



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

Scuola di dottorato in
Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche
Indirizzo: Biochimica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare
Direttore: Prof. Bruno Masala

Sviluppo di strategie analitiche per la misurazione delle arginine
metilate libere ed incorporate nelle proteine

Tutor:
Prof. **Luca Deiana**

Dottoranda:
Dr. **Bastianina Scanu**

1.INTRODUZIONE	3
1.1 Cenni sull'aterosclerosi	3
1.2 Endotelio	6
1.3 L'ossido nitrico	8
1.4 La dimetil-arginina asimmetrica (ADMA).....	10
1.5 ADMA come marker di disfunzione endoteliale.....	12
2.GENERALITÀ SULL'ELETTROFORESI CAPILLARE.....	15
2.1 Alimentatore	16
2.2 Capillare.....	16
2.3 Rivelatore	18
2.4 Principi di separazione in CE.....	19
2.5 Tecniche in CE.....	22
2.5.1 Elettroforesi capillare zonale (CZE).....	22
3. SCOPO DELLA TESI	24
4.MATERIALI E METODI	25
4.1 Materiali.....	25
4.2 Preparazione dei campioni per la determinazione dell'ADMA free.....	25
4.3 Preparazione dei campioni per la determinazione dell'ADMA incorporata nelle proteine	26
4.4 Elettroforesi capillare.....	26
5.RISULTATI E DISCUSSIONE	28
5.1 ARGININE METILATE LIBERE	28
5.1.1 Ottimizzazione della separazione degli analiti	28
5.1.2 Concentrazione dei campioni	30
5.1.3 Validazione del metodo	32
5.2 DETERMINAZIONE DELLE ARGININE METILATE INCORPORATE NELLE PROTEINE	35
5.3 APPLICAZIONI CLINICHE	37
5.3.1 Occlusione venosa della retina (RVO).....	38
5.3.2 Spondilite Anchilosante (SA).....	43
5.3.3 Attività fisica e ADMA	47
6.CONCLUSIONI	53
7. BIBLIOGRAFIA	56

1.INTRODUZIONE

Le malattie vascolari rappresentano la principale causa di mortalità e disabilità nel mondo occidentale. La causa di tali patologie è principalmente il processo aterosclerotico a cui concorrono diversi fattori eziologici.

Negli ultimi anni si fa sempre più pressante la necessità di individuare marcatori precoci della malattia cardiovascolare al fine di sviluppare procedure terapeutiche atte a ridurre la progressione del danno vasale già nelle fasi precoci della malattia. A tal proposito l'attenzione si è rivolta allo studio della parete vasale in quanto essa è il sito in cui avvengono le alterazioni precoci della malattia.

La disfunzione endoteliale, considerata la prima tappa nello sviluppo delle alterazioni strutturali e funzionali tipiche del processo aterosclerotico, viene estensivamente studiata sia dal punto di vista funzionale (variazioni dinamiche del tono arterioso in risposta a stimoli ischemici o farmacologici) sia dal punto di vista degli esami di laboratorio con il dosaggio di marcatori specifici della funzione endoteliale.

1.1 Cenni sull'aterosclerosi

L'aterosclerosi è una malattia infiammatoria cronica delle arterie di grande e medio calibro che si manifesta con un'alterazione del tono vasale e un incremento della capacità "adesiva" delle cellule endoteliali (1).

Anatomicamente, la lesione caratteristica dell'aterosclerosi è l'ateroma o placca aterosclerotica, ossia un ispessimento dell'intima (lo strato più interno delle arterie, che è rivestito dall'endotelio ed è in diretto contatto con il sangue) delle arterie dovuto principalmente all'accumulo di sostanze grasse, cellule e da una componente calcifica diffusa o localizzata, che tende progressivamente ad aumentare nel tempo e a proliferazione del tessuto connettivo.

Il primo evento nella formazione dell'ateroma consiste nell'infiltrazione delle lipoproteine nella parete dell'arteria, e nel loro conseguente sequestro nell'intima (2). Questo processo di intrappolamento può essere il risultato dell'interazione tra la componente proteica delle LDL (apo B) e sostanze come i glicosaminoglicani delle strutture intimali, o di modificazioni delle lipoproteine di natura chimica, come ossidazione, glicazione o combinazione con la malondialdeide. Le lipoproteine modificate vengono fagocitate dai macrofagi (3) attraverso un meccanismo dipendente da un recettore diverso dal recettore specifico delle LDL. Questo "recettore spazzino" (scavenger) non viene inibito da un eccesso di colesterolo intracellulare (come invece avviene per il recettore specifico delle LDL), cosicché l'internalizzazione delle LDL modificate prosegue, dando luogo a un accumulo di colesterolo in forma di goccioline che conferiscono alle cellule un aspetto schiumoso. Si formano così le cellule schiumose (foam cells) caratteristiche della lesione ateromatosa.

L'infiltrazione delle macromolecole lipoproteiche nell'intima può essere accelerata da un danneggiamento dell'endotelio che la riveste, come può

verificarsi in seguito a ipertensione. Le sedi colpite dalle lesioni corrispondono alle zone del sistema vascolare sottoposte a stress, come quelle in cui si verifica una turbolenza o altre perturbazioni del flusso ematico. Se la risposta infiammatoria non riesce a neutralizzare efficacemente o a rimuovere gli agenti dannosi, essa può continuare e dare luogo ad un aumento del numero di monociti-macrofagi e linfociti T, che migrano dal sangue e si moltiplicano all'interno della lesione. L'attivazione di queste cellule conduce alla liberazione di enzimi proteolitici, citochine, chemochine e fattori di crescita che possono condurre ad un danno ulteriore ed eventualmente causare una necrosi focale all'interno della lesione.

In effetti, i mediatori dell'infiammazione come il fattore di necrosi tumorale (TNF)-alfa, l'interleuchina (IL)-1, il fattore stimolante la crescita di colonie macrofagiche (M-CSF) e la proteina chemiotattica dei monociti (MCP)-1 favoriscono il legame delle LDL all'endotelio e al muscolo liscio e inducono la trascrizione del gene per il recettore delle LDL (4).

Pertanto, la presenza di questi lipidi nei vasi alimenta un circolo vizioso che dall'infiammazione porta alla modificazione delle lipoproteine e quindi ad un ulteriore stato infiammatorio.

Se gli agenti che creano il danno non vengono rimossi o neutralizzati dalla risposta infiammatoria e l'infiammazione progredisce, la risposta da protettiva diventa dannosa. Infatti, uno stimolo dannoso costante o ripetitivo può indurre i

tessuti a riparare o ad arginare il danno attraverso una risposta fibroproliferativa.

Le lesioni avanzate stabili sono caratterizzate da capsule fibrose uniformemente dense. Le lesioni potenzialmente pericolose sono spesso non-occlusive e pertanto difficili da diagnosticare mediante angiografia.

L'infarto del miocardio insorge nella gran parte dei pazienti a causa dell'erosione o della degradazione e rottura della capsula fibrosa della placca che avviene grazie alla produzione di metalloproteinasi, come la collagenasi, l'elastasi e la stromelisinasi da parte dei macrofagi presenti nella lesione. Le cellule T attivate possono stimolare la biosintesi di questi enzimi e quindi promuovere l'instabilità della placca.

1.2 Endotelio

Considerato in passato come un semplice rivestimento dei vasi, attualmente l'endotelio viene visto come un vero e proprio organo, capace di elaborare una vastissima quantità di sostanze attive, in grado di modulare l'attività sia delle varie strutture della parete vasale da esso rivestite, sia delle cellule ematiche e delle proteine del sistema coagulativo, che vengono in contatto con la sua superficie luminale. Parte di queste sostanze sono secrete dalle cellule endoteliali nelle immediate vicinanze (secrezione paracrina), per esercitare i loro effetti sulla parete vasale, o sono immesse nella circolazione (secrezione endocrina) per svolgere la loro azione a distanza, come nel caso delle sostanze che concorrono al controllo della pressione arteriosa (es. ossido di azoto e

endotelina) (5). Altre molecole prodotte dall'endotelio esplicano la loro azione rimanendo legate alla superficie delle cellule endoteliali, come accade per le molecole di adesione per i leucociti o per quelle che influenzano la coagulazione.

Alcune di queste sostanze sono prodotte costitutivamente (cioè anche in condizioni basali), altre invece vengono elaborate soltanto quando le cellule endoteliali vengono attivate da stimoli appropriati, come avviene, ad esempio, nel corso dell'infiammazione. Si parla di disfunzione endoteliale quando risulta compromessa la capacità delle cellule endoteliali di elaborare quelle sostanze che vengono prodotte in condizioni fisiologiche. Per attivazione endoteliale si intende propriamente la stimolazione alla sintesi di molecole, che non vengono prodotte in condizioni fisiologiche. Tuttavia nella maggioranza dei casi la disfunzione e l'attivazione endoteliale sono presenti contemporaneamente e si parla in generale di disfunzione endoteliale. La disfunzione endoteliale è quindi caratterizzata dall'espressione di molecole adesive alla superficie cellulare e dalla compromissione della attività endocrino-paracrina dell'endotelio, con secrezione di sostanze biologicamente attive (citochine, fattori di crescita, radicali liberi, ecc.), che sono responsabili dell'attivazione dei leucociti e del controllo del tono vasale. L'alterazione funzionale si manifesta anche con modificazioni delle proprietà emostatiche dell'endotelio e della permeabilità alle proteine plasmatiche. Sebbene la disfunzione riguardi tutte le funzioni endoteliali, clinicamente la disfunzione endoteliale viene valutata

principalmente come compromissione della vasodilatazione endotelio-dipendente a livello del circolo coronarico o di quello brachiale (6).

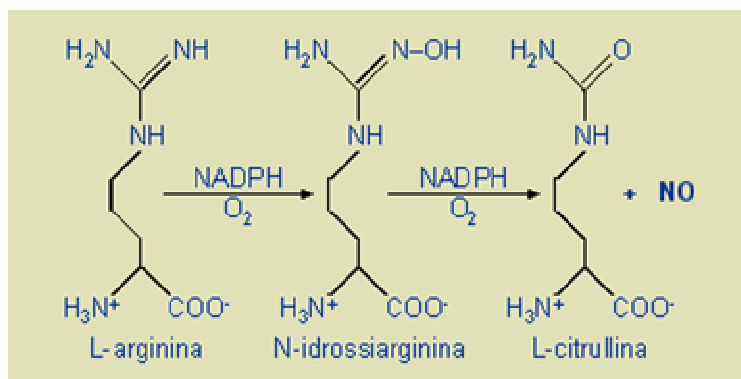
Nella formazione dell'aterosclerosi (aterogenesi) vanno identificati il danno dell'endotelio (danno funzionale o disfunzione endoteliale) dovuto a diverse cause: aumento delle LDL e le loro modificazioni ossidative, i radicali liberi formati in seguito al fumo di sigaretta, ipertensione, diabete mellito, microrganismi infettivi come l'Herpes Virus e la Clamydia pneumoniae, aumentati livelli di omocisteina, inibitori competitivi della NOS (ossido nitrico sintasi) e la combinazione di questi fattori (7).

Indipendentemente dalla causa della disfunzione endoteliale, una volta che ciò si è realizzato, si osserva la tendenza delle LDL a passare nello strato sottoendoteliale, dei leucociti o delle piastrine ad aderire all'endotelio, mentre le proprietà procoagulanti dell'endotelio tendono a prevalere su quelle anticoagulanti.

1.3 L'ossido nitrico

L'ossido nitrico (NO) è coinvolto in una vasta gamma di meccanismi regolatori del sistema cardiovascolare: esso media la vasodilatazione endotelio-dipendente, inibisce la proliferazione delle cellule muscolari lisce, l'aggregazione piastrinica e dei leucociti, l'adesione dei monociti, l'ossidazione delle LDL e inibisce la formazione dei radicali liberi (8-11). Una scarsa biodisponibilità di NO è causa di disfunzione endoteliale e questo gioca un ruolo centrale nel processo delle malattie cardiovascolari. L'NO viene sintetizzato dall'ossidazione

stereospecifica di un nitrogene guanilato terminale dell'aminoacido L-arginina (L-ARG) in una reazione multi-step catalizzata dalla NOS (ossido nitrico sintasi) in cui si forma L-citrullina (12).



Le cellule dei mammiferi presentano almeno tre geni in grado di codificare per ogni isomero della NOS, dando così luogo alla formazione dei tre isoenzimi, NOS endoteliale (eNOS), NOS neuronale (nNOS) e NOS inducibile (iNOS) (13). Le forme costitutive (eNOS e nNOS) sono Ca^{2+} /calmodulina dipendenti (CAM). Questi enzimi producono costantemente piccole quantità di NO partecipando così alla regolazione dei processi fisiologici.

Le forme inducibili compaiono nelle cellule dopo induzione da endotossine e da citochine batteriche. L'NO sintasi è un dimero costituito da un dominio ossigenasico ed uno reduttasico. In condizioni catalitiche ideali (la presenza di una concentrazione ideale di L-arginina e di tutti i cofattori come tetraidrobiopterina (BH₄), calmodulina, NADPH, FMN e FAD) il trasferimento di elettroni avviene a partire dall'ossigeno (O₂) attraverso la cascata dei cofattori fino ad arrivare all'L-arginina e producendo infine citrullina ed NO. In caso di

condizioni sub-ottimali come la scarsa disponibilità di L-arginina, presenza di colesterolo LDL o presenza di ADMA il meccanismo catalitico è disaccoppiato. Una volta che l'NO entra all'interno della cellula attiva una serie di reazioni a cascata in cui viene attivata la proteina cGMP. Un aumento dei livelli di GMP ciclico fa diminuire l'entrata degli ioni Ca inibendo così la formazione del complesso Ca-calmodulina che causa una ridotta fosforilazione delle catene leggere di miosina determinando una ridotta contrazione delle cellule muscolari lisce.

1.4 La dimetil-arginina asimmetrica (ADMA)

La produzione di NO può essere ridotta dall'inibizione competitiva della NOS mediata dagli analoghi dell'arginina, in particolare la dimetilarginina asimmetrica (ADMA) e la monometilarginina simmetrica (L-NMMA).

Le arginine metilate derivano dal catabolismo di proteine che contengono residui di arginina che viene metilata post-traduzionalmente. In particolare la reazione è mediata dalle protein-arginin metiltransferasi (PRMTs) (14). La protein-arginin metiltransferasi può essere di tipo I (PRMT I) e produce l'ADMA o di tipo II (PRMT II) che produce la dimetilarginina simmetrica (SDMA) (15). I gruppi metilici derivano dall' S-adenosilmetionina (SAM) (16) che donando il metile si trasforma in S-adenosilomocisteina (SAH) grazie all'enzima N-metiltransferasi. L'attività della PRMT è regolata dalla presenza di SAM e di SAH, infatti una concentrazione elevata di SAM promuove la

metilazione delle proteine mentre l'aumento di SAH inibisce l'attività dell'enzima.

Le arginine metilate (ADMA e SDMA) sono eliminate dall'organismo con l'escrezione urinaria. È stato dimostrato infatti da Vallance (17) che pazienti con malattia renale cronica hanno un aumento da due a dieci volte rispetto ai controlli delle concentrazioni di ADMA. In pazienti sottoposti ad emodialisi, in cui sono presenti livelli alti di ADMA e SDMA, è stato notato che dopo dialisi peritoneale si ha un abbassamento dei livelli plasmatici di SDMA ma pressoché inalterati livelli di ADMA (18,19). Ciò può essere spiegato col fatto che i reni sono l'unica via di eliminazione della SDMA mentre per l'ADMA esiste un'altra via di eliminazione alternativa (20).

Il metabolismo dell'ADMA, e non della SDMA, avviene tramite degradazione idrolitica ad opera dell'enzima dimetilarginina dimetilidrolasi (DDAH) che sembra essere responsabile di circa il 90% del catabolismo (21). L'attività dell'enzima DDAH produce citrullina e dimetilamina. Sono state identificate due forme di DDAH: il tipo I è localizzato nei tessuti che esprimono la nNOS, mentre il tipo II si riscontra prevalentemente nei tessuti che contengono la eNOS (22). L'attività di questo enzima è soggetta ad un complesso meccanismo regolatorio che non è ancora noto in dettaglio. Ito et al. (23) hanno dimostrato che lo stress ossidativo delle LDL ossidate o TNF- α fa diminuire l'attività della DDAH, ma non l'espressione dell'enzima, in cellule endoteliali in coltura. La DDAH è inattivata anche dalla S-nitrosilazione (24), suggerendo l'esistenza di

un meccanismo regolatorio a feedback nel quale alti livelli di NO aumentano i livelli di ADMA. Quindi, l'ADMA viene costantemente prodotta dal turnover delle proteine ed eliminata dalla DDAH, perciò un'alterata attività dell'enzima contribuisce ad un aumento dei livelli plasmatici di ADMA in diverse patologie.

1.5 ADMA come marker di disfunzione endoteliale

Sembra che esista un'importante relazione tra i livelli di ADMA e la gravità del danno endoteliale: in uno studio su soggetti sottoposti ad emodialisi i livelli di ADMA sono risultati predittivi di eventi cardiovascolari e di mortalità. Questa scoperta supporta l'ipotesi che l'ADMA sia un marker del rischio di patologia cardiovascolare in questi pazienti come inibitore della NOS. L'aumento dei livelli di ADMA è stato studiato anche in rapporto ai tradizionali fattori di rischio cardiovascolare come l'ipercolesterolemia, l'ipertensione, il diabete, l'iperomocisteinemia e nei soggetti con patologie aterosclerotiche.

La concentrazione di ADMA aumenta in conigli ipercolesterolemici (25) che sottoposti a una dieta arricchita con 1% di colesterolo mostrano un incremento in sole 4 settimane rispetto ai controlli (26). L'ADMA aumenta anche in soggetti umani con ipercolesterolemia o aterosclerosi.

Attualmente l'ADMA viene comunemente misurata mediante dosaggi immunoenzimatici, che oltre ad essere costosi non permettono di determinare simultaneamente anche l'arginina o la SDMA che possono dare indicazioni cliniche aggiuntive importanti.

Per questo scopo vengono utilizzate le metodiche in HPLC o GC che permettono di analizzare tutte le arginine ma si tratta di determinazioni costose e che spesso necessitano di passaggi complicati e dispendiosi in termini di tempo. In particolare i metodi HPLC, tra i più utilizzati in letteratura, necessitano di un passaggio di estrazione degli analiti previo passaggio del campione in colonnina (estrazione in fase solida) e successiva derivatizzazione mediante OPA (ortho-phthaldialdeide) (27-39)

Tuttavia, i derivati sono spesso instabili e oltre alla perdita di fluorescenza nel corso dell'analisi in HPLC, le arginine metilate non sono ben risolte in determinate condizioni cromatografiche. Inoltre i tempi di analisi in HPLC richiedono spesso tempi lunghissimi (20-50 minuti).

Anche la quantificazione delle arginine incorporate nelle proteine necessita di passaggi per la purificazione dopo la derivatizzazione con OPA (40,41). Tuttavia in questo caso l'arricchimento dell'analita durante la preparazione del campione potrebbe essere facilmente eseguito a partire da concentrazioni più elevate di proteine, rendendo possibile migliorare altri approcci analitici per l'analisi.

Per questo motivo è stato deciso di mettere a punto un nuovo metodo in elettroforesi capillare (CE). Questo strumento infatti permette la stessa tipologia di analisi di un sistema HPLC e quindi la possibilità di quantificare simultaneamente più analiti, ma la duttilità durante la fase di messa a punto di nuovi metodi, la semplicità di impiego e la possibilità di abbattere in maniera

notevole sia i costi sia i tempi di analisi lo rendono un ottimo strumento nell'analisi chimico-clinica per screening di massa.

2.GENERALITÀ SULL'ELETTROFORESI CAPILLARE

Attualmente le metodiche in elettroforesi capillare relativamente nuove stanno avendo uno sviluppo eccezionale paragonabile a quello avuto, negli anni passati, dalla tecnica cromatografica ad alta risoluzione (HPLC) in ambito cromatografico.

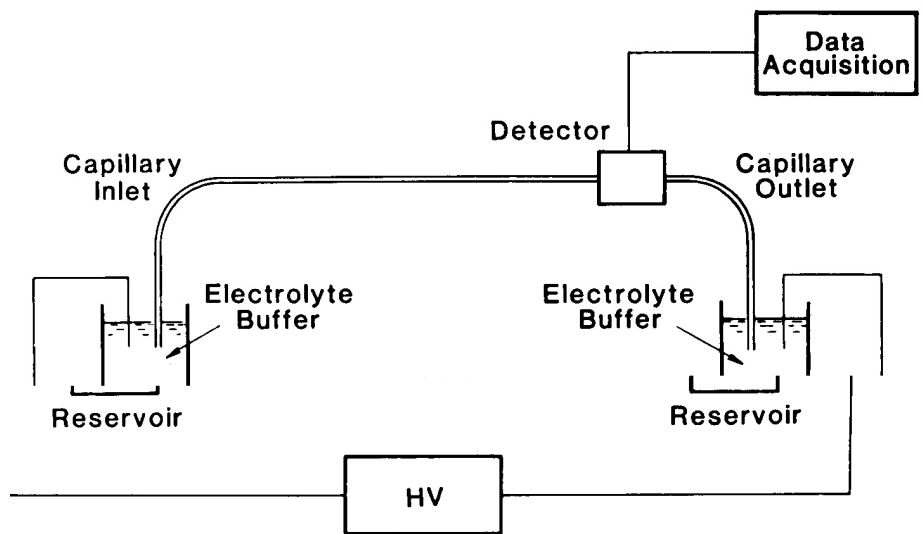
I motivi risiedono in alcune sue interessanti caratteristiche:

- Elevate possibilità di automazione;
- Efficienze estremamente elevate sull'ordine della gas-cromatografia;
- Elevata sensibilità e riproducibilità
- Quantità di tampone e di campione richieste per l'analisi estremamente basse;
- Possibilità di separare sostanze sia cariche sia neutre

Gli elementi fondamentali della strumentazione comprendono un generatore di corrente ad alto voltaggio, un capillare ed il rivelatore; il capillare è teso tra due pozzetti riempiti con l'opportuno tampone (BGE= Background electrolyte), nei quali sono immersi, oltre alle estremità del capillare, due elettrodi di platino collegati all'alimentatore; verso la fine del capillare è posto il rivelatore, il quale è collegato ad un sistema per l'amplificazione del segnale e per l'acquisizione ed elaborazione dei dati.

L'apparecchiatura comprende comunque anche altre parti altrettanto importanti quali, per esempio, l'autosampler per l'alloggiamento dei campioni e/o dei tamponi.

La strumentazione per elettroforesi capillare può essere schematizzata come:



Componenti fondamentali della strumentazione per elettroforesi capillare.

2.1 Alimentatore

Costituisce una parte fondamentale della strumentazione poiché è responsabile, direttamente o indirettamente, del movimento all'interno del capillare, delle specie da separare; per assolvere a tale funzione il generatore deve essere in grado di generare campi elettrici abbastanza elevati da 200 a 1000 V/cm, voltaggi compresi tra 1 e 30 kV, correnti da 0 a 250 μ A e deve permettere lo scambio delle polarità ai capi degli elettrodi di platino immersi nei pozzetti (vials).

2.2 Capillare

Le sue dimensioni, per quanto riguarda il diametro interno e la lunghezza, sono variabili in un range compreso, rispettivamente, tra 25-100 μ m e 15-

100 cm; il materiale di cui si compongono è generalmente la silice fusa o il teflon, anche se quest'ultimo trova scarsa applicazione in quanto non ci sono in commercio capillari in teflon con un diametro interno ridotto.

I capillari in silice fusa invece, pur essendo molto fragili, sono molto diffusi e all'inconveniente della fragilità si ovvia rivestendo il capillare con uno strato di poliimmide che viene poi rimosso, in corrispondenza del rivelatore, o con una fiamma o con acido solforico concentrato a una temperatura di 120 °C; la rimozione dello strato di poliimmide è necessaria per sfruttare la trasparenza agli UV della silice fusa.

Il volume dei capillari è relativamente basso per cui il volume di campione iniettabile è anch'esso basso; solitamente si iniettano volumi compresi tra 2,5 e 100 nl, vale a dire meno dell'1% del volume del capillare.

Il capillare risiede, solitamente, all'interno di una particolare cartuccia in cui circola liquido termostato, fondamentale per evitare l'innalzamento della temperatura e la conseguente degradazione di sostanze termolabili, nonché alterazioni delle condizioni analitiche di separazione.

Nella cartuccia, a una certa altezza, è presente una finestrella che permette, in senso trasversale, il passaggio della luce emessa da una opportuna sorgente; la radiazione viene quindi focalizzata ed inviata alla finestrella, a livello della quale investe il centro del capillare, preventivamente trattato in modo da rimuovere, almeno per tutta la lunghezza della finestrella, lo strato di poliimmide.

Gli estremi del capillare sporgono dalla cartuccia per circa 5 cm (cartucce Beckman) e quando la cartuccia trova posto nella sua sede, all'interno dello strumento, si trovano allineati ai due elettrodi di platino, che li proteggono dalla rottura.

2.3 Rivelatore

Nonostante i piccoli volumi di campione iniettabili, la rivelazione in CE è comunque competitiva con altre tecniche analitiche quale, per esempio, l'HPLC, dalla quale sono stati spesso mutuati i principali sistemi di rivelazione.

Tra i metodi di rivelazione maggiormente utilizzati in CE vi è sicuramente la misura di assorbanza in UV, si hanno però anche rivelatori di fluorescenza, conducibilità elettrica, amperometrici ecc.

In CE è possibile anche la rivelazione indiretta, attraverso la quale il campione viene individuato e quantificato, paradossalmente, sulla base della sua non rivelazione; in sostanza non si fa altro che utilizzare un tampone con particolari proprietà chimico-fisiche a cui il rivelatore risponde con un segnale di fondo elevato. In queste condizioni quando la specie chimica analizzata raggiunge il rivelatore, scalsa il BGE determinando un decremento del segnale, che risulta evidente attraverso la formazione di un picco negativo, cioè sotto la linea di base. La rivelazione indiretta si rende necessaria ed è particolarmente utile, quando il campione in esame non possiede nessuna caratteristica misurabile con i comuni

rivelatori e quando non sia possibile neanche la sua derivatizzazione. La rivelazione indiretta è stata applicata con successo, per esempio, per la risoluzione di miscele complesse di cationi e con essa è possibile separare virtualmente qualunque tipo di sostanza.

2.4 Principi di separazione in CE

In elettroforesi capillare la separazione delle sostanze avviene all'interno di un capillare, nel quale viene iniettata una piccolissima quantità di campione.

Dopo l'iniezione alle estremità del capillare viene applicata una forte differenza di potenziale per cui le specie chimiche presenti nel campione migrano a velocità costante ma differente da specie a specie. La differente velocità posseduta dalle molecole all'interno del capillare permette la loro separazione e identificazione in quanto esse raggiungeranno il rivelatore in tempi differenti.

La velocità con cui le diverse molecole si muovono all'interno del capillare è la risultante di due fenomeni: la mobilità elettroforetica ed il flusso elettroendosmotico.

La mobilità elettroforetica è una caratteristica propria di ogni sostanza e rappresenta la velocità di migrazione posseduta da uno ione quando, alla soluzione che lo contiene, viene applicato un campo elettrico; in queste circostanze lo ione risente sia della forza del campo elettrico, che tende a muoverlo verso il compartimento elettrodico di carica opposta, sia della

viscosità del mezzo che invece si oppone al suo movimento. La mobilità elettroforetica μ_i è matematicamente espressa dalla relazione:

$$\mu_i = \frac{q}{6 \pi r_i \eta}$$

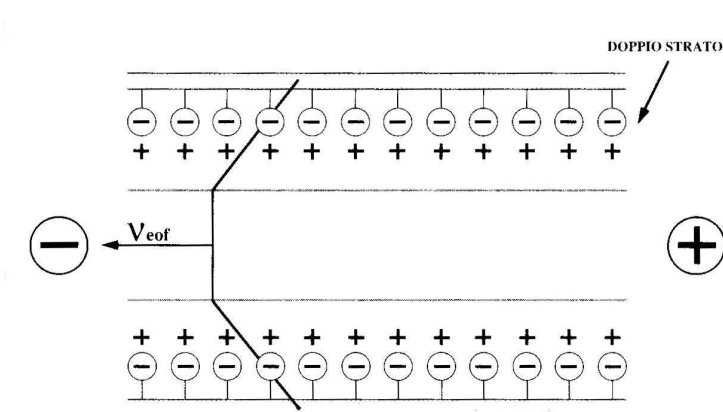
in cui:

q = carica dello ione;

η = viscosità del mezzo;

r_i = raggio della particella;

L'origine del flusso elettroosmotico (EOF) è in stretta dipendenza con la composizione chimica del materiale utilizzato per costruire il capillare, generalmente in silice fusa rivestita con uno strato di un polimero, solitamente di polimide. Sulla superficie interna del capillare sono presenti dei gruppi silanolo, i quali a pH acidi si caricano negativamente; non appena tale carica si forma, al fine di neutralizzarla, i cationi contenuti nel BGE tendono ad aggregarsi in prossimità dei gruppi silanologici carichi negativamente, generando un doppio strato elettrico di spessore dell'ordine del nanometro, come nello schema in Figura:



Direzione e origine del flusso elettroosmotico.

Nel momento in cui viene applicato un campo elettrico alle estremità del capillare, i cationi del doppio strato migrano verso il catodo e, poiché sono solvatati, trasportano anche il solvente generando un flusso netto di tampone, detto appunto flusso elettroendosmotico.

Le specie chimiche presenti nel campione vengono spinte perciò, indipendentemente dalla loro carica e quindi dalla loro mobilità elettroforetica, verso il catodo. Il valore dell'EOF può essere molto forte, con una velocità di 2 mm/s a pH 9 in sodio borato 20 mM; a pH relativamente acidi l'EOF è meno intenso e si attesta, in capillari con un diametro di 50 µl, attorno a 0,5 µl/s; il valore assunto dall'EOF può essere dedotto matematicamente mediante l'espressione:

$$v_{\text{eof}} = \frac{\varepsilon \zeta}{4 \pi \eta} E$$

in cui:

ε = costante dielettrica del mezzo;

ζ = potenziale zeta;

η = viscosità del mezzo;

E = campo elettrico applicato;

Alcune tecniche in CE richiedono l'abolizione dell'EOF, esistono perciò metodi per controllarlo o sopprimerlo, mentre altre sfruttano appieno il fenomeno, permettendo la separazione contemporanea di cationi, anioni e specie neutre: a pH neutri o alcalini, infatti, l'EOF è molto più intenso della

mobilità elettroforetica per cui le specie chimiche migrano verso il rivelatore nell'ordine cationi, specie neutre, anioni.

Nel corso della separazione, qualora non sia stato soppresso, al flusso elettroendosmotico si somma, nel caso di ioni positivi, oppure si sottrae, nel caso di ioni negativi, la tipica mobilità elettroforetica; nel caso di composti neutri la separazione, ma non la risoluzione, dipende invece unicamente dalle caratteristiche del flusso elettroendosmotico.

2.5 Tecniche in CE

L'elettroforesi capillare comprende diverse tecniche che si differenziano nelle caratteristiche operative e di separazione; esse sono:

- Elettroforesi capillare zonale (CZE);
- Isoelettrofocalizzazione (IEF),
- Elettroforesi gel capillare (CGE);
- Isotacoforesi (ITP);
- Cromatografia capillare elettrocinetica micellare (MECC).

2.5.1 Elettroforesi capillare zonale (CZE)

La tecnica usata per la messa a punto della nuova metodica per la misurazione delle arginine metilate viene effettuata in elettroforesi capillare zonale.

È anche conosciuta come elettroforesi capillare in soluzione libera e rappresenta la tecnica in CE più semplice e più utilizzata.

La separazione avviene all'interno di capillari con un diametro compreso tra 25-75 μm riempiti di tampone ed in assenza di supporto; dopo l'iniezione e l'applicazione del voltaggio gli analiti contenuti nel campione si dispongono, in funzione del rapporto carica/massa analita, in zone discrete; in CZE è possibile lavorare in presenza o meno di EOF; l'effetto dell'EOF sarà più forte a pH nettamente alcalini mentre a pH bassi sarà la componente μ_i a prevalere; nel primo caso sarà possibile la separazione anche di composti neutri, senza però risoluzione giacché essi migreranno con la stessa velocità costituendo un unico picco. L'eccezionale diffusione della metodica free zone è dovuta alla sua versatilità e semplicità applicativa, che si manifesta attraverso la possibilità di modificare velocemente diversi parametri influenzanti la separazione quali il pH, l'intensità dell'EOF, la forza ionica, la temperatura ecc.

3. SCOPO DELLA TESI

L'endotelio gioca un ruolo fondamentale nel mantenimento del tono e della struttura vasale. Uno dei maggiori mediatori prodotto dall'endotelio stesso è l'ossido nitrico (NO), che deriva dall'aminoacido L-Arginina grazie all'enzima ossido nitrico sintasi (NOS).

L'NO è implicato in una serie di meccanismi regolatori del sistema cardiovascolare quali l'inibizione della proliferazione delle cellule muscolari lisce, l'inibizione dell'adesione delle piastrine e dei monociti.

Una scarsa biodisponibilità di NO porta dunque ad una disfunzione endoteliale che è una fra le prime cause dello sviluppo delle malattie aterosclerotiche. In particolar modo l'arginina metilata asimmetrica (ADMA), che è un inibitore endogeno della NOS e che deriva dalla proteolisi di proteine metilate post tradizionalmente, è un utile biomarker per malattie vascolari.

Lo scopo della presente tesi è stato quello della messa a punto di nuove metodiche per la quantificazione dell'ADMA plasmatica (free) e incorporata nelle proteine in elettroforesi capillare zonale che fosse in grado di fornire dei risultati in breve tempo, ma che allo stesso tempo si rivelasse economica, attendibile, riproducibile e applicabile in campo biochimico, clinico e della ricerca.

4.MATERIALI E METODI

4.1 Materiali

L'arginina, la dimetilarginina asimmetrica (ADMA), la dimetilarginina simmetrica (SDMA), l'omoarginina, il tris, l'acido fosforico, l'acido idroclorico, l'ammoniaca concentrata (25%), l'acetonitrile che provengono dalla Sigma (St Louis, USA). I filtri (0,45 μm ;usato per filtrare tutti i tamponi prima di iniettare in elettroforesi capillare) prodotto da Millipore (Bedford, USA). I filtri Vivaspin 500 microconcentratori (cut off Mr 10000, membrana MWCO PES) prodotti da Vivascience AG (Hannover ,Germania).

Per la retta di taratura (1 mmol/L per l'arginina, l'ADMA e la SDMA) sono stati accuratamente preparati disciogliendo la quantità pesata in 10 mmol/L HCl. Come descritto da Teerlink (40), queste soluzioni sono stabili a 4°C per più di un anno. Le concentrazioni finali sono sono 200 $\mu\text{mol/L}$ per l'ADMA e la SDMA e vengono conservati a queste concentrazioni a -20°C. La soluzione stock dello standard interno (IS) omoarginina (1mmol/L disciolto in 10 mmol/L di HCl) è conservato a -20°C.

4.2 Preparazione dei campioni per la determinazione dell'ADMA free

Il sangue viene raccolto tramite prelievo venoso in provette con EDTA e immediatamente centrifugato a 3000 g per 5 minuti a 4°C.

Il plasma (400 μl) ottenuto viene miscelato con 50 μl di IS omoarginina (50 $\mu\text{mol/L}$ di concentrazione finale). In seguito vengono aggiunti 900 μl

ACN/ammoniaca (90/10) per precipitare le proteine. Dopo centrifugazione a 3000 g per 5 min, il surnatante viene raccolto e trasferito in provette pulite per essere evaporato. In seguito viene risospeso e disciolto bene in 500 μ l di H₂O e successivamente filtrato nei microconcentratori Vivaspin 500 praticando una centrifugazione a 3000 g per 20 min per poter eliminare ulteriori proteine rimaste. Il campione così trattato (circa 300 μ l) viene di nuovo evaporato. Infine i campioni e gli standard vengono risospesi in 50 μ l di H₂O e iniettati in elettroforesi capillare.

4.3 Preparazione dei campioni per la determinazione dell'ADMA incorporata nelle proteine

Il sangue viene raccolto tramite prelievo venoso in provette con EDTA e immediatamente centrifugato a 3000 g per 5 minuti a 4°C.

Un mg di proteine plasmatiche vengono precipitate con 1 ml di TCA al 10%. Dopo la centrifugazione a 3000 g per 5 min il pellet viene lavato 2 volte con 1 ml di TCA al 3%.

Dopo idrolisi acida delle proteine (con 400 mL di HCl 6 M a 110°C per 16 ore) i campioni sono stati essiccati, risospesi in 1 mL di H₂O, e iniettato direttamente in CE.

4.4 Elettroforesi capillare

È stato utilizzato il sistema d'elettroforesi capillare MDQ, equipaggiato di un detector diode-array (Beckman Instruments, CA, USA) e dotato di

un'alimentazione di 30 kV con un limite di corrente di 300 mA. L'analisi viene effettuata in un capillare "uncoated" di silice fusa (75 μm di diametro e 60,2 cm di lunghezza, 50 cm dalla finestra di rilevazione) iniettando 1s di H_2O (0,5 psi) seguito da 10 s di campione (0,5 psi). La separazione viene effettuata con il tampone tris 50 mmol/L titolato con acido fosforico 1 mol/L a pH 2,3 per la determinazione dell'ADMA free mentre con lo stesso tampone a pH 2,15 per l'ADMA legata alle proteine. La corsa viene effettuata a una temperatura di 15°C, e ad un voltaggio di 15kV (75 mA) in polarità normale. Dopo ogni corsa il capillare viene lavato con acido cloridrico 0,1 mmol/L e riequilibrato per un minuto con il buffer di corsa.

5.RISULTATI E DISCUSSIONE

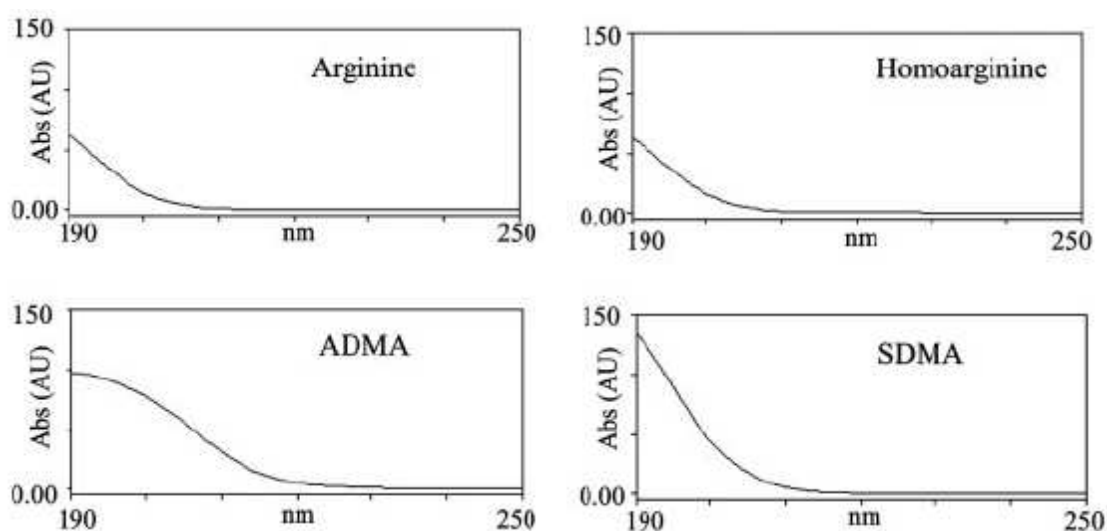
5.1 ARGININE METILATE LIBERE

5.1.1 Ottimizzazione della separazione degli analiti

L'arginina, l'ADMA e la SDMA sono degli aminoacidi basici, che ad un basso pH (<3) risultano carichi positivamente e mostrano quindi una maggiore mobilità elettroforetica rispetto agli aminoacidi acidi o neutri. In elettroforesi capillare (CE) con una normale polarità (anodo alla fine dell'inlet), e con l'utilizzo di un tampone di corsa appropriato sono facilmente separabili. In particolare si ottiene una buona separazione utilizzando un tampone Tris-fosfato a pH 2,30 e ad una temperatura di 15°C. Queste condizioni hanno inoltre consentito di ottenere la completa separazione anche tra arginina e omoarginina che può dunque essere impiegato come standard interno (IS). È stato valutato anche l'uso della monometil arginina (MMA) come standard interno e i risultati ottenuti, molto simili a quelli ottenuti dall'omoarginina, dimostrano che anche questo può essere usato come IS.

Per valutare la migliore lunghezza d'onda per il rilevamento dell'analita è stato preso in considerazione uno spettro di assorbimento tra 190 e 250 nm con il buffer scelto. Come riportato nella figura, tutte le arginine hanno il più alto coefficiente di estinzione molare a 190 nm. In particolare ADMA e SDMA mostrano una maggiore assorbanza rispetto all'arginina e all'omoarginina (+ 54 e + 113% rispettivamente). Inoltre quando l'analisi è stata effettuata a 200 nm

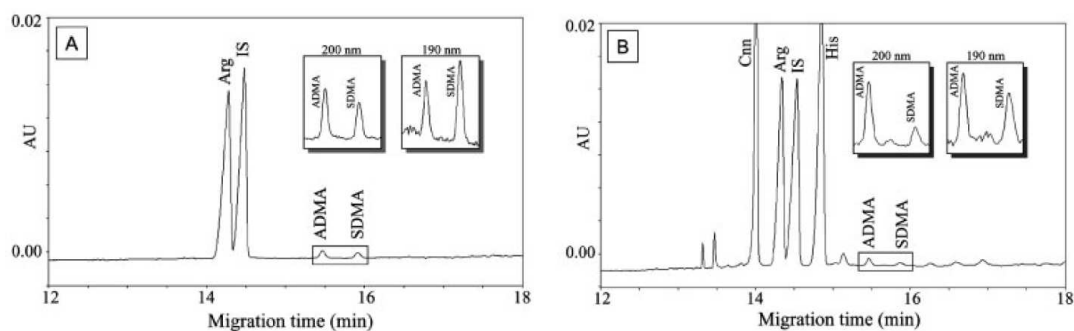
invece che a 190 nm, l'assorbanza della SDMA diminuisce del 67 %, mentre c'è una riduzione del 21% nel segnale dell'ADMA. Così l'ADMA può essere facilmente rilevata tra i 190 e i 200 nm, mentre per la SDMA è consigliabile impostare la lunghezza d'onda a 190 nm. Inoltre la risoluzione dell'arginina e dell'omoarginina risultava migliore quando la rilevazione veniva eseguita a 200 nm ($R_s=1,103$) rispetto ai 190 nm ($R_s=1,003$) perché l'assorbanza perduta permette di ottenere dei picchi meno sovrapposti.



Spettri di assorbimento dell'arginina, omoarginina ADMA e SDMA

Tutti gli analiti di riferimento risultano risolti in soli 16 min sia per la miscela degli standard (A) sia per il campione biologico (B). Il rilevamento è fissato a 200 nm per l'arginina, l'omoarginina e l'ADMA, e a 190 nm per la SDMA. Inoltre nella stessa corsa è possibile misurare altri importanti metaboliti come la creatinina (CNN). I livelli di CNN misurati con questo metodo sono in accordo con i valori ottenuti mediante una diversa metodica in elettroforesi capillare (dati non mostrati), confermando che la valutazione in contemporanea

dell'arginina, dell'ADMA, della SDMA e della creatinina potrebbe essere eseguita con la nuova metodica.



Elettroferogramma di una miscela di standard (A) e di un campione di plasma (B).

5.1.2 Concentrazione dei campioni

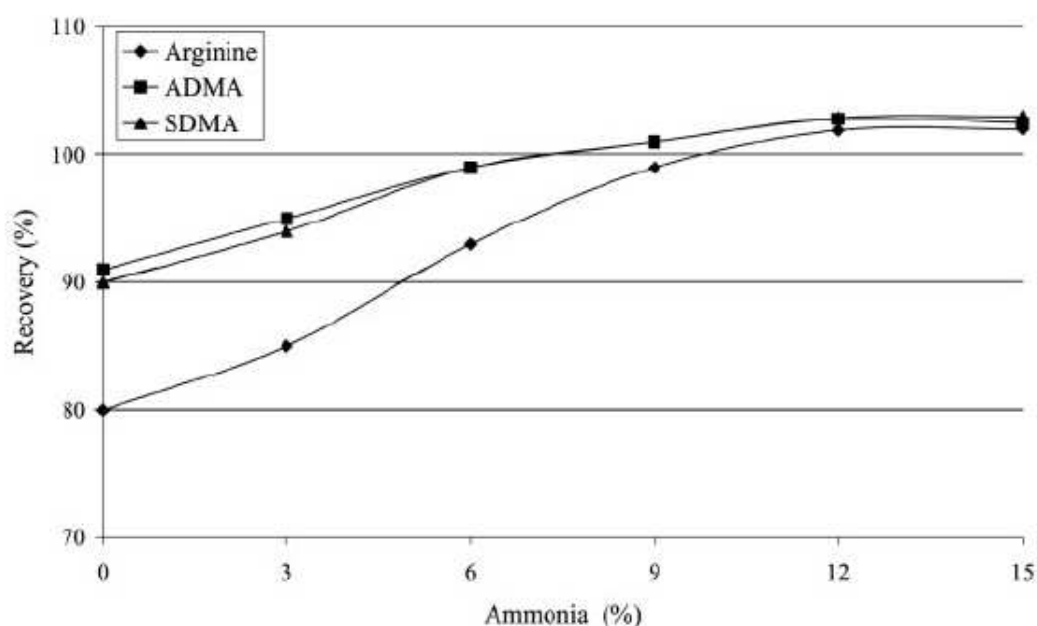
Le condizioni elettroforetiche finora descritte permettono di raggiungere un LOQ di circa 1 $\mu\text{mol/L}$ che non è sufficiente per una determinazione quantitativa delle arginine metilate nel plasma in cui le concentrazioni di questi analiti si aggirano tra 0,3 e 0,7 $\mu\text{mol/L}$. Per questo motivo è necessario concentrare il campione di 8 volte e si deve perciò partire da un volume di 400 μL di plasma. Dopo l'aggiunta di 50 μL di IS (50 mmol/L di concentrazione finale), le proteine plasmatiche vengono precipitate con 900 μL di ACN/ammoniaca (90/10), il surnatante viene evaporato e il residuo viene disciolto in 500 μL di H_2O e poi filtrato nei microconcentratori Vivaspin 500 tramite centrifugazione. Alla fine, l'ultrafiltrato viene nuovamente evaporato e risospeso in 50 μL di H_2O prima di essere iniettato in elettroforesi capillare.

Anche se questi step risultano dispendiosi in termini di tempo sono necessari per aumentare il recupero del campione. La filtrazione diretta del campione, infatti,

porta alla perdita di circa 10-30% delle arginine, che probabilmente vengono assorbite dalle proteine precipitate sulla membrana. Inoltre, è stato notato che la perdita delle arginine risultava aumentata quando venivano usati filtri con diametro più ristretto.

In primo luogo è stata effettuata una precipitazione delle proteine aggiungendo due volumi di acetonitrile/ammoniaca. Quando la precipitazione è stata fatta usando solo acetonitrile, la perdita dell'arginina e delle metilarginine è di circa 20 e 10% rispettivamente. L'uso infine di acido metafosforico e di acido tricloroacetico è stato evitato perché quando viene concentrato insieme al campione, provocano la perdita della tensione durante la corsa elettroforetica.

Il recupero delle arginine è stato migliorato aggiungendo l'ammoniaca all'ACN. Come riportato nella figura successiva, quando è stata usata una soluzione di ACN/ammoniaca (90/10) il recupero delle arginine risulta ottimale.



Recupero delle arginine all'aumento di ammoniaca alla soluzione di acetonitrile

Dal momento che questa soluzione non poteva essere direttamente filtrata a causa della sua incompatibilità con la membrana del filtro, dopo l'eliminazione delle proteine, il surnatante è stato evaporato, risospeso in H₂O e dunque filtrato per pulire il campione. Questo passaggio di filtrazione permette di eliminare alcuni composti come peptidi o piccole proteine, che si sovrapporrebbero alle arginine durante la loro determinazione.

L'ultrafiltrato (circa 300 µL) viene essiccato sottovuoto e infine risospeso in 50 µL di H₂O in cui gli analiti risultano concentrati di ben otto volte rispetto al volume di partenza.

5.1.3 Validazione del metodo

Le curve di calibrazione, ottenute come il rapporto tra le aree dei picchi delle arginine rispetto alla concentrazione dello standard interno, risultano lineari nell'intervallo che va da 10 a 200 µmol/L per l'arginina e di 0,1-2 µmol/L per le dimetilarginine.

Calibration range (µmol/L)	Analyte	Slope (CV%)	Intercept	R ²
10–200	Arginine (200 nm)	0.0233 (5.13)	-0.2031	0.9977
0.1–2	ADMA (200 nm)	0.0540 (5.93)	-0.0029	0.9993
0.1–2	SDMA (190 nm)	0.0919 (5.89)	-0.0055	0.9973

Curve di calibrazione degli analiti (n=5)

I tests di precisione, che sono stati eseguiti ripetendo l'iniezione dello stesso campione, mostrano una buona riproducibilità del metodo, sia per i tempi di migrazione (CV 0,25 %) che per le aree dei picchi (CV 1,9 %). In particolare il test intra-assay, ottenuto ripetendo per 15 volte l'iniezione dello stesso campione preparato indipendentemente, e il test inter-assay, ottenuto misurando per 15 giorni di seguito lo stesso campione, dimostrano una buona riproducibilità.

	Injection reproducibility		Method reproducibility	
	Migration times (min)	Peak area (AU)	Intra-assay ($\mu\text{mol/L}$)	Inter-assay ($\mu\text{mol/L}$)
	Mean (CV%)			
Arg	14.464 (0.21)	3045 (1.2)	64.76 (2.0)	67.21 (2.7)
ADMA	15.433 (0.23)	79.92 (1.5)	0.537 (2.1)	0.551 (2.7)
SDMA	15.909 (0.25)	120.5 (1.6)	0.475 (2.2)	0.474 (3.2)

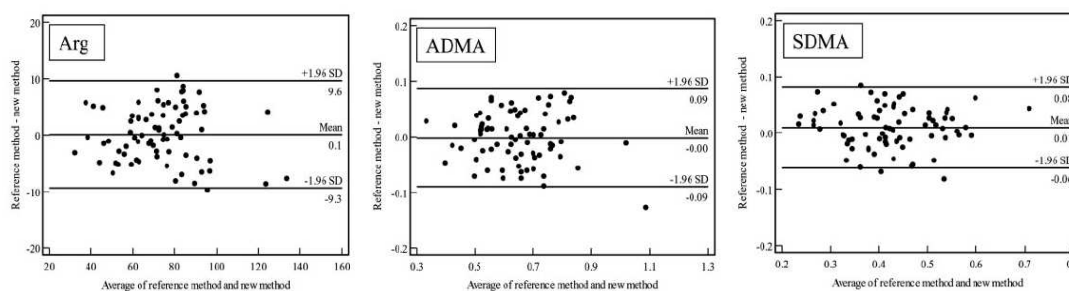
Riproducibilità del metodo (n=15)

Il recupero delle arginine è stato determinato aggiungendo quantità note di standard al campione di plasma. L'analisi dei recuperi, con l'aggiunta di tre concentrazioni differenti, è stata tra 102% e 103%.

	Sample ($\mu\text{mol/L}$)	Added ($\mu\text{mol/L}$)	Measured ($\mu\text{mol/L}$)	Recovered %
Arg	69.36	180	257.2	103.2
		60	131.1	101.4
		20	90.6	101.4
Mean (SD)				102.0 (0.99)
ADMA	0.724	1.8	2.621	103.8
		0.6	1.371	103.5
		0.2	0.939	101.6
Mean (SD)				103.0 (1.18)
SDMA	0.423	1.8	2.266	101.9
		0.6	1.061	103.7
		0.2	0.642	103.0
Mean (SD)				102.9 (0.88)

Il LOD, valutato con iniezioni da 39 nL di una soluzione nota di standard era 0,03 $\mu\text{mol/L}$ per le arginine dimetilate e 0,06 $\mu\text{mol/L}$ per l'arginina, valutato come S/N di 3. Il LOQ, valutato come S/N di 10, era di circa 0,1 $\mu\text{mol/L}$ per l'ADMA e la SDMA e di 0,2 $\mu\text{mol/L}$ per le arginine.

La precisione della nuova metodica è stata valutata misurando i livelli di ADMA, SDMA e arginina in 77 soggetti anche con un metodo già noto in letteratura in LIF-CE (41). I dati ottenuti sono stati poi valutati con test statistici per il confronto dei risultati. In particolare, il Bland-Altman test, ottenuto plottando le differenze nella concentrazione degli analiti ottenuta con i due metodi, contro le medie dei due valori, non ha mostrato alcuna differenza.



Bland-Altman test

L'analisi di regressione Passing Bablock ha mostrato una stretta correlazione tra pendenza e intercetta, con valori di 1 e 0 entro i limiti di confidenza $\pm 95\%$.

	Slope	95% CI of slope	Intercept	95% CI of intercept	Correlation coefficient	p-value
Arginine	1.026	0.952; 1.111	-1.759	-7.211; 3.456	0.968	<0.0001
ADMA	1.005	0.916; 1.104	0.000	-0.065; 0.055	0.944	<0.0001
SDMA	0.995	0.898; 1.087	0.014	-0.027; 0.053	0.928	<0.0001

Passing Bablock regression

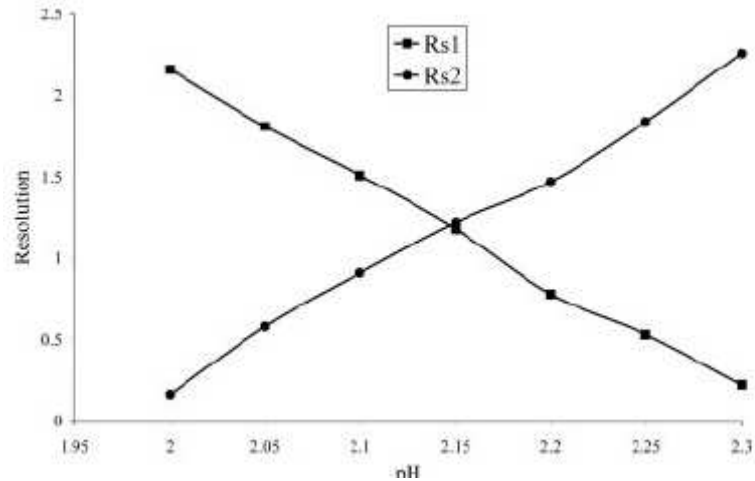
In sintesi, il confronto delle due metodiche con l'utilizzo dei test statistici non ha riportato alcuna differenza significativa.

5.2 DETERMINAZIONE DELLE ARGININE METILATE INCORPORATE NELLE PROTEINE

Le concentrazioni di ADMA nel plasma, come è stato già detto, derivano dalla proteolisi delle proteine che vengono metilate post traduzionalmente dall'enzima protein-arginin metiltransferasi. La metilazione delle arginine ha luogo fisiologicamente per diversi motivi quali la regolazione della trasduzione del segnale, l'esportazione dell'RNA, e la proliferazione cellulare.

Per poter meglio comprendere la via di sintesi dell'ADMA libera nel plasma è necessario dunque capire qual è il grado di metilazione delle arginine proteiche e per questo motivo è stata messa a punto una nuova metodica in elettroforesi capillare.

Utilizzando un tampone per la corsa come a quello usato per la determinazione delle arginine nel plasma (tris fosfato 50 mmol/L a pH 2,30) è stata ottenuta la separazione dei vari amminoacidi. La migrazione verso la finestra di rilevamento è avvenuta nel seguente ordine: Arg, His, MMA, ADMA, SDMA, e Gly. Tuttavia, dopo l'idrolisi delle proteine, sono state rilasciate alte concentrazioni di MMA e di His che portano alla sovrapposizione dei picchi. Una separazione di base di questi picchi è stata raggiunta riducendo il pH del tampone della corsa. Tuttavia, l'acidificazione del tampone porta a una perdita in risoluzione tra SDMA e glicina. La risoluzione ottimale ($R_s > 1$) tra His/MMA e tra SDMA/Gly è stato raggiunta utilizzando un tampone di corsa con un pH di 2,15.

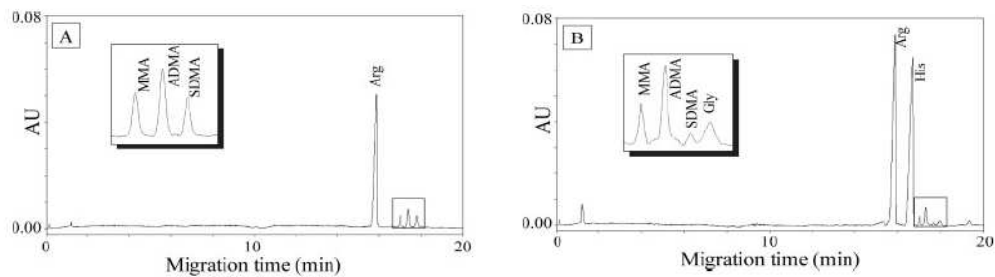


Effetti del pH sulla risoluzione tra His/MMA (Rs1) e tra SDMA/Gly (Rs2)

I risultati delle curve di taratura (pendenza, intercetta e coefficienti di correlazione), il recupero delle arginine (valutata con tre diverse concentrazioni per ogni analita) e la riproducibilità del metodo sono riportate nella tabella di seguito.

	Calibration curves ($\mu\text{mol/L}$)				Analytical recovery (%)	Method reproducibility (nmol/mg protein)	
	Range	Slope	Intercept	r^2	Recovery mean (CV)	Intra-assay mean (CV)	Interassay mean (CV)
Arg	500–25	10.1	160	0.999	96.9 (3.41)	153 (3.13)	158 (4.87)
MMA	16–2	25.6	-23.5	0.998	92.3 (3.72)	3.04 (3.99)	3.13 (5.56)
ADMA	16–2	61.1	-20.5	0.998	95.7 (3.88)	3.43 (4.03)	3.52 (5.21)
SDMA	16–2	23.4	11.0	0.997	93.4 (4.89)	1.38 (4.55)	1.44 (6.05)

Adottando le condizioni ottimali, è stata raggiunta una buona risoluzione di tutte le arginine sia utilizzando una miscela di standard (Arg 200 mmol/L e MMA, ADMA, SDMA 10 mmol/L), sia le proteine idrolizzate di un campione di sangue.



Elettroferogramma di una miscela di standard (A) e di un campione di sangue (B)

Questa nuova metodica permette una valutazione accurata della metilazione delle proteine in diversi campioni biologici come sangue intero, plasma, globuli rossi, cellule in coltura e tessuti.

5.3 APPLICAZIONI CLINICHE

Diversi studi hanno suggerito che in patologie come ipertensione, l'aterosclerosi e disfunzione immunitaria, potrebbero essere causate almeno in parte, da una disfunzione del percorso L-arginina/NO con un secondario accumulo di ADMA. Questa osservazione è stata potenziata da ulteriori ricerche che dimostrano che l'ADMA è un predittore indipendente di morbilità e mortalità cardiovascolare (43,44). Per questo motivo sono state prese in considerazione alcune patologie come l'Occlusione Venosa della Retina (RVO) e la Spondilite Anchilosante (SA) che coinvolgono una disfunzione endoteliale conclamata e una risposta infiammatoria.

Dopo aver dimostrato il ruolo dell'ADMA nelle patologie sopraelencate, si è pensato di quantificarne i livelli plasmatici in soggetti volontari sottoposti ad esercizio fisico. Poiché i livelli di ADMA risultano ridotti post esercizio, è stato

dimostrato ancora una volta come l'attività fisica possa costituire un elemento di prevenzione nell'insorgenza delle malattie cardiovascolari.

5.3.1 Occlusione venosa della retina (RVO)

L'occlusione venosa retinica (RVO) è un'importante causa di moderata e grave perdita della vista in persone anziane (45). Questa condizione può coinvolgere o il tronco centrale e i rami della circolazione venosa (CRVO e BRVO rispettivamente). La patogenesi della CRVO e della BRVO rimane incerta, ma è probabile che sia multifattoriale. Sono stati ipotizzate due diverse cause: 1) trombosi della vena derivante da una compressione dell'arteria adiacente dovuta da cambiamenti aterosclerotici, e 2) un'alterazione locale del flusso sanguigno derivante da fattori fisiologici.

I fattori di rischio più comuni sono l'aumento dell'età, l'ipertensione sistemica, il diabete mellito e il glaucoma ad angolo aperto primario (46,47). Siccome, tra questi fattori di rischio, sia per l'invecchiamento che per l'ipertensione si sa che sono strettamente connesse con un aumento plasmatico di ADMA (48,49), abbiamo indagato se nei pazienti con RVO ci sono comunque elevate concentrazioni di ADMA che potrebbero spiegare, almeno in parte, i meccanismi patologici di questa malattia.

Si è trattato di uno studio caso-controllo in cui sono stati reclutati 54 pazienti (26 uomini, 28 donne, età media: $66,2 \pm 11,1$ anni) con RVO (CRVO e BRVO) provenienti dall'Istituto di Oftalmologia dell'Università degli Studi di Sassari tra aprile 2003 e novembre 2005. Un totale di 30 pazienti (13 uomini, 17 le donne,

età media: 66,0±12,0 anni) aveva CRVO mentre 24 avevano BRVO (13 uomini, 11 donne, età media: 66,4±14,6 anni) .

Una valutazione completa di entrambi gli occhi è stata realizzata, compresa la corretta acuità visiva (BCVA), con la lampada a fessura e l'angiografia. Il gruppo di controllo includeva 32 soggetti reclutati da parenti o amici dei pazienti o dal personale ospedaliero durante il termine di reclutamento dei pazienti stessi. I criteri di esclusioni dei controlli sono stati l'insufficienza renale, tumori, disturbi vascolari della retina e l'uso di farmaci con vitamina B₆, B₁₂ o acido folico. Anche i controlli hanno subito una valutazione oftalmica standard.

Da ciascun partecipante allo studio è stato prelevato un campione di sangue dopo un digiuno notturno ed è stato raccolto in una provetta con EDTA.

Ogni partecipante ha ricevuto informazioni dettagliate e ha fornito il consenso informato prima della partecipazione allo studio.

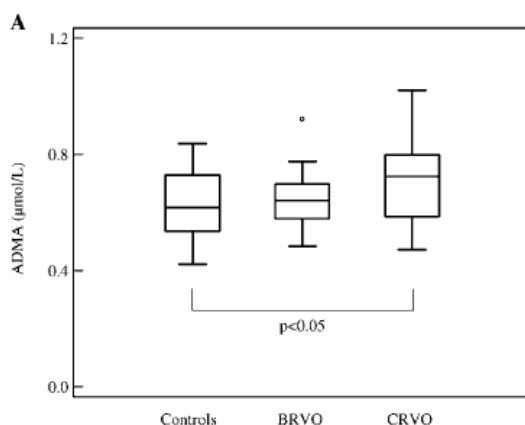
Tutti i dati sono stati riportati come media ± deviazione standard, la correlazione è stata verificata mediante il coefficiente di correlazione di Pearson e il livello di significatività è stato accettato per p<0,05.

Le principali variabili biochimiche sono riportate nella tabella di seguito:

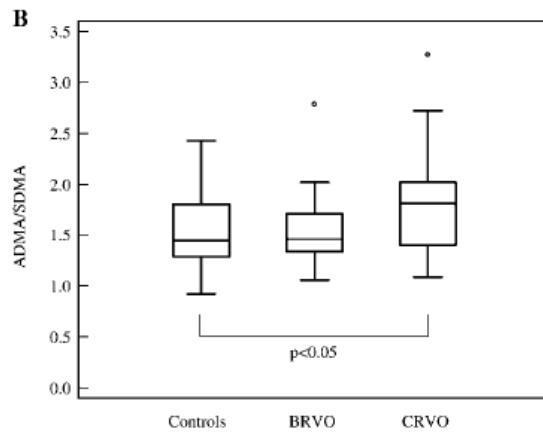
	Controls (32) (Mean±SD)	RVO (54) (Mean±SD)
Sex, males	13 (41%)	26 (48%)
Age, years	63.2±13.4	66.2±13.1
Total cholesterol, mmol/L	5.23±1.17	5.39±1.09
LDL-C, mmol/L	3.26±1.04	3.34±1.01
HDL-C, mmol/L	1.48±0.49	1.48±0.36
Triglycerides, mmol/L	1.14±0.42	1.23±0.50
Creatinine, μmol/L	76.0±23.9	77.8±18.6
Total homocysteine, μmol/L	11.0±3.4	11.4±4.6
Total cysteine, μmol/L	227±52	247±51
Arginine, μmol/L	75.4±17.8	79.5±20.3
ADMA, μmol/L	0.635±0.117	0.672±0.120
SDMA, μmol/L	0.425±0.083	0.423±0.092
ADMA/SDMA	1.541±0.382	1.643±0.433
Diabetes, Yes	4 (12%)	6 (12%)
Hypertension, Yes	10 (31%)	24 (44%)
Cardiovascular history, Yes	5 (16%)	10 (18%)

LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol.

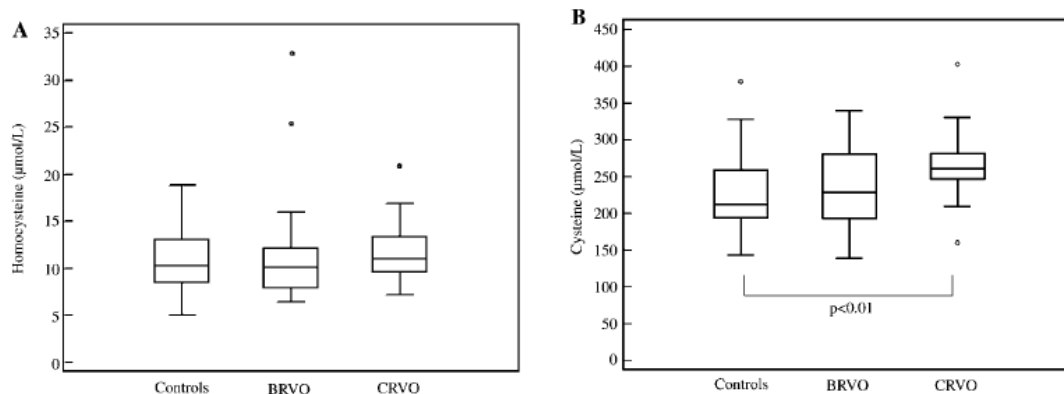
Come già precedentemente valutato (50), è stata osservata una stretta relazione tra l'omocisteina e l'ADMA sia nei controlli ($r=0.55$, $p=0.001$) sia nei pazienti RVO ($r=0.42$, $p=0.002$). Inoltre è stata trovata per la prima volta una relazione tra la cisteina e l'ADMA ($r=0.39$, $p=0.028$ nei controlli; $r=0.32$, $p=0.018$ nei pazienti). Quando i pazienti sono stati classificati in base al tipo di occlusione venosa (CRVO e BRVO), l'ADMA è risultata significativamente aumentata solo nei pazienti con CRVO ($0,710 \pm 0,139 \mu\text{mol/L}$ nei CRVO, $0,642 \pm 0,096 \mu\text{mol/L}$ nei BRVO e $0,635 \pm 0,117 \mu\text{mol/L}$ nei controlli) (A).



Nei pazienti CRVO è stato trovato significativo anche il rapporto ADMA/SDMA ($1,796 \pm 0,497 \mu\text{mol/L}$ nei CRVO, $1,542 \pm 0,342 \mu\text{mol/L}$ nei BRVO e $1,541 \pm 0,382 \mu\text{mol/L}$ nei controlli) (B). La SDMA viene rimossa solo attraverso l'escrezione renale, mentre per l'ADMA vi è una seconda via attraverso l'idrolisi enzimatica tramite la DDAH. Considerando che i livelli di creatinina sono simili in tutti i gruppi presi in esame (suggerendo una escrezione renale del tutto identica), la differenza osservata nel rapporto ADMA/SDMA fa supporre una diminuzione nel catabolismo dell'ADMA nei pazienti CRVO.



Non sono stati riscontrati cambiamenti nei livelli di arginina tra i pazienti BRVO e quelli CRVO ($81,9 \pm 24,1$ vs $77,7 \pm 16,8$ rispettivamente). Inoltre, come già descritto, non sono state trovate differenze nei livelli di omocisteina (A) mentre i valori di cisteina sono notevolmente aumentati nei CRVO (B).



Nella regressione multipla, in cui sono stati considerati i valori di ADMA, cisteina, omocisteina, colesterolo totale, ipertensione sistemica ed età, è stato dimostrato che solo la cisteina è significativamente associata con il rischio di sviluppare disordini vascolari (OR=1.022, intervallo di confidenza 95% (CI) 1,002-1,044; p=0.035). Per valutare se la cisteina è un predittore dei livelli di ADMA, è stata eseguita un'analisi di regressione multipla per i controlli e per i pazienti.

Come riportato nella tabella di seguito, l'omocisteina è un fattore determinante per l'ADMA sia nei controlli che nei pazienti BRVO, mentre, nei pazienti CRVO la cisteina predice i valori di ADMA.

	t	p-Value
Controls		
Age	1.63	0.11
Sex	2.17	0.04
Cysteine	-0.54	0.59
Homocysteine	2.48	0.02
Creatinine	1.98	0.06
BRVO patients		
Age	0.42	0.67
Sex	0.04	0.96
Cysteine	-1.76	0.10
Homocysteine	2.53	0.02
Creatinine	0.89	0.38
CRVO patients		
Age	1.29	0.24
Sex	2.75	0.01
Cysteine	2.67	0.01
Homocysteine	1.22	0.24
Creatinine	-0.35	0.72

È già stato studiato in colture cellulari che l'omocisteina inibisce direttamente l'attività della DDAH (51). Elevati livelli di cisteina (nei CRVO) fanno supporre un'inibizione post traduzionale sull'attività della DDAH da parte della cisteina stessa proprio come accade con l'omocisteina. In effetti questi due tioli plasmatici hanno le stesse proprietà chimiche derivanti dalla presenza del gruppo sulfidrilico (51). Anche se si tratta di una prova sperimentale, per confermare la nuove ipotesi, è necessario studiare la correlazione tra i livelli plasmatici di cisteina i quelli di ADMA. Questo è stato confermato anche dall'analisi di regressione multipla, in cui la cisteina, fra i fattori esaminati, risulta essere il più importante determinante per i livelli di ADMA nei pazienti con CRVO.

Per concludere, è stato trovato che la concentrazione di ADMA e del rapporto ADMA/SDMA plasmatici sono significativamente più alti nei pazienti con CRVO, suggerendo così che un aumento dei livelli di ADMA possono essere dovuti ad un'inibizione dell'attività della DDAH. Tuttavia sono necessari ulteriori studi per confermare i risultati ottenuti e i possibili meccanismi coinvolti che portano all'aumento dei valori di ADMA, e verificare se questa molecola possa in qualche maniera contribuire allo sviluppo dei disturbi vascolari che portano alla patogenesi nell'occlusione venosa della retina.

5.3.2 Spondilite Anchilosante (SA)

La Spondilite Anchilosante (SA) è una malattia infiammatoria cronica caratterizzata da un interessamento prevalente dello scheletro assiale (rachide e articolazioni sacroiliache), ma anche da artrite periferica ed entesite, con evoluzione verso l'anchilosi, in particolare del rachide.

Nella popolazione italiana la SA ha una prevalenza del 0.45% circa, con un rapporto M:F pari a 5:1. Alcuni studi indicano che i pazienti affetti da SA hanno una ridotta aspettativa di vita rispetto alla popolazione generale: il rischio relativo di mortalità è infatti pari all' 1.5 - 3 %; tuttavia il contributo che i disordini cardiovascolari danno all'aumentata mortalità non è stato ancora quantificato. Si ritiene comunque che, ciò che accade in altre malattie reumatiche infiammatorie come l'artrite reumatoide, che si associano ad un incremento del rischio cardiovascolare rispetto alla popolazione generale, possa accadere anche nella SA. In letteratura sono pochi, e non concordi, i dati

riguardanti il rapporto tra infiammazione e malattie cardiovascolari nella SA; l'aumentato rischio cardiovascolare in questi pazienti potrebbe essere infatti dovuto ad una alta prevalenza dei fattori di rischio convenzionali e al fatto che hanno, ovviamente, una diminuita attività fisica. Alcuni studi, tuttavia, indicano non solo come la SA sia significativamente associata a malattie cardiache, ma lasciano anche supporre che, in questi pazienti, l'infiammazione cronica stessa possa dare un contributo importante all'aumentato rischio cardiovascolare. In ogni caso, ad oggi, non è noto se nei pazienti con SA vi sia un aumento della rigidità arteriosa. Probabilmente in questi pazienti, i fattori di rischio legati alla malattia, in associazione a fattori di rischio tradizionali, determinano un danno vascolare amplificato ed accelerato, responsabile dell'eccesso di mortalità per malattie cardiovascolari. Obiettivo principale dello studio è di valutare se i pazienti affetti da SA presentano un processo di aterosclerosi accelerato rispetto ai controlli, indipendente dai fattori di rischio cardiovascolare tradizionali o, comunque, attribuibile anche alla malattia di base; di stimare se presentano una condizione di disfunzione endoteliale indipendente dai fattori di rischio cardiovascolare tradizionali; se i livelli plasmatici di ADMA risultano più elevati rispetto alla popolazione di controllo e se possono essere interpretati come predittori indipendenti dell'aterosclerosi subclinica, della disfunzione endoteliale e della rigidità arteriosa.

Sono stati valutati 17 pazienti consecutivi affetti da Spondilite Anchilosante classificata secondo i criteri di New York del 1984. Sono stati esclusi tutti i

pazienti con età inferiore a 18 anni, con storia di eventi cardiovascolari (sindrome coronaria acuta, angina instabile, ictus, attacco ischemico transitorio, procedure di rivascularizzazione, tromboendarteriectomia, ischemia sintomatica arteriosa periferica), diabete, ipertensione arteriosa non controllata, insufficienza renale, malattie epatiche e/o incremento asintomatico delle transaminasi, infezioni in corso (acute o croniche), modificazione della terapia per la SA nel mese precedente all'inclusione nello studio malattie o condizioni concomitanti che, nell'opinione dello sperimentatore, potevano rendere il paziente incapace di completare lo studio. I controlli, tutti soggetti maggiori di 18 anni di età, sono stati incrociati in maniera stretta, per età (± 5 anni), sesso, classe di Indice di Massa Corporea (BMI), fattori di rischio cardiovascolare tradizionali (fumo, ipercolesterolemia, ipertensione arteriosa, storia familiare di eventi cardiovascolari precoci), tipo di antiipertensivo e statina. Sia i pazienti che i controlli hanno firmato il consenso informato per la partecipazione allo studio.

L'età media dei pazienti con SA era di 39 ± 11 anni (range 20-58) e la durata media di malattia di 114 ± 108 mesi (range 12-360). Non esistevano tra i due gruppi differenze significative per quanto riguarda i parametri antropometrici: in particolare era presente una sostanziale equivalenza dell'indice di massa corporea (BMI) (26 ± 4.4 nei pazienti vs 24 ± 4 nei controlli, $p = 0.1$). Il profilo lipidico dei casi e dei controlli è risultato sovrapponibile (colesterolo totale 167.94 ± 28.12 mg/dl nei casi vs 178.82 ± 32.25 mg/dl nei controlli, $p = 0.3$;

colesterolo HDL 48.53 ± 9.52 mg/dl nei casi vs 56.12 ± 15.32 mg/dl nei controlli, $p = 0.09$; colesterolo LDL 107.06 ± 27.39 mg/dl nei casi vs 109.71 ± 23.14 mg/dl nei controlli, $p = 0.7$).

I livelli dell'ADMA sono risultati significativamente più elevati nei pazienti affetti da SA rispetto ai controlli (0.65 ± 0.10 $\mu\text{mol/L}$ nei casi vs 0.54 ± 0.07 $\mu\text{mol/L}$ nei controlli, $p = 0.001$). Al contrario i livelli della SDMA (0.36 ± 0.07 $\mu\text{mol/L}$ nei casi vs 0.42 ± 0.09 $\mu\text{mol/L}$) sono risultati significativamente più elevati nei controlli ($p=0.046$). I livelli medi di arginina (precursore dell'ADMA e della SDMA) non risultavano differenti nei due gruppi (74.3 ± 15.5 $\mu\text{mol/L}$ nei casi vs 70.1 ± 11.7 $\mu\text{mol/L}$ nei controlli, $p = 0.3$).

La dimostrazione che il processo aterosclerotico, a parità di fattori di rischio, risulta più accelerato nei pazienti affetti da differenti malattie reumatiche (LES, AR), fa ritenere che meccanismi correlati all'alterazione del processo immunitario e alla regolazione della flogosi svolgano un ruolo importante nel controllo dello stato di salute vascolare. Si è peraltro raggiunta una considerevole sicurezza nel ritenere che l'infiammazione sistemica sia uno dei fattori determinanti la riduzione della risposta vasodilatatrice e l'acquisizione di un fenotipo endoteliale pro-trombotico.

La disfunzione endoteliale è stata infatti dimostrata in maniera convincente in pazienti con malattie reumatiche in fase precoce, tanto da essere considerata una spia sensibile dell'impegno vascolare infiammatorio e dell'attività di malattia. Si ritiene che in questi soggetti i livelli delle citochine pro-infiammatorie, le

alterazioni dell'assetto coagulativo e la riduzione della riserva riparativa endoteliale (testimoniata dai ridotti livelli dei progenitori delle cellule endoteliali) siano responsabili dell'alterazione della funzione endoteliale.

L'analisi dei dati derivanti dallo studio, suggerisce per la prima volta il ruolo dell'incremento dell'ADMA come spia e/o mediatore di danno vascolare nei pazienti affetti da SA. Sono necessari studi prospettici per valutare il peso dell'elevazione dell'ADMA nel determinismo degli eventi cardiovascolari nei pazienti affetti da SA e l'utilità della sua determinazione, per la stratificazione prognostica e la definizione dell'approccio terapeutico.

5.3.3 Attività fisica e ADMA

Il ruolo dell'esercizio fisico nella prevenzione delle malattie e il miglioramento della qualità della vita è ampiamente riportato in letteratura. Le prove indicano che l'inattività fisica porta ad un'aumentata incidenza di malattie cardiovascolari (malattie cardiache, ipertensione, ictus, l'adesione e l'aggregazione delle piastrine) (52-56), malattie metaboliche (diabete di tipo 2, obesità e dislipidemie) (57-59), tumore (mammella, colon, prostata, pancreas e melanoma) (60-64), disfunzioni immunitarie (65) e disturbi neurologici (deficit cognitivo, il morbo di Alzheimer, e demenza) (66).

L'attività fisica giornaliera può aiutare a prevenire le malattie cardiache e l'ictus attraverso il rafforzamento del muscolo cardiaco, l'abbassamento della pressione sanguigna, la riduzione del grasso corporeo, l'aumento delle lipoproteine ad alta

densità (HDL) e alla riduzione delle lipoproteine a bassa densità (LDL) e il miglioramento del flusso sanguigno.

Recentemente è stato dimostrato come l'esercizio faccia diminuire i livelli plasmatici di omocisteina, che è un noto fattore di rischio per le malattie vascolari (67,68). Diversi studi suggeriscono che i livelli plasmatici di omocisteina sono connessi alle concentrazioni plasmatiche di ADMA (19,40).

Per questo motivo è stato valutato come siano influenzati i livelli plasmatici di ADMA in soggetti sani dopo esercizio fisico, nonché verificare se le variazioni di ADMA possano essere correlate alla diminuzione dei livelli di omocisteina plasmatici.

Sono stati quindi selezionati 16 giovani maschi, di età compresa tra 21 e 37 anni, per lo studio sulla variazione dei livelli di ADMA e omocisteina dopo esercizio.

I criteri di esclusione sono stati: l'iperlipidemia, l'ipertensione, l'uso di integratori alimentari o di terapia vitaminica, insufficienza renale (creatinina superiore a 15 mg / L); diabete mellito (glicemia a digiuno > 150 mg / dl).

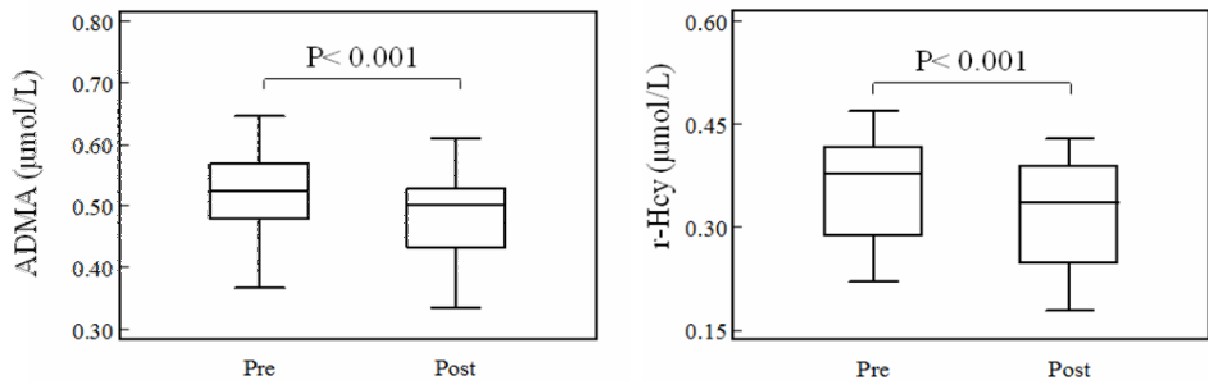
Inoltre, tutti i soggetti che hanno partecipato a questo studio avevano valori normali del TSH e dei parametri ematologici, che sono stati misurati all'inizio e alla fine del protocollo. L'indice di massa corporea di tutti gli individui è stato tra il 19 e il 27%. Come confermato da interviste mediche, i partecipanti non stavano ricevendo e integratori alimentari di vitamina B6, B12, acido folico, o la terapia farmacologica. Tutti i volontari sono stati selezionati non fumatori. Il test comprendeva una fase di pre-test che di durata di 3 minuti che è stata

caratterizzata da un carico di lavoro standard di 25 W per tutti i soggetti. Questa fase è stata seguita da un caricamento incrementale di lavoro di 50 W, ciascuno della durata di 2 minuti fino ad esaurimento (fase di test di stress). Su richiesta dei partecipanti o quando la frequenza sulla bicicletta (60 giri) non era più mantenuta, il carico di lavoro è stato portato fino a 25 W e ai soggetti è stato chiesto di continuare a pedalare per tre minuti (fase di recupero attivo). Al termine di questa fase, e smesso di pedalare, i soggetti sono rimasti seduti sulla cyclette per tre minuti (fase di recupero passivo). Subito dopo la fine della prova è stato prelevato un campione di sangue per la valutazione delle concentrazioni di omocisteina e ADMA.

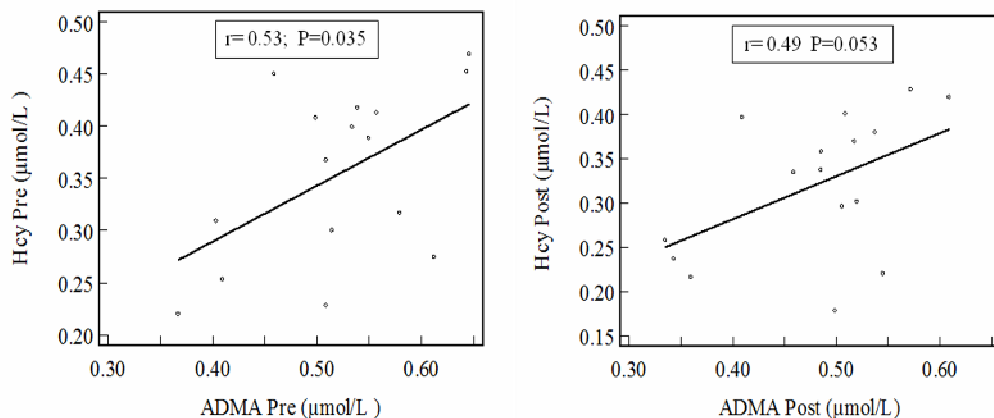
Diversi studi supportano il legame tra ADMA e Hcy. Infatti la DDAH (dimetilamino dimetil idrolasi), che è responsabile del catabolismo dell'ADMA, è inibito dalla presenza di omocisteina. È stato dimostrato in vitro che l'omocisteina inibisce direttamente l'attività della DDAH (69) che porta dunque ad un accumulo di ADMA.

Per valutare in che modo la concentrazione di ADMA sia influenzata dall'attività fisica, sono stati misurati i livelli plasmatici di ADMA prima e dopo l'esercizio fisico ed stata trovata una significativa diminuzione di questo aminoacido (0,520 $\mu\text{mol} / \text{L}$ vs 0,480 $\mu\text{mol} / \text{L}$; $p < 0,001$), dopo lo sforzo.

Con lo stesso campione, è stato anche scoperto che l'omocisteina ridotta, ma non totale, è diminuita in seguito lo stesso esercizio.

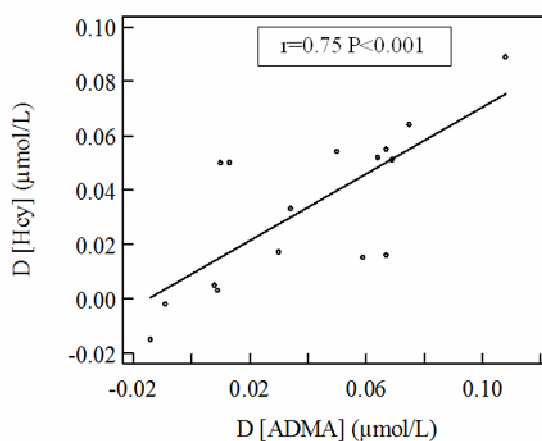


L'omocisteina circolante si dovrebbe trovare in piccole quantità (0,2-0,5%) in forma ridotta, circa il 10-20% esiste come disolfuro ossidato a basso peso molecolare (omocistina e omocisteina-cisteina disulfide misto), e una quantità maggiore (70-80%) è legato ai residui di cisteina della proteina (70,71). La somma delle tre forme è comunemente definito come l'omocisteina totale. La Correlazione di Pearson tra ADMA e Hcy ridotta conferma la relazione, ampiamente descritta in letteratura per l'omocisteina totale, tra questi aminoacidi. È stata trovata una correlazione positiva significativa sia prima ($r = 0.53$, $P = 0,035$) e, anche se leggermente più debole, dopo l'esercizio fisico ($r = 0.49$, $P = 0,053$).



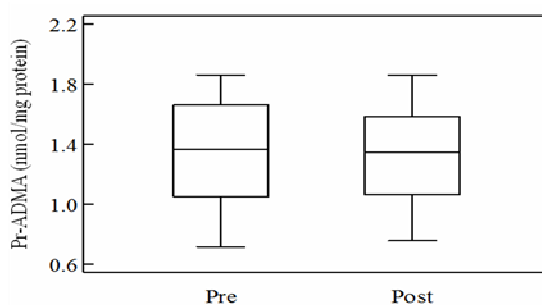
Per valutare se la diminuzione di ADMA è correlata a un abbassamento dell'Hcy, le differenze tra le concentrazione di Hcy pre e post-esercizio sono

stati riportati in funzione delle differenze tra i livelli di ADMA. Come dimostrato nella figura successiva, vi è una forte correlazione tra le differenze degli analiti prima e dopo gli esercizi ($r = 0.75$, $P < 0.001$), suggerendo così che il calo di concentrazione dei due analiti è effettivamente connesso.



Per verificare se questo rapporto è dovuto a una diminuzione della reazione di metilazione delle proteine (con una produzione inferiore di ADMA) o ad una ridotta inibizione DDAH (a causa della diminuzione di Hcy) è stato misurato il contenuto di ADMA nelle proteine del plasma.

Come riportato nella figura successiva, non sono state riscontrate differenze significative nella metilazione proteina plasmatiche (1,335 vs 1,321 nmol / mg di proteina, rispettivamente, di pre e post esercizio), suggerendo che la diminuzione di ADMA libero dopo l'esercizio fisico non dipenda da una diminuzione della produzione ADMA, ma è probabilmente dovuta alla via di eliminazione.



Dal momento che l'ADMA viene eliminato principalmente attraverso l'attività della DDAH è evidente che dopo lo sforzo fisico vi è un aumento dell'attività di questo enzima quasi certamente imputabile alla diminuzione dell'omocisteina. Anche se non è stato possibile valutare i livelli di DDAH nel sangue o nei tessuti dei soggetti studiati è stato supposto che i livelli di questo enzima rimangano praticamente invariati durante l'esercizio fisico, visto che i campioni di sangue (prima e dopo l'esercizio fisico) sono state prelevati entro 15-20 minuti. È ragionevole, infatti, pensare che questo tempo non sia sufficiente per stimolare e produrre DDAH di neo-sintesi. Pertanto, la diminuzione della concentrazione di Hcy, dopo l'esercizio fisico potrebbe portare ad un aumento dell'attività della DDAH che a sua volta riduce i livelli plasmatici di ADMA.

Dal momento che l'abbassamento dei livelli di Hcy e ADMA sono già rilevabili dopo un piccolo periodo di esercizio, si può ipotizzare che riduzioni più significative di questi analiti potrebbero essere osservate quando l'attività fisica viene effettuata costantemente e per un periodo più lungo.

6.CONCLUSIONI

L'ADMA è un aminoacido plasmatico, si trova nelle cellule e nei tessuti, e viene escreto per via urinaria (16,17). In questi ultimi tempi ha suscitato molto interesse perché inibisce l'ossido nitrico sintasi (42) e ha quindi la potenzialità di produrre notevoli effetti biologici, in particolare nel sistema cardiovascolare. Recentemente, diversi studi hanno suggerito che i livelli di ADMA plasmatici possano fornire un utile marker di rischio per le disfunzioni endoteliali e le malattie cardiovascolari. (42,44). La SDMA risulta inattiva nei confronti dell'NO sintasi ma, condividendo con l'ADMA e l'Arg lo stesso percorso per l'ingresso nelle cellule, condiziona indirettamente la produzione di NO (45). Pertanto la misurazione delle concentrazioni dell'arginina e dei suoi metaboliti metilati ADMA e SDMA nei fluidi biologici, sono utili per lo studio del sistema Arginina-NO e dei suoi inibitori endogeni. Tuttavia, è importante sottolineare che la concentrazione di ADMA ha una distribuzione molto ristretta nella popolazione generale e un aumento evidente è associato ad un aumento del rischio di malattie cardiovascolari. Questa combinazione implica che la misurazione precisa dell'ADMA è di massima importanza (46). Saggi per la misurazione dell'ADMA con CV alto possono portare ad una bassa potenza statistica nei trials clinici e ad una severa sottostima di associazione con studi epidemiologici. Attualmente, l'ADMA può essere misurata in maniera attendibile solo con procedure complicate e lunghe in termini di tempo che portano ad un'impresione del test stesso.

Recentemente, Teerlink (40) ha suggerito che l'inadeguata precisione dei dosaggi usati per la misurazione dell'ADMA può portare ad una sottovalutazione nell'associazione tra ADMA e altre variabili cliniche o biochimiche.

Per questo motivo, sono state messe a punto due nuove metodiche in cui sono stati eliminati sia la purificazione in SPE sia la procedura di derivatizzazione al fine di evitare la perdita dell'analita durante la preparazione del campione. Inoltre, il trattamento preanalitico del campione, assicura il completo recupero delle arginine, e l'uso dell'omoarginina come standard interno permette di aumentare la precisione dei test. Così, la qualità dei nuovi metodi che sono molto vicini agli standard imposti dai lavori di Teerlink et al.(40,46,47), anche se hanno un CV interassay più elevato rispetto a quello suggerito (2,7 anziché 2,0%) è comunque più basso in confronto alle altre metodiche in HPLC o GC.

Inoltre, è stato trovato un buon accordo tra i valori misurati in 77 soggetti con il nuovo metodo per la quantificazione delle arginine libere nel plasma e un saggio già esistente in letteratura descritto da Causse et al. (42) per tutti gli analiti presi in considerazione.

Inoltre, le nuove metodiche sono state usate per applicazioni cliniche in cui sono stati confrontati i valori dell'Arg e delle arginine metilate nei pazienti e nei controlli. La metodica sviluppata si è dimostrata utile per riscontrare differenze significative tra casi e controlli per quanto riguarda le patologie con disfunzione

endoteliale conclamata (RVO e SA) ed inoltre per dimostrare come l'attività fisica favorisca la riduzione dei livelli di ADMA nel plasma.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2292-301.
2. Klimiuk PA, Sierakowski S, Latosiewicz R et al. Soluble adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with distinct variants of rheumatoid synovitis. *Ann Rheum Dis* 2002;61:804-9.
3. Watanabe T, Tokonuga O, Fan JL et al. Atherosclerosis and macrophages. *Acta Pathol JPN* 1989;39:473-486.
4. Sattar N, McCarey DW, Capell H, McInnes IB. Explaining how “high-grade” systemic inflammation accelerates vascular risk in rheumatoid arthritis. *Circulation* 2003;108:2957-63.
5. Cooke JP, Tsao PS: Is NO an endogenous antiatherogenic molecule? *Arterioscler Thromb*;1994 14: 653-655,
6. Widlasnsky ME, Gokce N, Keaney Jr JF, et al. The clinical implications of endothelial dysfunction in the human coronary and peripheral circulation. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26: 1235-41.
7. Kullo IJ, Gau GT, Tajik AJ. Novel risk factors for atherosclerosis. *Mayo Clin Proc* 2000; 75:369-80
8. Wolf A, Zalpour C, Theilmeyer G. Dietary L-arginine supplementation normalizes platelet aggregation in hypercholesterolemic humans. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29: 479-85.
9. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4651-55.
10. Böger RH, Bode- Böger SM, Kienke S et al. Dietary L-arginine decreases myointimal cell proliferation and vascular monocyte accumulation in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 1998; 136: 67-77.
11. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromocyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of

- cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83: 1774-77.
12. Förstermann U, Closs EI, Pollock js, et al. Nitric oxide synthase isoenzymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994; 23: 1121-31.
 13. Vallance P., Leiper J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004; 24: 1023-30.
 14. McDermott JR. Studies on the catabolism of Ng-methylarginine, Ng, Ng-dimethylarginine and Ng, Ng-dimethylarginine in the rabbit. *Biochem J.* 1976;154(1):179-84
 15. Gary JD. RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog. Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1998; 61: 65-131
 16. Böger, R. H., Sydow, K., Borlak, J., Thum, T. *et al.* LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ. Res.* 2000; 87: 99–105.
 17. Vallance P., Leone A., Calver A. et al. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure., *Lancet* 1992; 339: 572- 5
 18. MacAllister RJ, Rambauusek MH., Vallance P. et al., Concentration of dimethyl-L-arginine in the plasma of patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Trasplant* 1996; 11: 2449-52.
 19. Kielstein JT, Böger R.H., Bode- Böger SM et al. Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: relationship to treatment method and atherosclerotic disease., *J Am Soc Nephrol.* 1999; 10: 594-600.

20. MacAllister RJ, Fickling SA, Whitley GS et al. Metabolism of methylarginines by human vasculature; implications for the regulation of nitric oxide synthesis. *Br J Pharmacol*, 1994; 112: 43-8.
21. Ogawa T., Kimoto M., Sasaoka K. Occurrence of a new enzyme catalyzing the direct conversion of NG,NG-dimethyl-L-arginine to L-citrulline in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 148: 671-77
22. Leiper JM, Santa Maria J., Chubb A et al. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem J*. 1999; 343: 209-14
23. Ito A., Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation*. 1999; 99: 3092-5.
24. Leiper J., Murray-Rust J., McDonald N. et al. S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 13527- 32.
25. Bode- Böger SM, Böger R.H., Kienke S., et al. Elevated L-arginine/dimethylarginine ratio contributes to enhanced systemic NO production by dietary L-arginine in hypercholesterolemic rabbits. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 219: 598- 603
26. Böger R.H., Bode- Böger SM, Brandes RP et al. Dietary L-arginine reduces the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: comparison with lovastatin. *Circulation* 1997; 96: 1282-90
27. Schwedhelm E. Quantification of ADMA: analytical approaches. *Vasc. Med*. 2005; 10: 89–95.
28. Tsikas D., Junker W., Frölich JC. Determination of dimethylated arginines in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 1998; 705: 174–6.

- 29.Chen BM., Xia L.W., Zhao R.Q. Determination of N(G),N(G)-dimethylarginine in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr B.* 1997;692: 467–71.
- 30.Pettersson A., Uggla L., Backman V. Determination of dimethylated arginines in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.* 1997; 692: 257–262.
- 31.Pi J., Kumagai Y., Sun G., Shimojo N., Improved method for simultaneous determination of L-arginine and its mono- and dimethylated metabolites in biological samples by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 2000; 742: 199–203.
- 32.Chen BM., Xia LW., Liang SX., Chen GH. *et al.*, *Anal.Chim. Acta* 2001, 444, 223–7.
- 33.Teerlink T., Nijveldt RJ., de Jong S., van Leeuwen PA., Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological samples by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 2002, 303: 131–137.
- 34.Marra M., Bonfigli AR., Testa R., Testa I. et al. High-performance liquid chromatographic assay of asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, and arginine in human plasma by derivatization with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde. *Anal. Biochem.* 2003; 318: 13–17.
- 35.Heresztyn T.,Worthley MI., Horowitz JD. Determination of l-arginine and NG, NG - and NG, NG' -dimethyl-L-arginine in plasma by liquid chromatography as AccQ-Fluor fluorescent derivatives. *J. Chromatogr.B* 2004; 805: 325–329.
- 36.Unceta N., Vicente AS., Goicolea MA., Salles J., Barrio RJ., *J. Sep. Sci.* 2002, 25, 665–670.
- 37.Zhang WZ., Kaye DM. Simultaneous determination of arginine and seven metabolites in plasma by reversed-phase liquid chromatography with a

- time-controlled ortho-phthaldialdehyde precolumn derivatization. *Anal. Biochem.* 2004; 326: 87–92.
38. Heresztyn T., Worthley MI., Horowitz JD. Determination of l-arginine and NG, NG - and NG, NG' -dimethyl-L-arginine in plasma by liquid chromatography as AccQ-Fluor fluorescent derivatives *J. Chromatogr.B* 2004; 805: 325–9.
39. Nonaka S., Tsunoda M., Imai K., Funatsu T. High-performance liquid chromatographic assay of N(G)-monomethyl-L-arginine, N(G),N(G)-dimethyl-L-arginine, and N(G),N(G)'-dimethyl-L-arginine using 4-fluoro-7-nitro-2, 1,3-benzoxadiazole as a fluorescent reagent. *J. Chromatogr.A* 2005; 1066: 41–45.
40. Teerlink T. Determination of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine in biological samples by HPLC. *Methods Mol. Med.* 2005; 108: 263–274.
41. Bulau P., Zakrzewicz D., Kitowska K., Wardega B., Kreuder J., Eickelberg O. Quantitative assessment of arginine methylation in free versus protein-incorporated amino acids in vitro and in vivo using protein hydrolysis and high-performance liquid chromatography. *BioTechniques* 2006; 40: 305–310.
42. Caussé E., Siri N., Arnal JF., Bayle C. et al. Determination of asymmetrical dimethylarginine by capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence. *J. Chromatogr.B* 2000; 741: 77–83.
43. Vallance P., Leone A., Calver A., Collier J., Moncada S. Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis., *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1992; 20: S60–S62.
44. Zoccali C., Bode-Boger S., Mallamaci F., Benedetto F. et al. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* 2001; 358: 2113–2117.

45. Valkonen VP., Päivä H., Salonen JT., Lakka TA. et al. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 2001; 358: 2127–2128.
46. Klein R, Wang Q, Klein BE, Moss SE, Meuer SM. The relationship of age-related maculopathy, cataract, and glaucoma to visual acuity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36: 182–91.
47. Mitchell P, Smith W, Chang A. Prevalence and associations of retinal vein occlusion in Australia: the Blue Mountains Eye Study. *Arch Ophthalmol* 1996; 114: 1243–7.
48. Cugati S, Wang JJ, Rochtchina E, Mitchell P. Ten-year incidence of retinal vein occlusion in an older population: the Blue Mountains Eye Study. *Arch Ophthalmol* 2006; 124: 726–32.
49. Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J, Tsikas D, Boeger RH, Bode-Boeger SM, et al. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 33: 652–8.
50. Schulze F, Maas R, Freese R, Schwedhelm E, Silberhorn E, Boger RH. Determination of a reference value for N(G), N(G)-dimethyl-L-arginine in 500 subjects. *Eur J Clin Invest* 2005; 35: 622–6.
51. Stuhlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2001; 104: 2569–75.
52. Stamler JS, Slivka A. Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. *Nutr Rev* 1996; 54: 1–30.
53. Saraceni C, Broderick TL. Cardiac and metabolic consequences of aerobic exercise training in experimental diabetes. *Curr Diabetes Rev* 1999; 3: 75-84.
54. Milani RV, Lavie CJ. The role of exercise training in peripheral arterial disease. *Vasc Med* 2007; 12: 351-358.

55. Fagard RH. Physical activity in the prevention and treatment of hypertension in the obese. *Med Sci Sports Exerc* 1999; 31: 624-630
56. Gardner AW, Poehlman ET. Exercise rehabilitation programs for the treatment of claudication pain. *JAMA* 1995; 274: 975-980
57. Goldstein LB, Adams R, Becker K, et al. Primary prevention of ischemic stroke: a statement for healthcare professionals from the Stroke Council of the American Heart Association. *Circulation* 2001; 103: 162-182
58. Hu FB, Sigal RJ, Rich-Edwards JW. Walking compared with vigorous physical activity and risk of type 2 diabetes in women: a prospective study. *JAMA* 1999; 282: 1433-1439
59. Blair SN, Brodney S. Effects of physical inactivity and obesity on morbidity and mortality: current evidence and research issues. *Med Sci Sports Exerc* 1999; 31: 646-662
60. Leon AS, Sanchez OA. Response of blood lipids to exercise training alone or combined with dietary intervention *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33: 502-515
61. Friedebreich CM, Bryant HE, Courneya KS. Case control study of lifetime physical activity and breast cancer risk. *Am J Epidemiol* 2001; 154: 336-347
62. Colditz GA, Cannuscio CC, Frazier AL. Physical activity and reduced risk of colon cancer: implications for prevention. *Cancer Causes Control* 1997; 8: 649-666
63. Lee IM, Sesso HD, Chen JJ et al. Does physical activity play a role in the prevention of prostate cancer? *Epidemiol Rev* 2001; 23: 132-137
64. Michaud DS, Giovannucci E, Willett et al. Physical activity, obesity, height and the risk of pancreatic cancer. *JAMA* 2001; 286: 921-929
65. Shors AR, Solomon C, McTiernan A et al. Melanoma risk in relation to height, weight and exercise (United States). *Cancer Causes Control* 2001; 12: 599-606

66. Shephard RJ, Verde TJ, Thomas SG, Shek P. Physical activity and the immune system. *Can J Sport Sci.* 1991; 16:169-85.
67. Laurin D, Verreault R, Lindsay J, et al. Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. *Arch Neurol* 2001; 58: 498-504
68. Zinellu A, Sotgia S, Caria MA et al. Effect of acute exercise on low molecular weight thiols in plasma. *Scand J Med Sci Sports* 2007; 17:452-456.
69. Sotgia S, Carru C, Caria MA et al. Acute variations in homocysteine levels are related to creatine changes induced by physical activity. *Clin Nutr* 2007; 26: 444-449.
70. Sengupta S, Chen H, Togawa T. Albumin thiolate anion is an intermediate in the formation of albumin-S-S-homocysteine. *J Biol Chem.* 2001; 276: 30111-30117.
71. Jacobsen DW, Catanescu O, Dibello PM et al. Molecular targeting by homocysteine: a mechanism for vascular pathogenesis. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 1076-1083