 males and 14 females, medium age 71 years). In pediatric field we enrolled a group of 31 extremely low birth weight (ELBW) newborns versus 30 term newborn to evaluate whether ADMA levels correlate with specific perinatal/neonatal risk factors or short-term outcome indicators; and EBC samples from a group of 29 children with asthma 5,8 to 16,3 years old and 62 healthy controls 5,1 to 15,4 years old.

Results and conclusions: In healthy adults plasma and serum we did not found appreciable differences in concentration of ADMA and related metabolites, except for Arg and relative ratio versus ADMA, that appeared higher more than 60% in serum than in plasma. In adult subjects with heart diseases ADMA and SDMA values were respectively of $0.89 \pm 0.17 \mu\text{M}$ and $0.72 \pm 0.26 \mu\text{M}$, significantly higher than normal controls ($p < 0.05$); hyperglycemic subjects, instead have shown ADMA levels of $0.47 \pm 0.13 \mu\text{M}$ significantly lower ($p = 0.002$) than healthy subjects. There was any significant difference in SDMA concentrations between two studied populations.

We observed that ADMA concentrations are significantly lower in pregnant pre-eclamptic women than in the control group at the time of delivery, but these data have some important limitation, owing to the small number of subjects enrolled and to the possible confounding effects of anti-hypertensive therapy in the pre-eclamptic group.

In ELBW newborns ADMA, NMMA and SDMA concentrations remained stable from delivery to day 7 and were not dependent on gender, gestational age or birth weight. ADMA levels resulted significantly higher in infants born to mothers with histologic chorioamnionitis than in infants delivered for other maternal or fetal indications. We speculate that ADMA might be involved in the complex biological events associated with fetal exposure to chorioamnionitis.

In this thesis, was also developed and validated a sensitive and selective method for the quantification of ADMA, arginine, SDMA, NMMA, citrulline, homo-arginine, tyrosine and nitrotyrosine simultaneously, in human EBC based on UPLC-MS/MS enrichment technology. Actually, do not exist in literature, any analytical method to

detect ADMA and its related compounds in EBC human samples. The assay demonstrated excellent accuracy, precision, linearity and specificity for the intended clinical purpose and a good reproducibility of method of collection, demonstrating that it is possible to measure ADMA in exhaled breath condensate.

EBC ADMA values in asthmatic children (median value 2,17 [1,15-3,19] $\mu\text{mol/mL}$) were significantly higher than in healthy children (median value 1,1 [0,7-1,5] $\mu\text{mol/mL}$, $p < 0,001$) and in the asthmatic group ADMA values were significantly correlated with inhaled corticosteroids dosage ICS ($p = 0,005$; $r = 0,406$).

Conclusions: The UPLC-ESI/MS/MS method applied at adult populations with different NO-related endothelial dysfunctions, confirmed data from the literature. The fast run time, the feasibility of high sample throughput and the small amount of sample required make this method very suitable for routine analysis in the clinical setting.

Preliminary data on neonatal and pediatric field, show that this method is a very good analytical tool for study dimethylarginines and their metabolism in healthy and disease conditions, it particularly suitable for future applications in the pediatric medicine. These data focus on ADMA as a biologically active molecule associated to exposure to antenatal inflammation, and we suggest its role deserves further investigation in larger clinical studies or appropriate experimental models.

This was, also, the first study that demonstrates ADMA dosage feasibility in exhaled breath condensate, showing that ADMA is increased in asthma and has a possible role in asthmatic inflammation. Further studies will clarify the role of ADMA as a biomarker of asthmatic inflammation and a possible target for new pharmacological approaches.

1. INTRODUZIONE

Lo stress ossidativo può essere definito come “una modificazione dell’equilibrio tra fattori pro- e anti- ossidanti in favore dei primi che può determinare un potenziale danno nell’organismo” [1].

Esso coinvolge una quantità considerevole di molecole, reazioni chimiche ed interazioni cellulari partecipando alla patogenesi e al mantenimento di numerose malattie come ad esempio aterosclerosi, ipertensione, artrite reumatoide e danno da ischemia riperfusione [2].

Nel corso degli anni, è nata sempre di più la necessità di trovare possibili biomarker di tipo descrittivo e talvolta predittivo di patologie indotte da stress ossidativo. Tra questi, la dimetilarginina asimmetrica (ADMA) è stata ampiamente descritta in letteratura quale possibile marcatore di danno endoteliale e di rischio cardiovascolare in patologie come l’ipertensione, l’ipercolesterolemia, il diabete, l’aterosclerosi e l’insufficienza renale cronica, e più recentemente nella preeclampsia quale della complicanza della gravidanza e nell’ambito delle malattie respiratorie, suscitando pertanto un notevole interesse in ambito clinico e laboratoristico.

Essa è un metabolita biologicamente attivo, prodotto dall’organismo umano in condizioni fisiologiche insieme ad una famiglia di metilarginine ad essa correlate, grazie all’attività di enzimi specifici a partire dall’amminoacido arginina.

L’ADMA svolge la funzione di potente inibitore endogeno delle diverse isoforme dell’enzima ossido nitrico sintetasi (NOS) che catalizzano la produzione di ossido di azoto (NO) in diversi distretti corporei [1] ed è stata recentemente individuata come possibile fattore di regolazione del sistema di produzione endogena del NO stesso con conseguenti implicazioni all’interno dell’organismo [2].

1.1. Specie radicali ossidanti e loro vie di produzione

I principali attori dello stress ossidativo sono radicali liberi e specie chimiche altamente reattive che hanno un alto potere ossidante. Tali molecole hanno la caratteristica comune di essere particolarmente instabili poiché possiedono uno o più elettroni spaiati in uno degli orbitali molecolari. Questa forte instabilità li porta a reagire con altre molecole per cercare un equilibrio appropriandosi di un elettrone delle molecole con cui vengono in contatto. A seconda della composizione chimica i radicali ossidanti vengono distinti in due grandi categorie: le specie radicali dell’ossigeno (ROS) e le specie radicali dell’azoto (RNS).

Anione superossido (O_2^-), perossido di idrogeno (H_2O_2), radicale ossidrilico (OH^\cdot) e acido ipocloroso ($HOCl$) sono le principali molecole che costituiscono la classe dei ROS [3]. La classe dei RNS, invece, è costituita principalmente da NO e la specie radicale che si forma per ossidazione di quest’ultimo è il perossinitrito ($ONOO^\cdot$) [4].

La produzione intracellulare di radicali ossidanti può essere il prodotto secondario di alcune reazioni metaboliche cellulari oppure può essere dovuta all'azione di enzimi specifici che li sintetizzano attivamente. Del primo caso fa parte la catena di trasporto degli elettroni attraverso le creste mitocondriali durante la quale l'1-2% degli elettroni sfugge portando alla formazione di O_2^- [3, 5-6]. Tra gli enzimi che generano attivamente specie radicaliche ricordiamo:

- Xantina ossidasi: catalizza la reazione di ossidazione della xantina ad acido urico producendo una molecola di O_2^- . In alcuni casi la xantina ossidasi riduce l' O_2 producendo H_2O_2 oltre al radicale O_2^- ;
- NADPH ossidasi: genera l'anione superossido attraverso la reazione:
$$NADPH + 2O_2 \rightleftharpoons NADP^+ + 2O_2^- + H^+$$
;
- Superossido dismutasi (SOD): genera H_2O_2 secondo la reazione:
$$2O_2^- + 2H^+ \rightleftharpoons O_2 + H_2O_2$$
 ;
- Mieloperossidasi (MPO): utilizza H_2O_2 per produrre HOCl secondo la reazione:
$$Cl^- + H_2O_2 \rightarrow OCl^- + H_2O$$
 ;
- Ossido nitrico sintetasi (NOS): sintetizza NO a partire da L-Arg attraverso la reazione:
$$L-Arg + O_2 + NADPH \rightarrow L-Citrullina + NO + NADP^+$$
.
La reazione di NO con O_2^- porta alla formazione di ONOO⁻, uno dei radicali dell'azoto più reattivi.

1.2. Principali effetti delle specie radicali ossidanti

La natura chimica dei ROS fa sì che essi tendano facilmente ad interagire con l'ambiente in cui si trovano inducendo alcuni cambiamenti. Essi possono modificare chimicamente le molecole biologiche inducendo danni permanenti oppure possono agire in maniera indiretta interferendo con il signalling intracellulare.

1.2.1. Effetto diretto sulle molecole biologiche

Le modificazioni chimiche operate dai ROS a carico delle strutture cellulari possono riguardare i lipidi, le proteine e il DNA con conseguenti danni di tipo strutturale e funzionale.

La perossidazione lipidica porta alla modifica della struttura tridimensionale dei lipidi che costituiscono le membrane cellulari con ripercussioni sulla loro fluidità e permeabilità e compromissione dell'integrità di funzionamento delle stesse.

L'ossidazione delle proteine può determinare un cambiamento della struttura tridimensionale della molecola impedendone il corretto funzionamento, oppure può modificare il sito catalitico di un enzima impedendo il legame con il substrato. A seconda del tipo di proteina coinvolta può esserci un mal funzionamento delle reazioni

metaboliche cellulari (enzima), delle vie di trasduzione del segnale (recettore) o dei gradienti di membrana di diverse sostanze (trasportatori).

Il danno al DNA consiste invece in modificazioni chimiche dei nucleotidi che spesso danno origine a rotture del filamento di acido nucleico o a errori nella replicazione con l'introduzione di mutazioni. Molto probabilmente il danno al DNA dei vari ROS è mediato dal radicale OH^\cdot altamente reattivo, che interagisce con tutti i suoi componenti: deossiribosio, purine e pirimidine. Anche i radicali dell'azoto hanno lo stesso meccanismo di azione: NO e ONOO^\cdot interagiscono direttamente con il DNA causando reazioni di deamminazione e cross-linking aumentando la mutagenesi oppure determinano la formazione di radicali degli zuccheri che causano la rottura del filamento di DNA [4-5].

Le modificazioni strutturali che interessano le macromolecole cellulari possono influenzare il destino della cellula. Infatti, limitati danni cellulari vengono in genere riparati da complessi enzimatici capaci di ripristinare la naturale struttura molecolare, basti pensare agli enzimi di riparazione del DNA.

Se però la cellula subisce dei danni più consistenti, la normale architettura cellulare viene persa e la cellula va incontro alla morte per necrosi. In alcuni casi, in particolare in seguito all'accumulo di rotture o mutazioni del DNA, la cellula induce una forma di morte cellulare più "fisiologica", l'apoptosi.

1.2.2. Effetto indiretto sulle vie di segnalazione

La presenza di radicali ossidanti interferisce con diverse vie di trasduzione del segnale anche se i meccanismi molecolari non sono ancora del tutto chiari. I ROS possono agire a diversi livelli: nel signalling intracellulare interferendo con la via di propagazione del segnale fino al nucleo, interagendo con fattori di trascrizione coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare (p52), della traduzione (AP-1) e della trascrizione di molti geni (NF-kB) o inducendo l'espressione di molecole che attivano diversi processi cellulari. Sostanze ossidanti come H_2O_2 sono in grado di attivare p52 che a sua volta lega specifiche sequenze di DNA su geni proapoptotici inducendo l'apoptosi [5]. L'ossido nitrico, invece, a basse concentrazioni sembra essere in grado di indurre l'espressione di p52, quindi l'arresto del ciclo cellulare e l'induzione dell'apoptosi, mentre ad alte concentrazioni di ridurne l'espressione funzionando da fattore anti-apoptotico [5,7].

1.3. Ossido nitrico sintetasi (NOSs)

Gli enzimi appartenenti alla famiglia delle ossido nitrico sintetasi (NOSs), identificati per la prima volta nel 1978, sono comunemente considerati dimerici allo stato attivo, anche se in realtà l'attività enzimatica dipende strettamente dall'interazione con la calmodulina (CaM). Le NOSs sono anche associate a una serie di co-fattori comprendenti la tetraidrobiopterina (BH_4), il FAD, l'FMN e l'eme e catalizzano la

reazione di formazione dell'NO a partire dall'L-arginina, dall'NADPH e dall'ossigeno (O₂) (Fig. 1.1). L'associazione dei monomeri della NOS è necessaria alla formazione dell'enzima attivo, la cui stabilizzazione è promossa dalla presenza di BH₄, come anche della L-arginina e dell'eme, in tutte e tre le isoforme. In particolare per l'nNOS, l'aggiunta di BH₄ e dell'L-arginina al dimero già formato favorisce la conversione in una forma dimerica ancora più stabile [8].

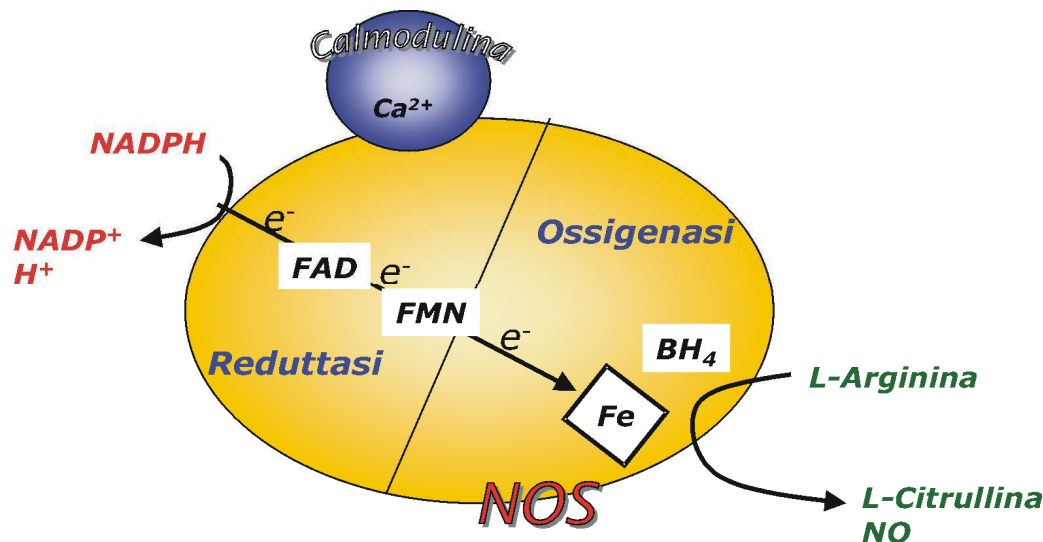


Figura 1.1 Schema della struttura e della reazione enzimatica della NOS

L'ossido nitrico sintetasi (NOS) è un enzima dimerico costituito da un dominio ossigenasico contenente eme e un dominio reduttasico. Per la sua attività sono richiesti numerosi cofattori: il flusso di elettroni parte dal NADPH e passa attraverso il FAD, l'FMN per poi ridurre il ferro (Fe) contenuto nel gruppo eme. La tetraidrobiopterina (BH₄) è un altro co-fattore utile alla reazione enzimatica. La NOS sintetizza NO attraverso l'ossidazione dell'L-arginina in L-citrullina con un meccanismo Ca²⁺/calmodulina-dipendente.

Sono state identificate tre isoforme della NOS che sono prodotte da tre geni distinti e che hanno diverse localizzazioni, regolazioni, proprietà catalitiche, sensibilità agli inibitori. Esse sono comunemente chiamate: 1) nNOS, nota anche come NOS-I poiché identificata per prima e situata nei tessuti neuronali; 2) iNOS, conosciuta anche come NOS-II, essendo l'isoforma inducibile in una vasta gamma di cellule e tessuti; 3) eNOS chiamata anche NOS-III è stata invece identificata per la prima volta nel sistema vascolare. Queste isoforme sono anche distinte sulla base della loro espressione costitutiva (cNOS) o inducibile (iNOS) e della loro calcio-dipendenza (eNOS e nNOS) o calcio-indipendenza (iNOS). Oltre alle tre canoniche forme di NOSs, esiste anche un'altra isoforma dell'enzima denominata NOS mitocondriale (mtNOS), espressa costitutivamente all'interno dei mitocondri [9] all'interno dei quali risulta legata alla membrana interna e interagisce con la citocromo C ossidasi e con il complesso I della catena di trasporto mitocondriale. In condizioni fisiologiche la produzione di NO, da parte della mtNOS, ha importanti implicazioni nel mantenere il metabolismo cellulare, poiché è in grado di modulare il consumo di O₂ nei mitocondri, attraverso il suo legame reversibile con la citocromo C ossidasi. Al contrario, elevate concentrazioni di NO o dei

suoi derivati (perossinitrito: ONOO^- ; nitrosotioili: SNO) possono causare l'inibizione irreversibile della catena di trasporto mitocondriale, indurre stress ossidativo/nitrosativo e portare in ultimo alla morte cellulare [8].

1.3.1. Reazioni catalizzate dalla NOS

La biochimica della NOS è particolarmente interessante, poiché rappresenta il primo pathway riconosciuto nei mammiferi, di sintesi e di utilizzo di una molecola gassosa come molecola segnale ed inoltre poiché catalizza una reazione nuova per un'emoproteina e conferisce al co-fattore BH_4 un ruolo unico. La figura 1.2 mostra la sintesi dell'NO catalizzata dalla NOS dove L-arginina, NADPH e O_2 sono i substrati ed NADP e L-citrullina i prodotti, mentre l'L-N-w-idrossi-L-arginina (NHA) è considerata il prodotto intermedio.

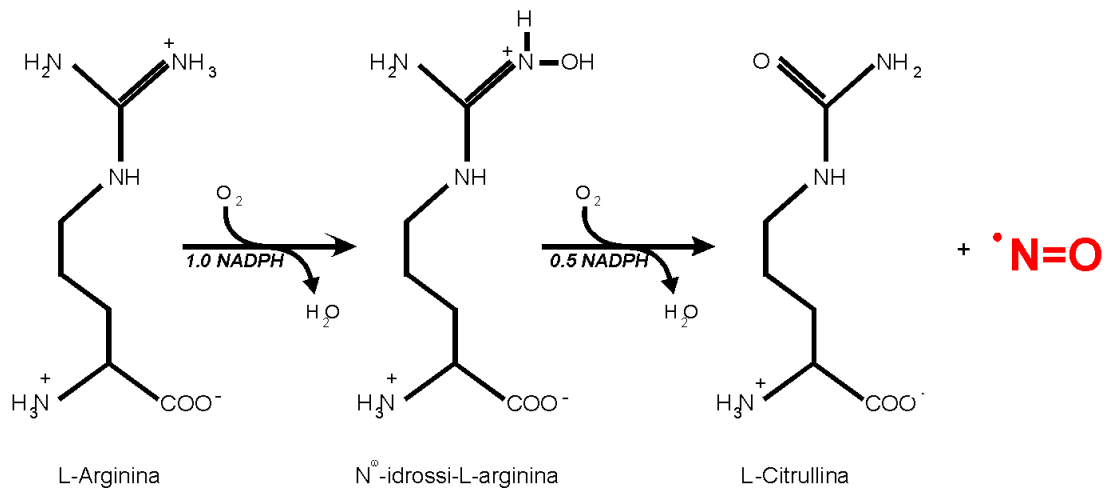


Figura 1.2 Sintesi dell'ossido nitrico

La sintesi di NO si articola in due passaggi. Il primo porta alla formazione dell'intermedio stabile N⁰-idrossi-L-arginina attraverso l'ossidazione di 1.0 equivalente di NADPH; il secondo passaggio produce L-citrullina e NO attraverso l'utilizzo di 0.5 equivalenti di NADPH.

Lo stesso prodotto della NOS, l'NO, può portare all'inibizione dell'attività dell'enzima in seguito all'elevata stabilità del complesso $\text{Fe}^{2+}\text{-NO}$ che si forma durante reazione. L'auto-inibizione può essere evitata dall'aumento del grado di dissociazione dell'NO o dalla modifica della reattività chimica del legame $\text{Fe}^{3+}\text{-NO}$ attraverso la competizione con l' O_2 .

1.4. L'ossido di azoto

L'NO, è una molecola ad elevata reattività che pur essendo potenzialmente tossica è implicata in una vasta gamma di processi fisiologici. Esso si trova naturalmente sottoforma di gas, pertanto altamente diffusibile nei vari tessuti sui quali esercita azioni specifiche e la sua velocità di produzione sembra essere un fattore cruciale per il mantenimento delle condizioni fisiologiche degli stessi [10].

L'NO ha una funzione importante già all'inizio della vita, quando la sua produzione nei gameti maschili è richiesta per l'attivazione delle uova immediatamente dopo la fecondazione [11]. E' anche coinvolto nei processi di sviluppo [12] e governa un vasto numero di reazioni fisiologiche come la neurotrasmissione, la regolazione dei sistemi immunitario e cardiovascolare, il rilassamento della muscolatura involontaria, l'aggregazione piastrinica [13-17]. Questi processi condividono fondamentalmente i seguenti meccanismi biochimici: 1) la sintesi enzimatica dell'NO da parte delle NOSs, a partire dall'aminoacido L-arginina; 2) la formazione di un complesso ferro-NO nell'eme di una proteina bersaglio allo scopo di promuovere la sua funzione. Questa poliedricità nella modulazione dei processi che regolano la vitalità cellulare deriva fondamentalmente dalla sua complessa chimica. L'ossido nitrico può esistere, oltre che in forma neutra, anche in forme redox dotate di proprietà distinte e di elevata reattività, tra cui NO^+ ed NO^- , in quanto facenti parte delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) con tutte le implicazioni biochimiche ormai ben conosciute.

L'ossido nitrico (NO) è una specie neutra che ha, di conseguenza, la capacità di diffondere velocemente attraverso mezzi acquosi e di attraversare le membrane cellulari. Inoltre, da un lato strettamente biologico, esso reagisce principalmente con l' O_2 e con i metalli di transizione, tra cui soprattutto le metalloproteine contenenti l'eme, come l'emoglobina, o con centri Fe-S come l'aconitasi o la citocromo C ossidasi appartenente alla catena di trasporto mitocondriale [18-19].

La chimica dell'ossido nitroso NO^+ è invece caratterizzata da reazioni di addizione o sostituzione con molecole nucleofile, come le basi ricche di elettroni ed i gruppi aromatici. La nitrosazione nella fase acquosa può interessare i centri delle molecole organiche contenenti -S, -N, -O e -C. Un esempio importante di tali addotti è costituito dai tionitriti (RSNO) e dalle nitrosoamine (RNHNO).

La chimica dell'anione nitrossido (NO^-) è infine, meno importante poiché questa molecola, in ambiente acquoso, si trasforma rapidamente in N_2O attraverso la dimerizzazione e la deidratazione. Quest'ultima specie può reagire con l'eme, come accade per l'NO, ma può anche formare degli addotti con molecole tioliche a basso peso

molecolare, o con le proteine portando all'ossidazione dei gruppi sulfidrilici con la formazione dell'intermedio RSNOH [20].

1.4.1. Ruolo dell'NO nell'omeostasi e nella morte cellulare

L'ossido nitrico è prodotto da diverse cellule del nostro organismo in particolare a livello endoteliale, nei globuli bianchi, nel cervello e nel cervelletto, dove funziona da "molecola segnale" di notevole importanza per il mantenimento dell'omeostasi cellulare. Nelle cellule endoteliali vascolari l'NO è sintetizzato grazie all'attività dell'enzima eNOS ed è essenziale per la regolazione del tono vascolare e delle funzioni endoteliali, nonché per la regolazione dell'aggregazione piastrinica in quanto induce la lisi dell'aggregato e inibisce l'adesione delle piastrine, con conseguente attività antitrombotica.

Nelle cellule neuronali invece, la sua produzione è catalizzata dall'isoforma nNOS ed in questa sede è coinvolto nei processi di apprendimento, di memoria e nella neurotrasmissione. L'isoforma inducibile (iNOS) presente in caso di attivazione della risposta immunitaria, spiega il ruolo dell'ossido di azoto anche nell'attivazione delle difese immunitarie da parte dell'organismo [8-9].

L'ossido nitrico, in relazione alla sua concentrazione, ha anche un duplice ruolo nell'induzione o nell'inibizione della morte cellulare (apoptosi), meccanismo essenziale per il normale sviluppo dell'organismo e per il mantenimento dell'omeostasi tissutale. La sua tossicità è data soprattutto dall'interazione con altre specie reattive, tra cui il O_2^- , portando alla produzione di intermedi tossici fra cui il ONOO⁻ ed il diossido di azoto (NO_2). Se prodotto ad elevate concentrazioni (dell'ordine di 1-3 mM), l'NO con i suoi derivati può avere effetti deleteri per tutte le funzioni cellulari, portando per esempio alla perdita di funzioni enzimatiche, all'alterazione dell'integrità di membrana e alle mutazioni del DNA [21-22].

La produzione elevata di RNS e quindi lo stress nitrosativo sono stati osservati in numerosi stati patologici. Infatti, i prodotti di ossidazione stabile dell'NO, i nitriti ed i nitrati, sono stati riscontrati ad elevate concentrazioni nella fibrosi cistica, nell'AIDS e nelle malattie neurodegenerative. La capacità dell'NO di produrre apoptosi è stata osservata per la prima volta nei macrofagi [23]. Da allora è stato dimostrato che molti altri tipi cellulari possono essere indotti all'apoptosi in seguito ad esposizione a flussi elevati di NO o di ONOO⁻. Un tessuto particolarmente sensibile all'effetto citotossico dell'NO è il sistema nervoso: infatti, assieme ai ROS, gli RNS sembrano essere i principali responsabili della morte delle cellule nervose nelle malattie neurodegenerative.

1.4.2. Ruolo dell'NO nel sistema cardio-vascolare

L'NO prodotto dalla eNOS è il più importante vasodilatatore endogeno [13-14]. Il meccanismo attraverso cui si esplica la sua azione è l'attivazione della guanilato ciclasi solubile (GCs) e il conseguente accumulo della guanosina 3'5' monofosfato (GMPc). La eNOS può essere regolata attraverso differenti processi post-trascrizionali o

post-traduzionali che ne modulano sia l'espressione, sia l'attività, sia la localizzazione cellulare [24]. In condizioni fisiologiche, la eNOS è regolata dalla concentrazione di Ca^{2+} intracellulare ed è attivata da acetilcolina e bradichinina.

L'NO che diffonde dalle cellule endoteliali, stimolate in modo opportuno, induce il rilassamento della muscolatura del vaso sanguigno, attraverso l'attivazione della GCs: una proteina eterodimerica formata da una subunità α e una β , ciascuna con un gruppo eme che è in grado di legarsi all'NO formando un complesso Fe-NO (Fig. 1.3). La formazione di tale complesso induce un cambiamento conformazionale dell'enzima tale da attivarlo e portare all'accumulo di GMPc, un noto secondo messaggero in grado di stimolare la protein-chinasi G (PKG) ed i canali ionici GMPc-dipendenti, coinvolti nel rilassamento muscolare [25].

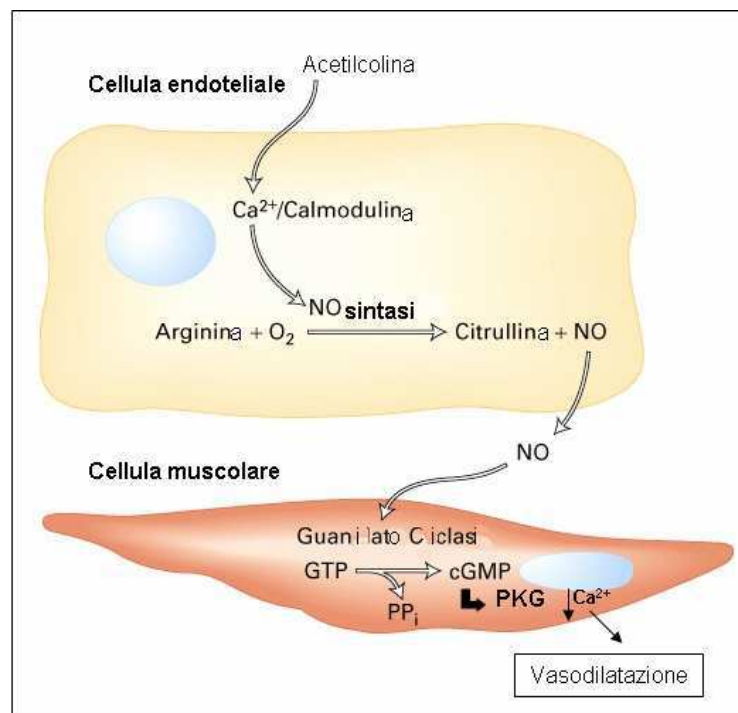


Figura 1.3 L'ossido nitrico nella regolazione della vasodilatazione

Nella cellula endoteliale l'attivazione della eNOS attraverso uno stimolo chimico o fisico è dovuta all'aumento del Ca^{2+} intracellulare. L'NO prodotto diffonde verso le cellule della muscolatura del vaso dove attiva la guanilato ciclasi solubile (GCs). Il GMPc attiva la protein chinasi G (PKG) che causa una diminuzione dei livelli di Ca^{2+} e la conseguente vasodilatazione.

Nel sistema cardiovascolare dunque, il rilascio endoteliale dell'ossido di azoto è in grado di agire sulla regolazione del flusso sanguigno e sulla pressione del sangue nei vasi presenti nel muscolo liscio [13].

1.4.3. Ruolo dell'NO come mediatore biochimico e radicale di difesa

Diversi studi hanno evidenziato che nell'uomo, lo stress ossidativo è ritenuto responsabile di una serie di malattie croniche, spesso a carattere degenerativo tra cui l'obesità e patologie cardiometaboliche quali insulino-resistenza, dislipidemia, ipertensione, infiammazione, squilibri dell'assetto ormonale, diabete mellito, aterosclerosi, cancro [13]. Inoltre, numerose evidenze sperimentali dimostrano che la disfunzione endoteliale, associata a queste patologie è dovuta ad un'alterazione del rilascio di NO da parte dell'endotelio vascolare. Responsabili di questa alterazione sono i radicali liberi dell'ossigeno che causano stress ossidativo e distruggono l'NO.

In tale contesto, studi condotti su animali da laboratorio hanno dimostrato che l'integrazione alimentare con L-arginina, favorendo la sintesi di NO, accelera la guarigione di ulcere in ratti diabetici Sprague-Dawley, esercitando un effetto benefico sull'ipertensione ed il metabolismo lipidico degli stessi [26]. Questi favorevoli effetti, confermati recentemente anche in ratti resi diabetici mediante streptozotocina [27], dimostrano che è sperimentalmente possibile, attraverso l'aggiunta di L-arginina alla dieta, migliorare la sintesi endogena di NO e revertire gli effetti sfavorevoli dovuti ad una ridotta biodisponibilità del mediatore.

1.4.4. Inibizione della produzione di NO

L'amminoacido precursore dell'ossido di azoto è l'arginina, sia essa endogena o fornita supplementariamente con la dieta, che attraverso la famiglia di enzimi NOS viene convertita in citrullina ed NO. L'attività della ossido nitrico sintetasi può essere inibita competitivamente quando in circolo siano presenti elevate concentrazioni degli analoghi sostituiti guanidinici dell'arginina, come la monometilarginina (NMMA) e la dimetilarginina asimmetrica (ADMA) [28].

In Figura 1.4 è evidenziato il ruolo svolto dall'ossido di azoto in condizioni normali e l'inibizione della NOS da parte dell'ADMA [29].

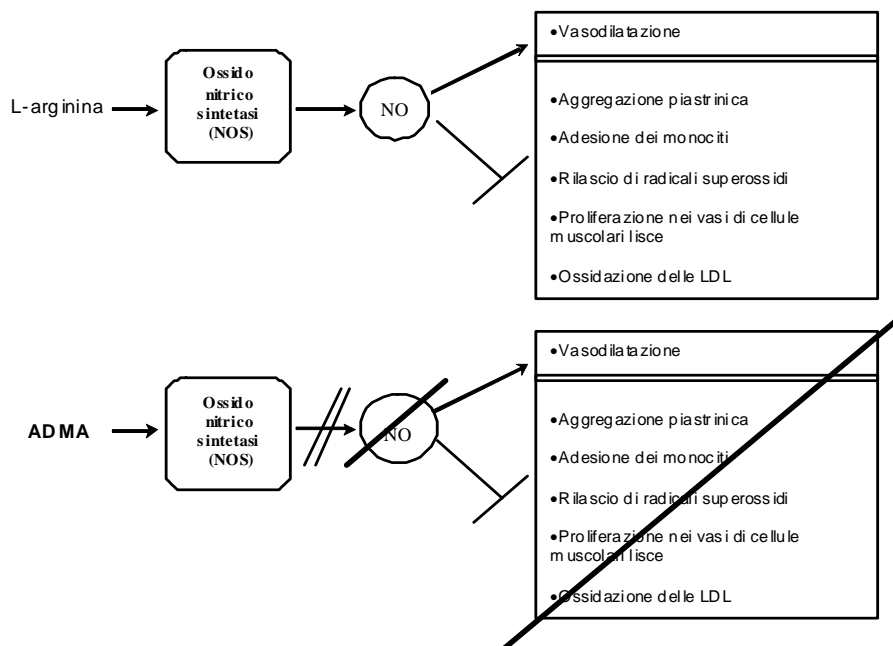


Figura 1.4 Schema delle funzioni svolte dall'ossido nitrico sintetasi e dell'attività inibitoria svolta dall'ADMA

1.5. L'arginina e i suoi analoghi metilati

La L-arginina non è un amminoacido essenziale per l'uomo adulto, ma la sua sintesi da parte dell'organismo in accrescimento non è sufficiente a coprire il fabbisogno pertanto può essere definita un amminoacido "semiessenziale".

Essa si trova largamente diffusa in natura ed è contenuta in gran parte delle proteine che compongono i tessuti animali; svolge importanti funzioni nel metabolismo cellulare ed è il principale substrato per la ossido nitrico sintetasi che la converte prima in idrossi-arginina e successivamente in L-citrullina e ossido di azoto (Fig 1.2).

Tale amminoacido presenta un gruppo guanidinico carico positivamente e dunque potenzialmente instabile (Fig. 1.5).

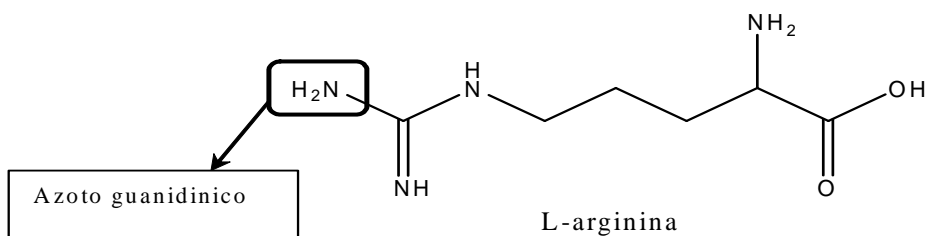


Figura 1.5 Struttura della L-arginina

Nei liquidi biologici sono stati individuati tre analoghi dell'arginina che presentano uno o più atomi di azoto guanidinico sostituito con gruppi metilici.

Due di questi metaboliti la N^G, N^G -dimetil-L-arginina (ADMA) o dimetilarginina asimmetrica e la N^G, N^G -dimetil-L-arginina (SDMA) o dimetilarginina simmetrica sono isomeri e presentano pertanto una struttura simile, ma svolgono attività molto diverse all'interno dell'organismo. Il terzo metabolita, la N^G -monometil-L-arginina (NMMA) presenta un solo gruppo metile legato all'azoto guanidinico ed è anch'esso un inibitore della ossido nitrico sintetasi, ma la sua attività è molto più bassa rispetto a quella dell'ADMA, poiché è presente in circolo in concentrazioni di circa un ordine di grandezza inferiore a quest'ultima [30].

Le strutture degli analoghi dell'arginina sono rappresentate in Figura 1.6.

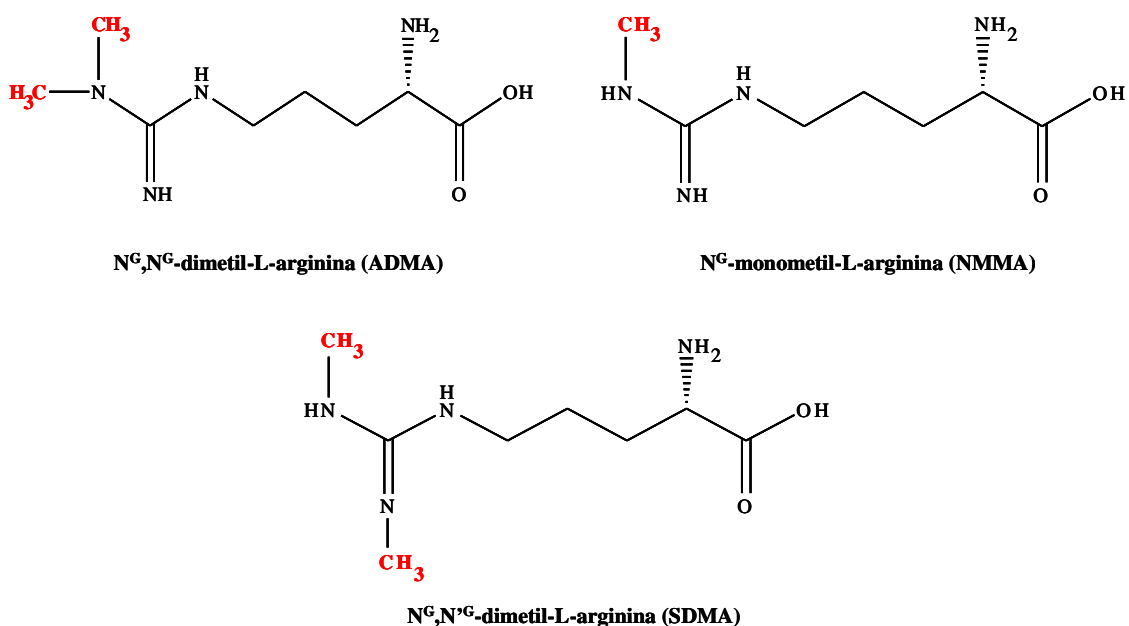


Figura 1.6 Struttura degli analoghi strutturali della L-arginina.

L'ADMA e la NMMA sono capaci di inibire competitivamente l'attività della ossido nitrico sintetasi, con una conseguente diminuzione della concentrazione di ossido nitrico circolante [28].

La SDMA, isomero dell'ADMA, non agisce direttamente sull'attività della NOS, ma è in grado di bloccare in maniera "dose dipendente" la sintesi di NO nelle cellule endoteliali attraverso l'inibizione competitiva del trasporto della L-arginina all'interno delle cellule e del suo riassorbimento a livello renale nell'ansa di Henle. La sua attività dunque porterebbe ad una diminuzione della produzione di ossido di azoto conseguente ad una ridotta disponibilità del suo precursore [31].

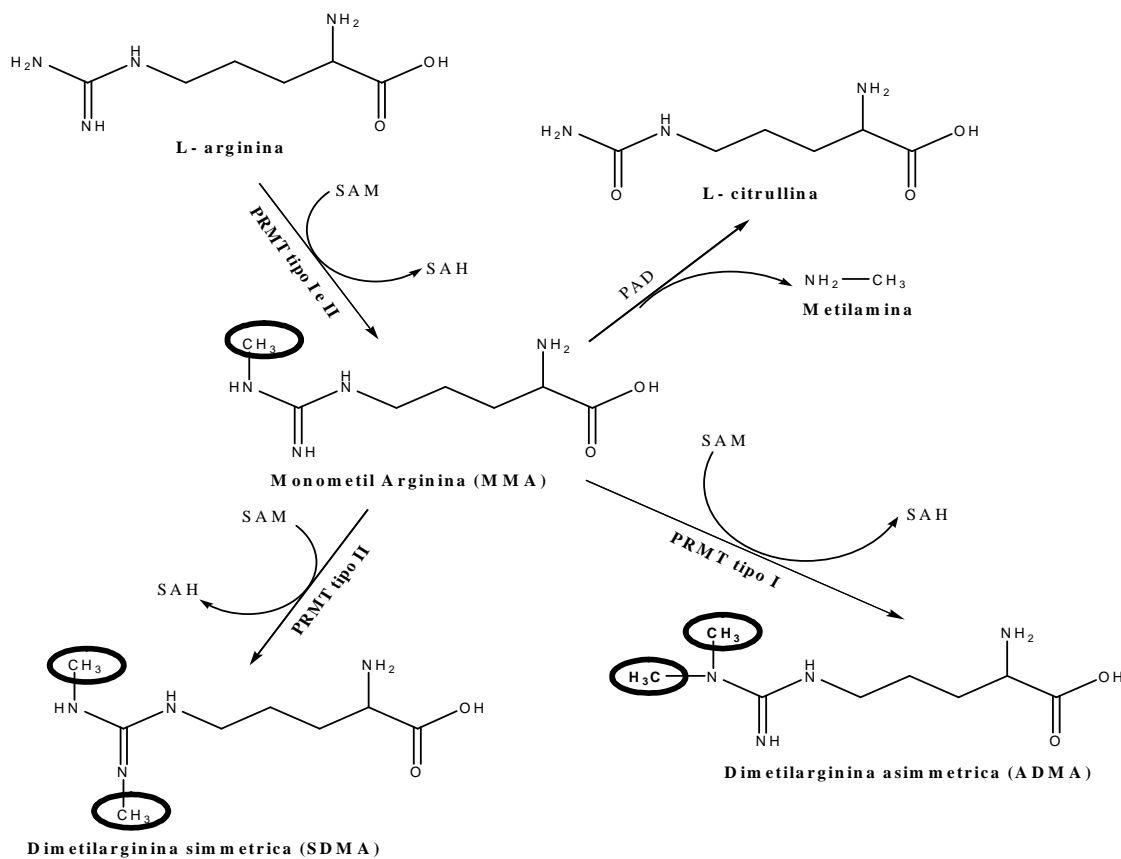
La metilazione dei residui di arginina è una modificazione molto comune che avviene prevalentemente nel nucleo delle cellule, e come tutte le reazioni di metilazione, gioca un ruolo chiave nella trasduzione del segnale, nella regolazione della

trascrizione, nel trasporto nucleare e nella diretta modulazione delle interazioni degli acidi nucleici, nonché nella circolazione delle proteine [10].

Questa reazione è catalizzata da una famiglia di enzimi denominati N-metiltransferasi proteiche (PRMTs) delle quali esistono due diversi tipi che svolgono funzioni biologiche differenti:

- il tipo 1 protein arginina metiltransferasi 1 (PRMT1) catalizza la formazione dell' N^G,N^G -dimetil-L-arginina (ADMA);
- il tipo 2 protein arginina metiltransferasi 2 (PRMT2) catalizza la formazione dell' N^G,N^G -dimetil-L-arginina (SDMA).

Entrambe le classi di enzimi catalizzano poi la formazione dell'intermedio N^G -monometil-L-arginina (NMMA) (Fig. 1.7).



SAM: S-adenosilmetionina; SAH: S-adenosilomocistina; PAD: peptidylarginin-deaminasi; PRMT1 e PRMT2: protein arginina metiltransferasi tipo 1 e 2

Figura 1.7 Via biosintetica di formazione degli analoghi metilati dell'arginina

Le PRMTs vengono espresse dalle cellule vascolari, ed in particolare, l'espressione del tipo PRMT1 nelle cellule endoteliali aumenta in risposta allo stress, generando una conseguente variazione nel rilascio di ADMA. Questo suggerisce dunque che la quantità di questo metabolita prodotto nei vasi sanguigni possa essere in parte regolata in seguito ad alterazioni nell'espressione dell'enzima PRMT.

L'attività del PRMT1 risulta, inoltre, influenzata dall'espressione delle lipoproteine a bassa densità (LDL) ed anche in questo caso gli effetti sembrano essere correlati con una alterata produzione di ADMA [30].

Tutti i metaboliti sopracitati: arginina, ADMA, SDMA ed NMMA si trovano fisiologicamente in basse concentrazioni nel plasma circolante e vengono eliminati dall'organismo attraverso l'escrezione urinaria; pertanto pazienti con patologie renali in cui è limitata l'escrezione fisiologica, avranno, in particolare, concentrazioni circolanti maggiori di ADMA, e, di conseguenza, elevate concentrazioni plasmatiche di ossido di azoto [32].

1.6. ADMA

La produzione di ADMA nell'organismo avviene, come detto precedentemente, in seguito ad una metilazione post-translazionale che attacca due gruppi metilici all'azoto guanidinico dell'arginina inglobata all'interno delle proteine. Essa viene poi liberata in circolo mediante proteolisi durante il normale turnover delle proteine stesse.

Da un punto di vista strutturale l'ADMA è molto simile all'arginina e pertanto compete con quest'ultima per il legame con la NOS, enzima chiave nella formazione dell'ossido di azoto. La presenza in circolo di basse quantità di ADMA non produce alcun effetto patologico, in quanto la concentrazione di arginina circolante è nettamente superiore e non vi è competizione per il legame con l'enzima; quando invece a seguito di processi di infiammazione o di stress ossidativo i livelli di ADMA circolanti crescono notevolmente, essa spiazzata completamente l'arginina legandosi al sito catalitico del NOS ed inibendone l'attività con conseguente produzione di ossido di azoto.

Nonostante anche NMMA rivesta un ruolo importante nell'inibizione endogena del NOS, i livelli plasmatici di ADMA risultano essere circa 10 volte superiori, motivo per il quale si focalizza l'attenzione soprattutto sul dosaggio dell'ADMA [30].

Dati riportati in letteratura dimostrano che la diminuzione dei livelli circolanti di ossido di azoto è un fattore prognostico negativo in pazienti affetti da patologie vascolari e cardiache, in quanto contribuisce alla formazione delle placche ateromatose e quindi dell'aterosclerosi. In questo senso il dosaggio dell'ADMA risulterebbe essere importante non tanto nella diagnosi di malattia, quanto allo scopo di evidenziare il grado di rischio nella manifestazione di eventuali complicazioni cardiovascolari e quindi in un peggioramento del quadro clinico. E' nota infatti l'associazione tra l'incremento dei livelli di ADMA e i principali fattori di rischio cardiovascolare quali età, ipertensione, diabete, insulino resistenza, ipercolesterolemia, ipertrigliceridemia e iperomocisteinemia [33], ma solo recentemente questo biomarker è stato associato anche alla patogenesi di alcune malattie respiratorie tra cui l'asma e la fibrosi cistica, in quanto, promuovendo lo stress ossidativo e l'iperreattività delle vie respiratorie, contribuisce ad aggravare lo stato infiammatorio delle vie aeree [34].

1.6.1. La via metabolica dell'ADMA e il ruolo del DDAH

La metilazione dei residui di L-arginina all'interno delle proteine o dei polipeptidi avviene grazie all'attività dell'enzima N-metiltransferasi che utilizza l'S-adenosilmetionina (SAM), un metabolita intermedio nel metabolismo dell'omocistina, come donatore di gruppi metili.

L'S-adenosilmetionina dopo aver ceduto il gruppo metile viene convertita in S-adenosilomocistina (SAH) e questa a sua volta in omocistina.

I residui di arginina metilati che si trovano legati alle proteine vengono liberati in circolo dall'azione fisiologica delle proteasi che scindono il legame tra proteina e arginina metilata. L'ADMA formatasi per metilazione post-traslazionale, che viene a trovarsi libera nel citoplasma, va incontro ad eliminazione o per inattivazione enzimatica o, dato il suo basso peso molecolare, attraverso eliminazione renale [35].

L'idrolisi enzimatica dell'ADMA è la principale via di eliminazione di questo metabolita (Fig. 1.8). Essa viene degradata in L-citrullina e dimetilamina attraverso l'azione dell'enzima dimetilarginina dimetilaminoidrolasi (DDAH) che svolge la sua attività praticamente in tutti i tessuti, soprattutto nel fegato e nel rene [35].

Il DDAH gioca un ruolo chiave nella regolazione dei livelli di ADMA circolanti in quanto, con la sua attività, permette di bilanciarne fisiologicamente la produzione, come dimostrato in studi di overespressione genica e di blocco dell'attività dell'enzima; di conseguenza, risulta essere un regolatore critico dell'attività della ossido nitrico sintetasi. Sembra infatti che ci sia un meccanismo di regolazione "feedback negativo" tra DDAH e NOS che porta al bilanciamento della produzione di NO nelle cellule endoteliali in condizioni fisiologiche [36].

Quando la funzione dell'enzima DDAH, in seguito a stimoli infiammatori e stress ossidativo, risulta compromessa, si viene a creare un incremento dei livelli di ADMA che provocano l'inibizione del NOS e una conseguente vasocostrizione con possibile aumento dei fattori di rischio cardiovascolare [37]. Il rapporto dunque DDAH/ADMA potrebbe essere una nuova via di modulazione della produzione di NO e delle funzioni endoteliali [36].

L'enzima DDAH riesce a metabolizzare solo l'ADMA e la NMMA, mentre la SDMA viene eliminata completamente per via renale senza essere stata modificata.

Recentemente è stata isolata una seconda isoforma dell'enzima DDAH che si trova largamente espresso nella placenta (DDAH2) e che risulta implicato nella preeclampsia [38]. Le due isoforme dell'enzima DDAH si trovano localizzate in diversi tessuti, ma entrambe presentano la medesima attività [37-38].

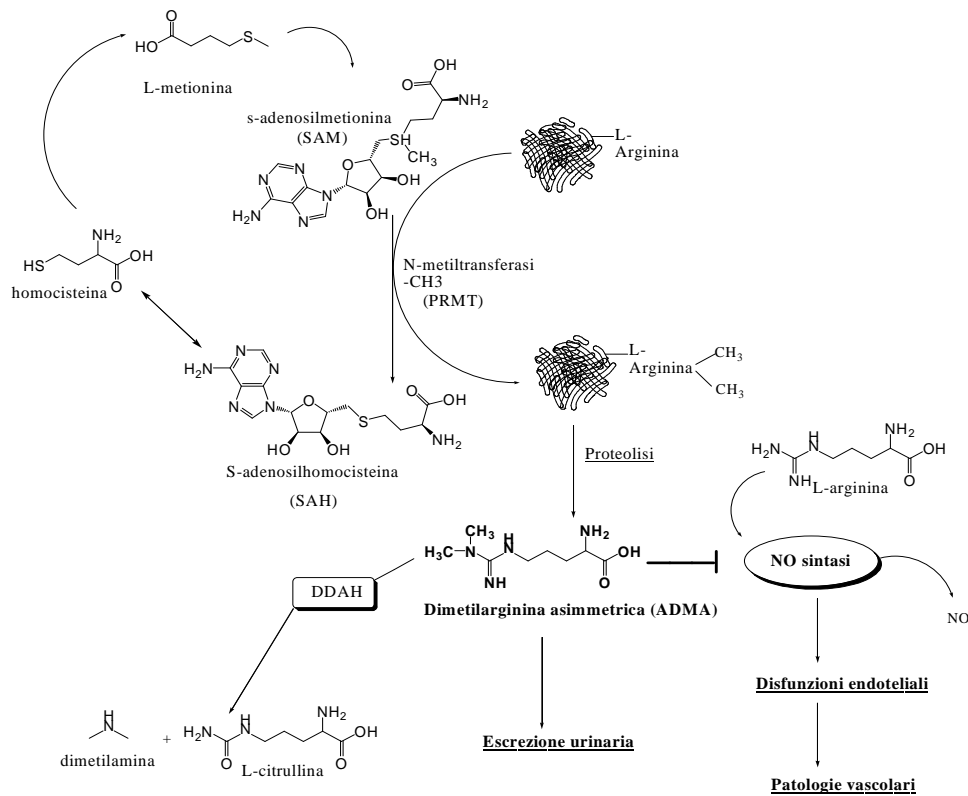


Figura 1.8 Via metabolica di sintesi dell'ADMA

1.7. Patologie dell'adulto indotte da stress ossidativo

1.7.1. Ruolo dell'ADMA nelle diverse patologie

Elevati livelli di ADMA circolante possono essere dovuti essenzialmente a tre diverse cause:

- Aumento della sua produzione che porta ad un accumulo del metabolita sia a livello plasmatico che urinario, in seguito allo sbilanciamento che si viene a creare tra il repentino aumento delle sue concentrazioni e la velocità di eliminazione, pur funzionando correttamente tutte le vie di escrezione;
- Inibizione dell'attività dell'enzima DDAH che non riesce più a metabolizzare l'ADMA in citrullina e dimetilamina;
- Compromissione renale e conseguente blocco dell'escrezione urinaria dell'ADMA normalmente prodotta: un blocco renale o un non corretto funzionamento del filtro renale comportano l'innalzamento dei livelli di ADMA [32].

La Tabella 1.1 riporta l'elenco delle patologie in cui risultano aumentati i livelli di ADMA circolante [35].

Tabella 1.1 Patologie in cui la concentrazione di ADMA risulta aumentata rispetto ai valori della popolazione sana

Patologia o disfunzione	Incremento
Ipertensione infantile	2 - 3 volte
Infarto cardiaco cronico	2 - 3 volte
Insufficienza renale acuta e cronica	2 - 7 volte
Patologie coronariche croniche	~ 2 volte
Diabete mellito di tipo II	2 - 3 volte
Epatopatie	2 - 3 volte
Ipercolesterolemia	~ 2 volte
Iperomocistinemia	~ 2 volte
Ipertensione	~ 2 volte
Ipertiroidismo	~ 2 volte
Patologia arteriosa periferica	2 - 3 volte
Preeclampsia	2 - 3 volte
Ipertensione indotta in gravidanza	~ 2 volte
Ipertensione polmonare	~ 2.5 volte
Stroke (colpo apoplettico)	~ 2 volte

- Malattie cardiovascolari: sono la causa più importante di mortalità, morbilità e invalidità nella popolazione italiana. La principale sfida nel corso degli anni è stata quella di riconoscere gli eventi che caratterizzano la genesi e la progressione del processo aterosclerotico, un percorso patologico che spazia dalla formazione della placca nella parete delle arterie, alla sua crescita e all'insorgenza delle successive complicazioni (ulcerazione, rottura, trombosi e ischemie). Una terapia medica appropriata può influenzare considerevolmente la prognosi dei pazienti, riducendo la probabilità d'insorgenza di eventi cardiovascolari sfavorevoli. L'aumento dei livelli di ADMA è stato riscontrato in numerose patologie già note come fattori di rischio cardiovascolare, quali l'ipercolesterolemia, l'ipertensione, il diabete, l'iperomocistinemia e in individui con patologia aterosclerotica conclamata [33,39-40]. Anche nella sindrome delle apnee ostruttive notturne (OSAS) gli aumentati livelli di CD40L (marker di aterosclerosi) sono stati correlati con un incremento dei valori di ADMA indipendentemente dalla presenza di altri fattori di rischio cardiovascolari. Questa osservazione sembra supportare l'idea che l'OSAS possa essere essa stessa un fattore di rischio cardiovascolare indipendente [41].
- Aterosclerosi. In passato il processo di aterosclerosi era considerato come un lento accumulo di componenti inerti nel lume di una arteria fino alla sua occlusione; oggi è noto che la maggioranza degli eventi clinici legati all'aterosclerosi deriva da lesioni dell'endotelio causa di stenosi. L'aterosclerosi è considerata come una risposta dell'intima di tipo immune/infiammatorio ad un danno tessutale. Essendo l'ossido nitrico una molecola con una potente

attività anti-aterosclerotica, una diminuzione dei livelli circolanti, causata dalla presenza dell'ADMA, induce un aumento del rischio di sviluppare aterosclerosi [39-40]. Anche in questo caso il dosaggio dell'ADMA risulterebbe essere importante allo scopo di evidenziare il grado di rischio nella manifestazione di eventuali complicazioni cardiovascolari e quindi in un peggioramento del quadro clinico del paziente.

- Insufficienza cardiaca: l'incremento dei livelli di ADMA e' stato associato ad una riduzione della frazione di eiezione che impedisce un normale aumento dell'output cardiaco sotto sforzo [42];
- Arteriopatia obliterante periferica: nei pazienti affetti da questa malattia, è stata riscontrata una correlazione negativa tra i livelli di ADMA nel plasma e dei nitrati nelle urine, indicativi della sintesi di NO; mentre la somministrazione di L-arginina ha dimostrato un aumento della distanza percorsa senza dolore grazie al miglioramento della vasodilatazione NO-mediata indotta dall'endotelio [43];
- Arresto cardiaco: diversi lavori hanno riportato aumentati livelli di ADMA nei pazienti che hanno subito un arresto cardiaco correlati alla gravità della disfunzione endoteliale [37,44-45].
- Ipertensione polmonare. Il termine "ipertensione polmonare arteriosa" identifica un gruppo di malattie caratterizzate da un progressivo aumento delle resistenze arteriose polmonari che determinano scompenso cardiaco destro con riduzione della sopravvivenza in assenza di trattamento. Appartengono a questa classe i pazienti con ipertensione polmonare primitiva e quelli con ipertensione polmonare associata a sclerodermia, a cardiopatie congenite con shunt sistemico-polmonari, ad infezione da HIV e ad ipertensione portale. Nell'ipertensione arteriosa polmonare l'aspetto istologico dei vasi polmonari è caratterizzato da estesa proliferazione di tutte le componenti cellulari e da una disfunzione dell'endotelio dei vasi polmonari. Nei bambini con ipertensione polmonare i livelli plasmatici di ADMA sono risultati da 2 a 3 volte superiori rispetto ai valori normali e modelli sperimentali hanno dimostrato che nell'ipertensione polmonare l'ADMA aumenta quando il DDAH è difettivo. Nella circolazione polmonare, molto sensibile agli inibitori della NOS, si e' riscontrato un ruolo attivo anche della NMMA che causerebbe un rapido e prolungato aumento della pressione nelle arterie polmonari [44].
- Insufficienza renale. L'insufficienza renale cronica è una condizione patologica in cui viene meno la normale funzione renale di escrezione che porta ad un accumulo nel sangue di prodotti di scarto del metabolismo cellulare. Progressivamente si osserva un aumento di azotemia, creatininemia, uricemia, fosfatemia e potassiemia. In letteratura esistono diverse evidenze dello stretto legame tra stress ossidativo e uremia, spesso considerata come l'evento scatenante dello squilibrio tra fattori pro- e antiossidanti [40]. Questo sbilanciamento è dovuto sia ad un aumento della produzione di ROS, sia ad una

riduzione della capacità antiossidante caratteristica dei pazienti uremici dovuta all'accumulo di aldeidi reattive e gruppi tiolici ossidati e ad una concomitante riduzione dei gruppi tiolici ridotti antiossidanti. L'ambiente altamente ossidante, inoltre, determina una elevata perossidazione lipidica che contribuisce al danno cellulare. L'insufficienza renale acuta (IRA) può essere classificata come prerenale, postrenale e renale. Le cause prerenali e postrenali (ostruzione dello sbocco vescicale, iperplasia prostatica, neoplasia) sono potenzialmente reversibili se diagnosticate e trattate precocemente; sono curabili anche alcune cause renali come l'ipertensione maligna, le vasculiti, le infezioni batteriche, le reazioni a farmaci e le malattie metaboliche. L'ADMA risulta avere valori da 2 a 7 volte superiori rispetto alla norma in pazienti con insufficienza renale terminale [32,37,46].

- Epatopatie: diverse evidenze sperimentali hanno dimostrato che, nel caso di danni epatici, i livelli di ADMA tendono ad aumentare, in quanto nel fegato c'è un'elevata presenza dell'enzima DDAH che non è più in grado di metabolizzare l'ADMA circolante, mentre i livelli di SDMA rimangono inalterati, in quanto questo metabolita non subisce alcuna modificazione da parte dell'enzima e viene eliminato direttamente per via renale [37,46-47].
- Diabete. Esistono due tipi di diabete: il diabete mellito di tipo I e quello di tipo II. Il diabete mellito di tipo I, sebbene possa insorgere a qualunque età, si sviluppa prevalentemente durante l'infanzia o l'adolescenza ed è caratterizzato da una produzione scarsa o nulla di insulina da parte del pancreas. Il diabete mellito di tipo II viene diagnosticato abitualmente nei pazienti di età superiore a 30 anni ma può essere riscontrato anche nei bambini e negli adolescenti. Esso è caratterizzato clinicamente da iperglicemia e resistenza all'insulina. Livelli elevati di ADMA sono stati riscontrati in pazienti con diabete di tipo II insulino resistente dimostrando anche una correlazione tra il grado di insulino resistenza e l'incremento delle concentrazioni di questo metabolita. L'ipotesi più probabile che spiegherebbe tale aumento è legata al fatto che il glucosio, che in questi pazienti si trova in quantità elevata in circolo, sopprimendo l'attività del DDAH rallenta il metabolismo dell'ADMA che inevitabilmente si accumula nel sangue [37].
- Pre-eclampsia: è un disordine multisistemico caratterizzato da una elevata pressione sanguigna, edema e proteinuria. Essa rappresenta una delle maggiori cause di morbilità e mortalità sia materna che fetale [38]. Le cause della pre-eclampsia rimangono tuttora sconosciute e l'esito è altamente condizionato dalla tempestività dell'intervento medico; per questo motivo è importante il riconoscimento precoce della malattia e l'identificazione delle donne ad alto rischio. La malattia origina in epoca gestazionale precocissima, ma i segni clinici e i sintomi si manifestano solo in uno stadio più tardivo della gravidanza (verso il terzo trimestre). Studi recenti hanno dimostrato che i livelli plasmatici di ADMA sembrano essere normali nelle donne in gravidanza con decorso

normale mentre risultano aumentati nelle donne con pre-eclampsia, e che tale incremento si abbia anche prima che siano evidenti i segni clinici o i sintomi della disfunzione. Ne consegue che questo metabolita potrebbe rappresentare un nuovo marker per l'identificazione delle gravidanze a rischio di sviluppare tale patologia. L'ADMA viene prodotta anche dal feto ed è presente in gran parte nelle urine e nel plasma fetali. La placenta, inoltre, in condizioni normali esprime elevati livelli di DDAH2, l'enzima deputato al suo metabolismo. Nel caso in cui si verificasse un danno o un malfunzionamento della placenta stessa si verrebbe a creare dunque, un incremento dei livelli di ADMA sia nel feto che nella madre, a causa del non corretto funzionamento dell'enzima [37-38].

1.8. Patologie del neonato e del bambino indotte da stress ossidativo

1.8.1. Patologie legate alla prematurità e possibile ruolo dell'ADMA

La prematurità comporta nel bambino sia problemi a breve termine che problemi a lungo termine e la loro gravità è inversamente proporzionale all'età gestazionale al momento del parto. I problemi sono particolarmente gravi quando la nascita avviene prima di 34 settimane, viceversa, il parto dopo la 36° settimana è considerato abbastanza sicuro per il feto, se non esistono altre patologie concomitanti ed il suo sviluppo intrauterino si è svolto in maniera regolare. Il neonato pretermine va frequentemente incontro ai seguenti problemi:

- difficoltà nel mantenere un'adeguata temperatura corporea;
- elevato rischio di infezioni da batteri, virus o funghi; in quanto il sistema immunitario non è ancora sviluppato e la maggior parte degli anticorpi deriva dal passaggio trans-placentare;
- problemi di tipo respiratorio a causa dell'imaturità polmonare che portano alla Sindrome da Distress Respiratorio (RDS) o malattia da membrane ialine. Questa patologia insorge a causa della scarsa quantità di surfattante, una sostanza prodotta dai polmoni maturi che aiuta a mantenere aperti gli alveoli. A causa della mancanza di surfattante, gli alveoli collassano, rendendo difficoltosa la respirazione. L'RDS colpisce circa il 40% dei prematuri e rappresenta ancora oggi una delle cause principali di morte nei neonati a bassissimo peso (VLBW: Very Low Birth Weight, peso <1489 g e ELBW: Extremely Low Birth Weight, peso <990 g);
- broncodisplasia polmonare (BPD) che spesso insorge come complicanza della ventilazione meccanica e della ossigenoterapia ad elevate concentrazioni in questi bambini. Essa può diventare causa frequente di malattia respiratoria cronica con significativa morbidità nei primi anni di vita, che va tuttavia riducendosi nel tempo, mentre le anomalie funzionali tendono invece a persistere più a lungo, fino alle soglie dell'età adulta. L'incidenza della BPD aumenta col decrescere del peso alla nascita e attualmente colpisce circa il 30% dei neonati ELBW che sviluppano la patologia a causa della marcata immaturità polmonare che consegue all'arresto

dell'alveolarizzazione nel neonato pretermine. Sta diventando sempre più evidente come ci sia una connessione tra diminuita alveolarizzazione e precedente processo infiammatorio. Nella fase acuta della BPD indotta su modelli animali è stato dimostrato un afflusso di neutrofili e macrofagi nei polmoni e di vari mediatori dell'infiammazione, inclusi chemochine, citochine e fattori di crescita, che sono presenti nell'aspirato tracheale di bambini con BPD [48]. Nella fase iniziale della BPD indotta dall'iperossia in modelli animali, oltre all'afflusso di polimorfonucleati e macrofagi, è stato anche associato un incremento di molecole come la MCP-1 e l'IL-8, potenti chemoattrattori per le cellule infiammatorie. Le sorgenti di queste ed altre citochine sono l'epitelio alveolare, l'endotelio e le stesse cellule infiammatorie. Ci sono parecchi studi sperimentali che dimostrano che il blocco dei mediatori dell'infiammazione o dei loro recettori migliora l'outcome polmonare, specificatamente con un aumento dell'alveolarizzazione [49]. Tuttavia il processo infiammatorio sia esso associato a corioamnionite clinicamente manifesta può essere esacerbata dalla rianimazione in sala parto, specie se con alti volumi correnti. A ciò si deve aggiungere che anche l'aria ambiente è relativamente iperossica per il polmone prematuro che normalmente è esposto a minor tensione di ossigeno in utero. In questo contesto l'esposizione all'iperossia e il danno polmonare indotto dalla ventilazione continuano il processo infiammatorio eventualmente iniziato durante la vita fetale (corioamnionite);

- anemia, in quanto nel periodo neonatale i globuli rossi hanno una vita più breve e durante le prime settimane di sviluppo la loro produzione è limitata, oltre al fatto che le infezioni possono contribuire a ridurre il numero;
- apnee principalmente dovute all'imaturità del sistema nervoso, spesso associate a bradicardia (rallentamento del battito cardiaco) e desaturazione (diminuzione della quantità di ossigeno nel sangue);
- retinopatia della prematurità, maggiormente frequente nei pretermine nati prima della 28^a settimana, causata da un'anomala crescita dei vasi sanguigni che irrorano l'occhio;
- dotto di Botallo pervio, dovuto ad una mancata chiusura fisiologica del dotto per cui parte del sangue dall'aorta viene rimandato indietro nei polmoni, provocando seri danni sia al sistema cardiovascolare che polmonare;
- ittero, dovuto ad un eccessivo accumulo di bilirubina nel sangue, e' causato nell'79% dei prematuri dall'imaturità del fegato che non riesce ad eliminare per coniugazione la grande quantità di bilirubina prodotta. Allo scopo di evitare danni cerebrali dovuti all'eccesso di bilirubina si ricorre alla fototerapia, o nei casi più gravi alla exanguinotrasfusione.
- grave rischio di emorragie cerebrali causate dalla fragilità dei vasi sanguigni, la cui estensione viene indicata su una scala di quattro gradi secondo la gravità. Le emorragie di I e II grado sono le più frequenti e solitamente non causano danni cerebrali permanenti; al contrario bambini con un'emorragia molto estesa, di III o

IV grado, possono andare incontro ad idrocefalo (aumento della quantità di liquido nei ventricoli cerebrali) e a gravissimi danni permanenti.

- Problemi nello sviluppo neurocomportamentale, particolarmente nei neonati pretermine piccoli per età gestazionale (SGA: Small for Gestational Age), vi è una maggiore incidenza di deficit e disturbi dell'apprendimento; sono segnalati anche disturbi della crescita post-natale (ritardo staturò-ponderale più evidente rispetto ai prematuri appropriati per età gestazionale), ritardo nell'eruzione dei denti, un lieve aumento dell'incidenza di infezioni nei primi due anni di vita.

In questo contesto si è voluta porre particolare attenzione allo sviluppo polmonare del neonato, a livello del quale l'ossido nitrico (NO) è un fattore critico di regolazione della morfogenesi e del mantenimento dell'omeostasi durante la vita fetale verificando il ruolo dell'ADMA quale possibile marker di patologia di alcuni disordini che originano in neonati prematuri e di peso estremamente basso alla nascita ELBW ed esposti a corioamnionite durante la vita fetale e quindi, di poter validare il suo dosaggio nella pratica clinica quotidiana, come fattore di rischio per lo sviluppo di patologie NO-dipendenti e nella prognosi di sindromi da stress ossidativo in caso di infiammazione in epoca prenatale.

1.8.2. Ruolo dell'ADMA nelle patologie respiratorie

Come riportato in precedenza, la dimetilarginina asimmetrica è coinvolta nella patogenesi di molte condizioni cliniche, ma solo studi recenti suggeriscono che essa possa avere un ruolo anche nella patogenesi delle malattie respiratorie, tra cui l'asma, la fibrosi cistica e la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) [34,48].

L'asma è una malattia infiammatoria cronica nella quale sono coinvolti numerosi tipi di cellule tra cui neutrofili, eosinofili, macrofagi, mastociti, linfociti T, cellule epiteliali, dendritiche e muscolari lisce. L'infiammazione cronica è associata a iperreattività bronchiale che si accompagna a frequenti episodi di wheezing, sensazione di mancanza di respiro, costrizione toracica e tosse (prevalentemente notturna o nelle prime ore del mattino), spesso associati all'esposizione a "triggers". Questi episodi sono generalmente accompagnati da un diffuso se pur variabile grado di ostruzione bronchiale, spesso reversibile, spontaneamente o mediante opportuna terapia [50]. Le infezioni virali sono i triggers più importanti [51], seguite dall'esposizione ad allergeni inalanti, domestici (acari della polvere, forfora di pelo di gatto e cane), oppure esterni (pollini) [52]. Tradizionalmente, la classificazione più conosciuta dell'asma fa riferimento al grado di severità della sintomatologia e della riduzione del flusso aereo e alla variazione della funzione respiratoria, distinguendo 4 sottotipi: lieve intermittente, lieve persistente, moderato persistente e severo persistente. Una definizione più utile però è quella che determina la severità dell'asma in base all'intensità di trattamento necessaria a mantenere i sintomi sotto controllo. Se si considera il grado di controllo, si distinguono 3 categorie: asma in buon controllo, in parziale controllo o non controllato. Il ruolo attivo dell'ADMA è stato recentemente riscontrato come contributo ad

aggravare lo stato infiammatorio delle vie aeree nella patogenesi di alcune malattie respiratorie tra cui l'asma e la fibrosi cistica, in quanto promuove lo stress ossidativo influenzando l'iperreattività delle vie respiratorie [50-51].

Da studi recenti di Wells et al. su cellule epiteliali murine si evince infatti, che quando ADMA è presente in elevate concentrazioni, essa spiazzata l'arginina dal sito attivo di NOS provocando un disaccoppiamento dell'attività di questo enzima, con aumentata produzione di O_2^- e $ONOO^-$ radicali altamente reattivi e ridotta sintesi di NO. L'incremento di queste specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto è responsabile del danno ossidativo sulle componenti proteiche, con conseguente disfunzione e danno cellulare. Il modello di Wells ipotizza che ADMA inibisca preferenzialmente eNOS piuttosto che iNOS, sulla quale al contrario avrebbe un effetto disaccoppiante che induce l'incremento di radicali altamente reattivi.

Lo stress ossidativo, indotto dall'alterazione dei livelli circolanti di ADMA, sommato all' O_2^- prodotto nei mitocondri e ad opera della NADPH ossidasi, potrebbe quindi essere coinvolto nella patogenesi dell'infiammazione cronica delle vie aeree che è alla base stessa dell'asma [52].

Studi condotti da Persinger e coll. hanno dimostrato che in presenza di bassi livelli di arginina causati o dall'incremento della concentrazione plasmatica di ADMA o dall'aumentata attività enzimatica dell'arginasi, l'enzima iNOS risulta disaccoppiato, pertanto l'arginina non completamente metabolizzata ad NO provocherebbe la produzione di ROS e RNS, responsabili del danno da ossidazione su proteine, lipidi, DNA e carboidrati e della morte cellulare di vari tipi di cellule, tra cui gli pneumociti di tipo 2 del polmone [53].

Questi dati rafforzano quindi l'ipotesi di un possibile coinvolgimento dell'ADMA nell'alterazione della funzionalità respiratoria non solo in quanto inibitore competitivo dell'ossido nitrico sintetasi, ma anche per azione diretta sull'attività dell'arginasi, influenzando pertanto il metabolismo dell'arginina [54].

A questi studi ne sono seguiti altri che hanno impiegato modelli murini per indagare il ruolo dell'ADMA nelle malattie polmonari caratterizzate da rimodellamento e stato infiammatorio cronico. Negli esperimenti di Ahmad et al. effettuati su topi BALB/c per riprodurre un modello di asma allergico, i livelli endogeni di ADMA, individuati mediante test ELISA, sono risultati aumentati rispetto ai controlli e questi dati correlano con l'incremento dei livelli di nitrotirosina nel modello murino di asma allergico. Secondo gli autori, l'aumento dei livelli endogeni di questo metabolita nell'asma sarebbe dovuto al suo alterato metabolismo, dimostrato dall'aumentata espressione di PRMT2 e da una ridotta espressione di DDAH2. Inoltre i livelli di ADMA e di $ONOO^-$ sono risultati elevati nei mitocondri degli stessi topi, ipotizzando un ruolo dell'ADMA anche nella disfunzione mitocondriale recentemente riscontrata nella patologia di tipo asmatico, oltre che nell'aumentata deposizione di collagene a livello della matrice extracellulare caratteristica nel fenomeno di "remodeling" delle vie aeree, tipico di patologie come la broncopneumopatia cronico-ostruttiva (BPCO) in risposta al danno infiammatorio [54-56]. Un modello che potrebbe spiegare il ruolo di

ADMA nell'accumulo di collagene nelle vie aeree fa riferimento al suo effetto indiretto sul metabolismo dell'arginina, convertita in ornitina e urea per mezzo dell'enzima arginasi. In tale contesto, ADMA aumenterebbe la disponibilità di L-arginina inibendo sia l'attività di NOS che quella di NOHA, principale intermedio della conversione di L-arginina in NO, che agisce da inibitore competitivo dell'arginasi. Di conseguenza l'arginasi, avendo a disposizione più substrato, aumenterebbe la disponibilità di L-prolina, aminoacido fondamentale per la sintesi del collagene. Si evince che questa interferenza sul metabolismo dell'arginina potrebbe essere un meccanismo secondario di alterazione della funzionalità respiratoria da parte dell'ADMA [57].

Sebbene le evidenze finora riportate derivino da studi su modelli murini recentemente Scott e coll. Hanno riportato un incremento dei valori di ADMA nell'espettorato di bambini asmatici e in campioni di tessuto polmonare umano, confermando un ruolo attivo dell'ADMA nell'iperreattività bronchiale e nella produzione di NO nei pazienti asmatici [51].

1.8.3. Il condensato dell'aria espirata (EBC)

Sebbene la metodica standard per lo studio dell'infiammazione delle vie aeree preveda l'utilizzo di procedure invasive tra cui la broncoscopia, il broncolavaggio e le biopsie bronchiali, recentemente è stata proposta l'analisi sul condensato dell'aria espirata (EBC: Exhaled Breath Condensate), la cui composizione si ritiene rifletta quella del liquido di superficie delle vie aeree. Si tratta di una metodica non invasiva, facilmente eseguibile in campo pediatrico e che permette il dosaggio di biomarkers di infiammazione e stress ossidativo provenienti dalle vie respiratorie.

La raccolta dell'EBC avviene raffreddando l'aria esalata dal soggetto durante una respirazione a volume corrente attraverso un boccaglio, dotato di un filtro, connesso ad un condensatore per un tempo di circa 15 minuti. In tal modo si ottengono circa 1-2 mL di condensato. La presenza del filtro assicura un miglior controllo della possibile contaminazione salivare durante l'esecuzione della raccolta in quanto, essendo presenti a livello delle basse vie aeree diversi mediatori chimici che si ritrovano anche nella saliva, quest'ultima potrebbe interferire con l'analisi delle sostanze d'interesse prodotte in questo tratto di sistema respiratorio. Esistono due teorie che spiegano come avvenga la formazione dell'aerosol di cui è costituito il condensato. La prima fa riferimento ai fenomeni di turbolenza che, nella respirazione a volume corrente, si sviluppano soprattutto in prossimità delle ramificazioni dell'albero bronchiale, come la carena tracheale. Sarebbe proprio l'elevata energia di collisione dell'aria espirata sulle pareti dei bronchi a determinare la formazione di una maggiore quantità di particelle, disperse in aerosol, misurabili nel condensato. La seconda ipotesi si basa invece sull'apertura repentina e quasi esplosiva dei bronchioli respiratori e degli alveoli durante la respirazione [58].

Il condensato che viene raccolto è quindi costituito principalmente da tre componenti: vapore acqueo, che rappresenta da solo più del 98%, composto da particelle disperse in aerosol; sostanze volatili tra cui ammoniaca, perossido di idrogeno

ed etanolo e sostanze non volatili tra cui citochine, lipidi, surfactante e prodotti di natura ossidativa provenienti dalle vie respiratorie.

Da qui nasce l'idea di utilizzare questo biofluido allo scopo di studiare i processi patologici a carico delle vie aeree, monitorando alcuni marker di stress ossidativo nell'infiammazione di tipo asmatico, tra cui la dimetilarginina asimmetrica e la nitrotirosina (3-NT), anch'essa coinvolta nello stress nitrossidativo.

1.8.4. Raccolta dell'EBC

Al paziente viene chiesto di respirare a volume corrente per circa 15 minuti attraverso un boccaglio connesso ad un condensatore. Durante questo tempo, in genere ben tollerato dal probando, si ottengono circa 1-2 mL di condensato, sia da soggetti adulti che dalla maggior parte dei bambini di età superiore ai 4 anni [59]; per quanto riguarda invece i bambini di età inferiore, non esiste ancora una metodica raccomandata [60] anche se ci sono diversi studi che ne hanno confermato la fattibilità. La respirazione attraverso un boccaglio è piuttosto faticosa per i bambini in età prescolare e richiede comunque un certo grado di collaborazione, tuttavia uno studio pubblicato nel 2006 ha dimostrato la fattibilità della raccolta dell'EBC anche in bambini di età compresa tra 1 e 30 mesi, in tale studio, è stata raccolta in un tempo di 10 minuti una quantità di condensato (49 μ L) sufficiente ad effettuare l'analisi di un solo metabolita, sebbene richiedesse la sedazione del paziente [61].

Il boccaglio è dotato di un filtro per evitare la contaminazione salivare, che può essere valutata mediante il dosaggio dell'amilasi salivare nell'EBC [59]. Esistono comunque diverse tecniche per evitare tale contaminazione, tra cui il posizionamento del condensatore a un livello più alto rispetto alla bocca e la separazione del boccaglio dal condensatore mediante un sistema di tubi interconnessi.

Anche la temperatura del condensatore è un parametro importante che va controllato e segnalato all'inizio della raccolta. In uno studio effettuato da Goldoni et coll. È stato infatti dimostrata la tendenza all'aumento del volume di condensato raccolto al diminuire della temperatura a cui avviene la raccolta [62].

1.8.5. Contenuto dell'EBC

Il condensato dell'aria espirata, grazie alla semplice modalità di raccolta, del tutto non invasiva, può essere usato per quantificare molecole provenienti dalle vie respiratorie. Dai dati forniti dalla letteratura a tutt'oggi nel condensato sono stati dosati i seguenti biomarkers:

- Marker di stress ossidativo:

Perossido di idrogeno (H_2O_2): prodotto per conversione dell'anione O_2^- (superossido) da parte dell'enzima superossido dismutasi, è una molecola volatile sintetizzata da diversi tipi di cellule coinvolte nel processo infiammatorio [63]. I livelli di questa molecola, instabile nell'EBC, sono influenzati da stati patologici ed in particolare, risultano elevati in soggetti asmatici [64]. È stato dimostrato che soggetti in terapia corticosteroidica presentano una riduzione dei livelli di H_2O_2 [65] mentre non c'è

miglioramento dopo trattamento con antagonisti recettoriali dei leucotrieni (Montelukast) [66].

Isoprostani: sono molecole simili alle prostaglandine che si formano mediante reazione non enzimatica dell'acido arachidonico con specie reattive dell'ossigeno [67]. Le loro concentrazioni sono aumentate, rispetto ai valori normali, nell'asma [68], nella fibrosi cistica [69], nella BPCO e nei fumatori sani [70,71].

Nitrotirosina: prodotta dalla reazione del ONOO^- (perossinitrito) con residui di tirosina, è un composto stabile, identificabile con l'uso di anticorpi specifici [72]. I livelli di nitrotirosina nell'EBC sono risultati aumentati nei bambini asmatici [73] e negli adulti asmatici che non hanno mai assunto steroidi inalatori [74].

- Derivati dell'Ossido Nitrico:

Nitriti e nitrati: prodotti di reazioni redox presenti nel liquido che bagna le superfici bronchiali. Nell'EBC di soggetti con esacerbazione asmatica in corso, NO_2^- (anione nitrito) è risultato essere incrementato rispetto a soggetti asmatici in buon controllo e in trattamento con steroidi inalatori [75,76]. In altri lavori però, che coinvolgevano soggetti con asma moderato [77] o fibrosi cistica [78], non sono stati osservati incrementi nei livelli di NO_2^- esalato.

- Metaboliti dell'Acido Arachidonico

Leucotrieni: vengono prodotti a partire dall'acido arachidonico per azione della 5-lipossigenasi e classificati in LTB₄ e cisteinil-leucotrieni. Sono molecole prodotte da vari tipi di cellule dell'infiammazione, tra cui i mastociti e sono coinvolte nella patogenesi dell'asma, dove sostengono la contrazione della muscolatura liscia peribronchiale e accentuano la secrezione mucosa [79]. Numerosi studi hanno identificato la presenza di elevati livelli di queste molecole nel condensato dell'aria esalata di bambini asmatici [80,81].

Prostanoidi: in questo gruppo, rientrano due famiglie di sostanze, le prostaglandine e i trombossani, entrambi sintetizzati dall'enzima ciclossigenasi (COX). Le prostaglandine E₂ (PGE₂), che hanno un ruolo sia pro-infiammatorio che antinfiammatorio, D₂ (PGD₂) e PGF_{2a} e il trombossano B₂ sono stati ritrovati nel condensato [82].

- Citochine e altri mediatori:

Molte citochine tra cui IL-4, IL-8, IL-17 e TNF α sono risultate aumentate nell'EBC di soggetti asmatici [83].

1.9. Metodi analitici per il dosaggio dell'ADMA

Dato il notevole interesse che l'ADMA ha suscitato in qualità di possibile marker di rischio cardiovascolare e di stress ossidativo, sono stati sviluppati diversi metodi analitici per determinarne la concentrazione a livello plasmatico.

Alcune di queste tecniche come ad esempio l'HPLC [84,85], l'elettroforesi capillare [86], la gas-cromatografia/spettrometria di massa (GC/MS) [87], la cromatografia liquida/spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) [88], la cromatografia liquida/spettrometria di massa (LC-MS) [89,90] e l'HPLC/ spettrometria

di massa tandem (HPLC-MS/MS) [91] risultano avere spesso tempi di analisi troppo lunghi e richiedono l'uso di quantità di campione elevate, diventando, dunque, impronunciabili nell'ambito di uno studio approfondito in età neonatale.

Solo recentemente sono stati sviluppati dei metodi ELISA [92,93], che pur avendo alcuni svantaggi (bassa specificità e accuratezza, variabilità a seconda della matrice, sovrastima del dato e il limite di monitorare un solo metabolita), sono però in grado di rispondere all'esigenza di un laboratorio chimico clinico di utilizzare piccole quantità di campione per l'esecuzione dell'analisi.

Tutte le metodiche finora utilizzate hanno tuttavia, dovuto far fronte alle numerose difficoltà analitiche associate alla quantificazione nei fluidi biologici, di questi metaboliti metilati, tra cui l'ADMA [94].

In primo luogo, mentre le concentrazioni dei diversi aminoacidi nel plasma sono per lo più dello stesso ordine di grandezza (i livelli di arginina sono, per esempio, dell'ordine di 49 μM), le concentrazioni tipiche dell'ADMA e dell'SDMA sono di due ordini di grandezza più basse, ed i livelli di L-NMMA sono ancora inferiori rispetto a queste ultime, di un altro ordine di grandezza. Queste condizioni richiedono dunque saggi ad alta specificità e sensibilità, caratteristiche non completamente collimate dall'uso di test ELISA.

Arginina, ADMA, SDMA e L-NMMA sono composti privi di gruppi cromofori, pertanto risulta impossibile ai fini della loro determinazione l'uso di tecniche spettrofotometriche UV e di detector fluorescenti. Inoltre, dato che gli aminoacidi sono composti polari, termicamente labili e non volatili, non possono essere analizzati tramite tecniche dirette di gascromatografia e la loro analisi senza derivatizzazione risulta difficile anche con l'uso dei principali metodi di HPLC in fase inversa, a differenza dell'elettroforesi capillare che invece risulta difficoltosa proprio per la necessità di derivatizzare il campione [95].

L'uso della spettrometria di massa ha permesso invece di identificare questi composti in base al loro rapporto massa/carica (m/z) valutando i loro caratteristici pattern di frammentazione relativamente ai tempi di ritenzione ottenuti grazie all'accoppiamento con HPLC o GC. Lo spettrometro di massa, rispetto ai convenzionali detector usati in cromatografia, offre il vantaggio di avere una maggiore selettività con una diminuzione degli errori nella quantificazione dovuti a possibili interferenze.

Un problema concernente l'accuratezza nella quantificazione di questi metaboliti è dato dalla disponibilità degli standard interni (SI): difatti i più convenzionali metodi HPLC usano l'omoarginina o L-NMMA, che essendo delle sostanze endogene possono portare ad errori nella quantificazione, dovuti al fattore individuale di ciascun campione contenente al suo interno lo standard stesso. In entrambi i casi, aumentando le concentrazioni dello standard interno, si otterrebbe un errato rapporto di concentrazioni tra SI ed analita, con conseguente incremento dell'imprecisione e dell'inaccuratezza [94].

Occorre infine considerare l'effetto della matrice che generalmente rende non riproducibile e non ripetibile l'analisi, ampliando la variabilità tra diversi campioni o

addirittura all'interno dello stesso campione e che dunque può portare ad errori sistematici nella quantificazione di concentrazioni così piccole come nel caso dell'ADMA. Quando la calibrazione per un determinato analita viene eseguita in una matrice come il plasma o le urine, tramite aggiunte di sostanza a concentrazioni crescenti, la curva risultante non passa per l'origine, ma avrà un'intercetta sull'asse y, il cui valore corrisponde alla concentrazione endogena di analita nella matrice stessa. Il valore vero di concentrazione dell'analita nella matrice si trova, generalmente, nel range più basso della curva di calibrazione laddove normalmente l'imprecisione analitica è maggiore. Se l'effetto matrice viene trascurato, preparando per esempio una curva di calibrazione in acqua, aumenta la probabilità di andare incontro ad inaccuratezza nell'espressione dei risultati ottenuti sia con tecniche analitiche convenzionali che con approcci basati sulla spettrometria di massa, in particolare, per i metodi di LC-MS che sfruttano una ionizzazione a pressione atmosferica (API) dove l'effetto della matrice sulla soppressione nella formazione degli ioni d'interesse è molto evidente.

L'effetto matrice può essere minimizzato sia migliorando le condizioni di preparazione del campione che ottimizzando la procedura cromatografica o le condizioni di ionizzazione, ma il metodo migliore risulta essere l'utilizzo del rapporto isotopico che consiste nell'uso di un composto marcato con un isotopo stabile a concentrazione nota e costante, che risente degli stessi effetti della matrice rispetto al campione incognito [95].

1.9.1. Metodi ELISA

Nel 2003 Boger ha sviluppato un saggio immunoenzimatico ELISA consistente nella reazione dell'analita di interesse contenuto in una matrice opportuna, con un anticorpo specifico. Per l'ADMA ha utilizzato un anticorpo policlonale specifico validato in HPLC ed in cromatografia-spettrometria di massa. La cross-reattività di questo anticorpo con SDMA ed L-NMMA è al di sotto del 5% e, nonostante un'alta riproducibilità dei risultati, il limite di rilevabilità è risultato essere molto alto [93,96].

1.9.2. Metodi GC-MS/MS

L'arginina ed i suoi metaboliti metilati, in quanto amminoacidi polari e composti non volatili, non possono essere analizzati in GC senza che siano stati derivatizzati tutti i centri polari della molecola, pertanto sono state messe a punto nel corso degli anni diverse metodiche di derivatizzazione accompagnate da una valutazione attenta sull'effetto a livello strumentale.

Un primo approccio [87] consiste nella derivatizzazione tramite un primo step di esterificazione con metanolo e successiva reazione con anidride pentafluoropropionica (PFPA). In tal modo si ottengono dei picchi stretti e ben separati per arginina ed ADMA che, lavorando in ionizzazione chimica negativa (NICI) con GC-MS/MS, non interferiscono tra loro nel cromatogramma. L'SDMA durante la derivatizzazione porta alla formazione di un prodotto molto diverso dall'ADMA pertanto i due isomeri strutturali possono essere facilmente separati. Lo standard interno usato per la

determinazione quantitativa dell'arginina è la [¹⁵N₂]-Arg, mentre non è disponibile commercialmente uno standard interno marcato con un isotopo stabile per l'ADMA. Schwedhelm nel 2005, ha utilizzato nel suo lavoro l'ADMA-[D₃]-metilestere come SI sintetizzato attraverso una reazione tra ADMA e CH₃OD [94].

Un'altra procedura per la determinazione di Arg ed ADMA nel plasma umano ed in sovrantanti di colture cellulari prevede dopo la precipitazione delle proteine con acetone, un passaggio di estrazione in fase solida (SPE) in colonna a scambio ionico, la derivatizzazione in doppio step con metanolo e PFPA, e analisi in NICI-MS. Non si osservano negli spettri interferenze da parte di sostanze endogene e i due isomeri ADMA ed SDMA risultano ben separati, ma anche in questo lavoro persiste il problema dello standard interno non disponibile in commercio [97].

1.9.3. Metodi LC-MS o LC-MS/MS

La metodica LC-MS/MS sviluppata da Vishwanathan e coll. nel 2000 consiste in una corsa cromatografica di 15 minuti con una fase mobile isocratica che ha permesso di ottenere una completa separazione di ADMA ed SDMA, ma con un livello di rumore nel cromatogramma molto alto che influenza la sensibilità del sistema. Anche il picco della L-NMMA risulta essere seriamente soppresso in seguito ad un abbassamento del rapporto segnale/rumore. La quantificazione a cui si è arrivati tramite l'uso di ESI-MS o ESI-MS/MS non è sostanzialmente migliorata in termini di selettività [98].

L'analisi effettuata, da Huang e coll., con APCI-MS in "selected ion monitoring" (SIM), previa precipitazione delle proteine in plasma o urine, con acido 5-solfosalicilico, ha portato invece ad un miglioramento della sensibilità [99].

Martens-Lobenhoffer e Bode-Boger hanno poi utilizzato un metodo applicabile a plasma ed urine, che consiste in una derivatizzazione degli analiti con orto-ftalaldeide (OPA) e 2-mercaptoetanololo usato come co-reagente nella separazione HPLC, e come analizzatori detector UV, ma dato che ADMA ed SDMA producono OPA-derivati con una struttura identica, esse non riescono ad essere separate in LC-MS. La quantificazione dei due isomeri con questo metodo richiede la loro completa separazione cromatografica usando un gradiente molto lento ed una corsa di 27 minuti. Anche in questo caso l'effetto matrice provoca fenomeni di soppressione della ionizzazione, che influiscono negativamente su accuratezza e precisione del metodo, problemi che vengono parzialmente risolti attraverso l'uso dello standard interno marcato e del rapporto isotopico [89].

Kirchherr e coll. hanno effettuato invece, nel 2005, la quantificazione di ADMA ed SDMA, partendo dalla separazione degli analiti non derivatizzati attraverso una colonna HPLC di carbone grafitico poroso, la precipitazione delle proteine e la determinazione degli analiti attraverso ESI-turbo-ion-spray in modalità MS/MS. Il tempo di analisi è di soli 6 minuti e si ottengono picchi stretti e simmetrici ma i due isomeri risultano ancora non separati, pregiudicando la possibilità di un'accurata quantificazione [91].

Recentemente Martens-Lobenhoffer e coll. hanno riportato un metodo per la separazione di arginina, ADMA ed SDMA attraverso la tecnica di cromatografia liquida ad interazione idrofilica (HILIC). In questo metodo gli amminoacidi sono separati senza che subiscano derivatizzazione, attraverso una colonna di silice con una fase mobile costituita da acqua, acetonitrile, acido trifluoroacetico (TFA) e acido propionico (10:89:0.025:1). In una separazione di tipo HILIC, gli analiti si distribuiscono tra la fase mobile relativamente apolare e il sottile film di acqua che si deposita sulla superficie della silice della fase stazionaria. Uno dei principali vantaggi di questa tecnica è che favorisce i processi di ionizzazione in ESI. La corsa cromatografica dura 8 minuti e anche se ADMA ed SDMA non risultano completamente separate, esse danno luogo a differenti pattern di frammentazione lavorando in modalità MS/MS [100,101].

Sulla base dei dati offerti dalla letteratura (Tab. 1.2), nel nostro laboratorio è stato sviluppato e validato un metodo, adatto alla quantificazione dell'ADMA e dei metaboliti ad essa correlati, avente caratteristiche di semplicità ma allo stesso tempo di specificità, accuratezza e mancanza di variabilità causata dall'effetto della matrice, con l'utilizzo di quantità esigue di campione e che permetta di poter analizzare un elevato numero di campioni secondo le necessità di un laboratorio chimico clinico [102].

Tabella 1.2 Confronto tra i diversi metodi analitici presenti in letteratura

Metodo	Quantità di campione utilizzata	Tempo di preparazione	Derivatizzazione	Tempo di analisi per campione	Numero metaboliti analizzati
UPLC-MS/MS [102]	10µl	1 h 20 min	butilazione	1.9	6
HPLC [84,85]	1 mL	35 min	OPA o-ftalaldeide	40 min	5 (no SDMA)
CE [86]	300 µL	8 h 20 min	NBD-F 4-fluoro-7-nitrobenfurazano	30 –49 min	5
GC/MS [87]	49 µL	2 h	PFPA pentafluoro propionic anidride	10 min	2
GC-MS/MS [87]	99 µL	1 h 40 min	PFPA pentafluoro propionic anidride	10 min	1
LC-MS [89,90]	249 µL	10 min	OPA o-ftalaldeide	32 min	3
LC-MS/MS [88]	49 µL	40 min	butilazione	6 min	3
HILIC-ESI-MS [100,101]	20 µL	20 min	no	8 min	3
ELISA [92,93]	20 µL	20 h	no	0.62 min	1

1.10. Il sistema UPLC

In questo studio, in particolare, è stato utilizzato uno strumento UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) ossia un sistema di cromatografia liquida che, rispetto ai tradizionali HPLC, garantisce elevate prestazioni sia per quanto riguarda la sensibilità sia per quanto riguarda la capacità di separazione dei picchi cromatografici.

Questa tecnica risulta essere il prodotto di un progresso tecnologico che riguarda non solo l'evoluzione della chimica delle particelle, ma anche l'ottimizzazione dei sistemi, il disegno dei rivelatori, l'elaborazione e il controllo dei dati. Tutte queste innovazioni nel loro insieme consentono di migliorare significativamente le prestazioni cromatografiche, abbattendo i tempi di analisi (sino a 9 volte inferiori) rispetto ai sistemi tradizionali, senza pregiudicare la risoluzione, anzi aumentando la sensibilità.

Un importante aspetto della tecnologia UPLC riguarda l'utilizzo di colonne cromatografiche con particelle microporose di fase stazionaria di 1.7 μm di diametro.

Questo permette di avere un eccellente impaccamento della colonna e un elevato numero di piatti teorici, mantenendo dunque alte l'efficienza separativa, la risoluzione e la sensibilità anche in condizioni di flusso elevato poichè è in grado di ottimizzare i parametri dell'equazione di Van Deemter.

L'utilizzo di fasi stazionarie con particelle sempre più piccole aumenta l'efficienza di separazione ma comporta, in genere, condizioni di esercizio con pressioni in colonna molto elevate necessarie per ottenere le velocità richieste. Questo limita fortemente il vantaggio di poter operare a flussi sempre più alti, come descritto dalle curve di Van Deemter in Figura 1.7 in cui viene, infatti, evidenziato come la nuova tecnologia UPLC, utilizzata in questo studio, abbia permesso di raggiungere attualmente una situazione ottimale nella descrizione dell'equazione e per quanto riguarda le prestazioni delle colonne. Le condizioni di esercizio della tecnica UPLC, con l'utilizzo di più piccole particelle in colonne più corte sottoposte a più alti flussi operativi, consentono di lavorare con pressioni estremamente elevate, con il conseguente miglioramento delle separazioni cromatografiche e la diminuzione dei tempi di analisi.

L'ottimale combinazione fra velocità, sensibilità e risoluzione è dovuta essenzialmente alla possibilità di operare a velocità lineari elevate con particelle sotto i 2 μm , con contropressioni che arrivano fino a 14890 psi.

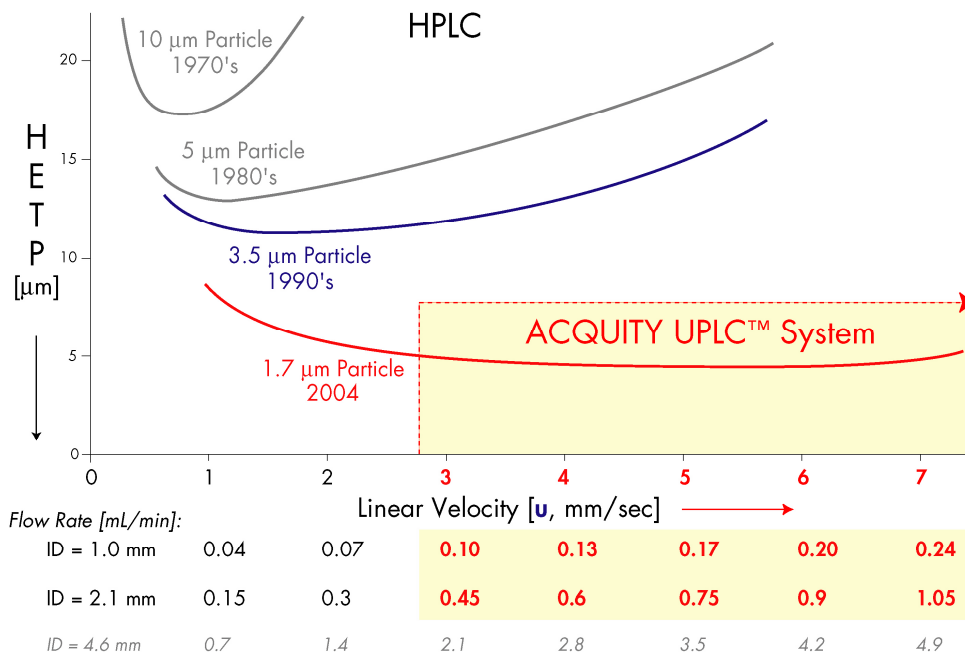


Figura 1.9 Prestazioni della colonna UPLC

Considerando la relazione che descrive la risoluzione del sistema:

$$R_s = \sqrt{\frac{N}{4}} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k}{k + 1} \right)$$

Efficienza
Selettività
Capacità

si può notare che nell'UPLC essa è proporzionale alla radice quadrata di N a sua volta inversamente proporzionale alla granulometria della fase stazionaria:

$$N \propto \frac{1}{dp}$$

L'efficienza, in questo sistema cromatografico, è il fattore che ha il maggiore impatto sul processo di separazione, mentre selettività e capacità hanno lo stesso effetto rispetto ad un sistema classico HPLC.

La Figura 1.10 evidenzia come si sono evolute nel tempo le particelle che compongono la fase stazionaria di una colonna. Nel corso degli anni grazie alle moderne tecnologie si è cercato di progettare particelle sempre più piccole in modo da aumentare il numero dei piatti teorici/metro e di conseguenza l'efficienza cromatografica della colonna; oggi infatti con l'impiego delle nuove particelle con diametro inferiore ai 5 μm si possono ottenere separazioni cromatografiche migliori caratterizzate da picchi perfettamente simmetrici. Ridurre il diametro delle particelle aumenta l'efficienza, migliora la riproducibilità e la stabilità della colonna.

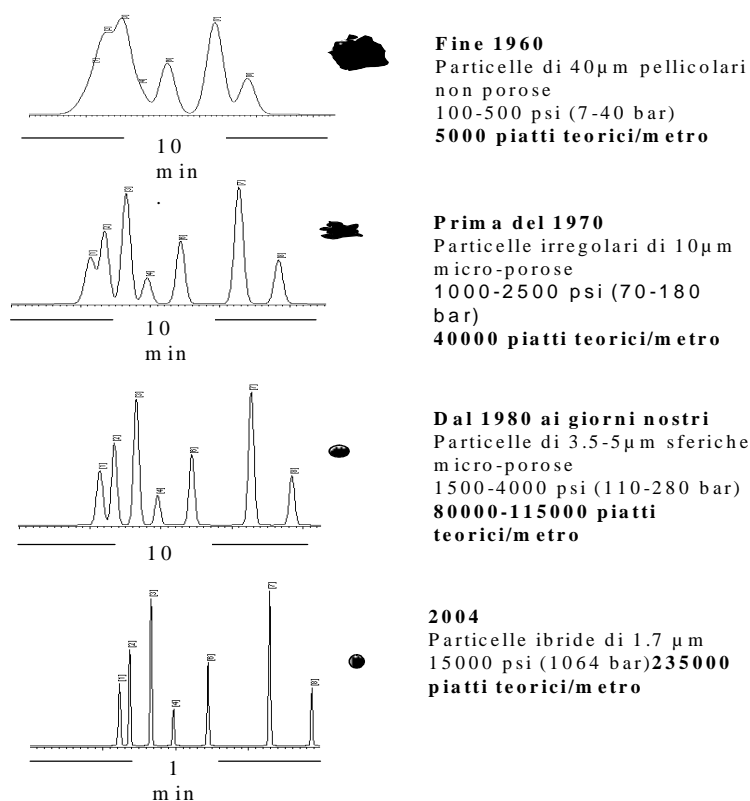


Figura 1.10 Evoluzione della dimensione delle particelle

1.10.1. Caratteristiche della colonna per UPLC

Tra le colonne cromatografiche più utilizzate nel sistema UPLC la più comune è la colonna C₁₈ “Bridged Ethyl Hybrid” (BEH) con un diametro delle molecole inferiore ai 2 μ m. Essa è composta da particelle ibride silicio-carbonio, che sfruttano sia le caratteristiche inorganiche del silicio sia quelle polimeriche del carbonio.

	VANTAGGI	SVANTAGGI
INORGANICO (SILICIO)	MECCANICAMENTE FORTE ALTA EFFICIENZA RITENZIONE PREVEDIBILE	RANGE pH LIMITATO PICCHI SCODATI CON BASI CHIMICAMENTE INSTABILE
POLIMERICICO (CARBONIO)	RANGE pH AMPIO NO INTERAZIONI IONICHE CHIMICAMENTE STABILE	MECCANICAMENTE SOFFICE BASSA EFFICIENZA RITENZIONE IMPREVEDIBILE

L’impiego di queste particelle ibride (Fig. 1.11) permette di ottenere una migliore forma del picco, una maggiore resistenza alla pressione e di poter lavorare in un ampio range di pH; inoltre la fase stazionaria risulta essere più resistente alla pressione in quanto il legame H₂C-CH₂ resiste ad una maggior tensione.

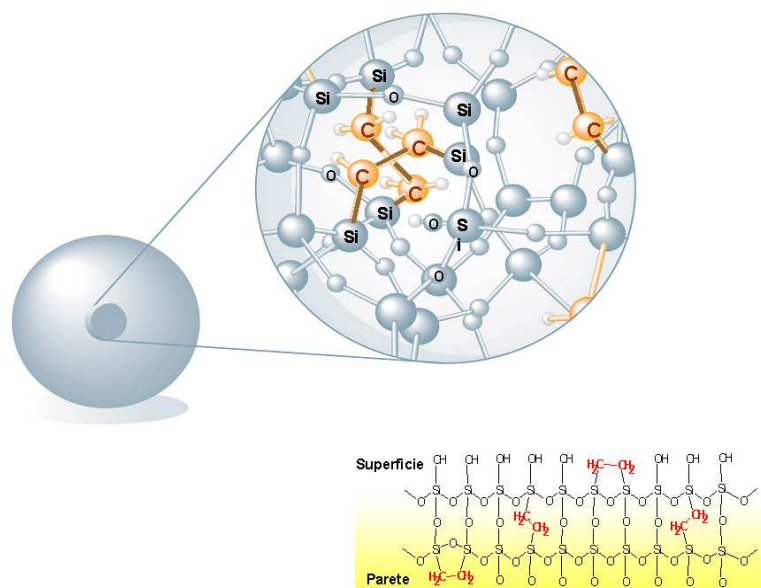


Figura 1.11 Schema delle particelle presenti nelle colonne Acquity UPLC

1.11. Lo spettrometro di massa

La spettrometria di massa è una tecnica analitica di ampio utilizzo in diversi ambiti lavorativi, che si contraddistingue per la versatilità di applicazione e per le caratteristiche di sensibilità e specificità elevate. Rispetto ad altre metodiche di analisi, infatti, consente di effettuare dosaggi con quantità di campione estremamente limitate, a concentrazioni di analita molto basse e in miscele complesse.

Tali caratteristiche rendono la spettrometria di massa uno strumento prezioso per identificare prodotti incogniti, eseguire determinazioni quantitative di composti noti e chiarire le proprietà strutturali e chimiche delle molecole, proprietà di particolare interesse soprattutto per determinazioni di carattere forense.

Uno spettrometro di massa è in grado di misurare la massa di una molecola che ha subito un processo di ionizzazione, mediante il quale viene conferita alla molecola una carica elettrica. Gli ioni prodotti, che si trovano in fase gassosa, vengono separati dall'analizzatore sulla base del loro rapporto massa/carica (m/z) e vengono raccolti da un rivelatore all'interno del quale essi generano un segnale elettrico proporzionale al numero di ioni presenti. Il sistema di elaborazione dati registra questi segnali elettrici in funzione del rapporto m/z e li converte in uno spettro di massa [103].

Le differenti parti dello spettrometro di massa sono rappresentate in Figura 1.12.

Nel nostro studio è stato utilizzato un triplo quadrupolo Micromass Quattro Ultima (Fig. 1.13) avente un sistema di ionizzazione per elettro-nebulizzazione (Electrospray Ionization, ESI). Esso si basa sulla formazione di goccioline cariche ottenute da una soluzione che viene nebulizzata attraverso un capillare tenuto ad un alto potenziale elettrico.

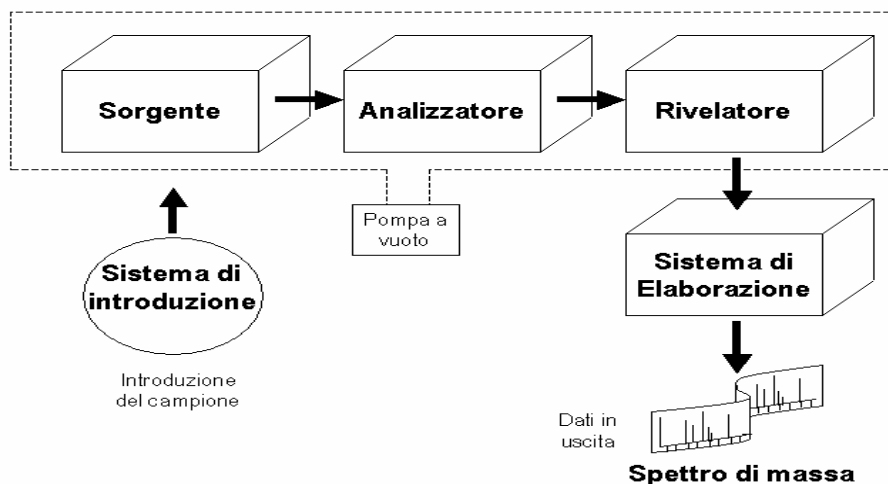


Figura 1.12 Differenti parti di uno spettrometro di massa

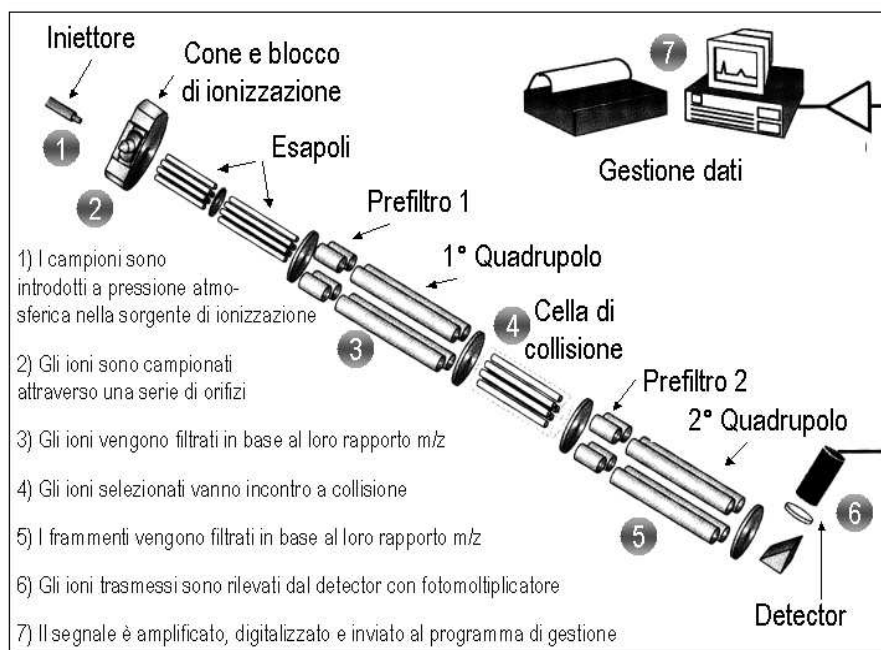


Figura 1.13 Descrizione schematica dello spettrometro di massa Micromass Quattro Ultima utilizzato in questo studio in ionizzazione positiva

La produzione di ioni si osserva al termine di tre steps successivi, che si svolgono a pressione atmosferica entro un elevato campo elettrico generato tra il capillare e una lente di estrazione:

- Nebulizzazione: produzione di goccioline cariche dal capillare;
- Desolvatazione ed evaporazione: rapida diminuzione delle dimensioni delle goccioline per evaporazione del solvente;
- Produzione di ioni in fase gas, originate dall'evaporazione delle goccioline cariche e a seguito di fenomeni di esplosione coulombiana.

Gli ioni generati vengono focalizzati dal gas, generalmente azoto, nella regione a pressione atmosferica e focalizzati in alto vuoto e all'interno dello spettrometro di massa, mediante opportune lenti, fino a raggiungere l'analizzatore.

In questo studio è stata scelta la tecnica ESI in quanto risulta particolarmente compatibile con le tecniche di separazione in fase liquida ed è considerata una ionizzazione "soft" poichè non provoca una frammentazione dello ione molecolare.

In Figura 1.14 è illustrato uno schema del funzionamento dell'elettrospray.

Nella figura è possibile vedere come venga applicata un'alta differenza di potenziale tra il capillare e la prima lente; le goccioline di solvente si dividono in goccioline più piccole e gli analiti carichi, una volta desolvatati, vengono focalizzati per l'analisi della massa.

L'applicazione di un alto voltaggio (3-6 kV) è sufficiente per generare la formazione di un aerosol a pressione atmosferica all'uscita del capillare. Le cariche indotte nelle goccioline si distribuiscono sulla superficie delle stesse fino a che la densità di carica non supera il limite di Rayleigh con conseguente rottura della goccia in goccioline più piccole. Questo fenomeno è chiamato esplosione di Coulomb. Le goccioline rimangono intatte fintanto che la tensione superficiale del solvente non viene superata dalla repulsione causata dalla densità di carica.

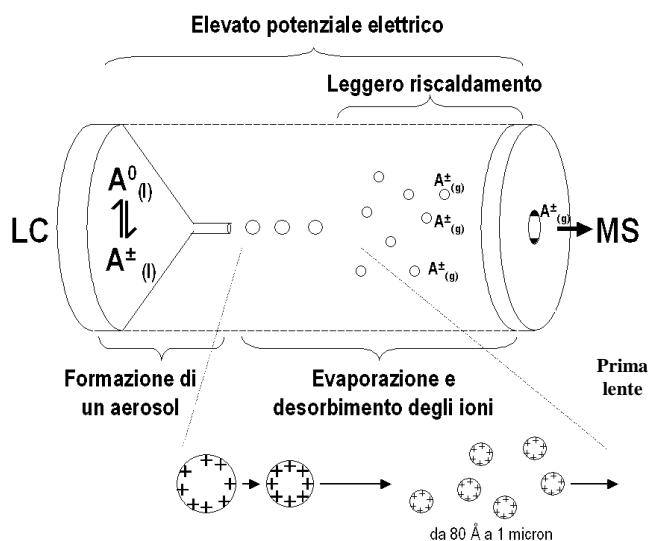


Figura 1.14 Schema dell'elettrospray

La ionizzazione per elettronebulizzazione presenta alcune caratteristiche fondamentali, tra cui elevata sensibilità, segnale stabile anche con solventi contenenti alta percentuale di acqua, limitate frammentazioni delle molecole in analisi, possibilità di applicazione ad analiti volatili e non volatili, ionici e/o polari e molecole ad alto peso molecolare. Limiti della tecnica sono rappresentati dall'inibizione della ionizzazione in presenza di alte concentrazioni saline e da una ridotta efficienza con l'utilizzo di tamponi non volatili.

Lo spettrometro di massa utilizzato in questo studio possiede un analizzatore di tipo quadrupolare che permette di separare gli ioni prodotti dalla sorgente sulla base del loro rapporto m/z . Gli analizzatori quadrupolari consistono in quattro barre (poli) di sezione iperbolica, disposte parallelamente, alle quali viene applicata una combinazione di campi elettrici continui e alternati a radiofrequenza. La scansione viene effettuata con la variazione sistematica di questi campi, da cui dipende il moto risultante degli ioni, e permette di separare ioni con m/z diversi fra loro.

Il triplo quadrupolo possiede due quadrupoli in serie, separati da una cella di collisione intermedia (anch'essa chiamata quadrupolo). Generalmente, nel quadrupolo centrale, si può introdurre un gas di collisione ad una pressione tale per cui uno ione che vi entra può subire al suo interno una o più collisioni. Se il gas è inerte, una parte dell'energia di collisione viene convertita in energia interna provocando la frammentazione dello ione, i cui frammenti vengono poi analizzati dal terzo quadrupolo. Questo sistema ha dato origine alla "spettrometria di massa tandem".

L'accoppiamento di due stadi di analisi di massa (MS/MS) è molto utile per identificare composti in miscele complesse e per determinare la struttura di sostanze incognite. Questa strumentazione può essere infatti utilizzata in tre modi principali:

- 1) nel primo caso si focalizza il primo quadrupolo su uno ione con rapporto m/z definito che attraversando la cella di collisione subisce delle frammentazioni, gli ioni prodotti vengono definiti product ions ("ioni figli" o daughter scan) che derivati dallo ione genitore, vengono analizzati nel secondo quadrupolo in scansione;
- 2) la seconda modalità consiste nel focalizzare il secondo quadrupolo su uno ione frammento ben preciso, per poter risalire allo ione molecolare che lo ha originato in quanto legato al frammento specifico, precursor ions (parents ions); il primo quadrupolo viene mantenuto in scansione;
- 3) la terza modalità infine permette di lavorare contemporaneamente con il primo ed il secondo quadrupolo in scansione imponendo tra i due quadrupoli una differenza di massa definita, determinando così tutti gli ioni precursori che frammentandosi nella cella di collisione subiscono una perdita neutra costante, definita dalla differenza di massa tra i due analizzatori (neutral loss).

1.12. Uso di uno standard marcato con isotopi stabili

Le tecniche di ionizzazione elettrospray risultano essere molto sensibili alle caratteristiche dell'eluente utilizzato e alla natura della matrice.

Possibili interferenti possono portare a soppressione/innalzamento del segnale con conseguente compromissione del dato quantitativo.

Per minimizzare, durante l'analisi quantitativa questo "effetto matrice", sono stati utilizzati in questo studio, standard interni marcati con isotopi stabili, cioè sostanze con struttura identica all'analita d'interesse in cui più atomi di idrogeno $^1\text{H}_1$ o di carbonio ^{12}C vengono sostituiti con i loro corrispondenti isotopi stabili deuterio $^2\text{H}_1$ e carbonio ^{13}C .

Questo implica che le caratteristiche chimico-fisiche dello standard interno marcato sono pressoché uguali a quelle dell'analita d'interesse; pertanto anche durante le varie fasi di purificazione dell'analita dalla matrice, il comportamento di quest'ultimo e del suo omologo marcato è sostanzialmente identico.

L'utilizzo della diluizione isotopica si è rivelato importante in questo studio, soprattutto per la necessità di quantificare i metaboliti d'interesse, presenti nelle matrici in concentrazioni molto basse. La presenza nella miscela dello standard interno marcato ha permesso una migliore co-estrazione del composto stesso migliorando il rapporto segnale/rumore.

La quantificazione di tutti i metaboliti analizzati è stata infine effettuata, calcolando il rapporto tra l'area sottesa al picco dello standard interno (presente in ogni campione in concentrazione costante) e l'area sottesa al picco dell'analita in esame. Tale operazione viene eseguita automaticamente su tutti i campioni, estrapolando i dati ottenuti dalle relative curve di calibrazione.

2. SCOPO

L'attività di ricerca svolta durante il primo anno di Dottorato, si è focalizzata sullo sviluppo e la validazione di una metodologia per il dosaggio, mediante interfacciamento della cromatografia con la spettrometria di massa, dell'ADMA e degli aminoacidi strutturalmente correlati (SDMA, NMMA, arginina, citrullina e omo-arginina) [102]. Lo scopo di questo progetto è stato quello di porre particolare attenzione allo sviluppo polmonare del neonato, a livello del quale l'ossido nitrico (NO) è un fattore critico di regolazione della morfogenesi e del mantenimento dell'omeostasi durante la vita fetale. Lo studio ha coinvolto un campione di neonati a termine, come controllo, ed un campione di neonati pre-termine ricoverati nel reparto di Patologia Neonatale della Clinica Pediatrica di Padova selezionati sulla base di criteri clinici e laboratoristici pre-definiti. L'obiettivo è stato quello di confermare il ruolo dell'ADMA quale possibile marker di patologia di alcuni disordini che originano in neonati prematuri e di peso estremamente basso alla nascita ELBW (extremely low birth weight) ed esposti a corioamnionite durante la vita fetale e quindi, di poter validare il suo dosaggio nella pratica clinica quotidiana, come fattore di rischio per lo sviluppo di patologie NO-dipendenti e nella prognosi di sindromi da stress ossidativo in caso di infiammazione in epoca prenatale.

L'attività di ricerca svolta durante il secondo anno si è invece focalizzata sullo studio di popolazioni adulte sane e patologiche allo scopo di confermare l'ADMA quale possibile marker di rischio cardiovascolare, di stress ossidativo e di disfunzione endoteliale. Lo studio ha coinvolto un campione di volontari adulti sani (maschi e femmine) allo scopo di avere una popolazione di controllo abbastanza numerosa, sulla base della quale confermare i valori plasmatici di riferimento della popolazione sana precedentemente ottenuti su un ristretto numero di campioni adulti. Questi ultimi sono stati confrontati con i livelli dei vari metaboliti ottenuti in pazienti con particolari patologie che, come ormai noto in letteratura, correlano con elevati livelli plasmatici di ADMA, tra cui infarto miocardico, diabete di tipo II insulino-resistente e preeclampsia.

Infine, durante il terzo anno di Dottorato, si è posta l'attenzione allo studio dello stress ossidativo nelle disfunzioni a carattere respiratorio NO-dipendenti tra cui l'asma e la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), valutando il possibile coinvolgimento della dimetilarginina asimmetrica e degli aminoacidi strutturalmente correlati nella diagnosi e prognosi di queste patologie, attraverso la loro quantificazione sul condensato dell'aria espirata (EBC). Lo scopo dello studio è stato quello di implementare il metodo analitico UPLC-MS/MS messo a punto nel nostro laboratorio, mediante arricchimento del campione prima dell'analisi cromatografica ottenendo pertanto una maggiore sensibilità analitica dello spettrometro di massa. Il metodo, considerando le notevoli difficoltà che comporta l'utilizzo di questo tipo di matrice in termini di basse concentrazioni degli analiti in essa presenti, è risultato alla validazione sensibile e riproducibile ed è stato applicato per la quantificazione di biomarkers di

stress ossidativo, su campioni di EBC in un gruppo di bambini affetti da asma in buon controllo, con o senza terapia, confrontati con un gruppo di controllo di bambini sani, al fine di verificare l'ipotesi di un possibile coinvolgimento dell'ADMA nell'alterazione della funzionalità respiratoria.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Soggetti arruolati nello studio

3.1.1. Studio sulla popolazione adulta con diverse patologie

Allo scopo di raccogliere campioni provenienti da soggetti rappresentativi della popolazione sana e pazienti con diverse patologie, sono state intrattenute collaborazioni con diversi reparti dell'Azienda Ospedaliera di Padova per l'arruolamento di soggetti cardiopatici ricoverati nei reparti di Unità Coronarica e di Cardiologia Intensiva, pazienti con iperglicemia o diabete tipo II insulino-resistente afferenti al Laboratorio Centrale e donne in gravidanza ricoverate presso il reparto di Ginecologia e Ostetricia dell'Ospedale di Padova.

Lo studio è stato approvato dal Comitato per la Sperimentazione Clinica dell'Azienda Ospedaliera di Padova e l'arruolamento dei pazienti è avvenuto dopo aver ottenuto consenso informato e scritto.

Sono stati quindi ottenuti campioni di plasma da prelievo di sangue intero in provette contenenti litio-eparina o EDTA e campioni di siero da sangue capillare arterializzato al fine di confrontare le concentrazioni dei diversi metaboliti in entrambe le matrici. I soggetti arruolati possono essere così riassunti:

- 18 maschi adulti sani (età media pari a 41 anni)
- 18 donne adulte sane (età media pari a 32 anni)
- 15 donne in gravidanza senza complicanze (età media pari a 32 anni)
- 15 donne con gravidanza complicata da disordini ipertensivi e diagnosi di pre-eclampsia al momento del ricovero (età media pari a 32 anni): prelievi effettuati al momento del ricovero, a 24 ore e a 30 giorni dal parto.
- 20 soggetti cardiopatici: 10 uomini (età media pari a 68 anni) e 10 donne (età media pari a 84 anni) con livelli di troponina I superiori a 0.15µg/L. Il prelievo è stato effettuato subito dopo arresto cardiaco o danno miocardico acuto.
- 30 pazienti con iperglicemia: 14 donne (età media pari a 72 anni) e 16 uomini (età media pari a 70 anni), selezionati in base ai valori di emoglobina glicosilata (Hb A1C) in quote proporzionalmente maggiori al crescere della glicemia, e in base ai valori di glicemia.

3.1.2. Studio sui neonati prematuri

Nel presente studio sono stati arruolati 30 neonati a termine, come campione di controllo, e 31 neonati pre-termine (età gestazionale <28 settimane; peso alla nascita <1000 g), ricoverati nel reparto di Patologia Neonatale della Clinica Pediatrica di Padova, di cui due sono deceduti subito dopo la nascita. In questo gruppo, le cause del parto pretermine sono state identificate in travaglio spontaneo (14 casi), preeclampsia (9 casi), IUGR, intrauterine growth retardation (5 casi) e rottura della placenta (1 caso). 24 bambini sono nati attraverso taglio cesareo. L'infiammazione della placenta è stata

riscontrata in 14 casi e classificata come stadio I (subcorioamnionite/corioamnionite) in 7, stadio II (corioamnionite) in 4 e stadio III (corioamnionite necrotizzante) in 3 casi. Funisite si è presentata solo in 3 casi.

Il prelievo di sangue capillare è stato effettuato alla nascita (entro le prime 2 ore), a 3 e a 7 giorni di vita in un gruppo di 29 neonati ELBW, mentre nel gruppo di 30 neonati sani in prima ed in terza giornata. Il prelievo è stato effettuato attraverso l'uso di un capillare privo di anticoagulante ed i campioni di siero ottenuti sono stati congelati a -20°C fino al momento dell'analisi.

Tutti i neonati ELBW sono nati presso la Clinica Ostetrica di Padova e successivamente sono stati ricoverati presso il reparto di Patologia Neonatale della Clinica Pediatrica. L'età gestazionale è stata verificata attraverso la storia mestruale della madre e l'ultrasonografia effettuata a 7-10 settimane di gestazione. La diagnosi di corioamnionite è stata effettuata mediante esame istologico delle membrane placentare ed extraplacentare e le cause di parto prematuro sono state identificate attraverso dati di tipo ostetrico ed istologico. All'interno del gruppo di neonati prematuri, sono stati distinti due sottogruppi in base alla presenza o meno nella madre di diagnosi di corioamnionite, definita dall'infiammazione acuta delle membrane placentare ed extraplacentare. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliera di Padova e sono stati raccolti i consensi informati da parte di entrambi i genitori per effettuare i prelievi.

Immediatamente dopo la nascita per ogni paziente sono stati registrati il peso corporeo ed è stata effettuata l'attribuzione del punteggio di Apgar al 1° minuto di vita e dopo 5 minuti. Si tratta di una valutazione contemporanea di 5 segni clinici (attività cardiaca, attività respiratoria spontanea, tono muscolare, riflessi, colorito), cui vengono singolarmente attribuiti dei valori numerici che vengono poi sommati. L'Apgar del primo minuto fornisce un giudizio sulla vitalità del neonato allo scopo di oggettivare la situazione clinica di ciascuno, indirizzare la scelta di precisi piani di terapia ed individuare i neonati che necessitano di un'assistenza immediata. L'Apgar del quinto minuto presenta invece una precisa correlazione con la mortalità neonatale e la morbilità del primo anno di vita.

I neonati sono stati ricoverati presso il Reparto di Patologia Neonatale della Clinica Pediatrica ed il loro decorso è stato monitorato dai medici del reparto. Sono stati in seguito registrati i seguenti dati: presenza/assenza di emorragia intraventricolare, retinopatia, sepsi e broncodisplasia polmonare (BPD), la complicanza più comune per i neonati pretermine. Sono stati infine presi in considerazione alcuni parametri che permettono di descrivere la gravità dei problemi respiratori, come impiego di surfattante, necessità e durata della ventilazione meccanica e dell'ossigeno terapia.

I criteri clinici monitorati nei soggetti prematuri arruolati nello studio sono descritti in Tabella 3.1.

Tabella 3.1. Caratteristiche di tutti i neonati prematuri e dei sottogruppi con e senza corioamnionite arruolati nello studio

	Tutti neonati ELBW (n=29)	ELBW con corioamnionite (n=14)	ELBW senza corioamnionite (n=15)
Maschi/Femmine	17/12	9/5	8/7
Peso alla nascita (g)	805±175	818±173	792±182
Età gestazionale (settimane)	26.6±1.3	25.9±1.21	27.5±0.77
Tm corticosteroidi prenatale	22	9	13
Indice di Apgar			
1 min	5.7±1.8	4.9±1.5	6.4±1.8
5 min	8±1.1	7.6±1.2	8.3±0.9
Terapia con surfattante	23	12	11
Ventilazione meccanica (n)	24	12	12
Ventilazione meccanica (giorni)	5 (2.7–17)	4.5 (2–17)	6 (3.5–14)
Durata O ₂ terapia (giorni)	42 (9–77.5)	49 (10–90)	42 (1.5–57.5)
Indice di ossigenazione			
Giorno 1	4.3 (2.8–6.6)	5.2 (3.4–8.8)	3.4 (2.5–5.8)
Giorno 3	4.2 (2.8–5.6)	3.3 (2–5.5)	4.5 (3.5–6)
Giorno 7	3.4 (2.4–5.1)	3 (2.3–5.3)	3.5 (2.4–4.9)
AaDO ₂			
Giorno 1	102.5 (65.5–191)	152 (73–307)	96.5 (54–127)
Giorno 3	61.5 (42–128.7)	61.5 (45–143)	69.5 (43–122)
Giorno 7	45 (37–60)	43 (31.5–52)	52 (37.8–63.8)
Necessità di farmaci vasoattivi	13	8	5
Pressione arteriosa media			
Giorno 1	31.9±6.1	31±7.1	32.9±4.9
Giorno 3	37.9±5.0	36.6±5.0	39.2±5.0
Giorno 7	41.6±6.6	41.2±6.7	41.9±6.8
Patent ductus arteriosus	15	9	6
Decesso	1 (3.4%)	1 (7%)	0
BPD (O ₂ dipendenza a 36 settimane)	9 (31%)	4 (28%)	5 (33%)
Sepsi (coltura positiva)	3	2	1
Emorragia intraventricolare			
I–II gr.	7 (24%)	5 (36%)	2 (13%)
≥III gr.	1 (3.4%)	1 (7%)	0
Retinopatia da prematurità			
I–II gr.	10 (34%)	6 (43%)	4 (26%)
≥III gr.	1 (3.4%)	1 (7%)	0

3.1.3. Studio sull'EBC di bambini affetti da malattie respiratorie

Pazienti con asma: tra i bambini asmatici afferenti all'Unità di Pneumologia Pediatrica del Dipartimento di Pediatria dell'Università di Padova, sono stati reclutati 29 bambini di età compresa fra i 5,8 e i 16,3 anni (media 11,1) di cui 12 femmine e 17 maschi. La diagnosi di asma, fatta precedentemente all'inclusione nello studio, era stata formulata in accordo con le linee guida internazionali basandosi sulla storia clinica (tosse soprattutto notturna, broncospasmo ricorrente, costrizione toracica, dispnea) e sulla positività del test di broncodilatazione.

I 29 bambini inclusi presentavano asma allergico persistente, in buon controllo, con o senza terapia al momento del reclutamento. Cinque dei bambini asmatici inclusi avevano asma allergico in buon controllo senza terapia di fondo e ricorrevano sporadicamente, secondo necessità, a broncodilatatori a breve durata d'azione. I restanti 24 bambini invece avevano asma persistente e assumevano regolarmente terapia con steroidi inalatori a dosaggio medio-basso. 13 di loro assumevano anche un broncodilatatore a lunga durata d'azione in associazione alla terapia steroidea. Due bambini facevano uso di un antagonista recettoriale dei leucotrieni (Montelukast). Tutti i bambini asmatici erano allergici, con test cutanei positivi a uno o più dei comuni allergeni inalanti.

Controlli sani: nello studio è stato incluso un gruppo di controllo formato da 62 bambini sani di età compresa fra i 5,1 e i 15,4 anni (media 9,9) dei quali 26 femmine e 36 maschi, frequentanti le scuole pubbliche della città. Nessuno dei bambini sani ha avuto storia di malattia polmonare cronica.

Il protocollo dello studio è stato approvato dal comitato etico dell'Azienda Ospedaliera di Padova. A tutti i bambini e ai loro genitori sono stati illustrati gli scopi dello studio, nonché le modalità dell'analisi e ciascuno di loro ha espresso il proprio consenso favorevole alla partecipazione firmando un apposito modulo.

3.1.3.1. Raccolta del condensato dell'aria espirata

Il condensato dell'aria espirata (EBC) è stato raccolto usando un dispositivo TURBO DECCS (Trasportable Unit for Research on Biomarkers Obtained from Disposable Exhaled Condensate Collection System, Medivac, Parma, Italia) studiato e realizzato secondo le linee guida tecniche e metodologiche proposte da ATS/ERS (American Thoracic Society/European Respiratory Society). La raccolta dell'EBC è avvenuta facendo respirare ciascun bambino a volume corrente attraverso un sistema monouso (DECCS), costituito da un boccaglio dotato di valvola unidirezionale e filtro per la saliva, connesso tramite un tubo in polietilene alla provetta in cui si forma il condensato. Tale provetta è posta in un supporto in alluminio, all'interno del sistema refrigerante (TURBO). Durante la raccolta, i bambini hanno respirato regolarmente per via orale con l'aiuto di una clip nasale per un tempo di 20 minuti e hanno mantenuto la bocca quanto più possibile asciutta eliminando periodicamente l'eccesso di saliva. La temperatura del sistema è stata mantenuta a un valore costante di -4°C per tutto il tempo

della raccolta. I campioni di EBC sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'analisi.

3.2. Reagenti

Gli standard interni marcati con isotopi stabili che sono stati utilizzati sono: L-arginina-5- ^{13}C ;4,4,5,5- $^2\text{H}_4$ (99%, HPLC), L-tirosina-ring- $^2\text{H}_4$ (98%, HPLC) sono state acquistate dalla ditta Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA) mentre $^{13}\text{C}_6$ -tyrosine dalla ditta Isotec Inc. (Miamisburg, OH, USA). L-citrullina-5,5- $^2\text{H}_2$ ottenuta per gentile concessione della Mayo Clinic e ADMA-3,3,4,4,5,5- $^2\text{H}_6$ sintetizzata nel nostro laboratorio [98] a partire da L-Ornitina-3,3,4,4,5,5- $^2\text{H}_6$ (98%, HPLC) comperata dalla Cambridge Isotope Laboratories.

Gli amminoacidi non marcati L-citrullina, L-arginina CHR, L-omoarginina, L-tirosina e N-metil-L-arginina sono stati acquistati dalla Fluka. $\text{N}^{\text{G}},\text{N}^{\text{G}}$ -dimetil-L-arginina, $\text{N}^{\text{G}},\text{N}^{\text{G}}$ -dimetil-L-arginina, 3-nitrotirosina, sodiotetrafluoroborato (NOBF_4), bromociano agarosio, n-butanolo e cloruro di acetile sono state acquistate dalla Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

L'ammoniaca è stata acquistata dalla Merck (Darmstadt, Germania), metanolo e acetonitrile per HPLC dalla Carlo Erba (Milano, Italia), ed acido formico, acido cloridrico, dimetilamina e carbonato di rame (II) dalla Fluka (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA). Tutti i solventi erano HPLC grade, l'acqua utilizzata era MilliQ (Millipore).

3.2.1. Sintesi dello standard marcato: $\text{N}^{\text{G}},\text{N}^{\text{G}}\text{-}[^2\text{H}_6]\text{-dimetil-L-arginina}$

La sintesi della $\text{N}^{\text{G}},\text{N}^{\text{G}}\text{-}[^2\text{H}_6]\text{-dimetil-L-arginina}$ [30,31] è stata condotta attraverso le seguenti fasi (Fig. 3.1):

FASE 1:

- Preparazione del bromociano-agarosio

0.4 g di bromociano-agarosio sono stati sciolti in 10 mL di HCl 1 mM in metanolo ed incubati per 30 minuti a temperatura ambiente. La soluzione ottenuta è stata poi filtrata in modo da eliminare tutta la parte liquida e lavata prima con 5 mL di HCl 1mM in metanolo e successivamente con 5 mL di H_2O , recuperando la polvere di bromociano-agarosio rimasta sul filtro che è stata posta in una provetta con un agitatore magnetico

- Soluzione di $^2\text{H}_6$ -ornitina e rame (II)

Sono stati pesati 0.127 g di $^2\text{H}_6$ -ornitina e disciolti in 1.25 mL di H_2O , aggiungendo alla soluzione il CuCO_3 fino a saturazione in modo da ottenere una colorazione blu. Dopo filtrazione, il pH è stato portato ad un valore di 10 con KOH 10M.

- Soluzione di bromociano-agarosio $^2\text{H}_6$ - ornitina e rame (II)

La soluzione di bromociano-agarosio preparata precedentemente è stata sciolta nella soluzione di $^2\text{H}_6$ -ornitina e rame a pH 10 e lasciata in agitazione per tutta la notte a $+4^{\circ}\text{C}$.

FASE 2:

Si è proceduto con la filtrazione in modo da eliminare tutta la parte acquosa. La $^2\text{H}_6$ -ornitina legata all'agarosio è stata trattenuta dal filtro. Successivamente si è proceduto con il lavaggio, prima con una soluzione di HCl 1M fino a quando la fase solida di $^2\text{H}_6$ -ornitina e di agarosio non è risultata completamente incolore e poi con H_2O in modo da eliminare completamente il rame rimasto nella fase solida.

FASE 3:

Il precipitato ottenuto dopo la filtrazione è stato disciolto in 3 mL di dimetilamina al 20% e mantenuto a 50°C per 24 ore. Trascorso tale periodo la sospensione è stata filtrata nuovamente e lavata per due volte con 10 mL di H_2O .

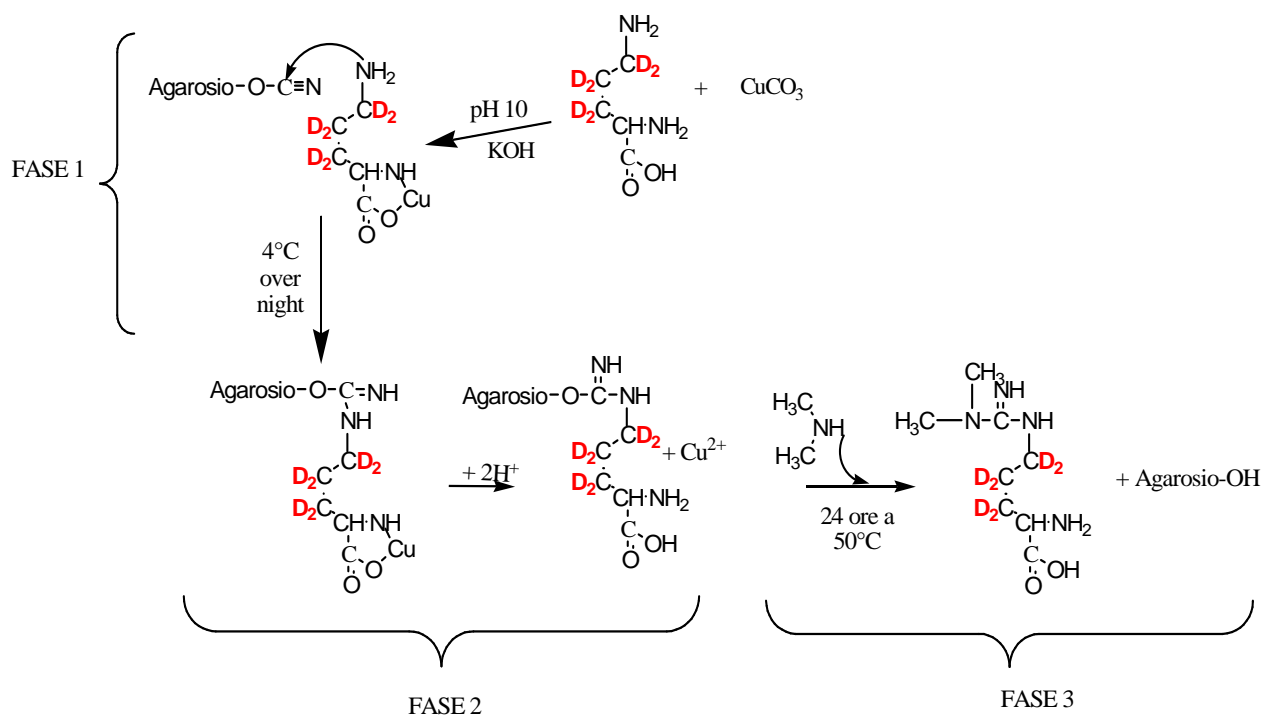


Figura 3.1 Fasi di sintesi della N^G, N^G - $[\text{}^2\text{H}_6]$ -dimetil-L-arginina

Purificazione del prodotto di sintesi:

Il prodotto ottenuto dalla sintesi è stato purificato attraverso una colonna costituita da una resina Dowex 50W-X2 (resina a scambio cationico) sciolta in HCl 0.1N. Filtrando mediante una pompa da vuoto in modo da eliminare l'HCl 0.1N in eccesso, la soluzione di ADMA marcata è stata portata a pH inferiore a 3 con HCl 37% e caricata sulla cartuccia. L'eluizione è stata eseguita mediante aggiunta di soluzioni di ammoniaca in H_2O a concentrazioni crescenti da 1.8% a 3%, raccogliendo tutte le frazioni, che sono state successivamente analizzate per verificare in quale frazione l'ADMA marcata è stata eluita. La frazione contenente la $^2\text{H}_6$ -ADMA è stata portata a un volume di 10 ml con metanolo e utilizzando una soluzione di ADMA non marcata, analizzata per verificarne il titolo.

3.3. Preparazione e analisi dei campioni

3.3.1. Preparazione dei campioni di plasma

I campioni di plasma sono stati ottenuti prelevando il sangue intero in provette contenenti litio-eparina o EDTA.

Nei neonati il plasma è stato ottenuto da sangue capillare prelevato dal tallone o da un polpastrello, mediante l'utilizzo di un capillare privo di anticoagulante. Il prelievo è stato fatto a tutti i neonati in prima ed in terza giornata dalla nascita per valutare la bilirubina e l'ematokrito. Il capillare, che solitamente verrebbe eliminato dopo il dosaggio, è stato invece riutilizzato per l'analisi delle dimetilarginine su una quantità molto esigua (10 μ L) di campione, tramite il metodo messo a punto in questo studio, senza dover pertanto ricorrere ad un prelievo supplementare che per i neonati, soprattutto se prematuri, diventerebbe un problema non indifferente.

I campioni di plasma provenienti dai soggetti adulti sono stati ottenuti sia da sangue venoso che da sangue capillare arterializzato.

A 10 μ L di plasma sono stati aggiunti 150 μ L di una soluzione di amminoacidi marcati (^{13}C , $^2\text{H}_4$ -arginina, $^2\text{H}_2$ -citrullina e $^2\text{H}_6$ -ADMA) in metanolo; posti a -20°C per 10 minuti per ottenere la precipitazione delle proteine e centrifugati a 13000 rpm per 10 minuti. Il sovranatante è stato portato a secco mediante flusso di azoto ad una temperatura di 60°C e successivamente derivatizzato. La butilazione è stata effettuata trattando il campione con 100 μ L di una miscela di butanolo e di cloruro di acetile in rapporto 20:1 mantenuta a 60°C per 20 minuti, avendo cura che non siano presenti residui di acqua o umidità che potrebbero inficiare il processo di derivatizzazione (Fig. 3.2). Dopo aver portato a secco il campione per evaporazione del solvente mediante flusso di azoto ad una temperatura di 60°C , esso è stato ripreso con 50 μ L di una soluzione 10% di metanolo + 0.1% di acido formico (v/v).

3.3.2. Analisi dei campioni di plasma

La strumentazione utilizzata è composta da un UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) Acquity e da uno spettrometro di massa Quattro ULTIMA (entrambi della ditta Waters). La colonna cromatografica usata è una colonna Acquity UPLC BEH C_{18} 1.7 μm 2.1 x 50 mm della ditta Waters.

I campioni sono stati alloggiati all'interno dell'UPLC, dove l'autocampionatore preleva 6 μ L che vengono iniettati nella colonna, posta all'interno di un fornello termostato alla temperatura di 40°C .

L'eluizione dei campioni è avvenuta mediante l'utilizzo di un gradiente costituito da percentuali diverse delle soluzioni A) H_2O + 0.1% acido formico (v/v); B) Metanolo + 0.1% acido formico (v/v) come rappresentato in Tabella 3.2.

L'utilizzo di un gradiente è necessario al fine di poter separare cromatograficamente le varie molecole sfruttando la loro diversa idrofobicità.

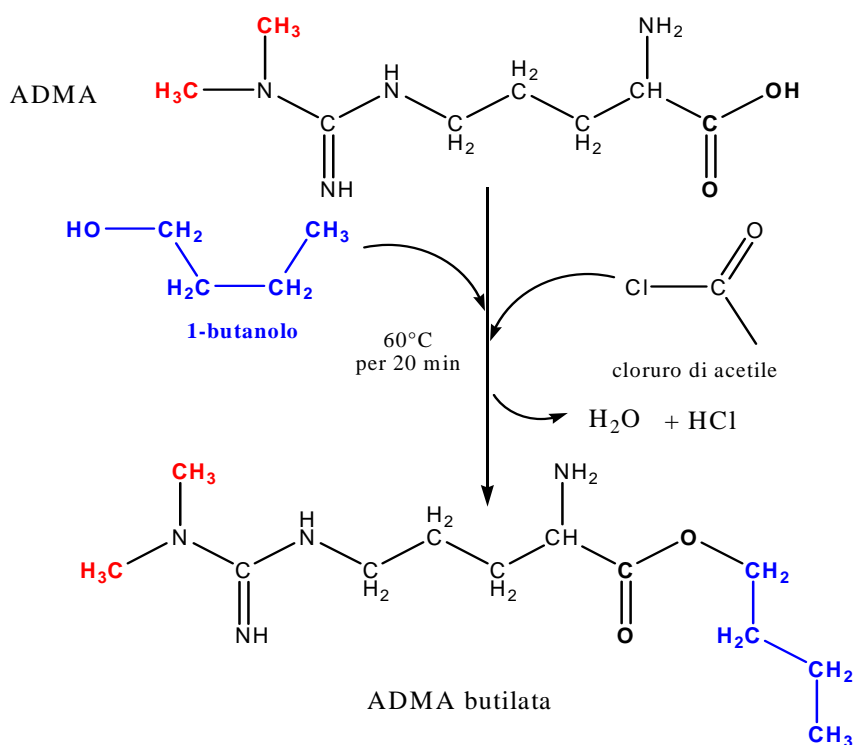


Figura 3.2 Schema della butilazione dell'ADMA

All'uscita dalla colonna cromatografica il campione è stato splittato 1:10 prima di entrare nella sorgente, questo ha permesso di utilizzare quantità elevate di solvente senza perturbare troppo la sorgente ionica.

Tabella 3.2 Gradiente cromatografico utilizzato per l'eluizione dei campioni di plasma

Tempo (min)	Flusso (mL/min)	%A	%B
0.00	0.600	98	2
0.10	0.600	98	2
0.21	0.600	90	10
1.18	0.600	90	10
1.28	0.600	50	50
1.80	0.600	50	50
1.81	0.600	98	2

3.3.2.1. Elaborazione statistica

I dati ottenuti dall'analisi spettrometrica mediante software Masslynx 4.1 e l'uso dell'applicazione Quanlynx (Waters), sono stati poi analizzati mediante il test della T di Student per dati appaiati e non appaiati. La differenza è stata considerata significativa per $p < 0.05$.

3.3.3. Preparazione dei campioni di EBC

I campioni di condensato ottenuti come precedentemente descritto, sono stati centrifugati a 3500 rpm per 5 minuti per eliminare l'eventuale precipitato formatosi in seguito a contaminazione salivare. Generalmente il condensato dell'aria espirata si presenta in forma chiaramente trasparente essendo costituito prevalentemente da vapore acqueo, che rappresenta da solo più del 99%, e da particelle disperse in aerosol.

A 500 μL di EBC sono stati aggiunti 150 μL di una soluzione di amminoacidi marcati (^{13}C , $^2\text{H}_4$ -arginina, $^2\text{H}_2$ -citrullina e $^2\text{H}_6$ -ADMA 3 μM , $^2\text{H}_4$ -tirosina 4 μM , $^{13}\text{C}_6$ -nitrotirosina 200 nM) in metanolo e la soluzione è stata portata a secco mediante flusso di azoto ad una temperatura di 40°C. La butilazione è stata effettuata trattando il campione con 100 μL di una miscela di butanolo e di cloruro di acetile (20:1) a 60°C per 20 minuti. Dopo aver portato a secco il campione per evaporazione del solvente mediante flusso di azoto a 60°C, esso è stato ripreso con 50 μL di una soluzione acquosa (100%) contenente 1% acido formico (v/v).

3.3.4. Analisi dei campioni di EBC

L'analisi dei campioni è stata effettuata utilizzando un sistema analitico Acquity UPLC interfacciato con uno spettrometro di massa tandem quadrupolare Quattro Premier XE della ditta Waters.

Il sistema di arricchimento on line ha il seguente funzionamento: un autocampionatore robotizzato Sample Manager 2777 (Waters) preleva 20 μL di campione che sono dapprima iniettati in una cartuccia Direct Connect HP XBridgeTM C18 (10 μm , 2.1x30mm Column; Waters), con lo scopo di concentrare ulteriormente il campione, e poi eluiti in una colonna cromatografica. I solventi (H_2O +1% acido formico (v/v), metanolo+1% acido formico (v/v) ed acetonitrile+1% acido formico (v/v)) eluiti nella colonna di intrappolamento, sono controllati da un sistema Alliance HT HPLC (High Performance Liquid Chromatography; Waters) collegato all'autocampionatore.

Il campione concentrato è stato poi fatto eluire in una colonna Acquity UPLC BEH C18 (1,7 μm , 1x50mm; Waters Co., Mildford, Massachussets, USA), termostata a 60°C, per ottenere la separazione cromatografica, mediante l'utilizzo di un gradiente costituito da percentuali diverse delle soluzioni A) H_2O +0,5% di acido formico (v/v); B) metanolo+0,5% di acido formico (v/v) seguendo lo schema riportato in Tabella 3.3.

Tabella 3.3 Gradiente cromatografico utilizzato per l'eluizione dei campioni di EBC

Tempo (min)	Flusso (mL/min)	%A	%B
0.00	0.250	99	1
1.00	0.250	85	15
3.00	0.250	10	90
5.00	0.250	99	1

Il flusso, in uscita dalla colonna, è stato splittato 1:10 prima di entrare nello spettrometro di massa tandem, dove viene desolvato, nebulizzato e ionizzato mediante l'applicazione di un potenziale di 3.2 kV alla sorgente Elettrospray (ESI).

L'acquisizione dei dati prodotti dall'analisi spettrometrica è stata controllata dal software Masslynx 4.1 e i dati ottenuti sono stati processati con l'applicazione Quanlynx (Waters co., Millford, MA, USA).

3.3.4.1. Analisi statistica dei dati sull'EBC

L'analisi dei dati ha dimostrato una distribuzione non normale (test di Shapiro-Wilkoxon); per tale motivo i risultati sono stati espressi come mediana e range interquartile. Il confronto fra i due gruppi è stato fatto con il test di Mann-Whitney e le correlazioni sono state valutate con il test di Spearman.

La significatività statistica è stata considerata per valori di $p < 0,05$.

3.3.4.2. Riproducibilità sui campioni di EBC

Per verificare il metodo di analisi di ADMA nel condensato dell'aria espirata, l'EBC è stato raccolto in due occasioni, a distanza di 24 ore, in un gruppo di 8 volontari adulti sani e i dati sono stati analizzati mediante test di Bland Altman.

3.4. Le curve di calibrazione

Allo scopo di dosare i metaboliti di interesse sono state preparate per ogni metabolita delle curve di calibrazione nelle diverse matrici utilizzate.

I punti della curva sono costituiti da una quantità precisa della miscela di standard interni marcati che è costante per tutti i campioni, e da quantità crescenti dei metaboliti da analizzare. La curva viene preparata prendendo in considerazione un range di concentrazione abbastanza ampio in modo da tener conto sia dei valori di riferimento per i soggetti sani che di quelli patologici. Nell'esecuzione della curva viene calcolato un rapporto tra l'intensità del segnale del metabolita di interesse e quello del suo standard interno marcato e il dato viene correlato con la concentrazione teorica dei diversi punti.

Le curve di calibrazione sono state eseguite sia in soluzione acquosa che in matrice (plasma ed EBC), al fine di valutare una possibile interferenza di quest'ultima nella quantificazione del campione.

Le concentrazioni utilizzate per la curva in acqua, costituita da 6 punti a concentrazioni scalari dei metaboliti di interesse, sono riportate in tabella 3.4.

Tabella 3.4 Concentrazioni dei punti utilizzati per le curve di calibrazione preparate in soluzione acquosa ed in plasma

	PUNTO 1 (μM)	PUNTO 2 (μM)	PUNTO 3 (μM)	PUNTO 4 (μM)	PUNTO 5 (μM)	PUNTO 6 (μM)
Arginina	0.50	1.0	25.0	50	100	250
Citrullina	0.50	1.0	25.0	50	100	250
NMMA	0.05	0.1	0.5	1	2	4
ADMA	0.05	0.1	0.5	1	2	4
SDMA	0.05	0.1	0.5	1	2	4
Omo-Arg	0.05	0.1	0.5	1	2	4

3.4.1. Curve di calibrazione preparate su plasma

La curva su plasma è costituita complessivamente da 7 punti: un basale, contenente solo il plasma e lo standard marcato, e da altri 6 punti a cui vengono aggiunte quantità crescenti dei metaboliti di interesse le cui concentrazioni sono riportate in Tabella 3.4. Dalle curve ottenute è stato estrapolato il valore basale corrispondente alla quantità di ogni metabolita presente endogenamente nella matrice e le stesse curve sono state poi ricostruite tenendo conto dei valori basali (Fig. 3.3).

3.4.2. Curve di calibrazione preparate su EBC

Per la preparazione della curva di calibrazione su condensato, sono stati raccolti campioni di EBC da 10 soggetti adulti sani ed il pool da essi ottenuto è stato utilizzato per la validazione analitica del metodo. La curva preparata su EBC, analogamente a quella in plasma, è costituita da 8 punti di cui uno basale e 7 punti a cui vengono aggiunte concentrazioni scalari crescenti dei metaboliti di interesse (Tab. 3.5). Anche in questo caso, dalle curve ottenute è stato estrapolato il valore basale corrispondente alla quantità di ogni metabolita presente endogenamente nella matrice e le stesse curve sono state successivamente ricostruite tenendo conto dei valori basali (Fig. 3.4).

Tabella 3.5 Concentrazioni dei punti utilizzati per le curve di calibrazione preparate su EBC

	PUNTO 1 (μM)	PUNTO 2 (μM)	PUNTO 3 (μM)	PUNTO 4 (μM)	PUNTO 5 (μM)	PUNTO 6 (μM)	PUNTO 7 (μM)
Arginina	0.97	1.95	3.9	7.8	15.6	31.2	62.5
Citrullina	0.97	1.95	3.9	7.8	15.6	31.2	62.5
NMMA	0.0156	0.0313	0.0625	0.125	0.250	0.5	1
ADMA	0.0156	0.0313	0.0625	0.125	0.250	0.5	1
SDMA	0.0156	0.0313	0.0625	0.125	0.250	0.5	1
Omo-Arg	0.0156	0.0313	0.0625	0.125	0.250	0.5	1
Tirosina	0.78	1.56	3.12	6.25	12.5	25	50
3-NT (nM)	7.8	15.6	31.2	62.5	125	250	500

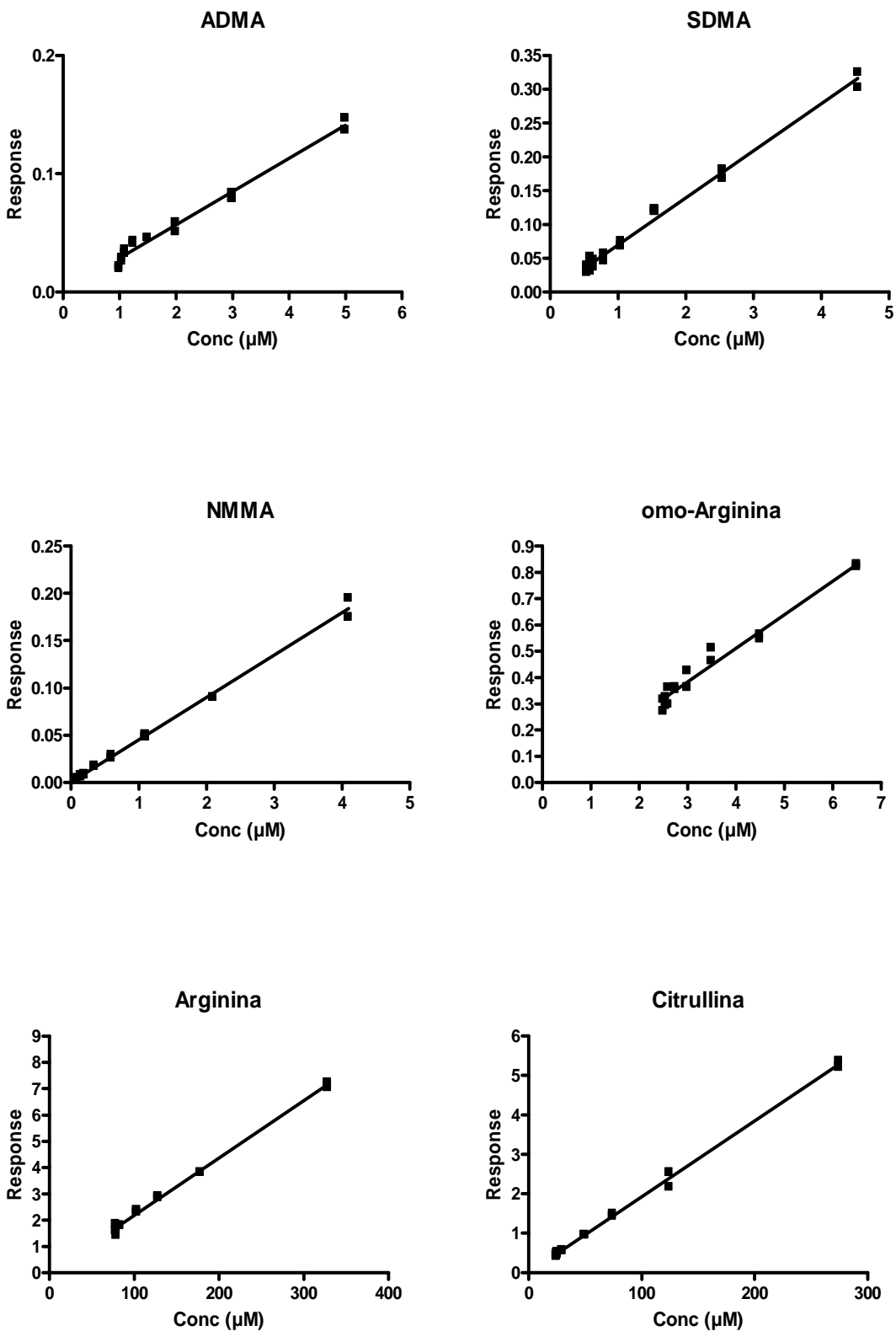


Figura 3.3 Curve di calibrazione di ciascun analita preparate in plasma

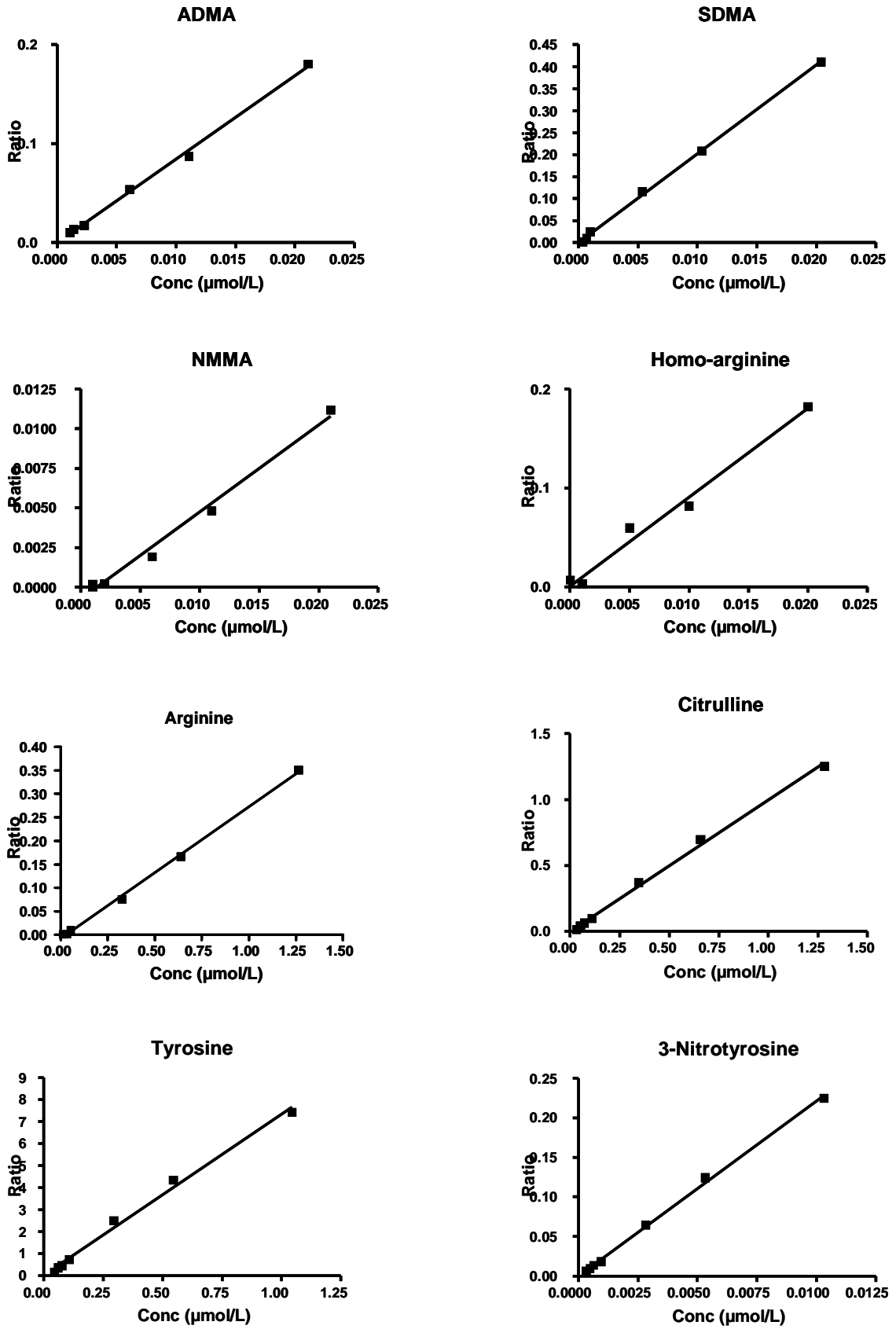


Figura 3.4 Curve di calibrazione di ciascun analita preparate in EBC

3.5. Analisi quantitativa in spettrometria di massa tandem

L'utilizzo di uno strumento tandem massa (MS/MS) ha permesso, in questo studio, di identificare e quantificare i composti d'interesse in matrici complesse come plasma ed EBC, con un buon rapporto segnale/rumore. Per poter effettuare un dosaggio quantitativo in maniera accurata, il segnale delle sostanze incognite è stato rapportato con quello di uno standard interno marcato con isotopi stabili che viene aggiunto ad ogni campione.

L'analisi strumentale viene eseguita selezionando sul primo quadrupolo uno ione precursore, che viene frammentato nella cella di collisione ed i cui prodotti sono analizzati dal secondo quadrupolo. Questa procedura indicata come SRM (Single Reaction Monitoring) o MRM (Multiple Reaction Monitoring) permette una elevata specificità e sensibilità in quanto porta ad un notevole miglioramento del rapporto segnale/rumore.

3.5.1. L'analisi in MRM

L'analisi MRM viene utilizzata prevalentemente a scopo quantitativo, su una molecola generalmente caratterizzata di cui si conoscono sia lo ione precursore che lo ione frammento. Entrambi i quadrupoli sono statici, vengono cioè posizionati su delle masse (m/z) definite: il primo è statico sulla massa dello ione precursore e il secondo è statico sulla massa dello ione frammento, così da poter monitorare una specifica transizione per ogni analita. In figura 3.5 è rappresentato un esempio di applicazione MRM per l'ADMA dove m/z 259 è lo ione precursore e m/z 214 il suo ione frammento.

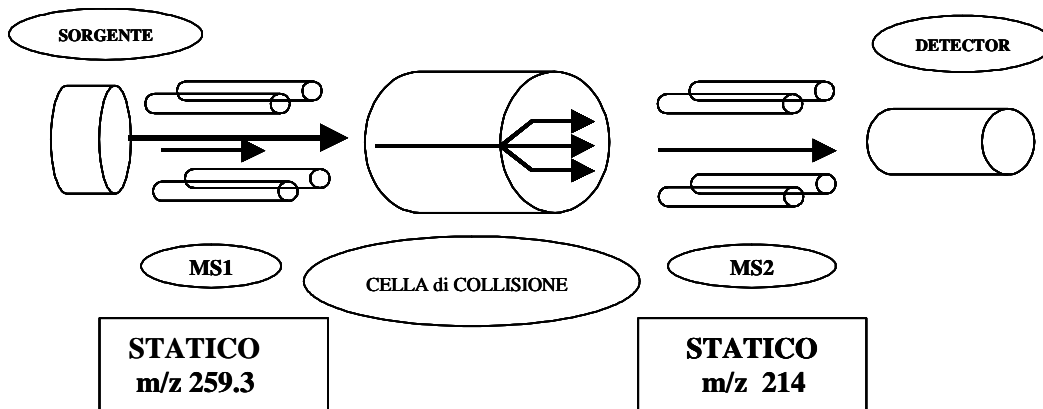


Figura 3.5 Schema dell'analizzatore in applicazione MRM per l'ADMA utilizzato nella metodica UPLC/MS/MS messa a punto

Allo scopo di settare i parametri di analisi MRM per ciascun metabolita è stato eseguito uno studio di frammentazione infondendo delle soluzioni (200 μ M) contenenti esclusivamente il metabolita d'interesse, mediante una pompa a siringa con un flusso continuo di 10 μ L al minuto, nella sorgente, dove la molecola viene ionizzata in fase gassosa a pressione atmosferica.

Il file di acquisizione, in questo tipo di analisi, viene suddiviso in tre finestre, come riportato nella Tabella 3.6 (a, metodo di analisi su plasma; b, metodo di analisi su EBC), allo scopo di migliorare la risposta cromatografica del detector di massa. All'interno di questo file, vengono indicati tutti quei parametri necessari allo spettrometro di massa per poter eseguire l'analisi in MRM; oltre alla transizione dallo ione molecolare al suo frammento caratteristico vengono indicate anche:

- l'energia di collisione: ossia l'energia necessaria per frammentare lo ione precursore e per ottenere i frammenti;
- il cone voltage: cioè il voltaggio imposto al cono prima dell'ingresso nell'analizzatore;
- l'interscan delay: ossia il tempo che lo spettrometro impiega per eseguire il reset prima di partire con una nuova scansione (valore fissato a 0.01 sec e non riportato in tabella);
- dwell time: cioè il tempo di esposizione al detector per ogni transizione.

In Figura 3.6 sono rappresentati, come esempio, tre cromatogrammi ottenuti rispettivamente dall'analisi in MRM di un punto della curva di calibrazione in acqua, di un campione di plasma e di un controllo di qualità ad alta concentrazione (HQC) in EBC.

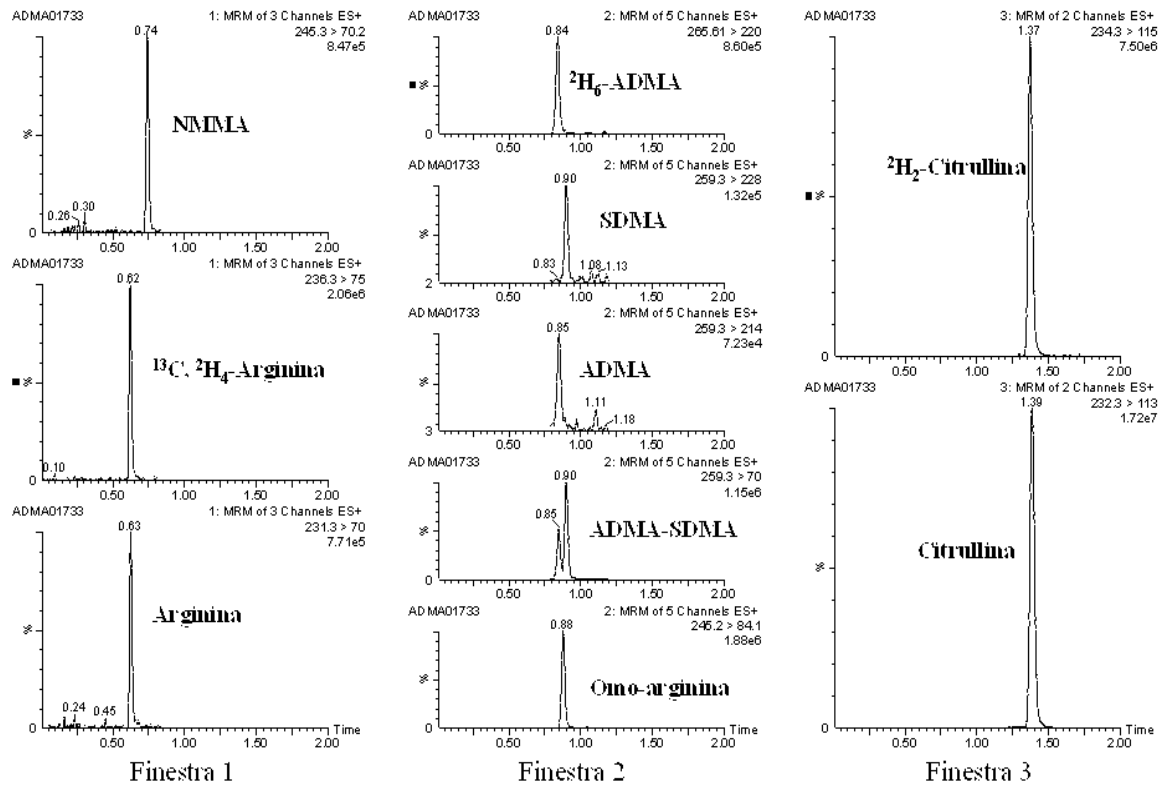
Table 3.6. Tempi di ritenzione, transizioni e parametri di acquisizione specifici per ogni metabolita relativi al metodo UPLC/MS/MS per analisi di campioni su plasma (a) e su EBC (b)
a)

Metabolita	Transizione (m/z)	Dwell time (sec)	Cone voltage (V)	Energia di collisione (eV)	Tempo di ritenzione (min)
<i>Finestra 1 (da 0.00 a 0.83 minuti)</i>					
Arg	231.30 > 70.00	0.020	75	17	0.63
Arg- ¹³ C-d ₄	236.30 > 75.00	0.020	75	15	0.62
NMMA	245.30 > 70.20	0.020	75	25	0.75
<i>Finestra 2 (da 0.74 a 1.20 minuti)</i>					
ADMA	259.30 > 214.00	0.020	75	20	0.85
SDMA	259.30 > 228.00	0.020	75	20	0.89
ADMA-SDMA	259.30 > 70.00	0.020	75	20	0.85-0.89
Omo-Arg	245.20 > 84.2	0.020	60	20	0.87
ADMA-d ₆	265.61 > 220.00	0.020	75	20	0.83
<i>Finestra 3 (da 1.20 a 1.9 minuti)</i>					
Cit	232.30 > 113.00	0.020	75	20	1.36
Cit-d ₂	234.30 > 115.00	0.020	75	20	1.35

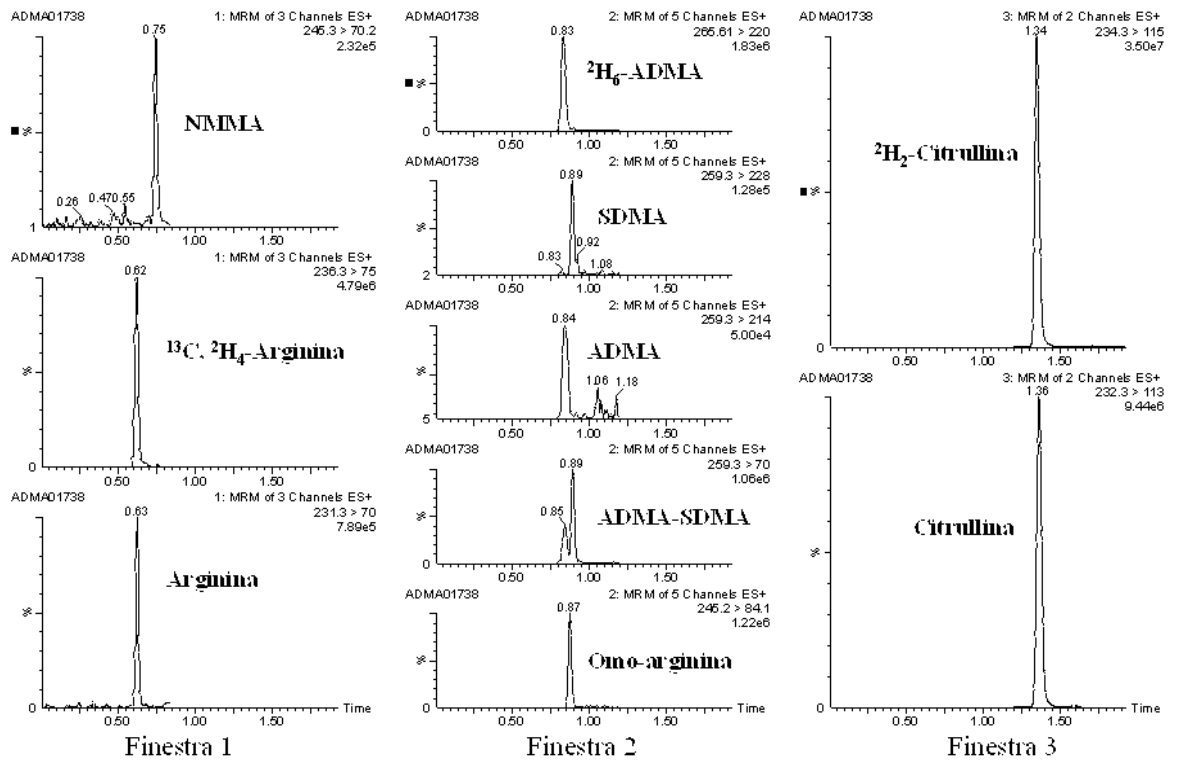
b)

Metabolita	Transizione (m/z)	Dwell time (sec)	Cone voltage (V)	Energia di collisione (eV)	Tempo di ritenzione (min)
<i>Finestra 1</i>					
ADMA	259.30 > 214.00	0.020	75	20	1.63
SDMA	259.30 > 228.00	0.020	75	20	1.65
ADMA-SDMA	259.30 > 70.00	0.020	75	20	1.63-1.65
Omo-Arg	245.20 > 84.2	0.020	60	20	1.68
ADMA-d ₆	265.61 > 220.00	0.020	75	20	1.69
<i>Finestra 2</i>					
NMMA	245.30 > 70.20	0.020	75	25	1.58
Arg	231.30 > 70.00	0.020	75	17	1.05
Arg- ¹³ C-d ₄	236.30 > 75.00	0.020	75	15	1.02
Cit	232.30 > 113.00	0.020	75	20	1.77
Cit-d ₂	234.30 > 116.00	0.020	75	20	1.77
<i>Finestra 3</i>					
3-NT	182.00 > 165.00	0.020	70	15	2.50
¹³ C ₆ -NT	186.00 > 169.00	0.020	70	15	2.50
Tyr	182.00 > 165.00	0.020	70	15	2.32
Tyr-d ₄	186.00 > 169.00	0.020	70	15	2.32

a) CAMPIONE DELLA CURVA DI CALIBRAZIONE



b) CAMPIONE DI PLASMA



c) High Quality Control in EBC

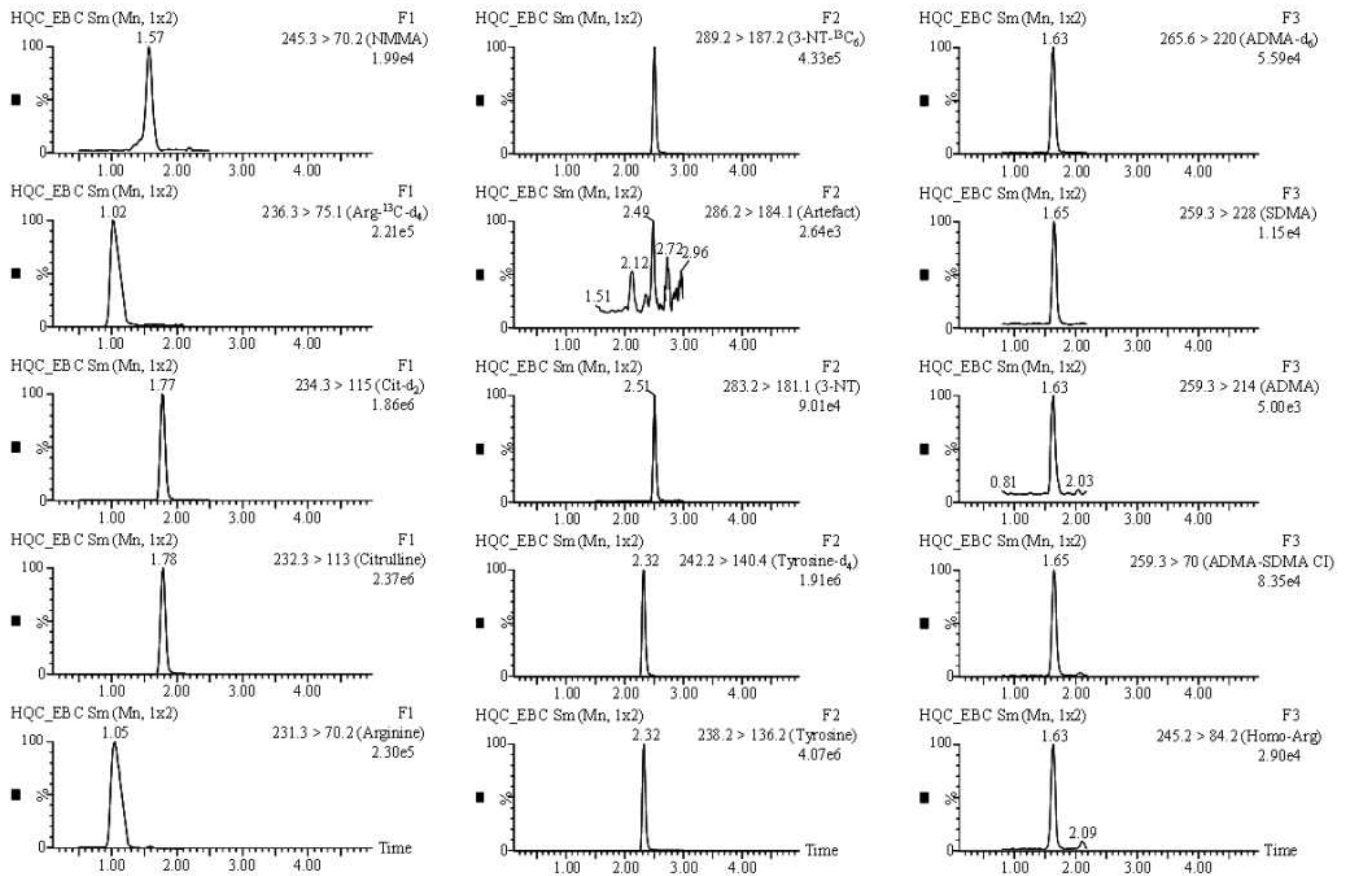


Figura 3.6 Esempio di cromatogramma in analisi MRM di un campione della curva di calibrazione in acqua (a), di un campione di plasma umano (b) e di un controllo di qualità nel pool di EBC

4. RISULTATI

4.1. Dati quantitativi ottenuti su plasma con metodo UPLC/MS/MS

4.1.1. Studio su soggetti sani e con diverse patologie

Sulla base dei dati riportati in letteratura, il primo approccio di verifica del metodo è stato quello di determinare la concentrazione media di ADMA nei plasmi di soggetti sani adulti: uomini pari a $0.63 \pm 0.07 \mu\text{M}$ e donne pari a $0.55 \pm 0.09 \mu\text{M}$. Non è stata inoltre riscontrata alcuna influenza relativa al prelievo capillare o venoso sulla quantificazione dell'ADMA nell'adulto (uomini e donne) ottenendo dati del tutto sovrapponibili tra plasma e siero.

In Tabella 4.1 sono riportati i valori di riferimento ottenuti da campioni di plasma di adulti sani, donne in gravidanza con decorso normale e di neonati a termine, raccolti in prima e in terza giornata di vita.

Tabella 4.1 Valori di riferimento di ciascun metabolita in campioni di plasma di soggetti rappresentativi della popolazione sana

	Neonati a termine (I giornata) N=45	Neonati a termine (III giornata) N=45	Donne in gravidanza normale N=48	Adulti sani N=48
	μM	μM	μM	μM
Arginina				
m \pm DS	126 ± 52.16	50.67 ± 24.07	93.59 ± 22.76	42.9 ± 21.7
Mediana	118.6	47.12	85.6	53.76
Range	20.72 - 238.8	12.15 - 138.01	67.83 - 132.44	17.2 - 88.31
SDMA				
m \pm DS	1.27 ± 0.29	1.35 ± 0.32	0.47 ± 0.11	0.27 ± 0.11
Mediana	1.37	1.33	0.47	0.29
Range	0.69 - 1.84	0.58 - 2.18	0.32 - 0.69	0.13 - 0.49
NMMA				
m \pm DS	0.18 ± 0.03	0.26 ± 0.14	0.17 ± 0.12	0.05 ± 0.02
Mediana	0.19	0.22	0.12	0.04
Range	0.09 - 0.27	0.07 - 0.81	0.06 - 0.46	0.02 - 0.10
Citrullina				
m \pm DS	12.33 ± 2.74	11.19 ± 4.23	17.13 ± 5.91	29.29 ± 11.42
Mediana	11.44	10.82	15.57	34.84
Range	6.34 - 19.75	5.14 - 27.54	10.81 - 30.77	13.25 - 54.42
ADMA				
m \pm DS	1.20 ± 0.28	1.03 ± 0.23	0.62 ± 0.15	0.66 ± 0.11
Mediana	1.16	0.98	0.56	0.65
Range	0.78 - 1.81	0.57 - 1.57	0.43 - 0.92	0.41 - 0.89

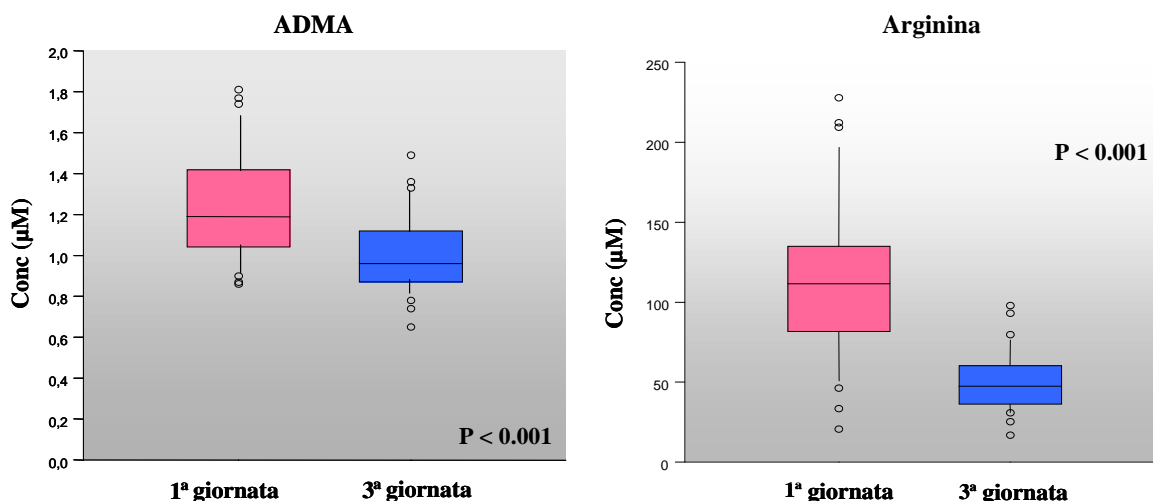


Figura 4.1. Andamento dei livelli plasmatici di ADMA ed arginina, espressi in $\mu\text{mol/L}$, in neonati sani a termine in prima e terza giornata di vita

Si è ottenuta una differenza statisticamente significativa nei neonati a termine tra prima e terza giornata di vita nei valori di ADMA e di arginina ($p < 0,001$) i cui andamenti sono riportati in Figura 4.1, non si sono invece osservate differenze significative nei valori di SDMA, al contrario dei livelli di NMMA che sono risultati significativamente aumentati ($p < 0,001$) tra la prima e la terza giornata di vita (Tab. 4.1).

Nelle popolazioni costituite da soggetti (uomini e donne) con cardiopatie i valori di ADMA e di SDMA ottenuti sono stati rispettivamente pari a $0,89 \pm 0,17 \mu\text{M}$ e $0,72 \pm 0,26 \mu\text{M}$, risultando entrambi significativamente più alti rispetto ai controlli sani ($p < 0,05$), a differenza invece dei soggetti iperglicemici che hanno mostrato livelli significativamente inferiori ($p = 0,002$) di ADMA ($0,47 \pm 0,13 \mu\text{M}$) rispetto ai relativi controlli, ma nessuna differenza nelle concentrazioni di SDMA. E' risultata invece significativamente più bassa in entrambi i gruppi di pazienti la concentrazione di omomarginina ($p < 0,05$) rispetto ai relativi soggetti sani (Fig. 4.2).

Nelle donne in gravidanza normale si è potuto constatare un incremento significativo delle concentrazioni di ADMA rispetto alla popolazione sana di riferimento, durante tutto il periodo gestazionale a partire dal I trimestre fino al termine della gravidanza con una normalizzazione dei valori solo a 30 giorni dal parto (dati non mostrati). Il confronto tra la concentrazione dei vari metaboliti analizzati nelle donne gravide sane e con pre-eclampsia, ha invece evidenziato che la concentrazione di ADMA al momento del ricovero è stata significativamente più bassa nelle gravide ipertese rispetto alle gravide normotese ($p = 0,006$) (Fig. 4.3), contrariamente a quanto riportato in letteratura, mentre a 30 giorni di distanza dal parto la situazione si è invertita e la concentrazione di ADMA è risultata significativamente più elevata nelle donne precedentemente affette da pre-eclampsia rispetto ai controlli. Infine, mentre la concentrazione di arginina è risultata essere sempre inferiore nelle donne pre-eclampatiche rispetto ai controlli, dal momento del ricovero fino al trentesimo giorno dopo il parto, anche se la differenza è risultata statisticamente significativa solo a

distanza di 24 ore dopo il parto, la pre-eclampsia sembrerebbe condizionare le concentrazioni di citrullina risultate ridotte sin dal primo giorno dopo il parto e mantenutesi tali a distanza di 30 giorni (Tab. 4.2)

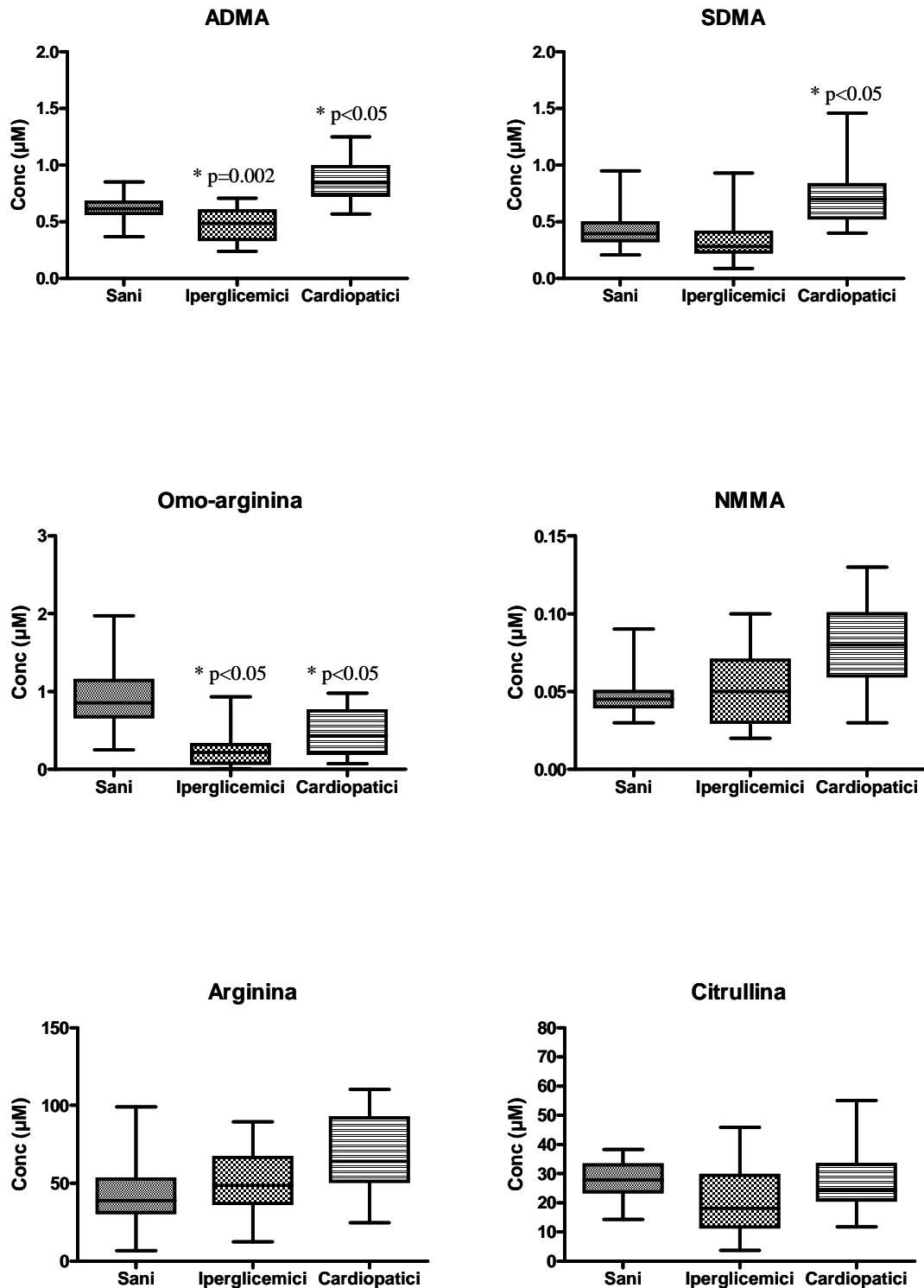


Figura 4.2 Andamento dei livelli plasmatici dei metaboliti d'interesse, espressi in µmol/L, in soggetti adulti iperglicemici e affetti da cardiopatie

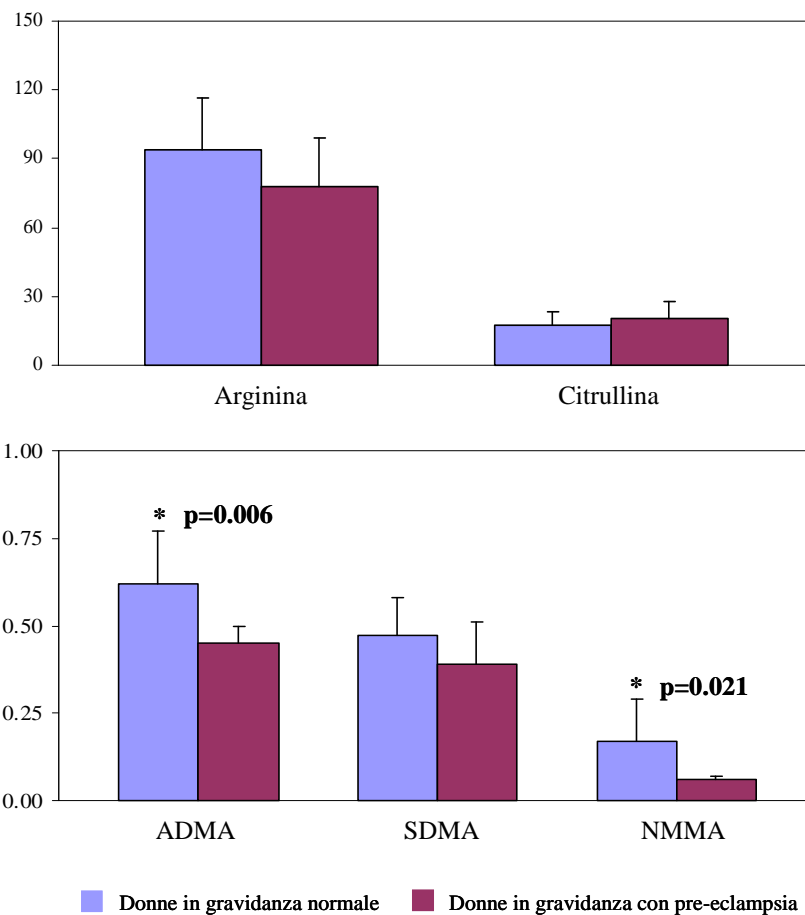


Figura 4.3 Concentrazioni plasmatiche di ADMA, espresse in $\mu\text{mol/L}$, misurate al momento del ricovero in donne in gravidanza normale e con preeclampsia

Tabella 4.2 Valori ottenuti per ciascun metabolita da campioni di plasma di donne in gravidanza con diagnosi di pre-eclampsia

	Arginina μM	NMMA μM	SDMA μM	ADMA μM	Cit μM	ADMA/Arg μM
I Trimestre						
Media	55.1	0.102	0.769	0.339	12.3	0.015
DS	15.8	0.020	0.286	0.051	3.1	0.009
Range	27.2 - 76.1	0.08 - 0.14	0.42 - 1.35	0.27 - 0.42	7.7 - 17.6	0.007 - 0.040
II Trimestre						
Media	73.3	0.08	0.74	0.34	15.3	0.012
DS	27.7	0.04	0.27	0.06	3.9	0.008
Range	38.4 - 139.7	0.03 - 0.15	0.39 - 1.3	0.26 - 0.42	10.1 - 23.9	0.005 - 0.034
Travaglio						
Media	56.3	0.10	0.76	0.44	16.2	0.016
DS	19.3	0.05	0.29	0.08	5.0	0.009
Range	31.8 - 95.4	0.03 - 0.2	0.48 - 1.56	0.32 - 0.58	7.1 - 24.8	0.006 - 0.036
I giorno post parto						
Media	93.1	0.09	0.67	0.43	21.0	0.008
DS	27.4	0.04	0.28	0.05	6.0	0.004
Range	60.6 - 155.6	0.04 - 0.16	0.38 - 1.38	0.32 - 0.51	13.2 - 33.0	0.004 - 0.019
III giorno post parto						
Media	87.3	0.10	0.74	0.43	20.4	0.009
DS	23.1	0.04	0.31	0.06	5.0	0.004
Range	51.1 - 123.2	0.05 - 0.19	0.36 - 1.65	0.29 - 0.54	13.9 - 31.2	0.005 - 0.021
XXX giorno post parto						
Media	113.4	0.08	0.50	0.39	33.1	0.004
DS	25.5	0.05	0.19	0.06	6.1	0.001
Range	89.6 - 168.4	0.05 - 0.22	0.31 - 1.02	0.32 - 0.5	22.6 - 41.5	0.003 - 0.006

4.1.2. Studio sui neonati prematuri

Ad una prima analisi, i plasmi dei neonati pre-termine (età gestazionale 26.6 ± 1.3 settimane; peso alla nascita 805 ± 175 g) hanno presentato dei valori medi di ADMA che sono risultati significativamente inferiori ($p=0.008$) rispetto a quelli riscontrati nei neonati a termine in prima ed in terza giornata di vita; è stato inoltre possibile evidenziare un aumento significativo di NMMA ($p=0.003$) e una diminuzione statisticamente significativa ($p=0.002$) della concentrazione plasmatica di arginina tra questi due gruppi. All'interno del gruppo di neonati prematuri, sono stati distinti due sottogruppi in base alla presenza o meno, nella madre, di corioamnionite, definita da infiammazione acuta delle membrane placentare ed extraplacentare. Le concentrazioni plasmatiche di ADMA e di SDMA alla nascita e durante i primi giorni di vita nei bambini nati da madri con corioamnionite ($n=14$) sono risultate maggiori rispetto al sottogruppo senza corioamnionite ($n=15$) come mostrato in Figura 4.4. Esse sono rimaste costanti durante tutta la prima settimana di vita e non sono risultate essere dipendenti dall'età gestazionale e dal peso alla nascita, nè correlate con la durata della ventilazione meccanica e l'ossigeno dipendenza. Non ci sono state invece differenze significative tra le due popolazioni nei livelli plasmatici di arginina. Tutti i dati ottenuti sono schematizzati in Tabella 4.3.

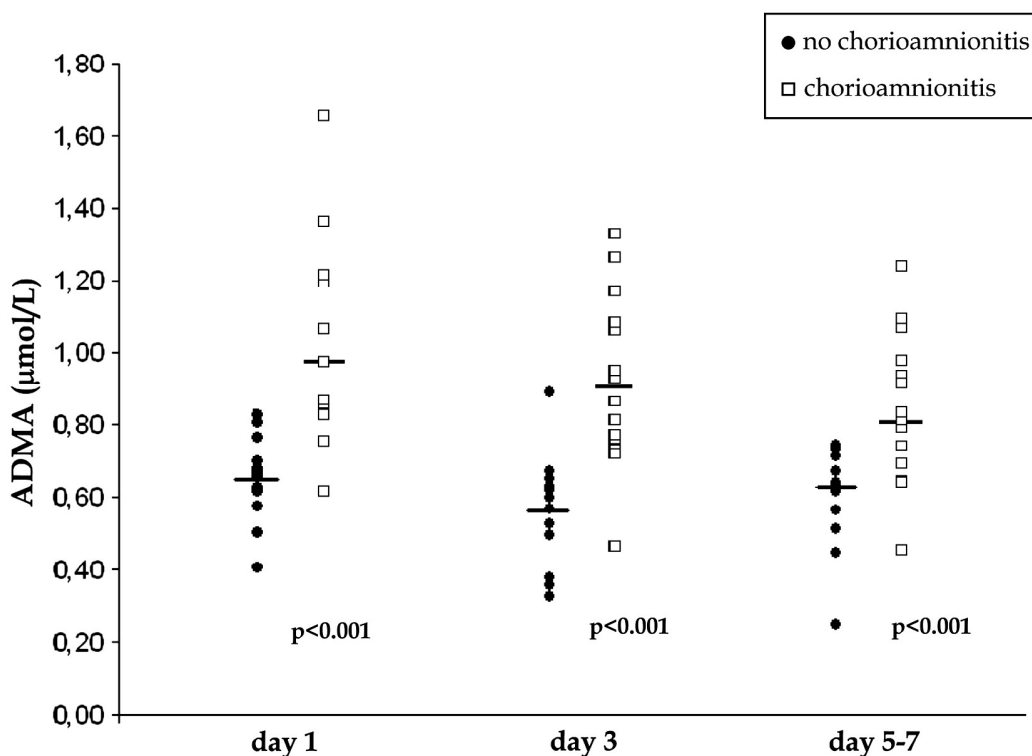


Figura 4.4. Concentrazioni dell'ADMA misurate in neonati con e senza corioamnionite. Il test (ANOVA=NS) per i due gruppi non mostra significative variazioni dei livelli di ADMA nei neonati prematuri nella prima settimana di vita.

Tabella 4.3 Risultati dello studio sull'intero gruppo di neonati ELBW e sui due sottogruppi con e senza corioamnionite. I dati sono espressi in $\mu\text{mol/L}$ come media \pm DS. La significativita' tra i sottogruppi di EBLW con e senza corioamnionite e' espressa come: * $p < 0.01$; ** $p < 0.05$.

	Gruppo EBLW (n = 29)	EBLW con corioamnionite (n = 14)	EBLW senza corioamnionite (n = 15)
ADMA ($\mu\text{mol/L}$)			
Giorno 1	0.75 (0.61–0.86)	0.97 (0.75–1.19)	0.65 (0.61–0.69)*
Giorno 3	0.72 (0.55–0.91)	0.89 (0.76–1.07)	0.57 (0.50–0.63)*
Giorno 7	0.70 (0.64–0.82)	0.83 (0.70–0.97)	0.66 (0.60–0.70)*
SDMA ($\mu\text{mol/L}$)			
Giorno 1	0.77 (0.61–0.88)	0.89 (0.8–1.01)	0.65 (0.56–0.71)**
Giorno 3	0.93 (0.77–1.07)	1.06 (0.99–1.22)	0.76 (0.66–0.8)*
Giorno 7	0.92 (0.75–1.02)	0.94 (0.76–1.03)	0.90 (0.67–1.00)
NMMA ($\mu\text{mol/L}$)			
Giorno 1	0.09 (0.07–0.14)	0.1 (0.06–0.14)	0.08 (0.07–0.12)
Giorno 3	0.08 (0.06–0.12)	0.1 (0.06–0.15)	0.06 (0.06–0.09)
Giorno 7	0.09 (0.08–0.14)	0.11 (0.08–0.14)	0.09 (0.08–0.12)
L-Arg ($\mu\text{mol/L}$)			
Giorno 1	22.2 (18.2–39.0)	19.7 (11.5–34.5)	22.3 (19.2–41.1)
Giorno 3	27.5 (16.0–45.5)	31.3 (18.1–49.6)	23.9 (15.9–41.3)
Giorno 7	49.9 (25.6–69.1)	49.9 (38.4–54.3)	44.6 (24.6–110)

Le concentrazioni di ADMA sono risultate simili per i maschi e le femmine [0.8(0.63–0.94) vs. 0.66(0.58–0.84) μM , $p=0.4$], e nei soggetti con e senza BPD [0.79 (0.61–1.02) vs. 0.67 (0.60–0.80) μM , $p=0.41$]. Nessuno dei parametri misurati è risultato associato ai livelli circolanti delle metilarginine, tuttavia le concentrazioni di ADMA sono risultate significativamente correlate al valore di AaDO₂ (alveolar–arterial oxygen difference) alla nascita ($R = 0.51$, $p=0.012$).

Nessuna significativa correlazione è stata trovata tra l'incremento della concentrazione di ADMA e il grado di severità della corioamnionite.

4.2. Messa a punto e validazione del metodo di analisi su EBC

Durante il terzo anno di Dottorato mi sono dedicata alla messa a punto e alla validazione di un metodo analitico sulla base di quello precedentemente pubblicato [102], per la quantificazione di biomarkers di stress ossidativo, sul condensato dell'aria espirata di bambini con patologie respiratorie, considerando le notevoli difficoltà che comporta l'utilizzo di questo tipo di matrice in termini di basse concentrazioni degli analiti in essa presenti.

Questo nuovo metodo, consente di arricchire il campione prima dell'analisi cromatografica in UPLC ottenendo pertanto una maggiore sensibilità analitica dello spettrometro di massa. Il processo di validazione ha avuto l'obiettivo di dimostrare la

validità e l'applicabilità della metodica in ambito clinico ed è stato condotto attraverso la raccolta di un pool di EBC tale da poter consentire la preparazione delle curve di calibrazione in matrice e dei controlli di qualità necessari per valutare la precisione, la robustezza e la riproducibilità del metodo di analisi. Essendo l'EBC una matrice molto diluita è stato necessario sviluppare un sistema di concentrazione del campione che ha permesso di incrementare la sensibilità analitica e quindi la quantificazione anche di concentrazioni molto basse dei metaboliti d'interesse.

Per tener conto di possibili differenze nella diluizione dei campioni, in fase di elaborazione dei dati i vari metaboliti sono stati espressi in termini assoluti e come rapporto rispetto alla Tirosina (Tyr), considerata come un fattore di correzione per la diluizione in quanto come altri aminoacidi, passa la barriera alveolo-capillare e, da valutazioni effettuate su campioni asmatici e di controllo in cui le concentrazioni sono risultate simili, la sua escrezione nel condensato sembra non essere influenzata da processi infiammatori.

Tra i criteri che definiscono l'efficienza di un metodo analitico sono stati valutati:

- La precisione che comprende sia la misura della ripetibilità (precisione intra-assay) che della riproducibilità (precisione inter-assay). La precisione intra-assay è la misura della dispersione dei valori attorno ad un valore medio, ottenuta dallo stesso operatore in un'unica seduta analitica senza cambiare reattivi o apparecchi. La valutazione di tale parametro è stata effettuata preparando 10 campioni a tre diverse concentrazioni per ciascun metabolita (LQC, MQC e HQC), che sono stati iniettati una sola volta al giorno per tre differenti giornate. La precisione inter-assay invece permette di determinare la deviazione dei risultati rispetto al valore medio, ottenuta nel corso di più sedute analitiche, da operatori diversi e utilizzando reagenti diversi. Per valutare la precisione inter-assay sono stati preparati 3 campioni a diversa concentrazione di ciascun metabolita, che sono stati iniettati in giorni diversi ed elaborati poi tutti insieme.
- La robustezza dei dati ottenuti in termini di riproducibilità in relazione alla raccolta del campione è stata valutata in 8 volontari adulti sani, che hanno eseguito 2 raccolte di EBC, a distanza di 24 ore ed il relativo test di Bland-Altman ha dimostrato una buona correlazione, all'interno delle $\pm 2SD$ dalla media verso le differenze % dei valori misurati, sia tra i dosaggi dei diversi metaboliti in termini assoluti che in termini di rapporto rispetto alla Tyr.
- L'accuratezza è stata determinata attraverso il calcolo del BIAS% ossia come scarto del valore trovato con le determinazioni sperimentali da un valore teorico. È stata valutata iniettando i 7 campioni della curva di calibrazione, per i quali si conosce il valore teorico di ciascun metabolita.
- La sensibilità è stata determinata in termini di LOD (limit of detection) e LOQ (limit of quantification) iniettando soluzioni progressivamente diluite a partire dal punto più basso della curva di calibrazione. Il metodo in esame presenta elevata

sensibilità in quanto permette di distinguere anche variazioni di concentrazione inferiori a 5 nmol/L.

- Il recupero analitico è stato valutato aggiungendo ad un campione di EBC concentrazioni note crescenti dei vari metaboliti. È stata poi effettuata la quantificazione, confrontando i valori di concentrazione misurati sperimentalmente con i valori di concentrazione di metabolita aggiunto in modo da determinarne il recupero, ed espressa in percentuale della concentrazione effettiva di ogni metabolita recuperato durante la procedura analitica.
- L'errore strumentale inteso come errore intrinseco alla strumentazione utilizzata, è stato determinato su tre differenti campioni a concentrazioni crescenti dei diversi metaboliti, di cui sono state effettuate 10 iniezioni per ciascun campione. Tale errore, in questo studio, risulta essere sistematico: i dati ottenuti vengono infatti modificati in maniera costante in tutte le determinazioni effettuate.

La validazione del metodo ha portato a ottimi risultati in termini di quantificazione dei metaboliti d'interesse e di riproducibilità dei dati ottenuti come mostrato in Tabella 4.4.

Tabella 4.4 Dati relativi alla validazione del metodo UPLC/MS/MS tramite arricchimento del campione on-line sviluppato per l'analisi del condensato dell'aria espirata (EBC)

	ADMA		SDMA		NMMA		H-Arg		Arginine		Citruiline		Tyrosine		3-NT										
	0.01 - 1	0.01 - 1	0.01 - 1	0.01 - 1	0.01 - 1	0.01 - 1	0.01 - 1	0.9 - 62.5	0.9 - 62.5	0.9 - 62.5	0.78 - 50	0.78 - 50	0.9 - 62.5	0.78 - 50	0.0078 - 0.5	-									
Working range ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	8.442 \pm 0.2292	20.21 \pm 0.3186	0.5490 \pm 0.02500	9.007 \pm 0.5826	0.2803 \pm 0.005339	0.9967 \pm 0.02412	7.341 \pm 0.2878	22.11 \pm 0.4172																	
<i>Calibration curves</i>																									
Slope	-0.0002166 \pm 0.002319	0.003061	-0.0007416 \pm 0.0002325	0.0006483 \pm 0.005460	-0.007753 \pm 0.003171	0.00001956 \pm 0.01358	-0.00007393 \pm 0.1332	0.00001182 \pm 0.001898																	
Intercept	0.9971	0.9990	0.9987	0.9953	0.9986	0.9971	0.9924	0.9982																	
Correlation r^2																									
<i>Inter-assay precision (n=30)</i>																									
Mean	LQC 0.03	MQC 0.54	HQC 0.83	LQC 0.02	MQC 0.42	HQC 0.91	LQC 0.01	MQC 0.11	HQC 0.62	LQC 0.02	MQC 0.45	HQC 0.74	LQC 0.87	MQC 20.2	HQC 48.1	LQC 1.39	MQC 25.3	HQC 49.4	LQC 0.69	MQC 18.6	HQC 46.8	LQC 0.009	MQC 0.08	HQC 0.49	
SD	0.01	0.03	0.01	0.01	0.04	0.39	0.001	0.02	0.37	0.003	0.12	0.17	0.07	2.63	7.41	0.70	1.81	5.75	0.14	2.80	3.11	0.004	0.05	0.16	
CV%	15.2	5.0	7.6	8.7	9.9	20.3	10.6	12.7	16.9	10.6	12.7	16.9	3.1	3.6	4.1	1.8	2.4	5.8	4.7	4.2	12.7	11.2	6.7	16.6	
<i>Intra-assay precision (n=30)</i>																									
Mean	LQC 0.04	MQC 0.52	HQC 0.98	LQC 0.02	MQC 0.37	0.81	LQC 0.02	MQC 0.15	HQC 0.69	LQC 0.04	MQC 0.58	HQC 0.86	LQC 0.88	MQC 21.9	HQC 42.8	LQC 1.43	MQC 19.5	HQC 45.1	LQC 0.95	MQC 16.8	HQC 50.8	LQC 0.010	MQC 0.07	HQC 0.52	
SD	0.02	0.05	0.25	0.06	0.15	0.49	0.01	0.06	0.42	0.08	0.13	0.19	0.03	1.51	5.7	0.79	0.15	1.58	0.11	2.15	9.46	0.005	0.03	0.13	
CV%	7.1	10.0	19.7	16.5	13.1	19.8	10.6	12.7	16.9	20.1	10.5	17.5	3.6	5.0	4.4	2.1	0.7	1.2	3.6	3.6	10.9	11.1	4.9	12.2	
<i>Accuracy [Bias%] (n=10)</i>	-2.24	-2.93	18.6	19.7	-0.56	2.32	-2.10	9.49																	
<i>Instrumental Error [CV%] (n=30)</i>	3.59	4.27	6.45	8.33	2.87	2.66	3.64	4.90																	
<i>Recovery (mean) [%] (n=7)</i>	97.8	97.1	102.8	109.7	99.4	102.3	98.4	109.0																	
<i>LLOD (S/N=3) (nmol/L)</i>	5	5	10	10	1	1	1	0.1																	
<i>LLOQ (S/N=10) (nmol/L)</i>	20	20	20	20	10	10	10	1																	

4.2.1. Valutazione delle interferenze

Non sono state rilevate interferenze per quanto riguarda il dosaggio dei due isomeri, ADMA ed SDMA, poiché per ogni metabolita sono stati monitorati gli ioni frammento che li caratterizzano, corrispondenti alle transizioni specifiche 259.3→214 per ADMA e 259.3→228 per SDMA, ed uno ione frammento comune ad entrambe, derivante dalla transizione 259.3→70. Questo ha permesso la valutazione del rapporto fra gli ioni caratteristici e lo ione comune, che si è mantenuto costante in tutte le determinazioni. Inoltre, dall'analisi delle curve di calibrazione effettuate prima in acqua e poi in matrice per ciascun metabolita, non sono state rilevate interferenze dovute alle diverse matrici utilizzate per i dosaggi.

E' stata invece monitorata, per ogni determinazione, la presenza di un possibile artefatto co-eluyente allo stesso tempo di ritenzione della 3-NT, che può verificarsi in seguito a reazione di nitrificazione dell'aminoacido in fase di derivatizzazione del campione. Il gruppo -OH della tirosina infatti, appare particolarmente suscettibile alla nitrificazione, nei campioni biologici, subendo sostituzione dell'idrogeno con un nitrogruppo (-NO₂) in posizione 3 dell'anello fenolico. La formazione di 3-nitrotirosina, prodotta da specie ossidanti presenti nella miscela di reazione, come perossinitriti (ONOO⁻; ONOOH) e radicali dell'ossido nitrico ([•]NO₂), può contribuire alla sovrastima della 3-NT endogena in campioni di EBC. Sebbene questo fenomeno possa essere considerato una limitazione del presente metodo analitico, attraverso il monitoraggio durante ciascuna analisi della specifica transizione 286.2>184.1 m/z corrispondente all'artefatto prodotto per nitrificazione della tirosina libera, e' stato possibile calcolare esattamente per ogni campione il contributo di quest'ultimo sulla sovrastima della 3-NT endogena presente nei campioni di condensato, applicando una semplice formula:

$$\% \text{ 3-NT}_{\text{Art}} = [(\text{Tirosina}_{\text{conc}}) \times (\text{Artefatto}_{\text{conc}})]/100$$

Da cui:

$$\text{3-NT}_{\text{Corr}} = \text{3-NT}_{\text{End}} - \text{3-NT}_{\text{Art}}$$

Il contributo dell'artefatto e' risultato essere costante per tutte le determinazioni.

In Figura 4.5 e' riportato un esempio di cromatogramma in un campione biologico che mostra il monitoraggio della transizione specifica per l'artefatto prodotto in sede di derivatizzazione.

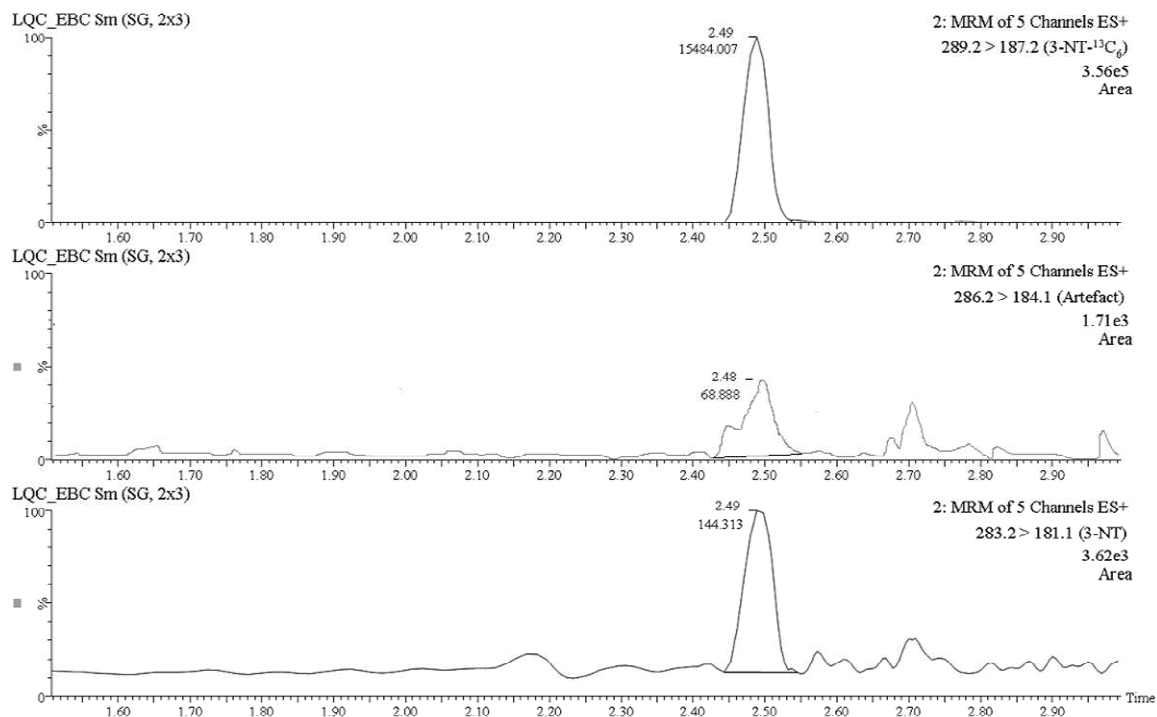


Figura 4.5 Transizioni MRM estratte da un cromatogramma di un campione di EBC: la transizione specifica per l'artefatto viene monitorata durante ciascuna analisi

4.3. Studio sull'EBC di bambini affetti da malattie respiratorie

Nello studio sono stati inclusi 29 bambini asmatici di età compresa tra i 5,8 e i 16,3 anni (età media 11,1) e 62 controlli sani di età compresa tra i 5,1 e i 15,4 anni (età media 9,9). Tutti i 91 soggetti sono stati in grado di svolgere le manovre per la raccolta del condensato dell'aria espirata e la spirometria.

4.3.1. Valutazione dei livelli di ADMA nell'EBC

Dal nostro studio è emerso che è possibile dosare ADMA nel condensato dell'aria espirata mediante spettrometria di massa.

Per tener conto di possibili differenze nella diluizione dei campioni, l'ADMA è stata anche espressa in rapporto con la tirosina che, avendo concentrazioni simili sia nei bambini asmatici e che nei sani, non sembra influenzato dai processi infiammatori.

La riproducibilità della metodica è stata valutata in 8 volontari adulti sani, che hanno eseguito 2 raccolte di EBC, a distanza di 24 ore. Il test di Bland-Altman ha dimostrato una buona riproducibilità dei dosaggi di ADMA e dei valori di ADMA/Tyr, con tutti i punti del grafico che cadono entro 2 deviazioni standard dalla media verso le differenze % di ciascun valore come mostrato in Figura 4.6.

Bland-Altman: %Differenza vs media

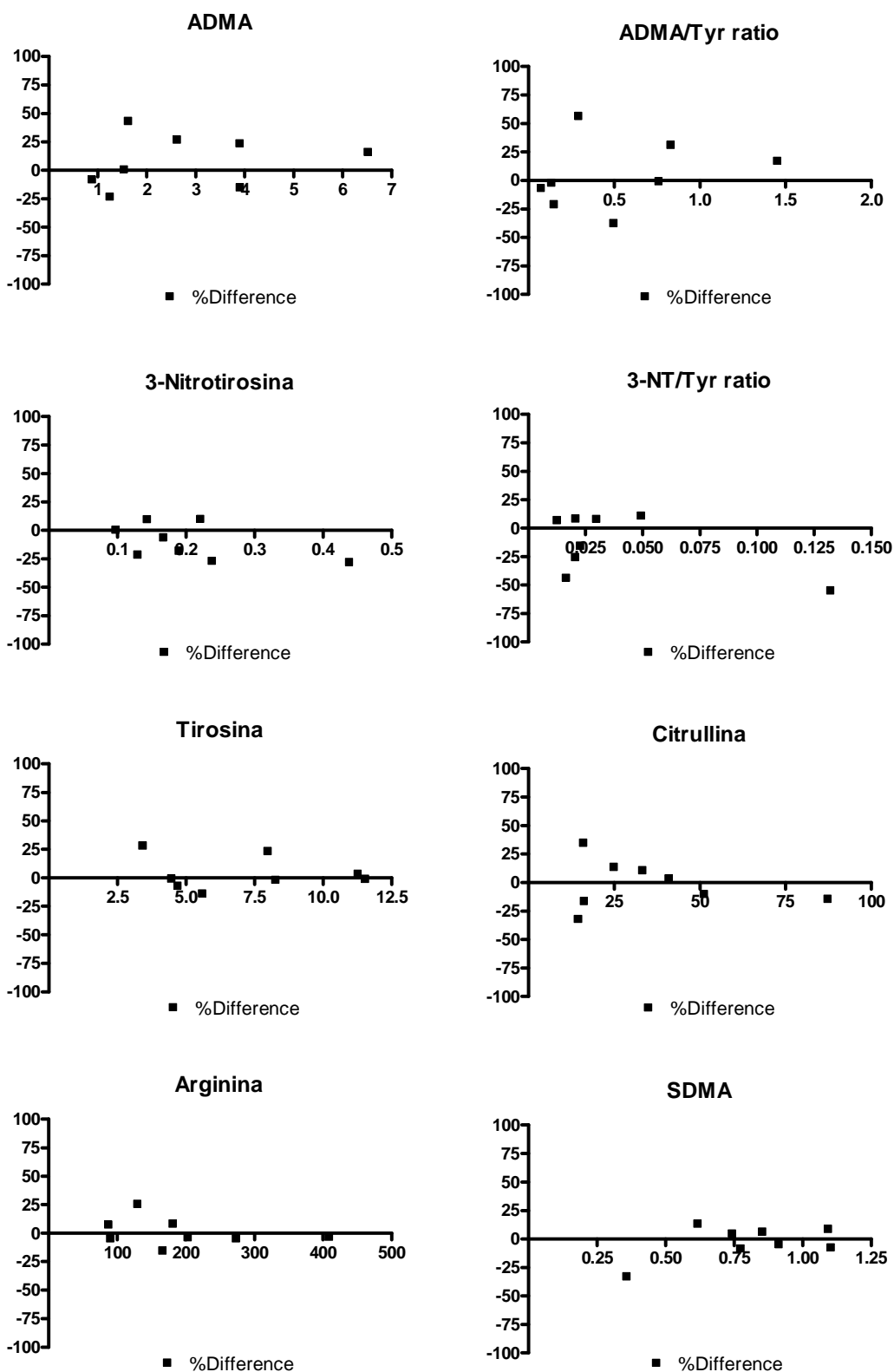


Figura 4.6-Bland Altman plot dei valori dei diversi metaboliti misurati nell'EBC a distanza di 24 ore in un gruppo di soggetti adulti sani

4.3.2. Confronto fra i gruppi dei soggetti asmatici e sani

I valori di ADMA e del rapporto ADMA/ Tyr sono risultati significativamente più elevati nei bambini asmatici rispetto a quelli dei bambini del gruppo di controllo (rispettivamente $p < 0,001$ e $p = 0,003$) (Tab. 4.6). La figura 4.7 costituisce una rappresentazione grafica della distribuzione gaussiana dei valori ottenuti per i due gruppi di bambini studiati, mettendo in luce una possibile distinzione di due ulteriori sottogruppi all'interno della popolazione di bambini asmatici, probabilmente correlata alla gravità dell'asma. Il test di Mann-Whitney non ha dimostrato una differenza significativa dei valori di ADMA e ADMA/Tyr tra maschi e femmine.

Anche le concentrazioni di SDMA e 3-NT sia in termini assoluti che normalizzate rispetto alla tirosina sono risultate significativamente più elevate nei bambini asmatici rispetto al gruppo di controllo (rispettivamente $p < 0,001$ e $p < 0,05$), come mostrato in figura 4.8.

Non sono state evidenziate invece differenze significative nei valori di tutti gli altri metaboliti nei due gruppi presi in considerazione.

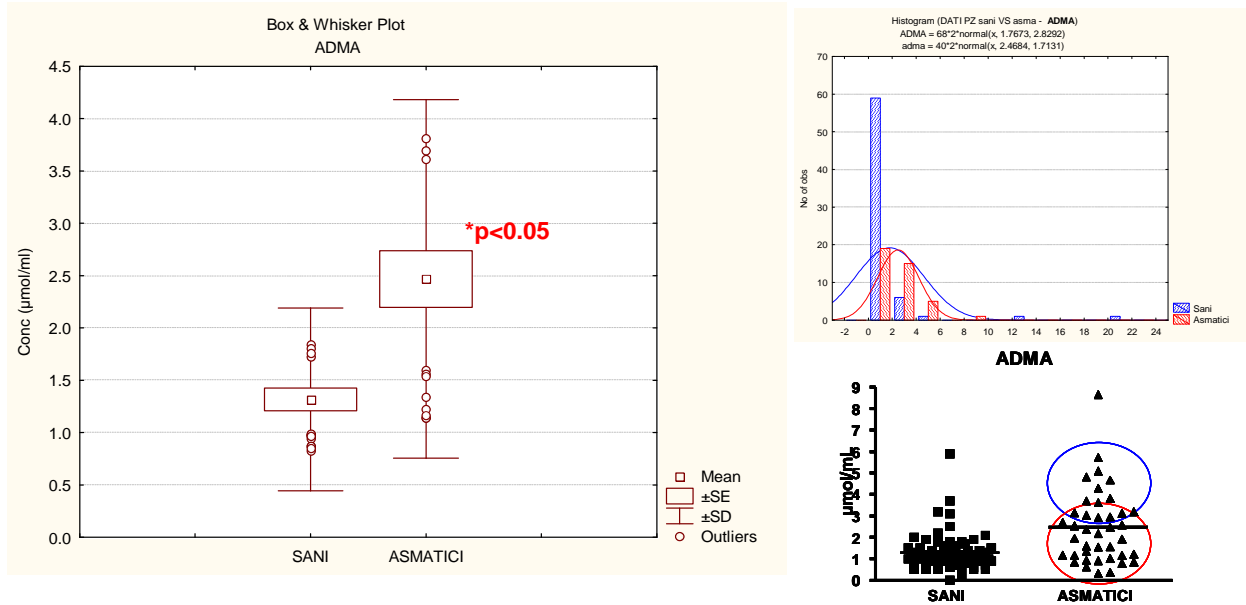
Tabella 4.6-Valori di ADMA espressi come mediana e range interquartile nei due gruppi studiati

	Bambini asmatici	Controlli sani	Significativita' (p)
Numerosità (F/M)	29 (12/17)	62 (26/36)	
ADMA ($\mu\text{mol/mL}$)	2.17 [1,15-3,19]	1.1 [0,7-1,5]	$< 0,001$ (**)
ADMA/Tyr ratio ($\mu\text{mol}/\mu\text{mol Tyr}$)	0.173 [0,059-0,377]	0.072 [0,053-0,105]	0,003 (*)

Sono state studiate alcune correlazioni tra i valori dei metaboliti quantificati nell'EBC ed i parametri spirometrici quali FVC%, FEV1% e non è stata dimostrata alcuna correlazione significativa tra questi ultimi e i valori di ADMA, né nell'intero gruppo di bambini (asmatici e sani considerati assieme) né nel solo gruppo di bambini asmatici. Analogamente per quanto riguarda i parametri spirometrici in rapporto ai valori di ADMA/Tyr ($p > 0,05$). Nel gruppo dei bambini asmatici, invece, i valori di ADMA correlano in maniera significativa con il dosaggio dei farmaci corticosteroidi inalatori ICS ($p = 0,005$; $r = 0,406$) (Fig. 4.9a). Un'analoga correlazione è stata dimostrata per ADMA/Tyr e il dosaggio degli ICS ($p = 0,04$; $r = 0,406$) (Fig. 4.9b).

I dosaggi di ADMA e di ADMA/Tyr non correlano con l'età dei bambini asmatici ($p > 0,05$) né con la durata della malattia asmatica ($p > 0,05$).

a)



b)

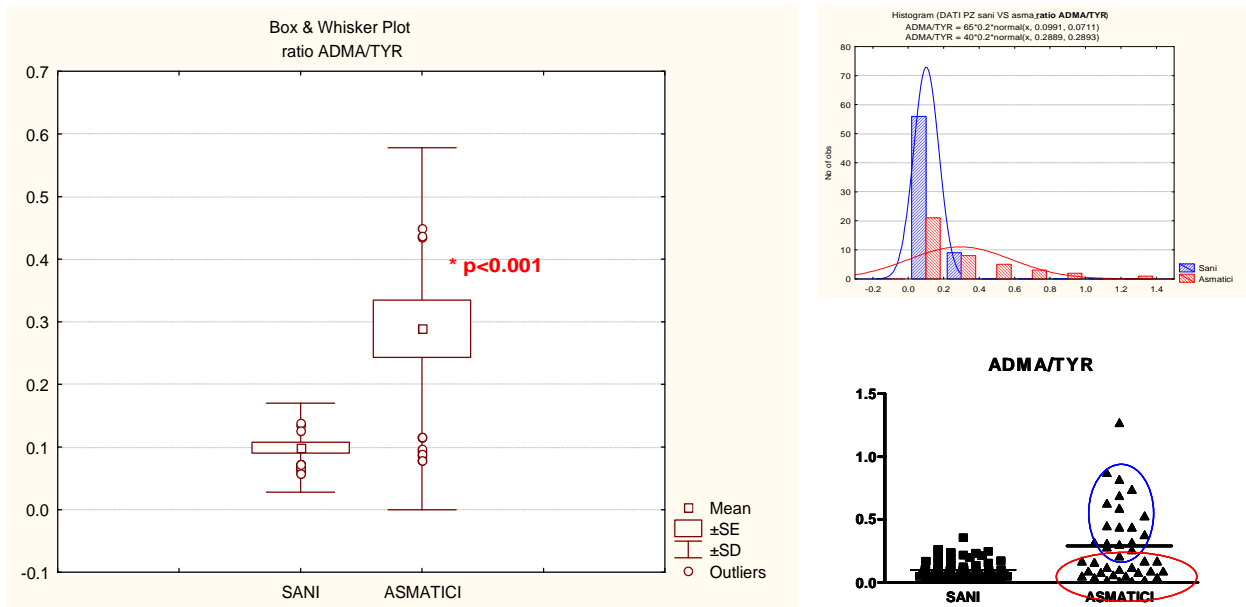


Figura 4.7 Rappresentazione grafica dei valori di ADMA (a) e del rapporto ADMA/Tyr (b) nel gruppo di bambini asmatici e nel gruppo di controllo

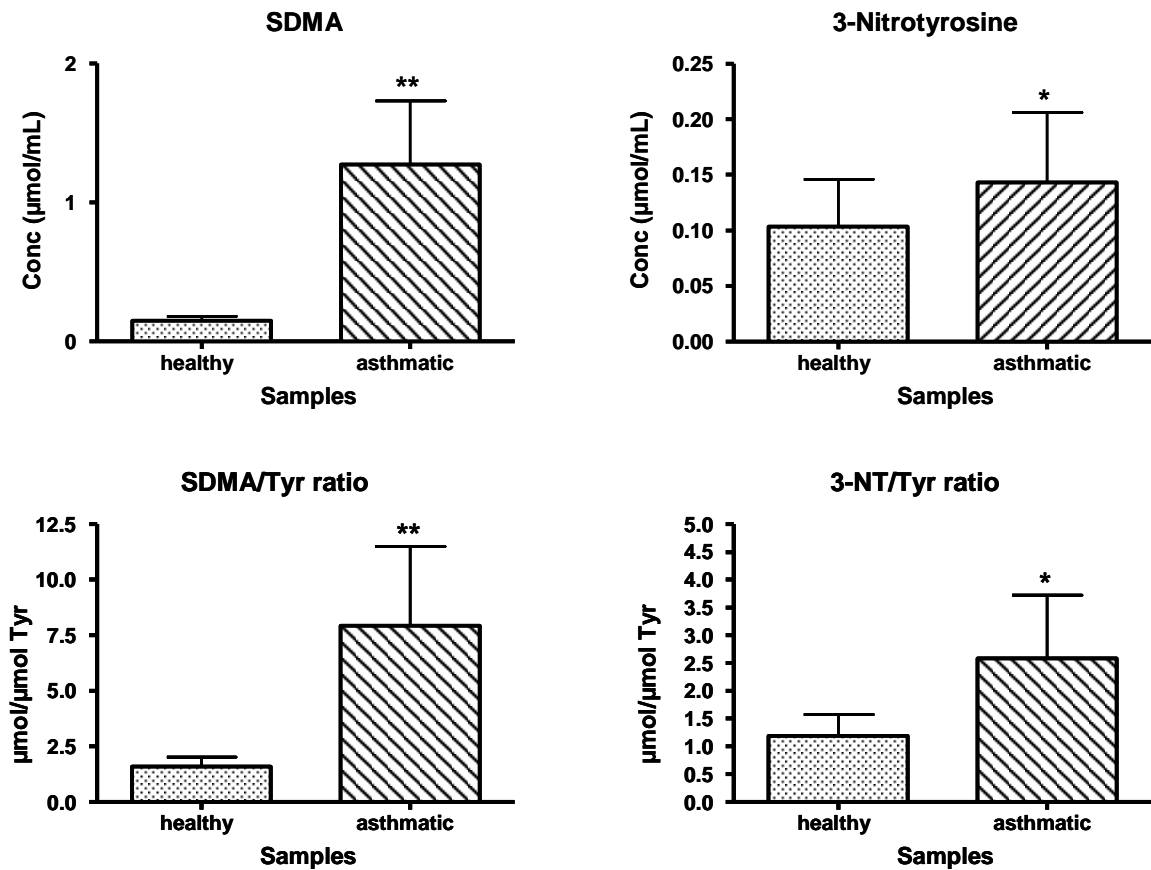


Figura 4.8 Rappresentazione grafica dei valori di SDMA e 3-NT e dei loro relativi rapporti con la Tyr nel gruppo di bambini asmatici verso il gruppo di controllo. ** p<0.001; * p<0.05

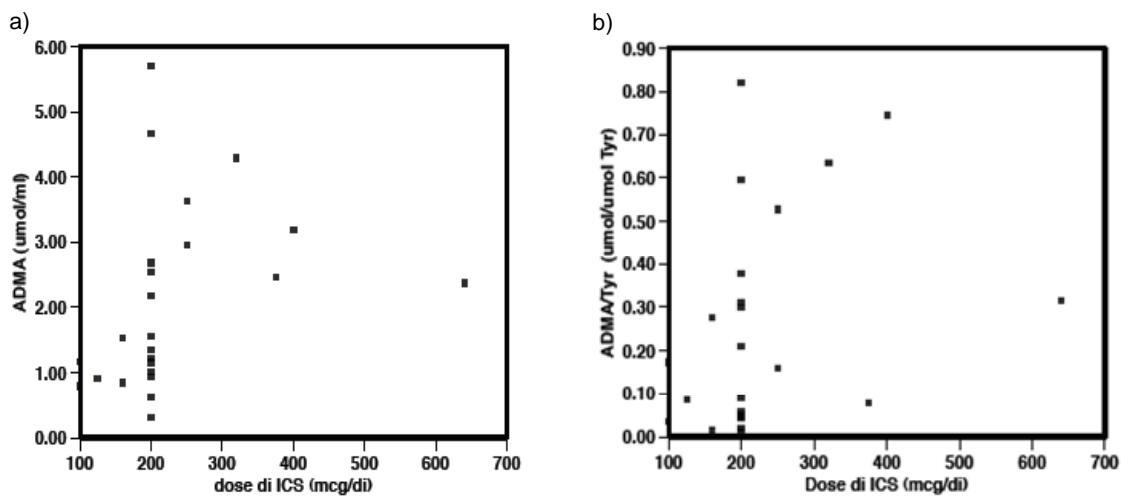


Figura 4.9 Scatter Plot dei valori di ADMA (a) e del rapporto ADMA/Tyr (b) in relazione al dosaggio di ICS

5. DISCUSSIONE

Le arginine metilate, e in particolare la dimetilarginina asimmetrica (ADMA), hanno suscitato un crescente interesse negli ultimi anni, in qualità di markers di rischio cardiovascolare e di stress ossidativo e possibili effettori di danno endoteliale in numerose malattie acute e croniche dell'età adulta [30-38]; si tratta di molecole in grado di esercitare importanti effetti biologici, soprattutto in relazione alla loro attività di inibizione competitiva dell'enzima NOS, e quindi come antagonisti delle numerose funzioni dell'ossido nitrico [7-9].

L'ADMA è stata pertanto studiata nel corso degli anni in popolazioni adulte sane e patologiche mediante l'uso di diverse metodiche analitiche per determinarne la concentrazione in matrici comunemente utilizzate tra cui plasma e urine, ma non esistono dati in letteratura che ne riportino le concentrazioni sul condensato dell'aria espirata. Inoltre, in ambito pediatrico i dati sono ancora molto esigui e al momento, pochi sono gli studi di determinazione dell'ADMA effettuati in neonati sani e nelle rispettive madri al momento del parto ed in neonati prematuri, su un campione sufficientemente numeroso e con metodi analitici dotati di elevata specificità e sensibilità.

5.1. Considerazioni sullo studio in ambito neonatale

I dati riportati in questa tesi rappresentano la prima esperienza di determinazione longitudinale dei livelli di arginine metilate nel neonato, sia a termine che pretermine, oltre il primo giorno di vita.

I risultati ottenuti suggeriscono che l'ADMA possa svolgere un ruolo nella regolazione dell'emodinamica fetale e nelle prime fasi dell'adattamento postnatale [104], con marcate differenze nelle concentrazioni circolanti di questa sostanza in relazione alle diverse epoche di gravidanza e che, nel neonato pretermine, in relazione alle diverse cause di prematurità, possa essere implicata in patologie come l'ipertensione polmonare persistente, in analogia con quanto avviene nell'ipertensione polmonare in età adulta [105]. Nel contempo, è andato aumentando l'interesse sul ruolo biologico dell'ADMA nel neonato, soprattutto dal momento in cui è stato riportato che nel sangue cordonale di neonati a termine sani questa molecola si trova in concentrazioni molto superiori a quelle del sangue materno [104].

Nel corso di diversi studi, la quantificazione plasmatica di questo metabolita nei neonati, è risultata difficile a causa dell'impossibilità di misurarne la concentrazione senza sottoporre gli stessi a procedure invasive di prelievo, soprattutto nei neonati pretermine di basso peso, in cui il ridotto volume di sangue circolante rende inaccettabile il prelievo di quantità elevate di campione ritenute adeguate per le comuni metodiche di analisi.

Per tale motivo si è ricorsi in alcuni studi alla valutazione dei livelli urinari dell'ADMA, come ad esempio nei casi di ipertensione polmonare neonatale [106], pur sapendo che, date le caratteristiche di catabolismo delle arginine metilate, la concentrazione urinaria di questo metabolita non può essere considerata un affidabile indicatore degli effettivi livelli circolanti dello stesso.

L'applicazione del metodo di analisi in UPLC/MS/MS ha permesso di quantificare l'arginina, l'ADMA e le altre arginine metilate (SDMA e NMMA), con elevate sensibilità e riproducibilità e con l'impiego di ridottissime quantità di siero o plasma (10µl), rendendo pertanto possibile l'applicazione sia su neonati sani sia su neonati prematuri di peso inferiore ai 1000 g, che hanno volumi circolanti di poche decine di mL. Infatti in entrambi i casi sono stati utilizzati i residui di siero prelevati per altri scopi, nel neonato a termine per eseguire le determinazioni routinarie di bilirubinemia ed ematocrito, e nei neonati pretermine per i controlli di emogasanalisi, bilirubinemia o ematocrito. In tal modo è stato possibile eseguire per la prima volta uno studio sequenziale della concentrazione delle arginine metilate nel neonato senza sottoporre i partecipanti allo studio ad alcun prelievo che non fosse già necessario per le normali necessità cliniche.

In prima giornata di vita i bambini nati a termine dopo gravidanza fisiologica hanno presentato elevati livelli circolanti di ADMA, la cui concentrazione è risultata essere circa il doppio rispetto a quella delle popolazioni adulte di riferimento, come confermato in questa tesi con lo stesso metodo di dosaggio, su volontari sani.

I risultati di un lavoro precedentemente riportato in letteratura, ipotizzano che l'ADMA presente ad elevate concentrazioni nel sangue cordonale possa essere il mediatore, grazie alla sua azione di aumento del tono vascolare, degli aggiustamenti emodinamici necessari per il benessere fetale durante lo stress del travaglio e del passaggio attraverso il canale del parto [104]. I nostri dati però non confermano questa interpretazione perchè non esistono differenze nella concentrazione di ADMA tra neonati partoriti con taglio cesareo, in assenza di travaglio, o per via vaginale.

Se l'ADMA ha un ruolo fisiologico nel mediare il tono vascolare nel feto è forse più probabile che eserciti la sua funzione a livello polmonare, dove il mantenimento di resistenze elevate è fondamentale per un'emodinamica fetale fisiologica. Questa ipotesi è sostenuta peraltro da recenti evidenze che l'ADMA circolante è in gran parte derivata da produzione nell'ambito del letto vascolare polmonare [105]. Il ruolo "fetale" dell'ADMA dovrebbe venir meno dopo la nascita, dal momento in cui è necessario, per la transizione circolatoria, che le resistenze vascolari polmonari si riducano rapidamente. Infatti la concentrazione di ADMA nel nostro studio mostra un decremento significativo di circa il 25% entro le prime 72 ore di vita (Fig. 4.1).

Questa riduzione potrebbe derivare, in accordo con dati ottenuti su modelli sperimentali, da un aumento dell'attività degradativa da parte dell'enzima DDAH, che viene espresso maggiormente dopo la nascita, soprattutto in prima giornata di vita, rispetto all'epoca fetale [107] e risulterebbe un fenomeno fondamentale, in epoca di

transizione postnatale, per consentire all'NO di svolgere la sua azione di dilatazione del letto vascolare polmonare [108].

Il pattern di concentrazione delle arginine metilate risulta fundamentalmente differente nel gruppo dei neonati prematuri (ELBW, peso alla nascita <1000 g), studiati sequenzialmente a 1, 3, 5 e a 7 giorni di vita. Rispetto ai neonati a termine questi bambini presentano alla nascita valori significativamente inferiori dell'ADMA e delle altre arginine metilate (Tab. 4.3), e le variazioni sono modeste per tutta la durata della prima settimana di vita (Fig. 4.3). Questi dati suggeriscono che il ruolo fisiologico dell'ADMA sia meno importante nelle epoche fetali precoci rispetto a quanto avviene a termine; il fatto che tutte e tre le molecole metilate siano presenti a concentrazioni ridotte rispetto alle fasi successive di gestazione può far pensare che il meccanismo di metilazione dei residui proteici di arginina (e quindi l'attività dell'enzima PRMT) sia complessivamente meno attivo. Una possibile speculazione è che l'aumento di sintesi dell'ADMA in epoca fetale sia correlata alla maturazione dell'attività della NOS; in altri termini, man mano che aumenta la potenzialità per la produzione di NO con il progredire della maturazione fetale, progressivamente aumenterebbe anche l'attività destinata a tenerla sotto controllo fino alla nascita.

Un dato interessante deriva dall'analisi separata dei sottogruppi di bambini pretermine con e senza storia di corioamnionite. L'esposizione a fenomeni di infiammazione cronica in utero è un evento molto frequente alle età gestazionali più basse e il suo ruolo è probabilmente importante nel determinare fenomeni di maturazione e di priming della risposta infiammatoria a livello polmonare [109]. I neonati con storia di corioamnionite presentano valori di ADMA circolante significativamente più elevati rispetto agli altri neonati ELBW, nati per la maggioranza in seguito a gestosi ipertensiva. E' possibile ipotizzare che tali effetti possano ripercuotersi anche sui meccanismi di produzione di sostanze vasoattive come le arginine metilate, incrementandone i valori come avviene nelle epoche successive di gravidanza. Al contrario, valori particolarmente bassi di ADMA sono stati riscontrati in prima giornata di vita nei neonati da madri con preeclampsia, condizione in cui è stata segnalata una possibile disfunzione della compartimentazione dell'ADMA a livello placentare. E' interessante notare come in questo gruppo di bambini l'ADMA aumenti significativamente nei giorni successivi alla nascita, portandosi ai livelli rilevati negli altri neonati.

Nessuna differenza significativa è risultata dall'analisi dei valori delle arginine metilate in relazione ad eventi potenzialmente in grado di modificarne le concentrazioni, come la persistenza della pervietà del dotto arterioso e la sepsi. Anche la displasia broncopolmonare non risulta correlata con le concentrazioni alla nascita delle arginine metilate, nè differenze sono state evidenziate nella loro cinetica tra bambini con o senza la malattia. E' possibile comunque che l'influenza di questi fattori possa essere stata sottostimata a causa della ridotta numerosità del campione studiato. Per la definizione della cinetica e per la valutazione del loro ruolo potenziale delle arginine

metilate in queste condizioni sono necessari studi specifici su popolazioni maggiormente selezionate.

5.2.Considerazioni sui dati ottenuti da soggetti in età adulta

La cardiopatia ischemica rappresenta la prima causa di mortalità e morbilità nei paesi industrializzati; essa è sinonimo di patologia coronarica, perché quasi sempre l'ischemia del muscolo cardiaco è il risultato dell'ostruzione del lume dei vasi coronarici dovuta a placche aterosclerotiche. Quando le lesioni ateromatose provocano una stenosi maggiore del 50% del diametro vasale si osserva una riduzione del flusso sanguigno coronarico che determina ipossia del muscolo cardiaco; lo stesso si verifica quando si realizza un danno della placca con conseguente formazione di trombi. L'ossido nitrico (NO) è coinvolto in una vasta gamma di meccanismi regolatori del sistema cardiovascolare: esso media la vasodilatazione endotelio-dipendente, inibisce la proliferazione delle cellule muscolari lisce, l'aggregazione piastrinica e dei leucociti, l'adesione dei monociti, l'ossidazione delle LDL e inibisce la formazione dei radicali liberi [110-113]. Una scarsa biodisponibilità di questo mediatore è causa di disfunzione endoteliale e questo gioca un ruolo centrale nel processo delle malattie cardiovascolari.

L'aumento dei livelli di ADMA riscontrato in questo studio nei soggetti con patologie cardiache legate a danno endoteliale NO-dipendente, rispetto ai soggetti sani di controllo è consistente con i numerosi dati forniti dalla letteratura [31-33,35] dimostrando che le concentrazioni di ADMA rilevabili in questo tipo di disfunzioni possono essere associate a problematiche cardiovascolari di ordine maggiore, anche in presenza di normali livelli circolanti di arginina.

In uno studio effettuato su pazienti ad alto rischio cardiovascolare, sono stati osservati ridotti valori di RFC (valutazione della riserva di flusso coronarico) in associazione ad elevati livelli plasmatici di ADMA, indicando come la disfunzione endoteliale sia presente negli stadi più precoci di aterosclerosi, quando non sono ancora evidenti manifestazioni cliniche di cardiopatia ischemica, ma è già presente la compromissione del microcircolo coronarico [35].

Il dosaggio dell'ADMA risulterebbe essere in questo contesto, di grande importanza non solo nella diagnosi di malattia, ma ancor di più nell'identificazione del grado di rischio nella manifestazione di eventuali complicazioni cardiovascolari e quindi in un peggioramento del quadro clinico del paziente, consentendo inoltre di individuare i pazienti a maggior rischio in cui è auspicabile intraprendere una terapia cardiovascolare più aggressiva e di monitorare nel tempo gli effetti farmacologici sull'emodinamica coronarica al fine di poter pianificare interventi mirati volti a modificare il decorso della patologia fin dalle fasi precoci.

Recentemente sono emersi alcuni dati sull'efficacia di alcuni farmaci comunemente utilizzati nell'ambito della terapia cardiovascolare nel migliorare la disfunzione endoteliale. In particolare, è stato dimostrato l'effetto protettivo delle

statine sull'endotelio vascolare secondario all'induzione dell'ossido nitrico sintetasi, enzima che gioca un ruolo chiave nella patogenesi della disfunzione endoteliale [114].

Recenti evidenze dimostrano come l'insulino-resistenza giochi un ruolo importante nel determinare la riduzione della performance cardiovascolare. È stata dimostrata la presenza di una cardiomiopatia diabetica e anche di una cardiomiopatia da insulino-resistenza sulla base di alterazioni cardiovascolari fini, precoci, subcliniche.

Studi epidemiologici e clinici hanno confermato, almeno in parte, gli studi sperimentali identificando un nesso fra la condizione di insulino-resistenza, le alterazioni della funzione endoteliale e quelle morfo-funzionali del ventricolo sinistro, con la possibilità di un'evoluzione fino all'insufficienza cardiaca [115,116] Esiste un'intrigante relazione tra resistenza insulinica e ADMA: i livelli di questo metabolita aumentano nei soggetti insulino-resistenti indipendentemente dall'ipertensione e il trattamento farmacologico volto al miglioramento della sensibilità insulinica riduce la concentrazione di ADMA.

In questo contesto, l'ADMA risulterebbe strettamente correlata alle dirette conseguenze vascolari e cardiache del dismetabolismo glucidico, nella sua fase preclinica ed in quella conclamata di malattia diabetica.

La disfunzione endoteliale dovuta ad una riduzione dell'attività della NOS è un comune aspetto nei pazienti diabetici e gioca un ruolo fondamentale nelle complicazioni vascolari della patogenesi diabetica [47]. Inoltre, nei diabetici, spesso si osserva una riduzione nella concentrazione di L-arginina che se associata ad un aumento dei livelli di ADMA porta alla diminuzione del rapporto L-arginina/ ADMA e quindi alla riduzione dell'attività della NOS sia per la presenza dell'inibitore che alla deficienza del substrato.

Numerosi lavori hanno evidenziato che ogni fattore, stato patologico o alterazione metabolica che conduce o si associa ad un aumento dello stress ossidativo (infiammazione, iperomocitemia, iperglicemia, agenti infettivi, LDL ossidate) può ridurre l'attività del DDAH e permettere all'ADMA di accumularsi e coinvolgere l'endotelio vascolare [36]. Studi in vitro ed in vivo hanno mostrato che l'aumento dello stress ossidativo nel diabete sia in relazione con l'aumento di ADMA. Ad esempio, nei ratti diabetici si è osservato che i livelli plasmatici di ADMA sono più alti rispetto ai ratti controllo e che questo fatto è in relazione con l'attività del DDAH.

Analoga osservazione si ha nell'attività e l'espressione del DDAH in cellule muscolari lisce vascolari di ratto incubate in condizioni di normale o alto glucosio dove l'alto glucosio non modifica l'espressione del DDAH ma ne riduce significativamente l'attività. La conferma del ruolo dello stress ossidativo associato all'iperglicemia nel regolare i livelli di ADMA viene dagli stessi autori che avevano esposto colture di una linea cellulare endoteliale umana a normale glucosio, a glucosio e mannosio (controllo osmotico), ad alto glucosio ed alto glucosio in presenza di un antiossidante. Essi avevano quindi notato che l'attività del DDAH era ridotta nelle cellule coltivate in presenza di alto glucosio e che la presenza di un antiossidante ne preservava l'attività, supportando l'ipotesi che l'attività del DDAH può essere danneggiata da stress

ossidativo indotto da glucosio. Questo ripristino dell'attività del DDAH è associato quindi anche ad un corrispondente riduzione di ADMA endoteliale [36]. Negli'ultimi anni è aumentato l'interesse attorno alla possibilità della modulazione dell'ADMA con la terapia farmacologica e come questa possa contribuire ad una maggiore biodisponibilità di NO e al miglioramento della funzionalità vascolare.

Nel nostro studio, i dati ottenuti su pazienti iperglicemici dimostrano una significativa diminuzione dei livelli di ADMA rispetto agli adulti di controllo, al contrario dei dati riportati in letteratura. Questo potrebbe essere spiegato dal fatto che il miglioramento del controllo glicemico in questi pazienti diabetici potrebbe essere in grado di ridurre i livelli di ADMA. In effetti è stata osservata una riduzione della concentrazione di ADMA in associazione con il miglioramento del controllo glicemico in pazienti con diabete di tipo 2 ed in pazienti iperglicemici trattati con metformina la diminuzione è simile se usata in monoterapia o in combinazione con sulfanilurea [117].

Il controllo metabolico può venire anche da una corretta attività fisica. Gli elevati livelli di ADMA dei diabetici di tipo 1, che sono ad alto rischio di sviluppare malattia cardiovascolare, possono essere ridotti a quelli dei soggetti sani con il regolare esercizio fisico. Questo effetto favorevole su l'ADMA non è mantenuto quando si interrompe l'attività fisica.

Le nostre osservazioni, a causa della bassa numerosità dei soggetti analizzati, non permettono ancora di formulare ipotesi definitive sull'effettivo ruolo biologico dell'ADMA nella patogenesi e nell'evoluzione delle malattie cardiovascolari, sebbene i risultati suggeriscano la possibilità di individuare precocemente quei pazienti in cui è necessario uno stretto controllo dei fattori di rischio cardiovascolare ed un intervento terapeutico più aggressivo, utilizzando un metodo analitico preciso e robusto che permette la quantificazione dei marker diagnostici su ridotte quantità di campione biologico.

5.3.Considerazioni sulle donne in gravidanza normale e affette da pre-eclampsia

Recentemente, eccessivi livelli di ADMA circolanti sono stati correlati all'insorgenza di pre-eclampsia, patologia della gravidanza che rappresenta una delle principali cause di prematurità; l'ADMA sarebbe responsabile, proprio attraverso l'inibizione dell'azione regolatrice sul tono vascolare propria dell'NO, dell'ipertensione e del danno endoteliale che caratterizza questa patologia [38]. Questa sindrome si presenta come un disordine multisistemico caratterizzato da elevata pressione sanguigna, edema e proteinuria, che ha origine in epoca gestazionale precocissima, ma con segni clinici e sintomi che si manifestano solo in uno stadio più tardivo della gravidanza (verso il terzo trimestre). Essa rappresenta a tutt'oggi una delle maggiori cause di morbilità e mortalità sia materna che fetale il cui esito è altamente condizionato dalla tempestività dell'intervento medico, per questo motivo risulta fondamentale il riconoscimento precoce della malattia e l'identificazione delle donne ad alto rischio.

In questo ambito, diversi studi hanno dimostrato che i livelli di ADMA nelle donne in gravidanza con decorso normale sono confrontabili rispetto alla popolazione femminile sana, mentre risultano significativamente aumentati nelle donne con pre-eclampsia anche prima che siano evidenti i sintomi clinici della patologia [118].

In questa tesi è stata dapprima valutata la distribuzione delle donne in gravidanza con decorso normale ottenendo un incremento significativo delle concentrazioni di ADMA rispetto alla popolazione sana di riferimento, durante tutto il periodo gestazionale a partire dal I trimestre fino al termine della gravidanza con una normalizzazione dei valori solo a 30 giorni dal parto.

Il confronto tra la concentrazione dei vari metaboliti analizzati nelle donne gravide sane e nelle gravide con pre-eclampsia, ha invece evidenziato che la concentrazione di ADMA al momento del ricovero risulta significativamente più bassa nelle gravide ipertese rispetto alle gravide normotese, contrariamente a quanto riportato in letteratura, mentre a 30 giorni di distanza dal parto la situazione si inverte e la concentrazione di ADMA risulta significativamente più elevata nelle donne precedentemente affette da pre-eclampsia rispetto ai controlli. Queste osservazioni si avvicinano ai dati ottenuti da Maas e coll. su 62 donne colombiane affette da pre-eclampsia i cui valori di ADMA non differiscono dal gruppo di controllo [121], analogamente a quanto riscontrato su un altro studio effettuato da Kim e coll. sia nelle concentrazioni di ADMA che di SDMA e del rapporto ADMA/SDMA nei due gruppi di donne presi in esame [122].

Infine Siroen e coll. in uno studio condotto su 16 pazienti con pre-eclampsia e 7 pazienti con sindrome HELLP concludono che non vi sono differenze significative nella concentrazione di ADMA fra le pazienti normotese e le pre-eclamptiche, mentre questa risulterebbe correlata alla disfunzione d'organo (fegato e rene) presente nella sindrome HELLP [123].

Il significato dei dati riportati in questa tesi non è chiaro e potrebbe essere inficiato dalla bassa numerosità dei due gruppi di pazienti analizzati. E' inoltre possibile che ci siano delle interferenze sul dosaggio legate all'impiego di farmaci anti-ipertensivi, correntemente assunti dalle donne con pre-eclampsia durante la gravidanza. Una volta sospesa la terapia, pertanto, i livelli di ADMA aumenterebbero significativamente, indicando una possibile persistenza di alterazioni a livello endoteliale. Tra i metaboliti analizzati, la concentrazione di arginina è risultata essere sempre inferiore nelle donne pre-eclamptiche rispetto ai controlli, dal momento del ricovero fino al trentesimo giorno dopo il parto, anche se la differenza è risultata statisticamente significativa solo a distanza di 24 ore dopo il parto. Questo dato è in accordo con quanto rilevato da Záhúmský e coll. che evidenziano un miglioramento clinico nelle donne pre-eclamptiche supplementate con L-arginina [124]. Tuttavia, le valutazioni relative ai dati ottenuti in questa tesi sono da considerarsi preliminari e andranno confermate, allo scopo di precisare il ruolo patogenetico dell'ADMA e dei biomarkers di stress ossidativo nella genesi e nella progressione della pre-eclampsia, su una coorte di donne gravide all'esordio della sintomatologia clinica e longitudinalmente

fino al momento del parto per correlarne le eventuali variazioni a parametri clinici e laboratoristici di gravità della patologia in atto, come l'ipertensione, la proteinuria e la funzionalità placentare.

5.4. Considerazioni sullo studio nei bambini asmatici

L'idea di utilizzare il condensato dell'aria espirata per monitorare diversi biomarker di stress ossidativo è legata allo studio dei processi patologici a carico delle vie respiratorie, partendo dall'idea che sia l'ADMA che la nitrotirosina possano essere associate alla patogenesi di alcune malattie respiratorie tra cui l'asma e la fibrosi cistica, poichè, promuovendo lo stress ossidativo e l'iperreattività delle vie respiratorie, contribuiscono ad aggravare lo stato infiammatorio delle vie aeree [50,51].

Sebbene le tecniche di raccolta e analisi dell'EBC non siano ancora completamente standardizzate, questa metodica presenta molti vantaggi: è completamente non invasiva, facile da eseguire soprattutto in ambito pediatrico, richiede un breve tempo di attuazione ed è ideale per il dosaggio di composti non volatili o a bassa volatilità, biomarkers di infiammazione e stress ossidativo, prodotti dalle cellule delle vie aeree.

In questo studio, sulla base del metodo analitico UPLC/MS/MS precedentemente messo a punto nel nostro laboratorio [102], è stata realizzata una tecnica di arricchimento on-line allo scopo di aggirare le notevoli difficoltà che comporta l'utilizzo del condensato dell'aria espirata quale matrice in termini di basse concentrazioni degli analiti in essa presenti. Utilizzando un autocampionatore robotizzato il campione prelevato viene dapprima iniettato e concentrato all'interno di una cartuccia C18 e successivamente eluito all'interno della colonna cromatografica per ottenere la separazione degli analiti. Il procedimento di arricchimento consente di lavorare con una quantità di campione iniziale, sia al momento della preparazione che al momento dell'iniezione, superiore rispetto al volume che viene poi eluito in colonna e successivamente analizzato dallo spettrometro di massa, garantendo pertanto eccellenti prestazioni analitiche del sistema UPLC/MS/MS, in termini di sensibilità e riproducibilità nel dosaggio dei metaboliti d'interesse.

La validazione ha portato a ottimi risultati (Tab. 4.4) dimostrando precisione e robustezza della metodica analitica che ha permesso di quantificare l'ADMA e altri marker di stress ossidativo ad essa correlati nell'ambito pediatrico delle malattie respiratorie in bambini sani ed asmatici, per la prima volta nel condensato dell'aria espirata.

Ulteriori vantaggi sono rappresentati dalla semplicità nella preparazione del campione e dai tempi di analisi molto contenuti rispetto ai metodi analitici attualmente presenti in letteratura (Tab. 1.2), risultando pertanto indicato per scopi di tipo chimico-clinici in laboratori di analisi.

L'impiego della diluizione isotopica è stato importante per il dosaggio dei metaboliti in questione poichè le loro concentrazioni sono molto basse a causa della

forte diluizione del condensato in qualità di matrice analizzata. L'utilizzo degli standard interni marcati, per ciascun metabolita d'interesse, ha aumentato la co-estrazione degli analiti e quindi migliorato il rapporto segnale/rumore.

Inoltre non sono state evidenziate interferenze per la determinazione quantitativa dei due isomeri ADMA e SDMA che sono stati monitorati, dal punto di vista dell'analisi di massa, sia per lo ione frammento specifico che per quello comune.

In questa tesi sono stati studiati i valori di ADMA nel condensato dell'aria espirata (EBC) di due gruppi di bambini: un gruppo costituito da bambini asmatici in buon controllo e un gruppo di controllo composto da soggetti sani.

Si tratta del primo studio nel quale ADMA è stato dosato nel condensato dell'aria espirata. I dosaggi di ADMA sono risultati significativamente più elevati nel condensato dei bambini asmatici rispetto a quelli del gruppo di controllo.

Nel confronto tra gruppi, il nostro studio ha permesso di evidenziare valori di ADMA più elevati nell'EBC dei soggetti asmatici rispetto ai sani. Alcuni studi precedenti, condotti principalmente su modelli murini, hanno valutato il ruolo di ADMA nelle malattie respiratorie, supportati anche dal fatto che il tessuto polmonare è il sito principale del metabolismo dei residui metilati di L-arginina e quindi contribuisce in maniera significativa ai livelli di ADMA in circolo [125].

Studi recenti compiuti finora su modelli murini hanno suggerito un ruolo di ADMA nella patogenesi dell'asma. In primo luogo, le evidenze in letteratura dimostrano che ADMA può contribuire allo stress ossidativo. Wells et al. hanno osservato che la somministrazione di ADMA in una linea di cellule di topo determina quello che gli autori definiscono un disaccoppiamento dell'attività della ossido nitrico sintetasi (NOS) provocando da un lato l'inibizione dell'accumulo di nitriti in modo dose-dipendente, dall'altro un rapido incremento di O_2^- che, combinandosi con NO per formare perossinitrito $ONOO^-$, importante mediatore di danno e disfunzione cellulare, porterebbe ad un incremento di stress ossidativo [126].

Queste osservazioni suggeriscono un ruolo di ADMA nella produzione di molecole coinvolte nel danno infiammatorio nelle vie aeree quali i radicali dell'ossigeno e dell'azoto (ROS e RNS, rispettivamente).

ADMA sembra inoltre favorire la risposta infiammatoria delle vie aeree. Lo studio di Klein e coll. ha dimostrato che l'infusione di ADMA in topi precedentemente sensibilizzati con ovalbumina aumenta l'infiltrato cellulare determinato nel BAL (Bronchoalveolar Lavage) rispetto al gruppo che ha ricevuto un'infusione di soluzione salina [127]. Anche lo studio istologico delle biopsie polmonari di questi topi conferma l'aumento dello stato infiammatorio sia nelle vie aeree che negli spazi alveolari in seguito all'infusione di ADMA. Queste evidenze dimostrano l'esistenza di un'associazione in vivo tra i livelli endogeni di ADMA e l'infiammazione scatenata da una risposta allergica. Un'ulteriore prova a favore del ruolo di ADMA nell'infiammazione delle vie aeree nell'asma allergico deriva dal fatto che nel BAL di topi che sovraesprimono DDAH1, enzima responsabile della maggior parte del metabolismo di ADMA, è stata individuata una riduzione nel numero di eosinofili e

neutrofili. Questo risultato osservato da Klein et al. suggerisce che l'aumentato metabolismo di ADMA si associa a una riduzione della risposta infiammatoria nelle vie aeree. Lo studio di Klein [127] mette in luce un'osservazione interessante secondo cui l'incremento dello stato infiammatorio in risposta ad elevati livelli di ADMA è associato all'aumento dell'espressione della forma inducibile di NOS, sebbene sia comunemente riconosciuto come inibitore competitivo di NOS. Per risolvere questa apparente contraddizione, Klein et al. hanno ipotizzato, sulla base di precedenti studi [126], un modello secondo cui ADMA inibisce l'attività della forma costitutiva di NOS e la disaccoppia, favorendo la formazione di O_2^- e $ONOO^-$, che a loro volta possono mediare un aumento dell'espressione della forma inducibile di NOS (iNOS). ADMA pertanto contribuirebbe alla risposta infiammatoria a livello polmonare anche mediante l'aumento dell'espressione di iNOS e l'inibizione delle isoforme costitutive [127].

E' stata dimostrata anche una relazione tra ADMA e iperreattività delle vie aeree. Scott e coll. hanno dimostrato che modelli murini di asma allergico esprimono elevati livelli di ADMA nel tessuto polmonare. Inoltre, la somministrazione di ADMA in forma nebulizzata in topi naive determina iperreattività delle vie aeree al test della metacolina e alterazione della funzione polmonare, come dimostrato dall'aumento delle resistenze polmonari [34]. Anche Wells e colleghi avevano osservato che ADMA in dosi crescenti determinava un aumento della resistenze e una riduzione della compliance dinamica in risposta al test di scatenamento con metacolina. Il dato interessante che emerge da questo studio è che queste alterazioni funzionali si accompagnano a un'aumentata deposizione di collagene a livello della matrice extracellulare (ECM). Dal momento che alterazioni a carico della ECM contribuiscono al fenomeno del remodeling delle vie aeree, un aumento dei livelli endogeni di ADMA potrebbe essere determinante nelle modificazioni funzionali ma anche strutturali di molte patologie respiratorie, tra cui l'asma e la fibrosi polmonare [57].

Nonostante le evidenze finora riportate derivino da studi su modelli murini, il lavoro di Scott per la prima volta ha riportato un aumento dei livelli di ADMA nell'espettorato di bambini asmatici di età compresa fra gli 8 e i 16 anni rispetto ai controlli. Un analogo risultato, pur non raggiungendo la significatività statistica, è stato osservato su campioni di tessuto polmonare proveniente da individui asmatici adulti deceduti per stato asmatico [34].

La metodica ha dimostrato avere una buona riproducibilità intrasoggetto e nel confronto tra i gruppi dei soggetti arruolati si è evidenziato un significativo incremento dell'ADMA nei bambini asmatici rispetto ai sani, confermando quanto i modelli murini e i dati di Scott et al. avevano suggerito riguardo il possibile ruolo di questo metabolita nella patogenesi dell'asma [34]. Non si sono riscontrate correlazioni tra i valori di ADMA e i parametri spirometrici in nessuno dei due gruppi studiati. È possibile che questo risultato dipenda dal fatto che tutti i bambini asmatici coinvolti nello studio avevano un asma in buon controllo (anche se con diversi dosaggi di steroide inalatorio), con parametri spirometrici sostanzialmente normali. A tal proposito, potrebbe essere

utile in studi futuri valutare l'ADMA in pazienti con asma grave e parametri spirometrici ridotti.

Un dato interessante è invece la correlazione emersa tra concentrazioni di ADMA e dosaggio dei farmaci corticosteroidi inalatori (ICS) utilizzati dai bambini. Tale evidenza potrebbe indicare che quanto più è difficile il controllo farmacologico, e quindi quanto maggiore è il dosaggio di ICS necessario a mantenere il controllo della malattia, tanto più alti sono i livelli di ADMA. Questo metabolita potrebbe quindi rappresentare un nuovo marker di severità della malattia asmatica, facilmente dosabile nell'EBC, che in quanto "biofluido d'organo", nello studio dell'infiammazione polmonare e dello stress ossidativo è risultato qualitativamente più utilizzabile dell'urina, la cui composizione è inevitabilmente influenzata dal metabolismo dell'intero organismo [128].

6. CONCLUSIONI

Il metodo sviluppato in questo studio soddisfa i requisiti analitici di precisione, riproducibilità, specificità, sensibilità e recupero analitico indispensabili per l'impiego in ambito clinico. Esso inoltre è facilmente automatizzabile e risulta essere adatto per il suo utilizzo su una larga serie di campioni, consentendo l'applicazione a livello laboratoristico, in qualità di metodo diagnostico nell'ambito delle patologie da stress ossidativo e da disfunzione endoteliale NO-dipendente e delle malattie cardiovascolari.

L'uso di una quantità esigua di campione necessario per l'analisi inoltre, lo rende particolarmente appropriato per l'impiego in ambito neonatale, creando le basi per sviluppi futuri ai fini di valutare la rilevanza clinica del monitoraggio dell'ADMA e dei metaboliti ad essa correlati nelle diverse patologie del neonato prematuro come la sepsi, l'ipertensione polmonare e lo scompenso cardiaco.

Infine, questo rappresenta il primo studio che dimostra la fattibilità del dosaggio dell'ADMA e dei biomarker di stress ossidativo nel condensato dell'aria espirata.

Da ricerche effettuate nella presente letteratura emerge che fino ad ora l'ADMA è stato infatti dosato in vari biofluidi tra cui siero, plasma, urine, BAL (broncolavaggio alveolare), in vari tipi di tessuti e nell'espettorato indotto. D'altro canto lo studio di biofluidi "sistemici" quali urina e sangue, raccolti in modo sostanzialmente non invasivo, può essere meno informativo sui processi patologici polmonari rispetto a un biofluido d'organo quale è stato definito l'EBC.

I dati preliminari riportati in questa tesi, presentando risultati concordanti con i lavori precedentemente pubblicati che hanno dimostrato un aumento di ADMA nell'asma in altre matrici biologiche, pongono i presupposti per estendere la casistica al fine di confermare il suo possibile ruolo come biomarker nell'infiammazione asmatica e come possibile target di nuovi approcci farmacologici, ed estendere l'applicazione allo studio di altre patologie respiratorie, in cui questo metabolita sembra essere coinvolto, tra cui la broncopneumopatia cronico-ostruttiva (BPCO), la fibrosi cistica e le malattie polmonari acute e croniche.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Sies H.J. **Role of reactive oxygen species in biological processes.** *Klin Wochenschr* 1991, 69(21-23):965-8.
2. Irani K. **Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling.** *Circ Res.* 2000, 87(3):179-83.
3. Descamps-Latscha B, Drüeke T, Witko-Sarsat V. **Dialysis-induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences, and therapy.** *Semin Dial.* 2001, 14(3):193-9.
4. Davis KL, Martin E, Turko IV, Murad F. **Novel effects of nitric oxide.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001, 41:203-36.
5. Chandra J, Samali A, Orrenius S. **Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress.** *Free Radic Biol Med.* 2000, 29(3-4):323-33.
6. Finkel T, Holbrook NJ. **Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.** *Nature.* 2000, 408(6809):239-47.
7. Wink DA, Mitchell JB. **Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide.** *Free Radic Biol Med.* 1998, 25(4-5):434-56.
8. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. **Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition.** *Biochem J.* 2001, 357(Pt 3):593-615.
9. Carreras MC, Poderoso JJ. **Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses.** *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007, 292(5):C1569-80.
10. Martens-Lobenhoffer, S. M. Bode-Bogher. **Chromatographic-mass spectrometric methods for the quantification of L-arginine and its methylated metabolites in biological fluids.** *Journal of Chromatography* 2007; 851: 30-41
11. Kuo RC, Baxter GT, Thompson SH, Stricker SA, Patton C, Bonaventura J, Epel D. **NO is necessary and sufficient for egg activation at fertilization.** *Nature* 2000, 406:633-6.
12. Wingrove JA, O'Farrell PH. **Nitric oxide contributes to behavioral, cellular, and developmental responses to low oxygen in Drosophila.** *Cell.* 1999, 98(1):105-14.
13. Zago AS, Zanesco A. **Nitric oxide, cardiovascular disease and physical exercise.** *Arq Bras Cardiol.* 2006, 87(6):e264-70.
14. Cengel A, Sahinarslan A. **Nitric oxide and cardiovascular system.** *Anadolu Kardiyol Derg.* 2006, 6(4):364-8.
15. Kleinbongard P, Keymel S, Kelm M. **New functional aspects of the L-arginine-nitric oxide metabolism within the circulating blood.** *Thromb Haemost.* 2007, 98(5):970-4.
16. Feletou M, Tang EH, Vanhoutte PM. **Nitric oxide the gatekeeper of endothelial vasomotor control.** *Front Biosci.* 2008, 13:4198-217.
17. Garthwaite J. **Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission.** *Eur J Neurosci.* 2008, 27(11):2783-802.

18. Giuffrè A, Barone MC, Brunori M, D'Itri E, Ludwig B, Malatesta F, Müller HW, Sarti P. **Nitric oxide reacts with the single-electron reduced active site of cytochrome c oxidase.** *J Biol Chem.* 2002, 277(25):22402-6.
19. Kim S, Ponka P. **Role of nitric oxide in cellular iron metabolism.** *Biometals.* 2003, 16(1):125-35.
20. Turk T, Hollocher TC. **Oxidation of dithiothreitol during turnover of nitric oxide reductase: evidence for generation of nitroxyl with the enzyme from *Paracoccus denitrificans*.** *Biochem Biophys Res Commun.* 1992, 183(3):983-8.
21. Fabbri F, Brigliadori G, Ulivi P, Tesei A, Vannini I, Rosetti M, Bravaccini S, Amadori D, Bolla M, Zoli W. **Pro-apoptotic effect of a nitric oxide-donating NSAID, NCX 4040, on bladder carcinoma cells.** *Apoptosis.* 2005, 10(5):1095-103.
22. Yung HW, Bal-Price AK, Brown GC, Tolkovsky AM. **Nitric oxide-induced cell death of cerebrocortical murine astrocytes is mediated through p53- and Bax-dependent pathways.** *J Neurochem.* 2004, 89(4):812-21.
23. Albina JE, Mastrofrancesco B. **Modulation of glucose metabolism in macrophages by products of nitric oxide synthase.** *Am J Physiol.* 1993, 264(6 Pt 1):C1594-9.
24. Fleming I, Busse R. **Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003, 284(1):R1-12.
25. Bellamy TC, Wood J, Goodwin DA, Garthwaite J. **Rapid desensitization of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, underlies diversity of cellular cGMP responses.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000, 97(6):2928-33.
26. Huang TC, Lu KT, Wo YY, Wu YJ, Yang YL. **Resveratrol Protects Rats from A β -induced Neurotoxicity by the Reduction of iNOS Expression and Lipid Peroxidation.** *PLoS One.* 2011, 6(12).
27. Kamper M, Tsimpoukidi O, Chatzigeorgiou A, Lymberi M, Kamper EF. **The antioxidant effect of angiotensin II receptor blocker, losartan, in streptozotocin-induced diabetic rats.** *Transl Res.* 2010, 156(1):26-36.
28. R. H. Böger, P. Vallance, J. P. Cooke. **Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a key regulator of nitric oxide synthase.** *Atherosclerosis Supplements* 2003; 4: 1-3.
29. R. H. Böger. **The Pharmacodynamics of L-Arginine.** *The Journal of Nutrition* 2007; 137: 1650S-1655S.
30. J. P. Cooke. **Asymmetrical dimethylarginine the über marker?** *Circulation* 2004; 109:1813-1819.
31. S. M. Bode-Bogher, F. Scalera, J. T. Kielstein, J. Martens-Lobenhoffer, G. Breithardt, M. Fobker, H. Reinecke. **Symmetrical Dimethylarginine: a new combined parameter for renal function and extent of coronary artery disease.** *Journal Am. Soc. Nephrol.* 2006; 17: 1128-1134.
32. R. H. Böger, C. Zoccali. **ADMA: a novel risk factor that explains excess cardiovascular event rate in patient with end-stage renal disease.** *Atherosclerosis Supplements* 2003; 4: 23-28.
33. R. H. Böger. **The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor.** *Review. Cardiovascular Research* 2003; 59: 824-833.

34. Scott JA, North ML, Rafii M, Huang H, Pencharz P, Subbarao P, Belik J, Grasemann H Am **Asymmetric dimethylarginine is increased in asthma.** J Respir Crit Care Med. 2011, 184(7):779-85.
35. R. H. Böger. **Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the “L-arginine paradox” and acts as a novel cardiovascular risk factor.** Symposium on Arginine on April 5-6 2004 in Bermuda.
36. H. Y. Xin, D. J. Jiang, S. J. Jia, K. Song, G. P. Wang, Y. J. Li, F. P. Chen. **Regulation by DDAH/ADMA pathway of lipopolysaccharide-induced tissue factor expression in endothelial cells.** Thromb. Haemost. 2007; 97: 830-838
37. P. Vallance, J. Leiper. **Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine: dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway.** Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2004; 24:1-9
38. M. D. Savvidou, A. D. Hingorani, D. Tsikas, J. C. Frölich, P. Vallance, K. H. Nicolaidis. **Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia.** The Lancet 2003; 361: 1511-1517
39. D. E. L. Wilchen, A. S. Sim, J. Wang, X. L. Wang. **Asymmetric dimethyl arginine (ADMA) in vascular, renal and hepatic disease and the regulatory role of L-arginine on its metabolism.** Molecular and Genetics Metabolism 2007; 91 :309-317
40. R. J. Nijveldt, M. P. C. Siroen, T. Teerlink, P. A. M. van Leeuwen. **Elimination of asymmetric dimethylarginine by the kidney and the liver: A link to the development of multiple organ failure?** Symposium on Arginine on April 5-6 2004 in Bermuda.
41. Barceló A, de la Peña M, Ayllón O, Vega-Agapito MV, Piérola J, Pérez G, González C, Alonso A, Agustí AG. **Increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine and soluble CD40 ligand in patients with sleep apnea.** Respiration. 2009, 77(1):85-90.
42. Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, MacAllister R, Vallance P. **Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase.** Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003, 23(8):1455-9.
43. Böger RH, Bode-Böger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, Frölich JC. **Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease.** Circulation. 1997, 95(8):2068-74.
44. S. W. Bae, M. C. Stühlinger, H. S. Yoo, K. H. Yu, H. K. Park, B. Y. Choi, Y. S. Lee, O. Pachinger, Y. H. Choi, S. H. Lee, J. E. Park. **Plasma asymmetric dimethylarginine concentrations in newly diagnosed patients with acute myocardial infarction or unstable angina pectoris during two weeks of medical treatment.** The American Journal of Cardiology 2005; 95: 729-733.
45. VP. Valkonen, J. Laakso, H. Päivä, T. Lehtimäki, T. A. Lakka, M. Isomustajärvi, I. Ruokonen, J. T. Salonen, R. Laaksonen. **Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) and risk of acute coronary events. Does statin treatment influence plasma ADMA levels?** Atherosclerosis Supplements 2003; 4: 19-22.

46. Testa, B. Spoto, G. Tripepi, F. Mallamaci, L. Malatino, P. Fatuzzo, R. Maas, R. Boeger, C. Zoccali. **The GLU298ASP variant of nitric oxide synthase interacts with asymmetric dimethyl arginine in determination cardiovascular mortality in patients with end-stage renal disease.** *Journal of hypertension* 2005; 23 :1825-1830.
47. Can A, Bekpinar S, Gurdol F, Tutuncu Y, Unlucerci Y, Dinccag **Dimethylarginines in patients with type 2 diabetes mellitus: relation with the glycaemic control.** *Diabetes Res Clin Pract.* 2011, 94(3).
48. N. Groneck P, Götze-Speer B, Oppermann M, Eiffert H, Speer CP. **Association of pulmonary inflammation and increased microvascular permeability during the development of bronchopulmonary dysplasia: a sequential analysis of inflammatory mediators in respiratory fluids of high-risk preterm neonates.** *Pediatrics.* 1994, 93(5):712-8.
49. Auten RL Jr, Mason SN, Tanaka DT, Welty-Wolf K, Whorton MH. **Anti-neutrophil chemokine preserves alveolar development in hyperoxia-exposed newborn rats.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001 Aug;281(2):L336-44.
50. Global Initiative for Asthma. **Pocket Guide For Asthma Management and Prevention in Children.** 2006.
51. Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson G, Smith S, Lampe F, Josephs L, Symington P, O'Toole S, Myint SH, Tyrrell DA, et al. **Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children.** *BMJ.* 1995, 310(6989):1225-9.
52. Global Initiative for Asthma. **Global Strategy for Asthma Management and Prevention.** 2010.
53. Bacharier LB, Boner A, Carlsen KH, Eigenmann PA, Frischer T, Götz M, Helms PJ, Hunt J, Liu A, Papadopoulos N, Platts-Mills T, Pohunek P, Simons FE, Valovirta E, Wahn U, Wildhaber J; European Pediatric Asthma Group. **Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report.** *Allergy.* 2008, 63(1):5-34.
54. Townshend J, Hails S, McKean M. **Diagnosis of asthma in children.** *BMJ.* 2007, 335(7612):198-202.
55. Busse WW, Lemanske RF Jr. **Asthma.** *N Engl J Med.* 2001, 344(5):350-62.
56. Jeffery P. **Inflammation and remodeling in the adult and child with asthma.** *Pediatr Pulmonol Suppl.* 2001;21:3-16.
57. Wells SM, Buford MC, Migliaccio CT, Holian A. **Elevated asymmetric dimethylarginine alters lung function and induces collagen deposition in mice.** *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009, 40(2):179-88.
58. Hunt J. **Exhaled breath condensate: an evolving tool for noninvasive evaluation of lung disease.** *J Allergy Clin Immunol.* 2002, 110(1):28-34.
59. Horváth I, Hunt J, Barnes PJ, Alving K, Antczak A, Baraldi E, Becher G, van Beurden WJ, Corradi M, Dekhuijzen R, Dweik RA, Dwyer T, Effros R, Erzurum S, Gaston B, Gessner C, Greening A, Ho LP, Hohlfeld J, Jöbsis Q, Laskowski D, Loukides S, Marlin D, Montuschi P, Olin AC, Redington AE, Reinhold P, van Rensen EL, Rubinstein I, Silkoff P, Toren K, Vass G, Vogelberg C, Wirtz H; ATS/ERS Task Force on Exhaled Breath Condensate.

- Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions.** Eur Respir J. 2005, 26(3):523-48.
60. Baraldi E, Carraro S. **Exhaled NO and breath condensate.** Paediatr Respir Rev. 2006,7 Suppl 1:S20-2.
61. Moeller A, Franklin P, Hall GL, Horak F Jr, Wildhaber JH, Stick SM. **Measuring exhaled breath condensates in infants.** Pediatr Pulmonol. 2006, 41(2):184-7.
62. Goldoni M, Caglieri A, Andreoli R, Poli D, Manini P, Vettori MV, Corradi M, Mutti A. **Influence of condensation temperature on selected exhaled breath parameters.** BMC Pulm Med. 2005 Sep 1;5:10.
63. Culpitt SV RR. **The measurement of hydrogen peroxide in airway disease.** European respiratory review 1999, 68:246-248.
64. Jobsis Q, Raatgeep HC, Hermans PW, de Jongste JC. **Hydrogen peroxide in exhaled air is increased in stable asthmatic children.** Eur Respir J 1997, 10(3):519-521.
65. Antczak A, Kurmanowska Z, Kasielski M, Nowak D. **Inhaled glucocorticosteroids decrease hydrogen peroxide level in expired air condensate in asthmatic patients.** Respir Med 2000, 94(5):416-421.
66. Sandrini A, Ferreira IM, Gutierrez C, Jardim JR, Zamel N, Chapman KR. **Effect of montelukast on exhaled nitric oxide and nonvolatile markers of inflammation in mild asthma.** Chest 2003, 124(4):1334-1340.
67. Janssen LJ. **Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology.** Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001, 280(6):L1067-82.
68. Baraldi E, Ghiro L, Piovan V, Carraro S, Ciabattani G, Barnes PJ, et al. **Increased exhaled 8-isoprostane in childhood asthma.** Chest 2003, 124(1):25-31.
69. Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattani G, Corradi M, van Rensen L, Geddes DM, et al. **Exhaled 8-isoprostane as a new non-invasive biomarker of oxidative stress in cystic fibrosis.** Thorax 2000, 55(3):205-209.
70. Montuschi P, Collins JV, Ciabattani G, Lazzeri N, Corradi M, Kharitonov SA, et al. **Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers.** Am J Respir Crit Care Med 2000, 162(3 Pt 1):1175-1177.
71. Guatura SB, Martinez JA, Santos Bueno PC, Santos ML. **Increased exhalation of hydrogen peroxide in healthy subjects following cigarette consumption.** Sao Paulo Med J 2000, 118(4):93-98.
72. Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai M, Martin JC, Smith CD, et al. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. Arch Biochem Biophys 1992 Nov 1;298(2):431-437.
73. Baraldi E, Giordano G, Pasquale MF, Carraro S, Mardegan A, Bonetto G, et al. **3-Nitrotyrosine, a marker of nitrosative stress, is increased in breath condensate of allergic asthmatic children.** Allergy 2006, 61(1):90-96.)
74. Hanazawa T, Kharitonov SA, Barnes PJ. **Increased nitrotyrosine in exhaled breath condensate of patients with asthma.** Am J Respir Crit Care Med 2000, 162(4 Pt 1):1273-1276.

75. Hunt J, Byrns RE, Ignarro LJ, Gaston B. **Condensed expirate nitrite as a home marker for acute asthma.** *Lancet* 1995, 346(8984):1235-1236.
76. Kharitonov SA, Donnelly LE, Montuschi P, Corradi M, Collins JV, Barnes PJ. **Dose-dependent onset and cessation of action of inhaled budesonide on exhaled nitric oxide and symptoms in mild asthma.** *Thorax* 2002, 57(10):889-896.
77. Corradi M, Montuschi P, Donnelly LE, Pesci A, Kharitonov SA, Barnes PJ. **Increased nitrosothiols in exhaled breath condensate in inflammatory airway diseases.** *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 163(4):854-858.
78. Balint B, Kharitonov SA, Hanazawa T, Donnelly LE, Shah PL, Hodson ME, et al. **Increased nitrotyrosine in exhaled breath condensate in cystic fibrosis.** *Eur Respir J* 2001, 17(6):1201-1207.
79. Wardlaw AJ, Hay H, Cromwell O, Collins JV, Kay AB. **Leukotrienes, LTC₄ and LTB₄, in bronchoalveolar lavage in bronchial asthma and other respiratory diseases.** *J Allergy Clin Immunol* 1989, 84(1):19-26.
80. Baraldi E, Carraro S, Alinovi R, Pesci A, Ghiro L, Bodini A, et al. **Cysteinyl leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbations.** *Thorax* 2003, 58(6):505-509.
81. Csoma Z, Kharitonov SA, Balint B, Bush A, Wilson NM, Barnes PJ. **Increased leukotrienes in exhaled breath condensate in childhood asthma.** *Am J Respir Crit Care Med* 2002, 166(10):1345-1349.
82. Kostikas K, Koutsokera A, Papiris S, Gourgoulianis KI, Loukides S. **Exhaled breath condensate in patients with asthma: implications for application in clinical practice.** *Clin Exp Allergy* 2008, 38(4):557-565.
83. Matsunaga K, Yanagisawa S, Ichikawa T, Ueshima K, Akamatsu K, Hirano T, et al. **Airway cytokine expression measured by means of protein array in exhaled breath condensate: correlation with physiologic properties in asthmatic patients.** *J Allergy Clin Immunol* 2006, 118(1):84-90.
84. B. M. Chen, L. W. Xia, R. Q. Zhao. **Determination of N^G, N^G-dimethylarginine in human plasma by high-performance liquid chromatography.** *Journal of Chromatography B* 1997; 692: 467-471
85. T. Teerlink, R. J. Nijveldt, S. De Jong, P. A. M. van Leeuwen. **Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological samples by high-performance liquid chromatography.** *Analytical Biochemistry* 2002; 303: 131-137
86. G. Trapp, K. Sydow, M. T. Dulay, T. Chou, J. P. Cooke, R. N. Zare. **Capillary electrophoretic and micellar electrokinetic separations of asymmetric dimethyl-L-arginine and structurally related amino acids: Quantitation in human plasma.** *J. Sep. Sci.* 2004; 27: 1483-1490
87. D. Tsikas, B. Schubert, F-M. Gutzki, J. Sandmann, J. C. Frölich. **Quantitative determination of circulating and urinary asymmetric dimethylarginine (ADMA) in humans by gas chromatography-tandem mass spectrometry as methyl ester tri(N-pentafluoropropionyl) derivative.** *Journal of Chromatography B* 2003; 798: 89-99

88. E. Schwedhelm, J. Tan-Andresen, R. Maas, U. Riederer, F. Schulze, R. H. Böger. **Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of asymmetric dimethylarginine in human plasma.** *Clinical Chemistry* 51 2005; 7:1268-1271
89. J. Martens-Lobenhoffer, S. M. Bode- Böger. **Simultaneous detection of arginine, asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine and citrulline in human plasma and urine applying liquid chromatography-mass spectrometry with very straightforward sample preparation.** *Journal of Chromatography B* 2003; 798: 231-239
90. J. Martens-Lobenhoffer, O. Krug, S. M. Bode-Böger. **Determination of arginine and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in human plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with the isotope dilution technique.** *J. Mass Spectrometry* 2004; 39: 1287-1294
91. H. Kirchherr, N. Kühn-Velten. **HPLC-tandem mass spectrometric method for rapid quantification of dimethylarginines in human plasma.** *Clinical Chemistry* 51 2005; 1:249-251
92. J. Martens-Lobenhoffer, S. Westphal, F. Awiszus, S. M. Bode-Böger, C. Luley **Determination of asymmetric dimethylarginine: liquid chromatography-mass spectrometry or ELISA?** *Clinical Chemistry* 51 2005; 11: 2188-2189
93. F. Schulze, R. Wesemann, E. Schwedhelm, K. Sydow, J. Albsmeier, J. P. Cooke et R. H. Böger. **Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA assay.** *Clin. Chem. Lab. Med.* 2004; 42 (12):1377-1383
94. E. Schwedhelm. **Quantification of ADMA: analytical approaches.** *Vascular Medicine* 2005; 10:S89-95
95. J. Martens-Lobenhoffer, S. M. Bode-Böger. **Chromatographic-mass spectrometric methods for the quantification of L-arginine and its methylated metabolites in biological fluids.** *Journal of Chromatography B* 2007; 851: 30-41
96. P. Vallance, A. Leone, A. Calver, J. Collier, S. Moncada. **Accumulation of an endogenous inhibitor of NO synthesis in chronic renal failure.** *Lancet* 1992; 339: 572-575
97. J. Albsmeier, E. Schwedhelm, F. Schulze, M. Kastner, R. H. Böger. **Determination of N^G,N^G-dimethyl-L-arginine, an endogenous NO synthase inhibitor, by gas chromatography-mass spectrometry.** *Journal of Chromatography B* 2004; 809: 59-65
98. K. Vishwanathan, R. L. Tackett, J. T. Stewart, M. G. Barlett. **Determination of arginine and methylated arginines in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *Journal of Chromatography B* 2000; 748:157-166
99. L. F. Huang, F. Q. Guo, Y. Z. Liang, B. Y. Li, B. M. Cheng. **Simultaneous determination of L-arginine and its mono- and dimethylated metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2004, 380:643-649
100. J. Martens-Lobenhoffer, S. M. Bode- Böger. **Fast and efficient determination of arginine, symmetric dimethylarginine, and asymmetric dimethylarginine in**

- biological fluids by hydrophilic-interaction liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry.** *Clinical Chemistry* 2006; 52:3 488-493
101. J. Martens-Lobenhoffer, E. Sulyok, E. Czeiter, A. Buki, J. Kohl, R. Firsching, U. Tröger, S. M. Bode-Böger. **Determination of cerebrospinal fluid concentrations of arginine and dimethylarginines in patients with subarachnoid haemorrhage.** *Journal of Neuroscience Methods* 2007, 164(1):155-60.
 102. Di Gangi IM, Chiandetti L, Gucciardi A, Moret V, Naturale M, Giordano G. **Simultaneous quantitative determination of N(G),N(G)-dimethyl-L-arginine or asymmetric dimethylarginine and related pathway's metabolites in biological fluids by ultrahigh-performance liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry.** *Anal Chim Acta.* 2010, 677(2):140-8.
 103. I. Lavagnini, F. Magno, R. Seraglia, P. Traldi. **Quantitative applications of mass spectrometry.** John Wiley & Sons, LTD 2006.
 104. T. Maeda. T. Yoshimura, H. Okamura. **Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, in maternal and fetal circulation.** *J Society of Gynecologic Investigation* 2003, 10: 2-4.
 105. Konduri GG. **New approaches for persistent pulmonary hypertension of newborn.** *Clin Perinatol* 2004, 31:591-611.
 106. C. M. Pierce, S. Krywawych, A. J. Petros. **Asymmetric dimethylarginine and symmetric dimethylarginine levels in infants with persistent pulmonary hypertension of the newborn.** *Pediatr Crit Care Med* 2004, 5(6): 517-520.
 107. Arrigoni FI, Vallance P, Haworth SG, Leiper JM. **Metabolism of asymmetric dimethylarginines is regulated in the lung developmentally and with pulmonary hypertension induced by hypobaric hypoxia.** *Circulation.* 2003, 107(8):1195-201.
 108. Lakshminrusimha S, Steinhorn RH. **Pulmonary vascular biology during neonatal transition.** *Clin Perinatol* 1999, 26: 601-619.
 109. Jobe AH. **Antenatal factors and the development of bronchopulmonary dysplasia.** *Semin Neonatol* 2003, 8:9-17.
 110. Wolf A, Zalpour C, Theilmeier G. **Dietary L-arginine supplementation normalizes platelet aggregation in hypercholesterolemic humans.** *J Am Coll Cardiol* 1997, 29: 479-85.
 111. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. **Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion.** *Proc Natl Acad Sci* 1991, 88: 4651-55. 10.
 112. Böger RH, Bode- Böger SM, Kienke S et al. **Dietary L-arginine decreases myointimal cell proliferation and vascular monocyte accumulation in cholesterol-fed rabbits.** *Atherosclerosis* 1998, 136: 67-77.
 113. Garg UC, Hassid A. **Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromocyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells.** *J Clin Invest* 1989, 83: 1774-77.
 114. Eto M, TF Luscher. **The cardioprotective effects of statins.** *Coronary Artery Disease* 2004, 15: 243-245.

115. Ilercil A, Devereux RB, Roman MJ, Paranicas M, O'Grady MJ, Lee ET, Welty TK, Fabsitz RR, Howard BV. **Associations of insulin levels with left ventricular structure and function in American Indians: the Strong Heart Study.** *Diabetes* 2002, 51:1543-7.
116. Ingelsson E, Sundstrom J, Arnlov J, Zethelius B, Lind L. **Insulin resistance and risk of congestive heart failure.** *JAMA* 2005, 294:334-41.
117. Bestermann WH Jr. **The ADMA-Metformin Hypothesis: Linking the Cardiovascular Consequences of the Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes.** *Cardiorenal Med.* 2011, 1(4):211-219.
118. P. López-Jaramillo, W.D. Arenas, R.G. García, M.Y. Rincon, M. López. **The role of the L-arginine-nitric oxide pathway in pre-eclampsia.** *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2008, 2(4):261-75.
119. *JAMA.* 2004 Feb 18;291(7):823-4.
120. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in Colombian women with pre-eclampsia.
121. Maas R, Böger RH, Schwedhelm E, Casas JP, López-Jaramillo P, Serrano N, Díaz LA. **Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in Colombian women with pre-eclampsia.** *JAMA.* 2004, 291(7):823-4.
122. Kim YJ, Park HS, Lee HY, Ha EH, Suh SH, Oh SK, Yoo HS. **Reduced L-arginine level and decreased placental eNOS activity in preeclampsia.** *Placenta.* 2006, 27(4-5):438-44.
123. Siroen MP, Teerlink T, Bolte AC, van Elburg RM, Richir MC, Nijveldt RJ, van der Hoven B, van Leeuwen PA. **No compensatory upregulation of placental dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity in preeclampsia.** *Gynecol Obstet Invest.* 2006, 62(1):7-13.
124. Záhúmský J, Menzlová E, Hermann H, Zmrhalová B, Sottner O, Vasíčka I, Halaska M. **A delay in the HELLP syndrome diagnosis.** *Vnitr Lek.* 2011, 57(1):113-6.
125. Bulau P, Zakrzewicz D, Kitowska K, Leiper J, Gunther A, Grimminger F, et al. **Analysis of methylarginine metabolism in the cardiovascular system identifies the lung as a major source of ADMA.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007, 292(1):L18-24.
126. Wells SM, Holian A. **Asymmetric dimethylarginine induces oxidative and nitrosative stress in murine lung epithelial cells.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007, 36(5):520-528.
127. Klein E, Weigel J, Buford MC, Holian A, Wells SM. **Asymmetric dimethylarginine potentiates lung inflammation in a mouse model of allergic asthma.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010, 299(6):L816-25.
128. Cokugras H, Akcakaya N, Seckin, Camcioglu Y, Sarimurat N, Aksoy F. **Ultrastructural examination of bronchial biopsy specimens from children with moderate asthma.** *Thorax* 2001, 56(1):25-29.

7. ABBREVIAZIONI

ADMA	N ^G ,N ^G -dimetil-L-arginina
CE	Elettroforesi capillare
CV	Coefficiente di variazione
Da	Dalton
Daughter ion	Ione precursore
DDAH	Dimetilarginina dimetilamminoidrolasi
EBC	Exhaled breath condensate
ESI	Ionizzazione per elettronebulizzazione (Electrospray Ionization)
GC/MS	Gas cromatografia/ spettrometria di massa
HEPT	Altezza equivalente del piatto teorico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPLC-MS/MS	HPLC/spettrometria di massa tandem
LC-MS	Cromatografia liquida /spettrometria di massa
LC-MS/MS	Cromatografia liquida /spettrometria di massa tandem
LDL	Lipoproteine a bassa densità
M	Media
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS1 o MS2	Primo o secondo analizzatore
MS/MS	Spettrometria di massa tandem
m/z	Rapporto massa/carica
NADPH	Nicotinamide adenindinucleotide fosfato
NMMA	N ^G -monometil-L-arginina
NOS	Ossido nitrico sintetasi
Parent ion	Ione frammento
PRMTs	Arginina metiltransferasi proteica
SAH	S-adenosil omocisteina
SAM	S-adenosil metionina
SD	Deviazione standard
SDMA	N ^G ,N ^G -dimetil-L-arginina
SRM	Single Reaction Monitoring
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography