

1° Congresso Interregionale Sa.Si.Ca.  
Delegazioni Regionali  
Sardegna, Sicilia, Campania

## **“Agi-Lab” Congress on “Laboratory Medicine of Aging and Longevity”**

Perfugas (SS), 4-6 giugno 2009

### **Presidenti**

*Giuseppe Castaldo, Marcello Ciaccio, Luca Deiana*

### **Comitato Scientifico**

*Giovannella Baggio (Padova, Sassari) - Giuseppe Castaldo (Napoli)*

*Marcello Ciaccio (Palermo) - Luca Deiana (Sassari)*

*Giorgio Federici (Roma) - Claudio Franceschi (Bologna)*

*Leonardo Gaspa (Sassari) - Mario Plebani (Padova)*

*Francesco Salvatore (Napoli) - Gerard Siest (Nancy, F)*

*James W. Vaupel (Dhuram, USA)*

### **Comitato Organizzatore**

*Luca Deiana (Sassari), Presidente - Alessandra Aste (Cagliari)*

*Chiara Bellia (Palermo) - Giulia Bivona (Palermo)*

*Giuseppe Castaldo (Napoli) - Ciriaco Carru (Sassari)*

*Marcello Ciaccio (Palermo) - Dino Decandia (Perfugas)*

*Stefano Miccichè (Palermo) - Andrea Montella (Sassari)*

*Antonello Pileri (Erula) - Rossella Tomaiuolo (Napoli) - Angelo Zinellu (Sassari)*

### **Segreteria Scientifica**

*Chiara Bellia (Palermo) - Ciriaco Carru (Sassari) - Rossella Tomaiuolo (Napoli)*

### **Con il Patrocinio**

*Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca, Ministero del Lavoro, della Salute e  
delle Politiche Sociali, Università degli Studi di Sassari, Università degli Studi di*

*Napoli Federico II, Università degli Studi di Palermo,*

*Regione Sardegna, Provincia di Sassari, Comune di Perfugas, Comune di Erula,*

*AOU Sassari, ASL 1 Sassari,*

*Assessorato Sanità Regione Sardegna, Presidenza dell'Assemblea Regionale Siciliana,*

*Provincia Regionale di Catania, Comune di Catania*

*Nota dell'Editore:*

*I riassunti sono stati riprodotti senza alcuna revisione editoriale dal materiale direttamente fornito dagli autori.*

**ADIPOSIITY, CALORIE RESTRICTION AND AGING**

L. Fontana

*Division of Nutrition and Aging, Ist. Superiore di Sanità, Rome, Italy & Division of Geriatrics and Nutritional Science, Center for Human Nutrition, Washington University School of Medicine, St. Louis (MO), USA*

In the near future, human aging and age-associated diseases will become one of the biggest challenges faced by developed and developing countries. Life expectancy has markedly increased in most developed countries in the last century, from about 45 years at the beginning of the XX century to about 77 years today. This increase is due primarily to reduced deaths from infectious diseases and in infancy, but also to improved sanitation and working conditions, better nutrition and housing, organized sewage disposal, the development of antibiotics and vaccines, and better health care. However, the overall increase in average life span is far greater than that for healthy life expectancy, as evidenced by the incremental burden of age-associated diseases, including coronary heart disease, stroke, heart failure, diabetes, hypertension and cancer. Cardiovascular disease, cancer, stroke and diabetes account for nearly 70% of the deaths in the United States and Europe. The financial burden caused by these age-associated chronic diseases is already overwhelming and, if present trends continue, is likely to become unbearable in the next few decades. One of these trends involves the overconsumption of diets rich in empty calories and poor in nutrients and a sedentary lifestyle leading to a marked increase in age-associated chronic diseases. Another is the rapid increase in the proportion of older individuals, with the most dramatic increases in the number of adults over 65 years of age. In contrast to these harmful effects of overeating unhealthy foods, restriction of calorie intake with adequate intake of nutrients has a wide range of benefits. Moderate calorie restriction (CR) with optimal nutrition can prevent and reverse the harmful effects of obesity, type 2 diabetes, hypertension and other age-associated metabolic alterations and diseases. Studies on laboratory animals and preliminary studies on humans have shown that more severe CR without malnutrition has additional benefits on the aging process itself. Although there are currently no interventions or gene manipulations that can prevent, stop or reverse the aging process, there are a number of interventions that can slow aging and prolong maximal lifespan up to 60% in experimental animals. Long-term calorie restriction without malnutrition and reduced function mutations in the insulin/IGF-1 signalling pathway are the most robust interventions known to increase maximal lifespan and healthspan in rodents. Although it is currently not known if long-term CR with adequate nutrition extends maximal lifespan in humans, we do know that long-term CR without malnutrition results in some of the same metabolic and hormonal adaptations related to longevity in CR rodents. CR decreases insulin resistance, growth factors and inflammation, improves diastolic function,

and alters neuroendocrine function. These are among the adaptations that have been hypothesized to mediate the slowing of aging and protection against cancer by CR in rodents. Additional studies are needed to identify the molecular and cellular mechanisms responsible for the therapeutic effects of CR and to identify reliable markers of aging to facilitate evaluating the effect of CR and other anti-aging interventions in randomized controlled clinical trials.

**PARENTAL LONGEVITY IMPACTS ON THE HEALTHY AGEING OF THEIR OFFSPRING: EFFECTS ON INSTRUCTIVE IMMUNITY**

G. Colonna-Romano, S. Buffa, M. Bulati, G. Candore, D. Lio, M. Pellicanò, S. Vasto, C. Caruso

*Immunosenescence Unit, Departments of Pathobiology and Biomedical Methodologies, University of Palermo*

The elderly suffer from an increased susceptibility to infectious disease and cancer. Ageing of the immune system contributes to this state of affairs due to immunosenescence. Because repeated intermittent or chronic antigen exposure may lead to lymphocyte clonal exhaustion, chronic antigenic stress plays a part in the compromised immunity of the elderly, who have accumulated a lifetime's exposure to infectious agents, autoantigens, and cancer antigens. Literature on immunosenescence has focused mainly on T cell impairment, but B cell compartment is also affected. The age-dependent B cell changes indicate that advanced age per se is a condition characterized by lack of B clonotypic immune response to new extracellular pathogens. In any event, data are suggesting that the loss of naive B cells could represent a hallmark of immunosenescence and could provide a biomarker possibly related to the life span of humans and potentially useful for the evaluation of anti-ageing treatment. Since information on the senescence of B cells is of obvious interest, further studies are necessary to confirm these suggestions as well as to extend the number of markers used to characterize the cells. Present studies involve the analysis of B cells in two classes of individuals: old people and centenarian offspring. Our data showed difference in values of B cell counts from individuals ranging from 70 to 85 years old and centenarian offspring. B cell compartment was analysed using IgD+CD27-, IgD+CD27+, IgD-CD27+ and IgD-CD27- antibodies which represent switched, un-switched, double negative and naive phenotype. As expected, in both cohorts we observed a marked decrease of B cell count although within the B cell population, centenarian offspring do not behave as old individuals. Indeed, in centenarian offspring, naive B cells are more abundant whereas IgD-CD27- cells don't show the typical increase that we have previously demonstrated in healthy elderly donors. Indeed naive B cells are more abundant as well as double negative B cells in centenarian offspring. These data are similar to that found in previously experiment on young subjects.

So, B cell compartment of the offspring of centenarians seems to be more similar to that of young respect to the old one. B cell subset changes could represent a hallmark of immunosenescence and could be used as a biomarker of human life span, potentially useful for the evaluation of anti-ageing treatment.

#### PROTHROMBOTIC VARIANTS IN ELDERLY

G. Chiarello, L. Liga, C. Migliorisi, B. Lo Sasso, M. Ciaccio

*Chair of Clinical Biochemistry, School of Medicine, University of Palermo, Italy*

Venous thrombosis is a common disorder in the elderly with a substantial morbidity and mortality. Environmental risk factors, particularly immobilization, play an important role in the etiology of thrombosis in the elderly, and cause a substantial proportion of the total number of cases because risk factors associated with disease are more prevalent in old than in young individuals. Abnormalities in the clotting system, either genetic or acquired, appear to be equally and possibly more important in the elderly than in young and middle-aged individuals (1). Thrombosis results from the interaction between predisposing genetic polymorphisms and acquired risk factors (2). Knowledge about hereditary thrombophilia has increased in the last two decades and this has led to widespread testing of hereditary thrombophilia in patients with venous thromboembolism. Several allelic variants have been associated with inherited thrombophilia, these include: factor V Leiden, factor II Prothrombin G20210A, beta-fibrinogen -455G>A, methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G, Apolipoprotein E (Apo E) polymorphisms, angiotensin converting enzyme (ACE) I/D (3-4). Variants of certain haemostatic genes (such as that encoding factor V Leiden) are involved in the development of venous thrombosis (5). The risk of venous thrombosis associated with factor V Leiden increases when other thrombophilic genes co-exist and when acquired risk factors are also present (6). The second most common form of reported inherited thrombophilia is the prothrombin polymorphism G20210. This mutation increases the concentration of circulating prothrombin. MTHFR catalyzes remethylation of homocysteine to methionine. Elevated levels of homocysteine can result from several mutations in the MTHFR gene (C677T and A1298C) and have been identified as risk factors for thrombosis (7). A defective fibrinolysis can also contribute to thrombosis and patients with a history of thrombosis were found to have a high prevalence of increased plasminogen-activator 1 (PAI-1) levels (8). Yet there are few data in the literature about the prevalence of these polymorphisms in the centenarian population.

#### References

1. J Thromb Haemost 2007;5 Suppl 1: 310-7.
2. Mol Genet Metab 2005;86(1-2):91-9.

3. Semin Thromb Hemost 2007;33(6):573-81
4. Semin Thromb Hemost 2005;31(1):33-8.
5. Lancet. 2006;367:651-8.
6. J Nurs Scholarsh 2006; 38(1):19-25.
7. Am J Reprod Immunol 2008; 60(5):426-31.
8. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92(6):1851-5.

#### FETUIN-A, RENAL FUNCTION AND CARDIOVASCULAR DISEASE IN ELDERLY SUBJECTS

C. Bellia, A. Caruso, S. Cammarieri, R. Carollo, M. Ciaccio

*Chair of Clinical Biochemistry, School of Medicine, University of Palermo*

Because human serum is supersaturated with respect to calcium and phosphorus, the existence of serum-based precipitation inhibitors has long been postulated. Human fetuin-A, also known as alpha2-Heremans Schmid glycoprotein, a protein produced by the liver and secreted into serum in high concentrations, about 0.5-1.0 g/l, is a major serum-based inhibitor of vascular calcification and accounts for roughly 50% of the inhibition of calcium and phosphorus precipitation (1). In fetuin-deficient mice, the serum inhibition of apatite formation was compromised as well as in heterozygotes. In addition, homozygous fetuin-deficient developed ectopic microcalcifications in soft tissues (2). After these seminal evidences, it has been demonstrated that precipitation inhibition by fetuin-A is caused by transient formation of soluble, colloidal spheres, containing fetuin-A, calcium and phosphates, providing a possible way to transport and remove mineral precipitates in the bodies of mammals (3, 4). Moreover, patients with end-stage renal disease and chronic kidney disease usually have lower serum levels than age- and sex-matched populations with normal kidney function (5), providing a physiopathological link between kidney dysfunction and the higher prevalence of cardiovascular disease observed in these patients. Further evidences supporting this hypothesis came from the study of Moe et al that shown a negative correlation of coronary artery calcification scores, assessed by computed tomography, with serum fetuin-A levels; moreover, authors demonstrated an increased immunostaining for fetuin-A in arteries with increasing calcification (6). Several evidences indicate that the role of fetuin-A in renal and cardiovascular disease may be more complex: actually, in a cohort of coronary artery disease patients, Ix et al found a direct correlation between higher cystatin C, which indicates a worse kidney function, and adjusted mean serum fetuin-A concentrations (7). In addition, it has been recently demonstrated that higher fetuin-A levels confer a higher risk of myocardial infarction and ischemic stroke in the general population (8). Moreover, there are no data regarding circulating levels of fetuin-A in elderly and their potential association with renal function, which notably declines during aging.

#### Bibliografia

1. Jahnen-Dechent W, et al. Mineral chaperones: a

- role for fetuin-A and osteopontin in the inhibition and regression of pathologic calcification. *J Mol Med* 2008; 86: 379-389.
2. Jahnen-Dechent W, et al. Cloning and targeted deletion of the mouse fetuin gene. *J Biol Chem* 1997; 272(50): 31469-31503.
  3. Heiss A, et al. Structural basis of calcification inhibition by alpha2-HS Glycoprotein/Fetuin A. *J Biol Chem* 2003; 278(15): 13333-13341.
  4. Price PA, et al. Serum Levels of the Fetuin-Mineral complex correlate with artery calcification in the rat. *J Biol Chem* 2004; 279(3): 1594-1600.
  5. Ciaccio M, et al. Changes in serum fetuin-A and inflammatory markers levels in end-stage renal disease (ESRD): effect of a single session haemodialysis. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46(2): 212-214.
  6. Moe SM, et al. Role of calcification inhibitors in the pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease (CKD). *Kidney Int* 2005; 67(6): 2295-2304.
  7. Ix JH, et al. Fetuin A and kidney function in persons with coronary artery disease – data from the Heart and Soul Study. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 2144-2151
  8. Weikert C, et al. Plasma fetuin-A levels and the risk of myocardial infarction and ischemic stroke. *Circulation* 2008; 118: 2555-2562.

#### RESVERATROLO, ELISIR DI LUNGA VITA?

A.M. Posadino, L. Deiana, A. Cossu, S. Deidda, M. Fois, G. Pintus

*Dip. di Scienze Biomediche, Università di Sassari*

Il Resveratrolo (trans-3,4',5-triidrossistilbene), il più noto antiossidante tra i polifenoli del vino rosso, è stato oggetto di grande interesse negli ultimi anni a causa di peculiari proprietà anti-invecchiamento. Queste includono benefici cardiovascolari grazie ad un aumento della produzione di NO, down-regulation di peptidi vasoattivi, riduzione dei livelli di LDL nel sangue ed inibizione della ciclossigenasi; possibili benefici sull'Alzheimer con effetti diretti sui tessuti neuronali; azioni fito-ormonali; proprietà antitumorali attraverso la modulazione della trasduzione di diversi segnali intracellulari ed effetti antimicrobici. Molti di questi effetti biologici del resveratrolo sarebbero dovuti alla sua capacità di modulare i radicali liberi. Questi sono molecole altamente reattive che vengono prodotte dalle cellule e sono oggi riconosciute come causa dell'invecchiamento e di molte patologie degli esseri viventi.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di studiare gli effetti del resveratrolo su colture di cellule endoteliali umane estratte da cordone ombelicale, nell'ottica di conoscere ed approfondire alcuni aspetti molecolari indotti da tale molecola a partire dalla sua presunta benefica azione antiossidante; le cellule endoteliali, nel sistema cardiovascolare, risultano le più esposte

all'azione di questa molecola assunta con bevande e/o cibi o con l'ingestione volontaria della stessa.

Gli aspetti cellulari che abbiamo analizzato sono la modulazione della proliferazione, dell'apoptosi e della citotossicità indotti dal resveratrolo sul modello endoteliale.

I nostri risultati mostrano come il resveratrolo induca effetti differenti sulla biochimica della cellula modificando il bilancio tra crescita e morte cellulare: alte concentrazioni di resveratrolo non hanno effetti benefici sulla vita della cellula endoteliale umana mentre le basse concentrazioni risultano benefiche, con degli effetti sui ROS che si riducono drasticamente alle alte concentrazioni del polifenolo. Alla luce di tutto questo è necessario riconsiderare il ruolo benefico che si attribuisce agli antiossidanti e che ha indotto ad aumentarne enormemente l'assunzione ed è opportuno identificare la soglia di beneficio ovvero la concentrazione ottimale sotto la quale l'organismo può trarre un vantaggio dall'assunzione di tali molecole ed oltre la quale questi antiossidanti diventano nocivi.

\*Lavoro supportato da: MIUR e Fondazione Banco di Sardegna.

#### AGING AND SOMATOPAUSE

G. Fanciulli, A. Delitala, F. Badessi, C. Usai, A. Usai, G. Delitala

*Dipartimento-Struttura Clinica Medica-Patologia Speciale Medica, University of Sassari, Sassari, Italy*

The Growth Hormone (GH)/ Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) axis is a main regulator of growth during childhood and adolescence, and it also modulates body composition and metabolic activities throughout the entire lifespan. The activity of GH/IGF-1 axis progressively declines during aging. These biochemical changes, together with their possible link with frailty in older subjects, have been called "somatopause". The decline in GH secretion begins during the third decade, and reaches a plateau during the seventh decade [1]. Analysis of 24-h GH secretory profiled showed that GH secretion decreases by 14% per decade of life [2]. Interestingly, the 24-h mean serum GH concentrations in premenopausal women remain stable until the menopause, probably due to the stimulating effect of estrogens on GH secretion.

The mechanism(s) of the reduction of GH secretion is unclear, even though a derangement of the secretion of hypothalamic GH-Releasing (GHRH) and/or somatostatin into the portal circulation might be responsible for this altered secretion. The hypophyseal gland remains responsive to the direct stimulation by GH secretagogues (GHS), though a reduction of GH response to GHRH has been reported [3]. Co-administration of substances able to reduce the hypothalamic somatostatinergic tone, such as arginine, can restore the GH secretion to GHRH response in elderly [4]. Thus, the available data might suggest that

the effect of aging upon GH secretion probably includes an increased somatostatinergic tone, although a decline in GHRH (or other GHS) could take part in this phenomenon.

Several studies have been performed to restore the GH and IGF-1 levels within the young adult range [5]. However, there is to date no evidence that elderly subjects might take advantage from administration of GH or GHS.

#### References

1. Ho KK and Hoffman DM. Aging and growth hormone. *Horm Res* 40, 80-6, 1993
2. Iranmanesh A et al. Age and relative adiposity are specific negative determinants of the frequency and amplitude of growth hormone (GH) secretory bursts and the half-life of endogenous GH in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 73, 1081-8, 1991
3. Lang I et al. Effects of sex and age on growth hormone response to growth hormone-releasing hormone in healthy individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 65, 535-40, 1987
4. Ghigo E et al. Growth hormone (GH) responsiveness to combined administration of arginine and GH-releasing hormone does not vary with age in man. *J Clin Endocrinol Metab* 71, 1481-5, 1990
5. Rudman D et al. Effects of human growth hormone in men over 60 years old. *N Engl J Med* 323, 1-6, 1990

#### FORMYL-PEPTIDE RECEPTORS, NADPH OXIDASE AND AGING

R. Ammendola

*Università degli Studi del Molise*

The formyl-peptide receptor family members FPR, FPRL1 and FPRL2, expressed in human cells, belong to pertussis toxin sensitive G-protein coupled seven transmembrane receptor family (GPCR). In polymorphonucleate cells (PMN) binding of small formyl-peptide derivatives, whose prototype is N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (N-fMLP), to these receptors triggers a complex program that results in cell migration, reorganization of the actin cytoskeleton and superoxide anion generation through NADPH oxidase activation. FPR and FPRL1 bind N-fMLP with high and low efficiency, respectively. FPRL2 does not respond to formyl-peptides and it was described as a low affinity receptor for several FPRL1 agonists.

FPR and FPRL1 were initially detected in phagocytic leukocytes, while FPRL2 was described only in monocytes and in dendritic cells but in the last years many results demonstrate that several other cell types and tissues also express these receptors.

In addition to N-fMLP, several nonformylated peptide agonists or other non-proteic ligands that preferentially activate either or both FPR and FPRL1 in nonphagocytic cells have been identified. They include WKYMVM peptide, isolated by screening a random oligonucleotide library, annexin 1, lipoxin A4 (LXA4), urokinase and its

receptor, serum amyloid A, humanin and cathelicidin LL-37.

Phagocytic NADPH oxidase activation and the subsequent reactive oxygen specie (ROS) generation represents one of the downstream target of the signaling cascade triggered by FPR and/or FPRL1. Proteins homologous to the membrane catalytic subunit gp91phox and to the cytosolic regulatory components p47phox and p67phox of NADPH oxidase also have been identified in nonphagocytic cells. Compared with PMN, much less is understood about the signal transduction pathways involved in the regulation of the activation of nonphagocytic NADPH oxidase, triggered by formyl-peptide receptors/agonist interaction.

We demonstrated that human fibroblasts and epithelial cells express FPRL1 and an enzymatic machinery homologous to phagocytic NADPH oxidase. In serum-deprived cells, exposure to growth factors stimulates NADPH oxidase to generate superoxide anion and treatment with NADPH oxidase inhibitors results in impairment of the serum-induced signaling cascade. Furthermore, exposure to N-fMLP or to 10-fold lower concentration of WKYMVM for short times (1') induces superoxide generation due to serine-phosphorylation and membrane translocation of the regulatory cytosolic NADPH oxidase subunit p47phox. These effects are in large part mediated by the rapid activation of ERKs and are inhibited by pertussis toxin, suggesting the involvement of GPCRs. In addition to ERKs, in these cells exposed to N-fMLP or WKYMVM, p47phox phosphorylation and its translocation on membrane also requires Protein kinase C- $\alpha$  and - $\delta$ .

On the other hand the exposure for longer times (up to 3hrs) induces p21waf1 accumulation, the block of the G1/S cycle, a significative increase of  $\beta$ -gal positive cells and the appearance of a senescent phenotype.

#### BRAIN BIOCHEMISTRY IN THE ELDERLY: EVALUATION BY <sup>1</sup>H MRS

G. Bivona, M. Ciaccio

*Chair of Clinical Biochemistry, School of Medicine, University of Palermo*

In vivo proton MRS allows the presence of certain metabolites in brain tissue to be detected if the minimum concentrations are between 0.5 and 1.0 mM. Some of these present clinical importance, such as: N-acetyl aspartate (Naa), which is a neuronal marker that is present in neuron bodies and axons and indicates their density and viability; Creatine (Cr) is a marker of the aerobic energy metabolism; its peak may be used as a control value in relation to other metabolites; Choline (Cho), which is a constituent molecule of the phospholipid metabolism of cell membranes and reflects membrane turnover; Myoinositol, which is considered to be a glial function marker, generally presents reduction in hepatic encephalopathy and elevation in Alzheimer's disease. Lactate is not commonly detected in proton spectroscopy of brain tissue: its presence indicates a

pathological condition with regard to the final products of anaerobic metabolism. Other metabolites that can be detected via proton MRS include the following amino acids: alanine, acetates and succinates (1). Since metabolic and biochemical pathway changes occur in neurological diseases including those with cognitive decline and such a transitional condition is known (2) between physiological aging and Dementia, it could be of some clinical importance to evaluate normal biochemical pathway in the elderly, making possible a comparison among subjects with and without aging-induced cognitive impairment of various entity.

Proton magnetic resonance spectroscopy of the brain is useful whenever biochemical or metabolic assessment may be necessary, therefore in vivo MRS investigation represents a useful tool to differentiate metabolic changes due to aging from those due to disease. While several long -echo time MRS studies (3) reported metabolite changes in elderly people, including reduction of NAA, Cho, ml concentrations and increase of Cr, a number of short-echo time performed studies (4) showed no significant changes in the same metabolite concentrations.

Finally, some Authors focused the role of biochemical abnormalities exclusively referred to hippocampus area as possible mechanism underlying hippocampus-memory decline (5).

#### References

1. N Ackl, M Ising, YA Schreiber, M Atiya, A Sonntag, DP Auer. Hippocampal metabolic abnormalities in mild cognitive impairment and Alzheimer's diseases. *Neuroscience Letters*, 2005; 384:23- 8.
2. A Lin, BD Ross, K Harris, W Wong. Efficacy of Proton Magnetic Resonance Spectroscopy in Neurological Diagnosis and Neurotherapeutic Decision Making. *NeuroRx*, 2005; 2: 197-214.
3. L Chang, T Ernst, RE Poland, DJ Jenden. In vivo proton magnetic resonance spectroscopy of the normal aging brain. *Life Sci* 1996; 22: 2049-2056.
4. DE Saunders, FA Howe, A van den Boogaart, JR Griffiths, MM Brown. Aging of the Adult Human Brain: In Vivo Quantitation of Metabolite Content With Proton Magnetic Resonance Spectroscopy. *Journal Of Magnetic Resonance Imaging*, 1999; 9:711-716.
5. I Driscoll, DA Hamilton, H Petropoulos, RA Yeo, WM Brooks, RN Baumgartner, RJ Sutherland. The Aging Hippocampus: Cognitive, Biochemical and Structural Findings. *Cerebral Cortex*, 2003;13:1344-1351.

#### LA MICROGRAVITA' E LE BIOTECNOLOGIE SPAZIALI: UN NUOVO STRUMENTO NELLO STUDIO DELLA IMMUNOSENESCENZA ?

P. Pippia, A. Saba, M.A. Meloni

*Dip. di Scienze Fisiologiche, Biochimiche e Cellulari, Università di Sassari*

L'allungamento dell'aspettativa di vita e l'aumentata frequenza di soggetti anziani nella popolazione generale

portano ad un incremento della spesa sanitaria destinata a soggetti anziani e questo a causa del fatto che l'invecchiamento è associato con l'insorgenza di differenti condizioni patologiche. Il progressivo declino del sistema immunitario, o immunosenescenza, è uno dei più importanti motivi dell'insorgenza di dette patologie. Diverse osservazioni sperimentali suggeriscono che il sistema immunitario subisce varie alterazioni con l'avanzare dell'età, con conseguente aumento dell'incidenza e della gravità di alcune malattie infettive. I linfociti T sembrano essere la componente del sistema immune più sensibile all'invecchiamento: la proliferazione indotta da mitogeni in tali cellule è generalmente ridotta e ciò potrebbe essere il risultato della disfunzione dell'omeostasi delle citochine. Infatti sono state osservate diminuzione della produzione di IL-2 e del suo recettore IL-2-R-alfa (CD-25) ed un aumento dei livelli ematici di IL-6, TNF-alfa e IL-1-beta. Inoltre sono state osservate alterazioni citoscheletriche ed aumentata apoptosi, nonostante tale processo sia generalmente associato ad una deficiente risposta infiammatoria. Anche il sistema immunitario dell'uomo nello spazio (shuttle, ISS, razzi sonda) o in condizioni di microgravità simulata (bed rest, clinostato) presenta diversi processi molecolari e cellulari analoghi a quelli osservati nel corso della immunosenescenza: riduzione della proliferazione nei T linfociti umani, aumento di IL-1, diminuzione della espressione genica di IL-2 e CD-25, alterazione del pattern di actina, tubulina e vinculina, aumento molto rilevante della cicloossigenasi, del rilascio del citocromo C e delle caspasi con conseguente aumentata apoptosi. In particolare, nell'esperimento ROALD compiuto recentemente a bordo della Stazione Spaziale Internazionale abbiamo dimostrato che i T linfociti umani nello spazio subiscono, dopo 24-48 ore, un aumento di markers specifici dell'apoptosi, come p53 e calpaina, e dei livelli di frammentazione del DNA. Dopo 3 ore di esposizione alla microgravità reale inoltre i T linfociti mostrano una aumentata produzione di LTB4. Diversi studi dimostrano che molti parametri alterati negli anziani sono correlati con lo stato di salute in atto o anche pregresso. Dal momento che è possibile sottoporre a condizioni microgravitazionali soggetti sani, noi pensiamo che gli studi in condizioni di microgravità applicati alla fisiopatologia del sistema immunitario possano contribuire a chiarire alcuni aspetti cellulari e molecolari della immunosenescenza.

Ricerca compiuta con finanziamenti dell'Agenzia Spaziale Italiana (MoMa grant) di Roma e della Fondazione Banco di Sardegna di Sassari

#### HYPONATREMIA IN THE ELDERLY: PHYSIOLOGICAL CHANGES OF AGEING AND CLINICAL CONSEQUENCES

G. Delitala, A. Usai, C. Usai, F. Badessi, A. Delitala, G. Fanciulli

*Dipartimento-Struttura Clinica Medica-Patologia Speciale Medica, University of Sassari, Sassari, Italy*  
Ageing is associated with many changes in the

homeostatic systems involved in the regulation of water and sodium balance. These systems include the hormones vasopressin (ADH), atrial natriuretic hormone (ANH) and aldosterone. Disturbances of water and electrolyte balance are common in the elderly as part of normal ageing especially when older persons are challenged by diseases, drugs or environmental factors (see Table below).

Ageing effects on sodium and water regulation	
Renal alterations	Hormonal alterations
Decreased kidney mass	ADH
Decline in renal blood flow	Normal or increased basal secretion
Decline in glomerular filtration rate (GFR)	Increased response to osmotic stimulation
Impaired distal renal tubular diluting capacity	Decreased nocturnal secretion
Impaired renal concentrating capacity	ANH
Impaired sodium conservation	Increased basal secretion
Impaired renal response to vasopressin	Increased response to stimulation
Fluid intake	
Decreased thirst perception	

It is generally accepted that there is a 50% to 60% decline in GFR from the ages of 30 to 80 years. Despite this decrease, the serum creatinine remains within normal limits: this paradox is due to the decrease in muscle mass. A decrease in maximal urinary concentration is observed in the elderly, but it is not clear whether this failure results from a decreased medullary solute gradient or a decrease tubular response to ADH at the receptor level. Hyponatremia, the most common electrolyte disorder, occurs frequently in older people and in hospitalized patients. Elderly have also an intrinsic defect in the thirst mechanism resulting in decreased fluid intake despite increases in osmolarity and sodium level. The hormonal regulation of fluid and electrolyte balance requires an intricate interaction between aldosterone, ADH, and ANH. Alterations in the levels of these hormones are partly responsible for the changes in fluid balance associated with aging. ADH levels are increased for any given plasma osmolarity, and osmoreceptor hypersensitivity is the proposed mechanism for the exaggerated ADH response. These alterations can make the elderly more susceptible to hyponatremia. The syndrome of inappropriate ADH secretion is characterized by isovolemic hyponatremia and elevated ADH levels despite subnormal plasma osmolarity level. There are numerous conditions associated with the syndrome, such as central nervous system disorders, infection, and malignancies. Moreover, a variety of drugs often taken by elderly persons can induced hyponatremia: these include fluoxetine and its derivatives, amitriptyline hydrochloride,

the dopamine agonist pramipexole, carbamazepine, oxcarbazepine, vincristine, cyclophosphamide, and chlorpropamide.

Hyponatremia is a common finding in elderly persons, and can lead to significant morbidity and mortality particularly in patients who have pre-existing cognitive impairment. Hyponatremia can also occur in association with hypervolemia and hypovolemia. Common to all these circumstances is an increased secretion of vasopressin. Understanding the pathophysiological basis of hyponatremia and of brain compensatory mechanisms is critical to safe treatment.

**ALTERAZIONI ETÀ-CORRELATE DEL CICLO DELLA METIONINA**

C. Carru

*Dip. di Scienze Biomediche Università di Sassari*

La metionina è un aminoacido essenziale che, a seguito dell'attivazione ad S-adenosil-metionina, funge da donatore universale di gruppi metilici ad una serie di riceventi (tra cui l'acido guanidinoacetico, gli ormoni steroidei, le basi puriniche di DNA ed RNA) venendo trasformato in omocisteina. L'omocisteina può essere, a sua volta, trans-sulfurata irreversibilmente in cistationina e quindi in cisteina, glutatione e taurina, oppure, in carenza di metionina assunta con la dieta, rimetilata a metionina. Una serie di enzimi e di cofattori regolano queste vie metaboliche; per il processo di trans-sulfurazione, l'enzima fondamentale è la cistationina β-sintetasi (CBS), che necessita del cofattore piridossal-fosfato (PLP) (vitamina B6), mentre un numero maggiore di enzimi - e di cofattori - svolge un ruolo fondamentale nella rimetilazione della omocisteina. Il donatore di metile è in questo caso il 5-metil-tetraidrofolato (MTHF), a sua volta rigenerato dalla metilene tetraidrofolato reductasi (MTHFR), e la reazione è catalizzata dalla metionina sintetasi che necessita, come cofattore, della transcobalamina (vitamina B12 metilata).

Tra i diversi prodotti della metilazione che derivano da questo ciclo particolare importanza assumono sia la dimetilargininaasimmetrica (ADMA), regolatore endogeno della attività della ossido nitrico sintasi nella produzione dell'ossido nitrico, sia la Metil-Citosina, specificatamente nelle isole CpG determinando tra gli altri la modificazione della espressione di promotori genici.

Le cause delle alterazioni del ciclo della metionina possono essere diverse: su base genetica (carenze enzimatiche), e poi nutrizionale, endocrina, farmacologica, patologica o riconducibili a processi tipici dell'invecchiamento. Nonostante ancora i meccanismi generali non siano stati ancora definiti studi osservazionali dimostrano associazioni tra alterati livelli di vitamina B12, di omocisteina, ADMA, di metilazione del DNA e le principali patologie età correlate.

Tali marcatori svolgono un ruolo importante nelle patologie di tipo vascolare e se gli ultralongevi hanno un

meccanismo di protezione dalla attività nociva di questi prodotti è un fenomeno ancora da investigare.

### PRINCIPI DI ELETTROFORESI CAPILLARE ED APPLICAZIONI NELLA DIAGNOSTICA CLINICA

A. Zinellu

*Dip. di Scienze Biomediche, Università di Sassari*

L'elettroforesi capillare (CE) è una tecnica che permette di separare gli analiti in tubi capillari dal diametro interno estremamente ridotto (20-100µm), che garantiscono una efficace dispersione del calore riducendo così lo slargamento delle bande con un conseguente aumento della selettività. Non è necessario l'utilizzo di un supporto stabilizzante all'interno del capillare per cui l'elettroforesi può essere eseguita direttamente in fase libera. Le separazioni vengono condotte solitamente in capillari di lunghezza compresa tra 30 e 80 cm con voltaggi compresi tra 10 e 30 kV. Considerando il diametro estremamente ridotto dei capillari, il volume di tampone necessario per la separazione è di pochi microlitri (0,5-5 µL). Il caricamento del campione (5-30 nL) avviene ad una estremità del capillare per pressione o per voltaggio. Si applica quindi una 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 elettroosmotico (EOF). 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. L'origine dell' EOF è invece in stretta dipendenza con la composizione chimica del materiale utilizzato per produrre il capillare, generalmente silice fusa rivestita esternamente con uno strato di un polimero, solitamente di polimide. La detection avviene grazie ad una fessura nel rivestimento del capillare in cui passa il raggio del detector. Tra i metodi di rivelazione maggiormente utilizzati in CE vi è sicuramente la misura di assorbanza in UV/Visibile, si hanno però anche rivelatori di fluorescenza, amperometrici o spettrometria di massa. Grazie ai bassi costi di esecuzione, coniugati ad un notevole sensibilità, selettività e rapidità di analisi, in questi ultimi anni la CE ha trovato ampia applicazione in ambito clinico per la determinazione ad esempio delle sieroproteine o nell'analisi di composti a basso peso molecolare come creatinina, acido urico, acido ascorbico ed aminoacidi.

### EVOLUZIONE DELLA CROMATOGRAFIA LIQUIDA: DALL'HPLC ALL'UPLC

S. Sotgia

*Facoltà di Farmacia, Università di Sassari*

Sebbene la sua diffusione come tecnica analitica di largo impiego sia relativamente recente, intorno agli anni '40, l'importanza della cromatografia, nelle sue diverse emanazioni, è oggi un dato di fatto. È, infatti, improbabile che in un laboratorio, sia esso di chimica organica, industriale, clinica o di ricerca, non si ricorra alla tecnica cromatografica. In particolare, la gascromatografia (GC) con la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) costituiscono le due metodologie cromatografiche regine, benché altre tecniche quali la cromatografia su strato sottile (TLC) o la cromatografia liquida su colonna classica nella sua variante "flash", trovino, tuttora, largo impiego nei laboratori di sintesi. Per quanto riguarda l'HPLC, oltre ad aver dovuto in questi anni resistere agli assalti di altre tecnologie analitiche quale, per esempio, l'elettroforesi capillare, è stata anche la tecnica che maggiormente si è evoluta da punto di vista dei materiali di impaccamento delle colonne. Si è passati, infatti, gradualmente da resine con granulometria pari a 10 µm, negli anni '70, a granulometrie dell'ordine dei 3,5 µm, negli anni '90, fino a 2,5 µm nei primi anni del 2000. L'efficienza della separazione cromatografica è cresciuta, entro certi limiti di velocità di flusso della fase mobile, di pari passo con la diminuzione del diametro delle particelle segnando tuttavia un vero e proprio salto in avanti nel 2004, grazie all'introduzione di resine con particelle di diametro pari a 1,7 µm. Con questo tipo di particelle, infatti, l'efficienza della separazione, espressa come altezza equivalente del piatto teorico (HETP), non diminuisce al crescere del flusso della fase mobile, ma rimane costante in un ampio range compreso tra 2,6 e 6 mm/s. Questo ha permesso di ottenere separazioni cromatografiche molto veloci attraverso l'utilizzo di colonne di piccole dimensioni e/o con velocità di flusso alte. Numericamente, l'efficienza ottenuta con questo tipo di particelle è cresciuta di circa 3 volte rispetto a quelle da 3,5 e 5 µm mentre il guadagno in termini di risoluzione è aumentato di circa il 70% rispetto alle particelle da 5 µm e del 40% rispetto a quelle da 3,5 µm. La velocità di analisi si è anch'essa notevolmente ridotta attraverso una diminuzione di circa 3 volte la lunghezza delle colonne che, a parità di risoluzione rispetto ad una colonna impaccata con particelle da 5 µm, hanno permesso di diminuire i tempi di analisi di circa 9 volte. In altre parole, si è passati da un tipo di separazione ad alta efficienza ad una separazione, cosiddetta, ad ultra efficienza. Per le loro caratteristiche altamente innovative, i sistemi cromatografici ad ultra prestazioni (UPLC) rappresentano una importante evoluzione nell'ambito della cromatografia liquida.

**CONGELAMENTO - SCONGELAMENTO DEI LIQUIDI BIOLOGICI E GRADIENTE DI CONCENTRAZIONE PROTEICA**

M. Falcone<sup>1</sup>, S. Petti<sup>1</sup>, M. Angiolilli<sup>1</sup>, M.A. Prencipe<sup>1</sup>, F. Simone<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Azienda Ospedaliero-Universitaria OO.RR. di Foggia 1° Laboratorio Analisi Cliniche, Foggia

Cinque campioni di siero con piccole Componenti Monoclonali (CM) sono stati congelati in provette da 3 ml, scongelate dopo 3 giorni. Il siero non miscelato è stato diviso in due aliquote, una ricavata dalla parte superiore della provetta ed un'altra dal fondo. La prima parte è stata denominata siero diluito (D), la seconda siero concentrato (C). Su queste provette sono stati eseguiti l'elettroforesi proteica, il dosaggio di albumina e proteine totali. Si riportano gli integrali del tracciato elettroforetico ed i rapporti di uno dei campioni, come esempio di dati dei campioni concentrato (C) e diluito (D). Alb C 1.081, D 0.836, R 1.29;  $\alpha$ 1 C 0.087, D 0.057, R 1.53;  $\alpha$ 2 C 0.238, D 0.163, R 1.46;  $\beta$ 1 C 0.187, D 0.134, R 1.40;  $\beta$ 2 C 0.069, D 0.061, R 1.13;  $\gamma$  C 0.295, D 0.190, R 1.55; Tot. Integrale C 1.957, D 1.442, R 1.36; CM C 0.098, D 0.072, R 1.36; Prot. Tot. g/dl C 8, D 6.1, R 1.31; Alb C 4.5, D 3.4, R 1.32. Il rapporto indica che le varie frazioni hanno subito una concentrazione che raggiunge anche 1,5 volte. L'elettroforesi è stata eseguita in gel d'agarosio (Medical Systems / Alfa-Wassermann), i dosaggi di albumina e proteine totali con apparecchiature Beckman / Synchron 20). Tutti i campioni hanno avuto lo stesso comportamento di crioconcentrazione in proteine verso il fondo della provetta. Anche su urine positive alla BJ l' R C/D ha dato valori intorno a 1.5. Si osserva tale fenomeno anche su diluizione di siero 1/61 in fisiologica. Conclusioni: questi dati dimostrano che durante lo scongelamento di soluzioni proteiche si determina un gradiente di concentrazione crescente che va dall'alto verso il basso. Ciò succede per tutte le frazioni come dimostra l'elettroforesi. Scopo: questi dati mostrano che lo scongelamento determina un gradiente di concentrazione e tutte le proteine subiscono tale fenomeno. Considerazioni conclusive: Questa osservazione può essere foriera di sviluppi e nell'evitare di lavorare su sieri che subiscono crioconcentrazione e/o nel favorirla per aumentare la sensibilità di metodi analitici che ricercano proteine.

**Bibliografia**

Immunologia, Immunoematologia E Terapia Trasfusionale. F.A. Zanolli (C. E. Ambrosiana, 1996).

**ARE ANTIOXIDANTS REALLY VASCULO-PROTECTIVE AND ANTI-AGING MOLECULES?**

A.M. Posadino<sup>1</sup>, V. Pasciu<sup>1</sup>, A. Cossu<sup>1</sup>, B. Sanna<sup>1</sup>, B. Tadolini<sup>1</sup>, L. Gaspa<sup>1</sup>, M. Fois<sup>1</sup>, A. Marchisio<sup>1</sup>, G. Pintus<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Biomedical Sciences, National Institute of Biostructures and Biosystems, University of Sassari, Sassari, Italy

Accumulating evidences indicate age-associated alterations in vascular structure and function as major risk factors for cardiovascular diseases. This structural and functional disturbance of the blood vessels appears tightly associated with the increased vascular oxidative stress accompanying the aging process. High intake of natural antioxidants (NA) from plant-derived foods and beverages is thought to provide cardiovascular benefit and hence anti-aging effects. The endothelium plays a pivotal role in cardiovascular homeostasis and for this reason the molecular events resulting from NA actions on endothelial cells (ECs) are actively investigated. Here we show the direct impact of two NA, coumaric acid and resveratrol, on intracellular reactive oxygen species (ROS) generation and cell physiology in human ECs. While at lower doses both NA promoted antioxidant effects, at moderately high doses NA elicited a dose-dependent pro-oxidant effect, which was followed by apoptosis, cell damage and phospho-Akt (p-Akt) down-regulation. Treatment of ECs with the mitochondrial permeability transition pore (MPTP) inhibitor cyclosporine A (CsA), completely prevented oxidative cell damage strongly indicating mitochondrial involvement in NA-induced ECs impairment. NA-induced pro-oxidant effects were counteracted by sulfaphenazole (SPZ), suggesting a role for Cytochrome P450 (CYP) 2C9 in NA-induced toxicity. SPZ also prevented NA-induced p-Akt down-regulation and mitochondrial membrane potential (MMP) impairment indicating that Akt can work downstream of CYP2C9 in mediating cellular responses to NA. Stimulation of p-Akt by insulin, dramatically counteracted NA-induced MMP impairment and cell death, an effect abolished by the Akt inhibitor wortmannin further suggesting that mechanistically Akt regulates cell survival in response to NA-induced stress. Our study is the first to show in a human vascular model that moderately high-doses of NA can induce mitochondrial-dependent cell damage mediated by CYP2C9- and the Akt pathway. We believe the present results are of particular importance in light of the popularity of antioxidant rich diets and therapeutic approaches aimed at reducing cardiovascular risk.

\*Work supported by MIUR and Banco di Sardegna Foundation.

**PRUNE MELANOIDINS PROTECT HUMAN ENDOTHELIAL CELLS AGAINST OXIDATIVE STRESS AND CELL DAMAGE**

A. Cossu<sup>1</sup>, A.M. Posadino<sup>1</sup>, A. Piga<sup>1</sup>, M.A. Madrau<sup>1</sup>, V. Pasciu<sup>1</sup>, A. Zinellu<sup>1</sup>, C. Carru<sup>1</sup>, L. Gaspa<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>1</sup>, B. Tadolini<sup>1</sup>, G. Pintus<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Biomedical Sciences, National Institute of Biostructures and Biosystems, University of Sassari, Sassari, Italy

Inverse associations between fruit and vegetable intake and age-related diseases, such as different types of cancer and cardiovascular diseases, have been demonstrated in several epidemiological studies. The health-promoting effects of diet rich in fruit and vegetable seems mainly due to plant-contained antioxidants, which would delay the aging process by counteracting oxidative stress. Food industry uses thermal processes to sterilize foodstuff and to increase the times of conservation. Thermal sugar degradation during these processes form high molecular weight polymers called melanoidins. Melanoidins are widely distributed in processed foodstuffs and could exert different functional properties including antioxidant, antihypertensive and antimicrobial. The endothelium plays a pivotal role in vascular homeostasis and perturbation of such homeostasis by age-associated oxidative stress is the trigger for the development of vascular pathologies. This work has been undertaken with the intent to investigate whether prunes melanoidins may modulate intracellular ROS generation and counteract oxidative cell damage in a human model of endothelial cells (EC). Melanoidins were extracted from prunes and characterized by browning index at 420 nm. Accordly with a previously study using coffee melanoidins on human epatoma cells, a range of doses between 6 and 25 µg/ml was tested on the EC line ECV304. Melanoidins fractions were able to dose dependently inhibit intracellular ROS generations eliciting a parallel increase in cell vitality. The observed decrease in ROS production was associated to a marked increase in reduced GSH (rGSH) and was followed by a significant up-regulation of ERK1/2 phosphorylation. Exposition of cells culture to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dramatically affected cell vitality and significantly enhanced LDH release in the culture media. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced deleterious effects were associated to ERK1/2 inhibition and rGSH down-regulation. Pre-treatment of cell culture with melanoidins significantly abolished H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress and cell damage. In summary, our results support previous data on the antioxidant effect of melanoidins and extend the protective effect reported for other dietary compounds to food melanoidins contained in prunes.

\*Work supported by MIUR and Banco di Sardegna Foundation.

**INDAGINE SULLE MODALITÀ DI PRELIEVO DI SANGUE VENOSO**

M. Falcone<sup>1</sup>, R.R. Chiorazzi<sup>1</sup>, S. Petti<sup>1</sup>, M. Angiolilli<sup>1</sup>, V. Lisi<sup>1</sup>, A. Ciampella<sup>1</sup>, M.A. Prencipe<sup>1</sup>, F. Simone<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Azienda Ospedaliero Universitaria OO.RR. di Foggia 1° laboratorio Analisi Cliniche

RIMEL /IJLAM 2006, suppl. 2 riporta come la variabilità preanalitica sia tra 46% e 68.2%, comprendente: insufficienza del campione, errata identificazione, non corretto prelievo, non adeguate condizioni cliniche del paziente, trasporto non appropriato. Presso l'Az. Osped. – Univer. OO.RR. di Foggia è stata condotta dal 1° Laboratorio Analisi Cliniche un sondaggio sulle modalità di raccolta del sangue per scopi analitici. E' stato distribuito agli infermieri un questionario con 20 domande che indagavano sulle attenzioni da porre nell'effettuare un prelievo di sangue venoso. Scopo dell'indagine è documentare la variabilità che ha il personale nell'effettuare un prelievo. Ciò si ripercuote sulla accuratezza dei dati finali di laboratorio. Hanno risposto più di 100 infermieri, con età <35 anni il 30%, tra 30 e 50 il 52% e >52 il 17%, il 62.6% è di sesso femminile. Tutti avevano oltre 12 anni di servizio e lavorano presso 10 reparti del nosocomio foggiano. Il sistema utilizzato per il prelievo è il Vacutainer per il 43,3% ed il butterfly per il 26%, la rimanente percentuale utilizza aghi cannula, siringa, port-a-cath, CVC. Il 65% applica istruzione scritte, il 36% rilascia il laccio quando inizia ad uscire il sangue, solo il 28% non fa aprire e chiedere il pugno (pompare) durante il prelievo. Il 68% rimuove l'aria dal tubo del butterfly, il 57% elimina i 5ml dall'ago cannula collegato ad una flebo. Chi effettua prelievi con siringa per il 41% non aspira con forza. L'83% sceglie un braccio non con ematomi. Riempie completamente le provette di VES e Coagulazione l'86%. Solo il 41% è attento alla sequenza di provette da riempire. Il 60% non miscela energicamente le provette. Si sono riportate le percentuali dei corretti comportamenti, il rimanente a 100 indica la reale variabilità che si traduce in un prelievo non di qualità che può alterare il campione e non essere più rappresentativo della situazione omeostatica in vivo. Un caso particolare: presso il servizio TAO si effettuano i prelievi con il butterfly, non si rimuove l'aria dal tubo di raccordo, quindi tutte le provette di coagulazione contengono circa 1.5ml di sangue in meno.

Bibliografia

Lippi G. et al. Raccomandazioni per il prelievo di sangue venoso, *Biochim Clin* 2008;32.

**PURINE METABOLITE IN FIBROMYALGIA PATIENTS**

V. Ruggiero<sup>1</sup>, A. Fais<sup>2</sup>, E. Cacace<sup>1</sup>, M. Corda<sup>2</sup>, L. Uras<sup>1</sup>, B. Era<sup>2</sup>, S. Porcu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Azienda Mista Ospedaliero Universitaria

<sup>2</sup>Dip. di Scienze Applicate ai Biosistemi, Università di Cagliari

Fibromyalgia (FM) is a syndrome characterized by chronic, diffuse musculoskeletal pain and by low pain threshold at specific anatomical points called "tender points". The etiology of FM is still unknown; many hypothesis have been proposed as a genetic predisposition, neurohormonal deregulation, viral infections, psychiatric disorder, etc.

Numerous other conditions may overlap with FM; among these myofascial pain syndrome and chronic fatigue syndrome. Some authors reported that fibromyalgia could include dysfunction of purine nucleotide metabolism and nociception (1). Some disorders of purine nucleotide metabolism as myoadenylate deaminase (MAD) deficiency reported symptoms similar of those of FM as muscle cramps, exercise intolerance, fatigue, stiffness, and pain after exercise.

Aim of the study. In light of these evidences and in order to verify the possible presence of purine metabolism abnormalities we have analyzed some purine metabolites amount in serum samples from fibromyalgia patients.

Moreover, we have investigated their relationship with the severity of the disease and the associated clinical distress. Material and Methods. 18 females (aged 29-53) affected by primary fibromyalgia and 15 control females age matched were examined. In all subjects have been evaluated the APA-antipolymer IgG antibodies (ELISA), adenosine, inosine, ipoxantine, xantine, guanosine, uric acid (RP-HPLC). All patients were interviewed using the Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ).

Statistical analysis was performed using commercially available statistical software (STATISTICA 6.0 Stat. Soft Inc. USA) and a p value < 0.05 was considered as significant.

Results and Discussion. In FM patients mean levels of inosine (8.63+6.15µmol/l) were higher than in controls (6,90+4.15µmol/l). Levels of ipoxantine (10.70+8.12µmol/l) and xantine (3.20+1.89µmol/l) were slightly increased respect to controls (ipoxantine 9,30+5.43µmol/l, xantine 2.83+1.85 µmol/l). A correlation between number of tender points and inosine levels has also been found.

Our preliminary results seems to indicate an involvement of catabolism of inosine in patients affected by fibromyalgia.

Reference

1. Staines DR. Is fibromyalgia an autoimmune disorder of endogenous vasoactive neuropeptides? Medical Hypotheses 2004;62:665-9.

**VARIANTI POLIMORFICHE DEL GENE BDNF NEL SUICIDIO: UNO STUDIO DI 512 CASI**

F. Zarrilli<sup>1</sup>, S. Keller<sup>2</sup>, S. Sacchetti<sup>2</sup>, V. Borrelli<sup>2</sup>, V. Carli<sup>3</sup>, A. Videtic<sup>4</sup>, L. Chiariotti<sup>5</sup>, M. Sarchiapone<sup>3</sup>, G. Castaldo<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Facoltà di Scienze MFN, Università del Molise, Isernia, Italy

<sup>2</sup>CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Naples, Italy

<sup>3</sup>Dip. di Scienze per la Salute, Università del Molise, Campobasso, Italy

<sup>4</sup>PINT Dept., UP University, Slovenia

<sup>5</sup>a) CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Naples, Italy; b) Dip. di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare, Università Federico II, Naples, Italy

<sup>6</sup>a) CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Naples, Italy; b) Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università Federico II, Naples, Italy

La condotta suicidaria è tra le prime tre cause di morte nel mondo e determina più di un milione di decessi ogni anno. Studi familiari hanno evidenziato come i fattori genetici possano svolgere un importante ruolo nella predisposizione al comportamento suicida e molti dei geni espressi nel sistema nervoso centrale sono potenziali candidati. Tra questi abbiamo studiato il gene che codifica per BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), una neurotrofina coinvolta nella crescita, nel differenziamento, nella sopravvivenza e nella plasticità neuronale. Una ridotta espressione di BDNF era stata dimostrata nel tessuto cerebrale di soggetti suicidi (Dwivedi, 2005) suggerendo un possibile ruolo nella fisiopatologia del suicidio. In questo studio abbiamo analizzato le varianti polimorfiche Val66Met (A196G) e -281 C/A del gene BDNF in una popolazione caucasica di 262 suicidi e 250 controlli su DNA estratto da campioni autoptici di tessuto cerebrale dell'area di Wernicke utilizzando la PCR seguita da analisi in RFLP. Le frequenze genotipiche GG, GA e AA (Val66Met) nella popolazione totale erano 61.5%, 34.4% e 4.1% rispettivamente e non si evidenziava nessuna differenza statisticamente significativa tra casi e controlli ( $\chi^2 = .318$ ,  $p = .853$ ). Le frequenze alleliche erano 79% (G) e 21% (A) nel campione totale in accordo con quelle riportate in altri studi per la popolazione caucasica. Per il polimorfismo -281C/A, la frequenza dell'allele raro A era < 5% come riportato in letteratura per la popolazione caucasica. Il presente studio esclude un'associazione significativa tra le varianti polimorfiche analizzate ed il suicidio. Le differenze nell'espressione del BDNF riportate nei tessuti cerebrali di soggetti suicidi potrebbero essere collegate ad altri polimorfismi o ad altri fattori. La metilazione del DNA rappresenta il più comune meccanismo epigenetico di regolazione genomica nei mammiferi. Attualmente il nostro gruppo si sta occupando della misurazione del grado di metilazione delle isole CpG nelle regioni del promotore del gene BDNF mediante la tecnica del Pyrosequencing. Risultati preliminari hanno evidenziato una stretta correlazione tra livelli di metilazione di BDNF e livelli di mRNA.

Il lavoro è stato svolto con i contributi della Regione Campania (DGRC 2362/07) e del MiUR (PS 35-126/Ind).

### ASYMMETRIC DIMETHYLARGININE (ADMA) PLASMATIC ACCUMULATION IN PATIENTS WITH ANKYLOSING SPONDYLITIS

G.L. Erre<sup>1</sup>, P. Sanna<sup>2</sup>, A. Zinellu<sup>3</sup>, A. Ponchiotti<sup>1</sup>, P. Fenu<sup>1</sup>, M. Piras<sup>1</sup>, S. Sotgia<sup>3</sup>, C. Carru<sup>3</sup>, A. Ganau<sup>2</sup>, G. Passiu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Chair of Rheumatology, University of Sassari

<sup>2</sup>Chair of Cardiology, University of Sassari

<sup>3</sup>Dept. of Biomedical Sciences, University of Sassari

Ankylosing spondylitis (AS) patients experience a reduced life expectancy mainly due to increased atherosclerotic-related cardiovascular morbidity and mortality. Many lines of independent research have pointed out the role of asymmetric dimethylarginine (ADMA), an endogenous inhibitor of nitric oxide, in promoting endothelial dysfunction and atherosclerotic process. We performed a cross-sectional study to evaluate whether plasmatic ADMA levels in AS patients are elevated respect to general population regardless of traditional cardiovascular factors. Seventeen consecutive AS patients (10 males, 7 females,  $39 \pm 11$  yrs of age,  $114 \pm 108$  months of mean disease duration), classified according to the New York criteria, free of any cardiovascular disease, and atherosclerotic risk factors were recruited. In patients and controls vascular status was assessed as follows: a) common carotid intima media thickness (IMT) by high-resolution ultrasonography; b) flow-mediated dilation (FMD) and nitrate-mediated dilatation (NMD) by Power-Doppler of brachial artery; c) central arterial stiffness (aortic augmentation pressure [aAP] and aortic augmentation index [aAix@75]) by pulse wave analysis of applanated radial artery. Plasmatic ADMA levels were assessed by capillary electrophoresis. IMT appeared to be not significantly different in cases respect to controls (see table). Although a difference between AS and controls was noticed in aAix@75, FMD and NMD this did not reach a statistical significance. Conversely in AS patients levels of ADMA appeared significantly ( $p = 0.001$ ) higher than in the control group. Bivariate analysis performed in the whole sample showed a significant association between ADMA levels and the presence of disease ( $r = 0.541$ ,  $p = 0.002$ ), the BMI ( $r = 0.387$ ,  $p = 0.024$ ) the female sex ( $r = 0.478$ ,  $p = 0.004$ ) and the ESR/CRP levels ( $r = 0.501$ ,  $p = 0.003$  and  $r = 0.387$ ,  $p = 0.032$  respectively). In a multiple regression prediction model BMI, female sex and the presence of AS explained at least a third of ADMA elevation ( $R = 0.787$ ,  $R^2 = 0.620$ ,  $AR^2 = 0.582$ ,  $\Delta R^2 = -0.031$ ,  $F = 16.318$ ,  $p = 0.000$ ). We suggest for the first-time that in AS plasmatic ADMA levels could be significantly raised respect to general population and may at least partially related to systemic inflammation.

### LA TERAPIA COMBINATA EZETIMIBE/SIMVASTATINA MIGLIORA I MARKERS DI DISFUNZIONE ENDOTELIALE IN PAZIENTI AFFETTI DA MALATTIA RENALE CRONICA

G. Loriga<sup>1</sup>, G. Farre<sup>1</sup>, B. Scanu<sup>2</sup>, M. Sanna<sup>2</sup>, E. Pisanu<sup>2</sup>, A. Satta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ist. di Patologia Speciale Medica, Azienda Ospedaliero Universitaria di Sassari

<sup>2</sup>Cattedra di Biochimica Clinica, Dipartimento di Scienze Biomediche, Universitaria di Sassari

Recenti studi hanno suggerito che il trattamento della dislipidemia è efficace nella riduzione della morbilità e mortalità cardiovascolare in pazienti affetti da malattia renale cronica, ma il ruolo dei farmaci ipolipemizzanti nella protezione vascolare non è ancora stato chiarito.

In tali pazienti il target terapeutico nella correzione della dislipidemia è difficile da raggiungere, nonostante dosi elevate di statina, e col rischio di effetti collaterali muscolari ed epatici. Trials clinici randomizzati hanno dimostrato che la terapia combinata con ezetimibe/simvastatina è più efficace, rispetto alla simvastatina da sola, nel raggiungimento del target lipidico, senza ulteriore peggioramento del profilo di rischio. Non è noto se tale effetto possa tradursi in una maggiore efficacia anti-aterogena e quindi in una protezione cardiovascolare a lungo termine.

Durante un periodo di osservazione di 12 mesi, abbiamo valutato gli effetti della terapia combinata ezetimibe/simvastatina (10/20 o 10/40 mg/die) sul profilo lipidico (colesterolo totale, LDL e HDL, e trigliceridi), su markers di disfunzione endoteliale (asymmetrical dimethylarginine, ADMA) e su parametri di funzione renale in dieci pazienti affetti da nefropatia cronica.

La terapia con ezetimibe/simvastatina ha determinato una riduzione del 38.7% del colesterolo totale, del 56% del LDL-C, del 17.4% dei trigliceridi, e una importante riduzione del rapporto LDL/HDL ( $3.45 \pm 1.6$  vs  $1.41 \pm 0.5$ ,  $p=0.001$ ), con un aumento del HDL-C del 5%. Parallelamente, i livelli di ADMA si sono mostrati significativamente ridotti ( $0.71 \pm 0.12$  vs  $0.63 \pm 0.08$  micromol/L,  $p=0.015$ ), e tale riduzione era strettamente correlata alla variazione percentuale del colesterolo totale ( $r=0.67$ ,  $p=0.033$ ), LDL ( $r=0.75$ ,  $p=0.013$ ) e del rapporto LDL/HDL ( $r=0.73$ ,  $p=0.016$ ). I parametri renali non hanno mostrato modificazioni rispetto al basale.

La terapia combinata con ezetimibe/simvastatina è una terapia valida e sicura in pazienti con nefropatia cronica, efficace nel raggiungimento del target lipidico. I nostri dati suggeriscono inoltre che il miglioramento del profilo lipidico e la riduzione dei markers di disfunzione endoteliale, potrebbe tradursi in un miglioramento del danno vascolare e potenzialmente in una protezione cardiovascolare a lungo termine.

**IDENTIFICAZIONE E QUANTIFICAZIONE IN LIQUIDI BIOLOGICI DI PEPTIDI OPIOIDI ALIMENTARI CON ATTIVITÀ MODULATRICE SUL SISTEMA ENDOCRINO**

E. Azara<sup>1</sup>, A. Delitala<sup>2</sup>, G. Fanciulli<sup>2</sup>, A. Usai<sup>2</sup>, G. Delitala<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ist. di Chimica Biomolecolare, CNR, Sezione di Sassari

<sup>2</sup>Ist. di Clinica Medica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Sassari

Le Gluten Exorphins appartengono ad una classe di peptidi di origine alimentare identificata nei primi anni 90 in digesti enzimatici di glutine. In modelli animali, la Gluten Exorphin A5 (GE-A5, Gly-Tyr-Tyr-Pro-Thr) stimola la secrezione di insulina, mentre la Gluten Exorphin B5 (GE-B5, Tyr-Gly-Gly-Trp-Leu) determina un incremento dei livelli ematici prolattina. Non è noto se tali peptidi esercitino azioni sul sistema endocrino nell'uomo. Il nostro gruppo di ricerca ha sviluppato e validato due metodiche in grado di quantificare la GE-A5 e la GE-B5 in liquido cefalorachidiano (CSF). Il dosaggio della GE-A5 è stato effettuato con un sistema di cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa (LC-MS). Per la separazione dell'analita dalla matrice biologica (5 µL di CSF) è stata utilizzata una colonna C18 (150 x 4.6 3µ). La fase mobile è costituita da Eluente A: acqua con 0.6% acido acetico ed Eluente B: acetonitrile/metanolo (75:25, v/v) ad un flusso di 0.4 mL/min. Il limite inferiore di rilevabilità (LLOD) ed limite inferiore di quantificazione (LLOQ) per la GE-A5 sono stati calcolati a 0.6 e a 1.50 ng/mL. La determinazione analitica della GE-B5 è stata effettuata in LC-MS con una colonna C12 (150 x 2.1 4µ), iniettando aliquote di 10 µL di CSF. La fase mobile è costituita da Eluente A: acqua con 0.01% acido acetico ed Eluente B: acetonitrile ad un flusso di 0.25 mL/min. Gli LLOD ed LLOQ per la GE-B5 sono stati calcolati a 0.30 e a 0.78 ng/mL.

Recentemente, la GE-B5 e la sua frazione GE-B4 (Tyr-Gly-Gly-Trp) sono state identificate dal nostro gruppo. Tale studio, che si è avvalso di una metodica di LC-MS/MS, ha rilevato la presenza nel sangue umano di questi due peptidi in modelli sperimentali con incrementata permeabilità intestinale (malattia celiaca). Poiché tale studio presenta aspetti qualitativi ma non quantitativi, le concentrazioni della GE-B5 nel sangue umano sono pertanto sconosciute. Esperimenti preliminari sembrano tuttavia indicare che la quantificazione delle Gluten Exorphins nei liquidi biologici rappresentano un tassello per comprendere la cinetica di tale sostanze, le loro concentrazioni in condizioni fisiologiche e patologiche e il loro eventuale ruolo biologico.

**APPLICAZIONE DI METODOLOGIE BIOLOGICO-MOLECOLARI NELLA DEFINIZIONE DI BERSAGLI TERAPEUTICI PER IL CARCINOMA DEL COLON**

M. De Miglio<sup>1</sup>, A. Mura<sup>2</sup>, M. Uras<sup>2</sup>, M. Contini<sup>2</sup>, P. Cossu Rocca<sup>2</sup>, S. Mulas<sup>3</sup>, S. Ena<sup>3</sup>, S. Sotgia<sup>3</sup>, C. Carru<sup>3</sup>, G. Massarelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Patologia Generale, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari

<sup>2</sup>Ist. di Anatomia Patologica, Università di Sassari

<sup>3</sup>Cattedra di Biochimica Clinica, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari

Il Carcinoma Colo-Rettale (CRC) è considerato una delle principali emergenze sanitarie al mondo, ponendosi al terzo posto tra i tumori più comuni in termini di incidenza ed al secondo per mortalità. Il trattamento con anticorpi monoclonali contro il recettore per il fattore di crescita epidermico (EGFR), migliora la sopravvivenza libera da malattia e la qualità di vita dei pazienti con cancro del colon-retto che non hanno risposto alla chemioterapia. Poiché non esiste alcuna correlazione tra espressione di EGFR e la risposta a tali farmaci, si è andati alla ricerca di fattori genetici potenzialmente correlati con la risposta a questi farmaci ed ai meccanismi di resistenza. Uno di questi è stato recentemente identificato nello stato mutazionale del gene K-RAS, a livello degli esoni 2 e 3. Scopo del nostro studio è la valutazione dello stato mutazionale di K-RAS con metodologie biologico-molecolari su campioni neoplastici fissati in formalina ed inclusi in paraffina. Le metodologie utilizzate sono state il sequenziamento diretto del DNA ed un saggio commerciale basato su tecniche di amplificazione/ibridazione inversa. Sono stati studiati 20 casi di CRC in stadio avanzato (T4, M0; T3, M1) mediante dissezione manuale del tessuto neoplastico per garantire la presenza di almeno il 70% di cellule tumorali, al fine di evitare falsi negativi. Le due tecniche sono state messe a confronto allo scopo di valutare sensibilità e specificità relative. Le analisi hanno evidenziato la presenza di specifiche mutazioni a carico dell'esone 2 (codone 12-13) in 10 casi su 20 analizzati mediante sequenziamento diretto; in 9 casi su 20 analizzati con il kit commerciale. Abbiamo inoltre verificato l'assenza di correlazione con l'espressione immunofenotipica di EGFR. I risultati ottenuti hanno mostrato una maggiore sensibilità del sequenziamento rispetto al saggio commerciale; peraltro, la metodica convenzionale appare più vantaggiosa in termini economici. I vantaggi del kit commerciale consistono in una più semplice esecuzione ed applicabilità anche in laboratori privi di specifiche apparecchiature. L'esecuzione di queste metodologie costituisce un'ulteriore campo di applicazione della biologia molecolare, in particolare nella definizione di indicatori molecolari di risposta al trattamento.

### VARIANTI PROTROMBOTICHE IN PAZIENTI CON SINDROME CORONARICA ACUTA AD ESORDIO GIOVANILE E NON GIOVANILE

S. Quaranta<sup>1</sup>, P. Di Micco<sup>2</sup>, R. di Fiore<sup>3</sup>, V. Borrelli<sup>1</sup>, C. Bellia<sup>4</sup>, G. Castaldo<sup>3</sup>, M. Ciaccio<sup>4</sup>

<sup>1</sup>CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Naples, Italy

<sup>2</sup>Osp. Fatebenefratelli, Naples, Italy

<sup>3</sup>a) CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Naples, Italy; b) Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli Federico II, Naples, Italy

<sup>4</sup>Cattedra di Biochimica Clinica, Università di Palermo, Palermo, Italy

L'ipercoagulabilità nelle patologie coronariche è stata oggetto di numerosi studi negli ultimi decenni, tuttavia, studi sull'associazione tra fattori genetici protrombotici e insorgenza precoce di sindromi coronariche acute (< 50 aa) sono carenti in letteratura e i risultati sono contrastanti. Abbiamo studiato 232 pazienti affetti da sindrome coronarica acuta, 132 ad esordio giovanile (<50 anni) e 100 ad esordio non giovanile, diagnosticata secondo le linee guida dell'ACCP/AHA e, in confronto, 384 soggetti della popolazione generale. Le varianti geniche analizzate (mediante real time PCR) sono state: Leiden ed HR2 del fattore V; G20210A della protrombina; C677T e A1298C dell'MTHFR; 4G/5G del PAI-1; Val34Leu del fattore XIII; A455G del beta fibrinogeno. I principali risultati dello studio sono: 1) la variante genica C677T della MTHFR e la variante V34L del fattore XIII sono significativamente più frequenti nei pazienti affetti da sindrome coronarica acuta ad esordio non giovanile rispetto alle forme giovanili e ai controlli; 2) la variante HR2 del fattore V è presente con frequenza significativamente più elevata nei pazienti affetti da sindrome coronarica acuta ad esordio giovanile rispetto alle sindromi coronariche ad esordio non giovanile ( $p < 0.01$ ) e rispetto alla popolazione generale di controllo ( $p = 0.05$ ); 3) nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata tra le frequenze delle altre varianti geniche nei diversi gruppi analizzati.

Da questi dati emerge che anche le sindromi coronariche acute sarebbero correlate ai fattori di rischio protrombotico (in genere associati a fenomeni trombotici venosi)<sup>1</sup>. Tuttavia i meccanismi sembrano differenti tra le forme giovanili e non giovanili: nel primo caso il fattore di rischio è rappresentato da mutazioni del fattore V che sono causa di parziale resistenza alla APC; le forme non giovanili sono correlate all'aumento di omocisteina che agirebbe da trigger vascolare "cronico".

#### Bibliografia

1. Lowe Gordon D.O. Common risk factors for both arterial and venous thrombosis. *Br J Haematol* 2008 Mar;140(5):488-95.

Il lavoro è stato svolto con i contributi della Regione Campania (DGRC 2362/07) e del MiUR (PS 35-126/Ind).

### VARIANTI GENICHE DELLA MBL: UN VANTAGGIO O UN FRENO ALL'INVECCHIAMENTO DI SUCCESSO?

R. Tomaiuolo<sup>1</sup>, G. Castaldo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>a) CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Naples, Italy; b) Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università Federico II, Naples, Italy

La lectina legante il mannosio (MBL2) è una proteina secreta del fegato che va incontro ad un diverso grado di polimerizzazione nel siero (da dimeri ad esameri). I polimeri interagiscono con la superficie dei batteri favorendo la risposta immunitaria mediante: a) attivazione del complemento attraverso la via MBL-MASP; b) promozione dell'opsonofagocitosi; c) attivazione dell'IL8. Tre mutazioni nell'esone 1 del gene MBL (R52C, G54D e G57E) riducono la polimerizzazione della proteina e l'interazione con la superficie batterica; altre 3 mutazioni nel promotore (-550G>C; -221G>C; +4C>T) ne riducono i livelli di espressione.

La ridotta attività funzionale di MBL è stata associata a numerose patologie: infezioni batteriche recidivanti, particolarmente in età pediatrica; nei pazienti con Fibrosi Cistica, il deficit di MBL agisce da "modulatore" negativo del fenotipo respiratorio ed epatico (1); inoltre, abbiamo descritto che una ridotta attività di MBL riduce la down-regolazione di IL1-beta ed è un fattore di rischio per il tumore gastrico in soggetti con infezioni da *H. pylori* (2). Tuttavia, le mutazioni del gene MBL2 sono molto diffuse nella popolazione generale: sono state riscontrate nel 65% dei casi in 550 soggetti del sud-Italia (2).

Recentemente, in una piccola popolazione "campione" di 50 soggetti ultracentenari del sud-Italia, abbiamo riscontrato una frequenza di mutazioni MBL molto più bassa rispetto a quella ottenuta nella popolazione generale (unpublished results), e quindi abbiamo ipotizzato che la buona funzionalità della proteina fosse un fattore favorevole all'invecchiamento. Per verificare quest'ipotesi, in collaborazione con il gruppo del Prof. Deiana (Università di Sassari) abbiamo promosso uno studio più ampio, volto a valutare la prevalenza delle mutazioni del gene MBL in ampie coorti di soggetti, afferenti alle stesse aree etnico-geografiche, di diverse fasce d'età avanzata (tra gli 80 e i 110 anni), rispetto a gruppi di controllo della popolazione generale.

#### Bibliografia

1. Tomaiuolo R, et al. *Digest Liver Dis* 2009 (in press)

2. Scudiero O, et al. *Clin Chem* 2006;52:1625-7.

Il lavoro è stato svolto con i contributi della Regione Campania (DGRC 2362/07) e del MiUR (PS 35-126/Ind).

### FREE AMINO ACIDS IN PLASMA AND SYNOVIAL FLUID OF SUBJECTS WITH OSTEOARTHRITIS

V. Ruggiero<sup>1</sup>, L. Uras<sup>1</sup>, E. Cacace<sup>1</sup>, A. Fais<sup>2</sup>, A. Denotti<sup>1</sup>, M. Corda<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Azienda Mista Ospedaliero Universitaria Cagliari

<sup>2</sup>Dip. di Scienze Applicate ai Biosistemi, Università di Cagliari

Osteoarthritis is a disease characterized by pain, inflammation and stiffness due to an involvement of articular cartilage, soft tissues and bone. The specific pathogenesis remains still undetermined but cartilage role is central.

Synovial fluid is formed through an ultrafiltration process of serum by synoviocytes.

Very few data are reported about plasma and synovial fluid aminoacids in osteoarthritic patients.

McNearney et Al. (1) demonstrated increased glutamate and aspartate concentrations in synovial fluid of patients with active arthritis suggesting a role of these aminoacids in the pathogenesis of arthritic conditions.

Aim of our study was to evaluate plasma and synovial fluid amino acids in patients with osteoarthritis of the knee.

Materials and Methods. 20 subjects (8 males and 12 females aged 52-75) affected by grade II osteoarthritis (according to Keller and Lawrence) were studied. From each subject have been obtained a serum sample and a synovial fluid sample. The concentration of free aminoacids (Histidine, Lysine, Threonine, Phenylalanine, Methionine, Tryptophan, Valine, Leucine, Isoleucine, Glutamic Acid, Asparagine, Aspartate, Glutamine, Glycine, Serine, Alanine, Proline, Hydroxyproline, Tyrosine, Ornithine, Cistine, Arginine) was determined by HPLC. Statistical analysis was performed with commercial available software (Statistica 6.0).

Results and discussion. According to other Authors in OA patients serum levels of glutamic acid and aspartate were above normal range. Free aminoacid concentrations in synovial fluid are slightly lower than in serum, except for glutamine, proline, hydroxyproline and cistine. A significant difference has been found between serum ( $253.87 \pm 113.75 \mu\text{M/L}$ ) and synovial fluid ( $129.23 \pm 5.38 \mu\text{M/L}$ ) of glutamic acid and between serum ( $78.34 \pm 20.33 \mu\text{M/L}$ ) and synovial fluid ( $35.72 \pm 17.81 \mu\text{M/L}$ ) of aspartate.

Our data seems to indicate higher levels of EAA (glutamic acid and aspartate) in serum than in synovial fluid of patients with OA. Further studies are in progress to evaluate the different behaviour of free aminoacids in serum and synovial fluid.

Reference

1. Mc Nearney T, Speegle D, Lawand N, Lisse J. and Westlund K:N: Excitatory amino acid profiles of synovial fluid from patients with arthritis J Rheumatol 2000 Mar;27(3):739-45.

### VALIDATION OF CentAK® IMMUNOASSAY (PANTEC) FOR MEASUREMENT OF SERUM ANTI-GAD65 ANTIBODIES IN PATIENTS WITH LATENT AUTOIMMUNE DIABETES OF ADULT

L. Puddu<sup>1</sup>, F. Tolu<sup>1</sup>, G.M. Pes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Diabetes and Metabolic Diseases Unit, AOU Sassari

<sup>2</sup>Diabetes and Metabolic Diseases Unit, AOU Sassari

<sup>3</sup>Dept. of Biomedical Sciences, University of Sassari, Sardinia

Aim/Objective. Type 1 diabetes (T1D) and latent autoimmune diabetes in adults (LADA) are characterized by the presence of markers of immune-mediated destruction of insulin-secreting cells such as anti-glutamic acid decarboxylase (anti-GAD<sub>65</sub>) autoantibodies. The gold standard for anti-GAD<sub>65</sub> antibodies measurement requires a <sup>35</sup>S-radiolabelled antigen. Recently several RIA or EIA commercial kits have been developed using <sup>125</sup>I-labelled instead of <sup>35</sup>S-labelled antigen. The CentAK® anti-GAD<sub>65</sub> kit, distributed in Italy by PANTEC, is a direct immunoassay using a highly purified human recombinant GAD<sub>65</sub> labelled with <sup>125</sup>I. Antibody titres are expressed as U/ml (1 U/ml=25U/ml of NIBSC 97/550 reference material). In this study we report the result of the comparison of CentAK® method with the <sup>35</sup>S reference method.

Methodology. The reference method makes use of GAD<sub>65</sub> labelled in vitro with <sup>35</sup>S-methionine and expressed in nuclease-treated rabbit reticulocyte lysate as described by Grubin et al. (1994). Labelled antibody-bound antigen is separated from free antigen after 45 minutes of incubation by means of Protein A-coated Sepharose microbeads (Sigma Aldrich). Radioactivity is counted in a Top Count NXT (Packard). With this method we have screened more than 4000 sera from patients with type 2 diabetes, identifying 207 GAD<sub>65</sub>-positive sera. All positive sera and a random sample of 252 GAD<sub>65</sub>-negative sera have been re-tested with the CentAK® anti-GAD<sub>65</sub> kit.

Results One hundred ninety eight sera were found positive with the CentAK® anti-GAD<sub>65</sub> assay out of 207 sera positive in the reference method (95.7% sensitivity). Two hundred fifty samples were negative out of 252 samples already negative in the reference method (99.2% specificity). Agreement between the two methods was rather high ( $r=0.634$ ;  $p<0.05$ ). The frequency of false positive and false negative was 1.0% and 3.4%, respectively.

Conclusion. The results of our study show a high sensitivity, specificity and diagnostic accuracy of CentAK® anti-GAD<sub>65</sub> assay, as well as a good quantitative correlation with the reference method. Moreover, due to its greater simplicity and rapidity, we consider the CentAK® anti-GAD<sub>65</sub> immunoassay a valuable tool for the accurate laboratory diagnosis of autoimmune diabetes.

**DETERMINAZIONE DEI LIVELLI DI CREATININA NEL SIERO UMANO MEDIANTE ELETTROFORESI CAPILLARE ZONALE AD INIEZIONE INVERSA**

A. Zinellu<sup>1</sup>, S. Sotgia<sup>1</sup>, M. Sanna<sup>1</sup>, E. Pisanu<sup>1</sup>, B. Scanu<sup>1</sup>, L. Murgia<sup>1</sup>, S. Pinna<sup>1</sup>, A. Marchisio<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>1</sup>, C. Carru<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari*

Questo lavoro descrive un metodo ultrarapido in elettroforesi capillare (CE) UV detection per misurare i livelli di creatinina nel siero. La creatinina è un prodotto di degradazione della creatina, ed essendo eliminata per via renale i suoi livelli nel siero forniscono un'importante indicazione dell'attività e della funzionalità renale. Comunemente la creatinina serica viene misurata con il dosaggio colorimetrico di Jaffé, anche se non mancano metodi in HPLC e GC. Questi metodi sono però spesso dispendiosi in termini di tempo e di costi, o risentono di interferenze che possono portare ad una alterazione dei risultati, per cui per ovviare a tali problemi abbiamo sviluppato un nuovo metodo rapido e semplice in CE-UV. Il campione viene trattato con un volume di TCA al 5% ed in seguito a centrifugazione il surnatante viene diluito quattro volte con acqua e quindi iniettato in CE. La separazione dei picchi viene effettuata su un capillare di lunghezza totale pari a 60,2 cm x 75 µm ID con un tampone sodio fosfato 40 mmol/L, pH 2,35. La modalità di iniezione inversa riduce i tempi di analisi a circa 1 minuto in quanto il campione viene iniettato all'outlet del capillare in prossimità della finestra di rilevamento, riducendo quindi la distanza di migrazione a soli 10,2 cm. La retta di calibrazione ( $y=0,255X-0,152$ ) mostra un andamento lineare nell'intero intervallo testato (2-200 µg/ml) con un coefficiente di regressione  $r^2=0,99$ . Il dosaggio mostra una buona riproducibilità del tempo di migrazione ( $CV% < 0,5%$ ) e dell'area del picco ( $CV% < 2,8$ ). La riproducibilità intra ed intersaggio risulta essere 3,06 e 6,26% rispettivamente ed il recupero è stato del 99,4%. Il limite di detection, valutato su una iniezione a pressione (0,5 psi x 3 sec) è di 0,5 µg/ml. Il metodo è stato validato attraverso la quantificazione della creatinina su 128 soggetti normali sia con la nuova metodica che con il metodo Jaffé e i dati ottenuti sono stati messi a confronto mediante test statistici quali Bland-Altman test e Passing Bablok regression. Il confronto statistico indica che i dati ottenuti con le due metodiche sono sovrapponibili.

**VALUTAZIONE DEI FATTORI PREANALITICI NELLA DETERMINAZIONE DI ACIDO ASCORBICO E ACIDO URICO NEL PLASMA UMANO**

A. Zinellu<sup>1</sup>, S. Sotgia<sup>1</sup>, M. Sanna<sup>1</sup>, E. Pisanu<sup>1</sup>, B. Scanu<sup>1</sup>, A. Baralla<sup>1</sup>, F. Lai<sup>1</sup>, R. Rossi<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>1</sup>, C. Carru<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dip. di Scienze Biomediche, Università di Sassari*

Questo lavoro descrive la messa a punto di una metodica in elettroforesi capillare UV detection (CE-UV) per la quantificazione dei livelli di acido ascorbico (AA) e acido urico (AU) nel plasma.

L'AA è una vitamina solubile in acqua, ampiamente distribuita nei liquidi biologici e con spiccate proprietà antiossidanti. L'AU è un prodotto del metabolismo delle purine anch'esso caratterizzato da una discreta capacità antiossidante. La determinazione degli urati riveste una certa importanza clinica non solo perchè rappresenta un marcatore della funzionalità renale ma anche perchè elevati livelli di AU sono associati a ipertensione e malattie vascolari. Per contro, deficit gravi di AA possono essere causa di scorbutto, e sono stati riscontrati in patologie come l'anemia falciforme. Poichè durante la preparazione del campione entrambi gli analiti mostrano una certa tendenza all'ossidazione sono stati valutati i fattori pre-analitici che influenzano la loro stabilità. In particolare la determinazione di AA ed AU deve preferibilmente essere effettuata aggiungendo al campione una soluzione contenente EDTA 10mmol/L e cisteina 1mmol/L (concentrazione finale) al fine di evitarne l'ossidazione. Inoltre l'eliminazione delle proteine mediante un volume di MPA al 5% w/v risulta essere la condizione più idonea per il completo recupero degli analiti.

La separazione di entrambi gli analiti viene effettuata in meno di 4 minuti su un capillare di lunghezza pari a 60,2 cm x 75 µm ID con tampone sodio borato 100mM pH 8. Queste condizioni permettono una buona riproducibilità intrasaggio ( $CV=4.2$  e  $3.9%$ ) e intersaggio ( $CV=6.8$  e  $5.8%$ ) per l'AA e l'AU rispettivamente. I limiti di detection risultano essere pari a 0.5 mg/L per l'AA (a 264nm) e 0.5mg/L per l'AU (a 292 nm).

Le determinazioni sono state effettuate su un totale di 32 campioni sia con il nuovo metodo che con un metodo di riferimento sempre in CE. I dati ottenuti sono stati messi a confronto con test statistici quali Bland-Altman test e Passing Bablok regression e risultano essere sovrapponibili.

Grazie alla rapidità e al basso costo delle analisi, il nostro metodo può essere un buon strumento per le determinazioni dell' AA e AU sia nella ricerca che nella sperimentazione clinica per monitorare lo stato di salute dei pazienti o l'efficacia della terapia vitaminica.

**RESTENOSI E LIVELLO DEI TIOLI PLASMATICI IN PAZIENTI CHE HANNO SUBITO ENDOARTERECTOMIA**

C. Carru<sup>1</sup>, A. Zinellu<sup>1</sup>, S. Sotgia<sup>1</sup>, R. Chessa<sup>1</sup>, F. Piredda<sup>2</sup>, M.A. Casu<sup>2</sup>, A. Marchisio<sup>1</sup>, F. Lai<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>1</sup>, P. Porcu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari*

<sup>2</sup>*Chirurgia Vascolare, Università di Sassari*

La restenosi è una complicanza che può presentarsi in seguito ad intervento di endoarterectomia della carotide (CEA) o ad altro tipo di manipolazione dell'arteria.

L'obiettivo del lavoro è stato quello di studiare l'associazione tra i livelli di omocisteina e cisteina plasmatici (due importanti fattori di rischio cardiovascolare) e la percentuale di restringimento della carotide in un gruppo di 68 pazienti che hanno subito un intervento di endoarterectomia della carotide. I tioli nel plasma sono stati misurati mediante elettroforesi capillare con detector laser (CE-LIF). La media dei valori ematologici studiati rientravano nei limiti della norma e il 25% dei pazienti erano iperomocisteinemici (Hcy > 15 µM). La correlazione di Pearson tra il grado di riduzione del lume della carotide e i più comuni fattori di rischio per l'aterosclerosi ha mostrato una correlazione positiva tra il grado di restringimento della carotide e i livelli di cisteina ( $r = 0,252$ ,  $p < 0,05$ ). Con l'impiego della regressione lineare multipla, utilizzando il grado di restringimento della carotide quale variabile dipendente e cisteina, omocisteina, età, trigliceridi e lipoproteine a bassa densità come variabili indipendenti è stato confermato che la cisteina è significativamente associata al restringimento del lume carotideo. Un ulteriore approfondimento statistico eseguito attraverso il raggruppamento della popolazione secondo i percentili di Cys e di Hcy, ha permesso di confermare la correlazione tra restringimento del lume vasale e la Cys ( $p = 0,025$ ) ma di individuare anche una debole correlazione con l'Hcy ( $p = 0,033$ ). Il nostro studio fornisce importanti indicazioni sul fatto che l'Hcy plasmatica e la Cys potrebbero essere coinvolte nel restringimento della carotide dopo l'intervento di endoarterectomia della carotide.

**LA DIMINUZIONE DEL GSH DOPO TRATTAMENTO ACIDO DEGLI ERITROCITI È CORRELATA CON I LIVELLI DI EMOGLOBINA**

A. Zinellu<sup>1</sup>, S. Sotgia<sup>1</sup>, M. Sanna<sup>1</sup>, E. Pisanu<sup>1</sup>, B. Scanu<sup>1</sup>, M. Marras<sup>1</sup>, S. Pasella<sup>1</sup>, E. Canu<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>1</sup>, C. Carru<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dip. di Scienze Biomediche, Università di Sassari*

L'alterazione dei livelli di glutatione (GSH) nei globuli rossi riflette la stessa variazione nei tessuti meno accessibili e perciò la proporzione di GSH/GSSG (stato redox) che si riscontra negli eritrociti può essere un ottimo marker dello stato redox generale. Tuttavia, riuscire a determinare con cura lo stato di ossidazione negli eritrociti è estremamente complesso, soprattutto quando per la deproteinizzazione vengono utilizzati precipitanti acidi. È stato ipotizzato che il trattamento acido potrebbe determinare infatti la precipitazione dell'ossiemo globina, con rilascio di ferro e produzione di perossido d'idrogeno, portando ad una parziale ossidazione del GSH. Per verificare una possibile correlazione tra la scomparsa di GSH ed i livelli di emoglobina sono stati misurati i livelli di GSH ridotto e ossidato in 28 volontari mediante elettroforesi capillare con detector laser. La valutazione della concentrazione effettiva di GSH intracellulare è stata eseguita utilizzando alcuni accorgimenti per ridurre al minimo l'ossidazione: gli eritrociti sono stati lisati in H<sub>2</sub>O a 4°C e le proteine sono state precipitate mediante l'aggiunta di due volumi di ACN. I risultati dimostrano che più del 98% del GSH intraeritrocitario è in forma ridotta così come ampiamente riportato dalla letteratura. Sono dunque stati valutati gli effetti di un trattamento acido con MPA (acido metafosforico) sugli stessi campioni. Il confronto con il GSH misurato a seguito di lisi in H<sub>2</sub>O ha permesso di valutare che la quantità di GSH scomparso in seguito a trattamento acido era compresa tra 15,6 % e 35,5 %. Come ci si aspettava, la quantità di GSH scomparso era correlata con la concentrazione iniziale di GSH ridotto ( $R = 0,80$ ;  $p < 0,0001$ ) ma soprattutto la perdita di GSH è strettamente correlata con la concentrazione di emoglobina ( $R = 0,65$ ;  $p < 0,0005$ ). Pertanto il livello di GSH misurato dopo la precipitazione acida è in parte determinato dal livello iniziale di emoglobina e questo suggerisce che, in molti studi casi-controllo, la differenza riscontrata tra pazienti e soggetti sani potrebbe essere dovuta a differenze nei parametri ematologici piuttosto che ad una patologia di tipo pro-ossidante.

**PRELIMINARY DATA ON Y CHROMOSOME POLYMORPHISMS IN SARDINIAN CENTENARIANS**

R. Rossi<sup>1</sup>, D. Sanna<sup>2</sup>, O. Semino<sup>3</sup>, P. Francalacci<sup>2</sup>, C. Franceschi<sup>6</sup>, G. Baggio<sup>4</sup>, J.W. Vapuel<sup>5</sup>, A. Zinellu<sup>1</sup>, C. Carru<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dip. Scienze Biomediche, Università di Sassari*

<sup>2</sup>*Dip. di Zoologia e Genetica Evoluzionistica, Università di Sassari*

<sup>3</sup>*Dip. di Genetica e Microbiologia, Università di Pavia*

<sup>4</sup>*Direttore UOC di Medicina Generale, Azienda Ospedaliera di Padova*

<sup>5</sup>*Max Planck Institute for Demographic Research, Laboratory of Survival and Longevity, Rostock, Germany*

<sup>6</sup>*Dip. di Patologia Sperimentale, Università di Bologna*

The Sardinian population is characterised by an elevated number of centenarians, evenly distributed on the Island, with an unusual high abundance of males. In such context, this work is aimed to outline the genetic variability of centenarians' Y chromosomes at a deeper level of resolution. In order to investigate possible relationships between longevity and the relative haplogroup frequencies distribution, we enlarged the number of centenarians analyzed in a previous study (Passarino et al., 2001). We analysed 118 centenarians, 216 individuals 80-99 years old, and 221 younger people (<60) as a controls. Recruited within the project AkeA the group was divided in 6 sub-groups, according to the geographic origin. All individuals were unrelated to at least two generations. We report preliminary results obtained using a hierarchical screening of some of the most widespread SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) in Europe: M9(xM173), M173, M26, M201, and an Alu insertion (YAP) used for M1, for a total of 5 Y chromosome biallelic polymorphisms, all located in the male-specific portion of the Y chromosome. Even if the complete plan of this work is based on the analysis of a total of 16 SNPs, surveys, the first five above mentioned biallelic polymorphisms account for about 82% of Y chromosome variability of the whole sample.

The Principal Components Analysis (PCA) showed homogeneity among and within the three groups taken into account (>100, 80-99, <60), suggesting the absence of genetic structure within Sardinian classes of age and geographic origin.

Furthermore, the analysis of molecular variance (AMOVA) was performed to test the occurrence of a significant genetic structuring between groups and among Sardinian regions. The pairwise FST values, based on Tamura and Nei (1993) genetic distances, were consistent in revealing absence of sub-structuring among the three main groups, but a low level significance was observed considering the sub-regions. This finding was probably due to the genetic drift. However, it is worthy to note a statistic significance between the group "80-99" from Nuoro area with almost all other groups.

**Reference**

Passarino G, Underhill PA, et al. *Hum Hered* 2001;52(3):136-9.

**APPROCCIO PROTEOMICO PER L'INDIVIDUAZIONE DEL RUOLO DELL'APO-J IN UNA POPOLAZIONE ANZIANA SARDA**

S. Pasella<sup>1</sup>, A. Baralla<sup>1</sup>, S. Sotgia<sup>1</sup>, B. Scanu<sup>1</sup>, E. Pisanu<sup>1</sup>, M. Sanna<sup>1</sup>, A. Marchisio<sup>1</sup>, A. Mannu<sup>1</sup>, C. Carru<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dip. Scienze Biomediche, Università di Sassari*

L'Apo-J, anche nota come Clusterina, è una glicoproteina formata da 449aa, espressa in vari tessuti e presente in tutti i fluidi biologici. Anche se le sue funzioni non sono ancora chiare sembra essere coinvolta in differenti processi fisiologici come la maturazione degli spermatozoi, il trasporto dei lipidi, l'inibizione del complemento, il rimodellamento dei tessuti, interazioni cellula-cellula e cellula-substrato, proliferazione e morte cellulare. Dalla letteratura è noto che Apo-J è coinvolta in molti stati patologici come malattie neurodegenerative, e cancro e durante la senescenza. Lo scopo della ricerca è stato quello di confrontare le mappe proteomiche di plasma ottenuti da campioni di sangue prelevati da individui appartenenti a diverse fasce di età (50-60, ottantenni, novantenni, novantacinquenni e centenari) e valutare come la presenza o assenza di Apo-J varia con l'invecchiamento.

I soggetti presi in esame appartengono al gruppo del Progetto AkeA. Questo lavoro è stato realizzato mediante un approccio proteomico. Le mappe bidimensionali delle proteine plasmatiche sono state elaborate con il software PD-Quest. Gli spot corrispondenti alle Apo-J sono stati digeriti con tripsina e identificati mediante spettrometria di massa (MALDI-TOF e Q-TOF). I risultati dell'identificazione hanno rivelato la presenza di tre isoforme dell'Apo-J così come anche indicato in letteratura.

Confrontando il numero di presenze delle isoforme tra tutte le fasce di età oggetto di studio è emerso che le fasce 80-100 presentano una riduzione significativa (t-test) dell'Apo-J rispetto alla fascia 50-60.

Nelle successive fasi del Progetto Akea sarà valutata quantitativamente l'espressione dell'Apo-J nelle fasce di età sopra elencate in modo da valutare il ruolo di tale proteina durante il processo di invecchiamento.

**Bibliografia**

\**The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34 (2002) 1430-1448

Clusterin/Apolipoprotein J in human aging and cancer  
Ioannis P. Trougakos, Efstathios S. Gonos

**FIBRIN ALPHA C TERM FRAGMENT, STUDIO PRELIMINARE NEI PROCESSI DI INVECCHIAMENTO**

S. Pasella<sup>1</sup>, A. Baralla<sup>1</sup>, S. Sotgia<sup>1</sup>, B. Scanu<sup>1</sup>, E. Pisanu<sup>1</sup>, M. Sanna<sup>1</sup>, F. Lai<sup>1</sup>, L. Murgia<sup>1</sup>, C. Carru<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dip. Scienze Biomediche, Università di Sassari*

Il fibrinogeno è un dimero solubile costituito da tre diverse catene polipeptidiche [(A $\alpha$ )<sub>2</sub> (B $\beta$ )<sub>2</sub>  $\gamma$ 2] legate da ponti disolfuro e due paia di oligosaccaridi N-linked. La conversione del fibrinogeno a fibrina è catalizzata dalla trombina con il rilascio dei fibrinopeptidi delle catene  $\alpha$  producendo monomeri di fibrina I. Il secondo taglio delle catene  $\beta$  viene effettuato dopo che i monomeri di fibrina I hanno polimerizzato "end to end" per formare delle fibrille che successivamente vengono legate a formare un coagulo dal fattore FSF (fibrin-stabilizing factor). Alterazioni del gene della catena  $\alpha$  del fibrinogeno (FGA) possono causare diverse patologie, tra cui l'afibrinogenemia congenita e l'amiloidosi di tipo 8 (AMYL8). La prima è una malattia rara autosomica recessiva caratterizzata da emorragie più o meno gravi e da una completa assenza o livelli molto bassi del fibrinogeno nel plasma e nelle piastrine; la seconda è generalmente ereditaria causata da amiloidi di apolipoproteina A1, fibrinogeno e lisozima. L'AMYL8 interessa principalmente i visceri, mentre non vi è un coinvolgimento del sistema nervoso<sup>1</sup>.

Lo scopo della ricerca è stato quello di valutare la variazione dell'espressione dei fattori della coagulazione durante il processo di invecchiamento. Si è proceduto mediante l'analisi delle proteine plasmatiche di campioni di sangue provenienti da soggetti sardi aderenti al Progetto AkeA. Le fasce di età prese in esame comprendevano la fascia 50-60 anni, 80-90, 90-95, 95-100. È stato usato un approccio proteomico tramite le tecniche di elettroforesi bidimensionale e spettrometria di massa (MALDI-TOF e Q-TOF). L'analisi degli spot di interesse (PDQuest) ha evidenziato la presenza di tre isoforme del frammento C term della catena alpha del fibrinogeno. L'elaborazione statistica (t-test) ha mostrato una significativa assenza di due di queste isoforme nelle fasce di età tra 80-100 rispetto alla fascia 50-60. Ulteriori determinazioni analitiche saranno necessarie per poter ottenere più informazioni circa un'eventuale correlazione tra l'espressione del frammento in oggetto e il processo di invecchiamento.

**Bibliografia**

1. Willem Nieuwenhuizen. Fibrin-Mediated Plasminogen Activation. *Annals New York Academy Of Sciences*. Volume 936, pp. 237-246

**STUDIO DELLE ISOFORME DELL'HISTIDINE-RICH GLYCOPROTEIN IN RELAZIONE ALLA LONGEVITÀ**

A. Barralla<sup>1</sup>, S. Pasella<sup>1</sup>, A. Marchisio<sup>1</sup>, S. Pinna<sup>1</sup>, L. Murgia<sup>1</sup>, A. Mannu<sup>1</sup>, E. Canu<sup>1</sup>, F. Lai<sup>1</sup>, C. Carru<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dip. Scienze Biomediche, Università di Sassari*

L'histidine-rich glycoprotein (HRG) è una glicoproteina plasmatica caratterizzata da una struttura multidominio in grado di svolgere molte funzioni modulatrici in diversi sistemi biologici e di interagire con vari ligandi tra cui lo ione Zn<sup>2+</sup>, la tropomiosina, l'eparina e l'eparan solfato, il plasminogeno, la plasmina, il fibrinogeno, la trombospondina, le IgG, le Fc $\gamma$ R e il sistema del complemento. Nella regione ricca di istidina della molecola l'affinità di legame aumenta in seguito all'interazione con lo ione Zn<sup>2+</sup> o all'esposizione ad un basso valore di pH, condizioni associate a siti in cui sono presenti danno tissutale o sviluppo tumorale. La natura multidominio dell'HRG e la possibilità di interagire con più ligandi suggerisce una sua azione come adattatore extracellulare collegando diversi ligandi sulla superficie cellulare. L'HRG inoltre lega in modo differenziato le IgG, prevenendo la generazione di complessi immuni insolubili; ha proprietà anti-angiogeniche ed aumenta la clearance dei corpi apoptotici e necrotici fagocitati<sup>1</sup>. La sua abilità nel legare diverse molecole, indica che l'HRG può immunomodulare molte condizioni patologiche. Basandoci sui dati presenti in letteratura, in questo studio ci si è preposti l'obiettivo di valutare l'eventuale correlazione tra i livelli espressi di HRG nel plasma e il processo di longevità. I soggetti che hanno aderito al progetto di ricerca (Project AkeA), appartenenti a diverse fasce d'età (50-60, ottantenni, novantenni, novantacinquenni e centenari) sono stati sottoposti a un prelievo di sangue, e le proteine estratte dal plasma sono state separate mediante elettroforesi bidimensionale. Le varie mappe di plasma ottenute sono state analizzate e confrontate con il software PD-Quest; quindi gli spot più interessanti sono stati identificati attraverso spettrometria di massa (MALDI-TOF) individuando tre diverse isoforme dell'HRG. L'elaborazione statistica (T-test) dei risultati ottenuti mostra una riduzione significativa di due della tre isoforme nel gruppo appartenente alla fascia d'età 80-100 anni rispetto a quella 50-60. Poiché i risultati ottenuti sono solo parziali saranno necessari ulteriori studi per chiarire l'eventuale relazione tra l'HRG e i meccanismi molecolari alla base della longevità.

**Bibliografia**

1. Miri Blank & Yehuda Shoenfeld. Histidine-Rich Glycoprotein Modulation of Immune/Autoimmune, Vascular, and Coagulation Systems. *Clinic Rev Allerg Immunol* (2008) 34:307–312.

**VARIABILITA' GENETICA DELLA PON55 E LONGEVITA' NEI SARDI**

L. Musino<sup>1</sup>, S. Pasella<sup>1</sup>, A. Baralla<sup>1</sup>, E. Canu<sup>1</sup>, A. Mannu<sup>1</sup>, L. Murgia<sup>1</sup>, A. Marchisio<sup>1</sup>, F. Lai<sup>1</sup>, C. Carru<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dip. Scienze Biomediche Università di Sassari

Lo stress ossidativo ricopre un ruolo cruciale in numerosi processi patologici e in particolare l'ossidazione delle lipoproteine è reputata il principale fattore scatenante ed aggravante nelle lesioni aterosclerotiche. Diversi studi suggeriscono che l'effetto antiossidante e protettivo delle HDL dipende dalla paraoxonasi sierica (PON), un enzima arilesterasico complessato alle HDL che riduce significativamente l'ossidazione lipoproteica. Gli individui longevi sembrano essere maggiormente protetti dai danni ossidativi vascolari e tali eventi potrebbero essere modulati da variazioni nei geni codificanti per le PON.

Lo scopo del nostro studio caso-controllo è quello di approfondire su una casistica più ampia una analisi condotta in precedenza nel nostro laboratorio per chiarire il ruolo della variante funzionale Leu/Met 55 del gene PON1 nella longevità, la correlazione con l'età e la associazione tra i genotipi e i livelli dei lipidi plasmatici.

I partecipanti allo studio sono stati reclutati nell'ambito del progetto sardo AKeA (1) e selezionati in maniera casuale. Il campione era costituito da un totale di 603 soggetti: 116 sessantenni (età media 60,7#2,4; M=41, F=75), 172 ottantenni (età media 81#1,05; M=83, F=89), 165 novantenni (età media 90,5#1,44; M=77, F=88) e 150 centenari (età media 101,2#1,6; M=67, F=83). La regione polimorfica Leu55Met del gene PON 1 è stata isolata dal DNA genomico e sottoposta a PCR-RFLP mediante le procedure standard descritte in letteratura. Il quadro lipidico è stato determinato nel laboratorio di analisi centrale. Le frequenze alleliche sono state calcolate mediante conta allelica; mentre è stato utilizzato il test ANOVA per stimare la relazione tra genotipi PON 55 e variabili lipidiche. La relazione tra il polimorfismo in esame e l'età è stata valutata mediante il test del x2.

L'analisi del locus Leu/Met 55 non ha evidenziato differenze significative in relazione all'età, al sesso e ai livelli dei lipidi plasmatici. Le frequenze alleliche e genotipiche erano comparabili nelle quattro classi di età. I risultati ottenuti confermano le osservazioni del nostro precedente studio suggerendo la mancanza di associazione tra il polimorfismo PON55 e la longevità nei sardi AKeA.

**Bibliografia**

1. Deiana et al. Aging Clin Exp Res, 11:142-149;1999.

**LIVELLI DI CISTEINA E OMOCISTEINA NEI CENTENARI**

A. Zinellu<sup>1</sup>, A. Baralla<sup>1</sup>, S. Pasella<sup>1</sup>, S. Pinna<sup>1</sup>, L. Murgia<sup>1</sup>, E. Casu<sup>1</sup>, A. Mannu<sup>1</sup>, A. Marchisio<sup>1</sup>, C. Carru<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari

Negli ultimi decenni gli enormi progressi raggiunti nelle medicina e nelle scienze hanno permesso di modificare la natura e le condizioni di vita limitando i rischi e i disturbi associati all'età e garantendo la possibilità di prolungare il periodo di vita con soddisfacente stato fisico e mentale. Numerose sono le ricerche volte a conoscere quali siano le caratteristiche biologiche dei centenari e a capire quindi quali siano i possibili segreti per prolungare la vita. Particolare attenzione viene data al legame tra longevità e benessere del sistema cardiocircolatorio. In questo senso abbiamo voluto valutare i livelli di omocisteina (Hcy) e cisteina (Cys) durante l'invecchiamento. Sia la Cys che l'Hcy sono due aminoacidi solforati potenzialmente citotossici che derivano dal ciclo della metionina. È ormai noto da qualche anno che l'ipomocisteinemia e l'ipercisteinemia sono associati a eventi trombotici e ad un maggiore rischio vascolare. In un gruppo di 30 centenari sardi reclutati dal progetto AKeA sono stati determinati i livelli di come omocisteina e cisteina mediante elettroforesi capillare cod detector laser (CE-LIF) ed i dati sono stati confrontati con quelli ottenuti da quattro gruppi di controllo costituiti da 30 sessantenni, ottantenni, novantenni e novantacinquenni. I risultati indicano che i sessantenni possiedono una concentrazione plasmatica di Hcy pari a  $6.80 \pm 2.59 \mu\text{M}$ , e tale concentrazione aumenta col progredire dell'età, essendo pari a  $10.00 \pm 4.01 \mu\text{M}$  negli ottantenni ( $p < 0.05$  vs 60 anni),  $15.05 \pm 7.89 \mu\text{M}$  nei novantenni ( $p < 0.0001$  vs 60 anni),  $16.62 \pm 7.89 \mu\text{M}$  nei novantacinquenni ( $p < 0.0001$  vs 60 anni), e  $19.77 \pm 8.73 \mu\text{M}$  nei centenari ( $p < 0.0001$  vs 60 anni). Anche per ciò che concerne i livelli di Cys si osserva un aumento significativo nei vari gruppi di età; 60 anni ( $198.6 \pm 44.2 \mu\text{M}$ ), 80 anni ( $243.2 \pm 49.9 \mu\text{M}$ ,  $p < 0.0001$  vs 60 anni), 90 anni ( $272.4 \pm 76.7 \mu\text{M}$ ,  $p < 0.0001$  vs 60 anni), 95 anni ( $298.8 \pm 65.3 \mu\text{M}$ ,  $p < 0.0001$  vs 60 anni), 100 anni ( $271.6 \pm 58.1 \mu\text{M}$ ,  $p < 0.0001$  vs 60 anni).

Sebbene nei centenari si riscontri un aumento significativo di entrambe i biomarkers predittivi del rischio vascolare, essi non sembrano ridurre la probabilità di sopravvivenza. Ciò spinge a pensare che altri meccanismi possano intervenire nella protezione dei questi soggetti.

**CARATTERIZZAZIONE DELLE ISOFORME DELLA TRANSTIRETINA NELLA POPOLAZIONE SARDA ANZIANA**

A. Baralla<sup>1</sup>, S. Pasella<sup>1</sup>, M. Marras<sup>1</sup>, E. Canu<sup>1</sup>, A. Marchisio<sup>1</sup>, F. Lai<sup>1</sup>, S. Pinna<sup>1</sup>, L. Murgia<sup>1</sup>, C. Carru<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dip. Scienze Biomediche, Università di Sassari

La Transtiretina (TTR) è una proteina di 55kDa presente sia nel sangue sia nel liquido cerebro-spinale, sintetizzata nel fegato, nel plesso coroidale e nell'epitelio del pigmento retinale. La TTR è coinvolta direttamente nel trasporto degli ormoni tiroidei e indirettamente in quello del retinolo. Nel fluido cerebro-spinale è il principale trasportatore della tiroxina (T4), e agisce anche come trasportatore del retinolo (Vitamina A) attraverso l'associazione con la proteina legante il retinolo (RBP).

La TTR è coinvolta in diverse forme di amiloidosi con diversa localizzazione tissutale, tempo di sviluppo e velocità di progressione, delle quali alcune sono ereditarie e altre sporadiche. Le TTR-amiloidosi che sono associate a specifiche mutazioni puntiformi colpiscono tipicamente i tessuti neuronali (familial amyloid polyneuropathy, FAP), mentre le TTR-amiloidosi che coinvolgono TTR-wild type colpiscono il tessuto cardiaco in un sostanziale numero di persone anziane (senil systemic amyloidosis) indicando una instabilità conformazionale anche del TTR-wild type1. Grazie al loro potenziale diagnostico e al fatto che non sia ancora chiara la relazione tra TTR circolante e TTR amiloide risulta di rilevante interesse l'analisi di questa proteina nel siero. Nel presente studio è stata analizzata l'espressione della transtiretina serica in una popolazione di 129 individui aderenti al Progetto AKeA e appartenenti alle seguenti fasce d'età: centenari, novantacinquenni, novantenni, ottantenni, cinquantenni e sessantenni. Le proteine sono state separate mediante elettroforesi bidimensionale e gli spot di interesse, identificati mediante MALDI-TOF e/o Q-TOF. L'analisi degli spettri di massa ha mostrato sei isoforme della TTR. Il t-test ha individuato un'assenza significativa di tre delle sei isoforme nelle fasce di età tra gli 80-100 anni rispetto alla fascia di 50-60 anni. Vista l'implicazione di alcune isoforme della TTR in neuropatie amiloidi, un'ipotesi che vorremo verificare è l'esistenza di una correlazione tra le isoforme della TTR individuate e lo score ottenuto dal Mini Mental State Examination per la valutazione dei disturbi dell'efficienza intellettiva e della presenza di deterioramento intellettivo.

**VALUTAZIONE DEI LIVELLI PLASMATICI DI TAURINA NEI CENTENARI**

A. Zinellu<sup>1</sup>, A. Baralla<sup>1</sup>, S. Pasella<sup>1</sup>, S. Pinna<sup>1</sup>, F. Lai<sup>1</sup>, S. Deidda<sup>1</sup>, A. Mannu<sup>1</sup>, L. Murgia<sup>1</sup>, C. Carru<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dip. di Scienze Biomediche, Università di Sassari

Negli ultimi anni i progressi fatti dalla medicina e dalle scienze, unitamente al miglioramento dello stile di vita, hanno significativamente ridotto il rischio di patologie correlate all'età. Questo ha permesso di aumentare l'aspettativa e la qualità di vita permettendo agli individui di invecchiare in condizioni fisiche e psicologiche soddisfacenti. La relazione tra la longevità e l'efficienza del sistema cardiocircolatorio coinvolge diversi fattori che svolgono un ruolo protettivo nei confronti dell'aterosclerosi, come ad esempio gli antiossidanti. Tra di essi, la taurina è uno dei più concentrati nel plasma degli umani. È stato dimostrato che essa svolge non solo funzioni fisiologiche agendo da neurotrasmettitore, stabilizzatore di membrana, antiossidante e modulatore dei livelli di calcio intracellulare, ma possiede anche proprietà farmacologiche, essendo un ottimo protettore del fegato e della cistifellea e un regolatore della pressione sanguigna. Recentemente, è stato provato che la supplementazione di taurina nei ratti diabetici ne riduce la mortalità. Col presente studio sono stati valutati i livelli plasmatici di taurina in 30 centenari sardi reclutati dal progetto AKeA, di età compresa tra i 100 e i 104 anni (età media  $101.0 \pm 1.3$ ) reclutati grazie alla collaborazione delle anagrafi regionali, e di 30 sessantenni, ottantenni, novantenni e novantacinquenni utilizzati come controlli. La determinazione della taurina è stata effettuata utilizzando un saggio in elettroforesi capillare con detection laser, previa derivatizzazione del campione con isotiocianato di fluoresceina. Dall'analisi è emerso che i controlli sessantenni possiedono una concentrazione plasmatica di taurina pari a  $53.64 \pm 19.75 \mu\text{M}$ , e che la concentrazione si riduce col progredire dell'età, essendo pari a  $36.59 \pm 19.82 \mu\text{M}$  negli ottantenni ( $p < 0.001$  rispetto ai sessantenni),  $32.32 \pm 10.76 \mu\text{M}$  nei novantenni ( $p < 0.0001$  rispetto ai sessantenni),  $32.83 \pm 9.99 \mu\text{M}$  nei novantacinquenni ( $p < 0.0001$  rispetto ai sessantenni), e  $33.34 \pm 8.77 \mu\text{M}$  nei centenari ( $p < 0.0001$  rispetto ai sessantenni). Pare quindi che i bassi livelli di taurina, importante fattore protettivo contro numerose patologie, non riducano la possibilità di una maggiore sopravvivenza, suggerendo dunque la presenza nei centenari di ulteriori meccanismi di protezione individuale.

### AUMENTO DEI LIVELLI PLASMATICI DI DIMETILARGININA ASIMMETRICA (ADMA) IN PAZIENTI AFFETTI DA OCCLUSIONE VENOSA PROFONDA DELLA RETINA

B. Scanu<sup>1</sup>, A. Pinna<sup>2</sup>, R. Chessa<sup>1</sup>, E. Pisanu<sup>1</sup>, A. Zinellu<sup>1</sup>, S. Sotgia<sup>1</sup>, M. Sanna<sup>1</sup>, S. Pasella<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>1</sup>, C. Carru<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dip. di Scienze Biomediche, Università di Sassari*

<sup>2</sup>*Clinica Oculistica, Università di Sassari*

L'ossido nitrico (NO) è coinvolto in una vasta gamma di meccanismi regolatori del sistema vascolare: 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. Una scarsa biodisponibilità di NO può portare perciò a fenomeni di disfunzione endoteliale. La produzione di NO può essere ridotta dall'inibizione competitiva della NOS mediata dagli analoghi dell'arginina e in particolare dell'ADMA. Per la prima volta sono stati misurati i livelli di ADMA e SDMA (dimetilarginina simmetrica) in pazienti affetti da RVO (occlusione venosa profonda della retina) che causa una perdita parziale o totale della vista. Sono stati coinvolti nello studio 54 pazienti e 32 controlli. Dallo studio è risultato che non ci sono differenze tra i due gruppi per i livelli plasmatici di ADMA ma quando i pazienti sono stati suddivisi in base al coinvolgimento del tronco centrale (CRVO) o dei rami (BRVO) della circolazione venosa si è notato un aumento significativo nei CRVO ( $0,710 \pm 0,139$  mmol/L nei CRVO,  $0,642 \pm 0,096$  mmol/L nei BRVO e  $0,635 \pm 0,117$  mmol/L nei controlli). Inoltre, nei pazienti con CRVO, c'è anche un rapporto significativo tra ADMA/SDMA ( $1,796 \pm 0,497$  nei CRVO,  $1,542 \pm 0,342$  nei BRVO e  $1,541 \pm 0,382$  nei controlli). Questo risultato può essere spiegato come una diminuzione del catabolismo dell'ADMA. Infatti, è noto che la SDMA viene rimossa solo tramite escrezione renale, mentre per l'ADMA vi è una seconda via di eliminazione attraverso l'idrolisi a dimetilammina e citrullina ad opera dell'enzima dimetilarginina dimetilaminoidrolasi (DDAH). Considerando che i livelli di SDMA e di creatinina sono simili in tutti i gruppi analizzati (il che indica un'identica escrezione renale di ADMA) la differenza osservata nel rapporto tra ADMA/SDMA potrebbe indicare una diminuzione del catabolismo di ADMA nei pazienti con CRVO dovuta probabilmente ad una riduzione dell'attività della DDAH. Tale riduzione sarebbe imputabile agli elevati livelli di cisteina presenti nei CRVO che potrebbero inibire l'attività della DDAH con un meccanismo simile a quello già dimostrato per l'omocisteina.

### DETERMINAZIONE DELLA TAURINA PLASMATICA MEDIANTE CZE-LIF

B. Scanu<sup>1</sup>, M. Sanna<sup>1</sup>, E. Pisanu<sup>1</sup>, A. Zinellu<sup>1</sup>, S. Sotgia<sup>1</sup>, G. Pintus<sup>1</sup>, R. Rossi<sup>1</sup>, M. Fois<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>1</sup>, C. Carru<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari*

In questo studio viene descritto un metodo rapido e sensibile in elettroforesi capillare con LIF detection per la quantificazione della taurina plasmatica. La taurina è un aminoacido solforato ampiamente distribuito nei vari tessuti e presente in questi in concentrazioni millimolari. Tra le sue tante funzioni fisiologiche ricordiamo la sua azione come neurotrasmettitore, antiossidante, modulatore dei livelli intracellulari di calcio, protettore epatico e della cistifellea, modulatore della pressione sanguigna ed antiaritmico. Una riduzione dei livelli di taurina nei liquidi biologici è stata riscontrata nel corso di patologie quali Alzheimer, cancro, epilessia, degenerazione della retina, ritardo mentale, diabete mellito e patologie cardiovascolari. La metodica prevede la derivatizzazione della taurina con fluoresceina isocianato (FITC) e l'uso di acido omocisteico come standard interno in quanto quest'ultimo permette un'analisi più precisa essendo la FITC un cromoforo caratterizzato da una certa instabilità.

L'utilizzo della FITC e l'impiego di elevate temperature durante il processo di derivatizzazione riduce drasticamente i tempi pre-analitici (da 6h a 40° C a 20 min a 100° C). La corsa elettroforetica dell'addotto FITC-aurina viene effettuata su un capillare di 40 cm di lunghezza e 75 µm ID, con l'impiego di un tampone di sodio fosfato tribasico pH 11.8, a 22kV. Queste condizioni permettono una buona riproducibilità intra ed intersaggio (CV 4,63 e 6,44%, rispettivamente) e un ottimo recupero dell'analita (da 98,1 a 102,3%). È stato inoltre valutato il limite minimo di quantificazione (LOQ) che per una iniezione di 18nL di campione è pari a 1 µmol/L.

Il metodo è stato testato misurando i livelli di taurina in 50 volontari (18 femmine e 32 maschi con età compresa tra i 51± 16 anni). Nei soggetti esaminati sono stati riscontrati valori medi di  $60,2 \pm 17,9$  µmol/L, simili a quelli già riportati in letteratura (1).

Infine questa metodica permette di quantificare contemporaneamente anche altri aminoacidi come l'acido glutammico, l'acido aspartico, la glicina, l'alanina e la serina.

#### Bibliografia

1. Mitani et al. *Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2006;30:1155.

### QUANTIFICAZIONE DELLA METIONINA PLASMATICA IN PAZIENTI AFFETTI DA OCCLUSIONE VENOSA DELLA RETINA

A. Pinna<sup>2</sup>, M. Sanna<sup>1</sup>, E. Pisanu<sup>1</sup>, B. Scanu<sup>1</sup>, A. Zinellu<sup>1</sup>, S. Sotgia<sup>1</sup>, R. Chessa<sup>1</sup>, A. Baralla<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>1</sup>, C. Carru<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari

<sup>2</sup>Clinica Oculistica, Università di Sassari

La metionina (Met) è un amminoacido essenziale coinvolto nella sintesi delle proteine e nelle reazioni di metilazione. Essendo il precursore di aminoacidi quali omocisteina(Hcy) e cisteina(Cys) un difetto nel ciclo della Met potrebbe determinare un aumento di entrambi gli intermedi che è ormai noto sono importanti fattori indipendenti di rischio cardiovascolare. Generalmente la determinazione della Met viene effettuata mediante HPLC utilizzando (OPA) come derivatizzante ma i tempi di separazione degli analiti risultano spesso molto lunghi e la stabilità degli addotti piuttosto limitata. In questo studio, al fine di evitare la derivatizzazione degli analiti, il campione è stato sottoposto a filtrazione e concentrazione, al fine di poter rilevare la metionina direttamente mediante UV a 204 nm. La separazione viene effettuata in elettroforesi capillare (CE) UV in meno di 14 minuti, con l'impiego di un capillare di lunghezza pari a 50 cm in tampone fosfato 125mmol/L a pH 2,3. In queste condizioni, il flusso elettrosmotico viene soppresso e gli analiti si separano in base alla differente mobilità elettroforetica.

La determinazione dell'analita è stata effettuata su 29 pazienti affetti da occlusione venosa della retina (RVO) la più frequente causa di perdita della vista, e su un gruppo di controllo costituito da 37 individui che non presentano nessuna condizione patologica. I pazienti RVO sono stati suddivisi in CRVO e BRVO in base al coinvolgimento del tronco venoso della vena retinica: l'occlusione di una branca (BRVO) e l'occlusione della vena centrale (CRVO).

Sebbene non esistano differenze tra pazienti RVO e controlli, suddividendo i pazienti nelle due sub-classi è stato osservato che i valori di metionina nei CRVO (21,83±8,57) sono significativamente più alti rispetto a quelli dei BRVO (19,41± 7,05) e dei controlli (16,48 ±3,74) (P=0,003 vs controlli). I dati ottenuti con il nuovo metodo sono stati messi a confronto con i dati ottenuti in HPLC utilizzando test statistici quali Bland-Altman test e Passing Bablok regression. Il confronto statistico indica che i risultati ottenuti con le due metodiche sono simili.

### NUOVA METODICA PER LA MISURAZIONE DELLE ARGININE METILATE DEL PLASMA IN ELETTROFORESI CAPILLARE

E. Pisanu<sup>1</sup>, B. Scanu<sup>1</sup>, M. Sanna<sup>1</sup>, A. Zinellu<sup>1</sup>, S. Sotgia<sup>1</sup>, A. Posadino<sup>1</sup>, L. Musino<sup>1</sup>, F. Maglione<sup>2</sup>, L. Deiana<sup>1</sup>, C. Carru<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari

<sup>2</sup>Azienda Sanitaria di Potenza, Dipartimento Diagnostica di Laboratorio

Studi recenti hanno dimostrato che un aumento plasmatico di dimetilarginina asimmetrica (ADMA) inibisce in maniera significativa il funzionamento della NOS riducendo dunque la biodisponibilità di NO che è causa di disfunzione endoteliale. Le tecniche per la determinazione dei livelli di ADMA attualmente in uso sono costose e spesso necessitano di passaggi complicati e dispendiosi in termini di tempo. Per questo motivo è stato deciso di mettere a punto un nuovo metodo in elettroforesi capillare (CE) in grado di misurare non solo l'ADMA, ma anche la dimetilarginina simmetrica (SDMA) e l'arginina (Arg).

ADMA, SDMA e Arg sono aminoacidi che a pH<3 sono carichi positivamente ed in un sistema elettroforetico a tale pH migrano più velocemente rispetto agli aminoacidi acidi o neutri. In particolare, si ottiene una buona separazione usando un tampone tris-fosfato a pH 2,3 e alla temperatura di 15°C in soli 16 min ed un capillare di 75 µm x 60 cm di lunghezza. Queste condizioni permettono anche la separazione tra arginina e omoarginina che può quindi essere usato come standard interno. Per poter quantificare l'ADMA plasmatica, che ha un range di 0,3-0,7 µM è necessario inoltre concentrare il campione di almeno 8 volte durante la fase pre-analitica. Si parte da 400 µL di campione e, dopo l'aggiunta dello standard interno, le proteine vengono precipitate con ACN/ammoniaca (90:10). Il supernatante viene fatto evaporare e una volta portato a secco viene risospeso in 500 µL di acqua e quindi filtrato. Alla fine l'ultrafiltrato viene nuovamente evaporato e risospeso in 50 µL di acqua prima di venire iniettato in elettroforesi capillare. I test di precisione indicano una buona riproducibilità sia dei tempi di migrazione (CV<0,25%) che delle aree dei picchi (CV<1,9%). Inoltre il metodo dimostra un'ottima riproducibilità intra- ed intersaggio (CV<2,2% e CV<3,2%, rispettivamente). La nuova metodica è stata validata misurando gli analiti in 77 soggetti apparentemente sani e confrontando i risultati ottenuti con quelli ricavati mediante un metodica in CE-LIF descritta in letteratura. I dati ottenuti sono stati comparati mediante test statistici quali Bland-Altman e Passing Bablock test che indicano come i risultati ottenuti con le due metodiche siano sovrapponibili.

**QUANTIFICAZIONE DI ATP, ADP E AMP MEDIANTE ELETTROFORESI CAPILLARE ZONALE AD INIEZIONE INVERSA**

V. Pasciu<sup>1</sup>, E. Pisanu<sup>1</sup>, B. Scanu<sup>1</sup>, A. Zinellu<sup>1</sup>, S. Sotgia<sup>1</sup>, L. Musino<sup>1</sup>, A. Posadinu<sup>1</sup>, A. Cossu<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>1</sup>, C. Carru<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dip. di Scienze Biomediche, Università di Sassari*

Questo lavoro descrive la messa a punto di una nuova metodica per la misurazione i livelli intracellulari dei nucleotidi adenosina-5'-trifosfato(ATP), adenosina-5'-difosfato (ADP), e di adenosina-5'-monofosfato (AMP). La molecola dell' ATP è la più importante fonte energetica della cellula e viene utilizzata in una moltitudine di reazioni biochimiche come biosintesi, fotosintesi, respirazione, mobilità, divisione cellulare. L' applicabilità del metodo è stata dimostrata effettuando le determinazioni su campioni quali globuli rossi e spermatozoi. In questi ultimi la misurazione dei livelli di ATP è particolarmente importante in quanto può essere un indicatore dell' integrità mitocondriale in seguito a crioconservazione.

La corsa elettroforetica è stata effettuata su un capillare di lunghezza pari a 60,2 cm in un tampone di sodio acetato 60 mmol/L pH 3.80, in presenza di 0.01 % di MC (metilcellulosa) che riduce i tempi di migrazione degli analiti, attraverso la riduzione dell'intensità del flusso elettroosmotico. La modalità di iniezione inversa riduce ulteriormente i tempi di analisi in quanto il campione viene iniettato all' outlet del capillare in prossimità della finestra di rilevamento, riducendo quindi la distanza di migrazione a soli 10,2 cm. In queste condizioni elettroforetiche i tempi di migrazione degli analiti sono stati 1,35 min per ATP, 1,85 min per l'ADP, e 4,64 min per AMP. Queste condizioni hanno dato una buona riproducibilità intra e intersaggio (CV <4 e 8%, rispettivamente) e la procedura di analisi ha dimostrato un ottimo recupero (da 98,3 a 99%). I limiti di detection della metodica (LOD) sono di 6 µmol/L per l'ATP e 5 µmol/L per l' AMP. I risultati ottenuti con la nuova metodica sono stati messi a confronto con i dati ricavati utilizzando una metodica spettrofotometrica mediante test statistici quali Bland Altmann test e Passing Bablok regression. Il confronto statistico indica che i dati ottenuti con le due differenti metodiche risultano equivalenti.

**SVILUPPO DI UNA NUOVA METODICA IN ELETTROFORESI CAPILLARE PER LA MISURAZIONE DELL'ACIDO ASCORBICO E DELL'ACIDO URICO**

M. Sanna<sup>1</sup>, E. Pisanu<sup>1</sup>, B. Scanu<sup>1</sup>, A. Zinellu<sup>1</sup>, S. Sotgia<sup>1</sup>, S. Pinna<sup>1</sup>, S. Pasella<sup>1</sup>, A. Baralla<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>1</sup>, C. Carru<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari*

L'acido ascorbico (AA) è una vitamina idrosolubile ampiamente distribuita nei fluidi corporei e nei tessuti umani e degli altri mammiferi con spiccate proprietà antiossidanti, così come l'acido urico (UA), un prodotto del metabolismo purinico che si trova a concentrazioni elevate nel plasma. Recenti studi hanno dimostrato che un'elevata assunzione di AA riduce il rischio di malattie croniche come cancro, cataratta e malattie coronariche, mentre, una deficienza di AA è responsabile dello scorbuto ed è stata riscontrata in alcune malattie croniche come l'anemia falciforme. I livelli elevati di UA sono associati a ipertensione, malattie vascolari e disfunzioni renali. È stata dunque sviluppata un nuova metodica per la misurazione dell'AA e dell'UA mediante elettroforesi capillare. Gli analiti vengono risolti in meno di 4 minuti con l'utilizzo di tampone sodio glicinglicina (Glygly) 50 mM, a pH 8 e 40°C. Grazie all'utilizzo del Diode Array Detector permette di monitorare più lunghezze d'onda contemporaneamente è stato possibile utilizzare la lunghezza d'onda più opportuna sia per l'AA (262 nm) che per l'UA (288 nm). I parametri elettroforetici come la risoluzione, i tempi di migrazione, l'efficienza e le aree dei picchi sono stati confrontati con quelli ottenuti mediante due metodi in elettroforesi capillare già descritti in letteratura nei quali gli analiti vengono separati con diversi tamponi: sodio borato (che assicura una migrazione veloce ma poco risolutiva) oppure tricina (che aumenta la risoluzione ma allunga i tempi di migrazione). L'utilizzo di glicinglicina sodica permette la stessa risoluzione della tricina ed i tempi di migrazione rapidi del sodio borato.

I livelli di acido ascorbico e di acido urico sono stati misurati su 35 volontari con tutti e tre i metodi e i risultati sono stati confrontati statisticamente con il test Mountain-Plot, la regressione di Passing-Bablok e il test di Bland-Altman. I risultati ottenuti con i tre metodi erano sovrapponibili. È stato così dimostrato che il metodo messo a punto è migliorativo rispetto ai due metodi già riportati in letteratura e risulta essere più facilmente applicabile per scopi di ricerca e di clinica di laboratorio.

### MISURAZIONE SIMULTANEA DI ACIDO GUANIDINOACETICO, CREATININA E CREATININA MEDIANTE ELETTROFORESI CAPILLARE

E. Pisanu<sup>1</sup>, B. Scanu<sup>1</sup>, M. Sanna<sup>1</sup>, A. Zinellu<sup>1</sup>, S. Sotgia<sup>1</sup>, F. Maglione<sup>2</sup>, A. Cossu<sup>1</sup>, L. Gaspa<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>1</sup>, C. Carru<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dip. di Scienze Biomediche, Università di Sassari*

<sup>2</sup>*Azienda Sanitaria di Potenza, Dip. Diagnostica di Laboratorio*

Per molti anni l'acido guanidinoacetico (GAA), assieme a creatina (Cn) e creatinina (Cnn), è stato proposto come marker della funzionalità renale. Tuttavia, le difficoltà nella sua misurazione sia nel plasma che nelle urine, e la semplicità nella determinazione della Cnn, hanno determinato l'elezione di quest'ultima come marcatore renale. L'acido guanidinoacetico è un metabolita chiave nel meccanismo di sintesi della creatina, ed ha assunto grande importanza nella diagnosi dei disordini metabolici della Cn stessa. Infatti, qualora si verificano errori nel metabolismo della creatina, i pazienti possono incorrere in disturbi di differente natura ed entità come patologie neurologiche, ritardo mentale, epilessia, disturbi del linguaggio e nei movimenti. Studi clinici hanno dimostrato che il supplemento di Cn in bambini con deficit di uno degli enzimi coinvolti nella sintesi della Cn, allevia la sintomatologia, mettendo in luce quindi l'importanza di una diagnosi precoce. Per questa ragione sono richiesti nuovi metodi rapidi ed economici, per la misurazione della Cn nel plasma e nelle urine. È stato messo a punto un nuovo metodo per la misurazione del GAA in elettroforesi capillare con detection UV, senza derivatizzazione preventiva del campione. I campioni di plasma vengono filtrati utilizzando i concentratori "Microcon-10" e direttamente iniettati in elettroforesi capillare, mentre per i campioni di urine è necessaria una diluizione di venti volte in acqua. Una buona separazione degli analiti si ottiene in meno di 8 min, con l'utilizzo di un tampone Tris-fosfato 75 mM, a pH 2,25 a 15 °C in un capillare di 75 µm ID x 60 cm (50 cm dalla finestra di detection). I test di precisione indicano una buona riproducibilità sia dei tempi di migrazione (CV<0,25%) che delle aree dei picchi (CV<2,7%). Inoltre il metodo dimostra un'ottima riproducibilità intra- ed inter-saggio (CV<3,9% e CV< 6,3% rispettivamente). La nuova metodica è stata validata misurando la Cnn e la Cn nel plasma di 32 soggetti apparentemente sani e confrontando i risultati ottenuti con quelli ricavati mediante un saggio precedentemente proposto. La rapidità e il basso costo della nuova metodica la rendono uno strumento applicabile sia alla clinica che alla ricerca di laboratorio

### VALUTAZIONE SIMULTANEA DELLA CONCENTRAZIONE DELLA NAC E DEI TIOLI PLASMATICI A BASSO PESO MOLECOLARE IN SOGGETTI CON BPCO

A. Fois<sup>2</sup>, P. Pirina<sup>2</sup>, V. Spada<sup>2</sup>, F. Becciu<sup>2</sup>, A. Zinellu<sup>1</sup>, S. Sotgia<sup>1</sup>, S. Pasella<sup>1</sup>, A. Baralla<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>1</sup>, C. Carru<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dip. di Scienze Biomediche, Università di Sassari*

<sup>2</sup>*Clinica Pneumologica, Università di Sassari*

La NAC (N-acetil-L-cisteina) è un farmaco contenente un gruppo tiolico, somministrato come mucolitico nel trattamento dei disturbi respiratori. Recenti studi hanno dimostrato che l'utilizzo di NAC può modificare i livelli plasmatici dei tioli a basso peso molecolare (LMW), quali cisteina (Cys), omocisteina (Hcy) e glutazione (GSH) riducendone le concentrazioni ematiche. L'effetto assume grossa rilevanza quando si parla di Cys e Hcy la cui eccessiva presenza nel plasma è associata a disturbi vascolari: sembra infatti promuovere l'aterogenesi alterando la funzionalità endoteliale. La riduzione dei tioli plasmatici può essere in parte spiegato con lo spostamento, da parte della NAC, dei tioli dal loro sito di legame per le proteine, e dalla formazione di addotti NAC-Cys e NAC-Hcy che subiscono una maggiore clearance renale. Ciò potrebbe rappresentare l'inizio di un approccio alternativo per il trattamento dell'iperomociteinemia, considerando anche che il farmaco è ben tollerato e non ha effetti collaterali gravi.

Recentemente è stata descritta una metodica in elettroforesi capillare per la misurazione dei tioli plasmatici a basso peso molecolare con l'impiego di N-metil-D-glucammina quale additivo del tampone di corsa per migliorare la risoluzione dei picchi (1). Successivamente è stato messo a punto un nuovo metodo per la misurazione simultanea della concentrazione plasmatica dei tioli fisiologici e della NAC, in elettroforesi capillare, in pazienti con ostruzione bronco-polmonare (BPCO). Rispetto alla metodica precedente, si è pensato di allungare il tempo della corsa elettroforetica attraverso l'incremento della concentrazione del tampone. La separazione completa degli analiti è stata ottenuta utilizzando un tampone contenente sodio fosfato 20 mM, acido borico 16 mM e N-metil-D-glucammina 75 mM, a pH 11,4, in meno di 10 min. L'applicazione del metodo sviluppato, su pazienti affetti da BPCO e sottoposti a trattamento con NAC ha messo in luce per la prima volta che il trattamento riduce i livelli plasmatici degli LMW dopo la prima somministrazione, ma già al secondo giorno di terapia, i tioli tendono ad aumentare, confermando la complessità dell'effetto del farmaco sulla concentrazione plasmatica dei tioli.

Bibliografia

1. Zinellu A. et al. *Electrophoresis* 2003;24:2796-804.

### QUANTIFICAZIONE DELLA CISTEINILGLICINA PLASMATICA IN ELETTROFORESI CAPILLARE: APPLICAZIONI CLINICHE

M. Sanna<sup>1</sup>, E. Pisanu<sup>1</sup>, B. Scanu<sup>1</sup>, A. Zinellu<sup>1</sup>, S. Sotgia<sup>1</sup>, E. Canu<sup>1</sup>, A. Mannu<sup>1</sup>, L. Murgia<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>1</sup>, C. Carru<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dipartimento Scienze Biomediche, Università di Sassari*

Diversi studi hanno dimostrato che un aumento degli aminotioili plasmatici quali cisteina (Cys) e omocisteina (Hcy) è correlato con il rischio di malattie cardiovascolari. Al contrario, altri aminotioili come il glutatione e il suo precursore cisteinilglicina (Cys-Gly) sembrano avere effetti benefici agendo come antiossidanti. Inoltre la Cys-Gly sembrerebbe avere un ruolo importante nell'aterosclerosi grazie alla capacità di inibire l'omocisteinilazione delle LDL.

Esistono diversi metodi per la misurazione dei tioli nel plasma quali RIA ed ELISA che però permettono la misurazione della sola omocisteina, mentre altri dosaggi mediante HPLC, GC pur consentendo di misurare tutti i tioli in un'unica corsa sono spesso caratterizzati da elevati costi e lunghi tempi analitici. Nel tentativo di ovviare a questi problemi è stato sviluppato un nuovo metodo per la misurazione dei tioli in elettroforesi capillare. Infatti, usando un capillare lungo 47 cm con tampone di corsa costituito da sodio fosfato 3 mM e acido borico 2.5 mM in presenza di N-methylglucamina (75 mM) a pH 11.5 ed alla temperatura di 45°C, si otteneva una buona separazione tra Cys-Gly, Hcy e Cys in 2 min. Confrontando il nostro metodo con uno recente in HPLC descritto da Frick et al.(1) si evince come la nuova metodica permetta una riduzione dei tempi pre-analitici e analitici.

Il nuovo metodo in CE è stato applicato per misurare i livelli di Cys-Gly su pazienti affetti da occlusione venosa profonda della retina (RVO), un'importante causa di perdita parziale o totale della vista. I risultati indicano che i pazienti con RVO hanno una significativa diminuzione dei livelli di Cys-Gly rispetto a quelli dei controlli (19.5 mmol/L vs 22.7 mmol/L, p<0.0001). Questa differenza nella concentrazione di Cys-Gly può determinare un incremento della omocisteinilazione delle LDL contribuendo così ad un aumento del danno vascolare.

In conclusione, la semplicità nella preparazione dei campioni, la possibilità di misurare simultaneamente i più importanti tioli plasmatici, la velocità nei tempi analitici e i bassi costi del metodo da noi proposto, lo rendono un ottimo strumento nell'analisi chimico-clinica per screening di massa.

#### Bibliografia

1. Frick B. et al. Clin Chim Acta 2003;331:19–23.

### MISURAZIONE CROMATOGRAFICA DELL'ADMA PLASMATICA DOPO DERIVATIZZAZIONE PRE-COLONNA CON NINIDRINA

S. Sotgia<sup>1</sup>, A. Zinellu<sup>1</sup>, M. Sanna<sup>1</sup>, E. Pisanu<sup>1</sup>, B. Scanu<sup>1</sup>, A. Baralla<sup>1</sup>, M. Fois<sup>1</sup>, S. Pinna<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>1</sup>, C. Carru<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dip. di Scienze Biomediche, Università di Sassari*

L'ossido nitrico (NO) è una molecola che gioca un ruolo chiave in diversi processi biologici. È sintetizzato dalle ossidionitrico sintasi (NOS), enzimi in grado di catalizzare l'ossidazione dell'azoto terminale del gruppo guanidinico dell'arginina. Alcune isoforme delle NOS mostrano un diverso grado di suscettibilità all'inibizione da parte di molecole analoghe alla L-arginina e, quando questa inibizione è inserita in un contesto patologico, la ridotta disponibilità di NO determina una disfunzione endoteliale. Tra le molecole endogene in grado di inibire le NOS, vi sono le metilarginine derivanti dalla proteolisi. Esistono in tre tipi, la monometil-L-arginina (L-MMA), dimetil-L-arginina asimetrica (ADMA) e dimetil-L-arginina simetrica (SDMA). Solo L-NMMA e l'ADMA sono in grado di inibire le NOS ma, poichè la concentrazione dell'ADMA è dieci volte superiore a quella della L-NMMA, si ritiene che l'ADMA sia il più importante inibitore endogeno delle NOS. La valutazione dei livelli di ADMA mediante metodiche analitiche specifiche, sensibili e rapide ha perciò una certa rilevanza in ambito clinico-diagnostico. In questo lavoro descriviamo un metodo di derivatizzazione pre-colonna specifico per l'analisi dell'ADMA plasmatica. Sostanzialmente dopo la deproteinizzazione di 200 µL di plasma con 200 µL di acetonitrile, a 300 µL di surnatante sono addizionati 20 µL di KOH al 5% e 20 µL di una soluzione di ninidrina al 3% in etanolo. Dopo 5 minuti sono quindi aggiunti 20 µL di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 M e la soluzione è incubata per 10 minuti a 100 °C. L'addotto ADMA-ninidrina così formatosi è utilizzabile per una veloce misurazione dei livelli di ADMA attraverso una separazione cromatografica mediante HPLC e rilevazione della fluorescenza emessa dall'addotto alle lunghezze d'onda 390 (eccitazione) e 497 (emissione). Le condizioni ottimali per la separazione degli analiti, in termini di massima risoluzione e breve tempo di ritenzione, prevedono l'uso di una fase mobile composta da una soluzione acquosa di NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 10 mM contenente tetraidrofurano al 10% v/v. In queste condizioni l'ADMA e lo standard interno di omoarginina sono separati rispettivamente in 11,42 e 6,40 min. I limiti di rilevazione e quantificazione determinati dal rapporto segnale-rumore pari a 3:1 e 10:1, rispettivamente, sono pari a 12 nM per l'ADMA e 4 nM per l'omoarginina.

#### Bibliografia

1. Sotgia S. et al. Amino Acids 2008;34:677–682.

**VALUTAZIONE DEL GRADO DI METILAZIONE DEL DNA MEDIANTE ELETTROFORESI CAPILLARE ZONALE A INIEZIONE INVERSA**

S. Sotgia<sup>1</sup>, A. Zinellu<sup>1</sup>, M. Sanna<sup>1</sup>, E. Pisanu<sup>1</sup>, B. Scanu<sup>1</sup>, L. Murgia<sup>1</sup>, R. Rossi<sup>1</sup>, M. Marras<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>1</sup>, C. Carru<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari

La metilazione del DNA è la più comune modificazione epigenetica del DNA che coinvolge sequenze palindromiche dette isole CpG. Questa trasformazione, benchè reversibile, può avere importanti effetti sulla salute umana ed è dovuta alla sostituzione, a livello del carbonio-5' dell'anello pirimidinico della citosina, di un atomo di idrogeno con un gruppo metilico per formare la 5'-metilcitosina. La valutazione del grado di metilazione del DNA mediante tecniche analitiche rapide e sensibili può essere perciò un utile strumento clinico-diagnostico. In questo lavoro descriviamo una nuova metodica analitica per la misurazione del grado di metilazione del DNA, espresso come rapporto tra la metilcitosina (mC) e le citosina (C) totale, mediante elettroforesi capillare zonale a iniezione inversa. Utilizzando come tampone della corsa una soluzione di Tris 100 mM portata a pH 3.5 con acido fosforico 1 M e utilizzando l'elettroforesi capillare nella modalità "short-end", citosina e metilcitosina erano separate con una buona risoluzione ( $R = 3,4$ ) rispettivamente in 1,1 (% RSD = 0,12%) e 1,2 (RSD% = 0,18%) minuti, con una buona efficienza ( $C = 25,000$  N/m,  $mC = 19,000$  N/m). Il limite di rilevazione (LOD) e di quantificazione (LOQ), valutati dal rapporto segnale-rumore pari, rispettivamente, a 3 e 10 erano  $0,04 \mu\text{M}$  per la citosina e  $0,15 \mu\text{M}$  per la metilcitosina. La misurazione del grado di metilazione del DNA in 71 individui (28 maschi, 43 femmine) apparentemente sani di età compresa tra i 13 e gli 86 anni unitamente ad altri parametri quali i livelli di cisteina, omocisteina e metionina, ha rivelato che la metilazione del DNA correla negativamente con l'età e che la cisteina rappresenta il più importante determinante della metilazione del DNA.

**Bibliografia**

Sotgia S. et al. Journal of Chromatography A 2008;1185:145–150.

**FATTORI CHE INFLUENZANO LA S-OMOCISTEINALAZIONE DELLE LDL**

A. Zinellu<sup>1</sup>, S. Sotgia<sup>1</sup>, S. Sanna<sup>1</sup>, E. Pisanu<sup>1</sup>, B. Scanu<sup>1</sup>, G. Rocca<sup>1</sup>, E. Canu<sup>1</sup>, A. Mannu<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>1</sup>, C. Carru<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari

L'iperomocisteinemia è un importante fattore di rischio per le malattie vascolari e l'aterosclerosi, ma i meccanismi attraverso i quali l'omocisteina (Hcy) esercita i suoi effetti citotossici sono ad oggi poco noti. Poiché le modificazioni delle lipoproteine a bassa densità (LDL) possono aumentare il loro effetto pro-aterogeno abbiamo investigato sui principali fattori che influenzano l' omocisteinilazione delle LDL. Abbiamo misurato mediante elettroforesi capillare con detection laser i livelli di Hcy, cisteina (Cys), cisteinilglicina (Cys-Gly), glutatione (GSH) e glutammilcisteina (Glu-Cys) legati alla apoproteina B delle LDL in 104 soggetti apparentemente sani. La distribuzione dei tioli legati alle LDL differisce dalla distribuzione dei tioli totali nel plasma. In particolare la percentuale di Cys-Gly e di GSH nelle LDL è maggiore di quella degli stessi tioli nel plasma, mentre gli altri tioli sono meno rappresentati nella frazione lipoproteica che nel plasma. Inoltre, i dati ottenuti hanno dimostrato che gli addotti apoB-CysGly, apoB-Hcy, e apoB-Cys sono più elevati negli uomini che nelle donne. La correlazione di Pearson tra i livelli di apoB-Hcy ed i fattori che potrebbero influenzarne la concentrazione quali Cys-Gly, Hcy, Cys, GSH, Glu-Cys, colesterolo totale, LDL, HDL ed età, indicano che solo l'Hcy totale è correlata con i livelli di apoB-Hcy ( $P < 0.0001$ ). Attraverso l'utilizzo dell'analisi multivariata con apoB-Hcy come variabile dipendente e sesso, Cys, Hcy, Cys-Gly LDL e HDL come variabili indipendenti è stato confermato che l'Hcy totale è il principale determinante dei livelli di Hcy legata alle LDL (t-test, 7.979;  $P < 0.0001$ ), ma è stata osservata anche un'associazione positiva con il colesterolo LDL (t-test, 2.068;  $P < 0.041$ ) ed il sesso (t-test, 3.410;  $P < 0.001$ ) mentre una correlazione inversa è stata riscontrata con la Cys (t-test, -1.986;  $P < 0.046$ ) e soprattutto con la Cys-Gly (t-test, -4.003;  $P < 0.0001$ ). Questi dati suggeriscono che la Cys-Gly compete con l'Hcy per il sito di legame sulle LDL e potrebbe così avere un importante effetto protettivo nei confronti dello sviluppo dell'aterosclerosi attraverso la riduzione della concentrazione di Hcy che viene trasferita assieme alle LDL dal plasma allo spazio sottoendoteliale.

**VALUTAZIONE DELLA DISTRIBUZIONE DEI TIOLI LEGATI ALLE LIPOPROTEINE MEDIANTE ELETTROFORESI CAPILLARE**

A. Zinellu<sup>1</sup>, M. Sanna<sup>1</sup>, E. Pisanu<sup>1</sup>, B. Scanu<sup>1</sup>, S. Sotgia<sup>1</sup>, S. Pasella<sup>1</sup>, L. Murgia<sup>1</sup>, E. Canu<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>1</sup>, C. Carru<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dip. Scienze Biomediche, Università di Sassari

I tioli a basso peso molecolare come omocisteina (Hcy), cisteina (Cys), cisteinglicina (Cysgly), glutatione (GSH) e glutamilsteina (Glucys), sono in grado di reagire con un elevato numero di gruppi tiolici presenti nelle proteine e in altre molecole d'interesse biologico. Le proteine plasmatiche tiolate sono state rilevate in individui sani, in pazienti con patologie cardiovascolari e in alcuni tipi cellulari in seguito ad esposizione ad agenti ossidanti. È stato recentemente dimostrato che tra le proteine in grado di legare i tioli vi sono le lipoproteine a bassa densità (LDL), la cui modificazione può avere serie conseguenze sulla funzionalità della proteina stessa, in particolare quando si lega all'Hcy. Recentemente abbiamo descritto un metodo per la misurazione di Hcy, Cys e Cys-Gly legati ad apo-B, tuttavia il metodo non era sufficientemente sensibile per permettere la determinazione dei tioli meno concentrati come glutatione e glutamilsteina (1). Modificando il trattamento del campione e i parametri elettroforetici è stata ideata una nuova metodica in elettroforesi capillare con un limite di quantificazione (LOQ) di circa 1,5 nM, attraverso il quale è stato dimostrato che le LDL legano tutti i tipo di tioli plasmatici. L'incremento della sensibilità rispetto al precedente saggio, è stato ottenuto portando a secco i tioli rilasciati da apo-B dopo trattamento riducente con tributilfosfina (TBP), e successivamente disciogliendoli direttamente in un volume ridotto di tampone di derivatizzazione. Inoltre, aumentando la concentrazione del tampone di corsa anche la selettività risulta migliorata, in particolare quella tra GSH ed un picco residuo di derivatizzante. In particolare la separazione completa degli analiti è stata ottenuta utilizzando un tampone contenente sodio fosfato 30 mM, acido borico 33 mM e N-metil-D-glucammina 75 mM, a pH 11,3, su un capillare da 75 µm ID x 60 cm, in meno di 15 min. Visto il potenziale patologico delle proteine tiolate, il presente metodo può essere usato per comprendere i meccanismi che regolano e bilanciano l'interazione tra tioli e le proteine con gruppi -SH liberi.

**Bibliografia**

1. Zinellu a. et al., Clin Chem. 2005;51:658-60.

**DETERMINAZIONE DEI LIVELLI DI CISTEINA E OMOCISTEINA IN PAZIENTI AFFETTI DA OCCLUSIONE VENOSA DELLA RETINA**

A. Pinna<sup>2</sup>, C. Masia<sup>2</sup>, A. Zinellu<sup>1</sup>, S. Sotgia<sup>1</sup>, R. Chessa<sup>1</sup>, M. Sanna<sup>1</sup>, E. Pisanu<sup>1</sup>, B. Scanu<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>1</sup>, C. Carru<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari  
<sup>2</sup>Clinica Oculistica, Università di Sassari

L'omocisteina (Hcy) e la cisteina (Cys) sono due aminoacidi solforati (aminotioli) potenzialmente citotossici che derivano dal ciclo della metionina. È noto da diversi anni che l'iperomocisteinemia è associata ad eventi trombotici e ad un maggiore rischio cardiovascolare. Di recente anche l'ipercisteinemia è stata indicata quale importante fattore di rischio vascolare. Nel corso di questo studio sono stati determinati i livelli plasmatici di Cys, Hcy, vitamina B12 e folati in pazienti affetti da occlusione venosa della retina (RVO), una importante causa di perdita parziale o totale della vista, per verificare il possibile coinvolgimento degli aminotioli plasmatici in questo tipo di patologia. La determinazione degli analiti è stata effettuata su 75 pazienti RVO e 72 soggetti sani. I pazienti RVO sono stati suddivisi in un gruppo di 33 CRVO e 42 BRVO in base al coinvolgimento del tronco venoso centrale o dei rami della vena retinica. I livelli di Cys e Hcy sono stati determinati mediante elettroforesi capillare con detector laser. Le differenze tra i gruppi sono state valutate mediante test statistici quali t-Student o Wilcoxon test dove appropriato. I risultati dimostrano che non ci sono differenze significative per i livelli di Cys e Hcy tra i pazienti RVO ed i controlli.

In seguito alla suddivisione dei pazienti nelle due sottoclassi è stato riscontrato che i livelli di Cys erano significativamente più elevati nei pazienti CRVO che nei controlli (259.3±50.8 e 237.7±46.4µmol/L rispettivamente P=0.034), mentre BRVO e controlli non mostravano differenze. I risultati ottenuti possono essere in parte spiegati dallo stato nutrizionale dei pazienti. Infatti sono state trovate delle differenze tra pazienti CRVO e BRVO per ciò che riguarda i livelli dei folati, più bassi del 17.3% nei pazienti CRVO. Poiché i folati sono essenziali per la conversione dell'Hcy a metionina nella via della rimetilazione, la riduzione dei folati nei CRVO può essere responsabile di un abbassamento dell'attività di questa via con un incremento invece della via della transulfurazione in cui l'Hcy viene trasformata in Cys. I dati ottenuti suggeriscono che l'ipercisteinemia potrebbe contribuire in qualche modo alla patogenesi dell'occlusione venosa dei rami laterali della vena retinica.

**RUOLO DEL POLIMORFISMO CENTROMERICO HINDIII NELLA REGOLAZIONE DELLA PRESSIONE SANGUIGNA E NELL'INVECCHIAMENTO**

R. Rossi<sup>1</sup>, D. Sanna<sup>2</sup>, C. Franceschi<sup>2</sup>, J.W. Vapuel<sup>3</sup>, A. Zinellu<sup>1</sup>, L. Gaspa<sup>1</sup>, G. Pintus<sup>1</sup>, S. Pasella<sup>1</sup>, C. Carru<sup>1</sup>, L. Deiana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dip. Scienze Biomediche, Università di Sassari*

<sup>2</sup>*Dipartimento di Zoologia e Genetica Evoluzionistica, Università di Sassari*

<sup>3</sup>*Max Planck Institute for Demographic Research, Laboratory of Survival and Longevity, Konrad Zuse Str.1 D-18057 Rostock, Germany*

L'ipertensione essenziale rappresenta un classico esempio di patologia complessa, multifattoriale e poligenica, sessualmente dimorfica, avendo gli uomini una pressione sanguigna significativamente più alta rispetto alle donne di pari età prima della menopausa. Ad oggi sono ancora pochi i dati sulla correlazione tra un polimorfismo centromerico HindIII del cromosoma Y e la pressione arteriosa. Il presente studio si prefigge lo scopo di: 1) valutare la frequenza del genotipo A e B del polimorfismo HindIII nei confronti della pressione arteriosa, 2) valutare la frequenza dei due genotipi con il progredire dell'età in una coorte di pazienti campionati per decenni di età. Per questo studio sono stati reclutati 666 soggetti di età compresa tra i 60 e i 108 anni appartenenti al progetto AkeA. I soggetti partecipanti allo studio sono stati sottoposti a valutazione obiettiva e i principali parametri funzionali sono stati rilevati e inseriti in una apposita cartella clinica. Le procedure di indagine genetica sono state effettuate tramite metodica RFLP secondo quanto descritto da Ellis. La pressione arteriosa sistolica mostra una sostanziale stabilità fino alla decade con età compresa fra 80 e 89 anni per avere poi una diminuzione statisticamente significativa e stabile nella fascia di età compresa fra 90 e 99 anni e da 100 anni in poi. La frequenza relativa dell'allele A (74,2%) risulta significativamente differente nelle diverse fasce di età ( $\chi^2 = 13.2, p=0.010$ ).

I risultati del nostro studio hanno indicato che il genotipo HindIII+/A:

1) è presente con frequenza maggiore, statisticamente significativa, nelle persone con età superiore ad 80 anni e presenta una frequenza crescente dalla età di 60 anni a quella di 80 anni; 2). non si associa ai livelli di pressione arteriosa nell'età superiore a 60 anni; 3) non si associa con i parametri lipidici nè con la funzione renale nè con i principali indicatori antropometrici al variare delle fasce di età considerate; 4). non implica un maggior rischio cardiovascolare come dimostrato dalla assoluta eguaglianza delle curve di sopravvivenza valutate per i due genotipi in funzione del progredire della età.

Bibliografia

Ellis JA, et al. Hypertension 2000;36:731-733.