

3° Congresso Regionale SIBioC
Sezione Sicilia

Dalla Genetica Molecolare alla Biochimica Clinica *in vivo*

Palermo, 4-6 Ottobre 2006

Villa Malfitano, Sede della Fondazione Giuseppe "Whitaker",
Palazzo Chiaramonte Steri, Sede del Rettorato, Sala Magna

Presidenti

Prof. Marcello Ciaccio

Prof. Stefano Micciché

Presidenti Onorari

Prof. Salvatore Macaione

Prof. Antonino Bono

Comitato Scientifico

Dott. Francesco Amato (Palermo)

Prof. Antonino Bono (Palermo)

Prof. Vittorio Calabrese (Catania)

Prof. Marcello Ciaccio (Palermo)

Dott. Giuseppe Falliti (Palermo)

Dott. Franco Ferrara (Agrigento)

Prof. Riccardo Ientile (Messina)

Prof. Salvatore Macaione (Messina)

Prof. Stefano Micciché (Palermo)

Dott. Roberto Pace (Enna)

Prof.ssa Marcella Renis (Catania)

Con il Patrocinio

Ministero dell'Università e della Ricerca

Ministero della Salute

Università degli Studi di Palermo

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Presidenza della Regione Sicilia

Presidenza dell'Assemblea Regionale Siciliana

Provincia Regionale di Palermo

Città di Palermo

Ordine dei Medici Chirurghi della Provincia di Palermo

I riassunti delle presentazioni non sono stati sottoposti ad alcuna revisione editoriale

Letture Magistrali

Le Cellule Staminali: miniere di salute, nonché di... problemi

Francesco Salvatore

Professore di Biochimica Umana, Università degli Studi di Napoli Federico II, Presidente e Coordinatore scientifico del CEINGE-Biotecnologie Avanzate

Il mito di Prometeo riflette un credo antichissimo per l'uomo: quello che parti del nostro corpo possano rigenerarsi. Oggi si parla sempre più di medicina rigenerativa, perché è stato dimostrato che cellule del nostro organismo sono in grado, in opportune condizioni, sia di proliferare al di là di quanto fosse noto in precedenza e sia di differenziarsi o di riprogrammarsi rigenerando gruppi di cellule o addirittura tessuti o perfino parti di organo, dando luogo, così, alla riparazione di quanto sia stato distrutto o alterato per cause patologiche nell'organismo. Queste cellule sono dette "staminali" e si è visto che sono presenti, se non in tutti, in molti tessuti dell'uomo, sia pure in misura diversa e con diversa capacità di proliferazione e differenziazione. Ancor più l'embrione, nelle prime fasi di sviluppo, può essere considerato il naturale serbatoio di cellule staminali, proprio perché costituito da cellule non ancora differenziate e che possono esprimere, quindi, una pluripotenza ed una capacità di espansione sicuramente maggiore delle altre. Tuttavia le cellule staminali da sole non bastano alla finalità rigenerativa complessiva (le potremmo quasi chiamare cellule "ignoranti") e devono essere istruite da fattori, per così dire, di "apprendimento" che indichino loro, da un lato, dove trasmigrare e dall'altro in che tipologia di cellula differenziata trasformarsi. Gli eventi molecolari alla base di tutti questi processi cominciano ad essere sempre più noti, e questo permetterà, con gradualità, di poter intervenire su di essi accelerandoli ed indirizzandoli verso il raggiungimento della finalità da perseguire. Risultano così anche chiare la grande delicatezza e la precisione che sono richieste da interventi di questo tipo, per evitare che essi possano dar luogo a cellule diverse da quelle volute o, ancor peggio, a cellule più suscettibili di trasformazione neoplastica. La scelta delle cellule da utilizzare è anche un problema sul quale c'è molto dibattito, non tanto scientifico (la valenza scientifica è, a mio avviso, solo un riflesso), ma soprattutto di carattere giuridico, etico ed economico: mi riferisco al dibattito sull'uso delle cellule staminali provenienti da embrioni, o prelevate da adulti o dal cordone ombelicale. In realtà, allo stato attuale delle conoscenze, il dibattito è solo foriero di distorsioni, in quanto non è ancora ben nota la biologia delle cellule staminali di varia provenienza o natura e, come si è detto, vi è ancora un lungo cammino da percorrere. Un dibattito non scientifico è prematuro e rischia di portare ad un rallentamento o addirittura ad un arresto nel progresso delle conoscenze nel campo e risulta, pertanto, in principio, pregiudizievole per il progresso e l'economia della conoscenza. L'uso clinico delle cellule staminali è, per alcune specifiche e limitate applicazioni, promettente o persino attuale, ma è errato ingenerare nel pubblico eccessivi ottimismo e trionfalismi che, a volte, invece di riflettersi in un vantaggio per l'avanzamento della scienza, ne menomano solo la credibilità.

1ª Sessione Nuove Frontiere della Biochimica Clinica

MolecularMente: le nuove metodologie per lo studio in vivo dei correlati metabolici delle funzioni cerebrali

Pietro Pietrini

Laboratorio di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dipartimento di Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia, Università degli Studi di Pisa

La prima descrizione della relazione tra attività mentale e circolazione ematica cerebrale risale al 1881, quando il fisiologo torinese Angelo Mosso, osservando il cervello di un paziente con la teca cranica lesionata, notò vere e proprie pulsazioni dei vasi ematici che variavano sistematicamente in rapporto a diverse attività cerebrali, quali la percezione di un rumore o l'esecuzione di un calcolo matematico (1). Fu con le ricerche pionieristiche di Kety e Sokoloff che, a metà del 1900, si cominciarono a comprendere le basi metaboliche del funzionamento del cervello e i rapporti tra attività neuronale-sinaptica, flusso ematico e metabolismo energetico cerebrale (2). A partire dai primi anni '80, infine, lo sviluppo di sofisticate metodologie di esplorazione funzionale del cervello, quali la tomografia ad emissione di positroni (PET) e la risonanza magnetica funzionale (fMRI), ha permesso di esaminare i correlati metabolici delle attività cerebrali in maniera non invasiva direttamente nell'uomo, in condizioni fisiologiche o in presenza di patologie mentali. Utilizzando paradigmi sperimentali sempre più sofisticati si è cominciato a studiare i meccanismi neurobiologici che sottendono non solo le funzioni sensoriali e motorie ma anche i processi cognitivi, le emozioni, il comportamento, la regolazione del tono dell'umore, fino ad arrivare allo studio dei sentimenti e della vita spirituale. Studi condotti in soggetti sani ed in gruppi di pazienti affetti da disturbi psichiatrici, quali la depressione o i disturbi d'ansia, o malattie neurodegenerative, quali la demenza di Alzheimer, hanno permesso di riscontrare alterazioni funzionali associate alla presenza di patologie e di comprendere gli effetti dei trattamenti farmacologici e non farmacologici (3,4). I risultati che provengono da questi studi vanno quindi ad integrare l'osservazione clinica dei fenomeni psicopatologici riscontrati nei singoli pazienti e consentono di indagare il nesso causale tra una determinata manifestazione sintomatologica e alterazioni funzionali presenti in specifiche strutture cerebrali. In questo ambito, lo studio dei correlati cerebrali della modulazione del tono dell'umore e del sonno e dei rapporti che esistono tra alterazioni dello stato affettivo e disturbi del ritmo sonno-veglia sta ricevendo un'attenzione crescente. Non è passato molto tempo da quando i disturbi mentali venivano distinti in organici (es. demenza) e funzionali (es. depressione o psicosi) a seconda che presentassero o meno evidenti alterazioni della struttura cerebrale. Questa distinzione rifletteva semplicemente la nostra incapacità di andare al di là di ciò che potevamo vedere ad occhio nudo. Con le metodologie di esplorazione funzionale del cervello, unitamente al grande sviluppo delle tecniche di biologia molecolare, abbiamo oggi un potentissimo microscopio per osservare i processi biochimici della nostra mente, delle sue sofferenze e dei suoi meccanismi di difesa (5).

Bibliografia

1. Mosso A. Concerning the circulation of blood in the human brain. Verlag von Viet and Company, Leipzig, 1881.
2. Kety SS e Schmidt CF. The nitrous oxide method for the quantitative determination of cerebral blood flow in man: theory, procedure and normal values. J Clin Invest 27:476-83, 1948
3. Pietrini P, Alexander GE, Furey ML, Hampel H, Guazzelli M. The neurometabolic landscape of cognitive decline: *in vivo* studies with positron emission tomography in Alzheimer's disease. Int J Psychophysiol, 37:87-98, 2000
4. Furey ML, Pietrini P, Haxby JV. Cholinergic enhancement and increased selectivity of perceptual processing during working memory. Science, 290:2315-2319, 2000
5. Pietrini P. Toward a biochemistry of mind? Am J Psychiatry, 160:1907-8, 2003.

Diagnostica molecolare in vivo: lo studio non invasivo del metabolismo

Raffaele Lodi

Dipartimento di Medicina Clinica e Biotecnologia Applicata "D. Campanacci" & Dipartimento dell'Area Radiologica, Policlinico S.Orsola-Malpighi, Università di Bologna

La risonanza magnetica (MR) è una tecnica di indagine completamente non invasiva che permette di studiare la biochimica, la fisiologia e morfologia di organi e tessuti. In particolare, la spettroscopia di risonanza magnetica (MRS) permette di quantificare senza l'uso di traccianti radioattivi numerosi metaboliti di interesse biologico. In ambito clinico le indagini di spettroscopia RM del fosforo e, soprattutto, quella del protone hanno trovato largo impiego e vengono spesso associate ad indagini RM convenzionali (MRI). Il valore aggiunto dell'indagine MRS è quello di fornire specificità a quadri MRI non specifici o evidenziare alterazioni metaboliche in assenza di alterazioni strutturali.

La spettroscopia RM del fosforo (^{31}P -MRS) permette di quantificare numerose molecole fosforilate fra le quali ATP, fosfocreatina (PCr) e fosfato inorganico. Inoltre permette di calcolare la concentrazione di ADP, di magnesio libero ed il pH citosolico. In ambito clinico la ^{31}P -MRS, che fornisce informazioni sullo stato bioenergetico tessutale, è utilizzata nella diagnosi ed il follow-up di malattie vascolari, infiammatorie e metaboliche che interessano il sistema nervoso centrale, il muscolo scheletrico e cardiaco. La spettroscopia del protone (^1H -MRS) permette di quantificare numerosi metaboliti con elevata risoluzione spaziale. In ambito clinico è estensivamente utilizzata per lo studio di malattie del sistema nervoso centrale e della prostata. A livello cerebrale i più importanti metaboliti quantificabili sono l'*N*-acetil-aspartato (NAA), il lattato, la colina (Cho), il glutammato, la glutammina, il mio-inositolo (ml) e la creatina-fosfocreatina (Cr). L' NAA è il segnale di risonanza più importante essendo un marker neuronale. Ridotta concentrazione di NAA è tipicamente rilevabile in malattia neurodegenerative come la Malattia di Alzheimer, in aree cerebrali ischemiche o in tumori. Il lattato si accumula tipicamente in presenza di ipossia, ischemia, di tessuto neoplastico in rapida crescita e di deficit della fosforilazione ossidativa (encefalomiopatie mitocondriali). Il segnale della Cho è tipicamente aumentato nelle neoplasie ad alto grado come i glioblastomi. La concentrazione di glutammina è tipicamente aumentata nella encefalopatia epatica in cui si riscontra anche una caratteristica riduzione del contenuto di ml. Nell'ambito della patologia prostatica, mediante l'utilizzo di bobine endorettali, l'uso combinato dell'MRI e della MRS integra il dettaglio anatomico dell'imaging convenzionale con l'informazione metabolica. Con l'MRS è possibile quantificare, con una risoluzione spaziale $< 0.3 \text{ cm}^3$, alcuni metaboliti caratteristici del tessuto prostatico quali: citrato, creatina, colina e poliammine. L'adenocarcinoma è caratterizzato da ridotti/assenti livelli di citrato ed aumento di quelli di colina. Con la MRS è possibile quindi ottenere una sorta di "mappa" metabolica dell'intera ghiandola, direttamente sovrapponibile alle immagini RM. La MRS permette così di caratterizzare metabolicamente regioni prostatiche ad alterata intensità di segnale (ipointensità) e sospette per carcinoma indirizzando il mapping biotico ecoguidato diversamente del tutto random. Nel complesso la MRS rappresenta un metodo ideale per studiare la biochimica tessutale in condizioni patologiche. L'introduzione della MRS nella pratica clinica ha dimostrato l'efficacia di questa tecnica d'indagine non invasive per la diagnosi, lo staging, il planning terapeutico ed il monitoraggio della terapia fornendo informazioni aggiuntive ed evitando procedure più invasive.

Diagnosi precoce delle Malattie da Prioni: imaging molecolare

Caterina Tonon

Dipartimento di Medicina Clinica e Biotecnologia Applicata & Dipartimento dell'Area Radiologica, Policlinico S. Orsola-Malpighi, Università di Bologna

Le Malattie da Prioni sono rari disordini degenerativi del sistema nervoso centrale che possono colpire l'uomo ed altre specie animali, a prognosi infausta. Nell'uomo sono descritte forme sporadiche (malattia di Creutzfeldt-Jakob, sCJD); familiari (fCJD, insonnia fatale fFFI; malattia di Gerstmann Sträussler-Scheinker, GSS), e acquisite con un'infezione (CJD iatrogena, nuova variante della CJD, vCJD; Kuru). La presentazione clinica classica è una sindrome demenziale e/o atassica, associata a miocloni ed altri segni neurologici, a decorso rapidamente progressivo. Sebbene i criteri diagnostici della sCJD siano stati definiti, non sono ancora disponibili test diagnostici *in vivo* dotati di un'elevata accuratezza diagnostica, pertanto la diagnosi definitiva rimane neuropatologica. Negli ultimi anni tecniche avanzate di risonanza magnetica quali la RM di diffusione (DWI) e la spettroscopia di Risonanza Magnetica cerebrale del protone (^1H -MRS) sono state applicate allo studio della microstruttura e del metabolismo cerebrali in diverse condizioni patologiche. La DWI permette un'analisi quantitativa dei movimenti delle molecole di acqua attraverso il calcolo del coefficiente apparente di diffusione dell'acqua (ADC). L'ADC dipende dalle interazioni delle molecole di acqua e l'ambiente chimico circostante, dalla presenza di barriere strutturali presenti a livello cellulare e sub-cellulare che ostacolano il loro moto *in vivo*. Tipicamente, processi patologici che modifichino l'integrità di un tessuto, come le forme neurodegenerative, causano un aumento di ADC. La ^1H -MRS permette di quantificare *in vivo* diversi metaboliti, presenti in concentrazioni mM, con una risoluzione spaziale inferiore ad 1 cm^3 , fra cui l'*N*-acetil-aspartato (NAA), marcatore di integrità e di densità neuronale e il mio-inositolo (ml), indicatore di proliferazione gliale. Al contrario di altre patologie neurodegenerative, nelle malattie da prioni è tipica una riduzione di ADC, prevalentemente a livello di: corteccia cerebrale, caudato, putamen, talamo. Tale tecnica diagnostica presenta una sensibilità e specificità diagnostica superiore al 90%.

Inoltre nelle malattie da prioni si riscontra una marcata riduzione del contenuto di NAA talamico ed un aumento di ml. Tali alterazioni metaboliche hanno dimostrato una significatività statistica rispetto sia ad una popolazione di volontari sani, sia ad un gruppo di pazienti-controllo, reclutati con il sospetto di Malattia da Prioni possibile/probabile, ma in cui il follow-up clinico e strumentale ne ha successivamente escluso la diagnosi. Nella nostra esperienza la sensibilità e specificità diagnostica delle alterazioni spettroscopiche è rispettivamente del 92 e del 100%. Le basi patologiche delle alterazioni di diffusione e metaboliche sono state investigate con il confronto con il quadro neuropatologico. La riduzione di ADC è risultata correlata al grado di spingosi e la riduzione di NAA all'entità della perdita neuronale e gliosi.

Tali risultati indicano che la RM di diffusione e la spettroscopia di RM forniscono accurati marcatori diagnostici precoci *in vivo* nella malattia da Prioni, pertanto tali tecniche dovrebbero essere integrate nel protocollo diagnostico di pazienti con un esordio recente di demenza e/o atassia a decorso rapidamente progressivo.

2ª Sessione

Malattie Gastrointestinali Ereditarie: dal DNA alla Corsia

La diagnosi di malattia celiaca

Antonio Carroccio

Cattedra di Medicina Interna, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo

I criteri diagnostici della malattia celiaca (MC), al pari degli aspetti clinici, epidemiologici e patogenetici, hanno subito nel corso dell'ultimo decennio una evoluzione che ha cambiato alcuni dei comportamenti considerati fino a poco tempo il "gold standard" per la diagnosi. Una protagonista fondamentale del cambiamento nell'approccio diagnostico è stata la "sierologia per la malattia celiaca", cioè l'insieme dei test di laboratorio su sangue che consentono di porre il sospetto di MC. Tali test sono, infatti, divenuti sempre più affidabili perché dotati, in genere, di ottima sensibilità e specificità diagnostica, ed inoltre la maggior parte di essi sono di semplice esecuzione ed alla portata di qualsiasi laboratorio. Per tale motivo, i test sierologici vengono eseguiti come esame di primo livello per confermare o smentire il sospetto di MC ed una loro eventuale positività determina l'esecuzione dell'esame di II livello, che rimane l'esame istologico della mucosa duodenale. Gli attuali criteri diagnostici si basano su quel che è stato approvato dal gruppo di lavoro della Società Europea di Gastroenterologia Pediatrica (ESPGHAN) nel 1990. In quella consensus si affermò che la diagnosi di MC doveva basarsi sui cinque criteri elencati di seguito:

- Presenza di segni clinici compatibili con la diagnosi di MC
- Presenza di test sierologici positivi per MC
- Presenza di lesioni istologiche dei villi intestinali (atrofia), alla biopsia duodenale
- Scomparsa dei sintomi in corso di dieta priva di glutine (gluten-free diet, GF-diet)
- Negativizzazione dei test sierologici per MC, durante la dieta priva di glutine.

Come si può notare, si tratta di un iter diagnostico che prevede un lungo follow-up del paziente, per accertare la "glutine-dipendenza" delle alterazioni sierologiche e dei sintomi clinici. Si può, tuttavia, osservare che questo protocollo, pur mantenendo nel suo iter la biopsia intestinale per dimostrare il danno della mucosa duodenale al momento della prima osservazione, non prevede più l'esecuzione di ulteriori biopsie nelle differenti fasi della malattia. Si tratta dunque di una semplificazione che rende molto meno invasivo l'iter diagnostico; in precedenza, oltre alla biopsia intestinale iniziale, si eseguiva una seconda biopsia dopo circa un anno di dieta gluten-free (per dimostrare la normalizzazione dei villi intestinali), ed una terza biopsia dopo la ri-esposizione al glutine (challenge diagnostico per dimostrare la ricomparsa di lesioni istologiche intestinali glutine-dipendenti). Dunque, i criteri diagnostici più recenti riducono l'importanza della valutazione dell'istologia intestinale, semplicemente perché assumono che i test sierologici (e loro variazioni in risposta alla dieta priva di glutine) riproducono fedelmente la condizione di intolleranza al glutine. Nel corso di questa relazione viene approfondita la conoscenza dei test sierologici per la diagnosi di MC e si discute l'importanza di un corretto approccio all'esame istologico della biopsia duodenale.

La celiachia, aspetti genetici e associazione con altre patologie

Lucia Sacchetti

Cattedra di Biochimica Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Napoli "Federico II"

La celiachia è una patologia intestinale cronica ad eziologia multifattoriale, negli ultimi 15 anni l'idea che fosse una malattia rara che colpisce prevalentemente i bambini si è andata trasformando e si sa oggi che essa è una malattia frequente con una prevalenza nei paesi occidentali di 1/100 che sale al 5-15/100 in gruppi a rischio (soggetti con patologie autoimmuni, etc). Essa colpisce non solo nei primi anni di vita ma anche nell'età adulta (40-50 anni), in particolare, la celiachia nell'adulto si presenta spesso in una forma atipica, senza segni gastrointestinali e pertanto la diagnosi è fatta tardivamente (circa 8-10 anni dalla comparsa dei sintomi), con gravi conseguenze in termini di sviluppo di complicanze e malattie associate (osteoporosi, infertilità, etc.) (1).

Allo sviluppo della patologia concorrono fattori genetici (HLA e non HLA), specifici frammenti peptidici (presenti nel grano, orzo e segale) e fattori ambientali additivi.

Nel mio intervento sottolineerò alcuni degli aspetti inerenti il contributo dell'indagine genetica alla diagnostica della malattia celiaca, alcuni dati inerenti il contributo della genetica alla diagnosi differenziale tra forme tipiche e atipiche, ed infine alcuni risultati che mostrano come la celiachia può essere associata non solo alle patologie autoimmuni, ma anche ad altri tipi di patologie genetiche (2).

Che i fattori genetici giochino un ruolo importante emerge dall'elevato grado di segregazione familiare, circa il 10% dei familiari di 1° grado sono affetti e dall'alto grado di concordanza tra gemelli monozigoti (=75%). Sono stati condotti molti studi di screening genomico e da questi emerge che tra le regioni cromosomiche associate alla celiachia

ci sono regioni HLA e regioni non-HLA. I geni HLA sono sicuramente quelli per i quali sono stati raccolti più dati finora. I geni HLA di classe II (crom 6p21.31) spiegano dal 36 al 53% dell'effetto genico, ma ci sono senza dubbio anche altri geni, basti pensare che il grado di concordanza tra fratelli HLA identici è del 30%, questi altri geni si immagina abbiano un peso simile all'HLA. Nella regione HLA estesa, che si estende oltre quella classica predetta (di 3.6 Mb) per 7.6 Mb, ci sono geni molto interessanti quale il TNF che è overespresso nella celiachia e i geni MIC di cui parleremo tra un momento. Le regioni non-HLA sono state individuate sui cromosomi 5, 2 e 19 e individuano i loci chiamati celiac 2, 3 e 4 (il 2: cluster genico di citochine, il 3: contenente fattori costimolatori CTLA4, ICOS, CD28) (3).

Tra tutte sicuramente la regione CELIAC 1, quella cioè che contiene i geni HLA di classe 2 ha un peso consistente di oltre il 30% nella malattia. I geni del sistema HLA (human leucocyte antigen), furono i primi prodotti genici scoperti sulla superficie dei leucociti e, nonostante inizialmente studiati per la loro abilità a conferire tolleranza in seguito a trapianti di tessuti o organi (MHC major histocompatibility complex), la loro funzione principale è la difesa contro patogeni. Le molecole MHC di classe I presentano antigeni endogeni alle cellule T CD8+, mentre le molecole HLA di classe II presentano antigeni esogeni alle cellule T CD4+, tra le molecole di classe III ci sono quelle del complemento che insieme ad altre proteine, quali le citochine, intervengono nella risposta immune.

Nella celiachia il locus HLA-DQ è quello che media l'effetto legato all'HLA, infatti oltre il 90% dei soggetti affetti posseggono la variante DQ2, questa variante può essere presente in cis cioè i due alleli codificanti per l'eterodimero DQA1*0501/DQB1*0201 sullo stesso cromosoma, o in *trans* quando i due alleli sono su cromosomi diversi. I celiaci che non posseggono il DQ2 posseggono in alternativa il DQ8, l'eterodimero DQA1*0301/DQB1*0302 (circa il 10%) o ½ eterodimero (più raramente).

Quando fare la tipizzazione HLA? Il test non va assolutamente effettuato per finalità diagnostiche, e questo è chiaro considerata la presenza dell'eterodimero in circa il 30-40% della popolazione sana, ma può essere utile nei casi dubbi, quando non è possibile effettuare una biopsia intestinale, nelle forme di celiachia latente e soprattutto nello screening di soggetti a rischio quali i familiari di celiaci. In tal caso la sua negatività (elevato valore predittivo negativo) consente di escludere la presenza o il rischio di sviluppo di celiachia con certezza quasi assoluta. Il vantaggio in presenza di un test negativo è di evitare al soggetto a rischio di sottoporsi periodicamente a test sierologici di screening, e soprattutto di tranquillizzarlo per il futuro. Occorre tuttavia nel contempo sottolineare che un eventuale valore positivo non è indicativo di sviluppo della malattia, ma solo di una predisposizione ad essa e quindi suggerisce l'opportunità del monitoraggio sierologico.

L'osservazione che tutti i soggetti celiaci presentano le molecole DQ2/DQ8, ma che tuttavia queste stesse molecole sono presenti anche in un 30% dei soggetti normali non celiaci, fa concludere che l'eterodimero è una condizione necessaria ma non sufficiente per lo sviluppo della celiachia. In particolare spiega la risposta adattativa al glutine da parte delle cellule T, c'è poi una risposta immune innata mediata dai linfociti intraepiteliali (IELs), quest'ultima contribuisce alla distruzione tissutale che si ha nella celiachia (4). Uno dei geni coinvolti in questa risposta è il gene MICA. Il gene MICA (MICA è una molecola HLA-classe I non classica) è espresso nell'epitelio intestinale e produce una glicoproteina di membrana che presenta piccoli peptidi alle cellule T (CD8+ α/β TCR), rendendole capaci di eliminare le cellule ospiti infettate. L'IL-15, che è overespressa nella lamina propria e nell'epitelio gastrointestinale del celiaco, induce la molecola MICA presente nell'epitelio intestinale, questa si lega al recettore NKGD2 presente sui linfociti IELs (γ/δ -T e α/β - T) e l'interazione ne aumenta l'attività citolitica che porta a distruzione degli stessi enterociti. Il gene MICA svolgerebbe quindi un ruolo importante nella morte dell'enterocita.

Il gene MICA è molto polimorfico e tra i vari polimorfismi descritti un polimorfismo di ripetizione (tripletta gct) nell'esone 5 della porzione transmembrana porta alla formazione di diversi alleli. Tra questi l'allele 5.1, caratterizzato dalla presenza di una ulteriore G nella sequenza dell'allele 5, introduce uno stop codon che impedirebbe alla proteina la traslocazione sulla membrana delle cellule epiteliali. In questo modo MICA non verrebbe esposto sulla superficie dell'enterocita e non potrebbe quindi più legarsi ai linfociti IELs-tramite il recettore NKGD2 (5). Ciò porterebbe quindi ad una ridotta o assente distruzione dell'epitelio intestinale e potrebbe spiegare l'assenza dei sintomi gastrointestinali mostrata da alcuni pazienti celiaci (celiachia atipica). In particolare, in una nostra casistica di celiaci adulti e di controlli dell'area campana l'allele 5.1 è risultato maggiormente presente nei celiaci rispetto ai controlli ed inoltre l'allele 5.1 in omozigosi è risultato più frequente in modo statisticamente significativo nei celiaci atipici rispetto ai celiaci tipici ($p < 0.05$). Tale test potrebbe quindi in futuro supportare la diagnosi di celiachia atipica, forma maggiormente presente nei soggetti adulti.

Le forme atipiche di celiachia rappresentano ancora oggi una sfida diagnostica per il clinico presentandosi con un quadro spesso ambiguo e comune a vari disordini, a questo proposito vorrei sottolineare che anche se ben descritta in letteratura una maggiore frequenza della patologia in altri disordini autoimmuni, per cui soggetti con diabete tipo I, tireopatie autoimmuni, ecc. vengono considerati soggetti a rischio per la celiachia e spesso sottoposti a screening sierologico per gli specifici autoanticorpi, sta emergendo che anche altre patologie potrebbero essere associate, il nostro gruppo ha infatti recentemente segnalato una nuova associazione tra la celiachia e l'intolleranza ereditaria al fruttosio, malattia genetica non autoimmune (2).

Bibliografia

1. Periolo N, Chernavsky AC. Coeliac Disease, *Autoimmunity Reviews* 5: 202-208 (2006)

2. Ciacci C, Gennarelli D, Esposito G, Tortora R, Salvatore F, Sacchetti L. Hereditary fructose intolerance and celiac disease: a novel genetic association. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006 May;4(5):635-8.
3. Robins and Howdle P D Advances in celiac disease *Curr. Opin. Gastroenterol.* 21: 152-161 (2005)
4. Stepniak D and Koning F. Celiac disease-sandwiched between innate and adaptive immunity *Human Immunology* 67:460-468 (2006)
5. Suemizu H et al. A basolateral sorting motif in the MICA cytoplasmic tail *PNAS* 99:2971-2976 (2002)

Celiachia: diagnostica molecolare?

Giuseppe Magazzù

Cattedra di Pediatria Generale e Specialistica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Messina

La celiachia e' una intolleranza permanente al glutine di frumento, orzo e segale, che si determina in persone geneticamente suscettibili.

Fino all'inizio degli anni 90 la celiachia veniva identificata con una enteropatia caratterizzata da un'atrofia subtotale dei villi intestinali, in presenza di sintomi gastrointestinali; sia i sintomi che il danno istologico dovevano regredire a dieta senza glutine, per ricomparire alla reintroduzione del glutine. Su questa base veniva posta la diagnosi definitiva di celiachia. Tale protocollo diagnostico, conosciuto come protocollo ESPGAN (acronimo della European Society for Paediatric Gastroenterology and Nutrition) riconosceva, pertanto, come gold standard, la suddetta atrofia subtotale dei villi all'esame istologico.

Nel corso degli anni 90 venivano sviluppati due importanti filoni di ricerca clinica per la celiachia: il riconoscimento di forme di celiachia "silenti" dal punto di vista clinico, che permetteva la definizione di una incidenza di malattia 6-7 volte maggiore rispetto a quella stimata sulla base dei casi diagnosticati per sintomi prevalentemente gastrointestinali; lo sviluppo di test sierologici che, come nel caso degli anticorpi antigliadina, consentivano il riconoscimento dei casi asintomatici o atipici, dopo conferma istologica.

Alle fine degli anni 90 veniva identificato l'autoantigene patogenetico della celiachia, la transglutaminasi, e venivano sviluppati dei test diagnostici, in immunofluorescenza e in Elisa, per la determinazione degli (auto)anticorpi.

Mediante tali test era possibile identificare casi di celiachia con sintomatologia gastrointestinale assente, soprattutto in paesi, come gli USA, nei quali a torto si pensava che la celiachia fosse rara, nonostante la suscettibilità genetica della popolazione fosse simile a quella europea, dalla quale la gran parte della popolazione nordamericana discendeva.

Nel tempo si e' assistiti sempre piu' frequentemente a casi caratterizzati da sintomi gastrointestinali con lesioni intestinali minime, svelati dal precoce riconoscimento indotto dai test sierologici; tali casi presentavano, il piu' spesso, un grado marcato di atrofia dei villi solo dopo un maggiore carico di glutine nella dieta. Le stesse lesioni intestinali "minime" venivano riscontrate anche in diversi casi di malattie autoimmuni, per le quali era possibile dimostrare una glutino dipendenza o, almeno, una associazione con la celiachia.

Per tale motivo veniva rivista la classificazione istologica per porre la diagnosi di celiachia, valorizzando il concetto di continuum che Marsh aveva suggerito oltre 15 anni prima, secondo il quale esiste un graduale sviluppo della fase di "atrofia" seguente a una iniziale fase infiltrativa.

E' stata prospettata, su questa base, la possibilita' di avviare una dieta senza glutine a condizione che vi sia - in un soggetto con un aplotipo compatibile, nell'ambito dell'HLA di classe II - almeno un infiltrato linfocitario dell'epitelio (> 25/100 enterociti), che sia glutino-dipendente, a maggior ragione se sono presenti gli autoanticorpi patogenetici in circolo.

La definizione del gold standard pertanto e' stata rivista e probabilmente subira' un'ulteriore revisione se saranno confermati i dati gia' dimostrati in due condizioni cliniche, quali la dermatite herpetiforme (a tutti gli effetti da considerare la celiachia con organo bersaglio la pelle e frequente danno intestinale "minimo") e l'atassia criptogenetica, nelle quali con tecniche di immunoistochimica sono stati riscontrati gli anticorpi antitransglutaminasi nella mucosa intestinale e non in circolo.

Il riconoscimento di cloni linfocitari intestinali produttori di anticorpi antitransglutaminasi in soggetti con diabete mellito di tipo I, in assenza di sierologia positiva e di danno istologico, fa prospettare un'espansione del concetto di celiachia, inteso come malattia autoimmune a localizzazione la piu' varia, il cui riconoscimento richiede il superamento del vecchio gold standard.

Le diarree congenite**Roberto Berni Canani**

Dipartimento di Pediatria, Università degli Studi di Napoli "Federico II"

Le diarree congenite sono un gruppo di severe patologie croniche ad elevato rischio di grave disidratazione e mortalità. Per tali motivi la diagnosi precoce di queste condizioni assume un carattere di estrema importanza in associazione ad un approccio terapeutico mirato. Come riportato in Tabella per alcune di queste condizioni è possibile una diagnosi genetica. Il nostro gruppo svolge da tempo la propria attività clinica e di ricerca presso un Centro di III° livello per la cura delle patologie gastrointestinali e genetiche in età pediatrica. Per tali patologie il gruppo svolge anche attività di consulenza per pazienti di altre regioni italiane o provenienti da altre nazioni. In questi ultimi anni è stato costituito nell'ambito della Società Italiana di Gastroenterologia, Epatologia e Nutrizione Pediatrica (SIGENP) un gruppo di lavoro per lo studio ed il management delle diarree croniche su base genetica, coordinato dal nostro gruppo, che vede coinvolti diverse competenze in campo gastroenterologico, immunologico, e genetico-metabolico. Questo gruppo di lavoro opera in stretta collaborazione con la Società Italiana di Neonatologia. La creazione di questo gruppo di lavoro ha permesso la razionalizzazione di un percorso diagnostico assistenziale e di centralizzare la diagnosi genetica di queste patologie.

Malattia	Gene	Locus	Funzione
Difetti di specifici sistemi di trasporto intestinale di elettroliti e nutrienti			
Cloridorea Congenita (OMIM 214700)	SCL26A3 (OMIM 126650)	7q22-q31.1	Scambiatore Cl-/HCO ₃ ⁻
Sodiorrea Congenita (OMIM 270420)	Sconosciuto	22q13.1	Scambiatore Na ⁺ /H ⁺
Malassorbimento Glucosio-Galattosio	SGLT1 (OMIM 182380)	13q33	Cotrasportatore Na ⁺ /Glu (SGLT-1)
Malassorbimento primitivo di acidi biliari (PBAM)	ISBT (OMIM 601295)	7q31.2	Trasportatore ileale Na ⁺ /Sali biliari
Fibrosi cistica (OMIM 219700)	CFTR (OMIM 602421)		Canale del Cl ⁻
Difetti ultrastrutturali dell'enterocita			
Malattia da inclusione dei microvilli (OMIM 251850)	Sconosciuto		Sconosciuto
Enteropatia a ciuffi	Sconosciuto		Sconosciuto
Deficit di Disaccaridasi			
Deficit congenito di Lattasi (OMIM 223000)	Sconosciuto	2q21	Attività idrolasica della Lattasi-florizina
Intolleranza ai disaccaridi (OMIM 222900)	EC 3.2.1.48	3q25-q26	Saccarasi-Isomaltasi
Difetti Multiorgano dei trasportatori			
Abetalipoproteinemia (OMIM 200100)	MTP (OMIM 157147)	4q22-q24	Trasporto microsomale dei trigliceridi
Acrodermatite enteropatica (OMIM 201100)	Sconosciuto	8q24.3	Probabile assorbimento Zn
Disregolazione immunitaria, poliendocrina con enteropatia (OMIM 304790)	FOXP 3 (OMIM 30092)	p11.23-q13.3	Regolatori della trascrizione
Intolleranza alle proteine con lisinuria (OMIM 222700)	y(+)-LAT1 (OMIM 603593)	14q11.2	Trasporto aminoacidi di basici
Sindrome di Shwachman-Diamond (OMIM 260400)	SBDS (...)	7q11	Sconosciuta

Rapporti tra Fibrosi Cistica e Cloridorrea

Chiara Bellia

Cattedra di Biochimica Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo – CEINGE Biotecnologie Avanzate scarl, Napoli

La Fibrosi Cistica (CF) è la malattia genetica autosomica recessiva ad esito letale più frequente nella popolazione caucasica: ne è affetto un neonato ogni 2500-2700 nati vivi e la frequenza dei portatori, asintomatici, è di 1:25 (1). Il gene-malattia codifica per una glicoproteina transmembrana di 1480 amminoacidi (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator, CFTR) espressa nella porzione apicale delle cellule epiteliali dove svolge funzioni di canale per il cloro. Fino ad oggi sono state identificate oltre 1400 mutazioni causali di malattia nel gene CFTR, classificate in base agli effetti sul prodotto proteico: le mutazioni di classe I e II comportano rispettivamente un'alterata sintesi e maturazione della proteina, quelle di classe III e IV un'alterata regolazione e conduttanza ionica del canale e, infine, quelle di classe V alterano la stabilità della proteina. Al momento, l'analisi dell'intera regione codificante del gene CFTR con DGGE, DHPLC o sequenziamento diretto permette di identificare circa il 90% degli alleli CF, ma la detection rate scende ulteriormente se si considerano le forme atipiche di CF di cui si dirà successivamente (2). È possibile ipotizzare, inoltre, la presenza di mutazioni nelle regioni regolatorie, non codificanti (introni, regioni extrageniche) del gene CFTR, oppure mutazioni in geni diversi da CFTR, il cui prodotto genico sia in grado di interagire con l'attività di CFTR, e tra questi alcuni canali ionici della famiglia SLC26 (3).

Gli scambiatori anionici SLC26 (Solute Linked Carrier) costituiscono una famiglia genica che comprende almeno 10 membri i cui prodotti proteici trasportano con differente specificità anioni mono- e bivalenti attraverso la membrana; i trasportatori SLC26 sono coinvolti in svariati processi fisiologici ed alcuni di essi sono correlati allo sviluppo di malattie genetiche ereditarie. Ad esempio, la Cloridorrea congenita (CLD) è una rara malattia genetica, a trasmissione autosomica recessiva (4), caratterizzata da diarrea profusa, acida, molto ricca di ioni cloruro, che si manifesta anche durante la vita intrauterina. La malattia è causata da mutazioni nel gene SLC26A3 che codifica per uno scambiatore anionico Cl-/HCO₃⁻. A tutt'oggi sono note circa una trentina di mutazioni a carico del gene SLC26A3 e causative di malattia. Recentemente, è stato dimostrato che alcuni membri della famiglia SLC26 sono in grado di interagire con CFTR, modulandone l'attività. Inoltre, sembrerebbe che il difetto principale della CF non è una mancanza del trasporto di Cl- in sé, ma un'alterazione a carico della secrezione dei fluidi bicarbonato-mediata, causato dall'incapacità dei mutanti di CFTR di attivare lo scambio Cl-/HCO₃⁻ (5). Successivamente, è stato esteso il collegamento tra CFTR e HCO₃⁻, dimostrando che CFTR specificamente up-regola l'attività di tre membri della famiglia della SLC26. Fondamentalmente, questi studi hanno dimostrato che il trasporto del Cl- e la modulazione dello scambio Cl-/HCO₃⁻ sono attività distinte e separate di CFTR. Inoltre, si è avuta l'evidenza di una diretta interazione molecolare tra CFTR e SLC26A3 (3). Il legame tra i due trasportatori risulta in un'unica, reciproca up-regolazione delle loro attività di trasporto, e ciò spiega come mai la secrezione di fluidi e bicarbonato dipenda dall'espressione di entrambe le proteine. L'interazione non è solo di tipo funzionale: sembrerebbe infatti che esista una reciproca regolazione tra le due proteine, in base a cui l'espressione di SLC26A3 provoca una nuova up-regolazione di CFTR. Inoltre, i livelli di espressione di SLC26A3 sono dipendenti da CFTR in molte cellule epiteliali (6), suggerendo che CFTR regola l'espressione dei geni SLC26. È possibile ipotizzare, dunque, che nei pazienti con CF in cui l'analisi molecolare del gene CFTR non risulti informativa, esistano mutazioni nei geni codificanti i canali SLC26 in grado di ridurre l'interazione SLC26/CFTR e dunque l'attivazione e l'espressione di CFTR.

Le manifestazioni cliniche della forma "classica" di CF, dovute alla presenza di secrezioni esocrine mucose dense, comprendono insufficienza pancreatica esocrina, malattia polmonare cronica ostruttiva con evoluzione verso l'insufficienza respiratoria, epatopatia, diabete e, nella quasi totalità dei maschi affetti, sterilità. In ogni caso, però, l'espressione clinica risulta piuttosto eterogenea, con quadri clinici che possono condurre a morte nei primi giorni o mesi di vita per ileo da meconio o insufficienza respiratoria fino a forme della malattia oligosintomatiche, diagnosticate tardivamente. Negli ultimi anni sono state individuate forme di CF a fenotipo attenuato, dette "atipiche", in cui il quadro clinico si esprime spesso in modo monosintomatico, con prognosi benigna. Numerosi studi nell'ultimo decennio hanno tentato di correlare l'espressione clinica della malattia al tipo di mutazione (correlazione genotipo-fenotipo) con risultati però controversi (7). Inoltre, la discordanza dell'espressione clinica in coppie di fratelli affetti ha escluso un ruolo determinante dei fattori ambientali (ambiente di vita, compliance alla terapia) nella modulazione della gravità del quadro clinico della malattia, suggerendo che l'espressione clinica della CF possa essere modulata da geni differenti, ereditati in maniera indipendente da CFTR e definiti geni modulatori (8). L'effetto di un gene modulatore può essere quello di cambiare l'espressività, la penetranza o la gravità di una malattia. In generale, si tende a pensare che i geni modulatori siano varianti alleliche comuni, con modesto impatto funzionale quando considerati nell'organismo sano, ma che possono agire come "modulatori" in particolari condizioni patologiche. È possibile, pertanto, che in pazienti con CF classica o con forme atipiche della malattia, alcune mutazioni nei geni SLC26 possano rendere più o meno funzionale la proteina a livello dell'organo dove è espressa, e ciò potrebbe modulare l'espressione d'organo della CF.

Bibliografia

1. McIntosh I et al. Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator and etiology and pathogenesis of cystic fibrosis. *FASEB J* 1992;6:2775-2782.
2. Claustres M, et al. Spectrum of CFTR mutations in cystic fibrosis and in congenital absence of the vas deferens in France. *Hum Mutat* 2000;16(2):143-56.
3. Ko et al. Gating of CFTR by the STAS domain of SLC26 transporter. *Nature Cell Biol* 2004;6:343-350.
4. Norio R. Congenital chloride diarrhea, an autosomal recessive disease. Genetic study of 14 Finnish and 12 other families. *Clin Genet* 1971;2:182-192.
5. Ko SB et al. A molecular mechanism for aberrant CFTR-dependent HCO₃⁻ transport in cystic fibrosis. *EMBO J* 2002;21:5662-5672.
6. Chernova MN et al. Acute regulation of the SLC26A3 congenital chloride diarrhea anion exchanger (DRA) expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 2003;549:3-19.
7. The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium. Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1993;18:1308-1313.
8. Salvatore F, et al. Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis: the role of modifier genes. *Am J Med Genet* 2002; 22:88-95.

Il Villaggio Globale della Celiachia**Francesco Cataldo**

Cattedra di Pediatria Generale e Specialistica, Università degli Studi di Palermo

Negli ultimi anni le nostre conoscenze sulla epidemiologia della malattia celiaca sono aumentate: vi è un ampio spettro di presentazione clinica (forme classiche, atipiche, silenti e latenti), l'aspetto istopatologico intestinale varia da gradi più precoci e lievi a gradi più severi (stati di Marsh) ed è stata riconosciuta l'importanza dei fattori genetici (HLA e non HLA correlati) nella patogenesi della malattia. Inoltre l'avvento di nuovi tests sierologici non invasivi ed altamente sensibili e specifici (anticorpi antigliadina, antiendomio e antitransglutaminasi) ha dimostrato che la malattia celiaca è la forma di intolleranza alimentare più comune che interessa, con prevalenze sovrapponibili, (dello 0,5 – 1 % nella popolazione generale e molto più elevata in alcuni soggetti a rischio) tutte le aree del mondo dove viene assunto glutine. Quindi essa è diffusa come in un "villaggio globale", non soltanto tra le popolazioni europee o di origine europea (Stati Uniti, Canada, America Latina, Australia) ma anche tra quelle del Nord Africa, del Medio Oriente e del Sud Asia, dove fino a pochi anni fa era ritenuta rara.

Caso Clinico: il sogno nel cassetto di Gaspare**Giuseppe Primavera**

Pediatria, Palermo

Gaspare nasce dalla prima gravidanza, post-termine, P Kg 4.3. Allattato con latte vaccino adattato, dai 5 mesi l.v. fresco diluito, cresce ma compaiono rigurgiti e vomito sempre più frequente, che ne rallentano la crescita. A 10 mesi viene eseguita pHmetria (assenza di RGE patologico), sulla scorta di un beta-lattotest pos. viene messo a dieta con latte di soia. Il vomito persiste e il peso resta stazionario, per cui a 12 mesi decido di reintrodurre il latte, che viene ben tollerato. Perdo di vista Gaspare, lo rivedo a 21 mesi, la madre mi racconta che da più di 1 mese il bimbo presenta poliuria e polidipsia. Il percorso è breve: riscontro di glicosuria, glicemia a digiuno 180, 2h dopo il pasto 320 mg/dl. Gli AGA sono neg. Inizia una fase di cattivo controllo metabolico, con valori glicemici elevati e fabbisogno insulinico variabile, e Gaspare dopo il primo periodo comincia a perdere di nuovo peso, gli AGA continuano ad essere negativi (AGA IgA 3.2%, IgG 62%), ma gli EmA, disponibili da poche settimane...sono positivi! A 2 anni e 9 mesi la diagnosi di celiachia viene confermata dalla biopsia intestinale. Gaspare viene posto a dieta priva di glutine, il controllo metabolico migliora, la curva ponderale riprende a risalire, le cose vanno benino per più di 1 anno, ma a 4 anni e mezzo ci risiamo, il peso va di nuovo giù. Cosa era successo? Gaspare mangiava di nascosto pane e biscotti, gli EmA erano tornati fortemente positivi. Da allora Gaspare è stato controllato più attentamente dalla mamma, è cresciuto, adesso è un ragazzo di 15 anni con tutti i problemi di un adolescente alle prese con una malattia cronica.

Commento: Siamo in presenza di un bambino con una patologia autoimmune (il diabete tipo I), che poco tempo dopo l'esordio si scopre essere anche celiaco. E' difficile non pensare alla glutine-dipendenza anche della malattia d'esordio. Un recente studio pubblicato su JAMA¹ ha trovato una forte correlazione tra precoce introduzione del glutine e maggiore sviluppo di diabete in neonati geneticamente predisposti.

Volete conoscere uno dei crucci di Gaspare? Il fatto che il papà, celiaco anche lui, si rifiuti di assaggiare il suo pane e la sua pasta.

E il suo sogno nel cassetto? Poter ricevere, prima o poi, un trapianto di pancreas...

3ª Sessione

I Marcatori Biochimico-Clinici nella Patologia Cardiovascolare

Infiammazione e patologia cardiovascolare: uso appropriato della Proteina-C-Reattiva nella pratica clinica

Martina Zaninotto

Dipartimento interaziendale di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera, Padova

La cascata infiammatoria attivata dai ben conosciuti fattori di rischio promoventi l'aterosclerosi (fumo, ipertensione, lipoproteine aterogeniche ed iperglicemia) comprende un elevato numero di marcatori potenzialmente utili come indicatori del processo aterosclerotico e/o predittori di complicanze: citochine, ed in particolare IL-6; molecole di adesione come ICAM-1 e selettine; reattanti della fase acuta, quali fibrinogeno, Siero Amiloide A (SAA) e Proteina-C-Reattiva (PCR); il numero dei leucociti circolanti e la velocità di eritrosedimentazione. Tuttavia non tutti questi *potenziali* marcatori possono diventare *clanicamente* utili. Le caratteristiche desiderabili di un predittore di rischio di Malattia Cardiovascolare (CVD) sono state definite da un Gruppo di Lavoro AHA/CDC¹, che ha emesso una serie di Raccomandazioni sull'uso diagnostico e clinico della Proteina-C-Reattiva, valutata con metodi ad alta sensibilità (hs-PCR), perché presente in concentrazioni modestamente aumentate nella patologia cardiovascolare in fase non acuta. Tra queste raccomandazioni, almeno 2 due attengono al Laboratorio: la capacità di standardizzare il metodo e di controllare la variabilità della misura da un lato, un costo accettabile dall'altro. La valutazione dei potenziali marcatori di infiammazione in CVD alla luce del loro utilizzo nella pratica clinica, della stabilità dell'analita, della disponibilità commerciale, della precisione del metodo e della sua standardizzazione, favorisce la scelta di PCR, in quanto analita stabile, determinabile con metodi di accettabile precisione alle concentrazioni di interesse clinico e con verifiche di qualità esterne già attive (Proficiency testing del College of American Pathologists). La Raccomandazione AHA/CDC¹ afferma infatti che "tra i marcatori di infiammazione correntemente identificati, hs-PCR è il parametro che presenta le caratteristiche più adatte per l'uso nella pratica clinica" (Classe IIa, livello di evidenza B). Tale scelta è ulteriormente supportata dalle recenti evidenze cliniche in base alle quali la proteina non sembrerebbe rappresentare un semplice marcatore di rischio, statisticamente associato con la malattia ma non implicato nella sua patogenesi, ma un vero fattore di rischio, legato casualmente all'instaurarsi, progredire e complicarsi dell'aterosclerosi².

La dimostrazione che l'infiammazione sottostante il processo aterosclerotico viene evidenziata da concentrazioni di PCR inferiori ai tradizionali livelli decisionali dell'analita utilizzati per la diagnostica dell'infiammazione acuta ed in particolare nelle infezioni virali e batteriche, ha reso necessaria la messa a punto di metodi analitici più sensibili rispetto a quelli tradizionali, in grado di determinare con accuratezza e precisione concentrazioni di PCR inferiori a 5 mg/L. Si definisce, hs-PCR, la PCR determinata con questi metodi al fine diagnostico di stratificare il rischio cardiovascolare. Tale precisazione dal punto di vista biochimico ed analitico, risulta di particolare importanza, data la scarsa chiarezza nella terminologia che finora è stata utilizzata.

I risultati di numerosi studi comparsi nella letteratura recente³ supportano comunque l'importanza clinica di inserire nel pannello biochimico di valutazione del rischio cardiovascolare tale determinazione e più recenti meta-analisi eseguite sui dati di 11 studi prospettici, hanno dimostrato un rischio relativo di eventi coronarici maggiori di circa 2 volte (95% CI 1.6-2.5) in pazienti che presentano concentrazioni di tale proteina nel terzile superiore dei valori, rispetto a coloro che si collocano nel terzile dei valori più bassi, e questo indipendentemente dalla valutazione clinica del rischio come pure dalla valutazione del profilo lipidico.

In realtà il consenso sul reale vantaggio di questa determinazione biochimica non è del tutto unanime e le raccomandazioni emesse dalle Società Americane di Cardiologia, relativamente all'utilizzo della hs-PCR sollevano numerose perplessità: la forza delle evidenze sulla base dei criteri della Evidence-Based-Medicine è massima (Classe IIa, Livello di Evidenza B) per la valutazione del rischio cardiovascolare in pazienti classificati a rischio intermedio, come pure per la prognosi e la stratificazione del rischio di eventi cardiaci ricorrenti in pazienti con angina stabile o sindrome coronarica acuta. Al contrario, il suo utilizzo nel monitoraggio dell'efficacia della terapia, come parte della valutazione del rischio cardiovascolare globale in pazienti che non soffrono di cardiopatia (prevenzione primaria) o nell'ambito dell'applicazione di strategie per la prevenzione secondaria presenta un livello di evidenza ancora poco robusto (Classe III, Livello di Evidenza C).

Le problematiche che ancora la comunità scientifica internazionale sta discutendo in associazione alla volontà di iniziare a proporre un utilizzo razionale di tale determinazione, appropriato alle esigenze della popolazione e calato nella realtà sanitaria italiana, ha dato l'avvio ad una serie di incontri tra componenti delle Società di Cardiologia, di Laboratorio, di Medicina Generale, allo scopo di porre le basi analitiche e cliniche di un ampio consenso e di una più condivisa diffusione sull'utilizzo della hs-PCR nella pratica clinica attuale con l'interesse di giungere a raccomandazioni/suggerimenti emanati da tutte le Società scientifiche interessate, ma tipicamente centrate sulle reali esigenze e sulla politica di gestione dei pazienti nella realtà italiana.

Bibliografia

1. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon III RO, Criqui M, et al. Centers for disease control and prevention; American Heart Association. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003;107:499-511.
2. Yeh ET, Palusinski RP. C-reactive protein: the pawn has been promoted to queen. *Curr Atheroscler Rep.* 2003;5:101-5.
3. Scirica BM, Morrow DA. Is C-reactive protein an innocent bystander or proatherogenic culprit? The verdict is still out. *Circulation* 2006; 113:2128-51

Marker biochimico-clinici di patologia vascolare periferica**Antonio Pinto**

Cattedra di Metodi e Didattiche delle Attività Motorie, facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo

L'aterosclerosi è una patologia infiammatoria cronica multifattoriale sotto il controllo del sistema immunitario caratterizzata da un danno endoteliale progressivo e le cui manifestazioni cliniche sembrano coinvolgere una cascata di eventi quali l'adesione dei monociti alle cellule endoteliali, la migrazione transendoteliale, la formazione di placche ateromasiche, il loro indebolimento strutturale ad opera di proteasi, l'ulcerazione e la rottura delle placche, la trombosi e l'ischemia. Contrariamente a quanto avvenuto per altre patologie cardiovascolari come ad esempio l'infarto del miocardio e lo scompenso cardiaco al momento non disponiamo di marker diagnostici per alcune delle manifestazioni cliniche dell'aterosclerosi come la arteriopatia periferica obliterante cronica degli arti inferiori e la placca carotidea. Pur infatti riconoscendo il ruolo delle metodiche ultrasonografiche ed angiografiche nella diagnosi di queste condizioni cliniche è comunque indubbia l'enorme importanza che potrebbe assumere la disponibilità di marker plasmatici in grado di fungere da indicatori biologici della instabilità di placca o della progressione verso la placca complicata o verso gli eventi clinici. Proprio la consapevolezza della ormai riconosciuta natura infiammatoria della malattia aterosclerotica e delle sue complicanze potrebbe in tal senso offrire spunti interessanti per il monitoraggio delle cosiddette "placche vulnerabili" sia a livello del distretto aorto-iliaco-femorale che di quello carotideo.

La progressione di placche aterosclerotiche stabili in placche vulnerabili è infatti verosimilmente legata ad un particolare "microambiente" della placca stessa, a sua volta dipendente da un bilancio tra migrazione/proliferazione cellulare, produzione/degradazione di matrice extracellulare ed infiltrato infiammatorio rappresentato da macrofagi e linfociti T (1,2). È ormai noto che i linfociti T, attraverso la produzione di interferone da un lato stimolano i macrofagi a produrre le metalloproteinasi (MMP), e dall'altro inibiscono la sintesi del collagene. Tale squilibrio tra produzione di collagene e matrice extracellulare e la sua digestione comporta un assottigliamento del cappuccio da cui potrebbero derivare alcuni delle complicazioni di placca a cui collegare molti degli eventi vascolari connessi all'aterosclerosi polidistrettuale. Nonostante queste considerazioni ad oggi soltanto pochi studi hanno analizzato il possibile ruolo dei marker immunoinfiammatori nel monitoraggio della progressione della malattia vascolare periferica su base aterosclerotica.

Nylaende et al (3) hanno mostrato in 127 pazienti con AOP diagnosticata su base angiografica come i livelli sierici di MCP-1, CD40L ed IL-6 siano significativamente associati con la estensione della vasculopatia periferica valutata sulla base di opportuni score angiografici e con la maximum treadmill walking distance. Analogamente Tzoulaki I (4) et al hanno mostrato come i livelli sierici di PCR, IL-6 ed ICAM-1 rappresentino rispetto alle altre variabili infiammatorie valutate, marker affidabili e caratterizzati dal migliore valore predittivo di progressione di malattia.

La natura multifattoriale della malattia aterosclerotica ha inoltre condotto alla valutazione del possibile ruolo predittivo di alcune variabili emocoagulative come ad esempio i livelli di D-dimero e PAI-1/TPA con risultati positivi soprattutto per quanto riguarda il D-dimero come riportato da Unlu et al e McDermott et al (5,6) che hanno rispettivamente mostrato l'associazione positiva tra i livelli di questo marker e la presenza di AOP e l'associazione indipendente tra i livelli di D-dimero oltre che con l'AOP anche con una anamnesi positiva per eventi cardiovascolari e cerebrovascolari.

Questi risultati sottolineano in ultima analisi la natura prettamente infiammatoria oltre che della malattia aterosclerotica anche delle complicanze periferiche ad essa legata prospettando un possibile impiego di alcuni marker immunoinfiammatori anche per la valutazione e stratificazione del rischio cardiovascolare e cerebrovascolare globale del paziente con malattia vascolare periferica rispettivamente del distretto aorto-iliaco femorale o carotideo.

Bibliografia

1. Virmani R, Burke AP, Farb AH, Kolodgie FD. Pathology of the unstable plaque. *Prog Cardiovasc Dis* 2002;44: 349-56.
2. Seeger J, Barratt E, Lawson GA, Klingman N. The relationship between carotid plaque composition, plaque morphology and symptoms. *J Surg Res* 1995; 58: 330-6.
3. Nylaende M, Kroese A, Stranden E, Morken B, Sandbaek G, Lindahl AK, Arnesen H, Seljeflot. Markers of vascu-

- lar inflammation are associated with the extent of atherosclerosis assessed as angiographic score and treadmill walking distances in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Vasc Med.* 2006 Feb;11(1):21-8.
4. Tzoulaki I, Murray GD, Lee AJ, Rumley A, Lowe GD, Fowkes FG. C-reactive protein, interleukin-6, and soluble adhesion molecules as predictors of progressive peripheral atherosclerosis in the general population: Edinburgh Artery Study. *Circulation.* 2005 Aug 16;112(7):976-83.
 5. Unlu U, Karapolat S, Karaka Y, Kiziltune A. Comparison of levels of inflammatory markers and hemostatic factors in the patients with and without peripheral arterial disease. *Thromb Res.* 2006;117(4):357-364.
 6. McDermott MM, Greenland P, Green D, Guralnik JM, Criqui MH, Liu K, Chan C, Pearce WH, Taylor L, Ridker PM, Schneider JR, Martin G, Rifai N, Quann M, Fornage M. D-dimer, inflammatory markers, and lower extremity functioning in patients with and without peripheral arterial disease. *Circulation.* 2003 Jul 1;107(25):3191-8.

Diagnostica genetica molecolare delle Ipercolesterolemie

Maurizio Averna

Cattedra di Medicina Interna, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo

Le Dislipoproteinemie sono le malattie causate da disordini del trasporto dei lipidi plasmatici. E' possibile classificarle in forma primitive - prevalentemente genetiche - e secondarie ad altre patologie o all'uso di farmaci. La tipizzazione e l'inquadramento diagnostico delle varie forme di Dislipoproteinemia si è basata per anni sul fenotipo biochimico. I progressi compiuti dalla genetica e biologia molecolare consentono oggi per molte forme di Dislipoproteinemia di identificare sia il difetto molecolare che la modalità di trasmissione all'interno delle famiglie affette. L'identificazione precoce dei soggetti portatori di forme genetiche di Dislipoproteinemie aterogene-Ipercolesterolemia Familiare dominante e recessiva, Iperlipidemia familiare combinata, Disbetalipoproteinemia ed Ipoalfalipoproteinemia- rappresenta una priorità sul piano della prevenzione delle malattie cardiovascolari

Malattie Cardiovascolari: aggiornamenti nella diagnostica di laboratorio

Claudio Galli

Medical Marketing & Scientific Training Manager, Abbott Diagnostici, Roma

La diagnosi di infarto miocardico acuto (IMA) è stata modificata nel 2000 da un gruppo di lavoro congiunto delle Società Europea ed Americana di Cardiologia (ESC/ACC). Questo documento congiunto (1), oltre a stabilire il "continuum" della lesione ischemica cardiaca dall'angina stabile all'infarto miocardico franco, ha ribadito la centralità diagnostica della determinazione della troponina cardiaca, suggerendo all'uopo l'impiego di una soglia unica di "anormalità" per TnI, stabilita in base al valore corrispondente al 99° percentile della distribuzione dei risultati in una popolazione sana, ovvero ad un valore ad esso superiore per il quale il test in uso garantisca una (im)precisione totale del 10%; per contro, le antecedenti indicazioni degli specialisti di laboratorio (2) prevedevano l'adozione di due valori soglia, il primo in corrispondenza del 97,5° percentile della distribuzione nei soggetti sani (soglia limite di normalità), e il secondo da valutare, per i pazienti con infarto miocardico, mediante curve ROC (receiver-operating characteristics), in base alle raccomandazioni NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) in merito alla determinazione del valore soglia per i test quantitativi.

Sin dalla pubblicazione del documento ESC/ACC si era stimato che la revisione della definizione di malattia coronarica in seguito all'adozione dei criteri suggeriti dai cardiologi avrebbe portato ad un incremento del numero delle diagnosi di infarto miocardico acuto (IMA), fino al 20-30% all'anno. Nella realtà, queste stime si sono rivelate errate per difetto: alcune osservazioni preliminari (3, 4) hanno messo in evidenza un aumento del 25-30%, ma una recente esperienza ha rivelato come, in un gruppo di 258 pazienti ben caratterizzati nei quali erano stati ottenuti due prelievi ad almeno 6 ore di distanza, l'aumento delle diagnosi di IMA adottando come soglia il 99° percentile della popolazione sana in luogo dei classici criteri WHO sia stato superiore all'80% (5).

Oltre a questi problemi clinici e gestionali, la principale difficoltà nell'adozione della "soglia unica" proposta dai cardiologi è la mancata coincidenza dei due valori (99° percentile e 10% di CV) per tutti i dosaggi esistenti in commercio (6). Inoltre, i valori ottenuti sono in ogni caso specifici del dosaggio in uso e non possono essere adottati indiscriminatamente per qualsiasi test. E' noto infatti che i dosaggi per troponina I forniscono risultati spesso assai diversi a causa delle differenze negli epitopi riconosciuti dagli anticorpi impiegati e della mancanza di standardizzazione, cioè di un materiale primario di riferimento. I valori di concentrazione assoluti ottenuti con i diversi test possono quindi differire anche di diverse volte, anche se il valore di correlazione tra dosaggi diversi è spesso accettabile o anche molto buono.

Le nuove raccomandazioni hanno fatto sì che per ogni dosaggio per troponina I o T le ditte produttrici indichino nell'inserito quattro diverse "soglie": la sensibilità analitica (limite inferiore di rilevazione, valutato mediante repliche multiple di un calibratore concentrazione di analita pari a zero e del primo punto della curva di calibrazione), il limite di riferimento al 99° percentile di una popolazione sana, la concentrazione più bassa alla quale i test mostrano una

imprecisione del 10%, e infine il "cutoff" per IMA stabilito mediante curva ROC, in base alle raccomandazioni usuali per i test quantitativi. A titolo di esempio, per uno dei dosaggi di ultima generazione per troponina I (Architect TnI stat) i valori riportati nell'insero (Figura 1) sono i seguenti:

sensibilità analitica 0,003 $\mu\text{g/L}$

99° percentile in soggetti sani: 0,015 $\mu\text{g/L}$

valore minimo con 10% di CV totale: 0,032 $\mu\text{g/L}$

soglia stabilita mediante curva ROC (174 pazienti IMA e 778 non-IMA) = 0,3 $\mu\text{g/L}$

E' evidente da questi dati che l'unicità della soglia diagnostica prospettata dal documento ESC/ACC appare inficiata dalla mancata corrispondenza dei due valori, cosa peraltro evidenziata nel 2004 dal comitato IFCC per la standardizzazione dei marcatori di danno miocardico (6). A questo proposito è opportuno considerare come il 99° percentile di troponina I in una popolazione realmente sana, e quindi priva di patologia miocardica ischemica, oltre ad essere influenzato dalla numerosità e dal tipo di popolazione arruolata (donatori ovvero soggetti ambulatoriali o con altra patologia), dovrebbe per definizione essere prossimo allo zero, o alla sensibilità analitica dei metodi, che allo zero è sempre più prossima. Per contro, il valore di imprecisione al 10%, essendo prettamente analitico, dovrebbe essere molto più "robusto" e riproducibile, ed in effetti così è, dal momento che esperienze diverse, relative sempre al dosaggio Architect TnI, hanno mostrato valori analoghi (7, 8, 9) (Figura 2). Dato che solamente in una delle esperienze sinora condotte è stata osservata la coincidenza dei due valori (10) ai fini pratici appare quindi consigliabile l'adozione, come soglia di patologia miocardica, del valore corrispondente ad un CV totale del 10%. Oltre agli studi già citati (9,10), una recente esperienza italiana ha permesso di confermare la migliore sensibilità clinica della determinazione di valori bassi di troponina I (11): su una coorte di 108 pazienti consecutivi con sospetta patologia miocardica ischemica, 16 sono stati diagnosticati come IMAi: di essi, solamente il 37,5% erano positivi per troponina I sul primo prelievo utilizzando la soglia ROC di 0,3 $\mu\text{g/L}$, mentre l'87,5% presentava livelli superiori alla "sensibilità funzionale" di 0,032 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0,01$).

Un altro punto rilevante da un punto di vista diagnostico è l'eterogeneità molecolare della troponina (12) e le conseguenti difficoltà di standardizzazione dei dosaggi, o meglio la mancanza della medesima. Dal momento che solo nel 2006 è stato stabilito un possibile standard di riferimento (13), appare in realtà più coerente parlare di armonizzazione dei dosaggi, ma oltre a ciò va messo in evidenza come la maggiore o minore sensibilità dei test dipendano fortemente dalla combinazione anticorpale selezionata dal produttore; recenti evidenze indicano l'importanza dell'impiego di anticorpi diretti contro la porzione N-terminale della molecola, e segnatamente dei residui amoniacidici 24-40 e 41-49 per garantire una migliore sensibilità clinica (9).

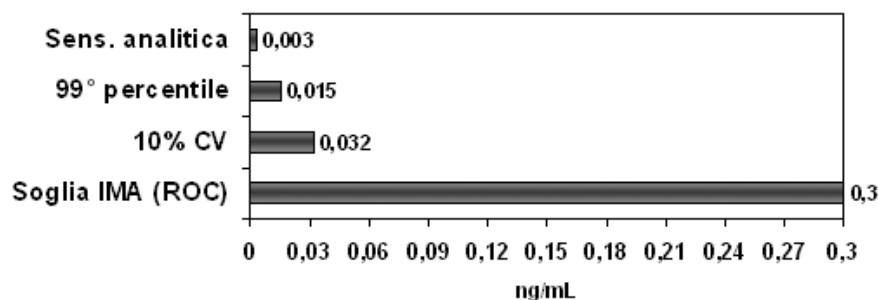


Figura 1

Sensibilità analitica e funzionale e soglie decisionali per il dosaggio automatizzato Architect TnI stat

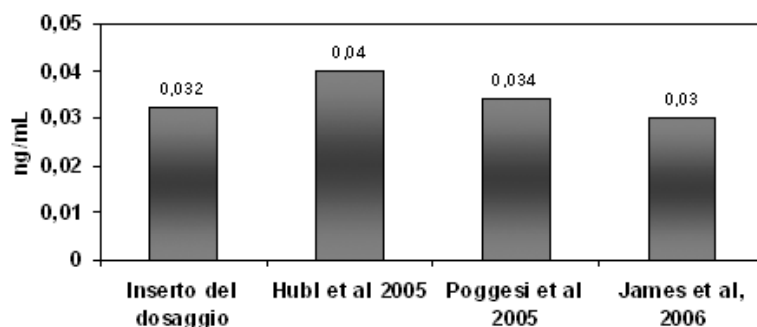


Figura 2

Concentrazione di troponina I alle quali il dosaggio Architect TnI stat mostra una variabilità totale < 10%: confronto tra il valore riportato nell'insero del metodo e quello rilevato in tre studi indipendenti

Un'altra sfida diagnostica nella patologia miocardica ischemica è rappresentata dagli indici prognostici; la valutazione iniziale del danno dovrebbe infatti essere accompagnata da alcuni esami dotati di adeguata predittività, al fine di poter impostare correttamente, oltre alla gestione diretta dell'emergenza ischemica, anche un adeguato follow-up dei pazienti. In tal senso, sono disponibili diversi parametri ed altri lo saranno di "routine" in un prossimo futuro; tra i primi, la determinazione dell'isoenzima MB della creatina chinasi (CK-MB), pur avendo perso rilevanza nella diagnosi iniziale, rimane un prezioso strumento di monitoraggio e indice di dimensionamento della lesione ischemica. Maggiormente utili per valutare l'evoluzione della placca aterosclerotica potrebbero essere ad esempio la mieloperossidasi (MPO), indice di destabilizzazione della placca, e il fattore di crescita placentare (PIGF), che consente invece di valutare il rischio di rottura della placca.

Un discorso a parte merita la determinazione del peptide natriuretico di tipo B (BNP): questo ormone, prodotto prevalentemente, ma non esclusivamente, dai fibroblasti del ventricolo sinistro, è un fattore rilevante nell'omeostasi circolatoria, venendo secreto rapidamente e con breve emivita (20') in seguito a stimolo meccanico (stress della parete ventricolare) e/o ormonale e che esercita le sue principali funzioni ipotensive a livello del tubulo prossimale e della parete arteriolare. Non si tratta quindi di un semplice marcatore, ma di una sostanza bioattiva antagonista del sistema renina-angiotensina-aldosterone, la cui determinazione è di rilevanza diagnostica acclarata per l'esclusione dello scompenso cardiaco. Diverse osservazioni hanno peraltro consentito di stabilire l'elevato valore prognostico del BNP in pazienti con patologia miocardica ischemica (14).

Bibliografia

1. Alpert JS, Antman E, Apple F, Armstrong PW, Bassand JP, de Luna AB, et al. Myocardial infarction redefined: a consensus document of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:959-69.
2. Wu AHB, Apple FS, Gibler WB, Jesse RL, Warshaw MM, Valdes R Jr. National Academy of Clinical Biochemistry Standards of Laboratory Practice: recommendations for use of cardiac markers in coronary artery disease. *Clin Chem* 1999; 45: 1104-21.
3. Trevelyan J, Needham EWA, Smith SCH, Mattu RK. Impact of the recommendations for the redefinition of myocardial infarction on diagnosis and prognosis in an unselected United Kingdom cohort with suspected cardiac chest pain. *Am J Cardiol* 2004; 93: 817-821.
4. Amit G, Gilutz A, Cafri C, Reuben AW, Zahger ID. What have the new definition of acute myocardial infarction and the introduction of troponin measurement done to the coronary care unit? *Cardiology* 2004; 102: 171-176.
5. Kaysak PA, MacRae AR, Lustig V, Bhargava R, Vandersluis R., Palomaki GE, Yema M-J, Jaffe AS. The impact of the ESC/ACC redefinition of myocardial infarction and new sensitive troponin assays on the frequency of acute myocardial infarction. *Am Heart J* 2006; 152: 188-125.
6. Panteghini M, Pagani F, Yeo K-TJ, Apple FS, Christenson RH, Dati F, Mair J, Ravikilde J, Wu AHB. Evaluation of imprecision for cardiac troponin assays at low-range concentrations. *Clin Chem* 2004; 50 (2): 327-332.
7. Hubl W, Demant T, Gladrow E. Evaluation of the Architect STAT Troponin-I assay. *Clin Lab* 2005; 51: 251-255.
8. Poggesi M, Galli C, Scarà MT, Rapi S, Brogioni M. Valutazioni analitiche di marcatori di danno miocardico su Architect ci8200. *SIBioC* 2005
9. James S, Flodin M, Johnston N, Lindhal B, Venge P. The antibody configurations of cardiac troponin I assays may determine their clinical performance. *Clin Chem* 2006; 52 (5): 832-837.
10. Lam Q, Black M, Youdell O, Splisbury S, Schneider H-G. Performance evaluation and subsequent clinical experience with the Abbott automated Architect STAT Troponin-I assay. *Clin Chem* 2006; 52 (2): 298-300.
11. Brunati P, Colzani C, Galli C, Terramocci R. Determinazione bassi livelli di troponina I in pazienti con sospetto di malattia ischemica coronarica. *SIBioC* 2005.
12. Bunk DM, Dalluge JJ, Welch MJ. Heterogeneity in human cardiac troponin I standards. *Anal Biochem* 2000;284:191-200.
13. Bunk DM, Welch MJ. Characterization of a new certified reference material for human cardiac troponin I. *Clin Chem* 2006; 52 (2): 212-219.
14. De Lemos JA, McGuiere DK, Drazner MH. B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease. *Lancet* 2003; 362: 316-322.

4ª Sessione

La Malattia Diabetica tra Laboratorio e Clinica

Autoimmunità pancreatica clinica e diagnostica

Marco Songini

U.O.C. di Diabetologia, Ospedale San Michele, Azienda Ospedaliera G. Brotzu, Cagliari

Il Diabete di tipo 1, inquadrato in base all'ultima classificazione 1997 dell' ADA, è distinto in due categorie:

A) autoimmune, caratterizzato dalla presenza di autoanticorpi anti pancreas endocrino, e

B) idiopatico, meno frequente, nel quale non è presente alcun segno di autoimmunità.

Il tipo immunomediato risulta dalla distruzione autoimmune cronica selettiva delle cellule beta pancreatiche, in individui geneticamente predisposti ed innescata da fattori ambientali.

Una delle prime evidenze che l'autoimmunità era coinvolta nelle patogenesi del diabete tipo 1 A fu presentata da Bottazzo e coll. nel 1974, con la scoperta degli ICA (poi estesa ad altre specificità autoantigeniche della betacellula pancreatica).

Tali autoanticorpi, e con essi gli altri scoperti successivamente, non sono patogenetici (essendo il danno beta cellulare mediato dai T linfociti), ne rappresentano probabilmente un epifenomeno ma allo stesso tempo sono gli unici marcatori sierologici di autoimmunità disponibili.

L'importanza della determinazione degli anticorpi antiinsula è dovuta al fatto che nella maggior parte dei casi di diabete di tipo 1 A essi appaiono in circolo già in fase prediabetica, ancora del tutto asintomatica. Utilizzandoli correttamente è pertanto possibile un inquadramento diagnostico più precoce e preciso nonché la realizzazione pratica ed efficace di eventuali interventi di tipo preventivo.

Sono stati individuati sino ad ora numerosi anticorpi rivolti verso varie strutture dell'insula; la diagnostica è attualmente orientata verso la ricerca degli ICA (Islet Cell Autoantibodies), GADA (Glutamic Acid Decarboxylases Autoantibodies), IAA (Insulin Autoantibodies), IA-2 (IA-2A Autoantibodies). Inoltre ha rappresentato un grosso progresso diagnostico il fatto che, a parte gli ICA, determinabili mediante IFI come verrà menzionato in seguito, per la determinazione dei GADA, IAA e IA-2 i rispettivi antigeni sono stati ottenuti con tecniche di DNA ricombinante, quindi altamente purificati, evitando così reazioni aspecifiche. Questo non è ancora possibile con gli antigeni verso cui sono diretti gli altri autoanticorpi scoperti, per i quali peraltro non è ancora chiaramente dimostrata una predittività paragonabile a quella degli anticorpi testati citati.

I GADA, IA-2 e IAA possono così essere determinati con metodiche radioimmunologiche altamente sensibili, specifiche (validate da Workshop internazionali come metodiche di riferimento) e sono inoltre evidenziabili su spot e su sangue capillare.

Secondo le linee guida elaborate dall' Immunology of Diabetes Society (IDS), i familiari di primo grado di soggetti con diabete tipo 1 A dovrebbero eseguire un esame di primo livello che prevede la determinazione dei GADA e IA-2 (o IAA nel caso che l'età inferiore a 15 anni). I soggetti riscontrati positivi per almeno un marcatore dovrebbero essere esaminati successivamente per la presenza di ICA più IA-2 o IAA. Tenendo conto che non tutti i soggetti positivi sviluppano la malattia ma semplicemente hanno un rischio maggiore di svilupparla rispetto ai negativi, la valutazione del rischio è associata al titolo ed al numero di anticorpi presenti. La presenza di un solo marcatore ha uno scarso significato, significato che è ancora inferiore se l'anticorpo è presente a basso titolo (ad eccezione che nei bambini, in cui il rischio in tal caso merita una ponderata attenzione anche in monopresenza a basso titolo); il rischio è circa del 50 % nei soggetti positivi per almeno due o tre anticorpi e dell'80 % in caso di presenza contemporanea di tutti i 4 anticorpi. Tali percentuali sono state calcolate in familiari di primo grado non essendo attualmente possibile una stima precisa del rischio nei casi senza positività familiare in cui comunque, anche in tal caso, aumenta con l'aumentare del numero di anticorpi contemporaneamente presenti nello stesso individuo, specie in regioni ad elevato rischio di malattia come Finlandia e Sardegna.

La loro utilità è stata inoltre dimostrata anche nella sorveglianza dei pazienti sottoposti a trapianto di pancreas: la loro ricomparsa o aumento rappresenta infatti un indice prognostico sfavorevole di sopravvivenza dell'organo trapiantato.

ICA

Furono scoperti da Bottazzo e collaboratori nel 1974 in soggetti con poliendocrinopatia e/o diabete. Infatti mentre nel diabete di tipo 1A i vari anticorpi possono essere presenti anche solo transitoriamente, nelle sindromi poliendocrinopatiche persistono nel tempo.

La frequenza degli ICA risulta mediamente del 70 % all'insorgenza della malattia, del 50 % dopo 6 mesi, del 35 % dopo 2 anni e del 15 % oltre i 2 anni. Vengono rilevati in immunofluorescenza indiretta su pancreas umano di gruppo 0, evitando così la rivelazione di antigeni gruppo specifici contro cui possono reagire isoanticorpi naturali presen-

ti nel siero in esame rendendo difficile l'interpretazione del preparato.

La concentrazione di tali anticorpi nel siero viene espressa in UI-JDF (Juvenile Diabetes Federation) sulla base di un Siero Standard Internazionale di riferimento di concentrazione pari a 80 JDF. Il problema principale consiste nel reperimento del pancreas adatto da cadavere donatore di organi. Un'alternativa può essere rappresentata dall'uso del pancreas di primate ma con sensibilità e specificità nettamente inferiori. Gli ICA sono rivolti contro un' eterogeneità di antigeni bersaglio dell' insula, non solo quelli riconosciuti dagli anticorpi GADA, IA-2 e IAA, ma anche altri antigeni non tutti ancora caratterizzati.

IAA

Scoperti da Palmer nel 1983. L'insulina è stato il primo autoantigene ad essere caratterizzato da un punto di vista molecolare. Gli IAA sono rivolti contro l' insulina nativa: non devono essere determinati dopo l'inizio della terapia insulinica, poiché pochi giorni dall'inizio della terapia si ha la produzione di IAA indistinguibili da quelli contro l'Insulina nativa. Riconoscono un epitopo conformazionale dell'insulina con leucina in posizione 13 della catena alfa (la sostituzione di questo aminoacido comporta la perdita del legame degli IAA all' insulina). Possono essere presenti in altre malattie autoimmuni (S. di Hashimoto, LES, epatiti trattate con Interferon, Malattia di Hirata).

Gli IAA sono un marcatore precoce di autoimmunità, nella prima infanzia sono i più frequentemente trovati e spesso in tale età la loro comparsa precede quella degli ICA, GADA e IA-2. Sono inoltre caratterizzati dalla rapida scomparsa. Gli IAA sono determinabili con metodiche radioimmunologiche utilizzando Insulina marcata con I125

GADA

Sono caratterizzati da prolungata persistenza dopo l'esordio della malattia, sono quindi determinanti nella diagnostica del LADA (Latent Autoimmune Diabetes of Adults).

Nel 1982 Baekeskov scoprì che sieri di diabetici tipo 1A messi in contatto con lisati di cellule insulari precipitavano una proteina da 64 kDa che invece non era precipitata da sieri di non diabetici. Trattando con tripsina tale proteina si otteneva un frammento da 50 kDa. Nel 1990 Baekeskov scoprì che tale frammento corrispondeva all'enzima Glutammato Decarbossilasi (GAD). Infatti sieri di pazienti con Stiff Man Syndrome (SMS) precipitavano tale frammento. La SMS è caratterizzata da aumento del tono muscolare e ridotta capacità di rilasciare i muscoli volontari per carenza di GABA (un neurotrasmettitore inibitorio) dovuto alla carenza di GAD, enzima che catalizza la trasformazione dell' acido glutammico a GABA (1/3 dei pazienti con SMS è anche diabetico). Era quindi ragionevole ipotizzare che il GAD è un autoantigene sia nella SMS che nel diabete tipo1. Infatti mettendo in contatto sieri di diabetici tipo 1 con GAD questo veniva precipitato per la presenza del GADA: a questo punto gli stessi sieri non erano più in grado di precipitare il frammento da 50 kDa.

Esistono due isoforme di GAD, da 65 e 67 kDa. I GADA riconoscono prevalentemente la forma da 65. La GAD è espressa prevalentemente nel sistema nervoso ma è stata trovata anche nel rene e nelle insule pancreatiche. E' ancora controversa la sua espressione nelle gonadi, tube di Fallopio e midollare del surrene.

E' tutt'ora allo studio il possibile ruolo patogenetico svolto dai GADA sull' immunità cellulo-mediata. I GADA sono determinabili con metodiche radioimmunologiche utilizzando S35 o I125.

Conclusioni

Sembra opportuno concludere con la considerazione che le determinazioni degli autoanticorpi menzionati andrebbero eseguite a seguito di una richiesta specifica del diabetologo ed interpretate nel contesto di un sospetto diagnostico. Sarebbe preferibile che le determinazioni dei GADA, IAA e IA-2, per i quali esistono in commercio kits di buona sensibilità e specificità, fossero comunque eseguite solo presso i centri di riferimento.

L'esecuzione presso centri specializzati è sostanzialmente obbligatoria per la determinazione degli ICA, eseguiti con tecnica IFI su pancreas umano espresso in JDF.

Abbreviazioni:

ADA: American Diabetes Association

GABA: Gamma Aminobutyric Acid

GAD: Glutammato Decarbossilasi

GADA: Glutamic Acid Decarboxylases Autoantibodies

ICA: Islet Cell Autoantibodies

IA-2: IA-2A Autoantibodies

IAA: Insulin Autoantibodies

IDS: Immunology of Diabetes Society

IFI: Immuno Fluorescenza Indiretta

JDF: Juvenile Diabetes Federation

LADA: Latent Autoimmune Diabetes of Adults

SMS: Stiff Man Sindrome

Nefropatia Diabetica: ruolo del laboratorio

Giovanni Cerasola

Cattedra di Medicina Interna, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo

Come è ben noto, la malattia diabetica si associa con un'elevata incidenza di malattie cardiovascolari, mentre circa il 40% della popolazione diabetica è esposto al rischio di sviluppare la nefropatia diabetica. Quest'ultima è divenuta la prima causa di insufficienza renale terminale nel mondo occidentale, divenendo, quindi, la prima causa di accesso al trattamento dialitico sostitutivo dei pazienti che incidono sulla dialisi, immediatamente seguita dall'ipertensione arteriosa. E' pertanto chiaramente deduttiva l'importanza che nella pratica clinica hanno assunto l'identificazione precoce della nefropatia stessa ed il conseguente trattamento nefro-protettivo da attuare nei pazienti esposti al rischio. I principali indici clinici d'identificazione precoce della nefropatia diabetica sono rappresentati dalla microalbuminuria e dalle modificazioni della filtrazione glomerulare.

Infatti, i pazienti diabetici e microalbuminurici (escrezione urinaria compresa tra 30 e 300 mg/die) hanno un rischio di sviluppare la nefropatia clinica da 10 a 20 volte maggiore di quelli non microalbuminurici; inoltre, la presenza di microalbuminuria e/o di insufficienza funzionale renale si associano con un elevato rischio di mortalità cardiovascolare.

Microalbuminuria e filtrato glomerulare sono dosabili con metodiche di laboratorio differenti e su campioni raccolti con modalità differenti. Esistono quindi cut-off points di riferimento diversi in relazione al tipo di raccolta impiegato.

Sono poi utilizzabili altre più sofisticate indagini di laboratorio come il dosaggio del TNFalfa e del TGFbeta o del VEGF per la valutazione dell'attivazione di natura infiammatoria ed endoteliale coinvolte nella fisiopatologia delle nefropatia diabetica.

Il Laboratorio nella gestione delle complicanze del diabete: raccomandazioni per la misura di lipidi e proteine

Maria Stella Graziani

Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche, Ospedale Civile Maggiore, Azienda Ospedaliera, Verona

L'intervento, partendo dalle linee guida esistenti riguardanti la prevenzione e la gestione delle complicanze micro e macrovascolari del diabete, esamina in ruolo del Laboratorio in questo ambito. Per quanto riguarda la malattia cardiovascolare, vengono trattati sia le alterazioni del metabolismo lipidico in questa popolazione, che le caratteristiche che le tecniche di misura devono possedere per rispondere al meglio alle esigenze di diagnosi e di monitoraggio in questo particolare ambito. Attenzione viene anche data al ruolo dell'infiammazione e alla misura degli indicatori di flogosi. La diagnosi e il monitoraggio della nefropatia diabetica vengono affrontate attraverso l'analisi delle caratteristiche che i test di screening e di conferma devono possedere per rispondere alle esigenze cliniche di questi pazienti.

Un accenno viene fatto riguardo al problema emergente della misura della albumina urinaria "immunologicamente non reattiva"

Standardizzazione IFCC e campagna mondiale per il diabete

Andrea Mosca

Cattedra di Biochimica Clinica, Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali, Università degli Studi di Milano

La Federazione Internazionale di Chimica Clinica (IFCC) ha attivato nel corso degli ultimi anni diversi gruppi di lavoro con obiettivi applicativi ben definiti nel campo della standardizzazione di metodologie analitiche. Per l'emoglobina glicata è attivo un gruppo di studio (IFCC WG-HbA1c) che ha ad oggi praticamente raggiunto tutti gli obiettivi previsti. Il risultato complessivo di tali attività, ben documentate in una serie di pubblicazioni (tutte reperibili sul sito www.ifcchba1c.com), ha comportato che le misure di emoglobina A_{1c} effettuate con tale sistema di riferimento forniscono valori decisamente più bassi (di circa 1-2 unità % dell'emoglobina totale) rispetto a quelli ottenuti con le metodiche alle quali si è attualmente allineati, tutte generalmente calibrate secondo le attività coordinate dallo National Glycohemoglobin Standardisation Program, NGSP (www.missouri.edu/~diabetes/ngsp.html). Questo costituisce di fatto il principale scoglio alla pronta utilizzazione del nuovo sistema di riferimento IFCC, che richiede evidentemente un'adeguata campagna informativo-educazionale che è in corso di organizzazione in collaborazione con tutte le principali società scientifiche diabetologiche e di laboratorio internazionali interessate alla misura di questo parametro nel sangue (ADA, EASD, JDF). Si sconsiglia l'allineamento al sistema IFCC in assenza di precise direttive emanate appunto dalle summenzionate società scientifiche. Le attività connesse alla Campagna per il Diabete (IFCC Global Diabetes Campaign) riguardano, oltre che la standardizzazione dell'HbA_{1c}, una serie di iniziative volte a diffondere conoscenze ed aumentare il ruolo del laboratorio nella diagnosi e nella sorveglianza del diabete mellito. Sono operativi diversi gruppi che hanno prodotto documenti relativi alla normalizzazione della misura del glucosio mediante glucometri portatili, allo studio di aspetti tecnici relativi alla microalbuminuria, all'utilizzo della emoglobina glicata per la diagnosi del diabete ed altro. Per ulteriori informazioni consultare il sito <http://www.ifcc.org/ifcc.asp>.

Abstracts

Association between gene polymorphisms of ACTN3 and SRD5A and athletic performance

Nicolò Musso¹, Vincenza Barresi¹, Mario Veca⁴, Giuseppe Russo⁴, Francesco Pomara⁴, Giuseppe Clementi², Dario Vasta³, Daniele Filippo Condorelli¹, Gennaro Gravante⁴

¹Dept. of Chemical Sciences, Sec. of Biochemistry and Molecular Biology, University of Catania

²Dept. of Experimental and Clinical Pharmacology, University of Catania

³MedLab s.n.c., Catania

⁴Experimental Medicine Department, University of Palermo, Italy

Introduction

The α -actinins (ACTNs) are actin-binding proteins encoded by a multigene family formed by four members. In humans, ACTN2 is expressed in all muscle fibres, while ACTN3 expression is restricted to fast (type 2) fibers. ACTN3 is absent in 18% of healthy white individuals because of homozygosity for a common stop-codon polymorphism in the ACTN3 gene, R577X. Highly significant associations between ACTN3 genotype and athletic performance has been shown (Yang et al. 2003). In the present study we analyzed the R577X polymorphism in two groups of male Sicilian elite athletes: 1) sprinters (track 100-200-400m) and endurance athletes (5000-10000m, marathon, triathlon). Since it has been reported that muscle power is also influenced by the androgen hormonal status, we have also determined the blood levels of testosterone and the genetic polymorphisms of the two isoforms of Steroid 5-alpha reductase (SRD5A1 and SRD5A2), the enzymes that catalyze the conversion of testosterone to the bioactive 5-alpha dihydrotestosterone.

Materials and methods

DNA was extracted by standard methods and the polymorphisms were analyzed by PCR, restriction enzyme digestion and agarose electrophoresis. Statistical analysis were carried out using chi-squared test.

Results and discussion

In the present study we established the ACTN3 genotype in a population of male Sicilian elite athletes in well-defined disciplines that represent two opposite models of athletic performance. In the control population (n=70) the genotype frequencies are in agreement with those reported for Caucasians (RR: 30%; RX: 57%; XX: 13%). In comparison to the control population, an increase in RR genotype (42%) and in allele R (66% vs. 58%) frequency was observed in male elite sprinters (n=12), but it did not reach statistical significance. On the contrary, a highly significant decrease in the frequency of the RR genotype and in allele R frequency was detected in the population of male endurance athletes (n=17). No difference in the distribution of SRD5A1 and SRD5A2 genotypes was detected. Our data suggest that the lack of the ACTN3 protein is an advantage in performance requiring long-lasting efforts with low-power energy requirement.

Reference

1. N. Yang et al, Am J Hum Genet 73:627-631, 2003

Redox proteomics approach to investigate cellular stress response in aging and neurodegenerative disorders

Vittorio Calabrese¹, Rukhsana Sultana², Fai Poon², Eleonora Guagliano¹, Maria Sapienza¹, Giovanni Scapagnini¹, D. Allan Butterfield², Stella Annamaria Giuffrida¹

¹Department of Chemistry, University of Catania, Catania

²Dept. of Chemistry, University of Kentucky, USA

There is increasing interest in identifying new pharmacological strategies to increase defense mechanisms by activating multiple antioxidant defense genes, i.e. vitagenes. This process has been referred to as programmed cell life (1).

Induction of heme oxygenase-1 (HO-1) can represent an efficient antioxidant system and a potential pharmacological target in a variety of oxidant- and inflammatory-mediated diseases, including brain aging and neurodegenerative disorders (2). Acetylcarnitine (LAC) is emerging as a therapeutic agent for several degenerative diseases. In the present study we report that treatment for four months of senescent rats with LAC induces heme oxygenase-1 as well

as Hsp70 and SOD-2, and that this effect was associated with up-regulation of GSH levels. In addition, by using redox proteomics we provide a valuable insight into the mechanism of age-related protein oxidation and the effect of LAC in reducing oxidative stress associated with functional improvements in the aged brains.

Redox proteomics analysis showed that the specific carbonyl levels of three proteins, hemoglobin (HMG), cofilin 1 (COF 1) and b-actin (ACT), are significantly increased in the hippocampus of senescent rats. All of the specific carbonyl levels of these proteins are reduced by LAC administration in old rats brains. In the cortex of senescent rats, the specific carbonyl levels of eight proteins were increased. These proteins are heat shock protein 70 (Hsp70), glyoxylase 1 (GOL 1), b-actin (ACT), 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (MPST), peroxiredoxin 1 (PDX), phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1 (PPRPS1), and fumarase (FUM).

LAC administration reduced the specific carbonyl levels of all these protein in the CX of senescent rats. The proteins identified in our study are involved in three processes impaired in aged brains: antioxidant defence, mitochondrial function and plasticity. Treatment by LAC might improve the decline of these functions. We posit that LAC can be target for novel therapeutic approach to treat cognitive decline of aging and neurodegenerative disorders.

Reference

1. Calabrese et al (2006) *Antiox Redox Signal* 8,404.
2. Calabrese et al (2006) *Neuroscience* 138,1161

Analisi comparativa del profilo proteomico di cellule di leucemia mieloide cronica resistenti all'imatinib dopo trattamento con carbossiamidotriazolo (CAI)

Simona Fontana¹, Riccardo Alessandro¹, Marilisa Barranca¹, Margherita Giordano¹, Chiara Corrado¹, Michel Becchi², Isabelle Zanella-Cleon², Elise Carol Kohn³, Giacomo De Leo¹

¹Dip. Biopatologia e Metodologie Biomediche, Università di Palermo, Italia

²UMR 5086 CNRS, Institut de Biologie et Chimie des Proteines, Lyon, France

³Molecular Signaling Section, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, USA

La leucemia mieloide cronica (LMC) è una malattia neoplastica del sistema emolinfopoietico le cui cellule sono caratterizzate dalla presenza di un cromosoma più corto (cromosoma Philadelphia), frutto di una traslocazione reciproca (9:22).

Questo cromosoma contiene il gene di fusione BCR/ABL codificante un'oncoproteina di 210-kDa con attività tirosin-chinasica costitutiva. Tale attività ha un ruolo centrale nella patogenesi della LMC, poiché induce nelle cellule leucemiche un incremento della proliferazione cellulare e l'inibizione dell'apoptosi. Il trattamento della LMC con l'Imatinib mesilato (Gleevec, STI571), un inibitore semi-selettivo di BCR/ABL, induce risposta ematologica e citogenetica in un'alta percentuale di pazienti in fase cronica della malattia. Tuttavia, pazienti in fase più avanzata della patologia (crisi blastica) spesso sviluppano resistenza alla monoterapia con Imatinib.

L'obiettivo di questo lavoro è stata la valutazione dell'effetto del carbossiamidotriazolo (CAI), un inibitore della trasduzione del segnale mediata dal calcio, su cellule di LMC resistenti all'Imatinib. Il CAI è un farmaco citostatico entrato nella fase II dei trials clinici al National Cancer Institute, NIH, USA, per il quale è stata dimostrata una significativa attività antitumorale sia in vitro che in vivo (1).

Gli esperimenti qui riportati sono stati condotti sulle linee cellulari LAMA84R, K562R e KCL22R. I nostri risultati mostrano che su queste cellule il CAI esercita un significativo effetto citotossico e determina la riduzione dei livelli generali di fosforilazione in tirosina, inibendo vie di trasduzione del segnale BCR/ABL-dipendenti ed indipendenti. Inoltre, lo studio comparativo del profilo proteomico delle cellule trattate e non trattate con il CAI, ha messo in evidenza variazioni nei livelli di espressione di proteine coinvolte nei processi di detossificazione, regolazione dell'apoptosi, tumorigenesi e farmaco-resistenza. L'analisi dettagliata dei dati ottenuti contribuirà alla comprensione degli effetti molecolari indotti dal CAI e fornirà indicazioni rilevanti per un uso razionale di questo farmaco nel trattamento di pazienti affetti da LMC che non rispondono alla monoterapia con l'Imatinib.

Bibliografia

1. Hussain M, et al. *J Clin Oncol*, 21:4356-63, 2003

Expression of Ca²⁺-independent and Ca²⁺-dependent phospholipases A₂ and cyclooxygenases in human melanocytes and malignant melanoma cell lines

Loriana Romeo¹, Carmelina Daniela Anfuso¹, Gabriella Lupo¹, Mariagrazia Rita Scuderi², Carla Motta¹, Giovanni Giurdanella¹, Liliana Guerra³, Renato Bernardini², Mario Alberghina¹

¹Department of Biochemistry, University of Catania, Italy

²Department of Experimental and Clinical Pharmacology, University of Catania, Italy

³Tissue Engineering and Cutaneous Physiopathology, Istituto Dermatologico dell'Immacolata, IDI- IRCCS, Pomezia, Roma, Italy

Introduction

Tumor cell interaction with endothelial cells (ECs) is a crucial step leading to organ-selective metastasis. Adhesion of melanoma cells to ECs was found to be mediated by endogenous 12(S)-HETE, a 12-lipoxygenase metabolite of arachidonic acid expressed by tumor cells, via activation of endothelial protein kinase C [1-2]. In this study, we asked whether variations in the expression of both Ca²⁺-independent phospholipase A₂ (iPLA₂) and cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) can be correlated with tumor cell proliferation rate.

Materials and methods

The human melanoma M10, M14, SKMP93, OCM1A, MEL243, and metastatic SKMEL28, 1074MEL, COLO38 cell lines were a generous gift of the Laboratory of Immunology, Institute "Regina Elena", Rome. Cell proliferation was measured using a crystal violet test. Cellular fractionation, Western blot analyses and RT-PCR were performed as previously reported [3].

Results

We provide novel evidence that human melanoma cell lines (M10, M14, SKMEL28, SKMP93, MEL 243, OCM1A, MEL1074 and COLO38) express, at mRNA and protein level, either iPLA₂ or cPLA₂ and its phosphorylated form. Normal human melanocytes contained the lowest levels of both PLA₂s. Cyclooxygenase-1 and -2 (COX-1 and COX-2) are also expressed in cultured tumor cells as measured by Western blots. The most pronounced overexpression of iPLA₂ and COX-1 was found in two melanoma-derived cells, M14 and COLO38. In melanocytes and M10 melanoma cell line no COX-2 expression was revealed. Our results with a panel of human melanoma tumor cells show that the highest levels of iPLA₂ and cPLA₂ expression were associated with the most proliferative cells. A possible correlation between PLA₂-COX activity and tumor cell proliferation in the melanocytic system was established. The high expression levels of both PLA₂s and COXs suggest that eicosanoids modulate cell proliferation, metastasis and tumor invasiveness.

Reference

1. Sanchez T. and Moreno J.J. (2002) *J. Cell. Physiol.* 193, 293-298.
2. Pisano C. et al. (2005) *Anticancer Res.* 25, 2065-8.
3. Lupo G. et al. (2005) *Biochim. Biophys. Acta* 1753, 135-150.

Caratterizzazione molecolare di stipiti di *Mycobacterium tuberculosis* isolati a palermo

Celestino Bonura, Maria Angela Platia, Rita Immordino, Giovanna Laura Pitarresi, Salvatore Distefano, Anna Giammarco

Dipartimento di Igiene e Microbiologia "G. D'Alessandro", Università degli Studi di Palermo

Studi da noi precedentemente condotti su 166 stipiti di *Mycobacterium tuberculosis* isolati nel nostro laboratorio hanno dimostrato la possibilità di valutare il tipo e la frequenza delle mutazioni correlabili con la resistenza alla rifampicina e all'isoniazide rispettivamente attraverso l'analisi delle sequenze nucleotidiche del gene *rpoB* e di alcune delle regioni geniche coinvolte nella resistenza all'isoniazide come i geni *katG* e *ahpC*, la regione intergenica *oxyR-ahpC* e la regione regolativa a monte dell'operone *mabA-inhA*.

L'obiettivo della nostra indagine attuale è stato quello di valutare i vantaggi offerti dall'utilizzo degli strumenti molecolari finalizzati all'identificazione di specie e alla determinazione della resistenza farmacologica in un gruppo selezionato di 40 ceppi di *Mycobacterium tuberculosis* di recente isolamento nel nostro laboratorio. Per l'isolamento, la coltivazione e la determinazione dell'antibiogramma da un punto di vista fenotipico abbiamo impiegato il sistema colturale rapido BD BBL MGIT/BBL MGIT AST SIRE (Becton Dickinson) basato sull'uso di terreni liquidi. Parallelamente, a partire dalle colture di isolamento abbiamo analizzato le sequenze nucleotidiche dei geni precedentemente menzionati.

I nostri risultati indicano che una metodica molecolare "home-made" quale il sequenziamento del gene *rpoB* offre l'opportunità di ottenere in tempi molto più brevi (1-2 giorni) le stesse informazioni sulla resistenza alla rifampicina che si possono ricavare anche con l'uso dei più rapidi metodi colturali in terreno liquido (1). Inoltre, la stessa sequenza

nucleotidica fornisce l'ulteriore vantaggio dell'identificazione della specie nonché la possibilità di evidenziare nuove mutazioni correlabili con la resistenza farmacologica. Risultati analoghi sono stati ottenuti dallo studio delle sequenze nucleotidiche dei geni coinvolti nella resistenza all'isoniazide.

In conclusione, si può affermare che, anche nel nostro laboratorio, i metodi molecolari potrebbero essere utilizzati preliminarmente per la caratterizzazione di isolati di *Mycobacterium tuberculosis*.

Bibliografia

1. Herrera L., Jiménez S., Valverde A., Garcia-Aranda M.A., Saez-Nieto J.A. 2003. *Int. J. of Antimicrob. Agents* 21: 403-408.

Screening for C677T and A1298C MTHFR polymorphisms as predictors of hyperhomocysteinemia in patients with parkinson's disease

Daniela Caccamo¹, Gaetano Gorgone¹, Giulia Parisi¹, Monica Currò¹, Francesco Pisani², Paolo Calabresi³, Riccardo Ientile¹

¹Department of Biochemical, Physiological and Nutritional Sciences, University of Messina

²Department of Neurosciences - First Neurological Clinic, University of Messina

³Neurological Clinic, University of Perugia

Plasma homocysteine (Hcy) levels have been shown to be increased by levodopa management of Parkinson's disease (PD). Different studies have investigated the effect of severe methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) deficiency, owing to C677T polymorphism, on Hcy levels in PD patients. However, it has been demonstrated that also compound heterozygosity for the C677T and A1298C MTHFR polymorphic alleles is a genetic risk factor for mildly increased Hcy levels, especially if stores of folate or vitamin B12 are depleted.

This study was aimed at investigating the prevalence of C677T and A1298C MTHFR polymorphisms in a population of PD patients, and the possible synergistic effects of these genetic determinants with other factors (i.e. demographic features, vitamin status and levodopa therapy) in increasing Hcy levels.

Forty-nine patients and 63 controls were recruited for this study, and genotyping for MTHFR polymorphisms was carried out by DG-DGGE analysis as previously described (1).

No significant differences between PD patients and healthy subjects were found with regard to the prevalence of MTHFR diplotypes, and folate and cobalamin plasma levels. In contrast, median Hcy levels in patients were significantly different from those of control group (16.3±5.7 vs 11.7±2.7, p<0.001). Further, increased Hcy levels were significantly associated with the TT677/AA1298 MTHFR diplotype (p<0.005) both in patients and controls, while no association was found with sex, age, folate, and vitamin B12 plasma levels. Indeed, patients having the TT677/AA1298 diplotype had the highest Hcy levels (22.1±4.9 mol/L, p<0.001) compared to controls with the same diplotype or patients carrier of other MTHFR diplotypes. Further, Hcy levels in patients were related to levodopa daily dosage (p<0.005), while no association was found with duration of illness.

Our data indicate that vitamin supplementation could have marginal effects on homocysteine levels if dietary intake is adequate or over-production of S-adenosyl-Hcy saturates the re-methylation pathway. These findings could have implications in treatment of Parkinson's disease patients who are potentially at risk for vascular diseases and cognitive impairment.

Bibliografia

1. Caccamo et al. (2004) *Neuromolecular Medicine* 6,117-126.

Down-regulation of astroglial connexin expression after protracted seizures

Angela Trovato-Salinaro¹, Anna Andrioli², A.Chakir², Paolo F. Fabene², M. Palomba², Giuseppa Mudò³, Vincenza Barresi¹, Nicolò Musso¹, Natale Belluardo³, Marina Bentivoglio², Daniele F. Condorelli¹

¹Dept. of Chemical Sciences, Section of Biochemistry and Molecular Biology, University of Catania

²Dept. Morphol. Biomed. Sci., University of Verona

³Dept. of Experimental Medicine, Section of Human Physiology, University of Palermo

Introduction

Connexins, the gap junctions protein are encoded by a large multigene family, whose members are also expressed in the CNS. Cx36 is expressed in GABAergic interneurons in several brain areas, while Cx43 and Cx30 are the main connexins expressed in astrocytes. It is believed that there is a possible correlation between abnormal neuronal activity, such as epilepsy, and gap junctions levels and several reports have indicated that neurons control the level of gap-junction-mediated communication between astrocytes. In the present study we analysed changes in the expres-

sion of Cxs elicited by experimental seizures.

Materials and Methods

Total RNA was extracted by standard methods. Reverse transcription was performed using SuperScript First-Strand Synthesis System (Invitrogen). mRNA levels were measured using ABI Prism 7700 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems). In situ hybridization technique and immunohistochemistry were performed as described in Condorelli et al 2003.

Results

The analysis was conducted at 3h, 6h and 24h after the onset of protracted seizures elicited by ip administration of the muscarinic cholinergic agent pilocarpine. Expression of Cx36 mRNA, evaluated by in situ hybridization, did not vary in this paradigm, whereas Cx43 and Cx30 mRNAs exhibited a marked downregulation at 24h in neocortical and limbic cortical areas. Double immunofluorescence for the simultaneous visualization of Cx43 protein and immunolabeled astrocytes, examined with confocal microscopy, pointed out a marked decrease at 24h (but not at 3h) of Cx43 punctate immunolabeling. Regional evaluation of the expression of Cxs under the same experimental paradigm with quantitative real time-PCR confirmed the a 75% decrease of Cx43 and Cx30 mRNA levels 24 hours after pilocarpine injection. The data strongly implicate glial Cxs in the brain response to seizures, suggesting a possible involvement in post-ictal depression.

Reference

1. Condorelli DF, Trovato-Salinario A, Mudò G, Mirone MB, Belluardo N. Eur. J. Neurosc. (2003) 18:1807-1827. Research funded by Fondazione Mariani.

Gap junctional coupling and connexin expression in idiopathic pulmonary fibrosis lung fibroblasts

Angela Trovato-Salinario¹, Elisa Trovato-Salinario², Marco Failla², Claudio Mastruzzo², Valerio Tomaselli², Elisa Gili², Nunzio Crimi², Daniele F. Condorelli¹, Carlo Vancheri²

¹Department of Chemical Sciences, Section of Biochemistry and Molecular Biology, University of Catania

²Department of Internal Medicine and Specialistic Medicine, Respiratory Diseases Section, University of Catania

Introduction

Gap junctions, membrane channels formed by an array of connexins, link adjacent cells realizing an electro-metabolic synapse. Each intercellular channel is formed by the conjunction of two hemichannels, or connexons, formed by the hexameric assembly of subunit proteins, called connexins. Connexin-mediated communication is crucial to regulation of cell growth, differentiation, and development. Activation and proliferation of phenotypically altered fibroblasts represent central events in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). Nevertheless, the role of connexin-43, the most represented gap junction subunit in the human lung, in the pathogenesis of this condition is not known. In this study we investigated the transcription of connexin-43 and the gap-junctional intercellular communication (GJIC) in primary normal (NF) and fibrotic fibroblasts (FF) derived from healthy and IPF patients.

Materials and Methods

Primary lines of normal human lung fibroblasts were established by using an outgrowth from explant following the method described by Jordana et al. 1988. Total RNA was extracted by standard methods. mRNA levels were measured using ABI Prism 7700 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems). Functional assay of the gap junctional activity was assessed with a dye-loading technique by means of flow cytometry as described in Czyz et al. 2000.

Results

Connexin-43 transcription was significantly reduced in FF as demonstrated by standard and quantitative RT-PCR. GJIC was evaluated by means of the dye-loading technique. FF showed a significantly reduced homologous GJIC in respect to NF. Similarly, we demonstrated that heterologous GJIC was significantly impaired in FF using a NF line as dye donor, thus confirming a defect in GJIC of FF. We demonstrate that cell-to-cell communication is impaired in IPF fibroblasts. This might account for some of the features, like altered proliferation, metabolic homeostasis and programmed cell death, characterizing activated fibroblasts in the lungs of IPF patients.

Reference

1. Jordana M., Schulman J., McSharry C., Irving LB., Newhouse MT., Jordana G. and Gaudie J. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1988-137:579-584
2. Czyz J., Irmer U., Schulz G., Mindermann A. and Hulser DF. *Exp. Cell Res.* 2000-255:40-46

iNOS expression in oxidative stress conditions in primary rat astroglial cell cultures: role of carnosine

Vittoria Spina Purrello¹, Vincenzo Nicoletti¹, Cristian Cuppari¹, Davide Licciardello¹, Giuseppa Perticone¹, AnnaMaria Santoro², Giuseppa Grasso², Enrico Rizzarelli¹, AnnaMaria Giuffrida Stella¹

¹Dep. of Chemical Sciences, Sec. of Biochemistry and Molecular Biology, Medical Faculty, University of Catania, Catania

²Ist. Biostrutture e Bioimmagini CNR, Sez. di Catania, Catania

Introduction

Inhibition of iNOS expression could represent a mechanism of protection against excessive NO production. Recent studies have shown that small molecules, such as carnosine, are able to prevent peroxynitrite damages and possess antioxidant properties against oxidative stress. Carnosine, is an endogenous dipeptide (β -alanyl-L-histidine), normally found in brain and muscle, sometimes at surprisingly large concentrations (up to 10mM). It is involved in many physiological functions and in particular in the intracellular defense. In the present study we investigated the effect of carnosine against NO-induced oxidative stress in rat astroglial cell cultures. To better understand the molecular mechanism underlying the role of carnosine we measured cell viability, nitrite production, LDH release and expression of iNOS and NFkB.

Materials and Methods

Interferon- γ (400U/ml) and lipopolysaccharide (LPS 4 μ g/ml) were used to induce iNOS dependent stress conditions in primary rat astroglial cell cultures (1-2). Carnosine at different concentrations (1, 10, 20 mM) was added. LDH release into cell culture medium (Cytotox test Promega), nitrite production (Griess test) and cell viability (MTT) were measured. Western blot analysis for iNOS and NFkB expression was performed by polyclonal antibodies.

Results and Discussion

After LPS and INF- γ treatment an increase of LDH and nitrite release and a decrease of cell viability (MTT) was observed. The dose-response experiment performed to establish the most protective carnosine concentration demonstrated that carnosine was able to decrease nitrite and LDH release and to increase cell viability in a dose-response manner. The effect of carnosine on iNOS and NFkB expression in our stress conditions is particularly interesting suggesting a possible control by a feed-back mechanism. The data obtained suggest an antioxidant role of carnosine, however further investigations are in progress to better clarify its role for possible clinical applications.

Reference

1. Nicoletti VG et al. (1998) *Biochimie* 80, 871-881
 2. Spina PurrelloV et al.(2002)*Mechanism of ageing and development* 5, 511-20
- Research funded by: RICERCA ATENEO, UNIVERSITY OF CATANIA, FIRB 2005 RBNEO3PX83 and PRIN 2005 Prot.2005054147

Characterization of the antiproliferative effects of guanine-based purines by uptake inhibitors, short interfering rna and genetically-modified cells

Roberta Garozzo, Vincenza Barresi, Daniele Filippo Condorelli

Dept. of Chemical Sciences, Sec. of Biochemistry and Molecular Biology, University of Catania

Introduction

Several studies have shown that guanosine exerts biological effects in primary astroglial cultures, possibly through a membrane receptors (Ciccarelli R. et al., 2001). In the present work we report the growth-inhibitory effects of guanine and its nucleosides on human glioma cell lines (U87-MG, U373-MG) and an attempt to characterize the molecular mechanism involved by the use of pharmacological inhibitors, short interfering RNA and genetically-modified cell lines.

Methods

Cell lines were treated with various concentration of nucleobases, nucleosides and nucleotides. Cytotoxicity was measured by MTT assay. GPCRs mRNA expression was evaluated by PCR and specific siRNAs were used to repress mRNA expression. mRNA levels were measured using ABI PRISM 7700. Sensitivity of guanine, guanosine or GMP was evaluated on silenced cell lines. A human orphan receptor was cloned into pcDNA3.1 TOPO expression vector (Invitrogen). Stable overexpressing U87/U373 cell lines were obtained by lipotransfection and geneticin selection.

Results and Discussion

Significant inhibitory effects were obtained with GMP (GI50 = 100 μ M), guanosine (GI50 = 100 μ M), and guanine (GI50 = 50 μ M). To determine whether the antiproliferative effect was due to the uptake of guanine and or guanosine, we used different pharmacological inhibitors of equilibrative (ENT) and concentrative (CNT) transporters. No significant effects were detected, thus suggesting an extracellular mechanism of action.

In order to identify a putative receptors, the expression of different orphan G protein-coupled receptors (GPCRs), selected on the basis of their homology to adenosine and ATP receptors, was repressed by RNA interference. The silencing of one orphan GPCR reduced significantly the antiproliferative effects of both guanosine and guanine. The sensitivity of the overexpressing clones to guanine was significantly increased. On the contrary the sensitivity of overexpressing clones to related compounds acting through known mechanism (phosphodiesterase inhibitors) was not modified. In conclusion the basal expression of the identified GPCR is able to modulate the biological effects of guanine and guanosine.

Bibliografia

1. Ciccarelli R. et al., *Int J Dev Neurosci.* 2001 Jul;19:395-414.

Mutations in Factor V Leiden (G1691A) and prothrombin (G20210A) genes are important risk factors for venous Tromboembolism

Antonietta Caruso, Concetta Scazzone, Elisa Lio, Salvatore Cammarieri, Chiara Bellia, Giuseppe Mingoia, Marcello Ciaccio

Chair of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Palermo

Introduction

Genetic or acquired factors may alter emostasis, leading to a hypercoagulability state. The thrombosis is a manifestation of the hypercoagulability state, a serious clinical condition that may lead to death.

Incidence increases with age, from 1: 100.000 in the very young to 1:100 among the elderly. Factor V Leiden results from the replacement of a guanine residue (G) by an adenine (A) at position 1691 of the factor V gene. Consequently, a poor anticoagulant response due to the factor V resistance to the activated protein C is observed.

The G20210A prothrombin mutation results in high prothrombin plasma concentration with a consequent higher rate of conversion of fibrinogen to fibrin.(1)

Materials and Methods

We have examined 73 subjects (age 24-76; ♀ =33, ♂ =40) affected by thromboembolic disease and 23 healthy subjects (age 25-65; ♀ =13, ♂ =10).

Total genomic DNA was extracted by salting-out procedure. DNA samples were amplified by a polymerase chain reaction. The detection of the G1691A in the Factor V gene was investigated by the enzyme MnlI. To detect the G20210A mutation, a 506-bp fragment from the 3'- untranslated region of FII gene was amplified by PCR using the mutagenic reverse primer. The nucleotide substitution close to the 3' end of the mutant oligonucleotide, combined with the genetic abnormality (20210 G to A) creates a new restriction enzyme cleavage site, which is recognized by Hind III. Digested PCR products were separated by electrophoresis on agarose gel.

Results and Discussion

Our analysis included 73 patients affected by deep venous thrombosis (DVT). Among the patients, 9 (12%) subjects were heterozygotes for G1691A, 7 (9%) were heterozygotes for PTG20210A; no homozygotes subjects were detected. Only one patient was heterozygotes for both mutations. All control subjects were wild- type for G1691A and PTG20210A.

Heterozygous 1691G→A have 5-7 fold increased risk of DVT and Heterozygous 20210G→A have 2.7-3.8 fold increased risk of thrombosis, than subjects with normal genotype. Analysis of these results indicates that 22% of tested subjects with DVT were carriers of these polymorphisms while the controls were wild-type.

Reference

1. L.C. Godoi et al., (2006) Clin Chim Acta 365: 304-365.

Apo E polymorphism as risk factor for cardiovascular diseases in sicilian subjects

Elisa Lio, Concetta Scazzone, Salvatore Cammarieri, Valentina Cucchiara, Antonietta Caruso, Giuseppe Mingoia, Marcello Ciaccio
Chair of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Palermo

Introduction

The Apolipoprotein E polymorphism consists of three alleles E2, E3 and E4 on the long arm of chromosome 19, coding for three protein isoforms, APO E2, APO E3 and APO E4.

The APO E2 isoform differs from APO E3 by cysteine for arginine substitution at amino acid residue 158, while APO E4 differs from APO E3 by an arginine for cysteine substitution at residue 112. Apolipoprotein E mediates interaction with lipoprotein receptors of mainly triglyceride rich lipoproteins, of which affinity depends on the APO E protein isoform. Particularly, APO E3 is associated with normal lipidic metabolism.

Since Apolipoprotein E polymorphism has been associated with atherosclerosis and implicated in many chronic cardiovascular diseases (CVD) (1), the APO E genotyping is of increasing importance in clinical practice to identify those individuals at risk for these pathologies.

Materials and Methods

In our study we focused 17 healthy subjects (age: 25-65; ♀ =10, ♂ =7) and 38 patients (age: 24-76; ♀ =18, ♂ =20) affecting by cardiovascular diseases and without any other risk factors for atherosclerosis. Total genomic DNA was extracted from whole human blood by salting-out procedure. DNA sample were amplified by a polymerase chain reaction and the detection of the polymorphism APO E was investigated by the restriction fragment length polymorphism (RFLP) using the enzyme HhaI. The restriction fragments were separated by electrophoresis on 8% polyacrilamide gel.

Results and Discussion

Among the patients, 25 (65.8%) subjects were E3/E3, 6 (15.8%) E2/E3, 1(2.6%) E2/E4 and 6 (15.8%) E3/E4. The control subjects were 14 (82.3%) E3/E3, 1 (5.9%) E2/E3 and 2 (11.8%) E3/E4.

No significant differences were observed in the Apo E genotype distributions between patients and controls.

Thus, the only detection of Apo E genotypes cannot diagnose those subjects at high risk for cardiovascular diseases. In conclusion, the data indicate that other environmental, life style factors can be involved in the clinical expression of the individual Apo E genotype.

Reference

1. D. Jurkovicova et al., (2006) Gen Physiol Biophys 25: 3-10.

Hyperhomocysteinemia and methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T and 1298A→C mutations in patients with venous thromboembolic disease

Concetta Scazzone, Lio Elisa, Antonietta Caruso, Francesca Asaro, Luisa Ferraro, Chiara Bellia, Salvatore Cammarieri, Giuseppe Mingoia, Marcello Ciaccio

Chair of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Palermo

Introduction

Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C mutations, being considered unfavourable genetic factors by causing elevated serum homocysteine levels, may be risk factors for cardiovascular disorders. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is a flavoprotein that catalyzes the reduction of 5,10 methylenetetrahydrofolate to 5, methyltetrahydrofolate, the major circulatory form of folate and methyl donor for homocysteine remethylation, thereby regulating the fasting plasma homocysteine level.

A mutation in Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T, results in a thermolabile variant with reduced activity. The present study aimed to analyze both mutations of the MTHFR gene (C677T and A1298C) and plasma homocysteine levels in subjects with venous thromboembolic disease (VTD) (1).

Materials and Methods

The present study groups comprised 86 patients with VTD (age 24-76; ♀ =32, ♂ =34) and 28 healthy subjects (age 25-65; ♀ =17, ♂ =11). Total genomic DNA was extracted from whole human blood by salting-out procedure. DNA sample were amplified by a polymerase chain reaction. The detection of the C677T in the MTHFR gene was investigated by the restriction enzyme Hinf I. A similar protocol was used to analyze the A1298C by using the restriction enzyme MbolI. The restriction fragments were separated by electrophoresis on a 3% agarose gel.

Results: Total homocysteine levels were significantly higher in homozygotes for the MTHFR mutation (TT) and in heterozygotes (CT) in patients with VTD (22.2 ± 21.3 versus 14.4 ± 9.2 $\mu\text{mol/L}$, respectively) than in control subjects (10.2 ± 4.5 versus 9.6 ± 3.2 $\mu\text{mol/L}$, respectively).

While, tHcy concentrations were not significantly different in patients with the 1298CC or 1298AC genotypes in both the VTD group and the controls groups.

Discussion

These results suggest that homocysteine levels were not significantly increased in subjects carriers the 1298A?C mutation, but homocysteine was elevated ($p < 0.05$) in patients with VTD who were homozygous (TT) for the 677C→T polymorphism. Our studies confirmed that the polymorphism 677C→T of MTHFR may represent a new genetic risk factor for VTD.

Reference

1. R. Pejchal et al., (2006) *Biochem* 45: 4808-4818.

Vitamin E and vitamin K1 in cardiovascular disease

Egidio Guglielmini¹, Daniela Butera¹, Giulia Bivona¹, Leonarda Carubia¹, Stefano Miccichè³, Antonino Bono², Marcello Ciaccio¹

¹Chair of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Palermo

²Chair of Medical Chemistry, Faculty of Medicine, University of Palermo

³U.O. Clinical Pathology, P.O. Casa del Sole, AUSL n. 6, Palermo

Introduction

Nowadays is wellknown that an important step in the formation of atherosclerotic plaques is represented by lipid peroxidation and LDL modification. Vitamin E, with its antioxidant activity, is able to prevent lipid peroxidation. Also calcification occurs early in the development of atherosclerotic plaques and a group of vitamin K- dependent proteins have been identified in calcified atherosclerotic plaques, such as vitamin K dependent- γ - carboxyglutamic acid (Gla)- proteins. The onlyknown function of these proteins is to bind calcium and it has been suggested that Gla-proteins may be actively related to atherosclerotic calcification (1). We studied the association of the concentrations of cholesterol, vitamin E and vitamin K1 in the sera of normocholesterolemic and hypercholesterolemic subjects.

Material and method

Serum levels of vitamin E, vitamin K1 and cholesterol were measured in 20 subjects normocholesterolemic and 20 subjects hypercholesterolemic. Serum cholesterol was measured by enzymatic methods whereas vitamin E and vitamin K1 concentrations were assayed by established simultaneous liquid chromatography procedures.

Results

The mean concentration (\pm SE) of vitamin E in the normocholesterolemic subjects was $7,0 \pm 1,5$ (mg/L), in the the subjects hypercholesterolemic was $12,0 \pm 2$ (mg/L). The mean concentration (\pm SE) of vitamin K1 in the normocholesterolemic subjects was 340 ± 50 ($\mu\text{g/L}$), in the hypercholesterolemic subjects was 570 ± 80 ($\mu\text{g/L}$).

Conclusion: our data suggest a good linear correlation between vitamin E and K1 and plasma cholesterol concentrations. From a biochemical point of view vitamin E and vitamin K1 may be regarded as being antiatherogenic. From a clinical point of view, the reduction of serum cholesterol coexists with a concomitant reduction of vitamin E and vitamin K1 plasma levels. These findings deserve to further investigation.

References

1. C.M. Shanahan et al., (1998) *Crit Rev Eucaryot Gene Expr* 8: 357-375.

Antioxidant vitamins and homocysteine plasma levels in patients with alzheimer disease

Giulia Bivona, Leonarda Carubia, Egidio Guglielmini, Luisa Ferraro, Marcello Ciaccio

Chair of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Palermo

Introduction

Alzheimer Disease is a multi-factor pathological condition on which onset and progression nutritional status, such as oxidative stress, may play a role in the pathogenesis of Alzheimer Disease¹. A deficiency in A, E and B complex vitamins have been recently associated with cognitive impairment in old age.

The aim of our study was to determine vitamins A, E, D, B6, B12 and homocysteine plasma levels in patients with Alzheimer Disease.

Material and Methods

Vitamin A, E, D, B6, B12 plasma levels were measured in 68 patients (38 males, age between 60-81 years; 30 females, age between 58-80 years) by High-Performance Liquid Chromatography; vitamin A and vitamin E were measured by UV detection at 280 nm, while B6 was measured by fluorescence detector, λ_{ex} 380 nm, λ_{em} 450 nm; B12 and homocysteine values were obtained by autoanalyser Immulite System.

Results

Alzheimer patients showed vitamin A, D, E and B6 plasma levels significantly reduced (vitamin A: 0.16 ± 0.06 mg/L, n.v.: 0.3-0.65 mg/L; vitamin D: 4.83 ± 2.62 μ g/L, n.v.: 20-120 μ g/L; vitamin E: 3.51 ± 0.83 mg/L, n.v.: 5-20 mg/L; vitamin B6: 2.54 ± 0.94 ng/ml, n.v.: 4.3-17 ng/ml), while B12 vitamin was substantially in the normal range (B12: 438 ± 61.52 pg/ml, n.v.: 174-878 pg/ml); homocysteine plasma levels were increased (20.7 ± 5.1 μ mol/L; n.v.: 11 μ mol/L).

Conclusion

An increased oxidative stress correlates with the depletion of antioxidant nutrients such as vitamin A, D and E. B complex deficiency can also result in hyperhomocysteinemia, a well known risk factor for atherosclerosis. Since mild cognitive impairment represents a condition of increased risk for Alzheimer Disease use of antioxidants in mild cognitive impairment could be of importance for prevention of Alzheimer Disease.

Reference

1. P. Mecocci et al., (2004) J Alzheimer Disease 6: 159-163.

Bone metabolism and oxidative stress in post-menopausal womenEgidio Guglielmini¹, Daniela Butera¹, Giulia Bivona¹, Leonarda Carubia¹, Stefano Miccichè³, Antonino Bono², Marcello Ciaccio¹¹Chair of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Palermo²Chair of Medical Chemistry, Faculty of Medicine, University of Palermo³U.O. Clinical Pathology, P.O. Casa del Sole, AUSL n. 6, Palermo**Introduction**

Osteoporosis is one of the critical age-related disorders for postmenopausal women, in which bone metabolism is altered because of an accelerated resorption rate. Recently, reactive oxygen species (ROS) are considered to be responsible for the aging process and osteoporosis. There is evidence that ROS are involved in bone resorption, with a direct contribution of osteoclast-generated superoxide to bone degradation. In addition, it has been demonstrated that osteoblasts produce antioxidants such as glutathione peroxidase to protect against ROS⁽¹⁾. The purpose of our study was to assess whether plasma antioxidant defences are decreased in elderly osteoporotic women compared with control.

Material and method

Uric acid, vitamins C, E and A plasma levels were measured in 50 subjects with osteoporosis (age 65 years old) and 50 age-matched controls. All antioxidants were detected by HPLC: vitamin C and acid uric were measured by electrochemical detection while vitamin A and vitamin E were measured by UV detection at 280 nm.

Results

Mean plasma levels of vitamin C, vitamin E, Vitamin A, and uric acid were consistently lower in patient with osteoporosis (Vitamin A 2.04 ± 0.21 μ mol/L, Vitamin C 25 ± 3.7 μ mol/L, Vitamin E 45 ± 4 μ mol/L, Uric Acid 220 ± 10 μ mol/L)

than in controls (Vitamin A $2.37 \pm 0.22 \mu\text{mol/L}$, Vitamin C $50 \pm 10.1 \mu\text{mol/L}$, Vitamin E $60 \pm 6 \mu\text{mol/L}$, Uric Acid $350 \pm 20 \mu\text{mol/L}$).

Conclusion

Our data showed significantly lower levels of all natural antioxidants in elderly osteoporotic women compared with controls. This findings confirm what previous studies suggested that elderly osteoporotic women have lower antioxidant defenses also because antioxidant deficiency has a negative impact on bone mass. The mechanism underlying antioxidant depletion and its relevance to the pathogenesis of osteoporosis deserve further investigation.

Reference

1. S. Basu et al., (2001) *Biochem Biophys Res Commun* 288: 275-279.

Chemotherapeutic effects of anthocyanins in CaCo2 cells: dna damage and involvement of cell cycle/stress related proteins

Marcella Renis¹, Christian Scifo¹, Maria Laura Calandra¹, Barbara Tomasello¹, Venera Cardile², Giuseppe Galvano³, Luca Vanella¹, Fabio Galvano⁴

¹Dept. Biol. Chem., Med. Chem, and Molec. Biology- Univ. of Catania

²Dept. Physiol. Science-Univ. of Catania

³Dept. ACPA- Univ. of Catania

⁴Dept. Agro.Forestry, Envir. Sc. and Techn, Mediterran.- Univ. of Reggio Calabria

Aims

We examined, on a human colon cancer cell line (CaCo2), some of the possible molecular mechanisms involved in the potential chemotherapeutic effect elicited by cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside (CY3G) and cyanidin chloride (CY), two ring-based class of flavonoids, known to exert important antioxidant and antiinflammatory activities.

Methods

Proliferative/functional parameters of CY3G/CY (from 25 to 200 μM) were evaluated through MTT assay or clonogenic test; measurement of ROS (Reactive Oxygen Species) formation by 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; Western blotting detection of some cell cycle (ATM, p53, p21, TOPOII β) and stress related proteins (OGG1, Hsp70). Much attention was focused on DNA fragmentation, monitored by the typical and atypical Comet assay, both cellular (treatment on agarose-embedded cells) and acellular (treatment on nude DNA); this last performed in order to evaluate a possible direct flavonoids-DNA interaction.

Results

The treatments induce a moderate, not clearly dose dependent antiproliferative effect and a moderate decrease in ROS level, significant only after CY; an increase mostly in ATM and TOPOII β , followed by HSP70 and p53. A possible crosstalk between HSP70 and OGG1 may be hypothesised. DNA fragmentation is induced by both CY/CY3G; it is clearly dose dependent in the case of CY3G, as evidenced by cellular atypical COMET; while dose dependence is observed for CY only with the acellular version.

Conclusions

The data evidence a possible involvement of a direct interaction with DNA in antiproliferative effect elicited by CY in CaCo2 cells, while a cross-linking capability seems to characterize CY3G, probably due to the sugar moiety in its structure. The pleiotropic and some times slightly contradictory activities of anthocyanins may be explained by taking into account a structure/function relationship that could also influence anthocyanin intracellular localisation. Our in vitro findings reinforce the new chemotherapeutic role of CY/CY3G, already used in diet supplementation for their chemopreventive action, and goad into investigation, in human and animal models, of the potential and safety profile of the two molecules as novel agents for chemotherapy of colon carcinoma.

Reference

1. Fimognari C. et al. *Chemotherapy* 51:332,2005

Serum arginine and related amino acids in dialysis patients

Grazia De Luca¹, Vincenzo Macaione¹, Pina Rita Calpona¹, Guido Bellinghieri², Vincenzo Savica¹, Domenico Santoro¹, Agostino Mallamace¹, Rosa Maria Di Giorgio¹

¹Dip. Scienze Biochimiche, Fisiologiche e della Nutrizione

²Dip. Clinico-Sperimentale di Medicina e Farmacologia

L-Arginine is one of the most versatile amino acids in animal cells, serving as a precursor for the synthesis not only of proteins but also of urea, creatine, nitric oxide, polyamines and agmatine. It also influences the release of several hormones and the synthesis of pyrimidine bases. This places arginine, its precursors, and its metabolites at the centre of the interaction of different metabolic pathways and inter-organ communication. Arginine metabolites may participate in the pathogenesis of renal disease and constitute the rationale for manipulating L-arginine metabolism as a strategy to ameliorate kidney disease. The kidneys are thought to be the main site of net de novo arginine synthesis, which would contribute to the maintenance of whole body arginine homeostasis.

In this study we determined serum levels of free arginine, citrulline and ornithine in healthy adults and in patients, undergoing emodialysis three times/week, lasting 210 min. Blood samples were collected during a dialysis session at time 0, 20, 40, 60, 120, 150, 180, 210 min. Amino acid levels were determined by RP-HPLC using the Pico-Tag method (Waters) according to manufacturer's specifications. Amino acids were derivatized with phenylisothiocyanate and the phenylthiocarbonyl amino acid derivatives were separated on the C18 Pico-Tag physiological free amino acid column (300 x 3.9 mm), using a stated binary gradient of Waters eluents 1 and 2 at a flow rate of 1.0 ml/min. Serum levels of citrulline are significantly increased (by 3- to 4-fold vs. healthy adult) in dialysis patients, whereas serum levels of arginine are maintained within normal values. An inverse correlation between the serum citrulline concentration and renal function appears evident. The arginine levels are probably maintained by increased synthesis of the amino acid in the remaining nephrons, extrarenal synthesis and decreased utilization of arginine or, most likely, by a combinations of this factors.

Data obtained during the dialysis session shows that a) arginine levels remain in a normal range; b) the elevated pre-dialysis citrulline levels reach the normal range at the end of dialysis session; c) the arginine/citrulline ratio is under normal range and it reaches normal levels only in 50% of patients.

Importanza della diagnostica molecolare nella malattia celiaca

Maria Garrubba¹, Maria Savino¹, Francesco Perri², Mario D'Altilia³, Stefano Angelo Santini¹

¹U.O. Patologia Clinica, Ospedale "Casa Sollievo della Sofferenza" San Giovanni Rotondo (FG)

²U.O. Gastroenterologia, Ospedale "Casa Sollievo della Sofferenza" San Giovanni Rotondo (FG)

³U.O. Pediatria, IRCCS Ospedale "Casa Sollievo della Sofferenza" San Giovanni Rotondo (FG)

Introduzione

La malattia celiaca è una intolleranza permanente al glutine ad elevata incidenza (1:150 nella popolazione italiana). La sua patogenesi coinvolge fattori genetici, ambientali ed immunologici. Tra i fattori genetici, la più forte associazione riscontrata è quella con i geni del complesso HLA II codificanti gli eterodimeri DQ2 e DQ8. Infatti, nel 90% dei soggetti celiaci è presente l'aplotipo DQ2, mentre i celiaci DQ2 negativi sono per la maggior parte positivi per il DQ8. Gli stessi alleli sono osservati nel 25-30% dei familiari sani dei celiaci; quindi, la loro presenza è un indicatore di predisposizione genetica alla malattia.

Obiettivi

Scopo del nostro studio è dimostrare l'importanza della determinazione degli alleli DQ2 e DQ8 dell'HLA al fine di escludere la malattia celiaca nei casi con risultati sierologici dubbi o negativi e nei soggetti a rischio, soprattutto parenti di primo grado.

Metodologia

Nel nostro Ospedale, presso l'Unità Operativa di Patologia Clinica, è stata eseguita la determinazione degli aplotipi DQ2 e DQ8 dell'HLA in 88 casi di cui 30 appartenenti ad 8 famiglie (2-51 a) e 58 casi (2-66 a) con risultati sierologici dubbi o negativi. I casi in età pediatrica erano complessivamente 34. È stato utilizzato per la determinazione degli aplotipi DQ2 e DQ8 il kit Eu-DQ dell'Eurospital.

Risultati

Lo studio molecolare degli alleli DQ2 e DQ8 dell'HLA nelle 8 famiglie e nei 58 casi con risultati sierologici dubbi o negativi ha permesso di identificare rispettivamente 9 (30%) e 18 (31%) soggetti negativi per entrambi gli alleli. Dei 34 casi in età pediatrica 7 (23%) sono risultati negativi. Pertanto, nel 30% dei soggetti analizzati l'assenza di entrambi gli aplotipi è indicativa di "assenza di predisposizione genetica alla malattia celiaca" in oltre il 99% della popolazione.

Conclusioni

Questo studio ci conferma che, da un punto di vista diagnostico, la tipizzazione HLA ha un valore predittivo negativo quasi assoluto; ciò può risultare molto utile per escludere un possibile sviluppo di malattia celiaca in soggetti a rischio ed in casi con risultati sierologici dubbi o negativi.

Bibliografia

1. Green PH, Jabri B. Celiac disease *Annu Rev Med.* 2006;57:207-21

Plasma glutathione levels during aging

Maria Concetta Gueli¹, Floriana Battaglieri², Giuseppe Salemi²

¹Dip. di Scienze Biochimiche, Università di Palermo, Italia

²Dip. Universitario di Neuroscienze Cliniche, Università di Palermo, Italia

Background

Analysis of low molecular weight thiols and disulfide is potentially important in order to understand the oxidant status of an individual under normal or pathological condition, as oxidative damage is associated or preceded by their reduction. Glutathione (GSH), the most abundant nonprotein thiol, has many wide-ranging functions within the cell including detoxification of free radicals and peroxides, cell proliferation and protein function, regulation of gene expression.

Aims

Since plasma levels of reduced and oxidized GSH (GSSG) are often used as indices of physiological stress, the effect of age on plasma GSH levels was also investigated.

Methods

The healthy subjects recruited in this study were male and female volunteers (University workers) divided into five different age groups (21-30 to 51-60 and >60 years). In preliminary step using blood collection into Vacutainers, some samples had a slight reddish color suggesting that hemolysis can occur by this procedure. Thus, to avoid erroneously high value for GSH, blood was collected using a butterfly needle and syringe. Blood was immediately dripped into tubes containing EDTA and centrifuged (2000g for 10 min at 4°C) to obtain plasma. The concentrations of GSH and GSSG in plasma were determined by HPLC as reported (1). HPLC separation (Waters 600E pump, equipped with a Waters 474 fluorometer) was carried out on a Spherisorb ODS2 column (40°C). SBDf-derivatized thiols were eluted isocratically and analyzed by fluorescence detection.

Results

Plasma GSH levels in both males and females decreased with increasing age (means \pm SE 0.97 \pm 0.09 to 0.52 \pm 0.15 μ M and 1.12 \pm 0.15 to 0.45 \pm 0.13 μ M, respectively). GSSG levels showed no significant correlation with age for either males or females. Neither GSH nor GSSG levels showed significant differences among male and female volunteers of the same age.

Discussion

GSH content will decrease when 1) consumption is increased, as a result of exposure to massive oxidants or decreased GSHR activity, and/or 2) GSH synthesis is decreased, as a result of decreased availability of substrate and/or the activities of the enzymes involved in this process. More work has to be done to clarify the issue.

Reference

1. Gueli MC et al., 2004 *Biochim Clin* 28, 136.