



Finanziare la Ricerca per la Salute 2019

Il contributo della Fondazione del Monte di Bologna e Ravenna

INCONTRO

23 marzo 2019

**Biblioteca Comunale dell'Archiginnasio
Sala dello Stabat Mater**

NUOVE METODOLOGIE PER MISURARE LA VITAMINA D ED I SUOI METABOLITI

Esame diagnostico innovativo per il dosaggio della Vitamina D e dei suoi Metaboliti

Responsabile

Uberto Pagotto, UOC Endocrinologia e CRBA, Policlinico S. Orsola – Malpighi, Bologna Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università di Bologna

Gruppo di Studio

Marco Mezzullo, Flaminia Fanelli (UOC Endocrinologia e CRBA, Policlinico S. Orsola – Malpighi, Bologna Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università di Bologna)

Introduzione

Due principali classi di molecole compongono il “sistema vitamina D”, la vitamina D₂ e la vitamina D₃. La prima viene assunta esclusivamente con la dieta. Circa il 90% della vitamina D₃, invece, è prodotto nell'uomo a livello della cute, in seguito all'esposizione ai raggi ultravioletti. La restante parte è assunta con la dieta. La vitamina D e i suoi metaboliti circolano in forma legata alla proteina legante la vitamina D (VDBP). A livello epatico, viene idrossilata a 25-idrossi vitamina D₃, e questa epimerizzata a 3epi-25-idrossi vitamina D₃. Nel rene, in risposta ai livelli plasmatici di calcio e fosfato, la 25-idrossi vitamina D₃ viene ulteriormente idrossilata nella forma attiva, la 1,25-diidrossi D₃, che lega il recettore della vitamina D (VDR) nei tessuti bersaglio, o nella forma, ad oggi ritenuta inattiva, 24,25-diidrossi vitamina D₃.

Il ruolo della vitamina D nella regolazione del metabolismo calcio-fosfato e nella fisiologia dell'osso è molto ben conosciuto. Una carenza di vitamina D durante la crescita è causa di rachitismo, mentre in età adulta può provocare una riduzione della densità ossea, con aumento del rischio di fratture. La scoperta della presenza del VDR e dell'enzima 1 α -25-idrossilasi in organi come l'intestino, il pancreas e la prostata, e in cellule dell'immunità, ha posto le basi per una nuova visione pleiotropica riguardo le azioni di questo ormone.

Il dosaggio ematico della 1,25-diidrossi vitamina D₃ è estremamente problematico, principalmente per via delle basse concentrazioni, della breve emivita e dell'elevata variabilità intra- e inter-individuale che rende difficile l'interpretazione del valore laboratoristico. Simili difficoltà si incontrano nel dosaggio delle altre isoforme. È noto che la concentrazione della 3epi-25-idrossi vitamina D₃ è particolarmente elevata nei neonati, in relazione al grado di immaturità del fegato. Tuttavia, non è noto se essa medi particolari funzioni in età adulta. La 24,25-diidrossi vitamina D₃ è il principale marcatore di ipercalcemia familiare idiopatica infantile. Nell'adulto, il rapporto molare tra 24,25-diidrossi e 25-idrossi vitamina D₃ è stato recentemente indicato come marcatore di appropriatezza della supplementazione orale di vitamina D e potrebbe portare ad una posologia ottimale personalizzata. Anche il dosaggio della 25-idrossi vitamina D₂, ampiamente diffusa negli integratori alimentari, permetterebbe la corretta valutazione dei soggetti in supplementazione. Per studiare in modo sistematico funzione e utilità di questi mediatori, sarebbe necessario disporre di buone metodologie di misurazione da applicare ad una campionatura diffusa tra stati di normalità, in rapporto a sesso, età, alimentazione e stagionalità e condizioni patologiche.

Ad oggi, l'unico indicatore disponibile per la valutazione dello stato di ipovitaminosi è dato dal dosaggio ematico della 25-idrossi vitamina D₃, grazie agli elevati livelli di ormone presenti nel sangue e alla lunga emivita circolante. Nondimeno, tale indagine pone parecchie criticità. In prima istanza, va attentamente considerato come lo status vitaminico sia influenzato da numerosi fattori quali stagione, genere, età, etnia, dieta, adiposità, esposizione solare e pigmentazione cutanea. Questa estrema variabilità complica in maniera non trascurabile la definizione e l'applicazione di valori normativi efficaci nella pratica clinica.

Sebbene una *consensus* internazionale circa i livelli ottimali di 25-idrossi vitamina D₃ non sia stata ancora raggiunta, si ritiene che livelli di 25-idrossi vitamina D₃ inferiori a 20ng/mL possano essere associati ad una ridotta salute ossea, mentre livelli superiori a 80ng/mL sono potenzialmente tossici. Non esistono indicazioni su quali debbano essere i valori circolanti di 25-idrossi vitamina D₃ in relazione alle funzioni di tipo “non scheletrico”.

Il dosaggio della 25-idrossi vitamina D₃ viene prevalentemente eseguito mediante metodi immunometrici diretti (*immunoassays*, IA). L'elevato grado di automazione degli IA consente un grande volume di analisi, fattore essenziale nei grandi laboratori di *routine*. Tuttavia, la metodica *gold-standard* per il dosaggio della 25-idrossi vitamina D₃ e dei suoi metaboliti è la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS). Tale tecnologia, accoppiando la capacità separativa e la praticabilità della LC, alla rivelazione mediante MS, garantisce elevate sensibilità, specificità ed accuratezza per la quantificazione assoluta delle piccole molecole. Poiché la decisione medica riguardo la carenza di vitamina D si basa, a tutt'oggi, esclusivamente sulla valutazione dei livelli di 25-idrossi vitamina D₃, la comparabilità dei risultati forniti da diversi metodi di dosaggio costituisce un fattore determinante. Ad oggi, molti studi hanno comparato gli IA alla LC-MS/MS, evidenziando come il tasso di falsi positivi e falsi negativi sia altamente variabile tra IA di diverse case produttrici, con un *bias* medio complessivo per gli IA nei confronti della LC-MS/MS compreso tra $\pm 18\%$. Sebbene i principali produttori abbiano recentemente apportato miglioramenti nelle prestazioni analitiche dei propri IA, sussistono ancora notevoli differenze tra le diverse metodiche. Le principali problematiche sono insite nei metodi anticorpo-mediati ed amplificate dalla natura della 25-idrossi vitamina D₃. Infatti, in circolo sono presenti numerose molecole strutturalmente simili alla 25-idrossi vitamina D₃, che possono interferire col legame da parte dell'anticorpo. Un'ulteriore fonte di variabilità risiede nelle diverse procedure utilizzate da ciascun IA per indurre il rilascio della 25-idrossi vitamina D₃ dalla VDBP. Le metodiche basate su LC-MS/MS, invece, sebbene richiedano un elevato livello di *expertise* tecnica nella fase di sviluppo e validazione del metodo, consentono di superare tali limitazioni analitiche, garantendo nel lungo periodo anche una riduzione dei costi operativi.

Scopo del progetto

Lo scopo del presente progetto è stato quello di sviluppare e validare un metodo LC-MS/MS per la quantificazione assoluta della 25-idrossi vitamina D₃, della 3epi-25idrossi vitamina D₃, della 25-idrossi vitamina D₂, e di 1,25- e 24,25-diidrossi vitamina D₃.

Disegno dello studio

Il presente progetto è stato condotto sulla piattaforma LC-MS/MS costituita dal cromatografo Serie 200 (PerkinElmer) accoppiato allo spettrometro di massa API4000 Q-Trap (Sciex) disponibile al Centro di Ricerca Biomedica Applicata (C.R.B.A.) del Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche – Università di Bologna, presso il Policlinico S.Orsola-Malpighi.

Lo sviluppo del metodo si è articolato nello sviluppo sequenziale di un metodo di identificazione mediante lo spettrometro di massa, di un metodo cromatografico selettivo, di procedure di preparazione del campione, di validazione dei parametri di sensibilità, specificità, imprecisione e accuratezza.

Tra le principali criticità analitiche da affrontare, vi era la necessità di garantire l'assenza di interferenza reciproca tra le molecole 1,25- e 24,25-diidrossi vitamina D₃, e 25-idrossi e 3epi-25idrossi vitamina D₃. Per quanto concerne la preparazione del campione, è stato necessario trovare condizioni che permettessero un recupero estrattivo, e quindi una sensibilità analitica, soddisfacente per tutti gli analiti. Inoltre, al fine di garantire l'applicabilità del metodo anche in soggetti pediatrici o debilitati, è stato necessario utilizzare un volume di campione minimo.

Sviluppo del metodo LC-MS/MS

Metodo di rivelazione in MS. I parametri strumentali che determinano la sensibilità (parametri di ionizzazione) e di specificità (parametri elettrici) sono stati ottimizzati per ciascuna analita singolarmente. I parametri elettrici, in particolare, consentono allo strumento di identificare l'analita sulla base del peso e della struttura.

Metodo di separazione LC. La colonna cromatografica selezionata è una Kinetex pentafluorofenilica (PFP) 100×3,0mm, 2,6µm. La composizione delle fasi mobili ottimale è risultata 0,05mM NH₄OH in H₂O per la fase acquosa, e 0,05mM NH₄OH in MeOH per la fase organica. La durata complessiva dell'analisi cromatografica è di 13min, ad un flusso pari a 400µL/min. La 24,25-diidrossi vitamina D₃ viene eluita a 3,27min, seguita dalla 1,25-diidrossi vitamina D₃ a 3,76min, dalla 25-idrossi vitamina D₃ a 6,12min, dalla 3-epi-25-idrossi vitamina D₃ a 6,43min, e dalla 25-idrossi vitamina D₂ a 6,57min.

Preparazione del campione. Il volume di siero minimo sufficiente per l'analisi del profilo analitico in studio è stato stabilito in 100µL. Per indurre un esaustivo rilascio degli analiti dalla proteina di trasporto VDBG, è stato scelto NH₄OH 0,5M. Per l'estrazione ci si è avvalsi della tecnica liquido-liquido, perché economica e rapida. La miscela organica di esano ed acetato di etile in proporzione 80:20 era quella che forniva il maggior recupero della 24,25-idrossi vitamina D₃.

Risultati

Il metodo cromatografico messo a punto ha portato ad una separazione soddisfacente della 25-idrossi dalla 3-epi-25-idrossivitaminina D₃, e della 1,25-idrossi dalla 24,25 diidrossi vitamina D₃. La sensibilità ed il range dinamico ottenuti sono soddisfacenti per 4 delle 5 molecole di interesse, e pari a 0,39 – 200, 0,78 – 25, 0,19 – 25 e 1,56 – 100ng/mL per 25-idrossivitaminina D₃, 3-epi-25-idrossivitaminina D₃, 24,25-diidrossivitaminina D₃ e 25-idrossivitaminina D₂, rispettivamente, utilizzando un volume di siero di soli 100µL. L'imprecisione è compresa tra 2,1 e 12,7%, mentre l'accuratezza è compresa tra 82,5 e 95,7%. Purtroppo, la sensibilità ottenuta per la 1,25 diidrossi vitamina D₃ con la strumentazione a disposizione è risultata insufficiente per determinarne i livelli circolanti. Per tanto non è stato possibile includere tale molecola nel metodo validato.

Conclusioni e sviluppi futuri

Grazie alla *expertise* laboratoristica sviluppata dal nostro gruppo nell'ultimo decennio riguardo le applicazioni della LC-MS/MS alla misurazione di ormoni, si è voluto recentemente affrontare una nuova sfida nel campo applicativo di tale tecnologia. Il punto di forza di tale tecnologia risiede, oltre che nella elevata sensibilità e specificità analitica, nella possibilità di caratterizzare simultaneamente pannelli multianalitici. Tale aspetto è di fondamentale importanza in sistemi biologici complessi quali il "sistema vitamina D", un'ampia famiglia che include non solo precursori e ormoni attivi, ma anche svariati metaboliti intermedi e vie sintetiche alternative.

È stato così intrapreso uno studio, anche grazie al finanziamento ottenuto da parte della Fondazione del Monte, dedicato alla caratterizzazione di varie forme circolanti di vitamina D₂ e D₃. Lo sviluppo biochimico-analitico del progetto si è rivelato complesso, pur portandoci ad ottenere una metodologia *in house* di rapida ed efficace esecuzione. L'intervallo dinamico e la sensibilità ottenuti ci permettono di individuare puntualmente sia gli stati di carenza, definiti dalla carenza del principale marcatore 25-idrossi vitamina D₃, che gli stati di tossicità, dovuti ad un eccesso di supplementazione, per la valutazione dei quali è utile la valutazione dell'isoforma D₂. Inoltre, il metodo permette di valutare i metaboliti diretti 24,25 diidrossi e 3-epi-idrossi vitamina D₃, il cui ruolo risulta ancora largamente sconosciuto in numerosi ambiti clinici.

È nostro obiettivo imminente applicare tale metodo a studi di ampia portata, volti a caratterizzare il pannello di metaboliti a nostra disposizione in rapporto a condizioni fisiologiche, descritte in base a età, sesso, stagionalità, dieta e adiposità, nonché a situazioni patologiche di largo impatto sulla popolazione, per le quali è stato ipotizzato in letteratura un coinvolgimento di stati di ipovitaminosi, quali obesità, salute metabolica, fertilità maschile e femminile.

Il metodo conseguito rappresenta, a nostro parere, un netto miglioramento tecnologico in rapporto a quanto disponibile ad oggi nei laboratori di analisi italiani. La gran parte di essi, infatti, offre il solo dosaggio della 25-idrossi vitamina D₃, mentre alcuni offrono anche il dosaggio della 1,25-diidrossi vitamina D₃. Inoltre, nella quasi totalità dei casi, questi dosaggi vengono effettuati mediante metodiche obsolete e naturalmente prone a problemi di specificità e sensibilità, quali gli IA. Tale disponibilità analitica rappresenta ad oggi il limite centrale alla conoscenza sistematica del ruolo svolto dalla moltitudine dei metaboliti della vitamina D, e delle potenzialità che dalla comprensione del sistema vitamina D deriverebbero in termini di strategie di prevenzione e/o interventistiche future.

Un limite del presente studio è rappresentato dalla impossibilità, ad oggi, di quantificare la 1,25-diidrossi vitamina D₃. Sebbene la molecola risponda bene alle condizioni generali del metodo sviluppato, i livelli circolanti risultano essere troppo bassi per la strumentazione LC-MS/MS in uso presso il nostro laboratorio (C.R.B.A.), pertanto, si renderà necessario in futuro studiare tale molecola con strumenti ancora più potenti. Inoltre, una prossima fase necessaria a completare la validazione del metodo, consisterà nel verificare l'accuratezza della metodologia da noi sviluppata in studi di comparazione con altre metodiche LC-MS/MS in uso in laboratori esteri di provata *expertise*. Un simile programma di armonizzazione, in collaborazione con nove centri di cinque nazioni europee, è stato recentemente avviato dal nostro gruppo per numerosi ormoni steroidei, per i quali il nostro gruppo ha validato da tempo un metodo LC-MS/MS.

Tabella:

COMPARAZIONE TRA LO STATO DELL'ARTE E RISULTATI OTTENUTI CON IL NOSTRO STUDIO

ANALITA	METODO di ROUTINE attualmente in uso in tutti i laboratori di analisi	METODO LC-MS/MS SVILUPPATO in corso di questo studio presso il C.R.B.A.
25-idrossi vitamina D ₃	Disponibile prevalentemente come IA, performance estremamente variabile tra metodi diversi	Performance adeguata e validata
3epi-25idrossi vitamina D ₃	Non disponibile	Performance adeguata e validata
1,25-diidrossi vitamina D ₃	Metodi IA scarsamente disponibili e con performance generalmente poco adeguata	Performance ottenuta non adeguata, ma migliorabile con piattaforme di ultima generazione
24,25-diidrossi vitamina D ₃	Non disponibile	Performance adeguata e validata
25-idrossi vitamina D ₂	Non disponibile	Performance adeguata e validata

Bibliografia

Bouillon R, Carmeliet G. Vitamin D insufficiency: Definition, diagnosis and management. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2018; 32:669-684.

Garg U. 25-Hydroxyvitamin D Testing: Immunoassays Versus Tandem Mass Spectrometry. *Clin Lab Med.* 2018; 38:439-453.

Wagner D, Hanwell HE, Schnabl K et al. The ratio of serum 24,25-dihydroxyvitamin D(3) to 25-hydroxyvitamin D(3) is predictive of 25-hydroxyvitamin D(3) response to vitamin D(3) supplementation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011;126:72-7.

LA NEUROINFIAMMAZIONE DALL'EVENTO ACUTO ALLA NEURODEGENERAZIONE CRONICA

Studio di nuovi fattori prognostici e di intervento preventivo nelle patologie neurodegenerative

Responsabile

Patrizia Hrelia, *Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie, Università di Bologna*

Gruppo di Studio

Federico Licastro (*Dipartimento di Medicina Specialistica Diagnostica e Sperimentale, Università di Bologna*), **Roberto Piperno** (*Centro Studi per la Ricerca sul Coma Casa dei Risvegli Luca De Nigris, Azienda USL di Bologna*)

Introduzione

Le malattie neurodegenerative rappresentano un insieme di patologie contraddistinte da un'irreversibile e progressiva perdita di cellule neuronali in specifiche aree del cervello. Tali patologie sono spesso condizioni debilitanti e in gran parte incurabili, possono essere sia acute, quali l'ictus (IC) e il trauma cranio encefalico (TCE), che croniche, quali la malattia di Alzheimer (AD) e di Parkinson. Attualmente le terapie disponibili sono solo di tipo sintomatico e quindi inefficaci nel modulare il processo degenerativo in atto. Le malattie neurodegenerative colpiscono 50 milioni di persone in tutto il mondo, un numero che, secondo l'OMS, sarà quasi triplicato entro il 2050 (OMS, 2017). L'invecchiamento della popolazione è tipicamente accompagnato da un aumento dell'incidenza delle malattie croniche, dall'aumento delle comorbidità e da una maggiore pressione sui sistemi di assistenza socio-sanitari.

L'eziopatologia delle malattie neurodegenerative risulta essere ancora poco chiara. Recenti studi hanno evidenziato il coinvolgimento di molteplici fattori cellulari e molecolari (LaFerla, 2007), tra i quali l'iperattivazione e perdita di regolazione nelle risposte infiammatorie mediate dalle cellule gliali, che determinano il rilascio di fattori proinfiammatori e l'alterazione della funzione autofagica-lisosomiale.

All'eziopatogenesi delle malattie neurodegenerative concorrono anche fattori ambientali di carattere fisico e traumatico. In particolare, il TCE risulta epidemiologicamente correlato all'AD (Yang, 2015). Lesioni cerebrali acute e croniche, conseguenti ad un insulto traumatico, possono comportare morte cellulare, degenerazione neuronale, perdita tessutale e gliosi. Si ritiene che una condizione di neuroinfiammazione cronica sia una delle conseguenze possibili del TCE, che può determinare un graduale deterioramento delle funzioni motorie e cognitive dopo il trauma. Infatti, un grave TCE o un evento ischemico possono accelerare o persino scatenare l'inizio di AD anche dopo molti anni, a prescindere dall'età in cui si è verificato l'evento acuto (Lucke-Wold, 2015).

In uno scenario di mancanza di valide soluzioni terapeutiche, la chiave per un miglioramento del quadro epidemiologico è la ricerca volta a comprendere le cause e i meccanismi alla base di malattie neurologiche e neurodegenerative.

In questo contesto, il progetto condotto presso i laboratori dei Dipartimenti FABIT, DIMES dell'Università di Bologna e la Casa dei Risvegli Luca De Nigris è stato orientato all'identificazione di percorsi patogenetici comuni nelle patologie neurodegenerative, sia acute che croniche, attraverso un approccio integrato di studi preclinici e clinici, al fine di delineare innovative strategie farmacologiche per la prevenzione e/o il contenimento della neuroinfiammazione, della neurodegenerazione e del deficit cognitivo associati a diverse patologie neurodegenerative, come l'AD, l'IC e il TCE durante il follow up clinico fino a 12 mesi.

Studio dei meccanismi e dei fattori per il controllo della sopravvivenza neuronale e dei processi neurodegenerativi

L'AD è una patologia neurodegenerativa che si manifesta clinicamente con un inesorabile declino della memoria associato ad un'alterazione delle capacità cognitive, conseguenze della progressiva perdita dei neuroni dell'ippocampo, dei nuclei della base e di altre aree cerebrali. Una delle ipotesi patogenetiche più accreditate sostiene che l'evento responsabile della neurodegenerazione e delle modificazioni morfologiche, funzionali e cognitive sia l'eccessiva formazione o accumulo di peptidi amiloidi. La proteina Abeta nel tessuto cerebrale esiste in diversi stati di aggregazione, come monomeri, dimeri e oligomeri ad alto peso molecolare; l'ulteriore aggregazione di questi ultimi genera le protofibrille ed infine le fibrille. L'ipotesi della "tossicità dell'oligomero Abeta" ha attirato l'attenzione di molti ricercatori per la possibilità di delucidare in questo modo la correlazione tra il deposito di Abeta nelle placche amiloidee e il deficit cognitivo. Per questo motivo, l'iniezione del peptide Abeta nel cervello di roditori può rappresentare un'alternativa ai modelli transgenici per lo studio degli effetti delle forme solubili di Abeta in assenza di placche, caratteristiche degli stadi precoci della malattia. Nell'ambito di questo progetto sono stati valutati gli effetti neurotossici del peptide Abeta in topi in cui è stata iniettata per via intracerebroventricolare (icv) la forma oligomerica del peptide. Trascorsi 10 giorni dall'intervento, è stato impiegato un approccio integrato di test comportamentali e tecniche molecolari e immunostochimiche per caratterizzare il modello sperimentale impiegato (Morrone, 2016).

Dalla valutazione comportamentale effettuata è emerso che l'Abeta determina un calo significativo sia dell'apprendimento che delle funzioni mnestiche (Figura 1).

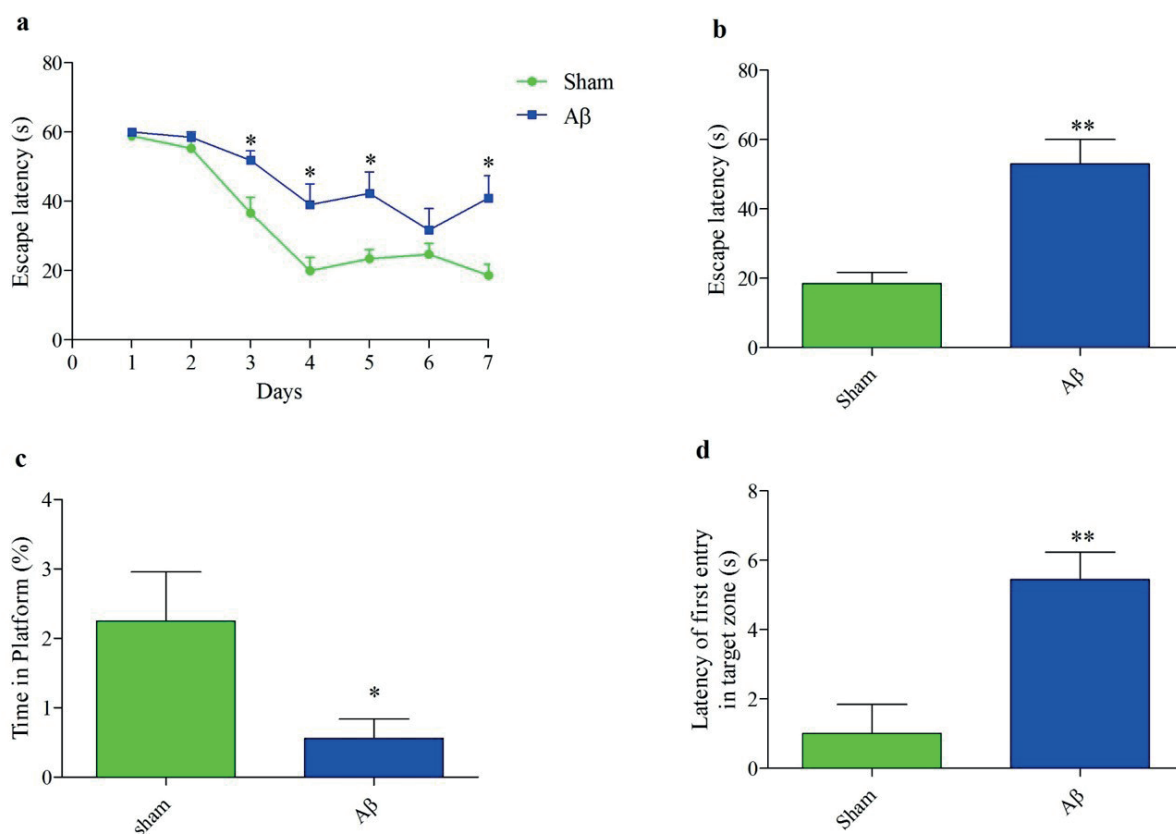


Figura 1. Effetti dell'iniezione icv di oligomeri di Abeta sulla performance dei topi nel test Morris Water Maze. Tempo necessario per raggiungere la piattaforma (escape latency) (b), tempo trascorso nel quadrante della piattaforma (c), tempo trascorso prima dell'ingresso nel quadrante della piattaforma (d). (a–c: *p < 0.05, d: **p < 0.01; t-test).

Per quanto riguarda i meccanismi molecolari e cellulari responsabili dei deficit cognitivi, si è verificato un aumento dei livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nei topi a cui sono stati iniettati gli oligomeri, dimostrando il coinvolgimento del danno ossidativo; al contempo si è evidenziato un aumento dei livelli di glutazione (GSH) che riflette probabilmente un tentativo di risposta adattativa da parte dell'organismo, a difesa dal danno indotto. Inoltre, dai risultati è emersa l'attivazione della caspasi-9 indotta dagli oligomeri di Abeta, dimostrando il coinvolgimento della morte cellulare apoptotica nei meccanismi di danno indotti dal peptide (Figura 2).

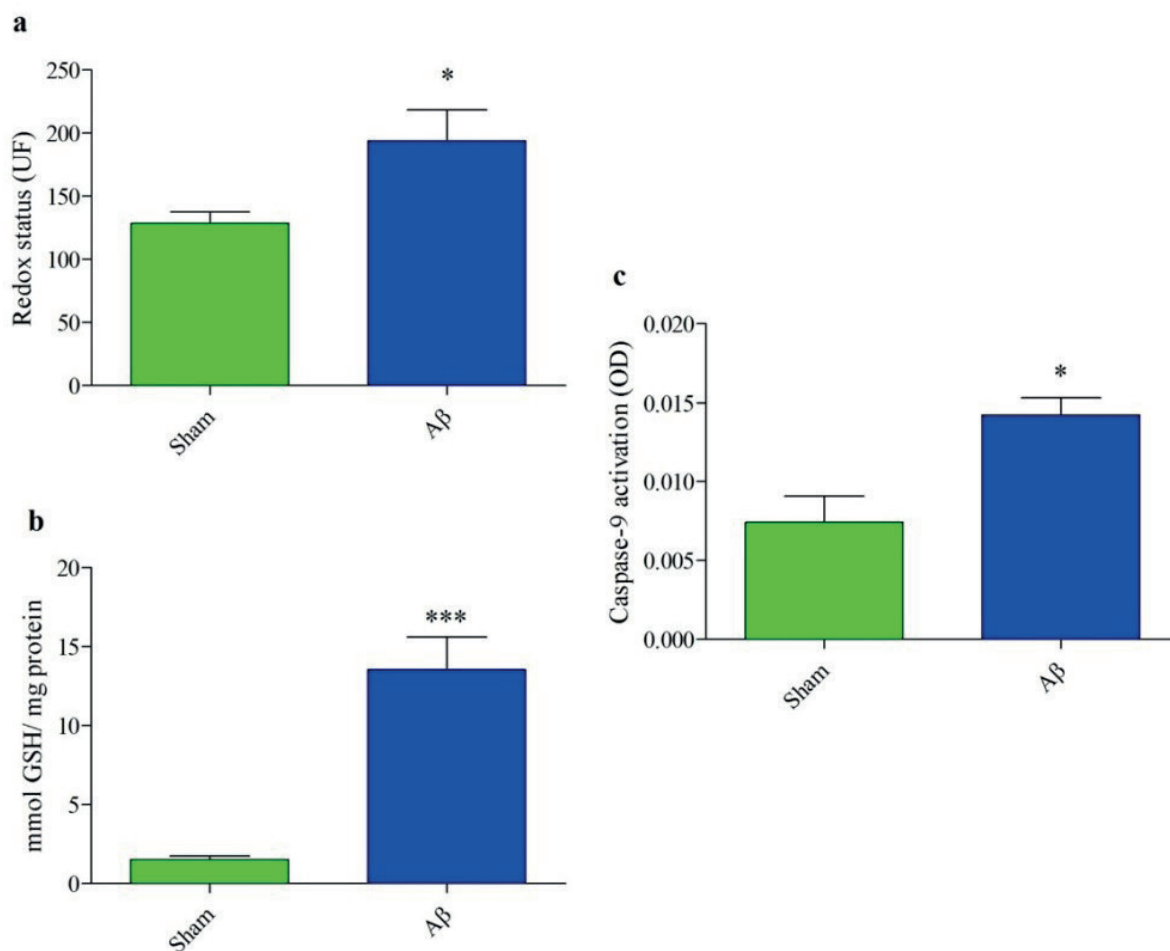


Figura 2. Effetti dell'iniezione icv di oligomeri di Abeta sullo stato redox (a), sui livelli di GSH (b) e sull'attivazione della caspasi-9 (c). (a) (* $p < 0,05$; t-test). (b) (** $p < 0,001$; t-test). (c) (* $p < 0,05$; t-test).

Lo studio dei principali pathway che mediano il meccanismo neurotossico hanno evidenziato che la tossicità degli oligomeri Abeta è legata all'aumento della fosforilazione di proteine coinvolte nei processi di memorizzazione, nella proteolisi aberrante di Abeta e nella cascata di eventi che precedono la formazione di grovigli neurofibrillari e la morte cellulare. In ultimo, dal nostro modello si evince anche una severa compromissione dell'attività sinaptica, come mostrato dalla significativa riduzione dell'espressione della proteina sinaptofisina.

Il modello descritto è stato successivamente impiegato per la valutazione dell'attività neuroprotettiva dell'estere feniletico dell'acido caffeico (CAPE) (Morroni, 2018). Il trattamento con CAPE ha mostrato una significativa attività antiossidante e antiapoptotica (Figura 4), effetti riconducibili alla sua capacità di modulare il fattore di trascrizione Nrf2 e i livelli di fosforilazione della proteina GSK3, chinasi coinvolta nei meccanismi di sopravvivenza cellulare (Figura 5). Infine, è stata definita l'azione antinfiammatoria del CAPE attraverso la quantificazione dell'attivazione di astrociti e microglia (Figura 6). I risultati ottenuti evidenziano un'interessante attività neuroprotettiva del CAPE, che potrebbe quindi risultare un utile strumento da affiancare alle terapie farmacologiche attualmente in uso.

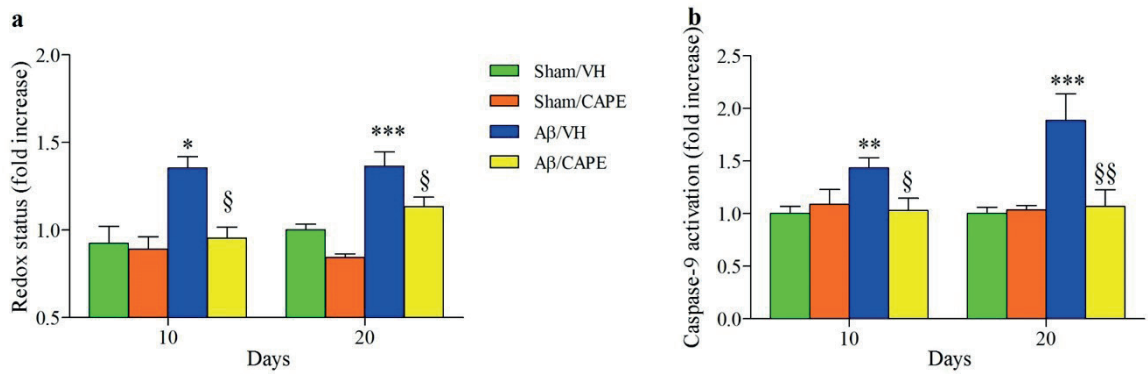


Figura 4. Effetti del CAPE (10 mg/kg per 10 giorni) sullo stato redox (a) e sull'attivazione della caspasi-9 (b). (* $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; § $p < 0,05$; §§ $p < 0,01$; ANOVA, post hoc test Bonferroni).

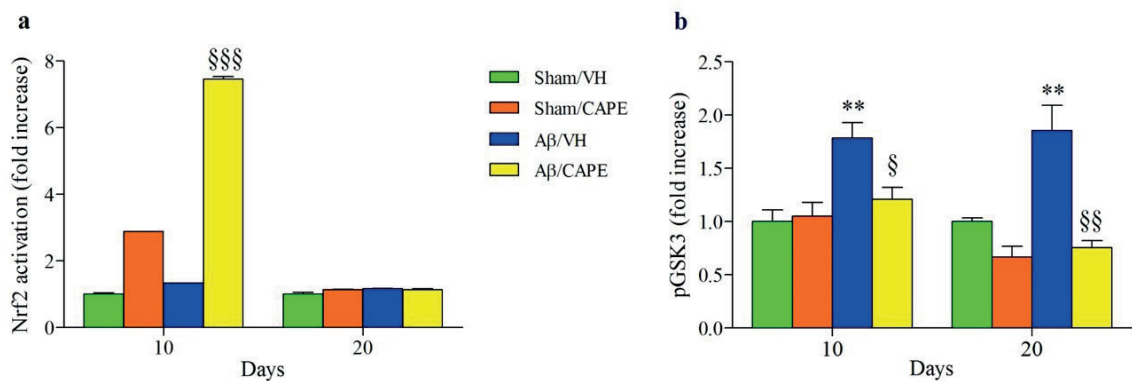


Figura 5. Effetti del CAPE (10 mg/kg per 10 giorni) sull'attivazione di Nrf2 (a) e sulla fosforilazione della proteina GSK3 (b). (** $p < 0,01$; § $p < 0,05$; §§ $p < 0,01$; ANOVA, post hoc test Bonferroni)



Figura 6. Effetti del CAPE (10 mg/kg per 10 giorni) sull'attivazione della risposta infiammatoria mediata dalla microglia (a) e dagli astrociti (b). (*** $p < 0,001$; § $p < 0,05$; §§ $p < 0,01$; §§§ $p < 0,001$; ANOVA, post hoc test Bonferroni).

Un ulteriore obiettivo è stato quello di indagare la connessione fra le patologie neurodegenerative croniche ed acute, ed il potenziale ruolo neuroprotettivo della modulazione negativa del recettore CD36. A questo scopo è stato impiegato un modello murino di occlusione transitoria dell'arteria media cerebrale (MCAo). In seguito ad IC è possibile osservare l'attivazione di numerose risposte pro-morte cellulari, quali infiammazione, stress ossidativo, e disfunzione vascolare, che culminano nella morte cellulare apoptotica e necrotica. Il CD36 è un recettore scavenger di classe B che riconosce patterns molecolari patogeno-associati ed è coinvolto nella risposta infiammatoria attivata dall'insulto ischemico. Appare evidente che gli animali knockout per tale recettore presentino una migliore performance nei test comportamentali ed

una minore estensione dell'infarto ischemico in seguito ad IC focale.

L'obiettivo primario è stato quello di stabilire la batteria di test motori e cognitivi e la loro scansione temporale in seguito ad IC, al fine di determinare gli effetti a lungo termine di tale condizione patologica, nonché di determinare se la deplezione del recettore di interesse fosse efficace nell'azione neuroprotettiva. I risultati ottenuti hanno evidenziato come gli animali knockout per il recettore CD36 presentassero una migliore prestazione motorio-sensoriale rispetto agli animali wild type lesionati evidenziando il coinvolgimento di tale recettore nell'evoluzione a lungo termine dell'IC (Figura 7).

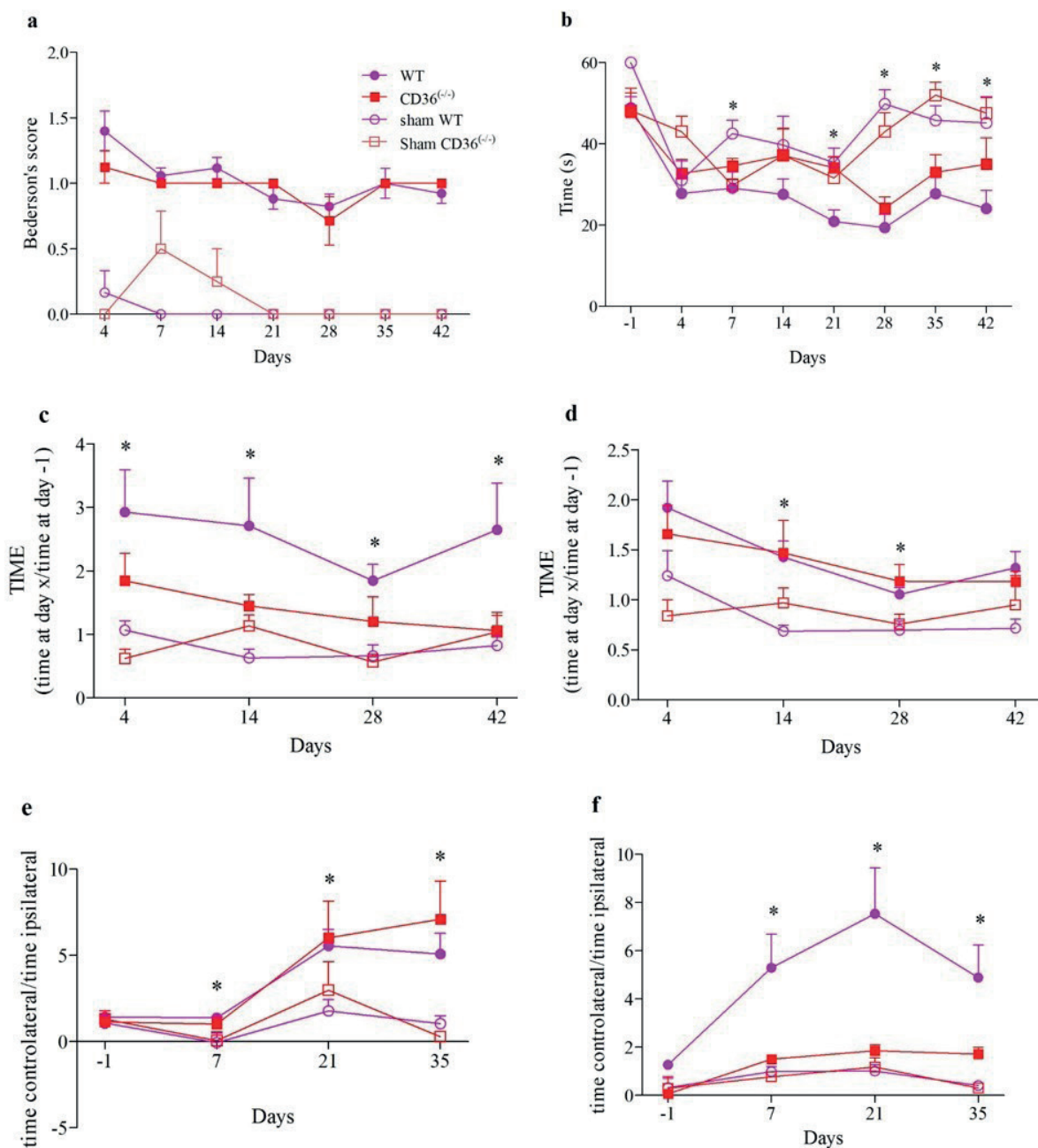


Figura 7. Effetti del recettore CD36 sulla performance motorio-sensitiva in seguito ad IC. (a) Bederson test. (b) Wire test, indice della forza. (c, d) Pole test, indice della coordinazione e dell'equilibrio. (e, f) Tape test, indice della sensibilità e del controllo del movimento fine.

Analisi del recupero e/o deterioramento long term delle funzioni cognitive in pazienti con esiti di grave TCE e analisi di biomarcatori di infiammazione e stress ossidativo

e stress ossidativo. I soggetti che ne sono colpiti possono mostrare diversi profili di recupero neurologico e una combinazione di danni ossidativi ed infiammatori possono influenzare il decorso della situazione patologica. È noto che una sovraespressione di citochine può essere misurata nel sangue periferico già nelle prime ore/giorni dopo la lesione, ma poco si conosce circa le settimane e i mesi che costituiscono le fasi post-acute e cronica. Inoltre, non sono disponibili informazioni circa le risposte mediate dai principali enzimi antiossidanti: superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT) e dagli enzimi legati al ciclo redox del GSH, glutatione perossidasi (GPx), glutatione reduttasi (GR).

A questo scopo sono stati misurati biomarcatori di infiammazione e stress ossidativo su campioni plasmatici ottenuti da soggetti selezionati. I test sono stati effettuati anche grazie alle collaborazioni da tempo attivate con colleghi del Dipartimento QuVi dell'Università di Bologna.

Nell'ambito di questo progetto è stato possibile valutare in un campione di 22 pazienti con grave TCE i livelli plasmatici di citochine pro-infiammatorie e l'attività di enzimi antiossidanti in fase post-acute (un mese dopo l'evento traumatico) e cronica (6 mesi dopo l'evento disabilità - Licastro, 2016). I risultati evidenziano che in fase cronica alti livelli di TNF- α , INF- λ e bassi livelli di glutatione perossidasi (GPx) sono statisticamente associati ad un quadro di peggiore recupero cognitivo valutato tramite il disability rating scale (DRS) (Figura 8).

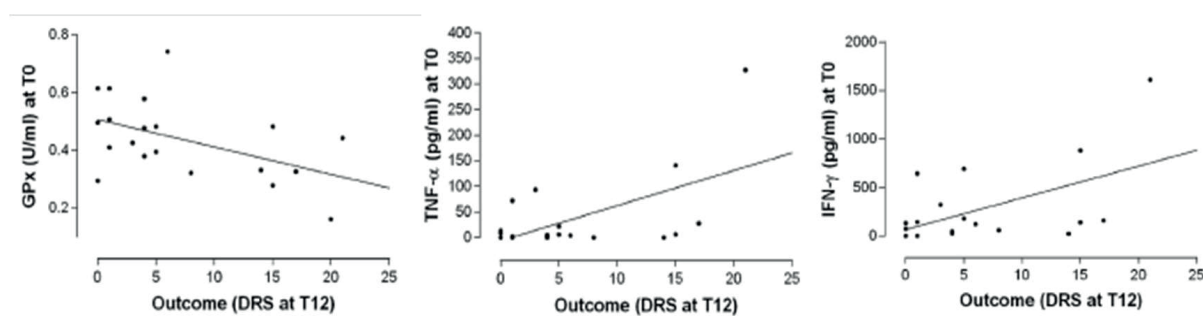


Figura 8. Relazione tra i livelli basali (T0) di GPx, TNF- α e IFN- γ ed i risultati del test funzionale DRS a 12 mesi. La persistenza di un quadro infiammatorio e l'alterazione dell'omeostasi redox influenzano negativamente il recupero funzionale e cognitivo, evidenziando come questi parametri possano essere proposti come marcatori plasmatici delle potenzialità di recupero dopo un grave trauma cranio encefalico.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti dal nostro progetto hanno evidenziato una nuova prospettiva di indagine per la prevenzione della neurodegenerazione, attraverso la valutazione dei meccanismi che orchestrano i percorsi neurodegenerativi, aprendo la strada allo sviluppo di strategie neuroprotettive e neuroristorative. Questo è particolarmente rilevante per una popolazione che invecchia, e in cui l'invecchiamento in salute è auspicabile. Il presente progetto, associando gli sforzi dei diversi gruppi di ricercatori impegnati nello studio dei meccanismi patogenetici comuni alle diverse patologie neurodegenerative, croniche e acute, ha suggerito che è possibile pensare a nuovi approcci preventivi, protettivi e terapeutici per limitare non solo l'entità del danno, ma contrastare anche la neurodegenerazione promossa dall'insulto tossico o traumatico nel cervello.

BIBLIOGRAFIA

- LaFerla FM, et al. *Nat Rev Neurosci.* 8: 499-509; 2007.
 Licastro F, et al. *Front Neurol.*; 7: 189; 2016.
 Lucke-Wold BP, et al. *J Alzheimers Dis.* 43(3): 711-24; 2015.
 Morrioni F, et al. *Behav Brain Res*; 314:106-15; 2016.
 Morrioni F, et al. *Aging Dis*; ;9(4):605-622; 2018.
 Yang ST, et al. *J Neurol Sci.* 349 (1-2): 99-104; 2015.

RICONOSCIMENTO AUTOMATICO DELLA CATAPLESSIA

Sviluppo di un sistema computerizzato per la identificazione della cataplessia basato sulla analisi di registrazioni video

Responsabile

Giuseppe Plazzi, *Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie, Università di Bologna*

Gruppo di Studio

Ilaria Bartolini (*Dipartimento Informatica – Scienza e Ingegneria, Università di Bologna*), **Andrea Di Luzio** (*Dipartimento Informatica e Dipartimento Scienze Biomediche e Neuromotorie, Università di Bologna*), **Fabio Pizza**, **Giulia Neccia**, **Elena Antelmi**, **Stefano Vandi** (*Dipartimento Scienze Biomediche e Neuromotorie, Università di Bologna*)

Background

La narcolessia di tipo 1 (NT1) è una malattia rara caratterizzata da sonnolenza diurna, cataplessia (ovvero improvvise perdite di tono muscolare in veglia scatenate da stimoli emotivi), allucinazioni e paralisi del sonno alle transizioni sonno-veglia e sonno notturno disturbato. La patologia esordisce in età pediatrica o giovanile, ha un decorso cronico e ritrova la causa patogenetica nella perdita di neuroni produttori di ipocretina a livello dell'ipotalamo dorso-laterale (AASM 2014).

La NT1 soffre di un enorme ritardo tra comparsa dei sintomi e raggiungimento di una corretta diagnosi, stimato con una media compresa tra i 14 ed i 15 anni a livello europeo e dei più rilevanti studi internazionali (Luca 2013; Thorpy 2014). Il ritardo della diagnosi è dovuto non solo al mancato riconoscimento dei sintomi della malattia, ma anche alla erronea interpretazione dei fenomeni cataplettici come espressione di altri disturbi, ad esempio episodi di perdita di coscienza di natura epilettica, riduzioni di forza da patologia neuromuscolare o addirittura alterazioni comportamentali di pertinenza psichiatrica o neuropsichiatrica infantile (Thorpy 2014). Pochi studi hanno considerato le caratteristiche video-poligrafiche della cataplessia in età adulta (Rubboli 2000; Vetrugno 2010) e solo recentemente è stato descritto il fenotipo motorio della cataplessia pediatrica utilizzando esclusivamente registrazioni video degli attacchi evocati dalla visione di cartoni divertenti (Serra 2008; Plazzi 2011; Pizza 2013a). Tali lavori scientifici hanno evidenziato in primo luogo la possibilità di documentare gli eventi cataplettici sia nel setting del laboratorio di poligrafia che nel contesto più semplice di registrazioni video. Inoltre hanno mostrato come nel contesto della risposta fisiologica alla risata vi siano degli elementi distintivi della cataplessia, particolarmente evidenti a livello delle modificazioni della mimica facciale e rilevabili da neurologi in cieco rispetto alla condizione del paziente (o del controllo sano), che in prospettiva potrebbero diventare indispensabili strumenti a guida della corretta identificazione diagnostica. Inoltre la documentazione del fenomeno cataplettico è risultata indispensabile nelle situazioni cliniche ambigue in cui le cadute riferite in anamnesi si rivelino di origine "funzionale", ovvero nel caso in cui si tratti di "pseudo cataplessia" nel contesto di una sostanziale patologia psichiatrica (Plazzi 2010; Pizza 2013b; Pizza 2018).

L'attuale progetto di ricerca è stato finalizzato alla messa a punto di un metodo per il riconoscimento automatico della cataplessia tramite l'applicazione di tecniche di analisi automatica del contenuto visivo associato alle registrazioni video effettuate su pazienti con NT1 e su controlli sani (o altra ipersonnia di origine centrale non associata a cataplessia) sottoposti a stimolazione emotiva tramite visione di filmati divertenti atti ad evocare il riso.

Materiali e Metodi

Registrazione video

Nel corso dell'ospedalizzazione per sospetta ipersonnia del sistema nervoso centrale c/o il Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie dell'Università di Bologna (3-4 ricoveri alla settimana), i pazienti

sono stati sottoposti alla seguente serie di accertamenti: valutazione clinica sistematica, monitoraggio polisonnografico prolungato del ciclo sonno-veglia della durata di 48 ore (Pizza 2013c), test delle latenze multiple dell'addormentamento, ed una puntura lombare finalizzata al dosaggio del livello di ipocretina liquorale (AASM 2014). È stato inoltre effettuato un test in laboratorio finalizzato ad evocare e documentare l'eventuale occorrere di cataplessia secondo le modalità riportate in precedenti studi sul fenotipo motorio della cataplessia in pazienti di età pediatrica (Serra 2008; Plazzi 2011; Pizza 2013b; Vandi 2017). In breve il test viene effettuato in laboratorio di poligrafia, il paziente è monitorato con i parametri poligrafici standard e viene dapprima intervistato per determinare le individuali preferenze in ambito di filmati in grado di evocare una risata e, in caso sia sonnolento, viene invitato ad effettuare un breve pisolino. Il test prevede che il paziente sia messo a proprio agio in posizione seduta con davanti un computer su cui vengono proiettati filmati presi da cartoni, film, programmi televisivi comici (per lo più scelti dal singolo paziente eventualmente via connessione internet) e nel contempo il paziente viene registrato sia nei propri parametri neurofisiologici sia nel proprio comportamento motorio tramite videocamera sotto il controllo di personale tecnico addestrato. Il test dura da un minimo di 20 minuti ad un massimo di 60 minuti; nel caso sia evidenziabile durante il test una modificazione comportamentale suggestiva di cataplessia, il paziente viene interrogato per confermare che abbia percepito soggettivamente l'occorrere di debolezza muscolare. Al termine il test è pertanto in cieco rispetto ai risultati dei successivi accertamenti previsti nel corso del ricovero, il personale tecnico addestrato (in cieco rispetto al sospetto diagnostico) e successivamente il personale medico rivalutano la ripresa ed il tracciato poligrafico a verifica dell'occorrere o meno di fenomeni motori e giudicano questi ultimi sia nel dettaglio delle modifiche della mimica facciale (ptosi, apertura della bocca, protrusione della lingua, cedimento del capo) che nella loro globale natura (cataplessia, pseudo cataplessia, normale risposta alla risata) prendendo in considerazione il comportamento motorio evidenziato dalla ripresa video congiuntamente ai dati neurofisiologici documentati (atonie muscolare nei parametri elettromiografici). Ai fini dello studio l'identificazione dei fenomeni motori parcellari è stata effettuata tramite una "etichettatura" dettagliata dei singoli fenomeni motori. Ai fini del presente studio sono state valutate registrazioni video di un gruppo di 15 pazienti con NT1 ed un parallelo gruppo di 15 soggetti bilanciato per distribuzione di età e sesso.

Analisi del contenuto video

L'analisi automatica delle registrazioni video dei pazienti al punto precedente è stata effettuata mediante l'applicazione del framework software SHIATSU (Bartolini 2010a; Bartolini 2010b; Bartolini 2010c; Bartolini 2013).

Nel dettaglio, SHIATSU (Semantic-based Hierarchical Automatic Tagging of videos by Segmentation using cUts) è un'architettura di analisi automatica del contenuto di collezioni video generiche sviluppato dal gruppo di ricerca "MultiMedia Database" del Dipartimento di Informatica – Scienza e Ingegneria (DISI). Partendo dal framework SHIATSU, è stato messo a punto uno strumento per il riconoscimento della cataplessia in termini d'identificazione automatica dei "pattern motori" (ptosi, apertura della bocca, cedimento del capo) che caratterizzano la cataplessia; il tutto, sfruttando e specializzando opportunamente le specificità proprie di SHIATSU, ovvero abilità di identificazione automatica dei "punti di taglio" di un video, e conseguente sua suddivisione nelle parti costituenti sulla base del riconoscimento automatico dei pattern motori di interesse e confrontandole con le categorizzazioni fornite dal personale tecnico e medico competente (Bartolini 2013, Bartolini 2015, Bartolini 2011).

Risultati

Il personale tecnico e medico ha identificato 153, 105, e 11 episodi di ptosi, apertura della bocca e caduta del capo in pazienti NT1, mentre SHIATSU ha identificato un maggiore numero di episodi nello stesso gruppo di soggetti.

Al contrario nei soggetti non narcolettici gli esaminatori non hanno identificato alcun episodio motorio di interesse, mentre SHIATSU ha identificato elementi compatibili con ptosi in due registrazioni ed ha

confermato l'assenza di fenomenologia motoria nei restanti 13 pazienti. I casi di falsa positività all'analisi automatica sono risultati concomitanti con intensa risata e occorrenza del “sorriso di Duchenne” (contrazione della parte laterale del muscolo orbicolare dell'occhio sincrona alla risata).

Discussione

Il presente lavoro ha mostrato una adeguata sensibilità e specificità dell'approccio automatico per l'identificazione della cataplessia in pazienti affetti da NT1 ed analogamente ottimi risultati nell'esclusione della cataplessia durante la risata (Bartolini 2018). Tali risultati sono clinicamente rilevanti in quanto prospettano la possibilità di sviluppare in futuro strumenti utili alla diagnosi differenziale della cataplessia nonché alla quantificazione della severità della stessa in maniere non operatore dipendente in un contesto in cui tale fenomeno non viene attualmente confermato da test obiettivi validati.

Conclusioni

I risultati di questo studio incoraggiano lo sviluppo di più complessi approcci automatici per identificare la cataplessia, potenzialmente utili non solo ai fini di una diagnostica medica, ma anche applicabili quali strumenti di screening via web per favorire l'emersione di una patologia che è rara ma altresì scarsamente e tardivamente riconosciuta (Bartolini 2018).

Riferimenti bibliografici

- American Academy of Sleep Medicine. International classification of sleep disorders, 3rd ed. Darien, IL: American Academy of Sleep Medicine, 2014.
- I. Bartolini and C. Romani. SHIATSU: Annotating Your Videos the Easy Way!. In *Proceedings of the 3rd International Conference on Similarity Search and Applications (SISAP 2010)*, Istanbul, Turkey, September 2010, a.
- I. Bartolini and C. Romani. Efficient and Effective Similarity-based Video Retrieval. In *Proceedings of the 3rd International Conference on Similarity Search and Applications (SISAP 2010)*, Istanbul, Turkey, September 2010, b.
- I. Bartolini, M. Patella, and C. Romani. SHIATSU: Semantic-Based Hierarchical Automatic Tagging of Videos by Segmentation using Cuts. In *Proceedings of the 3rd International ACM MM Workshop on Automated Information Extraction in Media Production (AIEMPro10)*, Florence, Italy, October 2010, c.
- I. Bartolini, M. Patella, and G. Stromei. The Windsurf Library for the Efficient Retrieval of Multimedia Hierarchical Data. In *Proceedings of the International Conference on Signal Processing and Multimedia Applications (SIGMAP 2011)*, Seville, Spain, July 2011. Best Paper Award.
- I. Bartolini, M. Patella and C. Romani. SHIATSU: Tagging and Retrieving Videos without Worries. In *Multimedia Tools and Applications Journal (MTAP)*, DOI: 10.1007/s11042-011-0948-1, 63(2): 357-385, 2013.
- I. Bartolini and M. Patella. Multimedia Queries in Digital Libraries. In *Data Management in Pervasive Systems*, Series: Data-Centric Systems and Applications, ISBN: 978-3-319-20062-0, Springer, November 2015.
- Bartolini I, Pizza F, Di Luzio A, Neccia G, Antelmi E, Vandi S, Plazzi G. Automatic detection of cataplexy. *Sleep Med.* 2018 Dec;52:7-13. doi: 10.1016/j.sleep.2018.07.018.
- Luca G, Haba-Rubio J, Dauvilliers Y, Lammers GJ, Overeem S, Donjacour CE, Mayer G, Javidi S, Iranzo A, Santamaria J, Peraita-Adrados R, Hor H, Kutalik Z, Plazzi G, Poli F, Pizza F, Arnulf I, Lecendreux M, Bassetti

- C, Mathis J, Heinzer R, Jennum P, Knudsen S, Geisler P, Wierzbicka A, Feketeova E, Pfister C, Khatami R, Baumann C, Tafti M; European Narcolepsy Network. Clinical, polysomnographic and genome-wide association analyses of narcolepsy with cataplexy: a European Narcolepsy Network study. *J Sleep Res* 2013;22:482-95.
- Pizza F, Franceschini C, Peltola H, Vandi S, Finotti E, Ingravallo F, Nobili L, Bruni O, Lin L, Edwards MJ, Partinen M, Dauvilliers Y, Mignot E, Bhatia KP, Plazzi G. Clinical and polysomnographic course of childhood narcolepsy with cataplexy. *Brain* 2013a;136:3787-95.
- Pizza F, Vandi S, Poli F, Moghadam KK, Franceschini C, Bellucci C, Cipolli C, Ingravallo F, Natalini G, Mignot E, Plazzi G. Narcolepsy with cataplexy mimicry: the strange case of two sisters. *J Clin Sleep Med* 2013b;9(6):611-2.
- Pizza F, Moghadam KK, Vandi S, Detto S, Poli F, Mignot E, Ferri R, Plazzi G. Daytime continuous polysomnography predicts MSLT results in hypersomnias of central origin. *J Sleep Res* 2013c;22(1):32-40.
- Pizza F, Antelmi E, Vandi S, Meletti S, Erro R, Baumann CR, Bhatia KP, Dauvilliers Y, Edwards MJ, Iranzo A, Overeem S, Tinazzi M, Liguori R, Plazzi G. The distinguishing motor features of cataplexy: a study from video-recorded attacks. *Sleep*. 2018 May 1;41(5).
- Plazzi G, Khatami R, Serra L, Pizza F, Bassetti CL. Pseudocataplexy in narcolepsy with cataplexy. *Sleep Med*. 2010 Jun;11(6):591-4.
- Plazzi G, Pizza F, Palaia V, Franceschini C, Poli F, Moghadam KK, Cortelli P, Nobili L, Bruni O, Dauvilliers Y, Lin L, Edwards MJ, Mignot E, Bhatia KP. Complex movement disorders at disease onset in childhood narcolepsy with cataplexy. *Brain* 2011;134:3477-89.
- Rubboli G, d'Orsi G, Zaniboni A, Gardella E, Zamagni M, Rizzi R, Meletti S, Valzania F, Tropeani A, Tassinari CA. A video-polygraphic analysis of the cataplectic attack. *Clin Neurophysiol* 2000;111 Suppl 2:S120-8.
- Serra L, Montagna P, Mignot E, Lugaresi E, Plazzi G. Cataplexy features in childhood narcolepsy. *Mov Disord*. 2008 Apr 30;23(6):858-65.
- Thorpy MJ, Krieger AC. Delayed diagnosis of narcolepsy: characterization and impact. *Sleep Med*. 2014;15:502-7.
- Vandi S, Pizza F, Antelmi E, Neccia G, Iloti M, Mazzoni A, Avoni P, Plazzi G. A standardized test to document cataplexy. *Sleep Med*. 2017 Oct 9. pii: S1389-9457(17)30375-1. doi: 10.1016/j.sleep.2017.08.021.
- Vetrugno R, D'Angelo R, Moghadam KK, Vandi S, Franceschini C, Mignot E, Montagna P, Plazzi G. Behavioural and neurophysiological correlates of human cataplexy: a video-polygraphic study. *Clin Neurophysiol* 2010;121:153-62.

LA CRIOCONSERVAZIONE DEI GAMETI NELLA TUTELA DELLA FERTILITÀ UMANA E NELLA ZOOTECONOLOGIA

Sostanze antiossidanti ed ottimizzazione delle tecniche di crioconservazione dei gameti: studio comparativo nella specie umana e suina

Responsabile

Renato Seracchioli, *Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università di Bologna*

Gruppo di Studio

Carlo Tamanini, Giovanna Galeati (*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna*)
Giuseppe Damiano, Nilla Calza, Leonardo Notarangelo (*Dipartimento delle Donne, del Bambino e delle Malattie Urologiche, Azienda Ospedaliero Universitaria Policlinico S. Orsola – Malpighi, Bologna*)

Introduzione

La crioconservazione dei gameti ha un ruolo fondamentale sia nelle procedure di PMA, in quanto consente un notevole miglioramento dei tassi di gravidanza cumulativa, sia nei programmi di tutela della fertilità in pazienti a rischio di esaurimento precoce della propria funzione riproduttiva, primitiva o secondaria a patologie neoplastiche o quale conseguenza delle terapie mediche (radioterapia, chemioterapia) o chirurgiche. L'efficacia e la sicurezza di questa metodica è stata largamente studiata nella popolazione infertile e nei cicli da ovodonazione e dal 2013 non è più considerata sperimentale nella tutela della fertilità avendo dato risultati sicuri e riproducibili (Gook et al.1994; Porcu et al. 1997, Porcu 2000, Oktay 2006, Porcu 2008, ASRM 2013 AIOM 2017). Negli animali la crioconservazione dei gameti è uno dei mezzi più validi per il miglioramento delle biotecnologie riproduttive, il recupero di patrimoni genetici di razze in estinzione e per sostenere la biodiversità animale.

Nel processo di crioconservazione degli ovociti e degli spermatozoi il danno ossidativo sembra essere tuttavia responsabile di un minor tasso di fecondazione e sviluppo embrionale dovuto alla riduzione della concentrazione del glutatione intracellulare e l'accumulo di radicali liberi dell'ossigeno (Agarwal et al 2005, Somfai et al., 2007).

STUDIO GAMETI UMANI

Obiettivi

Obiettivo del progetto è stato quello di ottimizzare il protocollo di congelamento/scongelo dei gameti umani, riducendo il danno ossidativo mediante l'identificazione di sostanze antiossidanti tale da migliorare l'efficienza clinica della crioconservazione.

Materiali e Metodo

Le sostanze antiossidanti utilizzate nei processi di vitrificazione/warming degli ovociti umani sono state: Acido Folico (Vitamina B9), Vitamina B6 e Cobalamina (vitamina B 12) alla concentrazione di 400 µg/ml; Acido Ascorbico, alla concentrazione di 50 µmol/ml; Taurina e L-Carnitina alla concentrazione: 300µg/ml (Halliwell et al. 1999. Guaiquil et al., 2001 Wang et al 2002, Asok, 2007, Zou, 2008). La sostanza antiossidante utilizzata nei processi di congelamento/scongelo degli spermatozoi è stata il Resveratrolo (3,5,4' - Triidrossistilbene) (Agarwal et al. 2005, Aitken et al 2006).

Risultati

Vitrificazione/Warming Ovociti

Sono stati eseguiti 70 cicli di vitrificazione senza aggiunta di antiossidanti, per un totale di 424 (6.1±4.8) ovociti crioconservati e 75 cicli di vitrificazione con aggiunta di antiossidanti (Acido Ascorbico, Acido Folico, Vitamina B6 e Cobalamina, Taurina e L-Carnitina), con un numero medio di ovociti vitrificati per ciclo pari a 5.8±3.8 per un totale di 433 ovociti crioconservati. Sono stati scongelati (warming) 291 ovociti con un numero medio per ciclo di 4.3±2.0 senza aggiunta di antiossidanti, e 311 ovociti con un numero medio per ciclo di 4.4±2.1 con aggiunta di antiossidanti. I tassi di sopravvivenza ottenuti nei due gruppi sono stati: 86.2% (251/291) e 87.1% (271/311) rispettivamente nei cicli con e senza aggiunta di antiossidanti. Sono stati eseguiti 65 cicli di inseminazione ovocitaria senza antiossidanti e 67 cicli di inseminazione con l'aggiunta di antiossidanti, con un totale rispettivamente di 240 (3.5±1.2) e 252 (3.7±1.2) ovociti inseminati mediante ICSI. La percentuale di fecondazione ottenuta nei cicli di inseminazione senza antiossidanti è stata del 76.6% (184/240) con una percentuale di clivaggio embrionale di 88.1% (162/184), ed una percentuale di embrioni di buona qualità del 50.6% (embrioni di Grado 1- 2). Nei cicli di inseminazione con antiossidanti è stata ottenuta una percentuale di fecondazione del 76.2%, di clivaggio del 87.0% ed una percentuale di embrioni di buona qualità del 52.1% (Tab. 1). L'analisi dei dati rilevati non ha evidenziato differenze statisticamente significative in termini di età, tassi di sopravvivenza, fecondazione; sviluppo embrionale e qualità embrionale nei gruppi valutati.

Congelamento/Scongelo Spermatozoi

Sono stati eseguiti 20 cicli di crioconservazione degli spermatozoi. Ogni campione dedicato allo studio è stata suddivisa in tre aliquote: la prima è stata mantenuta senza aggiunta di antiossidanti (controllo), le altre due aliquote sono state trattate rispettivamente con 15 µM e 30 µM di Resveratrolo. I risultati allo scongelamento dei campioni seminali, rispetto al controllo non trattato con aggiunta di antiossidante hanno evidenziato che il Resveratrolo alla concentrazione di 30 µM è in grado di migliorare la motilità sia totale che progressiva (29.7% vs 18% P<0.001 per la motilità totale e 18% verso 5% p<0.001 per la progressiva). Alla concentrazione di 15 µM il miglioramento della motilità rispetto al controllo non è significativo. Ad entrambe le concentrazioni il Resveratrolo non mostra effetti migliorativi sulla percentuale delle forme normali degli spermatozoi scongelati (Tab. 2).

STUDIO GAMETI SUINI

Obiettivi

Obiettivo del progetto è stato quello di testare l'effetto di molecole di origine vegetale con attività antiossidante addizionate durante le manipolazioni in vitro dei gameti. In particolare sono state testate l'epigallocatechina-3-gallato (EGCG), catechina presente in grande quantità nel tè verde, e il resveratrolo (RESV), polifenolo naturale estratto dalla buccia degli acini d'uva. Sono stati inoltre valutati gli effetti della supplementazione di un estratto etanolic di tannini da Quercus Robur sulla fecondazione in vitro di ovociti e spermatozoi di maiale e lo sviluppo di embrionale.

Sono stati dapprima valutati gli effetti della supplementazione singola in diverse concentrazioni di RES (0.5, 1 o 2 mM) e EGCG (25, 50 o 100 µM) e combinata dell'EGCG 50 µM e del RESV 2 mM. Allo scongelamento seminale sono state valutate caratteristiche qualitative del seme, quali vitalità, integrità acrosomiale e tasso di fertilizzazione degli ovociti. Gli effetti della supplementazione di estratti di tannino sulla fecondazione in vitro e sulle caratteristiche seminali allo scongelamento sono stati valutati ai dosaggi di 0.1, 10 e 100 µg/ml.

Risultati

Ogni campione seminale suino scongelato è stato suddiviso in tre aliquote: la prima è stata mantenuta senza aggiunta di antiossidanti (gruppo di controllo, CTR) e le altre due con aggiunta di RES o EGCG. La vitalità degli spermatozoi e l'integrità degli acrosomi e la capacità di penetrazione degli spermatozoi sono stati valutati nei gruppi CTR, RES o EGCG dopo 1 ora di incubazione a 37 ° e con differenti concentrazioni di

RES e EGCG. I risultati hanno evidenziato che il RES e EGCG, da sole o in associazione, quando addizionate nella fase di scongelamento degli spermatozoi determinano un aumento significativo della percentuale degli ovociti fecondati in vitro, anche se la loro associazione non porta ad un effetto sommazione (Tab. 3a e 3b). I risultati hanno inoltre evidenziato che l'estratto di tannini a basse dosi (10 µg/ml) è in grado di modulare il grado di capacitazione degli spermatozoi e di aumentare la percentuale di ovociti fecondati mentre ad alte dosi (100 µg/ml) esplica un effetto negativo (Tab. 4).

Discussione

L'analisi dei risultati ottenuti sugli spermatozoi umani indicano che l'aggiunta di Resveratrolo alla concentrazione di 30 µM è in grado di limitare gli effetti del danno ossidativo sugli spermatozoi. Sebbene siano necessari ulteriori dati i risultati ottenuti incoraggiano lo sviluppo di protocolli di crioconservazione degli spermatozoi a basso danno ossidativo di particolare rilevanza clinica nella crioconservazione seminale di pazienti oncologici. I risultati ottenuti nella valutazione dell'efficacia dell'uso degli antiossidanti sugli ovociti umani hanno mostrato una percentuale di sopravvivenza (87.1% vs 86.2%) ed una percentuale di embrioni clivati di buona qualità (I e II grado) (88.1% vs 76.2%) maggiore nei campioni trattati con aggiunta di antiossidanti. Seppure non statisticamente significativi questi dati sembrano tuttavia indicare che la scelta di continuare la ricerca di riduzione del danno ossidativo possa consentire di formulare protocolli ottimali di crioconservazione dei gameti e fornire una alternativa riproduttiva ai pazienti a rischio di esaurimento della propria funzione riproduttiva. Nel loro complesso i risultati ottenuti sui gameti di maiale (Bucci et al., 2007; Spinaci et al., 2017). suggeriscono un potenziale utilizzo delle molecole di origine vegetale testate, in particolare, dell'EGCG e del RES durante lo scongelamento del seme al fine di minimizzare i danni dovuti alla produzione di radicali ossidanti mentre l'estratto di tannini potrebbe risultare efficace nella modulazione del processo di capacitazione degli spermatozoi.

Tab. 1. Risultati cicli di vitrificazione/warming ovociti umani con antiossidanti

	(A) Cong/Scong No Antiossidante	(B) Cong/Scong Antiossidante	P
Cicli Crioconservazione	70	75	
Età	34.1±4.8	33.8±4.5	Pa-b: ns
Ovociti crioconservati (m±ds)	424 (6.1±3.5)	433 (5.8±3.8)	Pa-b: ns
Cicli Scongellamento	68	70	
Ovociti scongelati (m±ds)	291 (4.3±2.0)	311 (4.4±2.1)	Pa-b: ns
Ovociti sopravvissuti (%)	251 (86.2)	271 (87.1)	Pa-b: ns
Cicli inseminazione	65	67	
Ovociti inseminati (m±dev.st)	240 (3.5±1.2)	252 (3.7±1.2)	Pa-b: ns
Ovociti fecondati 2pn 2pb	184 (76.6)	192 (76.2)	Pa-b: ns
Embrioni sviluppati (%)	162 (88.1)	167 (87.0)	Pa-b: ns
- Grado 1	8 (4.9)	11 (6.6)	Pa-b: ns
- Grado 2	74 (45.7)	76 (45.5)	Pa-b: ns
- Grado 3	53 (32.7)	49 (29.3)	Pa-b: ns
- Grado 4	19 (11.7)	21 (12.6)	Pa-b: ns
- Grado 5	8 (5.0)	10 (6.0)	Pa-b: ns

Tab. 2. Risultati cicli di congelamento/scongelo spermatozoi umani con Resveratrolo

Cicli congelamento spermatozoi	Scongelo No antiox (Controllo)	Scongelo 15 μ M Resveratrolo	Scongelo 30 μ M Resveratrolo	P
Totale Spermatozoi x 10⁶	262.8	262.8	262.8	-
N° Sperm x 10⁶/ Paillette	13.1 \pm 2.7	13.1 \pm 2.7	13.1 \pm 2.7	-
Motilità Totale (%)	46.7 (18%)	61.5 (24%)	78.2 (29.7%)	P _{b-c} = ns P _{b-d} < 0.001
Motilità Progressiva (%)	12.8 (5%)	25.5 (11%)	47.6 (18.1%)	P _{b-c} = ns P _{b-d} < 0.001
Forme Normali (%)	31 (11%)	31 (11%)	29 (11%)	P _{b-c} = ns P _{b-d} = ns

Tab. 3a. Risultati cicli di scongelamento spermatozoi di maiale con Resveratrolo (RES)

	CTR	RES 0.5mM	RES 1mM	RES 2mM	P
Vitalità (%)	51.7 \pm 9.4	48.5 \pm 5.3	48.4 \pm 8.6	43.8 \pm 10.7	ns
Integrità Acrosoma (%)	86.4 \pm 6.1	82.5 \pm 3.2	81.9 \pm 2.6	82.4 \pm 1.0	ns
Tasso fecondazione	33.8 \pm 12.4	42.3 \pm 2.7	46.8 \pm 5.0	68.8 \pm 6.4	P ₁₋₄ < 0.05

Tab. 3b. Risultati cicli di scongelamento spermatozoi di maiale con Epigallocatechina-3-gallato

	CTR	EGCG 25 µM	EGCG 50 µM	EGCG 100 µM	P
Vitalità (%)	45.1±3.8	46.6±7.0	45.4±10.1	48.2±5.8	ns
Integrità Acrosoma (%)	86.2±5.5	84.3±6.3	87.1±1.5	85.4±1.5	ns
Tasso fertilizzazione	31.9±9.4	55.0±5.3	54.8±9.0	48.6±10.4	P ₁₂ < 0.05 P ₁₃ < 0.05 P ₁₄ < 0.05

Tab. 4. Risultati cicli di scongelamento spermatozoi di maiale con Tannini

	CTR	Tannini 0.1 µg/ml	Tannini 10 µg/ml	Tannini 100 µg/ml	P
Vitalità (%)	35.4±10.8	40.0±10.0	43±5.0	66.9±9.3	P ₁₄ < 0.001
Integrità Acrosoma (%)	82.0±2.0	85.0±3.0	88±1.0	90.0±3.0	P ₁₃ < 0.05 P ₁₄ < 0.05
Tasso fertilizzazione	69.0±14.8	71.0±15.0	91.9±4.0	68.0±30.0	P ₁₃ < 0.001

Bibliografia

- Agarwal A., Prabakaran S.A., and Said T.M.: Prevention of oxidative stress injury to sperm. J Androl 2005; 26: pp. 654-660
- AIOM, 2017 Linee guida Preservazione della fertilita' nei pazienti oncologici edizione 2017. 2006;250:66-9
- Asok C A "In utero physiology: role of folic acid in nutrient delivery and fetal development." The american journal of clinical nutrition 85.2 (2007): 598S- 603S
- Bucci D, Spinaci M, Mislei B, Gadani B, Rizzato G, Love CC, Tamanini C, Galeati G, Mari G. Epigallocatechin-3-gallate (egcg) and green tea polyphenols do not improve stallion semen parameters during cooling at 4°C. Reprod Domest Anim. Apr;52(2):270-277, 2017
- Guaiquil,VH, et al. "Mechanism of Vitamin C Inhibition of Cell Death Induced by Oxidative Stress in Glutathione-depleted HL-60 Cells." Cells Journal of Biological Chemistry 2001;276 (44):40955-40961.
- Halliwell B., and Gutteridge J.M.C.: Free radicals in biology and medicine. Oxford, U.K.: Oxford Science Publications, 1999.
- Longhi A., Porcu E., Petracchi S., Versari M., Conticini L., Bacci G. Reproductive functions in female patients treated with adjuvant and neoadjuvant chemotherapy for localized osteosarcoma of the extremity. Cancer, 89(9): 1961-65,2000.
- Porcu E., Fabbri R., Seracchioli R., Ciotti P.M., Magrini O., Flamigni C.: Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. Fertil Steril, 68 724-6, 1997.
- Porcu E., Fabbri R., G. Damiano, S. Giunchi, R. Fratto, PM. Ciotti S. Venturoli, C. Flamigni. Clinical experience

and applications of oocyte cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 169, 33-37, 2000.

Porcu E, Venturoli S, Damiano G, Ciotti PM, Notarangelo L, Paradisi R, Moscarini M, Ambrosini G. Healthy twins delivered after oocyte cryopreservation and bilateral ovariectomy for ovarian cancer. *Reprod Biomed Online*.,2008a;17(2):265-7.

Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine; Practice Committee of Society for Assisted Reproductive Technology. Mature oocytes cryopreservation: a guideline. *Fertil Steril*, 2013;99: 37-43.

Spinaci M, Bucci D, Gadani B, Porcu E, Tamanini C, Galeati G. Pig sperm preincubation and gamete coincubation with glutamate enhance sperm- oocyte binding and in vitro fertilization. *Theriogenology* 95:149-153 (2017)

Wang, X., "Vitamin C and Vitamin E supplementation reduce oxidative stress–induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate." *Fertility and Sterility* 78.6 (2002): 1272-1277.

Zou,X., et al "The effects of L-Carnitine on the combination of, inhalation anesthetic-induced developmental, neuronal apoptosis in the rat frontal cortex." *Neuroscience*151.4 (2008): 1053-1065.

UNA POSSIBILE STRATEGIA PER IL PROBLEMA DELLA RESISTENZA AI FARMACI ANTIBIOTICI: LE BAULAMICINE UNA NUOVA CLASSE DI COMPOSTI ANTIBATTERICI

Sviluppo di nuove molecole ad attività antibatterica e prove di sensibilità in vitro nei confronti di batteri multi-drug resistant: le Baulamicine

Responsabile

Vittorio Sambri, *Dipartimento di Medicina Specialistica Diagnostica e Sperimentale, Università di Bologna e Unità Operativa di Microbiologia Centro Servizi di Pievesestina, AUSL della Romagna*

Gruppo di Studio

Manuela Morotti (*UO Microbiologia AUSL della Romagna*), **Antonella Marangoni**, **Claudio Foschi** (*Dipartimento di Medicina Specialistica Diagnostica e Sperimentale, Università di Bologna*), **Piergiorgio Cozzi**, **Andrea Gualandi** (*Dipartimento di Chimica "G. Ciamician", Università di Bologna*)

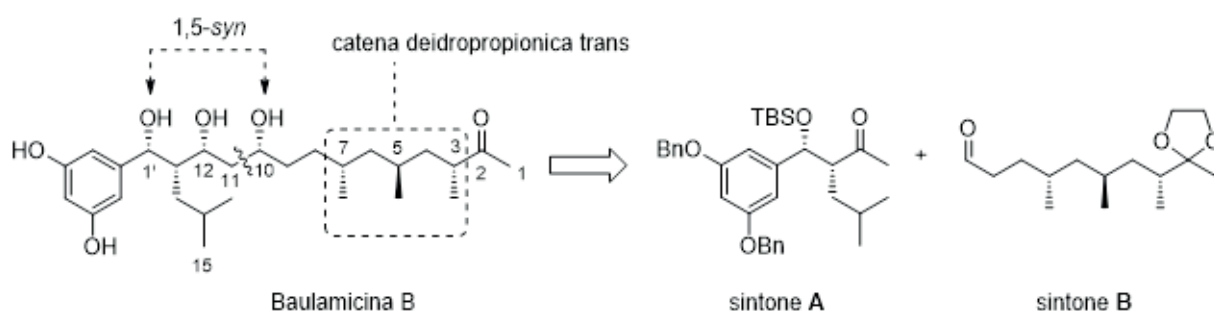
Premessa

Il trattamento delle infezioni batteriche richiede l'impiego di molecole antibiotiche dotate di alcune caratteristiche indispensabili: la tossicità selettiva per le cellule procariotiche che esclude quindi un effetto dannoso diretto verso le cellule del paziente, la capacità di inibire selettivamente vie metaboliche batteriche, la capacità di raggiungere concentrazioni efficaci (batteriostatiche o battericide) nei distretti anatomici sede d'infezione. Ad oggi sono svariate le classi di sostanze impiegate per la terapia delle infezioni batteriche: fra le principali vie metaboliche che costituiscono i bersagli dell'attività di queste molecole si elencano: la biosintesi del peptidoglicano (componente fondamentale degli involucri della cellula procariotica), la sintesi proteica batterica, la sintesi degli acidi nucleici (processo fondamentale per la replicazione cellulare). Ad oggi molte classi di farmaci antibatterici che hanno come bersaglio le sopra elencate vie metaboliche hanno dimostrato fenomeni di resistenza che rendono le cellule batteriche insensibili all'azione di queste sostanze e pertanto rendono sempre meno agevole l'impiego delle stesse per il trattamento delle infezioni. L'effetto pratico di questa capacità di resistere ai farmaci antibiotici da parte di molti generi e specie batteriche ha come effetto diretto l'aumento delle infezioni da microrganismi multiresistenti (cioè in grado di resistere all'attività di più classi di farmaci antibiotici) e costituisce, ad oggi, un serio problema di salute pubblica. A parte le strategie che coinvolgono il buon uso terapeutico dei farmaci antibatterici, che richiedono un interesse anche a livello politico, il problema della resistenza può essere affrontato anche mediante lo sviluppo di nuove molecole con potenziale antibatterico. In questo studio è stata verificata la possibilità di sviluppo e sintesi di una nuova classe di farmaci identificati come Baulamicine. Il loro target cellulare è costituito dai siderofori, piccole molecole capaci di chelare e immagazzinare ioni ferro nel citoplasma batterico: inibendo la loro biosintesi, risultano compromesse virulenza e vitalità batterica. Al momento sono state identificate due molecole capaci di inibire la biosintesi dei siderofori appartenenti a questa classe molecolare: la Baulamicina A e B, entrambe derivanti da microrganismi marini. In preliminari studi in vitro, queste molecole hanno mostrato una buona attività antibiotica, prevalentemente nei confronti di microrganismi Gram positivi. L'enterobactina è il sideroforo più attivo ad oggi conosciuto, capace di legare lo ione ferrico (Fe^{3+}) con elevata affinità. Il grado di affinità di enterobactina è decisamente più elevato rispetto anche ad alcuni chelanti sintetici dei metalli, come EDTA. A causa della sua alta affinità, l'enterobactina è capace di esercitare la sua azione chelante anche in ambienti in cui la concentrazione dello ione ferrico è in realtà piuttosto bassa, ad esempio all'interno delle cellule degli organismi viventi.

Materiali e metodi

Sintesi chimica dei composti

Il primo passo del progetto è stato la messa a punto dei metodi (a cura del Gruppo del Dipartimento “G. Ciamician” diretto dal Professor P. Cozzi) per la sintesi delle molecole di Baulomicina. Tramite un approccio retrosintetico sono stati individuati i sintoni target A e B che contengono rispettivamente due e tre centri stereogenici definiti. L'unione dei due sintoni avverrà tramite una reazione di condensazione aldolica. Il sintone target A è stato preparato in quattro passaggi sintetici sulla scala di un grammo a partire da una benzaldeide e un ossazolidinone. Il sintone B presenta una catena deidropropionica avente tre metili. Il gruppo ha scelto per la sintesi del sintone B una metodica affidabile per l'alchilazione aldeidica. Il gruppo fenilico presente viene ossidato e convertito in estere metilico. I sintoni A e B sono stati uniti mediante reazione aldolica. Il modello semplificato di Baulomicina è il seguente:



I tentativi di sintesi hanno portato alla disponibilità di alcuni composti derivanti dalla struttura molecolare della Baulomicina che sono stati saggiati in vitro per la loro attività antibatterica.

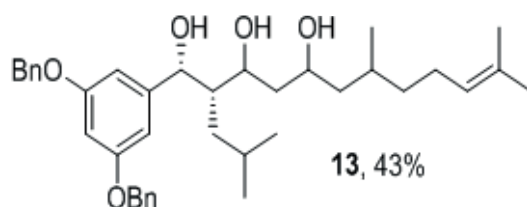
- **LM 1258** ($C_{38}H_{52}O_6$): ottenuti 12.6 mg

- exact mass: 588.38
- Mol.Wt.: 588.82

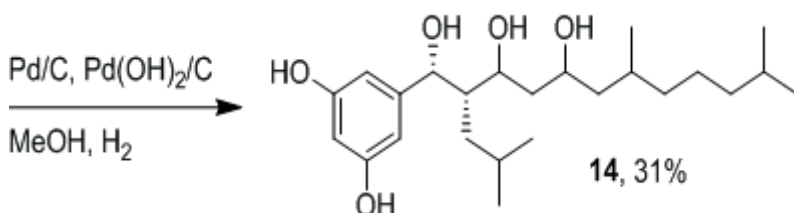
- **LM 1262 A** ($C_{24}H_{42}O_5$): ottenuti 1.1 mg

- exact mass: 410.3
- Mol.Wt.: 410.5

La struttura del composto LM1258 è indicata di seguito:



La struttura del composto LM1262A è indicata di seguito:



Dati preliminari sull'attività di LM 1262A hanno portato a sintetizzare analoghi aventi una catena di atomi di carbonio lineare a diversa lunghezza (LM 1317 ed LM1344), di cui è stato possibile studiare l'efficacia antibatterica in vitro.

- **LM1317 (C₁₇H₂₈O₅)**: ottenuti 14 mg

- Mol.Wt.: 410.59

- **LM1344 (C₁₇H₂₈O₅)**: ottenuti 4.1 mg

- exact mass: 312.19
- Mol.Wt.: 312.40

Saggio dell'attività antibatterica con metodo di microdiluizione in brodo secondo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)

Sono stati utilizzati ceppi isolati di: *Escherichia coli* con fenotipo wild type (WT), *Escherichia coli* con fenotipo produttore di β -lattamasi (+n), *Staphylococcus aureus* con fenotipo meticillino sensibile (MSSA), *Staphylococcus aureus* con fenotipo meticillino resistente (MRSA), stafilococco coagulasi-negativo (CoNS) meticillino sensibile ma con fenotipo polichemioresistente, ed infine *Enterococcus faecalis* polichemioresistente (fenotiporesistente a gentamicina e streptomina ad alto dosaggio - HL).

I ceppi derivano dalla collezione di isolati batterici mantenuta presso la UO Microbiologia dell'AUSL della Romagna e sono stati scongelati per l'uso specifico del saggio di attività dei derivati di Baulamicina previa verifica del fenotipo pregresso.

Le quattro molecole sono state solubilizzate in DMSO al fine di ottenere una soluzione madre avente concentrazione 100 mM. Le successive diluizioni di saggio (a partire da 20 mM) sono state eseguite in brodo Muller Hinton (MH) secondo standard CLSI.

Per ogni isolato, a partire da colonie isolate cresciute su agar non selettivi dopo 18-24 ore di incubazione, è stata preparata una sospensione standardizzata (0,5 McFarland, circa 1×10^8 UFC/ml) in soluzione fisiologica. Per testare i composti LM1258 ed LM 1262 A, sono state preparate, rispettivamente, n. 20 e n. 5 sospensioni, in doppio, dei seguenti ceppi:

E. coli WT; *E. coli* ESBL+; MSSA e MRSA.

Per quanto riguarda le molecole LM1317 e LM1344 i dettagli dei saggi sono i seguenti:

- LM1317 è stato saggiato con n. 15 isolati di ognuno dei seguenti ceppi:

E. coli fenotipo WT; *E. coli* ES β L+; MSSA e MRSA, n. 20 isolati di CoNS meticillino-sensibile polichemioresistente e n. 20 di *E. faecalis* polichemioresistente, HL gentamicina/streptomina.

- LM 1344 è stato saggiato utilizzando isolati di:

E. coli fenotipo WT (n. =5); *E. coli* ES β L+ (n.= 5); MSSA (n. =10) e MRSA (n. = 10), CoNS meticillino-sensibile polichemioresistente (n.=15) e *E. faecalis* polichemioresistente (n.=15),

Il numero inferiore di ceppi saggiati per questa molecola è dovuto alla minor quantità di composto chimico disponibile. Le sospensioni batteriche iniziali sono state diluite in brodo MH (concentrazione finale: 5×10^5 UFC/ml). Attraverso diluizioni seriali in base 2, sono state testate concentrazioni nel range 5 mM - 0,02 mM per ciascun composto. La MIC (concentrazione minima inibente) è stata definita come la concentrazione minima di composto capace di inibire la crescita batterica. In particolare la MIC è stata valutata considerando il pozzetto con concentrazione minore di farmaco, in cui la crescita batterica risultava completamente inibita. Per la valutazione della MBC (concentrazione minima battericida) invece, sono stati riseminati su agar non selettivo, 10 μ L della sospensione presente ogni pozzetto in cui visibilmente era assente la crescita batterica. La MBC è definita come la concentrazione di composto capace di ridurre la crescita batterica di oltre il 99%. La MBC₅₀ è stata definita come la concentrazione minima di composto capace di esercitare azione battericida nel 50% dei ceppi testati.

Risultati

Il composto **LM1258** non è risultato attivo su nessuno dei ceppi testati a tutte le concentrazioni studiate. Inoltre la molecola ha dimostrato scarsa solubilità in mezzo acquoso. LM1258 presenta gruppi funzionali fenolici protetti come eteri benzilici che lo rendono decisamente più apolare rispetto a LM 1262A. Tale caratteristica strutturale è verosimilmente responsabile della marcata differenza di solubilità tra le due molecole nella miscela DMSO/tampone acquoso usata per effettuare i test biologici.

Il composto **LM1262A** non ha presentato alcuna attività antibatterica nei confronti dei batteri gram negativi, mentre nei confronti dei gram positivi le MIC e le MCB ottenute sono state le seguenti (valori medi).

Isolati MSSA

- MIC₅₀: 2.5 mM
- MCB₅₀: 12.5 mM

Isolati MRSA

- MIC₅₀: 5.0 mM
- MCB₅₀: 25 mM

I composti **LM1317** ed **LM1344** sono risultati efficaci verso i seguenti microrganismi testati:

LM1317

Isolati MSSA e MRSA (valori ottenuti identici):

- MIC₅₀: 2.5 mM
- MCB₅₀: 5.0 mM

Il saggio per MSSA e MRSA è stato ripetuto in presenza di chelante del ferro con i seguenti risultati

Isolati MSSA

- MIC₅₀: 1.25 mM
- MCB₅₀: 2.5 mM

Isolati MRSA

- MIC₅₀: 2.5 mM
- MCB₅₀: 5.0 mM

Isolati CoNS

- MIC₅₀: 2.5 mM
- MBC₅₀: 5.0 mM

Isolati di *E. faecalis*

- MIC₅₀: 5.0 mM
- MBC₅₀: 12.5 mM

LM1344

Isolati CoNS

MIC₅₀: 1.25 mM

MCB₅₀: 5.0 mM

Isolati di *E. faecalis*

MIC₅₀: 5.0 mM

MCB₅₀: 12.5 mM

In generale il saggio in presenza di chelante del ferro ha dato valori MIC inferiori di almeno una diluizione rispetto al test in assenza di chelante ferroso.

Discussione

Solo tre molecole hanno dimostrato un certo livello di attività antibatterica in vitro: nessuna efficacia è stata messa in evidenza, come atteso, nei confronti di batteri gram negativi (*E. coli*), indipendentemente dal fenotipo di resistenza di ciascun isolato batterico studiato. I tre composti chimici dotati di attività

antibatterica (verso i Gram positivi, sia con fenotipo MSSA o MRSA o verso ceppi di CoNS o *E. faecalis*) sono stati LM1262A, LM1317 e LM1344. In particolare quest'ultima molecola ha dimostrato valori di MIC abbastanza bassi e quindi indicativi di una buona attività antibatterica. Ovviamente, trattandosi di molecole di nuova sintesi, non esistono (come non esistono per la Baulamicina di derivazione naturale) standard di riferimento e tanto meno valori di break point, per cui una valutazione comparativa verso molecole antibiotiche ad attività nota è al momento non possibile. È interessante il dato che la presenza di una molecola chelante il ferro nel sistema di saggio in vitro corrisponde ad un aumento dell'attività antibatterica delle sostanze di nuova sintesi: le motivazioni sono al momento ignote ed andranno ulteriormente indagate.

In conclusione, come atteso, alcuni derivati sintetici della Baulamicina hanno attività antibatterica verso germi gram positivi, in vitro ed in futuro sarebbe interessante continuare a valutare la possibilità di sintesi di nuovi derivati ed approfondire lo studio in vitro dell'efficacia del composto LM1344.

Bibliografia

Levi SB and Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Medicine* 2004; 10: s122.

Lobanovska M, Pilla G. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? *Yale J Biol Med.* 2017; 90:135.

Gillings MR, Paulsen IT, Tetu SG. Genomics and the evolution of antibiotic resistance. *Ann N Y Acad Sci.* 2017; 1388: 92.

Kahlmeter G. Breakpoints for intravenously used cephalosporins in Enterobacteriaceae--EUCAST and CLSI breakpoints. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14: Suppl 1:169.

CLSI Antimicrobial Susceptibility Testing (AST) Standards available at: <https://clsi.org/meetings/ast/> (last accessed on January 3rd, 2019)

Lorenzo P, Butts CP, Myers EL, Aggarwal VK. The Story behind "Synergy of Synthesis, Computation, and NMR Reveals Correct Baulamycin Structures". *Biochemistry.* 2017; 56: 6177-6178.

Wu J, Lorenzo P, Zhong S, Ali M, Butts CP, Myers EL, Aggarwal VK. Synergy of synthesis, computation and NMR reveals correct baulamycin structures. *Nature.* 2017;547: 436.

Guchhait S, Chatterjee S, Ampapathi RS, Goswami RK. Total Synthesis of Reported Structure of Baulamycin A and Its Congeners. *J Org Chem.* 2017; 82: 2414.

Sengupta S, Bae M, Oh DC, Dash U, Kim HJ, Song WY, Shin I, Sim T. Structural Revision of Baulamycin A and Structure-Activity Relationships of Baulamycin A Derivatives. *J Org Chem.* 2017;82: 12947.

CELLULE MESENCHIMALI STAMINALI DA CORPO VERTEBRALE COME PROSPETTIVA BIOLOGICA INNOVATIVA PER LA CHIRURGIA VERTEBRALE

Le cellule mesenchimali staminali autologhe da corpo vertebrale nella chirurgia vertebrale

Responsabile

Milena Fini, *Laboratorio Studi Preclinici e Chirurgici – IRCCS Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna*

Gruppo di Studio

Francesca Salamanna, Deyanira Contartese (*Laboratorio Studi Preclinici e Chirurgici – IRCCS Istituto Ortopedico Rizzoli*), **Giovanni Barbanti Brodano, Alessandro Gasbarrini** (*Dipartimento di Chirurgia Oncologica e Degenerativa della Colonna Vertebrale – IRCCS Istituto Ortopedico Rizzoli*), **Guido Staffa** (*Unità Operativa di Chirurgia del Sistema Nervoso Periferico, Ospedale Umberto I, Lugo, Ravenna*)

Introduzione

La fusione o artrodesi vertebrale è una tecnica chirurgica che ha lo scopo di unire i segmenti ossei del rachide per il trattamento di traumi, deformità, instabilità ed altre patologie oncologiche e degenerative del rachide (1-2). La pseudoartrosi (guarigione ossea non ottimale) è una delle possibili complicanze degli interventi di artrodesi e, a seconda delle tecniche chirurgiche e di fattori legati al paziente, ha una incidenza che varia dall'11% al 35% (3-10). Sesso femminile, età avanzata, osteoporosi ed alcuni stili di vita scorretti rappresentano caratteristiche individuali del paziente che possono impedire di ottenere una fusione solida fra le vertebre. Sono, quindi, adottate diverse strategie per aumentare l'indice di fusione e ridurre il rischio di pseudoartrosi, fra cui l'impianto di osso autologo rappresenta il *gold standard*. La insufficiente quantità (soprattutto per le fusioni che interessano più vertebre) e le possibili complicanze relative al prelievo dal sito donatore ne rappresentano i principali limiti (11). Come sostituto dell'osso autologo nella pratica chirurgica viene utilizzato l'osso allogenico (dalle Banche dei Tessuti) e sono stati proposti vari biomateriali artificiali (12). Sia l'osso allogenico che i biomateriali sono privi di proprietà osteogeniche. Una strategia innovativa per aumentarne le capacità biologiche è l'utilizzo delle cellule mesenchimali staminali (MSCs) autologhe isolate dall'aspirato midollare prelevato dalla cresta iliaca dello stesso paziente (13-14). Durante le procedure di chirurgia vertebrale il prelievo di aspirato midollare dalla cresta iliaca comporta il coinvolgimento di un ulteriore sito chirurgico con conseguente aumento dei tempi operatori e riabilitativi del paziente (15). Le complicanze al sito di prelievo sono ancora più frequenti nei pazienti osteoporotici che presentano un maggiore rischio di emorragie, penetrazione accidentale della corticale interna dell'ileo e lesioni nervose. Il presente progetto nasce, quindi, dalla necessità clinica di impiegare MSCs autologhe isolate dall'aspirato midollare (BMA) prelevato dai corpi vertebrali direttamente in sala operatoria durante l'intervento di fusione e senza intervenire in altri siti anatomici. L'obiettivo è migliorare il successo della chirurgia di fusione vertebrale e la qualità della vita dei pazienti riducendo la percentuale di complicanze ed i tempi di ripresa funzionale. In particolare, lo studio ha risposto alle seguenti domande: 1) il BMA prelevato dai corpi vertebrali rappresenta una sorgente di cellule staminali non invasiva ed alternativa alla cresta iliaca?; 2) il BMA può essere utilizzato *in toto* o è necessario procedere a tecniche per concentrare il numero delle MSCs quali la centrifugazione?; 3) per aumentare il processo di fusione vertebrale il BMA può essere una valida strategia anche nei pazienti di età avanzata ed osteoporotici che sono ad aumentato rischio di pseudoartrosi?

Metodologia

Sono stati arruolati 6 pazienti osteoporotici (DEXA T-score ≤ -2.5 SD) e 6 non-osteoporotici (DEXA T-score ≥ -1.0 SD), di genere ed età indifferenti, non sottoposti a terapie farmacologiche che influenzano il rimodellamento osseo, trattati per traumi, deformità, instabilità ed altre patologie degenerative del rachide (protocollo vMSC-artrodesi approvato dal Comitato Etico IOR). Il BMA da corpo vertebrale è stato prelevato

durante la chirurgia standard ed è stato suddiviso in due quantità uguali: una parte è stata direttamente posta in coltura, BMA *in toto*, l'altra parte è stata concentrata attraverso centrifugazione. Per valutare l'efficacia terapeutica del BMA vertebrale, il BMA sia *in toto* che concentrato, è stato coltivato per isolare le MSCs presenti. Poiché il microambiente mesenchimale fisiologico ha una concentrazione di O₂ di 2-6%, le colture cellulari sono state allestite sia in condizioni standard di normossia (O₂ 20%) che in condizioni di ipossia (O₂ 2%). Le MSCs così isolate sono state caratterizzate attraverso l'analisi di specifici marcatori di superficie, la capacità di formare colonie cellulari e di differenziare nel fenotipo osteogenico, adipogenico e condrogenico. La caratterizzazione delle MSCs è stata completata dallo studio dell'espressione dei principali geni indici del differenziamento mesenchimale e dei geni HOX e TALE che sono in grado di regolare la morfologia di specifici elementi vertebrali. La vitalità e la proliferazione delle MSCs sono state valutate anche in associazione ad un biomateriale di utilizzo clinico, una spugna di gelatina riassorbibile con alto effetto emostatico.

Risultati

Le MSCs isolate da BMA *in toto* hanno presentato un maggiore indice di proliferazione, il fenotipo mesenchimale (Figura 1) ed un maggior numero di colonie in condizioni fisiologiche di ipossia, confermando che il BMA da corpo vertebrale rappresenta una sorgente ricca di MSCs. Dopo l'induzione al differenziamento, il test di vitalità cellulare ha permesso di osservare una chiara distribuzione delle cellule proliferanti ed assenza di cellule apoptotiche in tutte le condizioni di coltura (Figure 2 e 3). Il differenziamento osteogenico ha evidenziato un maggior numero di noduli di mineralizzazione nelle MSCs isolate dal BMA *in toto* coltivate in ipossia (Figure 2a e 3a). Il test di differenziamento adipogenico e condrogenico ha mostrato rispettivamente un maggior numero di vacuoli di lipidi intracitoplasmatici in normossia (Figure 2b e 3b) e la presenza di gruppi isogeni con sintesi di proteoglicani e glicosaminoglicani confermando ulteriormente il fenotipo cellulare (Figure 2c e 3c). Le analisi molecolari inerenti l'espressione dei geni tipici del differenziamento mesenchimale, hanno evidenziato un aumento dell'espressione dei *markers* di differenziamento osteogenico e condrogenico nelle MSCs isolate dal BMA *in toto* e in condizioni di ipossia. I *markers* di differenziamento adipogenico erano up-regolati nelle MSCs, isolate dal BMA concentrato ed in particolare in normossia. Le MSCs in tutte le condizioni di coltura, modulavano differenti livelli di espressione dei geni HOX e TALE.

Non si sono osservate differenze significative fra le MSCs derivanti da pazienti osteoporotici e non-osteoporotici in tutte le condizioni di coltura. Infine, le MSCs seminate sul biomateriale di utilizzo clinico hanno evidenziato un aumento della proliferazione ed il mantenimento della vitalità cellulare.

	MSCs <i>in toto</i>		MSCs concentrate	
	Normossia	Ipossia	Normossia	Ipossia
CD31	1%	2%	2%	1%
CD45	1%	1%	2%	0%
CD34	1%	1%	1%	1%
CD44	99%	93%	96%	52%
CD73	93%	84%	96%	64%
CD90	99%	96%	98%	87%
CD105	98%	98%	96%	97%

a

	MSCs <i>in toto</i>		MSCs concentrate	
	Normossia	Ipossia	Normossia	Ipossia
CD31	5%	2%	2%	1%
CD45	5%	1%	1%	0%
CD34	3%	8%	2%	2%
CD44	100%	100%	100%	100%
CD73	100%	100%	100%	100%
CD90	96%	100%	99%	99%
CD105	84%	99%	89%	78%

Figura 1: Caratterizzazione immunofenotipica con citofluorimetria delle MSCs nelle diverse condizioni di coltura. a) MSCs derivate da pazienti non-osteoporotici; b) MSCs derivate da pazienti osteoporotici.

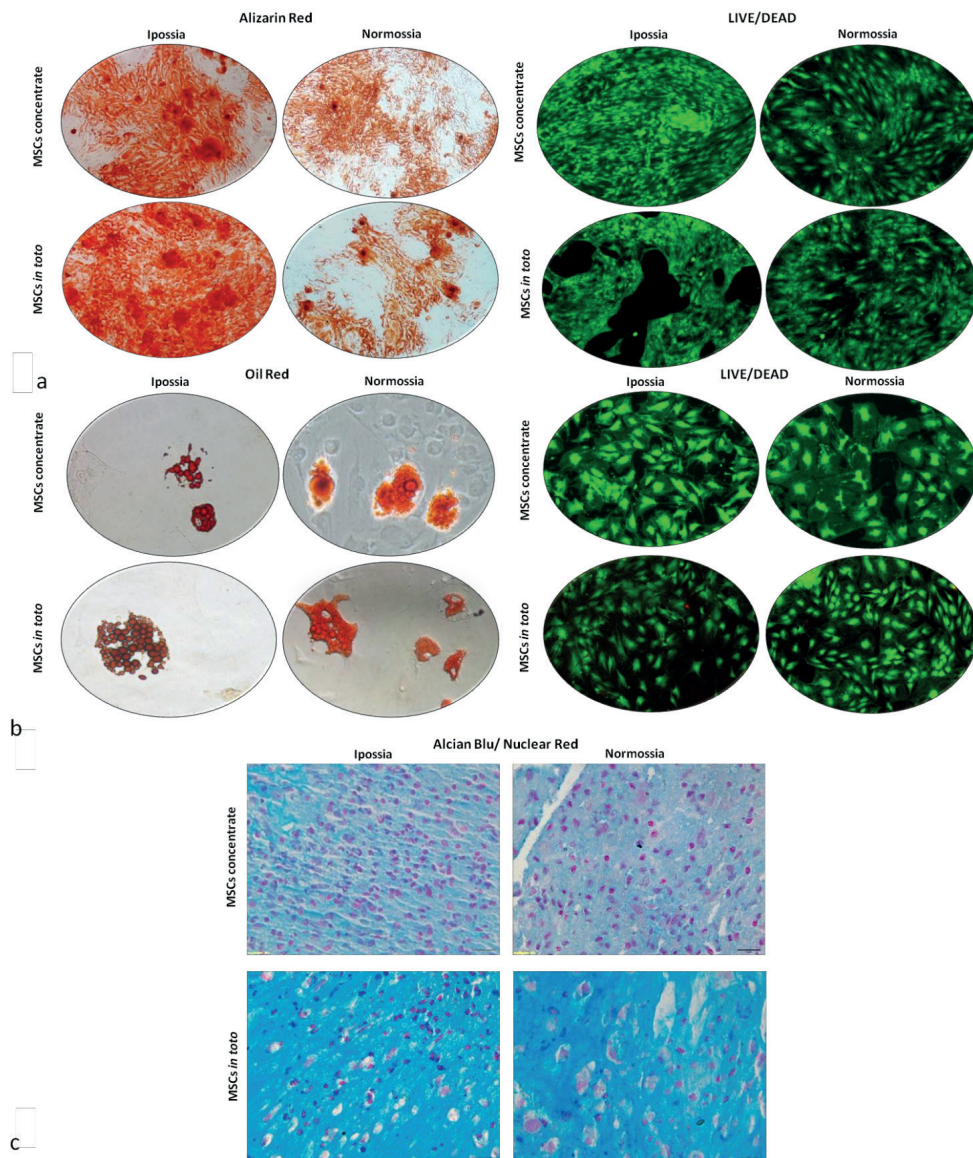


Figura 2: Differenziamento a) osteogenico, b) adipogenico, c) condrogenico e vitalità cellulare delle MSCs derivate da pazienti non-osteoporotici nelle diverse condizioni di coltura (voce bibliografica).

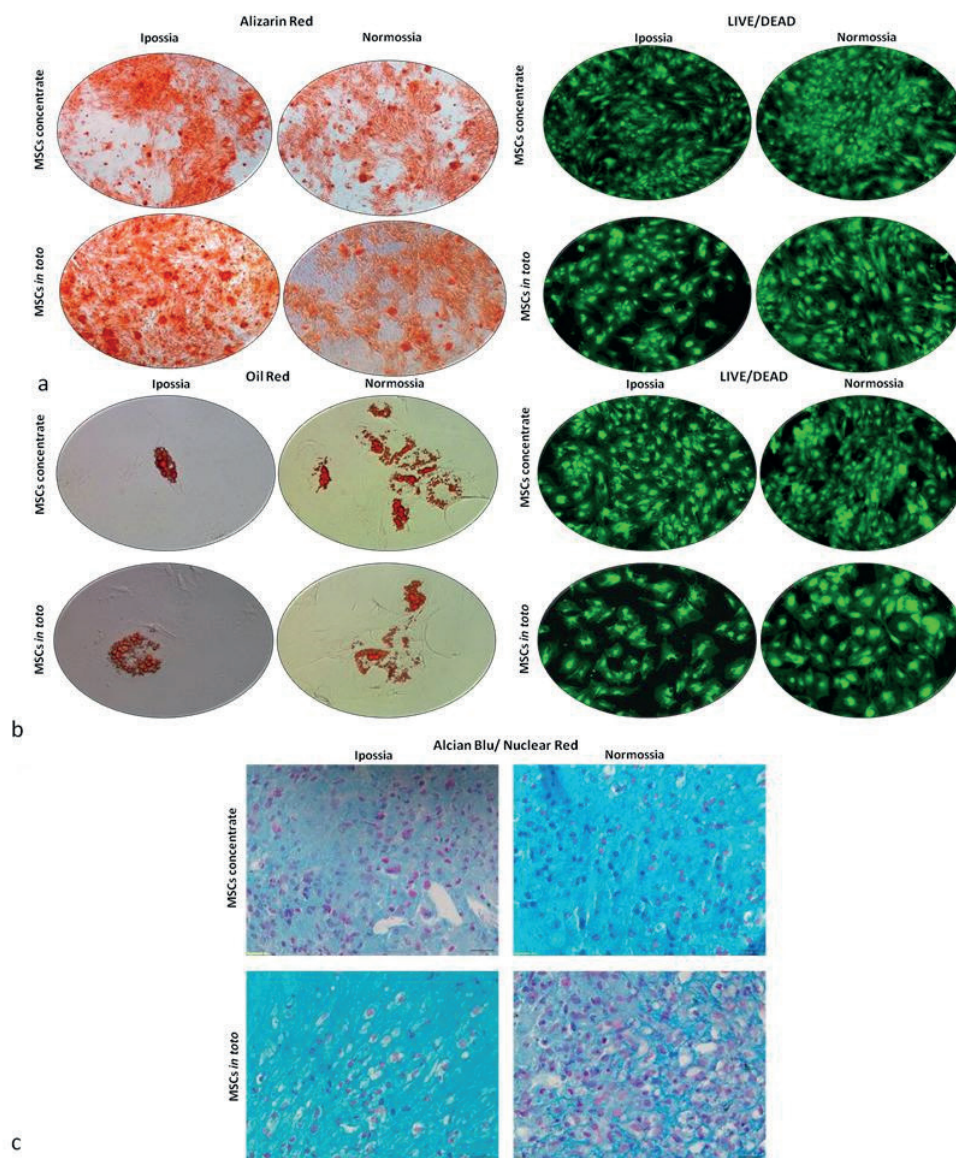


Figura 3: Differenziamento a) osteogenico, b) adipogenico, c) condrogenico e vitalità cellulare delle MSCs derivate da pazienti osteoporotici nelle diverse condizioni di coltura

Conclusioni

I risultati ottenuti hanno dimostrato che le MSCs isolate da BMA in toto e in condizioni di ipossia sovrapponibili a quelle dei pazienti presentano una maggiore proliferazione, differenziano con più efficienza in senso osteogenico e condrogenico, con minore efficienza in senso adipogenico, e una maggiore up-regolazione dei livelli di geni HOX. Queste caratteristiche vengono mantenute anche nei pazienti affetti da osteoporosi e quando il BMA *in toto* è utilizzato in associazione all'impiego di un biomateriale di uso clinico in chirurgia vertebrale.

Questi aspetti sono fondamentali per il miglioramento delle procedure di chirurgia vertebrale dove la natura ipossica del sito facilita il differenziamento delle MSCs in senso osteoblastico, inibendo in tal modo l'adipogenesi e garantendo una adeguata rigenerazione ossea. Questa applicazione apre nuove prospettive per il miglioramento della chirurgia vertebrale dove nel corso della procedura chirurgica, il midollo osseo da corpo vertebrale può essere prelevato e reintrodotta nel sito di fusione (anche in associazione a tessuto osseo omologo o autologo o a biomateriali), senza alcuna ulteriore procedura chirurgica, tempo chirurgico aggiuntivo per la centrifugazione o coinvolgimento di altri siti scheletrici.

Bibliografia

1. Cortesi et al. Spine (Phila Pa 1976). 2017;42(18):1398-1404.
2. Campbell et al. Global Spine J. 2017;7(5):482-490.
3. Kornblum et al. Spine (Phila Pa 1976). 2004;29(7):726-33.
4. Fischgrund et al. Spine (Phila Pa 1976). 1997;22(24):2807-12.
5. Fritzell et al. Spine (Phila Pa 1976). 2002;27(11):1131-41.
6. Kurd et al. Eur Spine J. 2015;24(5):1066-73.
7. Miyazaki et al. Eur Spine J. 2009;18(6):783-99.
8. Irmola et al. Spine (Phila Pa 1976). 2018;43(4):295-301.
9. Kim et al. Spine (Phila Pa 1976). 2006;31(3):291-8
10. Boden et al. Spine (Phila Pa 1976). 2004;29(5):504-14.
11. Tuchman et al. Global Spine J. 2016;6(6):592-606.
12. Barbanti Brodano et al. J Biol Regul Homeost Agents 2017; 31 (4 Suppl): 167-181.
13. Salamanna et al. Stem Cells Int. 2017;2017:3537094.
14. Hernigou et al. Int Orthop. 2017;41(1):127-132.
15. Pesenti et al. Int Orthop. 2017;41(10):2083-2090.

AVERE CONSAPEVOLEZZA DEL PROPRIO RISCHIO PROTEGGE I VASI DALL'INVECCHIAMENTO

Consapevolezza di avere fattori di rischio cardiovascolare e correlazione con parametri di invecchiamento vascolare precoce: uno studio di popolazione

Responsabile

Arrigo F.G. Cicero, *Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università di Bologna*

Gruppo di Studio

Federica Fogacci, Elisa Grandi, Marina Giovannini, Elisabetta Rizzoli, Sergio D'Addato, Claudio Borghi,

Brighella Heart Study Group (*Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università di Bologna*)

Premessa

Le malattie cardiovascolari (MCV) rappresentano la prima causa di morte nel mondo, raggiungendo nel 2012 il 31% (1), valore che aumenta enormemente nei Paesi industrialmente sviluppati ove cause infettive e belliche sono nettamente meno rappresentate. Fra le MCV, le complicanze dell'aterosclerosi (malattie coronariche e cerebrovascolari) rappresentano la principale causa di morte precoce in Europa, essendo responsabili dei decessi sotto i 75 anni del 42% delle donne e del 38% degli uomini (2). L'impatto economico globale delle MCV è stato stimato in circa 900 miliardi di dollari nel 2015 e si stima che possa crescere fino a quasi 1100 miliardi nel 2030 (3). Le MCV rappresentano inoltre una delle principali cause di invalidità nei Paesi occidentali, con un impatto devastante sulla produttività e sulla perdita di anni in buona salute (4). Alcuni fattori di rischio cardiovascolari non sono modificabili (sesso, età, etnia, familiarità per eventi cardiovascolari/predisposizione genetica), mentre altri sono facilmente riconoscibili e trattabili con modificazioni dello stile di vita e, quando necessaria, eventuale terapia farmacologica (2). Una delle tappe limitanti la gestione efficace dei fattori di rischio cardiovascolari è la scarsa percezione di essi che ha la popolazione generale (5,6). Un certo numero di studi ha investigato la percezione del proprio rischio di malattia cardiovascolare (7,8), mentre il nostro obiettivo è stato quello di investigare la consapevolezza di essere interessati da fattori di rischio cardiovascolari maggiori e di correlare tale consapevolezza al grado di invecchiamento vascolare in un campione di popolazione generale senza malattie cardiovascolari in atto.

Materiali e metodi

Il Brisighella Heart Study è uno studio epidemiologico longitudinale attivo sulla popolazione di Brisighella (RA) dal 1972 e finalizzato ad investigare fattori dietetico-comportamentali, genetici, laboratoristici e strumentali associati ad aumento del rischio di malattia cardiovascolare (9,10).

Per questo studio sono stati selezionati i dati raccolti sui 1652 soggetti in prevenzione primaria per malattie cardiovascolari che hanno partecipato all'ultimo survey di popolazione del Brisighella Heart Study (M: 46.6%, F: 53.4%).

A tutti i soggetti è stato chiesto se erano consapevoli di avere uno dei seguenti fattori di rischio: ipertensione arteriosa, ipercolesterolemia, ipertrigliceridemia e diabete di tipo 2. La misurazione della pressione arteriosa ed il dosaggio dei parametri ematochimici dosati sono stati eseguiti secondo metodiche standardizzate. La misurazione della rigidità arteriosa (augmentation index, pulse wave velocity) è avvenuta con metodica strumentale validata non invasiva (Vicorder®) (11,12). La conferma della diagnosi di ipertensione, ipercolesterolemia, ipertrigliceridemia e diabete è avvenuta matchando i parametri clinici misurati con l'anamnesi farmacologica specifica.

I parametri categorici sono stati riassunti come numeri e percentuali, quelli continui riportati come medie e deviazioni standard. Il confronto dei parametri continui per categorie di soggetti (consapevoli di non

avere il disturbo e realmente sani, non consapevoli e affetti, consapevoli di essere affetti realmente affetti) sono stati confrontati con analisi univariata seguita da test di Tukey per confronti ripetuti. Per ogni test è stato impiegato il software statistico SPSS 23.0, versione per Windows. Una soglia di significatività di $p < 0.05$ è stata applicata a tutti i test.

Risultati

Su 1049 soggetti che si dichiaravano non ipertesi il 23,5% (N. 246) era iperteso, fra i 16 soggetti che non erano sicuri di essere ipertesi, il 50% lo era.

Confrontando i parametri emodinamici dei soggetti non ipertesi e consapevoli di non esserlo, con quelli di ipertesi inconsapevoli ed ipertesi consapevoli emerge che tutti i parametri pressori sono (come atteso) maggiori nei soggetti ipertesi rispetto a non ipertesi, tuttavia i non consapevoli tendono ad avere valori maggiori rispetto ai consapevoli. Per quanto riguarda i parametri relativi all'arterial stiffness i soggetti inconsapevoli hanno valori simili a quelli consapevoli, ma significativamente superiore rispetto ai non affetti (Tabella 1).

Tabella 1 – Confronto dei parametri emodinamici in soggetti consapevoli e non consapevoli di essere affetti da ipertensione arteriosa

	Pressione sistolica (mmHg)	Pressione diastolica (mmHg)	Pressione di polso (mmHg)	Pressione media (mmHg)
Corretta consapevolezza di non essere affetti	128.9±11.5	69.9±7.8	58.9±10.1	89.6±7.8
Incorretta consapevolezza di non essere affetti	159.5±17.6 ^{***00}	78.9±9.5 ^{***0}	80.6±16.4 ^{***00}	105.7±10.2 ^{***00}
Corretta consapevolezza di essere affetti	151.6±21.7 ^{**}	76.8±10.4 ^{**}	74.8±18.4 ^{**}	101.1±12.4 ^{**}
	Pressione aortica (mmHg)	Augmentation index	Pulse Wave Velocity (m/s)	
Corretta consapevolezza di non essere affetti	125.6±11.7	23.1±9.2	8.3±1.9	
Incorretta consapevolezza di non essere affetti	156.6±17.6 ^{***00}	28.1±7.7 ^{**}	10.0±2.5 ^{**}	
Corretta consapevolezza di essere affetti	148.9±21.4 ^{**}	28.4±8.7 ^{**}	9.9±2.6 ^{**}	

*p<0.05 vs. Corretta consapevolezza di non essere affetti; °p<0.05 vs Corretta consapevolezza di essere affetti

** p<0.001 vs. Corretta consapevolezza di non essere affetti; °°p<0.001 vs Corretta consapevolezza di essere affetti

Su 841 soggetti che si dichiaravano non ipercolesterolemici il 18.1% (N. 152) era ipercolesterolemico, fra i 60 soggetti che non erano sicuri di essere ipercolesterolemici, il 40% (N. 24) lo era. I soggetti ipercolesterolemici consapevoli e non consapevoli mostravano colesterolemia totale ed LDL significativamente maggiore rispetto ai non ipercolesterolemici, ma i non consapevoli presentavano valori superiori rispetto ai consapevoli. Gli inconsapevoli presentavano anche augmentation index superiore rispetto ai consapevoli (Tabella 2)

Tabella 2 – Confronto dei parametri lipidici e di rigidità arteriosa in soggetti consapevoli e non consapevoli di essere affetti da ipercolesterolemia

	Colesterolo totale (mg/dL)	LDL-Colesterolo (mg/dL)	HDL-Colesterolo (mg/dL)	Trigliceridi (mg/dL)
Corretta consapevolezza di non essere affetti	198.5±29.9	123.2±21.9	52.2±15.7	116.7±75.0
Incorretta consapevolezza di non essere affetti	252.1±23.2 ^{**°°}	179.3±17.9 ^{**°}	49.6±12.2	115.6±51.0 [*]
Corretta consapevolezza di essere affetti	264.9±27.6 ^{**}	187.8±24.1 ^{**}	51.3±13.8	129.0±54.4 [*]
	Lipoproteina (a) (mg/dL)	Augmentation index	Pulse Wave Velocity (m/s)	
Corretta consapevolezza di non essere affetti	20.4±7.9	25.9±8.5	9.1±2.5	
Incorretta consapevolezza di non essere affetti	22.4±9.9	27.4±8.2 [°]	8.9±2.5	
Corretta consapevolezza di essere affetti	27.5±13.2 [*]	25.5±9.2	9.4±2.1	

*p<0.05 vs. Corretta consapevolezza di non essere affetti; °p<0.05 vs Corretta consapevolezza di essere affetti

** p<0.001 vs. Corretta consapevolezza di non essere affetti; °°p<0.001 vs Corretta consapevolezza di essere affetti

Su 1226 soggetti che si dichiaravano non ipertrigliceridemicici l'1.2% (N. 15) lo era, fra i 200 soggetti che non erano sicuri di essere ipertrigliceridemicici, il 2% (N. 4) lo era. I soggetti ipertrigliceridemicici consapevoli e non consapevoli mostravano trigliceridemia significativamente maggiore e colesterolemia HDL significativamente inferiore rispetto ai normotrigliceridemicici, ma gli ipertrigliceridemicici inconsapevoli avevano valori di trigliceridemia superiore rispetto agli ipertrigliceridemicici consapevoli (Tabella 3). La consapevolezza o meno di ipertrigliceridemia non sembra associata a diverso livello di augmentation index o PWV.

Tabella 3 – Confronto dei parametri lipidici e di rigidità arteriosa in soggetti consapevoli e non consapevoli di essere affetti da ipertrigliceridemia

	Colesterolo totale (mg/dL)	LDL-Colesterolo (mg/dL)	HDL-Colesterolo (mg/dL)	Trigliceridi (mg/dL)
Corretta consapevolezza di non essere affetti	215.8±40.2	141.2±36.8	52.1±14.9	112.2±52.0
Incorretta consapevolezza di non essere affetti	222.2±32.4	116.1±28.4*	34.6±8.3**	414.5±139.2***°
Corretta consapevolezza di essere affetti	243.7±42.3°	135.2±42.9	35.3±8.2**	368.3±97.5**
	Lipoproteina (a) (mg/dL)	Augmentation index	Pulse Wave Velocity (m/s)	
Corretta consapevolezza di non essere affetti	25.5±9.2	25.6±9.2	9.1±2.4	
Incorretta consapevolezza di non essere affetti	25.6±6.9	25.6±6.9	9.4±1.9	
Corretta consapevolezza di essere affetti	26.5±12.7	26.5±12.7	8.6±1.4	

*p<0.05 vs. Corretta consapevolezza di non essere affetti; °p<0.05 vs Corretta consapevolezza di essere affetti

** p<0.001 vs. Corretta consapevolezza di non essere affetti; °°p<0.001 vs Corretta consapevolezza di essere affetti

Su 1472 soggetti che si dichiaravano non diabetici l'1% (N. 14) era diabetico, nessuno aveva dubbi circa l'essere o non essere diabetico. I soggetti diabetici consapevoli ed inconsapevoli mostravano livelli di glicemia ed HOMA-index superiori ai sani, mentre i diabetici inconsapevoli avevano augmentation index superiore sia ai sani che ai diabetici consapevoli (Tabella 4).

Tabella 4 – Confronto dei parametri glicemici e di rigidità arteriosa in soggetti consapevoli e non consapevoli di essere affetti da diabete di tipo 2

	Glicemia a digiuno (mg/dL)	Insulinemia a digiuno (mcU/mL)	HOMA Index
Corretta consapevolezza di non essere affetti	93.3±12.5	18.9±4.1	4.4±2.7
Incorretta consapevolezza di non essere affetti	193.4±72.2**°	15.9±6.7	7.6±3.9*
Corretta consapevolezza di essere affetti	178.3±42.2**	19.6±5.8	8.9±3.6*
	Augmentation index	Pulse Wave Velocity (m/s)	
Corretta consapevolezza di non essere affetti	25.5±9.3	9.1±2.4	
Incorretta consapevolezza di non essere affetti	27.8±8.3*°	10.1±1.5	
Corretta consapevolezza di essere affetti	25.3±6.2	10.2±3.0	

*p<0.05 vs. Corretta consapevolezza di non essere affetti; °p<0.05 vs Corretta consapevolezza di essere affetti

** p<0.001 vs. Corretta consapevolezza di non essere affetti; °°p<0.001 vs Corretta consapevolezza di essere affetti

Discussione

setting in cui si svolge l'indagine. Ad esempio, in un recente studio coreano il fattore di rischio meno noto ai soggetti intervistati era la dislipidemia (13), mentre nella nostra casistica l'ipertensione. Questo probabilmente è legato al fatto che il Brisighella Heart Study nasce con un focus specifico sull'associazione fra dislipidemie e rischio cardiovascolare e quindi la popolazione coinvolta è maggiormente edotta (14). Tuttavia, il coinvolgimento in uno studio epidemiologico focalizzato ha comunque migliorato di molto la consapevolezza di essere interessati da fattori di rischio, rispetto a setting di screening estemporaneo (15). Il dato di maggiore interesse nel nostro studio è che la non consapevolezza di essere affetti da fattori di rischio maggiori, in particolare ipertensione ed ipercolesterolemia, è associata ad un grado di invecchiamento vascolare simile o maggiore rispetto a quello di soggetti consapevoli già trattati con modificazione dello stile di vita e/o terapia farmacologica mirata. Questo dato è di particolare interesse in quanto è stato stimato che ad un aumento di 1 m/s della PWV coinciderebbe un incremento del rischio relativo di eventi cardiovascolari totali del 12%, di eventi cardiovascolari letali del 13% e di rischio di morte per tutte le cause del 6% (16).

Il nostro studio ha ovviamente alcune importanti limitazioni. Come sopra detto, lo studio arruola soggetti che fanno parte della coorte storica del Brisighella Heart Study, per cui è probabile che in passato sia stato già chiaramente spiegato ai soggetti affetti dai vari fattori di rischio di essere interessati dagli stessi. Inoltre, la terapia farmacologica veniva riferita dai soggetti intervistati col rischio di avere sovrastimato il controllo spontaneo dei fattori di rischio quando il soggetto avesse dimenticato di riportare la terapia stessa. Per lo stesso motivo però non era dato conoscere il grado di compliance dei pazienti alla terapia impostata. D'altra parte però, al meglio della nostra conoscenza, questo è il primo studio ad aver correlato direttamente il grado di consapevolezza di essere affetti da alcuni fattori di rischio cardiovascolari maggiori ed il grado di invecchiamento vascolare espresso in termini di augmentation index e PWV.

In conclusione, la mancata percezione di essere affetti da fattori di rischio quali ipertensione arteriosa ed ipercolesterolemia espone soggetti potenzialmente curabili ad una condizione associata ad invecchiamento vascolare precoce. Ulteriori sforzi dovranno essere prodotti al fine di aumentare la percezione dei fattori di rischio cardiovascolare in popolazione generale.

Bibliografia

1. Organisation WH. Cardiovascular diseases (CVDs) 2015. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> Last access Aug 28, 2018.
2. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, Cooney MT, Corrà U, Cosyns B, Deaton C, Graham I, Hall MS, Hobbs FDR, Løchen ML, Löllgen H, Marques-Vidal P, Perk J, Prescott E, Redon J, Richter DJ, Sattar N, Smulders Y, Tiberi M, van der Worp HB, van Dis I, Verschuren WMM, Binno S; ESC Scientific Document Group. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J*. 2016;37(29):2315-2381. doi: 10.1093/eurheartj/ehw106.
3. Bloom DE, Cafiero ET, Jané-Llopis E, Abrahams-Gessel S, Bloom LR, Fathima S, Feigl AB, Gaziano T, Mowafi M, Pandya A, Prettner K, Rosenberg L, Seligman B, Stein AZ, Weinstein C. The Global Economic Burden of Noncommunicable Diseases. Geneva: World Economic Forum; 2011 September. Report No.: 080911.
4. SIGN (Scottish Intercollegiate Guidelines Network). Risk estimation and the prevention of cardiovascular disease. A national clinical guideline. February 2007. Report No. 97.
5. Reboussin DM, Allen NB, Griswold ME, Guallar E, Hong Y, Lackland DT, Miller EPR 3rd, Polonsky T, Thompson-Paul AM, Vupputuri S. Systematic Review for the 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation,

- and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2018;138(17):e595-e616. doi: 10.1161/CIR.0000000000000601.
6. Grundy SM, Stone NJ, Bailey AL, Beam C, Birtcher KK, Blumenthal RS, Braun LT, de Ferranti S, Faiella-Tommasino J, Forman DE, Goldberg R, Heidenreich PA, Hlatky MA, Jones DW, Lloyd-Jones D, Lopez-Pajares N, Ndumele CE, Orringer CE, Peralta CA, Saseen JJ, Smith SC Jr, Sperling L, Virani SS, Yeboah J. 2018 AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCNA Guideline on the Management of Blood Cholesterol: Executive Summary. *Circulation*. 2018 Nov 10;CIR0000000000000624. doi: 10.1161/CIR.0000000000000624. [Epub ahead of print]
 7. Abshire DA, Lennie TA, Moser DK, Mudd-Martin GT. Perceptions Related to Cardiovascular Disease Risk in Caucasian College Males. *Am J Mens Health*. 2016;10(6):NP136-NP144.
 8. Tran DT. College Students' Perception of Current and Projected 30-Year Cardiovascular Disease Risk Using Cluster Analysis with Internal Validation. *J Community Health*. 2018. doi: 10.1007/s10900-018-00609-2. [Epub ahead of print]
 9. Cicero AFG, Fogacci F, Giovannini M, Grandi E, Rosticci M, D'Addato S, Borghi C. Serum uric acid predicts incident metabolic syndrome in the elderly in an analysis of the Brisighella Heart Study. *Sci Rep*. 2018;8(1):11529. doi: 10.1038/s41598-018-29955-w.
 10. Ruscica M, Ferri N, Fogacci F, Rosticci M, Botta M, Marchiano S, Magni P, D'Addato S, Giovannini M, Borghi C, Cicero AFG; Brisighella Heart Study Group. Circulating Levels of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 and Arterial Stiffness in a Large Population Sample: Data From the Brisighella Heart Study. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(5). pii: e005764. doi: 10.1161/JAHA.117.005764.
 11. Cicero AFG, Gitto S, Fogacci F, Rosticci M, Giovannini M, D'Addato S, Andreone P, Borghi C; Brisighella Heart Study Group. Fatty liver index is associated to pulse wave velocity in healthy subjects: Data from the Brisighella Heart Study. *Eur J Intern Med*. 2018;53:29-33. doi: 10.1016/j.ejim.2018.03.010.
 12. Cicero AF, Rosticci M, Baronio C, Morbini M, Parini A, Grandi E, D'Addato S, Borghi C; Brisighella Heart Study Group. Serum LDL cholesterol levels and new onset of arterial hypertension: an 8-year follow-up. *Eur J Clin Invest*. 2014;44(10):926-32. doi: 10.1111/eci.12325.
 13. Boo S, Yoon YJ, Oh H. Evaluating the prevalence, awareness, and control of hypertension, diabetes, and dyslipidemia in Korea using the NHIS-NSC database: A cross-sectional analysis. *Medicine*. 2018;97(51):e13713. doi: 10.1097/MD.00000000000013713.
 14. Cicero AF, D'Addato S, Veronesi M, Rosticci M, Santi F, Dormi A, Borghi C; Brisighella Heart Study Group. Relationship between blood pressure, cholesterolemia and serum apolipoprotein B in a large population sample: the Brisighella Heart Study. *J Hypertens*. 2012;30(3):492-6. doi: 10.1097/HJH.0b013e32834f6b11.
 15. Omboni S, Carabelli G, Ghirardi E, Carugo S. Awareness, treatment, and control of major cardiovascular risk factors in a small-scale Italian community: results of a screening campaign. *Vasc Health Risk Manag*. 2013;9:177-85. doi: 10.2147/VHRM.S40925.
 16. Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Terentes-Printzios D, Ioakeimidis N, Stefanadis C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with brachial-ankle elasticity index: a systematic review and meta-analysis. *Hypertension*. 2012;60(2):556-62. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.194779.