



Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia

Dottorato di ricerca in

Scienze e Tecnologie dei Prodotti per la Salute

**LE MUCOPOLISACCARIDOSI:
APPROCCI ANALITICI ALLA
DIAGNOSI ASINTOMATICA**

Relatore:

Prof. Nicola VOLPI

Dottorando:

Fabio GALEOTTI

Matr. 60300

Direttore della Scuola:

Prof.ssa Annalisa TAIT

Ciclo XXVI - Anno Accademico 2012/2013

SOMMARIO

1. PREFAZIONE.....	5
2. INTRODUZIONE	7
2.1 I GLICOSAMINOGLICANI.....	7
2.1.1 <i>Acido Ialuronico.....</i>	8
2.1.2 <i>Cheratan solfato.....</i>	10
2.1.3 <i>Eparina ed Eparan solfato</i>	13
2.1.4 <i>Condroitin solfato e Dermatan solfato.....</i>	15
2.2 IL CATABOLISMO DEI GLICOSAMINOGLICANI	20
2.2.1 <i>Catabolismo dell'Acido Ialuronico.....</i>	22
2.2.2 <i>Catabolismo del Cheratan Solfato</i>	23
2.2.3 <i>Catabolismo dell'Eparina e dell'Eparan Solfato.....</i>	24
2.2.4 <i>Catabolismo del Condroitin Solfato e del Dermatan Solfato ...</i>	24
2.3 LE MUCOPOLISACCARIDOSI	26
2.3.1 <i>Sintomatologia</i>	30
2.3.2 <i>Diagnosi</i>	35
2.3.3 <i>Terapie</i>	37
2.4 METODI ANALITICI.....	39
2.4.1 <i>Classici.....</i>	39
2.4.2 <i>Avanzati.....</i>	40
3. STRUMENTAZIONE	42
3.1 CROMATOGRAFIA LIQUIDA - HPLC	42
3.1.1 <i>Rivelatori per HPLC</i>	45
3.1.2 <i>Configurazione strumentale</i>	48
3.2 ELETTROFRESI CAPILLARE – CE.....	49
3.2.1 <i>Rivelatori per CE</i>	54
3.2.2 <i>Configurazione strumentale</i>	54
3.3 GAGs URINARI.....	55
3.4 DS/CS PLASMATICI.....	67
4. RISULTATI.....	69

4.1	HPCE ED ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO.....	69
4.2	HPLC	86
4.3	MPS IIIA.....	94
5.	CONCLUSIONI	96
	BIBLIOGRAFIA	104

1. PREFERAZIONE

Sovente patologie progressive possono essere controllate o arrestate se diagnosticate precocemente anche in assenza di un'evidente sintomatologia. È questo il caso delle Mucopolisaccaridosi, ovvero malattie rare dovute all'accumulo lisosomiale di glicosaminoglicani e causate da uno specifico deficit enzimatico che ne compromette la corretta degradazione.

L'obiettivo di questo studio è proprio quello di proporre metodi semplici, affidabili, non invasivi, riproducibili ed economici per la diagnosi della menzionata patologia.

Dal punto di vista clinico è fondamentale creare quanto prima i presupposti per un piano di screening neonatale esteso a tutta la popolazione dei nuovi nati.

Questa necessità è ancora più impellente se si considera che le moderne terapie di sostituzione enzimatica sono efficaci solo se attuate sin dalle prime settimane di vita del neonato.

Dal punto di vista sperimentale è stato ideato un insieme di protocolli diagnostici destinati appunto alla diagnosi precoce e asintomatica. Trattasi di un insieme di approcci più sofisticati rispetto alle tradizionali tecniche elettroforetiche e/o colorimetriche che ancora oggi rappresentano il principale screening correlato alla diagnosi delle Mucopolisaccaridosi. Il primo verte sulla determinazione qualitativa e quantitativa delle esosamine contenute nelle urine mediante Elettroforesi Capillare in UV. La loro concentrazione è di fatto correlabile al contenuto in glicosaminoglicani. Gli stessi risultati sono stati ottenuti anche mediante HPLC in fluorescenza, confermando la validità del metodo elettroforetico HPCE. Il secondo dipende invece dal contenuto di Galattosaminoglicani (DS e CS) a livello plasmatico e si fonda su una particolare condizione fisiopatologica recentemente dimostrata. In sostanza è ormai noto che l'accumulo primario

di un tipo di GAG ha come conseguenza un accumulo secondario di altre forme di glicosaminoglicani aspecifici rispetto alla forma di MPS in esame. Abbiamo dunque stabilito che il contenuto di DS-CS può essere considerato un marker appropriato per la diagnosi precoce di tutte le forme di MPS.

A conclusione della parte concernente la presentazione dei risultati ottenuti abbiamo inserito anche i dati relativi ad uno specifico soggetto affetto da MPS IIIA caratterizzato da lieve ritardo mentale e bassi livelli urinari di HS.

2. INTRODUZIONE

2.1 I GLICOSAMINOGLICANI

I glicosaminoglicani, o più brevemente GAGs, sono una classe di macromolecole glucidiche lineari molto eterogenea sia in termini di struttura sia di peso molecolare. Nei tessuti possono legare particolari proteine extracellulari per generare i cosiddetti proteoglicani, in altre parole enormi aggregati di tipo covalente nei quali i polisaccaridi rappresentano spesso oltre il 95% in peso dell'intero complesso.

I GAGs sono dei derivati macromolecolari di alcuni zuccheri semplici tra cui gli acidi uronici e gli aminozuccheri, i quali si legano per formare l'unità disaccaridica di base. Tra i principali acidi uronici riscontriamo l'acido D-glucuronico e il suo epimero, l'acido L-iduronico, mentre per gli aminozuccheri si annoverano la glucosamina e la galattosamina, anche in forma acetilata e solforilata (1).

La loro distribuzione è generalmente extracellulare e mostrano un ruolo caratteristico nella regolazione delle proprietà biochimiche e reologiche della matrice extracellulare (2). Sono contenuti anche nei mastociti, nei granulociti basofili, nell'umor vitreo e nei fluidi sinoviali (1). Svolgono un ruolo fondamentale come recettori di membrana andando a mediare parte dei segnali cellula-ligando e cellula-cellula (2); influenzano anche l'organizzazione della membrana basale e operano un controllo attivo dei processi diffusivi che interessano la matrice cellulare.

La classificazione proposta è in quattro classi:

1. Acido Ialuronico (HA);
2. Chondroitin Solfato (CS);
3. Eparina (HP) ed Eparan Solfato (HS);
4. Cheratan Solfato (KS).

2.1.1 Acido Ialuronico

L'acido ialuronico è il solo glicosaminoglicano non solfatao e non costituente proteoglicani. Il peso molecolare medio è di circa 2000 kDa. L'unità disaccaridica è composta di acido glucuronico e di N-acetil-D-glucosamina legate da un legame $\beta(1,3)$. Il polimero è biosintetizzato attraverso legami $\beta(1,4)$. La caratteristica principale di questo polimero lineare è quella di presentare un'elevata densità di carica anionica associata ad un'elevata flessibilità. In altri termini si osserva un carattere molto polare capace di esercitare un forte effetto igroscopico sull'ambiente circostante.

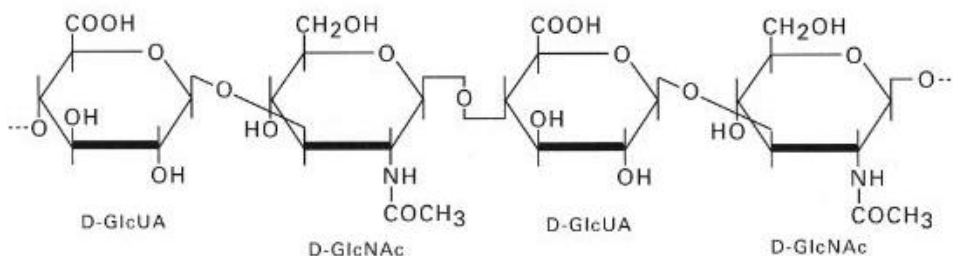


Figura 1 - Struttura dell'Acido Ialuronico.

L'importanza nei tessuti connettivi è confermata dalla concentrazione media che raggiunge i 200 mg per kg di peso corporeo. Si trova nell'umor vitreo, nel liquido sinoviale, nel derma, nelle cartilagini, nei tendini, nelle pareti aortiche e nel cordone ombelicale. Questa diffusione conferma un insostituibile ruolo strutturale in funzione soprattutto dell'elevata resistenza a stress meccanici.

La struttura reticolare supportata dall'acido ialuronico ha, in effetti, due importanti caratteristiche. La prima è di promuovere un mantenimento e un controllo attivo della forma e del tono del tessuto (3); questa funzione è particolarmente evidente soprattutto a livello del derma. La seconda fa riferimento alla regolazione dei processi diffusivi che interessano non solo le molecole segnale ma anche agenti patogeni; è nota, infatti, la capacità di

alcuni microorganismi di poter degradare l'acido ialuronico mediante alcune ialuronidasi specifiche.

Senza entrare nel dettaglio dei processi di biosintesi è importante notare come questa avvenga a livello della membrana plasmatica e non nel Golgi, come avviene per gli altri glicosaminoglicani, proprio a causa delle dimensioni molto elevate (3). L'esportazione è mediata da trasportatori Multi Drug Resistance o MDR.

Per quanto concerne il catabolismo dell'acido ialuronico, questo può avvenire in tre modi distinti. Il primo è endocellulare e prevede l'internalizzazione del polimero mediata dal recettore di superficie CD44 (4). La seconda possibilità prevede l'assorbimento del polimero a livello dei vasi sanguigni e linfatici e la successiva degradazione per opera di reni, milza e fegato (4). L'ultimo processo degradativo è legato all'azione dei radicali liberi (4). Alcuni dettagli catabolici saranno affrontati accuratamente nel capitolo 2.2.1.

Ecco un breve riferimento alle proprietà biologiche. L'HA, interagendo con i proteoglicani, costituisce l'ossatura principale dell'organizzazione della matrice extracellulare; forma inoltre associazioni con il collagene, la fibrina e altre molecole della matrice extracellulare supportando così la migrazione dei fibroblasti e delle nuove cellule endoteliali nell'area della lesione e contribuendo in modo sostanziale ai processi di riparazione tissutale (5). Da aggiungere l'importante ruolo che detiene nella regolazione delle proprietà reologiche e nel conferire elevata resistenza elastica. Quanto appena detto è dimostrato dalla forte presenza di HA nel liquido sinoviale delle articolazioni. Da citare inoltre l'importante ruolo che riveste in alcune fasi dell'embriogenesi, dell'angiogenesi e nell'attivazione dei fattori di trascrizione a livello dei precursori mesenchimali. In molti casi l'effetto di up-regolazione o down-regolazione dipende dal peso molecolare dell'HA pur interagendo con gli stessi recettori di membrana. Un caso

esemplificativo è quello dell'angiogenesi in cui molecole di HA a basso peso molecolare sembrano avere un effetto proliferatorio mentre quelle ad alto peso molecolare agiscono in modo inibitorio, anche se entrambe le classi agiscono sugli stessi recettori delle cellule endoteliali. Un esempio simile è legato alla modulazione della risposta infiammatoria. In molti casi si è dimostrato che il peso molecolare di HA è strettamente correlato a un preciso comportamento delle cellule immunitarie locali mediato dai recettori di membrana CD44, RHAMM e TRL4 (6). Infine è necessario considerare un ruolo non marginale nel contenimento di alcuni processi infettivi promossi da micobatteri, parassiti, virus e retrovirus. Come esempio si faccia riferimento alla capacità d'inibizione nei confronti del *Plasmodium falciparum*.

2.1.2 Cheratan solfato

Il cheratan solfato fa parte anch'esso della matrice extracellulare. Inoltre è particolarmente presente sulla superficie cellulare di cornee, cartilagini ed encefalo.

Il polimero del cheratan solfato è formato da disaccaridi costituiti da N-acetilglucosamina solfatata in posizione 6 e da galattosio legati mediante un legame $\beta(1-4)$. Le unità disaccaridiche sono invece unite le une alle altre mediante legami $\beta(1-3)$.

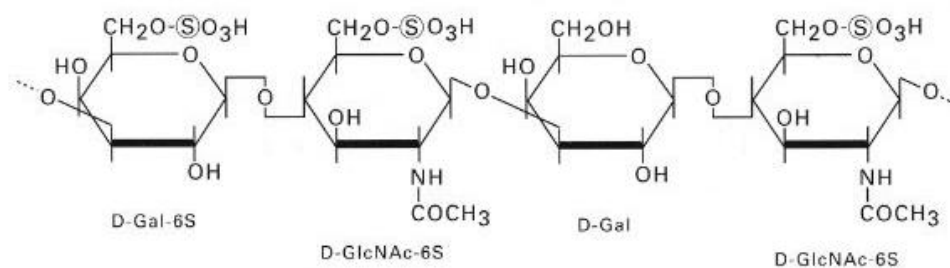


Figura 2 - Struttura del cheratan solfato.

Storicamente si usa distinguere tra il KS di tipo I e il KS di tipo II. Il primo è il maggior costituente della cornea tanto che la forza e la trasparenza di

quest'ultima dipendono in larga misura dal corretto sviluppo e da una buona organizzazione della matrice stromale cornea; il KS I interagisce con alcune proteine legandosi al gruppo amminico dell'asparagina e formando proteoglicani quali il lumican, il keratocane, il mimecan. Il secondo è presente soprattutto a livello delle cartilagini e si suddivide in KSIIA o cheratan solfato articolare, e in KSIIB o cheratan solfato non articolare; forma proteoglicani interagendo con il gruppo ossidrilico di serine e di treonine contenute in proteine target. Recentemente però, oltre ad essere stato identificato un nuovo tipo di KS denominato KSIII (7), si è notato che questa classificazione non è tessuto-specifica per cui è attualmente basata sui diversi proteoglicani che possono essere assemblati.

La biosintesi è mediata da glicosiltransferasi specifiche capaci di catalizzare l'aggiunta alternata di galattosio e di N-acetilglucosamina al polimero in fase di allungamento. Queste si suddividono in gal-transferasi e in N-acetilglucosaminatransferasi. La solfatazione è invece mediata da almeno 2 enzimi zolfo-transferasici. La biosintesi di KS è spesso alterata in risposta a particolari condizioni metaboliche e di sviluppo. In particolare la concentrazione e il grado di solfatazione del KS sono molto variabili durante la crescita corneale. Nell'embriogenesi del pulcino il KS solfato non è rilevabile fino alla dodicesima ora, dopo l'invasione e la migrazione delle cellule della cresta neurale nello stroma; dopo questo periodo il KS solfato si accumula rapidamente. Anche durante lo sviluppo cartilagineo sembra mostrare variazioni quantitative e nel tipo di solfatazione, simili a quelli notati nella cornea.

Per quanto concerne il catabolismo si faccia riferimento al capitolo dedicato mentre alcuni aspetti d'interesse riguardanti le proprietà biologiche del cheratan solfato saranno discussi nelle prossime righe.

Come già affermato, il KS ha un ruolo determinante nella struttura della cornea; la sua elevata concentrazione sembra essere legata all'idratazione

del tessuto e al mantenimento della trasparenza. Di fatto il KS e il dermatan solfato hanno un'elevata capacità igroscopica: il DS è completamente idratato mentre il KS lo è solo parzialmente. L'importanza del KS nello stroma della cornea è supportata da dati riguardanti la distrofia maculare, patologia nella quale il bilancio dei glicosaminoglicani è alterato e la quantità di KS è inferiore rispetto alla norma. Questa condizione è legata a un difetto dei fibroblasti stromali artefici di un metabolismo del KS alterato. Nella maggior parte dei soggetti affetti da suddetta patologia, il gene che codifica per l'enzima N-acetilglucosamina-6-solfotransferasi, deputato alla solfatazione del KS, codifica per una proteina inattiva o solo parzialmente funzionante. Esistono tre forme di questa patologia in relazione alla porzione di gene mutata e alla quantità di KS solfatato accumulata all'interno dei keratinociti (7). Il KS è anche implicato nella motilità delle cellule endoteliali della cornea: mostrano normalmente una distribuzione di KS a mosaico in prossimità della loro superficie apicale che è ridotta o talvolta assente durante la loro migrazione (7).

Oltre che nella cornea il KS svolge alcuni ruoli fondamentali per il funzionamento di altri tessuti.

Recenti studi in vitro concernenti l'azione fagocitaria e le capacità di aderenza dei macrofagi hanno dimostrato le proprietà antiadesive del KS (7).

Un altro ruolo è di formare una barriera alla crescita dei neuroni in vitro e dirigerne la direzione di crescita durante lo sviluppo in vivo e in vitro (7).

L'abbondanza delle cellule componenti l'endometrio uterino e associate al KS varia marcatamente durante il ciclo mestruale e raggiunge un massimo nel momento in cui si realizza l'impianto dell'embrione. Questa scoperta suggerisce un potenziale ruolo del KS nel processo d'impianto embrionale (7).

2.1.3 Eparina ed Eparan solfato

L'eparina è un polisaccaride con peso molecolare compreso tra 3 e 40 kDa la cui catena polimerica è costituita da disaccaridi di acido uronico e di N-glucosamina uniti da legami $\beta(1-4)$. I residui di acido uronico possono essere diversamente solfati e, inoltre, essere rappresentati da acido iduronico o da acido glucuronico. I residui di N-glucosamina possono essere diversamente sostituiti in quanto è nota la presenza non solo di N-solfato ma anche di N-acetile. Considerando le diverse posizioni solfatibili per entrambi i residui si arriva a 32 possibili unità disaccaridiche. Da tale considerazione si può facilmente dedurre una notevole eterogeneità strutturale (3). La struttura chimica dell'eparina è molto simile a quella dell'eparan solfato e differiscono essenzialmente per il grado di solfatazione. L'eparina è, di fatto, maggiormente solfata per cui mostra anche una densità di carica negativa più elevata. L'eparan solfato è invece rappresentato da polimeri a maggior peso molecolare.

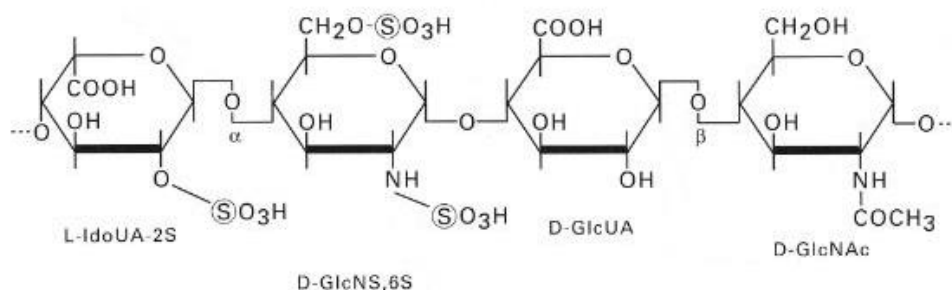


Figura 3 - Struttura dell'Eparan solfato.

L'eparan solfato è particolarmente associato in proteoglicani che rivestono le cellule dell'endotelio vascolare e dei linfociti donando quindi una carica negativa a queste superfici. L'eparina è invece rilasciata insieme all'istamina durante la degranolazione dei mastociti.

La biosintesi di questi GAGs può essere suddivisa in tre fasi distinte. Da aggiungere che l'elevata variabilità strutturale citata in precedenza è in parte

limitata da meccanismi biosintetici che prediligono certe combinazioni rispetto ad altre (8).

La prima fase è rappresentata dalla formazione della regione di legame alla porzione proteica. Segue la formazione della catena polisaccaridica e infine, la modificazione post-sintetica della stessa. La regione di legame alla proteina è costituita da una sequenza trisaccaridica di xilosio-galattosio-galattosio seguita da un residuo di acido glucuronico (8). Questo elemento strutturale è legato al gruppo idrossilico della serina del nucleo proteico e costituisce, a biosintesi terminata, il proteoglicano eparinico (8). Questa regione di legame è uguale per eparina, eparan solfato e condroitin solfato. In tutti i casi, il residuo di xilosio è trasferito sulla serina da una xilosiotransferasi, mentre le molecole di galattosio sono trasferite sullo xilosio da due differenti galattosiotransferasi che sembrano essere comuni a eparina e condroitin solfato. Infine, l'acido glucuronico che circonda la regione di legame è trasferito sul galattosio da una transferasi apparentemente diversa dalla glucuronosiltransferasi, legata alla formazione della catena polisaccaridica. A differenza del condroitin solfato, le reazioni di sintesi dell'eparina e dell'eparan solfato non richiedono la presenza di un core proteico. In funzione del tipo di esosamina legata all'acido glucuronico, è possibile generare due glicosaminoglicani differenti: il legame di un residuo di glucosamina genera eparina o eparan solfato mentre il legame di una galattosamina porta a condroitin solfato (8).

La reazione di polimerizzazione è caratterizzata dal trasferimento di acido D-glucuronico e di N-acetilglucosamina dai rispettivi donatori di zuccheri alla porzione non riducente della catena in fase di allungamento: gli UDP-esosi. Quest'azione è catalizzata da specifiche transferasi quali la glucuroniltransferasi e la N-acetil-glucosaminiltransferasi (8).

In seguito questa molecola non ancora solfatata è protagonista di una serie di modificazioni polimeriche che si susseguono in una rapida e ordinata

sequenza. Da notare che queste reazioni sono quantitativamente regolate a seconda che si stia biosintetizzando una molecola di eparina o di eparan solfato (8). Indicativamente la sequenza si articola in deacetilazione dei residui di N-acetilglucosamina, solfatazione dei residui di glucosamina, formazione di unità di acido iduronico, O-solfatazione sull'atomo in posizione 2 dei residui di acido iduronico e in posizione 3 e 6 dei residui di glucosamina (8). Ciascuna di queste reazioni coinvolge solo una frazione delle unità disaccaridiche disponibili in modo che la modificazione del polimero sia parziale e, ancora meglio, eterogenea (8).

Generalizzando si può affermare che la biosintesi dell'eparina sia molto rapida e termini in pochi minuti, presumibilmente nel compartimento del Golgi o nel Reticolo Endoplasmatico Rugoso (8).

Per il catabolismo fare riferimento al capitolo 2.2.3.

Le proprietà biologiche dell'eparina sono legate alla sua interazione elettrostatica con molte proteine. La forma endogena è presente nei mastociti e nel plasma, dove è strettamente associata a proteine seriche basiche regolandone l'attività biologica (3). L'importanza di questo GAGs deriva da una propria partecipazione attiva anche nell'emostasi, nell'angiogenesi e nel metabolismo lipoproteico.

2.1.4 Condroitin solfato e Dermatan solfato

Il condroitin solfato è un polisaccaride lineare costituito da unità disaccaridiche, formate da un acido uronico e da alfa-D-N-acetilgalattosamina. L'acido uronico può essere dunque β -D-glucuronico o alfa-L-iduronico e si lega al residuo glucidico attraverso un legame $\beta(1-3)$; le unità disaccaridiche sono legate tra loro mediante legami $\beta(1-4)$.

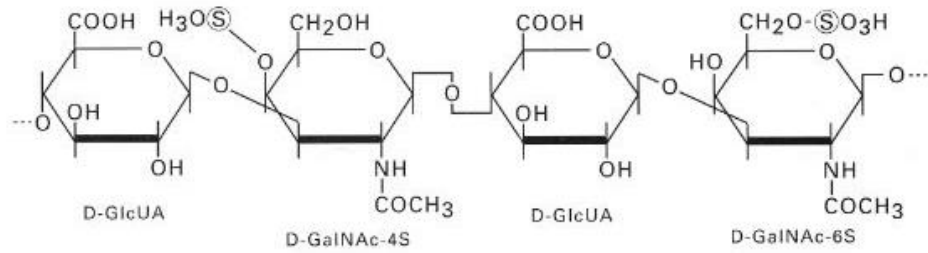


Figura 4 - Struttura del Condroitin solfato.

In merito al grado di solfatazione e alla localizzazione dei gruppi solfato è comodo, per semplificare l'eterogeneità che contraddistingue questo GAG, classificare il CS in 5 classi.

La prima è rappresentata dal condroitin solfato A. La struttura chimica presenta una solfatazione sul C4 della N-acetilgalattosamina e per tale caratteristica questo GAG è denominato anche condroitin-4-solfato (9).

La seconda classe fa riferimento al condroitin solfato B o meglio noto come dermatan solfato. Rispetto agli altri GAGs mostra un contenuto in acido iduronico inaspettatamente elevato se si considera che generalmente è predominante l'acido glucuronico. Il disaccaride principale di questo GAG è costituito da acido iduronico solfatato in posizione 2 e da N-acetilgalattosamina solfatata in posizione 4. Detto questo, è importante considerare che non sia esclusa la presenza di altri tipi di disaccaridi ma anzi, questi siano sempre presenti e in quantità molto variabili (9; 10).

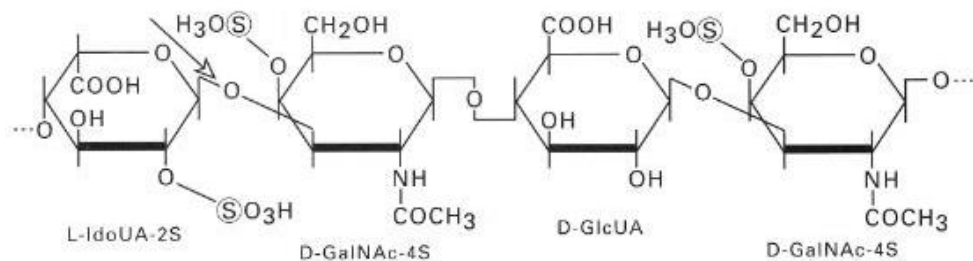


Figura 5 - Struttura del Dermatan solfato.

Il condroitin solfato C ha una struttura chimica molto simile a quella del tipo A da cui differisce per una solfatazione in C6 del residuo di N-acetilgalattosamina invece che in C4 (9).

La quarta classe è rappresentata dal condroitin solfato D. Il disaccaride principale è costituito da acido glucuronico solfatato in posizione 2 e da N-acetilgalattosamina solfatata in posizione 6. Questo tipo di GAG è particolarmente abbondante nella matrice cartilaginea di squalo (9).

E infine il condroitin solfato E. L'unità monomerica di base è costituita da acido glucuronico e da N-acetilgalattosamina solfatata in posizione 4 e in posizione 6. Si trova soprattutto nella cartilagine di calamaro, da cui si estrae e si purifica, ma è presente anche nei mastociti umani e murini (9).

Per la biosintesi del CS si rimanda il lettore alla parte che tratta della biosintesi dell'eparina considerando che i due processi sono strettamente correlati. Ciò che distingue le due vie di biosintesi è il tipo di esosamina introdotta nella fase di allungamento della catena polisaccaridica (8).

Quanto concerne il catabolismo sarà approfondito nel paragrafo 2.2.4.

Le proprietà biologiche dei condroitin solfato sono generalmente legate alla loro associazione in proteoglicani. Tra questi sono degni di nota l'aggrecan, il versican e il syndecan.

L'aggrecan è il proteoglicano più abbondante della cartilagine. E' costituito da una proteina centrale di circa 210 KDa e ricca di sequenze ripetute di serina e glicina cui si legano le catene polisaccaridiche. All'estremità amino terminale del core proteico è presente un dominio globulare capace di interagire in modo specifico con l'acido ialuronico. Il proteoglicano pare essere organizzato in una parte iniziale di cheratan solfato seguita da una regione ricca di condroitin solfato; la molecola termina con un altro dominio globulare in corrispondenza della terminazione carbossilica che presenta sequenze omologhe con la lectina epatica. Le principali funzioni

dell'aggrecan sono di conferire supporto meccanico e un'elevata resistenza elastica al tessuto mediante complessi d'aggregazione con l'acido ialuronico e mediante la grande ritenzione d'acqua favorita dalle cariche negative delle catene polisaccaridiche (9).

Il versican è un altro proteoglicano di grandi dimensioni localizzato a livello extracellulare ed espresso nella maggior parte dei tessuti connettivi umani. Anche questo proteoglicano è in grado di legare l'acido ialuronico e di aggregare in complessi sovramolecolari ad alto peso molecolare, conferendo resistenza ed elasticità al tessuto; inoltre sono in grado di interagire con alcuni fattori di crescita e regolare il differenziamento della cartilagine.

Il syndecan è un proteoglicano la cui porzione proteica è inserita profondamente nel doppio strato lipidico di membrana, con le catene polisaccaridiche esposte nell'ambiente extracellulare. Il syndecan connette le molecole della matrice extracellulare con le catene citoscheletriche dell'ambiente intracellulare contenenti actina. Questo proteoglicano presente sulla superficie cellulare di numerose cellule dell'endotelio vasale, svolge funzioni importantissime, come quella di recettore per diverse proteine della matrice extracellulare, agisce da anticoagulante e da antitrombotico endogeno, regola infine alcuni fattori di crescita (9).

Oltre a quelli menzionati basti ricordare la decorina, il byblycan, la trombomodulina e i serglycin per meglio comprendere l'eterogeneità di proteoglicani possibili (9).

Una proprietà di recente scoperta è la capacità inibitoria esercitata sull'elastasi prodotta dai leucociti umani. In vitro è stato osservato che molecole di CS con peso molecolare superiore a 2 kDa inibiscono l'elastasi con efficienza elevata mentre molecole a peso molecolare inferiore non alterano sensibilmente l'attività enzimatica. Sembra inoltre che la densità di carica del CS regoli il potere inibitorio. In altri termini l'inibizione dell'attività enzimatica decresce all'aumentare del contenuto in disaccaridi

non solfatati mentre cresce all'aumentare della quantità relativa di disaccaridi 2 e 6 solfatati (11).

Le importanti proprietà biologiche si traducono inevitabilmente in altrettanto promettenti applicazioni terapeutiche. La principale tra queste è come condroprotettivo nelle patologie articolare quali l'osteoartrosi. Il condroitin solfato è capace di stimolare i processi biosintetici per il ripristino dell'acido ialuronico e di agire, come proteoglicano, da antagonista delle metalloproteasi riducendo la flogosi (9). Tra i farmaci più rappresentativi si annovera il Condrosulf il cui principio attivo è proprio il condroitin solfato; è impiegato come antinfiammatorio e come farmaco antireumatico (12).

Un'altra possibile applicazione del condroitin solfato è quella diagnostica. Studi recenti hanno dimostrato che in un campione di pazienti affetti da patologie tumorali si manifesta un'anomalia strutturale del condroitin solfato escreto con le urine (13).

Il dermatan solfato mostra un'importante attività anticoagulante poiché inibisce la trombina attraverso la stimolazione di un inibitore della proteasi stessa, noto con il nome di cofattore eparinico II. Il modello molecolare prevede che la catena polisaccaridica interagisca sia con la proteasi e sia con l'inibitore per avere forte attività anticoagulante (9).

2.2 IL CATABOLISMO DEI GLICOSAMINOGLICANI

La degradazione dei GAGs avviene prevalentemente a livello lisosomiale, dove la maggior parte dei frammenti e dei monosaccaridi generati rientra nella via biosintetica. In vivo il processo degradativo è altamente organizzato e dipendente da idrolasi. Tali enzimi sono substrato-specifici in accordo con la stereoisomeria dello zucchero, con il tipo di legame glicosidico, con il pattern di sostituzione idrossilica della catena e con il pH del compartimento lisosomiale. La prima classe di questi enzimi è costituita da esoglicosidasi che catalizzano la liberazione dello specifico monosaccaride all'estremità non riducente della catena oligosaccaridica. Le endoglicosidasi idrolizzano invece specifiche sequenze glucidiche all'interno del biopolimero generando frammenti di circa 10 kDa. Al processo idrolitico cooperano anche delle solfatasi, delle esosaminidasi e delle glucuronidasi. Nella tabella seguente sono riportati solo alcuni enzimi responsabili del catabolismo dei GAGs.

<u>Enzima</u>	<u>Reazione</u>
Iduronato-2-solfatasi (3.1.6.13)	Idrolisi del gruppo 2-solfato in L-iduronato di DS e HS
α -iduronidasi (3.2.1.76)	Idrolisi di legami iduronosidici non solfatati in DS
GalNAc-4-solfatasi (3.1.6.12)	Idrolisi del gruppo 4-solfato di GalNAc4S e di GalAGs
GalNAc-6-solfatasi (3.1.6.4)	Idrolisi del gruppo 6-solfato di GalNAc6S (CS) e di D-gal (KS)
β -N-acetil-esosaminidasi (3.2.1.52)	Rimozione di GalNAc4S alla porzione terminale non riducente
β -glucuronidasi (3.2.1.31)	Rimozione dei residui di β -GlcA

Tabella 1 - Alcuni enzimi del catabolismo dei GAGs.

Ad ogni modo è necessario considerare che l'attività di questi enzimi è strettamente interconnessa e variabile in funzione dell'ampia varietà di GAGs presenti.

È nell'interesse di questa tesi trattare in modo approfondito gli aspetti legati al catabolismo di ciascuna classe di biopolimeri.

2.2.1 Catabolismo dell'Acido Ialuronico

Per quanto concerne il catabolismo dell'acido ialuronico questo può avvenire in tre modi distinti. Il primo è endocellulare e prevede l'internalizzazione del polimero mediata dal recettore di superficie CD44. La seconda possibilità prevede l'assorbimento del polimero a livello dei vasi sanguigni e linfatici e la successiva degradazione per opera di reni, milza e fegato. L'ultimo tipo di processo degradativo è legato all'azione dei radicali liberi.

Il processo catabolico lisosomiale comincia con l'intervento della ialuronoglucosamidasasi o ialuronidasasi (endoglicosidasi) che idrolizza i legami $\beta(1,4)$ tra le unità di N-acetilglucosamina (D-GlcNAc) e acido D-glucuronicico (D-GlcUA). L'azione di questo enzima genera come prodotto principale l'oligosaccaride GlcUA(β 1-3)-GlcNAc(β 1-4)-GlcUA(β 1-3)-GlcNAc. Il legame $\beta(1,3)$ è idrolizzato mediante l'esoenzima β -glucuronidasasi. Il legame $\beta(1,4)$ tra la GlcNAc e il GlcUA è invece substrato dell'enzima N-acetil- β -esosaminidasasi.

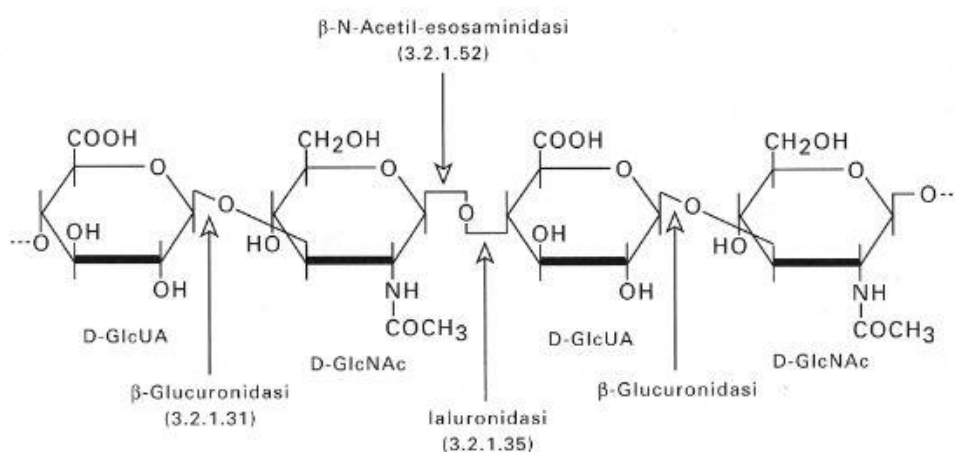


Figura 6 - Acido Ialuronico.

2.2.3 Catabolismo dell'Eparina e dell'Eparan Solfato

L'attività idrolitica è sostanzialmente sostenuta da due sottoclassi di enzimi: le glicosidasi e le O-solfatasi. In figura sono evidenziati i punti di attacco glicosidico da parte della L-iduronidasi, dell'alfa-N-acetilglucosaminidasi e della β -glucuronidasi. Si evidenziano inoltre i siti di azione della iduronato-2-solfatasi, della N-acetilglucosamina-6-solfatasi e dell'eparan-N-solfatasi. La desolforilazione nelle posizioni 6 e 2 delle esosamine è seguita da un'acetilazione del gruppo NH₂ mediata da un'acetil-trasferasi. La mancanza di questo enzima acetilante determina accumulo di substrato e l'insorgenza di una condizione patologica nota come sindrome di Sanfilippo.

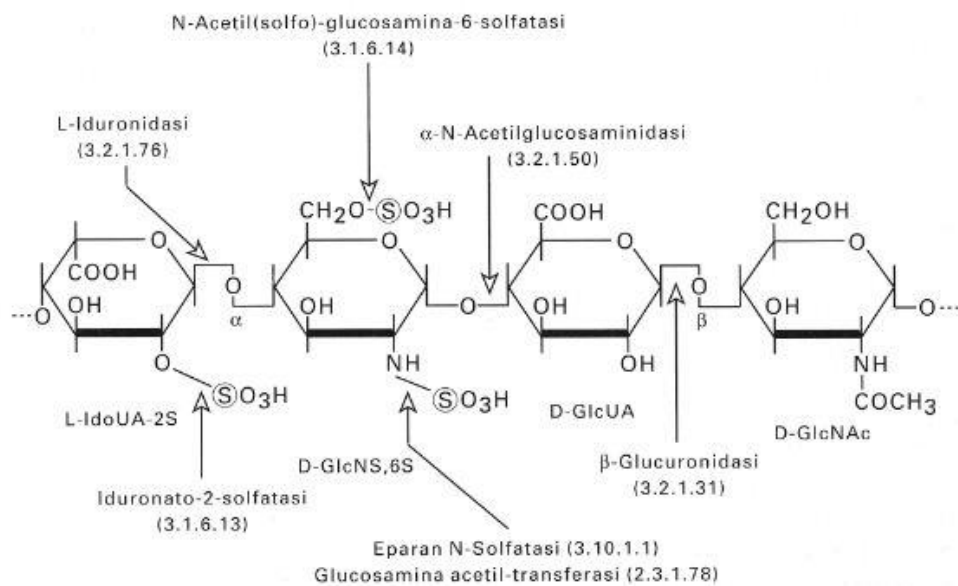


Figura 8 - Eparina ed Eparan solfato.

2.2.4 Catabolismo del Condroitin Solfato e del Dermatan Solfato

La degradazione di questi due glicosaminoglicani è parzialmente comune. Per quanto riguarda il legame glicosidico, il processo di degradazione del DS differisce da quello del CS per l'intervento di un enzima aggiuntivo

nella degradazione glicosidica: la L-iduronidasi. Gli enzimi comuni sono la β -glucuronidasi e la β -N-acetilesosaminidasi che agiscono in modo alternato. Le catene polisaccaridiche sono attaccate progressivamente da esoglicosidasi sul terminale non riducente. La rimozione dei gruppi solfato è mediata da solfatasi che agiscono in posizione 4 per il CS-A o in posizione 6 per il CS-C. Il solfato in posizione 2 sull'acido iduronico del DS è rimosso mediante l'intervento della iduronato-2-solfatasi.

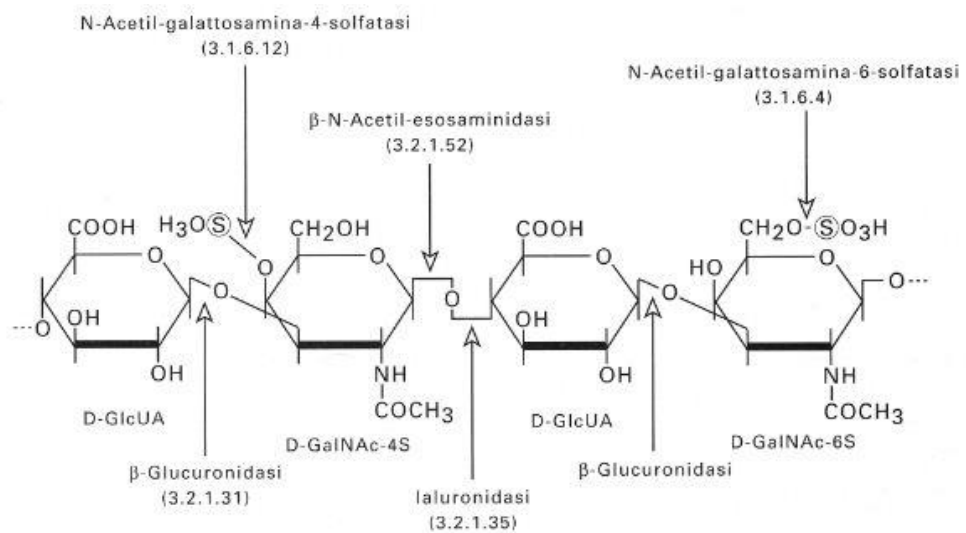


Figura 9 - Condroitin solfato.

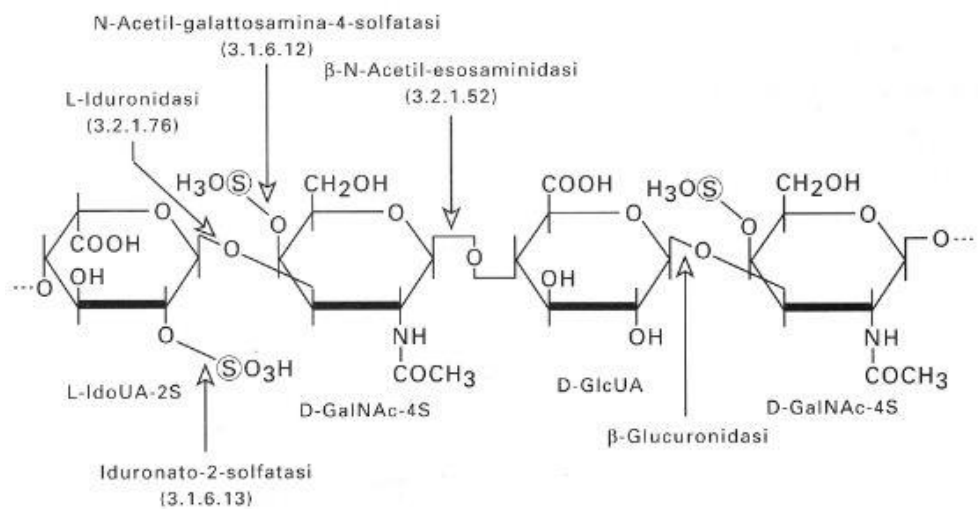


Figura 10 - Dermatan solfato.

2.3 LE MUCOPOLISACCARIDOSI

Le Mucopolisaccaridosi, in forma abbreviata MPS, fanno parte di un gruppo più ampio di patologie da accumulo lisosomiale che prende il nome di *lysosomal storage diseases* o LSDs. Complessivamente, sono note oltre 40 forme con un'incidenza media di circa 1 su 10.000 nuovi nati. L'aspetto comune è l'assenza o il deficit funzionale di particolari enzimi catabolici che determina l'accumulo lisosomiale di prodotti o detriti cellulari. Senza entrare nel dettaglio, oltre alle Mucopolisaccaridosi è inevitabile menzionare le Sfingolipidosi o Glicolipidosi (deficit enzimatico nella degradazione lisosomiale di sfingolipidi), le Oligosaccaridosi (deficit enzimatico nella degradazione di oligosaccaridi e di glicoproteine), patologie legate a un trasporto lisosomiale alterato (Cistinosi e malattia da accumulo di acido sialico o malattia di Salla), le Mucolipidosi di tipo II, di tipo III e la malattia di Schindler (patologie dovute al mancato trasporto di enzimi lisosomiali). Altre forme patologiche tipo LSDs sono la Glicogenosi tipo II o malattia di Pompe, le Ceroidolipofuscinosi, le Picnodisostosi e la Mucolipidosi tipo IV (14).

Nel caso delle MPS l'intero processo catabolico a carico dei glicosaminoglicani, o mucopolisaccaridi, è alterato. In funzione del tipo di deficit enzimatico può essere ostacolata la degradazione del dermatan solfato, dell'eparan solfato, del cheratan solfato, del condroitin solfato e dell'acido ialuronico, singolarmente o in combinazione. Il conseguente accumulo lisosomiale di glicosaminoglicani porta a una disfunzione delle cellule, dei tessuti e degli organi. Sono noti 11 enzimi carenti che danno origine a sette forme distinte di Mucopolisaccaridosi. Le Mucopolisaccaridosi condividono molti sintomi clinici, sebbene con diversi gradi. Nel nostro paese l'incidenza di queste forme è di circa 1:100000; la fonte è l'Associazione MPS Italia. Il principale aspetto sintomatologico riguarda un decorso cronico e progressivo cui si aggiunge un interessamento multi sistemico, organomegalia, disostosi multipla e anomalie facciali.

Possono essere colpiti l'udito, la vista, la respirazione, la funzione cardiovascolare e la motilità articolare. In molti casi si denota anche un grave ritardo mentale come nelle forme MPS IH (o Sindrome di Hurler), MPS II (o Sindrome di Hunter) e in tutti i sottotipi MPS III (o Sindrome di Sanfilippo). Nelle restanti forme il sistema nervoso centrale può rimanere normale. Le lesioni ossee della Mucopolisaccaridosi IV o Sindrome di Morquio sono specifiche di questo disordine.



Figura 11 - Pazienti affetti da MPS di tipo VI anche nota come Sindrome di Maroteaux-Lamy.

All'evidente similitudine patologica che intercorre tra i vari tipi di deficit enzimatici, si contrappone un ampio spettro di gravità clinica in ogni forma di MPS. In sostanza il decorso si diversifica nelle varie forme per età d'insorgenza, rapidità d'evoluzione e variabilità del fenotipo. Nelle forme più gravi il decesso può sopraggiungere prima di 10 anni di vita mentre pazienti affetti da forme attenuate possono sopravvivere fino a tarda età.

Nella tabella che segue sono riportate tutte le forme di MPS note ed è evidenziato il tipo di molecola accumulata a livello lisosomiale in funzione di ciascun deficit enzimatico.

Tipo	HS	DS	CS	KS	HA	Enzima deficitario
MPS I (Hurler/Scheie)	■	■				α -L-iduronidasi
MPS II (Hunter)	■	■				L-iduronato-2-solfatasi
MPS IIIA (Sanfilippo A)	■					Eparan-sulfamidasi
MPS IIIB (Sanfilippo B)	■					α -N-acetilglucosaminidasi
MPS IIIC (Sanfilippo C)	■					α -glucosaminide-N-acetiltransferasi
MPS IIID (Sanfilippo D)	■					N-acetilglucosamina-6-solfatasi
MPS IVA (Morquio A)			■	■		N-acetilgalattosamina-6-solfatasi
MPS IVB (Morquio B)		Galattosio				β -D-galattosidasi
MPS VI (Maroteaux-Lamy)		■				Ariolsolfatasi B
MPS VII (Sly)	■	■	■			β -D-glucuronidasi
MPS IX					■	Ialuronidasi

Tabella 2 - Elenco delle forme di MPS ed alcune caratteristiche.

Le Mucopolisaccaridosi sono patologie rare per cui i dati epidemiologici disponibili sono abbastanza scarsi. I numeri dei casi diagnosticati tra i nati vivi in uno specifico periodo e in una data area geografica sono stati presentati da Lowry per tutte le Mucopolisaccaridosi presenti in Canada tra gli anni 1952-1986 (15) e da Nelson tra gli anni 1958-1985 in Irlanda del Nord (15). Si pensa siano tuttavia dei dati sottostimati a causa dell'incompletezza relativa agli accertamenti. L'incidenza apparente dei casi di Mucopolisaccaridosi IH e Mucopolisaccaridosi II ha subito una precipitosa caduta dopo il 1972, dovuta in parte allo sviluppo di test biochimici accurati per la diagnosi prenatale. È interessante notare che ci sono notevoli differenze nelle frequenze delle diverse Mucopolisaccaridosi all'interno di una stessa popolazione. Infatti la Mucopolisaccaridosi II è più comune in Israele, la Mucopolisaccaridosi IV in Irlanda del Nord, la

Sindrome di Sanfilippo tipo B ha una prevalenza maggiore in Grecia mentre il tipo A in Inghilterra. La bassa incidenza della MPS VII è solo apparente perché può essere legata alla frequente letalità fetale e neonatale.



Figura 12 – Neonato affetto da Mucopolisaccaridosi di tipo VII o Sindrome di Sly.

La trasmissione di suddette patologie è di tipo autosomico recessivo. Fa eccezione la Mucopolisaccaridosi II che è legata al cromosoma X. Sebbene la situazione sia piuttosto diversa per ciascuna Mucopolisaccaridosi, possono essere fatte alcune generalizzazioni. Le mutazioni che determinano l'insorgenza di ciascun tipo di MPS sono molto eterogenee, ma uno o più alleli mutanti possono essere predominanti in specifiche popolazioni. Sono soprattutto mutazioni puntiformi o piccole modificazioni nel gene anche se è frequente osservare arrangiamenti del DNA e delezioni anche estese come accade nella MPS II. Alcune mutazioni possono essere chiaramente classificate come nulle in quanto determinano inattività enzimatica. Queste comprendono gravi variazioni del DNA tipo "frameshifts", mutazioni in regioni "consensus splice site" e codoni non senso. Comunemente si prevede che due alleli non senso, o uno solo nel caso della Mucopolisaccaridosi II, determinino la forma grave della malattia. In

numerosi casi è verificata invece la presenza di una forma più lieve poiché uno dei due alleli garantisce ancora un'attività enzimatica residua (16). Ne consegue che la correlazione tra la gravità della malattia e il genotipo è talvolta possibile, ma è generalmente difficile predire l'effetto di singole mutazioni nonsense. L'effetto clinico delle mutazioni nonsense può essere generalmente predetto solamente sulla base di esperienze precedenti riguardanti quelle specifiche mutazioni (16).

I pazienti affetti da MPS secretano ingenti quantitativi di GAGs attraverso la quotidiana minzione e questo, in associazione col dosaggio dell'attività enzimatica nei leucociti o nei fibroblasti, costituisce a tutt'oggi il metodo diagnostico più comune. La costruzione di metodiche rapide, economiche e non invasive creerebbe i presupposti per uno screening neonatale di routine efficace. L'importanza di una diagnosi estremamente precoce e asintomatica è correlata alla possibilità di intervenire con terapie tanto più efficaci quanto prima applicate come nel caso della terapia enzimatica sostitutiva o ERT (Enzyme Replacement Therapy). Quanto concerne la diagnosi sarà trattato in modo più esteso nelle prossime pagine proprio perché è uno degli argomenti discussi in questa tesi.

2.3.1 Sintomatologia

Nelle pagine successive sono riportati i comuni sintomi legati all'insorgenza di MPS. È importante comprendere che la gravità fenotipica della patologia è estremamente variabile anche all'interno della stessa forma genetica.

❖ Idrocefalo

Nei pazienti affetti da mucopolisaccaridosi si osserva l'allargamento ventricolare, che può essere dovuto alla combinazione dell'atrofia corticale secondaria, alla degenerazione del sistema nervoso centrale e a un difetto nel riassorbimento del liquido cerebrospinale. Il difetto di riassorbimento di liquido cerebrospinale nei pazienti affetti da mucopolisaccaridosi è

presumibilmente dovuto alla sottigliezza delle meningi e alla disfunzione delle granulazioni di Pacchioni nei villi aracnoidali. L'idrocefalo comunicante che si ha nelle mucopolisaccaridosi è di solito lentamente progressivo, con sintomi clinici che sono difficilmente distinguibili dalla malattia neurologica primaria. Non sono comuni sintomi acuti, come il vomito o il papilledema associati all'idrocefalo. Sono spesso indicate procedure di derivazione per migliorare la qualità della vita. La TAC del cranio senza mezzo di contrasto rileva frequentemente un idrocefalo da lieve a grave soprattutto nelle Mucopolisaccaridosi I, II e III. Tutti i pazienti con allargamento ventricolare mostrano un ritardo mentale e il grado di allargamento è correlabile con la gravità del ritardo. Pazienti con TAC negativa e intelligenza conservata possono appartenere a due soli tipi di Mucopolisaccaridosi: Sindrome di Hurler/Scheie o Sindrome di Hunter in forma lieve. La derivazione ventricolo-peritoneale nei pazienti con idrocefalo da moderato a grave è generalmente palliativa. Non è noto il grado in cui l'idrocefalo contribuisca al deterioramento neurologico nei pazienti affetti da Mucopolisaccaridosi. Il riconoscimento dell'idrocefalo seguito da un drenaggio precoce può dare ottimi risultati. L'aumentata pressione del sistema nervoso centrale e il progressivo allargamento ventricolare possono essere indicazioni al drenaggio. L'allargamento ventricolare nei pazienti con malattia di Sanfilippo è probabilmente secondario ad atrofia corticale, ma in genere si pensa che un drenaggio non dia dei benefici. Tuttavia un recente studio ha indicato che questa procedura ha alleviato alcuni disturbi comportamentali estremi in pazienti con malattia di Sanfilippo.

❖ Apparato oculare

L'offuscamento corneale è comune nelle Mucopolisaccaridosi I, IV, VI, e VII, e può portare a una significativa compromissione della vista. Il trapianto di cornea non sempre fornisce risultati positivi soprattutto a lungo termine. I pazienti con un trapianto possono avere comunque un deficit

visivo per l'associazione di un interessamento della retina o del nervo ottico. Il glaucoma è una complicanza con una frequenza particolarmente rilevante in molti casi di MPS. La rete trabecolare è solitamente satura di glicosaminoglicani mentre la sclera e la cornea sono assottigliate. Nelle Mucopolisaccaridosi I, II, e III si ha solitamente una degenerazione retinica, che porta a una progressiva diminuzione della visione periferica e alla cecità in mancanza di luce. In molti casi i disturbi del sonno possono essere alleviati mediante una lampada notturna.

❖ Apparato uditivo

È molto frequente una sordità di origine sia meccanica sia neurosensoriale. Tale complicazione è stata attribuita a tre cause: le frequenti infezioni dell'orecchio medio, le deformazioni degli ossicini e una probabile anomalia dell'orecchio interno.

❖ Rigidità articolare

La rigidità articolare è un sintomo molto comune in tutte le Mucopolisaccaridosi eccetto che nella Sindrome di Morquio. In quest'ultimo caso si assiste invece a un'estesa lassità legamentosa. La limitazione del movimento e la rigidità articolare possono portare a una significativa perdita di funzione. L'anomala funzionalità articolare deriva probabilmente dalla combinazione della deformità delle metafisi con l'assottigliamento delle capsule articolari, dall'accumulo di glicosaminoglicani e dalla fibrosi. Esercizi di mobilizzazione sembrano offrire validi benefici nella preservazione della motilità articolare soprattutto se iniziati molto precocemente. Nel caso in cui s'instaurasse una limitazione significativa, non è più possibile regredire tale condizione mentre è consigliabile evitare un ulteriore peggioramento. Certamente sarebbe opportuno portare a termine ulteriori studi sui benefici della ginnastica riabilitativa e di mantenimento nell'ambito delle Mucopolisaccaridosi.

❖ Sindrome del tunnel carpale

La sindrome del tunnel carpale è una complicanza che compare più tardivamente e che si manifesta solo all'instaurarsi di una grave compromissione. L'alta incidenza del tunnel carpale e i minimi disturbi di diagnosi recati al paziente raccomandano l'esecuzione routinaria di elettromiografia e la valutazione della velocità di conduzione nervosa. La perdita di funzionalità del pollice dovuta alla sindrome del tunnel carpale può rappresentare un handicap significativo in combinazione con la displasia scheletrica in quanto può generarsi una diminuzione consistente della motilità della mano. La decompressione chirurgica del nervo mediano porta a una parziale o completa restituzione della motilità della mano. Ovviamente i risultati migliori sono direttamente proporzionali alla precocità con cui s'interviene sulla disfunzione.

❖ Broncopatia ostruttiva

Contribuiscono alla broncopatia ostruttiva una trachea assottigliata, corde vocali ispessite, un tessuto ridondante nelle vie aeree superiori e una lingua particolarmente allargata. Nei pazienti più gravi è comunemente presente un'ostruzione intermittente che può portare ad apnea del sonno. In questi casi la tracheotomia può generare un importante miglioramento sintomatico. In caso di estesa ostruzione delle vie aeree, ipersonnolenza diurna, respiro rumoroso, ipoventilazione alveolare e apnea ostruttiva del sonno, è possibile trattare il paziente con alta pressione positiva e continua e ossigeno supplementare. La tonsillectomia e l'adenoidectomia sono frequentemente eseguite nei pazienti per correggere la disfunzione della tuba di Eustacchio e per ridurre la broncocostrizione. Alcuni pazienti possono trarre beneficio dal trattamento delle lesioni tracheali mediante l'escissione con laser.

❖ Anestesia

I pazienti affetti da mucopolisaccaridosi presentano dei rischi anestesilogici maggiori rispetto al normale grado di pericolosità. Nella sindrome di Morquio, in particolare, ma anche nelle Mucopolisaccaridosi I,

II e IV, l'articolazione atlantoassiale è instabile, il che richiede di posizionare attentamente il paziente e di evitare l'iperestensione del collo. L'induzione dell'anestesia può essere difficoltosa per l'incapacità di mantenere un'adeguata ventilazione. La visualizzazione può essere limitata durante l'intubazione e può essere necessario un tubo endotracheale più piccolo. La ripresa dopo anestesia può essere lenta ed è comune l'ostruzione aerea postoperatoria. Sono stati riportati casi di morte come conseguenza di complicanze anestesologiche. I pazienti affetti da Mucopolisaccaridosi dovrebbero essere sottoposti ad anestesia generale esclusivamente in centri con esperienza anestesologica specifica in tali disturbi.

❖ Complicanze cardiovascolari

Nella maggior parte dei pazienti affetti da Mucopolisaccaridosi sono presenti segni clinici di patologia cardiaca. Valvulopatie, ispessimento miocardico, ipertensione sistemica e polmonare, restringimento delle arterie coronariche con ischemia o addirittura infarto contribuiscono allo scompenso cardiaco congestizio e a casi d'improvviso collasso cardiocircolatorio. Il restringimento dell'aorta addominale e delle arterie viscerali e renali contribuisce probabilmente allo sviluppo dell'ipertensione sistemica. L'insufficienza mitralica è il disturbo più frequente nella Mucopolisaccaridosi IH e nella forma grave della Mucopolisaccaridosi II, mentre la valvulopatia aortica è più probabile nelle Mucopolisaccaridosi IH/S, Mucopolisaccaridosi IS, Mucopolisaccaridosi IV e Mucopolisaccaridosi VI. Sono noti casi di sostituzione valvolare. Durante il trattamento dei pazienti è utile un esame del cuore eseguito ad intervalli regolari mediante ecocardiografo in modo tale da monitorare la funzione e la grandezza ventricolare. Nei pazienti affetti da mucopolisaccaridosi che presentino anomalie cardiache è consigliata la profilassi per l'endocardite.

❖ Compressione del midollo spinale

La compressione del midollo spinale si riscontra comunemente in pazienti affetti da Mucopolisaccaridosi IV, ma è stata descritta in tutte le Mucopolisaccaridosi, eccetto che nella Mucopolisaccaridosi III e nella Mucopolisaccaridosi IX. La compressione del midollo spinale può avvenire per la sublussazione legata all'instabilità dell'articolazione atlantoassiale e all'ipoplasia odontoide. La ridotta tolleranza all'esercizio può essere il sintomo più precoce di mielopatia cervicale. Al fine di ottimizzare il timing per intervenire chirurgicamente è raccomandata una risonanza nucleare magnetica della colonna cervicale al momento della diagnosi e a successivi intervalli regolari. L'intervento di stabilizzazione della colonna, mediante fusione posteriore dei pazienti con Mucopolisaccaridosi IV, può salvare loro la vita. Tuttavia, se la compressione del midollo spinale è grave e mostra anteriormente un significativo ammasso di tessuto molle, può essere necessaria anche una decompressione anteriore per via trans orale e solo in seguito procedere con la fusione posteriore. È comune nelle Mucopolisaccaridosi I, II e IV una progressiva compressione del midollo spinale con successiva mielopatia imputabile all'ispessimento della dura madre, ma può non essere riconosciuta prima dell'aggravamento della patologia.

In tutte le MPS è comune lo sviluppo progressivo di gibbo lombare o di cifosi, eccetto che nella Mucopolisaccaridosi III. La velocità di progressione e il grado della cifosi lombare sono comunque variabili. Le complicanze neurologiche non sono comuni perché la collocazione della deformità è normalmente sotto il tronco. La fusione posteriore è efficace nel bloccare la progressiva deformità spinale.

2.3.2 Diagnosi

La diagnosi delle MPS è un aspetto particolarmente delicato in quanto la precocità dell'intervento terapeutico è direttamente legato alla limitazione o all'arresto della progressione sintomatica della patologia.

La ricerca dei GAGs urinari è stata ed è tuttora il più comune metodo diagnostico disponibile soprattutto per un'indagine preliminare. Si opera mediante elettroforesi bidimensionale per la separazione dei GAGs e mediante DMB o blu di metilene per la loro quantificazione. Si tratta di metodi semplici e sensibili che non permettono però di discriminare tra i vari sottogruppi della patologia e, tantomeno, tra forme attenuate e forme gravi. La diagnosi esatta si ottiene attraverso il dosaggio enzimatico. Per la quantificazione degli enzimi idrolitici lisosomiali si opera alternativamente sul siero, sui leucociti o sui fibroblasti coltivati. Questa scelta è in parte legata al particolare enzima preso in considerazione e alle competenze cliniche e analitiche del personale di laboratorio.

L'analisi del DNA per identificare eventuali portatori sani è un efficace sistema di prevenzione. Poiché è presente una notevole eterogeneità genotipica, l'analisi dei portatori richiede la conoscenza degli alleli mutanti nell'albero genealogico familiare preso in considerazione.

La diagnosi prenatale è quotidianamente sostenuta con colture di cellule prelevate dal liquido amniotico o attraverso la biopsia dei villi coriali usando i medesimi saggi enzimatici impiegati colle colture di fibroblasti. Anche se efficaci, a causa dell'invasività non è possibile, purtroppo, escludere tutte le forme di rischio per il feto o per la madre.

Con l'eccezione della Mucopolisaccaridosi di tipo IV è possibile valutare anche la concentrazione di GAG radio-marcato nelle cellule in coltura, soprattutto quando è necessaria una conferma di risultati equivocabili e ottenuti con materiale non colturale.

Il prelievo di cellule dal liquido amniotico può essere utile per il dosaggio enzimatico dell'iduronatosolfatasi nella diagnosi prenatale della Sindrome di Hunter. La valutazione di queste analisi deve però tener conto di un eventuale contributo materno che potrebbe mascherare il deficit enzimatico del feto. Allo stesso modo è stato dimostrato che un deficit amniotico di β -

glucuronidasi può essere attribuibile a un feto affetto da Mucopolisaccaridosi di tipo VII e con idrope fetale.

Da notare che la quantificazione diretta dei glicosaminoglicani contenuti nel liquido amniotico è generalmente irrealizzabile e poco significativa.

2.3.3 Terapie

Solo recentemente sono state approntate terapie alternative al trapianto di midollo osseo, a sua volta efficace solo per talune forme di MPS quali la MPS I e la MPS VI. La possibilità di biosintetizzare enzimi mediante la tecnologia del DNA ricombinante ha, di fatto, aperto nuovi orizzonti nel trattamento delle Mucopolisaccaridosi. La sostituzione enzimatica è oggetto di numerosi e approfonditi studi; clinicamente è stato dimostrato un sostanziale rallentamento della progressione associata a una notevole riduzione dei GAGs contenuti nelle urine. Al contempo si manifesta una risposta anticorpale specifica contro la proteina ricombinante che tuttavia non modifica l'efficacia del trattamento perché promossa da anticorpi non neutralizzanti. Attualmente è in corso la sperimentazione su alcune forme di MPS tra cui la MPS di tipo I, di tipo II e di tipo VI (17; 18).

Nella figura sottostante è riportato un importante successo terapeutico operato su una coppia di fratelli. La terapia della sorella ha avuto inizio all'età di 5 anni non appena le fu diagnosticata la patologia. Il precedente è stato un ottimo "allarme diagnostico" per valutare precocemente lo stato di salute del fratello sin dalla nascita ed incominciare anzitempo la terapia. Do 60 mesi (porzione C e porzione D della figura) di ERT, per esteso terapia di sostituzione enzimatica, è assolutamente evidente la mancanza di manifestazioni fenotipiche nel bambino mentre permangono alcuni sintomi nella bambina, anche se è stata bloccata la progressione della patologia (19).

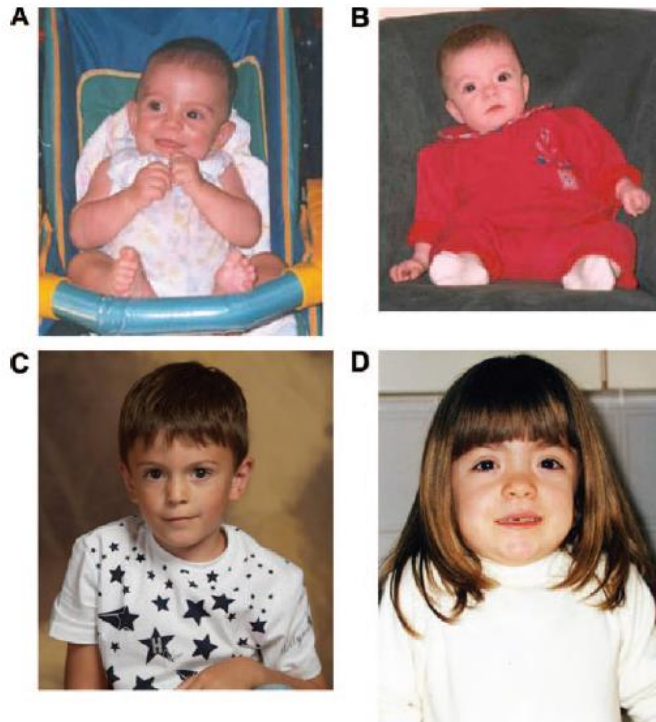


Figura 13 – Coppia di fratelli affetti da MPS di tipo I.

L'aspetto più dolente è quello economico. Le spese sostenute per sottoporre a ERT un paziente di circa 30 kg sono stimate in circa 300.000 euro annui. Un tentativo di ridurre questi costi è attualmente in corso d'opera presso l'Università di Pavia, dove si valuta una terapia alternativa basata sulla sostituzione enzimatica endogena. Tale pratica si basa sull'impianto di capsule contenenti cellule ingegnerizzate capaci di sovra-esprimere l'enzima difettivo. In altre sperimentazioni, come presso l'Università Federico II di Napoli ma non solo, si sta valutando la possibilità di impiegare vettori lentivirali come agenti di trasfezione genica. Tali pratiche rappresentano l'ultima frontiera della terapia genica e per ora si stanno ottenendo risultati sperimentali molto promettenti su animali modello.

2.4 METODI ANALITICI

In letteratura è disponibile un'ampia varietà di metodiche per la determinazione quali-quantitativa dei glicosaminoglicani. Cronologicamente gli studi più datati sono incentrati su tecniche elettroforetiche classiche. In seguito è stato introdotto l'uso della HPLC in UV o, ancora meglio, in fluorescenza. Per ultimo sta avendo un importante successo l'applicazione della spettrometria di massa.

L'obiettivo di questo corso di Dottorato è stato quello di sviluppare metodi analitici alternativi per la diagnosi asintomatica di MPS in termini di forma e anche di gravità della futura manifestazione fenotipica.

Il primo dei due metodi sviluppati è relativo al contenuto urinario di GAGs ed è stato possibile grazie allo sfruttamento delle potenzialità dell'Elettroforesi Capillare (HPCE). E' noto che l'accumulo tissutale di GAGs patologici si traduce in un arricchimento del loro contenuto a livello urinario.

Il secondo è invece incentrato sul contenuto di Galattosaminoglicani (CS e DS) a livello plasmatico. Recentemente è stato dimostrato che indipendentemente dalla forma di MPS in esame, l'accumulo primario MPS-specifico comporta l'accumulo secondario di altri tipi di GAGs. Abbiamo dunque ipotizzato e verificato la possibilità di utilizzare un unico test quantitativo specifico per il contenuto di DS-CS plasmatico in modo tale da diagnosticare qualsiasi forma di MPS.

2.4.1 Classici

La "fluorophore assisted carbohydrate electrophoresis" o, più comunemente, FACE è stata ed è tuttora una metodica molto comune per l'analisi dei GAGs perché permette la separazione elettroforetica dei disaccaridi insaturi fluoromarcanti ottenuti per digestione enzimatica o chimica dei polisaccaridi. Il trattamento del campione prevede una digestione con condroitinasi ABC e

la derivatizzazione dei disaccaridi con AMAC. Mediante un transilluminatore è possibile visualizzare in modo quantitativo le bande corrispondenti ai disaccaridi caricati in elettroforesi (20; 21).

Altre tecniche sono basate invece sulla cromatografia. Tra queste assume particolare rilevanza quella di ripartizione e quella ad esclusione dimensionale (22). La possibilità di avere un detector di fluorescenza rende queste metodiche molto sensibili fino a poche decine di femtogrammi.

Per quanto riguarda il caso specifico delle Mucopolisaccaridosi è necessario fare distinzione tra test preliminare e diagnosi clinica accurata. Il test preliminare è appunto un esame a basso costo che permette di quantificare indicativamente i GAGs contenuti nel plasma o nelle urine. Attualmente è in uso il test spettrofotometrico con DMB o blu dimetilmetilene ideato alla fine degli anni '80 (23) e perfezionato negli anni successivi (24). In breve si tratta di prelevare un'aliquota di urine compresa tra 100 e 250 μ l (secondo la presunta concentrazione di GAGs), aggiungere 2,50 ml di soluzione di DMB e infine leggere allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 520 nm.

La semplicità di questo test non è però accompagnata da alcuna informazione di natura qualitativa per cui, per identificare la forma patologica in esame, è necessario completare la diagnosi con il dosaggio enzimatico di tutti gli enzimi catabolici interessati generalmente estratti da colture di fibroblasti. Questo sistema permette dunque l'identificazione esatta della patologia ereditata e consente quindi di intraprendere, quando possibile, la terapia di sostituzione enzimatica adeguata. Un problema ancora irrisolto è l'impossibilità di discriminare tra la manifestazione fenotipica in forma lieve o in forma grave.

2.4.2 Avanzati

Oggigiorno la rapida diffusione della spettrometria di massa ha reso possibile l'ideazione di protocolli analitici rapidi e sensibili. In letteratura si

trovano numerosi studi che fanno affidamento sulle capacità analitiche della tandem massa anche applicate al caso specifico delle Mucopolisaccaridosi. La maggioranza di queste è spesso accoppiata a una fase separativa in HPLC. Questi sistemi analitici multidimensionali permettono una quantificazione diretta ed una caratterizzazione strutturale dei GAGs plasmatici e urinari: recenti studi hanno fornito la sequenza dei polisaccaridi aprendo la strada verso nuove prospettive di ricerca (25; 26). Effettivamente la variabilità strutturale è correlata a un ampio ventaglio di funzioni biologiche tessuto-specifiche la cui conoscenza deve essere propedeutica alla struttura molecolare del polimero.

Per contro è necessario compiere investimenti ingenti per l'acquisto dello spettrometro di massa e anche i costi di esercizio non possono essere considerati come trascurabili.

3. STRUMENTAZIONE

3.1 CROMATOGRAFIA LIQUIDA - HPLC

Fin dai primi momenti dello sviluppo della cromatografia liquida, gli scienziati compresero che era possibile aumentare l'efficienza della colonna diminuendo le dimensioni delle particelle di riempimento. Non fu prima degli anni '60, comunque, che poté essere sviluppata la tecnologia per produrre e usare riempimenti con dimensioni comprese tra 3 e 10 μm . Questa tecnologia richiede strumenti sofisticati che sono in contrasto con la semplicità delle tradizionali colonne di vetro per cromatografia liquida. Il nome cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) distingue questa nuova tecnica dai metodi tradizionali ancora in uso per scopi preparativi.

L'elenco seguente è costituito dai cinque tipi di HPLC più usati:

- cromatografia di ripartizione o cromatografia liquido-liquido;
- cromatografia di adsorbimento o cromatografia solido-liquido;
- cromatografia a scambio ionico;
- cromatografia di permeazione gel;
- cromatografia di gel-filtrazione.

Nella moderna cromatografia liquida, dove si applicano colonne impaccate con particelle di diametro variabile dai 3 ai 10 μm , sono richieste pressioni di pompaggio di diverse centinaia di atmosfere per raggiungere velocità di flusso sufficienti a permettere una buona separazione. La conseguenza principale è che l'equipaggiamento di una moderna apparecchiatura per HPLC è notevolmente più costoso rispetto a quello della cromatografia classica. La figura 7 mostra gli elementi più importanti di un tipico strumento per HPLC.

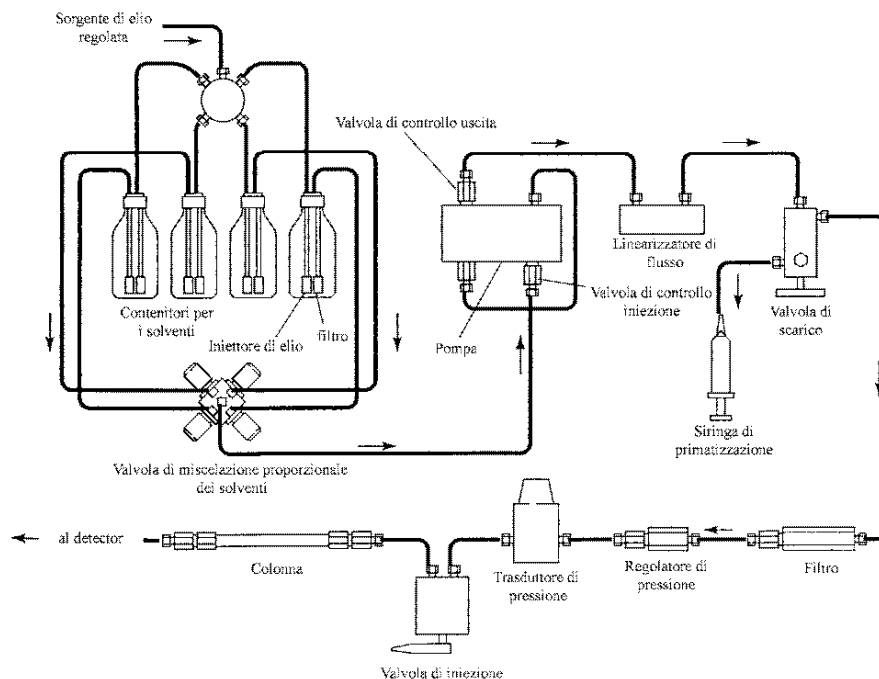


Figura 14 - Schema di un HPLC.

Nell'ultimo decennio si è lavorato intensamente al miglioramento tecnico della tecnologia di base della HPLC in modo tale da superarne i limiti intrinseci. I risultati di questi sforzi sono sfociati recentemente nello sviluppo della UPLC ovvero dell'Ultra Pressure Liquid Chromatography.

La cromatografia liquida UP fornisce risultati a maggior risoluzione e in un tempo più breve rispetto alla HPLC. Le minor dimensioni delle colonne determinano un minor consumo di solventi e quindi un costo di esercizio minore. Queste caratteristiche dipendono in larga misura dalle nuove tecniche di riempimento delle colonne che permettono un impaccamento altamente regolare e con particelle anche al di sotto dei 2 micrometri. Da aggiungere inoltre l'impiego di pompe capaci di raggiungere pressioni anche di 1000 bar contro i circa 200 bar applicate in HPLC.

Nelle figure sottostanti è possibile confrontare le caratteristiche cromatografiche di entrambe le tecniche. La separazione HPLC e UPLC è ottimizzata per acetaminofene, caffeina, 7-idrossicumarina e cumarina; la

risoluzione UPLC è stata determinata utilizzando i picchi dell'acetaminofene e della caffeina.

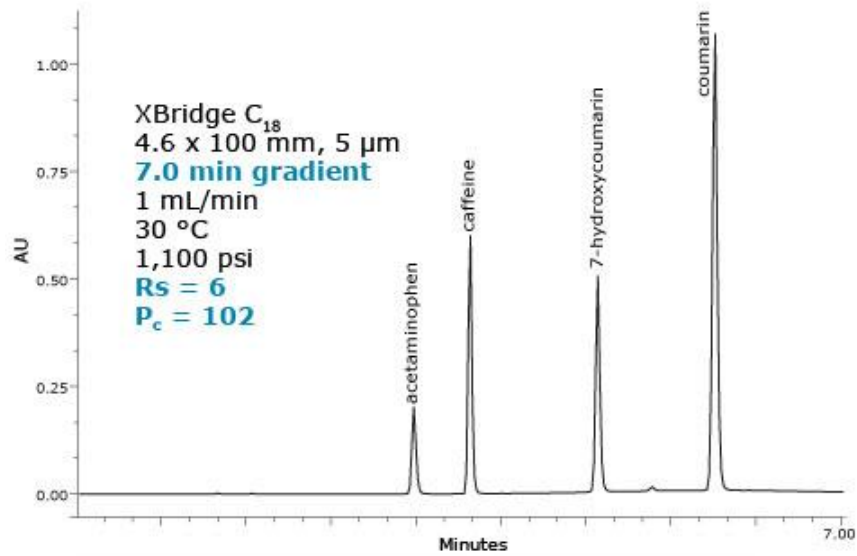


Figura 15 - Analisi in HPLC.

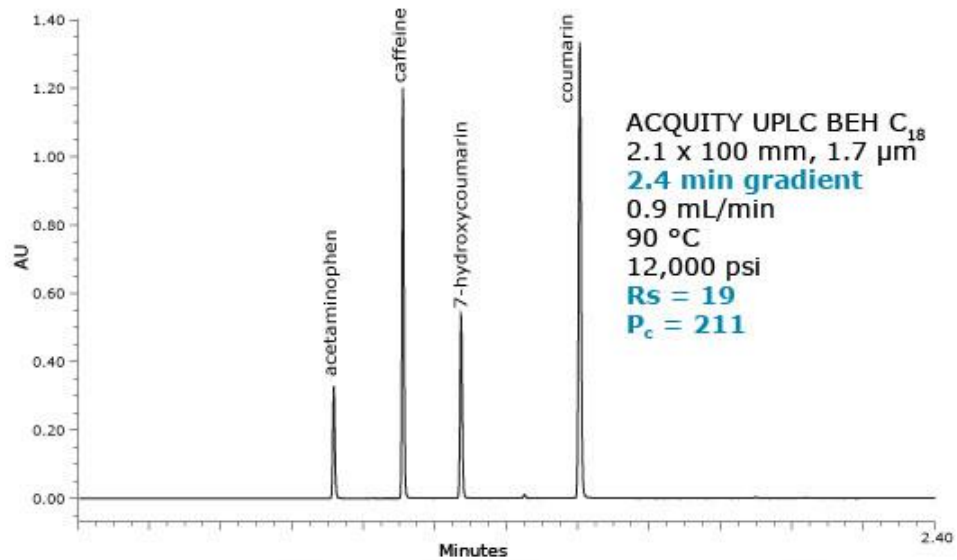


Figura 16 - Analisi in UPLC.

È degna di nota la differenza nei tempi di ritenzione. Inoltre il sistema UPLC offre una risoluzione e una sensibilità maggiori incrementando contemporaneamente la produttività con l'utilizzo di temperature elevate.

3.1.1 Rivelatori per HPLC

I rivelatori per cromatografia liquida possono essere raggruppati in due categorie. I rivelatori delle proprietà di massa rispondono a caratteristiche fisiche globali della fase mobile, come l'indice di rifrazione, la costante dielettrica e la densità, cioè proprietà influenzate dalla presenza del soluto. La categoria rappresentata dai rivelatori delle proprietà del soluto risponde solo ad alcune proprietà specifiche dello stesso, quali l'assorbanza UV, la fluorescenza e la corrente di diffusione, proprietà che non sono possedute dalla fase mobile.

Nell'elenco sottostante sono riportati alcuni dei più comuni rivelatori per HPLC.

<u>Rivelatori per LC</u>	<u>LOD</u> (limit of detection)
Assorbanza	1 pg
Fluorescenza	10 fg
Elettrochimici	100 fg
Indice di rifrazione	10 ng
Conducibilità	500 pg
Spettrometria di massa	1 pg
FT-IR	100 ng
Diffusione luminosa	500 ng
Attività ottica	1 ng
Fotoionizzazione	1 pg
Selettivo per elementi	10 ng

Questo lavoro di tesi è in parte stato eseguito attraverso l'uso di HPLC con rivelatore a fluorescenza per cui è mia intenzione descrivere brevemente quest'ultimo. I rivelatori a fluorescenza presentano il vantaggio di una maggiore sensibilità rispetto ai metodi ad assorbanza in UV, di solito

superiore anche di un paio d'ordini di grandezza. Hanno però lo svantaggio di un minore campo di applicabilità, dato che il numero delle specie assorbenti è notevolmente superiore rispetto a quelle fluorescenti. Si possono comunque usare rivelatori a fluorescenza anche con analiti non fluorescenti previa derivatizzazione ed è questo il caso. Infatti, l'uso di acido antranilico come derivatizzante fluorescente ha permesso di rendere rilevabili le esosamine sia in fluorescenza e sia in assorbanza. La fluorescenza è osservata attraverso un detector fotoelettrico posto a 90° rispetto alla sorgente di eccitazione che di solito è una lampada a mercurio. In strumenti più sofisticati si usano lampade allo xeno e reticoli di diffrazione che assicurano una miglior monocromaticità della radiazione fluorescente.

Degno di nota è anche il sempre più ampio impiego della spettrometria di massa come rivelatore per la cromatografia liquida. Solo con lo sviluppo d'interfacce idonee è stato possibile risolvere il problema legato alla grande quantità di eluato proveniente dalla colonna che mal si conciliava con la necessità del vuoto spinto indispensabile nelle analisi con spettrometro di massa.

Nella ionizzazione electrospray o ESI, la fase mobile proveniente dalla colonna è introdotta in un capillare di conduzione mantenuto a un potenziale compreso tra 2,5 e 5 kV rispetto a un controlettrodo posto all'entrata dell'analizzatore. All'estremità dell'ago l'eluato è nebulizzato a causa del campo elettrico e le goccioline formatesi assumono una carica superficiale della stessa polarità della carica dell'ago. Durante la loro breve migrazione in direzione del controlettrodo avvengono l'evaporazione del solvente e un conseguente aumento della densità di carica superficiale, che favorisce la disgregazione delle goccioline in goccioline sempre più piccole. Questa evaporazione continua fino a generare uno ione molecolare multicarica che entra nell'analizzatore. Questo sistema di ionizzazione è particolarmente adatto a molecole biologiche perché rende possibile l'analisi di pesi

molecolari molto elevati. Per contro non fornisce informazioni strutturali perché la frammentazione è quasi assente tanto che prende il nome di ionizzazione soft.

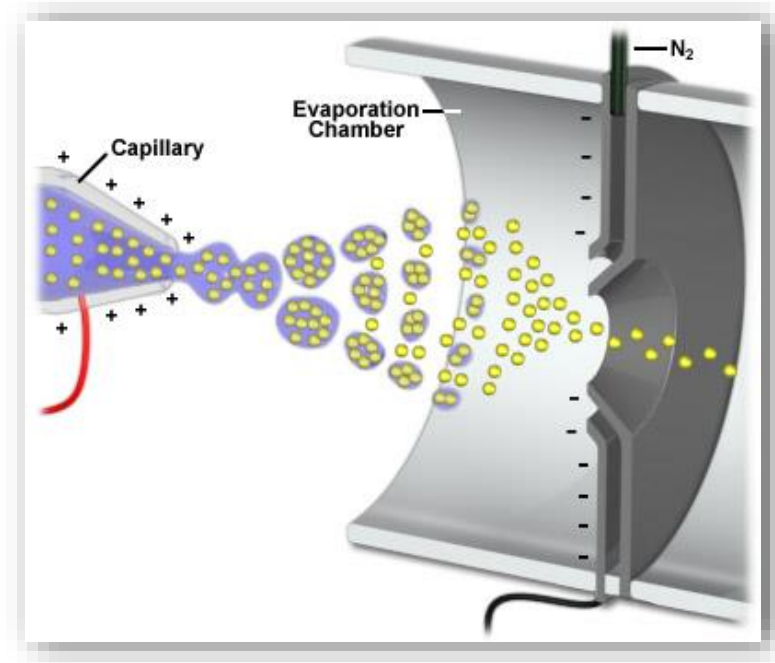


Figura 17 - Sorgente ESI.

L'altro metodo di ionizzazione molto impiegato per molecole biologiche è il MALDI o Matrix Assisted Laser Desorption Ionization. La tecnica è particolarmente adatta a biomolecole termolabili a elevato peso molecolare. È una ionizzazione soft che generalmente provoca la formazione dello ione monovalente e inoltre, regolando finemente l'intensità della radiazione elettromagnetica incidente, permette di ottenere alcune informazioni strutturali a causa di una frammentazione a bassa efficienza post sorgente più precisamente nota come post source decay o PSD. Il desorbimento è generato da una radiazione laser che incide su una miscela di analita e di matrice in proporzioni comprese tra 1:1000 e 1:10000. Le matrici più comunemente impiegate sono l'acido sinapico, l'acido 2,5-diidrossibenzoico e il glicerolo; svolgono il ruolo di isolare spazialmente le molecole di analita per evitare la formazione di aggregati ionici e,

soprattutto, agiscono da mediatori energetici assorbendo l'energia incidente e rilasciandola alle molecole di analita che quindi ionizzano all'interno della nuvola gassosa desorbita. Il processo di ionizzazione è tuttora incerto e poco conosciuto ma fornisce ioni mono-carica ad alte rese che proseguono il loro percorso verso l'ingresso dell'analizzatore.

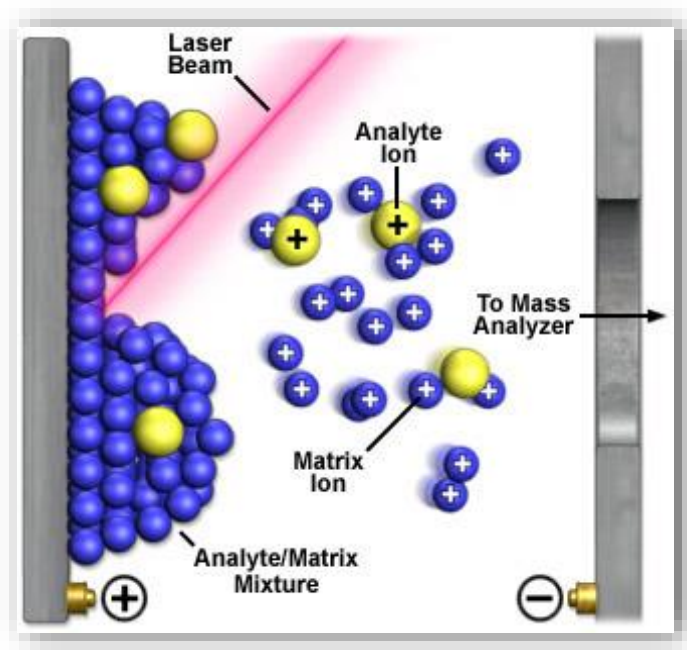


Figura 18 - Sorgente MALDI.

Questo tipo di sorgente ben si adatta ad analizzatori a tempo di volo TOF perché, essendo discontinuo, non richiede il disaccoppiamento tra sorgente e analizzatore. Tale condizione è invece necessaria ad esempio con sistemi ESI-TOF giacché sorgente continua.

3.1.2 Configurazione strumentale

L'HPLC è stato in un primo momento impiegato solo per confermare i dati ottenuti tramite CE. La parte di ricerca basata sulla determinazione del contenuto plasmatico di GAGs è invece stata possibile grazie esclusivamente all'applicazione di questa tecnica cromatografica.

In particolare è stato sfruttato il principio della derivatizzazione post-colonna. In questa configurazione il passaggio di separazione degli analiti che avviene in colonna precede il legame degli stessi a un fluoroforo e prende appunto il nome di derivatizzazione post-colonna. Strumentalmente questo è possibile tramite l'utilizzo di una camera di reazione termostata a valle della colonna in cui gli analiti eluiti dalla colonna stessa proseguono la propria corsa mescolandosi con una soluzione opportuna in modo tale da promuovere il legame analita-derivatizzante. I prodotti della derivatizzazione proseguono dunque al rivelatore fornendo un segnale quantitativo.

L'HPLC utilizzato è marchiato JASCO e consta dei seguenti elementi:

- pompa PU-1580;
- pompa PU-2080 PLUS per buffer derivatizzante (1% 2-cianoacetamide e 100 mM sodio tetraborato);
- camera di reazione termostata a 136°C;
- rivelatore in fluorescenza FP-1520 (EX 331 nm, EM 383 nm);
- iniettore Rheodyne con loop da 20 µl.

3.2 ELETTROFORESI CAPILLARE – CE

L'elettroforesi capillare, pur essendo strumentalmente simile alla HPLC, si fonda sui principi che governano tutte le tecniche elettroforetiche. Più concretamente si definisce come un'elettromigrazione di sostanze cariche all'interno di un capillare per imposizione di un campo elettrico tra le due estremità. Lo strumento è quindi costituito da un generatore di voltaggio, da una colonna di silice fusa con diametro variabile tra 25 e 100 micron e

lunghezza compresa tra 50 e 100 cm, da un rivelatore e da due serbatoi di conduzione.

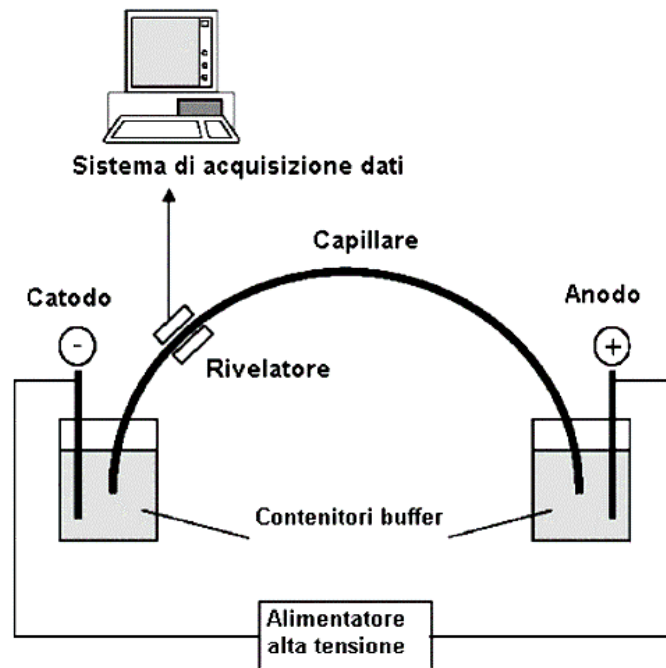


Figura 19 - Sistema CE.

Il caricamento del campione è realizzato all'anodo o al catodo e può avvenire in modo elettrostatico o per applicazione di una pressione idrostatica. L'intero campione è trascinato verso il catodo indipendentemente dalla carica a causa di un fenomeno fisico che prende il nome di flusso elettrosmotico. A pH maggiore di 3 i gruppi silanolic della superficie interna del capillare mostrano proprietà acide tali da richiamare i cationi del buffer. Questo strato di ioni a elevata mobilità è a sua volta spinto verso il catodo dall'azione del campo elettrico determinando il trascinarsi delle molecole di solvatazione e degli analiti. Molecole di analiti cariche positivamente avranno una velocità di migrazione ancora maggiore rispetto a quella del flusso elettrosmotico a causa della forza attrattiva esercitata dal catodo. Allo stesso modo le molecole cariche negativamente subiranno una leggera repulsione assumendo una velocità di migrazione inferiore. Molecole neutre si muoveranno logicamente alla

stessa velocità del flusso elettrosmotico. La mobilità o velocità elettroforetica è matematicamente espressa da:

$$v = \frac{qE}{6\pi r\eta}$$

A numeratore è espressa la forza di richiamo del catodo direttamente proporzionale alla carica q mentre a denominatore abbiamo la forza frenante legata al raggio molecolare e alla viscosità del mezzo. Considerando che E , η e π sono costanti per tutte le particelle sottoposte allo stesso campo elettrico e allo stesso tampone allora:

$$v = \frac{q}{r}$$

Da questo si deduce che la velocità elettroforetica dipende dal rapporto tra la carica e il raggio molecolare. Il raggio molecolare è proporzionale al peso molecolare per cui si può parlare di rapporto massa/carica.

L'efficienza separativa dipende da alcune variabili che possono influenzare il flusso elettrosmotico; l'ottimizzazione della tecnica deve essere valutata in funzione del pH del tampone, della forza ionica, dell'intensità del campo elettrico e della temperatura.

Il principale vantaggio della CE è che il fronte del flusso non è iperbolico, come nel caso di un flusso idrodinamico laminare, bensì quasi piatto determinando un aumento del potere risolutivo.



Figura 20 - A sinistra il fronte del flusso elettrosmotico; a destra quello laminare.

Inoltre è possibile applicare voltaggi molto più elevati rispetto alle tradizionali tecniche elettroforetiche perché l'elevato rapporto superficie/volume rende possibile una dissipazione di calore molto più efficiente limitando i fenomeni diffusivi tipici e la possibile degradazione termica di analiti termolabili. Da aggiungere che in molti casi la colonna capillare è all'interno di una camera o cartuccia termostata con un opportuno refrigerante.

Confrontando la CE con la HPLC si possono fare alcune considerazioni molto importanti. Le tecniche CE sono caratterizzate da alta efficienza, mediamente più elevata rispetto a quella ottenibile in HPLC, correlata a un numero di piatti teorici N molto elevato. Inoltre presenta un costo di esercizio sicuramente inferiore poiché i volumi di tampone sono molto contenuti.

La risposta del rivelatore UV o in fluorescenza è presentata in forma di elettroferogramma mettendo in relazione la risposta del rivelatore in funzione del tempo di migrazione.

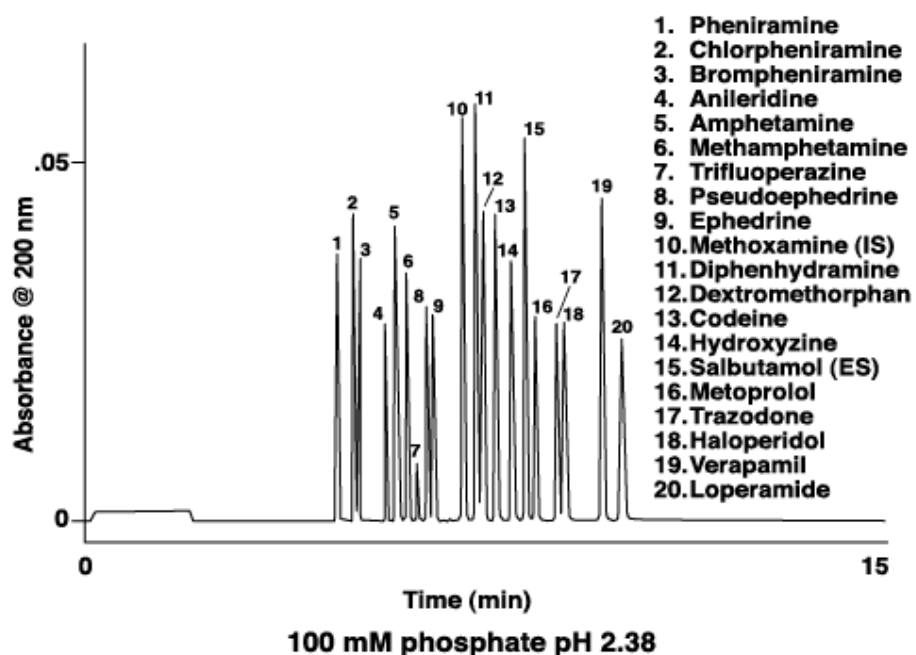


Figura 21 - Elettroferogramma di alcuni principi farmacologici.

La figura riportata nella pagina seguente mostra un tipico esempio di elettroferogramma concernente lo studio discusso in questa tesi.

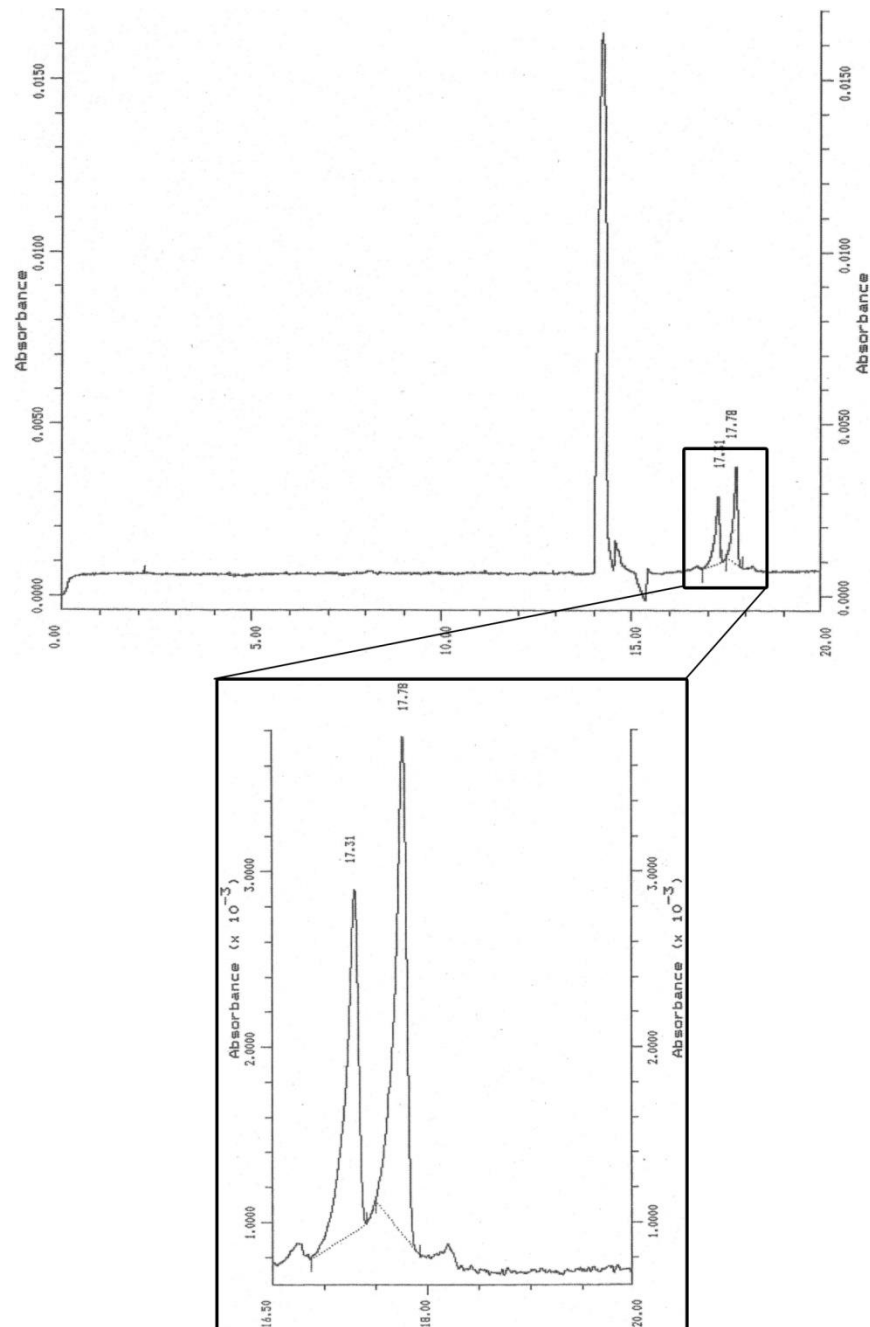


Figura 22 - Elettroferogramma di campione patologico.

3.2.1 Rivelatori per CE

I rivelatori per elettroforesi capillare possono essere quelli comunemente impiegati in HPLC. Recentemente sono stati sviluppati anche sistemi CE-MS molto all'avanguardia in grado di accoppiare l'efficienza separativa della CE con la sensibilità e l'accuratezza della spettrometria di massa. Nel lavoro di ricerca descritto in queste pagine, è stato largamente impiegato un semplice rivelatore d'assorbanza UV; l'economicità è controbilanciata da una bassa sensibilità, se confrontata con i rivelatori a fluorescenza. Quanto appena affermato non pregiudica in nessun modo la capacità di quantificare, accuratamente, quantitativi di esosamine fino a concentrazioni di pochi μg per ml di urina.

3.2.2 Configurazione strumentale

Le analisi sperimentali sono state eseguite mediante una HPCE Beckman P/ACE 5000 equipaggiata con un rilevatore a UV settato a 214 nm. La colonna capillare è di silice fusa e con un diametro interno di 50 μm ; presenta una lunghezza totale di 85 cm, 65 cm è la distanza tra il punto di iniezione e la finestra di misurazione. Le corse elettroforetiche sono eseguite in polarità normale, con una tensione di 15 kV e circa 60 μA (condizioni applicate fino al 2011).

Recentemente sono state eseguite importanti modifiche al fine di migliorare la tecnica elettroforetica. Per completezza di informazione è opportuno riportare che attualmente si utilizza un capillare da 80 cm con un diametro di 75 μm e un buffer di corsa leggermente diverso rispetto a quanto riportato inizialmente nella sezione 4.1. Inoltre si applica una tensione di circa 20 kV. Un esempio del grado di separazione ottenibile con questa nuova configurazione è riportato in figura 39.

Mediante l'equazione di Poiseuille e considerando un tempo di iniezione di 5 secondi, il volume di iniezione stimato è di 30 nl.

PROTOCOLLO OPERATIVO

3.3 GAGs URINARI

Contemporaneamente allo sviluppo del metodo qui proposto è stato applicato un metodo elettroforetico più classico al fine di fornire una valutazione qualitativa e quantitativa del contenuto urinario di GAGs ad elevato peso molecolare. Anche in questo caso l'obiettivo è stato quello di generare un metodo adeguato ad una diagnosi precoce della patologia. Una breve descrizione di questa tecnica è presentata nella parte conclusiva di questo capitolo.

In questa prima parte è descritto dettagliatamente il protocollo di derivatizzazione con acido antranilico per l'analisi in CE e HPLC del contenuto di GAGs urinari. La prima parte descrive il protocollo "grezzo", a seguire la sezione dedicata all'ottimizzazione di tutte le variabili, come pH e T, al fine di ottenere una derivatizzazione ad alta resa e un elettroferogramma privo di contaminanti. Infine è riportato il protocollo definitivo.

Il primo tra gli argomenti principali trattati in questo dottorato di ricerca è rappresentato dal protocollo descritto nella tabella ivi riportata e proposto nella sua versione non ancora ottimizzata. La formulazione di questo nuovo metodo è basata su due studi riguardanti l'applicazione della HPLC e della HPCE nella determinazione quantitativa di monosaccaridi in glicoproteine per uso farmacologico (27; 28).

1° step	Prelevare un'aliquota del volume di 600 µl di urine; centrifugare per 5 minuti a 10000 rpm; prelevare un'aliquota di 500 µl dal surnatante e liofilizzare.
2° step	<i>Degradazione acida</i> Aggiungere 200 µl di HCl 4M al liofilizzato e porre in stufa a 110°C per 1 ora; al termine raffreddare per pochi minuti in congelatore, aggiungere 2 ml di acqua e liofilizzare.
3° step	<i>Derivatizzazione</i> Riprendere il liofilizzato con 50 µl della soluzione I e con 50 µl della soluzione III; porre in bagno a 80°C per 1 ora; al termine raffreddare per pochi minuti in congelatore.
4° step	Aggiungere 150 ml di acqua e conservare in congelatore a -20°C; centrifugare 5 minuti a 10000 rpm prima di analizzare in CE mediante detector UV-VIS a 214 nm.

Tabella 3 - Protocollo operativo non ottimizzato

Soluzione I	Soluzione di acetato di sodio allo 0,1%
Soluzione II	120 mg di acetato di sodio e 100 mg di acido borico in 5 ml di metanolo
Soluzione III	30 mg di acido antranilico e 20 di sodio cianoboroidruo in 1 ml di soluzione II

Tabella 4 - Soluzioni impiegate per la derivatizzazione.

Dalle tabelle sopra riportate è intuitivo comprendere quale sia la semplicità manuale anche per persone non addette ai lavori o senza particolari qualifiche per l'esercizio in un laboratorio di analisi. Il primo step è essenzialmente un passaggio preparativo e, almeno in parte, di purificazione. Seguono quindi i due passaggi cardine del protocollo che sono la degradazione acida e la derivatizzazione delle esosamine con acido antranilico o, secondo la nomenclatura IUPAC, acido 2-aminobenzoico.

Strutturalmente è un amminoacido, ossia reca sulla propria molecola il gruppo funzionale amminico e carbossilico; non appartiene tuttavia alla serie degli amminoacidi costituenti le proteine.

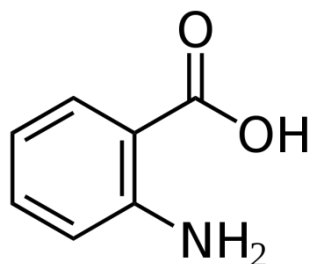


Figura 23 - Acido antranilico o acido 2-aminobenzoico.

Espluca la funzione di coenzima nella produzione del latte materno ed è per questo denominato, secondo la nomenclatura più obsoleta, anche come vitamina L. Le strutture delle esosamine d'interesse derivatizzabili sono rappresentate nella figura sottostante.

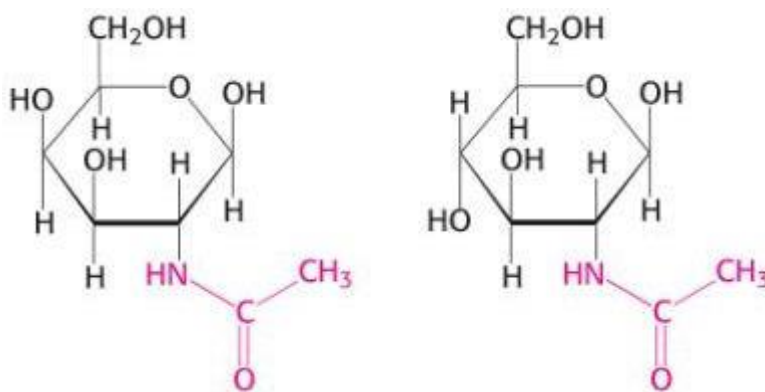


Figura 24 - A sinistra β -D-N-acetilgalattosamina; a destra α -D-N-acetilglucosamina.

Il prodotto derivato è ottenuto tramite una reazione di aminazione riduttiva: la base di Schiff, che rappresenta l'intermedio di reazione, è ridotta mediante NaBH_3CN generando un prodotto stabile. Il meccanismo di reazione è mostrato nella figura sottostante.

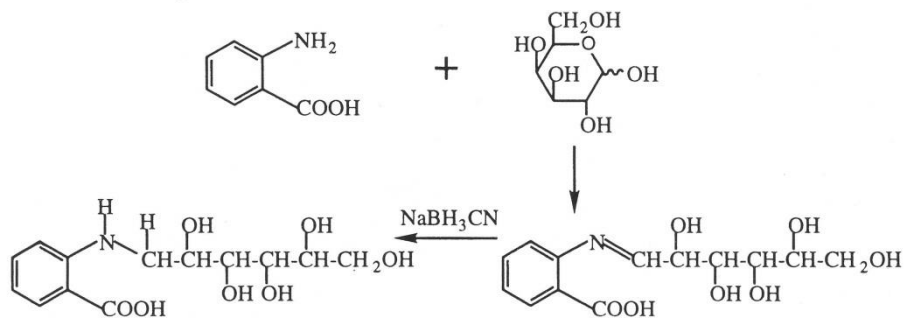


Figura 25 - Schema di reazione della derivatizzazione con acido antranilico.

Certamente la prima operazione è stata quella di associare correttamente ciascun picco alla relativa esosamina. Questo è stato possibile eseguendo prove con soluzioni standard mediante il metodo dello standard esterno e anche attraverso il metodo delle aggiunte. In tal modo è stato possibile rilevare che la galattosamina possiede un tempo di ritenzione inferiore rispetto alla glucosamina. Questo dato è importante poiché in HPLC il comportamento delle due esosamine è l'opposto com'è mostrato nella figura sottostante.

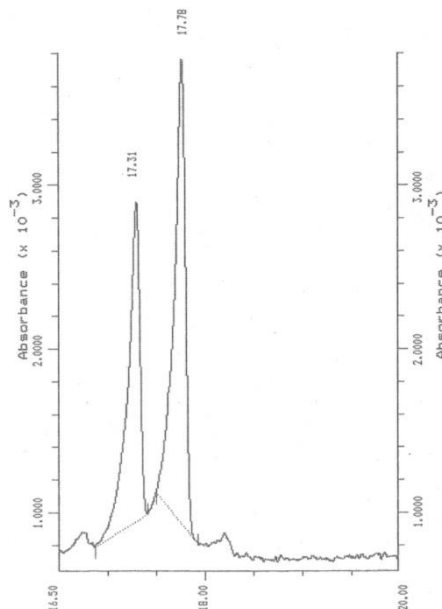


Figura 26 – Elettroferogramma: GalN a sinistra e GlcN a destra.

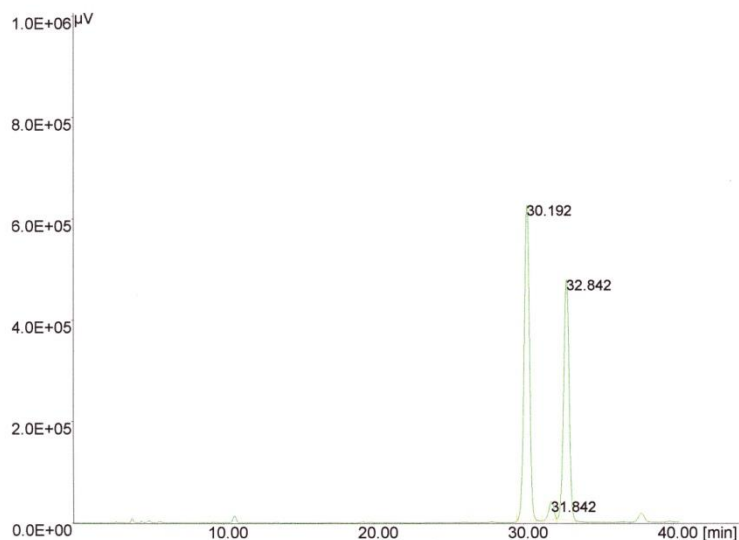


Figura 27 – Cromatogramma: GlcN a sinistra e GalN a destra.

La degradazione acida comporta la liberazione delle esosamine contenute nei polisaccaridi; avviene in due stadi e dipende dalla concentrazione dell'acido impiegato, dalla temperatura e dal tempo d'incubazione. Il primo passaggio prevede la degradazione del legame glicosidico e il secondo consiste nell'idrolisi del gruppo N-acetile con la liberazione delle esosamine. Si tratta di un passaggio di fondamentale importanza perché la quantità di esosamine liberate deve corrispondere quantitativamente alla quantità di GAGs contenuti nelle urine. Tempi d'incubazione eccessivamente lunghi porterebbero a una degradazione spinta dei monomeri con perdita di analita derivatizzabile; questo comporterebbe la possibilità di ottenere falsi negativi. Sui campioni di urine, ottenuti da soggetti affetti da MPS III, sono state eseguite le seguenti prove:

1	HCl 2M	60 minuti
2	HCl 2M	90 minuti
3	HCl 2M	120 minuti
4	HCl 4M	60 minuti
5	HCl 6M	60 minuti

Indipendentemente dal tempo si è notata una degradazione limitata nel caso dell'HCl 2M mentre una sostanziale invariabilità tra 4M e 6M con una risposta elettroforetica più intensa. Questo denota una capacità ottimale di degradazione già alla concentrazione 4M.

La degradazione mediata da HCl 4M è quindi valutata in funzione del tempo d'incubazione secondo l'elenco sottostante, includendo anche una prova di controllo senza l'impiego della stufa:

1	HCl 4M	120 minuti	4°C
2	HCl 4M	30 minuti	110°C
3	HCl 4M	60 minuti	110°C
4	HCl 4M	90 minuti	110°C
5	HCl 4M	120 minuti	110°C

Gli elettroferogrammi ottenuti suggeriscono che la concentrazione ottimale di HCl è di 4 mol/l con un tempo di incubazione di 120 minuti a 110°C. In queste condizioni è stato stimato un recupero di esosamine prossimo al 100% per i polisaccaridi e del 95% per i disaccaridi. Tale stima è stata calcolata sulla base di esperimenti eseguiti con soluzioni standard di CS, DS HS e relativi disaccaridi.

Il tipo di buffer elettroforetico, inizialmente rappresentato da una soluzione a pH7 di acido borico 150mM e di fosfato acido di sodio 50mM, è stato valutato sia in termini di acidità e sia di concentrazioni attraverso alcune diluizioni programmate. La scelta è poi caduta su una soluzione a pH7 di acido borico 75mM e di fosfato acido di sodio 50mM. In figura sono riportati gli elettroferogrammi di uno stesso campione patologico ottenuti con tre buffer a differente acidità: pH6 a sinistra, pH7 al centro e pH8 a destra; non sono raffigurati quelli ottenuti a pH5 e pH9.

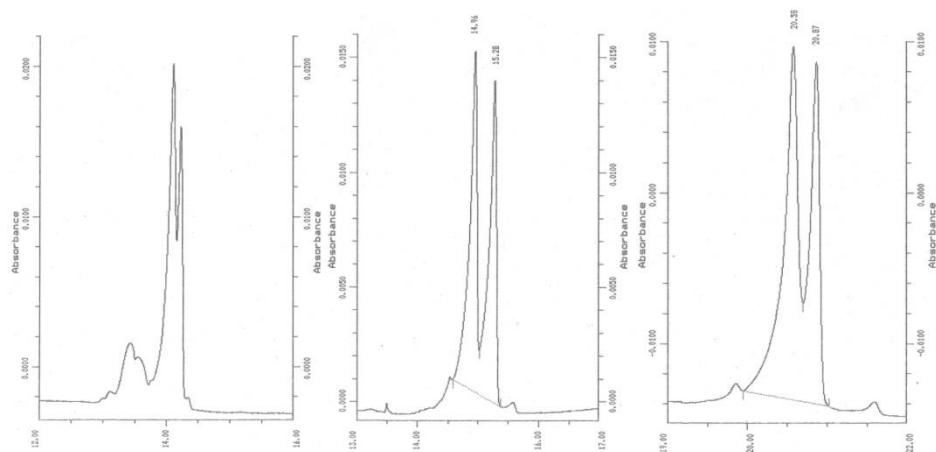


Figura 28 - Confronto tra buffer di corsa a pH6, pH7 e pH8.

Oltre alla variabilità dei tempi di ritenzione è da notare la differente capacità risolutiva dei picchi di galattosamina e di glucosamina; questa è massima a pH7 (condizioni applicate fino al 2011). Rispetto a quanto appena descritto, durante il corso di Dottorato, sono state apportate lievi correzioni al fine di migliorare la separazione delle esosamine e, inoltre, con l'intento di determinare qualitativamente e quantitativamente anche il contenuto di acidi uronici. Nella figura seguente è riportato un elettroferogramma dove è possibile osservare il miglioramento del grado di separazione di tutte le più comuni forme di esosamina.

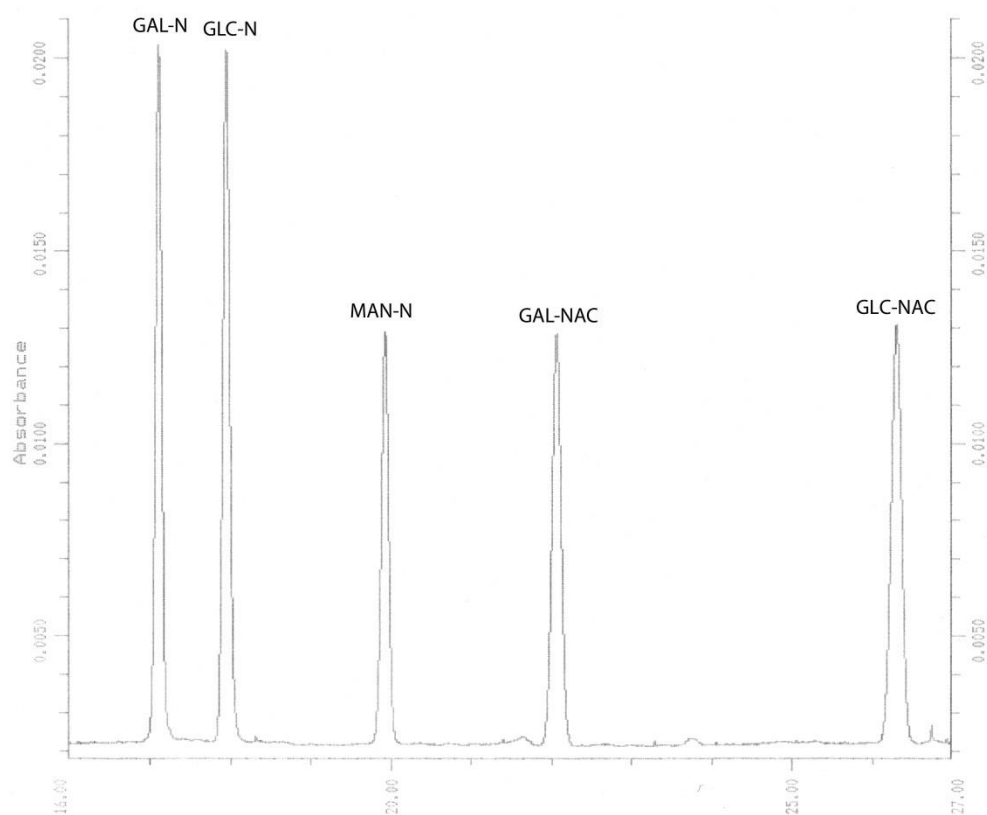


Figura 29 – Recente separazione HPCE di esosamine standard.

Questo grado di separazione è stato possibile grazie alla formulazione di un nuovo buffer così composto: acido bórico 200mM e fosfato acido di sodio 50mM, pH 8. Inoltre si è provveduto all'installazione di un capillare ad hoc di 80 cm con sezione di 75 μ m.

Il confronto tra la derivatizzazione di urine e la derivatizzazione di standard di esosamine ha mostrato che la presenza d'impurezze e contaminanti interferisce in qualche modo con la degradazione e/o la derivatizzazione. In questo senso si sono eseguite alcune prove aggiungendo un passaggio cromatografico di purificazione con AMBERLITE IRA-400. La soluzione più congeniale è stata però quella di introdurre uno step preliminare di precipitazione dei GAGs mediante etanolo saturo. Questo sistema permette di eliminare la prima liofilizzazione e ottenere un precipitato costituito da

polisaccaridi eliminando gran parte del contenuto urinario non desiderato e interferente. Inizialmente era previsto anche un passaggio di essiccazione del precipitato a 40°C subito tralasciato: in qualche modo si generava una parziale e imprevedibile degradazione termica, forse a causa della mancanza di umidità, traducibile in una perdita di accuratezza e precisione del metodo.

Per quanto riguarda il passaggio di derivatizzazione è stato variato solo il volume delle soluzioni I e III impiegate. Per evitare un effetto diluizione è stato anche eliminato il volume di acqua aggiunto alla fine del protocollo; questo ha permesso di ottenere segnali più intensi anche nell'analisi dei controlli dove il contenuto in esosamine è inferiore. Il tempo di derivatizzazione può però essere ridotto perché si ha completa derivatizzazione già dopo 20 minuti d'incubazione. A questo comportamento fa eccezione la N-acetil-lattosamina che richiede un'ora d'incubazione.

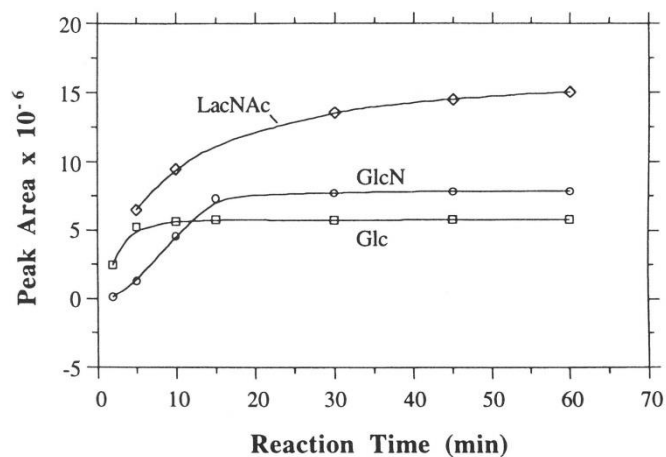


Figura 30 – Intensità del segnale a tempi d'incubazione crescenti per 3 esosamine diverse.

Per finire, nella pagina successiva è riportato il protocollo definitivo e ottimizzato in tutte le sue variabili principali.

1° step	Prelevare un'aliquota del volume di 500 µl di urine; centrifugare per 10 minuti a 10000 rpm; prelevare due aliquote di 200 µl dal surnatante per avere due preparati in doppio.
2° step	<i>Precipitazione</i> Aggiungere 1 ml di etanolo saturo a -20°C e porre in congelatore overnight.
3° step	<i>Degradazione acida</i> Centrifugare 10 minuti a 10000 rpm e conservare il precipitato; riprendere con 500 µl di HCl 4M e porre in stufa a 110°C per 2 ore; al termine raffreddare per pochi minuti in congelatore, aggiungere 1 ml di acqua e liofilizzare.
4° step	<i>Derivatizzazione</i> Riprendere il liofilizzato con 100 µl della soluzione I e con 100 µl della soluzione III; porre in bagno a 80°C per 1 ora; al termine raffreddare per pochi minuti in congelatore; conservare in congelatore a -20°C; centrifugare 5 minuti a 10000 rpm prima di analizzare in CE mediante detector UV-VIS a 214 nm.

Tabella 5 - Protocollo ottimizzato.

Per abbreviare i tempi di esecuzione si è valutata la possibilità di eseguire una precipitazione di alcune ore. Dai dati ottenuti sembra evidente che un tempo di appena 2 ore permetta una completa precipitazione del contenuto di GAGs. In tal modo è possibile accorciare la durata del protocollo passando da 48 ore a 24 ore circa. Nel grafico sottostante sono riportati gli andamenti delle aree sottese al picco della galattosamina ottenute a tempi di precipitazione crescenti. Sono stati valutati 5 campioni patologici e 2 campioni controllo.

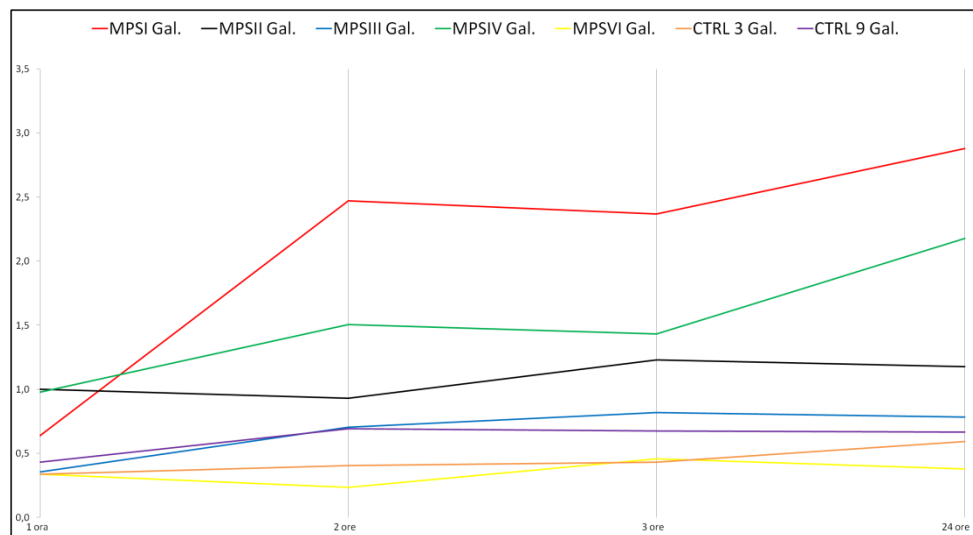


Figura 31 - Andamento della precipitazione di GalN all'aumentare del tempo di incubazione.

Come si può notare l'area sottesa è mediamente invariabile dopo le 2 ore di giacenza in congelatore mentre mostra un leggero incremento passando da 1 ora a 2 ore. Per quanto riguarda il rapporto tra le aree delle due esosamine questo tempo è del tutto influente. Questo si può evidenziare riportando la variazione della percentuale concernente la galattosamina, sempre in funzione del tempo, così come mostrato nel grafico che segue.

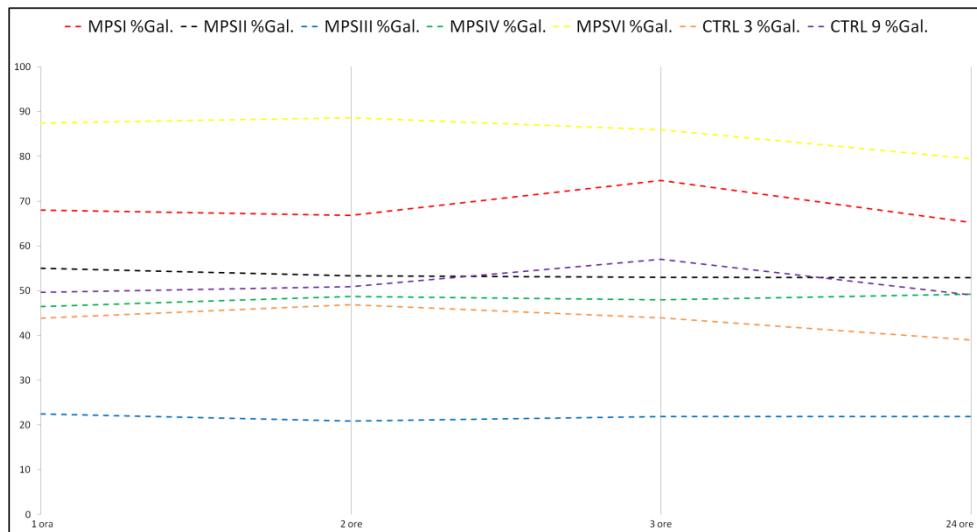


Figura 32 - Andamento della quantità relativa in % di GalN.

Evidentemente il rapporto tra le due aree si conserva anche a tempi molto brevi. Questo può essere utile quando è richiesta solo una valutazione qualitativa, anche se, quantitativamente, a un'ora la quantità di GAGs precipitati è sufficiente per discriminare tra campioni di soggetti sani e di soggetti patologici.

La tecnica elettroforetica più classica menzionata in precedenza altro non è che una elettroforesi in gel di agarosio di campioni urinari opportunamente trattati. Tale trattamento specifico prevede l'uso di CETAB al 5%, ossia cetiltrimetilammonio bromuro, al fine di precipitare quantitativamente i GAGs urinari che, dopo purificazione, possono essere caricati in gel e rilevati densitometricamente (29).

3.4 DS/CS PLASMATICI

Per questo metodo non è stato necessario approntare un piano di ottimizzazione delle condizioni poiché si tratta di un protocollo già ampiamente utilizzato da parte del nostro gruppo di ricerca per l'identificazione dei disaccaridi costituenti i GAGs all'interno di matrici complesse.

Sintetizzando possiamo scomporre il protocollo in una prima fase rappresentata da un trattamento enzimatico avente lo scopo di purificare il plasma e in una fase successiva caratterizzata dalla degradazione enzimatica specifica dei GAGs plasmatici.

Il protocollo dettagliato è così descritto:

1. si prelevano e liofilizzano 100 µl di plasma;
2. si recupera il liofilizzato con 500 µl di TRIS-Cl 10 mM a pH 7.5;
3. si aggiungono 20 µl di proteinasi K;
4. si pone in incubazione a 60°C per 12h;
5. si fa bollire per 5 minuti in modo tale da denaturare l'enzima;
6. si centrifuga a 5000 rpm per 5 minuti e si filtra il surnatante mediante filtri da 0,45 µm;
7. si filtra nuovamente mediante filtri YM3 e si liofilizza il ritenuto;
8. si dissolve il liofilizzato in 80 µl di ammonio acetato 50 mM, pH 8.0;
9. si tratta con 20 µl di condroitinasi ABC per 6h a 37°C;
10. infine si fa bollire per 5 minuti.

20 μ l della soluzione finale sono analizzati in HPLC. Come già introdotto precedentemente nella sezione dedicata alle tecniche strumentali, questo tipo di approccio sfrutta la cosiddetta pratica della separazione HPLC con derivatizzazione post-colonna; la colonna impiegata è a forte scambio anionico (SAX – strong anion exchange).

4. RISULTATI

4.1 HPCE ED ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO

In questa prima parte saranno presentati i risultati ottenuti tramite HPCE mentre nella parte conclusiva del capitolo verranno illustrati quelli relativi all'elettroforesi in gel di agarosio.

Questa nuova metodica analitica è stata applicata a un gruppo di 128 campioni; 83 di questi sono rappresentati da urine di soggetti non patologici mentre la parte restante, quindi 45, è costituita da campioni di urina di soggetti affetti da MPS. Nella tabella sottostante sono elencati i numeri di campioni analizzati per ogni forma di patologia e il sesso di appartenenza del paziente nella forma FEMMINA/MASCHIO.

<u>Controlli</u>	<u>MPS I</u>	<u>MPS II</u>	<u>MPS III</u>	<u>MPS IV</u>	<u>MPS VI</u>
83	14	11	12	7	1
27/56	7/7	0/11	6/6	1/7	1/0

Clinicamente la diagnosi dei sopracitati pazienti è stata eseguita presso la struttura ospedaliera di Ancona secondo il protocollo ordinario. Questo prevede uno screening preliminare mediante DMB seguito da un esame di conferma costituito da un'elettroforesi in acetato di cellulosa. Infine, mediante il dosaggio enzimatico, è stato identificato il tipo ed eventualmente anche il sottotipo di MPS. Anche i controlli sono stati confermati allo stesso modo perché, sovente, sono casi in cui il test del DMB è risultato borderline.

Il primo e più prevedibile risultato ottenuto è la capacità di discriminare quantitativamente i campioni di controllo dai campioni patologici. Un semplice confronto numerico mostra, infatti, una quantità di esosamine largamente superiore nel caso dei campioni patologici. In tabella è riportato

il valore medio per i campioni controllo e per ciascuna classe della patologia.

Campione	ug di GalN mg di CR	ug di GlcN mg di CR	Esosamine totali mg di CR	Variazione vs Controllo
Controllo	20,13	30,94	51,07	
MPS I	110,63	95,34	357,78	+600,58% p<0.001
MPS II	100,25	71,20	171,45	+235,72% p<0.01
MPS III	65,85	203,96	269,81	+428,31% p<0.000
MPS IV	71,75	90,98	162,73	+218,64% p=NS
MPS VI	451,20	122,40	573,60	+1023,16% P=ND

Importante notare che tutte le quantità di esosamine sono riportate in funzione dei mg di creatinina rilevati nelle urine. Questo sistema permette un confronto quantitativo diretto perché tale composto è escreto in modo costitutivo per cui è un comune marker per indicare la diluizione delle urine al momento della raccolta.

Il secondo dato rilevante è la capacità di poter discriminare la forma patologica; il rapporto tra la quantità di galattosamina e la quantità di glucosamina fornisce una possibile alternativa al dosaggio enzimatico per la diagnosi della forma patologica in esame. Nella tabella sottostante si può notare che questo rapporto è classe-specifico. I valori “GalN/GlcN vs AUC” rappresentano il rapporto diretto delle aree sottese alla curva mentre i valori “GalN/GlcN vs curve” sono i rapporti calibrati rispetto alla curva di taratura per galattosamina e glucosamina. Essendo queste due curve leggermente diverse si denota una certa differenza tra le due serie di valori. Questa discrepanza non pregiudica però la capacità di discriminare il tipo di

patologia anche in mancanza della curva di calibrazione; detto in altri termini, è quantitativamente significativo il dato AUC ottenuto fornito dal detector. Il colore azzurro evidenzia una differenza rilevante rispetto ai controlli.

	<u>Controlli</u>	<u>MPS I</u>	<u>MPS II</u>	<u>MPS III</u>	<u>MPS IV</u>	<u>MPS VI</u>
GalN/GlcN vs AUC	0,93	1,40	1,71	0,28	0,83	5,02
GalN/GlcN vs curve	0,65	1,16	1,41	0,32	0,79	3,69

L'unico problema riscontrabile è una differenza non marcata tra la MPS di tipo IV e i controlli; questa condizione è tuttora in fase di valutazione per evitare che si possa diagnosticare un falso negativo.

L'altra importantissima novità è la capacità di poter determinare la gravità della patologia in esame. Tale dato diagnostico non è rilevabile a livello genotipico ma si valuta solo sul fenotipo del soggetto quando ormai la patologia ha già raggiunto un certo grado di manifestazione e procurato un danno biologico importante. *Per la prima volta è dimostrato che la gravità fenotipica della patologia in esame è legata proporzionalmente alla quantità di GAGs contenute nelle urine.* In tabella sono riportati i valori di GalN e GlcN per la MPS di tipo I suddivisi in base alla gravità del fenotipo.

<u>Campione</u>	<u>ug di GalN</u> <u>mg di CR</u>	<u>ug di GlcN</u> <u>mg di CR</u>	<u>Esosamine totali</u> <u>mg di CR</u>	<u>Variazione</u> <u>vs Controllo</u>
MPS I lieve	110,63	95,34	205,97	+303,31% p<0.001
MPS I intermedio	197,92	110,21	308,13	+503,34% p=ND
MPS I grave	319,99	175,71	495,70	+870,63% p<0.001

La stessa distinzione può essere eseguita per la MPS di tipo II mentre negli altri casi non è stato possibile ottenere le informazioni necessarie per suddividere la patologia in base alla gravità oppure, il numero di campioni patologici è scarso come nel caso della forma VI.

Questa rilevante scoperta è ben rappresentata nel grafico seguente.

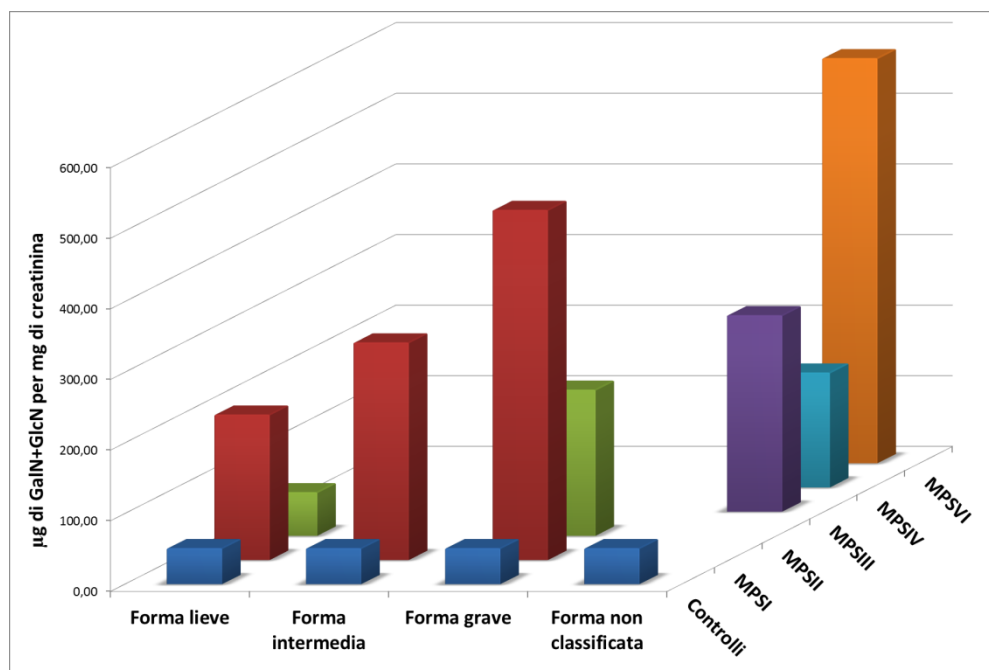


Figura 33 - Rappresentazione del contenuto totali di esosamine per ciascuna forma di MPS.

Si denota una correlazione indicativa tra il contenuto totale di esosamine e la forma patologica anche in funzione della gravità dell'espressione fenotipica. A tutt'oggi questa relazione è dimostrata solo per il tipo I e il tipo II; il fatto che la forma lieve e quella grave siano diagnosticabili in conformità ad una semplice determinazione quantitativa rappresenta un vantaggio importante soprattutto quando è necessario intervenire precocemente con una terapia capace di arrestare la progressione dei disturbi fisiologici.

La stessa valutazione può essere eseguita considerando il rapporto tra le due esosamine anziché il loro contenuto totale. In questi termini è possibile individuare un nuovo fattore discriminante tra le varie forme della patologia.

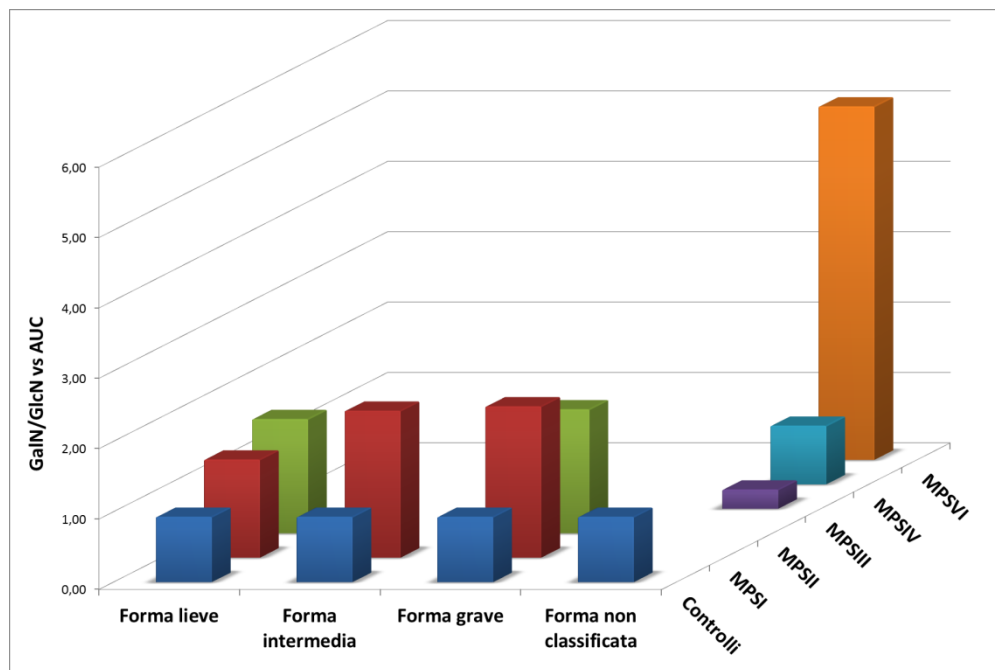


Figura 34 - Rappresentazione del rapporto GalN/GlcN per ciascuna forma di MPS.

È interessante approfondire i risultati ottenuti per ciascun tipo di MPS paragonandoli ai campioni di controllo. Nelle tabelle sottostanti sono riportati i risultati suddivisi per ciascuna classe di MPS precedute da un breve commento.

MPS I (Hurler-Scheie). Nei sei pazienti affetti dalla forma lieve il contenuto totale di esosamine incrementa del 303% rispetto ai controlli; anche il rapporto GalN/GlcN subisce una crescita del 78% e del 50% rispettivamente per i dati ricavati dalla curva di calibrazione e per i dati AUC.

Nei sette pazienti affetti dalla forma grave questi valori sono di circa 870% per il contenuto totale e di 131% per il rapporto GalN/GlcN (AUC).

L'unico dato disponibile per la forma intermedia della patologia mostra prevedibilmente un andamento compreso tra le due serie di dati: 503% per il contenuto totale e 125% per il rapporto GalN/GlcN (AUC).

	Controlli	MPS I Scheie	MPS I Hurler-Scheie	MPS I Hurler
GalN (µg/mg CR)	20.1±12.6	110.6±22.5	197.9	320.0±91.3
Difference vs Control		+450.2%	+884.6%	+1492.0%
ANOVA/Student		p<0.05/p<0.001	-	p<0.02/p<0.000
GlcN (µg/mg CR)	30.9±18.1	95.3±26.3	110.2	175.7±62.9
Difference vs Control		+208.4%	+256.6%	+468.6%
ANOVA/Student		p<0.05/p<0.002	-	p<0.02/p<0.001
Total Hexs (µg/mg CR)	51.1±30.1	206.0±45.7	308.1	495.7±151.7
Difference vs Control		+303.1%	+502.9%	+870.0%
ANOVA/Student		p<0.05/p<0.001	-	p<0.005/p<0.001
GalN/GlcN (µg/mg CR)	0.65±0.2	1.16±0.2	1.80	1.82±0.3
Difference vs Control		+78.5%	+176.9%	+180.0%
ANOVA/Student		p<0.05/p<0.05	-	p<0.02/p<0.000
GalN/GlcN (AUC)	0.93±0.2	1.40±0.2	2.09	2.15±0.4
Difference vs Control		+50.5%	+124.7%	+131.2%
ANOVA/Student		p<0.05/p<0.05	-	p<0.02/p<0.000

MPS II (Hunter). I quattro soggetti affetti dalla forma lieve mostrano un incremento del contenuto totale di esosamine del 21%. Tale dato non è però molto significativo a causa del coefficiente di variazione. Il rapporto è invece indicativo perché subisce un incremento del 93% (AUC) dovuto a una maggior quantità di GalN nelle urine.

I sette pazienti affetti dalla forma grave presentano invece un contenuto totale del 305% rispetto ai controlli mentre è conservato il rapporto. Questo suggerisce che l'incremento di GalN sia ben superiore all'incremento di GlcN e, infatti, tali valori sono rispettivamente del 521% e del 165%.

	Controlli	MPS II lieve	MPS II grave
GalN (µg/mg CR)	20.1±12.6	32.5±14.5	124.9±30.7
Difference vs Control		+61.7%	+521.4%
ANOVA/Student		p=NS/p=NS	p<0.05/p<0.01
GlcN (µg/mg CR)	30.9±18.1	29.3±10.6	82.0±19.1
Difference vs Control		-5.2%	+165.4%
ANOVA/Student		p=NS/p=NS	p<0.05/p<0.01
Total Hexs (µg/mg CR)	51.1±30.1	61.8±24.7	206.9±36.2
Difference vs Control		+20.9%	+304.9%
ANOVA/Student		p=NS/p=NS	p<0.05/p<0.01
GalN/GlcN (µg/mg CR)	0.65±0.2	1.11±0.2	1.52±0.7
Difference vs Control		+70.8%	+133.8%
ANOVA/Student		p<0.05/p<0.02	p<0.05/p<0.01
GalN/GlcN (AUC)	0.93±0.2	1.62±0.3	1.76±0.5
Difference vs Control		+93.3%	+89.2%
ANOVA/Student		p<0.05/p<0.02	p<0.05/p<0.01

MPS III (S. Filippo). I dodici campioni mostrano un incremento del contenuto totale del 444%. Il rapporto subisce una riduzione del 74% (AUC) a causa di un forte aumento del contenuto di GlcN nelle urine.

Non sono state osservate differenze rilevanti tra i sottotipi della patologia; per completezza d'informazione sei pazienti sono portatori del tipo A, cinque del tipo B e uno del tipo C.

	Controlli	MPS III
GalN (µg/mg CR)	20.1±12.6	65.9±37.5
Difference vs Control		+227.9%
ANOVA/Student		p<0.01/p<0.005
GlcN (µg/mg CR)	30.9±18.1	204.0±75.2
Difference vs Control		+560.2%
ANOVA/Student		p<0.005/p<0.000
Total Hexs (µg/mg CR)	51.1±30.1	269.9±89.4
Difference vs Control		+444.2%

ANOVA/Student		p<0.005/p<0.000
GalN/GlcN (µg/mg CR)	0.65±0.2	0.32±0.1
Difference vs Control		-50.8%
ANOVA/Student		p<0.005/p<0.000
GalN/GlcN (AUC)	0.93±0.2	0.27±0.1
Difference vs Control		-74.2%
ANOVA/Student		p<0.005/p<0.000

MPS IV (Morquio). Sono stati analizzati sei soggetti affetti dalla forma A e un soggetto affetto dalla forma B; non sono state evidenziate differenze tra i due sottotipi.

L'incremento del contenuto totale è di circa il 218%. Questo dato è però non indicativo perché ampiamente dovuto ai valori di due soggetti anomali che presentano un comportamento analitico diverso rispetto agli altri. Senza tener conto di questi il contenuto totale è paragonabile a quello dei controlli per cui è necessario un successivo studio per chiarire le anomalie appena descritte.

	Controlli	MPS IV
GalN (µg/mg CR)	20.1±12.6	71.7±66.9
Difference vs Control		+256.7%
ANOVA/Student		p=NS/p=NS
GlcN (µg/mg CR)	30.9±18.1	91.0±52.8
Difference vs Control		+194.5%
ANOVA/Student		p=NS/p=NS
Total Hexs (µg/mg CR)	51.1±30.1	162.7±118.6
Difference vs Control		+218.4%
ANOVA/Student		p=NS/p=NS
GalN/GlcN (µg/mg CR)	0.65±0.2	0.79±0.3
Difference vs Control		+21.5%
ANOVA/Student		p=NS/p=NS
GalN/GlcN (AUC)	0.93±0.2	0.83±0.3
Difference vs Control		-10.7%
ANOVA/Student		p=NS/p=NS

MPS VI (Maroteaux-Lamy). Purtroppo la disponibilità di soggetti affetti da questa forma è stata minima per cui questi risultati devono essere ancora attentamente riveduti. L'unico campione presenta un forte incremento del 1000% circa del contenuto totale. Questo è dovuto in larga misura ad un aumento consistente del contenuto di GalN nelle urine. La conseguenza di questo dato è un rapporto GalN/GlcN aumentato del 440% rispetto ai controlli.

	Controlli	MPS I Hurler-Scheie
GalN (µg/mg CR)	20.1±12.6	451.2
Difference vs Control		+2144.8%
ANOVA/Student		-
GlcN (µg/mg CR)	30.9±18.1	122.4
Difference vs Control		+296.1%
ANOVA/Student		-
Total Hexs (µg/mg CR)	51.1±30.1	573.6
Difference vs Control		+1022.5%
ANOVA/Student		-
GalN/GlcN (µg/mg CR)	0.65±0.2	3.69
Difference vs Control		+467.7%
ANOVA/Student		-
GalN/GlcN (AUC)	0.93±0.2	5.02
Difference vs Control		+439.8%
ANOVA/Student		-

In conclusione di questa breve rassegna, mi sembra opportuno riportare i grafici che si riferiscono alle singole determinazioni in HPCE sia con riferimento al contenuto totale di esosamine e sia in funzione del rapporto GalN/GlcN.

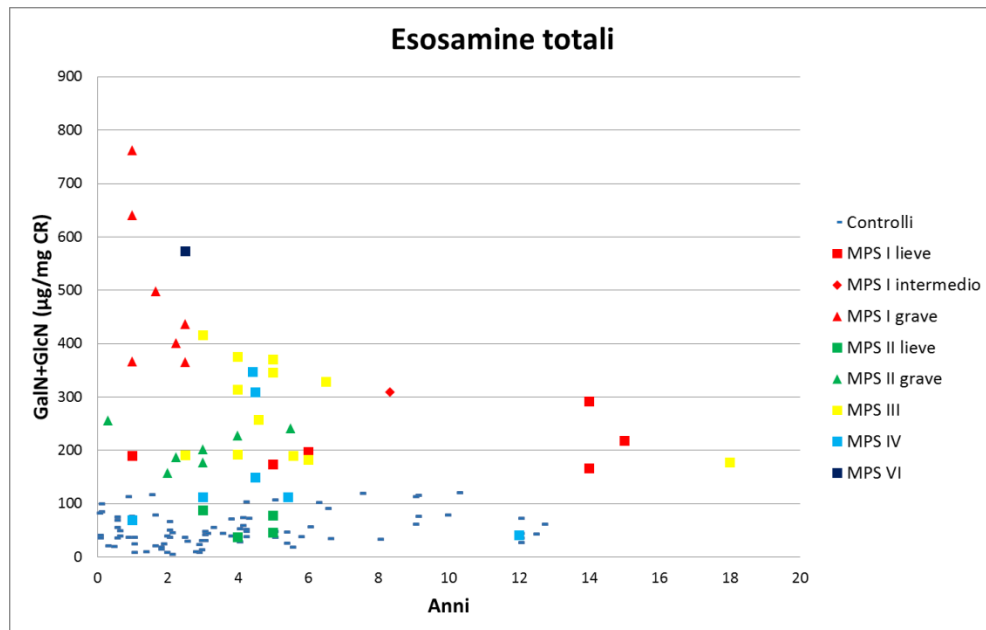


Figura 35 - Rappresentazione delle esosamine totali riscontrate in ciascun campione.

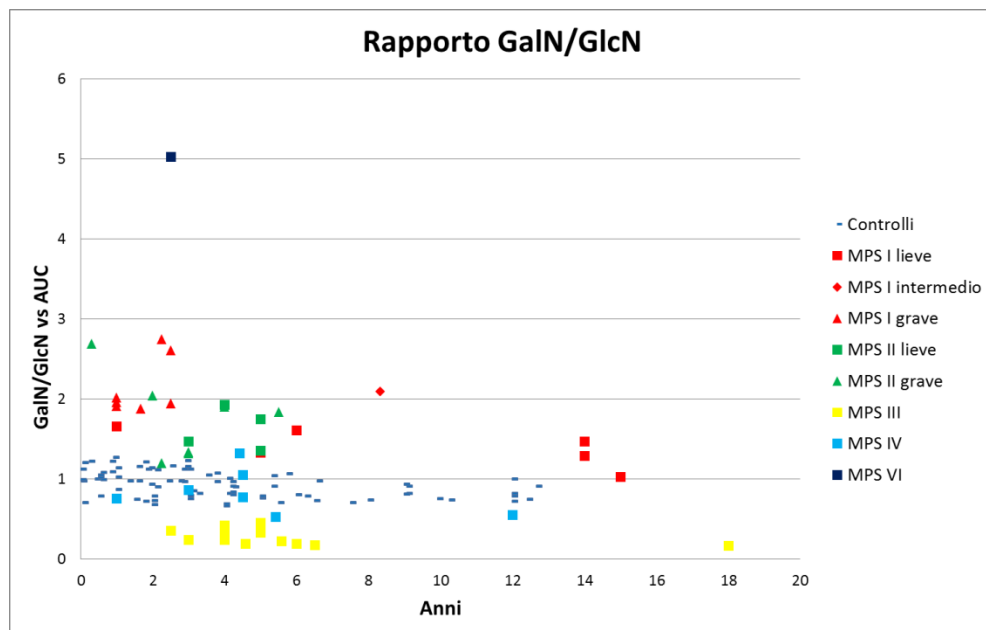


Figura 36 - Rappresentazione del rapporto GalN/GlcN in ciascun campione.

Anche se con alcune eccezioni, come nel caso della MPS di tipo IV, si evince che ogni forma patologica mostra un comportamento classe-specifico utile a una diagnosi precisa.

L'errore riportato nelle tabelle è la deviazione standard. L'errore standard associato ai valori medi di GalN e GlcN per ogni singolo tipo di patologia è invece rappresentato nel grafico seguente.

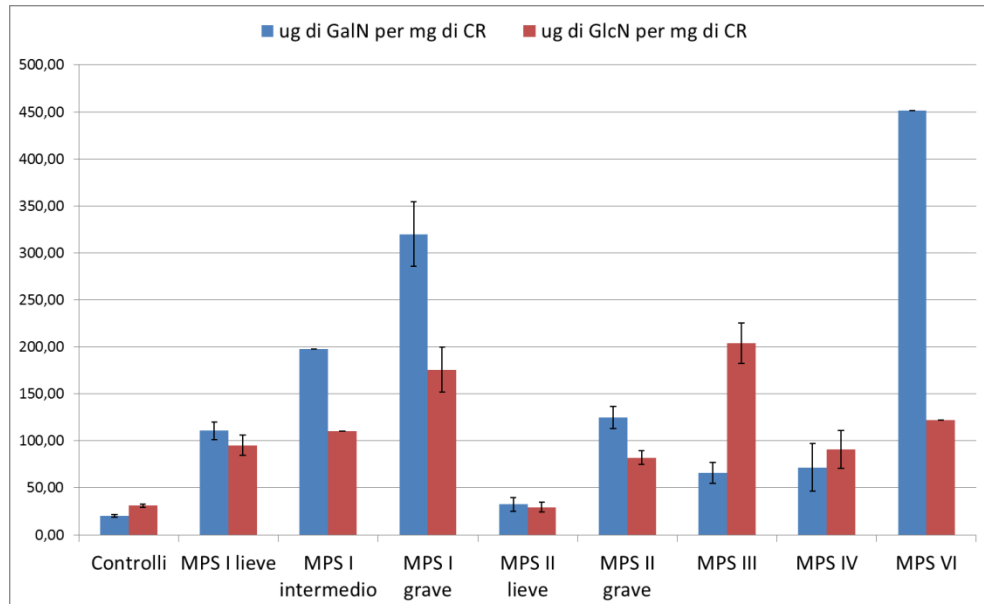


Figura 37 - Dati associati all'errore standard.

Ovviamente nei casi di MPS I intermedio e di MPS VI l'errore standard non può essere calcolato perché si tratta di determinazioni analitiche singole.

La variabilità è stata valutata su 28 campioni patologici mediante il coefficiente di variazione: indica la percentuale di variabilità, misurata con la deviazione standard, rispetto alla media. Si definisce *coefficiente di variazione*, e s'indica con *CV*, il rapporto, moltiplicato per 100, tra lo scostamento quadratico medio e la media aritmetica. Matematicamente si esprime come:

$$CV = \frac{\sigma}{m} 100$$

I dati di alcuni campioni sono riportati nella tabella sottostante e sono affiancati da quelli ottenuti mediante HPLC. Oltre alla precisione si è valutata contemporaneamente anche la robustezza affidando la preparazione

a due differenti operatori ciascuno dei quali ha derivatizzato due aliquote di ciascun campione.

	<u>MPSI</u>	<u>MPSII</u>	<u>MPSIII</u>	<u>MPSIV</u>	<u>MPSVI</u>
A	2,65958	3,13242	0,83468	0,54973	0,49747
B	2,60940	3,87883	0,84332	0,59102	0,32156
C	2,30573	4,50871	0,66579		0,37846
D	2,50811	4,31674	0,76646		
Media	2,52	3,96	0,78	0,57	0,40
SD	0,14	0,53	0,07	0,02	0,07
CV	5,38	13,36	9,14	3,62	18,36

In alcuni casi non è stato possibile lavorare in quadrupla copia per la scarsità di urine a disposizione. Il coefficiente di variazione è mediamente inferiore al valore del 20% assunto come limite superiore accettabile. È necessario precisare che nonostante la cura prestata nella preparazione dei campioni è di fatto presente un'importante variabilità sistemica legata alla mancanza di vetreria di reazione completamente ermetica. Dopo la fase di degradazione in stufa è sempre stato facile identificare evaporazioni rilevanti del contenuto evitando quindi l'analisi dei campioni in questione. Non è stato possibile però individuare evaporazioni parziali in cui, sostanzialmente, il contenuto non fosse visibilmente inferiore. Per ovviare a questo problema il nostro lavoro di ricerca continuerà attraverso una strategia gravimetrica e servendosi di guarnizioni non rigide in teflon, allo scopo di rendere minimo l'indice di variabilità e, in altre parole, migliorare largamente la ripetibilità e l'accuratezza del metodo rendendo futuribile l'istituzione di un nuovo approccio diagnostico. Nonostante questa valutazione è importante notare che già in queste condizioni il metodo presenta una variabilità molto ridotta e non potrà far altro che diminuire ulteriormente.

Con l'intento di valutare l'eventuale presenza e il significato dei monomeri urinari sono state eseguite analisi senza effettuare alcuna degradazione dei GAGs. Questo tipo di prova non ha prodotto alcun segnale in elettroforesi capillare mentre invece ha generato segnali di piccola intensità in HPLC; la differenza è legata alla sensibilità del detector: rivelatore a fluorescenza in HPLC e rivelatore UV-VIS in CE. I dati ottenuti sono mediamente equivalenti sia nel caso dei controlli e sia nei campioni patologici non evidenziando alcun ruolo differenziale esercitato dai monomeri. È noto però che alcune manifestazioni patologiche siano legate alla presenza di oligosaccaridi, anche se il proprio ruolo biologico non è ancora stato caratterizzato.

Infine, in merito alla stabilità del prodotto derivatizzato, sono state eseguite prove dello stesso preparato a distanza di alcune settimane l'una dall'altra sia in CE e sia in HPLC. Dai risultati ottenuti si evince che, almeno nell'intervallo esaminato, non si hanno fenomeni di decadenza dell'assorbanza e della fluorescenza.

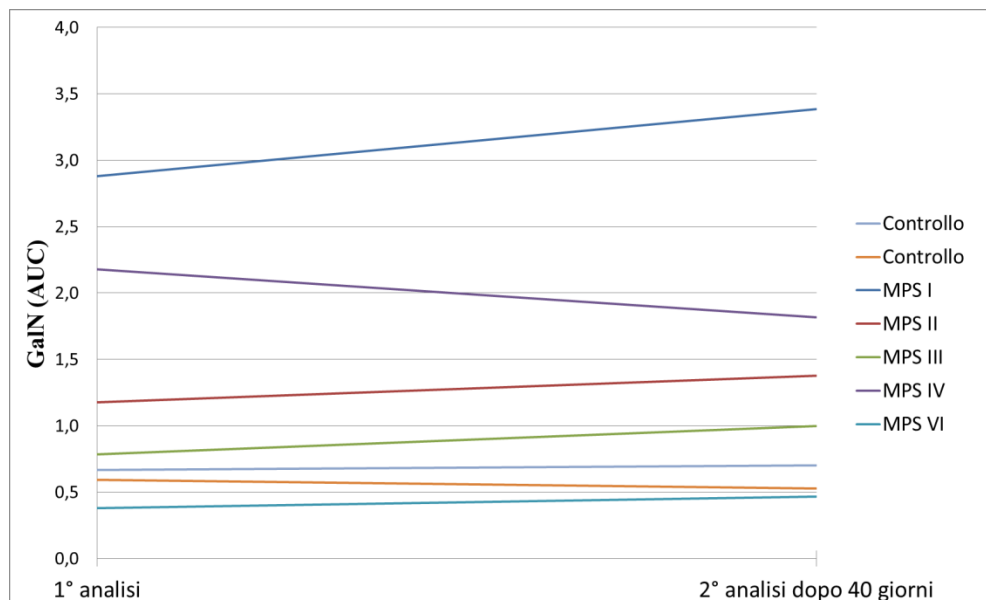


Figura 38 - Prove di stabilità del prodotto derivatizzato.

Come si può vedere la tendenza dei risultati ottenuti non è correlabile all'aumentare del tempo di conservazione bensì dovuta a una variabilità casuale. Questa è quasi totalmente assente se si valuta l'andamento del rapporto GalN/GlcN confermando che la conservazione dei prodotti derivatizzati è possibile per tempi superiori ai 60 giorni. Quanto appena affermato è stato verificato con esperimenti ripetuti in HPLC e non riportati in questo lavoro.

In quest'ultima parte saranno introdotti i risultati ottenuti tramite elettroforesi in gel di agarosio e sempre in relazione alla diagnosi di MPS. Innanzitutto mi sembra opportuno mostrare le scansioni dei gel da cui, tramite analisi densitometrica, sono stati ricavati i valori mostrati nella tabella a seguire.

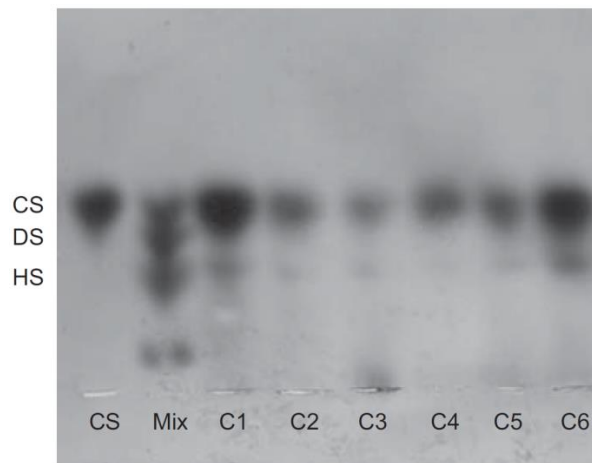


Figura 39 - Soggetti di controllo.

Comprensibilmente (29; 30; 31) si ottengono 2 bande, 85÷90 CS e 10÷15 HS, per un contenuto totale di GAGs di circa 13 µg/ mg CR. Da notare che questo valore è più alto rispetto a lavori simili in cui l'insieme dei soggetti di controllo presenta un'età media superiore (31). Questa differenza è dovuta alla ben nota relazione tra il contenuto di GAGs urinari e l'età (32).

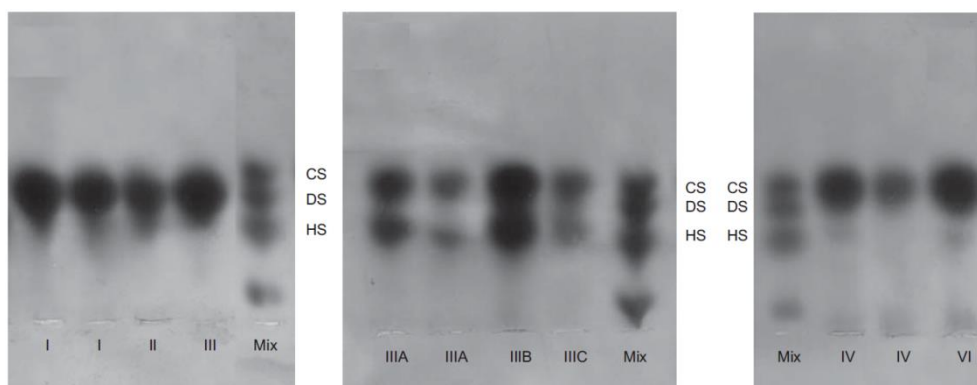


Figura 40 - Soggetti patologici.

I valori di GAGs totale sono stati normalizzati e sono indicati come μg di polisaccaride per mg di creatinina.

	N°	Età media	GAGs totali	CS/DS%	HS%
Controlli	83	4.0±0.4	12.7±6.7	95.6±6.6	4.4±6.6
MPS I	12	6.4±3.5	135.6±82.9	96.8±6.5	3.2±6.5
VS% controlli			+967.7	+1.2	-27.3
ANOVA/Student			p<0.000	p=NS	p=NS
MPS II	10	3.5±1.4	162.5±88.3	90.0±9.7	10.0±9.7
VS% controlli			+1179.5	-5.9	+127.3
ANOVA/Student			p<0.000	p=NS	p=NS
MPS III	12	5.7±1.2	79.1±62.5	52.0±9.4	48.0±9.4
VS% controlli			+522.8	-45.6	+991.0
ANOVA/Student			p<0.007	p<0.000	p<0.000
MPS IV	7	5.0±1.3	31.6±15.7	88.5±9.0	11.5±9.0
VS% controlli			+148.8	-7.4	+161.4
ANOVA/Student			p=NS	p=NS	p=NS
MPS VI	1	2.5	699.3	100.0	0.0
VS% controlli			+5406.0	-	-
ANOVA/Student			-	-	-

Per una corretta interpretazione di quest'ultimi dati è opportuno fare una brevissima considerazione a proposito dei pesi molecolari dei polisaccaridi in relazione alle tecniche appena introdotte.

Mediante gel di agarosio è possibile rilevare macromolecole con peso molecolare minimo di almeno 1500 Da; conseguentemente tale tecnica non permette la quantificazione di oligosaccaridi e frammenti a basso peso molecolare. Nel caso specifico si denota un contenuto di HS piuttosto ridotto se paragonato a quello di CS. L'analisi in CE precedentemente descritta ha messo però in luce la presenza di CS e HS a livello urinario e in concentrazione simili dimostrando che quest'ultimo è presente prevalentemente in forma di oligomero mentre il CS mantiene un forma polimerica ad elevato peso molecolare.

Propongo ora una breve interpretazione descrittiva dei risultati mostrati in tabella.

MPS I (accumulo di DS e HS). Il contenuto totale di GAGs urinari incrementa di circa 9,7 volte se paragonato a quello dei controlli dimostrando l'utilità di tale tecnica per un rapido screening della MPS di tipo I. Per i motivi descritti precedentemente non si denota un incremento del contenuto di HS e, infine, non si osservano differenze quantitative tra le diverse forme di MPS I.

MPS II (accumulo di DS e HS). Anche in questo caso si osserva un incremento considerevole del contenuto di GAGs rispetto ai controlli (circa 1200%) soprattutto dovuto all'aumento di DS perché quello di HS non è quantificabile; non si osservano differenze significative tra la forma di MPS II lieve e grave.

MPS III (accumulo di HS). In questo caso si osserva un importante accumulo di HS ad elevato peso molecolare a cui corrisponde anche un incremento considerevole del contenuto di GAGs totali (oltre 500%) rispetto ai controlli. Non si osservano differenze tra le varie forme di MPS III. La

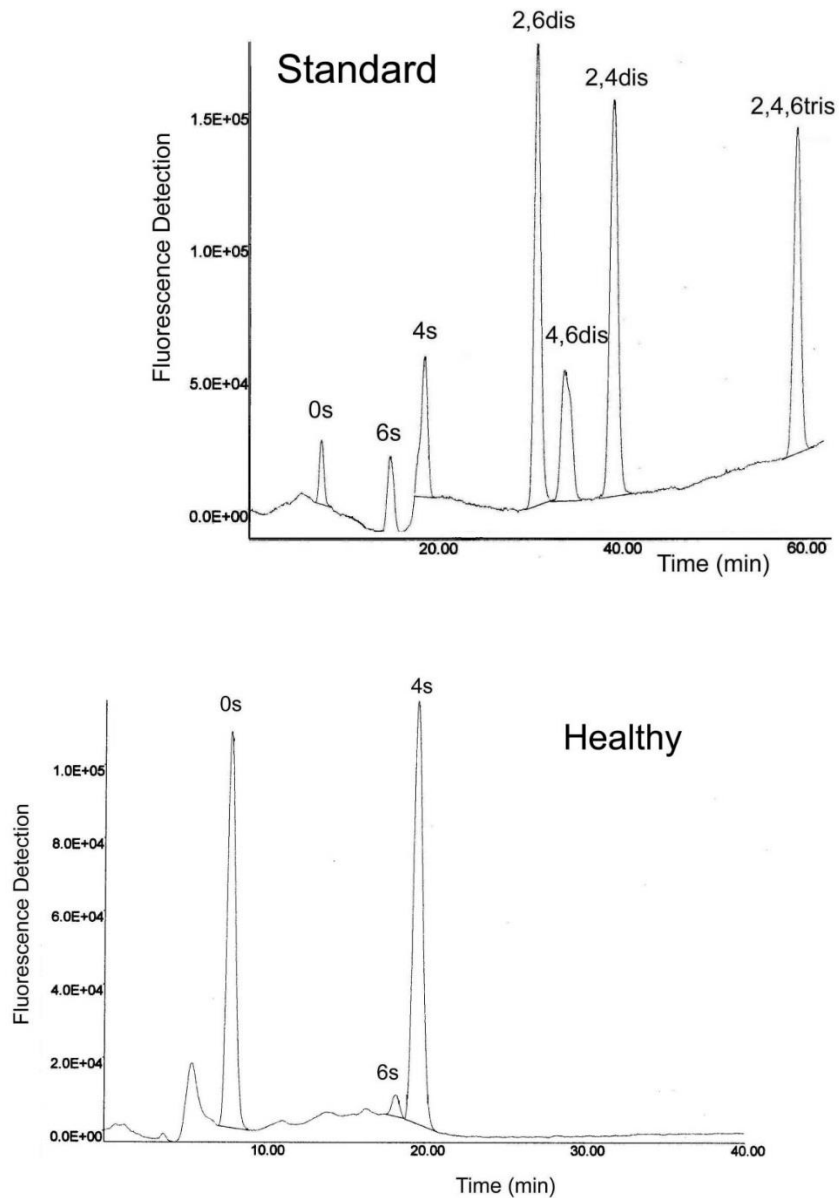
presenza di HS ad elevato peso molecolare rende questa pratica molto utile per l'identificazione della MPS di tipo III anche considerando che la sindrome di Sanfilippo è tra le più comuni.

MPS IV (accumulo di CS). L'incremento di GAGs totali non è propriamente significativo se paragonato ai controlli. Questo dato è legato in particolar modo a 2 campioni che presentano un valore del tutto simile a quello non patologico. Non si osservano differenze tra i sottotipi di MPS IV.

MPS VI (accumulo di DS). Nell'unico campione patologico a disposizione si osserva un contenuto totale di GAGs molto elevato (circa 5600%) rispetto ai controlli.

4.2 HPLC

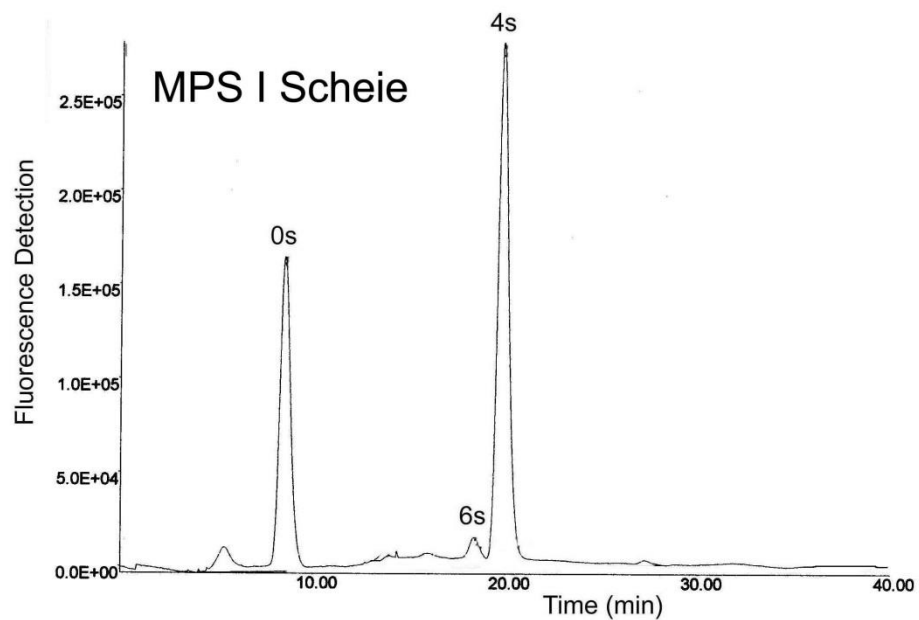
Come noto il plasma di soggetti non patologici contiene prevalentemente CS poco solfata covalentemente legato ad un inibitore plasmatico (bikunina) e avente un peso molecolare approssimativo di 6-8 kDa. La forma disaccaridica più rappresentativa è per il 40-60% il disaccaride non-solfato e per la restante parte il disaccaride 4-solfato con tracce di disaccaride 6-solfato (33; 34; 35).

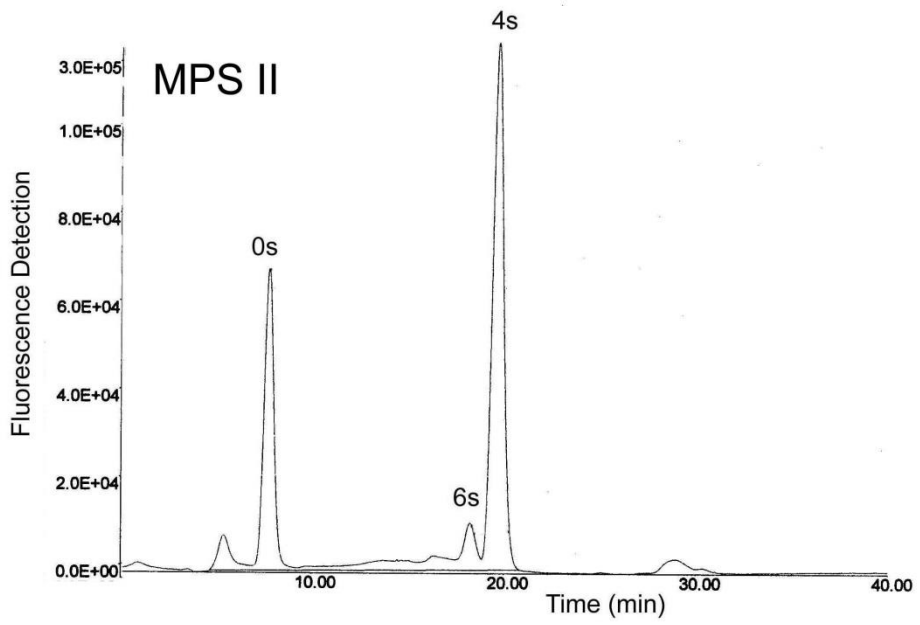
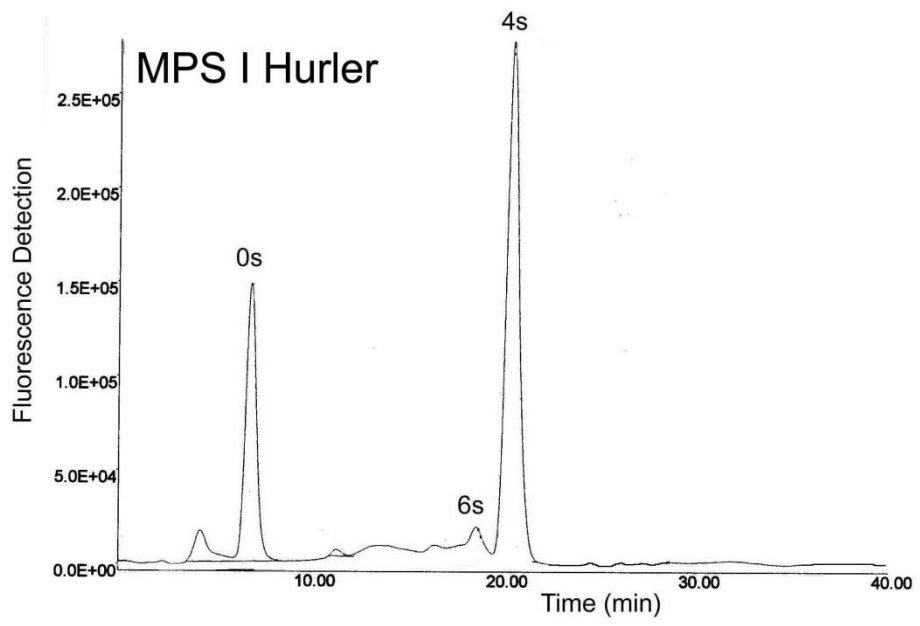


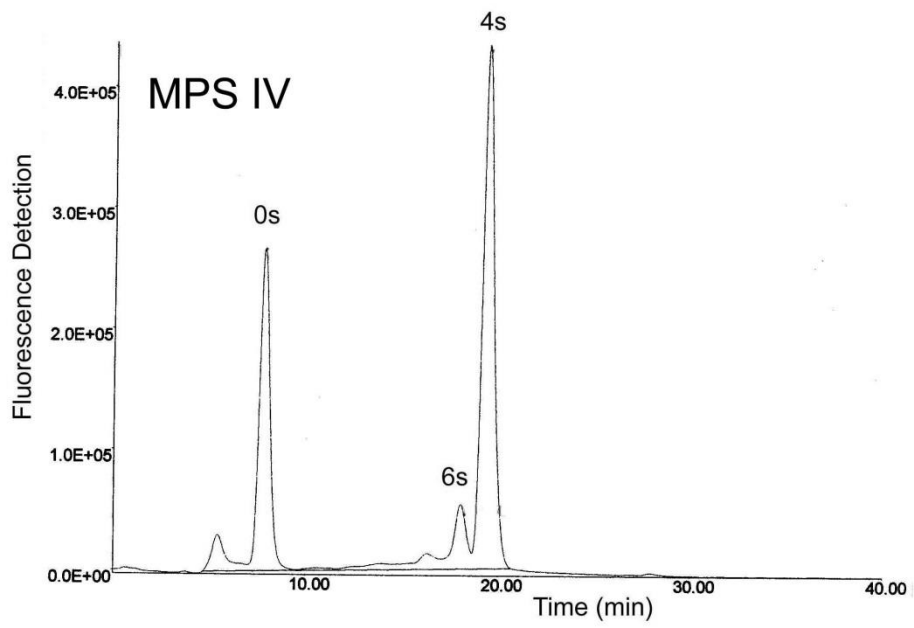
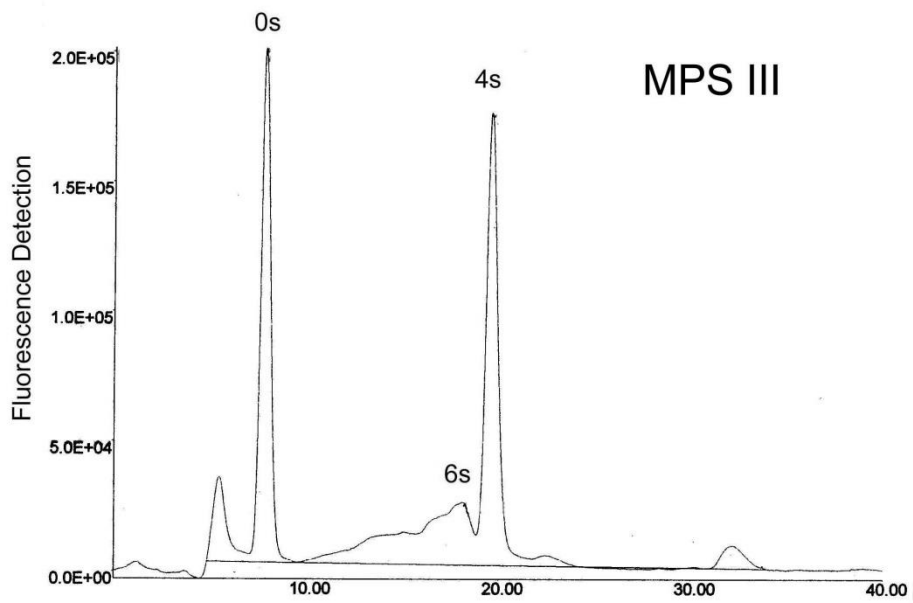
Le forme di MPS I, II e VI accumulano DS come polisaccaride primario mentre le forme III e IV presentano un accumulo secondario di DS-CS (32; 36). Come conseguenza, e come già anticipato precedentemente, per un'accurata valutazione della quantità di polisaccaridi plasmatici, CS-DS possono essere sfruttati per il trattamento enzimatico con condroitinasi ABC allo scopo di valutare la composizione disaccaridica.

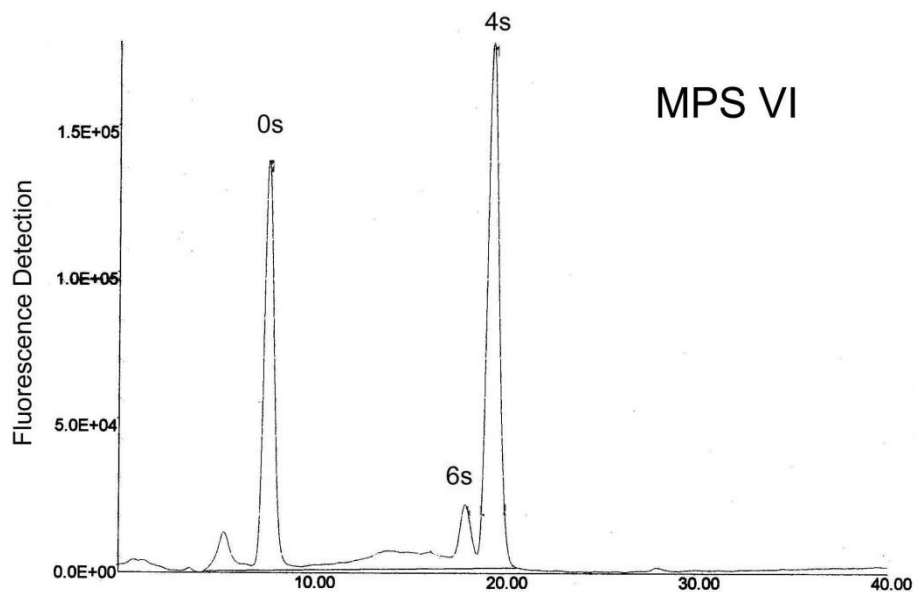
Tale enzima, rispetto ad altri, si presta molto bene allo scopo poiché essendo una endoliasi ad alta efficienza ha la capacità di degradare completamente la catena polisaccaridica indipendentemente dalla presenza di domini diversamente solfati.

Di seguito sono riportati i cromatogrammi tipici di ciascuna forma di MPS in modo tale da evidenziare eventuali differenze in termini qualitativi e quantitativi.









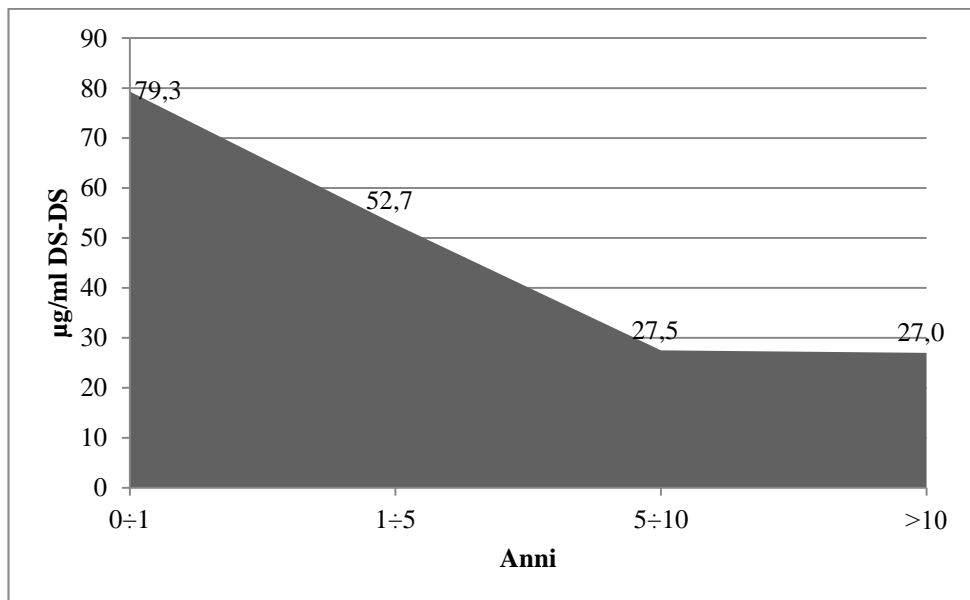
Dopo questa premessa atta a chiarire ulteriormente le basi teoriche del metodo cromatografico è possibile passare all'introduzione dei risultati ottenuti.

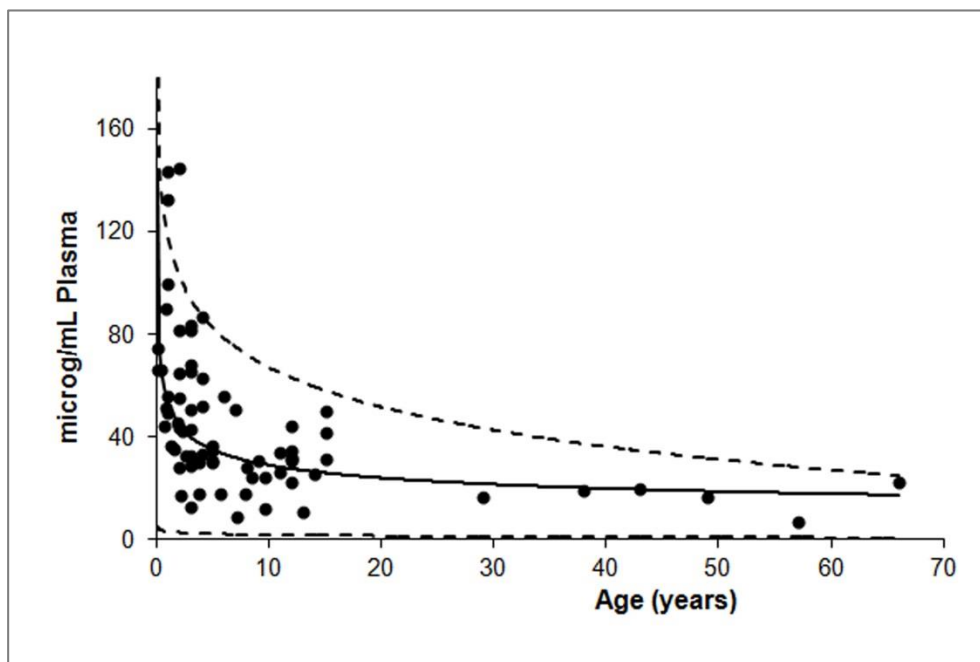
In tabella sono riportate le caratteristiche dei soggetti partecipanti alla sperimentazione.

	<u>Soggetti</u>	<u>F/M</u>	<u>Età media (min-max)</u>
Controlli	71	28/43	8.8±12.9 (0.04-66)
MPS I Scheie	3	3/0	19.8±27.9 (2.5-52)
MPS I Hurler	3	2/1	5.5±6.1 (1.5-12.5)
MPS II severe	3	0/3	2.4±0.5 (2-3)
MPS III	4	2/2	8.1±3.3 (5-12)
MPS IV	3	2/1	2.9±1.6 (1-4)
MPS VI	1	0/1	13

Il primo dato rilevante è che, tra i soggetti di controllo, la quantità di GAGs plasmatici tende ad un rapido decremento con l'età soprattutto durante il primo anno di vita; si passa da un contenuto iniziale medio di circa 80 µg/ml a un periodo di stabilità, oltre i 5 anni di vita, in cui tale contenuto è di circa 27 µg/ml.

<u>Soggetti</u>	<u>Età media</u>	<u>µg/ml</u>	<u>p vs 0÷1</u>	<u>p vs 1÷5</u>	<u>p vs 5÷10</u>
0÷1	0.70	79.4±33.5	-	-	-
1÷5	2.81	52.7±30.1	0.02	-	-
5÷10	7.42	27.5±13.5	-	0.010	-
≥10	23.60	27.0±11.2	-	-	0.934

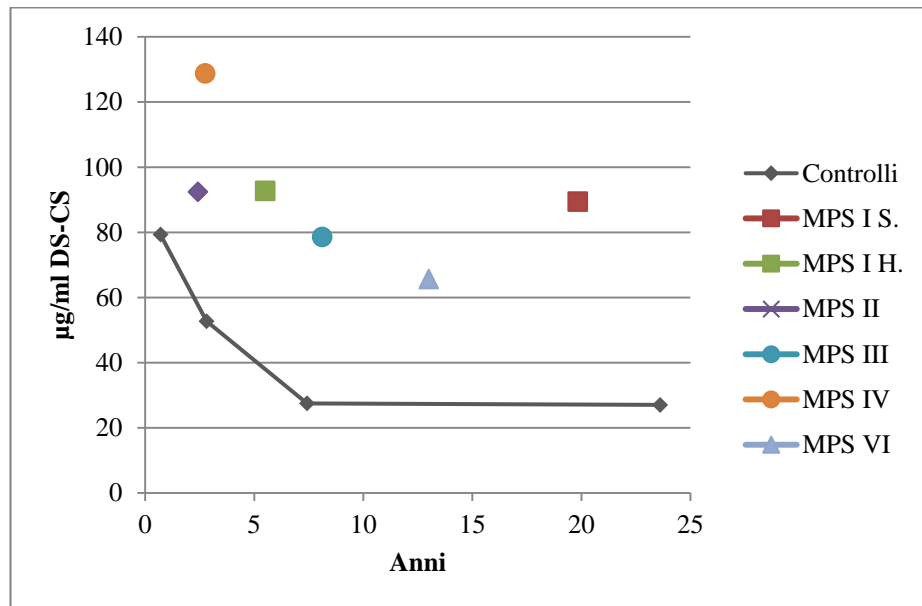




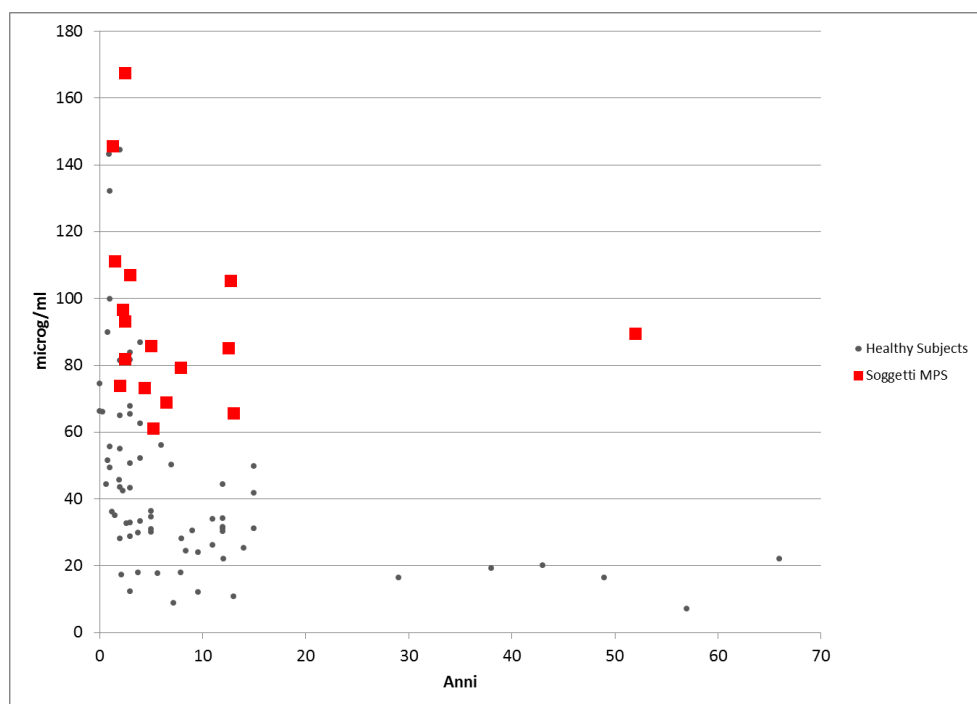
Considerando anche i dati relativi ai campioni plasmatici dei soggetti patologici la tabella è così compilata.

<u>Soggetti</u>	<u>Età media</u>	<u>µg/ml</u>	<u>p vs 0÷1</u>	<u>p vs 1÷5</u>	<u>p vs 5÷10</u>
0÷1	0.70	79.4±33.5	-	-	-
1÷5	2.81	52.7±30.1	0.02	-	-
5÷10	7.42	27.5±13.5	-	0.010	-
≥10	23.60	27.0±11.2	-	-	0.934

MPS I S.	19.8	89.4±3.7	-	0.004	0.007
MPS I H.	5.5	92.7±16.0	-	0.003	0.022
MPS II	2.4	92.5±16.9	-	0.009	0.046
MPS III	8.1	78.6±19.3	-	0.004	0.030
MPS IV	2.7	128.8±49.3	-	0.045	0.074
MPS VI	13.0	65.7	-	-	-



Dal grafico appena mostrato si evince che esiste un'importante differenza tra il contenuto plasmatico di CS-DS dei soggetti patologici e quello di soggetti non patologici. Oltre a questa primissima interpretazione è dimostrato inoltre che questa differenza è significativa anche per forme di MPS in cui l'accumulo primario non è di CS-DS, ma di altri polisaccaridi come nel caso delle forme III e VI.



4.3 MPS IIIA

Il soggetto esaminato in questo nostro studio è una donna di 28 anni affetta da MPS di tipo IIIA e caratterizzata da una lenta progressione del ritardo mentale.

Mediante specifico trattamento con condroitinasi ABC abbiamo estratto, purificato e analizzato tutto il contenuto urinario di HS. L'azione dell'enzima permette la totale eliminazione di CS e di DS.

L'analisi del soggetto prevede uno screening preliminare in gel di agarosio per verificare l'assenza di altri Glucosaminoglicani dopo trattamento enzimatico e la quantificazione di HS tramite densitometria. Infine si valuta tramite HPLC il contenuto totale di glucosamina secondo il metodo precedentemente descritto per ricavare il contenuto totale di HS.

Il soggetto in esame è stato confrontato con 5 soggetti affetti da MPS di tipo IIIA in forma grave e con un gruppo di soggetti non patologici.

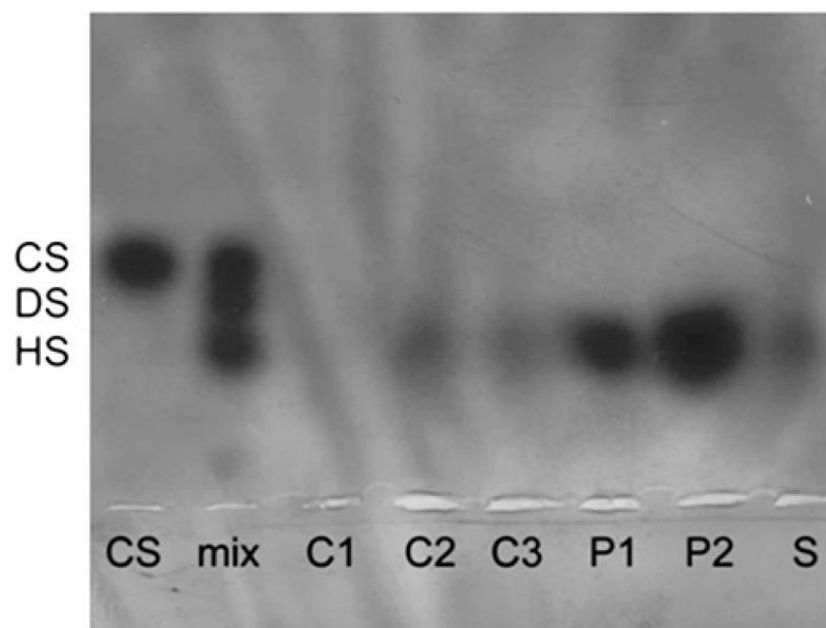
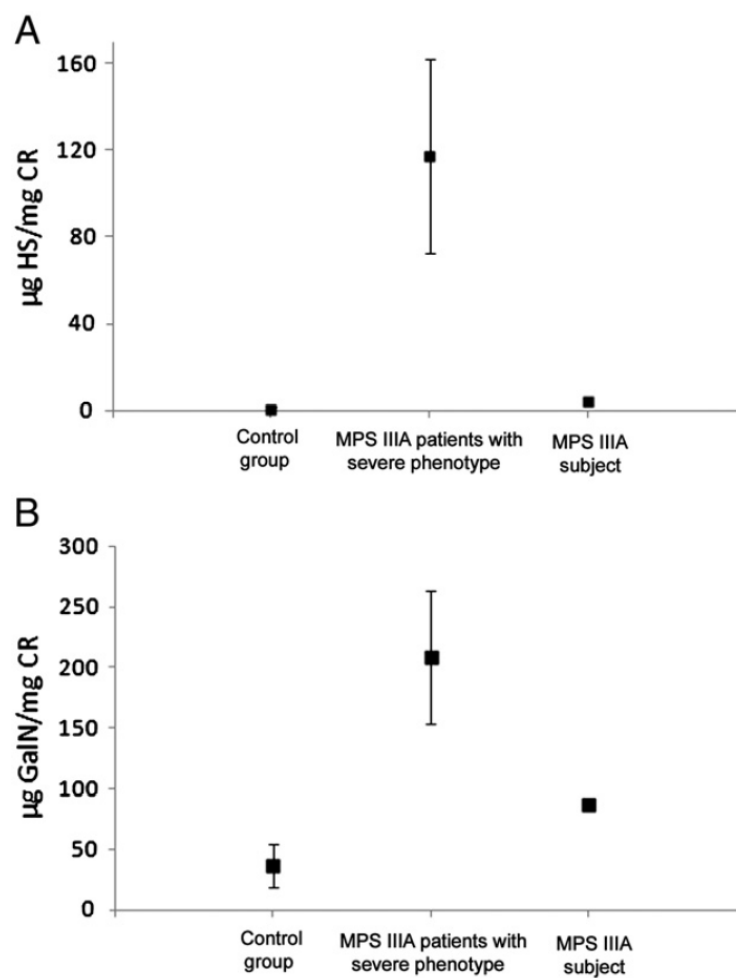


Figura 41 – C (soggetti di controllo) - P (MPS IIIA grave) - S (MPS IIIA lieve)

I risultati ottenuti sono i seguenti:

	<u>Controlli</u>	<u>MPS IIIA</u> <u>(forma lieve)</u>	<u>MPS IIIA</u> <u>(forma grave)</u>
$\mu\text{g HS/mg CR}$	0.6	4.2	117.0
$\mu\text{g GalN/mg CR}$	36	86	208



5. CONCLUSIONI

L'acido antranilico è un agente derivatizzante fluorescente comunemente impiegato per la determinazione della composizione glucidica di glicoproteine e di polisaccaridi complessi (27; 28). Il rivelatore può operare in modalità UV e/o in fluorescenza per cui si tratta di un metodo che ben si adatta alla maggioranza degli strumenti analitici sia HPCE e sia HPLC disponibili in commercio. Lo stesso approccio analitico è stato applicato nella determinazione di Glicosaminoglicani come l'eparina, il condroitin solfato e il dermatan solfato (38).

Ad oggi però nessuno studio riporta l'applicazione di un metodo simile nella diagnosi di MPS. La determinazione del contenuto di GAGs urinari sotto forma di esosamine AA-derivatizzate fornisce numerosi vantaggi. Il principale tra questi è la possibilità di discriminare i GAGs nelle due famiglie più importanti contemporaneamente alla loro determinazione quantitativa. L'idrolisi dei Glucosaminoglicani, come HS e KS, libera glucosamina (GlcN) mentre dai Galattosaminoglicani, che comprendono CS e DS, si ottiene galattosamina (GalN). In questo lavoro si è dimostrato che il rapporto tra le due esosamine costituisce un marker diagnostico importante per stabilire il tipo di MPS in esame.

La maggioranza dei metodi attualmente applicati nell'analisi delle MPS presenta alcuni svantaggi tali per cui non è ancora stato possibile approntare un protocollo universalmente valido ed economicamente sostenibile. I principali problemi sino a qui irrisolti riguardano la ridotta specificità (39; 40), la necessità di strumenti onerosi come la HPLC-ESI-MS/MS, di complessi protocolli di preparazione del campione, anche associati a passaggi di digestione enzimatica (22; 26; 40; 41), e l'incapacità di rilevare i GAGs urinari ad elevato peso molecolare.

La HPLC in UV o in fluorescenza è comunemente parte della dotazione di qualsiasi laboratorio analitico o clinico. Il più recente strumento analitico

rappresentato dalla HPCE presenta un'elevata risoluzione e un'importante produttività nell'analisi dei complessi e dei glucidi semplici (42). Nelle nostre analisi il tempo necessario a completare l'analisi in HPCE non è stato superiore a 10 minuti contro i 20-22 minuti richiesti invece per ottenere un cromatogramma in HPLC. Più di recente il metodo è stato rivisto anche per poter quantificare il contenuto di acidi uronici in modo tale da fornire una caratterizzazione più approfondita della struttura polimerica iniziale.

Il protocollo basato sulla determinazione delle esosamine proposto in questo lavoro di tesi è stato applicato a circa 80 controlli rappresentati da pazienti compresi tra un mese e 13 anni di vita. Quantitativamente abbiamo notato che i livelli delle due esosamine sono paragonabili, anche se maggiori per la glucosamina, si mantengono piuttosto bassi e non presentano un andamento dipendente dall'età anagrafica del paziente. Abbiamo notato inoltre che il rapporto GalN/GlcN è conservato sia quando calcolato in funzione dei mg di creatinina e con le curve di taratura, sia quando calcolato direttamente sulla base delle aree sottese ai picchi dell'elettroferogramma. Questo dato è importante perché consente una quantificazione diretta del rapporto senza la necessità di avere le relative curve di calibrazione.

Se confrontiamo scrupolosamente i dati ottenuti in HPCE con quelli ottenuti mediante elettroforesi in gel di agarosio è possibile ricavare un dato quanto mai rilevante (34; 43; 44; 45). Determinato che il contenuto in GAGs ricavato tramite gel è ripartito in CS e HS rispettivamente per l'85-90% e il 10-15% mentre in HPCE si presentano percentuali simili, e sapendo che il metodo elettroforetico non è capace di rilevare pesi molecolari inferiori a circa 1500 Da (34), è plausibile ipotizzare che i CS urinari siano presenti in larga misura come molecole ad elevato peso molecolare mentre gli HS siano prevalentemente in forma oligomerica con un peso molecolare non superiore al limite menzionato in precedenza. Questa considerazione è quanto mai essenziale e prova l'incapacità delle tecniche elettroforetiche classiche di quantificare correttamente il contenuto in GAGs; mediamente si

otterranno risultati quantitativi sottostimati con la possibilità di ottenere falsi negativi nel caso di rapidi screening preliminari. E' superfluo sottolineare che la mancanza di una corretta diagnosi soprattutto con questo tipo di errore è estremamente grave poiché porterebbe ad un ritardo più o meno prolungato dell'inizio di una corretta terapia con il conseguente aggravarsi dello stato fenotipico del paziente.

L'analisi dei Galattosaminoglicani plasmatici ha messo in evidenza un importante incremento del loro contenuto osservato sperimentalmente per tutte le forme di MPS.

La **Mucopolisaccaridosi di tipo I**, causata dalla deficienza dell'enzima α -L-iduronidasi, provoca l'accumulo lisosomiale di DS e di HS. Questo tipo di patologia è caratterizzato da un ampio spettro di manifestazioni fenotipiche che variano da una forma grave, Sindrome di Hurler, a forme più attenuate come la Sindrome di Hurler-Scheie e la Sindrome di Scheie. Nei nostri pazienti abbiamo osservato un incremento del contenuto totale di esosamine soprattutto nei casi più gravi. Questo è associato a una variazione del rapporto GalN/GlcN causato da un incremento maggiore dei livelli di GalN. Ad oggi non era ancora stata identificata nessuna relazione tra la diagnosi clinica e la gravità con cui si manifesta la patologia; il rapporto e il contenuto di esosamine non solo forniscono un marker diagnostico per identificare il tipo di MPS, ma anche per discriminare tra la forma lieve e quella grave della patologia. Il contenuto totale di GAGs urinari ottenuto tramite gel di agarosio incrementa di circa 9,7 volte se paragonato a quello dei controlli dimostrando l'utilità di tale tecnica per un rapido screening della MPS di tipo I. Per i motivi descritti precedentemente non si denota un incremento del contenuto di HS e, infine, non si osservano differenze quantitative tra le diverse forme di MPS I. Il contenuto di DS plasmatico è molto superiore rispetto ai controlli esaminati anche perché questo polimero costituisce il principale substrato accumulato in questo tipo di MPS.

La **Mucopolisaccaridosi di tipo II** è la sola forma X-linked ed è dovuta alla deficienza dell'enzima L-iduronato-2-solfatasi. Anche in questo caso può presentarsi in due forme clinicamente distinte, quella lieve e quella grave, biochimicamente non discriminabili. Con questo nuovo metodo è invece possibile correlarle con il contenuto totale e il rapporto delle esosamine fornendo un innovativo strumento diagnostico. Nella manifestazione lieve non abbiamo notato un incremento indicativo del contenuto totale di esosamine rispetto ai controlli ma, fortunatamente, il rapporto subisce un importante incremento dovuto all'aumento di GalN. La forma più severa mostra invece un forte incremento del contenuto totale e del rapporto causato dall'abbondanza di GalN. Da notare che il tipo I e il tipo II mostrano una risposta analitica simile causato per l'appunto dall'accumulo lisosomiale degli stessi tipi di GAGs: DS e HS. Analizzando i processi biochimici che riguardano la loro degradazione lisosomiale, è possibile spiegare il motivo per cui i livelli di GalN siano superiori rispetto alla GlcN nelle forme di MPS I e MPS II. In sostanza la concentrazione urinaria del galattosaminoglicano DS è maggiore perché questa si accumula come macromolecola in seguito alla mancata attività dell'enzima idrolitico deputato all'idrolisi dell'acido iduronico. Contemporaneamente, a causa della medesima deficienza enzimatica, occorre l'accumulo del glucosaminoglicano HS. La composizione variabile di questo GAGs permette che altre unità monomeriche siano correttamente degradate dagli enzimi funzionalmente attivi. Le porzioni correttamente degradate sono recuperate dal metabolismo anabolico mentre si verifica l'accumulo solo della parte di macromolecola che permane sotto forma di oligomeri. Anche in questo caso si osserva un incremento considerevole del contenuto di GAGs, rilevato tramite gel di agarosio, rispetto ai controlli (circa 1200%) soprattutto dovuto all'aumento di DS perché quello di HS non è correttamente quantificabile; non si osservano differenze significative tra la forma di MPS II lieve e grave. Come per la MPS I e per lo stesso motivo il contenuto di DS plasmatico è molto superiore rispetto ai controlli.

La **Mucopolisaccaridosi di tipo III** è legata alla deficienza o all'assenza di quattro enzimi diversi necessari per la degradazione specifica di HS (16; 46). Ogni singola deficienza definisce un diverso sottotipo della patologia. In questo studio abbiamo analizzato pazienti affetti dalla Sindrome di Sanfilippo del sottotipo A, B e C ma senza notare una correlazione significativa classe-specifica. Il contenuto totale di esosamine è molto superiore rispetto ai controlli; questo incremento è associato a una forte diminuzione del rapporto GalN/GlcN a causa dell'elevato accumulo di HS. Queste considerazioni possono essere utili per costruire uno screening neonatale di routine considerando che la Sindrome di Sanfilippo è la più diffusa forma di Mucopolisaccaridosi (16; 46). Tramite analisi in gel di agarosio si osserva un importante accumulo di HS ad elevato peso molecolare a cui corrisponde anche un incremento considerevole del contenuto di GAGs totali (oltre 500%) rispetto ai controlli. Non si osservano differenze tra le varie forme di MPS III. La presenza di HS ad elevato peso molecolare rende questa pratica molto utile per l'identificazione della MPS di tipo III anche considerando che la sindrome di Sanfilippo è tra le più comuni. Nonostante che l'accumulo primario sia rappresentato da HS si denota un incremento significativo anche dei Galattosaminoglicani plasmatici.

La **Mucopolisaccaridosi di tipo IV** dipende da una degradazione difettiva della glucosamina KS. L'enzima responsabile è la N-acetilgalattosamina-6-solfatasi per la forma IVA e l'enzima β -galattosidasi nella forma IVB. Non abbiamo notato variazioni significative con i controlli sia per quanto riguarda il contenuto totale e sia per il rapporto. Due pazienti affetti dalla Sindrome di Morquio di tipo IVA hanno però mostrato un contenuto totale di esosamine molto elevato soprattutto a causa di un aumento del livello di GalN. È necessario approntare un approccio analitico specifico in modo tale da ottenere altre informazioni ed eventualmente identificare quest'anomalia

come un nuovo sottotipo della patologia. L'incremento di GAGs totali valutato mediante gel di agarosio non è propriamente significativo se paragonato ai controlli. Questo dato è legato in particolar modo a 2 campioni che presentano un valore del tutto simile a quello non patologico. Non si osservano differenze tra i sottotipi di MPS IV. L'accumulo secondario di Galattosaminoglicani plasmatici è significativo soprattutto se paragonato al contenuto urinario di GAGs ottenibile tramite HPCE rispetto ai controlli (come già osservato in precedenza questa forma di MPS non presenta un accumulo urinario di GAGs paragonabile alle altre forme di MPS).

La **Mucopolisaccaridosi di tipo VI**, ereditabile in via autosomica recessiva, deriva da una deficienza funzionale legata all'enzima N-acetilgalattosamina-4-solfatasi, anche chiamato arilsolfatasi B. Abbiamo osservato importanti livelli urinari di esosamine soprattutto causate da un forte aumento di GalN. L'accumulo di DS provoca quindi un incremento molto significativo del rapporto GalN/GlcN. Dopo un'accurata ed esaustiva sperimentazione clinica, questi dati potrebbero diventare un ottimo strumento biochimico per la diagnosi di questa Sindrome. Nell'unico campione patologico a disposizione si osserva un contenuto totale di GAGs in gel di agarosio molto elevato (circa 5600%) rispetto ai controlli. Il contenuto plasmatico di Galattosaminoglicani è, proporzionalmente all'età del soggetto, significativamente più elevato rispetto ai controlli di riferimento.

Questi innovativi approcci analitici mostrano importanti differenze tra i controlli e le varie forme di MPS. Inoltre permettono di fare alcune valutazioni di carattere generali utili alla comprensione della patologia in termini di progressione e di manifestazione fenotipica. Il contenuto totale e il rapporto GalN/GlcN possono essere utilizzati come marcatori delle diverse forme patologiche, e discriminare inoltre la gravità del decorso eziologico. È stato dimostrato che questa dipende dalla quantità totale di GAGs, in forma di macromolecole ad alto peso molecolare e di oligomeri,

accumulati a livello cellulare ed escreti nelle urine. In funzione dell'elevata produttività e dell'equipaggiamento strumentale necessario relativamente semplice, è possibile ipotizzare che quest'approccio possa essere proposto come un ottimo candidato per l'istituzione di uno screening neonatale di routine a livello nazionale. In questo senso sarà necessario perfezionare gli aspetti clinici e analitici soprattutto incrementando largamente il numero di campioni a disposizione. Da aggiungere infine una breve considerazione di natura economica. Senza considerare il costo lavoro, il costo sostenuto per l'energia elettrica e l'ammortamento dell'elettroforesi capillare, abbiamo indicativamente calcolato un onere di appena 0,40€ per ciascuna analisi. Questo dato è di conforto se si considera la volontà di perfezionare il protocollo per renderlo idoneo e sostenibile per il Sistema Sanitario Nazionale.

Abbiamo dimostrato inoltre che è possibile diagnosticare in modo preliminare la patologia semplicemente andando a quantificare i Galattosaminoglicani plasmatici indipendentemente da quale sia l'accumulo primario univocamente correlato allo specifico enzima deficitario.

Tra gli argomenti di questo studio è compresa anche una dettagliata trattazione di uno specifico soggetto affetto da MPS IIIA.

Come già accennato in precedenza i sottotipi di MPS III dipendono da un insieme di 4 enzimi lisosomiali coinvolti nella degradazione dell'eparan solfato. Segni, sintomi e decorso clinico dei vari sottotipi non sono distinguibili tra loro e sono caratterizzati da un progressivo disordine neurodegenerativo. I pazienti affetti da MPS III possono però essere suddivisi in 3 gruppi fenotipici distinti sulla base della gravità con cui si manifestano i sintomi della patologia: forma grave, intermedia e lieve.

La forma grave prevede una perdita molto precoce delle normali abilità intellettuali e motorie, inoltre la morte sopraggiunge in giovane età. La forma intermedia comporta la perdita della parola in giovane età e una

parziale incapacità al movimento autonomo. Le forme più lievi presentano invece una regressione limitata delle normali funzioni intellettuali e motoria.

Il sottotipo IIIA è causato da l'enzima sulfamidasi (SGSH – EC 3.10.1.1) deficitario ed è tra le forme di MPS più diffuse; solo una piccola parte però manifesta forme fenotipiche attenuate. A dispetto dell'ampia caratterizzazione molecolare, si hanno pochissimi dati a disposizione per quanto riguarda il contenuto totale di GAGs urinari, e un solo studio è basato sul contenuto di HS urinario (37).

Le analisi hanno dimostrato che il contenuto urinario di HS per questa forma attenuata è sostanzialmente inferiore se paragonato alle forme fenotipiche tipicamente definite come gravi. Nello specifico il soggetto in esame presenta un contenuto di HS circa 7,5 volte più alto rispetto ai controlli e circa 28 volte più basso rispetto ai soggetti gravi; il contenuto di glucosamina è circa 2,4 volte più alto rispetto ai controlli e circa 2,4 volte più basso rispetto alle forme gravi. L'alto contenuto di glucosamina, se paragonato alla quantità di HS macromolecolare, dipende, come già detto in precedenza, dal fatto che la maggior parte di HS è presente come oligomero a livello urinario per cui non è rilevabile tramite gel d'agarosio mentre è correttamente quantificabile in HPLC. Con questi dati è plausibile ipotizzare che la concentrazione di HS possa essere indicativa per predire forme gravi di questo tipo di patologia.

Concludendo, a partire dal 2014 e per una durata di 3 anni sarà istituito un più ampio progetto di ricerca su base nazionale in parte basato sull'applicazione di questi metodi. Saranno disponibili alcune migliaia di campioni (plasma, urine e tessuti animali) in modo tale da generare una base statistica più consistente e, infine, cercare di ottenere un preciso ed accurato metodo diagnostico.

Bibliografia

1. Monesi, Valerio. *Istologia*. V. s.l. : Piccin, 2005. p. 49-51.
2. *A Coarse-Grained Molecular Model for Glycosaminoglycans: Application to Chondroitin, Chondroitin Sulfate, and Hyaluronic Acid*. Bathe, Mark, et al. 6, 1 Giugno 2005, The Biophysical Society, Vol. 88, p. 3870-3887.
3. Volpi, Nicola and Maccari, Francesca. Structure and activities of natural complex polysaccharides. *Glycobiology research trends*. Modena : Powell George, McCabe Oliver, 2009.
4. *Hyaluronan fragments: an information-rich system*. Stern, Robert, Asari, Akira A. e Sugahara, Kazuki N. 8, Agosto 2006, European journal of cell biology, Vol. 85, p. 699-715.
5. *Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan*. Volpi, Nicola, et al. 14, 2009, Current medicinal chemistry, Vol. 16, p. 1718-1745.
6. *Hyaluronan-mediated regulation of inflammation*. Krasiński, Rafal e Tchórzewski, Henryk. 61, 2007, Postepy Hig Med Dosw, Vol. 19, p. 683-689.
7. *Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function*. Funderburgh, James L. 10, Pittsburgh : s.n., Ottobre 2000, Glycobiology, Vol. 10, p. 951-958.
8. Volpi, Nicola. Eparina ed "LMW-Heparin". Struttura, metabolismo, funzioni. [a cura di] Lorenzo Bolognani. *Quaderni di biochimica*. Padova : Piccin, 1991, Vol. 47.
9. *Heparin. Chemistry and Clinical usage*. Kakkar, V. V. e Thomas, D. P. [a cura di] A. L. Bloom. London : s.n., 1976, Academic press.
10. *Therapeutic applications of glycosaminoglycans*. Volpi, Nicola. 15, 1 Febbraio 2006, Current Medicinal Chemistry, Vol. 13, p. 1799-1810.
11. *Inhibition of human leukocyte elastase activity by chondroitin sulfates*. Volpi, Nicola. 3, Modena : s.n., 1 Agosto 1997, Chemico-biological interactions, Vol. 105, p. 157-167.
12. *Oral absorption and bioavailability of ichthyic origin chondroitin sulfate in healthy male volunteers*. Volpi, Nicola. Modena : s.n., 2003, Osteoarthritis and cartilage, Vol. 11, p. 433-441.
13. *Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate*. Sugahara, K., et al. 5, 2003, Current opinion in structural biology, Vol. 13, p. 612-620.

14. *The portal for rare diseases and orphan drugs*. [Online] <http://www.orpha.net>.
15. *Pediatria Nutrizionale*. [Online] <http://www.wolfdesign.it/pediatrianutrizionale/index.php?PAG=1>.
16. Scriver, et al. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York : McGraw-Hill, 2001. p. 3421-3452.
17. *Japan Elaprased Treatment (JET) study: idursulfase enzyme replacement therapy in adult patients with attenuated Hunter syndrome (Mucopolysaccharidosis II, MPS II)*. Okuyama, Torayuki, et al. 2010, *Molecular genetics and metabolism* , Vol. 99, p. 18-25.
18. *Enzyme replacement therapy in Mucopolysaccharidosis VI: evidence for immune responses and altered efficacy of treatment in animal models*. Brooks, et al. 2, 1997, *Biochimica et biophysica acta*, Vol. 1361, p. 203-216.
19. *A follow-up study of MPS I patients treated with laronidase enzyme replacement therapy for 6 years*. Sifuentes, et al. 2, 2007, *Molecular genetics and metabolism*, Vol. 90, p. 171-180.
20. *Fluorophore-assisted electrophoresis of urinary carbohydrates for the identification of patients with oligosaccharidosis- and mucopolysaccharidosis-type lysosomal storage diseases*. Starr, Christopher M., et al. 1994, *Glycosilation & Disease*, Vol. 1, p. 165-176.
21. *Determination of molecular mass values of chondroitin sulfates by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE)*. Volpi, Nicola, Buzzega, Dania e Maccari, Francesca. 2010, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*.
22. *Glycosaminoglycan degradation fragments in mucopolysaccharidosis I*. Fuller, Maria, Meikle, Peter J. e Hopwood, John J. 5, 2003, *Oxford journal*, Vol. 14, p. 443-450.
23. *Dimethylmethylene blue-based spectrophotometry of glycosaminoglycans in untreated urine: a rapid screening procedure for mucopolysaccharidoses*. Jong, J.G., et al. 1989, *Clinical chemistry*, Vol. 35, p. 1472-1477.
24. *Evaluation of reliability for urine mucopolysaccharidosis screening by dimethylmethylene blue and Berry spot tests*. Mabe, et al. 1-2, 2004, Vol. 345, p. 135-140.
25. *Validation of disaccharide compositions derived from dermatan sulfate and heparan sulfate in mucopolysaccharidoses and mucopolipidoses II and III by tandem mass spectrometry*. Tomatsu S, Montañó AM, Oguma T, Dung VC, Oikawa H,

Gutiérrez ML, Yamaguchi S., et al. 2, 2010, *Molecular genetics and metabolism*, Vol. 99, p. 124-131.

26. *Determination of monosaccharides and disaccharides in mucopolysaccharidoses patients by electrospray ionisation mass spectrometry.* Ramsay, Meikle e Hopwood. 3, 2003, *Molecular genetics and metabolism*, Vol. 78, p. 193-204.

27. *Advances in fluorescence derivatization methods for high-performance liquid chromatographic analysis of glycoprotein carbohydrates.* Anumula, Kalyan R. 1, 2006, *Analytical biochemistry*, Vol. 350, p. 1-23.

28. *Determination of monosaccharides derivatized with 2-aminobenzoic acid by capillary electrophoresis.* Sato, Okubo e Yamazaki. 1, 1997, *Analytical biochemistry*, Vol. 251, p. 119-121.

29. *Comparison of cetylpyridinium chloride and cetyltrimethylammonium bromide extractive procedures for quantification and characterization of human urinary glycosaminoglycans.* Buzzega D., Pederzoli F., Maccari F., Aslan D., Turk M., Volpi N. 2010, *Clin Chem Lab Med*.

30. *Detection of submicrogram quantities of glycosaminoglycans on agarose gels by sequential staining with toluidine blue and stain-all.* Volpi N., Maccari F. 2002, *Electrophoresis*.

31. *Fine structural characterization of chondroitin sulfate in urine of bladder pain syndrome subjects.* Maccari F., Buzzega D., Galeotti F., Volpi N. 2011, *International Urogynecology Journal*.

32. *Highthroughput determination of urinary hexosamines for diagnosis of mucopolysaccharidoses by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography.* Coppa G.V., Galeotti F., Zampini L., Maccari F., Galeazzi T., Padelia L., Volpi N. 2011, *Analytical Biochemistry*.

33. *Isolation and characterization of undersulphated chondroitin-4-sulphate from normal human plasma.* Juvani M., et al. 1975, *Biochimica et Biophysica Acta*.

34. *Effect of 6 years of enzyme replacement therapy on plasma and urine glycosaminoglycans in attenuated MPS I patients.* Coppa, et al. 10, 2010, *Glycolbiology*, Vol. 20, p. 1259-1273.

35. *Microdetermination of chondroitin sulfate in normal human plasma by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE).* Volpi N., Maccari F. 2005, *Clinica Chimica Acta*.

36. *Secondary storage of dermatan sulfate in Sanfilippo disease.* Lamanna W.C., Lawrence R. et al. 2011, *Journal of Biological Chemistry*.

37. *Heparan sulfate levels in mucopolysaccharidoses and mucopolipidoses*. Tomatsu S., Gutierrez M.A., Ishimaru T., et al. 2011, Orphanet Journal Rare Disease.
38. *Quantitative capillary electrophoresis determination of oversulfated chondroitin*. Volpi, Nicola, Maccari, Francesca e Linhardt, Robert J. 2009, Analytical biochemistry, Vol. 388, p. 140-145.
39. *Clinical application of a new simple method for the identification of mucopolysaccharidoses*. Coppa, et al. 5-6, 1987, Vol. 42, p. 419-423.
40. *Analytical method for the determination of disaccharides derived from keratan, heparan, and dermatan sulfates in human serum and plasma by high-performance liquid chromatography/turbo ionspray ionization tandem mass spectrometry*. Oguma, et al. 1, 2007, Analytical biochemistry, Vol. 368, p. 79-86.
41. *Disease-specific markers for the mucopolysaccharidoses*. Fuller, et al. 5, 2004, Vol. 56, p. 733-738.
42. *Capillary electrophoresis of complex natural polysaccharides*. Volpi, Nicola, Maccari, Francesca e Linhardt, Robert J. 15, 2008, Electrophoresis, Vol. 29, p. 3095-3106.
43. *Direct quantitation of glycosaminoglycans in 2 mL of urine from patients with mucopolysaccharidoses*. Burlingame, et al. 1, 1981, Clinical chemistry, Vol. 27, p. 124-128.
44. *Anomalous structure of urinary glycosaminoglycans in patients with pseudoxanthoma elasticum*. Maccari, Francesca, Gheduzzi e Volpi, Nicola. 3, Modena : s.n., 2003, Clinical chemistry, Vol. 49, p. 380-388.
45. *Anomalous structure of urinary chondroitin sulfate from cancer patients. A potential new marker for diagnosis of neoplasias*. Dietrich, et al. 4, Aprile 1993, Vol. 68, p. 439-445.
46. *Prevalence of lysosomal storage disorders*. Meikle, et al. 3, 1999, Journal of American Medical Association, Vol. 281, p. 249-254.

