



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN :
Medicina dello Sviluppo e Scienze della Programmazione
INDIRIZZO: Malattie Rare; Genetica, Biologia e Biochimica
CICLO: XXVI

**APPLICAZIONE DELLA SPETTROMETRIA DI MASSA NELLO STUDIO DELLE
PNEUMOPATIE OSTRUTTIVE DEL BAMBINO**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Giuseppe Basso
Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Giorgio Perilongo
Supervisore :Ch.mo Prof. Eugenio Baraldi

Dottorando : Paola Pirillo

To my family, again

INDICE

RIASSUNTO	<i>1</i>
ABSTRACT	<i>5</i>
INTRODUZIONE	<i>9</i>
Spettrometria di Massa	<i>12</i>
Dall'analisi target allo studio untarget	<i>19</i>
Metabolomica: "dalla teoria alla pratica"	<i>22</i>
La Spettrometria di Massa in Metabolomica	<i>23</i>
Applicazione della metabolomica nelle malattie respiratorie	<i>25</i>
Respiromica	<i>29</i>
Workflow in Metabolomica	<i>31</i>
Bibliografia	<i>39</i>
OBIETTIVI DEL PROGETTO DI RICERCA E PRINCIPALI RISULTATI	<i>47</i>
CAPITOLO 1:	<i>51</i>
APPLICAZIONE DELLA RESPIROMICA ALLO STUDIO DELLA DISPLASIA BRONCOPOLMONARE	
INTRODUZIONE	<i>51</i>
OBIETTIVO	<i>55</i>
MATERIALI E METODI	<i>56</i>
Soggetti	<i>56</i>
Disegno dello studio	<i>57</i>
Raccolta dell'EBC	<i>57</i>
Analisi dei metaboliti mediante LC/MS_HPLC/Orbitrap	<i>58</i>
Analisi statistica	<i>62</i>
RISULTATI	<i>63</i>
DISCUSSIONE	<i>71</i>
CONCLUSIONI	<i>79</i>
Bibliografia	<i>80</i>

CAPITOLO 2:	83
ANALISI METABOLOMICA PER LO STUDIO DEL WHEEZING	
INTRODUZIONI	83
OBIETTIVO	85
MATERIALI E METODI	85
Soggetti	85
Disegno dello studio	86
Raccolta urine	86
Strumentazione e Materiali	87
Preparazione del campione per analisi in UPLC/MS	87
Condizioni cromatografiche	88
Analisi in spettrometria di massa	89
Controlli di qualità ed estrazione dei dati	90
Descrizione dei data set	91
Analisi statistica dei dati	92
RISULTATI	92
Identificazione delle variabili significative	94
DISCUSSIONE	95
CONCLUSIONI	100
Bibliografia	101
CAPITOLO 3:	105
ANALISI TARGET IN SPETTROMETRIA DI MASSA DI DIMETILARGININE SU CAMPIONI DI EBC NELLO STUDIO DELL'ASMA	
INTRODUZIONE	105
OBIETTIVI	109
MATERIALI E METODI	110
Reagenti e materiali	110
Soggetti	111
Disegno dello studio	112

Raccolta campioni EBC	112
Misurazione di funzionalità polmonare e FENO	113
Preparazione del campione e derivatizzazione	113
Analisi dei campioni in UPLC-MS/MS	114
MS/MS	115
Curve di calibrazione e Controlli di qualità	117
Validazione del metodo analitico	118
Analisi Statistica	119
RISULTATI	120
Separazione cromatografica e analisi in MS	120
Quantificazione degli analiti nei campioni di EBC di soggetti sani e asmatici	122
Studio dell' ADMA in EBC e plasmi di soggetti asmatici e sani	123
Funzione polmonare ed FENO	125
DISCUSSIONE	125
CONCLUSIONI	128
Bibliografia	129
CONCLUSIONI	133

RIASSUNTO

Background e obiettivi

Le pneumopatie ostruttive nel mondo, tra cui asma e bronco pneumopatia cronica ostruttiva (COPD), sono in continua crescita. Nel 2006 circa 46 milioni di persone erano affette da asma, di cui 9.5 milioni erano bambini; anche la COPD è in continuo aumento e, anche se l'incidenza cresce con l'età anagrafica, sembra che diversi fattori e malattie pregresse dell'infanzia, possano influenzare la funzionalità respiratoria dei soggetti e l'evolvere della patologia. Nonostante i molti studi condotti, i meccanismi alla base di queste malattie respiratorie non sono ancora del tutto chiariti, e necessitano pertanto di ulteriori indagini. La spettrometria di massa, tecnica analitica sensibile e robusta, trova sempre più applicazioni in ambito clinico-diagnostico, grazie alla capacità di determinare i metaboliti presenti nei campioni biologici dai valori di massa o identificarne la struttura tramite frammentazione con caratteristiche di estrema sensibilità, specificità e selettività. La possibilità di analisi di miscele complesse, grazie all'accoppiamento con tecniche cromatografiche gassose o liquide, i tempi di analisi ridotti, l'identificazione qualitativa ma soprattutto i dosaggi quantitativi anche di numerosi biomarcatori in una singola analisi, ha reso questa una tecnica di elezione per studi clinici.

In particolare oltre al classico approccio *target* per quantificare specifici composti già noti o che si suppone siano caratteristici di una patologia, negli ultimi anni si è sviluppato un nuovo tipo di approccio *untarget*, noto come "metabolomica", che vede lo studio dell'intero profilo metabolico di un campione biologico, attraverso tecniche analitiche altamente sensibili e ad elevata capacità, quali la spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS). Tramite questo approccio è possibile caratterizzare il profilo metabolico generale di un gruppo di soggetti con una determinata patologia rispetto ad un gruppo di controllo ed estrapolare le variabili discriminan-

ti, grazie a tecniche statistiche di tipo multivariato. L'analisi *untarget*, non basata su ipotesi a priori, può aprire la strada a nuove ipotesi eziopatologiche oltre ad aiutare nell'identificazione di *biomarkers* diagnostici e prognostici.

Obiettivo di questo dottorato era studiare le pneumopatie ostruttive in età pediatrica mediante l'applicazione di entrambi questi approcci, su campioni di urine o condensato di aria espirata (EBC). L'EBC è un biofluido che, data la sua raccolta assolutamente non invasiva, costituisce una matrice biologica ideale per studi di questo tipo, ma essendo la concentrazione dei metaboliti estremamente bassa, risulta al tempo stesso una matrice analiticamente complessa.

Metodi e risultati

Nel primo studio, l'analisi metabolomica HRMS dell'EBC è stata impiegata per indagare il profilo biochimico-metabolico degli EBC di adolescenti con diagnosi di broncodisplasia alla nascita (BPD) rispetto a quello di un gruppo di adolescenti sani. I campioni sono stati analizzati con lo spettrometro di massa LTQ-OrbiTrap e processati tramite analisi statistica multivariata. I risultati ottenuti hanno mostrato che è possibile discriminare il gruppo BPD dal gruppo di controllo attraverso la caratterizzazione dei campioni di EBC, ottenuta con un modello OPLS-DA robusto ($R^2:0.95$, $Q^2:0.82$), mostrando un differente profilo biochimico-metabolico negli adolescenti con BPD alla nascita. L'individuazione di glicerofosfolipidi, tra le variabili discriminanti, ha suggerito un possibile coinvolgimento del surfattante alveolare alla base della minore funzionalità respiratoria dei soggetti con BPD, anche dopo anni dalla fase acuta della malattia.

Il secondo studio ha previsto l'utilizzo della metabolomica HRMS per ottenere una prima caratterizzazione biochimica-metabolica dei bambini con broncospasmo ricorrente o *wheezing* in età prescolare, in vista di uno studio prospettico per valutare quali di questi bambini svilupperà asma con la crescita, e considerare a

posteriori se esistano dei *biomarkers* prognostici. I risultati preliminari di questa parte dello studio sono stati promettenti: grazie all'analisi di campioni di urina con lo spettrometro di massa ibrido Q-Tof associato ad UPLC, si è ottenuta una netta differenziazione dei soggetti con *wheezing* rispetto ai bambini sani, mediante un modello OPLSA- DA.

L'analisi preliminare ha permesso di ottenere una netta separazione tra bambini con *wheezing* e bambini sani, mettendo in evidenza alcune molecole discriminanti. Lo studio è ancora in corso in quanto prevede la valutazione degli stessi soggetti a 18 e 36 mesi.

La terza parte dello studio relativa all'utilizzo della MS *target* prevedeva la valutazione e quantificazione di alcuni indicatori di stress ossidativo in campioni di EBC di soggetti asmatici. È stata sviluppata e validata una metodica UPLC-MS/MS per l'analisi quantitativa di dimetilarginine, ADMA e SDMA, in campioni di EBC. L'analisi è stata condotta tramite tecnica MRM in spettrometria di massa quadrupolare associata ad UPLC, con sistema di arricchimento *on-line* del campione. Il sistema analitico è risultato robusto ($r^2 > 0.992$, %Bias < 3% intra- CV% inter-intra assay $\leq 20\%$, recovery% tra 97 e 102%), rapido (corsa cromatografica di 5 minuti), e sensibile, adatto anche ad analisi di campioni biologici diluiti quali gli EBC.

La quantificazione di tali metaboliti condotta su campioni di bambini asmatici e sani, ha mostrato un aumento di ADMA negli EBC dei soggetti asmatici, indicando un ruolo dell'ADMA nel danno tissutale delle vie aeree tipico dell'asma bronchiale.

Conclusioni

Questa ricerca ha dimostrato che la spettrometria di massa ad elevata sensibilità strumentale, grazie alla quale è stato possibile ottenere informazioni significative anche da piccole quantità di campione e da matrici estremamente diluite, può essere applicata con buoni risultati allo studio di pneumopatie ostruttive, rendendo

più facili studi di *follow up*, oltre che aiutare il medico nell'individuare possibili marcatori utili alla la diagnosi e/o nuovi *target* terapeutici.

ABSTRACT

Background and purposes

The obstructive pulmonary diseases in the world – among which asthma and the chronic obstructive pulmonary disease (COPD) – have been growing constantly. In 2006 about 46 million persons suffered from asthma, and 9.5 millions were children; the COPD has also been growing constantly and, despite the fact that the incidence increases with age, it looks like several factors and previous childhood diseases can influence the subjects' respiratory function and the evolution of the disease. Despite the many studies that have been carried out, it is not clear yet what are the mechanisms on which these respiratory diseases are based, and therefore further investigations must be made. Mass spectrometry, a sensitive and robust analytic technique, has found more and more applications in the clinical-diagnostic field, thanks to its capacity to determine the metabolites in the biological samples with a mass value or to identify their structure through fragmentation with extremely sensitive, specific and selective characteristics. The possibility to analyze complex blends, thanks to combination with gas or liquid chromatographic techniques, reduced analysis time, the qualitative identification but above all the quantitative dosages of several biomarkers in a single analysis, has made this technique preferable for clinical studies. Especially, besides the classical *target* approach used to quantify already known or presumably proper to certain pathologies specific compounds, over the past years a new type of approach has developed, the so called *untarget* approach, known as “metabolomic”, which sees the study of the entire metabolic profile of a biological sample, by means of highly sensitive and precise analytic techniques, such as high resolution mass spectrometry

(HRMS). This approach allows the characterization of the general metabolic profile of a group of subjects with a specific pathology as compared to a group of control and extracts the discriminating variables, thanks to multivariate statistic analysis techniques. The *untarget* analysis, which is not based upon prior hypotheses, can open the doors to new etiopathological hypotheses, besides helping identify the diagnostic and prognostic biomarkers. The purpose of this PhD thesis was to study the infant obstructive respiratory diseases by applying both of these approaches to urine or exhaled breath condensate (EBC) samples. The EBC is a biofluid which, given the extremely non invasive method of collecting it, represents an ideal biological matrix for studies of the kind, but, since the metabolite concentration is extremely low, is at the same time an analytically complex matrix.

Methods and results

In the first study, the HRMS metabolomic analysis of the EBC was employed to investigate upon the biochemical-metabolic profile of the EBCs of teenagers diagnosed with bronchopulmonary dysplasia (BPD) from birth as compared to a group of healthy teenagers. The samples were analyzed with the LTQ-Orbitrap mass spectrometer and processed by means of the multivariate statistic analysis. The results have demonstrated that it is possible to discriminate the BPD group from the control group by marking out the EBC samples, obtaining a robust OPLS-DA model ($R^2:0.95$, $Q^2:0.82$), indicating how the teenagers who were affected by BPD from birth have a different biochemical-metabolic profile. The individuation of the glycerophospholipids, among the several discriminating variables, has suggested a possible involvement of the alveolar surfactant at the basis of the minor respiratory function in the BPD affected patients, even years later after the severe phase of the disease.

The second study employed the HRMS metabolomic in order to obtain a first

biochemical-metabolic characterization of children with frequent bronchospasm (wheezing) in preschool age, in view of a perspective study which would help appreciate which of these children will develop asthma when growing up, and, *a posteriori*, consider whether prognostic biomarkers exist. The preliminary results of this part of the study have been encouraging: thanks to the analysis of the urine samples with the hybrid Q-Tof mass spectrometer associated to the UPLC, we have had a clear distinction of the subjects affected by wheezing as compared to healthy children, through an OPLSA- DA model.

The preliminary analysis has allowed to obtain a clear distinction between children who suffered from wheezing and healthy children, highlighting some discriminating molecules. The study is still ongoing since it presupposes the evaluation of the same subjects 18 and 36 months later.

The third part of the study was related to the use of the *target* MS and was meant to evaluate and quantify some oxidative stress indicators in EBC samples belonging to subjects affected by asthma. A UPLC-MS/MS method was developed and validated for the quantitative analysis of the dimethylarginine, ADMA and SDMA, in samples of EBC. The analysis was conducted by means of MRM technique in quadrupole mass spectrometry associated to UPLC, with a on line sample enrichment system. The analytic system has come out robust ($r^2 > 0.992$, %Bias < 3% intra- CV% inter-intra assay $\leq 20\%$, recovery between 97 and 102%), rapid (5 minutes chromatographic run) and sensitive, also suitable for the analysis of diluted biological samples, such as the EBCs.

The quantification of these metabolites, conducted on samples of asthmatic and healthy children, has pointed out a rise of the ADMA in the EBCs of the asthmatic subjects, indicating a role of the ADMA in the tissue damage of the respiratory tract which typically characterizes the bronchial asthma.

Conclusions

This research has demonstrated that instrumentally highly sensitive mass spectrometry, which has allowed us to obtain significant information even from small quantities of samples and from extremely diluted matrixes, can be successfully applied to the study of obstructive respiratory diseases, making the follow up studies easier, and also helping medical doctors identify possible markers useful to the diagnosis and/or new therapeutic *targets*.

INTRODUZIONE

La morbilità e la mortalità dovute a malattie dell'apparato respiratorio sono in continuo aumento in ogni parte del mondo.

Il sistema respiratorio ha l'importante funzione di portare l'ossigeno necessario all'organismo vivente e di rimuovere l'anidride carbonica prodotta. L'aria muove attraverso il passaggio nasale alla trachea che si divide nei due bronchi. Ciascuno di questi si dirama nei più piccoli bronchioli per terminare nelle sacche alveolari. Un blocco nel passaggio di questi elementi nel tratto respiratorio, dovuto ad una sottostante infiammazione, porta ad un'ostruzione delle vie aeree. In molti disordini dell'apparato respiratorio vi è una infiammazione delle vie aeree così come una costrizione della muscolatura liscia tracheale al passaggio dell'aria.

In particolare l'asma e la broncopneumopatia ostruttiva cronica (COPD) sono disordini dell'apparato respiratorio che mostrano un'elevata propensione all'ostruzione delle vie aeree, portando a difficoltà respiratoria causata da broncocostrizione, infiammazione e secrezione di muco.

I fattori sottostanti le due malattie sono comunque differenti: sono diversi i mediatori cellulari e molecolari così come le parti dell'apparato respiratorio colpite, che per l'asma coinvolgono le vie che conducono l'aria ai polmoni, quali trachea e bronchi, nella COPD principalmente bronchioli terminali e sacche alveolari (Barnes, 2008)¹.

Molti studi sono stati condotti per caratterizzare queste patologie, la cui incidenza nel mondo è in continuo aumento. In accordo con quanto riportato dalle linee guida del "*Global Initiative for Asthma*" (GINA), nel 2006 circa 46 milioni di persone erano affette da asma, di cui 9.5 milioni erano bambini e 27.5 milioni adulti

compresi di 8.5 milioni di anziani (Bateman et al., 2008; GINA, 2010; DATA monitor, 2006)^{2,3,4}.

L'incidenza dell'asma varia dall'1% al 18% considerando tutti i paesi del mondo. Gli Stati Uniti hanno il più alto numero di soggetti asmatici, sia in termini di percentuale che in numero assoluto, seguiti da Gran Bretagna, Francia e Germania. La prevalenza riportata per Italia è di 4.9%, corrispondente a circa 2.5 milioni di persone affette, e si assiste ad una crescita dei casi d'asma anche in Africa, Asia e America Latina. (DATA monitor,2006)⁴. Inoltre, come riportato dalla "World Health Organization", circa 250.000 persone muoiono ogni anno per asma e l'incidenza di asma severa che richiede intervento di ospedalizzazione è in crescita, specialmente tra i bambini. (Bateman et al.2008; GINA; 2010)^{2,3}.

Anche la COPD, malattia respiratoria caratterizzata da ostruzione bronchiale, bronchiti ed enfisema, è in continuo aumento tanto che uno studio riportato dal "Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease" (GOLD), prevede che nel 2020 la COPD sarà la terza causa di mortalità e la quinta per morbilità. Questa stima deriva dall'aumento dei fumatori nei paesi in via di sviluppo, che rappresentano un quarto della popolazione che ancora fuma, e all'incremento della popolazione stessa nei paesi in via di sviluppo. (Barnes, 2008; DATA Monitor; 2006; Rabe et al., 2007; GOLD 2010)^{1,4,5,6}.

Secondo le linee guida GOLD la COPD si può classificare in lieve, moderata, grave e molto grave (Rabe et al., 2007; GOLD 2010)^{5,6} e secondo un'indagine riportata dal *DATA Monitor survey* il totale della popolazione con COPD in sette diversi paesi era di 28.8 milioni nel 2006, di cui 6.8 milioni con forma severa. (DATA Monitor; 2006)⁴ Nonostante l'alta incidenza di queste due patologie, i fattori che determinano la suscettibilità individuale all'asma e la COPD non sono ancora chiari, anche se l'invecchiamento della popolazione, i cambiamenti nello stile di vita (es. fumo), le

condizioni ambientali (es. inquinamento) così come i fattori genetici, contribuiscono all'iniziazione e propagazione di queste due condizioni.

In particolare la COPD vede nell'avanzare dell'età un fattore determinante, dovuto al declino della funzionalità respiratoria, indicata dal valore di FEV1 (acronimo per "*Forced Expiratory Volume in 1st second*", misurato in spirometria tramite il volume di aria espirata nel corso del primo secondo di un'espiazione massima forzata). Si calcola ad esempio che il 9-10% della popolazione di adulti sopra i 40 anni presenti sintomi di COPD (DATA Monitor; 2006)⁴.

Pur non essendo quindi una patologia propria dell'infanzia, si deve tener presente che i fattori predisponenti agiscono già prima che la malattia si manifesti. La funzionalità respiratoria subisce, infatti un calo fisiologico a partire dai 20 anni di età, e se intervengono altri fattori quali esposizione a fumo di sigaretta o condizioni patologiche, il calo può essere più rapido e la funzionalità respiratoria scendere sotto ai livelli considerati normali, portando ai sintomi tipici della COPD. (Holt et al., 2009; Baraldi et al., 2007)^{7,8}. Tra le condizioni predisponenti troviamo la displasia broncopolmonare (BPD), patologia ostruttiva polmonare del neonato prematuro i cui segni e sintomi si protraggono fino all'età adulta.

È stato dimostrato in diversi studi che l'indice FEV1, anche dopo anni dalla fase acuta della malattia, si mantenga più basso rispetto al valore medio di soggetti sani con la stessa età anagrafica. (Broström et al., 2010, Jacob et al., 1998)^{9,10}. Pertanto si considera che i pazienti con BPD alla nascita possano andare più facilmente incontro a broncopneumopatia ostruttiva nell'età adulta. (Baraldi et al., 2009)¹¹.

Data l'importanza e l'incidenza delle broncopneumopatie ostruttive, quali asma e COPD, si sono voluti studiare sia gli aspetti specifici della malattia respiratoria sia i *pattern* metabolici utilizzando la spettrometria di massa come tecnica analitica, con approcci e tipi di strumentazione diversificati.

Lo studio dei profili metabolici caratterizzanti le broncopneumopatie ostruttive del bambino è stato condotto in spettrometria di massa ad alta risoluzione accoppiata a cromatografia liquida, tramite un approccio di tipo *untarget*, applicato a campioni biologici di condensato dell'aria esalata ed urine, la cui raccolta non invasiva ben si adatta all'età pediatrica, allo scopo di aggiungere dei tasselli alla conoscenza di patologie respiratorie tipiche dell'infanzia (Stern et al., 2008)¹² ma i cui esiti si protraggono fino all'età adulta.

Una parte dello studio ha invece utilizzato il classico approccio *target* di spettrometria di massa tandem accoppiata alla cromatografia liquida, finalizzata alla valutazione quantitativa di specifici marcatori di stress ossidativo, quali le dimetilarginine (ADMA e SDMA), in soggetti con patologia asmatica.

Spettrometria di massa

La spettrometria di massa è una tecnica analitica utilizzata per separare molecole in base al loro rapporto massa/carica (m/z). Vista la grande diversità strutturale e molecolare dei metaboliti presenti in un organismo sono necessarie più tecniche analitiche per studiarne i diversi composti. L'utilizzo della spettrometria di massa, la cui peculiarità sta nella capacità di determinare la massa con elevata precisione e accuratezza e permettere una stima precisa della composizione elementare portando ad ipotizzare la struttura chimica delle molecole, ha avuto notevoli applicazioni. Inoltre, la possibilità di quantificare i composti presenti anche in quantità molto basse (fino a concentrazioni di fM o aM) in un campione, ha reso questa tecnica molto diffusa nell'ambito clinico e diagnostico.

La spettrometria di massa si basa sulla ionizzazione delle molecole da analizzare, sulla separazione dei diversi ioni prodotti e sulla loro rivelazione. Il risultato dell'esperimento è uno spettro di massa che rappresenta l'abbondanza relativa degli

ioni in funzione del loro rapporto m/z .

In una generica configurazione, riportata nella Figura 1, gli analiti d'interesse vengono trasformati nella sorgente in molecole cariche (ionizzazione) prima di essere introdotti nello spettrometro di massa, dove verranno separati sulla base del loro rapporto m/z , utilizzando dei campi magnetici o elettrici in un ambiente mantenuto sotto vuoto (10^{-6} , 10^{-5} torr). Il vuoto è necessario per impedire la collisione

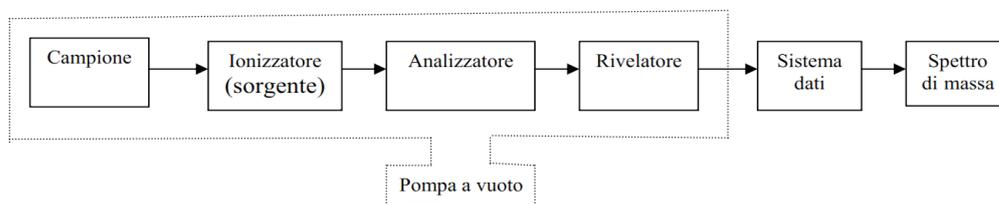


Figura 1 Schema a blocchi di uno spettrometro di massa

La sorgente riveste un ruolo molto importante nella ionizzazione delle molecole prima che queste entrino nell'analizzatore.

Ci sono diversi tipi di sorgenti i cui ioni sono prodotti con tecniche chimico-fisiche differenti, ma in ambito clinico hanno avuto più diffusione quelle che operano con una ionizzazione detta "soft". Sono sorgenti che lavorano a pressione atmosferica come la sorgente a ionizzazione di tipo elettrospray (ESI) o a ionizzazione chimica a pressione atmosferica (APCI). Nella prima la ionizzazione è ottenuta tramite la nebulizzazione a pressione atmosferica del campione disciolto in un solvente in un elevato campo elettrico provocando la formazione di goccioline da $100\ \mu\text{m}$ di diametro cariche che, evaporando, trasferiranno le cariche sulle molecole disciolte nel solvente. Nel secondo sistema viene fatta una nebulizzazione del solvente a pressione atmosferica ma la ionizzazione avviene attraverso una scarica effettuata da un ago mantenuto ad alto potenziale elettrico; le goccioline dell'aerosol vengono così caricate per effetto della scarica elettrica, e successivamente gli ioni ven-

gono attratti verso una “lente di estrazione o di focalizzazione”, mentre il solvente evapora e gli ioni carichi vengono accelerati verso l’analizzatore.

L’introduzione di queste sorgenti ha esteso il range analitico a peptidi, lipidi e proteine, senza la necessità di ulteriori tecniche preparative, e ha permesso l’accoppiamento con la cromatografia liquida. La spettrometria di massa è spesso preceduta da tecniche cromatografiche che consentono di separare dei diversi componenti di una miscela in base alle loro proprietà chimico-fisiche quali la polarità, l’idrofobicità e l’affinità con la fase stazionaria. La cromatografia liquida (LC) e quella gassosa (GC) sono utili quando si opera con miscele molto complesse, quali sono i fluidi biologici o tessuti. La ionizzazione soft permette la formazione di ioni protonati $[M+H]^+$ o deprotonati $[M-H]^-$, e quindi di ottenere la massa dello ione molecolare, inoltre questo tipo di sorgente ESI rende possibile la formazione di ioni multicaricati rendendo possibile anche l’analisi di molecole ad alto peso molecolare quali le proteine e DNA.

Spesso gli spettrometri di massa sono costituiti da più analizzatori configurati in modo diverso, in modo da poter manipolare gli ioni all’interno dello strumento, tra questi uno dei più diffusi è il triplo quadrupolo in cui il primo analizzatore è seguito da una cella di collisione per la frammentazione degli ioni e poi da un terzo analizzatore. Questa configurazione permette di operare con diversi tipi di scansioni per ottenere informazioni strutturali oltre a poter aumentare la sensibilità dello strumento selezionando una modalità detta MRM (Multiple Reaction Monitoring) con transizioni specifiche. In Figura 2 è riportato un schema di funzionalità di un triplo quadrupolo.

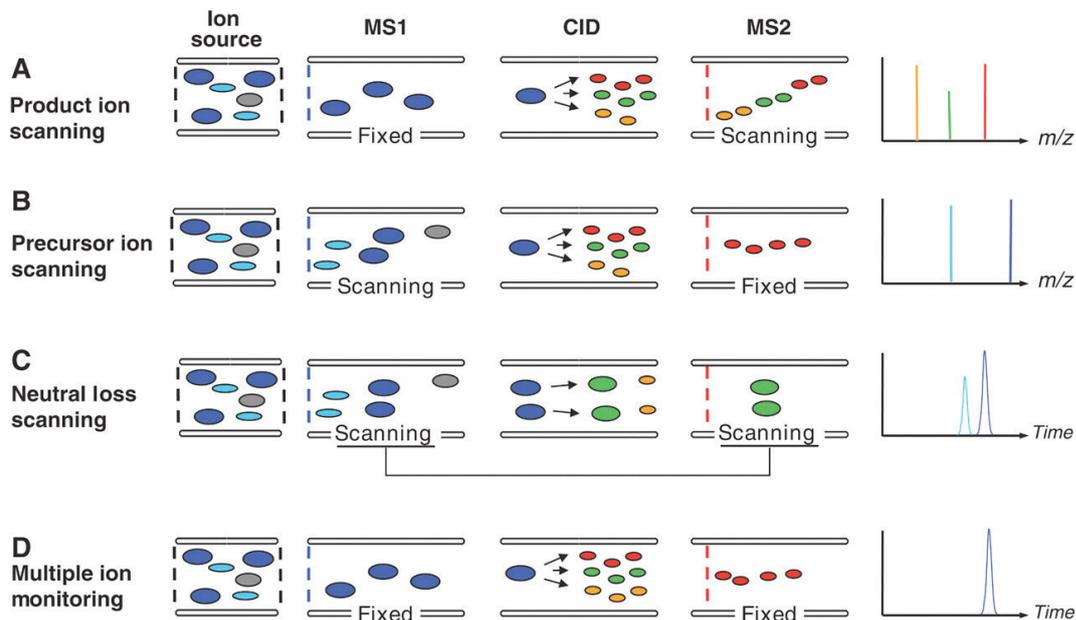
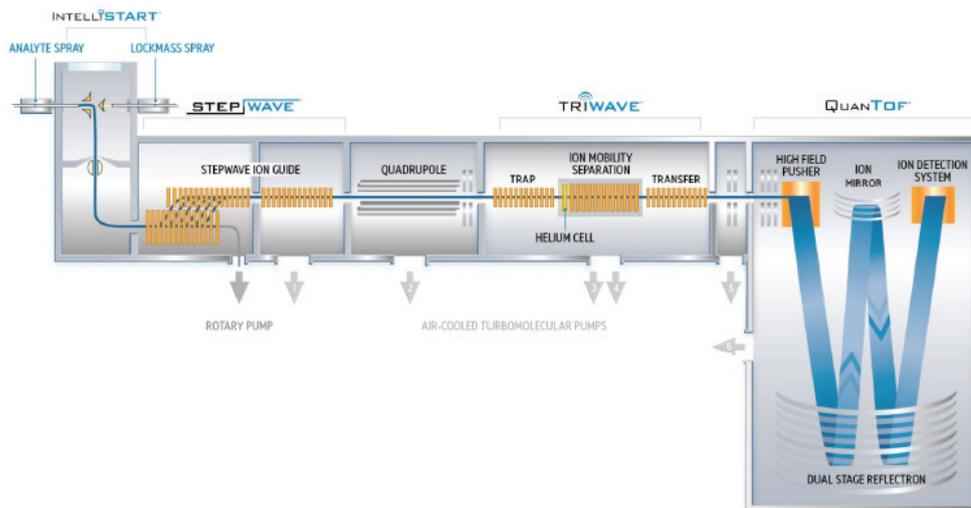


Figura 2 Schema di funzionalità di un triplo quadrupolo

Le tecniche di ionizzazione ESI hanno natura conservativa, dovuta all'assenza di frammentazione delle molecole, e pertanto non forniscono molte indicazioni riguardo la struttura chimica. E' quindi necessario che siano associate ad analizzatori in grado di eseguire esperimenti di tipo massa/massa (MS/MS, o MSⁿ) che, grazie ad un processo di collisione (CID), permettano di frammentare e identificare in maniera caratteristica una data molecola: sono stati sviluppati analizzatori di massa basati sul "tempo", cioè in grado di raccogliere gli ioni in uno spazio per poi eseguire più sequenze di frammentazione (MSⁿ), come le trappole ioniche, e analizzatori operanti nello "spazio", come il triplo quadrupolo, in cui lo ione passa attraverso più analizzatori in serie, e lo ione viene selezionato e poi frammentato (Werner et al. 2008)¹³. Vi sono poi altri spettrometri detti ibridi che associano più tipi di analizzatori in uno stesso strumento. Tra questi troviamo il Q-Tof, in cui l'ultima parte del triplo quadrupolo è sostituita da un analizzatore di massa a tempo di volo (Tof). In generale l'analizzatore Tof si basa sul principio che tutti gli ioni prodotti nella sor-

gente dello spettrometro di massa hanno mediamente la stessa energia cinetica, e successivamente vengono accelerati in un campo elettrico pulsante; per le leggi della cinetica, la velocità di ogni ione sarà inversamente proporzionale al quadrato della radice della propria massa. Come conseguenza il tempo dello ione per attraversare la regione di vuoto (il “tubo di volo” dello strumento) sarà correlata con il rapporto m/z dello ione. Nei Tof è importante che gli ioni presenti nella sorgente vengano pulsati simultaneamente e istantaneamente, così da ottenere il loro tempo di volo e quindi il loro m/z . In questo modo è possibile un’alta velocità di scansione, limitata solo dal tempo che gli ioni impiegano ad attraversare il tubo di volo. Nella prima generazione di Tof, gli ioni passavano direttamente dalla sorgente al detector e si ottenevano spettri a bassa risoluzione. Per incrementare la risoluzione di questi strumenti, basata sulla capacità dello strumento di misurare piccole differenze nel tempo richiesto agli ioni con simile m/z per giungere al detector, si è aumentata la distanza che devono percorrere, (ad esempio allungando il tubo di volo), con la conseguente problematica di un ingombro strumentale notevole. Per ovviare al problema sono stati utilizzati degli specchi per gli ioni noti come “*reflectrons*”, che riflettono lo ione facendogli compiere dei percorsi più lunghi, permettendo di ottenere una risoluzione maggiore (10.000 volte più alta rispetto ai primi TOF). (Ardrey, 2003)¹⁴. Ciò ha contribuito alla diffusione di questi analizzatori nelle analisi LC-MS ad alta risoluzione, specialmente laddove sia richiesta un’alta risoluzione cromatografica con una elevata velocità di scansione. Inoltre tali strumenti, come abbiamo visto, possono essere associati ad altri analizzatori, quali i quadrupoli, ottenendo così uno strumento che può operare con diverse modalità d’analisi (es. MS-MS e High Resolution Scan). In Figura 3 è riportato uno schema di spettrometro di massa ad alta risoluzione del tipo Q-Tof (Synapt G2, Waters) dotato di un quadrupolo e di un analizzatore a tempo di volo.



3 Figura 3 Schema di uno spettrometro di massa HRMS Q-ToF (Synapt G2 S,Waters)

Le differenti combinazioni di sorgenti e analizzatori sono in grado di coprire una gamma più ampia di molecole.

Gli analizzatori possono fornire l'intero spettro degli ioni, operando in scansione, o essere usati per la rivelazione di soli alcuni composti d'interesse, attraverso il monitoraggio di ioni selezionati (SIM) o di transizioni selezionate in MS/MS (SRM *single ion monitoring*; MRM *multiple reaction monitoring*) (Kitteringham et al., 2009)¹⁵. Grazie alla versatilità di queste tecniche spettroscopiche, l'ESI/MS o l'APCI/MS sono diventate le tecniche d'elezione nelle analisi in ambito clinico.

I tripli quadrupoli utilizzano un sistema a tre quadrupoli in serie, che consente di effettuare spettri MS/MS usando il secondo quadrupolo come cella di collisione, in presenza di gas argon a pressione di circa 2 mtorr. Il primo quadrupolo seleziona lo ione molecolare mentre nel secondo avviene la frammentazione dello ione (cella di collisione). I frammenti prodotti possono quindi essere separati tramite il terzo quadrupolo. Il vantaggio principale del triplo quadrupolo è l'elevata sensibilità con la quale riesce a determinare in modo quali-quantitativo gli analiti. Questi analizzatori sono largamente usati per l'identificazione qualitativa ma soprattutto quantitativa di metaboliti diagnostici in analisi cliniche di tipo *target*. Per esempio,

lavorando in modalità *parent ion* o *neutral loss scanning* è possibile l'analisi di alcune famiglie di composti quali i fosfolipidi, (Han, Gross, 2005a)¹⁶, i solfoconiugati (Lafaye et al., 2004)¹⁷, o le acilcarnitine. (McClellan et al., 2002)¹⁸ e mediante SRM o MRM è possibile analizzare e quantificare simultaneamente fino a qualche centinaio e più di composti, farmaci o metaboliti, come riportato in alcuni lavori (Bajad et al., 2006)¹⁹, (Gucciardi et al., 2012)²⁰

Tra gli analizzatori, la trappola ionica è spesso utilizzata per l'identificazione della struttura molecolare grazie alla possibilità di effettuare esperimenti in MS_n, ossia sequenze di frammentazione che facilitano l'interpretazione degli spettri di dissociazione indotti dalla collisione (CID). L'analizzatore FT-ICR (Fourier Transform - Ion Cyclotron Resonance) è un analizzatore a trappola che sfrutta un campo magnetico intenso per intrappolare gli ioni in traiettorie circolari. Applicando un campo elettrico in corrente alternata gli ioni assorbono energia e, di conseguenza, il raggio della loro orbita di rotazione aumenta. Il moto degli ioni in risonanza produce una corrente misurabile, di intensità proporzionale alla concentrazione degli ioni stessi. Il segnale risultante, costituito da una funzione dipendente dal tempo in cui molte frequenze sono sovrapposte, viene trasformato tramite la trasformata di Fourier. Ioni con specifico m/z possono essere isolati all'interno della trappola ICR espellendo tutti gli ioni con diverso m/z, e, introducendo un gas di collisione, viene realizzata la frammentazione degli ioni isolati, riuscendo a realizzare spettri MS_n. Evoluzione della trappola ionica è la trappola elettrostatica brevettata da Makarov (1996 e 2004) e commercializzata da Thermo Electro Corporation, nota col nome di Orbitrap. Lo strumento consiste in un sottile elettrodo centrale filiforme ed in un elettrodo cilindrico esterno. Un voltaggio a corrente continua è applicato tra i due elettrodi, producendo un potenziale radiale logaritmico. Ad esso si aggiunge un termine assiale provocato da un quadrupolo. Gli ioni introdotti oscillano nella trap-

pola in spirali attorno all'elettrodo centrale sotto l'influenza di un campo elettrico. La frequenza delle oscillazioni assiali viene misurata, ed i segnali risultanti vengono convertiti in uno spettro massa/carica attraverso un algoritmo in trasformata di Fourier (FFT). L'analizzatore ibrido LTQ FT Orbitrap combina la capacità di eseguire spettri MSn della trappola ionica lineare con l'alta risoluzione e l'elevata accuratezza di massa dell'orbitrap. In Figura 4 è riportato lo schema di uno spettrometro di massa LTQ Orbitrap (Thermo Electron Corporation).

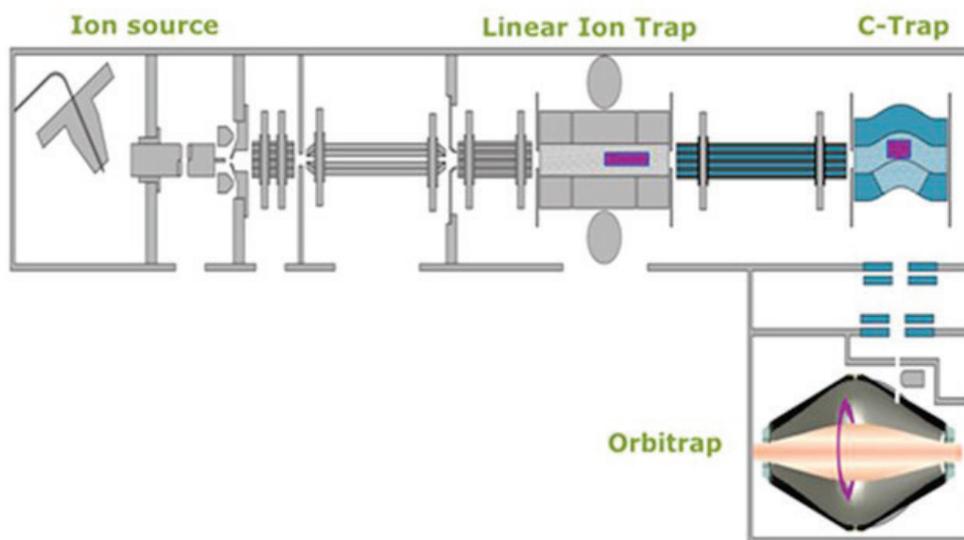


Figura 4 Schema di uno spettrometro LTQ Orbitrap (Thermo Electron Corporation)

Dall'analisi *target* allo studio *untarget*

In anni recenti è emerso il bisogno di studiare i sistemi biologici, in particolare quello umano, nel suo insieme, per comprendere non solo la funzione di ogni singolo componente ma anche come ognuno di questi interagisca con gli altri.

Si sta passando pertanto da un approccio di tipo riduzionistico (*target*), dove il sistema è analizzato nei suoi singoli componenti, ad un approccio di tipo sistemico (*untarget*), il cosiddetto "*system biology approach*", per comprendere come le diverse funzioni biologiche interagiscano tra di loro e come questo possa garantire lo stato di salute o al contrario portare ad uno stato di malattia: l'idea è analizzare

la relazione tra i diversi livelli molecolari dell'organizzazione biologica (es. geni, trascritti, proteine, metaboliti) riferendosi al concetto di *omeostasi* ossia la reazione fisiologica dell'essere vivente per mantenere lo stato di equilibrio (*steady state*). Le scienze che rientrano in questo quadro vengono definite scienze "omiche", dove il termine "omica" definisce l'approccio capace di descrivere l'intero set di proteine, mRNAs e metaboliti di un dato organismo (Nicholson, Wilson, 2003; Schnackenberg, Beger, 2006)^{21,22}.

Tra queste troviamo la trascrittomica, la proteomica e la metabolomica. Il termine metabolomica è stato introdotto per la prima volta nel 1998 da Oliver (Oliver et al., 1998)²³ ed è stata definita da Nicholson come l'analisi quantitativa di tutti i metaboliti a basso peso molecolare (metaboloma) presenti in un campione biologico (Nicholson, Lindon, 2008)²⁴. Lo studio dei metaboliti si rivela molto importante per comprendere lo stato di salute di un individuo in quanto il profilo metabolico, oltre ad essere l'espressione ultima delle informazioni contenute nel codice genetico, è influenzato da altri fattori non correlati col genoma, quali fattori ambientali e nutrizionali, interazioni con microrganismi commensali (ad esempio i metaboliti microbici che derivano dalla flora batterica intestinale possono essere individuati nel siero e nelle urine umane) ed esposizione a farmaci o sostanze tossiche. Lo studio del metaboloma permette una buona comprensione del fenotipo di un individuo ed inoltre può avere un ruolo nel prevedere quale sarà il corso della malattia e come l'organismo risponderà ai diversi trattamenti (Nicholson, 2006; Carraro et al., 2009)^{25,26}. La metabolomica, tra tutte le scienze "omiche" è considerata la più vicina all'espressione fenotipica in quanto il metaboloma è strettamente correlato alla funzione. L'analisi comprensiva del metaboloma fornisce una visione completa e funzionale dello stato attuale della biochimica cellulare che connette il genoma a un particolare fenotipo. Questo avviene perché il prodotto finale, cioè il flusso

metabolico, dipende da molteplici fattori perché è regolato dall'espressione genica (geni), dagli eventi post-trascrizionali (RNA), da eventi post-traduzionali (proteine), e subisce gli effetti anche di sviluppo fisiologico e delle influenze ambientali. Uno dei limiti delle altre omiche è quello di non rispecchiare in maniera puntuale il fenotipo biochimico; infatti, un'alterazione anche importante del trascrittoma o del proteoma spesso non si traduce in un'altrettanta importante variazione del fenotipo del sistema, in quanto spesso si riescono a trovare dei meccanismi di compenso. Diversamente se lo stato fisiologico, patologico e di sviluppo del sistema biologico subiscono qualche alterazione, queste si riscontrano subito nell'assetto metabolico, perché è il parametro che più rispecchia il reale stato di salute del sistema (Ryan et al., 2006; Nordström, Lewensohn, 2010)^{27,28}.

Si può sostenere che la metabolomica meglio definisce il fenotipo biologico, dato che i composti rivelati in un fluido biologico riflettono sia l'espressione genica che l'interazione dell'organismo, offrendo la possibilità di documentare le interazioni di un organismo (microorganismo, pianta, essere umano) con il suo ambiente e, in complemento con le altre scienze omiche, offrire una descrizione quanto più completa di un campione biologico. (Holmes et al. 2008b)²⁹ (Figura 5).

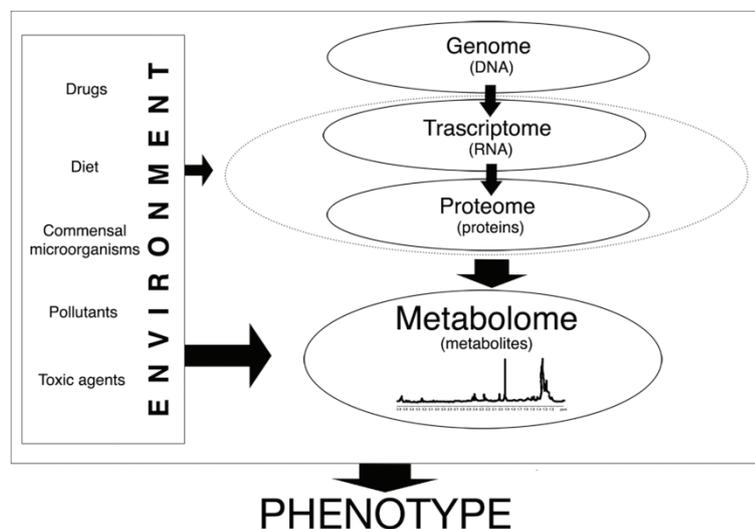


Figura 5 La cascata "omica" (adattata da Carraro S. et al., J Pediatr, 2009)²⁶

Metabolomica: “dalla teoria alla pratica”

L'applicazione dell'approccio metabolomico in uno studio clinico si pone come obiettivo di identificare l'intero pattern di metaboliti presenti in fluido biologico per poi arrivare ad individuare i composti che sono i veri e propri biomarkers significativi, quelli che discriminano i sani dai patologici o i diversi fenotipi per una patologia.

La metabolomica, secondo la definizione di Nicholson, può essere vista come la misura della risposta di un sistema vivente a uno stimolo fisiopatologico o ad una modificazione genica. (Nicholson, 1999)³⁰; è un approccio multidisciplinare che combina la chimica analitica per l'acquisizione del profilo metabolico (*fingerprints*), e la biostatistica, l'informatica e la biochimica per la comprensione e l'interpretazione dei dati. Anche con diverse tecniche d'analisi, non è possibile coprire l'intero metaboloma di un organismo, ma l'implementazione delle tecniche strumentali quali la risonanza magnetica nucleare e la spettrometria di massa, ha permesso di incrementare il numero di molecole rilevabili in una sola analisi, avvicinandosi alla possibilità di uno studio “globale” di un campione biologico. Dagli ultimi anni del 2000, grazie agli sviluppi nella biostatistica e nella chimica analitica, la metabolomica è stata impiegata in diversi campi, quali scienze ambientali (Viant, 2008)³¹ agronomia (Saito, Matsuda, 2010)³², nutrizione (McNiven et al., 2011)³³, medicina (Nicholson et al., 2012)³⁴, tossicologia (Robertson et al., 2012)³⁵, sviluppo di farmaci (Wei, 2011)³⁶.

Anche in ambito pediatrico, negli ultimi anni, sono stati condotti diversi studi, sia con tecniche NMR che MS: l'approccio metabolomico di tipo *untarget* ha permesso ad esempio lo studio dei disordini derivanti da errori del metabolismo neonatale (Wikoff et al., 2013)³⁷ e la descrizione del profilo metabolomico nel liquido

cerebrospinale di bambini con influenza associata ad encefalopatia, suggerendo che è possibile identificare biomarkers utili alla diagnosi precoce di questa malattia (Kawashima et al. 2007)³⁸. Nell'ambito della neonatologia uno studio metabolomico sulle urine di neonati prematuri ha indicato il pattern di metaboliti che sembrano predire la pervietà del dotto arterioso (Fanos et al., 2012)³⁹, e uno studio ha mostrato come il profilo metabolico di urine, raccolte entro la prima ora di vita, sia differente a seconda dell'età gestazionale.(Atzori et. al, 2011)⁴⁰. Una ricerca condotta nell'ambito dell'oncologia pediatrica, ha caratterizzato il profilo urinario e sierico di bambini con osteosarcoma confrontandoli con bambini con tumori benigni dell'osso e con controlli sani, ottenendo una separazione tra i diversi gruppi e identificando i possibili biomarkers caratterizzanti la neoplasia maligna. Diversi studi condotti sul diabete mellito di tipo 1 hanno permesso di definire la suscettibilità allo sviluppo di questa condizione patologica, e di poterne seguire l'evoluzione nel tempo (Oresic et al., 2008, Deja, 2013, Wei, 2102)⁴¹⁻⁴³ e altri studi, hanno messo in luce il ruolo della flora batterica intestinale nell'allergia al latte vaccino (Franca-villa et al., 2012)⁴⁴ e nella malattia celiaca (Sellitto et al., 2012)⁴⁵. Infine uno studio condotto nell'ambito della farmacometabolomica ha discriminato i bambini con un rischio più alto di sviluppare epatotossicità per l'assunzione di acido valproico, farmaco impiegato per il controllo dell'epilessia, contribuendo a definire i diversi fenotipi di risposta ai trattamenti. (Price et al., 2011)⁴⁶.

La Spettrometria di Massa in Metabolomica

Come riportato in letteratura, negli ultimi anni uno degli strumenti più utilizzati per lo studio metabolomico è la spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS). Il potere risolvete è la capacità dello spettrometro di massa di separare ioni con rapporto m/z simile o ioni isobari, ed è definito come il rapporto tra il picco della

massa misurata “ m ” e la differenza tra i picchi delle due masse “ Δm ”, misurata a metà dell’altezza del picco. ($m/\Delta m$, FWHM). Gli strumenti di massa ad alta risoluzione forniscono un’accuratezza di massa sotto i 5ppm, e una risoluzione di massa da 20.000 ad 1.000.000 ($m/\Delta m$, FWHM).

L’HRMS include strumenti quali i Tof, gli strumenti a risonanza ciclotronica in trasformata di Fourier (FT-ICR) e gli Orbitrap. Tali strumenti, grazie alla capacità di misurare la massa in modo accurato con un errore inferiore al ppm, discriminano tra specie isobariche, migliorano la rivelazione degli ioni e facilitano l’identificazione della composizione elementare e la caratterizzazione strutturale. (Aharoni et al., 2002)⁴⁷. Questo ha incrementato l’utilizzo della spettrometria di massa negli studi metabolomici (Dettmer et al., 2007)⁴⁸ con la produzione di nuovi strumenti più sensibili e versatili, con lo sviluppo di tools informatici, e con la costruzione di database di raccolta degli spettri e di interpretazione dei dati (Junot et al., 2013)⁴⁹. Nel campo della metabolomica l’efficacia della spettrometria di massa è stata a lungo limitata dalla sensibilità e dalla difficoltà di identificare le molecole. Inizialmente l’approccio metabolomico era condotto con strumenti a bassa risoluzione quali la trappola ionica e il triplo quadrupolo. (Lafaye et al., 2003)¹⁷. Attualmente la possibilità di misurazioni accurate delle masse con errori al di sotto di pochi ppm tramite analizzatori di massa ad alta risoluzione ha permesso di incrementare la sensibilità e l’informazione che si può ricavare da un approccio di studio cosiddetto “globale” e le prime pubblicazioni degli studi di metabolomica che impiegavano i TOF e gli LTQ-Orbitrap sono apparse nei primi anni del 2000 (Ding et al., 2007; Dunn et al., 2008; Madalinski et al., 2008)⁵⁰⁻⁵². Grazie alla HMRS è possibile rilevare metaboliti con la stessa massa nominale ma distinta massa esatta, come ad esempio specie isobariche in una matrice biologica, ed ottenere informazioni sulla composizione elementare, facilitando la ricerca nei relativi database e la successi-

va identificazione (Aharoni et al., 2002)⁴⁷. Questo ha incrementato l'utilizzo della spettrometria di massa negli studi metabolomici di tipo *untarget*. Ai giorni nostri, anche se i risultati migliori in termini di accuratezza e potere risolvete si ottengono con gli strumenti FTICR (Aharoni et al., 2002)⁴⁷, gli strumenti più utilizzati sono gli ESI-Tof e gli ESI-Orbitrap. Uno studio condotto nel campo della biologia vegetale ha riportato una comparazione tra i due modelli, concludendo che, anche se i Tof risultano migliori in termini di ripetibilità e accuratezza dello spettro, entrambi gli strumenti si possono considerare equamente efficienti per la metabolomica *untarget* se interfacciati con un sistema cromatografico (Glauser et al., 2012)⁵³.

In ambito clinico la spettrometria di massa, grazie all'elevata specificità e sensibilità strumentale, rende possibile l'analisi dei metaboliti su ridotti volumi di campione biologico (500µL di EBC o 10 µL di sangue) (Carraro et al. 2010, Rizzo et al. 2013)^{54,55} e l'identificazione di analiti presenti anche in concentrazioni molto basse, risultando adatta anche a studi in ambito pediatrico. (Mussap et al. 2013)⁵⁶

Applicazione della metabolomica nelle malattie respiratorie

Le malattie infiammatorie del polmone sono malattie complesse per la loro patogenesi, e la loro relazione tra infiammazione, segni clinici e risposta ai trattamenti. Attualmente sono disponibili e applicabili su larga scala, nuovi sofisticati metodi per quantificare l'espressione genica, le proteine e i lipidi e altri metaboliti nei polmoni, nel sangue e nelle urine. Le scienze "omiche" applicate allo studio delle malattie respiratorie comprendono la genomica, la trascrittomica, la proteomica, la lipidomica e la metabolomica. A quest'ultima branca appartiene anche la "respiromica" o "breathomics" il cui nome è nato per definire gli studi basati sulla misurazione dei composti volatili organici (VOCs) nel condensato dell'aria esalata (EBC). (Wheelock et al.,2013)⁵⁷

Questi metodi hanno il potenziale di definire le patologie ostruttive delle vie aeree in termini di disfunzione clinica, fisiologica e biologica. L'aspirazione di questi approcci è di migliorare la diagnosi di queste malattie, ad esempio definendo i fenotipi, e facilitando il monitoraggio della malattia e della terapia. Nell'ambito della ricerca hanno l'obiettivo di aiutare nella comprensione dei meccanismi molecolari e dei pathways biochimici sottostanti la malattia. I possibili biomarker della malattia possono essere selezionati preventivamente sulla base delle conoscenze pregresse, e misurati tramite specifici metodi, nell'analisi target, o ricercati tramite l'approccio "*unbias*", che utilizza piattaforme analitiche per l'analisi indiscriminata. Le principali matrici biologiche disponibili per lo studio e la scoperta delle malattie respiratorie, come riportato in una recente review, (Wheelock et al., 2013)⁵⁷ sono il tessuto intero dal polmone o le cellule isolate prelevate dal tessuto polmonare, il fluido derivante dal bronco lavaggio (BALF), lo sputo indotto o spontaneo, l'aria esalata, il condensato dell'aria esalata (EBC), il sangue (cellule, siero, plasma) e le urine. Ognuno di questi campioni presenta dei vantaggi e degli svantaggi e, a seconda del tipo di studio condotto, bisogna considerare quale è il più utile in termini di informazioni e applicazioni che si vogliono ottenere. Per esempio, il tessuto polmonare contiene informazioni per la trascrittomica, la proteomica e la metabolomica su diversi tipi di cellule, complicata però dall'analisi e dall'interpretazione dei dati, mentre l'EBC presenta un profilo proteico molto basso, quindi non adatto per studi di tipo proteomico.

L'applicazione della metabolomica nello studio delle malattie respiratorie è ai suoi inizi, se comparata a studi sul cancro o disturbi cardiovascolari. Questo approccio offre la possibilità di classificare le malattie respiratorie e i diversi fenotipi, ad esempio asma severa e non, e di identificare e monitorare uno specifico fenotipo, ad esempio monitorando uno specifico profilo o la concentrazione di determinati

metaboliti diagnostici o prognostici (Wheelock et al., 2013)⁵⁷

Molti dei primi studi metabolomici nel campo respiratorio sono stati condotti con la risonanza magnetica nucleare (NMR) per la facile applicazione e la natura non distruttiva, ma l'impiego della spettrometria di massa è in continua crescita per la sua aumentata sensibilità e specificità.

I primi approcci metabolomici applicati all'asma sono stati promettenti: uno studio condotto con l'¹H-NMR sulle urine ha portato a discriminare tra pazienti con asma stabile e con episodi di esacerbazione (Saude et al., 2011)⁵⁸. Mattarucchi nel 2012 ha classificato con successo, tramite statistica multivariata (OPLSA) applicata a campioni di urine, i bambini asmatici. Il primo modello ha differenziato i soggetti asmatici dai controlli con il 98% di accuratezza, il secondo ha distinto tra soggetti asmatici in terapia da quelli non in trattamento con un'accuratezza del 98%, il terzo ha separato soggetti asmatici in buon controllo da quelli a scarso controllo (Mattarucchi et al., 2012)⁵⁹. Lo stesso studio ha rivelato una ridotta escrezione di acido urocanico, di acido metilimidazolacetico e di un metabolita formato dagli amminoacidi Ile-Pro nei soggetti asmatici rispetto ai controlli.

Uno studio condotto da Carraro (Carraro et al., 2007)⁶⁰ ha dimostrato una maggiore capacità dell'approccio metabolomico ¹H-NMR nell'individuazione di soggetti asmatici dal profilo degli EBC rispetto all'ossido nitrico esalato (NO) e al FEV1 (con un'accuratezza dell'86% rispetto a 81%).

Un recente studio, eseguito su pazienti con COPD e soggetti sani, ha riportato che mediante l'analisi ¹H-NMR del siero è stato possibile differenziare tra COPD moderata e severa con un'accuratezza dell'82%. I soggetti con COPD si differenziavano dai controlli sani per l'inferiore concentrazione di amminoacidi ramificati (BCCA) valina e isoleucina, probabilmente risultante da una perdita di peso dovuta alla proteolisi in pazienti con cachessia, dato che è stato mostrato che gli amminoacidi

ramificati sono correlati con l'indice di massa corporea (BMI) (Ubhi et al.,2012)⁶¹
L'analisi di campioni di plasma tramite la LC/MS ha classificato la COPD enfisematosa da quella non enfisematosa con un'accuratezza del 64.3% , e l'applicazione della analisi discriminante sui primi 7 biomarkers (la cui struttura non è stata identificata nello studio) ha incrementato la classificazione con un'accuratezza del 96.5%. (Paige et al., 2011)⁶². In fine l'1H-NMR "profiling" della fibrosi cistica su campioni di EBC ha differenziato tra pazienti con fibrosi cistica stabile e instabile con un'accuratezza dell'86% (Montuschi et al., 2012)⁶³.

Inoltre la respiromica si è dimostrata efficace nell'identificare i bambini asmatici rispetto a quelli sani tramite l'analisi dell'EBC e nel caratterizzare i subfenotipi dell'asma, informazione utile a costruire una terapia farmacologica più mirata (Carraro et al., 2007)⁶⁰.

Respiromica

Il condensato dell'aria esalata (EBC, Exhaled Breath Condensate) è un biofluido che si ottiene raffreddando l'aria espirata durante respirazione spontanea. E' costituito da una complessa miscela di composti organici volatili (VOCs) in fase gassosa (Pauling et al., 1971)⁶⁴ e composti non volatili derivati dal vapor acqueo condensato e da particelle presenti in forma di aerosol (Horvath et al., 2005)⁶⁵. (Figura 6)

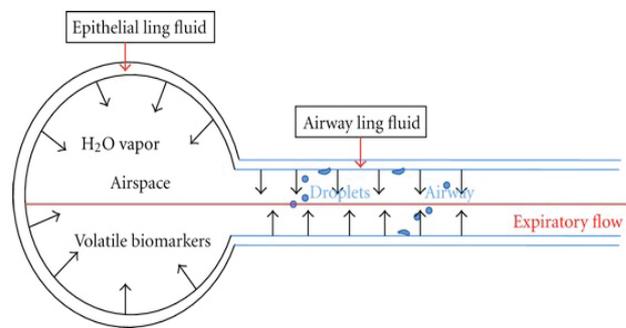


Figura 6 Schema rappresentativo dei principali componenti formanti l'EBC (Liang et al., SWJ, 2012)⁶⁶

La sua composizione rispecchia le caratteristiche del liquido di superficie delle vie aeree. L'origine dei metaboliti espirati varia, in quanto possono derivare sia dal metabolismo locale che da quello sistemico, oltre che da attività infiammatorie e ossidative.

Il vantaggio delle analisi condotte su EBC deriva principalmente dalla modalità di raccolta assolutamente non invasiva, che lo rende pertanto una matrice adatta a studi di follow up, specialmente in pazienti pediatrici.

La metabolomica associata allo studio dell'aria esalata è correntemente riferita quale *'breathomics'* o "respiromica".

La tecnica di elezione per analisi dei composti di tipo VOCs è la GC-MS (Phillips, 1997)⁶⁷ ma sono possibili analisi anche con altre sofisticate tecnologie quali la Proton Transfer Reaction associata alla spettrometria di massa (PTR-MS), la Ion

mobility-MS e la selected flow tube-MS (SIFT-MS). Inoltre la composizione molecolare combinata della miscela di gas può essere determinata tramite il “eNoses”, dispositivo basato su nanosensori che, pur non potendo identificare ogni molecola in quanto tale, individua il pattern delle loro interazioni nella miscela (D’Amico et al., 2008, Röck et al., 2008)^{68,69}.

L’EBC può essere analizzato tramite la maggior parte dei saggi biologici, per i quali il problema comune resta il limite di detection o rivelazione, date le concentrazioni estremamente basse dei metaboliti presenti. La GC-MS, oltre che per lo studio del cancro al polmone (Phillips et al., 2008)⁷⁰ è stata applicata allo studio delle patologie infiammatorie del polmone, incluse l’asma (Dallinga et al., 2008)⁷¹, la fibrosi cistica (Bennet et al., 2009)⁷² e la broncopneumopatia cronica ostruttiva o COPD (Van Berkel et al., 2010)⁷³. Un’analisi su 945 composti nell’aria esalata ha permesso un 92% di corretta classificazione tramite 8 composti estrapolati, tra bambini asmatici e non asmatici (Dallinga et al., 2008)⁷¹. Inoltre il profilo dei VOCs esalati si è visto essere associato rispettivamente ad una maggiore infiammazione eosinofila o neutrofila a seconda se si tratti di asma o COPD (Ibrahim et al., 2011; Fens et al., 2011)^{74,75}. Questo suggerisce come la respiromica sia adatta come metodo non invasivo per discriminare i diversi subfenotipi delle malattie infiammatorie delle vie aeree e possibilmente anche per il loro monitoraggio.

Inoltre la determinazione del pH, dell’adenosina e degli eicosanoidi nell’EBC ha provveduto a fornire utili informazioni riguardo i processi fisiopatologici dell’asma e della COPD (Horvath et al., 2005)⁶⁵. Recentemente un saggio multiplo per le proteine è stato applicato all’EBC, mostrando un segnale sufficiente per soggetti asmatici, se il campione è raccolto tramite un metodo di ricircolo del condensato dell’aria espirata. (Robroeks et al., 2010)¹¹⁰

Ad oggi la tecnica analitica più utilizzata associata all’analisi metabolomica dell’EBC

è l’NMR, che si dimostra una tecnica analitica robusta, pur coi limiti della maggior quantità di campione richiesta per questa analisi, dovuto a una minore sensibilità se confrontata alla HRMS. Recenti lavori hanno mostrato la possibilità di definire il profilo metabolico dell’EBC, permettendo di discriminare tra asma, COPD, e fibrosi cistica (Carraro et al. 2007, Van Berkel, 2010, Bennet et al. 2009)^{60,73,72}. Questi studi suggeriscono che l’analisi metabolica dei composti volatili e non volatili nel respiro esalato, sottoposta a validazione per determinarne l’accuratezza, può essere utilizzata come mezzo diagnostico.

Workflow in Metabolomica

Un tipico workflow in metabolomica (Figura 7) prevede il disegno dello studio sperimentale, la raccolta e la preparazione del campione, l’analisi in MS, l’estrazione e l’elaborazione dei dati, l’analisi statistica e l’identificazione di biomarkers e relativi pathways biologici.

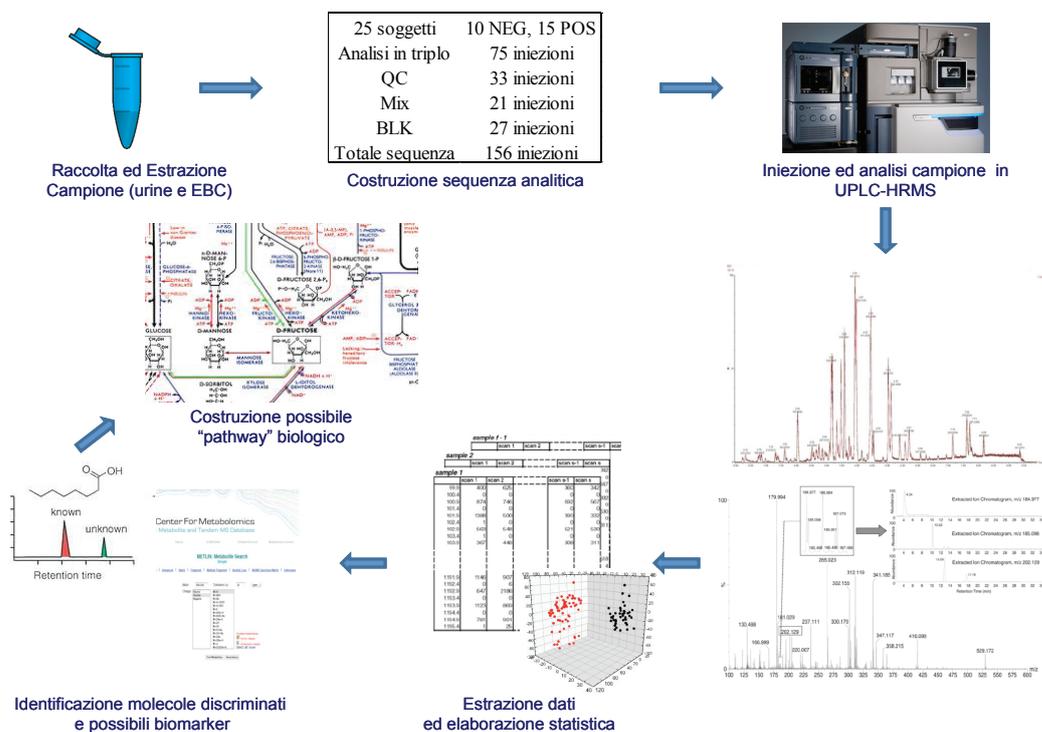


Figura 7 Tipico “metabolomic workflow”

Disegno dello studio sperimentale

Sono stati pubblicati alcuni protocolli specifici per gli studi metabolomici eseguiti su diverse matrici biologiche, quali urine, plasma o siero, e tessuti (Zelena et al.,2009; Dunn et al.,2011, Want et al.,2010; Want et al.,2012)⁷⁶⁻⁷⁹. Un adeguato disegno dello studio è infatti necessario per prevenire o gestire fattori che potrebbero artificialmente correlare con fattori biologici, portando così ad un'errata interpretazione dei dati. Questi artefatti possono derivare da condizioni analitiche (es. effetti del batch analitico, o bias indotti dalla contaminazione della sorgente per analisi effettuate alla fine del batch) o da condizioni biologiche quali parametri fisiologici come l'età, il genere, l'indice di massa corporea (Junot et al., 2013)⁴⁹. L'impatto di questi fattori può essere ridotto randomizzando le analisi dei campioni biologici all'interno di un batch e bilanciando i diversi gruppi che compongono la coorte di campioni. Inoltre è stato proposto l'uso di controlli di qualità dei campioni (QC) per correggere i bias analitici. Questi QC consistono in un pool rappresentativo dei campioni da analizzare, e vengono iniettati più volte durante il batch d'analisi per monitorare il profilo cromatografico medio e per valutare la risposta strumentale durante il batch d'analisi. (Sangster et al., 2006; Dunn et al., 2011;., 2007; Want et al., 2010)^{80,77,78}.

Preparazione e analisi dei campioni

A seconda della matrice biologica analizzata, i campioni possono essere trattati prima dell'analisi, ad esempio effettuando la precipitazione di proteine, la rimozione dei lipidi, la concentrazione o diluizione del campione.

L'analisi MS è spesso associata alla cromatografia liquida (LC) e notevoli miglioramenti sono stati apportati in questo campo, dalla velocità di acquisizione all'elaborazione dei dati per renderla adattabile a studi in HRMS. Tra questi troviamo

l'impiego di nuove colonne monolitiche o con tecnologia *core-shell*. Il miglioramento più diffuso e utilizzato resta la riduzione delle particelle della fase stazionaria (1.7 μ m), e lo sviluppo della cromatografia liquida ad alta prestazione (UPLC), che ha ridotto i tempi di analisi e incrementato la risoluzione cromatografica, e di conseguenza la sensibilità (Wilson et al.,2005)⁸¹. Inoltre sono stati sviluppati e ottimizzati dei metodi anche per l'analisi di composti altamente idrofilici, come derivati degli zuccheri o acidi e basi alifatici, utilizzando nuove colonne a fase stazionaria idrofila quali le HILIC (Yanes et al.,2011)⁸² e ottimizzando la composizione delle fasi mobili. La cromatografia liquida a fase inversa o organica (RP), i cui meccanismi di separazione sono ben conosciuti e studiati da lungo tempo, resta comunque la tecnica più utilizzata attualmente e la più riproducibile, adatta all'analisi di una grande quantità di composti, principalmente a bassa o moderata polarità, e di matrici biologiche. (Kirkland et al.2004; Stella et al.,2007, Zelena et al.,2009)⁸³⁻⁸⁵.

Estrazione dei dati

Dopo l'analisi dei campioni, i dati acquisiti sono processati tramite software commerciali o *open-access* che eseguono la rivelazione dei picchi e l'allineamento sulla base dei rapporti m/z e del tempo di ritenzione (RT). Essi forniscono una matrice di dati contenente l'RT, l'm/z, e l'intensità o l'area di ogni variabile (intensità del picco nello spettro o area cromatografica) nel campione (Lommen, 2009; Pluskal et al., 2010)^{86,87}.

Prima di procedere all'elaborazione statistica è utile eliminare il rumore di fondo o segnali di possibili contaminanti presenti nei Blank; mentre i QC sono necessari per valutare i parametri da utilizzare per estrarre le variabili nei campioni ed eseguire una normalizzazione dei dati. Per rendere l'LC/MS un approccio sempre più riproducibile nell'analisi di un grande numero di campioni sono stati sviluppati e imple-

mentati gli algoritmi necessari alla normalizzazione intra- ed inter-batch (Vaughan et al., 2012; Wang et al., 2013)^{88,89}.

Analisi statistica multivariata

Una volta estrapolata la matrice di dati, contenente la lista degli ioni, si deve procedere all'interpretazione dei dati (*data mining*) allo scopo di sottolineare i metaboliti d'interesse biologico; questo è possibile grazie ai *tools* statistici e visualizzazioni grafiche che aiutano nell'interpretazione biologica e clinica dei dati. I modelli statistici solitamente applicati, (in ambito biomedico e biologico sono i test *t*-Student o ANOVA), possono risultare non ideali quando si ha un grande set di variabili con poche osservazioni, dato che questi sono adatti all'elaborazione di poche variabili relative ad un numero elevato di osservazioni. Nello studio metabolomico invece si ottengono un numero elevato di variabili solitamente con un numero ristretto di osservazioni, che, con le tecniche classiche, porterebbe ad un aumento del rischio di risultati spuri, ossia con una significatività dovuta al caso che cresce esponenzialmente con il numero delle variabili (Strimmer,2008; Eriksson et al., Umometrics 2006)^{90,91}. Nella maggior parte degli studi si preferisce quindi impiegare l'analisi statistica multivariata quale ad esempio la Principal Component Analysis (PCA) o la Proiezione Ortogonale delle Strutture Latenti (OPLS, OPLS-DA), per la capacità di visualizzare ed elaborare i dati in multidimensione (Trygg et al.,2007)⁹².

La prima analisi statistica applicata ai dati in questi studi è la PCA. Questa tecnica è uno strumento potente in grado, tramite semplici trasformazioni matematiche applicate ai dati, di guardare tutte le variabili nel loro insieme e di rivelare, tramite una visualizzazione grafica, la distribuzione e la possibile differenziazione dei gruppi coinvolti. È un'analisi detta *unsupervised*, in quanto fornisce un quadro di quello che realmente c'è nel campione senza essere guidata a priori dalle informazioni

fornite dall'operatore; converte la tabella dei dati in due grafici nominati *scores and loadings plots*.

Lo *score plot* è una sintesi della relazione tra le osservazioni, il *loading plot* similmente è una sintesi delle variabili, ed è un mezzo per interpretare il *pattern* o la distribuzione vista nello *score plot*; i due grafici sono complementari e sovrapponibili e la direzione in un *plot* corrisponde alla stessa direzione nell'altro grafico (Eriksson et al. 2006)⁹¹. Questa tecnica permette di monitorare il trend dei dati, sottolineare gli outliers, verificare i controlli di qualità e le diversità biologiche. In Figura 8 è riportato un esempio di lettura dei due grafici.

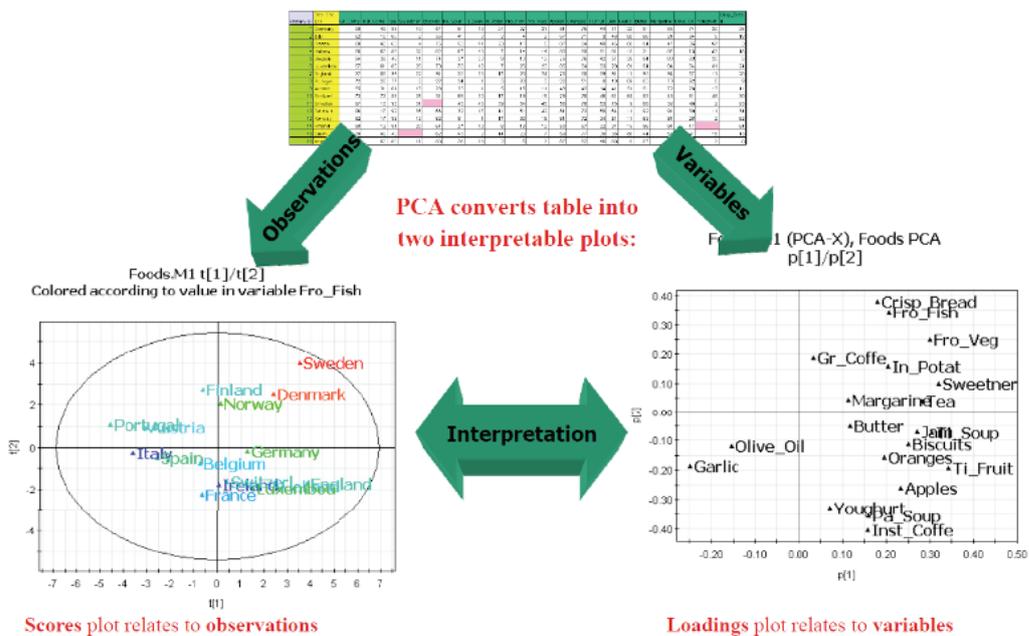


Figura 8 Schema rappresentativo dei due grafici derivati dall'analisi PCA della matrice dei dati (Eriksson, Umometrics, 2006)⁹¹

Una volta ottenuta questa *overview* dei dati si può procedere a tecniche di classificazione e discriminazione quali la PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis) e la OPLSA-DA (Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis). Questi tools permettono di ottenere la discriminazione dei gruppi, di estrapolare i biomarkers putativi e di costruire i modelli di classificazione per futuri campioni, e possono essere viste come dei modelli di regressione estesi alla PCA con lo scopo di predire i responsi “Y” dati i fattori “X” per nuove osservazioni.

Tutte e tre le tecniche dal punto di vista matematico relazionano con il concetto di proiezione delle osservazioni in un nuovo piano, o iperpiano, da cui sono ricavate le componenti latenti, ossia le caratteristiche principali in grado di spiegare la correlazione e la varianza presente nelle osservazioni. Si ottiene un numero limitato di componenti latenti con un diverso “peso”, ossia la prima componente ottenuta è quella che spiega la massima varianza tra i dati, e le altre componenti seguono in ordine decrescente di spiegazione della varianza. (Eriksson et al., *Umemetrics* 2006)⁹¹

Sui dati ottenuti e sui modelli costruiti si applicano delle analisi di validazione quale il test di permutazione dei responsi, per valutare se il modello estrapolato sia affetto da casualità e overfitting. L’analisi discriminante permette invece di ottenere i valori di R² e Q². Questi due valori indicano rispettivamente quanto il modello spieghi la varianza tra i dati, e quanto il modello abbia valore predittivo. (i valori sono compresi da 0 e 1). Al modello costruito si può applicare il cosiddetto *S plot*, un grafico in cui ciascuna variabile descrittiva del modello costruito viene rappresentata in base alla sua correlazione e alla sua covarianza rispetto allo score predittivo del modello, ed indica, tramite una visualizzazione grafica, quali variabili determinano la separazione dei gruppi in esame.

I dati, prima di essere processati con queste tecniche proiettive, sono sottoposti

allo *scaling* e alla *centratura*, ossia sono normalizzati in modo tale che tutti i dati abbiano la stessa “scala” di misura e la stessa origine o punto di riferimento.

Identificazione di biomarkers e pathways biologici

Prodotto finale dell’elaborazione statistica è una lista di metaboliti discriminanti o caratteristici, descritti da m/z e RT. Al fine di identificare la corrispondenza tra i metaboliti discriminanti, e nome e struttura dei possibili biomarkers, è necessario eseguire una ricerca in appositi database. Confrontando le masse esatte ottenute dai dati sperimentali con quelle contenute nei database metabolici quali HMDB (Wishart et al., 2007, 2013)^{93,94}, Metlin (Smith et al., 2005)⁹⁵, KEGG (Kanehisa & Goto, 2000)⁹⁶ e PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)⁹⁷, che contengono informazioni sia sulla massa accurata che sul tempo di ritenzione, è possibile individuare le caratteristiche metaboliche degli ioni rilevati. Ulteriore possibilità è quella di formulare delle ipotesi strutturali per le masse che non sono contenute nei database, che dovranno poi essere confermate da esperimenti in MS/MS o MSn.

L’identificazione dei metaboliti richiede l’uso di altre tecniche complementari come l’MS/MS ma anche la risonanza magnetica nucleare (NMR) e altre tecniche spettroscopiche quali l’infrarosso (IR) e l’ultravioletto (UV). Queste tecniche richiedono tempo in termini di purificazione ed estrazione dei metaboliti dai campioni, processi tra l’altro non sempre possibili se la quantità di campione disponibile è limitata. Per questo in molti casi la MS è l’unica tecnica disponibile e l’identificazione del composto rimane perciò parziale.

Nonostante i progressi ottenuti nell’identificazione dei metaboliti grazie alla HRMS è pertanto riconosciuto dalla comunità scientifica che l’identificazione dei composti rimane *il collo di bottiglia* della metabolomica e in letteratura troviamo

più di un articolo che affronta questo problema (Werner et al.,2008; Bowen & Northen, 2010; Hegeman, 2010; Neumann & Bocker, 2010; Wishart, 2011)⁹⁸⁻¹⁰². Numerose sono le ricerche rivolte allo sviluppo di nuovi *tools* informatici per il confronto e l'interpretazione dei dati provenienti dagli spettri e per la creazione di nuovi database (es. MetaboLights) (Steinbeck et al.,2012)¹⁰³. Attualmente i database utilizzati quali HMDB104, Metlin105, Mass Bank106, e Lipid Maps107 permettono il confronto con le masse di riferimento anche se gli spettri sono ricavati da differenti strumenti, e restano una buona base per la ricerca ed identificazione dei composti, come suggerito da più studi (Wishart et al.,2007, 2013; Smith et al.,2005; Horai et al.,2010; Fahy et al.,2009)^{93-95,108,109}.

Bibliografia

1. Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol*. 2008 Mar;8(3):183-92
2. Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Drazen JM, FitzGerald M, Gibson P, Ohta K, ØByrne P, Pedersen SE, Pizzichini E, Sullivan SD, Wenzel SE, Zar HJ. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J*. 2008 Jan;31(1):143-78.
3. Global Initiative for Asthma (GINA). 2010. Global strategy for asthma management and prevention. www.ginaasthma.org
4. DATA Monitor. 2006. Pipeline insight asthma/COPD: target therapies on the horizon. www.datamonitor.com
5. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C, Zielinski J; Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007
6. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. www.goldcopd.org
7. Holt PG, Sly PD. Non-atopic intrinsic asthma and the 'family tree' of chronic respiratory disease syndromes. *Clin Exp Allergy* 2009; 39: 807.
8. Baraldi E, Filippone M. Chronic lung disease after premature birth. *N Engl J Med*. 2007 Nov 8;357(19):1946-55.
9. Broström EB, Thunqvist P, Adenfelt G, Borling E, Katz-Salamon M. Obstructive lung disease in children with mild to severe BPD. *n Respir Med*. 2010 Mar;104(3):362-70
10. Jacob SV, Coates AL, Lands LC, MacNeish CF, Riley SP, Hornby L, Outerbridge EW, Davis GM, Williams RL. Long-term pulmonary sequelae of severe bronchopulmonary dysplasia *J Pediatr*. 1998 Aug;133(2):193-200.
11. Baraldi E, Carraro S, Filippone M. Bronchopulmonary dysplasia: definitions and long-term respiratory outcome. *Early Hum Dev*. 2009 Oct;85(10 Suppl):S1-3.
12. Stern DA, Morgan WJ, Halonen M, Wright AL, Martinez FD. Wheezing and bronchial hyper-responsiveness in early childhood as predictors of newly diagnosed asthma in early adulthood: a longitudinal birth-cohort study. *Lancet* 2008; 372: 1
13. Werner E, Heilier JF, Ducruix C, Ezan E, Junot C, Tabet JC. Mass spectrometry for the identification of the discriminating signals from metabolomics: current status and future trends. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* . 2008 871(2):143–163.
14. Ardrey B. *Liquid Chromatography –Mass Spectrometry:an introduction*. Ed. Wiley, 2003
15. Kitteringham NR, Jenkins RE, Lane CS, Elliot VL, Park BK. Multiple reaction monitoring for quantitative biomarker analysis in proteomics and metabolomics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009 877:1229–1239
16. Han X, Gross RW. Shotgun lipidomics: Electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples. *Mass Spectrom Rev* 2005a 24(3):367–412.
17. Lafaye A, Junot C, Ramounet-Le GB, Fritsch P, Ezan E, Tabet JC. Profiling of sulfoconjugates in urine by using precursor ion and neutral loss scans in tandem mass spectrometry. *Applica-*

- tion to the investigation of heavy metal toxicity in rats. *J Mass Spectrom* 2004 39(6):655–664.
18. McClellan JE, Quarmby ST, Yost RA. Parent and neutral loss monitoring on a quadrupole ion trap mass spectrometer: Screening of acylcarnitines in complex mixtures. *Anal Chem* 2002 74(22):5799–5806.
 19. Bajad SU, Lu WY, Kimball EH, Yuan J, Peterson C, Rabinowitz JD. Separation and quantitation of water soluble cellular metabolites by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2006 1125(1):76–88
 20. Gucciardi A, Pirillo P, Di Gangi IM, Naturale M, Giordano G. A rapid UPLC-MS/MS method for simultaneous separation of 48 acylcarnitines in dried blood spots and plasma useful as a second-tier test for expanded newborn screening *Anal Bioanal Chem.* 2012 Aug;404(3):741-51.
 21. Nicholson JK, Wilson ID. Opinion: understanding “global” system biology: metabonomics and the continuum of metabolism. *Nat. Rev. Drug Discovery* 2003; 668-76.
 22. Schnackenberg LK, Beger RD. Monitoring the health to disease continuum with global metabolic profiling and systems biology. *Pharmacogenomics.* 2006 Oct;7(7):1077-86
 23. Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F. 1998. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol* 16(9):373–377 Carraro S, Giordano G., Reniero F., Perilongo G., Baraldi E. Metabolomics: A New Frontier for Research in Pediatrics. *J. Pediatr* 2009;154:638-44
 24. Nicholson JK, Lindon JC: Systems biology: Metabonomics. *Nature* 2008; 455: 1054-1056
 25. Nicholson J. Global system biology, personalized medicine and molecular epidemiology. *Mol Syst Biol* 2006; 2:52.
 26. Carraro S, Giordano G., Reniero F., Perilongo G., Baraldi E. Metabolomics: A New Frontier for Research in Pediatrics. *J. Pediatr* 2009;154:638-44
 27. Ryan D, Robards K: Metabolomics: the greatest omics of them all? *Anal Chem* 2006; 78: 7954-7958.
 28. Nordström A, Lewensohn R: Metabolomics: moving to the clinic. *J Neuroimmune Pharmacol* 2010; 5: 4-17.
 29. Holmes E, Wilson ID, Nicholson JK.. Metabolic phenotyping in health and disease. *Cell* 2008 134(5):714–717.
 30. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E ‘Metabonomics’: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica.* 1999 Nov;29(11):1181-9.
 31. Viant MR. 2008. Recent developments in environmental metabolomics. *Mol Biosyst* 4(10):980–986.
 32. Saito K, Matsuda F. 2010. Metabolomics for functional genomics, systems biology, and biotechnology. *Annu Rev Plant Biol* 61:463–489.
 33. McNiven EM, German JB, Slupsky CM. 2011. Analytical metabolomics: Nutritional opportunities for personalized health. *J Nutr Biochem* 22(11):995–1002.
 34. Nicholson JK, Holmes E, Kinross JM, Darzi AW, Takats Z, Lindon JC. 2012. Metabolic phenotyping in clinical and surgical environments. *Nature* 491(7424):384–392.
 35. Robertson DG, Watkins PB, Reily MD. 2011. Metabolomics in toxicology: preclinical and clinical applications. *Toxicol Sci* 120(Suppl 1):S146–S170.
 36. Wei R. 2011. Metabolomics and its practical value in pharmaceutical industry. *Curr Drug Metab* 12(4):345–358.

37. Wikoff W, Gangoi J, Barshop B, Siuzdak G. Metabolomics identifies perturbations in human disorders of propionate metabolism. *Clin Chem* 2007;53:2169-76.
38. Kawashima H, Oguchi M, Ioi H, Amaha M, Yamanaka G, Kashiwagi Y, et al. Primary biomarkers in cerebral spinal fluid obtained from patients with influenza associated encephalopathy analyzed by metabolomics. *Int J Neurosci* 2006;116:927-36.
39. Fanos V, Antonucci R, Barberini L, Noto A, Atzori L. Clinical application of metabolomics in neonatology. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; 25 Suppl 1: 104.
40. Atzori L, Antonucci R, Barberini L, Locci E, Marincola FC, Scano P, Cortesi P, Agostiniani R, Defraia R, Weljie A, Gazzolo D, Lai A, Fanos V. ¹H NMR-based metabolomic analysis of urine from preterm and term neonates. *Front Biosci (Elite Ed)* 2011; 3: 1005.
41. Oresic M, Simell S, Sysi-Aho M, Nanto-Salonen K, Seppanen-Laakso T, Parikka V, Katajamaa M, Hekkala A, Mattila I, Keskinen P, Yetukuri L, Reinikainen A, Lahde J, Suortti T, Hakalax J, Simell T, Hyoty H, Veijola R, Ilonen J, Lahesmaa R, Knip M, Simell O. Dysregulation of lipid and amino acid metabolism precedes islet autoimmunity in children who later progress to type 1 diabetes. *J Exp Med* 2008; 205: 2975.
42. Deja S, Barg E, Mlynarz P, Basiak A, Willak-Janc E. (¹H NMR-based metabolomics studies of urine reveal differences between type 1 diabetic patients with high and low HbA_{1c} values. *J Pharm Biomed Anal* 2013; 83: 43.
43. Wei H, Pasman W, Rubingh C, Wopereis S, Tienstra M, Schroen J, Wang M, Verheij E, van der Greef J. Urine metabolomics combined with the personalized diagnosis guided by Chinese medicine reveals subtypes of pre-diabetes. *Mol Biosyst* 2012; 8: 1482.
44. Francavilla R, Calasso M, Calace L, Siragusa S, Ndagijimana M, Vernocchi P, Brunetti L, Mancino G, Tedeschi G, Guerzoni E, Indrio F, Laghi L, Miniello VL, Gobetti M, De Angelis M. Effect of lactose on gut microbiota and metabolome of infants with cow's milk allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 2012; 23:420
45. Sellitto M, Bai G, Serena G, Fricke WF, Sturgeon C, Gajer P, White JR, Koenig SS, Sakamoto J, Boothe D, Gicquelais R, Kryszak D, Puppa E, Catassi C, Ravel J, Fasano A. Proof of concept of microbiome-metabolome analysis and delayed gluten exposure on celiac disease autoimmunity in genetically at-risk infants. *PLoS One* 2012; 7: e33387.
46. Price KE, Pearce RE, Garg UC, Heese BA, Smith LD, Sullivan JE, Kennedy MJ, Bale JF, Jr, Ward RM, Chang TK, Abbott FS, Leeder JS. Effects of valproic acid on organic acid metabolism in children: a metabolic profiling study. *Clin Pharmacol Ther* 2011; 89: 867.
47. Aharoni A, Ric DV, Verhoeven HA, Maliepaard CA, Kruppa G, Bino R, Goodenowe DB. Nontargeted metabolome analysis by use of Fourier transform ion cyclotron mass spectrometry. *OMICS* 2002 6(3):217-234.
48. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. 2007. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev* 26(1):51-78.
49. Junot C, Fenaille F, Colsch B, Bécher F. High resolution mass spectrometry based techniques at the crossroads of metabolic pathways. *Mass Spectrom Rev*. 2013 Nov 28.
50. Ding J, Sorensen CM, Zhang Q, Jiang H, Jaitly N, Livesay EA, Shen Y, Smith RD, Metz TO. Capillary LC coupled with high-mass measurement accuracy mass spectrometry for metabolic profiling. *Anal Chem* . 2007 79(16):6081-6093.
51. Dunn WB, Broadhurst D, Brown M, Baker PN, Redman CW, Kenny LC, Kell DB. Metabolic profiling of serum using Ultra Performance Liquid Chromatography and the LTQ-Orbitrap mass

- spectrometry system. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008 871(2):288–298.
52. Madalinski G, Godat E, Alves S, Lesage D, Genin E, Levi P, Labarre J, Tabet JC, Ezan E, Junot C. Direct introduction of biological samples into a LTQ-Orbitrap hybrid mass spectrometer as a tool for fast metabolome analysis. *2008 Anal Chem* 80(9):3291–3303.
 53. Glauser G, Veyrat N, Rochat B, Wolfender JL, Turlings TC. 2012. Ultra-high pressure liquid chromatography-mass spectrometry for plant metabolomics: A lution quadrupole-time-of-flight and single stage Orbitrap mass spectrometers. *J Chromatogr A* 1292:151–159.
 54. Carraro S, Cogo PE, Isak I, Simonato M, Corradi M, Carnielli VP, Baraldi E. EIA and GC/MS analysis of 8-isoprostane in EBC of children with problematic asthma. *Eur Respir J*. 2010 Jun;35(6):1364-9.
 55. Rizzo C, Boenzi S, Inglese R, la Marca G, Muraca M, Martinez TB, Johnson DW, Zelli E, Dionisi-Vici C. Measurement of succinyl-carnitine and methylmalonyl-carnitine on dried blood spot by liquid chromatography-tandem mass spectrometry *Clin Chim Acta*. 2013 Nov 22;429C:30-33.
 56. Mussap M, Antonucci R, Noto A, Fanos V. The role of metabolomics in neonatal and pediatric laboratory medicine. *Clin Chim Acta*. 2013 Nov 15;426:127-38.
 57. Wheelock CE, Goss VM, Balgoma D, Nicholas B, Brandsma J, Skipp PJ, Snowden S, Burg D, D'Amico A, Horvath I, Chaiboonchoe A, Ahmed H, Ballereau S, Rossios C, Chung KF, Montuschi P, Fowler SJ, Adcock IM, Postle AD, Dahlen SE, Rowe A, Sterk PJ, Auffray C, Djukanovic R, U-BIOPRED Study Group. Application of 'omics technologies to biomarker discovery in inflammatory lung diseases. *Eur Respir J* 2013; 42: 802.
 58. Saude EJ, Skappak CD, Regush S, et al. Metabolomic profiling of asthma: diagnostic utility of urine nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 757–764.
 59. Mattarucchi E, Baraldi E, Guillou C. Metabolomics applied to urine samples in childhood asthma; differentiation between asthma phenotypes and identification of relevant metabolites. *Biomed Chromatogr* 2012; 26: 89–94.
 60. Carraro S, Rezzi S, Reniero F, et al. Metabolomics applied to exhaled breath condensate in childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 986–990.
 61. Ubhi BK, Riley JH, Shaw PA, et al. Metabolic profiling detects biomarkers of protein degradation in COPD patients. *Eur Respir J* 2012; 40: 345–355.
 62. Paige M, Burdick MD, Kim S, et al. Pilot analysis of the plasma metabolite profiles associated with emphysematous chronic obstructive pulmonary disease phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 413: 588–593.
 63. Montuschi P, Paris D, Melck D, et al. NMR spectroscopy metabolomic profiling of exhaled breath condensate in patients with stable and unstable cystic fibrosis. *Thorax* 2012; 67: 222–228.
 64. Pauling L, Robinson A, Teranishi RR, et al. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 2374–2376.
 65. Horvath I, Hunt J, Barnes PJ, et al. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 2005; 26: 523–548
 66. Liang Y, Yeligar SM, Brown LA. Exhaled breath condensate: a promising source for biomarkers of lung disease. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:217518
 67. Phillips M. Method for the collection and assay of volatile organic compounds in breath. *Anal Biochem* 1997; 247: 272–278

68. D'Amico A, Di Natale C, Paolesse R, et al. Olfactory systems for medical applications. *Sensor Actuat B: Chemical* 2008; 130: 458–465
69. Röck F, Barsan N, Weimar U. Electronic nose: current status and future trends. *Chem Rev* 2008; 108: 705–713.
70. Phillips M, Altorki N, Austin JH, et al. Detection of lung cancer using weighted digital analysis of breath biomarkers. *Clin Chim Acta* 2008; 393: 76–84.
71. Dallinga JW, Robroeks CM, van Berkel JJ, et al. Volatile organic compounds in exhaled breath as a diagnostic tool for asthma in children. *Clin Exp Allergy* 2010; 40: 68–76.
72. Bennett L, Ciaffoni L, Denzer W, et al. A chemometric study on human breath mass spectra for biomarker identification in cystic fibrosis. *J Breath Res* 2009; 3: 046002.
73. Van Berkel JJ, Dallinga JW, Möller GM, et al. A profile of volatile organic compounds in breath discriminates COPD patients from controls. *Respir Med* 2010; 104: 557–563
74. Ibrahim B, Basanta M, Cadden P, et al. Non-invasive phenotyping using exhaled volatile organic compounds in asthma. *Thorax* 2011
75. Fens N, de Nijs SB, Peters S, et al. Exhaled air molecular profiling in relation to inflammatory subtype and activity in COPD. *Eur Respir J* 2011; 38: 1301–1309.
76. Zelena E, Dunn WB, Broadhurst D, Francis-McIntyre S, Carroll KM, Begley P, O'Hagan S, Knowles JD, Halsall A, Wilson ID, Kell DB. Development of a robust and repeatable UPLC-MS method for the long-term metabolomic study of human serum. *2009 Anal Chem* 81(4):1357–1364
77. Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-McIntyre S, Anderson N, Brown M, Knowles JD, Halsall A, Haselden JN, Nicholls AW, Wilson ID, Kell DB, Goodacre R. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc* 2011 6(7):1060–1083.
78. Want EJ, Wilson ID, Gika H, Theodoridis G, Plumb RS, Shockcor J, Holmes E, Nicholson JK. Global metabolic profiling procedures for urine using UPLC-MS. *Nat Protoc* 2010 5(6):1005–1018.
79. Want EJ, Masson P, Michopoulos F, Wilson ID, Theodoridis G, Plumb RS, Shockcor J, Loftus N, Holmes E, Nicholson JK. Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS. *Nat Protoc* 2012 8(1):17–32.
80. Sangster T, Major H, Plumb R, Wilson AJ, Wilson ID. A pragmatic and readily implemented quality control strategy for HPLC-MS and GC-MS-based metabolomic analysis. *Analyst* 2006 131(10):1075–1078.
81. Wilson ID, Nicholson JK, Castro-Perez J, Granger JH, Johnson KA, Smith BW, Plumb RS. High resolution “ultra performance” liquid chromatography coupled to oa-TOF mass spectrometry as a tool for differential metabolic pathway profiling in functional genomic studies. *J Proteome Res* 2005 4(2):591–598.
82. Yanes O, Tautenhahn R, Patti GJ, Siuzdak G. 2011. Expanding coverage of the metabolome for global metabolite profiling. *Anal Chem* 83(6):2152–2161.
83. Kirkland JJ. Development of some stationary phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2004.1060:9–21.
84. Stella C, Rudaz S, Gauvrit JY, Lantéri P, Huteau A, Tchaplà A, Veuthey JL. Characterization and comparison of the chromatographic performance of different types of reversed-phase stationary phases. *J Pharm Biomed Anal* 2007 43:89–98

85. Zelena E, Dunn WB, Broadhurst D, Francis-McIntyre S, Carroll KM, Begley P, O'Hagan S, Knowles JD, Halsall A, Wilson ID, Kell DB. Development of a robust and repeatable UPLC-MS method for the long-term metabolomic study of human serum. *Anal Chem* 2009 81(4):1357–1364.
86. Lommen A. 2009. MetAlign: Interface-driven, versatile metabolomics tool for hyphenated full-scan mass spectrometry data preprocessing. *Anal Chem* 81(8):3079–3086.
87. Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Oresic M. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* . 2010 11:395–406.
88. Vaughan AA, Dunn WB, Allwood JW, Wedge DC, Blackhall FH, Whetton AD, Dive C, Goodacre R. Liquid chromatography-mass spectrometry calibration transfer and metabolomics data fusion. *Anal Chem* 2012 84(22):9848–9857.
89. Wang SY, Kuo CH, Tseng YJ. Batch normalizer: A fast total abundance regression calibration method to simultaneously adjust batch and injection order effects in liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry-based metabolomics data and comparison with current calibration methods. *Anal Chem* . 2013 85:1037–1046.
90. Strimmer K. A unified approach to false discovery rate estimation. *BMC Bioinformatics* 2008 9:1–14.
91. Eriksson L, Johansson E., n, Kettaneh-Wold, j.Trigg, C. Wikstrom, and S.Wold. Multi-and Megavariate Data Analysis, Part I Basic Principles and Applications, Umometrics Academy, 2006 January
92. Trygg J, Holmes E, Lundstedt T. Chemometrics in metabolomics. *J Proteome Res* . 2007 6(2):469–479
93. Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, Cheng D, Jewell K, Arndt D, Sawhney S, Fung C, Nikolai L, Lewis M, Coutouly MA, Forsythe I, Tang P, Shrivastava S, Jeroncic K, Stothard P, Amegbey G, Block D, Hau DD, Wagner J, Miniaci J, Clements M, Gebremedhin M, Guo N, Zhang Y, Duggan GE, Macinnis GD, Weljie AM, Dowlatabadi R, Bamforth F, Clive D, Greiner R, Li L, Marrie T, Sykes BD, Vogel HJ, Querengesser L. 2007. HMDB: The Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res* 35(Database issue):D521–D526.
94. Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y, Djoumbou Y, Mandal R, Aziat F, Dong E, Bouatra S, Sinelnikov I, Arndt D, Xia J, Liu P, Yallou F, Bjorndahl T, Perez-Pineiro R, Eisner R, Allen F, Neveu V, Greiner R, Scalbert A. HMDB 3.0—The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res* 2013 41(D1):D801–D807.
95. Smith CA, O'Maille G, Want EJ, Qin C, Trauger SA, Brandon TR, Custodio DE, Abagyan R, Siuzdak G. METLIN: A metabolite mass spectral database. *Ther Drug Monit* 2005 27(6):747–751.
96. Kanehisa M, Goto S. 2000. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 28(1):27–30.
97. The PubChem Project <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
98. Werner E, Heilier JF, Ducruix C, Ezan E, Junot C, Tabet JC. Mass spectrometry for the identification of the discriminating signals from metabolomics: current status and future trends. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008 871(2):143–163.
99. Bowen BP, Northen TR. Dealing with the unknown: metabolomics and metabolite atlases. *J Am Soc Mass Spectrom* 2010 21(9):1471–1476.

100. Hegeman AD. Plant metabolomics—Meeting the analytical challenges of comprehensive metabolite analysis. *Brief Funct Genomics* 2010 9(2):139–148.
101. Neumann S, Bocker S. Computational mass spectrometry for metabolomics: Identification of metabolites and small molecules. *Anal Bioanal Chem* 2010 398(7–8):2779–2788.
102. Wishart DS. Advances in metabolite identification. *Bioanalysis* 2011 3(15):1769–1782.
103. Steinbeck C, Conesa P, Haug K, Mahendraker T, Williams M, Maguire E, Rocca-Serra P, Sansone SA, Salek RM, Griffin JL. MetaboLights: Towards a new COSMOS of metabolomics data management. *Metabolomics* 2012 8(5):757–760.
104. Human Metabolome Database (HMDB) <http://www.hmdb.ca/>
105. Scripps Center For Metabolomics and Mass Spectrometry METLIN <http://metlin.scripps.edu/index.php>
106. MassBanks Database <http://www.massbank.jp/en/database.html>
107. Lipid MAPS <http://www.lipidmaps.org/>
108. Horai H, Arita M, Kanaya S, Nihei Y, Ikeda T, Suwa K, Ojima Y, Tanaka K, Tanaka S, Aoshima K, Oda Y, Kakazu Y, Kusano M, Tohge T, Matsuda F, Sawada Y, Hirai MY, Nakanishi H, Ikeda K, Akimoto N, Maoka T, Takahashi H, Ara T, Sakurai N, Suzuki H, Shibata D, Neumann S, Iida T, Tanaka K, Funatsu K, Matsuura F, Soga T, Taguchi R, Saito K, Nishioka T. MassBank: A public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *J Mass Spectrom* 2010 45(7):703–714.
109. Fahy E, Subramaniam S, Murphy RC, Nishijima M, Raetz CR, Shimizu T, Spener F, van MG, Wakelam MJ, Dennis EA. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* . 2009 (50 Suppl):S9–S14.
110. Robroeks CM, Rijkers GT, Jöbsis Q, Hendriks HJ, Damoiseaux JG, Zimmermann LJ, van Schayck OP, Dompeling E. Increased cytokines, chemokines and soluble adhesion molecules in exhaled breath condensate of asthmatic children. *Clin Exp Allergy*. 2010 Jan;40(1):77-84

OBIETTIVI DEL PROGETTO DI RICERCA E PRINCIPALI RISULTATI

Obiettivo generale del progetto di ricerca è stato lo studio delle malattie respiratorie ostruttive del bambino tramite l'utilizzo della spettrometria di massa .

Il progetto di ricerca si è articolato nei seguenti studi:

1) Applicazione della respiromica allo studio della displasia bronco-polmonare (BPD)

L'obiettivo di questo studio è stato di investigare i meccanismi patologici alla base della BPD applicando uno studio metabolomico al condensato dell'aria esalata (EBC). Sono stati analizzati gli EBC di adolescenti con diagnosi di BPD alla nascita e adolescenti sani, per caratterizzare, attraverso la spettrometria di massa ad alta risoluzione, i profili biochimico-metabolici dei due gruppi in esame e valutare se la funzionalità respiratoria ridotta riscontrata nei soggetti con BPD possa correlare con un differente profilo metabolico rispetto a soggetti sani.

I campioni sono stati analizzati con lo spettrometro di massa LTQ-OrbiTrap e processati tramite analisi statistica multivariata.

I risultati ottenuti hanno mostrato che è possibile discriminare il gruppo BPD dal gruppo di controllo attraverso la caratterizzazione dei campioni di EBC, ottenendo un modello OPLS-DA robusto ($R^2: 0.95$, $Q^2: 0.82$), indicando che negli adolescenti con BPD alla nascita possa persistere uno stato alterato a livello del sistema respiratorio che si traduce in un differente profilo biochimico-metabolico.

In particolare la struttura delle variabili discriminanti, caratterizzate da uno specifi-

co rapporto m/z, dal confronto con i database per la metabolomica paiono correlare con la famiglia dei lipidi complessi, in particolare glicerofosfolipidi, suggerendo un possibile coinvolgimento del surfattante alveolare alla base della minore funzionalità respiratoria dei soggetti con BPD, anche dopo anni dalla fase acuta della malattia.

Presentazione a congresso:

M. Maretti, S. Carraro, P. Pirillo, M. Stocchero, F. Tirelli, G. Giordano, E. Baraldi Approccio Metabolomico nella caratterizzazione del condensato di adolescenti con BPD. XVII Congresso Nazionale SIMRI 19-21 settembre 2013 Bolzano, Atti oral presentation.

Pubblicazione relativa a tale studio: sottomessa a rivista CHEST:

“Carraro S., Giordano G., Pirillo P., Maretti M., Reniero F., Cogo P., Perilongo G. Stocchero M., Baraldi E. Airway metabolic anomalies in BPD adolescents: new insights from the metabolomic approach.”

2) Analisi metabolomica per lo studio del wheezing

Questo studio ha voluto indagare i profili metabolici che caratterizzano i bambini con broncospasmo ricorrente o *wheezing* in età prescolare. Il *wheezing* è un sintomo comune a più disturbi respiratori tipici dell'infanzia tra cui le infezioni respiratorie, ma correla anche con la diagnosi di asma, in quanto il broncospasmo ricorrente può andare incontro a risoluzione con la crescita o evolvere in asma bronchiale dopo l'età prescolare. Nonostante esistano degli indici empirici, quali l'API, per valutare quali bambini con *wheezing* ricorrente in età prescolare andranno incontro

ad asma bronchiale con la crescita, mancano dei biomarker prognostici che possano aiutare il pediatra nella corretta diagnosi. L'obiettivo ultimo di questo studio, a carattere prospettico, è quello di estrapolare, tramite l'analisi in spettrometria di massa di campioni di urina, i composti caratterizzanti i bambini con wheezing, e attraverso una valutazione a posteriori, valutare se possano essere considerati dei biomarkers utili a predire il successivo sviluppo di asma.

I risultati preliminari di questa parte dello studio sono stati promettenti : grazie all'analisi di campioni di urina con lo spettrometro di massa ibrido Q-TOF associato ad UPLC, si è ottenuta una netta differenziazione dei soggetti con wheezing rispetto ai bambini sani, ottenendo un modello OPLSA- DA robusto. (Es. R2:0,82, Q2:0.60 per T3NEG).

L'indagine delle variabili m/z, tramite il confronto della massa esatta con i database metabolomici, ha indicato un possibile ruolo dei composti fosfolipidici (PGD2, acido fosfatidico, fosfatidilglicerolo) nello discriminare i bambini con wheezing dai soggetti sani.

3) Analisi target in spettrometria di massa di dimetilarginine in campioni di EBC nello studio dell'asma

Questa parte dello studio ha voluto indagare il ruolo di composti metilati dell'amminoacido arginina, (in particolare dell'ADMA) come possibile indice di stress ossidativo nei soggetti asmatici. Lo studio ha previsto la messa a punto di un metodo analitico per l'analisi dei metaboliti del "ciclo dell'ADMA" nel condensato dell'aria espirata.

L'analisi è stata condotta tramite tecnica MRM in spettrometria di massa quadrupolare associata ad UPLC, con sistema di arricchimento *on-line* del campione, e

applicata a campioni EBC di adolescenti con diagnosi di asma bronchiale e ad EBC di soggetti sani.

Il sistema analitico è risultato robusto, rapido (corsa cromatografica di 5 minuti), e sensibile, adatto anche ad analisi di campioni biologici diluiti, quali gli EBC. ($r^2 > 0.992$, %Bias < 3% intra- CV% inter-intra assay $\leq 20\%$, recovery tra 97 e 102%).

Il confronto statistico degli EBC dei soggetti asmatici, facenti parte di due coorti differenti (Padova e Misurina), ha mostrato un livello significativamente più alto nei soggetti asmatici rispetto ai soggetti sani. (p value < 0.017) confermando il coinvolgimento dell'ADMA nella patogenesi dell'asma.

Pubblicazione relativa a tale studio:

“Di Gangi IM, Pirillo P, Carraro S, Gucciardi A, Naturale M, Baraldi E, Giordano G. Online trapping and enrichment ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for sensitive measurement of “arginine-asymmetric dimethylarginine cycle” biomarkers in human exhaled breath condensate. Anal Chim Acta. 2012 Nov 19;754:67-74. “

CAPITOLO 1

APPLICAZIONE DELLA RESPIROMICA ALLO STUDIO DELLA DISPLASIA BRONCOPOLMONARE

INTRODUZIONE

Il principale scopo del polmone è il trasporto di ossigeno tramite l'aria inspirata al sangue e l'eliminazione dell'anidride carbonica accumulata dai tessuti. L'alveolo, la struttura base del tessuto polmonare, è il sito ove avviene questo scambio gassoso attraverso la barriera alveolocapillare, costituita dall'epitelio alveolare e dall'endotelio capillare. Queste due barriere sono a stretto contatto e supportate dalla matrice extracellulare (ECM). Per facilitare l'effettivo scambio la barriera deve essere il più sottile possibile per permettere alle molecole gassose di attraversarla in una breve distanza ed inoltre la superficie per lo scambio gassoso deve essere il più estesa possibile, per massimizzare la capacità di scambio gassoso del polmone. Questo processo, detto di alveolarizzazione, è l'ultimo stadio dello sviluppo polmonare, e porta ad una completa, matura e funzionale formazione del polmone). (Morty et al, 2009)¹

Lo sviluppo polmonare consiste di più fasi: vi è la fase di strutturazione del polmone, quando vi è una diramazione delle vie aeree durante la fase embrionale (4-7 settimane postconcezionali) e pseudoglandulare (5-7 settimane postconcezionali) dello sviluppo iniziale del polmone.

Lo sviluppo tardivo, del polmone porta ad assottigliare il tessuto interstiziale con "l'apertura" di spazi aerei, seguito poi dalla formazione delle unità saccolari (24-25 settimane postconcezionali) delle vie aeree e dalla settazione durante la fase alveolare (36 settimane postconcezionali fino ad alcuni anni dopo la nascita), che

aumenta il numero degli alveoli e ne riduce la dimensione. La formazione dei setti alveolari, processo chiave della fase alveolare, e che inizia durante la 34esima settimana postconcezionale, è ancora non del tutto conosciuta, ma si pensa che sia regolata dall'espressione genica, da fattori di crescita, dalla maturazione dell'ECM e da forze fisiche quali quelle generate durante la respirazione (Morrisey et al., 2013; Morrisey et. al, 2010; Warburton et al., 2010)^{2,3,4}. Quando l'ultima fase dello sviluppo polmonare è disturbata, si assiste ad una malformazione nella architettura del tessuto polmonare che può condurre a severe conseguenze in termini di funzionalità respiratoria, con esiti che si protraggono fino all'età adulta. (Madurga A. et al., 2013; Baraldi, Filippone, 2007)^{5,6}

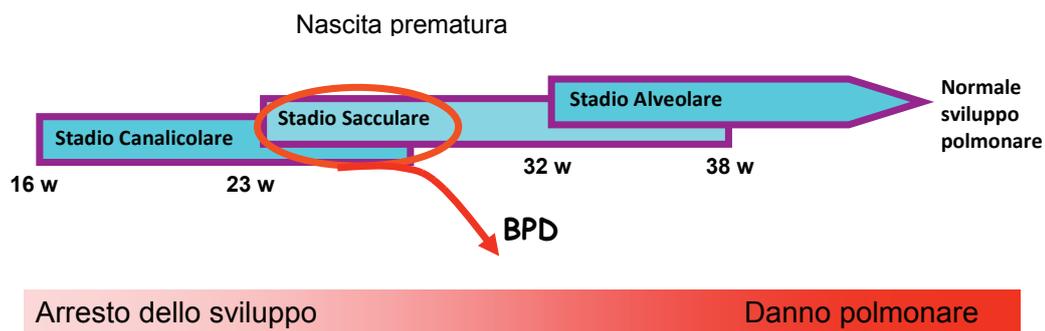


Fig 1. Schema dello sviluppo polmonare con possibile danno dovuto alla nascita prematura (adattata da Baraldi, NEJM, 2007)⁶

Un esempio di questa malformazione è la displasia broncopulmonare o BPD, una comune complicazione della nascita prematura, caratterizzata da una perturbazione della struttura polmonare che conduce ad una riduzione del numero degli alveoli, ad uno ispessimento dei setti polmonari, e ad una malformazione della circolazione polmonare (Northway et al., 1967)⁷. Come verificato in più studi (Baraldi, Filippone, 2007; Wong et al., 2011; Wong et al., 2008)^{6,8,9} queste anomalie strutturali portano a complicazioni durante l'infanzia, che persistono al crescere

dell'età del bambino (Fig 2), traducendosi in una diminuzione dei valori dell' indice spirometrico FEV1, impiegato per valutare la funzionalità respiratoria (misurato come il volume di aria espirata nel corso del primo secondo di una espirazione massima forzata).

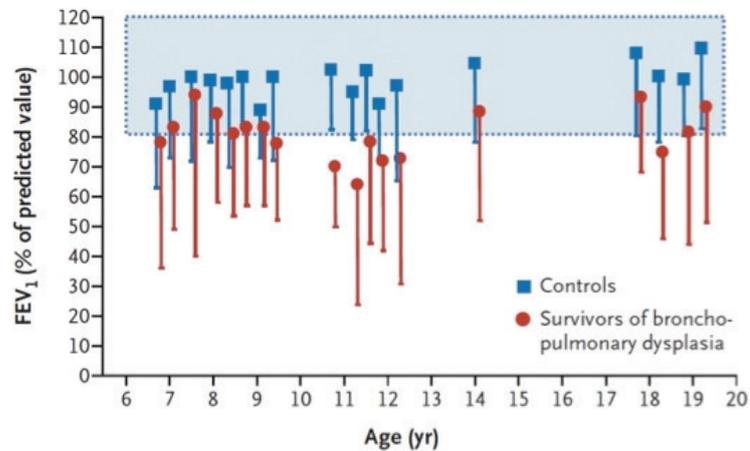


Figura 2: Valori di FEV1 di soggetti nati prematuri e con diagnosi di BPD alla nascita e controlli nati a termine nello stesso range d'età (6-20 anni). Sono riportati i risultati degli studi pubblicati dal 1990 al 2007. (adattata da Baraldi, NEJM, 2007),⁶

I miglioramenti nella gestione medica dei pazienti con BPD ha aumentato notevolmente la sopravvivenza dei neonati con diagnosi di BPD e ha cambiato il quadro fisiopatologico dalla BPD rispetto a quello descritto per la prima volta da Norway nel 1967,7 tanto che possiamo parlare di una *old BPD* e una *new BPD*. (Jobe et al., 2011)¹⁰ La BPD attuale è caratterizzata in particolare da una ipoplasia alveolare e da un dismorfismo della circolazione polmonare, mentre la fibrosi del parenchima polmonare e la fibroproliferazione dovuta ad un danno delle vie aeree è meno accentuata; pertanto possiamo dire che la BPD attualmente è correlata soprattutto all'arresto dello sviluppo polmonare, come riportato nella Figura 1

Le basi molecolari alla base di questa fase dello sviluppo polmonare non sono ancora chiare ed inoltre i progressi raggiunti nella gestione del neonato prematuro hanno portato ad un incremento della sopravvivenza dei nati altamente prematuri, aumentando l'incidenza di casi di BPD. Questo conduce al bisogno di una migliore comprensione di quelli che sono i meccanismi e le conseguenze di questa patologia, i cui esiti si protraggono anche nella età adulta, suggerendo come la BPD possa essere considerata la prima e probabilmente la più lunga malattia ostruttiva polmonare nell'uomo. (Carraro et al., 2013)¹¹

OBIETTIVO

Date queste premesse lo scopo di questo studio è stato quello di applicare l'approccio metabolomico a campioni di EBC di soggetti adolescenti affetti da displasia broncopulmonare alla nascita, confrontandoli con un gruppo di adolescenti sani. Con questo studio si intendeva valutare se i soggetti con BPD alla nascita mostrassero un profilo metabolico differente rispetto ai soggetti sani, che potrebbe indicare che la disfunzionalità respiratoria che si assiste in questi soggetti (Figura 3) non sia causata solamente da un danno occorso in epoca perinatale ma che persista uno stato patologico del polmone, che si riflette in un diverso assetto metabolico.

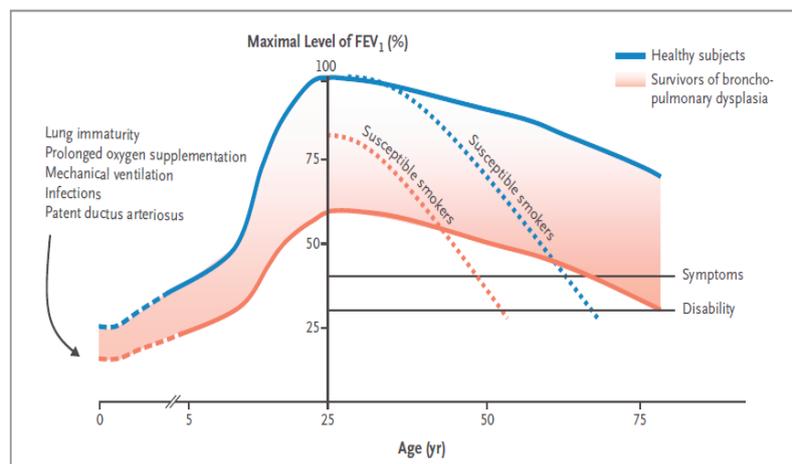


Figura 3 Modello dell' andamento della funzionalità respiratoria (FEV₁) nel corso della vita di controlli sani e soggetti con BPD alla nascita . (Baraldi, NEJM, 2007,)⁶

Lo studio, condotto tramite spettrometria di massa ad alta risoluzione, ha fornito i profili metabolici dei campioni di EBC tramite l'estrapolazione delle variabili m/z dagli spettri di massa ottenuti. I dati ricavati sono stati sottoposti ad analisi statistica multivariata per ottenere le caratteristiche dei profili metabolici dei due gruppi di studio, evidenziando similitudini e differenze.

MATERIALI E METODI

Soggetti

21 soggetti con diagnosi di BPD alla nascita sono stati arruolati da una popolazione di pazienti con BPD, con un'età gestazionale inferiore alle 31 settimane, e un peso alla nascita inferiore a 1500g, il cui *follow up* è seguito periodicamente dall'unità di dall'Unità di Pneumologia Allergologia e Pediatria dell' Ospedale della Salute della Donna e del Bambino dell'Università degli Studi di Padova. La BPD è definita come ossigeno dipendenza che persiste per 28 giorni dopo la nascita in neonati che necessitano di ventilazione meccanica (Ehrenkranz et al.,2005)¹² . Alla nascita l'età gestazionale media dei nostri casi di BPD era 28.4 ± 1.6 settimane e il peso medio 1028 ± 242 grammi. Al momento del reclutamento l'età media di questi soggetti era di 14.7 ± 1.85 anni. Tutti i soggetti con BPD erano clinicamente stabili al momento del reclutamento, sette di loro erano in trattamento con un a bassa o media dose di corticosteroidi per via inalatoria associati a beta agonisti a lunga durata d'azione, un soggetto era invece in trattamento con teofillina. Quattro di questi pazienti sono sensibilizzati per i più comuni allergeni presenti nell'aria (acari della polvere, pelo di cane, graminacee e pollini).

Il gruppo di controllo era composto da 15 soggetti sani la cui età al momento del reclutamento era simile a quella dei casi con BPD (età media 15.2 ± 1.78 anni), peso alla nascita 3060 ± 625 grammi, senza storia di prematurità, atopia o malattia respiratoria.

Tutti i soggetti al momento del reclutamento non avevano sofferto di alcuna infezione respiratoria nelle precedenti 4 settimane.

Disegno dello studio

Lo studio condotto è di tipo “*cross sectional*”. Tutti i partecipanti sono stati sottoposti all’esame obiettivo e anamnestico ed hanno eseguito il test dell’ossido nitrico esalato (FENO), una spirometria e la raccolta dell’EBC.

L’EBC raccolto, suddiviso in aliquote da 0.5mL è stato conservato a -80°C fino al momento dell’analisi.

Il protocollo per lo studio è stato approvato dal comitato etico dell’azienda ospedaliera di Padova (Prot. N 1360P) e tutti i genitori hanno dato il loro consenso informato.

Raccolta dell’EBC

L’EBC è stato raccolto e processato in accordo con le raccomandazioni ATS/ERS (www.ginaasthma.org)¹³ utilizzando il dispositivo TURBO-DECCS (Medivac, Parma, Italy).



Figura 4 Sistema TURBO con dispositivo DECCS.

Questo dispositivo (fig 4) è un sistema di condensazione basato sul raffreddamento dell’aria esalata grazie ad un sistema termoelettrico che dà origine ad un effetto Peltier. La raccolta avviene in modo semplice convogliando l’aria espirata dal soggetto, per un tempo variabile (nel nostro studio 20 minuti), dentro uno

speciale circuito monouso inserito nel condensatore

Il sistema TURBO è fornito con DECCS, un sistema di respirazione usa e getta che consiste di un boccaglio dotato di una valvola unidirezionale e una trappola per la saliva, collegato ad un flacone di raccolta da 50 ml, per mezzo di un tubo. I bambini respirano attraverso la bocca, comodamente seduti e con una clip nasale, mantenendo la loro bocca asciutta durante la raccolta, deglutendo o asciugando periodicamente la saliva in eccesso.

Analisi dei metaboliti mediante LC/MS_HPLC/Orbitrap

Le analisi dell'EBC in spettrometria di massa sono state eseguite con un sistema HPLC, Ultimate 3000 Dionex, accoppiato ad uno spettrometro di massa di tipo LTQ Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Bremen, DL) dotato di una sorgente *nano electrospray*, Advion Triversa NanoMate (Advion BioScience, inc. Ithaca, NY, USA).

La sorgente nanoESI permette di impiegare una quantità minima di campione preparato per l'analisi, dimostrandosi utile specialmente nei casi in cui la quantità di campione biologico è minima, come avviene per l'EBC. Nel nostro studio sono stati impiegati 20µL per ogni campione analizzato, prelevati tramite autocampionatore che permette un'iniezione veloce e precisa. Il campione, grazie alla pressione esercitata dall' HPLC, viene spinto nella colonna cromatografica, dove è eluito insieme ai solventi che costituiscono la fase mobile. Nel nostro studio si è utilizzata una colonna la cui fase stazionaria è di tipo apolare, detta anche a *fase inversa*, formata da catene silossaniche a 18 atomi di carbonio. Nella colonna si crea un equilibrio mobile d'interazione dei composti tra la fase stazionaria e la fase mobile, a sua volta costituita da due fasi, una acquosa e una organica. Usualmente la fase mobile viene modificata durante la corsa cromatografica con un gradiente la cui percentuale di fase organica aumenta linearmente. Nell'ultimo stadio della corsa

si raggiunge il massimo di % di fase organica per staccare tutti i componenti rimasti legati in colonna, seguita poi da una fase detta di equilibrio per riportare il gradiente alle condizioni cromatografiche iniziali e permettere una nuova analisi. In questa analisi il tempo di equilibrio è di 5 minuti.

Nella tabella sottostante sono riportate le percentuali del gradiente utilizzato nel nostro studio. I solventi sono costituiti da acqua MilliQ con lo 0.1% di acido formico (A), per la fase acquosa polare, e da 2 tipi di solventi per la fase organica, rispettivamente acetonitrile con 0.1% acido formico (B) e metanolo con 0.1% acido formico (C). Il tipo di HPLC disponibile è di tipo ternario, ossia utilizza 3 solventi, permettendo di creare un gradiente più preciso, che copre un range più ampio di polarità.

Tabella 1 Condizioni di gradiente cromatografico

Tempo (min)	Flusso ($\mu\text{L}/\text{min}$)	% eluente A	% eluente B	% eluente C
0	40	95	0	5
1.5	40	95	0	5
10	40	2	48	50
11	40	2	48	50
11.1	40	2	98	0
12	40	2	98	0
12.1	40	95	0	5

La colonna utilizzata per l'analisi è una colonna analitica Atlantis T3 (Waters co., Milford, MA, USA), con particelle della fase stazionaria di $3\mu\text{m}$, una lunghezza di 150 mm e un diametro interno di 1 mm.

Nella cromatografia il diametro delle particelle risulta importante in quanto minore è la loro dimensione, maggiore è la superficie assorbente della fase stazionaria,

elemento essenziale per aumentare la capacità ritentiva della colonna, così come espresso anche dalla formula per l'efficienza della separazione cromatografica (equazione di Van Deemter).

La colonna inoltre è termostata a 40°C, in quanto una temperatura maggiore di quella ambientale migliora la performance della cromatografia, grazie alla possibilità di utilizzare velocità di flusso più alte che si traducono in tempi di ritenzione minori.

Nella nostra analisi il campione, prima di essere eluito nella colonna cromatografica, viene iniettato in una prima colonna, detta *trap-column*, con una lunghezza inferiore a quella analitica, la cui funzione è di concentrare del campione prima che questo venga eluito nella colonna cromatografica. Tale accorgimento risulta utile nel caso di campioni molto diluiti, in cui i metaboliti siano presenti a basse concentrazioni come avviene nell'EBC. Per questa doppia eluizione lo strumento è dotato di una valvola che gestisce i flussi che entrano nelle due colonne, secondo lo schema mostrato nella Figura 5.

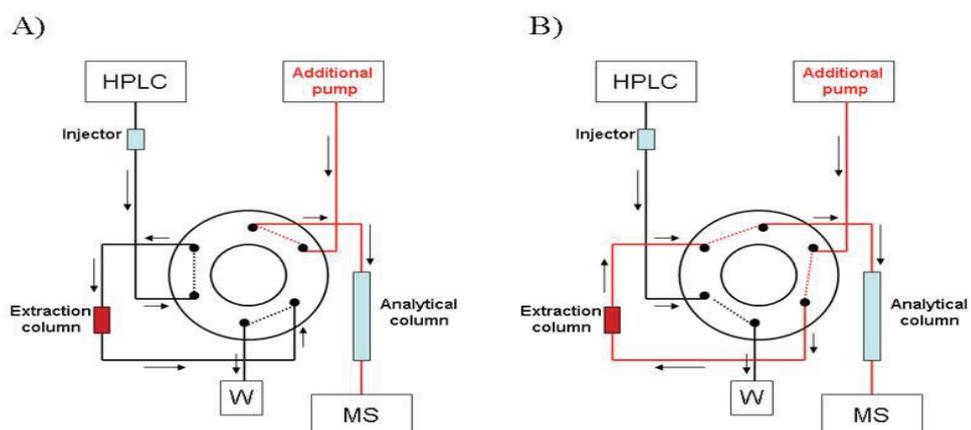


Figura 5 Schema di valvole a 6 porte per iniezione del campione in colonna cromatografica

La trap-column usata è una Atlantis T3, di 10 mm di lunghezza e 2.1mm di diametro, con particelle di 3 μ m; mentre la fase mobile è costituita dai soli solventi A e B. Alle condizioni iniziali B costituisce il 2% dell'eluente, cresce poi linearmente fino al 100% in 1.25 minuti, per tornare al 2% in 8 minuti.

I flussi di eluizione in questo tipo particolare di studio sono stati comunque mantenuti bassi (40 μ L/min) per entrambe le colonne, proprio perché l'analisi prevedeva l'utilizzo di una sorgente *nanoESI* per l'introduzione nello spettrometro di massa. Il flusso in uscita dalla colonna è stato ulteriormente diminuito con un sistema di "splittaggio" del flusso 1:100, che lascia entrare nella sorgente dello strumento solo 400nL di volume proveniente dall' HPLC.

I vantaggi di utilizzare questo tipo di sorgente risiedono nel fatto che è possibile utilizzare volumi di iniezione di campione più bassi, utile quando il campione biologico disponibile è esiguo, ed impiegare una minore quantità di solventi, con una riduzione dei costi e del possibile inquinamento ambientale. Inoltre si migliora l'efficienza di ionizzazione in quanto le dimensioni più piccole della goccia in uscita dal capillare e la minore distanza tra questo e lo spettrometro di massa permettono di ottenere un più alto trasferimento di carica.

L'analisi spettroscopica è stata condotta in ionizzazione positiva, ESI+, con un range di scansione da 50 a 1000 Da e una Risoluzione pari a 30.000 per una m/z pari a 400. I parametri utilizzati in sorgente sono di seguito elencati: voltaggio del tube lens 150V, voltaggio del capillare 45 V, temperatura del capillare 200°C, voltaggio dello ionspray 1.7kV.

Sono stati utilizzati tutti solventi con un grado di purezza HPLC, adatto alla LC-MS della ditta Sigma (St. Louis, Mo, USA).

Per evitare l'introduzione di bias analitici, ogni campione è stato analizzato in triplicato secondo un ordine di sequenza casuale, intercalando ogni decina di campioni

una soluzione di standard noti (QC) e un campione contenente solo la soluzione di solventi impiegati per diluire il campione biologico (Blank). In questo modo è stato possibile verificare le condizioni, la stabilità, e l'accuratezza delle analisi.

Il blank, oltre a verificare la linea di base del cromatogramma, è servito anche ad individuare le masse presenti nei solventi che poi sono state sottratte dallo spettro di massa dei campioni biologici.

La soluzione di standard per il QC è costituita da composti a massa nota, la cui intensità e il rapporto m/z sono necessari per verificare il coefficiente di variazione (CV%) dell'intensità dei picchi, dell'accuratezza di massa e dei tempi di ritenzione.

La sequenza d'analisi dello studio era quindi costituita da 35 campioni di QC, 35 di Blanks e 57 campioni di EBC, analizzati in triplicato per un totale di 171 analisi.

La riproducibilità analitica ottenuta dal controllo dei QC ha portato ad un CV% di intensità degli ioni pari al 20%, un errore di massa medio pari a -3.8 ± 2.9 ppm, e ad una differenza nei tempi di ritenzione pari 0.34 ± 0.05 min. Inoltre anche la Principal Component Analysis (PCA) applicata ai QC ha indicato la stabilità del sistema, in quanto tutti i QC risultavano raggruppati in una parte del grafico.

I dati ottenuti dall'analisi in LC/MS sono stati poi processati col software MarkerLynk della ditta Waters, dopo la trasformazione dei *raw data* (dati grezzi) in file codificati "*cdf*" per la lettura nel software MassLynk. (Waters co., Milford, MA, USA).

Analisi statistica

I dati ottenuti dalla spettrometria di massa sono stati analizzati tramite metodi di analisi proiettiva multivariata. Il primo passo dell'analisi dei dati è stata l'applicazione della PCA per la descrizione del pattern metabolico (Jackson, 1991)¹⁴. La struttura dei dati è stata poi studiata costruendo un modello discriminante basato sulla

proiezione ortogonale bidirezionale delle strutture o variabili latenti (OPLS-DA). (Trygg et al., 2003; Wiklund et al., 2008)^{15,16}. Per spiegare le differenze osservate tra i gruppi in termini delle variabili osservate si è costruito un S-plot, e una procedura basata sulla permutazione random dei responsi ha permesso di stimare gli intervalli di confidenza utili per selezionare i biomarker putativi dallo studio dell'S-plot (intervallo di confidenza 95%) (Mattarucchi et al., 2010)¹⁷.

Le variabili misurate sono state trasformate dalla funzione logaritmo e normalizzate sulla mediana (median fold change normalization) (Maher et al, 2011)¹⁸. La centratura sulla media e il *Pareto scaling* è stato applicato ai dati prima di essere processati in analisi multivariata. L'analisi multivariata è stata elaborata tramite la piattaforma SIMCA 13 (Umetrics, Umea, Svezia) mentre la piattaforma R 2.15.0 (R Foundation for Statistical Computing) è stata impiegata per l'analisi statistica sulle singole variabili.

I composti discriminanti sono stati identificati dal confronto delle masse con i dati di Metlin, HMDB, e LipidMaps, e il potere discriminante di ciascun singolo potenziale marcatore è stato caratterizzato dall'area sotto la curva (AUC) derivata dalla ROC analisi.

I dati clinici (parametri spirometrici e valori di FENO) sono stati invece analizzati applicando il t-test per dati non appaiati.

RISULTATI

L'analisi spettroscopica dei campioni di EBC ha generato degli spettri i cui i metaboliti sono rappresentati dal rapporto m/z.

L'informazione contenuta nello spettro è stata investigata tramite l'analisi statistica multivariata. I dati preliminari sono stati estrapolati tramite la PCA, il cui grafico è rappresentato in Figura 6.

Nel grafico, dove in blu sono indicati i campioni dei soggetti con BPD e in verde quelli del gruppo dei sani, è rappresentato lo *score plot* della prima componente principale (PC1) contro la quinta componente principale (PC5). Come si può leggere dal grafico (valori di R2X pari a 0,388 e 0.0475) questa prima analisi spiega fino al 40% della varianza.

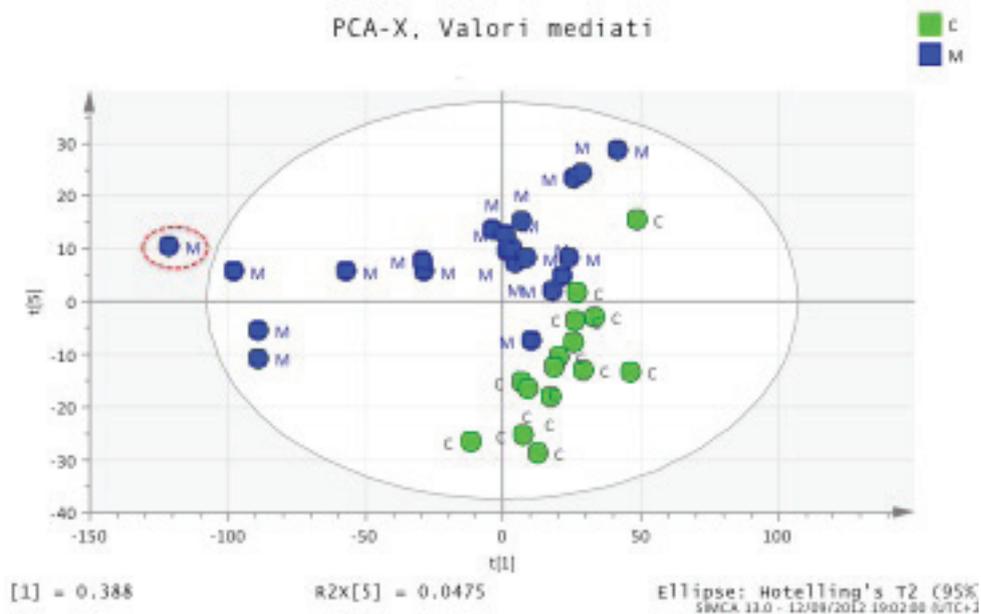


Figura 6 Grafico della PCA dei campioni analizzati (in verde i soggetto sani, in blu i soggetti con BPD)

La PCA ci ha permesso anche di valutare la bontà delle analisi. Come si può notare dalla figura ingrandita le analisi in triplicato dello stesso campione si trovano vicine tra loro, indicando che la variabilità tra le diverse corse non influenza il profilo dello spettro dello stesso paziente. (Figura 7)

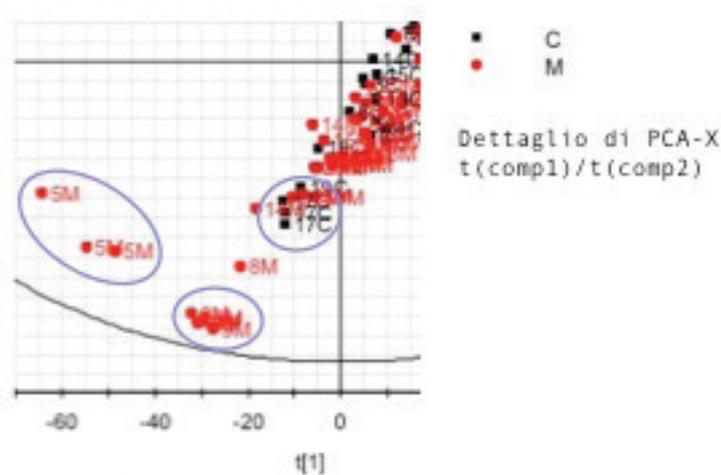


Figura 7 Ingrandimento del grafico PCA.
Il dettaglio mostra l'appaiamento dei dati ottenuti dall'analisi in triplicato.

Inoltre, grazie alla PCA, è stato possibile individuare un *outlier* che è stato eliminato dalle successive analisi per evitare che una alta variabilità individuale potesse influenzare la variabilità del sistema (cerchiato in rosso in Figura 6). Sono considerati *outliers* quei campioni che sono al di fuori del 95% dell'intervallo di confidenza (ellissi) che spiega la varianza tra i campioni. (T2 Hotelling). Questa analisi in PCA ha indicato l'andamento dei campioni, suggerendo una separazione tra i due gruppi in esame.

Per meglio caratterizzare le differenze osservate tra i due gruppi di soggetti da un punto di vista metabolico, i dati sono stati modellati dalla PLS-DA e la OPLS-DA, metodiche "*supervised*" che fanno uso di informazioni note a priori per guidare l'analisi e che servono a capire in che modo l'informazione sperimentale possa spiegare le differenze tra le diverse classi in esame.

Sul modello ottenuto mediante PLS-DA si è applicato il test di permutazione dei responsi che serve per valutare se il modello costruito sia reale, ossia se la distinzione trovata tra i due gruppi sia frutto di una associazione casuale fra le variabili.

Si costruiscono pertanto delle associazioni casuali per verificare che non corrispondano al modello costruito. Il test eseguito con 200 associazioni casuali ha dato esito negativo, pertanto è stato possibile affermare che il modello non fosse casuale e affetto da *overfitting*, e che la distinzione riscontrata sia quindi reale. (Figura 8)

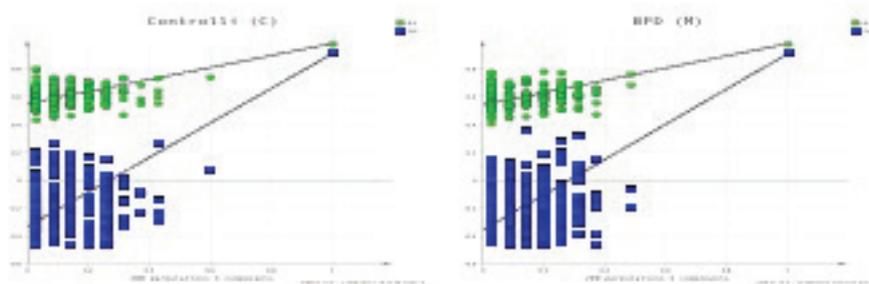


Figura 8 Test di permutazione per il gruppo dei controlli C (sinistra) e dei malati M (destra). Si può affermare che l'associazione non è casuale perché la linea (parte blu) che descrive la predittività del modello (Q2X) ha un'intercetta negativa.

Per meglio caratterizzare le differenze osservate tra i due gruppi di soggetti da un punto di vista metabolico i dati sono stati poi modellati dalla OPLS-DA. Si è ottenuto un modello robusto ad una sola componente, con R2 e Q2 pari rispettivamente a 0.95 e 0.92. Come si può notare nello score scatter plot in Figura 9, i due gruppi risultano ben distinti, consentendo di ipotizzare che ci siano processi metabolici in atto diversi tra i due gruppi che possano spiegare questa netta differenziazione.

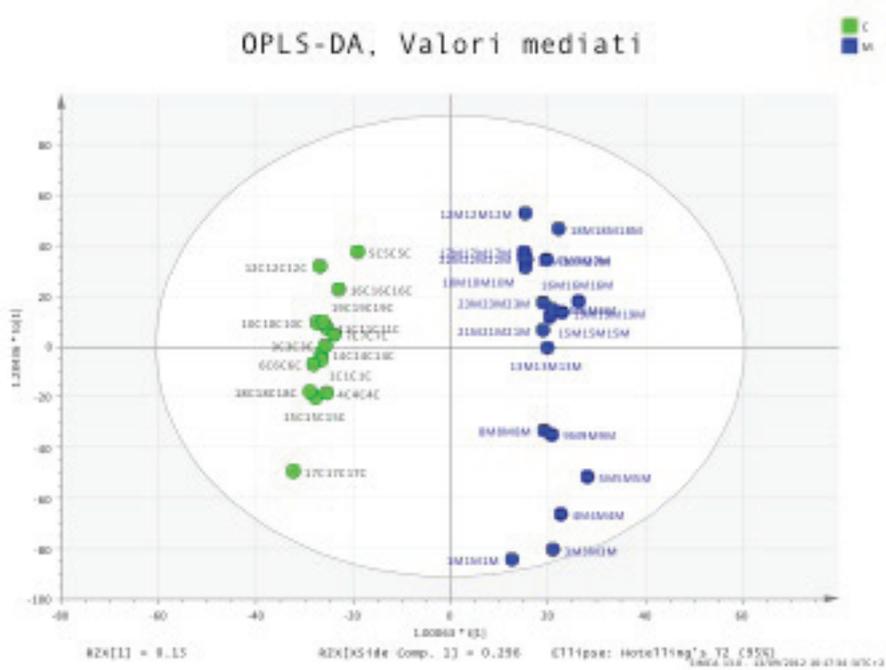


Figura 9 Grafico OPLS-DA

Nel grafico tridimensionale (Figura 10) che riporta i primi tre score del modello si nota come i controlli appaiono ben raggruppati tra loro, stando a significare che la variabilità biologica interindividuale, secondo le variabili prese in considerazione per discriminare il gruppo dei sani da quello dei malati, è bassa

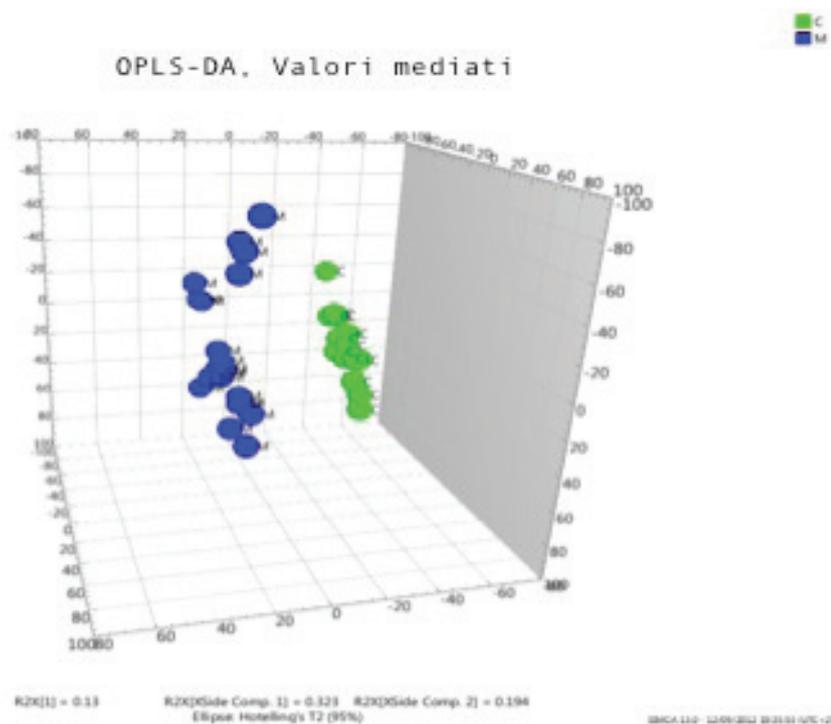


Figura 10 Rappresentazione tridimensionale della OPLS-DA

L'S-plot è stato utilizzato come tool statistico per meglio sottolineare le variabili che potrebbero svolgere un ruolo come marker putativi nella caratterizzazione dei profili biologici. (Figura 11)

Nell'S-Plot ciascuna variabile descrittiva del modello costruito viene rappresentata in base alla sua correlazione e alla sua covarianza rispetto allo score predittivo del modello. Le regioni nel grafico dove la correlazione e la covarianza risultano più elevate in valore assoluto (cioè le regioni più distanti dall'origine) contengono i potenziali marcatori.

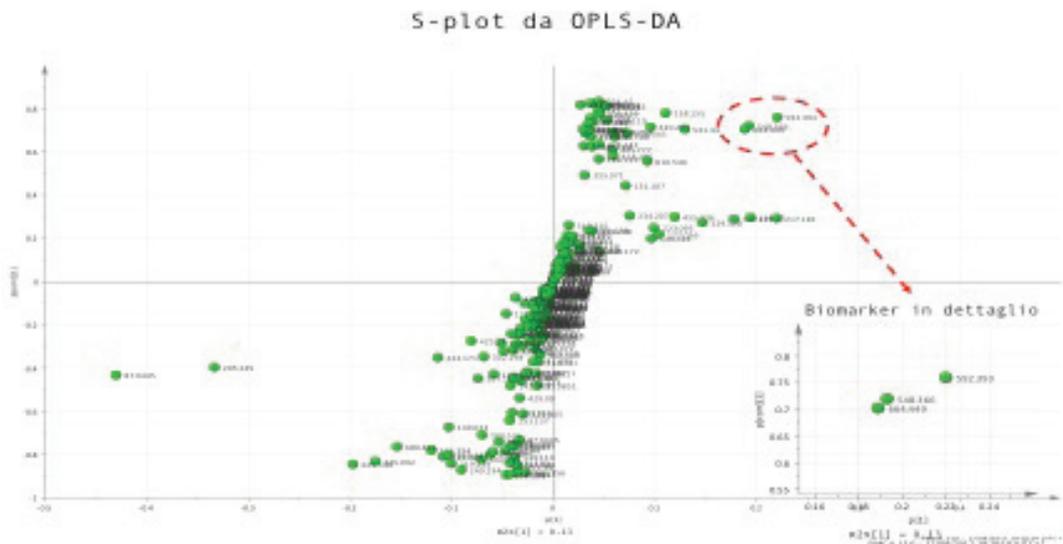


Figura 11 S-plot di OPLS-DA che mostra la correlazione e la covarianza delle variabili in riferimento al modello costruito. Le variabili sono rappresentate in funzione del valore di m/z.

I possibili metaboliti con struttura chimico-fisica corrispondente alle variabili selezionate sono stati identificati mediante ricerca in alcuni database di metabolomica disponibili on-line (HMDB, METLIN, LipidMaps).

La ricerca dei metaboliti è stata impostata con i seguenti parametri:

- valore m/z della massa analizzata;
- carica della massa positiva;
- ionizzazione del tipo $[M+H]^+$;
- tolleranza per l'errore di 10 ppm ($\Delta\text{ppm} = \frac{M_{\text{misurata}} - M_{\text{attesa}}}{M_{\text{attesa}}}$).

Le variabili estrapolate e i corrispondenti possibili biomarker per cui è stato possibile ipotizzare un ruolo biologico nella malattia in esame sono riportati in Tabella 2.

Tabella 2 Variabili estrapolate e possibili biomarkers corrispondenti, con indicazione di m/z, RT e CI 95% per ogni variabile

Group	m/z	RT	CI 95% AUC	Putative biomarkers	Database
BPD	548.3662	10.4549	0.975-0.994	PC(O-18:2(9Z,12Z)/2:0) PC(20:2(11Z,14Z)/0:0)	METLIN; HMDB; LipidMaps
BPD	592.3934	10.555	0.967-0.995	PC(18:1(9Z)/4:0) PC(20:2(11Z,14Z)/0:0)	METLIN; HMDB; LipidMaps
BPD	664.449	11.3396	0.856-0.992	PS(14:0/14:0) PS(15:0/13:0) PS(13:0/15:0) PS(12:0/16:0) PS(16:0/12:0)	METLIN; HMDB; LipidMaps
CTRL	319.2286	13.2048	0.941-0.999	12-HEPE; 5-HEPE; 15-KETE; 12-KETE; 5-KETE; 11R-HEPE; 14,15-EpETE and other isomers	METLIN; HMDB; LipidMaps
CTRL	680.446	10.7219	0.896-0.993	PS(14:0/14:0) PS(15:0/13:0) PS(13:0/15:0) PS(12:0/16:0) PS(16:0/12:0)	METLIN; HMDB; LipidMaps

Una volta estratti i biomarkers putativi si è proceduto al controllo di questi rapporti m/z negli spettri di massa dei campioni per verificare l'effettiva variazione nei due gruppi. In Figura 12 è mostrato il cromatogramma con le tre variabili caratterizzanti i BPD, dove si può notare la differenza d'intensità tra un campione appartenente a un soggetto BPD (panel M) e un campione appartenente ai soggetti sani (C), supportando i dati estrapolati tramite analisi multivariata.

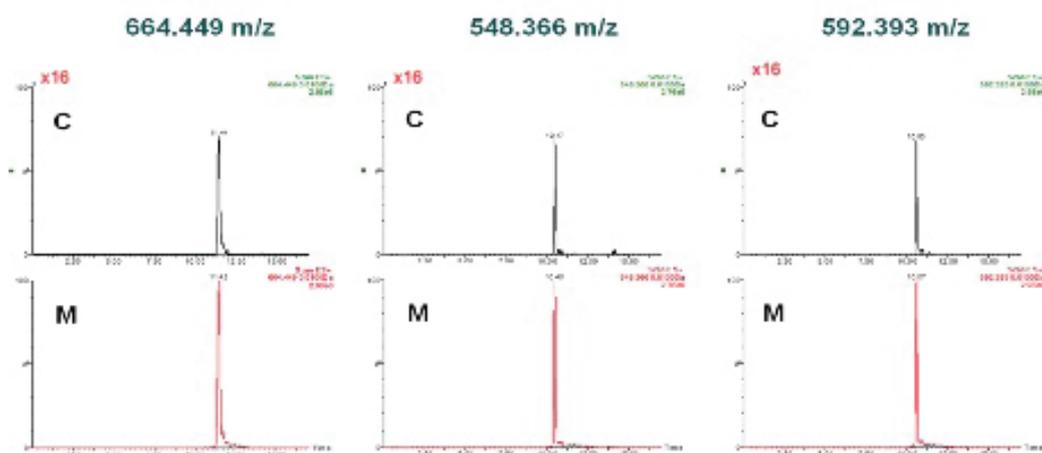


Figura 12 Cromatogrammi delle variabili significative in soggetti BPD (panel M) e sani (panel C)

Dall'analisi statistica dei parametri clinici, è emerso che i soggetti con BPD presentano dei parametri spirometrici significativamente più bassi ($p < 0.001$) rispetto ai soggetti sani, in concordanza con altri studi riportati in letteratura. (Baraldi, Filippone, 2007)⁶ (FVC (mean+SEM): $86 \pm 3.4\%$ pred vs $106 \pm 2.4\%$ pred; FEV1 $69 \pm 3.4\%$ pred vs $105 \pm 2.6\%$ pred; FEV1/FVC $74 \pm 2.3\%$ vs $90\% \pm 1.3$; FEF25-75 $54 \pm 5.3\%$ pred vs $122 \pm 5.2\%$ pred).

L'ossido nitrico esalato invece non è risultato significativamente differente tra i soggetti sani (median [IQR] 13.2 ppb [7.9-16.8]) e i soggetti con BPD (10.6 ppb [8.8-12.4]).

DISCUSSIONE

In questo studio è stata applicato, per la prima volta, l'approccio metabolomico al condensato dell'aria espirata (EBC) in pazienti adolescenti con diagnosi di bronco-displasia alla nascita. Lo scopo è stato quello di valutare, attraverso una strategia *unbiased*, ossia senza ipotesi a priori, se il profilo biochimico polmonare di tali soggetti si differenziasse da quello di un gruppo di soggetti sani .

Nello studio si è evidenziato come il profilo degli adolescenti si possa chiaramente discriminare da quello dei soggetti sani. Da questa prima analisi è risultato che le molecole che più caratterizzano i BPD appartengono alla specie dei glicerofosfolipidi, suggerendo che una disregolazione metabolica persista anche dopo anni dalla fase acuta di questa malattia. La BPD è la principale complicazione respiratoria della nascita prematura. I soggetti con BPD vanno incontro a ricorrenti esacerbazioni respiratorie, spesso scatenate dai virus respiratori, durante l'infanzia. (Smith et al., 2004, Vrijlandt et al. 2004; Anand et al., 2003)¹⁹⁻²¹. Inoltre i soggetti con BPD alla nascita spesso presentano un'anomala funzionalità respiratoria (Baraldi, de Jongste, 2001)²². Nonostante questo durante la crescita si nota un miglioramento

dei sintomi clinici, e la maggior parte di questi soggetti conduce una vita apparentemente normale. (Northway et al., 1990; Baradi, Filippone, 2007)^{23,6} Diversi studi condotti nei bambini con BPD per indagare i processi patogenetici sottostanti la malattia, hanno portato ad identificare diversi possibili meccanismi sottostanti la malattia: processo infiammatorio nel polmone (Ozdemir et al., 1997)²⁴, danno ossidativo, (Saugstad, 2010)²⁵ e alterato sviluppo della circolazione polmonare (Abman, 2010)²⁶. Poco però è conosciuto sulla natura dei processi patologici che coinvolgono il polmone nei soggetti con BPD dopo l'infanzia, nei quali si evidenzia una persistente limitazione al flusso delle vie aeree nonostante siano stabili da un punto di vista clinico. (Baradi, Filippone, 2007)⁶.

In questo studio abbiamo applicato l'analisi metabolomica proprio per valutare se si possa identificare un pattern metabolico-biochimico alterato in questi soggetti, che presentano una apparente stabilità dei sintomi respiratori con la crescita. L'approccio metabolomico, non essendo guidato da ipotesi a priori e quindi non ricercando dei singoli metaboliti, ha il grande potenziale di investigare le condizioni e i meccanismi non ancora conosciuti che potrebbero essere coinvolti. (Carraro et al. 2009; Dettmer et al., 2007)^{27,28}. Le tecniche spettroscopiche permettono di analizzare, un ampio spettro di metaboliti, senza doversi focalizzare solo su alcune molecole, dandoci un quadro del possibile assetto metabolico del campione, del suo *fingerprint*. Grazie a tecniche statistiche apposite, da una grande quantità di dati è possibile estrapolare le informazioni rilevanti, le variabili e quindi i metaboliti che caratterizzano la popolazione in esame rispetto ad un gruppo di controllo. Non avendo ipotesi a priori questo approccio permette di aprire il campo della ricerca a nuove speculazioni, a meccanismi o metaboliti nuovi che non erano stati considerati o confermare ipotesi già formulate. (Nicholson, Lindon, 2008)²⁹. I nostri dati mostrano come i pazienti con BPD presentino un differente profilo biochimico-

metabolico rispetto ai soggetti sani.

Questi dati supportano l'ipotesi, riportata da molti autori, che la persistente ridotta funzionalità respiratoria di adolescenti e giovani adulti nati prematuri, non sia solo l'espressione di un danno funzionale occorso in epoca perinatale, ma che sia il risultato di persistenti processi metabolici disregolati a livello polmonare. (Baraldi, Fippone 2007)⁶.

Anche se la discriminazione tra i sani e i BPD è il risultato di una combinazione di metaboliti visti nel loro insieme, l'analisi statistica ha sottolineato il ruolo di alcuni variabili caratterizzanti i soggetti con BPD da una parte e i soggetti sani dall'altra.

Dal confronto di queste masse con quelle registrate nei database METLIN, HMDB, e Lipidomics abbiamo evidenziato i biomarkers putativi (Tabella 2). In particolare le variabili per cui è stato possibile ipotizzare una struttura ed un ruolo nella patologia sono le seguenti:

per il gruppo dei BPD abbiamo individuato le variabili 548 [RT 10.4549 m/z 548.3662], 592 [RT 10.555 m/z 592.3934] correlata con la famiglia delle fosfatidilcoline (PC) e 664 [RT 11.3996 m/z 664.449] correlata alle fosfatidilserine (PS), mentre per i controlli sani sono emerse le variabili 319 [RT 13.2048 m/z 319.2286] e 680 [RT 10.7219 m/z 680.446] correlate rispettivamente ai derivati dell'acido eicosanoico e ad una fosfatidilserina.

(Come si può notare questi composti appartengono alla classe dei lipidi complessi confermando il ruolo di questi composti nella patogenesi delle malattie respiratorie, come suggerito da più autori). (Wheelock et al., 2013)³⁰

Per la variabile 548 i due possibili biomarker sono la lisofosfatidilcolina (LPC) [LysoPC(20:2(11Z,14Z))] e il fattore attivante le piastrine (PAF) [PC(O-18:2(9Z,12Z)/2:0)]. Il PAF è noto per essere un potente mediatore dell'infiammazione mentre la LPC è un fosfolipide ossidato presente nei tessuti infiammati. È

stato dimostrato che la specie LPC insatura induca la produzione di superossido nei neutrofili (Ojala et al., 2007)³¹ ed è riportato da diversi autori il suo ruolo nelle malattie del polmone. Questo dato è in accordo con alcuni recenti studi che suggeriscono la presenza di un persistente stress ossidativo e una infiammazione neutrofila nel polmone dei bambini e degli adolescenti nati prematuri (Filippone et al., 2009; Teig et al., 2012)^{32,33}. Per la variabile 592 abbiamo la corrispondenza con due fosfatidilcoline insature PC(4:0/18:1(9Z)) e [PC(18:1(9Z)/4:0)]

In generale, l'incremento di specie PC insature potrebbe essere indicativo della presenza di un certo grado di infiammazione nel polmone dei soggetti con BPD. Livelli incrementati di PC insature sono state precedentemente dimostrati in bambini con un acuto danno polmonare collegato alla perdita capillare e alla rottura della membrane dei neutrofili, e può essere considerata espressione dell'infiammazione associata al danno polmonare. (Todd et al., 2010)³⁴.

Un altro possibile biomarker che contribuisce alla caratterizzazione dei BPD ha una struttura compatibile con una PS modificata, appartenendo alle plasmenilfosfatidilserine [PS(P-16:0/12:0)], mentre i soggetti sani sono caratterizzati da possibili strutture legate alla conformazione classica della fosfatidilserina (Es. [PS(12:0/16:0)]).

I fosfolipidi anionici che compongono il surfattante alveolare, quali le fosfatidilserine, interagiscono selettivamente con specifiche proteine (gruppo SP-B) del surfattante. Questa interazione genera alcune perturbazioni nelle catene aciliche dei fosfolipidi, influenzandone il loro impaccamento e aiutando a stabilizzare il film di surfattante presente sulla superficie alveolare. (Cabrèet al., 2012)³⁵. Abbiamo ipotizzato che il cambiamento delle catene aciliche di questi fosfolipidi possa quindi influenzare le proprietà biofisiche del surfattante. Considerando contestualmente le due diverse fosfatidilserine emerse nei BPD e nei sani, questo dato potrebbe

significare una anomala composizione del tensioattivo alveolare nei soggetti con BPD che persiste anche al di là della fase acuta della malattia. Inoltre un polimorfismo genetico delle proteine che compongono il surfattante sembra predisporre allo sviluppo di displasia. (Hallman et al., 2006)³⁶. Si può pertanto speculare che questo polimorfismo genetico influenzi anche la composizione anomala del profilo lipidico, e non solo di quello proteico ma, dato che il nostro studio non prevedeva la scansione di masse maggiori di 1000Da, non possiamo affermare che un alterato profilo lipidico sia associato anche ad un alterato profilo proteico del surfattante. Dalla ricerca nei database è poi risultato che la variabile putativa per il gruppo di controllo potrebbe essere l'acido eicosapentaenoico, composto con un forte effetto antinfiammatorio. (Calder, 2010; Weylandt et al., 2012)^{37,38}

Abbiamo ipotizzato che questa differenza tra i due gruppi possa essere causata non da un incremento nel gruppo dei sani, ma ad una mancanza, e quindi una diminuzione del suo ruolo protettivo, nei soggetti con BPD.

Questo metabolita appartiene alla famiglia degli eicosanoidi, acidi grassi a 20 atomi di carbonio derivanti dall'acido arachidonico, principalmente attraverso tre pathways, che coinvolgono tre diversi enzimi. Un ruolo importante è svolto dalle cosiddette oxilipine, composti che, a seconda del tipo, della struttura, posseggono sia ruoli pro che antinfiammatori, in diverse patologie, tra cui quelle respiratorie. (Yang et al., 2009)³⁹. Data la loro importanza in diversi meccanismi patologici la rivelazione e identificazione di questa famiglia di composti è in continua espansione, e come riportato da un recente lavoro del gruppo del Prof Hammock, si è arrivati ad separare e quantificare 87 di questi composti in un'unica corsa cromatografica, tramite LC- associata a Q-Trap (Yang et al., 2009)³⁹. Come si può notare dalla Tabella 2, proprio per questo biomarker putativo, abbiamo il numero più alto di possibili strutture, dato l'elevato numero di isomeri ed isobari associati a questo rapporto

m/z. Per questa variabile però è difficile fare ulteriori studi, perché dall'analisi a posteriori degli spettri e dei cromatogrammi, nonostante sia risultata una variabile discriminativa, l'intensità risulta bassa e quindi difficilmente confrontabile con altri spettri.

Dato il ruolo chiave che svolgono questo tipo di composti nelle malattie infiammatorie respiratorie, ho partecipato ad un periodo formativo nel laboratorio del Prof. Hammock, sotto la supervisione del dott. Yang per lo sviluppo e la conoscenza dei metodi estrattivi e identificativi dei composti appartenenti alla famiglia delle oxilipine. L'applicazione delle nuove metodologie analitiche e conoscenze acquisite sarà sicuramente di grande aiuto per ulteriori approfondimenti relativi a questo studio.

Dal punto di vista metodologico non possiamo affermare con certezza che le molecole risultanti come possibili biomarker siano realmente quelle identificate nei databases. Questo è ovviamente un limite della nostra ricerca dovuta alla mancanza di standard esterni di riferimento e all'esigua quantità di campione biologico. Difatti una delle possibilità per identificare la molecola sarebbe quella di raccogliere la frazione di eluzione al tempo di ritenzione previsto, settando lo strumento sul rapporto m/z desiderato. Questo permetterebbe di concentrare il campione e sottoporlo così ad un'analisi di frammentazione tramite MS/MS, strumento utile per lo studio strutturale delle molecole. Ovviamente la forza del nostro studio sta comunque nell'aver condotto le analisi con uno strumento ad alta risoluzione che è appunto in grado di fornire la massa esatta della molecola ionizzata, permettendoci di identificare il composto tramite la sua massa nominale. Infatti come riportato in letteratura, l'accuratezza degli spettrometri di massa attuali è al di sotto dei 2ppm, valore sufficiente a separare tramite la massa più del 97% di possibili ioni, che rappresentano circa 293.000 composti naturali. (Kind and Fiehn, 2007)⁴⁰. Que-

sti metaboliti rappresentano solo una piccola porzione del totale, e come riportato in un recente articolo, i pochi database finora disponibili, nonostante siano costantemente aggiornati (Es. HMDB, METLIN, MetaCyc) sono ancora lontani dal monitorare tutti i metaboliti prodotti da una cellula, un tessuto o un organismo, cosa che invece ormai avviene per i database costruiti per la genomica e la trascrittomica. (Snyder, Li , 2013)⁴¹.

Come inoltre si può vedere dalla tabella dei biomarkers putativi, anche per i metaboliti per cui esiste una corrispondenza di massa con i valori trovati, possono esistere più strutture, che non sono separabili solo tramite il rapporto m/z , anche impiegando uno strumento ad alta risoluzione. Si tratta di composti isomeri, che se caratterizzati da diversa polarità potrebbero essere separati in cromatografia liquida, necessitando però di uno standard di riferimento. Altro strumento utile, introdotto recentemente nella spettrometria di massa, è la *Ion Mobility* che permette di ottenere una separazione degli ioni anche in presenza di specie isomeriche, isobariche ed enantiomeriche, basandosi sulla diversa geometria spaziale delle molecole. (Junot, 2013)⁴³. Tale procedura è utile negli studi dei metaboliti che presentano molte specie isomeriche, come riportato in un recente studio capace di rilevare, tramite la *IMS*, 1100 metaboliti nel sangue di cui 300 specie isomere . (Dweidi, Schultz, Hill, 2010)⁴⁴. In questa parte dello studio non si è potuto applicare questo metodo, al momento in cui i campioni sono stati analizzati non era ancora presente nel nostro laboratorio lo strumento provvisto di *Ion Mobility*. Altro punto importante negli studi metabolomici è quello di validare il modello costruito sui primi campioni su una popolazione più ampia. Il modello deve essere in grado di classificare correttamente il campione, inserendolo ad esempio nel gruppo dei sani o dei patologici, oltre ad estrapolare le stesse variabili discriminanti. Questa parte del progetto è iniziata con la raccolta di nuovi campioni, anche se il recluta-

mento di un numero ampio di pazienti di pazienti con diagnosi di BPD alla nascita richiede tempi lunghi. Importante negli studi metabolomici è anche costruire bene *l'experimental design* e avere uno stretto controllo di tutte le fasi dell'analisi. Il nostro studio, grazie ad un meticoloso controllo di ogni fase, che spazia dalla precisa preparazione dei solventi, alla verifica delle linee di base dei cromatogrammi, al controllo della temperatura esterna della stanza, fino alla verifica dell'intensità dei tempi di ritenzione degli ioni di riferimento, ci ha permesso di essere sicuri della bontà delle nostre analisi. Nel nostro caso quindi non vi è stata la necessità di ricorrere ai cosiddetti software di "allineamento" che permettono di creare una corrispondenza tra medesime masse e tempo di ritenzione corretto. (Katajamaa M, Oresic M, 2007)⁴⁵.

Dal punto di vista clinico riconosciamo che il nostro studio manca di un gruppo di confronto di adolescenti nati prematuri ma senza diagnosi di BPD, questo ci avrebbe permesso di valutare se la differenza riscontrata nel profilo metabolico sia dovuta alla BPD o alla nascita prematura nel suo insieme. Purtroppo non possiamo includere un gruppo nuovo nello studio, dato che tutti i campioni, nello studio per la costruzione del modello, devono essere analizzati contemporaneamente, per garantire le stesse condizioni analitiche. Un ulteriore limite consiste nella natura stessa dell'EBC che non ci permette di conoscere l'esatta origine anatomica dei biomarkers misurati; infatti anche se l'EBC sembra riflettere la composizione del fluido polmonare, (Hunt, 2002)⁴⁶ non possiamo affermare con certezza che l'anomala composizione lipidica descritta derivi direttamente dal surfattante alveolare invece che da una conduzione sistemica tramite le vie aeree. (Behrnard et al., 1997)⁴⁷.

CONCLUSIONI

Questo studio ha mostrato come la metabolomica possa fornire informazioni utili sulle malattie croniche ostruttive del polmone. In particolare, applicando questo approccio per la prima volta a campioni di EBC di soggetti con BPD alla nascita abbiamo evidenziato come sia possibile distinguere il profilo degli adolescenti con BPD dai controlli sani. L'aver individuato come possibili biomarker alcuni glicerofosfolipidi suggerisce un possibile coinvolgimento del surfattante alveolare alla base della minore funzionalità respiratoria dei soggetti con BPD, anche dopo anni dalla fase acuta della malattia.

Bibliografia

1. Morty RE, Konigshoff M, Eickelberg O. Transforming growth factor-beta signaling across ages: from distorted lung development to chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 6: 607–613, 2009.
2. Morrissey EE, Cardoso WV, Lane RH, Rabinovitch M, Abman SH, Ai X, Albertine KH, Bland RD, Chapman HA, Checkley W, Epstein JA, Kintner CR, Kumar M, Minoo P, Mariani TJ, McDonald DM, Mukoyama YS, Prince LS, Reese J, Rossant J, Shi W, Sun X, Werb Z, Whitsett JA, Gail D, Blaisdell CJ, Lin QS. Molecular determinants of lung development. *Ann Am Thorac Soc* 10: S12–S16, 2013
3. Morrissey EE, Hogan BL. Preparing for the first breath: genetic and cellular mechanisms in lung development. *Dev Cell* 18: 8–23, 2010.
4. Warburton D, El-Hashash A, Carraro G, Tiozzo C, Sala F, Rogers O, De Langhe S, Kemp PJ, Riccardi D, Torday J, Bellusci S, Shi W, Lubkin SR, Jesudason E. Lung organogenesis. *Curr Top Dev Biol* 90: 73–158, 2010.]
5. Madurga A, Mizíková I, Ruiz-Camp J, Morty RE Recent advances in late lung development and the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013 Dec;305(12):L893-905
6. Baraldi E, Filippone M Chronic lung disease after premature birth *N Engl J Med*. 2007 Nov 8;357(19):1946-55.
7. Northway WH Jr., Rosan RC, Porter DY. Pulmonary disease following respiratory therapy of hyaline-membrane disease Bronchopulmonary dysplasia. *N Engl J Med* 276: 357–368, 1967
8. Wong P, Murray C, Louw J, French N, Chambers D. Adult bronchopulmonary dysplasia: computed tomography pulmonary findings. *J Med Imaging Radiat Oncol* 55: 373–378, 2011.
9. Wong PM, Lees AN, Louw J, Lee FY, French N, Gain K, Murray CP, Wilson A, Chambers DC. Emphysema in young adult survivors of moderate-to-severe bronchopulmonary dysplasia. *Eur Respir J* 32: 321–328, 2008
10. Jobe AH. The new bronchopulmonary dysplasia. *Curr Opin Pediatr* 23: 167–172, 2011
 Jobe AH. What is BPD in 2012 and what will BPD become? *Early Hum Dev* 88, Suppl 2: S27–S28, 2012.
11. Carraro S, Filippone M, Da Dalt L, Ferraro V, Maretti M, Bressan S, El Mazloum D, Baraldi E Bronchopulmonary dysplasia: the earliest and perhaps the longest lasting obstructive lung disease in humans. *Early Hum Dev*. 2013 Oct;89 Suppl 3:S3-5
12. Ehrenkranz RA, Walsh MC, Vohr BR, Jobe AH, Wright LL, Fanaroff AA, Wraage LA, Poole K; Validation of the National Institutes of Health consensus definition of bronchopulmonary dysplasia. National Institutes of Child Health and Human Development Neonatal Research Network Pediatrics. 2005 Dec;116(6):1353-60.
13. www.ginaasthma.org
14. Jackson JE. *A Users Guide to Principal Components*. New York, John Wiley, 1991
15. Trygg J, Wold S. O2-PLS, a two-block (X-Y) latent variable regression (LVR) method with an integral OSC filter. *J Chemom* 2003;17:53-64.
16. Wiklund S, Johansson E, Sjöström L, Mellerowicz EJ, Edlund U, Shockcor JP, et al. Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. *Anal Chem* 2008;80:155-122

17. Mattarucchi E, Stocchero M, Moreno-Rojas JM, Giordano G, Reniero F, Guillou C. Authentication of Trappist Beers by LC-MS Fingerprints and Multivariate Data Analysis. *J Agric Food Chem* 2010, 58: 12089–12095
18. Maher AD, Fonville JM, Coen M, Lindon JC, Rae CD, Nicholson JK. Statistical total correlation spectroscopy scaling for enhancement of metabolic information recovery in biological NMR spectra. *Anal Chem.* 2012 Jan 17;84(2):1083-91.
19. Smith VC, Zupancic JA, McCormick MC, et al. Rehospitalization in the first year of life among infants with bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr* 2004;144:799–803
20. Vrijlandt EJ, Boezen HM, Gerritsen J, Stremmelaar EF, Duiverman EJ. Respiratory health in prematurely born preschool children with and without bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr* 2007;150:256–261.
21. Anand D, Stevenson CJ, West CR, Pharoah PO. Lung function and respiratory health in adolescents of very low birth weight. *Arch Dis Child* 2003;88:135-8.
22. Baraldi E, de Jongste JC; European Respiratory Society; American Thoracic Society. Measurement of exhaled nitric oxide in children, 2001. *Eur Respir J* 2002;20:223-37.
23. Northway WH Jr, Moss RB, Carlisle KB, et al. Late pulmonary sequelae of bronchopulmonary dysplasia. *N Engl J Med* 1990;323:1793-9.
24. Ozdemir A, Brown MA, Morgan WJ. Markers and mediators of inflammation in neonatal lung disease. *Pediatr Pulmonol* 1997;23:292-306.
25. Saugstad OD. Oxygen and oxidative stress in bronchopulmonary dysplasia. *J Perinat Med* 2010;38: 571-577.
26. Abman SH. Impaired vascular endothelial growth factor signaling in the pathogenesis of neonatal pulmonary vascular disease. *Adv Exp Med Biol* 2010;661:323-35.
27. Carraro S, Giordano G, Reniero F, Perilongo G, Baraldi E. Metabolomics: a new frontier for research in pediatrics. *J Pediatr* 2009;154:638-44
28. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev* 2007;26:51-78.
29. Nicholson JK, Lindon JC: Systems biology: Metabolomics. *Nature* 2008, 455:1054-6
30. Wheelock CE, Goss VM, Balgoma D, Nicholas B, Brandsma J, Skipp PJ, Snowden S, D'Amico A, Horvath I, Chaiboonchoe A, Ahmed H, Ballereau S, Rossios C, Chung KF, Montuschi P, Fowler SJ, Adcock IM, Postle AD, Dahlén SE, Rowe A, Sterk PJ, Auffray C, Djukanovic R; the U-BIO-PRED Study Group. Application of 'omics technologies to biomarker discovery in inflammatory lung diseases. *Eur Respir J* 2013
31. Ojala PJ, Hirvonen TE, Hermansson M, Somerharju P, Parkkinen J. Acyl chain-dependent effect of lysophosphatidylcholine on human neutrophils. *J Leukoc Biol* 2007;82:1501-9.
32. Filippone M, Bonetto G, Cherubin E, Carraro S, Baraldi E. Childhood course of lung function in survivors of bronchopulmonary dysplasia. *JAMA* 2009;302:1418-20.
33. Teig N, Allali M, Rieger C, Hamelmann E. Inflammatory Markers in Induced Sputum of School Children Born Before 32 Completed Weeks of Gestation. *J Pediatr* 2012;161:1085-90.
34. Todd DA, Marsh MJ, George A, Henderson NG, Barr H, Sebastian S, Clark GT, Koster G, Clark HW, Postle AD. Surfactant phospholipids, surfactant proteins, and inflammatory markers during acute lung injury in children. *Pediatr Crit Care Med.* 2010 Jan;11(1):82-91.
35. Cabré EJ, Loura LM, Fedorov A, Perez-Gil J, Prieto M. Topology and lipid selectivity of pulmonary surfactant protein SP-B in membranes: Answers from fluorescence. *Biochim Biophys*

- Acta 2012;1818:1717-1725.
36. Hallman M, Haataja R. Surfactant protein polymorphisms and neonatal lung disease. *Semin Perinatol.* 2006 Dec;30(6):350-61. Review.
 37. Calder PC. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes. *Nutrients* 2010; 2:355-7
 38. Weylandt KH, Chiu CY, Gomolka B, Waechter SF, Wiedenmann B. Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: towards an understanding of resolvin and protectin formation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2012;97:73-82.
 39. Yang J, Schmelzer K, Georgi K, Hammock BD. Quantitative profiling method for oxylipin metabolome by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 2009 Oct 1;81(19):8085-93
 40. Kind T, Fiehn O. Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. *BMC Bioinformatics.* 2007 Mar 27;8:105.
 41. Snyder M, Li X. Metabolomics as a robust tool in systems biology and personalized medicine: an open letter to the metabolomics community *Metabolomics* (2013) 9:532–534
 42. Kind T, Fiehn O. Metabolomic database annotations via query of elemental compositions: mass accuracy is insufficient even at less than 1 ppm *BMC Bioinformatics.* 2006 Apr 28;7:234.
 43. Junot C, Fenaille F, Colsch B, Bécher F. High resolution mass spectrometry based techniques at the crossroads of metabolic pathways. *Mass Spectrom Rev.* 2013 Nov 28.
 44. Dwivedi P, Schultz AJ, Hill HH.. Metabolic profiling of human blood by high resolution ion mobility mass spectrometry (IM-MS). *Int J Mass Spectrom* 2010 298(1–3):78–90.
 45. Katajamaa M, Oresic M.. Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *J Chromatogr A* 2007 1158(1–2):318–328.
 46. Hunt J. Exhaled breath condensate: an evolving tool for noninvasive evaluation of lung disease. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:28-3
 47. Bernhard W, Haagsman HP, Tschernig T, Poets CF, Postle AD, van Eijk ME, von der Hardt H. Conductive airway surfactant: surface-tension function, biochemical composition, and possible alveolar origin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17:41-50.

CAPITOLO 2

ANALISI METABOLOMICA PER LO STUDIO DEL WHEEZING

INTRODUZIONE

Il wheezing, o broncospasmo ricorrente, è un problema comune dei bambini in età prescolare, motivo di frequenti richieste di trattamento per il pediatra.

È caratterizzato da respiro sibilante (suono polmonare acuto ad alta tonalità), prolungato o continuo, di varia intensità, emesso dal polmone durante la fase espiratoria. Il broncospasmo è il risultato del restringimento delle vie aeree intratoraciche e della conseguente limitazione al flusso espiratorio e può essere associato a numerose patologie polmonari.

Il wheezing ricorrente è definito come il riscontro di tre o più episodi di respiro sibilante nell'arco di 6 mesi; mentre il wheezing persistente è definito dalla presenza di respiro sibilante nella maggior parte dei giorni della settimana nell'arco di 3 mesi che non scompare completamente tra gli episodi. (Baraldi, Piantentini, 2009; Brande t al., 2008, Martinez et al., 1995)^{1,2,3}

È una condizione etoregena, la cui prognosi a lungo termine varia dalla risoluzione fino allo sviluppo di asma persistente.(Dela Bianca et al., 2010)⁴

Proprio per la stretta relazione tra wheezing e successivo sviluppo di asma sono stati condotti molti studi per comprendere le caratteristiche e i fattori di rischio comuni, definire i diversi fenotipi di wheezing e studiarne i meccanismi fisiopatologici.(Stern et al., 2008)⁵.

Dal punto di vista clinico, per aiutare a predire quale bambino con wheezing ricorrente in età prescolare possa sviluppare asma dopo l'età di 6 anni, sono stati

messi a punto dei metodi detti indici di predizione o Asthma Predictive Index (API) (Castro et al., 2000; Guilbert et al., 2004)^{6,7}. Queste tecniche diagnostiche, pur essendo utili e di facile rivelazione, presentano un'accuratezza di predizione limitata. (Savenije et al., 2012)⁸

L'ideale sarebbe poter implementare questi indici attraverso dei marker biologici che possano meglio caratterizzare i diversi fenotipi di wheezing ricorrente.

La metabolomica, per la sua peculiarità di analizzare diverse matrici biologiche senza ipotesi a priori, si presta a questo tipo di studi il cui obiettivo è indagare la specificità dei profili metabolici dei diversi gruppi in esame.

Come già riportato, per indagare le malattie respiratorie, data la complessità dell'organo polmone, è utile integrare le informazioni provenienti da vari livelli di studio, da quello molecolare a quello dell'intero organo e la metabolomica è indicata per una visione comprensiva dei diversi composti presenti nelle matrici biologiche

Anche se le principali matrici biologiche per lo studio delle malattie respiratorie sono il condensato dell'aria esalata (EBC), il tessuto polmonare e le cellule isolate dal parenchima, lo sputo spontaneo o indotto e il fluido di lavaggio broncoalveolare, per le ripercussioni sistemiche delle patologie respiratorie, è possibile indagarle indirettamente anche attraverso le urine e il sangue.

In particolare le urine, data la loro non invasività di raccolta, si prestano bene agli studi condotti su soggetti in età pediatrica (Adamko et al., 2012)⁹, e sono riportati diversi studi di analisi metabolomica sulle urine che hanno portato a caratterizzare le diverse patologie respiratorie (Saude et al., 2011; Saude et al., 2009; Wolak et al., 2009, Laikis et al., 2010)^{10,11,12,13}. Inoltre le urine costituiscono un biofluido ottimale per diversi studi clinici data la presenza di una piccola quantità di cellule e proteine e di una composizione biochimica unica, influenzata dalla combinazione

di genotipo, condizioni patologiche, influenze ambientali, nutrizione. (Gu et al., 2009; Fanos et al., 2012)^{14,15}

Ovviamente questa matrice presenta anche degli svantaggi che sono dovuti principalmente alla distanza dal tessuto d'interesse e dall'influenza di patologie renali o epatiche che possono condizionare l'escrezione dei metaboliti.

OBIETTIVO

L'obiettivo di questa parte dello studio è di valutare, tramite lo studio metabolomico condotto con spettrometria di massa ad alta risoluzione, il profilo biochimico-metabolico di urine di soggetti in età prescolare con storia di wheezing ricorrente. Lo scopo è quello di confrontare le urine di bambini con wheezing rispetto a soggetti sani, valutando se sia possibile discriminarli attraverso l'analisi statistica multivariata.

Questo studio è solo la prima parte di un progetto più ampio; uno studio di *follow up* che verrà condotto sugli stessi soggetti allo scopo di valutare il profilo metabolico dei soggetti che svilupperanno asma e quelli che andranno incontro a risoluzione, verificando se vi siano dei *biomarkers* utili per una corretta predizione.

MATERIALI E METODI

Soggetti

I soggetti coinvolti nello studio sono stati reclutati dall'Unità di Pneumologia Allergologia e Pediatria del Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino dell'Azienda Ospedaliera-Università degli studi di Padova.

Il gruppo del wheezing è costituito da 41 bambini d'età compresa da 2 e 5 anni (età media 3.9) con diagnosi di wheezing ricorrente basato sul riscontro anamne-

stico di almeno 3 episodi di broncospasmo nell'ultimo anno. La matrice biologica analizzata è costituita da campioni di urine raccolti in condizioni di stabilità clinica ossia a distanza di almeno un mese da episodi acuti di broncospasmo. I criteri di esclusione prevedevano: nascita prematura, patologie respiratorie croniche o altre malattie croniche non respiratorie tipo cardiopatie e nefropatie, e storia di distress respiratorio alla nascita.

Il gruppo di controllo è costituito da 18 bambini con un'età tra i due e 5 anni (media 3.5 anni), nati a termine, sani e non affetti da patologie respiratorie o atopiche.

Disegno dello studio

Si tratta di uno studio *cross-sectional*, monocentrico, controllato (gruppo studio vs gruppo di controllo), su bambini affetti da *wheezing* ricorrente di sesso maschile e femminile. Per i bambini reclutati nello studio è stata raccolta l'anamnesi (con particolare riferimento a familiarità per asma, dermatite atopica, rinite allergica, storia di broncospasmo al di fuori degli episodi infettivi) ed è stato effettuato l'esame obiettivo.

In ogni soggetto è stato effettuato *Prick Test* per inalanti. Sono stati testati i seguenti allergeni inalanti: acari, graminacee, gatto, cane, erba canina, olivo, cipresso, betulla, nocciolo, artemisia, alternaria, lanciola.

Per ogni bambino reclutato è stato anche calcolato l'indice mAPI (*Modified Asthma Predictive Index*) (Castro et al., 2000; Guilbert et al., 2004)^{6,7}.

Raccolta urine

Per ciascun soggetto coinvolto nello studio è stato raccolto un campione di urina di almeno 4 mL.

Dopo la raccolta il campione veniva portato al nostro laboratorio (Laboratorio di

Spettrometria di Massa del Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino dell'Azienda Ospedaliera- Università degli studi di Padova) per essere stoccato secondo un protocollo adattato per gli studi di metabolomica.

Il campione è stato suddiviso in due aliquote di 3 mL, in provette di polipropilene precedentemente lavate in MeOH per evitare interferenti dovuti ai materiali plastici. Una delle due aliquote è stata addizionata di 20µL di sodio azide 1.07mM. Questo è un conservante che inibisce la formazione di microrganismi mantenendo la stabilità del campione senza alterarne le caratteristiche chimico-fisiche. Il conservante è stato aggiunto all' aliquota riservata ad analisi future da effettuarsi in relazione al *follow up* dei pazienti fino all'età scolare.

I campioni così aliquotati sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'analisi.

Strumentazione e materiali

L'analisi dei campioni urinari è stata eseguita tramite uno spettrometro di massa ad alta risoluzione con un analizzatore a tempo di volo del tipo Q-ToF (Synapt G2; Waters) interfacciato con un sistema cromatografico UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography). (Waters)

Sono stati utilizzati solventi e reagenti di grado LC-MS ULTRA (Sigma St.Louis, MO, USA) e acqua di tipo MilliQ con grado di purezza 1.

Per l'analisi cromatografica si sono utilizzate due tipi di colonne UPLC, HSS T3 (2.1x100 mm, 1.8) e BEH HILIC (2.1x100 mm, 1.8) rispettivamente a fase inversa e a fase polare. (Waters co., Miliford, MA USA)

Preparazione del campione per analisi in UPLC/MS

La preparazione del campione prevedeva la diluizione 1:5 di un' aliquota di urina con due diverse soluzioni a seconda del tipo di colonna utilizzata.

Nella cromatografia è utile che il campione iniettato abbia una composizione simile a quella della prima parte del gradiente cromatografico, per non alterarne le caratteristiche di polarità. Solitamente con le colonne a fase stazionaria apolare (o inversa) il gradiente inizia con un'alta percentuale di solvente polare per poi aumentare la fase organica, al contrario con le colonne a fase polare, dove il gradiente iniziale prevede un'alta percentuale di solvente organico che cala in favore del solvente più polare durante la corsa cromatografica.

Nella nostra analisi quindi 100µL di urina sono stati diluiti con una soluzione di acqua +0.1% acido formico (FA) per l'analisi con la colonna T3 e con una soluzione di Acetonitrile +0.1% FA per l'analisi in colonna HILIC.

Il campione di urina era stato precedentemente centrifugato a 16.000g per 10 minuti per precipitare le sostanze insolubili presenti nel campione.

Le soluzioni così preparate sono state poi trasferite in vials per l'iniezione tramite autocampionatore nel sistema UPLC.

Condizioni cromatografiche

La configurazione strumentale prevedeva l'uso di un sistema di cromatografia liquida UPLC. Questo sistema, grazie alle alte pressioni esercitate permette di utilizzare colonne analitiche con un diametro più stretto e particelle della fase stazionaria minori di quelle impiegate nell'analisi con HPLC. Questo permette di ottenere un'area d'interazione tra fase stazionaria e soluti maggiore, che si riflette in picchi cromatografici più stretti e risolti. Inoltre grazie alle alte pressioni esercitate è possibile impiegare velocità di flusso maggiori ottenendo corse cromatografiche più brevi. Per l'analisi con colonna T3 a fase stazionaria inversa sono stati impiegati gli eluenti A (acqua +0.1%FA) e B (Metanolo:Acetonitrile 90:10 +%FA). La percentuale del solvente B variava nel tempo nel seguente modo: 0 minuti 5%, 3.5 minuti 30%,

6 minuti 95%, 11 minuti 5% con un flusso di 500 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Per l'analisi in colonna a fase polare HILIC i solventi erano invece: A, acetato di ammonio 10 mM in acqua + 0.1 % acido formico e B, acetato di ammonio 1mM in acetonitrile:acqua 99.5:0.5 + 0.1% acido formico. La percentuale del solvente B variava nel tempo nel seguente modo: 0 minuti 99%, 5.5 minuti 80%, 6.01 minuti 5%, 11 minuti 99% ad un flusso di 500 $\mu\text{L}/\text{min}$. Le colonne per entrambe le analisi erano termostatate a 40°C.

Analisi in spettrometria di massa

L'analisi in spettrometria di massa è stata condotta tramite uno spettrometro di massa ad alta risoluzione con analizzatore ibrido a tempo di volo (Q-Tof).

Le caratteristiche degli spettrometri Tof sono l'alta capacità risolutiva che si traduce in una separazione di ioni con m/z anche molto vicini, l'alta sensibilità, che permette di quantificare anche ioni presenti in tracce, e la capacità di ricavare la massa esatta di una molecola, contribuendo alla sua identificazione. Inoltre questo tipo di strumento ibrido è dotato anche di un analizzatore del tipo quadrupolare che permette l'analisi di frammentazione degli ioni in esperimenti del tipo MS_n

La sorgente dello strumento era del tipo elettrospray (ESI) e le analisi sono state condotte sia in ionizzazione positiva (ESI+) che negativa (ESI-), per coprire un più ampio range di molecole ionizzate. Il voltaggio del capillare della sorgente è stato settato a 3kV, la temperatura a 110°C e il flusso di desolvatazione dell'azoto a 600 L/Hr. La scansione è stata effettuata in un range di massa da 20 a 1200 amu.

Ogni campione è stato quindi analizzato con due colonne cromatografiche e due sistemi di ionizzazione per ogni colonna. Nella Figura 1 è riportato un esempio di cromatogramma con le due diverse polarità, per evidenziare i differenti profili cromatografici che si ottengono da un campione di urine.

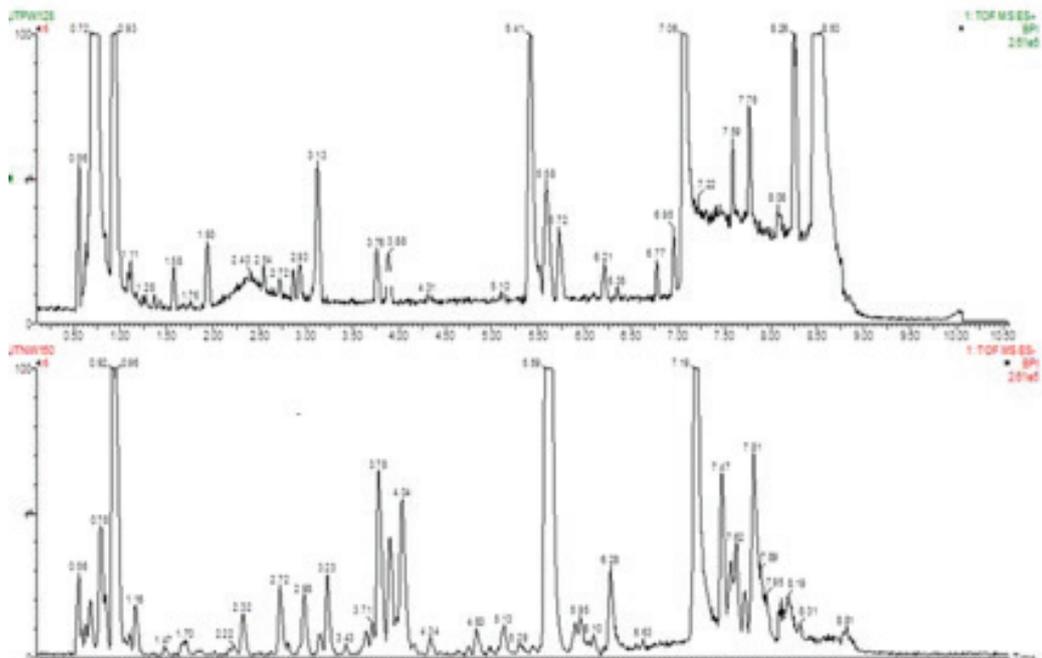


Figura 1 Profili cromatografici (amplificati 6 volte) dello stesso campione di urina analizzato mediante colonna HSS T3 nelle polarità positiva (in alto) e negativa (in basso)

Controlli di qualità ed estrazione dei dati

La modalità di costruzione delle sequenze analitiche ha seguito le stesse procedure dell'analisi metabolomica degli EBC per lo studio della BPD, ma estesa a più sequenze analitiche. Ogni campione è stato analizzato in triplicato, secondo sequenze casuali per evitare effetti sulla classificazione dovuti alle condizioni analitiche.

Per verificare la riproducibilità analitica e l'andamento caratteristico del profilo spettrale dei campioni d'urina si sono preparati dei controlli di qualità (QC), costituiti da un pool di urine di tutti i soggetti analizzati (20 μ L per campione), che sono stati inseriti nel batch d'analisi ogni 10 campioni. Stessa procedura è stata eseguita per valutare l'accuratezza di massa e dell'analisi cromatografica nel tempo, iniettando delle soluzioni di standards a massa nota (Sulfadimethoxine, Val-Tyr-Val, Leucine-Enkephalin, Erythromycin e Caffeine). Questi composti hanno la caratteristica di ionizzarsi sia in positivo che negativo, oltre a permettere una verifica dei tempi nell'intero profilo cromatografico avendo differenti polarità e quindi diversi

tempi di ritenzione. Sono stati inoltre inseriti dei bianchi costituiti solo da solvente per monitorare possibili contaminazioni e valutare poi durante la fase esplorativa degli spettri di massa quali ioni fossero caratteristici dei solventi utilizzati. L'analisi dei QC è servita anche ad estrapolare i parametri da impostare per l'analisi esplorativa degli spettri tramite il software MarkerLynks. (Waters co., Milford, MA USA), ad esempio ricavando i valori di *threshold*, i tempi per la finestra d'acquisizione o il tipo di *smoothing*.

Descrizione dei data set

Ciascuno dei 59 campioni di urina è stato analizzato mediante LC-MS utilizzando due diverse colonne cromatografiche (HILIC e T3) e due diversi metodi di ionizzazione (negativo e positivo). I dati ottenuti sono stati elaborati con il software MarkerLynx al fine di estrarre le variabili tempo-massa utili per l'analisi dati. I 4 data set ottenuti sono come HILIC NEG (dati prodotti mediante colonna HILIC in modalità di ionizzazione negativa), HILIC POS (colonna HILIC e ionizzazione positiva), T3 NEG (colonna T3 in negativo) e T3 POS (colonna T3 in positivo). Dopo aver eliminato da ciascun *data set* tutte le variabili che hanno presentato un numero di dati mancanti superiore al 10% rispetto ai campioni totali si è proceduto alla normalizzazione secondo il metodo denominato *median fold change normalization*. I *data set* sono pertanto risultati costituiti da 18 campioni di controllo (indicati con WS) e 41 campioni di soggetti affetti da *wheezing* e dal numero seguente di variabili tempo-massa

Tabella 1 Numero di variabili individuate per ogni data set dopo normalizzazione

ANALISI	VARIABILI
HILIC NEG	323
HILIC POS	533
T3 NEG	552
T3 POS	838

Analisi statistica dei dati

Le variabili di ciascun *data set* sono state log-trasformate e scalate secondo Pareto *scaling* dopo aver applicato la centratura sul valore medio di ciascuna variabile.

La tecnica di classificazione utilizzata per costruire i modelli statistici dei dati è stata OPLS-DA (*Orthogonal Projections to Latent Structures-Discriminant Analysis*) per i problemi a due classi. Ciascun modello è stato *full cross-validato* utilizzando 6, 7 e 8 gruppi (nel seguito si riporta il valore di Q2 per la *full cross-validazione* con 7 gruppi) e sottoposto al test di permutazione dei responsi. Al fine di rendere i modelli più robusti da un punto di vista statistico è stato applicato un filtraggio delle variabili basato sul parametro VIP in modo tale da realizzare il modello con il massimo valore di Q2. Il numero di variabili latenti per i diversi modelli è stato scelto in modo tale da garantire il massimo valore di Q2 sotto il vincolo di superare il test di permutazione dei responsi. I potenziali marcatori sono stati selezionati mediante esplorazione del cosiddetto S-plot.

Il potere discriminante di ciascun singolo potenziale marcatore è stato caratterizzato dal valore di p-value per il t-test e dall'area sotto la curva (AUC) derivata dalla ROC analysis.

RISULTATI

Per caratterizzare il gruppo dei controlli sani (WS) rispetto al gruppo dei soggetti affetti da wheezing per ciascuno dei 4 *dataset* sono stati costruiti i modelli OPLS-DA riportati in Tabella 2.

Tabella 2 Caratteristiche dei modelli OPLS-DA ottenuti per i 4 data set: N indica il numero di variabili del data set, N model il numero di variabili utilizzate dal modello dopo il filtraggio sui VIP, A il numero di variabili latenti del modello, R2 il grado di fitting del modello e Q2 il potere predittivo stimato mediante full cross-validazione con 7 gruppi.

data set	N	N model	A	R2	Q2
HILC NEG	323	57	1+1	0.7	0.48
HILC POS	533	103	1+1	0.65	0.48
T3 NEG	552	102	1+2	0.82	0.57
T3 POS	838	63	1+1	0.7	0.38

Come esempio in Figura 2 è mostrato lo score scatter plot relativo al modello per il data set T3 NEG. Come si può notare i controlli (in verde) risultano ben distinguibili dai soggetti con wheezing (in grigio), consentendo di ipotizzare che vi siano differenze nel profilo metabolico che spiegano la netta differenziazione tra i due diversi gruppi in esame.

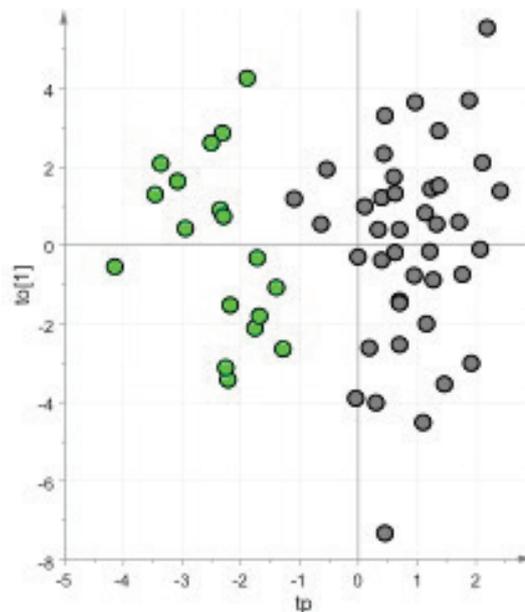


Figura 2 Score scatter plot del modello OPLS-DA per il data set T3 NEG; in verde sono riportati i campioni dei soggetti sani (controlli) mentre in grigio quelli dei soggetti con wheezing

L'analisi di *S-plot* di Figura 3 ha permesso di evidenziare le variabili particolarmente rilevanti nella discriminazione tra i gruppi (potenziali marcatori).

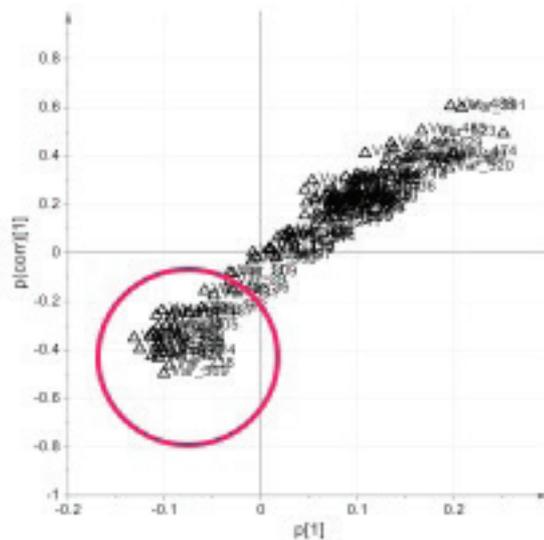


Figura 3 S-plot per il modello OPLS-DA relativo al modello sani contro soggetti con wheezing per il data set T3 NEG.

Identificazione delle variabili significative

Una volta creati i modelli OPLS-DA, è stato possibile procedere con l'identificazione delle variabili di maggiore rilevanza nella discriminazione tra i gruppi stessi. La ricerca in alcuni database di metabolomica disponibili (HMDB e METLIN) ha permesso di identificare alcuni metaboliti candidabili come potenziali biomarkers in quanto dotati di struttura chimico-fisica compatibile con quella delle variabili selezionate e caratterizzati da attività biologica potenzialmente significativa nell'ambito del wheezing.

Il database METLIN ha fornito le informazioni più utili per l'identificazione delle molecole in esame

La ricerca dei metaboliti è stata impostata con i seguenti parametri:

- valore m/z della massa analizzata;
- carica della massa positiva;
- ionizzazione del tipo $[M+H]^+$;
- tolleranza per l'errore di 10 ppm ($\Delta\text{ppm} = \text{Mmisurata} - \text{Mmattesa} / \text{Mmattesa}$).

In Tabella 3 sono riportati i potenziali biomarkers identificati nella discriminazione tra i soggetti sani ed i soggetti con wheezing.

Tabella 3 Potenziali biomarkers discriminanti tra i soggetti sani ed i soggetti con wheezing dall'analisi OPLS-DA.

var	RT	m/z	colonna	polarità	potenziali biomarkers
475	5,8298	349,2375	T3	positiva	PGD2
509	0,6310	647,4586	HILIC	positiva	acido fosfatidico
524	0,6345	681,475	HILIC	positiva	fosfatidil glicerolo

DISCUSSIONE

Questa parte dello studio ha visto l'applicazione dell'approccio metabolomico alle urine per studiare il broncospasmo ricorrente.

Lo studio è stato condotto tramite spettrometria di massa ad alta risoluzione associata ad UPLC. L'analisi si è dimostrata efficace nel caratterizzare il profilo metabolico delle urine tramite analisi in spettrometria di massa ad alta risoluzione

La metabolomica è una tecnica *unbiased*, in cui non sono ricercati dei particolari composti, ma si esegue una scansione dell'intero *pattern* dei metaboliti presenti in un campione. Con le tecniche attualmente disponibili non è possibile coprire l'intero metaboloma, e servono diversi tipi di approcci per individuare il più alto numero di metaboliti.

Proprio per ottenere più informazioni da un unico campione, in questa parte di studio è stato possibile, grazie alla maggiore quantità di matrice biologica disponibile, analizzare il campione in diverse modalità. Le analisi sono state condotte

infatti con due tipi di colonne e due modalità di ionizzazione per l'analisi in MS per poter rilevare più metaboliti nel campione urinario. (Bouatra et al., 2013)¹⁶

Le colonne erano rispettivamente a fase stazionaria inversa o apolare e a fase polare. Benchè la fase inversa sia una delle tecniche più conosciute e convalidate, (Kirkland, 2004; Stella et al., 2007, Zelena et al., 2009)¹⁷⁻¹⁹ per determinati composti, altamente polari, è difficile ottenere una buona separazione, anche variando gli eluenti della fase mobile, perché vengono poco o per niente trattenuti in colonna. Quindi per alcuni composti, quali ad esempio alcuni amminoacidi, è utile impiegare colonne a fase stazionaria polare come le nuove colonne HILIC per analisi in UPLC. (Yanes et al., 2011; Rodríguez et al., 2011)^{20,21}. Questa tecnica si adatta bene ai metaboliti presenti nelle urine, che per essere escreti, devono essere coniugati o trasformati in composti più polari e quindi più idrofili. (Muntané, 2009)²²

Lo studio è stato condotto anche con due diverse polarità della sorgente, dette ESI+ ed ESI-, per ottenere rispettivamente ioni a carica positiva e ioni a carica negativa. Solitamente la tecnica più utilizzata è la ESI+ in quanto le molecole si ionizzano più facilmente in positivo: confrontando gli spettri di massa nelle due diverse polarità, si può notare come vi siano meno segnali, ossia meno ioni, in polarità negativa, in gergo si dice che lo spettro è meno disturbato. Questo però non esclude che si possano ricavare informazioni utili anche dall'indagine di questi spettri, dato che alcune importanti classi di composti, quali acidi biliari, alcuni tipi di fosfolipidi e altri acidi organici, si caricano più facilmente in ionizzazione negativa. (Yousef et al., 2003)²³, (Bang et al., 2012)²⁴, (Sriboonvorakul, 2013)²⁵. La nostra analisi ha permesso quindi di indagare un più ampio numero di composti presenti nelle urine.

Dal punto di vista analitico, possiamo affermare che, dai risultati ottenuti per i QC, gli standards interni e i tre replicati dei campioni, l'analisi è accurata, sensibile e

riproducibile con una varianza espressa come CV% tra le analisi dei tre replicati <30%-, un errore medio di accuratezza di massa <3 ppm, e una differenza nei tempi di ritenzione di 0.1min.

Dal punto di vista statistico lo studio ha permesso di costruire robusti modelli in grado di discriminare i bambini con *wheezing* ricorrente dai controlli sani, come si evince dai valori di R2 e Q2 ottenuti. (Tabella 2)

Questi valori indicano come i modelli costruiti siano robusti e possano spiegare la variabilità dei profili ottenuti. Inoltre hanno permesso di costruire dei buoni modelli di classificazione e predizione, come si nota in particolare per il modello T3Neg e dal valore di Q2 ottenuto pari a 0.6. Il Q2 è infatti un parametro che indica la capacità predittiva del modello e si considera avere una buona predittività quando risulta maggiore di 0.5.

Dal punto di vista clinico il nostro studio ha mostrato come l'approccio metabolomico applicato alle urine possa caratterizzare i bambini con *wheezing* ricorrente in età prescolare, indicando un profilo metabolomico urinario differente dai soggetti sani.

Inoltre, dato che i campioni di urina sottoposti ad analisi metabolomica sono stati raccolti in condizioni di stabilità clinica (ossia a distanza da episodi acuti di broncospasmo), si può affermare che i bambini con *wheezing* ricorrente abbiano caratteristiche biochimiche metaboliche che li differenziano dai bambini sani anche a fronte di un quadro clinico stabile.

Una volta caratterizzati i profili, il passo successivo dell'analisi statistica è stata l'estrapolazione delle variabili utili per la discriminazione, tramite il tool statistico S-plot.

Le variabili sono state confrontate con i database HMDB26, METLIN27, e sulla base della massa esatta ottenuta con lo strumento ad alta risoluzione, si è ipotizzata la

natura biologica ed eventualmente il ruolo patogenetico nei bambini con *wheezing* ricorrente (biomarkers putativi).

Tra i composti caratterizzanti i bambini con *wheezing* sono state identificate le seguenti variabili che potrebbero avere un ruolo fisiopatologico nel broncospasmo ricorrente:

- 1) variabile 475 (RT 5.8298; m/z 349.2375) che ha una struttura ascrivibile a quella di un metabolita della prostaglandina D2 (11-deoxy-11-methylene-15-keto-PGD2);
- 2) variabile 509 (RT 0.631; m/z 647.459) che ha una struttura ascrivibile a quella dell'acido fosfatidico;
- 3) variabile 524 (RT 0.6345; m/z 681.475) che ha una struttura ascrivibile a quella del fosfatidil-glicerolo.

Per quanto riguarda la PGD2 essa ha un ruolo noto nell'infiammazione asmatica sostenuta dai linfociti T Helper antigene-specifici di tipo II (Th2) (Fajt et al., 2013)²⁸ e livelli aumentati sono stati riscontrati nelle urine di soggetti asmatici (Balgoma et al., 2013)²⁹.

Tipicamente i linfociti T helper 2 (Th2) esprimono un particolare profilo citochinico (IL-4,IL-5,IL-9, IL-13) che genera una caratteristica risposta infiammatoria orientata in senso anticorpale tipica delle malattie allergiche, coinvolgendo mastcellule, basofili, eosinofili. (Arima, Fukuda, 2011)³⁰

Il riscontro dell'acido fosfatidico e del fosfatidilglicerolo nella caratterizzazione dei bambini con *wheezing* suggerisce una possibile disregolazione dei fosfolipidi in questi soggetti. Inoltre l'acido fosfatidico può essere un precursore dell'acido lisofosfatidico per il quale è stato dimostrato un ruolo nella contrattilità della muscolatura liscia e nei processi infiammatori a carico delle vie aeree (Wheelock et al., 2013)³¹.

Dobbiamo riconoscere che le variabili discusse sono solo quelle per cui è stato possibile ottenere delle informazioni nei relativi database. Questo, come riportato in letteratura, è ancora il grosso limite dell'approccio metabolomico, che non dispone di database completi, che possano coprire l'intero set di metaboliti, come per altre tecniche "omiche" e il cui scoglio maggiore è rappresentato dalla identificazione degli ioni, che si può ottenere tramite studi di frammentazione. (Werner et al., 2008; Bowen, Northen, 2010; Hegeman, 2010; Neumann & Bocker, 2010; Wishart, 2011)³¹⁻³⁵

Anche se il nostro studio ha previsto l'acquisizione degli spettri in MSⁿ, non per tutti gli ioni è stato possibile ricavare chiari spettri di frammentazione, dato la minore intensità dei segnali in questo tipo di spettro.

Una possibilità è quella di sviluppare degli specifici esperimenti in MRM che siano altamente selettivi e sensibili per una determinata frammentazione, utilizzando ad esempio standards che abbiano la stessa struttura del probabile biomarker, o sintetizzando il composto con la struttura ipotizzata. Un'altra possibilità è rappresentata dalla raccolta frazionata del campione basata sul rapporto m/z specifico. Questo permette di raccogliere e concentrare il campione su cui poi acquisire lo spettro in MRM. A differenza dell'analisi condotta con gli EBC, questa metodica potrebbe essere applicata a tale studio, data la maggiore quantità di matrice biologica disponibile, ma in questa prima fase non è stata programmata tale indagine. Ulteriore passo, come per gli altri studi metabolomici, sarà la validazione dei modelli costruiti tramite l'analisi in LC-MS di un numero più ampio di soggetti con wheezing ricorrente in età prescolare.

CONCLUSIONI

Questo studio ha mostrato come sia possibile discriminare chiaramente i bambini con broncospasmo ricorrente dai soggetti sani, applicando per la prima volta l'approccio metabolomico ad urine di pazienti con wheezing ricorrente in età scolare. L'ulteriore indagine ha permesso di ipotizzare un possibile ruolo dei biomarker putativi nel caratterizzare i soggetti con wheezing, in particolare suggerendo un ruolo patogenetico dell'infiammazione T helper 2 (Fajt et al., 2013, Balgoma et., 2013)^{28,29} e una potenziale disregolazione dell'assetto fosfolipidico (Wheelock et al., 2013)³¹

Possiamo quindi affermare che l'analisi condotta tramite spettrometria di massa ad alta risoluzione sia una tecnica efficiente per condurre studi metabolomici e come anche i campioni costituiti dalla matrice urina possano essere impiegati per studiare le patologie del polmone. Ciò si dimostra assai utile in quanto la modalità di raccolta, come l'EBC, è totalmente non invasiva e quindi adatta ad analisi in ambito pediatrico oltre che per studi di *follow-up*.

Inoltre questo progetto rientra in uno studio prospettico, e questa prima analisi condotta è solo una parte promettente di un progetto che vedrà l'analisi metabolomica degli stessi soggetti dopo il sesto anno di età. Questo servirà a valutare a posteriori se esistano dei biomarkers specifici che possano indicare quali bambini con wheezing ricorrente in età prescolare svilupperanno asma, aprendo la strada a nuovi tools diagnostici e/o targets terapeutici.

Bibliografia

1. Baraldi E, Piacentini G. Step-up therapy for children with uncontrolled asthma. *N Engl J Med* 2010; 363: 90; author reply 91.
2. Brand PL, Baraldi E, Bisgaard H, Boner AL, Castro-Rodriguez JA, Custovic A, de Blic J, de Jongste JC, Eber E, Everard ML, Frey U, Gappa M, Garcia-Marcos L, Grigg J, Lenney W, Le Souef P, McKenzie S, Merkus PJ, Midulla F, Paton JY, Piacentini G, Pohunek P, Rossi GA, Seddon P, Silverman M, Sly PD, Stick S, Valiulis A, van Aalderen WM, Wildhaber JH, Wennergren G, Wilson N, Zivkovic Z, Bush A. Definition, assessment and treatment of wheezing disorders in preschool children: an evidence-based approach. *Eur Respir J* 2008; 32: 1096.
3. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. *N Engl J Med* 1995; 332: 133.
4. Dela Bianca AC, Wandalsen GF, Mallol J, Sole D. Prevalence and severity of wheezing in the first year of life. *J Bras Pneumol* 2010; 36: 402.
5. Stern DA, Morgan WJ, Halonen M, Wright AL, Martinez FD. Wheezing and bronchial hyper-responsiveness in early childhood as predictors of newly diagnosed asthma in early adulthood: a longitudinal birth-cohort study. *Lancet* 2008; 372: 1058.
6. Castro-Rodriguez JA, Holberg CJ, Wright AL, Martinez FD. A clinical index to define risk of asthma in young children with recurrent wheezing. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1403.
7. Guilbert TW, Morgan WJ, Zeiger RS, Bacharier LB, Boehmer SJ, Krawiec M, Larsen G, Lemanske RF, Liu A, Mauger DT, Sorkness C, Szeffler SJ, Strunk RC, Taussig LM, Martinez FD. Atopic characteristics of children with recurrent wheezing at high risk for the development of childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 1282.
8. Savenije OE, Kerkhof M, Koppelman GH, Postma DS. Predicting who will have asthma at school age among preschool children. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 130: 325.
9. Adamko DJ, Sykes BD, Rowe BH. The metabolomics of asthma: novel diagnostic potential. *Chest* 2012; 141: 1295.
10. Saude EJ, Skappak CD, Regush S, Cook K, Ben-Zvi A, Becker A, Moqbel R, Sykes BD, Rowe BH,
11. Adamko DJ. Metabolomic profiling of asthma: diagnostic utility of urine nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 757.
12. Saude EJ, Obiefuna IP, Somorjai RL, Ajamian F, Skappak C, Ahmad T, Dolenko BK, Sykes BD, Moqbel R, Adamko DJ. Metabolomic biomarkers in a model of asthma exacerbation: urine nuclear magnetic resonance. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179: 25.
13. Laiakis EC, Morris GA, Fornace AJ, Howie SR. Metabolomic analysis in severe childhood pneumonia in the Gambia, West Africa: findings from a pilot study. *PLoS One* 2010; 5: 10.1371/journal.pone.0012655.
14. Gu H, Pan Z, Xi B, Hainline BE, Shanaiah N, Asiago V, Gowda GA, Raftery D. 1H NMR metabolomics study of age profiling in children. *NMR Biomed* 2009; 22: 826.
15. Fanos V, Antonucci R, Barberini L, Noto A, Atzori L. Clinical application of metabolomics in neonatology. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; 25 Suppl 1: 104.
16. Bouatra S, Aziat F, Mandal R, Guo AC, Wilson MR, Knox C, Bjorndahl TC, Krishnamurthy R, Saleem F, Liu P, Dame ZT, Poelzer J, Huynh J, Yallou FS, Psychogios N, Dong E, Bogumil R,

- Roehring C, Wishart DS The human urine metabolome. *PLoS One*. 2013 Sep 4;8(9):e73076
17. Kirkland JJ. Development of some stationary phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2004.1060:9–21.
 18. Stella C, Rudaz S, Gauvrit JY, Lantéri P, Huteau A, Tchaplà A, Veuthey JL.. Characterization and comparison of the chromatographic performance of different types of reversed-phase stationary phases. *J Pharm Biomed Anal* 2007 43:89–98
 19. Zelena E, Dunn WB, Broadhurst D, Francis-McIntyre S, Carroll KM, Begley P, O'Hagan S, Knowles JD, Halsall A, Wilson ID, Kell DB.. Development of a robust and repeatable UPLC-MS method for the long-term metabolomic study of human serum. *Anal Chem* 2009 81(4):1357–1364.
 20. Yanes O, Tautenhahn R, Patti GJ, Siuzdak G. 2011. Expanding coverage of the metabolome for global metabolite profiling. *Anal Chem* 83(6):2152–2161.
 21. Rodríguez-Gonzalo E, García-Gómez D, Carabias-Martínez R. Development and validation of a hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry method with on-line polar extraction for the analysis of urinary nucleosides. Potential application in clinical diagnosis. *J Chromatogr A*. 2011 Dec 16;1218(50):9055-63
 22. Muntané J. Regulation of drug metabolism and transporters. *Curr Drug Metab*. 2009 Oct;10(8):932-45.
 23. Yousef IM, Perwaiz S, Lamireau T, Tuchweber B. Urinary bile acid profile in children with in-born errors of bile acid metabolism and chronic cholestasis; screening technique using electrospray tandem mass-spectrometry (ES/MS/MS). *Med Sci Monit*. 2003 Mar;9(3):MT21-31.
 24. Bang DY, Lim S, Moon MH. Effect of ionization modifiers on the simultaneous analysis of all classes of phospholipids by nanoflow liquid chromatography/tandem mass spectrometry in negative ion mode. *J Chromatogr A*. 2012 Jun 1;1240:69-76.
 25. Sriboonvorakul N, Leepipatpiboon N, Dondorp AM, Pouplin T, White NJ, Tarning J, Lindegardh N. Liquid chromatographic-mass spectrometric method for simultaneous determination of small organic acids potentially contributing to acidosis in severe malaria. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2013 Dec 15;941:116-22.
 26. <http://www.hmdb.ca/>
 27. <http://metlin.scripps.edu/>
 28. Fajt ML, Gelhaus SL, Freeman B, Uvalle CE, Trudeau JB, Holguin F, Wenzel SE. Prostaglandin D(2) pathway upregulation: relation to asthma severity, control, and TH2 inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131: 1504.
 29. Balgoma D, Larsson J, Rokach J, Lawson JA, Daham K, Dahlen B, Dahlen SE, Wheelock CE. Quantification of lipid mediator metabolites in human urine from asthma patients by electrospray ionization mass spectrometry: controlling matrix effects. *Anal Chem* 2013; 85: 7866.
 30. Arima M, Fukuda T. Prostaglandin D(2) and T(H)2 inflammation in the pathogenesis of bronchial asthma. *Korean J Intern Med* 2011; 26: 8.
 31. Wheelock CE, Goss VM, Balgoma D, Nicholas B, Brandsma J, Skipp PJ, Snowden S, Burg D, D'Amico A, Horvath I, Chaiboonchoe A, Ahmed H, Ballereau S, Rossios C, Chung KF, Montuschi P, Fowler SJ, Adcock IM, Postle AD, Dahlen SE, Rowe A, Sterk PJ, Auffray C, Djukanovic R, U-BIOPRED Study Group. Application of 'omics technologies to biomarker discovery in inflammatory lung diseases. *Eur Respir J* 2013; 42:
 32. Werner E, Heilier JF, Ducruix C, Ezan E, Junot C, Tabet JC.. Mass spectrometry for the identi-

- fication of the discriminating signals from metabolomics: current status and future trends. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008 871(2):143–163.
33. Bowen BP, Northen TR. Dealing with the unknown: metabolomics and metabolite atlases. *J Am Soc Mass Spectrom* 2010 21(9):1471–1476.
 34. Hegeman AD. Plant metabolomics—Meeting the analytical challenges of comprehensive metabolite analysis. *Brief Funct Genomics* 2010 9(2):139–148.
 35. Neumann S, Bocker S. Computational mass spectrometry for metabolomics: Identification of metabolites and small molecules. *Anal Bioanal Chem* 2010 398(7–8):2779–2788.
 36. Wishart DS. Advances in metabolite identification. *Bioanalysis* 2011 3(15):1769–1782.

CAPITOLO 3

ANALISI TARGET IN SPETTROMETRIA DI MASSA DI DIMETILARGININE SU CAMPIONI DI EBC NELLO STUDIO DELL'ASMA

INTRODUZIONE

L'asma è la più comune malattia cronica infiammatoria delle vie aeree dell'infanzia, colpendo il 32.6% dei bambini nel mondo occidentale. (Lai et al., 2009)¹ e con una incidenza in continuo aumento (Akinbami et al., 2009)².

È causata da una complessa interazione tra fattori genetici, epigenetici e ambientali e nonostante i molti studi condotti sull'asma i fattori determinanti rimangono ancora non del tutto chiariti. (Barnes et al., 2008)³

L'infiammazione e lo stress ossidativo delle vie aeree sono una causa essenziale nella patogenesi dell'asma, e recenti studi hanno messo in evidenza come i danni causati dall'ossidazione dei tessuti possano derivare da composti che si generano nel ciclo dell'ADMA, un analogo metilato dell'amminoacido L-Arginina. (Scott et al., 2011; Grasemann et al., 2011; Wells et al. 2007)^{4,5,6}

L'arginina (Arg), aminoacido semiessenziale, è un importante substrato per gli enzimi quali l'ossido nitrico sintetasi (NOS) e le arginasi (Meurs et al. 2003; Mori, Gotoh, 2000)^{7,8}. La produzione di ossido nitrico (NO) è un processo che può essere inibito competitivamente dagli analoghi dell'arginina, quali la dimetilarginina asimmetrica (ADMA), la dimetilarginina simmetrica (SDMA) e la N-monometilarginina (NMMA), derivati dalla metilazione post-traslazionale da parte di un gruppo di enzimi appartenenti alle metiltransferasi di tipo I e II (PRMT I & II).

L'ADMA, come rappresentato dalla Figura 1, è generata dalla proteolisi delle

proteine metilate. Il suo catabolismo avviene poi per opera degli enzimi DDAH che formano dimetilammina e citrullina.

L'ADMA formatasi può competere con l'Arginina per l'enzima ossido nitrico sintetasi (NOS) inibendolo, o causando un disaccoppiamento dell'enzima. Questo porta ad una riduzione della sintesi del composto NO e una promozione della formazione dello ione superossido (O_2^-), risultante poi in un incremento dei perossinitriti ($ONOO^-$), specie altamente reattive dell'azoto che causano danni ossidativi alle cellule.

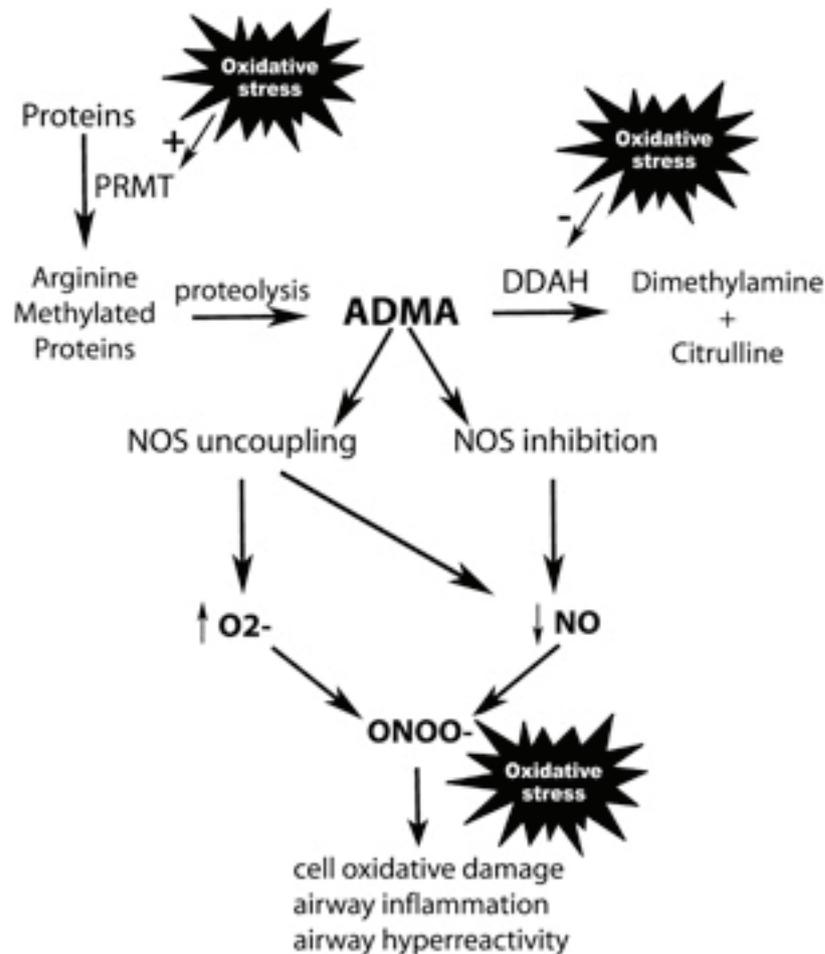


Figura 1 Pathway biochimico che descrive la generazione, l'eliminazione e la degradazione dell'ADMA. L'ADMA deriva dalla metilazione dei residui di arginina nelle proteine.

Il polmone è la fonte principale di ADMA (Bulau et al., 2007)⁹ e molti studi hanno esaminato il ruolo dell'ADMA nelle patologie infiammatorie del polmone, tra cui diverse *reviews* che spiegano il suo coinvolgimento nell'asma. (Scott et al., 2011; Grasmann et al., 2011, Bulau et al., 2007)^{4,5,9}. L'ossido nitrico (NO) endogeno gioca un ruolo chiave nella regolazione fisiologica delle vie aeree, con il controllo del tono bronchiale e vascolare e la regolazione neuroendocrina del rilascio dei mediatori. (Wells et al., 2007; Klein et al., 2010)^{6,10}

Mentre l'ADMA e la NMMA sono inibitori diretti del NOS, per il composto SDMA si pensa possa compromettere l'assorbimento cellulare di L-arginina, contribuendo ad una riduzione della disponibilità intracellulare del substrato. (Bogle et al., 1995)¹¹

Invece il derivato dell'Arg, omo-arginina (omo-Arg), è un substrato alternativo dell'enzima NOS, meno efficiente nel rilascio di NO; che compete con la L-arginina per il NOS, l'arginasi e il trasporto cationico degli aminoacidi e si suppone possa modulare la biodisponibilità intracellulare dell'Arginina. (Atzler et al., 2011)¹²

In condizioni di salute, l'organismo mantiene la biodisponibilità dei substrati per gli enzimi NOS e arginasi a livelli omeostatici grazie a degli efficienti meccanismi di *clearance* delle metilarginine in diversi tessuti tra cui rene e polmone, ma in condizioni di malattia i più alti livelli di metilarginine possono ridurre e/o reindirizzare il metabolismo dell'arginina. (Dweik, 2007, Bulau et al., 2007)^{13,9} (Figura 1)

La ridotta disponibilità del substrato, quale l'arginina, per l'enzima NOS, è stato recentemente mostrato avere un effetto importante nell'infiammazione delle vie aeree. Ad esempio l'alterata captazione della L-Arginina da parte dei trasportatori cationici degli aminoacidi (Dweik, 2007)¹³ e l'accumulo di ADMA nel polmone può contribuire alla limitata disponibilità del substrato per l'enzima iNOS epiteliale,

portando ad una ridotta produzione di NO nelle vie aeree dei soggetti asmatici, causando il disaccoppiamento dell'attività del NOS. (Balau et al., 2007)⁹

Nel nostro studio, per la costruzione del metodo analitico, abbiamo valutato i metaboliti facenti parte del cosiddetto "ciclo Arginina-ADMA", misurando ADMA, SDMA, NMMA, arginina, omo-arginina, citrullina e tirosina nel condensato dell'aria esalata tramite spettrometria di massa MS/MS

L'EBC è un biofluido raccolto in modo totalmente non invasivo, ottenuto raffreddando l'aria esalata durante la respirazione e quindi condensando il vapore acqueo e le gocce presenti in forma di aerosol nel respiro. (Hunt, 2002; Horváth et al., 2005)^{14,15}

La raccolta di EBC è una metodica promettente per lo studio delle patologie respiratorie, in quanto il condensato dell'aria espirata si crede riflettere la composizione del fluido delle vie aeree, e pertanto i composti misurati in questa matrice possono essere usati come biomarkers dei processi patologici che coinvolgono il polmone. (Bernhard et al., 1997)¹⁶

In letteratura sono riportati diversi metodi di quantificazione dell'ADMA e metaboliti correlati, in più matrici quali plasma, siero, urine, attraverso diverse tecniche quali HPLC (Teerlink, 2005; Heresztyn et al., 2004, Marra et al., 2003)¹⁷⁻¹⁹, LC-MS/MS (Atzler et al., 2011; Martens et al., 2003; Schwedhelm, et al. 2005; Bishop, et al. 2007; D'Apolito, et al. 2008, Di Gangi et al., 2010)^{12,20,24}, GC-MS (Albsmeier et al., 2009)²⁵, elettroforesi capillare (Trapp, 2004; Caussè, 2000)^{26,27} e ELISA (Schulze, 2004)²⁸, ma sulla base delle nostre conoscenze, non sono riportati studi di analisi di questi composti negli EBC.

Un recente studio riporta la misurazione di ADMA e Arg in campioni di sputo tramite LC-MS/MS, mostrando che l'incremento dei livelli di ADMA e l'inibizione dell'enzima NOS nell'asma è correlato con l'ostruzione delle vie aeree che si riscontra nei

soggetti asmatici. (Scott et al., 2011)²⁹

In generale le tecniche basate sulla spettromeria di massa sono considerate il “*gold standard*” per la misura di questi analiti e negli ultimi anni molti studi hanno riportato valori di riferimento per diverse matrici. (Meinitzer et al., 2007; Balckwell et al., 2010; El-Khoury et al., 2012; Lüneburg, 2011)³⁰⁻³³, anche se non tutti i metodi misurano i metaboliti SDMA (Bishop, et al. 2007)²² o NMMA e H-Arg ((Teerlink, 2005; Heresztyn et al., 2004, Marra et al., 2003; Martens et al. ,2003)¹⁷⁻²⁰ e richiedono elevate quantità di campione (Martens et al. ,2003; Schwedhelm, et al. 2005; Bishop, et al. 2007; D’Apolito, et al. 2008)²⁰⁻²³ o lunghi tempi per la cromatografia (Teerlink, 2005; Heresztyn et al., 2004, Marra et al., 2003; Martens et al. ,2003; Schwedhelm, et al.; Bishop, et al. 2007)¹⁷⁻²².

Le tecniche d’analisi degli EBC risultano comunque critiche in quanto non ancora del tutto standardizzate e il cui limite principale è la sensibilità analitica (Vogelberg et al. , 2008; Hoffmeyer et al., 2009)^{34,35}, dovuta al fatto che tutte le molecole non volatili presenti nel fluido delle vie aeree che giungono nell’EBC sono estremamente diluite nella matrice composta principalmente da vapor acqueo.

OBIETTIVI

Questa parte della ricerca aveva l’obiettivo di sviluppare e validare un metodo d’analisi in grado di quantificare i composti derivanti dal cosiddetto ciclo dell’ADMA, chiamato anche “Arginina-Metaboloma” (Lara et al., 2008)³⁶, nel condensato dell’aria esalata. Lo studio ha previsto delle modifiche di un metodo d’analisi già pubblicato dal nostro gruppo di ricerca (Di Gangi et al., 2010)²⁴, volte a migliorarne la sensibilità analitica, in modo tale da essere applicabile anche all’EBC. La tecnica, condotta tramite UPLC/MS/MS, prevede un sistema d’arricchimento *online* volto a concentrare il volume del campione ed eliminare i componenti della matrice, pri-

ma che questo venga iniettato ed eluito nella colonna cromatografica. Il metodo, che permette la quantificazione di ADMA, SDMA, NMMA, arginina, omo-arginina, citrullina e tirosina in un'unica corsa cromatografica di 5 minuti, dopo essere stato validato dal punto di vista analitico, è stato applicato all'analisi di un ristretto numero di campioni di EBC di soggetti asmatici, per quantificare questi metaboliti e validare il metodo da un punto di vista clinico. Una volta ottenuti questi risultati l'analisi è stata condotta su un campione numericamente più ampio, per confermare i primi dati ottenuti nella misurazione dell'ADMA sugli EBC e per confrontare i livelli di ADMA negli EBC con i livelli plasmatici degli stessi soggetti, allo scopo di verificare l'ipotesi che un aumento di ADMA nell'EBC di bambini asmatici correli con lo stress ossidativo e l'ostruzione delle vie aeree.

MATERIALI E METODI

Reagenti e materiali

Gli standard L-citrullina, L-arginina, L-omo-arginina, L-tirosina, e N-metil-L-arginina sono stati acquistati dalla ditta Fluka (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); i reagenti n-butanolo e acetilcloride dalla ditta Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

Gli standard interni L-arginina-5-13C (99%, HPLC), L-tirosine-ring-2H4 (98%, HPLC) e L-ornitina-3,3,4,4,5,5-2H6 (98%, HPLC), costituiti da composti marcati con isotopi stabili, sono stati acquistati dalla ditta Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA), mentre lo standard marcato L-citrullina-5-5-2H2 (99%, HPLC) è stato fornito dal centro Mayo Clinic (Rochester, Minnesota).

La NG,NG-dimetil-L-arginina-3,3,4,4,5,5-2H6 era stata sintetizzata dal nostro laboratorio secondo le linee guida pubblicate .

I solventi metanolo (MeOH), acetonitrile (ACN) e il reagente acido formico (FA),

tutti di grado di purezza per HPLC, sono stati acquistati presso la ditta Merck (Darmstadt, Germany) mentre l'acqua utilizzata era di tipo MilliQ (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

Soggetti

Per lo studio e la messa a punto del metodo d'analisi dell'ADMA e i metaboliti correlati sono stati reclutati 20 adulti sani, 19 adolescenti sani con età media di 13.2 anni, di cui 9 maschi e 10 femmine, e un gruppo di soggetti adolescenti con diagnosi di asma la cui età media era di 13.9 anni. I soggetti sono stati reclutati dall'unità di Allergologia e Pneumologia del Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino dell'Università degli Studi di Padova. Tutti i soggetti con asma erano in trattamento con corticosteroidi per via inalatoria (ICS) e β 2 agonisti, e due soggetti con asma instabile erano in trattamento anche con corticosteroidi per via orale.

Per la verifica dei dati ottenuti sono stati arruolati 44 bambini con asma con un'età compresa tra i 5 e i 16 anni dall'unità di Allergologia e Pneumologia del Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino dell'Università degli Studi di Padova e 33 bambini con asma con un'età compresa tra 5 e 17 anni ospitati dall'Istituto Pio XII di Misurina (BL). 56 soggetti erano in trattamento con corticosteroidi per via inalatoria, 27 con β 2 agonisti a lunga durata d'azione e 4 assumevano un antagonista dei leucotrieni (Montelukast).

La diagnosi di asma si è basata sulla storia clinica e l'esame obiettivo, la funzionalità respiratoria e la risposta ai farmaci β 2 agonisti, in accordo con le linee guida riportate in GINA (Global Initiatives for Asthma)³⁷

Il gruppo di controllo era costituito da 65 soggetti sani tra i 5 e i 15 anni senza storia di dermatite atopica, congiuntiviti e riniti allergiche, wheezing, asma o altre malattie respiratorie. Tutti i bambini coinvolti non avevano avuto infezioni respiratorie

nelle 2 settimane precedenti la raccolta del campione. Tutti i pazienti hanno dato il loro consenso informato prima di essere arruolati nello studio.

Disegno dello studio

Lo studio è di tipo *cross-sectional* e i soggetti con asma sono stati reclutati in due tempi differenti.

Un gruppo arruolato dai bambini con diagnosi di asma seguiti dall'unità di Pneumologia dell'Università di Padova, ed un gruppo indipendente di bambini asmatici ospitati dall'Istituto Pio XII di Misurina. In questo gruppo di soggetti, oltre all'analisi dell'ADMA in EBC, è stato misurato anche il livello di ADMA nel plasma, e l'ossido nitrico esalato (FENO).

Al momento del reclutamento ogni soggetto è andato incontro ad esame obiettivo, spirometria e raccolta dell'EBC.

Raccolta campioni EBC

Come nello studio della BPD, i campioni di EBC sono stati raccolti secondo le raccomandazioni ATS/ERS, tramite il dispositivo TURBO-DECCS (Medivac, Parma, Italy).

La temperatura di raccolta è stata mantenuta costante a -4°C durante la raccolta dell'EBC. I soggetti respiravano attraverso la bocca per 20 minuti, con una clip nasale, mantenendo la loro bocca asciutta durante la raccolta dell'EBC per evitare contaminazione con la saliva.

Il campione raccolto è stato immediatamente stoccato a -80°C in tubi di polipropilene fino all'analisi.

Misurazione di funzionalità polmonare e FENO

La funzionalità respiratoria è stata misurata tramite uno spirometro a campana 10-L (Biomedin). Per ogni test sono state completate almeno 3 manovre spirometriche di cui almeno 2 devono risultare riproducibili. Per le analisi si considera il miglior risultato di FVC e FEV1 ottenuto. Ogni risultato spirometrico è espresso come z-score e confrontato con l'appropriato *range* di riferimento.

L' FENO è stato misurato tramite un analizzatore a chemiluminescenza (HypAir Feno ; Sensormedics Italia Srl) secondo le linee guida ATS/ERS. I bambini inalavano aria libera da NO secondo la capacità totale del polmone ed espiravano attraverso un restrittore dinamico del flusso ad un flusso fissato di 50mL/s per almeno 6 o 7 secondi.

Preparazione del campione e derivatizzazione

Per la preparazione del campione 150 µL di soluzione di standard interno marcato sono stato aggiunti a 500µL di EBC in una provetta eppendorf da 1,5 mL, a cui sono seguite una miscelazione con *vortex* e l'evaporazione del solvente tramite centrifugazione sotto vuoto (Univapo System, UniEquip Laborgerätebau, Munich, Germany).

L'estratto a secco è stato quindi derivatizzato con una soluzione di 100µL di butanolo con il 5% v/v di acetilcloride, preparata contestualmente alla derivatizzazione, mantenendo la temperatura a 60°C per 20 minuti per far avvenire la reazione di butilazione. Il campione derivatizzato è stato portato a secco sotto flusso di azoto e ricostituito con 50µL di una soluzione di acqua e 1% FA v/v prima di essere analizzato tramite LC/MS.

I campioni di plasma sono stati derivatizzati secondo il metodo già pubblicato dal nostro laboratorio. (Di Gangi et al., 2010)²⁴.

Analisi dei campioni in UPLC-MS/MS

L'analisi dei campioni di EBC è stata condotta tramite UPLC-MS. Per la ridotta quantità di campione e la diluizione intrinseca del campione di EBC, per l'analisi si è impiegato un sistema di arricchimento *on-line*. La strumentazione era composta da un sistema HPLC Alliance HT (Waters, MD, USA) equipaggiato con un sistema automatizzato che fungeva da autocampionatore, costituito dalla piattaforma CTC PAL (2777 Sample Managers Waters). Questo sistema automatizzato preleva il campione con una siringa, minimizzando la perdita di campione dovuta all'adsorbimento nel *tube* che si verifica per gli altri autocampionatori. Il sistema prevede ad un ciclo di arricchimento automatico del campione, per aumentare la sensibilità analitica del metodo. Nello specifico, il campione (20 μ L) è stato caricato in un loop da 50 μ L posto in un sistema di valvola a sei porte (VICI® Valco Instruments), e poi iniettato in una colonna *online* per essere concentrato prima di essere eluito nella colonna analitica. Ad ogni ciclo il campione iniettato viene trasportato tramite il flusso condotto dall'HPLC alternativamente in due cartucce online del tipo Direct Connect Xbridge C18 (10 μ m, 2.1 mm \times 30 mm, Waters) montate in una valvola a 10 porte (VICI® Valco Instruments) che cambia posizione automaticamente, passando dalla configurazione A a quella B come mostrato nella Figura 2.

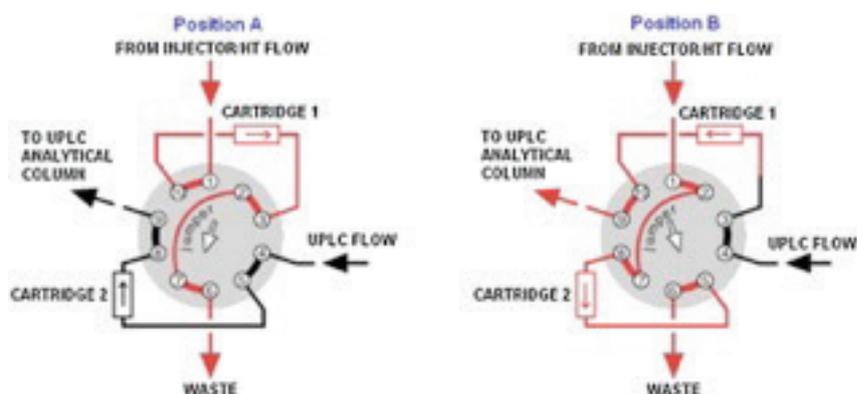


Figura 2 Sistema di valvole per l'iniezione e pre-concentrazione del campione

Il sistema HPLC, controllato dal CTC PAL, usa tre differenti pompe per condurre rispettivamente i solventi A (Acqua +0.1%FA), B (Acetonitrile +1% FA) e D (metanolo +1%FA). Quando il sistema si trova nella configurazione A, il campione e' iniettato nella cartuccia 1, precedentemente condizionata dai solventi, e rimane nella colonna per 0.3 minuti con il 95% del solvente A e il 5% del solvente B, ad un flusso di 200 μ L/min. La valvola passa poi nella configurazione B, e il flusso in uscita dalla cartuccia 1 viene condotto nella colonna analitica, dove i solventi che formano il gradiente sono spinti dal sistema UPLC (ACQUITY UPLC Waters, Milford, MA, USA). La seconda cartuccia, nel frattempo, viene lavata tramite un flusso di 800 μ L/min composto dal 100% del solvente B e quindi riequilibrata con un gradiente dato dal 95% di A e il 5% di B ad un flusso di 800 μ L/min. L'utilizzo di 2 colonne online ha permesso di risparmiare il tempo per il lavaggio e il condizionamento tra un'iniezione e la seguente.

La separazione cromatografica era condotta poi tramite una colonna analitica a fase inversa del tipo C18, di 1 mm di diametro, 50 mm di lunghezza e con particelle di 1,7 μ m (ACQUITY UPLC BEHC18, Waters). La temperatura della colonna era mantenuta a 60°C durante la corsa cromatografica e la fase mobile era formata dai solventi A1 (acqua+0.1% FA) e B1 (MeOH +0.1%FA) secondo il seguente gradiente: inizialmente 1% B1; da 0 a 1.0 min, fino a 15% B1; da 1.0 a 3.0 min, fino a 90% B1; da 3.0 a 4.99 min, ritorno a 1% B1 fino a 5.0 min.

La durata totale della corsa cromatografica era di 5 minuti, incluso il tempo richiesto per l'equilibratura dei solventi alle condizioni iniziali, e il flusso impostato a 250 μ L/min.

MS/MS

Il flusso in uscita dalla colonna era condotto allo spettrometro di massa di tipo qua-

drupolare, per permettere l'analisi MRM dei composti selezionati.

Nello specifico ci si è avvalsi dello spettrometro Q Premier (Waters) interfacciato con una sorgente a ionizzazione elettrospray (ESI). La sorgente per questa analisi operava in polarità positiva con un voltaggio del capillare impostato a 3.20kV. L'azoto è stato usato come gas di nebulizzazione e desolvatazione ad un flusso rispettivamente di 60 e 650L/h, mentre come gas di collisione per ottenere la frammentazione degli ioni nel secondo quadrupolo, è stato impiegato l'argon ad una pressione attorno ai 2.41×10^{-3} mbar. La temperatura della sorgente è stata mantenuta a 120°C, quella di solvatazione a 350°C. Il detector dello strumento era fissato a 700V. L'analisi MRM (Multiple Reaction Monitoring), consiste nel selezionare nel primo quadrupolo l' m/z dello ione d'interesse, e nel terzo quadrupolo il rapporto m/z del frammento caratteristico, formatosi nel secondo quadrupolo o cella di collisione. I parametri impostati per le diverse funzioni dei metaboliti analizzati sono mostrati nella Tabella 1.

Tabella 1 Parametri utilizzati per l'analisi MS/MS e tempi di ritenzione di ogni metabolita e dei corrispondenti standard marcati.

Compound	Ion transition (m/z)	Dwell time (s)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)	Retention time (min)
<i>Function 1 (0.4–2.5 min)</i>					
Arg- ¹³ C-d ₄	236.3 > 75.1	0.020	25	25	1.02
Arg	231.3 > 70.2	0.030	25	25	1.05
NMMA	245.3 > 70.2	0.030	30	25	1.54
Cit-d ₂	234.3 > 115.0	0.020	20	18	1.76
Cit	232.3 > 113.0	0.030	20	18	1.77
<i>Function 2 (1.5–3 min)</i>					
Tyr-d ₄	242.2 > 140.4	0.020	25	15	2.32
Tyr	238.2 > 136.2	0.030	25	15	2.33
<i>Function 3 (0.8–2.2 min)</i>					
ADMA-d ₆	265.0 > 220.0	0.020	25	15	1.63
ADMA	259.2 > 214.2	0.030	25	15	1.62
SDMA	259.2 > 228.2	0.030	25	15	1.65
ADMA-SDMA	259.3 > 70.0	0.030	30	30	1.62–1.65
H-Arg	245.2 > 84.2	0.030	30	25	1.60

Come si può notare le diverse reazioni MRM sono state suddivise in tre gruppi per ottimizzarne la rivelazione, ottenendo un buon numero di punti per descrivere il picco cromatografico di ogni composto (12-20 punti per picco). Il *delay time* è stato fissato a 0,01s e si sono ottimizzati i tempi del *dwell time* per ogni transizione, parametro importante per ottenere una buona definizione del picco.

Tutte le operazioni per condurre l'analisi e per l'acquisizione dei dati sono state condotte col software Masslynks 4.1 e i dati processati tramite il software QuanLynx Application Manager (Waters).

Curve di calibrazione e Controlli di qualità

Prima di procedere con l'analisi sono state costruite le curve di calibrazione per poter quantificare gli analiti, e preparati i controlli di qualità per ottimizzare e verificare il metodo d'analisi.

Si sono preparate le soluzioni stock in acqua per ogni standard, sia marcato che non marcato, con una concentrazione che varia da 0.25 a 1mg/mL. Da queste soluzioni stock si sono preparate le soluzioni a concentrazione 4 μ M di ADMA, SDMA, NMMA, H-Arg e le soluzioni di Arg, Cit, Tyr, a 250 μ M, diluendole in metanolo, e con diluizioni successive i 7 punti necessari a costruire le curve di calibrazione. Le curve di calibrazione sono state costruite secondo il metodo della diluizione isotopica. Le soluzioni di standard interno marcato sono state preparate dalla diluizione in MeOH della soluzione madre ad una concentrazione di 3 μ M per D6-ADMA, D2-citrullina e 13C-D4-arginina e 4 μ M per D4-tirosina. Le diverse soluzioni, una volta preparate, sono state conservate a -20°C.

Sono stati poi raccolti gli EBC di 10 adulti sani per formare il pool di EBC su cui validare il metodo analitico e per costruire la curva di calibrazione sulla matrice biologica, attraverso l'aggiunta di opportuni volumi di standard al pool di EBC.

La concentrazione endogena dell'analita nel campione è calcolata dall'intercetta della curva sull'asse y. La curva è costruita sulla base del rapporto tra l'area del picco cromatografico dell'analita rispetto al suo standard interno.

I controlli di qualità (QC) sono stati preparati aggiungendo una quantità nota di soluzione standard al pool di EBC, a tre diverse concentrazioni, corrispondenti rispettivamente ad il più basso, al medio e al più alto punto della curva di calibrazione (LQC, MQC e HQC).

Validazione del metodo analitico

La validazione del metodo è stata condotta tramite gli standards, impiegati per la calibrazione, e i controlli di qualità preparati secondo il metodo descritto per la derivatizzazione degli EBC. La linearità è stata testata impiegando gli standards a 7 diverse concentrazioni con un range che variava da da 0 a 20 nM per ADMA, SDMA, NMMA, H-Arg, da 0 a 1.25 µM per Arg e Cit e da 0 a 1 µM per Tyr. I sette punti delle curve di calibrazione sono stati preparati con il pool di EBC alle concentrazioni di 0.20, 0.60, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 nM per ADMA, SDMA, NMMA and H-Arg, di 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.31, 0.625, 1.25 µM per Arg and Cit e di 0.01, 0.03, 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1 µM per Tyr.

La linearità, l'accuratezza e la precisione del metodo è stata assicurata in tre diversi e separati batch analitici.

La curva di regressione degli standard è stata estrapolata separatamente dai 3 diversi batch, mentre i valori di QC sono stati ricavati tramite il metodo dello standard interno, con il rapporto delle aree dei picchi.

Per determinare la precisione e l'accuratezza *intra-day* ed *interday*, gli analiti sono stati aggiunti nel pool di EBC a tre diverse concentrazioni (low, medium, high-QC) e analizzati per 30 volte in unico batch analitico e per 10 volte in tre giorni separati.

La precisione è stata calcolata sul coefficiente di variazione (%CV) dei replicati e l'accuratezza mediante il confronto della concentrazione misurata dell'analita aggiunto rispetto alla concentrazione attesa (% Bias). Si è valutato anche il *carry-over*, ossia se ci fosse un trascinarsi di materiale tra una iniezione e l'altra, tramite l'iniezione di campioni di bianco, dopo l'analisi del punto più alto della curva di calibrazione.

Il *recovery* è stato ricavato dall'analisi dei sette punti della curva nella matrice biologica, calcolandolo come la percentuale del rapporto tra il valore misurato e il valore atteso.

Il limite di rivelazione o detection (LOD) è stato determinato come rapporto segnale:rumore (S/N) pari a 3:1 e il limite di quantificazione (LOQ) è stato stimato dalla concentrazione più bassa di analita che è possibile misurare con un'incertezza minore del 20% e un rapporto S/N pari a 10:1. Concentrazioni decrescenti di soluzioni di analita sono stati preparati in acqua ed nel pool di EBC per ottenere rispettivamente il LOD e il LOQ.

L'errore strumentale è stato calcolato iniettando 10 volte i campioni LQC, MQC e HQC ed espresso come media dei CV% per ogni analita. Infine per assicurare la ripetibilità degli analiti misurati nel campione, si è raccolto l'EBC di 20 volontari sani, per 2 volte, con 24 ore di differenza tra una raccolta e la successiva.

Analisi Statistica

I dati sono stati elaborati tramite i programmi Prism 4.0 e STATISTICA 6.0. (Stat Soft Inc.). I dati del primo batch di campioni sono espressi come media \pm deviazione standard ($m \pm SD$) e la significatività statistica tramite il test non-parametrico Wilcoxon-Mann-Whitney per variabili indipendenti, considerando valori di $p < 0.05$ differenza significativa e < 0.0001 altamente significativa.

Per il campione a più alta numerosità i dati a distribuzione normale (livelli nel siero e parametri spirometrici) sono stati espressi come media e il 95% dell'intervallo di confidenza (CI) mentre i dati non distribuiti normalmente (es. ADMA/Tyr ratio in EBC e valori di FENO) sono espressi come mediana e *range* interquartile (IQRs), dopo trasformazione con la funzione *log*.

Il confronto tra i due gruppi è stato condotto tramite *t* test per dati non appaiati. La correlazione tra campioni di plasma ed EBC è stata valutata tramite Pearson test e i risultati considerati significativi per valori di $P < 0.05$

RISULTATI

Separazione cromatografica e analisi in MS

Nella Figura 3 è mostrato un cromatogramma di un campione di EBC addizionato del punto HQC, dove i picchi cromatografici sono espressi come abbondanza percentuale relativa rispetto al tempo espresso in minuti.

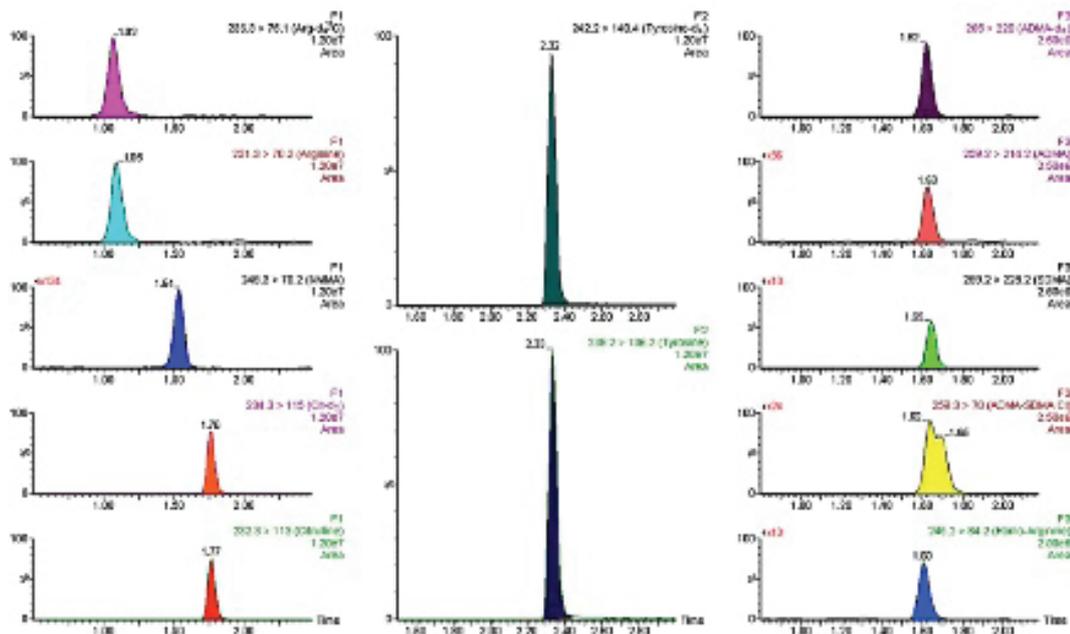


Figura 3 Cromatogramma di un controllo di qualità HQC addizionato a EBC

Per migliorare il responso del detector dello spettrometro di massa l'analisi MRM è stata suddivisa in 3 finestre di acquisizione: 0.4-2.5 min per il primo canale, 1.4-3 min per il secondo e 0.8-2.2 min per il terzo.

Dall'analisi dei bianchi è risultato non esserci nessuna interferenza di segnale con i picchi degli analiti d'interesse. Inoltre non si è notata alcuna interferenza per il tempo di ritenzione e la transizione dei due isomeri ADMA e SDMA.

In Tabella 2 sono mostrati i dati per le curve di calibrazione (media della pendenza dell'intercetta in $y \pm SD$) e in Tabella 3 i dati derivanti dal metodo di validazione.

Per ogni composto le curve di calibrazione mostrano un coefficiente di correlazione espresso come r^2 maggiore di 0.992.

Tabella 2 Risultati delle curve di calibrazione

	range di concentrazione	pendenza	intercetta	r^2
ADMA	0.20-20	8.442 ± 0.2292	-0.0002166 ± 0.002319	0.9971
SDMA	0.20-20	20.21 ± 0.3186	0.0000004755 ± 0.003061	0.999
NMMA	0.20-20	0.5490 ± 0.02500	-0.0007416 ± 0.0002325	0.9987
H-Arg	0.20-20	9.007 ± 0.5826	0.0006483 ± 0.005460	0.9953
Arginine	20-1250	0.2803 ± 0.005339	-0.007753 ± 0.003171	0.9986
Citrulline	20-1250	0.9967 ± 0.02412	0.00001956 ± 0.01358	0.9971
Tyrosine	10-1000	7.341 ± 0.2878	-0.00007393 ± 0.1332	0.9924

Tabella 3 Risultati della validazione del metodo

	Accuratezza [Bias%] (n = 10)	Errore strumentale [CV%] (n = 30)	Recovery medio [%] (n = 7)	LLOD (S/N = 3) (pmol L ⁻¹)	LLOQ (S/N = 10) (nmol L ⁻¹)
ADMA	-2.24	3.59	97.8	5	0.2
SDMA	-2.93	4.27	97.1	5	0.2
NMMA	18.6	6.45	102.8	10	0.2
H-Arg	19.7	8.33	99.7	10	0.2
Arginine	-0.56	2.87	99.4	1	20
Citrulline	2.32	2.66	102.3	1	20
Tyrosine	-2.1	3.64	98.4	1	10

La precisione l'intra e l'inter-assay è stata determinata in tutti i QC con una variabilità espressa come CV% ≤ del 20% e un'accuratezza espressa come bias% <3% per tutti gli analiti analizzati e per tutte le concentrazioni eccetto per NMMA e l'Harg, come indicato in nelle Tabelle 4 e 5.

Tabella 4 Risultati della validazione del metodo per l'analisi di ADMA, SDMA, NMMA e H-arg

	ADMA			SDMA			NMMA			H-Arg		
	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC
Inter-assay (n=30)												
Media (nmol/L)	0.61	5.8	19.6	0.44	8.4	18.2	0.50	6.2	15	0.36	5.3	17.4
SD	0.1	0.4	2	0.05	0.8	2.3	0.08	0.9	2.6	0.06	0.4	3.4
CV%	16.4	6.9	10.2	11.4	9.5	12.6	16.0	14.5	17.3	16.7	7.5	19.5
Intra-assay (n=30)												
Media (nmol/L)	0.78	6.4	19.6	0.41	7.4	16.2	0.48	7.3	13.8	0.43	6.1	17.2
SD	0.11	0.8	1.5	0.02	0.8	1.1	0.05	1.2	1.9	0.07	0.6	0.7
CV%	14.1	12.5	7.7	4.9	10.8	6.8	10.4	16.4	13.8	16.3	9.8	18.0

Tabella 5 Risultati della validazione del metodo per l'analisi di Arg, Cit e Tyr tirosina

	Arginina			Citrullina			Tirosina		
	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC
Inter-assay (n=30)									
Media (nmol/L)	22.1	426	852	27.8	506	988	18.3	472	936
SD	1.8	40	76	4.1	36.2	75	2.8	56	62.2
CV%	8.1	9.4	8.9	14.7	7.2	7.6	15.3	11.9	6.6
Intra-assay (n=30)									
Media (nmol/L)	26.3	438	856	28.6	490	902	19.4	516	954
SD	0.7	30.2	94	4.8	43	31.6	2.2	43	99.2
CV%	2.7	6.9	11.0	16.8	8.8	3.5	11.3	8.3	10.4

Il recupero o recovery medio risultava come segue: 93.8-100.2% per ADMA, 92.6-100.3% per SDMA, 81.5-106.4% per NMMA, 76.7-105.0% per H-Arg, 99.7-101.2% per Arg, 101.1-105.9% per Cit e 87.4-99.9% per Tyr.

Il limite di *detection* e il limite di quantificazione sono rispettivamente sotto o uguali al punto più basso della curva di calibrazione e il valore dell'errore strumentale è al di sotto del 10%.

Quantificazione degli analiti nei campioni di EBC di soggetti sani e asmatici

Le concentrazioni ricavate dall'analisi dei campioni, espresse in termini di concentrazione assoluta (mol/L), per i 10 soggetti sani e i 14 asmatici, sono mostrati nella Tabella 6.

Tabella 6 Valori di concentrazione dei metaboliti in EBC di soggetti sani e asmatici

	Controlli (n=19)	Asma (n=14)
ADMA	0.0012±0.005	0.0040±0.021**
SDMA	0.0002±0.0001	0.0020±0.015**
NMMA	0.002±0.001	0.002±0.001
H-Arg	0.001±0.002	0.002±0.002
Arginina	0.126±0.045	0.133±0.071
Citrullina	0.038±0.016	0.033±0.017
Tirosina	0.013±0.010	0.013±0.007

**p<0.001

In questo primo *batch* la concentrazione di ADMA e SDMA è significativamente più alta ($p < 0.0001$) negli adolescenti asmatici rispetto ai controlli sani.

Inoltre è stato trovato anche un livello più alto del rapporto ADMA/Tyr (asmatici 0.34 ± 0.09 vs. controlli 0.12 ± 0.02 , $p < 0.0001$) e SDMA/Tyr (asmatici 0.10 ± 0.04 vs. Controlli 0.015 ± 0.004 , $p < 0.0001$) negli adolescenti asmatici rispetto agli adolescenti sani.

Non c'è invece una differenza significativa tra adolescenti asmatici e i sani nella concentrazione degli aminoacidi arginina, citrullina, tirosina, e nei metaboliti NMMA e H-Arg.

Studio dell' ADMA in EBC e plasmi di soggetti asmatici e sani

L'ADMA è risultato misurabile per 135 dei 142 campioni totali (95%), di cui 71 erano i bambini con asma e 64 i soggetti sani.

Analizzando i soggetti reclutati a Padova, si sono trovati livelli significativamente più alti di ADMA/Tyr nell'EBC di soggetti asmatici rispetto a soggetti sani (mediana, 0.12ppm [IQR, 0.05-0.32] vs 0,07 [IQR 0.05-0.12]; $P=0.01$). Allo stesso modo una differenza significativa è stata trovata anche confrontando i livelli assoluti di ADMA (mediana, 1.60ppm [IQR, 1.05-3.00] vs 1.10 pmol/mL [IQR, 0.75-1.60]; $P < 0.001$).

Non sono state trovate differenze confrontando il rapporto ADMA/Tyr e il valore assoluto dell'ADMA tra i due gruppi analizzati separatamente (Padova, Misurina) confermando la bontà dell'analisi. I valori ricavati dagli EBC del gruppo di asmatici di Misurina sono infatti (ADMA/Tyr mediana, 0.11 [IQR, 0.05-0.21]; ADMA mediana, 1.95 pmol/mL [IQR, 1.50-3.10]). Nella figura è mostrato il box plot del rapporto ADMA/Tyr negli EBC di bambini asmatici e sani.

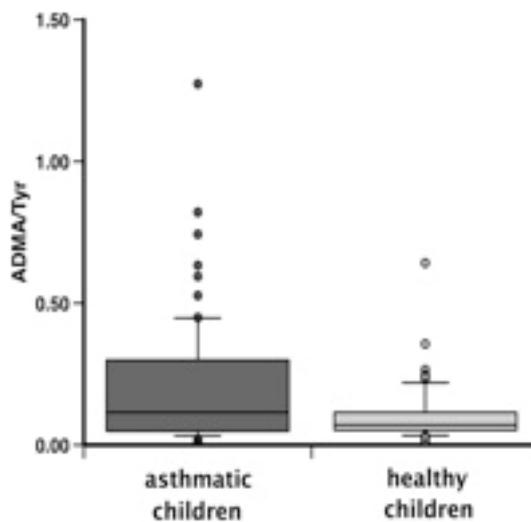


Figura 4 Box-plot del rapporto ADMA/Tyr in EBC di bambini asmatici e sani

I dati ricavati dalla misurazione dell'ADMA nel siero (media, 0.53 mM [95% CI, 0.47-0.60]; n=28) dei bambini del gruppo di Misurina non mostrano una correlazione con i dati trovati negli EBC del gruppo degli asmatici. ($P > 0.5$), come mostrato in Figura 5.

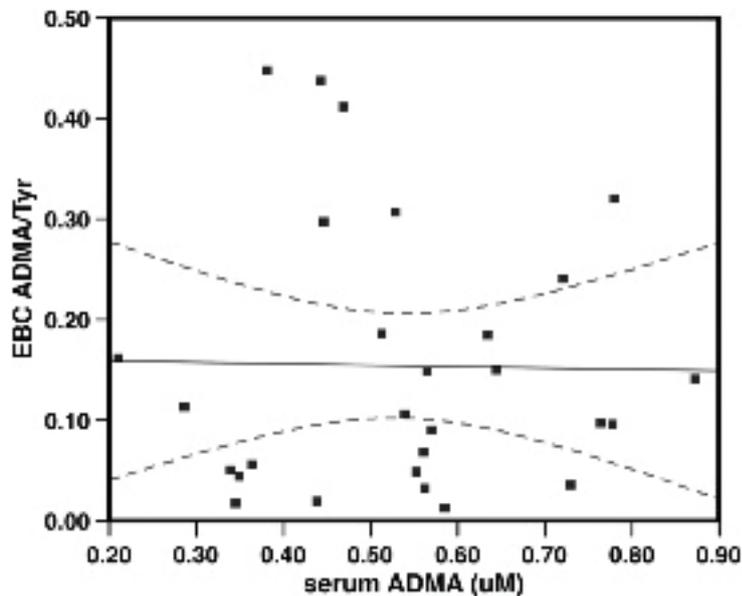


Figura 5 Correlazione tra valori di ADMA misurati nei sieri e nei corrispondenti EBC

Funzione polmonare ed FENO

I parametri spirometrici, di seguito riportati, sono stati trovati significativamente più bassi nei bambini asmatici rispetto ai controlli sani. ($p < 0.001$), in accordo con quanto già riportato. z -scores [mean (95% CI)]: FEV1, -0.19 [-0.44 to 0.06] vs 0.74 [0.47-1.00]; FEV1/FVC, -0.50 [-0.74 to -0.25] vs 0.18 [-0.08 to 0.44]. L' FENO è stato misurato in 25 bambini con asma del gruppo di Misurina (mediana, 18 ppb [IQR, 14-33]). Non è stata trovata nessuna correlazione significativa confrontando i livelli di ADMA/Tyr nell'EBC con i livelli di FENO ($P = 0.46$) e con gli altri parametri della funzione polmonare ($P = 0.09$ per FEV1 e FEV1/FVC).

DISCUSSIONE

Come riportato in altri studi, l'ADMA, composto derivato dall'amminoacido arginina, è correlato con fenomeni infiammatori e di stress ossidativo.

Nel nostro studio si è voluto implementare un metodo per l'analisi dell'ADMA e dei composti correlati in spettrometria di massa, che fosse robusto e sensibile, per de-

terminare l'ADMA nei campioni di condensato dell'aria esalata. L'analisi è stata poi condotta su EBC di bambini con asma bronchiale e sani, mostrando come i livelli di ADMA siano significativamente maggiori nei pazienti asmatici.

Dal punto di vista analitico, per meglio confrontare i dati ottenuti, si è rapportato il valore assoluto di ADMA e degli altri metaboliti correlati, con un amminoacido (tirosina), in modo tale da normalizzare i valori ricavati negli EBC ed essere meno influenzati dalla diluizione intrinseca del campione di EBC.

I valori misurati degli amminoacidi negli EBC sono stati confrontati con i dati di riferimento in letteratura per gli amminoacidi plasmatici Arg, Cit e Tyr in soggetti tra i 2 e i 18 anni (Shapira et al., 1989)³⁸. Risulta che la percentuale di escrezione varia da 0.02% a 0.13% ed è costante sia nei soggetti sani che asmatici, suggerendo che l'afflusso degli amminoacidi dal circolo sistemico al fluido delle vie aeree non sia condizionato dall'infiammazione. In questo modo il rapporto di ADMA sulla tirosina risulta essere un biomarker più rappresentativo per lo stress ossidativo di processi infiammatori in atto nel polmone. dei metaboliti in quanto tali. Su questa ipotesi inoltre tutti gli amminoacidi o i peptidi presenti nel fluido delle vie aeree possono essere considerati come possibili composti utili per la correzione del grado di diluizione dell'EBC. (Conventz, 2007)³⁹. Come proposto da Lara *et al.*³⁶ la bio-disponibilità globale dell'Arg per gli enzimi arginasi e NOS può essere determinata usando tutti i valori derivanti dal "metaboloma dell'arginina", calcolando i rapporti plasmatici dell'arginina con i suoi prodotti enzimatici e metabolici. Ad esempio calcolando il rapporto. Arg/Metil-arg ma anche Arg verso Cit, considerando che l'amminoacido L-arginina può essere generato dal ciclo L-citrullina/L-arginina nelle cellule che producono NO. In questo ciclo la L-citrullina, un prodotto secondario nella biosintesi dell'NO catalizzata dall'enzima NOS, può essere riciclata come substrato del NOS per la L-arginina, presumibilmente per mantenere costante la produzione

di NO (Morris, et al., 2002)⁴⁰. L'importanza del metabolismo dell' aminoacido L-arginina e della produzione di NO nelle malattie infiammatorie delle vie aeree è ampiamente documentato in letteratura (Ricciardolo et al., 2004)⁴¹ e l'ADMA può giocare un ruolo chiave nella regolazione dell'attività dell'enzima ossido nitrico sintetasi nel polmone (Wells et al., 2007)⁶.

Essendo un analogo dell'L-arginina, l'ADMA agisce come inibitore endogeno del NOS, enzima responsabile della conversione dell'arginina in NO e citrullina. Inoltre è stato postulato che l'ADMA possa disaccoppiare l'enzima NOS con un effetto simile ad un ambiente povero di arginina, dove si riduce la sintesi di NO e si incrementa la produzione di specie reattive dell'ossigeno, O₂ – (Wells et al., 2007)⁶. La rapida reazione fra queste due specie porta alla formazione di ONOO⁻, un potente ossidante che contribuisce in modo significativo al danno tissutale dovuto a reazioni ossidative a catena tipiche dell'asma e di altre malattie infiammatorie delle vie aeree (Ricciardolo et al., 2004)⁴¹. Inoltre è stato sottolineato il ruolo del polmone come fonte di ADMA (Bulau et al., 2007)⁹. Date queste premesse è presumibilmente corretto supporre un ruolo dell'ADMA nella patogenesi dell'asma ediversi studi condotti su modelli animali hanno mostrato una correlazione tra ADMA e infiammazione delle vie aeree (Ahmad et al 2010; Wells et al 2009)^{42,43}. In un modello murino per l'infiammazione allergica delle vie aeree Wells *et al*⁴³ hanno dimostrato che l'ADMA può esacerbare la iperreattività bronchiale e promuovere il deposito di collagene nel topo senza infiammazione polmonare, e uno studio condotto da Scott et al. (Scott et al., 2004)⁴ ha evidenziato livelli di ADMA maggiori nello sputo di 17 adulti con asma, dati che confermano i risultati da noi ottenuti. Con questa metodica inoltre abbiamo messo in luce come sia possibile misurare l'ADMA nel campione di EBC, che ha la caratteristica di essere un biofluido raccolto direttamente dall'organo d'interesse (vie aeree per l'asma). Questo potrebbe spiegare la

non correlazione tra l'ADMA misurata nell'EBC e l'ADMA misurata nel plasma dello stesso soggetto, indicando che non sempre i processi patologici del polmone possono essere riflessi a livello sistemico, anche se sono necessari ulteriori studi per confrontare l'ADMA plasmatica fra individui asmatici e sani e valutare se vi sia una differenza significativa a livello sistemico.

CONCLUSIONI

I dati ottenuti confermano la bontà del metodo analitico condotto in UPLC-MS/MS per misurare l'ADMA negli EBC, e i risultati ricavati dall'analisi degli EBC in adolescenti asmatici e sani indicano una concentrazione locale maggiore di ADMA nei soggetti con asma. Questo dato porta ad ipotizzare che l'alterazione nel metabolismo dell' L-arginina possa essere significativo per spiegare il danno ossidativo tipico dell'asma bronchiale e per comprendere i meccanismi sottostanti l'iperresponsività delle vie aeree.

Bibliografia

1. . C.K. Lai, R. Beasley, J. Crane, S. Foliaki, J. Shah, S. Weiland et al. Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms: phase three of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Thorax, 64 (2009), pp. 476–483
2. L.J. Akinbami et al. Status of childhood asthma in the United States, 1980–2007 Pediatrics, 123 (2009), pp. S131–S145
3. Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Nat Rev Immunol. 2008 Mar;8(3):183-92.
4. Scott JA, North ML, Rafii M, et al. Asymmetric dimethylarginine is increased in asthma. Am J Respir Crit Care Med. 2011;184(7):779-785
1. Grasemann H, Al-Saleh S, Scott JA, et al. Asymmetric dimethylarginine contributes to airway nitric oxide deficiency in patients with cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2011;183(10):1363-1368.
2. 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.
3. H. Meurs, H. Maarsingh, J. Zaagsma Arginase and asthma: novel insights into nitric oxide homeostasis and airway hyperresponsiveness Trends Pharmacol. Sci., 24 (2003), pp. 450–455
4. M. Mori, T. Gotoh Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes Biochem. Biophys. Res. Commun., 275 (2000), pp. 715–719
5. Bulau P, Zakrzewicz D, Kitowska K, 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-L24.
6. 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-L825.
7. R.G. Bogle, R.J. MacAllister, G.S. Whitley, P. Vallance Induction of N(G)-monomethyl-L-arginine uptake: A mechanism for differential inhibition of NO syntAm. J. Physiol., 269 (1995), pp. C750–C756
8. D. Atzler, M. Mieth, R. Maas, R.H. Böger, E. Schwedhel Stable isotope dilution assay for liquid chromatography-tandem mass spectrometric determination of L-homoarginine in human plasmaJ. Chromatogr. B, 879 (2011), pp. 2294–2298
9. R.A. Dweik The lung in the balance: Arginine, methylated arginines, and nitric oxide Am. J. Lung Physiol. Cell Mol. Physiol., 292 (2007), pp. L15–L17
10. Hunt J. Exhaled breath condensate: an evolving tool for noninvasive evaluation of lung disease. J Allergy Clin Immunol 2002; 110:28-34.
11. I. Horváth, J. Hunt, P.J. Barnes, K. Alving, A. Antczak, E. Baraldi, G. Becher, W.J. van Beurden, M. Corradi, R. Dekhuijzen, R.A. Dweik, T. Dwyer, R. Effros, S. Erzurum, B. Gaston, C. Gessner, A. Greening, L.P. Ho, J. Hohlfield, Q. Jöbsis, D. Laskowski, S. Loukides, D. Marlin, P. Montuschi, A.C. Olin, A.E. Redington, P. Reinhold, E.L. van Rensen, I. Rubinstein, P. Silkoff, K. Toren, G. Vass, C. Vogelberg, H. Wirtz ATS/ERS Task Force on Exhaled Breath Condensate Eur. Respir. J., 26 (2005), pp. 523–548
12. Bernhard W, Haagsman HP, Tschernig T, Poets CF, Postle AD, van Eijk ME, von der Hardt H. Conductive airway surfactant: surface-tension function, biochemical composition, and possi-

- ble alveolar origin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17:41-50.
13. T. Teerlink Determination of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine in biological samples by HPLC. *Methods Mol. Med.*, 108 (2005), pp. 263–274
 14. T. Heresztyn, M.I. Worthley, J.D. Horowitz J. Determination of L-arginine and NG,NG- and N G,NG'-dimethyl-L-arginine in plasma by liquid chromatography as AccQ-Fluor™ fluorescent derivatives *Chromatogr. B*, 805 (2004), pp. 325–329
 15. Marra M., A.R. Bonfigli, R. Testa, A. Gambini, G. Coppa High-performance liquid chromatographic assay of asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, and arginine in human plasma by derivatization with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde. *Anal. Biochem.*, 318 2003, pp. 13–17
 16. Martens-Lobenhoffer J., S.M. Bode-Böger, J. *Chromatogr. Mass spectrometric quantification of L-arginine and its pathway related substances in biofluids: The road to maturity. B* 798 (2) 2003 231–239.
 17. Schwedhelm E., 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. *Clin. Chem.* 51 (7) 2005 1268–1271.
 18. Bishop M.J., B. Crow, D. Norton, E. Paliakov, J. George, J.A. Bralley, J. Direct analysis of underivatized asymmetric dimethylarginine (ADMA) and L-arginine from plasma using mixed-mode ion-exchange liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chromatogr. B* 859 2007 164–169.
 19. D'Apolito O., G. Paglia, F. Tricarico, D. Garofalo, A. Pilotti, O. Lamacchia, M. Cignarelli, G. Corso, Development and validation of a fast quantitative method for plasma dimethylarginines analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin. Biochem.* 41 (16–17) 2008 1391–1395.
 20. Di Gangi I.M., L. Chiandetti, A. Gucciardi, V. Moret, M. Naturale, G. Giordano, 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* 677 (2) 2010 140–148.
 21. Albsmeier J., E. Schwedhelm, F. Schulze, M. Kastner, R.H. Böger, J. Determination of NG,NG-dimethyl-L-arginine, an endogenous NO synthase inhibitor, by gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatogr. B* 809 2004 59–65.
 22. Trapp G., K. Sydow, M.T. Dulay, T. Chou, J.P. Cooke, R.N. Zare, J. Capillary electrophoretic and micellar electrokinetic separations of asymmetric dimethyl-L-arginine and structurally related amino acids: quantitation in human plasma. *Sep. Sci.* 27 2004 1483–1490.
 23. Caussé, E.N. Siri, J.F. Arnal, C. Bayle, P. Malatray, P. Valdiguié, R. Salvayre, F. Couderc, Determination of asymmetrical dimethylarginine by capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence. *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.* 741 (1) 2000 77–83.
 24. Schulze F., R. Wesemann, E. Schwedhelm, K. Sydow, J. Albsmeier, J.P. Cooke, R.H. Böger, Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA assay. *Clin. Chem. Lab. Med.* 42 2004 1377–1383.
 25. Scott J.A., M.L. North, M. Rafii, H. Huang, P. Pencharz, P. Subbarao, J. Belik, H. Grasemann, Asymmetric dimethylarginine is increased in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184 (7) 2011 779–785.

26. Meinitzer, A. M. Puchinger, B.M. Winklhofer-Roob, E. Rock, J. Ribalta, J.M. Roob, I. Sundl, G. Halwachs-Baumann, W. März, Reference values for plasma concentrations of asymmetrical dimethylarginine (ADMA) and other arginine metabolites in men after validation of a chromatographic method. *Clin. Chim. Acta* 384 (1–2) 2007 141–148.
27. Blackwell S. The biochemistry, measurement and current clinical significance of asymmetric dimethylarginine. *Ann. Clin. Biochem.* 47 (Pt 1) 2010 17–28.
28. El-Khoury J.M., D.R. Bunch, E. Reineks, R. Jackson, R. Steinle, S. Wang, A simple and fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for measurement of underivatized L-arginine, symmetric dimethylarginine, and asymmetric dimethylarginine and establishment of the reference ranges. *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2) 2012 771–779.
29. Lüneburg N., V. Xanthakis, E. Schwedhelm, L.M. Sullivan, R. Maas, M Anderssohn, U. Riederer, N.L. Glazer, R.S. Vasan, R.H. Böger, Reference Intervals for Plasma L-Arginine and the L-Arginine:Asymmetric Dimethylarginine Ratio in the Framingham Offspring Cohort. *J. Nutr.* 141 (12) 2011 2186–2190.
30. Vogelberg C., A. Kahlert, C. Würfel, K. Marx, A. Böhm, U. Range, V. Neumeister, W. Leupold, Exhaled breath condensate nitrite--methodological problems of sample collection. *Med. Sci. Monit.* 14 (8) 2008 CR416–CR422.
31. Hoffmeyer F., M. Raulf-Heimsoth, R. Merget, T. Brüning, *Pneumologie* 63 (8) 2009 426–432.
32. Lara.A, S.B. Khatri, Z. Wang, S.A. Comhair, W. Xu, R.A. Dweik, M. Bodine, B.S. Levison, J. Hammel, E. Bleecker, W. Busse, W.J. Calhoun, M. Castro, K.F. Chung, D. Curran-Everett, B. Gaston, E. Israel, N. Jarjour, W. Moore, S.P. Peters, W.G Teague, S. Wenzel, S.L. Hazen, S.C. Erzurum, Alterations of the arginine metabolome in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 17 (7) 2008 673–681.
33. Global Initiative for Asthma (GINA). 2010. Global strategy for asthma management and prevention. www.ginaasthma.org
34. E. Shapira, M.G. Blitzer, J.B. Miller, D.K. Affrick, *Biochemical Genetics: A Laboratory Manual*, Oxford University Press, 1989.
35. Conventz, A. A. Musiol, C. Brodowsky, A. Müller-Lux, P. Dewes, T. Kraus, T. Schettgen, Simultaneous determination of 3-nitrotyrosine, tyrosine, hydroxyproline and proline in exhaled breath condensate by hydrophilic interaction liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 860 (1) 2007 78–85.
36. Morris S.M. Jr., D. Kepka-Lenhart, Hormonal induction of hepatic mitochondrial ornithine/citrulline transporter mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294 (4) 2002 749–752.
37. Ricciardolo FL, Di Stefano A, Sabatini F, Folkerts G. Reactive nitrogen species in the respiratory tract. *Eur J Pharmacol.* 2006; 533 (1-3): 240 - 252
38. Ahmad T, Mabalirajan U, Ghosh B, Agrawal A . Altered asymmetric dimethyl arginine metabolism in allergically inflamed mouse lungs . *Am J Respir Cell Mol Biol* . 2010 ; 42 (1): 3 - 8 .
39. 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 ;44 40 (2): 179 - 188 .

CONCLUSIONI

Lo studio ha dimostrato che la spettrometria di massa è una tecnica valida che può essere applicata a studi in ambito clinico per indagare diverse malattie tra cui le pneumopatie ostruttive. Data l'elevata sensibilità si dimostra particolarmente adatta a studi in ambito pediatrico per la possibilità di ottenere informazioni significative da campioni raccolti in modo totalmente non invasivo e in quantità ridotta, rendendo più facile il *follow up* del paziente, oltre ad aiutare il medico nell'individuare possibili nuovi marcatori per la diagnosi e la terapia.

Nello specifico il metodo sviluppato per l'analisi dell'ADMA ha verificato la maggiore concentrazione di ADMA nei soggetti asmatici, quantificandola per la prima volta nei campioni di EBC, ed evidenziandone il possibile ruolo nell'infiammazione correlata all'asma. Il metodo si dimostra quindi utile per la quantificazione dell'ADMA come possibile nuovo esame clinico, data anche la capacità di analizzare un grande numero di campioni in un tempo relativamente breve.

Lo studio metabolomico applicato all'EBC ha poi mostrato come questo nuovo approccio, condotto con spettrometria di massa ad alta risoluzione, possa fornire informazioni utili sulle malattie croniche ostruttive del polmone. Applicato per la prima volta a campioni di EBC di soggetti con BPD alla nascita, si è evidenziato come sia possibile distinguere il profilo degli adolescenti con BPD dai controlli sani, indicando una possibile implicazione dei glicerofosfolipidi costituenti il surfattante alveolare. Benchè lontani dal poter definire quali siano le cause di questa disfunzione respiratoria, grazie allo studio metabolomico, abbiamo aggiunto un tassello per la comprensione dei meccanismi di questa patologia che, come riportato in un interessante articolo¹¹,Cap.1, può essere considerata come la più longeva malat-

tia respiratoria dell'infanzia, i cui effetti si riscontrano anche nell'età adulta.

Lo studio del wheezing, a sua volta, ha mostrato come l'analisi *untarget* in HRMS di campioni di urine possa discriminare chiaramente i bambini con broncospasmo ricorrente in età prescolare dai bambini sani, e come e i campioni di urina possano essere impiegati per gli studi di alcune patologie polmonari, dimostrandosi assai utile in ambito pediatrico, in quanto la modalità di raccolta, come per gli EBC, è totalmente non invasiva.

Ulteriori studi saranno necessari per validare i dati ottenuti dagli studi, i quali, se confermati, potrebbero indicare la via per nuovi target terapeutici per migliorare la funzionalità respiratoria di soggetti con asma bronchiale e con diagnosi di BPD alla nascita, e per valutare a posteriori se esistano dei biomarkers che possano indicare quali bambini con wheezing ricorrente svilupperanno asma, aprendo la strada a nuovi tools diagnostici.

La spettrometria di massa tandem per l'analisi target e la spettrometria di massa ad alta risoluzione, si dimostrano pertanto uno strumento utile per l'identificazione dei metaboliti, anche quando presenti a basse concentrazioni, evidenziando inoltre come le diverse tecniche spettroscopiche, nel nostro caso di spettrometria di massa, non si escludano a vicenda ma siano necessarie e complementari per uno studio sinergico nella comprensione dei meccanismi sottostanti le malattie respiratorie del bambino.

RINGRAZIAMENTI

Innanzitutto desidero ringrazio il Prof. Eugenio Baraldi, che mi ha dato la possibilità di fare questa esperienza di ricerca, e il Dott. Giuseppe Giordano che mi ha seguito in questi 3 anni, trasmettendomi le sue conoscenze sulla Spettrometria di Massa e facendomi sentire parte del gruppo SPM di Pediatria.

Ringrazio il Dott. Matteo Stocchero per il prezioso aiuto nell'elaborazione statistica dei dati.

Ringrazio la Dott.ssa Silvia Carraro per le delucidazioni sulla parte clinica dello studio, e tutte le Dott.sse del gruppo che hanno provveduto alla raccolta dei campioni, e sono state fondamentali per la realizzazione di questo studio (Michela Maretti, Dania El Mazloun, Laura Cesca, Valentina Ferraro, Mariangela Berardi).

Ringrazio la Dott.ssa Antonina Gucciardi per il suo fondamentale aiuto durante la fase di stesura della tesi, per le sue revisioni e consigli e per il suo continuo supporto.

Ringrazio la Dott.ssa Irene Costa che ha condiviso con me questa esperienza di dottorato e per il suo costante appoggio.

Ringrazio Mauro Naturale per l'importante e concreto aiuto nel condurre le analisi.

Ringrazio La Dott.ssa Iole Di Gangi, con cui ho collaborato ad una parte del progetto e ringrazio la Dott.ssa Alina Damian per la sua revisione "inglese".

Vorrei anche ringraziare il Prof. Bruce Hammock e il Dott. Jun Yang dell'Università della California, UC Davis, che mi hanno dato la possibilità di fare questa esperienza nel loro gruppo di ricerca, e ringrazio Giovanni D'Agata, sempre disponibile ad aiutarmi per "documenti e scadenze".

Grazie Antonella, Irene, Mauro, Elena, Enzo, Elisa perché siete stati di più che dei "semplici" colleghi per me...

Un grande GRAZIE ad Anto e Irene, senza il vostro supporto, sia concreto per la correzione e per la gestione di tutte le pratiche per la consegna della tesi, sia morale, per avermi spronato in questo periodo non facile per me, questa tesi non sarebbe stata possibile.

Grazie ai nuovi amici che mi hanno fatto sentire a casa durante questo mio ultimo periodo di dottorato lontano dall'Italia.

*E grazie a tutte le amiche che ci sono ancora, che ci sono sempre..
(Grazie Chiara, grazie Alina, voi sapete perché ..)*

Infine il mio grande grazie, mai come questa volta, mai come in questo periodo, va alla mia famiglia, tutta intera, per il fondamentale sostegno, senza se e senza ma.

