



**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: Ematonecologia, genetica, malattie rare e medicina predittiva.

CICLO: XXVII

**LA METABOLOMICA: NUOVO APPROCCIO ALLA MEDICINA
PREDITTIVA PER IL BAMBINO E IL NEONATO**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

Supervisore :Ch.mo Dott. Giuseppe Giordano

Dottorando : Irene Costa

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	7
INTRODUZIONE	11
1. LA METABOLOMICA	11
1.1 Metabolomica e Systems Biology	11
1.2 Applicazioni cliniche della metabolomica	14
1.2.1 La metabolomica in ambito pediatrico	15
1.3 Lo studio dei metaboliti	18
1.4 Il “Metabolomic Workflow”	19
1.4.1 Acquisizione e preparazione dei campioni	20
1.4.2 Piattaforme analitiche	21
BIBLIOGRAFIA	24
SCOPI DELLA RICERCA	28
 <i>CAPITOLO 1</i>	
 APPROCCIO METABOLOMICO ALLO STUDIO DELLE PATOLOGIE ALLERGICHE IN AMBITO PEDIATRICO	
INTRODUZIONE	31
1. La metabolomica e l’allergia alimentare	31
1.1 L’allergia al latte vaccino	35
1.1.1 La Diagnosi	36

OBIETTIVI DELLO STUDIO	40
MATERIALI E METODI	40
1. Disegno dello studio	40
1.1 Il test di provocazione orale con latte	41
2. Analisi dei metaboliti urinari mediante spettrometria di massa accoppiata a cromatografia UPLC.	42
2.1 Strumentazione e materiali	42
2.2 Preparazione dei campioni	42
2.3 Analisi cromatografica e spettroscopica	43
2.4 Controllo di qualità	45
2.5 Estrazione dei dati	45
3. Analisi statistica	46
3.1 Dati LC/MS	46
3.2 Dati clinici e anamnestici	47
RISULTATI	48
1. Test di provocazione orale con il latte	48
2. Dati LC/MS	48
2.1 Filtraggio	48
2.2 Analisi preliminare con PCA	49
2.3 PLS-DA	50
2.4 OPLS-DA	51
2.5 Identificazione delle variabili significative	53
2.6 Albero decisionale	56

DISCUSSIONE	56
CONCLUSIONI	59
BIBLIOGRAFIA	60

CAPITOLO 2

APPROCCIO METABOLOMICO ALLO STUDIO DEL LIQUIDO AMNIOTICO

NELLA PREDIZIONE DEL RISCHIO DI PARTO PRETERMINE E SVILUPPO DI BPD

INTRODUZIONE	63
1. Lo studio dell'ambiente fetale	63
1.1 Il liquido amniotico	65
1.2 Parto pretermine e displasia broncopolmonare	68
OBIETTIVI DELLO STUDIO	71
MATERIALI E METODI	71
1. Disegno dello studio e caratteristiche dei pazienti	71
1.1 raccolta dei campioni di liquido amniotico	72
2. Applicazione della spettrometria di massa e della cromatografia liquida UPLC all'analisi del liquido amniotico	73
2.1 Strumentazione e materiali	73
2.2 Preparazione dei campioni	73
2.3 L'analisi cromatografica	74
2.4 Analisi di spettrometria di massa	75
2.5 Estrazione dei dati	76
2.6 Analisi statistica	77
2.6.1 Descrizione del set di dati	77
2.6.2 Analisi dei dati	77
RISULTATI	78

1. Effetto dei metadata sulla separazione dei campioni di liquido amniotico	78
2. Modello PLS-DA dei 3 gruppi di campioni raccolti tra la 21° e la 28° settimana di gestazione	80
2.1 Data set T3 NEG	81
2.2 Data set T3 POS	82
2.3 Identificazione delle variabili significative	83
DISCUSSIONE	84
CONCLUSIONI	89
BIBLIOGRAFIA	89

CAPITOLO 3

CARNITINA ED ACILCARNITINE NEL NEONATO A TERMINE E PRETERMINE: ANALISI QUANTITATIVA MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA/SPETTROMETRIA DI MASSA

INTRODUZIONE	95
1. Carnitina e Acilcarnitine	95
1.1 Ossidazione degli acidi grassi e acilcarnitine	98
1.2 La β -ossidazione e La ω -ossidazione	99
1.3 Acilcarnitine e metabolismo degli amminoacidi	100
2. Omeostasi del pool della carnitina	101
2.1 Sintesi	101
2.2 Distribuzione	102

2.3	Escrezione e riassorbimento	102
2.4	Analisi della composizione del pool della carnitina	103
OBIETTIVI	DELLO STUDIO	104
MATERIALI E METODI		105
1.	Soggetti	105
2.	Raccolta del campione	106
3.	Reagenti e materiali	106
4.	Estrazione delle acilcarnitine	108
5.	Analisi del campione	108
6.	Statistica	109
RISULTATI		110
1.	Profilo delle acilcarnitine nei campioni di plasma	110
1.1	Carnitina e acilcarnitine a catena corta	110
1.2	Acilcarnitine a catena media	115
1.3	Acilcarnitine a catena lunga	119
2.	Profilo delle acilcarnitine nei campioni di DBS	123
2.1	Carnitina e acilcarnitine a catena corta	123
2.2	Acilcarnitine a catena media	127
2.3	Acilcarnitine a catena lunga	131
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI		135
BIBLIOGRAFIA		139
CONCLUSIONI GENERALI		143

RIASSUNTO

PRESUPPOSTI DELLO STUDIO

La metabolomica è una scienza emergente, con promettenti applicazioni in campo medico. L'approccio metabolomico si basa sull'identificazione globale, non guidata da ipotesi a priori, di un elevato numero di metaboliti presenti in un fluido biologico; questo consente di caratterizzare il profilo metabolico di una determinata condizione e permette di identificare quali metaboliti o pattern di metaboliti possono essere utili nella discriminazione tra differenti gruppi di studio. Mediante l'analisi dei dati di spettroscopia e strumenti di analisi statistica multivariata consentono di estrapolare i dati metabolici rilevanti nella caratterizzazione di specifici stati fisiologici e patofisiologici. Inoltre, l'analisi metabolomica necessita di basse quantità di campione biologico, caratteristica che la rende applicabile a molteplici matrici ma che soprattutto la rende facilmente utilizzabile in ambito pediatrico. L'impatto di tale scienza nel campo degli studi materno-infantili è molto importante, sia per indagare se esistano metaboliti utili a diagnosticare alcune delle patologie maggiormente diffuse in età infantile sia per indagare se esistano delle correlazioni tra la condizione materna e lo sviluppo di malattie nel neonato. Nel caso specifico abbiamo applicato l'approccio metabolomico ad alcune delle più diffuse patologie dell'ambito materno infantile: l'allergia alimentare, il parto pre-termine, lo sviluppo di BPD e i difetti della β -ossidazione degli acidi grassi.

SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo del dottorato è stato quello di applicare l'analisi metabolomica basata sulla spettrometria di massa a diverse patologie che interessano l'ambito materno-infantile (allergie, parto pretermine in relazione allo sviluppo di BPD e al metabolismo degli acidi grassi attraverso la beta ossidazione) utilizzando diverse matrici biologiche: urine, liquido amniotico, plasma e spot di sangue. Si è proceduto all'applicazione di due diversi approcci: uno di tipo target, altamente specifico, che si focalizza sull'analisi qualitativa e quantitativa di un singolo analita, come un marcatore di malattia o il substrato di una reazione enzimatica; e uno di tipo untarget

(fingerprinting) focalizzato sull'analisi di un gruppo di metaboliti appartenenti a una specifica via metabolica o una certa classe di composti.

MATERIALI E METODI

Per quanto riguarda l'approccio untarget questo è stato applicato a due studi: il primo mirato a vedere su una coorte di bambini con presunta allergia al latte se si potesse differenziare la reazione allergica in campioni di urine prelevate prima dello scatenamento; il secondo a valutare i profili metabolici di liquidi amniotici di pazienti con parto pretermine e sviluppo di BPD al fine di riuscire a predire la prematurità del parto e lo sviluppo di BPD nel bambino. Per il primo studio sono stati reclutati 30 bambini, di cui 19 maschi e 11 femmine, di età media pari a 4 anni affetti da allergia alle proteine del latte vaccino IgE mediata. I pazienti sono stati sottoposti a test di provocazione orale con latte ed in base all'esito del test, sono stati suddivisi in due gruppi: pazienti con risposta positiva (15 bambini) e i pazienti con risposta negativa (15 bambini). Un campione di urina è stato raccolto prima dell'esecuzione del test di provocazione; i campioni sono stati poi sottoposti ad analisi metabolica basata su spettrometria di massa associata a cromatografia UPLC. Nel secondo caso si tratta di uno studio retrospettivo e trasversale che includeva 32 bambini nati da madri che avevano subito l'amniocentesi tra la 21^o e la 28^o settimana di gravidanza, e 12 bambini sani nati a termine attraverso il taglio cesareo da madri il cui campione di liquido amniotico era stato raccolto al momento del parto. I bambini sono stati poi suddivisi in tre gruppi differenti: A) neonati pretermine con BPD; B) neonati prematuri senza BPD e C) bambini nati a termine e senza sviluppo di BPD.

L'analisi dei campioni di urina e liquido amniotico è stata eseguita tramite uno spettrometro di massa Q-Tof (Synapt G2; Waters) ad alta risoluzione interfacciato con un sistema cromatografico UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) (Waters) caratterizzato da un'elevata risoluzione cromatografica e da un breve tempo analitico. I campioni sono stati analizzati utilizzando due diversi tipi di colonne cromatografiche (una colonna a fase inversa HSS T3 e una colonna a fase polare ACQUITY BEH HILIC). Per ciascuna colonna sono state impiegate due diverse modalità di ionizzazione (in positivo e in negativo). I dati ottenuti dall'analisi LC-MS sono stati elaborati con il software MarkerLynx e sottoposti a statistica multivariata. Le

variabili emerse dall'analisi statistica sono state poi confrontate con quelle presenti nei database disponibili in rete.

Per quanto riguarda l'approccio target, questo è stato applicato allo studio del metabolismo degli acidi grassi nella beta ossidazione. Sono stati arruolati 157 neonati e sono stati suddivisi in quattro gruppi a seconda della settimana gestazionale (SG): gruppo 1 (22-27+6 SG); gruppo 2 (28-31+6 SG); gruppo 3 (32-36+6 SG); gruppo 4 (37-41+6 SG). Tra le 48 e le 72 ore dalla nascita da ogni soggetto sono stati raccolti un campione di plasma e uno di sangue intero sotto forma di DBS (spot di sangue su carta bibula). Per l'analisi sono state utilizzate delle acilcarnitine non marcate donate dal Dott. Piero Rinaldo (Mayo Clinic, Rochester, MN, USA) e dei composti marcati con isotopi stabili, acquistati da ChromSystems Instruments & Chemicals (Monaco, Germania) che sono stati utilizzati come standard interni. Acetonitrile, metanolo, n-butanolo sono stati acquistati da Carlo Erba (Milano, Italia); acido trifluoroacetico (TFA) e cloruro di acetile da Sigma-Aldrich (Milano, Italia). Tutti i solventi erano di purezza cromatografica. Per quantificare le acilcarnitine sono state costruite delle curve di calibrazione per ciascuna di esse usando il metodo delle diluizioni isotopiche. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando i pacchetti software STATISTICA 6.0 (Stat Soft Inc, Tulsa, USA) e SPSS per Windows (versione 21.0, IBM Corp., Armonk, NY).

RISULTATI

Nello studio relativo all'allergia alimentare si sono ottenuti 4 set di dati (derivanti dall'uso combinato di 2 modalità di ionizzazione e di 2 diverse colonne cromatografiche), per ciascuno dei quali è stato possibile elaborare un modello robusto in grado di discriminare tra i soggetti con test di provocazione orale positivo e quelli con test negativo. Nello specifico, 4 variabili sono emerse come particolarmente significative nella differenziazione tra i due gruppi. Sebbene il confronto delle caratteristiche chimico-fisiche di queste variabili con i database metabolomici, non abbia permesso di identificare l'esatta natura delle variabili stesse, è rilevante sottolineare come utilizzando 2 delle variabili più importanti identificate sia possibile creare un albero decisionale.

Lo studio relativo alla previsione di parto pre-termine e sviluppo di BPD a partire dall'analisi dei liquidi amniotici ha portato allo sviluppo di due data set. L'analisi dei due data set ottenuti (uno per ciascuna modalità di ionizzazione applicata nell'analisi spettroscopica) ha permesso di costruire due robusti modelli di PLS-DA (Partial Least Square regression-Discriminant Analysis) ($R^2=0.78$ and $Q^2=0.56$; $R^2=0.80$ e $Q^2=0.56$), in grado di discriminare chiaramente i campioni di liquido amniotico appartenenti alle 3 classi oggetto di studio (A,B,C). Una preliminare analisi dei dati mediante PCA (Principal Component Analysis) aveva consentito di escludere che tale discriminazione potesse essere dovuta al ruolo confondente di alcune importanti variabili cliniche (età materna al momento del prelievo, epoca gestazionale e terapia assunta dalla madre in gravidanza).

Infine, per lo studio riguardante le acilcarnitine e gli amminoacidi, i risultati riportati definiscono gli intervalli di normalità delle concentrazioni dei componenti del pool della carnitina, compresi metaboliti isomeri e isobari, in campioni di plasma e DBS, per neonati di diverse età gestazionali. I valori ottenuti dall'analisi dei campioni non si distribuiscono secondo una gaussiana, quindi per ogni gruppo (G1, G2, G3, G4) sono stati calcolati mediane e percentili (10° , 25° , 75° , 90°) delle concentrazioni di ciascun metabolita. È stata inoltre effettuata l'analisi statistica delle differenze fra i vari gruppi.

CONCLUSIONE

I due studi untarget hanno dimostrato che l'analisi metabolomica è in grado di predire la risposta al test di provocazione orale con latte a partire dal profilo metabolico urinario e il parto pre-termine associato o meno allo sviluppo di BPD sulla base invece dei profili del liquido amniotico.

Nello specifico, nel caso dell'allergia alimentare, 4 variabili sono emerse come particolarmente significative nella differenziazione tra i due gruppi. Sebbene il confronto delle caratteristiche chimico-fisiche di queste variabili con i database metabolomici non ha permesso di identificare l'esatta natura delle variabili stesse, è rilevante sottolineare come utilizzando 2 delle variabili più importanti identificate sia possibile creare un albero decisionale che consente la corretta predizione della risposta al test in tutti i soggetti coinvolti eccetto uno. Tuttavia, anche a prescindere dalla completa identificazione dei metaboliti coinvolti, il dato rilevante è rappresentato

dall'esistenza di un "fingerprinting metabolico" in grado di individuare preventivamente i bambini più a rischio di avere una risposta positiva al test di provocazione orale con alimenti. Lo sviluppo e la validazione di tale metodica permetterà di evitare di sottoporre al test di provocazione orale i bambini con alta probabilità di sviluppare una reazione allergica (sistemica) generalizzata.

Lo studio condotto sui liquidi amniotici ha dimostrato che il profilo metabolico del liquido amniotico raccolto tra la 21a e 28a settimana di gravidanza può discriminare le gravidanze associate a parto pretermine da quelle associate a parto a termine, e identificare i neonati che svilupperanno BPD. Questi risultati supportano l'ipotesi che alcune alterazioni metaboliche prenatali possano giocare un ruolo chiave nella nascita pretermine e nello sviluppo di BPD nel neonato. Tuttavia, sono necessari successivi studi per confermare questi dati preliminari e per chiarire l'interazione tra l'ambiente materno-fetale e lo sviluppo di BPD nel neonato.

I risultati ottenuti dall'analisi del profilo delle acilcarnitine e degli amminoacidi confermano la necessità di definire specifici intervalli di normalità per ogni matrice utilizzata e per ogni gruppo di diversa età gestazionale, inoltre il confronto con i risultati ottenuti da altri autori fa emergere l'importanza che ogni laboratorio disponga di propri valori di riferimento, sia ai fini diagnostici che di ricerca. L'utilizzo del metodo UPLC-MS/MS ha consentito un'analisi rapida e completa del pool della carnitina nel neonato a termine e pretermine, permettendo per la prima volta l'analisi simultanea di oltre 40 acilcarnitine, comprese alcune forme isomeriche e isobare. Tali caratteristiche, unitamente ai risultati ottenuti, ne confermano il possibile utilizzo a scopo diagnostico, ad esempio come estensione dello screening neonatale/test di secondo livello.

ABSTRACT

BACKGROUND

Metabolomics is an emerging science, with promising application in medical practice. The metabolomic approach is based on the global identification, not driven by *a priori* hypothesis, of a high number of metabolites in a biological fluid; this allows the characterization of the metabolic profile typical of a certain condition, permitting to identify which metabolites or pattern of metabolites could be useful in discriminating different groups of subjects. By analysis of spectroscopic data, multivariate statistical analysis tools allow you to extract data relevant metabolic characterization of specific physiological and patho-physiological. Furthermore, the analysis needs metabolomics low amounts of biological sample, a feature that makes it applicable to multiple arrays but which especially makes it easy to use in the paediatric field. The impact of this science in the field of maternal and child studies is very important, to investigate whether there are metabolites useful to diagnose some of the most widespread diseases in childhood and to investigate whether there are correlations between the maternal condition and the development of diseases in the newborn. In the specific case we applied the metabolomic approach to some of the most common diseases of the scope for Childcare: food allergy, the preterm delivery, the development of BPD and defects of the β -oxidation of fatty acids.

OBJECTIVES

The aim of my PhD was to apply metabolomics analysis and mass spectrometry to investigate some of the most common diseases of children and maternal field (food allergy, pre-term birth, BPD development and defects of the β -oxidation of fatty acids) using different biological matrices: urine, amniotic fluid, plasma and blood spot. Two different approaches were applied: a target approach, very specific, that focuses on the qualitative and quantitative analysis of a single analyte, such as a marker disease or the substrate of an enzyme reaction; an untargeted approach (fingerprinting) focused on the analysis of a group of metabolites belonging to a specific metabolic pathway or a class of compounds.

METHODS

The untargeted approach was applied to two studies: the first to see on a group of children with suspected milk allergy to differentiate the allergic reaction in urine samples taken before the outbreak; the second to evaluate the metabolic profiles of amniotic fluid of patients with preterm delivery and development of BPD in order to be able to predict preterm birth and development of BPD in the child. The first is a prospective study including 30 children (19 males and 11 females, average age 4 years; they were all affected by IgE mediated cow's milk protein allergy). The patients submitted to a milk oral challenge test and, accordingly, were divided in two groups: positives (15 children) and negatives (15 children). A urine sample was collected for each patient before the milk challenge test. The second is a pilot study including 32 infants of mothers who had undergone amniocentesis between the 21st and the 28th week of gestation have been included in the study: 10 preterm infants with BPD (A), 11 healthy preterm infants without BPD (B), and 11 healthy term infants (C).

The metabolomic analysis of the urine and amniotic fluid was performed by means of Q-ToF (Synapt G2; Waters) high performance mass spectrometry platform coupled with a UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography, Waters) system, characterized by a high chromatographic resolution and a short analytic time. The sample were analysed by means of two different types of chromatographic columns (one column, HSS T3, with a reversed phase; the other with a polar phase, ACQUITY BEH HILIC). For each column the sample were analysed in positive and negative polarity. The results of the LC-MS analysis were processed with the MarkerLynx software and submitted to multivariate statistics methods. The variables which emerged from the statistic analysis were then confronted with the variables in the databases on the internet (HMDB and Metlin). As far as the targeted approach is concerned, it was applied to the study of the metabolism of the fatty acids during β -oxidation. 157 newborn children were taken into consideration, and they were divided in four groups, according to the gestational age (SG): group 1 (22-27 +6 SG); group 2 (28-31 +6 SG) group 3 (32-36 +6 SG) group 4 (37-41 +6 SG). 48-72 hours after birth, DBS (blood spot on blotting paper) and plasma samples were collected from each subject. For the analysis, unmarked acylcarnitine donated by Dr. Piero Rinaldo (Mayo Clinic, Rochester, MN, USA) were used, together with stable isotopes marked compositions,

purchased from the ChromSystems Instruments & Chemicals (Munich, Germany), which were used as internal standards. The acetonitrile, the methanol, and the n-butanol were purchased from Carlo Erba (Milan, Italy); the trifluoroacetic acid (TFA) and the acetyl chloride from the Sigma-Aldrich (Milan, Italy). All the solvents were chromatographically pure. In order to quantify the acylcarnitine, calibration curves were built for each of them by the isotopic dilution method. For the statistic analysis the STATISTICA 6.0 (Stat Soft Inc, Tulsa, USA) and SPSS for Windows (version 21.0, IBM Corp., Armonk, NY) software packs were used.

RESULTS

The study on the prediction of the pre-term delivery and the BPD development based on the analysis of the amniotic fluid had led to the development of two data sets. The analysis of these two sets (one for each ionization method applied during the spectroscopic analysis) has allowed us to build two robust PLS-DA (Partial Least Square regression-Discriminant Analysis) models ($R^2=0.78$ and $Q^2=0.56$; $R^2=0.80$ and $Q^2=0.56$), which are able to clearly discriminate the AF samples belonging to the three groups of infants (A,B,C). A preliminary data analysis through PCA (Principal Component Analysis) had permitted to exclude the hypothesis that this discrimination could be due to the confounding effect of some important clinical variables (mother age at amniocentesis, gestational age at amniocentesis and therapy the mother submitted to during pregnancy).

Last, in the study of the acylcarnitine and the amino acids, the reported results define the normal range of concentrations of the carnitine pool components, including isomers and isobaric metabolites in plasma and DBS samples, for infants of different gestational ages. The values obtained from the analysis of the samples do not fit a Gaussian distribution, therefore medians and percentiles (10° , 25° , 75° , 90°) of the concentrations of each metabolite were calculated for each group (G1, G2, G3, G4). We have also carried out the statistical analysis of the differences between the different groups.

CONCLUSION

The two untargeted studies have demonstrated that the metabolomic analysis is able to predict the milk oral challenge test response, on the basis of the urine metabolomic

profile, and to predict pre-term birth and BPD development through the analysis of amniotic fluid.

Especially as far as food allergy is concerned, 4 variables have emerged as particularly relevant in the differentiation of the two groups. Despite the fact that the confrontation of the chemical-physical characteristics of these variable with the metabolomic databases has not allowed the identification of the exact nature of the variables, it is worth underlining that the use of 2 of the most important identified variables leads to the creation of a decisional tree which allows the correct prediction in response to the test in all the subjects but one. Nevertheless, regardless of the complete identification of the involved metabolites, the most relevant result is the existence of a “metabolic fingerprint” that individuates children with higher risk of positive response to challenge test. The development and the validation of this method will allow us to avoid submitting to the oral challenge test children who are highly at risk of developing a generalized (systemic) allergic reaction.

The study on the amniotic fluids had demonstrated that the metabolic profile of the amniotic fluid collected between the 21st and the 28th pregnancy week can discriminate the pregnancies subject to a pre-term delivery from those subject to an on term delivery, and identify the newborn children who will develop a BPD. These results support the hypothesis that some prenatal metabolic alterations may have a key role in the pre-term birth and in the development of BPD in the newborn. Nevertheless, further studies are necessary in order to confirm these preliminary results and to explain the interaction between the maternal-fetal environment and the development of BPD in the newborn.

The results of the analysis of the acylcarnitine and the amino acids profile confirm the necessity to define specific normal intervals for every matrix and for each group of different gestational age; moreover, the comparison with results obtained by other Authors reveals the importance that each laboratory have its own reference values, both for diagnostic and research purposes. The use of HPLC-MS/MS method has allowed to complete the carnitine analysis in pre-term and on term newborn children, allowing for the first time the simultaneous analysis of more than 40 acylcarnitines, including some isomeric and isobaric forms. These characteristics and the obtained results make this test suitable for diagnostic purposes, such as second-tier test for expanded newborn screening.

INTRODUZIONE

1. LA METABOLOMICA

1.1 Metabolomica e Systems Biology

Lo studio di un sistema biologico costituisce una delle maggiori sfide della System Biology e cerca di svelare l'organizzazione e le interazioni tra i diversi meccanismi cellulari che sono alla base di processi complessi. La complessità di fondo del sistema biologico è fondata su un'intrecciata e complessa rete di interazioni dinamiche tra un gran numero di componenti cellulari, come i geni, le proteine e i metaboliti. Anche la natura stessa dei rapporti che intercorrono tra i vari elementi del sistema contribuisce ad aumentarne la complessità poiché le interazioni possono essere diverse per tipo (regolatorio, strutturale, catalitico).

Uno dei principali progressi scientifici, fondamentale nello studio dei sistemi biologici, è stata l'introduzione delle scienze Omiche. Queste sono definite come quelle discipline che permettono di investigare le diverse classi di componenti biologici (geni, trascritti, proteine e metaboliti) di un organismo nella loro globalità e la prima a nascere tra queste scienze è stata la genomica, lo studio del compartimento genomico, inteso come l'intero set di geni di una cellula. Accanto a questa scienza, negli ultimi dieci anni, si è potuto assistere alla rapida espansione di numerose altre discipline. La trascrittomica è lo studio dei livelli di mRNA in un campione biologico (trascrittoma) per quantificare la trascrizione genica; allo stesso modo, lo studio della traduzione proteica ha preso il nome di proteomica e il proteoma è definito come l'intero set di proteine presenti in una cellula o tessuto in un dato momento [1,2].

La metabolomica è la più nuova tra queste scienze Omiche; essa è lo studio del metaboloma, definito, in analogia con i termini precedenti, come l'insieme di metaboliti (piccole molecole con peso molecolare $< 1,5$ kDa) prodotti o presenti in un sistema biologico [2]. In realtà, la scienza che studia il metaboloma ha trovato, inizialmente, due differenti denominazioni e definizioni. Per primo, infatti, è stato introdotto il termine metabonomica, per descrivere "la misura quantitativa delle

risposte metaboliche multiparametriche di un sistema vivente come risposta a stimoli fisiopatologici o a modificazioni genetiche” [3]; successivamente, si è parlato di metabolomica in riferimento allo “studio dell’insieme di tutti i metaboliti in un sistema biologico e dei cambi nella concentrazione o nel flusso dei metaboliti in relazione a perturbazioni genetiche o ambientali” [4]. Tuttavia, la differenza tra le due definizioni, di tipo filosofico più che tecnico, ha fatto sì che i due termini siano ormai utilizzati indifferentemente.

I diversi livelli funzionali analizzati dalle scienze Omiche sono integrati tra loro nel contesto della systems biology, nuovo campo della scienza, che offre un innovativo approccio allo studio dei sistemi biologici. Fino ad ora, infatti, la biologia tradizionale si è focalizzata sull’individuare singoli componenti cellulari e sullo studio delle loro funzioni in maniera separata, con un approccio che viene definito “riduzionista”. Tuttavia, in anni recenti, si è fatta via via strada la consapevolezza che un sistema biologico è più della somma delle sue parti, e il suo funzionamento non può essere rispecchiato dalla funzione di un singolo componente. Così, in contrasto con il riduzionismo, la systems biology promuove un approccio di tipo “olistico”: un sistema biologico è visto come un complesso network di interazioni dinamiche tra i suoi componenti, quali geni, mRNA, proteine e metaboliti. La system biology, così, combina tra loro genomica, trascrittomica, proteomica e metabolomica, studiando in maniera omnicomprensiva la “cascata omica” Questo nuovo approccio non intende sostituirsi al tradizionale approccio riduzionista, ma ha le potenzialità per integrare quest'ultimo fornendo la visione di un sistema biologico o di un organismo da un punto di vista globale, contribuendo a comprenderne a fondo il funzionamento [2,5].

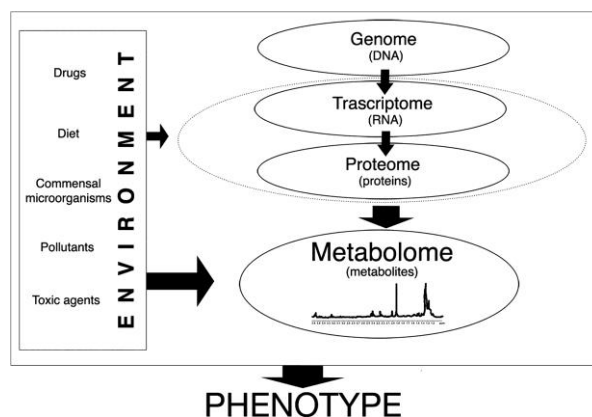


Fig. 1 La cascata omica, da Carraro et. al, 2009

La metabolomica si inserisce perfettamente nella visione della systems biology: con un approccio globale e non guidato da ipotesi a priori, essa caratterizza dal punto di vista quantitativo e qualitativo tutti i metaboliti presenti in un sistema biologico e le interazioni tra essi; così, permette di ottenere una visione integrata dei meccanismi biochimici tipici di un organismo complesso. Inoltre, dal momento che costituisce la piattaforma finale della “cascata omica”, la metabolomica presenta alcune caratteristiche peculiari che la rendono uno strumento unico per definire le proprietà di un organismo biologico. Essa è considerata la scienza omica più vicina all'espressione fenotipica poiché rispecchia sia l'informazione contenuta nel codice genetico sia le influenze derivate dall'interazione con l'ambiente.

Il metaboloma è influenzato dalla genetica ma anche dai processi regolatori presenti all'interno della cellula stessa (eventi post trascrizionali e post-traduzionali) [6] e i metaboliti presenti all'interno di una cellula si possono considerare come il prodotto finale indiretto dell'espressione genica. La metabolomica permette inoltre di studiare gli effetti delle relazioni dell'organismo con gli agenti esterni [2] poiché il profilo metabolico è fortemente influenzato da fattori ambientali come la dieta, l'esposizione ad agenti ambientali, l'assunzione di farmaci o altre sostanze.

Altra caratteristica del metaboloma è la sua natura altamente dinamica: questo permette al metaboloma di essere un indicatore molto rapido delle perturbazioni di un sistema [5].

In conclusione, si può affermare che, in virtù della posizione a valle all'interno dei meccanismi biochimici, i cambiamenti nei profili metabolici e nella loro distribuzione sono uno specchio dello stato biochimico *in vivo* di un sistema biologico: la metabolomica si può quindi considerare come la scienza Omica più vicina al fenotipo di un organismo. E grazie alle strette correlazioni del metaboloma con il genotipo, la fisiologia e l'ambiente, questa scienza offre l'opportunità unica di definire le correlazioni esistenti tra genotipo e fenotipo e le relazioni tra fenotipo ed ambiente [7,8,9].

1.2 Applicazioni cliniche della metabolomica

L'analisi metabolomica ha promettenti applicazioni in campo medico in quanto consentendo l'identificazione di pattern metabolici o di singoli metaboliti, risulta uno strumento utile per comprendere l'eziologia di una patologia e per seguirne la progressione nel tempo, soprattutto nell'ambito delle patologie multifattoriali. Inoltre, l'identificazione di metaboliti inattesi e sconosciuti, può consentire di formulare nuove ipotesi patogenetiche [10,11,12].

Da un punto di vista clinico l'approccio metabolomico ha tre importanti applicazioni potenziali:

- La prima applicazione è quella che si ha nell'ambito della caratterizzazione dei fenotipi patologici poiché andando a identificare l'insieme dei metaboliti che discriminano tra loro diversi gruppi di soggetti, rende possibile la descrizione metabolica di un particolare fenotipo di malattia. I metaboliti discriminanti possono quindi essere identificati come potenziali biomarkers di patologia. Considerando la stretta correlazione tra il metaboloma e il fenotipo, molte aspettative degli studi di metabolomica sono rivolte alla definizione delle perturbazioni metaboliche precoci che avvengono ancor prima della comparsa dei sintomi della malattia, offrendo potenzialmente uno strumento di diagnosi precoce.
- La seconda grande applicazione si ha nella potenziale determinazione di profili predittivi di patologia che, applicati alla popolazione generale, potrebbero consentire lo sviluppo di quella che viene chiamata "epidemiologia molecolare" [10].
- La terza importante potenzialità clinica è relativa all'identificazione delle caratteristiche metaboliche individuali che possono essere in grado di prevedere l'efficacia e la tossicità di un trattamento farmacologico secondo quella che viene definita "farmacometabolomica" [13,14]. Lo scopo di quest'ultima è quello di identificare dei markers misurabili prima dell'intervento terapeutico che siano in grado di predire l'effetto e/o la tossicità che il farmaco avrà sull'individuo, permettendo di ottimizzare le scelte terapeutiche per ogni singolo

paziente nell'ottica di una vera e propria medicina personalizzata [14] (Figura 2).

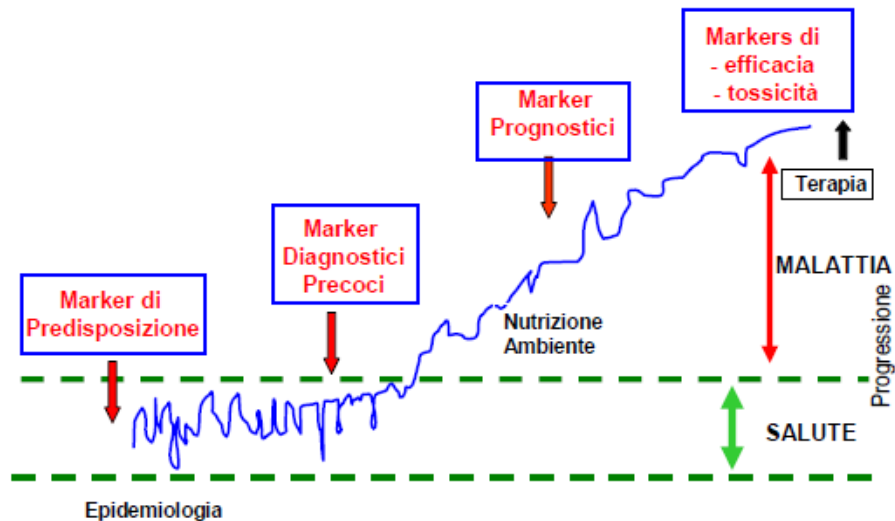


Figura 2: I biomarkers sono essenziali per descrivere il cambiamento dalla normalità alla disfunzione [52].

1.2.1 La metabolomica in ambito pediatrico

L'analisi metabolomica può essere applicata allo studio dei fluidi biologici raccolti in maniera non invasiva (es. urine) o minimamente invasiva (es. prelievo ematico) e permette di ottenere grandi quantità di informazioni anche da scarse quantità di campioni; queste caratteristiche la rendono una metodica appropriata per l'applicazione in ambito pediatrico.

Un numero crescente di studi si sta quindi interessando dell'applicazione dell'approccio metabolomico allo studio della popolazione pediatrica [15]. Alcuni studi si sono focalizzati sull'influenza che alcune variabili fisiologiche, come l'età o la dieta, possono avere sul profilo metabolico dei bambini. Gu *et al.*, ad esempio, ha dimostrato che il profilo metabolico urinario cambia con l'età, e come questo dato possa essere utile nella definizione dell'età biologica (che può, di fatto, discostarsi dall'età cronologica) [16]. Atzori *et al.* ha invece eseguito uno studio su bambini nati pretermine, ed hanno dimostrato che era possibile distinguere diversi pattern metabolici a seconda dell'età gestazionale; questo ha quindi suggerito che lo stato

metabolico del neonato alla nascita sia dipendente dall'età gestazionale [17]. Per valutare l'effetto della dieta, Bertram *et al.* ha comparato i profili urinari di due gruppi di bambini che seguivano una dieta diversa, un gruppo seguiva una dieta ricca in proteine del latte e uno con dieta ricca in proteine della carne: è stato possibile distinguere a che gruppo appartenesse un bambino a seconda del suo profilo urinario [18]. Numerosi studi sono inoltre stati condotti sulle possibili applicazioni della metabolomica nell'ambito della patologia in età pediatrica. Molti di questi studi si sono concentrati sull'identificazione di biomarker utilizzabili per la diagnosi precoce di malattia o utili nel definire il profilo prognostico di una patologia. Uno dei primi studi è stato condotto sugli errori congeniti del metabolismo, in particolare sui disturbi del metabolismo del propionato [19]; questo studio ha identificato come metabolita più rilevante nella discriminazione tra sani e malati la propionil-carnitina, che è di fatto il composto che viene ricercato nello screening neonatale per queste patologie; questo interessante risultato conferma le potenzialità della metabolomica che, pur sfruttando un approccio non guidato da ipotesi a priori, riesce ad identificare biomarker effettivamente rilevanti nella patogenesi di una malattia. Un recente studio condotto da Mickiewicz *et al.* ha permesso di identificare biomarker precoci di sepsi: i principali composti capaci di discriminare il paziente con sepsi dal controllo sano, sono risultati alcuni metaboliti associati con l'aumentata richiesta di energia e lo stato infiammatorio [20]. Biomarker precoci di malattia sono stati identificati anche per l'insufficienza renale acuta: in particolare, sono stati identificati marcatori di danno renale acuto in pazienti sottoposti a chirurgia cardiopolmonare; questo può essere utile sia nella diagnosi precoce di tale condizione, sia nel comprendere meglio la base fisiopatologica dell'insufficienza renale acuta post – operatoria [21]. Studi di metabolomica 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; un primo studio longitudinale ha dimostrato che esiste una disregolazione metabolica ancora prima che si instauri il processo autoimmune, che permette di distinguere tra soggetti geneticamente predisposti che effettivamente svilupperanno il diabete e quelli che invece non lo svilupperanno [22]. Uno studio recente ha poi messo in luce come esistano delle differenze nel profilo metabolico di un individuo affetto da diabete di tipo 1 a seconda del suo livello di emoglobina glicata; questo dato può dare importanti

informazioni relativamente alla progressione del diabete [23]. In pneumologia pediatrica, alcuni studi si sono concentrati sull'asma: Carraro *et al.*, ad esempio, ha recentemente condotto uno studio di metabolomica applicata all'analisi del condensato dell'aria esalata per la caratterizzazione dei fenotipi dell'asma pediatrico, focalizzandosi in particolare sull'asma grave. L'analisi metabolomica ha permesso sia di discriminare tra i bambini sani e quelli con asma, sia di distinguere, nel gruppo dei soggetti asmatici, diversi gradi di severità della malattia, potendo, in particolare, caratterizzare uno specifico fingerprinting metabolico associato all'asma grave. L'analisi metabolomica potrebbe quindi essere molto utile come approccio complementare alla valutazione clinica convenzionale dell'asma, permettendo, in particolare, di caratterizzare i diversi fenotipi di questa malattia [24]. Mentre in allergologia pediatrica, uno studio sulla dermatite atopica [25] ha visto come questa condizione sia in grado di determinare alterazioni in diverse vie del metabolismo sistemico; questa potrebbe essere una conseguenza dei meccanismi molecolari alla base di questa patologia. Francavilla *et al.* ha condotto invece uno studio su lattanti affetti da allergia alle proteine del latte vaccino, per valutare l'effetto dell'introduzione del lattosio (normalmente non presente nei lattini idrolisati dati a questi bambini) nella dieta: lo studio ha permesso di studiare sia le caratteristiche della flora batterica sia il metaboloma dei pazienti, applicando l'analisi a campioni fecali; è stato dimostrato che l'aggiunta di lattosio nella dieta è in grado di modulare positivamente la composizione della flora batterica intestinale di questi pazienti [26]. Nell'ambito della farmacometabolomica, sono stati condotti alcuni studi in neonatologia. Uno studio [27] ha applicato un approccio metabolomico utilizzando come tecnica la spettroscopia $^1\text{H-NMR}$ sulle prime urine di neonati a termine e pretermine, identificando pattern di metaboliti in grado di predire la pervietà del dotto arterioso al terzo – quarto giorno di vita; sembra sia anche possibile identificare quali, tra i neonati pretermine con dotto arterioso pervio, possano rispondere alla terapia con ibuprofene. Un altro studio [28] è stato applicato nell'ambito della terapia della sindrome da distress respiratorio nei neonati; sono stati identificati dei metaboliti in concentrazioni molto elevate nel broncolavaggio alveolare ottenuto durante la ventilazione meccanica, dopo la somministrazione di surfactante; tali dati suggeriscono come la metabolomica potrebbe offrire nuove prospettive nel trattamento farmacologico dei neonati prematuri malati.

1.3 Lo studio dei metaboliti

Lo scopo della metabolomica è, quindi, quello di analizzare l'insieme dei metaboliti presenti in un dato campione biologico (il metaboloma); caratterizzato da una grande varietà di molecole differenti chimicamente, come aminoacidi, acidi organici, carboidrati, lipidi. Questi composti sono presenti in diverse concentrazioni e non tutti sono presenti in tutti i tessuti e biofluidi. Dobbiamo poi prendere in considerazione anche la presenza e il ruolo di metaboliti esogeni derivanti da dieta, farmaci, flora microbica o altro [29].

Al momento attuale, nessuna metodica analitica è in grado di misurare l'intero metaboloma. Per questo motivo, per lo studio dei metaboliti, sono utilizzate differenti metodologie tra loro complementari.

La *target analysis* è un approccio altamente specifico che si focalizza sull'analisi qualitativa e quantitativa di un singolo analita, come un marcatore di malattia o il substrato di una reazione enzimatica [30].

Il *metabolite profiling* è invece un approccio focalizzato all'analisi di un gruppo di metaboliti appartenenti ad una specifica via metabolica o una certa classe di composti.

Target analysis e *metabolic profiling* sono approcci generalmente ipotesi-guidati, quindi basati sulle precedenti conoscenze, nonché selettivi, dal momento che si focalizzano su di un ristretto numero di metaboliti; non sono quindi considerabili come un vero tipo di approccio metabolomico. [2-30].

Il *metabolite fingerprinting* è invece un approccio che parte dalla valutazione del maggior numero di metaboliti possibile, per la definizione di pattern o "fingerprinting" metabolici associati a una determinata condizione. Lo scopo primario non è l'identificazione del singolo metabolita, ma piuttosto la definizione delle caratteristiche metaboliche che sono in grado di discriminare tra i gruppi in esame. Il *metabolite fingerprinting* è un vero e proprio approccio -omico, perché garantisce uno studio globale dei metaboliti, non guidato da ipotesi a priori.

Una volta identificato il pattern specifico di una certa condizione, si procede con l'identificazione strutturale dei metaboliti rilevanti: questo permette quindi di identificare biomarker significativi nella distinzione tra differenti condizioni fisiopatologiche.

Un grande vantaggio fornito da questo tipo di approccio non guidato da ipotesi a priori è che è lasciata aperta la possibilità di identificare biomarker inattesi se non addirittura sconosciuti, che possono aprire la strada alla migliore comprensione di meccanismi fisiopatologici non del tutto chiariti e diventare bersaglio di nuove terapie.

Al momento attuale il metaboloma umano non è ancora stato completamente mappato e non si conosce ancora il numero esatto dei suoi componenti; il processo di identificazione dei metaboliti è comunque in rapidissima espansione.

1.4 Il “Metabolomic Workflow”

Il procedimento caratteristico di un esperimento di metabolomica segue una serie di tappe specifiche. Dopo un'accurata preparazione dei campioni, si utilizzano tecniche sperimentali che permettono di quantificare i metaboliti all'interno del campione studiato. Le metodiche più frequentemente utilizzate sono la spettrometria di massa (MS) e la spettroscopia – NMR che permettono di ottenere uno spettro i cui picchi rappresentano i diversi metaboliti. Nella costruzione della sequenza analitica, oltre al campione da analizzare vengono inseriti anche dei Quality Control (QC), dato da una miscela di un'aliquota di ciascun campione, per monitorare la riproducibilità analitica e strumentale e l'eventuale presenza di contaminazioni; e una miscela di standard (Standard Mix composta da sostanze conosciute come massa e tempo di ritenzione) questo ci consente di monitorare l'accuratezza di massa nel tempo e l'eventuale comparsa di problemi di carattere analitico-strumentale durante la fase analitica.

La grande quantità di dati così ottenuti viene processata con software adeguati (Markerlynk) è poi elaborata grazie a metodiche di analisi statistica multivariata, che permettono di identificare quali variabili sono più significative nella caratterizzazione di una determinata condizione patologica, o quali sono utili nella discriminazione tra due gruppi in esame. La tappa finale è l'identificazione chimico-fisica dei metaboliti. Delle ipotesi strutturali in questo senso possono essere formulate mediante il confronto, con database di metaboliti (quali HMDB e METLIN). Tuttavia l'identificazione strutturale definitiva richiede il ricorso alle tecniche classiche e allo studio di frammentazione e infine alla conferma tramite l'utilizzo, se disponibile in commercio, di standard o della sintesi di quest'ultimo [29,30].

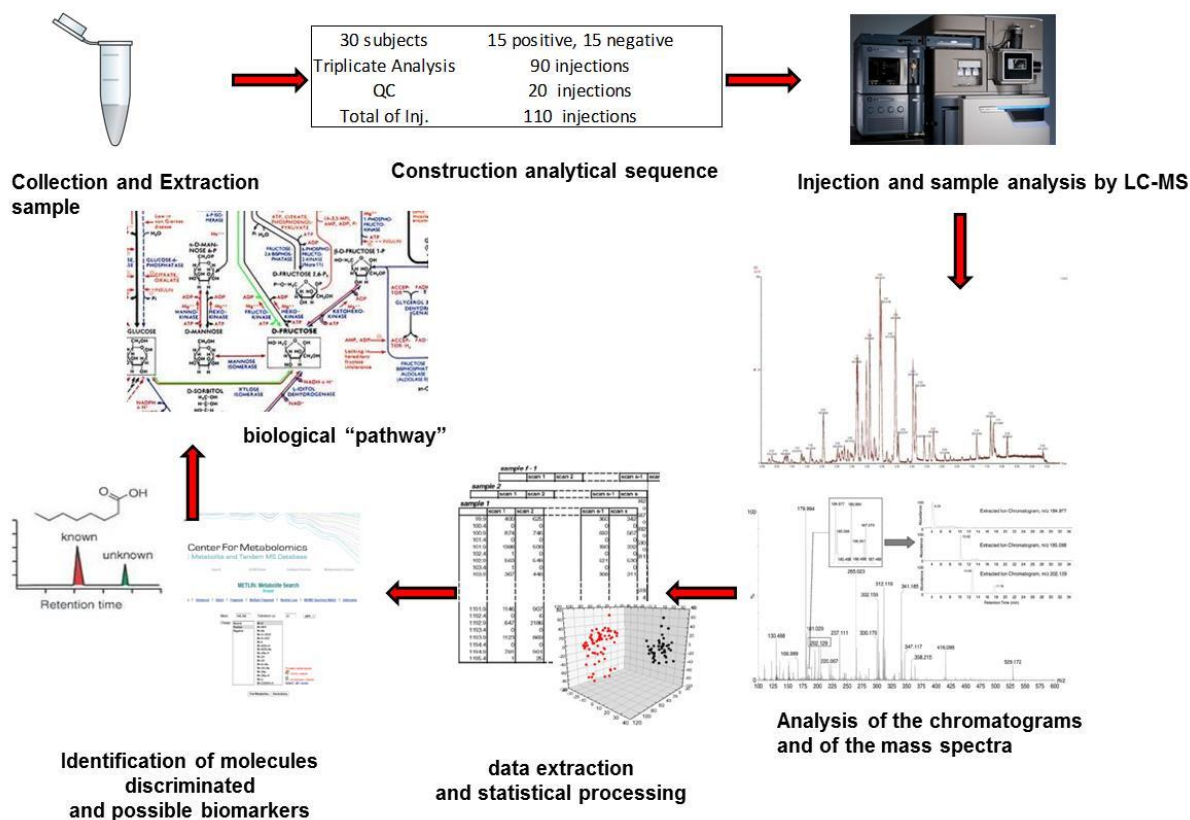


Fig. 3 II "metabolomic workflow"

1.4.1 Acquisizione e preparazione dei campioni

I metaboliti possono essere misurati in molti tipi di campioni differenti, quali tessuti, liquidi biologici (plasma, urine, liquor, condensato dell'aria espirata e altri) e colture cellulari. L'attività enzimatica può perdurare oltre il momento della raccolta del campione, per cui i campioni devono essere "attenuati", ovvero si applica un processo grazie al quale il metabolismo è ridotto o bloccato (congelamento ed eventuale aggiunta di conservante). In questo modo, i dati ottenuti sono rappresentativi del metaboloma al momento della raccolta del campione, senza introdurre elementi confondenti nell'analisi o BIAS. La preparazione dei campioni prevede l'estrazione dei metaboliti, l'eliminazione delle proteine e la rimozione della matrice del campione ma comporta inevitabilmente un certo grado di perdita di metaboliti. Per ogni tipologia di campione, sono stati definiti specifici protocolli di preparazione [5,29,30].

Visto l'esiguo numero di campioni, che spesso rappresentano i gruppi, ciascun campione, adeguatamente preparato, viene analizzato in triplicato per escludere

differenze statistiche di carattere analitico-strumentale anziché biologico e limitare la possibilità di dover escludere un campione per problemi di tipo strumentale.

1.4.2 Piattaforme analitiche

A causa della grande eterogeneità chimica del metaboloma, sono necessarie tecniche analitiche complementari per poterlo studiare completamente. Le due principali piattaforme analitiche utilizzate in metabolomica sono la spettroscopia-NMR e la spettrometria di massa; spesso accoppiata a metodiche di separazione cromatografica [31].

La spettroscopia – NMR

La spettroscopia $^1\text{H-NMR}$ viene utilizzata per identificare tutti i metaboliti del campione che contengono protoni; questi sono rappresentati in uno spettro, formato da un insieme di picchi in diverse posizioni (chemical shift) e con diverse intensità; ogni molecola ha un suo specifico pattern e una sensibilità dell'ordine delle nmoli- μ moli ed è molto riproducibile.

La spettrometria di massa

La spettrometria di massa è una metodica complementare alla spettroscopia- $^1\text{H-NMR}$, che viene largamente utilizzata negli studi di metabolomica. Con la spettrometria di massa, gli analiti d'interesse possono ionizzarsi in positivo o in negativo, e gli ioni sono separati secondo il loro rapporto massa/carica (m/z), per essere poi rappresentati in uno spettro con l'intensità degli ioni identificati. L'analisi spettroscopica è comunemente accoppiata a metodiche di separazione cromatografiche, come la cromatografia liquida o la cromatografia gassosa; che permettono di aumentare il numero di metaboliti identificati e di aumentare la sensibilità analitica [31]. In questo modo m/z , tempo di ritenzione e intensità sono i parametri che vanno a rappresentare il fingerprinting metabolico del campione in esame [30].

Il vantaggio della spettrometria di massa è la sua elevata sensibilità rispetto al NMR; questa metodica si è dimostrata una potente piattaforma per l'analisi metabolomica, grazie alla sua abilità d'identificare metaboliti presenti anche a bassi livelli (fM) [31].



Fig. 4 Spettrometro di massa ad alta risoluzione (Synapt G2, Waters)

Estrazione ed elaborazione dei dati

Le metodiche spettroscopiche producono grandi quantità di dati molto complessi, che sono legati all'insieme di metaboliti (o variabili) derivanti dall'analisi dei campioni; il trattamento di tali dati avviene con l'utilizzo di specifici software, come Markerlynk. L'elaborazione non può essere fatta mediante metodi di statistica classica che non sono in grado di gestire un numero così elevato di variabili con un numero ridotto di osservazioni, ma si basa su tecniche di analisi statistica multivariata. Le metodiche di statistica multivariata considerano tutte le variabili simultaneamente, descrivendo le relazioni che esistono tra esse; questo permette di ottenere una migliore descrizione dell'intero modello metabolico.

Le metodiche multivariate sono classificate in *unsupervised* e *supervised*. [32].

Con le metodiche *unsupervised*, la classificazione dei gruppi non è nota a priori. Queste metodiche riducono la complessità dei dati disponibili in modo da poterli rappresentare per mezzo di grafici interpretabili visivamente. Lo scopo è di valutare se il confronto degli spettri metabolici consente di discriminare i diversi gruppi di soggetti. Un esempio di metodica *unsupervised* molto utilizzata in metabolomica è la Principal Component Analysis (PCA).

Mentre con le metodiche *supervised*, la classificazione è nota a priori e l'obiettivo dell'analisi è di ottenere un modello matematico che, sulla base dei dati metabolomici, consenta di discriminare i gruppi mettendo in evidenza quali sono le variabili. La validazione del modello costruito è quindi testata con un gruppo indipendente di

soggetti (Test set). Grazie alle metodiche *supervised*, quindi, si ha la possibilità di predire con una certa probabilità a quale gruppo appartiene un eventuale nuovo campione.

Identificazione dei metaboliti biomarker

Un ulteriore passo fondamentale del “workflow metabolomico” è l’identificazione strutturale dei metaboliti emersi come potenziali biomarker. (Fig. 4)

Un importante supporto per l’ipotesi strutturale dei metaboliti emersi dall’analisi metabolomica è fornito dai diversi database di metaboliti disponibili on-line; questi database, in continuo aggiornamento ed espansione, contengono grandi quantità di informazioni sulle caratteristiche chimico-fisiche, spettroscopiche dei metaboliti finora conosciuti e identificati e la loro origine; che possono essere messe a confronto con le caratteristiche dei metaboliti che si stanno cercando di identificare. Spesso questa ricerca porta a considerare un numero ridotto di metaboliti che potrebbero corrispondere a quelli in esame.

Lo Human Metabolome Database è il più completo tra quelli a disposizione e contiene nella sua versione più aggiornata informazioni su oltre 40000 metaboliti. (www.hmdb.ca) [33]. Tuttavia l’identificazione definitiva dei metaboliti necessita di tecniche analitiche più sofisticate.

Una di queste è la misurazione della massa accurata. Ogni elemento ha degli isotopi con una massa caratteristica: utilizzando strumenti ad alta risoluzione, si può distinguere in maniera precisa e accurata tra masse anche molto simili tra loro. La misurazione della massa accurata consente di ottenere informazioni molto precise sulla composizione elementare del metabolita in esame, e quindi di ottenere la formula bruta del metabolita. Un ulteriore step analitico è il ricorso a metodiche di frammentazione, quali la spettrometria di massa MS/MS. Questa consiste nell’analisi di massa di uno ione, selezionato dal primo analizzatore, che viene frammentato in una cella di collisione, e l’analisi dei suoi frammenti che viene eseguita in un secondo analizzatore; si procede poi all’analisi degli “ioni prodotto” ottenuti dalla frammentazione in MS/MS. Ogni singolo composto ha un suo spettro di frammentazione caratteristico, per cui l’analisi MS/MS fornisce notevoli informazioni aggiuntive per ottenere l’identificazione strutturale dei metaboliti.

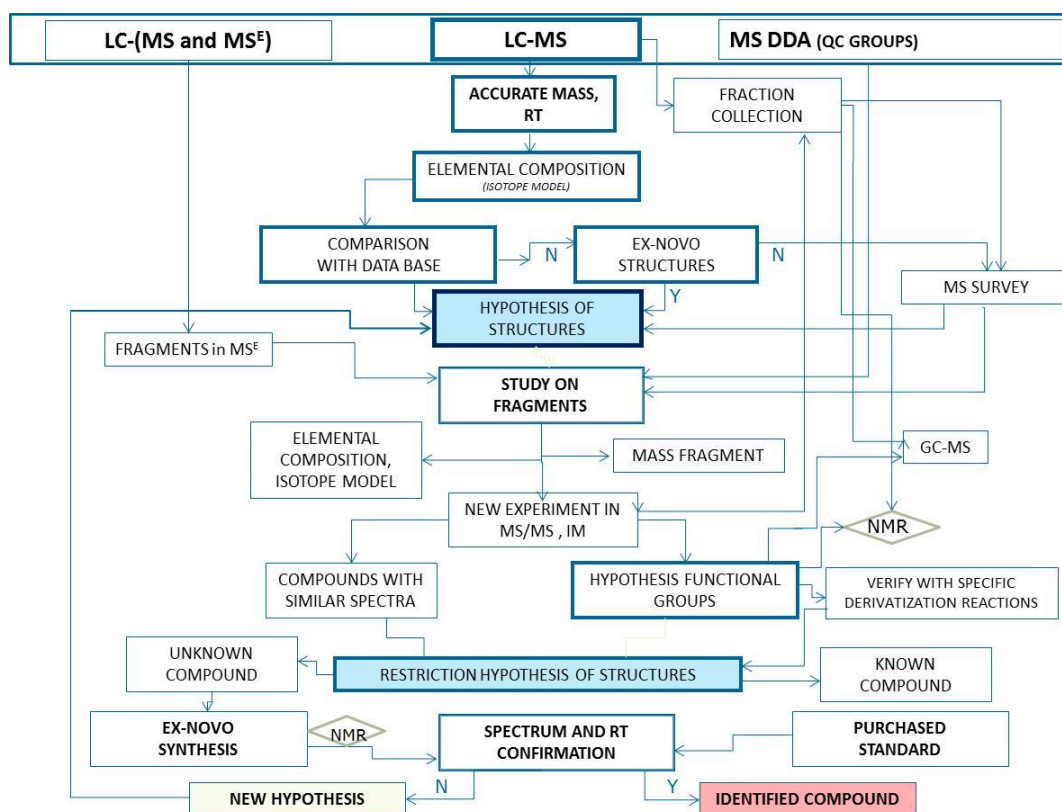


Fig.4 Schema di ricerca delle masse

BIBLIOGRAFIA

1. D'Alessandro A., Giardina B., Gevi F., Timperio A.M., Zolla L. Clinical Metabolomics: the next stage of clinical biochemistry; *Blood Transfus* 2012; 10 Suppl 2: s19-24.
2. Carraro S., Giordano G., Reniero F., Perilongo G., Baraldi E. Metabolomics: a new frontier for research in pediatrics. *J Pediatr* 2009; 154: 638-644.
3. Nicholson K., Lindon J.C., Holmes E., *Xenobiotica* 29 (1999) 1181.
4. Dunn W.B., R. Goodacre L. Neyses, Mamas M., *Bioanalysis* 3 (2011) 2205.
5. Dunn W.B., Broadhurst D.I., Atherton H.J., Goodacre R., Griffin J.L. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy; *Chem. Soc. Rev.*, 2011, 40, 387-426.
6. Hollywood K., Brison D.R., Goodacre R. Metabolomics: current technologies and future trends. *Proteomics* 2006; 6: 4716-4723.

7. Gomase V.S., Changbhale S.S., Patil S.A., Kale K.V. Metabolomics; *Current Drug Metabolism*, 2008, 9, 89-98 .
8. Eden P., Go E.P. Database Resources in Metabolomics: An Overview; *J Neuroimmune Pharmacol* (2010) 5:18–30.
9. Griffin J.L. Metabolic profiles to define the genome: can we hear the phenotypes? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004; 359: 857.
10. Nicholson J.K., Lindon J.C. Systems biology: Metabonomics. *Nature* 2008; 455: 1054.
11. Mamas M., Dunn W.B., Neyses L., Goodacre R. The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease. *Arch Toxicol* 2011; 85: 5.
12. Van der Greef J., Stroobant P., Van der Heijden R. The role of analytical sciences in medical systems biology. *Curr Opin Chem Biol* 2004; 8: 559.
13. Clayton T.A., Baker D., Lindon J.C., Everett J.R., Nicholson J.K. Pharmacometabonomic identification of a significant host-microbiome metabolic interaction affecting human drug metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 14728.
14. Carraro S., Piacentini G., Lusiani M., Uyan Z.S., Filippone M., Schiavon M., Boner A.L., Baraldi E. Exhaled air temperature in children with bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol* 2010; 45: 1240.
15. Baraldi E., Carraro S., Giordano G., Reniero F., Perilongo G., Zacchello F. Metabolomics: moving towards personalized medicine; *Italian J Pediatr* 2009, 35:30.
16. Gu H., Pan Z., Xi B., Hainline B.E., Shanaiah N., Asiago V., Gowda G.A., Raftery D. 1H-NMR metabolomics study of age profiling in children. *NMR Biomed* 2009; 22(8): 826-83.
17. Atzori L., Antonucci R., Barberini L., Locci E., Marincola F.C., 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* 2011; 3: 1005-1012.
18. Bertram H.C., Hoppe C., Petersen B.O., Duss J.Ø., Mølgaard C., Michaelsen K.F. An NMR-based metabonomic investigation in effects of milk and meat protein diet given to eight-year-old boys; *Br J Nutr* 2007, 97:758-63.
19. Wikoff W.R., Gangoiti J.A., Barshop B.A., Siuzdak G. Metabolomics Identifies Perturbations in Human Disorders of Propionate Metabolism; *Clin Chem* 2007 53:12 2169 – 2176.
20. Mickiewicz B., Vogel H.J., Wong H.R., Winston B.W.. Metabolomics as a Novel Approach for Early Diagnosis of Pediatric Septic Shock and Its Mortality; *Am J Respir Crit Care Med*, ol 187, Iss.9,pp,967–976.

21. Beger R.D., Holland R.D., Sun J, Schnackenberg L.K., et al. Metabonomics of acute kidney injury in children after cardiac surgery. *Pediatr Nephrol* 2008;23:977–984.
22. Orešić M., Simell S., Sysi-Aho M., Nääntö-Salonen K. et al. 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 – 2984.
23. Deja S., Barg E., Młynarz P., Basiak A., Willak-Janc E.. 1H NMR-based metabolomics studies of urine reveal differences between type 1 diabetic patients with high and low HbA1c values; *J Pharm Biomed Anal* 83 (2013) 43–48.
24. Carraro S., Giordano G., Reniero F., Carpi D., Stocchero M., Sterk P.J., Baraldi E. Asthma severity in childhood and metabolomics profiling of breathe condensate. *Allergy* 2013; 68: 110-117.
25. Assfalg M., Bortoletti E., D’Onofrio M., Pigozzi R., Molinari H., Boner A.L., Peroni D.G., Piacentini G.L. An exploratory 1H-nuclear magnetic resonance metabolomics study reveals altered urine spectral profiles in infants with atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2012; 166(5): 1123-1125.
26. 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 V.L., Gobbetti M., De Angelis M. Effect of lactose on gut microbiota and metabolome of infants with cow's milk allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 2012; 23: 420-427.
27. Atzori L., Barberini L., Lussu M., Murgia F., Noto A., Mercurio G., Bassareo P., et al. Metabolomics & Patent Ductus Arteriosus diagnosis: Is 1H-NMR (nuclear magnetic resonance) spectroscopy of urine at birth as predictive as ultrasound? *J Matern Fetal Neonatal Med* 2011;24 Suppl 2. *Proceedings 7th International Workshop on Neonatology*, Cagliari (Italy) 28–29 October 2011.
28. Fabiano A, Gazzolo D, Zimmermann LJ, Gavilanes AW, Paolillo P, Fanos V, Caboni P, et al. Metabolomic analysis of bronchoalveolar lavage fluid in preterm infants complicated by respiratory distress syndrome: preliminary results. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2011;24 Suppl 2:55–58.
29. Wang JH, Byun J, Pennathur S. Analytical Approaches to Metabolomics and Applications to Systems Biology; *Semin Nephrol*, 10 September 1; 30(5): 500–511.
30. Dettmer K, Aronov PA, Bruce D. Hammock BD. Mass spectrometry based metabolomics; *Mass Spectrom Rev.* 2007 ; 26(1): 51–78.
31. Atzori L, Barberini L, M Santoru ML, Antonucci R, Fanos V. Metabolomics explained to perinatologists and pediatricians; *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2012; 25(S5): 10–12.

32. Boccard J, Veuthey JL, Rudaz S. Knowledge discovery in metabolomics: An overview of MS data handling; *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 290–304.
33. Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y et al. HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D801-7.

SCOPI DELLA RICERCA

Lo scopo principale della mia ricerca è stato quello di applicare l'analisi metabolomica utilizzando la spettrometria di massa come tecnica spettroscopica in diversi ambiti di patologie che interessano l'ambito materno-infantile (allergie, parto pretermine in relazione allo sviluppo di BPD e ai difetti di ossidazione degli acidi grassi) utilizzando diverse matrici biologiche: urine, liquido amniotico e spot di sangue. Durante i primi due anni l'approccio metabolomico è stato applicato per l'identificazione di profili metabolici urinari predittivi di risposta al test di provocazione orale con latte in bambini affetti da allergia alle proteine del latte vaccino e in dieta di esclusione per tale alimento.

Gli obiettivi principali dell'applicazione della metabolomica allo studio delle allergie alimentari sono stati:

1. Applicare un approccio innovativo nella predizione della risposta al test di provocazione orale con alimenti .
2. Valutare se l'analisi metabolomica fosse in grado di discriminare e predire i bambini con risposta positiva al test di provocazione orale e bambini con risposta negativa al test mediante il confronto dei profili metabolici basali
3. Identificare i possibili metaboliti o pattern metabolico in grado di predire l'esito del test di scatenamento prima della somministrazione dell'allergene, quindi prima di sottoporre il bambino al test di scatenamento.

Gli obiettivi principali dell'applicazione della metabolomica allo studio della relazione tra parto pre-termine e BPD attraverso l'analisi dei liquidi amniotici sono stati:

1. Valutare se l'analisi metabolomica del liquido amniotico potesse discriminare tra parto pretermine con sviluppo di BPD nel bambino, parto pretermine senza sviluppo di BPD nel bambino, e il parto a termine;
2. Studiare l'eventuale correlazione tra parto pretermine e lo sviluppo di BPD e se ci fosse un'associazione con specifiche caratteristiche biochimico-metaboliche nel liquido amniotico.

Inoltre, sono stati presi in considerazione solo i campioni di liquido amniotico raccolti almeno 6 giorni prima del parto per valutare se il profilo metabolico fosse in grado di prevedere l'esito della gravidanza (pretermine rispetto a termine).

Infine, gli obiettivi dello studio target condotto su neonati a termine e pretermine, valutando il pattern delle acilcarnitine sono stati:

1. Mettere a punto il quadro dei valori di concentrazione delle acilcarnitine plasmatiche nel neonato a termine e pretermine, estendendo il numero dei metaboliti analizzati, grazie all'impiego di un nuovo metodo basato sull'impiego di UPLC-MS/MS
2. Analizzare, con la stessa tecnica UPLC-MS/MS, la concentrazione della carnitina e delle acilcarnitine su campioni ottenuti a partire da gocce di sangue (*dried blood spot*: DBS) raccolte dagli stessi soggetti e depositate su carta da filtro, in analogia a quanto viene normalmente eseguito per l'effettuazione degli screenings metabolici neonatali, con l'obiettivo di verificarne il possibile utilizzo a scopo diagnostico.

CAPITOLO 1

APPROCCIO METABOLOMICO ALLO STUDIO DELLE PATOLOGIE ALLERGICHE IN AMBITO PEDIATRICO

INTRODUZIONE

1.La metabolomica e l'allergia alimentare

L'allergia alimentare può essere definita come una risposta immunologica anomala nei confronti di proteine contenute negli alimenti, che causa la comparsa di reazioni cliniche avverse. Queste reazioni sono a loro volta suddivisibili in due gruppi: le forme IgE mediate, le più frequenti, e le forme non IgE mediate, la cui patogenesi è in genere riconducibile a meccanismi di ipersensibilità di tipo IV. Questa condizione patologica riguarda lo 0,1-1% degli adulti e lo 0,5-3,8% dei bambini [1]. L'allergia alimentare risulta quindi una problematica comune e un problema di salute rilevante nella popolazione generale, e ancor di più in età pediatrica. Qualsiasi alimento è potenzialmente in grado di dare allergia, ma il 90% dei casi è causato da otto alimenti: latte vaccino, uovo, frutta in guscio, arachidi, grano, soia, pesce e molluschi. Tra questi, l'allergia alle proteine del latte vaccino è tra le più frequenti, essendo un problema rilevante soprattutto in età pediatrica, in particolare nei primi anni di vita. Molto variabili sono i dati epidemiologici relativi all'allergia alle proteine del latte vaccino: da una parte, mancano studi definitivi sull'allergia alimentare e sul suo andamento nel tempo; dall'altra, si aggiunge che la prevalenza dell'allergia al latte vaccino tende ad essere molto sovrastimata nella popolazione, e pertanto l'allergia al latte riportata spesso non corrisponde alla vera allergia. È stato visto come i casi di allergia alimentare riportati direttamente dai pazienti (quindi non dimostrati con prove diagnostiche specifiche) variavano dall'1 al 17,5% nei bambini in età prescolare; dall'1 al 13,5% dai 5 ai 16 anni; dall'1 al 4% negli adulti. Viceversa, dai dati ottenuti mediante valutazione con prove diagnostiche specifiche, la prevalenza è stimata dallo 0,6 al 2,5% in età prescolare; dello 0,3% dai 5 ai 16 anni e a meno dello 0,5% negli adulti [2]. Il sistema gastrointestinale è in diretta comunicazione con l'ambiente esterno ed entra quotidianamente in contatto con grandi quantità di antigeni esogeni di

diversa natura. Esso è il più grande organo immunitario di tutto l'organismo ed è in grado di attuare una risposta protettiva nei confronti di antigeni nocivi, come ad esempio quelli infettivi; d'altra parte, però, si è evoluto in maniera tale da inibire la risposta immunitaria nei confronti di antigeni non nocivi, quali gli antigeni alimentari. La soppressione delle risposte immunitarie umorali e cellulo-mediate, sia locali sia sistemiche, nei confronti di specifici antigeni introdotti per via orale, prende il nome di tolleranza orale [3,4]. L'allergia alimentare è considerabile come un fallimento dell'acquisizione dei normali meccanismi di tolleranza orale nei confronti degli antigeni alimentari. Il fenomeno della tolleranza orale non è ancora stato completamente chiarito, ma numerosi sono i meccanismi identificati alla base di tale mancata risposta immunitaria nei confronti degli antigeni alimentari. Sono inizialmente implicati alcuni meccanismi endoluminali, innanzitutto la digestione delle proteine, dal momento che sembra determinare la degradazione degli epitopi antigenici, riducendo l'immunogenicità della molecola [5]. A livello della superficie intestinale, sono presenti meccanismi difensivi di prima linea, che impediscono all'antigene di interagire con il MALT (sistema immunitario associato alle mucose); questi includono la presenza di peptidi antimicrobici e di uno strato idrofobico oligosaccaridico in grado di intrappolare l'antigene [3]. La barriera intestinale non fornisce solo protezione di tipo fisico nei confronti degli antigeni esogeni, ma ha anche importanti componenti immunitarie, che sono sia innate (es. polimorfonucleati, macrofagi, cellule natural killer, cellule epiteliali e toll-like receptors) sia adattative (es. linfociti intraepiteliali e della lamina propria, placche di Peyer, IgA secretorie e citochine). Questi componenti partecipano alla tolleranza verso antigeni non dannosi, cooperando con cellule immunitarie (es. antigen presenting cell o APC, cellule dendritiche e linfociti T regolatori), che giocano un ruolo centrale nello sviluppo della tolleranza orale [6]. I meccanismi immunologici cominciano a livello del MALT, una volta che la proteina ingerita ha superato la digestione e le difese luminale. Qui, la proteina ingerita è riconosciuta dalle APC, cellule specializzate nel riconoscere l'antigene, processarlo e presentarlo ai linfociti T, regolandone l'attivazione: l'attività di questo tipo di cellule è quindi in grado di influenzare quale tipo di risposta immune si svilupperà verso quell'antigene. Tra le diverse APC, le cellule dendritiche (DC) della mucosa hanno il ruolo più determinante. L'attivazione dei linfociti T regolatori è l'ulteriore passo

fondamentale nell'acquisizione della tolleranza orale, dal momento che essi, una volta migrati nei tessuti linfoidei, sono in grado di sopprimere le risposte immunitarie T mediate nei confronti degli antigeni alimentari non nocivi, grazie alla produzione di citochine quali IL-10 e TGF- β [7]. I meccanismi descritti sono quindi alla base dello sviluppo della tolleranza orale verso antigeni non nocivi [8]. Affinché tale processo si svolga in maniera adeguata è necessario l'intervento di numerosi fattori intrinseci ed estrinseci, che contribuiscono a creare un milieu appropriato. Numerosi sono quindi i fattori condizionanti, ed alterazioni a livello di questi possono portare a un fallimento dell'acquisizione della tolleranza alimentare e, quindi, allo sviluppo di allergia alimentare. Tra i fattori legati all'ospite, la suscettibilità genetica è sicuramente da considerarsi implicata nella patogenesi dell'allergia alimentare. Questo è stato dimostrato dalla tendenza all'aggregazione familiare delle allergie alimentari [9], da una certa predilezione razziale [10], e da studi che hanno dimostrato elevata concordanza tra gemelli monozigoti per l'allergia alle arachidi [11]. Tuttavia, solo alcuni studi di genomica sono stati condotti per identificare i geni coinvolti e, sebbene in singoli studi alcuni polimorfismi genetici correlati all'allergia alimentare siano stati riconosciuti, non è detto che questi siano applicabili alla popolazione generale [4]. Sempre tra i fattori legati all'ospite, è stato visto anche come sia importante il ruolo della barriera epiteliale intestinale; questa, come detto, ha un ruolo di difesa fisica nei confronti degli antigeni esogeni, e l'inefficacia di questa barriera potrebbe essere un fattore che porta alla sensibilizzazione. Diversi studi hanno dimostrato che i bambini allergici hanno una maggiore permeabilità intestinale rispetto ai sani, e che tale aumento della permeabilità persiste anche in seguito all'eliminazione dell'alimento dalla dieta [12]. L'epitelio intestinale non riveste solo un ruolo di barriera inattiva, ma in realtà esso sembra giocare anche un ruolo attivo; infatti le cellule epiteliali sono in grado di agire da APC non professionali, che presentano l'antigene ai linfociti T, ma in assenza di molecole co-stimolatorie, determinando l'inibizione del linfocita invece che la sua attivazione. Inoltre l'epitelio produce un mediatore, la linfopietina stromale del timo (TSLP), che sembra stimolare tollerogenicità nelle cellule DC [4]. Tale barriera intestinale può essere meno efficiente o immatura nei lattanti e nei bambini piccoli, predisponendo, così, ad uno sviluppo non appropriato della tolleranza alimentare [6]. Un ulteriore ruolo chiave sulla risposta immunitaria della mucosa gastrointestinale è la

stimolazione microbica da parte della flora batterica intestinale; i batteri colonizzano l'intestino entro poche ore dalla nascita e tale interazione è probabilmente lo stimolo primario per un appropriato sviluppo immunitario postnatale. È stato visto, in studi su modelli murini, che animali germ-free non sviluppavano tolleranza orale [13]; in studi sugli uomini, è stato visto che c'è una differenza tra la flora batterica intestinale negli individui allergici e non allergici [14]. Inoltre, è stato visto che alcuni ceppi batterici, come *Lactobacillus* e *Bifidus*, possono influenzare la funzione immune attraverso diversi meccanismi immunologici [8]. Un altro studio ha dimostrato che la variabilità della microflora intestinale era inversamente correlata con il rischio di sviluppare sensibilizzazione verso allergeni alimentari [15]. Oltre ai fattori legati all'ospite, anche le modalità di esposizione agli antigeni alimentari sembrano giocare un ruolo nello sviluppo della sensibilizzazione o della tolleranza. È possibile che la mancanza di tolleranza orale sia dovuta anche a esposizione per vie alternative, quali la cute o il tratto respiratorio [7]. Questo è suggerito dal fatto che molti bambini manifestano i sintomi di allergia alla prima ingestione nota del cibo; questo fa ipotizzare che ci sia stata una precedente via di esposizione occulta. Infine, sembrano avere un ruolo nell'induzione della tolleranza le dosi e i tempi di introduzione degli alimenti nella dieta. Per quanto riguarda le dosi di esposizione, è stato visto, da modelli animali, che la tolleranza può essere indotta sia da introduzione ripetuta di piccole dosi di alimento, cosa che induce l'attività dei T regolatori, sia da una dose molto elevata anche singola, poiché questo induce anergia dei linfociti T. È ipotizzabile, quindi, che l'esposizione a dosi corrette durante il primo periodo di vita sia importante per l'induzione di una corretta risposta immune verso gli alimenti. Le risposte immunologiche possono essere di diverso tipo: esistono, infatti, forme di allergia IgE mediate e forme non IgE mediate; in alcuni casi, inoltre, entrambi i tipi di meccanismi sono coinvolti. Le forme di allergia IgE mediate sono anche definite come reazioni di ipersensibilità immediata, poiché i sintomi compaiono nell'arco di un breve tempo dall'esposizione all'allergene. La risposta immune che si sviluppa in questo caso è contraddistinta da due successive fasi: la sensibilizzazione e l'elicitazione. La sensibilizzazione allergica prevede che le cellule T, dopo essere state attivate dalla DC, si differenzino in linfociti T-helper 2 (Th2). I Th2 producono citochine quali IL-4, IL-5, IL-13, che stimolano i linfociti B a produrre anticorpi della classe IgE, specifici per il determinato antigene. Queste IgE si

legano al loro recettore ad alta affinità sulla superficie di mastociti e basofili nella cute, nell'intestino, nel tratto respiratorio e nel sistema cardiovascolare, preparando queste cellule a reagire in seguito alla riesposizione all'antigene. La fase di attivazione avviene entro poco tempo dalla riesposizione all'antigene: questo si lega alle IgE di superficie dei mastociti e dei basofili, stimolando la degranolazione delle cellule con rilascio di mediatori dell'infiammazione (tra cui l'istamina) che sono responsabili delle manifestazioni cliniche [4]. Le reazioni allergiche non IgE mediate sono definite da ipersensibilità ritardata, dal momento che i sintomi si manifestano ore dopo l'esposizione all'antigene. I meccanismi immunologici alla base di queste forme rimangono ancora non del tutto chiari; sono stati ipotizzati meccanismi che includono reazioni T-helper 1 mediate, la formazione di immunocomplessi che portano all'attivazione del Complemento, o interazioni tra cellule T mastcellule e neuroni che inducono alterazioni funzionali nell'attività della muscolatura liscia e della motilità intestinale. I meccanismi descritti vedono coinvolti i linfociti T, che tramite la produzione di citochine attivano cellule immuni quali eosinofili, basofili, macrofagi. I macrofagi, stimolati sia dalle citochine sia dagli antigeni alimentari, possono indurre flogosi locale cronica che si sviluppa a livello della mucosa intestinale e porta ad aumento della permeabilità della barriera intestinale, potendo aumentare l'esposizione alle proteine antigeniche. Gli allergeni alimentari sono sostanze di natura proteica, caratterizzate da peso molecolare relativamente basso, inferiore ai 70 kD, grande quantità presente nell'alimento, presenza di residui glicosilati, idrosolubilità, resistenza al calore e alla digestione [3].

1.1 L'allergia al latte vaccino

Il latte vaccino ha una ricca composizione in proteine; alcune sono considerate antigeni maggiori, alcune sono antigeni minori, altre sono state raramente descritte in associazione con l'allergia [16]. Negli individui allergici, è comune la sensibilizzazione verso multipli allergeni del latte. Tra le proteine del latte, quelle maggiormente implicate nella patogenesi delle manifestazioni allergiche sono le caseine, alfa-lattoalbumina (A-LA) e beta-lattoglobulina (BLG); tra le proteine minori, sono state identificate le immunoglobuline bovine e l'albumina sierica bovina [16]. Dato che la composizione del latte dei mammiferi tende a essere simile nelle differenti

specie, è possibile che questi allergeni del latte vaccino diano anche luogo a cross-reattività; cioè una reazione tra un anticorpo, diretto verso un determinato antigene, e un altro antigene, che contiene epitopi (determinanti antigenici) simili. Questo fa sì che i pazienti possano non tollerare anche altri tipi di latte, oltre a quello vaccino. I tipi di latte più simili a quello bovino sono quello di capra e quello di pecora. Il latte di maiale, cammello, e cavallo sarebbero meno simili e quindi più tollerabili, anche se in genere ai pazienti si sconsiglia qualsiasi tipo di latte, a parte quello umano [17]. L'allergia alle proteine del latte vaccino può presentarsi con un'ampia varietà di sintomi, che interessano differenti organi e apparati e che si manifestano in genere nei primi mesi di vita o entro alcune settimane dall'inizio dell'assunzione del latte vaccino; è inoltre possibile che l'allergia si manifesti anche in bambini allattati al seno, se la madre assume latte vaccino nella dieta. Le reazioni allergiche al latte possono essere suddivise in forme immediate, tipicamente IgE mediate, e forme ritardate, in genere non IgE mediate. Le reazioni immediate, si manifestano poco dopo l'ingestione del latte, dai primi minuti fino a un massimo di due ore e le più comuni sono a carico del sistema gastrointestinale (50-60%), cutaneo (50-60%) e respiratorio (20-30%). La gravità dei sintomi è variabile, e spesso le reazioni sono di lieve entità; in ogni caso, sono possibili reazioni severe, fino all'anafilassi potenzialmente letale; il latte vaccino è il terzo alimento più frequente, dopo arachide e frutta in guscio, che può dare anafilassi, che si presenta fino al 9% dei casi [17].

La presentazione clinica delle forme ritardate comprende invece diverse sindromi, sia acute sia croniche, che interessano principalmente il sistema gastrointestinale; anche manifestazioni cutanee e respiratorie sono possibili.

Generalmente la maggior parte dei bambini va incontro, nel corso degli anni, alla spontanea risoluzione della malattia ed è stato dimostrato che le forme IgE mediate abbiano una risoluzione più tardiva rispetto a quelle non IgE mediate [18].

1.1.1 La Diagnosi

Tra le prove diagnostiche per le forme di allergie IgE mediate, comunemente utilizzato come primo step dell'iter diagnostico per l'allergia al latte vaccino, troviamo il prick test cutaneo; test poco costoso e di facile esecuzione. Il test prevede l'utilizzo di un estratto, contenente gli allergeni verso cui si vuole confermare la sensibilizzazione: una

goccia viene posta sull'avambraccio del paziente e fatta penetrare di 1 mm nella cute del paziente tramite una "puntura" (prick) eseguita con una lancetta sterile; eseguendo anche un controllo positivo e uno negativo, rispettivamente con istamina e soluzioni fisiologica. Se il paziente è sensibilizzato, gli allergeni verranno in contatto con le IgE di superficie dei mastociti cutanei, determinando il rilascio locale di istamina e la comparsa sulla cute, entro 10-15 minuti, di un caratteristico pomfo circondato da un alone eritematoso. Se le dimensioni del pomfo sono superiori di almeno 3 mm rispetto al controllo negativo, il test è considerato positivo. Per ottenere un risultato attendibile, il paziente deve aver sospeso l'eventuale terapia con antistaminici per un tempo appropriato. In caso di prick test con estratto alimentare negativo, si può eseguire lo stesso test con l'alimento intero (metodo prick by prick). Altro esame che viene eseguito è il dosaggio delle IgE totali che però non fornisce dati aggiuntivi nella diagnosi di allergia alimentare; il dosaggio è eseguito con tecniche immunoenzimatiche, e le immunoglobuline ricercate sono quelle per alfa-lattoalbumina, beta-lattoglobulina e per caseina. Nonostante l'eccellente sensibilità, è possibile che alcuni pazienti manifestino reazioni allergiche, anche se le IgE non sono identificabili; pertanto, soprattutto se c'è un forte sospetto clinico, anche con IgE negative, un test di provocazione orale con alimenti dovrebbe essere eseguito per confermare l'assenza di allergia [19].

Poiché nelle forme di allergia non IgE mediate, le prove allergiche prima descritte risultano negative, è nata la necessità di valutare l'utilizzo di altri test nella diagnosi di queste forme di allergia alimentare. Un test molto studiato è il patch test cutaneo, che permette di valutare le risposte T-mediate nei confronti di diversi tipi di sensibilizzanti. Questo si esegue posizionando il cibo al di sotto di camere di Finn per 48 ore, per poi rimuovere la camera e valutare le modificazioni cutanee dopo altre 24 ore. Il test potrebbe effettivamente indurre una risposta T mediata che rifletta ciò che accade in corso di reazione non IgE mediata agli alimenti [20]; la mancanza di reagenti standardizzati, di metodi di applicazione univoci e di linee guida per l'interpretazione dei risultati, rendono l'utilizzo di questo test ancora non raccomandabile al di fuori dell'ambito della ricerca. Attualmente il gold standard per la diagnosi di tutte le forme allergia alimentare è il test di provocazione orale con alimenti. Questo tipo di test può essere eseguito sia a scopo diagnostico, sia per confermare che il paziente abbia

acquisito la tolleranza verso un alimento cui era precedentemente allergico. Il test con scopo diagnostico è eseguito tipicamente in tre situazioni [21]: una prima situazione è quella in cui il paziente soffre di patologie allergiche croniche, come sintomi gastrointestinali persistenti, e l'eliminazione di un alimento sospettato porti al miglioramento dei sintomi; in questo caso, il ritorno dei sintomi in seguito a un test di provocazione può confermare la diagnosi. Un secondo caso è quello in cui il paziente manifesti sintomi allergici acuti in seguito all'assunzione di alcuni cibi e la storia clinica e/o test in vitro indicano quali sono gli alimenti sospetti; in questo caso, il test di provocazione permette di confermare quale sia l'alimento implicato. La terza situazione è quella di pazienti in cui sia stata dimostrata una sensibilizzazione verso un alimento, con prick test o con il dosaggio delle IgE specifiche, ma che non hanno mai assunto l'alimento stesso.

Il test di provocazione orale è eseguito somministrando dosi crescenti dell'alimento al paziente, nell'arco di circa due ore. A questo segue un periodo di osservazione clinica, per valutare l'eventuale comparsa di reazioni allergiche. Il test viene interrotto quando il paziente manifesta sintomi (test positivo) o quando, dopo l'ingestione di adeguate quantità di latte e almeno due ore di osservazione clinica, non si sono manifestate reazioni (test negativo) [19]. Poiché la procedura ha un certo rischio, anche se non elevato, di scatenare un evento di anafilassi, il test deve essere eseguito da personale qualificato e in una struttura adeguata per manovre di rianimazione. Com'è stato detto in precedenza, i test cutanei e sierici utilizzati nella diagnosi di allergia alimentare non sono, da soli, sufficientemente accurati nel predire la reattività clinica, nonché la gravità della possibile reazione. Numerosi studi hanno dimostrato che meno del 40% dei pazienti con prick test o IgE positivi hanno un'allergia alimentare dimostrata anche con il test di provocazione orale con alimenti; quest'ultimo, quindi, non può essere escluso dall'iter diagnostico appropriato per allergie alimentari [22]. Il test di provocazione orale con alimenti ha, tuttavia, alcuni svantaggi, quali lunghi tempi di esecuzione, costi più elevati e la possibilità di indurre reazioni allergiche severe e potenzialmente letali. Molti studi hanno visto che, all'aumentare della concentrazione delle IgE specifiche e all'aumentare delle dimensioni del pomfo al prick test, la probabilità di avere una reazione clinica aumenta [23]; in ragione di questo, quindi, hanno investigato la relazione tra i valori di questi test e il test di provocazione in

doppio cieco, per ottenere valori di cut-off al di sopra dei quali la probabilità di reazione clinica sia molto elevata (>95%). Per quanto riguarda le dimensioni del pomfo al prick test cutaneo, Hill et al. riporta un VPP del 100% per dimensioni superiori a 6 mm nei bambini sotto i due anni, e di 8 mm per tutti i bambini [24]. Verstege et al. riporta un VPP del 95% per un diametro superiore a 12,5 mm, oppure per un valore di indice cutaneo (rapporto tra le dimensioni del pomfo dell'estratto dell'allergene e pomfo dell'istamina) di 2.7 [25]. Un più recente studio italiano, invece, ha riscontrato una predittività significativa per un cut-off di 15 mm [26]. Questi studi mostrano limitazioni simili a quelle viste per il dosaggio delle IgE specifiche: i valori di cut-off ottenuti non sono concordanti tra loro, e la popolazione su cui sono stati eseguiti è altamente selezionata. Gli studi sono confrontabili tra loro in quanto sono state utilizzate differenti metodiche di analisi statistica, di esecuzione del prick test, della definizione dei risultati e gli allergeni usati.

Sono stati condotti alcuni studi anche per valutare se il patch test cutaneo potesse essere predittivo di risposta positiva al test di scatenamento; Mehl et al. riporta che la sensibilità e specificità di questo test migliorano se associato al prick test e al dosaggio delle IgE, ma che comunque non è in grado di predire in maniera significativa la reattività clinica [27].

In conclusione, allo stato attuale nessun test cutaneo e sierico usato nella diagnosi di allergia alle proteine del latte vaccino sembra in grado di predire in maniera accurata la reattività clinica del paziente con sospetta allergia. Questo conferma che, tuttora, il test di scatenamento alimentare deve essere considerato il gold standard per la diagnosi di allergia alle proteine del latte vaccino e che non dovrebbe mai mancare nell'iter diagnostico per tale patologia, onde evitare casi di sovra diagnosi che porterebbero a sottoporre i pazienti a diete di esclusione non necessarie, se non addirittura dannose per la sua salute.

OBIETTIVI DELLO STUDIO

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di applicare l'analisi metabolomica basata sulla spettrometria di massa nell'identificazione di profili metabolici urinari predittivi di risposta al test di provocazione orale con latte in bambini affetti da allergia alle proteine del latte vaccino e in dieta di esclusione per tale alimento.

Nello specifico, scopi principali della presente tesi sono stati:

1. Applicare un approccio innovativo nella predizione della risposta al test di provocazione orale con alimenti;
2. Valutare se l'analisi metabolomica è in grado di discriminare tra bambini con risposta positiva al test di provocazione orale e bambini con risposta negativa al test mediante il confronto dei profili metabolici basali.

MATERIALI E METODI

1. Disegno dello studio

Lo studio è stato condotto presso l'Unità di Allergologia e Pneumologia Pediatrica del Dipartimento della salute della Donna e del Bambino dell'Azienda Ospedaliera – Università degli studi di Padova. Lo studio è stato approvato dal comitato etico dell'Azienda Ospedaliera di Padova (Protocollo 2347P).

Sono stati reclutati 30 bambini, di cui 19 maschi e 11 femmine, di età media pari a 4 anni affetti da allergia alle proteine del latte vaccino IgE mediata, per i quali vi era indicazione clinica all'esecuzione del test di provocazione orale con latte vaccino. Tutti i pazienti seguivano una dieta di esclusione per latte vaccino, con durata media della dieta di 3,7 anni.

I pazienti sono stati sottoposti a test di provocazione orale con latte e in base all'esito del test, sono stati suddivisi in due gruppi: pazienti con risposta positiva (15 bambini) e i pazienti con risposta negativa (15 bambini).

Si tratta di uno studio prospettico nel quale i pazienti reclutati sono stati sottoposti a test di provocazione orale con latte, eseguito secondo procedura standardizzata. Il

risultato di tale test è stato successivamente messo in relazione con le caratteristiche metaboliche basali.

Di ogni paziente sono stati rilevati i dati anamnestici (con particolare riferimento alla durata della dieta di esclusione, familiarità per allergia, storia clinica positiva per anafilassi, dermatite atopica, asma, rinite allergica); sono stati inoltre valutati i valori di IgE specifiche e dei prick test cutanei per le proteine del latte vaccino eseguiti nell'ultimo anno.

Un campione di urina è stato raccolto prima dell'esecuzione del test di provocazione; i campioni sono stati in seguito sottoposti ad analisi metabolomica in spettrometria di massa interfacciata con la cromatografia liquida (UPLC), condotta presso il Laboratorio di Spettrometria di Massa del Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino dell'Azienda Ospedaliera - Università degli studi di Padova.

1.1 Il test di provocazione orale con latte

Il test di provocazione orale è stato eseguito sotto controllo medico, in modo standardizzato ed in ambiente protetto. Ai genitori sono state fornite informazioni scritte relative alla procedura; essi hanno poi firmato il consenso informato.

I bambini dovevano essere in dieta di eliminazione per il latte; la terapia farmacologica doveva essere stata sospesa da almeno 7 giorni per gli antistaminici, almeno 4 settimane per i cortisonici, almeno 12 ore per i broncodilatatori. Prima dell'esecuzione del test, i bambini sono stati sottoposti a esame obiettivo preliminare per escludere a presenza di patologie acute in atto.

Il test è stato condotto alla presenza di personale addestrato per l'emergenza; sono stati predisposti i farmaci per l'emergenza (adrenalina, antistaminici, cortisonici) predosati in base al peso del paziente. A tutti i pazienti è stato posto un accesso venoso. Al momento dell'inizio del test (ore 8,30) i bambini dovevano essere a digiuno da almeno 4 ore. Il test è stato eseguito somministrando dosi crescenti di proteine del latte vaccino a intervalli di 15-20 minuti.

La risposta del test è stata valutata in base alle reazioni cliniche sviluppate dal paziente. La risposta positiva al test è stata definita come comparsa immediata (entro due ore dalla somministrazione) di reazione allergica generalizzata in seguito all'assunzione del latte; tali reazioni comprendono sintomi cutanei (orticaria, angioedema), respiratori

(tosse rinorrea, starnuti, broncospasmo), gastrointestinali (prurito alla lingua, algie addominali, vomito). La risposta negativa è stata definita come assenza di comparsa dei sintomi durante tutto il periodo di osservazione clinica.

2. Analisi dei metaboliti urinari mediante spettrometria di massa accoppiata a cromatografia UPLC.

2.1 Strumentazione e materiali

L'analisi dei campioni urinari è stata eseguita tramite uno spettrometro di massa Q-Tof (Synapt G2; Waters) ad alta risoluzione interfacciato con un sistema cromatografico UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) (Waters) caratterizzato da un'elevata risoluzione cromatografica e da un breve tempo analitico. 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.

2.2 Preparazione dei campioni

Dopo la raccolta, le urine sono state aliquotate in provette in polipropilene da 3 mL prima lavate in Metanolo per evitare possibili contaminazioni, e poi congelate a -80° C. Per procedere all'analisi si è prelevata un'aliquota da 150 µL di ciascun campione, trasferita in provette da 1,5 mL e centrifugata a 16000 g per 10 minuti, al fine di precipitare le sostanze insolubili presenti nelle urine.

Per l'analisi con colonna cromatografica a fase inversa HSS T3, 100 µL di surnatante sono stati trasferiti in vial di vetro (Waters), e diluiti 1:5 con una soluzione di H₂O + 0,1 % di Acido Formico (FA). I 100µL di campione per l'analisi con colonna cromatografica BEH HILIC sono stati invece diluiti 1:5 con una soluzione di Acetonitrile + 0,1 % di acido formico. Il campione viene poi posto per 15 minuti a -20°C e centrifugato a 16000 g per 10 minuti per separare l'eventuale deposito dovuto all'utilizzo dell'acetonitrile. Il surnatante è stato quindi trasferito in vial di vetro per l'analisi in cromatografia.

2.3 Analisi cromatografica e spettroscopica

I campioni sono stati analizzati utilizzando due diversi tipi di colonne cromatografiche in grado di trattenere e separare uno spettro più ampio di metaboliti a seconda della loro diversa idrofilicità e idrofobicità. Per ciascuna colonna sono state impiegate due diverse modalità di ionizzazione (in positivo e in negativo). Nel complesso i campioni sono stati studiati con 4 differenti modalità analitiche. È stata utilizzata una colonna a fase stazionaria apolare, definita anche a fase inversa, ACQUITY HSS T3 (Waters co., Milford, MA USA) con particelle di 1.8 μm , diametro di 2.1 mm e lunghezza di 100 mm. Gli eluenti utilizzati per l'analisi sono stati: A, H₂O + 0,1% di Acido Formico e B, Metanolo: Acetonitrile 90:10 + 0,1 % Acido Formico. 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 $\mu\text{L}/\text{min}$. E' stata poi utilizzata una colonna a fase polare ACQUITY BEH HILIC (Waters co., Milford, MA USA) con particelle di 1.7 μm , diametro di 2.1 mm e lunghezza di 100 mm. Gli eluenti utilizzati per l'analisi sono stati: A, acetato di ammonio 10 mM in acqua + 0,1% acido formico e B, acetato di ammonio 1 mM 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 minuti 60%; 6.01 minuti 5%, 11 minuti 99% ad un flusso di 500 $\mu\text{L}/\text{min}$.

La colonna per entrambe le analisi è stata mantenuta alla temperatura di 40°C.

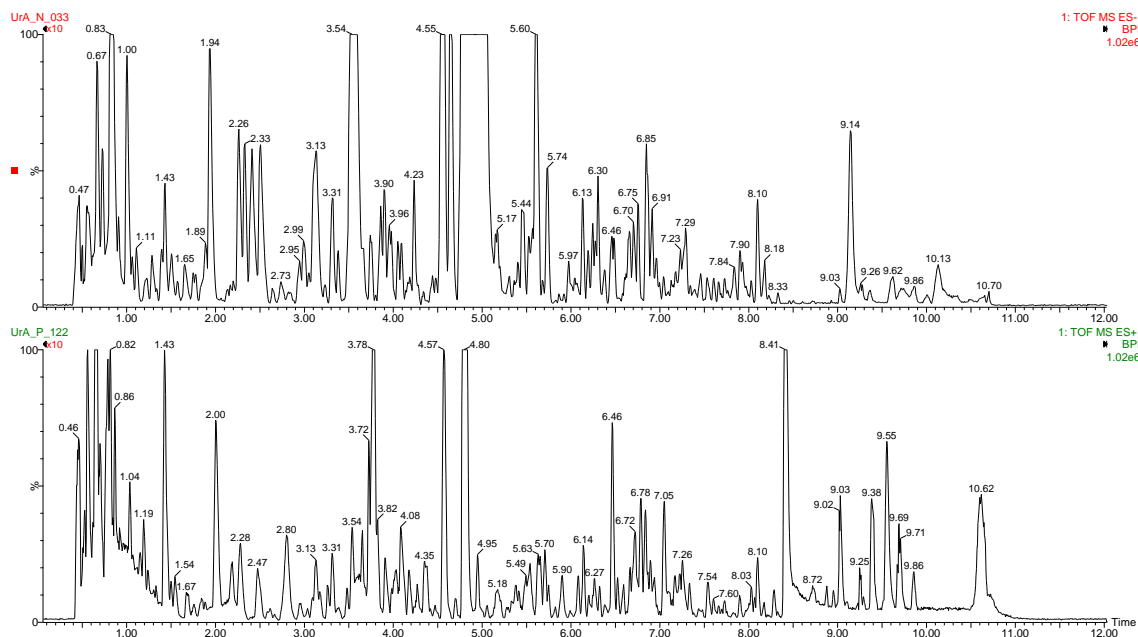


Fig.1: Profili cromatografici (amplificati 10 volte) dello stesso campione di urine acquisiti mediante colonna analitica HSS T3 nella polarità negativa (a) e positiva(b)

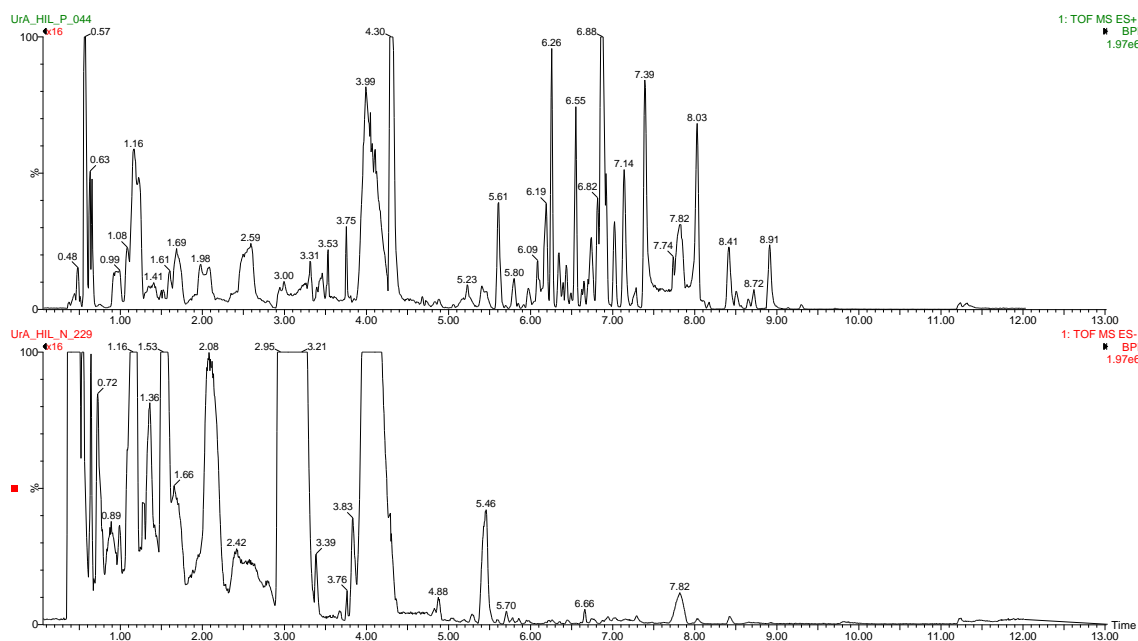


Fig. 2: Profili cromatografici (amplificati 16 volte) dello stesso campione di urina acquisiti mediante colonna analitica BEH HILIC nella polarità negativa (a) e positiva (b)

L'analisi MS è stata eseguita con spettrometro di massa ad alta risoluzione ed elevata sensibilità (Q-ToF), in grado di separare i metaboliti sulla base della loro massa esatta al fine di identificare in modo univoco i diversi composti. La ionizzazione dei composti è ottenuta con una sorgente del tipo Electrospray (ESI) e le analisi sono state effettuate sia in ionizzazione positiva (ESI+) che negativa (ESI-). Il voltaggio del capillare della sorgente è stato settato a 3 kV, la temperatura a 110 °C e il flusso di desolvatazione dell'azoto 600 L/Hr. La scansione è stata eseguita in un range di massa da 20 a 1200 amu.

2.4 Controllo di qualità

Tutti i campioni sono stati iniettati in triplicato in tre sequenze casuali al fine di evitare qualsiasi effetto sulla classificazione dovuto alle condizioni analitiche.

Per verificare la riproducibilità analitica, insieme ai campioni sono stati analizzati anche dei controlli di qualità (QC) ottenuti dalla miscela di un'aliquota (20µL) di ciascun campione. Sono stati inoltre inseriti dei bianchi costituiti solo da solvente per monitorare possibili contaminazioni e una soluzione di standard costituita da composti a massa nota (Sulfadimethoxine, Val-Tyr-Val, Leucine-Enkephalin, Erythromycin e Caffeine) per verificare l'accuratezza della massa e la risposta strumentale nel tempo d'analisi delle sequenze.

2.5 Estrazione dei dati

L'estrazione dei dati è stata eseguita mediante l'analisi dei cromatogrammi utilizzando il software MarkerLynx (Waters co., Milford, MA USA). I parametri di ottimizzazione dell'estrazione dati sono stati individuati mediante l'analisi preliminare dei QC. Dopo l'estrazione dei dati in matrice è stata eseguita un'elaborazione, mediante l'analisi statistica multivariata, per verificare la possibilità di costruire modelli statistici robusti in grado di discriminare i gruppi in studio.

3. Analisi Statistica

3.1 Dati LC/MS

I dati ottenuti dall'analisi LC-MS sono stati elaborati con il software MarkerLynx al fine di ottenere 4 differenti data set delle variabili identificate, ciascuno corrispondente ad una delle analisi compiute con le 4 differenti modalità di separazione cromatografica (derivanti dall'uso combinato di 2 modalità di ionizzazione e due diversi tipi di colonne cromatografiche).

Le variabili estratte sono state normalizzate sulla somma totale delle variabili.

Ciascun data set è stato filtrato al fine di eliminare le variabili potenzialmente non interessanti da un punto di vista dell'analisi dei dati e che potrebbero compromettere la robustezza del modello. In particolare sono stati applicati tre diversi filtri in successione che di seguito sono descritti:

- filtro A, rimuove tutte le variabili misurate che hanno un numero di elementi non determinanti per entrambe le classi superiore alla soglia M fissata ($M=0.5$);
- filtro B: trova la variabile misurata x con il massimo quadrato della correlazione rispetto al responso che specifica la classe ed elimina tutte le variabili misurate che hanno con x una correlazione del quadrato superiore alla soglia M fissata ($M=0.9$); ripete il filtraggio sulle variabili rimaste dopo aver incluso x nel data set filtrato; il filtraggio termina quando il massimo quadrato della correlazione è inferiore alla soglia M fissata ($M=0.1$);
- filtro C: calcola per ogni variabile misurata il limite inferiore al 95% di AUC per la ROC analysis ed elimina le variabili per le quali tale limite è inferiore a 0.5.

Le variabili ottenute sono state trattate con scaling tipo "Pareto" e centratura sulla media.

Per la descrizione dei data set è stato costruito un modello PCA (Principal Component Analysis). La PCA è una metodica proiettiva *unsupervised*, che consente di ottenere delle variabili latenti, o Componenti Principali, che permettono di descrivere la variabilità tra i campioni. La PCA semplifica l'informazione contenuta nella matrice di dati originali, consentendo di esplorare la distribuzione e la similarità tra i profili metabolici dei campioni in analisi ed evidenziare la presenza di raggruppamenti. Sono stati poi costruiti per ogni singolo data set dei modelli di classificazione PLS – DA

(Partial Least Square – Discriminant Analysis) e OPLS – DA (Orthogonal Latent Structure – Discriminant Analysis); tali metodiche *supervised* (guidate cioè dalla conoscenza a priori della classificazione dei campioni) consentono di creare modelli di classificazione che permettono di evidenziare con maggiore chiarezza quale parte dell'informazione sperimentale è più utile nella discriminazione tra due differenti gruppi. Nell'analisi OPLS, in particolare, tale informazione è riassunta in un limitato numero di score predittivi che risultano da un'appropriata combinazione delle variabili misurate. Frequentemente il modello ottenuto è interpretabile in termini di singole variabili, detti marcatori putativi, che caratterizzano uno specifico gruppo rispetto a un altro. Per confermare la validità dei modelli ed escludere che siano frutto di associazioni casuali, è stato applicato il test di permutazione sui responsi.

3.2 Dati clinici ed anamnestici

I dati clinici (durata della dieta di eliminazione, dosaggio IgE specifiche per le proteine del latte vaccino e misura dei prick test) hanno dimostrato distribuzione non normale, per cui sono stati espressi come mediana e range interquartile (IQR) e sono stati confrontati mediante test non parametrici (Test – U di Mann Whitney). I dati anamnestici (presenza di familiarità per allergia, storia personale di altre allergie alimentari, asma, rinite allergica, dermatite atopica, anafilassi) sono stati espressi come percentuale e confrontati mediante il *Bartlett's test for homogeneity of variance*. I risultati sono stati considerati significativi per $p < 0.05$.

RISULTATI

1. Test di provocazione orale con latte

15 bambini hanno sviluppato reazione positiva al test di provocazione orale con latte, intesa come comparsa di reazioni allergiche immediate in seguito all'assunzione di dosi cumulative dell'alimento. Le reazioni allergiche si sono manifestate dopo un tempo compreso tra un minuto e due ore dall'assunzione della prima dose, per dosi cumulative di proteine del latte comprese tra 0,1 e 6 grammi. I sintomi manifestati dai bambini erano di tipo cutaneo (orticaria, angioedema), gastrointestinale (prurito orale, algie addominali, vomito), respiratorio (prurito al naso, tosse, starnuti, broncospasmo). Tutti i pazienti eccetto uno hanno necessitato una terapia farmacologica. I bambini sono stati tenuti sotto osservazione clinica per almeno altre due ore.

15 bambini hanno avuto reazione negativa al test di provocazione con latte: hanno tollerato una dose cumulativa di proteine del latte vaccino pari a 8 grammi, somministrata nell'arco di due ore, senza manifestare sintomi allergici per tutta la durata della somministrazione e per le due successive ore di osservazione clinica.

2. Dati LC /MS

2.1 Filtraggio

Si sono ottenuti 4 differenti data set, ciascuno corrispondente ad una delle analisi compiute con le 4 differenti modalità di separazione cromatografica. Le variabili estratte sono state normalizzate sulla somma totale delle variabili. I 4 data set avevano le caratteristiche seguenti (tabella 1) dove N è il numero di variabili di tipo tempo x massa registrate utilizzando una soglia σ di 500 o di 300 in fase di estrazione dei dati.

Tabella 1. Caratteristiche dei data set costruiti

		filtro A	filtro B	filtro C
data set	N	N	N	N
HILIC neg 500	8287	4050	224	88
HILIC pos 500	3510	2035	105	38
T3 neg 1000	5939	3852	171	71
T3 pos 1000	5655	3466	234	116

Ciascun data set è stato filtrato al fine di eliminare le variabili potenzialmente non interessanti da un punto di vista dell'analisi dati e che potrebbero compromettere la robustezza del modello. In particolare sono stati applicati tre diversi filtri in successione (in tabella 1 N indica le variabili rimaste dopo il filtraggio). Si può notare come i data set ottenuti dopo il filtraggio contengano un limitato numero di variabili rispetto ai data set iniziali (sono rimaste circa solo 1-2% delle variabili iniziali).

2.2 Analisi preliminare con PCA

Per esplorare la distribuzione dei campioni e valutare la presenza di raggruppamenti, è stato costruito un modello PCA sulle medie dei dati in triplicato dei singoli campioni. In figura 7 è riportato il grafico tridimensionale costruito sulla base delle componenti 1, 2 e 3; che permette di spiegare oltre il 25% della variabilità totale.

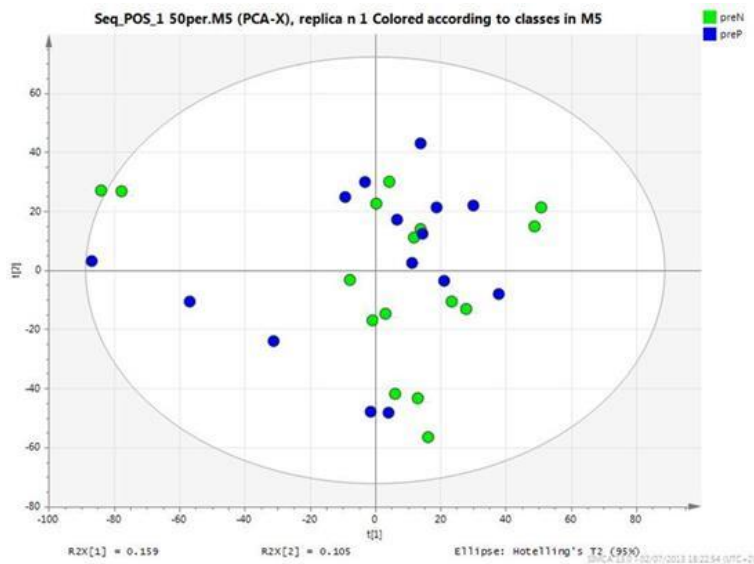


Fig. 3 Modello PCA (unsupervised) tramite l'analisi statistica multivariata con la rappresentazione delle tre componenti principali per la classificazione dei due gruppi in studio

Il grafico mostra che i due gruppi di soggetti in esame sono distinti. Inoltre, l'analisi PCA non ha identificato strong outliers.

2.3 PLS-DA

L'analisi PLS-DA ha fornito ulteriori informazioni sulla separazione tra i due gruppi di studio. È stato possibile costruire dei buoni modelli per la discriminazione dei due gruppi di studio. Il grafico in figura 8 mostra come i due gruppi siano ben separati.

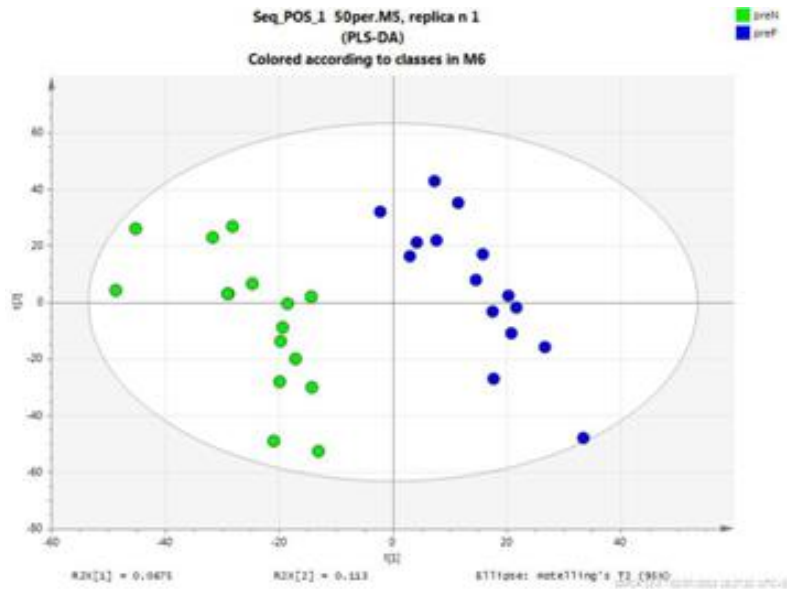


Fig. 4 Modello PLS-DA (supervised) tramite l'analisi statistica multivariata con la rappresentazione delle due componenti principali per la classificazione dei due gruppi in studio

Per dimostrare che la differenziazione tra i gruppi messa in evidenza dall'analisi PLS non sia frutto di associazioni casuali fra le variabili, è stato applicato un test di permutazione sui responsi. Tale test crea associazioni casuali tra variabili per dimostrare che non corrispondano al modello costruito. Il test di permutazione, effettuato sia per il gruppo dei pazienti con risposta positiva che per quelli con risposta negativa al test, ha dimostrato che il modello non è casuale (il parametro Q2 ha infatti valori negativi, Fig.5); la separazione tra i due gruppi è quindi effettiva.

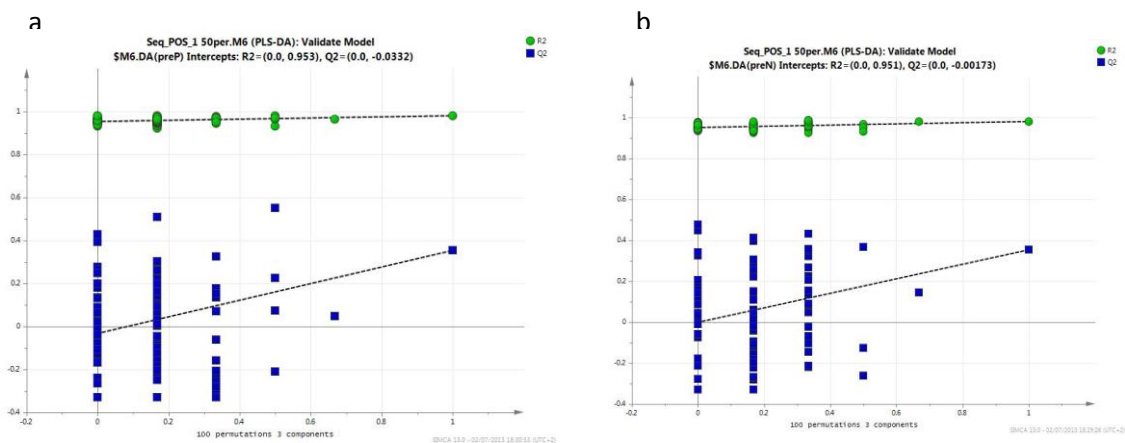


Fig. 5: Test di permutazione per i gruppi (a) preP e (b) preN

2.4 OPL-DA

I data set filtrati sono stati singolarmente utilizzati per costruire modelli di classificazione di tipo OPLS-DA applicando uno scaling di tipo Pareto e la centratura sulla media ai dati.

Con l'applicazione dell'analisi OPLS-DA è stato possibile costruire per ciascun data set un modello robusto in grado di discriminare tra i due gruppi in esame, cioè tra i pazienti con risposta positiva al test di provocazione orale e i pazienti con test di provocazione negativo. Come è mostrato in figura 10, i due gruppi risultano ben distinti.

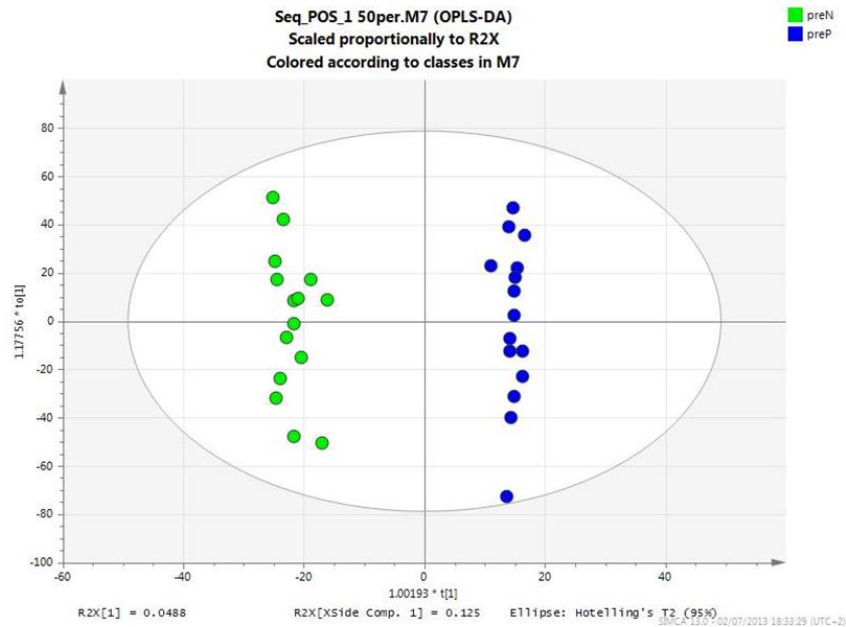


Fig. 6 Modello OPLS-DA (supervised) tramite l'analisi statistica multivariata con la rappresentazione delle due componenti principali per la classificazione dei due gruppi in studio

In tabella 2 si riportano le caratteristiche dei modelli ottenuti.

Tabella 2 Caratteristiche dei modelli OPLS-DA ottenuti

data set	A	R2	Q2
HILIC neg 500	1	0.82	0.73
HILIC pos 500	1+1	0.87	0.65
T3 neg 1000	1	0.80	0.71
T3 pos 1000	1	0.79	0.72
selected markers	1+1	0.81	0.69

Ciascuno dei modelli presentati in tabella 2 sembra quindi essere promettente in predizione. Tutti i modelli risultano avere caratteristiche simili fra loro; si può però notare come il parametro Q2 (che indica l'accuratezza del modello nel predire l'appartenenza a uno dei due gruppi) abbia il valore più alto nel modello costruito sulla base del data set HILIC neg 500. La possibilità di creare modelli robusti di predizione in grado di discriminare tra i pazienti con risposta positiva al test da quelli con risposta

negativa ha dimostrato che l'analisi permette di identificare un pattern metabolico in grado di predire la risposta al test di provocazione alimentare.

2.5 Identificazione delle variabili significative

Una volta creati i modelli OPLS – DA, è stato possibile procedere con l'identificazione, nel contesto del profilo metabolico caratterizzante i due gruppi, delle variabili di maggiore rilevanza nella discriminazione tra i gruppi stessi.

L'analisi dei singoli modelli OPLS-DA ha permesso di identificare 14 variabili in grado di differenziare tra i due gruppi. Di queste, 9 caratterizzano il profilo metabolico del gruppo di bambini con risposta positiva al test di provocazione orale, e 7 sono invece caratteristiche del profilo metabolico dei bambini con risposta negativa al test.

In tabella 3 sono riportate le variabili più caratterizzanti evidenziate dall'analisi dei modelli OPLS-DA e che meriterebbero un'ulteriore indagine (tabella 3). Nelle figure da 11 a 14 sono invece messi a confronto i profili cromatografici e i relativi spettri delle 4 variabili in un paziente del gruppo dei positivi ed uno del gruppo dei negativi, per mostrare come siano differenti.

Tabella 3: Marcatori putativi e le loro caratteristiche

ID	data set	RT	m/z	p-value Mann-Whitney test	p-value t-test	beta (0.05)	CI 95% AUC
1	HILIC neg 500	3.5018	1193.3547	0.001	0.0002	0.01	0.76-1.00
5	HILIC pos 500	0.83	379.2122	0.005	0.015	0.25	0.68-1.00
10	T3 neg 1000	7.5423	228.1601	0.003	0.036	0.42	0.70-1.00
13	T3 pos 1000	6.1051	257.0478	0.00007	0.0005	0.02	0.94-1.00

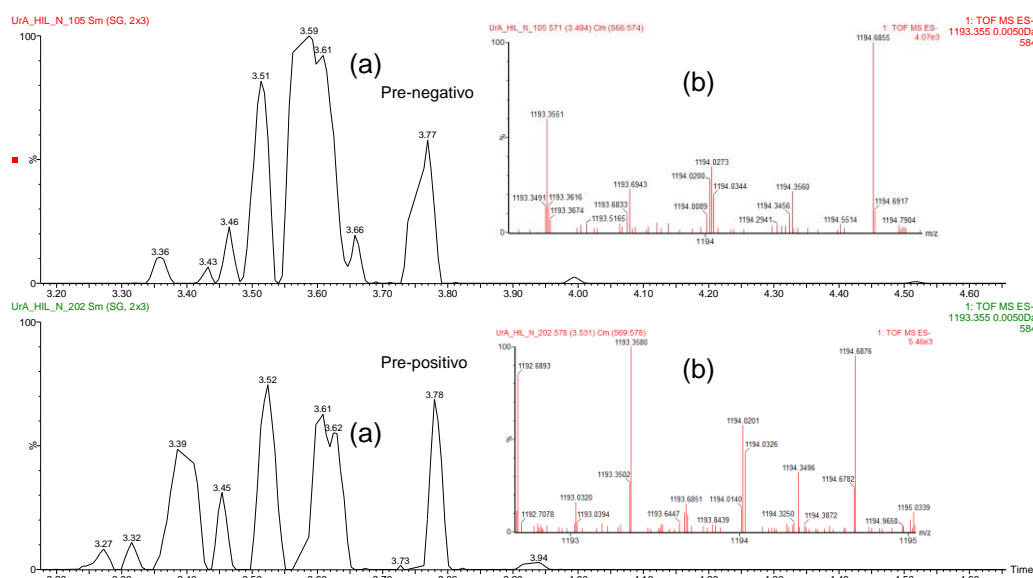


Fig. 7: (a) profilo cromatografico dello ione 1193.3550 m/z e (b) spettri in scansione dei picchi di interesse acquisiti con colonna analitica BEH HILIC in polarità negativa di due campioni di urine (pre-positivo e pre-negativo).

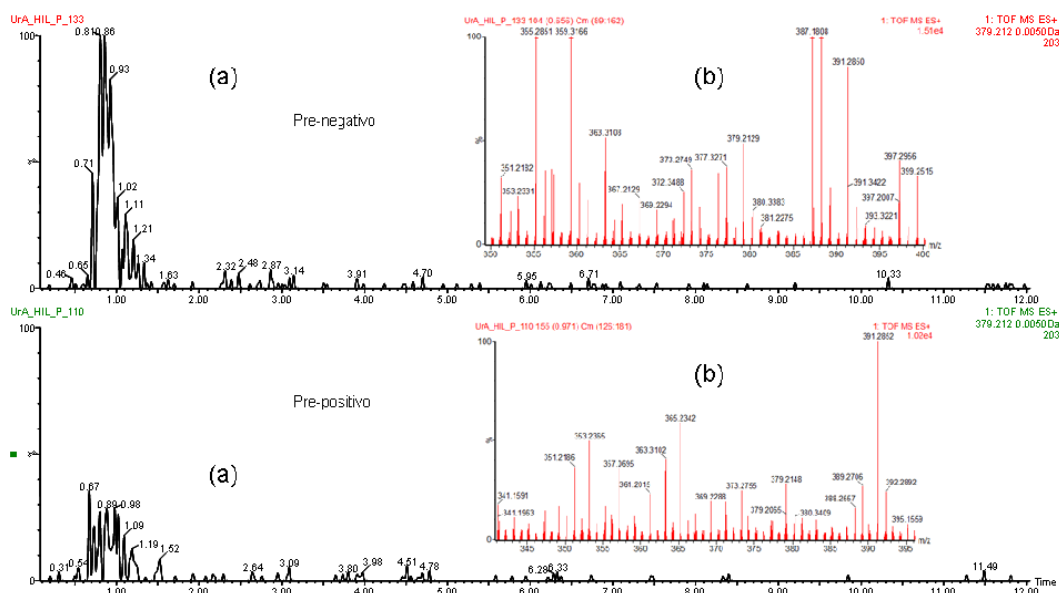


Fig. 8: (a) profilo cromatografico dello ione 379.2122 m/z e (b) spettri in scansione dei picchi di interesse acquisiti con colonna analitica BEH HILIC in polarità positiva di due campioni di urine (pre-positivo e pre-negativo).

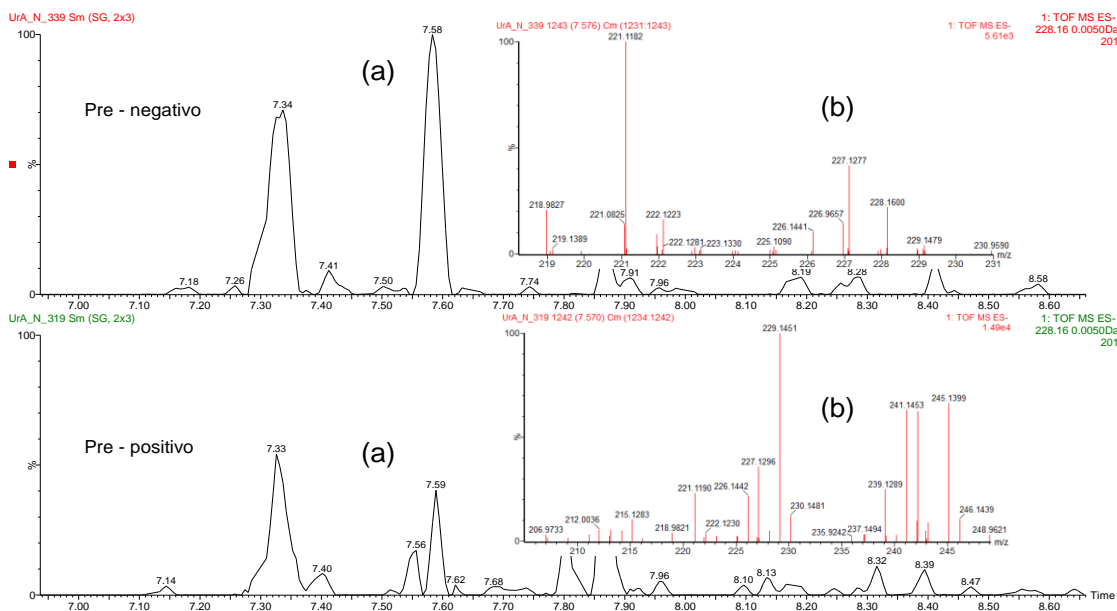


Fig. 9: (a) profilo cromatografico dello ione 228.1601.m/z e (b) spettri in scansione dei picchi di interesse con colonna HSS T3 in polarità negativa di due campioni di urine (pre-positivo e pre-negativo).

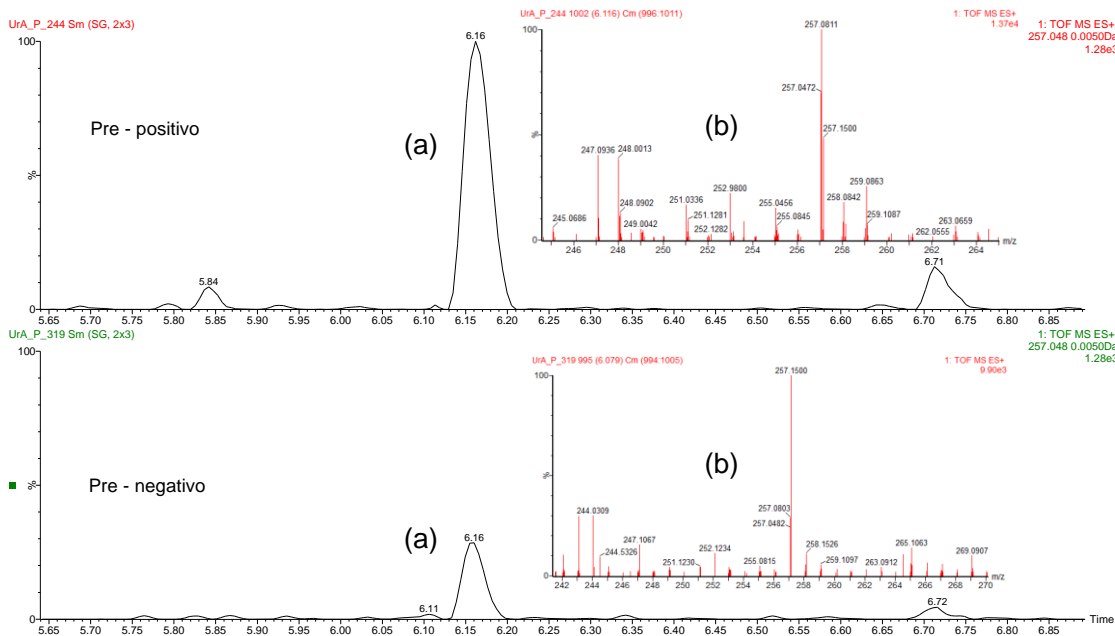


Fig. 10: (a) profilo cromatografico dello ione 257.0480 m/z e (b) spettri in scansione dei picchi di interesse acquisiti con colonna analitica HSS T3 in polarità positiva di due campioni di urine (pre-positivo e pre-negativo).

2.6 Albero decisionale

Le variabili riportate in tabella 3 con l'identificativo ID 10 e ID 13 possono essere utilizzate per costruire l'albero di decisione che segue (l'albero è stato ottenuto mediante l'algoritmo J48.)

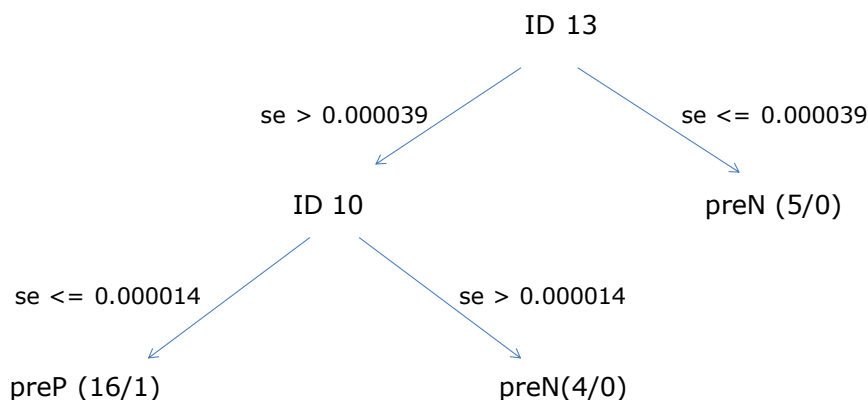


Fig. 11 Albero decisionale

In calcolo l'albero di decisione ha portato a un errore mentre in cross-validazione con 7 gruppi gli errori commessi sono risultati 2.

DISCUSSIONE

In questo lavoro è stato utilizzato per la prima volta l'approccio metabolomico nella ricerca di biomarcatori predittivi di risposta al test di provocazione orale con alimenti, in bambini affetti da allergia alle proteine del latte vaccino e in dieta di esclusione per questo alimento. Lo studio ha messo in luce come con l'analisi metabolomica su campioni urinari raccolti prima dell'esecuzione del test di provocazione orale, si possano ottenere dei profili metabolici (pre-test) caratteristici per quei bambini che svilupperanno risposta positiva al test di provocazione orale (quindi una reazione allergica generalizzata all'introduzione del latte) rispetto a quelli con test negativo (che hanno quindi sviluppato tolleranza all'alimento). Il risultato dello studio è quindi particolarmente promettente, in quanto apre la strada alla possibilità di individuare i bambini a rischio di avere una risposta positiva al test di provocazione con latte evitando di sottoporre al test bambini con elevato rischio di sviluppare una reazione allergica generalizzata.

Il test di provocazione orale è stato eseguito somministrando a bambini allergici al latte e in dieta di esclusione per tale alimento dosi crescenti di latte, monitorando i sintomi del paziente; il test è eseguito in ambiente protetto, sotto stretto controllo medico (sono garantiti un accesso vascolare e farmaci da somministrare in emergenza). Il test di provocazione orale è attualmente considerato il gold standard per la diagnosi di allergia alimentare; altri test diagnostici per allergia, come misurazione delle IgE specifiche e prick test, sono di fatto troppo poco sensibili, potendo solo dimostrare la sensibilizzazione di un individuo verso un alimento, senza poter predire se questo svilupperà manifestazioni cliniche. Inoltre, questi test non sono utili nel monitorare il decorso della malattia; l'allergia alimentare ha generalmente una buona prognosi, visto che il 70 - 80% dei bambini sviluppa tolleranza attorno al terzo o quarto anno di vita; tuttavia, dal momento che non esistono marcatori clinici di acquisita tolleranza, per dimostrarla si deve ricorrere al test di provocazione orale. Questo test è quindi di estrema utilità, ma presenta anche diversi svantaggi: è stressante per il paziente, lungo da eseguire ed espone il paziente al rischio di sviluppare reazioni allergiche severe, come l'anafilassi.

L'analisi metabolomica, che si è dimostrato avere promettenti applicazioni in campo medico, permette di identificare e quantificare un ampio numero di metaboliti presenti in un campione biologico, e di ricercare elementi caratterizzanti utili alla discriminazione tra i gruppi posti a confronto. L'analisi biochimica tradizionale si è sempre focalizzata sullo studio di singoli metaboliti, o di piccoli gruppi di essi, con indagini guidate dalle precedenti conoscenze e mirate allo studio di specifici elementi facenti parte di una certa via metabolica. La metabolomica, applicando un approccio olistico, permette lo studio globale e non basato su ipotesi a priori dei metaboliti: con l'applicazione di metodiche spettroscopiche, è infatti possibile analizzare simultaneamente un numero molto elevato di metaboliti presenti in un determinato campione biologico; si ottiene, così, la caratterizzazione dell'intero profilo metabolico del campione in esame. Ai profili metabolici ottenuti con l'analisi spettroscopica si applicano appropriate tecniche di analisi statistica multivariata, le quali identificano quei metaboliti o pattern di metaboliti che sono in grado di differenziare diversi gruppi sperimentali.

In questo studio, l'analisi metabolomica è stata applicata per la caratterizzazione del profilo metabolico urinario basale (relativo cioè a campioni urine raccolti prima

dell'esecuzione del test) in pazienti affetti da allergia IgE mediata alle proteine del latte vaccino che avevano indicazione clinica all'esecuzione di test di provocazione orale con il latte. Tutti questi bambini erano in dieta priva di latte per pregressa reazione allergica all'introduzione di questo alimento; la durata media della dieta di esclusione era di 3,7 anni. Scopo dello studio è stato valutare l'esistenza di un pattern metabolico in grado di discriminare i bambini che hanno una risposta positiva al test di provocazione orale da quelli che hanno una risposta negativa, consentendo la predizione della risposta al test in base alle caratteristiche metaboliche basali.

Dopo opportuno filtraggio, le variabili residue sono state studiate mediante analisi statistica multivariata che ha consentito, per ciascun data set, la creazione di un robusto modello OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Square Analysis) che è risultato in grado di discriminare i soggetti con test di provocazione orale positivo da quelli con test negativo. In particolare tutti e 4 i modelli OPLS-DA creati hanno dimostrato buoni valori di Q², parametro che indica la capacità predittiva del modello.

E' emerso il ruolo 14 variabili, di cui 9 in grado di caratterizzare il profilo metabolico del gruppo di bambini con test di provocazione positivo e 7 caratteristiche del profilo dei bambini con test negativo; tra queste, 4 hanno dimostrato il maggior potere discriminante (tabella 3). L'esatta natura chimico-fisica e il ruolo fisiopatologico di queste variabili non sono ancora stati completamente chiariti. Infatti, il confronto tra le caratteristiche di massa e tempo di ritenzione di tali molecole e quelle presenti nei database disponibili online (HMDB, METLIN) non hanno consentito di ipotizzare l'esatta natura di tali molecole. Questo aspetto fa parte delle caratteristiche intrinseche all'approccio metabolomico, che per sua natura può portare a mettere in luce nella caratterizzazione di una certa condizione patologica, il ruolo di metaboliti inaspettati e talvolta sconosciuti. Tuttavia, anche a prescindere dalla completa identificazione dei metaboliti coinvolti, il dato rilevante è rappresentato dall'esistenza di un "fingerprinting" metabolico in grado di individuare preventivamente i soggetti con maggiori probabilità di avere una risposta positiva al test di provocazione orale. E la validità dei modelli creati è confermata anche dal fatto che la costruzione di un albero decisionale basato sulle principali variabili identificate, consente la corretta predizione della risposta al test in tutti i soggetti coinvolti eccetto uno.

Fino ad ora, numerosi studi si sono focalizzati sulla ricerca di marcatori in grado di

predire la risposta al test di provocazione orale, focalizzandosi in particolare sul potenziale significato predittivo dei valori delle IgE specifiche e del prick test cutaneo. Tuttavia, questi studi hanno portato a risultati non completamente soddisfacenti, ed hanno evidenziato, in particolare, la difficoltà di stabilire un preciso cut-off per IgE e prick test in grado di predire risposta al test di provocazione orale ed applicabili nella pratica clinica[28, 29].

CONCLUSIONI

In conclusione, i risultati di questo studio dimostrano che l'analisi metabolomica è in grado di identificare profili metabolici urinari in grado di predire la risposta al test di provocazione orale con latte in bambini affetti da allergia alle proteine del latte vaccino. Applicando questo tipo di analisi allo studio di campioni urinari basali, è infatti possibile identificare un pattern metabolico in grado di discriminare tra i bambini che presenteranno risposta positiva al test di provocazione orale e quelli che presenteranno risposta negativa. Le variabili emerse come discriminanti tra i due gruppi non sono ancora state identificate dal punto di vista strutturale.

Considerando che, fino ad ora, la ricerca di singoli marcatori (quali il livello di IgE o il diametro del pomfo al prick test) predittivi di risposta al test di provocazione non ha portato ad esiti del tutto soddisfacenti, si può sottolineare come il nostro studio, basato sull'analisi metabolomica, rappresenti un significativo passo in avanti.

Il risultato dello studio è quindi particolarmente promettente, in quanto apre la strada alla possibilità di individuare i bambini a rischio di avere una risposta positiva al test di provocazione, consentendo quindi di evitare il test in bambini con elevato rischio di sviluppare reazione allergica generalizzata. La prospettiva futura è, quindi, che la metabolomica assuma rilievo nella pratica clinica, entrando a far parte dell'iter diagnostico dell'allergia alle proteine del latte vaccino.

BIBLIOGRAFIA

1. Scarpellini E., Tack J.: Food Allergy, from diagnosis to treatment. *Dig Dis* 2012;30:224–231.
2. Fiocchi A., Brozek J., Schunemann H., Bahna S.L., Von Berg A., Beyer K., et al. World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines. *Pediatr Allergy Immunol* 2010;21 Suppl 21:1-125.
3. Vickery B.P., Chin S., Wesley Burks A. Pathophysiology of Food Allergy. *Pediatr Clin North Am.* 2011 April; 58(2): 363–376.
4. Chin S., Vickery B.P. Pathogenesis of Food Allergy in the Pediatric Patient. *Curr Allergy Asthma Rep* 2012 12:621–629.
5. Scurlock A.M., Vickery B.P., Hourihane J.O., Burks A.W. Pediatric Food Allergy and Mucosal Tolerance. *Mucosal Immunol.* 2010 Jul;3(4):345-54.
6. Dupont C. Food Allergy: recent advances in pathophysiology and diagnosis. *Ann Nutr Metab.* 2011;59 Suppl 1:8-18.
7. Wang J., Sampson H.A. Food allergy: recent advances in pathophysiology and diagnosis. *J Clin Invest.* 2011 Mar;121(3):827-35.
8. Giovanna et al.: The immunopathogenesis of cow's milk protein allergy (CMPA). *Italian Journal of Pediatrics* 2012 38:35.
9. Hourihane J.O., Dean T.P., Warner J.O.. Peanut allergy in relation to heredity, maternal diet, and other atopic diseases: results of a questionnaire survey, skin prick testing, and food challenges. *BMJ.*1996;313:518–21.
10. Kumar R, Tsai H.J., Hong X., et al. Race, ancestry, and development of food-allergen sensitization in early childhood. *Pediatrics.* 2011;128:e821–9
11. Sicherer S.H., Furlong T.J., Maes H.H., et al. Genetics of peanut allergy: a twin study. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106:53–6.
12. Ventura M., Polimeno L., Amoruso A., Gatti F., Annoscia E., Marinaro M., et al. Intestinal permeability in patients with adverse reactions to food. *Dig Liver Dis.* Oct; 2006 38(10):732–736.
13. Mowat A.M., Parker L.A., Beacock-Sharp H., et al. Oral tolerance: overview and historical perspectives. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1029:1–8.
14. Bjorksten B., Sepp E., Julge K., Voor T., Mikelsaar M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol.* Oct; 2001 108(4):516–520.

15. Bisgaard H., Li N., Bonnelykke K. et al. Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128:646–652
16. Restani P., Ballabio C., Di Lorenzo C., Tripodi S., Fiocchi A. Molecular aspects of milk allergens and their role in clinical events; *Anal Bioanal Chem* (2009) 395:47–56
17. Huang F. & Kim J.S. IgE-Mediated Cow's Milk Allergy in Children. *Curr Allergy Asthma Rep* (2012) 12:630–640
18. Boné J., Claver Á., Guallar I., Plaza A.M.. Allergic proctocolitis, food-induced enterocolitis: immune mechanisms, diagnosis and treatment; *Allergo et Immunopathol.* 2009;37(1):36-42
19. Avigael H.B., Schäppi Tempia M.G., Belli D.C., Eigenmann P.A.. An overview of cow's milk allergy in children; *Swiss Med Wkly* 2009;(139)21-22:300-307.
20. Arslan Lied G. Gastrointestinal food hypersensitivity: Symptoms, diagnosis and provocation tests; *Turk J Gastroenterol* 2007; 18 (1): 5-13.
21. Ito K., Urisu A. Diagnosis of Food Allergy Based on Oral Food Challenge Test; *Allerg. International.*2009;58:467-474.
22. Järvinen K.M., H. Sicherer S.H.. Diagnostic oral food challenges: Procedures and biomarkers; *Journal of Immunological Methods* 383 (2012) 30–38.
23. Lieberman J.A., Sicherer SH. Diagnosis of Food Allergy: Epicutaneous Skin Tests, In Vitro Tests, and Oral Food Challenge; *Curr Allergy Asthma Rep* (2011) 11:58–64.
24. Hill DJ, Heine RG, Hosking CS. The diagnostic value of skin prick testing in children with food allergy. *Pediatr Allergy Immunol.* 2004; 15(5):435–41.
25. Verstege A., Mehl A., Rolinck-Werninghaus C., et al. The predictive value of the skin prick test weal size for the outcome of oral food challenges. *Clin Exp Allergy.* 2005; 35(9):1220–6
26. Calvani M., Alessandri C., Frediani T., et al. Correlation between skin prick test using commercial extract of cow's milk protein and fresh milk and food challenges. *Pediatr Allergy Immunol.* 2007; 18(7):583–8.
27. Mehl A., Rolinck-Werninghaus C., Staden U., Verstege A., Wahn U., Beyer K., Niggemann B. The atopy patch test in the diagnostic workup of suspected food-related symptoms in children; *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Oct; 118(4):923-9.
28. Costa A.J., Sarinho E.S., Motta M.E., Gomes P.N., de Oliveira de Melo S.M., da Silva G.A. Allergy to cow's milk proteins: what contribution does hypersensitivity in skin tests have to this diagnosis?; *Pediatr Allergy Immunol.* 2011 Feb;22(1 Pt 2):e133-8.
29. Niggemann B., Beyer K. Diagnosis of food allergy in children: toward a standardization of food challenge. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007;45:399-404.

CAPITOLO 2

APPROCCIO METABOLOMICO ALLO STUDIO DEL LIQUIDO AMNIOTICO NELLA PREDIZIONE DEL RISCHIO DI PARTO PRETERMINE E SVILUPPO DI BPD INTRODUZIONE

1. Lo studio dell'ambiente fetale

Negli ultimi anni sta emergendo l'evidenza che il periodo perinatale sia uno tra i più critici nella vita di un individuo con conseguenze sulla sua salute futura. Nel 1973, per la prima volta, è stata proposta la teoria dell'esistenza di un rapporto tra l'ambiente fetale e la predisposizione a sviluppare malattie cardiovascolari in età adulta. Sulla stessa linea, Barker ha proposto che gli eventi che si verificano nell'ambiente fetale possono essere legati a conseguenze a lungo termine per la salute e sulla durata della vita nell'adulto [1]. Gli studi condotti da Barker et al. alla fine degli anni '80 e primi anni '90 hanno dimostrato che la malnutrizione intrauterina è un fattore di rischio significativo per il successivo sviluppo d'ipertensione cronica, diabete, ictus e morte per malattia coronarica [2].

Nel 1994, è stato avviato uno studio che ha coinvolto un'ampia coorte di persone nate in un grande ospedale ad Amsterdam tra il novembre 1943 e il febbraio 1947, durante il periodo della "carestia olandese" che ha colpito la parte occidentale dei Paesi Bassi. Lo scopo di tale studio è stato quello di valutare se e come la carestia vissuta in epoca prenatale potesse avere delle conseguenze nello sviluppo di patologie in età adulta. È emerso che esiste un forte legame tra malnutrizione e denutrizione in utero e le malattie cardiovascolari, il diabete, un'alterazione della coagulazione e un'alta predisposizione alle malattie polmonari. Ricerche più recenti hanno dimostrato che gli individui esposti alla carestia durante la gestazione presentavano alterazioni epigenetiche in alcuni geni con conseguenze nei fenotipi metabolici e cardiovascolari [3].

Esistono molteplici dati a sostegno della cosiddetta "teoria della programmazione fetale" anche nel campo della dermatite atopica e delle malattie respiratorie. Dai

numerosi studi disponibili, sembra che le prime origini di asma e malattie allergiche correlate possano derivare da diversi fattori della complessa interazione materno-fetale, tra cui un equilibrio alterato delle citochine (Th1, Th2 e T materna), l'esposizione del feto agli allergeni, i diversi apporti dietetici materni e lo stile di vita della madre [4,5]. Per esempio, una concentrazione elevata nel sangue di IL-8 è stata correlata allo sviluppo di “sibili” ricorrenti in bambini di età inferiore a 1 anno. Per di più, l'apporto di nutrienti al feto ha un ruolo chiave sulla crescita e la maturazione delle vie aeree, e si è visto che la carenza di vitamina A ha effetti sulla ramificazione delle vie respiratorie e polmonari e sulla differenziazione delle cellule epiteliali [5]. Inoltre lo sviluppo delle vie aeree è fortemente influenzato dal fumo materno e sembra essere correlato maggiormente con lo sviluppo di asma e respiro affannoso durante l'età prescolare [6].

L'interesse nell'interazione materno-fetale è attualmente un tema di grande interesse poiché la comprensione delle origini di molte condizioni perinatali e neonatali, come la nascita prematura, asfissia, displasia broncopolmonare ed emorragia intraventricolare, può portare a una migliore comprensione di come queste condizioni possano influenzare la salute dell'individuo adulto [7]. Strumenti di indagine olistici come la metabolomica rappresentano un approccio ottimale per lo studio delle molteplici interazioni tra madre, placenta e il feto. Negli ultimi anni è emerso un crescente interesse per la caratterizzazione dei profili metabolici in gravidanze normali e complicate e nei loro esiti neonatali correlati. L'analisi metabolomica in medicina materno-fetale può essere applicata su diversi biofluidi, quali il plasma materno e il sangue, il liquido amniotico, le secrezioni vaginali, le urine materne e del neonato, il sangue del cordone ombelicale o della placenta. Finora gli studi hanno valutato la possibilità di correlare specifici profili metabolici con la comparsa di complicazioni quali la preeclampsia, il diabete mellito gestazionale, le malformazioni fetali, il parto pretermine, la restrizione della crescita fetale e l'encefalopatia ipossico-ischemica [8]. La maggior parte degli studi metabolomici applicati alla gravidanza sono stati eseguiti sulle urine della madre e del neonato o su plasma materno, e ci sono pochi dati pubblicati sull'analisi metabolomica applicata allo studio della composizione del liquido amniotico e la sua correlazione con lo sviluppo di patologie ostetriche o di complicazioni che si possono manifestare in epoca perinatale.

1.1 Il liquido amniotico

Il liquido amniotico è definito come l'ambiente dinamico che circonda il feto. Sia il suo volume che la sua specifica composizione al progredire della gravidanza, hanno un ruolo fondamentale sugli scambi tra la placenta, le membrane corioniche e la cavità amniotica, e sullo sviluppo di tessuti fetali e organi. Durante l'embriogenesi, l'acqua presente nel liquido amniotico ha origine dal plasma materno e passa attraverso le membrane fetali grazie a forze idrostatiche e osmotiche e pertanto in questo periodo iniziale la composizione del liquido amniotico è molto simile a quella del plasma della madre. Più tardi durante la gravidanza, la cheratinizzazione progressiva della pelle del bambino, lo sviluppo del rene e dell'uretra, l'inizio della deglutizione e della respirazione, e di altri processi fanno sì che il volume del liquido amniotico e la sua composizione diventino fondamentali allo sviluppo del feto stesso [10].

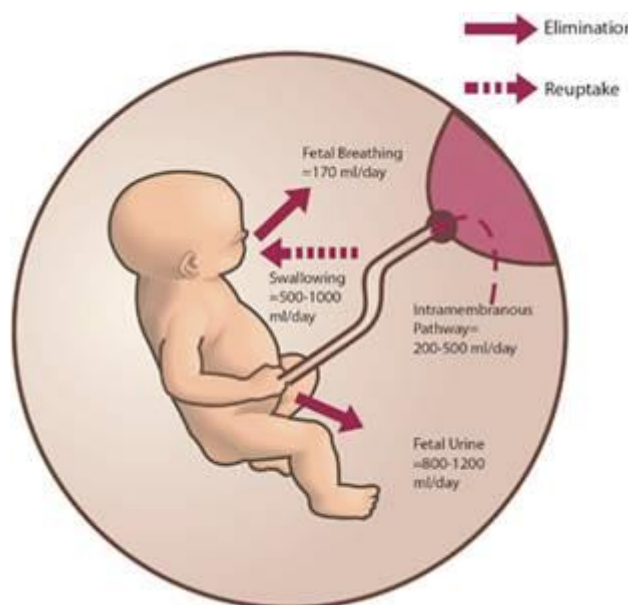


Fig. 1: Percorsi di amniotico ricircolo del liquido. Produzione e reuptake sono di solito vicino all'equilibrio.

Tra il primo e secondo trimestre di gravidanza la composizione chimica del liquido dipende dalla progressiva formazione della pelle e dallo sviluppo della filtrazione renale. Lo sviluppo del polmone e della trachea, contribuiscono invece più significativamente dal terzo trimestre, con un aumento del contenuto di tensioattivi polmonari [9].

Diversi ioni, metaboliti e altre piccole molecole organiche, quali glucosio, urea, creatinina, creatina, acido urico, aminoacidi, acidi lattici, corpi chetonici, lipidi, acidi grassi, acidi biliari, bilirubina, vitamine, ormoni e prostaglandine, possono essere ritrovate nel liquido amniotico in concentrazioni variabili nei diversi periodi della gestazione [10]. Mediante analisi proteomica tra le 19-20 settimane di gestazione sono state identificate concentrazioni crescenti di proteine e peptidi, indispensabili al movimento e alla proliferazione cellulare e allo sviluppo degli organi [11]. La loro concentrazione sembra diminuire verso il termine della gravidanza ed è probabilmente legata allo sviluppo della deglutizione fetale [12] mentre per quanto riguarda i lipidi, la loro concentrazione generalmente aumenta durante tutta la gravidanza. I fosfolipidi, che costituiscono uno dei principali elementi del contenuto lipidico totale, sono presenti a livelli elevati nel liquido amniotico soprattutto verso la fine della gestazione, in parallelo con la maturazione polmonare; poiché sono tra i principali costituenti del surfactante polmonare [35].

Altri fattori importanti che sono stati identificati nel liquido amniotico umano sono sostanze che compongono il sistema immunitario innato (come α -defensine e lattoferrina), e fattori di crescita (EGF, TGF- α , TGF- β 1, IGF-1, EPO e G-CSF).

Il liquido amniotico rappresenta un fluido biologico ottimale per la caratterizzazione sia della condizione materna che quella del bambino. Nonostante la sua natura invasiva, l'amniocentesi è ormai praticata da più di cento anni. Dal 1970, l'amniocentesi è comunemente eseguita generalmente a metà trimestre di gravidanza (14-20 settimane di gestazione). Le cellule prelevate in sede di amniocentesi possono essere utilizzate per diagnosticare alcune infezioni fetali (CMV, toxoplasmosi, rosolia, ecc), per prevedere la gravità di emolisi fetale attraverso il livello della bilirubina e per la valutazione della maturità polmonare in seguito al conteggio del corpo lamellare nel liquido amniotico. L'analisi del liquido amniotico è anche utile nella diagnosi prenatale dei difetti neurali (come la spina bifida), errori congeniti del metabolismo e malattie genetiche.

Grazie alla sua ricca composizione di metaboliti a basso peso molecolare, il liquido amniotico umano (AF) rappresenta un materiale biologico adeguato per essere analizzato con tecniche spettroscopiche. L'AF è stato fin d'ora studiato in particolare con la spettroscopia NMR per individuare una serie di biomarcatori indicativi sia del

normale sviluppo del feto sia d'insorgenza ed evoluzione di malattie che possono colpire il bambino e la madre [13,14]. Recentemente Graca et al. hanno analizzato il potenziale di diverse tecniche spettroscopiche con lo scopo di riuscire a caratterizzare la composizione metabolica del liquido amniotico umano. Queste analisi hanno consentito di rilevare e riconoscere più di 60 metaboliti, alcuni dei quali presenti in bassa concentrazione nel liquido amniotico [15,16]. Il contenuto metabolico del liquido amniotico è stato esplorato anche al fine di stabilire la sua correlazione con alcuni disturbi clinici, come il diabete mellito gestazionale, la preeclampsia, il parto pretermine, la fibrosi cistica, la maturazione del rene, la sindrome di Down e la spina bifida [17].

Nel 2004 Groenen et al. ha messo in luce le differenze rilevate nel liquido amniotico di gravidanze con spina bifida rispetto ad alcuni campioni di controllo [18]; mentre più recentemente Graca et al. ha valutato la correlazione tra la composizione metabolica del liquido amniotico e dell'urina materna al 2° trimestre in diverse condizioni patologiche, in presenza di malformazioni fetali sospette o diagnosticate, futura insorgenza di diabete mellito gestazionale e parto pretermine. Dai dati, è emerso che l'approccio metabolico al liquido amniotico è risultato in grado di predire l'insorgenza di malformazioni fetali e successivo parto prematuro [19].

L'analisi metabolica mirata più rilevante su AF è stata condotta da Romero et al. nel 2010 utilizzando la spettrometria di massa combinata con tecniche di separazione cromatografica (GC o LC) in due studi trasversali e retrospettivi che coinvolgevano donne in gravidanza con parto pretermine spontaneo (PTL) e membrane intatte. Nel primo studio, i biomarcatori del liquido amniotico sono stati in grado di discriminare 3 gruppi sulla base del successivo esito della gravidanza: 1) i pazienti con parto a termine, 2) i pazienti con PTL, senza infezione intrauterina con parto a pretermine, e 3) pazienti, con PTL con infezione intrauterina e con parto a pretermine. In questo primo studio è stato possibile selezionare una piccola collezione di variabili predittive che potrebbe spiegare i diversi fenotipi. Successivamente, gli autori hanno condotto un secondo studio di validazione per confermare l'efficacia dei biomarker predittivi rilevati nel primo studio [16]. Questi due importanti studi hanno dimostrato le potenzialità dell'analisi metabolica nel liquido amniotico e la possibilità di sviluppare adeguati test diagnostici rapidi per differenziare i pazienti a rischio di

imminente parto prematuro o di altre complicazioni di gravidanza da pazienti con una gravidanza normale.

Per quanto riguarda la relazione tra la composizione del liquido amniotico e lo sviluppo polmonare fetale, questa è stata ampiamente esplorata soprattutto attraverso l'uso di approcci trascrittomici e proteomici. È noto che la mancanza di liquido amniotico dovuta allo sviluppo del tratto urinario anormale o rottura precoce delle membrane prima della 26° settimana gestazionale possono portare a ipoplasia polmonare. Alcune proteine del surfattante polmonare, ad attività tensioattiva sintetizzate da cellule alveolari polmonari, sono tra i marcatori critici di maturazione polmonare nei bambini nati prematuramente. Ad oggi non sono presenti in letteratura approcci metabolomici “non mirati” sul liquido amniotico al fine di indagare il legame tra i possibili biomarcatori e il successivo sviluppo di BPD o altre malattie respiratorie.

1.2 Parto pretermine e displasia broncopolmonare

Il parto pretermine, rappresentando il 75% della mortalità perinatale e più della metà della morbilità a lungo termine nei paesi sviluppati, è ad oggi una grande sfida sia in ambito ostetrico sia nella neonatologia. È definito come la nascita che si verifica prima delle 37 settimane di gestazione con un'incidenza del 12-13% negli USA e 5-9% in Europa [20]. La nascita pretermine è generalmente classificata come spontanea o indotta. Di tutti i parti pretermine, il 45% risulta spontaneo e avviene con il mantenimento delle membrane intatte, il 25% presenta una rottura prematura delle membrane (PPROM) e il restante 30% è caratterizzata clinicamente da specifiche condizioni materne e fetali, come la preeclampsia, emorragia, sofferenza fetale intrauterina [20,21]. I suoi fattori di rischio principali sono stati identificati in comportamenti e caratteristiche demografiche materne, stato nutrizionale, stress e ambiente avverso, emorragie, infezione del tratto non-genitale e intrauterina, lunghezza del collo dell'utero e infine una predisposizione genetica.

La displasia broncopolmonare (BPD) rappresenta per la stragrande maggioranza dei casi una patologia polmonare cronica [23]. È stata originariamente descritta da Northway e collaboratori nel 1967 in un gruppo di bambini prematuri che hanno sviluppato insufficienza respiratoria cronica e caratteristici cambiamenti radiografici in seguito a ventilazione meccanica prolungata e supplementazione di ossigeno [24]. Due

decenni più tardi, gli stessi autori hanno riscontrato che i sintomi respiratori e le anomalie funzionali riscontrate alla nascita persistevano in adolescenza e nei primi anni dell'età adulta in una coorte di sopravvissuti; suggerendo che le lesioni polmonari nei primi anni di vita possono avere conseguenze permanenti [25].

Le caratteristiche e il trattamento dei neonati che sviluppano BPD oggi sono molto diverse da quelle descritte da Northway et al. nel 1967. La forma classica o definita "old BPD" era per lo più riscontrata in bambini nati pretermine con peso alla nascita circa di 900 g e sindrome da distress respiratorio, che hanno ricevuto un'importante ventilazione alla nascita e sono stati esposti a elevata concentrazione di ossigeno inspirato. Le radiografie del torace di questi soggetti hanno mostrato marcate alterazioni, mentre il danno ai polmoni, rilevato in campioni autoptici, è stato caratterizzato da forti cambiamenti morfologici che includevano enfisema, atelettasia, fibrosi, segnata metaplasia squamosa epiteliale e ipertrofia della muscolatura liscia delle vie aeree [26].

I progressi nella gestione della terapia intensiva, l'introduzione di steroidi prenatali, la terapia sostitutiva con tensioattivi, nuove modalità di ventilazione meccanica, migliori interventi nutrizionali e un attento monitoraggio della supplementazione di ossigeno, hanno portato alla sopravvivenza dei bambini più piccoli, in quella che ora è definita "new BPD" [27]. Il bambino tipico che sviluppa BPD oggi ha un peso alla nascita \leq 1000 g [28], e si trova in una fase di sviluppo polmonare ancora più precoce (24-26 settimane di gestazione), spesso con RDS meno gravi e con meno evidenti danni iatrogeni. La "new BPD" è principalmente un disturbo dello sviluppo, in cui il polmone immaturo non riesce a raggiungere la sua piena complessità strutturale, sviluppando un minor numero e una maggiore dimensione degli alveoli con una riduzione globale della superficie disponibile per lo scambio di gas. Le vie aeree sono meno colpite rispetto alla "old BPD" e l'infiammazione è di solito meno evidente [27]. Sebbene la BPD sia tradizionalmente considerata il risultato di lesioni prodotte da ventilazione meccanica e alte concentrazioni di ossigeno inspirato, recenti evidenze sperimentali e cliniche hanno dimostrato che esistono interazioni genetiche e ambientali ricollegabili allo sviluppo di BPD.

Negli anni la definizione di BPD e i criteri di inclusione sono cambiati, determinando ampie variazioni nelle caratteristiche delle popolazioni riportate in diversi studi e i dati

relativi all'incidenza della malattia [23,26]. Nel 2000 L'Istituto Nazionale per la Salute (NIH) ha organizzato un seminario per trovare una definizione migliore per la BPD e per uniformare i criteri diagnostici. Si è stabilito che la BPD viene definita come “la necessità di ossigeno supplementare per almeno 28 giorni”, e che la sua gravità deve essere classificata sulla base del supporto e della concentrazione di ossigeno respiratorio richiesto. Nel 2005, un progetto che coinvolgeva i bambini nati con peso alla nascita ≤ 1000 g e settimane di gestazione < 32 , ha confermato la validità del National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) che proponeva criteri diagnostici basati sulla gravità-della BPD, sullo sviluppo polmonare, neurologico e di crescita nei primi 2 anni di vita [28]. Considerando i risultati a lungo termine di questo disturbo, un approccio preventivo dovrebbe essere raggiunto, per progettare efficaci strategie terapeutiche attraverso il rilevamento di potenziali biomarcatori che permettano il riconoscimento precoce dei neonati ad alto rischio [30]. Nonostante i miglioramenti nella cura neonatale negli ultimi 4 decenni, la BPD rappresenta ancora una delle più importanti complicanze polmonari nei neonati pretermine che ricevono supporto respiratorio. L'incidenza riportata in letteratura varia ampiamente: si stima che da 10'000 a 15'000 nuovi casi di BPD si verificano ogni anno negli Stati Uniti, il 97% dei quali si sviluppano in neonati con un peso alla nascita inferiore a 1.250 g [31]. La BPD si verifica in circa un terzo dei neonati con peso inferiore a 1000 g di nascita, contribuendo ad una significativa morbilità in questo gruppo di neonati molto prematuri, con maggiori probabilità di sviluppare ritardo del linguaggio, paralisi cerebrale, e disturbi cognitivi rispetto ai neonati pretermine senza BPD.

OBIETTIVI DELLO STUDIO

Lo scopo di questo studio pilota è stato quello di applicare l'approccio metabolomico con la spettrometria di massa all'analisi dei campioni di liquido amniotico, al fine di caratterizzare il profilo biochimico-metabolico di questo fluido in relazione all'esito del parto (termine e pretermine) e allo sviluppo di displasia broncopolmonare nel nascituro. In particolare gli obiettivi di questo studio sono stati:

1. valutare se l'analisi metabolomica del liquido amniotico potesse discriminare gravidanze associate a parto pretermine con successivo sviluppo BPD nel neonato, gravidanze associate a parto pretermine senza sviluppo di BPD, e gravidanze associate a parto a termine;
2. valutare se il parto prematuro e lo sviluppo di BPD sono associati a specifiche caratteristiche metaboliche nel liquido amniotico.

Inoltre per valutare se il profilo metabolico fosse in grado di prevedere la nascita pretermine rispetto a quella a termine, abbiamo considerato solo i campioni di liquido amniotico raccolti almeno 6 giorni prima del parto.

MATERIALI E METODI

1. Disegno dello studio e caratteristiche dei pazienti

I campioni di liquido amniotico sono stati raccolti in collaborazione con il Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino (Università degli Studi di Padova) e la Clinica di Ostetricia e Ginecologia (Azienda Ospedaliera di Padova). Si tratta di uno studio retrospettivo e trasversale che includeva 32 bambini nati da madri che avevano subito l'amniocentesi tra la 21^o e la 28^o settimana di gravidanza, e 12 bambini sani nati a termine attraverso il taglio cesareo da madri il cui campione di liquido amniotico era stato raccolto al momento del parto.

I bambini sono stati poi suddivisi in tre gruppi differenti:

Gruppo A: neonati pretermine con BPD; composto di 10 bambini (3 femmine e 7 maschi) nati prematuri (tra la 25^o e la 28^o settimana gestazionale). I neonati avevano un peso medio alla nascita di 786 grammi e il punteggio medio di Apgar al 1^o minuto di vita era di 5. Tutti i bambini hanno sviluppato sindrome da distress respiratorio

(RDS) alla nascita e avevano dotto arterioso pervio (PDA). L'età media della madre al momento dell'amniocentesi era 30,5 anni (età della madre compresa tra i 18 e 42 anni).

Gruppo B: neonati prematuri senza BPD; composto da 11 bambini (4 femmine e 7 maschi). I neonati avevano un peso medio alla nascita di 1.260 grammi e il punteggio medio di Apgar al 1° minuto era 8. Solo 3 bambini hanno sviluppato RDS. L'età media della madre al momento dell'amniocentesi era 30 anni (età della madre compresa tra i 23 e i 41 anni). In questo caso 7 parti sono avvenuti per via vaginale, mentre 4 con taglio cesareo.

Gruppo C: bambini nati a termine (tra la 38° e la 40° settimana di gestazione); composto da 11 bambini (3 femmine e 8 maschi). I neonati avevano un peso medio alla nascita di 3.595 grammi e il punteggio medio di Apgar al 1° minuto era 9. I neonati non hanno sviluppato alcuna complicazione dopo la nascita. L'età media della madre al momento dell'amniocentesi era di 32 anni (tra i 21 e 37 anni). Tutti i parti sono avvenuti per via vaginale, tranne uno per taglio cesareo.

I campioni di liquido amniotico per questi 3 gruppi di bambini sono stati raccolti tra la 21° e la 28° settimana di gestazione, nel periodo compreso tra agosto 2004 e dicembre 2011. L'amniocentesi nelle madri è stata eseguita sia per indicazioni cliniche (età materna avanzata, storia familiare di anomalie cromosomiche, sospettato anomalie fetali o infezione virale, e richiesta materna) o per complicazioni durante la gravidanza (quali coriomnionite, febbre, IUGR, diabete gestazionale, ipertensione gestazionale e parto pretermine spontaneo).

Il tempo trascorso tra l'amniocentesi e il parto nei primi 2 gruppi di bambini pretermine variava da 0 (raccolta del campione al momento della consegna) a 12 settimane, mentre l'intervallo tra l'amniocentesi e il parto nel terzo gruppo di neonati a termine era tra le 11 e le 19 settimane.

Tutte le donne i cui bambini sono stati inclusi nello studio avevano fornito il loro consenso informato a donare il liquido amniotico per scopi di ricerca. La raccolta dei campioni e dei dati clinici è stato approvato dalle Commissioni Istituzionali delle istituzioni partecipanti (Padova, Azienda Ospedaliera, Treviso, Azienda Ospedaliera, Regione Veneto, Italia).

1.1 Raccolta dei campioni di liquido amniotico

Nei primi 3 gruppi, il liquido amniotico è stato raccolto tra la 21° e la 28° settimana gestazionale attraverso amniocentesi transaddominale, sotto la guida ecografica per le indagini cliniche, e 5 mL sono stati salvati per scopi di ricerca. È stato poi raccolto un quarto gruppo di liquidi amniotici al momento del parto dopo la rottura delle membrane.

Dopo la raccolta, i campioni di liquido amniotico sono stati trasportati al Laboratorio di Spettrometria di Massa (Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino, Università degli studi di Padova) dove sono stati congelati e conservati a -80 °C fino al momento dell'analisi.

2. Applicazione della spettrometria di massa e della cromatografia liquida UPLC all'analisi del liquido amniotico

2.1 Strumentazione e materiali

L'analisi dei campioni di liquido amniotico è stata eseguita tramite uno spettrometro di massa Q-ToF (Synapt G2; Waters) ad alta risoluzione interfacciato con un sistema cromatografico UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) (Waters) caratterizzato da un'elevata risoluzione cromatografica e da un breve tempo analitico. 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.

2.2 Preparazione dei campioni

Al momento dell'analisi, il campione di liquido amniotico è stato scongelato, miscelato tramite vortex e successivamente suddiviso in 2 aliquote da 500 µL circa. Poi, ciascuna aliquota è stata opportunamente diluita in metanolo con un rapporto 1:5, al fine di consentire la deproteinizzazione. Le aliquote sono state poi poste a -20°C per 30 minuti, poiché le basse temperature facilitano la deproteinizzazione.

Una volta scongelato il campione è stato centrifugato a 6200 g per 15 minuti, per permettere il deposito delle proteine sul fondo della provetta, successivamente è stato prelevato il surnatante e trasferito in ulteriori provette da 1,5 mL che sono state poste, a temperatura ambiente in un evaporatore rotante munito di pompa a vuoto per circa ore.

Per l'analisi cromatografica con la colonna a fase inversa HSS T3, i campioni sono stati ripresi e riportati al volume iniziale con una soluzione di H₂O + 0,1% di acido formico; mentre per l'analisi cromatografica con la colonna BEH HILIC il campione è stato riportato a volume con una soluzione acetonitrile / H₂O 80:20 + 0,1% di acido formico. In entrambi i casi il campione è stato poi trasferito in vials di vetro (Waters) per essere analizzato.

2.3 L'analisi cromatografica

I campioni sono stati analizzati utilizzando due diversi tipi di colonne cromatografiche in grado di trattenere e separare differenti tipologie di metaboliti a seconda della loro diversa idrofilicità e idrofobicità. Per ciascuna colonna sono state impiegate due diverse modalità di ionizzazione (in positivo e in negativo). Nel complesso i campioni sono stati studiati con 4 differenti modalità analitiche. È stata utilizzata una colonna a fase stazionaria apolare, definita anche a fase inversa, ACQUITY HSS T3 (Waters co., Milford, MA USA) con particelle di 1.8 µm, diametro di 2.1 mm e lunghezza di 100 mm. Gli eluenti utilizzati per l'analisi sono stati: A, H₂O + 0,1% di Acido Formico e B, Metanolo: Acetonitrile 90:10 + 0,1 % Acido Formico. 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 µL/min. E' stata poi utilizzata una colonna a fase polare ACQUITY BEH HILIC (Waters co., Milford, MA USA) con particelle di 1.7 µm, diametro di 2.1 mm e lunghezza di 100 mm. Gli eluenti utilizzati per l'analisi sono stati: A, acetato di ammonio 10 mM in acqua + 0,1% acido formico e B, acetato di ammonio 1 mM 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 minuti 60%; 6.01 minuti 5%, 11 minuti 99% ad un flusso di 500 µL/min.

La colonna per entrambe le analisi è stata mantenuta alla temperatura di 40°C.

In Fig. 2 sono riportati i profili cromatografici ottenuti da un campione di fluido amniotico analizzato in colonna HSS T3.

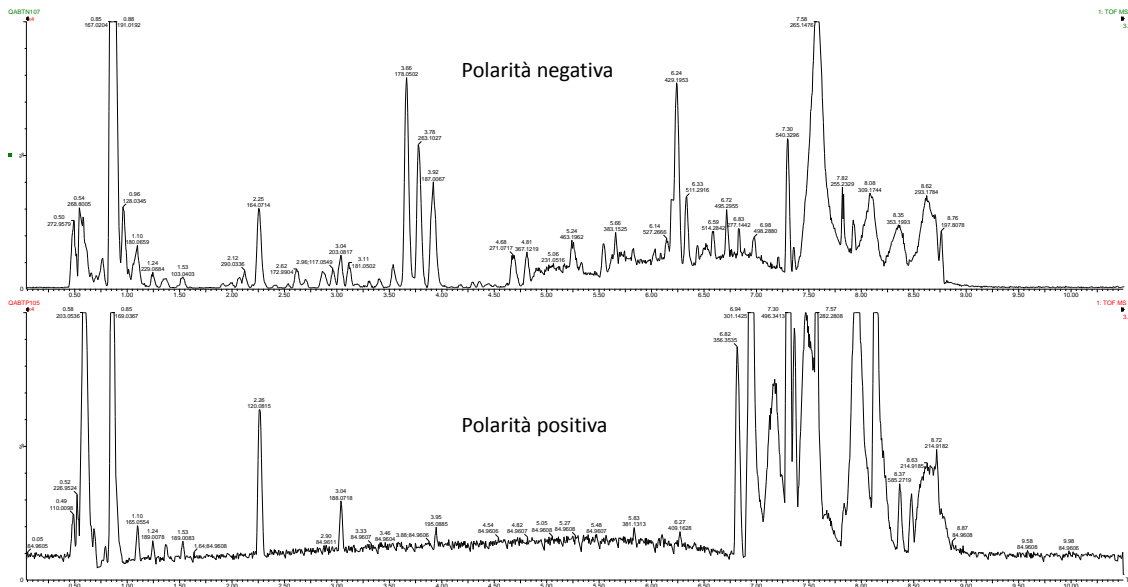


Fig.2: Profili cromatografici da un campione di fluido amniotico, derivati dalla colonna a fase inversa HSS T3 sia con modalità di ionizzazione positiva e negativa.

2.4 Analisi di spettrometria di massa

L'analisi MS è stata eseguita con spettrometro di massa ad alta risoluzione ed elevata sensibilità (Q-ToF), in grado di separare i metaboliti sulla base del tempo di ritenzione e della loro massa esatta al fine di identificare in modo univoco i diversi composti. La ionizzazione dei composti è ottenuta con una sorgente Electrospray (ESI) e le analisi sono state effettuate sia in ionizzazione positiva (ESI+) che negativa (ESI-). Il voltaggio del capillare della sorgente è stato impostato a 3 kV, la temperatura a 110 °C e il flusso di desolvatazione dell'azoto 600 L/Hr. La scansione è stata effettuata in un range di massa da 20 a 1200 amu.

Dall'analisi dei campioni di liquido amniotico, sono stati ottenuti i dati come cromatogrammi e spettri di massa i quali sono stati poi estratti utilizzando dei software specifici ed elaborati con l'analisi statistica multivariata per l'identificazione dei possibili biomarker. Ulteriori informazioni sulle variabili possono essere ricavate dagli spettri di frammentazione ottenuti tramite l'analisi dei campioni in MS^E, cioè tramite l'applicazione di una energia di collisione low and high. In seguito all'applicazione di

energia di collisione low si ottiene lo ione molecolare mentre con un'energia di collisione high ogni molecola subisce una frammentazione alla sua struttura chimica e alla presenza di gruppi funzionali legati alla molecola stessa. L'analisi in MS^E fornisce quindi delle informazioni utili alla successiva identificazione della molecola. Un'ulteriore tecnica analitica è stata utilizzata per supportare l'identificazione strutturale dei metaboliti. Si tratta del High Definition Direct Data Analysis (HD-DDA) che permette di selezionare, durante l'analisi gli ioni più intensi e fare uno spettro in MS/MS molto velocemente per poi condurre uno studio di frammentazione del metabolita.

Questo strumento risulta molto utile soprattutto per lo studio di frammentazione di molecole a bassa intensità e viene generalmente eseguito sui QC (quality control) di gruppo. Tutti i campioni sono stati iniettati in triplicato in tre sequenze casuali al fine di evitare qualsiasi effetto (BIAS) sulla classificazione dovuto alle condizioni analitiche.

Per verificare la riproducibilità analitica, insieme ai campioni sono stati analizzati anche dei controlli di qualità (QC) ottenuti dalla miscela di un'aliquota (20µL) di ciascun campione. Sono stati inoltre inseriti dei bianchi (blank) costituiti solo da solvente per monitorare carry-over o possibili contaminazioni e una soluzione di standard costituita da composti a massa nota (Sulfadimethoxine, Val-Tyr-Val, Leucine-Enkephalin, Erythromycin e Caffeine) per verificare l'accuratezza della massa e la risposta strumentale nel tempo d'analisi delle sequenze.

2.5 Estrazione dei dati

L'estrazione dei dati è stata eseguita mediante il software MarkerLynx (Waters co., Milford, MA USA). I parametri di ottimizzazione dell'estrazione dei dati sono stati individuati mediante l'analisi preliminare dei QC e la loro riproducibilità. Dopo l'estrazione dei dati in matrice è stata eseguita un'elaborazione, mediante l'analisi statistica multivariata, per verificare la possibilità di costruire modelli statistici robusti in grado di discriminare i gruppi in studio.

2.6 Analisi statistica

2.6.1 Descrizione del set di dati

Solo i risultati ottenuti dalla colonna HSS T3 sono stati considerati per l'analisi statistica in quanto sono state riscontrate delle contaminazioni nei campioni, legate soprattutto alla presenza di polimeri, messi in evidenza dall'analisi in colonna HILIC. La presenza e l'intensità di tali composti contaminanti hanno aumentato il rumore di fondo tanto da non permettere di evidenziare le differenze metaboliche presenti tra i gruppi di campioni in analisi.

I campioni sono stati analizzati in entrambe le modalità di ionizzazione (positiva e negativa) al fine di ottenere una descrizione quanto più completa della composizione chimica dei campioni. I dati ottenuti dall'analisi cromatografica sono stati estratti per essere elaborati tramite il software MarkerLynx. Abbiamo così ottenuto due insiemi di dati indicati come T3 NEG (dati prodotti utilizzando la colonna HSS T3 in modalità di ionizzazione negativa) e T3 POS (dati ottenuti dalla colonna HSS T3 in modalità di ionizzazione positiva). I due set di dati sono risultati composti da 11 campioni di controllo provenienti da donne con parto a termine e neonati che non hanno sviluppato BPD (CMTD), 11 campioni di controllo provenienti da donne con parto pre-termine e neonati che non hanno sviluppato BPD (CMPD), e 10 campioni provenienti da donne con parto pre-termine e neonati con successivo sviluppo di BPD (BPD). In un primo momento sono stati considerati per l'analisi statistica anche 12 campioni di liquido amniotico raccolti al momento del parto, che sono stati successivamente eliminati perché biologicamente diversi dai liquidi amniotici prelevati al momento dell'amniocentesi. Di seguito è riportato il numero di variabili, caratterizzate da differenti valori m/z e di tempo di ritenzione, messe in luce nelle due diverse modalità analitiche.

- **T3 NEG: 4101 variabili**
- **T3 POS: 2780 variabili**

2.6.2 Analisi dei dati

Lo studio condotto è da considerarsi come uno studio pilota a causa del ristretto numero di campioni per ciascun gruppo in esame. A questo proposito, per dimostrare

la robustezza delle nostre conclusioni e per escludere qualsiasi fattore confondente, come primo passo della nostra analisi dei dati abbiamo preso in considerazione il possibile effetto dei dati clinici disponibili (metadata) sul raggruppamento dei campioni in esame. I metadata che sono stati presi in considerazione sono stati:

- l'età gestazionale al momento della raccolta del liquido amniotico (settimana gestazionale dell'amniocentesi)
- tipo di parto, vaginale o cesareo,
- età materna all'amniocentesi,
- farmaci utilizzati durante la gravidanza.

Il secondo passo della nostra analisi dei dati ha riguardato la ricerca delle differenze tra CMTD, CMPD e BPD. Prima di procedere alla costruzione di un modello, le variabili ottenute sono state trattate con scaling tipo "Pareto" e centratura sulla media. Per la descrizione dei data set è stata costruito un modello PCA (Principal Component Analysis). Sono stati poi costruiti per ogni singolo data set dei modelli di classificazione PLS – DA (Partial Least Square – Discriminant Analysis) e OPLS – DA (Orthogonal Latent Structure – Discriminant Analysis) per confermare la separazione osservata già nel modello PCA tra i 3 gruppi di campioni. Ogni modello è stato incrociato e *cross-validato* n -volte (valori di $n = 6,7,8$) e sono stati condotti test di permutazione sui responsi (sono stati calcolati circa 400 permutazioni casuali). Ciascun data set è stato filtrato al fine di eliminare le variabili potenzialmente non interessanti da un punto di vista dell'analisi dati e che potrebbero compromettere la robustezza del modello, al fine di ottenere un modello con il valore massimo Q^2 .

RISULTATI

1. Effetto dei metadata sulla separazione dei campioni di liquido amniotico

Come primo passo esplorativo di analisi dei dati, con un approccio PCA, abbiamo valutato l'effetto di alcune variabili sul raggruppamento dei liquidi amniotici in esame:

- 1) età gestazionale al momento della raccolta del campione,
- 2) tipo di parto,

3) età materna al momento dell'amniocentesi.

Il modello PCA ha messo in evidenza l'effetto della età gestazionale sulla separazione dei campioni. Il modello ha mostrato una netta separazione tra i campioni di liquido amniotico raccolti alla nascita e quelli raccolti tra il 21 e il 28 ° settimana di gestazione. Pertanto per evitare effetti legati ai diversi momenti di prelievo del liquido amniotico, l'analisi metabolomica deve essere effettuata mettendo a confronto campioni di liquido amniotico raccolti a età gestazionale simili. Per tale motivo, nelle seguenti fasi di analisi dei dati abbiamo considerato solo i campioni di liquido amniotico raccolti tra la 21° e la 28° settimana di gestazione.

Per valutare poi i possibili effetti dei farmaci assunti in gravidanza, abbiamo eseguito una PCA considerando l'impatto di tutti i seguenti dati clinici:

- 1) terapia materna
- 2) tipo di parto
- 3) età materna all'amniocentesi

In Fig. 3 è messa in evidenza una separazione dovuta principalmente agli effetti dell'età del liquido amniotico e del tipo di parto. In particolare si può notare una chiara distinzione tra i campioni di liquido amniotico prelevati al momento del parto (TD, in giallo) e gli altri campioni di liquido amniotico prelevati tra 21 e 28 settimane di gestazione: controlli nati a termine (CMTD, in rosso), controllo nati con parto pretermine (CMPD, in blu) e bambini nati da parto pretermine con sviluppo di BPD (BPD, in verde). Una volta escluso il gruppo di liquidi amniotici prelevati alla nascita (TD), sono stati messi a confronto i tre gruppi con prelievo di AF all'amniocentesi (Fig.4). Da quanto riportato in Fig. 4 è emerso che i campioni non subiscono nessun raggruppamento sulla base dei dati clinici riportati sopra. Possiamo quindi concludere che la terapia materna, il tipo di parto e l'età della madre al momento dell'amniocentesi non hanno alcun effetto sulla separazione dei gruppi sopra descritti. Questa ipotesi ci ha permesso di confrontare il profilo metabolico dei 3 gruppi a prescindere da queste variabili.

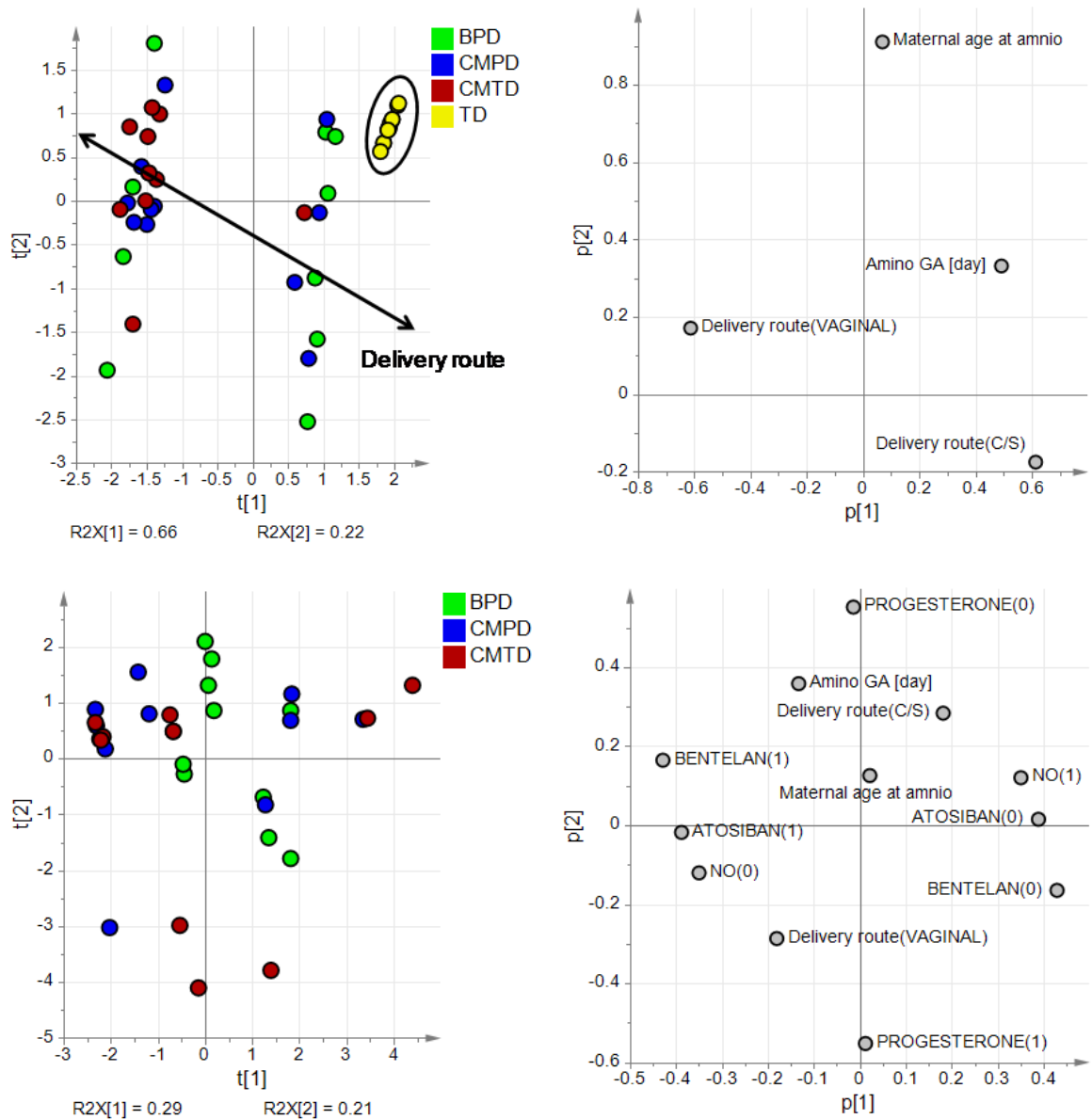


Fig. 3-4: Il diagramma a dispersione del modello PCA in relazione ai metadata presi in considerazione.

2. Modello PLS-DA dei 3 gruppi di campioni raccolti tra il 21° e il 28° settimana di gestazione.

Ciascuno dei due insiemi di dati (T3 NEG, T3 POS), è stato esplorato in primo luogo attraverso un modello PCA e poi successivamente un modello PLS-DA al fine di estrarre le informazioni utili per caratterizzare i 3 gruppi di campioni di interesse. Le caratteristiche dei modelli PLS-DA ottenuti sono riassunti nella Tabella IV dove N indica il numero di variabili nel set di dati; N_{model} indica il numero di variabili

utilizzate nel modello dopo la selezione VIP; A indica il numero di variabili latenti nel modello; R^2 indica la bontà di adattamento del modello e Q^2 indica il potere predittivo.

Tabella 1. Proprietà dei modelli PLS-DA ottenuti per i set di dati 2.

CMTD vs CMPD vs BPD					
Data set	N	N model	A	R^2	Q^2
T3 NEG	4101	254	3	0.78	0.56
T3 POS	2780	566	3	0.80	0.56

2.1 Data set T3 NEG

In figura 5 è rappresentato il grafico *scatter-plot* del modello PLS-DA per il set di dati T3 NEG. I campioni sono rappresentati considerando le prime 2 variabili latenti a score maggiore e quindi più rappresentative del modello. Il grafico mostra chiaramente come i 3 gruppi in esame siano tra loro separati sulla base delle differenze del profilo metabolico. Infatti, i campioni appartenenti a gruppi diversi occupano una regione diversa del grafico, dimostrando che CMTD (rosso), CMPD (blu) e BPD (verde) sono caratterizzati da un differente profilo metabolico.

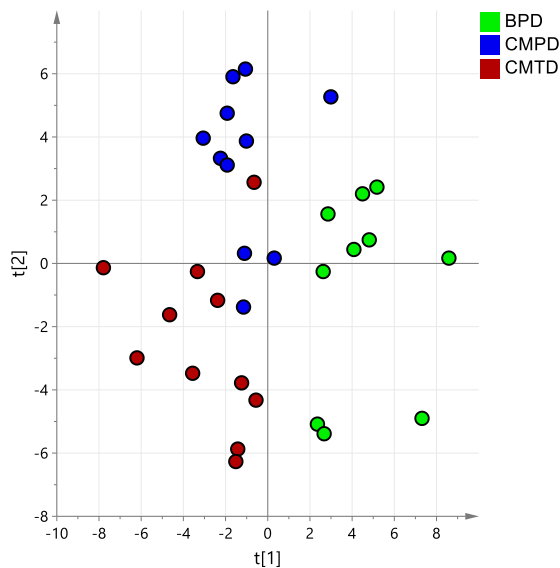


Fig.5:Scatter-plot del modello PLS-DA per il set di dati T3 NEG.

Il *loading-plot* riportato in figura 6, relativo al modello PLS-DA, ha messo in luce la presenza di variabili che possono essere considerate come possibili biomarcatori discriminanti.

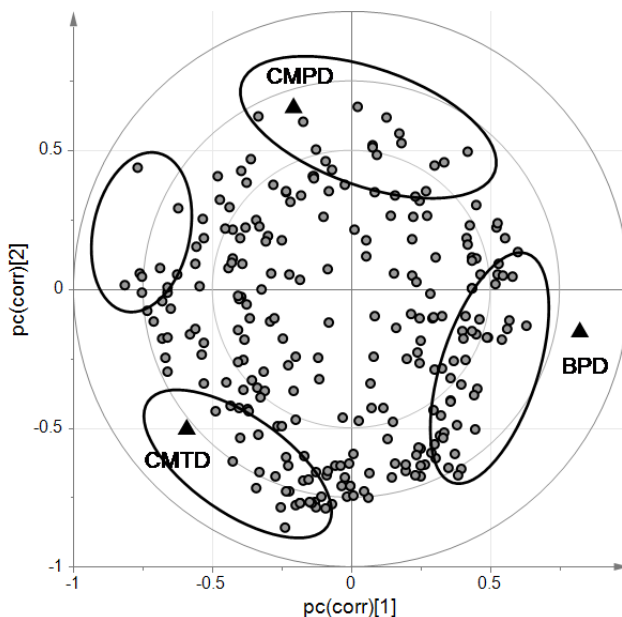


Fig. 6: *Loading-plot* del modello PLS-DA per il set di dati T3 NEG.

2.2 Data set T3 POS

Anche per il modello PLS-DA del set di dati T3 POS è stato dimostrato che i 3 gruppi di campioni in esame possono essere caratterizzati da differenti profili metabolici (Fig.7).

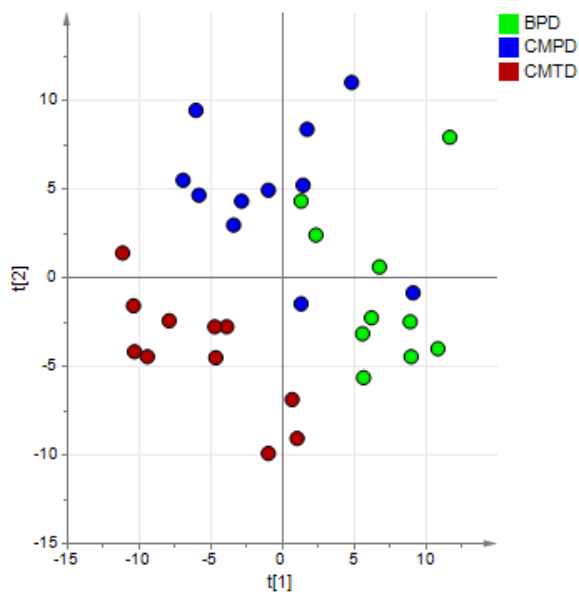


Fig.7: *Scatter-plot* del modello PLS-DA per il data set T3 POS.

Il *loading-plot* riportato in figura 8, relativo al modello PLS-DA, ha messo in luce la presenza di variabili che possono essere considerate come possibili biomarcatori discriminanti.

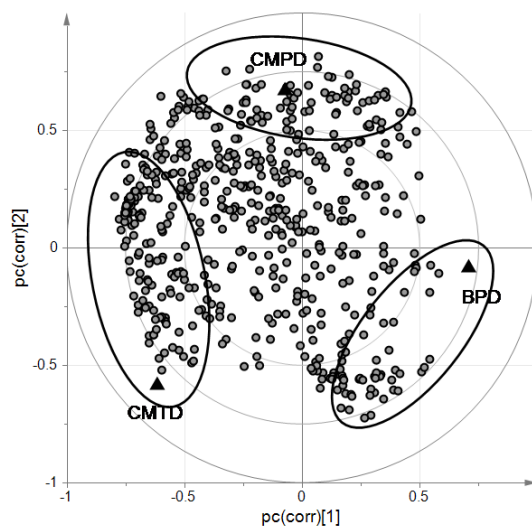


Fig. 8: Correlazione loading trama del modello PLS-DA per il set di dati T3 POS.

2.3 Identificazione delle variabili significative

Una volta creati i modelli OPLS-DA, è stato possibile procedere con l'identificazione, nel contesto del profilo metabolomico caratterizzante i due gruppi, delle variabili di maggiore rilevanza nella discriminazione tra i gruppi stessi. Per la ricerca delle variabili si sono utilizzati due dei database disponibili in rete (HMDB, Human Metabolome Database e METLIN) che hanno permesso, a partire dalle informazioni spettroscopiche, di risalire a una possibile struttura chimica confrontando le nostre variabili con i metaboliti presenti all'interno dei database. Questo è il primo di una serie di passaggi che sono utilizzati per arrivare all'identificazione di potenziali biomarker permettendo di ipotizzare sia la struttura chimica e la sua possibile attività biologica.

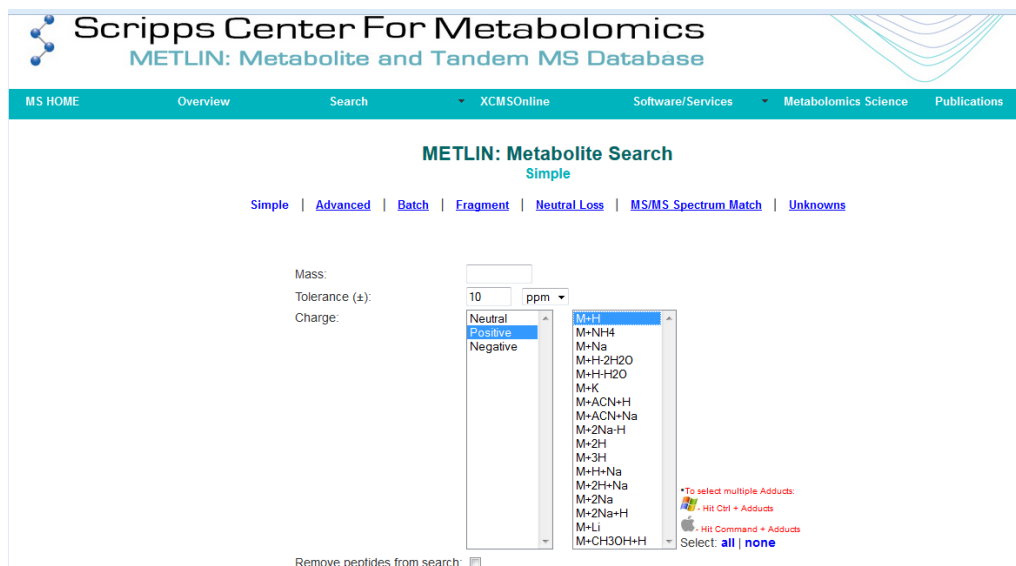


Fig. 9. METLIN Database

Inoltre, si sono utilizzati gli spettri derivanti dall'analisi Ms^E l'applicazione di una energia di collisione "high" ha permesso di rompere la molecola in frammenti caratteristici. Lo studio successivo di frammentazione permetterà di risalire alla struttura del metabolita e alla sua possibile identificazione. Nonostante il potenziale di queste numerose applicazioni, l'identificazione delle variabili significative è un processo elaborato che richiede misure complesse che non sempre portano al riconoscimento di uno specifico biomarker.

DISCUSSIONE

In questo studio abbiamo dimostrato per la prima volta che l'analisi metabolomica del liquido amniotico permette di discriminare, dal punto di vista biochimico-metabolico, gravidanze con parto a termine da gravidanze con parto pre-termine e l'ulteriore correlazione con lo sviluppo di BPD nel nascituro. L'analisi metabolomica si conferma dunque come metodo promettente, non guidato da ipotesi a priori, che permette in combinazione con la spettrometria di massa di mettere in luce le differenze metaboliche presenti tra diversi gruppi di campioni utilizzando diverse matrici tra cui il liquido amniotico che costituisce un fluido molto importante per descrivere le patologie che colpiscono l'ambito materno-infantile. Dalla grande quantità di dati, molto complessi, ottenuti dalle analisi spettroscopiche, è stato possibile, con

l'applicazione della statistica multivariata, mettere in luce le variabili significative per ciascun gruppo di campioni in esame consentendo di classificare rapidamente campioni associati a condizioni differenti in funzione delle loro caratteristiche metaboliche.

Il parto pretermine costituisce ancora oggi una grande sfida in ostetricia e neonatologia, rappresentando il 75% della mortalità perinatale e più della metà della morbilità a lungo termine nei paesi sviluppati. Anche la displasia broncopolmonare rimane ancora oggi una delle patologie più comuni derivanti da parto pretermine [32] e rappresenta la stragrande maggioranza dei casi di malattia polmonare cronica presenti nell'infanzia [33].

Negli ultimi anni sta emergendo il concetto che il periodo perinatale rappresenta un momento critico nella vita di un individuo e fondamentale per determinare la sua salute futura o la sua predisposizione a sviluppare patologie [2]. Il liquido amniotico rappresenta un'ottima matrice per descrivere la maturità del feto e lo sviluppo del polmone durante la vita intrauterina.[34] poiché la sua composizione può essere modificata in presenza di condizioni fisiopatologiche sia della madre che del bambino.

Alcune evidenze suggeriscono che il parto pretermine e malattia polmonare cronica possono essere più frequenti nei casi in cui si è riscontrata un'inflammazione in età prenatale [36]. Ad oggi la maggior parte degli studi eseguiti sui liquidi amniotici si è concentrata sulla ricerca di una correlazione tra fattori prenatali, rischio di parto prematuro e sviluppo di BPD a partire da singoli marcatori. Tuttavia, la complessità di tale relazione dovrebbe essere studiata anche attraverso un approccio più completo, come quello rappresentato dalle scienze -omiche che risultano del tutto innovative sul piano della ricerca scientifica applicata al liquido amniotico.

In questo studio, la costruzione di un robusto modello PLS-DA per ciascuno dei 2 data set ci ha permesso di mettere in luce la presenza di profili metabolici diversi tra gravidanze a termine, e gravidanze con parto prematuro, e tra queste ultime sviluppo o meno di BPD nel neonato. L'applicazione di tecniche spettroscopiche allo studio del liquido amniotico venne condotta già nel 1996 da Sims et al. al fine di identificare i possibili marcatori di insorgenza e evoluzione di malattie che colpiscono più frequentemente il feto o patologie che interessano la madre [14]. Successivamente nel 2004, Groenen et al. ha utilizzato la spettroscopia ^1H NMR per indagare la presenza di

marcatori dello sviluppo di spina bifida sempre a partire da campioni di liquido amniotico. È emersa una sostanziale differenza nella composizione amminoacidica e degli acidi organici rispetto al gruppo di controlli sani [18]. Analogamente, Graça et al. ha condotto due differenti studi metabolomici per indagare la composizione del liquido amniotico in presenza di malformazioni fetali o di altri disturbi presenti già in epoca prenatale rispetto a campioni prelevati da gravidanze con neonato sano. Nel primo studio era stato costruito un modello OPLS-DA che metteva in luce una netta separazione dei campioni prelevati da gravidanze con malformazioni rispetto ai controlli [37]. In seguito nel secondo studio, su un'altra coorte di campioni e in seguito a validazione con statistica multivariata, è stata confermata la validità del modello che è risultato predittivo dello sviluppo di malformazioni fetali sulla base di differenti profili metabolici [38]. Nello stesso studio, piccoli cambiamenti nei profili metabolici sono state osservate anche in campioni di liquido amniotico in soggetti sottoposti a parto pretermine e rottura prematura delle membrane. In particolare l'allantoina è stata suggerita come possibile biomarker di stress ossidativo, poichè è stato osservato un aumento di questo metabolita in campioni prelevati da donna che hanno poi subito un parto pretermine. Più di recente, lo stesso gruppo di ricerca ha eseguito studi mirati, tramite spettrometria di massa accoppiata a cromatografia di massa UPLC, su campioni di liquido amniotico e urine materne prelevati al 2° trimestre di gravidanza, per indagare la possibile correlazione tra la composizione dei liquidi biologici e possibili malformazioni fetali, sviluppo di diabete mellito gestazionale e successivo parto pre-termine. È stato osservata una diminuzione di alcuni amminoacidi e un aumento di derivati del glucosio in pazienti che hanno poi presentato un parto prematuro [19].

Nella valutazione del rischio di parto pretermine, il potenziale dell'approccio metabolomico e della spettrometria di massa applicata all'analisi del liquido amniotico è stato messo in luce per la prima volta da Romero et al. attraverso due studi retrospettivi molto interessanti. Romero et al. ha dimostrato che l'analisi metabolomica applicata al liquido amniotico può costituire un nuovo approccio nell'identificazione di fattori prognostici del parto pretermine rispetto a gravidanze con parto a termine. Inoltre hanno correlato i profili metabolici di parti pre-termine associati a infezioni intrauterine rispetto a liquidi amniotici privi di infezioni [17].

Tuttavia, il nostro sembra essere il primo studio che associa non solo al parto pretermine, ma anche allo sviluppo BPD nella prole, un caratteristico profilo metabolico del liquido amniotico. Quello che è emerso dal nostro studio supporta l'ipotesi che lo sviluppo di BPD non sia determinato solo da fattori post-natali ma anche da fattori prenatali che possono compromettere l'equilibrio materno-fetale e la normale fisiologia dello sviluppo del polmone.

Dopo aver dimostrato che l'analisi metabolomica è in grado di discriminare gravidanze con parto a termine, gravidanze con parto pretermine senza sviluppo di BPD, e gravidanze con parto pretermine e sviluppo di BPD, il passo successivo è stato quello di procedere alla caratterizzazione delle variabili discriminanti per ciascun gruppo. Le caratteristiche biochimiche-fisiche di queste variabili sono state confrontate con quelle dei metaboliti noti riportati in due database online (METLIN e HMDB), al fine di valutare se alcune delle variabili emerse fossero già presenti nei database. Nessuna delle variabili emerse è risultata già nota e pertanto si è proceduto all'osservazione degli spettri di frammentazione per ricavare delle informazioni utili alla ricostruzione della struttura chimica. Gli spettri di frammentazione delle variabili saranno poi confrontati con quelli di composti noti presenti in rete per consentire una migliore ricostruzione della molecola. È inoltre importante sottolineare che lo scopo finale della metabolomica non è tanto l'identificazione dei metaboliti quanto la messa in evidenza dell'esistenza di un "fingerprinting" metabolico caratterizzante una determinata condizione clinica. La messa in luce di tutto ciò porta alla formulazione dell'ipotesi che possa esistere un profilo metabolico diagnostico e prognostico di patologia. Al fine di rendere ciò possibile, il modello ottenuto tramite l'analisi statistica multivariata deve essere convalidato in un gruppo di soggetti indipendenti per permettere di sviluppare poi un test predittivo. Pertanto gli sviluppi futuri del nostro lavoro riguarderanno la raccolta di ulteriori campioni, la messa a punto del metodo analitico e la validazione del modello statistico.

Tuttavia tra le variabili significative emerse dal modello statistico, una è risultata di particolare interesse e le sue caratteristiche spettroscopiche e la struttura chimica sembrano attribuibili alle caratteristiche degli acidi grassi e in modo particolare ad un lattone degli acidi grassi (6-idrossi-4 dodecanolide). Questa variabile è risultato caratteristica del profilo dei liquidi amniotici dei bambini che hanno sviluppato BPD.

Diversamente nello stesso gruppo di soggetti sono stati riscontrati livelli inferiori di due variabili chimicamente affini agli amminoacidi.

L'ipotesi di un livello più alto di acidi grassi nei campioni di bambini che hanno poi sviluppato BPD sembrerebbe essere supportata dall'evidenza che i mediatori lipidici dell'infiammazione derivano spesso da famiglie di acidi grassi quali omega-6 e omega-3. In particolare, nell'infiammazione legata alla presenza di asma nel bambino, è emerso dalla letteratura che i principali mediatori siano soprattutto derivati dell'acido arachidonico come ad esempio le prostaglandine (PG) e i cisteinil-leucotrieni (CysLT) che svolgono sia con funzione anti-infiammatoria (PGE₂) che pro-infiammatorie (PGD₂) [39]. Inoltre il parto sembra essere associato con aumentata produzione di prostanoidei e rilascio di acido arachidonico dai tessuti intrauterini; e il tensioattivo fetale, secreto dal polmone in sviluppo, sembra rilasciare acidi grassi all'interno del liquido amniotico contribuendo così al livello di acido arachidonico [40].

Per quanto concerne gli amminoacidi, questi ultimi possono derivare dal processo di digestione delle proteine nel tratto gastrointestinale fetale, e dall'escrezione urinaria nel liquido amniotico da parte del feto. Pertanto uno stato di sotto-nutrizione fetale potrebbe portare a bassi valori di amminoacidi nel liquido amniotico, come riscontrato nel nostro studio, come conseguenza della scarsa proteolisi e dell'escrezione urinaria. Inoltre una nutrizione adeguata è fondamentale per quanto riguarda la capacità del polmone di resistere al danno iperossoico, la sostituzione dei tessuti polmonari danneggiati da barotrauma, la continua crescita del polmone, la resistenza alle infezioni, la tolleranza a sollecitazioni prolungate e potenzialmente tossiche [41]. Le considerazioni esposte fin ora riguardano il confronto tra liquidi amniotici prelevati allo stesso periodo della gravidanza (2° trimestre); ma nel nostro studio abbiamo ritenuto interessante confrontare anche i profili metabolici di liquidi amniotici prelevati tra il 2° e il 3° trimestre di gravidanza, con quelli raccolti al momento del parto, tra 37 e 41 settimane di gestazione. In questo caso il modello PCA è stato costruito (Principal Component Analysis) tenendo conto di tutti i 4 gruppi di campioni di liquido amniotico. È emersa una chiara distinzione tra i campioni di liquido amniotico prelevati al momento del parto e i campioni di liquido amniotico prelevati in una fase precedente. Questo conferma quanto già riportato in letteratura: il profilo metabolico cambia al cambiare dell'età gestazionale e quindi dello sviluppo del feto [24,42,43].

Inoltre il modello è in grado di prevedere l'esito del parto sulla base del diverso profilo metabolico confermando quanto già presente in letteratura [44].

CONCLUSIONI

Il nostro studio ha quindi per la prima volta dimostrato che ciascuna delle condizioni che sono state indagate (nascita a termine, parto pretermine senza BPD e parto pretermine con BPD) è caratterizzata da uno specifico profilo metabolico sia per quanto riguarda la nascita pre-termine che lo sviluppo di BPD. Ciò può indicare l'alterazione di alcune vie biochimico-metaboliche già nella vita intrauterina portando così a una maggiore predisposizione al parto pre-termine e allo sviluppo di BPD suggerendo il ruolo di fattori prenatali nella patogenesi di questa condizione. Attualmente, nei database disponibili in rete, non è stato riscontrato nessun metabolita con le caratteristiche chimico-fisiche affini a quanto messo in luce dall'analisi statistica. Pertanto, saranno necessari ulteriori studi per riuscire, con maggiore precisione, a risalire alla struttura e quindi alle caratteristiche biologiche dei metaboliti responsabili della discriminazione tra i diversi gruppi, per potere poi sviluppare un test diagnostico che porti a nuovi ed efficaci interventi terapeutici. Inoltre, è necessario validare i modelli statistici ottenuti attraverso la raccolta e l'analisi di una nuova coorte di campioni, di dimensioni maggiori rispetto alla precedente, al fine di confermare la corretta predizione dell'esito della gravidanza e dello sviluppo di BPD da parte del modello statistico.

BIBLIOGRAFIA

1. Barker D.J. The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ*. 1990 Nov 17; 301(6761):1111.
2. Romero R. Prenatal medicine: the child is the father of the man. 1996. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2009 Aug;22(8):636-9.
3. Heijmans B.T., Tobi E.W0., Stein A.D., Putter H., Blauw G.J., Susser E.S., Slagboom P.E., Lumey L.H. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Nov 4;105(44):17046-9.

4. Jones C.A., Holloway J.A., Warner J.O. Does atopic disease start in foetal life? *Allergy*. 2000 Jan;55(1):2-10.
5. Warner J.O., The early life origins of asthma and related allergic disorders. *Arch Dis Child*. 2004 Feb;89(2):97-102.
6. Gilliland F.D., Li Y.F., Peters J.M. Effects of maternal smoking during pregnancy and environment tobacco smoke on asthma and wheezing in children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Feb;163(2):429-36.
7. 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.
8. Fanos V., Atzori L., Makarenko K., Melis G.B., Ferrazzi E. Metabolomics application in maternal-fetal medicine. *Biomed Res Int*. 2013;2013:720514.
9. Sozanskii A.M. The biochemical composition of amniotic fluid and maternal and fetal blood at various periods of pregnancy. *Biull Eksp Biol Med*. 1961 Sep;51:323-6.
10. Underwood M.A., Gilbert W.M., Sherman M.P. Amniotic fluid: not just fetal urine anymore. *J Perinatol*. 2005, May;25(5):341-8.
11. Cho C.K., Shan S.J., Winsor E.J., Diamandis E.P. Proteomics analysis of Human amniotic fluid. *Mol Cell Proteomics* 2007;6:1406-15.
12. Jauniaux E., Hempstock J., Teng C., Battaglia F.C. and Burton GJ. Polyol concentrations in the fluid compartments of the human conceptus during the first trimester of pregnancy: maintenance of redox potential in a low oxygen. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Feb;90(2):1171-5. Epub 2004 Nov 23.
13. Smith I.C, Blandford D.E. Nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anal Chem*. 1995 Jun 15;67(12):509R-518R.
14. Sims C.J., Fujito D.T., Burholt D.R., Dadok J. and Wilkinson D.A. Comparison of metabolite levels in second and third trimester human amniotic fluid samples using proton magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Maternal-Fetal Investigation*, 1996, 6(2): 62-66.
15. Graça G, Duarte I.F, Goodfellow B.J., Barros A.S., Carreira I.M., Couceiro A.B., Spraul M., Gil A.M. Potential of NMR spectroscopy for the study of human amniotic fluid. *Anal Chem*. 2007 Nov 1;79(21):8367-75.
16. Graça G, Duarte I.F., J Goodfellow B., Carreira I.M., Couceiro A.B., Domingues Mdo R., Spraul M., Tseng L.H., Gil A.M. Metabolite profiling of human amniotic fluid by hyphenated NMR spectroscopy. *Anal Chem*. 2008 Aug 1;80(15):6085-92.
17. Romero R., Mazaki-Tovi S., Vaisbuch E., Kusanovic J.P., Chaiworapongsa T., Gomez R., Nien J.K., Yoon B.H., Mazor M., Luo J., Banks D., Ryals J., Beecher C. Metabolomics in

Premature Labor: A novel approach to identify patients at risk of preterm delivery. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2010 Dec;23(12):1344-59.

18. Groenen P.M., Engelke U.F., Wevers R.A., Hendriks J.C., Eskes T.K., Merkus H.M., Steegers-Theunissen R.P. High-resolution ¹H NMR spectroscopy of amniotic fluids from spina bifida fetuses and controls. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004 Jan 15;112(1):16-23.
19. Graça G, Goodfellow B.J., Barros A.S., Diaz S., Duarte I.F., Spagou K., Veselkov K., Want E.J., Lindon J.C., Carreira I.M., Galhano E., Pita C., Gil A.M. UPLC-MS metabolic profiling of second trimester amniotic fluid and maternal urine and comparison with NMR spectral profiling for the identification of pregnancy disorder biomarkers. *Mol Biosyst.* 2012 Apr;8(4):1243-54.
20. Goldenberg R.L., Culhane J.F., Iams J.D., Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet.* 2008 Jan 5;371(9606):75-84.
21. Iams J.D., Romero R., Culhane J.F., Goldenberg R.L. Primary, secondary, and tertiary interventions to reduce the morbidity and mortality of preterm birth. *Lancet.* 2008 Jan 12;371(9607):164-75.
22. Muglia L.J., Katz M.. The enigma of spontaneous preterm birth. *N Engl J Med.* 2010 Feb 11;362(6):529-35.
23. Baraldi E., Filippone M. Chronic lung disease after premature birth. *N Engl J Med.* 2007 Nov 8;357(19):1946-55.
24. Northway M.G. et al. Pulmonary disease following respiratory therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia. *N Engl J Med.* 1967 Feb 16;276(7):357-68.
25. Northway M.G. et al. Bronchopulmonary dysplasia: then and now. *Arch Dis Child.* 1990 Oct;65(10 Spec No):1076-81. Review
26. Bancalari E., Claure N. Definitions and diagnostic criteria for bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol.* 2006 Aug;30(4):164-70.
27. Coalson JJ. Pathology of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol.* 2006 Aug;30(4):179-84.
28. Ehrenkranz R.A., Walsh M.C., Vohr B.R., Jobe A.H., Wright L.L., Fanaroff A.A., Wraga L.A., 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.
29. Jobe A.H., Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Jun;163(7):1723-9.

30. Bhandari A., Bhandari V. Biomarkers in bronchopulmonary dysplasia. *Paediatr Respir Rev.* 2013 Sep;14(3):173-9.
31. Bhandari V. Postnatal inflammation in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2014 Mar;100(3):189-201.
32. Stoll B.J. et al. Infections in VLBW infants: studies from the NICHD Neonatal Research Network. *Semin Perinatol.* 2003 Aug;27(4):293-301.
33. Romero R. Prenatal medicine: the child is the father of the man. 1996. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2009 Aug;22(8):636-9.
34. Bock JL. Metabolic profiling of amniotic fluid by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy: correlation with fetal maturation and other clinical variables. *Clin Chem.* 1994 Jan;40(1):56-61.
35. Liu K.-Z., Dembinski T, C. and Mantsch H, H. Prediction of RDS from amniotic fluid analysis: a comparison of the prognostic value of TLC and infra-red spectroscopy. *Prenatal Diagnosis*, 1998, 18(12): 1267-1275.
36. Greenough A. Prenatal factors in the development of chronic lung disease. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2009 Dec;14(6):339-44.
37. Graça G, Duarte I.F, Barros A.S., Goodfellow B.J., Diaz S., Carreira I.M., Couceiro A.B., Galhano E., Gil A.M.. (1)H NMR based metabolomics of human amniotic fluid for the metabolic characterization of fetus malformations. *J Proteome Res.* 2009 Aug;8(8):4144-50.
38. Graca G, Duarte I.F., Barros A.S., Goodfellow B.J., Diaz S.O., Pinto J., Carreira I.M., Galhano E., Pita C., Gil A.M. Impact of prenatal disorders on the metabolic profile of second trimester amniotic fluid: a nuclear magnetic resonance metabolomic study. *J Proteome Res.* 2010 Nov 5;9(11):6016-24.
39. Wendell S.G., Baffi C., Holguin F. Fatty acids, inflammation, and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2014 May;133(5):1255-64.
40. Bernal A.L., Phizackerley P.J. Fetal surfactant as a source of arachidonate in human amniotic fluid. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2000 Jan;60(1-3):59-70.
41. Frank L., Sosenko I.R. Undernutrition as a major contributing factor in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Am Rev Respir Dis.* 1988 Sep;138(3):725-9.
42. Sims, C. J., Fujito, D. T., Burholt, D. R., Dadok, J. and Wilkinson, D. A.; Comparison of metabolite levels in second and third trimester human amniotic fluid samples using proton magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Maternal-Fetal Investigation*, 1996, 6(2): 62-66.

43. Graca G. et al. UPLC-MS metabolic profiling of second trimester amniotic fluid and maternal urine and comparison with NMR spectral profiling for the identification of pregnancy disorder biomarkers. *Mol Biosyst.* 2012 Apr;8(4):1243-54.
44. Houben M.L., Nikkels P.G., van Bleek G.M., Visser G.H., Rovers M.M., Kessel H., de Waal W.J., Schuijff L., Evers A., Kimpen J.L., Bont L. The association between intrauterine inflammation and spontaneous vaginal delivery at term: a cross-sectional study. *PLoS One.* 2009 Aug 10;4(8):e6572.

CAPITOLO 3

CARNITINA ED ACILCARNITINE NEL NEONATO A TERMINE E PRETERMINE: ANALISI QUANTITATIVA MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA/SPETTROMETRIA DI MASSA

INTRODUZIONE

1. Carnitina e Acilcarnitine

La carnitina è un composto presente in tutti i mammiferi, noto per la sua funzione nel trasporto degli acidi grassi all'interno dei mitocondri [1]. È stata isolata per la prima volta nel 1905 [2] come composto quantitativamente importante nel tessuto muscolare, la sua struttura chimica (Fig.1) è stata definita nel 1927 [3] e solo negli anni '50 è stata accertata la sua importanza nell'ossidazione degli acidi grassi [4].

La carnitina è una molecola polare a basso peso molecolare, che contenendo un

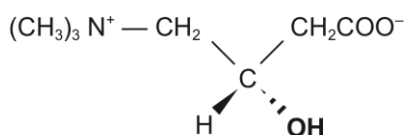


Fig. 1: Carnitina

carbonio chirale può presentarsi sotto forma di due enantiomeri: D- e L-carnitina, di cui solo l'isomero L- è fisiologicamente attivo. La capacità di formare legami forti tra acidi carbossilici

ed il suo gruppo ossidrilico porta alla

formazione delle acilcarnitine [5] fondamentali per il trasporto degli acidi grassi attraverso le membrane mitocondriali. Gli acidi grassi con catene costituite da un numero di atomi di carbonio uguale o inferiore a 12 possono entrare nel mitocondrio senza l'aiuto di trasportatori di membrana, ma quelli con catene più lunghe, che costituiscono la maggior parte degli acidi grassi liberi ottenuti dalla dieta o rilasciati dal tessuto adiposo, necessitano di una serie di reazioni enzimatiche dette sistema navetta o shuttle della carnitina [6] (Fig.2). Queste reazioni enzimatiche portano alla formazione di acilcarnitine a catena corta (C₂-C₅), media (C₆-C₁₀) o lunga (C₁₂-C₁₈) [7], che possono oltrepassare la membrana mitocondriale. Nella matrice mitocondriale le catene

carboniose vengono poi separate dalla carnitina e utilizzate per produrre energia attraverso la loro ossidazione.

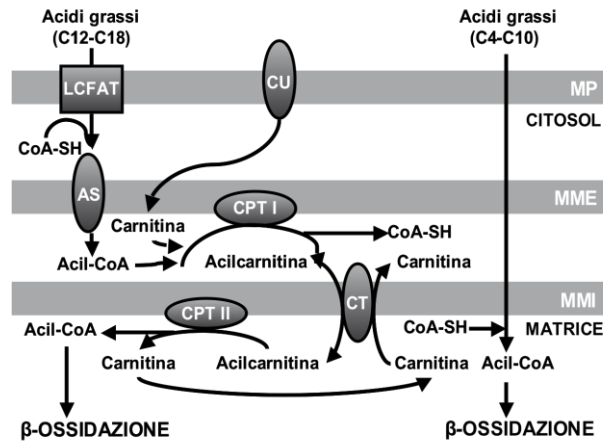


Fig. 2: ingresso degli acidi grassi nei mitocondri. LCFAT: trasportatore di acidi grassi a catena lunga; CU: uptake cellulare della carnitina; AS: acil-CoA sintetasi; CPT: carnitina palmitoil transferasi; CT: carnitina acilcarnitina traslocasi; MP: membrana plasmatica; MME: membrana mitocondriale esterna; MMI: membrana mitocondriale interna.

Le acilcarnitine non possono essere considerate solo come un prodotto intermedio dello “shuttle della carnitina”, ma anche come indicatori di un alterato metabolismo mitocondriale e possono quindi essere analizzate per definire adeguatamente lo stato metabolico di un soggetto. Le concentrazioni della L-carnitina e dei suoi esteri infatti si mantengono normalmente entro limiti relativamente stretti per garantire il normale funzionamento del processo di ossidazione degli acidi grassi e la disponibilità di CoA libero.

Il pool della carnitina svolge funzioni essenziali nell’ambito dei seguenti processi:

- ossidazione mitocondriale degli acidi grassi
- ossidazione perossisomiale
- omeostasi acil-CoA/CoA libero mitocondriale
- rimozione di gruppi acilici in eccesso.

Altre funzioni della carnitina individuate negli ultimi anni riguardano: l’attivazione della glicolisi anaerobia, l’aumento della funzionalità della catena respiratoria, il metabolismo degli amminoacidi, la donazione di gruppi acilici per i processi di

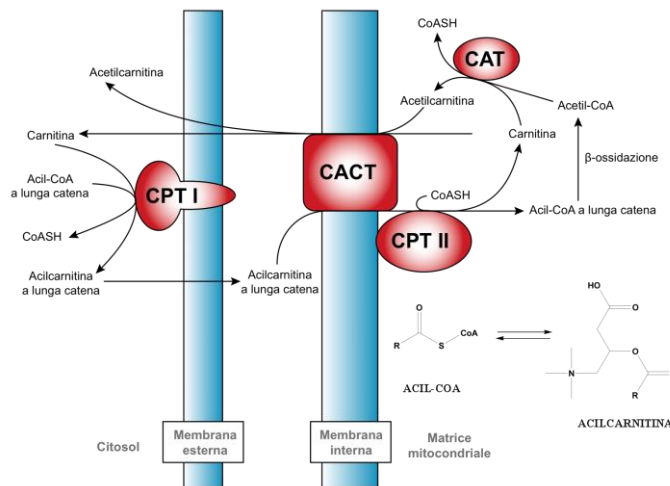
biosintesi, l'attività colino-mimetica, la stabilizzazione delle membrane e l'azione antiossidante.

La funzione della L-carnitina più importante e maggiormente studiata è il trasporto degli acidi grassi all'interno dei mitocondri. Il sistema navetta della carnitina è costituito dall'insieme di tre reazioni:

1. La prima reazione è catalizzata da una famiglia di isozimi specifici per acidi grassi a catena corta, media e lunga: le acil-CoA;
2. Nello spazio intermembrana avviene la seconda reazione dello shuttle catalizzata dalla carnitina aciltransferasi, presente sulla faccia esterna della membrana mitocondriale interna [8];
3. La terza ed ultima reazione, inversa rispetto alla seconda, consiste in una tioesterificazione. In questa reazione i gruppi acilici passano dall'acilcarnitina al CoA.
 - L-carnitina libera, che può uscire dalla matrice mitocondriale e raggiungere lo spazio intermembrana attraverso il trasportatore acilcarnitina/carnitina;
 - Acil-CoA, che può entrare nella via della β -ossidazione degli acidi grassi [9].

Gli acidi grassi a catena molto lunga vengono ossidati inizialmente nei perossisomi [10], in cui vi è un sistema enzimatico per la β -ossidazione particolarmente attivo nell'accorciamento di queste lunghe catene. Questi organelli a differenza dei mitocondri sono delimitati da una membrana permeabile agli acil-CoA, non necessitano perciò della carnitina per il loro trasporto [11].

Inoltre la carnitina regola il rapporto CoA libero-AcilCoA svolgendo una funzione tampone, che consente di estromettere dal mitocondrio i gruppi acilici in eccesso. Sia in condizioni di normalità che in quelle di patologia, la carnitina presente nella matrice dell'organello si lega ai gruppi acilici derivanti dagli acil-CoA in una reazione catalizzata dalla carnitina-palmitoiltransferasi II. Questa transesterificazione porta alla formazione di acilcarnitine ed alla liberazione di CoA, che può così essere utilizzato in altre reazioni mitocondriali [14]. L'accumulo di questi intermedi non destinati alla degradazione è tossico per la cellula, e vengono allontanati attraverso la formazione delle acilcarnitine, che escono dal mitocondrio e successivamente dalla cellula (Fig.3).



CPT: carnitina palmitoil-transferasi; CACT: trasportatore acilcarnitina/carnitina; CAT: carnitina acetil transferasi

Fig.3: Acil-CoA e Acil-Carnitina sono in equilibrio. L'Acil-Carnitina può essere trasportata fuori dalla cellula, riflettendo l'accumulo di Acil-CoA.

Alterazioni del rapporto extramitocondriale L-carnitina - acilcarnitine, potendo queste ultime oltrepassare la membrana del mitocondrio, riflette quindi eventuali alterazioni nel rapporto intramitocondriale tra acil-CoA e CoA libero [15]. La funzione svolta nella regolazione dell'omeostasi intracellulare del CoA, appena descritta, è strettamente correlata alla rimozione dei gruppi acilici in eccesso e potenzialmente tossici che possono derivare da xenobiotici [16]. Altre funzioni importanti della carnitina sono:

- Attivazione della glicolisi aerobia
- Aumento della funzionalità della catena respiratoria
- Metabolismo degli amminoacidi
- Donatore di gruppi acilici per la biosintesi
- Attività colino mimetica
- Stabilizzazione delle membrane ed azione antiossidante

1.1 Ossidazione degli acidi grassi e acilcarnitine

La fonte di energia primaria per l'organismo è il glucosio, fornito sia dalla dieta che dalle riserve di glicogeno epatiche e muscolari. In condizioni di stress catabolico e di depauperamento di tali riserve il livello di insulina diminuisce mentre aumenta quello del glucagone, che stimola l'attività delle lipasi con conseguente rilascio degli acidi

grassi a lunga catena, saturi e mono- e di-insaturi, dai trigliceridi presenti nel tessuto adiposo. Gli acidi grassi liberi entrano nel circolo sanguigno, dove si legano a delle lipoproteine per essere trasportati ai tessuti che li utilizzano, in particolare a muscoli e fegato dove il loro ingresso all'interno delle cellule è mediato da trasportatori della membrana plasmatica tessuto-specifici [17]. L'acetil-CoA generato può avere destini alternativi a seconda del tessuto in cui viene prodotto. Nel fegato l'acetil-CoA può essere convertito in corpi chetonici, che forniscono energia a cervello ed altri tessuti quando il glucosio non è disponibile.

1.2 La β -ossidazione e La ω -ossidazione

Gli acidi grassi destinati all'ossidazione nel mitocondrio per prima cosa devono essere attivati attraverso il legame con il Coenzima A, catalizzato da una acil-CoA sintetasi ATP-dipendente, che porta alla formazione dei rispettivi esteri: gli acil-CoA. L'attivazione del carbonio C-1 attraverso il legame col coenzima A consente l'ossidazione a tappe del gruppo acilico a livello della posizione C-3, carbonio definito anche β , da cui la denominazione del processo: la β -ossidazione.

L'ossidazione mitocondriale completa degli acidi grassi ha luogo in tre fasi:

Tabella. 1: Specificità degli enzimi che catalizzano l'ossidazione di acidi grassi a catena lunga (LCFA), media (MCFA) e corta (SCFA).

	LCFA		MCFA	SCFA
Acil-CoA deidrogenasi	VLCAD		MCAD	SCAD
Enoil-CoA idratasi	LHYD	Proteina Trifunzionale	Crotonasi	Crotonasi
3-OH Acil-CoA deidrogenasi	LCHAD		M/SCHAD	M/SCHAD
3-cheto Acil-CoA tiolasi	LKAT		MKAT	SKAT

La β -ossidazione degli acidi grassi è regolata innanzitutto dal rapporto insulina/glucagone, che quando è basso stimola la mobilizzazione dei trigliceridi e quindi il rilascio dei substrati utilizzati in questa via metabolica. All'interno delle cellule

la regolazione avviene a livello dell'entrata degli acidi grassi nel mitocondrio, basata sull'effetto del livello di malonil-CoA sull'attività di CPT I. Il malonil-CoA funge da segnale della quantità di carboidrati disponibili ed è substrato chiave per l'attivazione della via biosintetica degli acidi grassi. Un eccesso di carboidrati nell'organismo porta ad un turnover all'interno del ciclo di Krebs più elevato di quanto necessario, con la conseguenza di un accumulo di citrato nella matrice mitocondriale [18,19].

La β -ossidazione è il destino catabolico più importante per gli acidi grassi, tuttavia esiste un'altra via di ossidazione che coinvolge il carbonio ω , ossia il più distante dal gruppo carbossilico: la ω -ossidazione. Questa via assume una maggiore importanza nel momento in cui vi siano alterazioni nel funzionamento della β -ossidazione.

Gli enzimi della ω -ossidazione si trovano nel reticolo endoplasmatico del fegato e del rene ed i loro substrati preferenziali sono gli acidi grassi da 10 a 12 atomi di carbonio [20].

1.3 Acilcarnitine e metabolismo degli amminoacidi

I processi metabolici degli amminoacidi convergono verso la formazione di sei prodotti principali, tutti in grado di entrare nel ciclo dell'acido citrico: acetil-CoA, α -chetoglutarato, succinil-CoA, fumarato, ossalacetato e piruvato. Parti diverse dello scheletro carbonioso dello stesso amminoacido possono percorrere diverse vie metaboliche ed avere quindi destini diversi.

Leucina, isoleucina e valina sono amminoacidi a catena ramificata che vengono utilizzati come fonti energetiche, in particolare nel muscolo, nel rene, nel tessuto adiposo e nervoso. In questi tessuti extraepatici è contenuta un'amminotransferasi, assente nel fegato, in grado di agire su tutti e tre gli amminoacidi con catena laterale ramificata, producendo i corrispondenti α -chetoacidi.

Alcune evidenze sperimentali indicano che il complesso dell' α -chetoacido a catena ramificata deidrogenasi è regolato mediante modificazioni covalenti innescate in risposta alla quantità di amminoacidi a catena laterale ramificata presente nella dieta. L'eccesso di questi amminoacidi porta alla defosforilazione del complesso enzimatico e ad un aumento della sua attività [21].

È stato dimostrato che un aumento dei livelli di acilcarnitine con catene lunghe 4 e 5 atomi di carbonio indicano un aumento nel turnover degli amminoacidi a catena ramificata [22].

2. Omeostasi del pool della carnitina

Data la fondamentale importanza della L-carnitina e dei suoi esteri non stupisce che la loro concentrazione plasmatica e tissutale normalmente si mantenga entro limiti relativamente stretti. L'omeostasi è garantita da diversi fattori: assunzione e assorbimento attraverso la dieta, biosintesi de novo, distribuzione nei tessuti mediata da trasportatori, escrezione e riassorbimento renale (Fig.4).

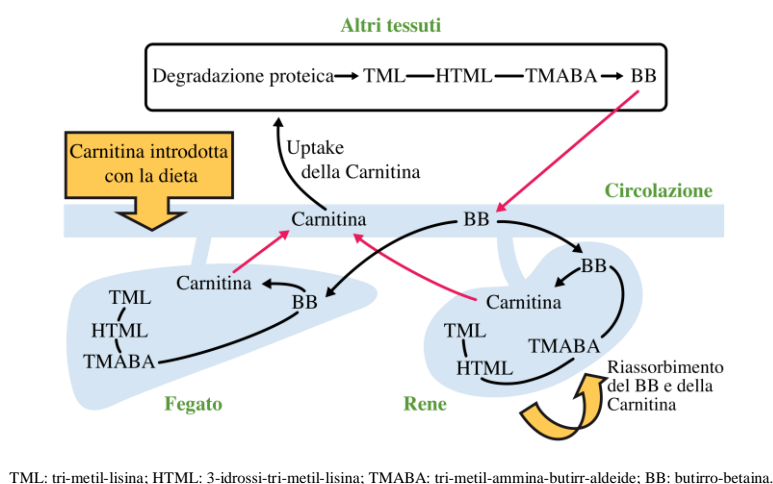


Fig.4: origine e distribuzione della carnitina.

2.1 Sintesi

Se si mantiene una dieta ricca di carnitina la biosintesi de novo apporta una quota pari approssimativamente al 25% della concentrazione totale.

La L-carnitina è sintetizzata a partire da due amminoacidi essenziali, lisina e metionina, a livello di rene, fegato e cervello. Cofattori essenziali per la sua sintesi sono l'acido ascorbico (vitamina C), il ferro, la piridossina (vitamina B6) e la niacina (vitamina B3) [23] e la carenza di uno di questi potrebbe quindi portare a deficit di carnitina.

Gli enzimi necessari per la sintesi sono ubiquitari, con l'eccezione della 4-N-trimetilaminobutiraldeide deidrogenasi, che nell'uomo si trova solo nel fegato, nel

cervello e nei reni [24]. Negli adulti questo enzima è maggiormente attivo a livello renale.

2.2 Distribuzione

La L-carnitina si distribuisce in molti tessuti del corpo e si concentra maggiormente nei muscoli scheletrici e nel miocardio. La maggior parte si trova a livello intracellulare (99%) [25] mentre solo una piccola frazione nel plasma. Questa grande differenza di concentrazione tra plasma e tessuti rende necessaria la presenza di un sistema di trasporto energia dipendente, che consenta alla carnitina di accumularsi nei tessuti. La capacità di uptake della carnitina varia da tessuto a tessuto.

Il legame con le proteine plasmatiche varia in base alla lunghezza della catena acilica: la L-carnitina e le acilcarnitine a catena corta (acetil- e propionil-carnitina) non vi si legano, mentre la percentuale di acilcarnitine che si legano aumenta all'aumentare della lunghezza della catena acilica, fino ad arrivare al legame totale delle acilcarnitine a catena lunga.

La regolazione della distribuzione tissutale è parzialmente controllata dagli ormoni, fra cui glucagone e insulina [26] e ormoni sessuali. L'età ed il sesso sono stati correlati con una diversa distribuzione, probabilmente in conseguenza della variazione degli ormoni sessuali [27].

2.3 Escrezione e riassorbimento

La prima via di eliminazione della L-carnitina è l'escrezione renale. Essendo una piccola molecola polare non legata alle proteine plasmatiche viene filtrata a livello glomerulare con clearance uguale alla velocità di filtrazione glomerulare, ma più del 95% viene riassorbita a livello del tubulo prossimale grazie al trasportatore OCTN2. Il riassorbimento tubulare varia a seconda della concentrazione della carnitina: aumenta quando si ha un ridotto apporto e si riduce quando vi è un aumento della concentrazione. Anche le acilcarnitine vengono riassorbite grazie a OCTN2, ma la loro clearance è 4-8 volte più alta rispetto a quella della L-carnitina.

2.4 Analisi della composizione del pool della carnitina

Le acilcarnitine costituiscono una famiglia composta da molti esteri, dei quali l'acetil-carnitina è il più abbondante. Nel corso degli anni l'analisi quantitativa dei composti della carnitina è stata effettuata utilizzando diverse tecniche. Inizialmente si impiegarono metodi di analisi enzimatici, che però consentivano di dedurre solo la quantità di acilcarnitine nel loro complesso mediante sottrazione, utilizzando i dati riguardanti la concentrazione della L-carnitina e quella totale del pool della carnitina. Grazie ad alcune modifiche con lo stesso metodo è stato possibile anche misurare direttamente l'acetil-carnitina. L'utilizzo della cromatografia ha poi consentito la misurazione specifica di acilcarnitine a catena corta e media.

L'innovazione più significativa è stata l'introduzione della spettrometria di massa tandem (MS/MS), con la quale si possono misurare singolarmente L-carnitina e acilcarnitine a catena corta, media e lunga. La spettrometria di massa è una tecnica analitica di largo impiego, necessita di quantità di campione estremamente limitate ed è caratterizzata da una elevata sensibilità, consente l'analisi di metaboliti presenti a concentrazioni molto basse anche in miscele complesse. Quest'ultima tecnica è largamente usata in molti laboratori ospedalieri per eseguire programmi di screening neonatale su spot di sangue al fine di individuare tempestivamente i disordini della β -ossidazione mitocondriale degli acidi grassi [28] che portano ad un accumulo di acil-CoA, che si riflette in un alterato profilo delle acilcarnitine. A determinati difetti enzimatici corrisponde infatti un'alterata concentrazione di specifiche acilcarnitine, più agevoli da misurare rispetto agli acil-CoA.

Per aumentare la sensibilità e la specificità dell'analisi e per poter distinguere tra loro gli isomeri, si può usare la cromatografia liquida ad alte prestazioni (*Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC) con una colonna che permetta di separare le acilcarnitine ed i loro isomeri, associata poi alla MS/MS, utilizzando la tecnica *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), in cui vengono seguite solo delle transizioni selezionate, analizzando molecole già caratterizzate, di cui si conosce lo ione precursore e lo ione frammento.

OBIETTIVI DELLO STUDIO

Le importanti funzioni fisiologiche svolte dalla carnitina e dai suoi esteri ed il loro utilizzo a fini diagnostici e terapeutici hanno portato ad un crescente interesse verso queste molecole. Grazie ad analisi sempre più specifiche è stato possibile individuare gli intervalli di normalità per i valori delle concentrazioni plasmatiche di carnitina libera e della maggior parte dei suoi esteri. Tali intervalli sono stati definiti anche per i neonati a termine, ma sebbene sia stato dimostrato che vi sono delle variazioni in base all'età gestazionale [29], ad oggi non sono stati pubblicati sufficienti dati per quanto riguarda i valori di riferimento per i neonati pretermine, soprattutto alle età gestazionali più basse. I progressi analitici e le possibilità offerte dalle nuove tecniche di separazione mediante cromatografia liquida ad alta pressione associate all'analisi mediante spettrometria di massa hanno consentito di allargare lo spettro delle acilcarnitine rilevabili, rispetto ai metodi utilizzati in letteratura (prevalentemente fatti per introduzione diretta, FIA) e di analizzare correttamente anche le forme isomeriche e isobariche. Questo metodo comporta un'importante ricaduta delle nostre conoscenze sul metabolismo intermedio del neonato pretermine e apre la strada ad un miglioramento diagnostico degli errori congeniti del metabolismo come second-tier test.

Scopi del presente lavoro sono stati:

- Mettere a punto il quadro dei valori di concentrazione delle acilcarnitine plasmatiche nel neonato a termine e pretermine, estendendo il numero dei metaboliti analizzati, grazie all'impiego di un nuovo metodo basato sull'impiego di UPLC-MS/MS;
- Analizzare, con la stessa tecnica UPLC-MS/MS, la concentrazione della carnitina e delle acilcarnitine su campioni ottenuti con quantità esigue a partire da gocce di sangue (dried blood spot: DBS) raccolte e depositate su carta da filtro;
- Lo scopo futuro sarà quello di applicare l'approccio metabolomico alle due coorti di neonati al fine di valutare la presenza di biomarker discriminanti e di correlarli al profilo degli acidi grassi ramificati.

MATERIALI E METODI

1. Soggetti

Lo studio è stato svolto presso il Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino dell'Università di Padova, dopo approvazione del comitato etico. E' stato ottenuto il consenso informato scritto dei genitori prima dell'inclusione dei soggetti nello studio stesso.

Sono stati arruolati 157 neonati, ricoverati nei reparti di Assistenza Neonatale (Nido) e di Patologia e Terapia Intensiva Neonatale. Al fine dell'inclusione nello studio i soggetti sono stati valutati entro 24 ore dal loro ingresso.

I criteri di inclusione sono stati:

- Assenza di patologia metabolica evidente alla nascita e durante la degenza ospedaliera
- Assenza di malformazioni congenite maggiori

I criteri di esclusione sono stati:

- il rifiuto del consenso da parte dei genitori, il sospetto di patologie metaboliche ereditarie e la presenza di una malformazione congenita maggiore.

I 157 pazienti sono stati suddivisi in quattro gruppi a seconda dell'età gestazionale:

- Gruppo 1 (G1): 22-27+6 settimane gestazionali; 18 soggetti
- Gruppo 2 (G2): 28-31+6 settimane gestazionali; 41 soggetti
- Gruppo 3 (G3): 32-36+6 settimane gestazionali; 47 soggetti
- Gruppo 4 (G4): 37-41+6 settimane gestazionali; 51 soggetti

2. Raccolta dei campioni

Tra le 48 e le 72 ore dalla nascita da ogni soggetto sono stati raccolti un campione di plasma e uno di sangue intero sotto forma di DBS.

Per ottenere il DBS, dopo disinfezione della cute con soluzione antisettica, è stata effettuata una puntura con lancetta sterile (Tenderfoot). Alcune gocce di sangue intero sono state depositate su una specifica carta assorbente S&S Grade 903 (Whatman, UK); il cartoncino è stato lasciato essiccare a temperatura ambiente e poi conservato a -20°C fino al momento dell'analisi.

Il plasma (circa 10 μ L) è stato ottenuto dal sangue prelevato da tallone con capillari eparinati. I capillari sono stati centrifugati per 5 minuti a 13.000 g. Le aliquote di plasma sono poi state anch'esse conservate a -20°C fino al momento dell'analisi.

3. Reagenti e materiali

Le acilcarnitine non marcate sono state donate da Piero Rinaldo (Mayo Clinic, Rochester, MN, USA). Le acilcarnitine marcate con isotopi stabili, acquistati da ChromSystems Instruments & Chemicals (Monaco, Germania), sono state utilizzate come standard interni [tabella IV, V, VI].

Acetonitrile, metanolo, n-butanolo sono stati acquistati da Carlo Erba (Milano, Italia); acido trifluoroacetico (TFA) e cloruro di acetile da Sigma-Aldrich (Milano, Italia). Tutti i solventi erano di purezza cromatografica.

Tabella 2: Carnitina ed acilcarnitine a catena corta e relativi standard interni

Metabolita	Abbreviazione	Standard interno
Carnitina libera		d9-carnitina libera
Acetil-carnitina	C2	d3-acetil-carnitina
Propionil-carnitina	C3	d3-propionil-carnitina
Malonil-carnitina	C3DC	d3-esanoil-carnitina
Butirril-carnitina	C4	d3-butirril-carnitina
Isobutirril-carnitina	isoC4	d3-butirril-carnitina
3-idrossi-butirril-carnitina	C4OH	d3-butirril-carnitina
Succinil-carnitina	C4DC	d3-esanoil-carnitina
Metil-maloinil-carnitina	C4DC	d3-esanoil-carnitina
2-metil-butirril-carnitina	C5	d9-isovaleril-carnitina
Isovaleril-carnitina	C5	d9-isovaleril-carnitina
2-metil-3-idrossi-butirril-carnitina	C5OH	d9-isovaleril-carnitina
3-metil-crotonil-carnitina	C5:1	d9-isovaleril-carnitina
Glutaril-carnitina	C5DC	d6-glutaril-carnitina

Tabella 3: Carnitina ed acilcarnitine a catena media e relativi standard interni

Metabolita	Abbreviazione	Standard interno
Esanoil-carnitina	C6	d3-esanoil-carnitina
3-idrossi-esanoil-carnitina	C6OH	d3-esanoil-carnitina
Adipoil-carnitina	C6DC	d3-esanoil-carnitina
Octanoil-carnitina	C8	d3-octanoil-carnitina
3-idrossi-octanoil-carnitina	C8OH	d9-isovaleril-carnitina
Octenoil-carnitina	C8:1	d3-octanoil-carnitina
Subaril-carnitina	C8DC	d3-decanoil-carnitina
Decanoil-carnitina	C10	d3-decanoil-carnitina
3-idrossi-decanoil-carnitina	C10OH	d3-esanoil-carnitina
Decenoil-carnitina	C10:1	d3-decanoil-carnitina
Decadienoil-carnitina	C10:2	d3-decanoil-carnitina
Sebacil-carnitina	C10DC	d3-decanoil-carnitina

Tabella 4: Carnitina ed acilcarnitine a catena lunga e relativi standard interni

Metabolita	Abbreviazione	Standard interno
Dodecanoil-carnitina	C12	d3-dodecanoil-carnitina
3-idrossi-dodecanoil-carnitina	C12OH	d3-octanoil-carnitina
Dodecenoil-carnitina	C12:1	d3-dodecanoil-carnitina
Miristoil-carnitina	C14	d3-miristoil-carnitina
3-idrossi-miristoil-carnitina	C14OH	d3-miristoil-carnitina
Tetradecenoil-carnitina	C14:1	d3-miristoil-carnitina
Tetradecanedienoil-carnitina	C14:2	d3-miristoil-carnitina
Palmitoil-carnitina	C16	d3-palmitoil-carnitina
3-idrossi-palmitoil-carnitina	C16OH	d3-miristoil-carnitina
Palmitoleil-carnitina	C16:1	d3-palmitoil-carnitina
3-idrossi-palmitoleil-carnitina	C16:1OH	d3-palmitoil-carnitina
Stearoil-carnitina	C18	d3-stearoil-carnitina
3-idrossi-stearoil-carnitina	C18OH	d3-stearoil-carnitina
Oleil-carnitina	C18:1	d3-stearoil-carnitina
3-idrossi-oleil-carnitina	C18:1OH	d3-stearoil-carnitina
Linoleil-carnitina	C18:2	d3-stearoil-carnitina
3-idrossi-linoleil-carnitina	C18:2OH	d3-stearoil-carnitina

4. Estrazione delle acilcarnitine

La soluzione di estrazione è stata preparata ricostituendo la miscela liofilizzata di acilcarnitine marcate con 50 mL di metanolo. Le acilcarnitine sono state estratte dai campioni di plasma e DBS secondo le seguenti procedure:

- al plasma (6 μ L) sono stati aggiunti 100 μ L della soluzione di metanolo contenente lo standard interno, la miscela è stata congelata a -20°C per 10 minuti e poi centrifugata a 13.000 g per 10 minuti per far precipitare le proteine e poterle rimuovere.
- dai DBS è stato prelevato un dischetto del diametro di 3,2 mm, è stato reidratato con 100 μ L di soluzione di estrazione e sonicato in bagno ad ultrasuoni per 20 minuti.

Il surnatante ottenuto dall'estrazione da plasma o da DBS è stato trasferito in una piastra da 96 pozzetti e lasciato evaporare sotto flusso di azoto a 60°C .

Le acilcarnitine sono state derivatizzate a butilesteri, aggiungendo 100 μ L di butanolo in soluzione al 5% v/v di cloruro di acetile e riscaldando la miscela a 60°C per 20 minuti.

I campioni poi sono stati fatti essiccare, favorendo l'evaporazione con flusso di azoto a 60°C , per poi essere ricostituiti con 50 μ L di una soluzione di acetonitrile/acqua (80:20, v/v) e iniettati in UPLC.

Per quantificare le acilcarnitine sono state costruite delle curve di calibrazione per ciascuna di esse usando il metodo delle diluizioni isotopiche. Il metodo consiste nel preparare 6 punti della curva a differenti concentrazioni di una miscela di acilcarnitine non marcate cui viene aggiunta una quantità costante di una miscela di standard interni. Si prepara la miscela di acilcarnitine non marcate mescolando opportunamente volumi prelevati dalle soluzioni madre di ciascuna acilcarnitina e portando a volume con metanolo in modo da ottenere le concentrazioni finali nell'intervallo utile per la determinazione. I campioni costituenti la curva di calibrazione vengono derivatizzati con la procedura sopra descritta.

5. Analisi dei campioni

L'analisi dei campioni è stata effettuata utilizzando un sistema analitico UPLC (ultra performance liquid chromatography) (Waters), interfacciato con uno spettrometro di massa tandem (MS/MS) a triplo quadrupolo Micromass Quattro Ultima (Waters,

Milford, MA, USA), dotato di una sorgente elettrospray (*electrospray ionization*, ESI) che opera in ionizzazione positiva.

I campioni sono stati posti all'interno dell'UPLC, dove l'autocampionatore prelevava da ciascuno una quota pari a 7 μL , per poi iniettarla in una colonna Acquity UPLC (Waters) BEH C18 (1.7 μm , 2.1 x 150 mm), termostata alla temperatura di 50°C all'interno di un apposito fornello.

L'eluizione dei campioni avveniva con flusso costante di 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ e mediante l'utilizzo di un gradiente, costituito da percentuali diverse delle seguenti soluzioni:

A. H_2O + 0.1% di TFA v/v

B. Acetonitrile + 0.1% di TFA v/v

All'uscita dalla colonna cromatografica, per consentire di utilizzare quantità elevate di solvente senza perturbare troppo la sorgente ionica, il campione veniva splittato 1:10 prima di entrare nella sorgente dello spettrometro di massa. L'acquisizione dell'analisi MS/MS è stata eseguita in MRM. Sono state monitorate le molecole la cui frammentazione produceva ioni con rapporto massa/carica (m/z) pari a 85. I pattern di frammentazione ottimali erano stati precedentemente determinati per ogni acilcarnitina alla concentrazione di circa 10 μM . I dati sono stati acquisiti con MassLynx 4.1 ed elaborati tramite Quan-Lynx. Attraverso l'integrazione delle aree dei picchi dei metaboliti e dei relativi standard interni è stata effettuata la quantificazione degli analiti, ottenuta mediante la comparazione con le corrispondenti curve di calibrazione.

6. Statistica

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando i pacchetti software STATISTICA 6.0 (Stat Soft Inc, Tulsa, USA) e SPSS per Windows (versione 21.0, IBM Corp., Armonk, NY).

Il test di Shapiro-Wilk è stato usato per valutare se la distribuzione delle acilcarnitine fosse normale.

Il test di Kruskal-Wallis e il test U di Mann-Whitney sono stati utilizzati per studiare differenze significative degli analiti tra i gruppi di diversa età gestazionale nei campioni di plasma e DBS. La significatività è stata definita per $p < 0,05$.

RISULTATI

Nei campioni di DBS e plasma raccolti in terza giornata sono state dosate le concentrazioni di carnitina libera e 42 specifiche acilcarnitine. Le acilcarnitine analizzate sono state suddivise in tre gruppi a seconda della lunghezza della catena carboniosa: corta (C2-C5), media (C6-C10) e lunga (C12-C18). Le concentrazioni sono state espresse in $\mu\text{mol/L}$. Le concentrazioni di C6OH, C8OH e C10OH non sono state riportate, poiché sono risultate uguali o inferiori al limite di quantificazione.

La distribuzione dei valori, dopo applicazione del test di Shapiro-Wilk, non è risultata normale e pertanto per ogni metabolita sono stati calcolati la mediana e la distribuzione espressa in percentili (10°, 25°, 75° e 90°). Il confronto fra i dati relativi ai diversi gruppi è stato effettuato utilizzando i test non parametrici di Kruskal-Wallis e di Mann-Whitney.

1. Profilo delle acilcarnitine nei campioni di plasma

1.1 Carnitina ed acilcarnitine a catena corta

In tabella 5 sono stati riportati per ciascun gruppo di età gestazionale (G1, G2, G3, G4) i valori riscontrati nei campioni di plasma relativi a carnitina ed acilcarnitine a catena corta. Nella stessa tabella è stato inoltre inserito per ogni metabolita il livello di significatività p calcolato con il test di Kruskal-Wallis.

A seguire sono stati inseriti i grafici, in cui è possibile osservare l'andamento delle concentrazioni di carnitina libera ed acilcarnitine a catena corta nei quattro gruppi di soggetti (Fig. 5/1-2-3).

Tabella 5: Concentrazioni di carnitina libera ed acilcarnitine a catena corta nei campioni di plasma dei neonati dei quattro gruppi di diversa età gestazionale. Le concentrazioni sono espresse in $\mu\text{mol/L}$; per ogni metabolita sono stati riportati mediana (10° - 90° percentile). La p si riferisce al test di Kruskal Wallis; ns: non significativo.

	G1 (n=18)	G2 (n=41)	G3 (n=47)	G4 (n=51)	p
Carnitina libera	16,637 (6,716 - 23,196)	13,001 (8,485 - 23,690)	12,295 (7,796 - 26,626)	14,602 (9,852 - 21,649)	ns
C₂	5,435 (2,676 - 7,415)	4,775 (3,084 - 9,670)	4,226 (1,817 - 12,711)	12,055 (7,576 - 19,182)	<0,001
C₃	0,539 (0,315 - 0,710)	0,579 (0,291 - 0,766)	0,346 (0,164 - 1,106)	3,544 (1,595 - 6,738)	<0,001
C₃DC	0,029 (0,022 - 0,057)	0,027 (0,018 - 0,043)	0,033 (0,016 - 0,086)	0,084 (0,078 - 0,098)	<0,001
C₄	0,168 (0,131 - 0,423)	0,206 (0,126 - 0,462)	0,192 (0,115 - 0,505)	0,441 (0,378 - 0,555)	<0,001
ISOC₄	0,390 (0,255 - 0,512)	0,313 (0,184 - 0,496)	0,259 (0,141 - 0,485)	0,371 (0,346 - 0,433)	ns
C₄OH	0,258 (0,248 - 0,356)	0,285 (0,252 - 0,371)	0,283 (0,250 - 0,408)	0,338 (0,316 - 0,460)	<0,001
C₄DC succinil	0,088 (0,026 - 0,570)	0,064 (0,039 - 0,300)	0,063 (0,023 - 0,154)	0,099 (0,088 - 0,122)	<0,001
C₄DC metilmalonil	0,019 (0,009 - 0,038)	0,021 (0,010 - 0,035)	0,021 (0,008 - 0,074)	0,073 (0,069 - 0,077)	<0,001
C₅ 2metilbutiril	0,236 (0,115 - 0,409)	0,142 (0,093 - 0,221)	0,084 (0,046 - 0,129)	0,044 (0,033 - 0,070)	<0,001
C₅ isovaleril	0,073 (0,030 - 0,188)	0,069 (0,039 - 0,201)	0,052 (0,038 - 0,153)	0,062 (0,050 - 0,085)	ns
C₅OH	0,057 (0,033 - 0,152)	0,048 (0,024 - 0,065)	0,042 (0,029 - 0,062)	0,040 (0,034 - 0,050)	<0,001
C_{5:1}	0,028 (0,010 - 0,052)	0,025 (0,011 - 0,043)	0,033 (0,023 - 0,039)	0,034 (0,033 - 0,036)	ns
C₅DC	0,058 (0,019 - 0,171)	0,052 (0,023 - 0,091)	0,049 (0,016 - 0,096)	0,100 (0,081 - 0,130)	<0,001

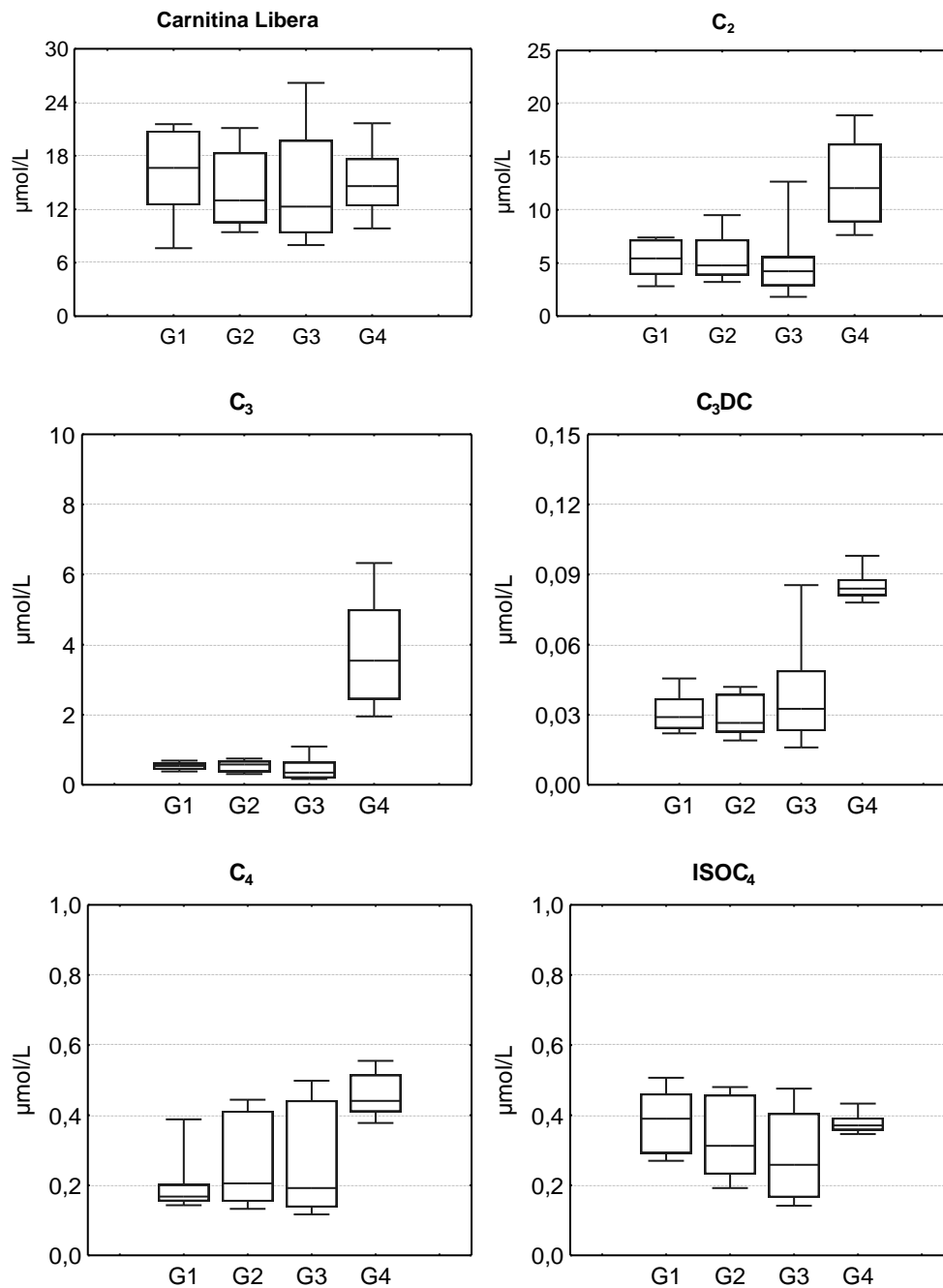


Fig. 5/1: Box plot relativi alle concentrazioni di carnitina libera e acilcarnitine a catena corta (C₂, C₃, C₃DC, C₄, ISOC₄) nei campioni di plasma; ogni diagramma a scatola e baffi riporta la mediana, 25° e 75° percentile (scatola), 10° e 90° percentile (baffi) di ogni metabolita nei quattro gruppi studiati (G1, G2, G3, G4).

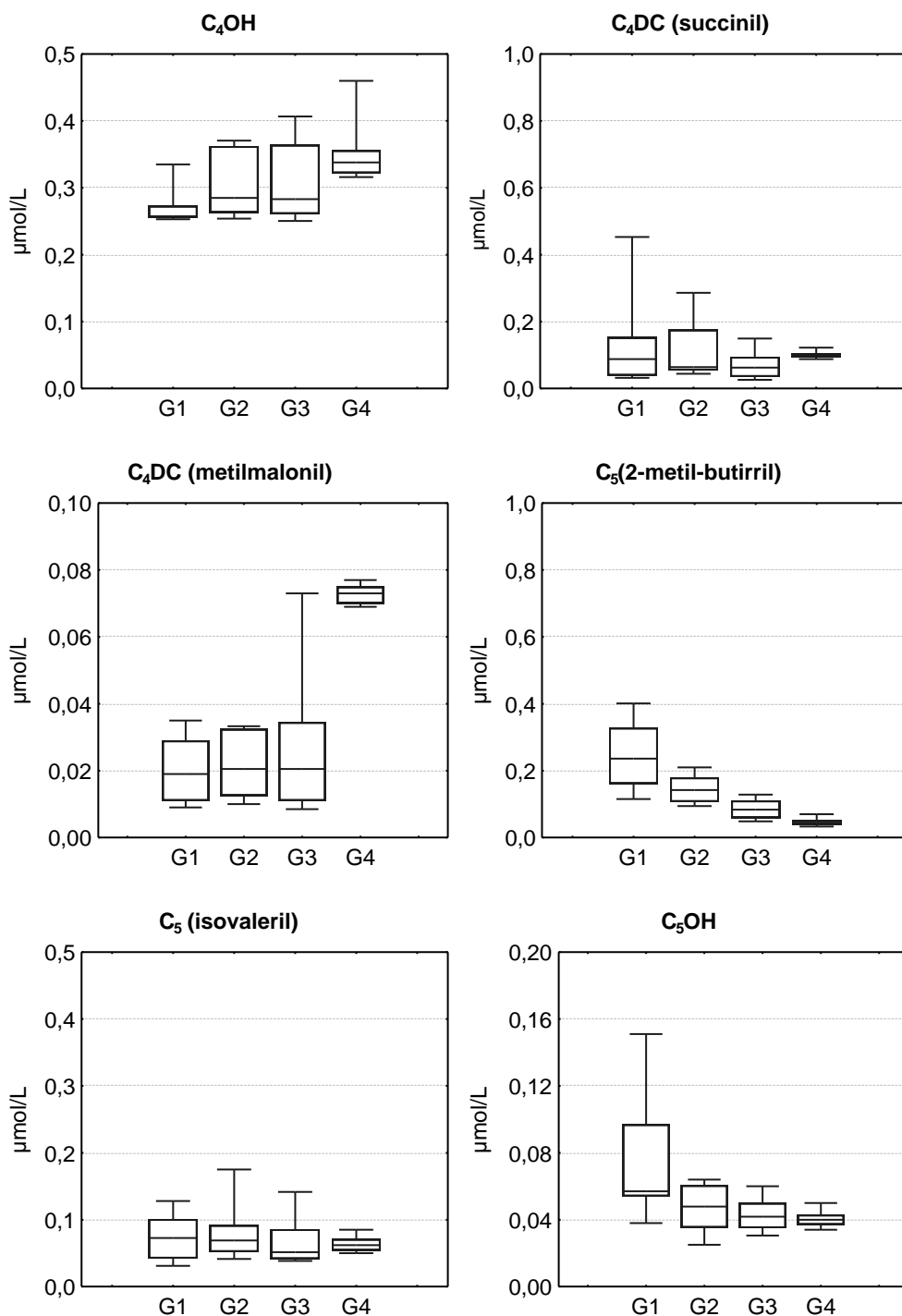


Fig. 5/2: Box plot relativi alle concentrazioni di carnitina libera e acilcarnitine a catena corta ($C_4\text{OH}$, $C_4\text{DC}$ succinil, $C_4\text{DC}$ metilmalonil, C_5 2metilbutirril, C_5 isovaleril, $C_5\text{OH}$) nei campioni di plasma; ogni diagramma a scatola e baffi riporta la mediana, 25° e 75° percentile (scatola), 10° e 90° percentile (baffi) di ogni metabolita nei quattro gruppi studiati (G1, G2, G3, G4).

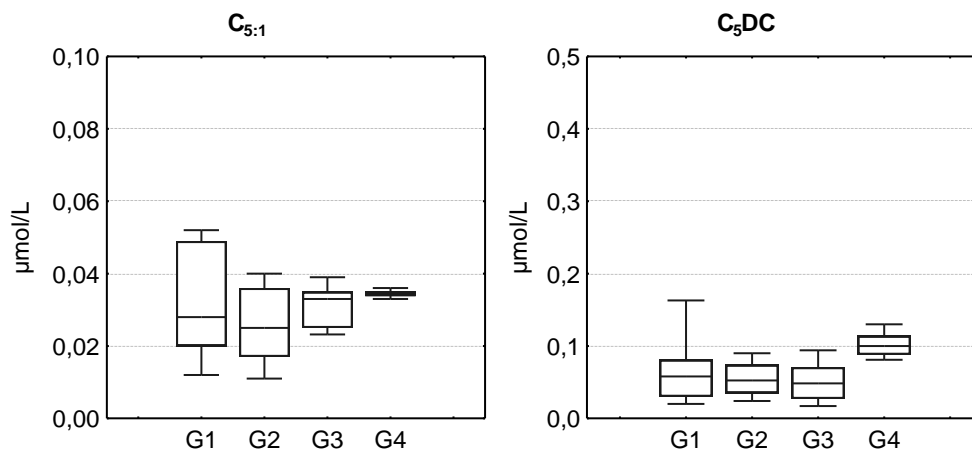


Fig. 5/3: Box plot relativi alle concentrazioni di carnitina libera e acilcarnitine a catena corta (C_{5:1}, C_{5DC}) nei campioni di plasma; ogni diagramma a scatola e baffi riporta la mediana, 25° e 75° percentile (scatola), 10° e 90° percentile (baffi) di ogni metabolita nei quattro gruppi studiati (G1, G2, G3, G4).

In tabella 5 infine sono stati riassunti i risultati del test di Mann-Whitney relativi a carnitina ed acilcarnitine a catena corta.

Tabella 5: Risultati del test di Mann Whitney - carnitina ed acilcarnitine a catena corta.

	G1 vs G4	G2 vs G4	G3 vs G4	G1 vs G2	G1 vs G3	G2 vs G3
Carnitina libera	ns	ns	ns	ns	ns	ns
C2	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns	ns
C3	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns	ns
C3DC	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns	ns
C4	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns	ns
ISOC4	ns	ns	ns	ns	0.034	ns
C4OH	<0.001	0.001	0.007	ns	ns	ns
C4DC	ns	0.003	<0.001	ns	ns	ns
C4DC	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns	ns
C5	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	<0.001	<0.001
C5	ns	ns	ns	ns	ns	ns
C5OH	<0.001	0.020	ns	0.018	0.002	ns
C5:1	ns	ns	0.012	ns	ns	ns
C5DC	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns	ns

1.2 Acilcarnitine a catena media

In tabella 6 sono stati riportati per ciascun gruppo di età gestazionale (G1, G2, G3, G4) i valori riscontrati nei campioni di plasma relativi alle acilcarnitine a catena media. Nelle stesse tabelle è stato inoltre inserito per ogni metabolita il livello di significatività p calcolato col test di Kruskal-Wallis.

A seguire sono stati inseriti i grafici (figura 6/1-2), in cui è possibile osservare l'andamento delle concentrazioni delle acilcarnitine a catena media nei quattro gruppi di soggetti.

Tabella 6: Concentrazioni delle acilcarnitine a catena media nei campioni di plasma dei neonati dei quattro gruppi di diversa età gestazionale. Le concentrazioni sono espresse in $\mu\text{mol/L}$; per ogni metabolita sono stati riportati mediana (10° - 90° percentile). La p si riferisce al test di Kruskal Wallis; ns: non significativo.

	G1 (n=18)	G2 (n=41)	G3 (n=47)	G4 (n=51)	p
C₆	0,022 (0,014 - 0,041)	0,028 (0,012 - 0,058)	0,031 (0,012 - 0,115)	0,102 (0,084 - 0,151)	<0,001
C₆DC	0,048 (0,017 - 0,631)	0,044 (0,014 - 0,433)	0,042 (0,012 - 0,189)	0,134 (0,105 - 0,192)	<0,001
C₈	0,027 (0,018 - 0,043)	0,029 (0,014 - 0,080)	0,021 (0,009 - 0,091)	0,088 (0,059 - 0,198)	<0,001
C_{8:1}	0,037 (0,015 - 0,071)	0,035 (0,018 - 0,068)	0,044 (0,014 - 0,178)	0,062 (0,027 - 0,177)	<0,001
C₈DC	0,009 (0,005 - 0,015)	0,008 (0,005 - 0,016)	0,009 (0,004 - 0,045)	0,031 (0,020 - 0,050)	<0,001
C₁₀	0,032 (0,017 - 0,075)	0,037 (0,013 - 0,104)	0,029 (0,014 - 0,146)	0,200 (0,101 - 0,411)	<0,001
C_{10:1}	0,035 (0,020 - 0,068)	0,038 (0,017 - 0,081)	0,035 (0,010 - 0,126)	0,071 (0,043 - 0,133)	<0,001
C_{10:2}	0,008 (0,004 - 0,019)	0,007 (0,004 - 0,013)	0,007 (0,004 - 0,021)	0,016 (0,013 - 0,022)	<0,001
C₁₀DC	0,007 (0,004 - 0,010)	0,004 (0,004 - 0,010)	0,004 (0,003 - 0,028)	0,020 (0,015 - 0,030)	<0,001

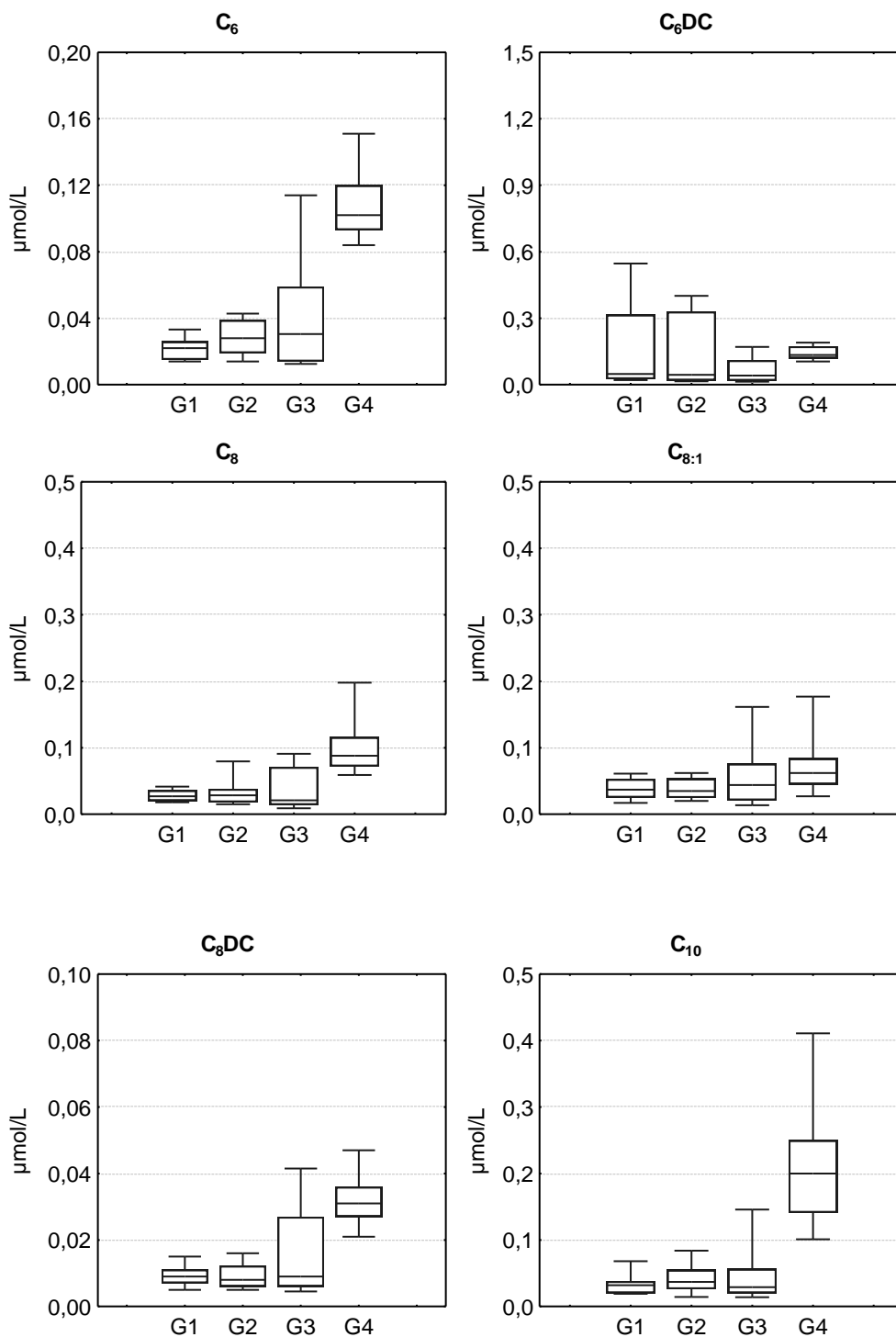


Fig. 6/1: Box plot relativi alle concentrazioni di acilcarnitine a catena media (C_6 , $C_6\text{DC}$, C_8 , $C_{8:1}$, $C_8\text{DC}$, C_{10}) nei campioni di plasma; ogni diagramma a scatola e baffi riporta la mediana, 25° e 75° percentile (scatola), 10° e 90° percentile (baffi) di ogni metabolita nei quattro gruppi studiati (G1, G2, G3, G4).

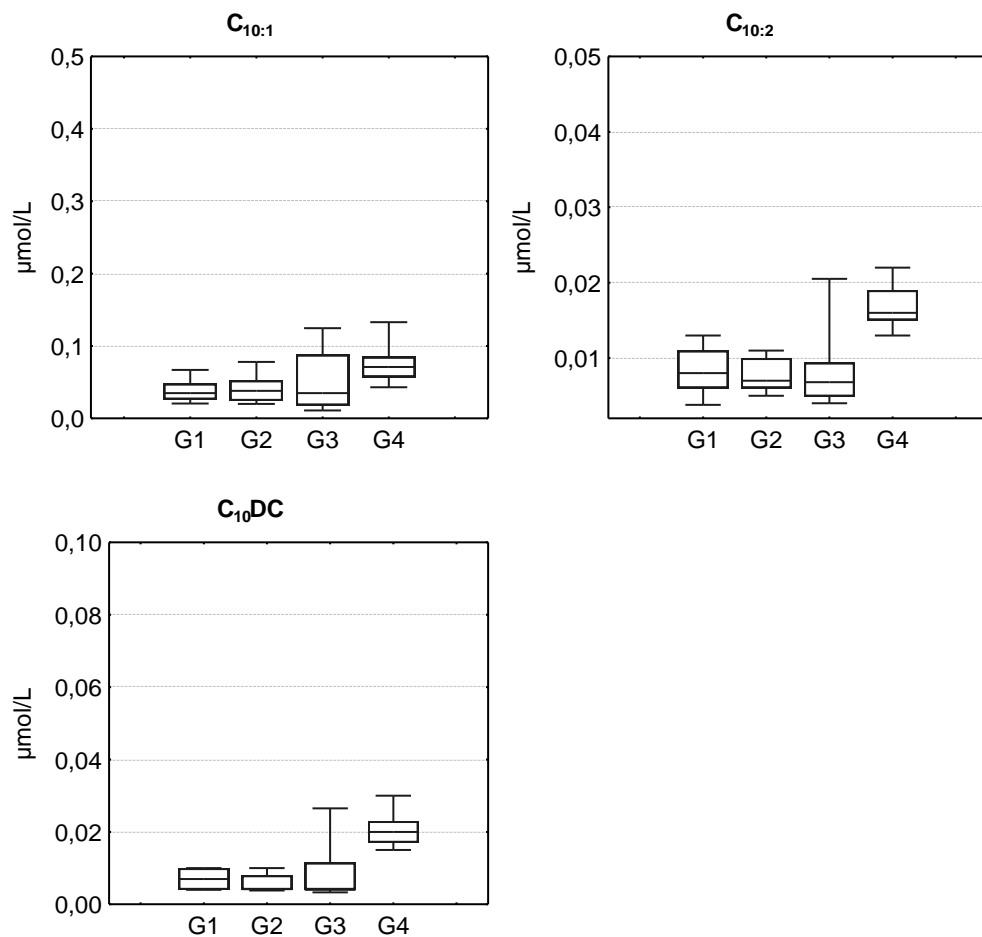


Figura 6/2: Box plot relativi alle concentrazioni di acilcarnitine a catena media (C_{10:1}, C_{10:2}, C₁₀DC) nei campioni di plasma; ogni diagramma a scatola e baffi riporta la mediana, 25° e 75° percentile (scatola), 10° e 90° percentile (baffi) di ogni metabolita nei quattro gruppi studiati (G1, G2, G3, G4).

In tabella 7 infine sono stati riassunti i risultati del test di Mann-Whitney relativi alle acilcarnitine a catena media.

Tabella 7: Risultati del test di Mann Whitney - acilcarnitine a catena media.

	G1 vs G4	G2 vs G4	G3 vs G4	G1 vs G2	G1 vs G3	G2 vs G3
C6	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns	ns
C6OH	<0.001	<0.001	<0.001	ns	0.016	0.006
C6DC	ns	0.003	<0.001	ns	ns	ns
C8	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns	ns
C8OH	<0.001	<0.001	<0.001	ns	0.013	0.010
C8:1	0.002	<0.001	0.021	ns	ns	ns
C8DC	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns	ns
C10	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns	ns
C10:1	<0.001	<0.001	0.002	ns	ns	ns
C10:2	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns	ns
C10DC	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns	ns

1.3 Acilcarnitine a catena lunga

In tabella 8 sono stati riportati per ciascun gruppo di età gestazionale (G1, G2, G3, G4) i valori riscontrati di plasma relativi alle acilcarnitine a catena lunga. Le concentrazioni sono espresse in $\mu\text{mol/L}$; per ogni metabolita sono stati riportati mediana (10° - 90° percentile). Nelle stesse tabelle è stato inoltre inserito per ogni metabolita il livello di significatività p calcolato col test di Kruskal-Wallis. La p si riferisce al test di Kruskal Wallis; ns: non significativo

Tabella 8: Concentrazioni delle acilcarnitine a catena lunga nei campioni di plasma dei neonati dei quattro gruppi di diversa età gestazionale.

	G1 (n=18)	G2 (n=41)	G3 (n=47)	G4 (n=51)	p
C₁₂	0,045 (0,025 - 0,066)	0,046 (0,019 - 0,079)	0,047 (0,024 - 0,178)	0,163 (0,092 - 0,335)	<0,001
C₁₂OH	0,004 (0,001 - 0,010)	0,005 (0,001 - 0,010)	0,003 (0,001 - 0,013)	0,007 (0,005 - 0,011)	<0,001
C_{12:1}	0,062 (0,023 - 0,109)	0,053 (0,017 - 0,117)	0,048 (0,020 - 0,237)	0,293 (0,091 - 0,573)	<0,001
C₁₄	0,035 (0,025 - 0,132)	0,056 (0,029 - 0,161)	0,083 (0,032 - 0,162)	0,164 (0,072 - 0,312)	<0,001
C₁₄OH	0,013 (0,009 - 0,054)	0,014 (0,009 - 0,092)	0,014 (0,012 - 0,091)	0,012 (0,007 - 0,017)	0,003
C_{14:1}	0,067 (0,033 - 0,160)	0,084 (0,028 - 0,179)	0,100 (0,031 - 0,275)	0,282 (0,126 - 0,595)	<0,001
C_{14:2}	0,024 (0,017 - 0,101)	0,028 (0,015 - 0,116)	0,031 (0,017 - 0,112)	0,052 (0,034 - 0,098)	0,002
C₁₆	0,165 (0,112 - 0,339)	0,204 (0,127 - 0,465)	0,271 (0,144 - 0,513)	0,585 (0,304 - 0,961)	<0,001
C₁₆OH	0,094 (0,039 - 0,157)	0,094 (0,039 - 0,158)	0,040 (0,039 - 0,160)	0,037 (0,035 - 0,041)	<0,001
C_{16:1}	0,122 (0,062 - 0,211)	0,144 (0,062 - 0,266)	0,121 (0,066 - 0,225)	0,187 (0,107 - 0,320)	<0,001
C_{16:1}OH	0,068 (0,040 - 0,126)	0,069 (0,039 - 0,127)	0,040 (0,039 - 0,096)	0,037 (0,035 - 0,043)	<0,001
C₁₈	0,225 (0,206 - 0,28)	0,223 (0,208 - 0,263)	0,219 (0,106 - 0,269)	0,114 (0,085 - 0,173)	<0,001
C₁₈OH	0,180 (0,180 - 0,185)	0,180 (0,180 - 0,188)	0,180 (0,025 - 0,188)	0,025 (0,024 - 0,027)	<0,001
C_{18:1}	0,261 (0,230 - 0,335)	0,270 (0,219 - 0,399)	0,236 (0,210 - 0,320)	0,276 (0,189 - 0,395)	ns
C_{18:1}OH	0,180 (0,180 - 0,185)	0,181 (0,180 - 0,187)	0,180 (0,025 - 0,186)	0,025 (0,024 - 0,026)	<0,001
C_{18:2}	0,199 (0,189 - 0,229)	0,205 (0,190 - 0,227)	0,195 (0,090 - 0,214)	0,070 (0,050 - 0,102)	<0,001
C_{18:2}OH	0,186 (0,182 - 0,212)	0,188 (0,184 - 0,229)	0,186 (0,031 - 0,262)	0,027 (0,025 - 0,033)	<0,001

A seguire sono stati inseriti i grafici (figura 7/1-2), in cui è possibile osservare l'andamento delle concentrazioni delle principali acilcarnitine a catena lunga nei quattro gruppi di soggetti.

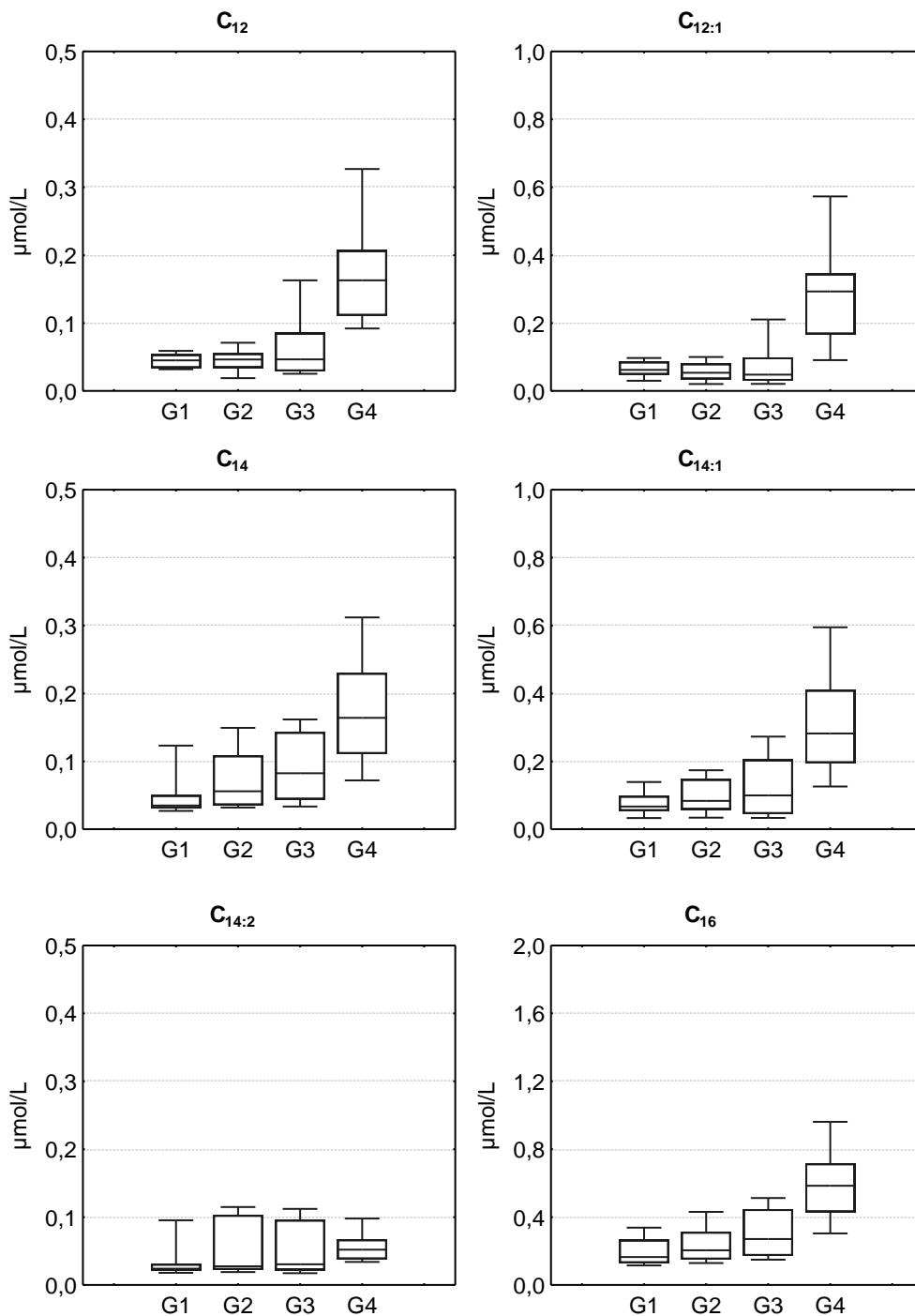


Figura 7/1: Box plot relativi alle concentrazioni di acilcarnitine a catena lunga (C_{12} , $C_{12:1}$, C_{14} , $C_{14:1}$, $C_{14:2}$, C_{16}) nei campioni di plasma; ogni diagramma a scatola e baffi riporta la mediana, 25° e 75° percentile (scatola), 10° e 90° percentile (baffi) di ogni metabolita nei quattro gruppi studiati (G1, G2, G3, G4).

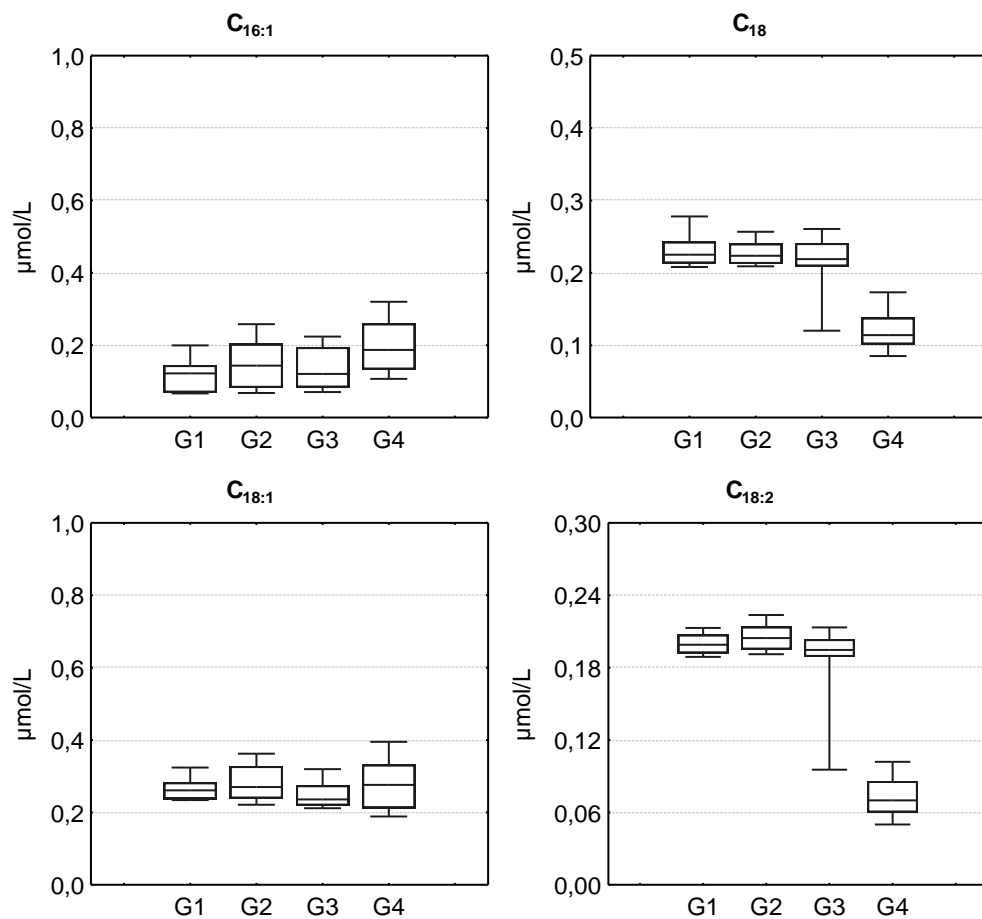


Figura 7/2: Box plot relativi alle concentrazioni di acilcarnitine a catena lunga ($C_{16:1}$, C_{18} , $C_{18:1}$, $C_{18:2}$) nei campioni di plasma; ogni diagramma a scatola e baffi riporta la mediana, 25° e 75° percentile (scatola), 10° e 90° percentile (baffi) di ogni metabolita nei quattro gruppi studiati (G1, G2, G3, G4).

In tabella 9 infine sono stati riassunti i risultati del test di Mann-Whitney relativi alle acilcarnitine a catena lunga.

Tab. 9: Risultati del test di Mann Whitney - acilcarnitine a catena lunga.

	G1 vs G4	G2 vs G4	G3 vs G4	G1 vs G2	G1 vs G3	G2 vs G3
C12	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns	ns
C12OH	<0.001	0.004	<0.001	ns	ns	ns
C12:1	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns	ns
C14	<0.001	<0.001	<0.001	0.040	0.003	ns
C14OH	<0.001	0.009	<0.001	ns	0.045	ns
C14:1	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns	ns
C14:2	<0.001	0.017	ns	ns	ns	ns
C16	<0.001	<0.001	<0.001	ns	0.010	ns
C16OH	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns	ns
C16:1	<0.001	0.011	0.002	ns	ns	ns
C16:1OH	<0.001	<0.001	<0.001	ns	0.011	0.013
C18	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns	ns
C18OH	<0.001	<0.001	<0.001	0.045	ns	ns
C18:1	<0.001	ns	ns	ns	0.043	0.009
C18:1OH	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns	ns
C18:2	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns	0.009
C18:2OH	<0.001	<0.001	<0.001	0.047	ns	ns

2. Profilo delle acilcarnitine nei campioni di DBS

2.1 Carnitina ed acilcarnitine a catena corta

In tabella 10 sono stati riportati per ciascun gruppo di età gestazionale (G1, G2, G3, G4) i valori riscontrati nei campioni di DBS relativi a carnitina ed acilcarnitine a catena corta. Le concentrazioni sono espresse in $\mu\text{mol/L}$; per ogni metabolita sono stati riportati mediana (10° - 90° percentile). Nelle stesse tabelle è stato inoltre inserito per ogni metabolita il livello di significatività p calcolato col test di Kruskal-Wallis. La p si riferisce al test di Kruskal Wallis; ns: non significativo.

Tabella 10: Concentrazioni di carnitina libera ed acilcarnitine a catena corta nei campioni di DBS dei neonati dei quattro gruppi di diversa età gestazionale.

	G1 (n=18)	G2(n=41)	G3(n=47)	G4(n=51)	p
Carnitina libera	22,141 (16,166 - 36,270)	29,953 (19,321 - 46,939)	24,946 (16,684 - 37,030)	21,195 (14,063 - 34,550)	<0,001
C₂	8,544 (2,872 - 14,159)	10,402 (4,265 - 29,955)	6,744 (3,902 - 17,362)	14,213 (7,624 - 24,187)	<0,001
C₃	1,372 (0,637 - 2,178)	1,532 (0,838 - 3,590)	1,335 (0,717 - 2,811)	1,469 (0,862 - 2,289)	ns
C₃DC	0,008 (0,006 - 0,011)	0,007 (0,005 - 0,010)	0,007 (0,005 - 0,009)	0,008 (0,006 - 0,010)	0,008
C₄	0,100 (0,065 - 0,209)	0,132 (0,070 - 0,430)	0,106 (0,057 - 0,280)	0,114 (0,080 - 0,248)	ns
ISOC₄	0,265 (0,188 - 0,474)	0,296 (0,160 - 0,502)	0,196 (0,106 - 0,344)	0,186 (0,125 - 0,311)	<0,001
C₄OH	0,071 (0,042 - 0,130)	0,072 (0,046 - 0,134)	0,058 (0,03 - 0,112)	0,111 (0,081 - 0,169)	<0,001
C₄DC succinil	0,100 (0,039 - 0,275)	0,122 (0,053 - 0,239)	0,115 (0,038 - 0,174)	0,181 (0,111 - 0,531)	<0,001
C₄DC metilmalonil	0,010 (0,005 - 0,018)	0,013 (0,004 - 0,020)	0,007 (0,004 - 0,019)	0,016 (0,012 - 0,021)	<0,001
C₅ 2metilbutirril	0,171 (0,103 - 0,268)	0,116 (0,071 - 0,167)	0,088 (0,065 - 0,120)	0,065 (0,050 - 0,093)	<0,001
C₅ isovaleril	0,099 (0,067 - 0,170)	0,112 (0,054 - 0,179)	0,073 (0,048 - 0,13)	0,070 (0,052 - 0,099)	<0,001
C₅OH	0, 223 (0,166 - 0, 286)	0,168 (0, 053 - 0, 267)	0,202 (0, 062 - 0, 288)	0,207 (0, 077 - 0, 281)	<0,001
C_{5:1}	0,036 (0,015 - 0,043)	0,028 (0,012 - 0,035)	0,029 (0,011 - 0,033)	0,028 (0,024 - 0,031)	<0,001
C₅DC	0,045 (0,020 - 0,101)	0,055 (0,027 - 0,092)	0,053 (0,022 - 0,086)	0,028 (0,021 - 0,096)	<0,001

A seguire sono stati inseriti i grafici (figura 8/1-2), in cui è possibile osservare l'andamento delle concentrazioni di carnitina libera ed acilcarnitine a catena corta nei quattro gruppi di soggetti. Ogni diagramma a scatola e baffi riporta la mediana, 25° e 75° percentile (scatola), 10° e 90° percentile (baffi) di ogni metabolita nei quattro gruppi studiati (G1, G2, G3, G4)

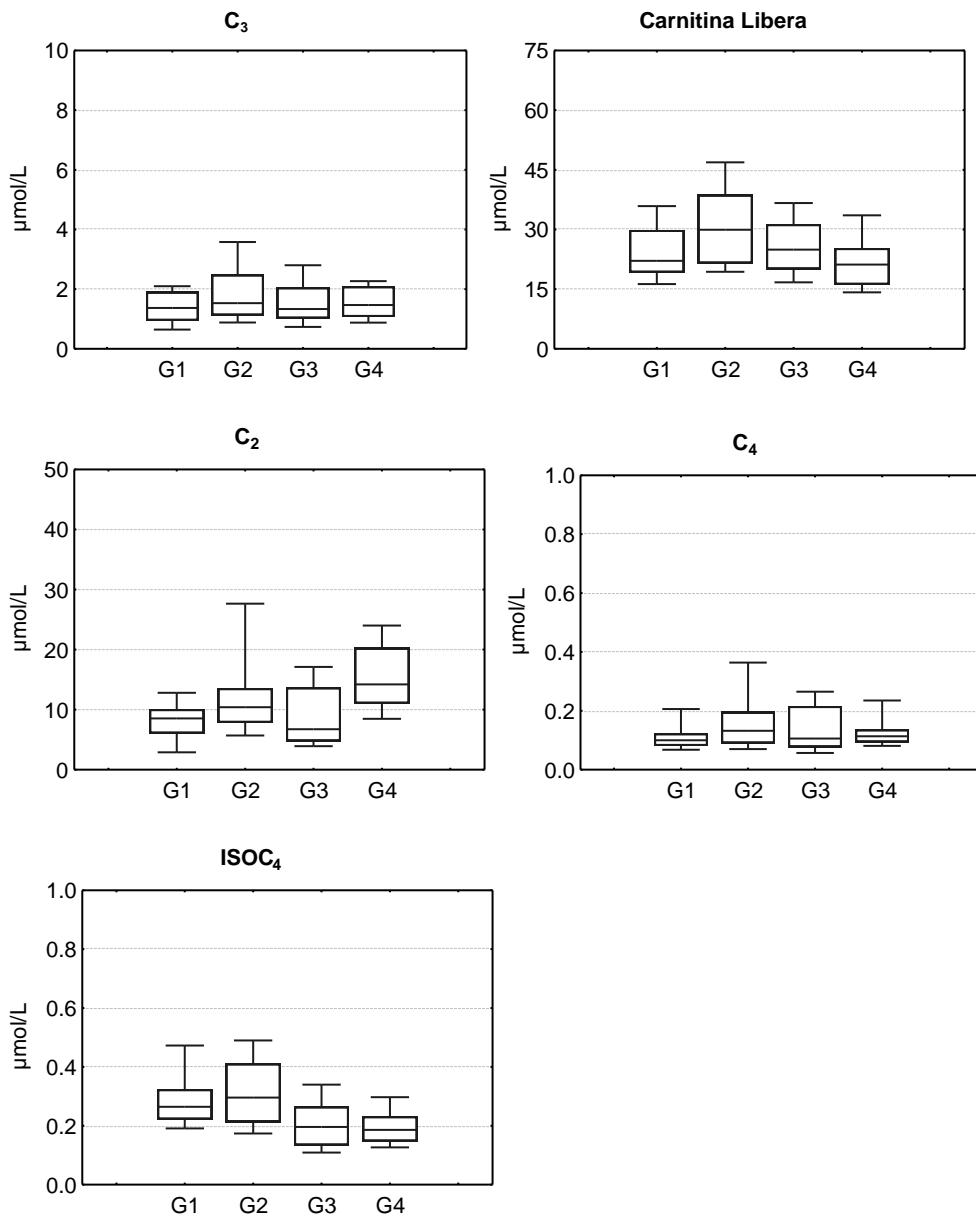


Fig. 8/1: Box plot relativi alle concentrazioni di carnitina libera ed acilcarnitine a catena corta (C₂, C₃, C₃DC, C₄, ISOC₄) nei campioni di DBS.

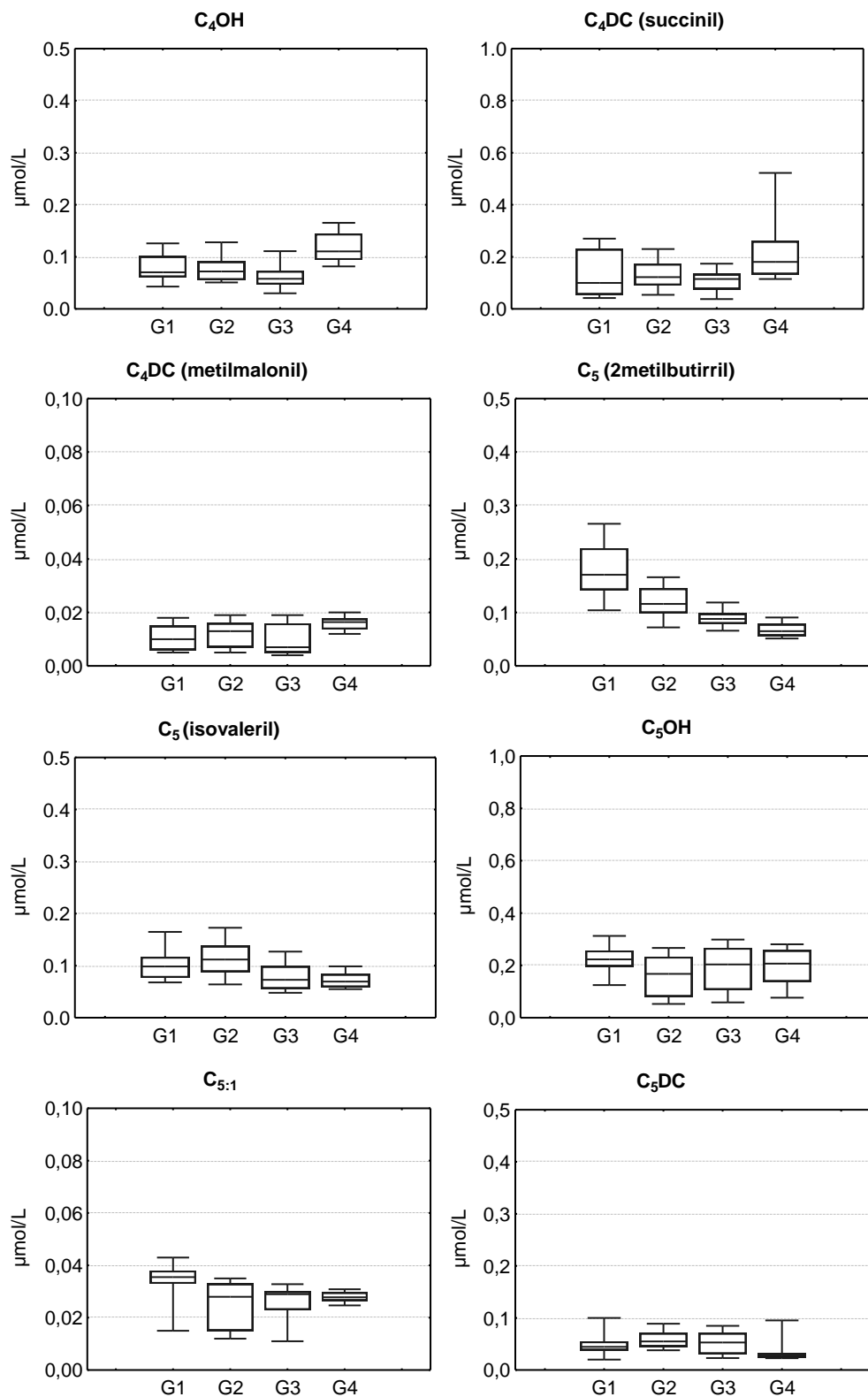


Fig. 8/2: Box plot relativi alle concentrazioni di carnitina ed acilcarnitine a catena corta ($C_4\text{OH}$, $C_4\text{DC}$ succinil, $C_4\text{DC}$ metilmalonil, C_5 2metilbutiril, C_5 isovaleril, $C_5\text{OH}$, $C_{5:1}$, $C_5\text{DC}$) nei campioni di DBS.

In tabella 11 infine sono stati riassunti i risultati del test di Mann-Whitney relativi a carnitina ed acilcarnitine a catena corta.

Tabella 11: Risultati del test di Mann Whitney – carnitina ed acilcarnitine a catena corta

	G1 vs G4	G2 vs G4	G3 vs G4	G1 vs G2	G1 vs G3	G2 vs G3
Carnitina libera	ns	<0.001	0.029	<0.001	ns	0.013
C2	<0.001	0.003	<0.001	0.003	ns	0.044
C3	ns	ns	ns	ns	ns	ns
C3DC	ns	0.012	0.002	0.012	0.085	ns
C4	ns	ns	ns	ns	ns	ns
ISOC4	<0.001	<0.001	ns	<0.001	0.006	<0.001
C4OH	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.033	0.022
C4DC	0.003	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns
C4DC	<0.001	0.001	<0.001	0.001	ns	ns
C5	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
C5	<0.001	<0.001	ns	<0.001	0.007	<0.001
C5OH	<0.001	<0.001	0.042	<0.001	ns	ns
C5:1	<0.001	ns	ns	ns	<0.001	ns
C5DC	0.002	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns

2.2 Acilcarnitine a catena media

In tabella 12 sono stati riportati per ciascun gruppo di età gestazionale (G1, G2, G3, G4) i valori riscontrati nei campioni di plasma relativi alle acilcarnitine a catena media. Nelle stesse tabelle è stato inoltre inserito per ogni metabolita il livello di significatività p calcolato con il test di Kruskal-Wallis.

Tabella 12 Concentrazioni delle acilcarnitine a catena media nei campioni di DBS dei neonati dei quattro gruppi di diversa età gestazionale. Le concentrazioni sono espresse in $\mu\text{mol/L}$; per ogni metabolita sono stati riportati mediana (10° - 90° percentile). La p si riferisce al test di Kruskal Wallis; ns: non significativo.

	G1 (n=18)	G2(n=41)	G3(n=47)	G4(n=51)	p
C₆	0,016 (0,001 - 0,026)	0,023 (0,012 - 0,039)	0,023 (0,013 - 0,038)	0,028 (0,020 - 0,045)	<0,001
C₆DC	0,160 (0,006 - 0,374)	0,313 (0,005 - 0,395)	0,015 (0,006 - 0,343)	0,300 (0,261 - 0,751)	0,002
C₈	0,030 (0,023 - 0,046)	0,036 (0,024 - 0,061)	0,037 (0,025 - 0,065)	0,068 (0,046 - 0,096)	<0,001
C_{8:1}	0,030 (0,019 - 0,041)	0,026 (0,016 - 0,050)	0,035 (0,021 - 0,071)	0,037 (0,020 - 0,078)	0,002
C₈DC	0,015 (0,007 - 0,018)	0,015 (0,003 - 0,018)	0,015 (0,003 - 0,027)	0,025 (0,019 - 0,031)	<0,001
C₁₀	0,031 (0,019 - 0,047)	0,034 (0,018 - 0,069)	0,037 (0,024 - 0,088)	0,104 (0,068 - 0,168)	<0,001
C_{10:1}	0,029 (0,013 - 0,041)	0,029 (0,015 - 0,064)	0,033 (0,018 - 0,074)	0,061 (0,044 - 0,101)	<0,001
C_{10:2}	0,016 (0,002 - 0,019)	0,015 (0,002 - 0,021)	0,016 (0,002 - 0,023)	0,018 (0,014 - 0,021)	0,005
C₁₀DC	0,015 (0,003 - 0,015)	0,014 (0,002 - 0,015)	0,015 (0,002 - 0,021)	0,018 (0,015 - 0,023)	<0,001

A seguire sono stati inseriti i grafici (figura 9/1-2), in cui è possibile osservare l'andamento delle concentrazioni delle acilcarnitine a catena media nei quattro gruppi di soggetti.

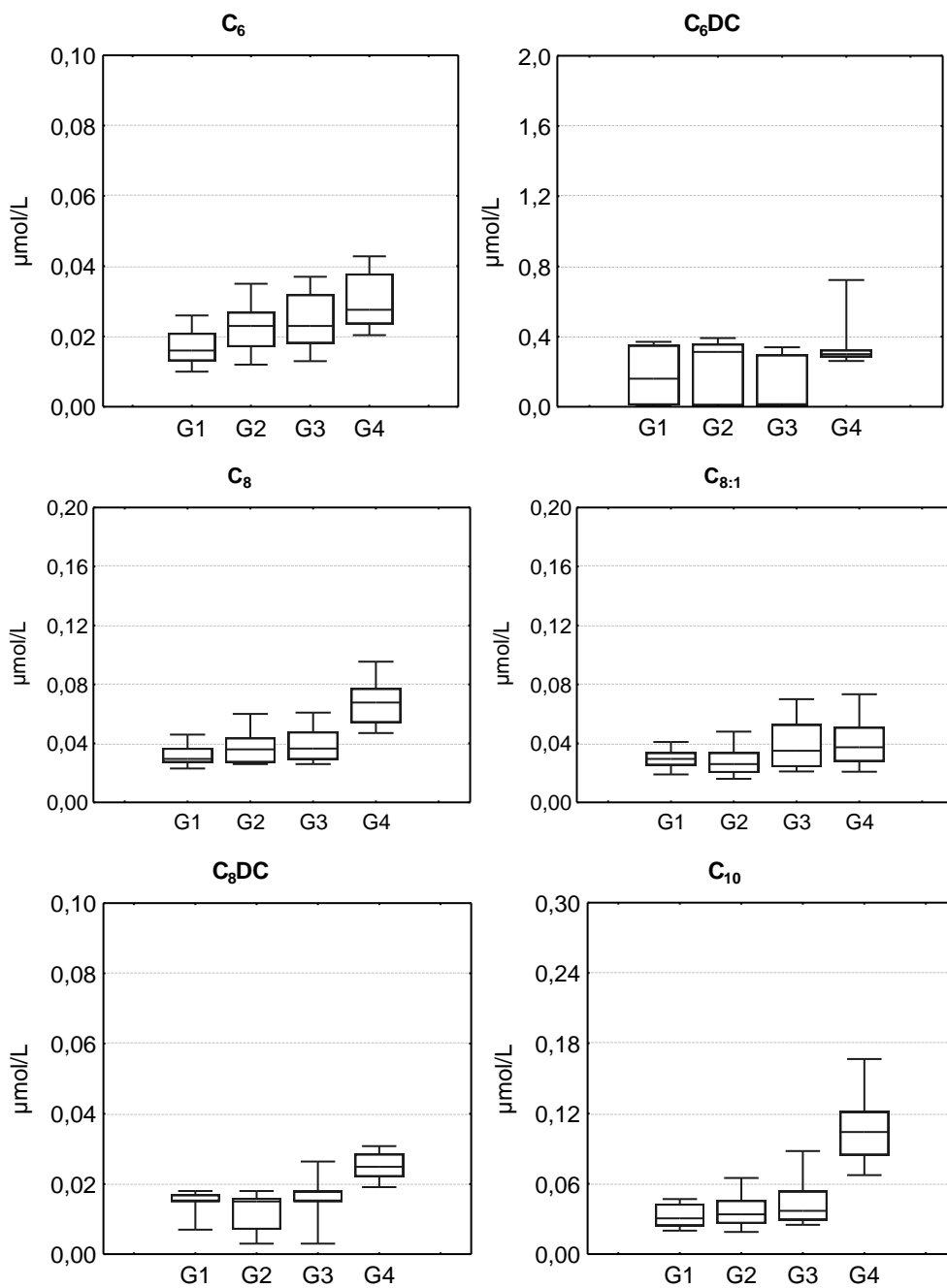


Figura 9/1: Box plot relativi alle concentrazioni di carnitina ed acilcarnitine a catena media (C_6 , $C_6\text{DC}$, C_8 , $C_{8:1}$, $C_8\text{DC}$, C_{10}) nei campioni di DBS; ogni diagramma a scatola e baffi riporta la mediana, 25° e 75° percentile (scatola), 10° e 90° percentile (baffi) di ogni metabolita nei quattro gruppi studiati (G1, G2, G3, G4).

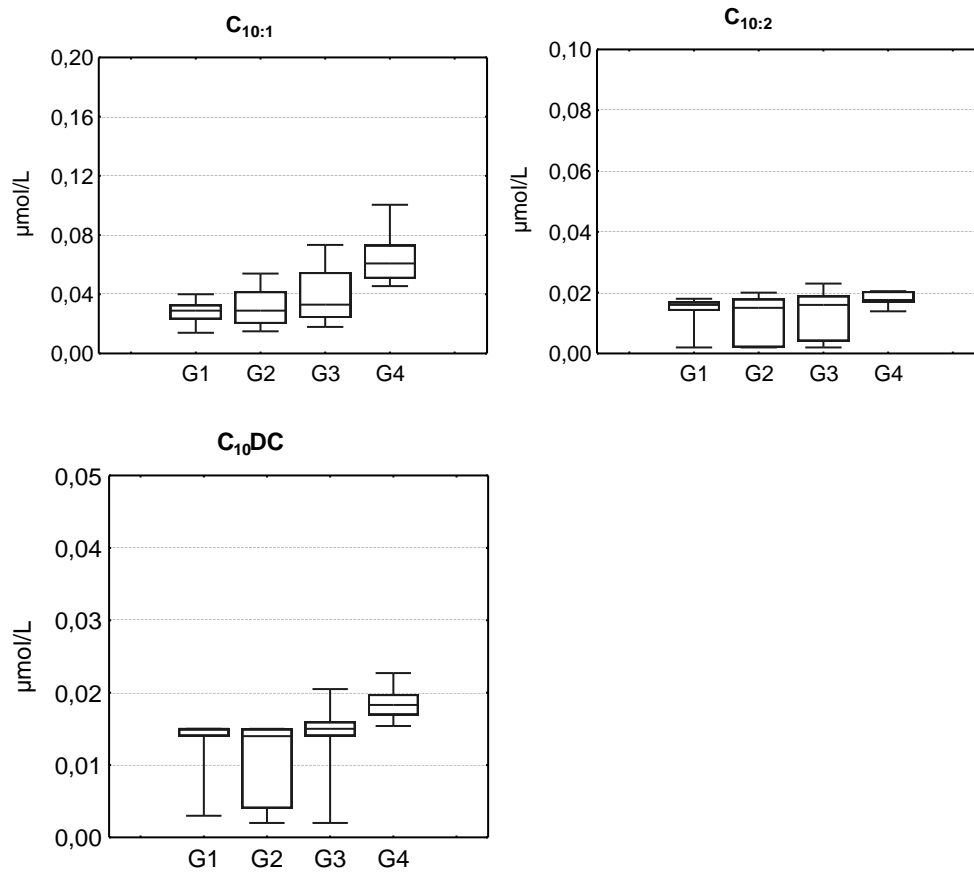


Figura 9/2: Box plot relativi alle concentrazioni di carnitina ed acilcarnitine a catena media (C_{10:1}, C_{10:2}, C_{10DC}) nei campioni di DBS; ogni diagramma a scatola e baffi riporta la mediana, 25° e 75° percentile (scatola), 10° e 90° percentile (baffi) di ogni metabolita nei quattro gruppi studiati (G1, G2, G3, G4).

In tabella 13 infine sono stati riassunti i risultati del test di Mann-Whitney relativi alle acilcarnitine a catena media.

Tabella 13: Risultati del test di Mann Whitney per le acilcarnitine a catena media

	G1 vs G4	G2 vs G4	G3 vs G4	G1 vs G2	G1 vs G3	G2 vs G3
C6	<0.001	0.001	0.002	0.001	0.001	ns
C6DC	ns	ns	<0.001	ns	ns	ns
C8	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.036	ns
C8:1	0.009	0.001	ns	0.001	ns	0.011
C8DC	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns
C10	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.043	ns
C10:1	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns
C10:2	0.009	0.001	0.043	0.001	ns	ns
C10DC	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns

2.3 Acilcarnitine a catena lunga

In tabella 14 sono stati riportati per ciascun gruppo di età gestazionale (G1, G2, G3, G4) i valori riscontrati nei campioni di plasma relativi alle acilcarnitine a catena lunga. Le concentrazioni sono espresse in $\mu\text{mol/L}$; per ogni metabolita sono stati riportati mediana (10° - 90° percentile). Nelle stesse tabelle è stato inoltre inserito per ogni metabolita il livello di significatività p calcolato con il test di Kruskal-Wallis (ns: non significativo).

Tabella 14: Concentrazioni delle acilcarnitine a catena lunga nei campioni di DBS dei neonati dei quattro gruppi di diversa età gestazionale.

	G1 (n=18)	G2(n=41)	G3(n=47)	G4(n=51)	p
C₁₂	0,070 (0,059 - 0,096)	0,086 (0,063 - 0,136)	0,093 (0,072 - 0,149)	0,146 (0,108 - 0,204)	<0,001
C₁₂OH	0,017 (0,008 - 0,019)	0,017 (0,008 - 0,019)	0,017 (0,008 - 0,021)	0,022 (0,019 - 0,030)	<0,001
C_{12:1}	0,063 (0,050 - 0,099)	0,073 (0,054 - 0,128)	0,079 (0,057 - 0,158)	0,165 (0,098 - 0,241)	<0,001
C₁₄	0,232 (0,187 - 0,296)	0,276 (0,208 - 0,362)	0,292 (0,201 - 0,385)	0,316 (0,262 - 0,411)	<0,001
C₁₄OH	0,153 (0,058 - 0,155)	0,152 (0,055 - 0,155)	0,153 (0,056 - 0,154)	0,153 (0,152 - 0,154)	0,003
C_{14:1}	0,193 (0,150 - 0,255)	0,212 (0,123 - 0,263)	0,201 (0,135 - 0,281)	0,266 (0,215 - 0,349)	<0,001
C_{14:2}	0,160 (0,070 - 0,168)	0,160 (0,062 - 0,169)	0,158 (0,066 - 0,182)	0,169 (0,162 - 0,181)	<0,001
C₁₆	0,761 (0,641 - 1,360)	1,516 (0,989 - 2,300)	1,644 (0,875 - 2,849)	2,296 (1,675 - 3,432)	<0,001
C₁₆OH	0,101 (0,097 - 0,102)	0,099 (0,094 - 0,102)	0,101 (0,096 - 0,102)	0,101 (0,099 - 0,102)	ns
C_{16:1}	0,212 (0,126 - 0,501)	0,281 (0,195 - 0,408)	0,320 (0,208 - 0,500)	0,331 (0,240 - 0,513)	<0,001
C_{16:1}OH	0,075 (0,015 - 0,082)	0,076 (0 - 0,078)	0,076 (0,073 - 0,078)	0,077 (0,075 - 0,076)	ns
C₁₈	0,450 (0,301 - 0,817)	0,619 (0,459 - 0,892)	0,549 (0,369 - 0,835)	0,663 (0,431 - 0,850)	<0,001
C₁₈OH	0,035 (0,012 - 0,035)	0,035 (0,012 - 0,036)	0,035 (0,012 - 0,039)	0,037 (0,036 - 0,040)	<0,001
C_{18:1}	0,225 (0,158 - 0,458)	0,285 (0,168 - 0,481)	0,244 (0,159 - 0,439)	0,257 (0,189 - 0,397)	ns
C_{18:1}OH	0,035 (0,012 - 0,036)	0,034 (0,012 - 0,036)	0,035 (0,012 - 0,038)	0,036 (0,035 - 0,038)	<0,001
C_{18:2}	0,123 (0,073 - 0,259)	0,156 (0,086 - 0,257)	0,128 (0,080 - 0,222)	0,118 (0,088 - 0,189)	0,018
C_{18:2}OH	0,037 (0,013 - 0,037)	0,036 (0,012 - 0,037)	0,036 (0,013 - 0,037)	0,037 (0,036 - 0,037)	0,009

A seguire sono stati inseriti i grafici (figura 10/1-2), in cui è possibile osservare l'andamento delle concentrazioni delle principali acilcarnitine a catena lunga nei quattro gruppi di soggetti.

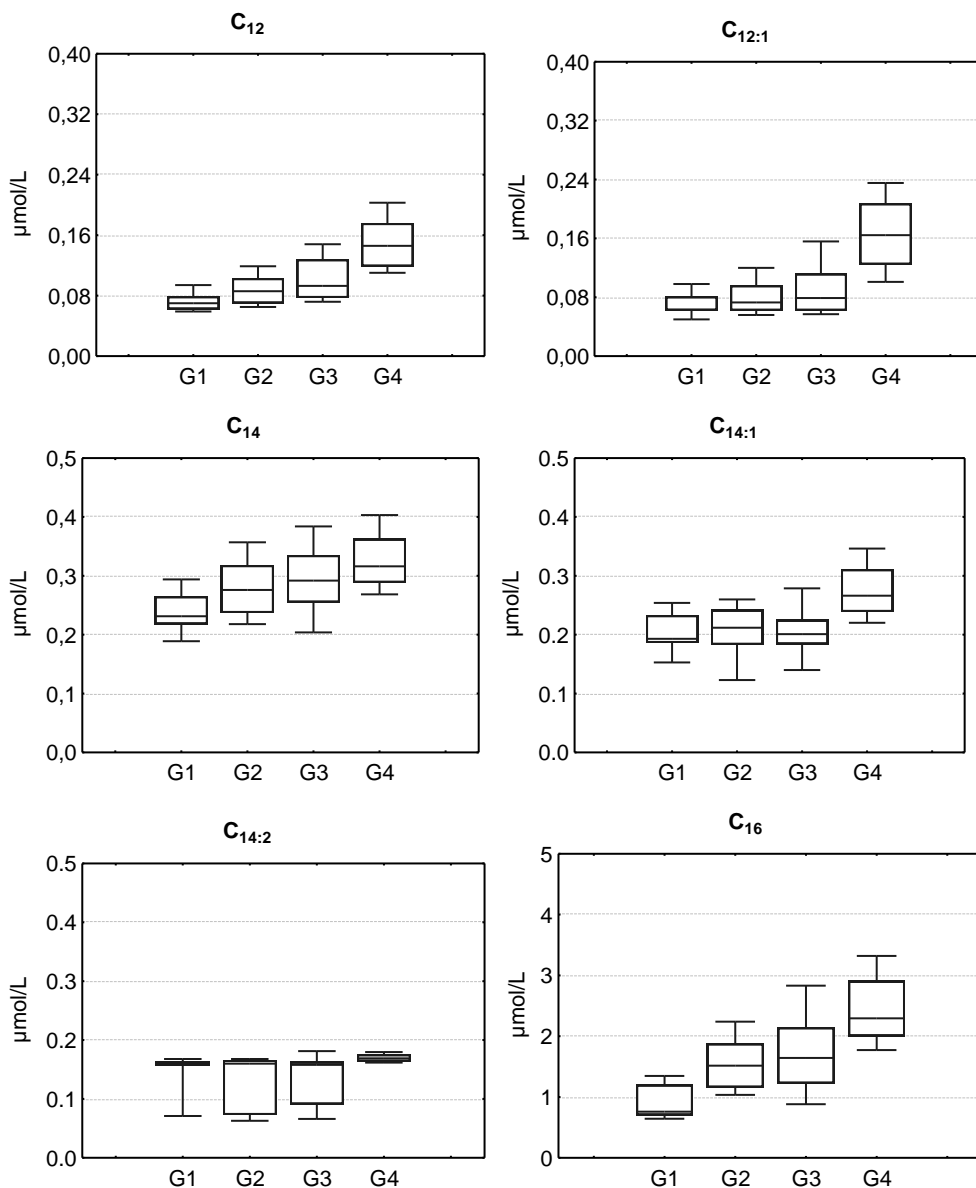


Fig. 10/1: Box plot relativi alle concentrazioni di acilcarnitine a catena lunga (C_{12} , $C_{12:1}$, C_{14} , $C_{14:1}$, $C_{14:2}$, C_{16}) nei campioni di DBS; ogni diagramma a scatola e baffi riporta la mediana, 25° e 75° percentile (scatola), 10° e 90° percentile (baffi) di ogni metabolita nei quattro gruppi studiati (G1, G2, G3, G4).

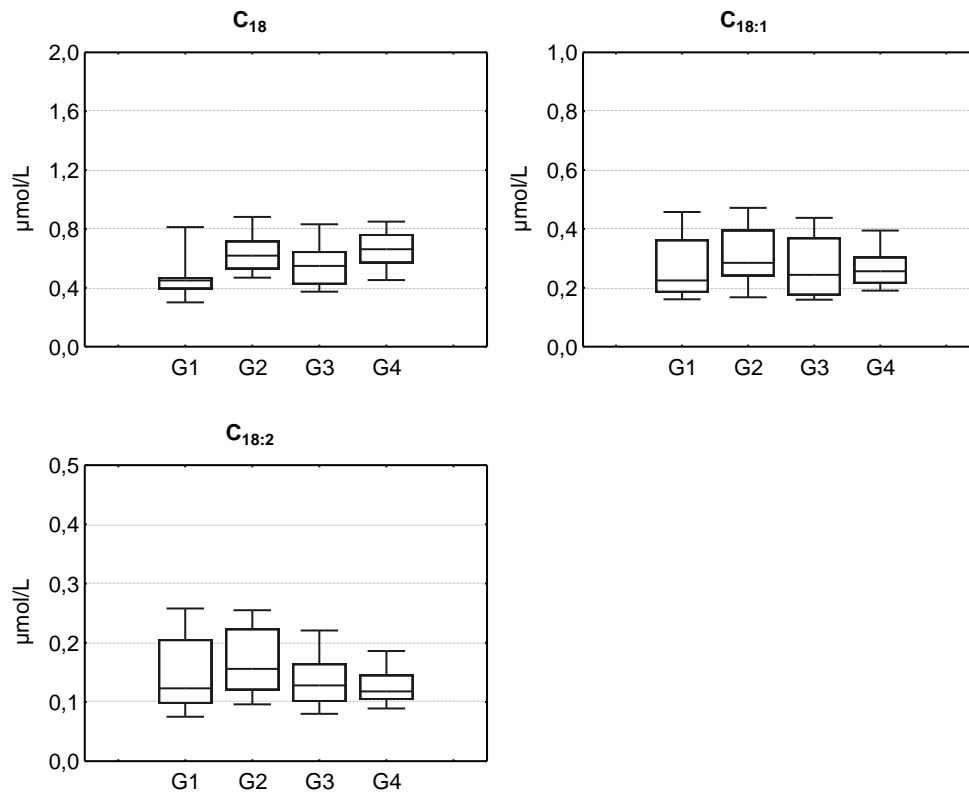


Fig. 10/2: Box plot relativi alle concentrazioni di acilcarnitine a catena lunga (C₁₈, C_{18:1}, C_{18:2}) nei campioni di DBS; ogni diagramma a scatola e baffi riporta la mediana, 25° e 75° percentile (scatola), 10° e 90° percentile (baffi) di ogni metabolita nei quattro gruppi studiati (G1, G2, G3, G4).

In tabella 15 infine sono stati riassunti i risultati del test di Mann-Whitney relativi alle acilcarnitine a catena lunga.

Tabella 15: Risultati del test di Mann Whitney per le acilcarnitine a catena lunga

	G1 vs G4	G2 vs G4	G3 vs G4	G1 vs G2	G1 vs G3	G2 vs G3
C12	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	ns
C12OH	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns
C12:1	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns
C14	<0.001	<0.001	0.005	<0.001	<0.001	ns
C14OH	ns	<0.001	0.004	<0.001	ns	ns
C14:1	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns
C14:2	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns
C16	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	ns
C16OH	ns	0.024	ns	0.024	ns	ns
C16:1	<0.001	0.005	ns	0.005	0.005	ns
C16:1OH	ns	ns	ns	ns	ns	ns
C18	<0.001	ns	0.003	ns	0.037	0.020
C18OH	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns
C18:1	ns	ns	ns	ns	ns	ns
C18:1OH	ns	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns
C18:2	ns	0.002	ns	0.002	ns	0.011
C18:2OH	ns	<0.001	0.020	<0.001	ns	ns

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Lo studio della concentrazione della carnitina e delle acilcarnitine in epoca neonatale è importante nella diagnosi degli errori congeniti del metabolismo e, più in generale nello studio delle modificazioni metaboliche, fisiologiche e patologiche, che interessano il neonato a termine e pretermine.

La disponibilità di tecniche analitiche, quali la spettrometria di massa tandem e, successivamente, la HPLC-MS/MS ha consentito di separare e misurare quantitativamente la carnitina e i suoi esteri a catena corta, media e lunga nelle diverse matrici fisiologiche (plasma, sangue intero, urine) a partire da quantità molto piccole di

campione, tali da poter essere applicate anche ai neonati e prematuri di età gestazionale estremamente bassa.

Nel nostro lavoro abbiamo applicato una tecnica analitica, messa a punto nel nostro laboratorio [30], basata sull'impiego della UPLC-MS/MS, per lo studio dei valori di riferimento della carnitina e delle acilcarnitine nel neonato a termine e nel neonato pretermine di età gestazionale compresa tra 22 e 36 settimane.

Sono stati analizzati campioni di plasma prelevato da sangue capillare e campioni da gocce di sangue intero essiccato su carta bibula (dried blood spot – DBS) allo scopo di disporre di parametri di riferimento utilizzabili sia nel contesto di studi metabolico/nutrizionali, sia in ambito diagnostico nel sospetto di errori congeniti del metabolismo. A questo riguardo, il tempo del prelievo (48-72 ore di vita) è stato scelto perché in accordo con quanto scritto nel protocollo approvato dal comitato etico. A nostra conoscenza, sono stati pubblicati in letteratura solo 3 lavori che riportano il profilo delle acilcarnitine nei neonati pretermine con tecniche di spettrometria di massa [31,32,33] e solo 2 lavori [30,34] analizzano le acilcarnitine sia su plasma che su DBS nei neonati.

Precedenti lavori hanno studiato la carnitina e le acilcarnitine utilizzando metodi diversi. Molti di essi presentano una scarsa numerosità e non hanno considerato neonati pretermine al di sotto della 28^o settimana di età gestazionale.

Meyburg et al. ha studiato 120 neonati suddivisi in gruppi di 30 in base all'età gestazionale: 22-27, 28-31, 32-36 e 37-41 settimane di gestazione. Il prelievo di sangue è stato effettuato mediante puntura da tallone in 5^o giornata di vita. I risultati ottenuti da questi autori su DBS indicano che le concentrazioni di carnitina e della maggior parte delle acilcarnitine è significativamente più elevata nei neonati più immaturi rispetto ai neonati a termine. In particolare, la concentrazione della carnitina libera diminuisce da un valore di $41 \pm 17 \mu\text{mol/L}$ a 22-27 settimane gestazionali a $28 \pm 10 \mu\text{mol/L}$ a 37-41 settimane ($p < 0.001$).

I valori riportati da questi Autori sono circa il doppio dei valori ottenuti nel nostro lavoro analizzando il plasma dei neonati, e risultano più elevati anche rispetto a quanto da noi ottenuto su DBS.

Queste differenze possono essere spiegate, in parte, dalle diverse metodologie utilizzate nei due lavori e, per quanto riguarda i campioni di DBS, dal fatto che circa il 73% del

pool della carnitina è contenuto nel globulo rosso, per cui la concentrazione di carnitina libera, misurata a partire da campioni di sangue intero, come i DBS, risulta più elevata rispetto al plasma.

Da notare inoltre che i nostri valori sono stati espressi come mediana e percentili, anziché come media e deviazione standard, in quanto i valori di concentrazione non sono distribuiti secondo una curva gaussiana.

Risultati contrastanti vengono riportati da De Sain-Van der Velden et al. che, analizzando la carnitina libera plasmatica in 54 neonati, riportano valori più elevati nel plasma che nei DBS ($26,8 \pm 14,0 \mu\text{mol/L}$ vs $19,2 \pm 8,5 \mu\text{mol/L}$; $p < 0,001$).

Sulla base dei nostri dati, la carnitina libera non subisce variazioni significative legate all'età gestazionale, come invece affermato da Meyburg et al.

Deve essere rilevato, a questo proposito, che il gruppo di neonati estremamente pretermine, come quelli compresi nel gruppo dei neonati nati alla 22°-27° settimana gestazionale, è un gruppo in cui le procedure terapeutiche ed i protocolli di nutrizione parenterale possono aver giocato un ruolo determinante nelle modificazioni del metabolismo della carnitina libera.

I neonati pretermine, arruolati nel nostro studio, non hanno ricevuto una supplementazione di L-carnitina e l'apporto esogeno è risultato pari a 1,2-1,5 mg per 100 mL di formula. Questi neonati sono stati supplementari principalmente con amminoacidi e glucosio e questo potrebbe indicare che la somministrazione di lisina e metionina, precursori della carnitina, è sufficiente a mantenere la sintesi di carnitina a livelli simili a quelli del neonato a termine.

A differenza dei dati riportati da Meyburg et al. (Ref.) e da Mandour et al. (Ref.) i nostri risultati, per quanto riguarda la concentrazione delle acilcarnitine, indicano che i neonati pretermine presentano valori significativamente più bassi rispetto ai neonati a termine, tranne che per le forme isomeriche derivate dal metabolismo degli amminoacidi a catena ramificata, come ad esempio il C₅-2-metilbutiril.

I neonati pretermine costituiscono sottogruppi in parte eterogenei, sia per l'età gestazionale, sia per la progressione dell'alimentazione parenterale ed enterale. Inoltre i valori di riferimento per le acilcarnitine, alle età gestazionali più basse, sono influenzati dal tipo di campionamento (plasma, sangue intero, urine) e dall'età post-natale a cui il prelievo viene effettuato.

L'effetto matrice risulta evidente quando si confrontano le concentrazioni delle acilcarnitine nel plasma con quelle ottenute analizzando i DBS. L'analisi statistica delle differenze fra i valori plasmatici e quelli da DBS (dati non riportati) non permette di evidenziare andamenti uniformi, nel senso di un aumento o di una diminuzione, dei vari metaboliti analizzati. Ne consegue la necessità di disporre di valori di riferimento specifici per ogni tipo di matrice utilizzata. Confrontando poi i nostri dati con i lavori pubblicati, risulta che vi è spesso discrepanza fra gli autori, sia per quanto riguarda le concentrazioni dei singoli metaboliti, che per quanto riguarda il loro trend nelle diverse epoche neonatali, rendendo così difficile una discussione comparativa che prenda in esame ogni singolo metabolita. Ne risulta quindi l'importanza che ogni laboratorio disponga di propri valori di riferimento, sia ai fini diagnostici che di ricerca.

È importante tuttavia sottolineare che il metodo di analisi messo a punto nel nostro laboratorio, rispetto ai metodi utilizzati dagli altri Autori che hanno affrontato questo argomento, è più rapido, consente di utilizzare pochi microlitri di plasma e di ottenere contemporaneamente la separazione e la misura delle concentrazioni di oltre 40 differenti acilcarnitine. In particolare è stato possibile ottenere informazioni quantitative sui seguenti isomeri ed isobari, per la prima volta simultaneamente separati col metodo UPLC-MS/MS sia nel neonato a termine che pretermine, in campioni sia di plasma che di DBS: butirril- ed isobutirril-carnitina (C_4); succinil- e metilmalonil-carnitina (C_4DC); 2-metilbutirril-, isovaleril- e pivaloil-carnitina (C_5), di cui la pivaloil-carnitina non è risultata quantificabile nel nostro studio, in quanto non è fisiologicamente presente, ma è rilevabile solo in seguito alla somministrazione di antibiotici pivaloil-coniugati; tigilil- e 3-metil-crotonil-carnitina ($C_{5:1}$), di cui la tigilil-carnitina fisiologicamente è presente in quantità non misurabili; 3-idrossi-isovaleril- e 2-metil-3-idrossi-butirril-carnitina (C_5OH), di cui la 2-metil-3-idrossi-butirril-carnitina sono presenti due diastereoisomeri non separabili ed entrambi fisiologicamente sono presenti in quantità non misurabili; octanoil- e valproil-carnitina (C_8), di cui la valproil-carnitina non è risultata quantificabile nel nostro studio, in quanto non fisiologicamente presente, ma rilevabile solo in seguito alla somministrazione di acido valproico; C_5DC e $C_{10}OH$, di cui la $C_{10}OH$ è risultata avere una concentrazione inferiore o uguale al limite di quantificazione. È stato inoltre possibile individuare per $C_{16}OH$, $C_{18}OH$, $C_{18:1}OH$, $C_{18:2}OH$ uno sdoppiamento del picco dovuto alla presenza di isomeri conformazionali,

aventi una diversa orientazione spaziale del gruppo ossidrilico. Questi picchi sono stati integrati in questo studio come fossero un unico picco, poiché corrispondenti allo stesso metabolita.

Possibili sviluppi del nostro lavoro potranno essere dosare, insieme alle acilcarnitine, gli amminoacidi, precursori di alcune di esse nei campioni di plasma e DBS e definire come ed in che misura i diversi regimi nutrizionali (enterale, parenterale) possano influire sulle variazioni del metabolismo amminoacidico, lipidico e della carnitina, soprattutto nei gruppi dei neonati pretermine. Inoltre sarà interessante condurre uno studio metabolomico sui campioni di plasma e sangue intero raccolti per questi studi, al fine di mettere in luce possibili marcatori caratteristici del bambino pre-termine rispetto al bambino nato a termine e valutare se questi ultimi siano correlabili con le differenze riscontrate nel profilo delle acilcarnitine dei due gruppi di pazienti.

BIBLIOGRAFIA

1. Reuter S.E., Evans A.M. Carnitine and Acylcarnitines Pharmacokinetic, Pharmacological and Clinical Aspects; *Clin Pharmacokinet* 2012; 51 (9): 553-572.
2. Gulewitsch W., Krimberg R. Zur Kenntnis der Extraktstoffe der Muskeln. II Mitteilung über das Carnitin. *Hoppe Seyler's Z. Physiol Chem* 1905; 45 (3-4): 326-330.
3. Tomita M, Sendju Y. Über die oxyaminverbindungen, welche die Biuretreaktion zeigen. III. Spaltung der γ -amino- β -oxy-buttersäure in die optisch-aktiven Komponenten. *Hoppe Seyler's Z. Physiol Chem* 1927; 169 (4-6): 263-277.
4. Carter H.E., Bhattacharyya P.K., Weidman K.R., et al. Chemical studies on vitamin B12 isolation and characterization as carnitine. *Arch Biochem Biophys* 1952; 38: 405-416.
5. Bremer J. Carnitine: metabolism and functions. *Physiol Rev* 1983; 63(4):1420-1480.
6. Nelson D.L. and Cox M.M. Catabolismo degli acidi grassi. In: *Principi di biochimica di Lehninger*, eds, Zanichelli Publ, Bologna, 2006, pp 644-670.

7. Choi Y.R., Fogle P.J., Clarke P.R., et al. Quantitation of water-soluble acylcarnitine and carnitine acyltransferases in rat tissues. *J Biol Chem* 1977; 252 (22): 7930-7931.
8. Miyazawa S., Ozasa H., Osumi T., et al. Purification and properties of carnitine octanoyltransferase and carnitine palmitoyltransferase from rat liver. *J Biochem* 1983; 94 (2): 529-42.
9. Hoppel C. The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism. *Am J Kidney Dis* 2003; 41 (4 Suppl. 4): S4-12.
10. Osmundsen H., Bremer J., Pedersen J.I. Metabolic aspects of peroxisomal fatty acid oxidation. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1085 (2): 141-58.
11. Treem W.R. Inborn defects in mitochondrial fatty acid oxidation. In: *Liver Disease in Children*. Suchy F ed, Mosby Publ, St. Louis, 1994 pp. 852-887.
12. Dhaunsi G.S., Bitar M.S. Antioxidants attenuate diabetes-induced activation of peroxisomal function in the rat kidney. *J Biomed Sci.* 2004, Sep-Oct; 11(5):566-70.
13. Verhoeven N.M., Roe D.S., Kok R.M., Wanders R.J., Jakobs C., Roe C.R. Phtanic acid and pristanic acid are oxidized by sequential peroxisomal and mitochondrial reactions in cultured fibroblasts. *J lipid Res.* 1998, Jan; 39(1):66-74.
14. Ramsay R.R. and Arduini A. The carnitine acyltransferases and there role in modulating acyl-CoA pools. *Arch Biochem Biophys* 1993; 302 (2): 307-14.
15. Pons R, de Vivo DC. Primary and secondary carnitine deficiency syndrome. *J Child Neurol* 1995; 10 Suppl. 2: S8-24.
16. Arrigoni-Martelli, Caso E, Caso V. Carnitine protects mitochondria and removes toxic acyls from xenobiotics. *Drugs Exp Clin Res* 2001; 27(1):27-49.
17. Rebouche C.J., Seim H. Carnitine metabolism and its regulation in microorganism and mammals. *Annu Rev Nutr* 1998; 18: 39-61.
18. Berk P.D., Stump D.D. Mechanisms of cellular uptake of long chain free fatty acids. *Mol. Cell. Biochem.* 1999; 192: 17-31.
19. Eaton S. Control of mitochondrial β -oxidation flux. *Prog. Lipid. Res.* 2002; 41: 197-239.

20. Lopez-Cardozo M., Klazinga W., van der Bergh S.G. Accumulation of carnitine esters of beta-oxidation intermediates during palmitate oxidation in rat liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 1978; 83: 629-634.
21. Nelson D.L. and Cox M.M. Catabolismo degli acidi grassi. In: Principi di biochimica di Lehninger. Nelson DL and Cox MM eds, Zanichelli Publ, Bologna, 2006, pp 644-670.
22. Smith W.E.S., Millington D.S., Koebert D.D., Lesser P.S. Glutaric Acidemia, Type I, missed by newborn screening in an infant with dystonia following promethazine administration. *Pediatrics* 2001; 107: 1184-1187.
23. Kendler B.S. Carnitine: an overview of its role in preventive medicine, *Prev Med* 1986, 15: 373-390.
24. Jacob C., Belleville F. L-carnitine: metabolism, functions and value in pathology, *Pathol Biol* (Paris)1992 Nov; 40 (9):910-9.
25. Flanagan J.L., Simmons P.A., Vehige J., Willcox M.D., Garrett Q. Role of carnitine in disease, *Nutr Metab* (Lond) 2010 Apr 16; 7:30.
26. Genuth SM, Hoppel CL. Acute hormonal effects on carnitine metabolism in thin and obese subjects: responses to somatostatin, glucagon and insulin, 1981, *Metabolism* 30 (4): 393-401.
27. Opalka J., Gellerich F., Zierz S. Age and sex dependency of carnitine concentration in human serum and skeletal muscle. 2001 *Clin Chem* 47 (12): 2150-3.
28. Rinaldo P., Tortorelli S., Matern D. Recent developments and new applications of tandem mass spectrometry in newborn screening. *Curr Opin Pediatr* 2004; 16: 427-433.
29. Chace D.H., Pons R, Chiriboga C.A., McMahon D.J., Tein I., Naylor E.W., De Vivo D.C. Neonatal blood carnitine concentrations: normative data by electrospray tandem mass spectrometry. *Pediatric research* 2003; 53:823-9.
30. Gucciardi A., Pirillo P., Di Gangi I.M., Naturale M. and 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.

31. Meyburg J., Schulze A, Kohlmueller D, Linderkamp O, Mayatepek E. Postnatal changes in neonatal acylcarnitine profile. *Pediatr Res* 2001; 49: 125-9
32. Meyburg J, Schulze A, Kohlmueller D, et al. Acylcarnitine profiles of preterm infants over the first four weeks of life. *Pediatr Res.* 2002;52:720-3
33. Mandour I., El Gayar D., Amin M., Farid T.M., Ali A.A. Amino acid and acylcarnitine profiles in premature neonates: a pilot study. *Indian J Pediatr.* 2013 Sep;80(9):736-44.
34. De Sain-van der Velden M.G., Diekman E.F., Jans J.J., van der Ham M., Prinsen B.H., Visser G., Verhoeven-Duif NM. Differences between acylcarnitine profiles in plasma and bloodspots. *Mol Genet Metab.* 2013 Sep-Oct;110(1-2):116-21.

CONCLUSIONI GENERALI

Gli studi condotti hanno messo in luce come l'analisi metabolomica, con i suoi approcci untarget e target, costituisca un strumento fondamentale per condurre un'analisi quanto più completa di un campione biologico e come sia in grado di mettere in luce relazioni importanti nella diagnosi di patologia. Abbiamo dimostrato che l'analisi metabolomica è in grado di predire la risposta al test di provocazione orale con latte, in base alle caratteristiche del profilo metabolico urinario basale in bambini affetti da allergia alle proteine del latte vaccino, e che esiste un "fingerprint metabolico" in grado di individuare preventivamente i bambini più a rischio di avere una risposta positiva al test di provocazione orale con alimenti. Il nostro studio ha inoltre dimostrato che il profilo metabolico del liquido amniotico raccolto tra la 21^a e 28^a settimana di gravidanza può discriminare le gravidanze associate a parto pretermine da quelle associate a parto a termine, e identificare i neonati che svilupperanno BPD. Questi risultati supportano l'ipotesi che alcune alterazioni metaboliche prenatali possano giocare un ruolo chiave nella nascita pretermine e nello sviluppo di BPD nel neonato. Anche nell'applicazione dell'approccio target allo studio dei valori di normalità delle acilcarnitine in bambini pretermine i risultati sono stati incoraggianti.

I risultati ottenuti confermano la necessità di definire specifici intervalli di normalità per ogni matrice utilizzata e per ogni gruppo di diversa età gestazionale, inoltre il confronto coi risultati ottenuti da altri autori fa emergere l'importanza che ci siano dei valori di riferimento, sia ai fini diagnostici che di ricerca. L'utilizzo del metodo UPLC-MS/MS ha consentito un'analisi rapida e completa del pool della carnitina nel neonato a termine e pretermine, permettendo per la prima volta l'analisi simultanea di oltre 40 acilcarnitine, comprese alcune forme isomeri e isobare. Tali caratteristiche, unitamente ai risultati ottenuti, ne confermano il possibile utilizzo a scopo diagnostico, ad esempio come estensione dello screening neonatale/test di secondo livello. Inoltre i risultati ottenuti gettano le basi per un successivo studio metabolomico untarget che porti alla luce ulteriori differenze metaboliche tra bambini nati a settimane gestazionali diverse; sia per quanto riguarda le acilcarnitine, sia per quanto riguarda altre vie metaboliche che possono essere importanti nella definizione della condizione di prematurità e di altre patologie.

I risultati ottenuti dagli studi di metabolomica sono stati presenti a due congressi:

- Il lavoro di metabolomica applicata alle allergie alimentari è stato presentato, sottoforma di poster, al I Congresso Europeo MSACL (Salisburgo 1-5 settembre 2014) dove ha ricevuto il premio “young travel award”.

Autori: Costa I., Tirelli F., Pirillo P., Naturale M., Gcciardi A., Stocchero M., Carraro S., Baraldi E. and Giordano G.

Titolo: “Metabolomics approach to the study of allergic disease in paediatric research”.

- Il lavoro di metabolomica applicata al parto pretermine e allo sviluppo di BPD è stato presentato al XVIII Congresso Nazionale SIMRI (2-4 ottobre 2014 Firenze) dove ha ricevuto il premio “giovani ricercatori”.

Autori: Moschino L, Giordano G, Stocchero M, Zaramella P, Costa I, Carraro S, Gervasi MT, Baraldi E.

Titolo: “Il profilo metabolico del liquido amniotico nella predizione del rischio di parto pretermine e sviluppo di displasia broncopolmonare”.

Lo studio relativo alle acilcarnitine è stato invece pubblicato sulla rivista *Pediatric Research*:

“Gucciardi A, Zaramella P, Costa I, Pirillo P, Nardo D, Naturale M, Chiandetti L, Giordano G. Analysis and interpretation of acylcarnitine profiles in dried blood spot and plasma of preterm and full-term newborn. *Pediatr Res.* 2014; 142.”

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio, in primis, il Dott. Giuseppe Giordano, per avermi dato la possibilità di lavorare nel laboratorio di Spettrometria di Massa e Metabolonica, mettendo a disposizione le sue conoscenze e la sua esperienza e permettendomi così di ampliare la mia conoscenza scientifica.

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

Ringrazio il Prof. Eugenio Baraldi e la Dott.ssa Silvia Carraro per il fondamentale contributo nella stesura della parte clinica.

Ringrazio le Dott.sse Mariangela Berardi, Francesca Tirelli e Laura Moschino, per aver contribuito alla raccolta dei campioni e per essere state delle ottime compagne di lavoro.

Ringrazio la Dott.ssa Antonina Gucciardi e la Dott.ssa Paola Pirillo per il sostegno scientifico e personale che mi avete riservato in questi tre anni passati insieme. Colleghe nel lavoro e “sorelle maggiori” nella vita. Grazie.

Ringrazio Mauro Naturale ed Enzo Pegoraro per la loro presenza costante e rassicurante, per avermi aiutato nella risoluzione dei problemi di tutti i giorni e per aver contribuito a rendere il mio lavoro migliore.

Ringrazio tutto il Laboratorio SPM (Anto, Paola, Mauro, Enzo ed Elena) e tutte le dottoresse che hanno lavorato con me, perché ognuno di voi ha reso questa esperienza unica.

Infine ringrazio i miei genitori per aver sempre creduto in me nonostante tutto, per essermi stati vicini in tutte le scelte della vita e per avermi sostenuto in tutto il mio percorso di studi. Senza di voi non avrei potuto raggiungere questo traguardo.

...e grazie a te, Luca, perché ci sei, sempre.