

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

DOTTORATO DI RICERCA IN
FISIOLOGIA, FARMACOLOGIA, MORFOLOGIA
E FISIOPATOLOGIA DEL SISTEMA NERVOSO
XXIII CICLO

NUOVA METODICA LC-MS/MS PER LA DETERMINAZIONE DI PEPTIDI ENDOGENI NEL PLASMA DI RATTO

Tutor:

Chiar.mo Prof. Vittorio Anania

Tesi di Dottorato di ricerca di:

Dott.ssa Elena Baralla

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Eusebio Tolu

ANNO ACCADEMICO 2009-2010

INDICE

Introduzione ...…….…….……....1

Pressione arteriosa e ipertensione ……....……...1

Sistema callicreina-chinine (KKS) ..……..…….……....4

Sistema renina-angiotensina (RAS)…..……...……..…….....7

Interazione tra i due sistemi……..……..…….….....10

Tecniche utilizzate per la quantificazione dei peptidi……..……..….11

Dosaggio Radioimmunologico (RIA)…….……..…12

Cromatografia liquida interfacciata con spettrometria di massa tandem …….…...16

Scopo del lavoro……..20

Materiali e metodi.…….……..……....22

Sostanze utilizzate……...22

Animali utilizzati.……...……..22

Valutazione dell'attività della callicreina urinaria……...……23

Prelievo di sangue dai ratti.……..……...24

Estrazione SPE della bradichinina e dell'angiotensina II dal plasma di ratto.....24

Dosaggio RIA.……..26

Dosaggio LC-MS/MS……..28

Analisi LC-MS/MS della bradichinina…….....28

Validazione del metodo…….....29

Analisi LC-MS/MS dell'angiotensina II……..31

Analisi statistica……..……31

Risultati e discussione …….……...32

Dosaggio RIA della bradichinina….……...……32

Dosaggio RIA dell'angiotensina II……...……..….33

Analisi LC-MS/MS della bradichinina……...…….35

Validazione del metodo…….……..37

Applicazione del metodo al plasma di ratto…….…....42

Analisi LC-MS/MS dell'angiotensina II……...…..44

Analisi statistica……..……47

Conclusioni……...……..48

Bibliografia…….……....50

INTRODUZIONE

Pressione arteriosa e ipertensione

L'ipertensione arteriosa è una delle patologie più diffuse, con un incidenza nella popolazione adulta del 10-20%. E' considerata un fattore di rischio per numerose manifestazioni patologiche a carico di diversi organi (cuore, cervello, rene, occhio) [1].

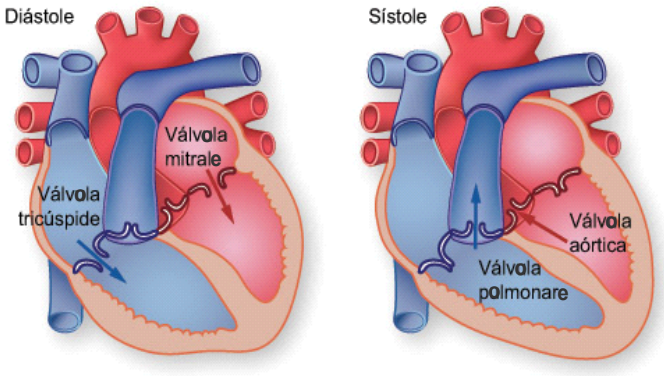
Dal punto di vista fisiologico, la pressione arteriosa è un'energia potenziale che viene convertita nel lavoro emodinamico necessario per far fluire il sangue verso i vasi periferici che irrorano i tessuti. I principali fattori che determinano il valore della pressione arteriosa sono:

- *Gittata cardiaca*, quantità di sangue espulsa dal ventricolo sinistro nell'unità di tempo.
- *Resistenze circolatorie periferiche*, il calibro dei vasi periferici, che può essere aumentato o ridotto a seconda del tono della parete.
- *Compliance dei vasi*, ovvero la loro distensibilità.
- *Volemia*, volume di sangue circolante all'interno del letto vascolare sottoposto a controllo emodinamico e renale.

Solitamente quando si misura la pressione arteriosa, ci si riferisce a due valori, indicati come "massima" e "minima"; per comprendere il loro significato, si può considerare la funzione di pompa del cuore. Ogni ciclo cardiaco comprende due fasi, una in cui il cuore si contrae e si svuota (sistole) e una in cui si distende e si colma di sangue (diastole); il flusso è regolato dalle valvole che, poste fra le cavità interne, si aprono e si chiudono in sequenza, consentendo il passaggio del sangue in una sola direzione. Le fasi di contrazione e rilassamento del cuore sono sincronizzate dal nodo seno-atriale, un

gruppo di cellule che invia impulsi elettrici ai muscoli di atri e ventricoli attraverso un sistema specializzato (Fig.1). Nella fase di *sistole* il ventricolo sinistro pompa il sangue ossigenato nell'aorta e il ventricolo destro pompa il sangue non ossigenato nelle arterie polmonari; nella fase di *diastole*, il cuore si rilassa, consentendo all'atrio destro di accogliere il sangue proveniente dal corpo e a quello sinistro di accogliere il sangue proveniente dai polmoni [2].

Fig. 1 Fase di diastole e sistole del cuore.



La pressione sanguigna è misurata da due valori espressi in millimetri di mercurio (mmHg): il valore maggiore (pressione sistolica) indica la pressione del sangue quando il cuore si contrae, mentre il valore minore (pressione diastolica) indica il tono dei vasi di resistenza. I valori pressori ottimali corrispondono a 120 mmHg per la pressione sistolica e 80 mmHg per la pressione diastolica. E' evidente che il valore soglia per definire l'ipertensione arteriosa deve essere considerato flessibile, essendo più o meno elevato a seconda dello stile di vita del soggetto. Tuttavia, si ritiene che il rischio cardiovascolare aumenti al punto di giustificare un intervento terapeutico, anche farmacologico, in presenza di valori di pressione pari o superiori a 140 mmHg per quanto riguarda la pressione sistolica e/o pari o superiori a 90 mmHg per quanto riguarda la pressione diastolica. Valori pressori compresi tra 140/90 e 160/100 sono

definiti ipertensione arteriosa di grado 1, tra 160/100 e 180/110 ipertensione arteriosa di grado 2 e, oltre i valori di 180/110, si parla di ipertensione arteriosa di grado 3.

Il controllo del sistema cardio-circolatorio avviene principalmente in 4 siti: cuore, arteriole, venule post capillari e rene. I meccanismi che giocano un ruolo fondamentale nella determinazione della pressione arteriosa, sono a loro volta distinti in base alla rapidità con cui intervengono in: controllo a breve termine e controllo a lungo termine. Il primo si esplica tramite i riflessi barocettivi, e chemiocettivi. Il secondo comprende ormoni implicati in modo diretto nella regolazione del circolo sistemico quali l'ormone antidiuretico della neuroipofisi (ADH), l'aldosterone e il sistema ad esso correlato renina-angiotensina (RAS), le chinine e le prostaglandine.

L'ipertensione può essere definita come un prolungato ed anomalo aumentato livello della pressione sanguigna, una condizione determinata principalmente da un aumento delle resistenze vascolari quale risultato di una costrizione dei vasi del letto arterioso.

Attualmente è una delle maggiori cause di malattia e di morte nei paesi civilmente più avanzati. La patogenesi è sempre complessa e possiamo fare una distinzione tra ipertensione "essenziale" e ipertensione secondaria. L'ipertensione arteriosa "essenziale" o "primaria" è una condizione morbosa multifattoriale la cui espressione è determinata dall'insieme di fattori ereditari e diversi fattori ambientali quali l'assunzione di sodio, l'obesità, il tipo di lavoro e l'ambiente in cui si vive. Questa condizione morbosa nella quale non si evidenziano chiare cause scatenanti interessa circa il 90% degli ipertesi. Nel restante 10% l'ipertensione viene definita "secondaria", poiché è riconoscibile una precisa causa quale l'insufficienza renale, l'iperaldosteronismo, alcuni tumori, ed alcune alterazioni ormonali.

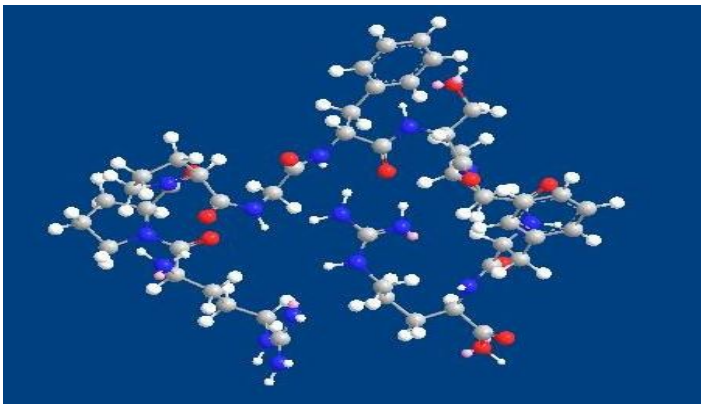
L'ipertensione rappresenta uno dei maggiori fattori di rischio per le malattie cardiovascolari determinando l'insorgenza di danno cerebrale e renale, scompenso cardiaco e malattia coronarica. In effetti il prolungato stato ipertensivo determina frequentemente alterazioni strutturali del miocardio responsabili dell'ipertrofia e successivamente della dilatazione delle pareti ventricolari (prevalentemente ventricolare sinistra) insieme ad alterazioni della parete dei vasi arteriosi che ulteriormente portano ad un aggravarsi della patologia ipertensiva [1].

Sistema callicreina-chinine (KKS)

Il sistema callicreina-chinine è costituito da polipeptidi basici (chinine) alla cui formazione concorrono principalmente sistemi enzimatici proteolitici presenti nel plasma e nei tessuti (callicreine o chininogenasi) attivati da diversi meccanismi [3]. Sono state isolate finora le seguenti chinine: bradichinina (BK), lisil-bradichinina (callidina) e metionil-lisil-bradichinina (metil-callidina). La bradichinina è un nonapeptide di sequenza aminoacidica Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg la cui struttura chimica è rappresentata in fig 2. Essa deriva dal chininogeno ad alto peso molecolare (high-molecular-weigth kininogen, HMWK) per opera della callicreina plasmatica. La callidina ha un residuo addizionale di lisina in posizione amino-terminale e viene per questo anche chiamata lisil-bradichinina; essa deriva dal chininogeno a basso peso molecolare (low-molecular-weight kininogen, LMWK) per opera della callicreina tissutale. In condizioni sperimentali, il sistema callicreina–chinine è attivato dal legame del fattore XII a superfici cariche negativamente. Il fattore XII è una proteasi comune a entrambi i sistemi delle chinine e della cascata intrinseca della coagulazione che si autoattiva e, in seguito, attiva la callicreina. La callicreina

attiva a sua volta il fattore XII, esercitando un'azione di feedback positivo sul sistema. Le chinine hanno un'esistenza labile in quanto la loro emivita plasmatica è pari a circa 15 secondi e l'80-90% delle chinine può essere distrutto da un singolo passaggio attraverso il letto vascolare polmonare.

Fig. 2 Struttura chimica della bradichinina.



La BK viene rapidamente degradata da specifici enzimi proteolitici [3]. I più importanti tra questi sono la carbossipeptidasi M ed N (CPM e CPN), conosciute come Chininasi I e l'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE) conosciuto anche come Chininasi II. La CPM e la CPN rimuovendo l'arginina carbossi-terminale della BK da luogo al metabolita attivo des-Arg^{9}-BK [4]. L'ACE, invece, è in grado di inattivare la BK catalizzando una doppia reazione idrolitica, rimuovendo prima il dipeptide carbossiterminale Phe^{8}-Arg^{9} e successivamente il dipeptide Ser^{6}-Pro^{7}. Il composto finale, il pentapeptide BK[1-5] risulta biologicamente inattivo [5]. L'ACE riconosce come substrato anche la des-Arg^{9}-BK che viene convertita anch'essa in BK[1-5] a seguito dell'idrolisi del tripeptide carbossiterminale Ser^{6}-Pro^{7}-Phe^{8} [5].

Esistono almeno due distinti recettori per le chinine, chiamati B_1 e B_2. Il recettore B_2 è espresso costitutivamente in molti tessuti normali e ad esso si legano selettivamente la bradichinina e la callidina mediando la maggior parte dei loro effetti [6]. I metaboliti delle chinine si legano invece selettivamente al recettore B_1, ed esso è assente o scarsamente espresso nella maggior parte dei tessuti. L'espressione del recettore B_1 è sovraindotta dall'infiammazione e dal danno vascolare, dalle citochine, dalle endotossine e dai fattori di crescita. In queste condizioni, gli effetti del recettore B_1 possono essere predominanti. Le concentrazioni plasmatiche di bradichinina sono difficilmente misurabili a causa dell'inadeguata inibizione delle chininogenasi o chininasi nel sangue, che può portare ad una formazione artefatta o ad una degradazione della bradichinina durante la raccolta di sangue. Così, le concentrazioni fisiologiche di bradichinina riportate oscillano tra pico e femtomolari. Le concentrazioni urinarie di callicreina sono più basse negli individui con ipertensione arteriosa [7,8]. In animali da esperimento e nell'uomo, l'infusione di bradichinina causa vasodilatazione e diminuzione della pressione arteriosa. La BK causa vasodilatazione attivando i suoi recettori B_2 espressi sulle cellule endoteliali. Questa dilatazione endotelio-dipendente è mediata dal nitrossido, dalla prostaciclina e dall'acido epossieicosatrienoico che è un metabolita dell'acido arachidonico.

La disponibilità di antagonisti specifici della bradichinina e di animali geneticamente modificati ha fortemente contribuito alla comprensione del ruolo della bradichinina endogena nella regolazione della pressione sanguigna [9]. La pressione arteriosa basale è normale negli animali trattati con antagonisti del recettore B_2 o in topi B2-knockout. Tuttavia questi animali mostrano una pressione arteriosa abnorme in risposta ad un carico salino o all'attivazione del sistema renina-angiotensina. Questi risultati

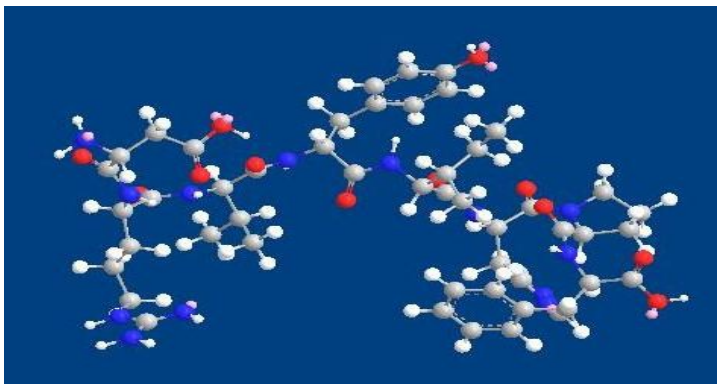
suggeriscono che il sistema endogeno callicreina-chinine giochi un ruolo non secondario, ma ancora poco conosciuto, nella regolazione della pressione arteriosa in circostanze normali. Il KKS sembra inoltre avere effetti cardioprotettivi. La bradichinina contribuisce all'effetto protettivo del precondizionamento del cuore contro il danno da ischemia e riperfusione [10]. In presenza di cellule endoteliali la BK previene la crescita e la proliferazione del muscolo liscio vasale. Inoltre stimola la liberazione del tPA dall'endotelio vascolare e può inibire la trombina [11, 12]. Attraverso questi meccanismi, la BK può contribuire alle difese endogene contro eventi cardiovascolari quali l'infarto del miocardio e l'ictus. Le chinine possono anche aumentare l'attività del sistema nervoso simpatico tramite meccanismi sia centrali che periferici [13-15].

Sistema renina-angiotensina (RAS)

Attualmente il sistema renina-angiotensina è riconosciuto tra i principali sistemi di regolazione dell'omeostasi cardiovascolare, per cui svolge un ruolo importante nella patogenesi dell'ipertensione arteriosa nonché di altre patologie cardiovascolari, come lo scompenso cardiaco. I fattori di regolazione più importanti di tale sistema sono alcuni enzimi, renina e ACE, un substrato, l'angiotensinogeno, i peptidi attivi, angiotensina I (Ang I) e angiotensina II (Ang II), e recettori, soprattutto gli AT_1. Il principale fattore regolatorio di tale sistema è l'Ang II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) la cui struttura chimica è rappresentata in fig.3. La sintesi dell'Ang II avviene a partire dall'angiotensinogeno per opera della renina, una glicoproteina prodotta dalle cellule mioepiteliali dell'apparato juxta-glomerulare del nefrone. La liberazione di renina da parte del rene è regolata da segnali provenienti da diversi sistemi recettoriali quali:

barorecettori delle pareti vasali, chemorecettori situati lungo il tubulo distale del nefrone e sensibili alla concentrazione di Na^+ nella preurina e recettori adrenergici di tipo α e di tipo β. L'Ang I, prodotta dall'angiotensinogeno, viene trasformata in Ang II ad opera dell'ACE. Quest'ultimo è una glicoproteina che, pur essendo particolarmente abbondante nel tessuto polmonare, è stata ritrovata anche nel tessuto cerebrale, nell'endotelio vascolare, nella maggior parte dei liquidi organici, nell'orletto a spazzola dell'epitelio mucoso intestinale, nelle cellule epiteliali del tubulo prossimale del nefrone, nella prostata e nella linfa renale. Un'ulteriore funzione dell'ACE come abbiamo già sostenuto prima è quella di degradare la bradichinina, a metaboliti inattivi.

Fig. 3 Struttura chimica dell'angiotensina II.



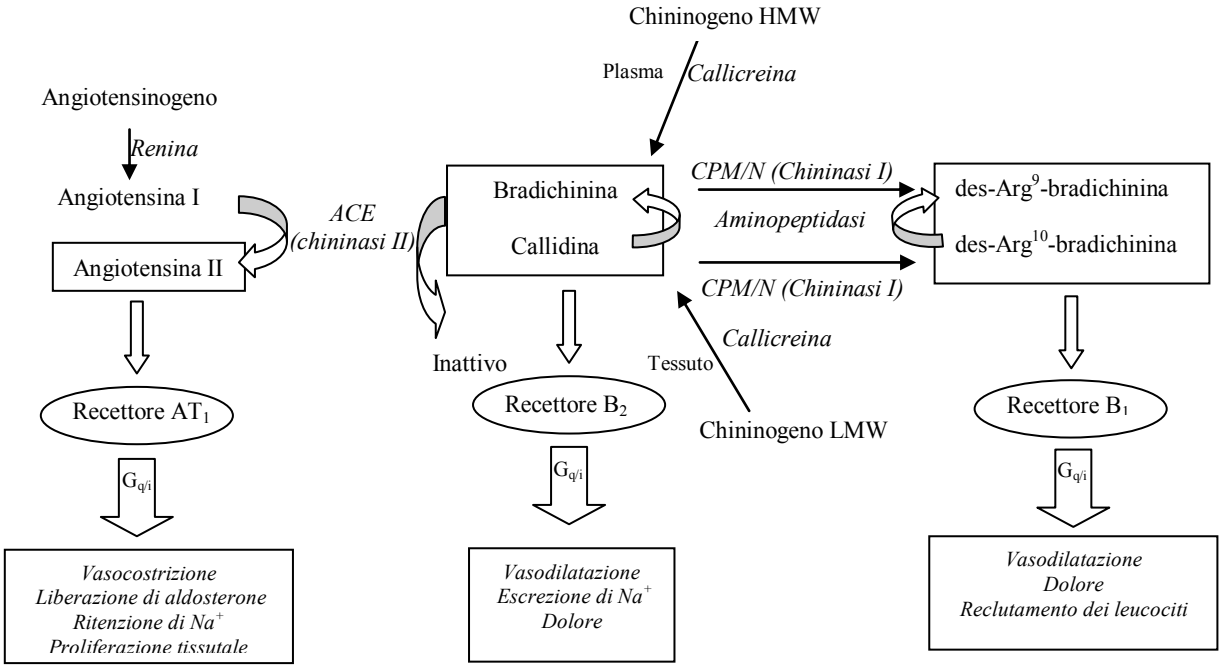
L'Ang II agisce legandosi a specifici recettori localizzati a livello delle fibrocellule muscolari lisce della parete delle arteriole, dove media la contrazione, e a recettori presenti nella ghiandola surrenale, nella quale stimola l'increzione di aldosterone, con conseguente ritenzione idrosalina ed aumento della volemia e della pressione arteriosa [1]. In aggiunta essa è dotata anche di un forte potere fitogeno e trofico a livello

vascolare. Inoltre si riconosce all'Ang II la capacità di indurre la sintesi di endotelina con un potenziamento della sua attività vasocostrittrice. L'Ang II attiva anche la tiroxina idrossilasi e i recettori presinaptici del neurone adrenergico, promovendo la liberazione e riducendo la ricaptazione di catecolamine. A tutt'oggi sono stati identificati diversi recettori dell'Ang II, ma soltanto due, denominati AT_1 e AT_2 , sono dotati dei requisiti richiesti dall'IUPHAR (Comitato Internazionale di Farmacologia) [16]. Il recettore AT_1 è distribuito prevalentemente a livello dei vasi sanguigni, dei reni, del surrene, del fegato, del polmone, del cervello, del cuore e dell'utero. Esso media la vasocostrizione, la contrazione del miometrio, la produzione e la liberazione dell'aldosterone, il rilascio di catecolamine, il riassorbimento di acqua e sodio, la crescita delle cellule muscolari lisce a livello vascolare, quella dei cardiomiociti e dei fibroblasti cardiaci. Il recettore AT_2 è distribuito a livello del surrene, del rene, dell'utero, del cervello, dei tessuti mesenchimali (feto), dei cardiomiociti, delle cellule endoteliali e dei fibroblasti. I ruoli funzionali del recettore AT_2 non sono stati ancora definiti in modo inequivocabile. Nonostante ciò, alcuni dati suggeriscono che il recettore AT2 sia in grado di esercitare effetti antiproliferativi, proapoptotici e vasodilatatori [17-19]. L'angiotensina II viene degradata ad angiotensina III (Ang III) ed altri metaboliti che possono presentare anch'essi attività farmacologica. Infine, il sistema renina-angiotensina interagisce con numerosi sistemi e mediatori che modulano la pressione arteriosa. Interferisce, infatti, con il sistema nervoso simpatico, con quello prostaglandinico, con il dopaminergico, il serotoninergico, con il rilascio del fattore natriuretico atriale, con le endoteline e con l'ossido nitrico [1].

Interazione tra i due sistemi

Il KKS e il RAS sono intimamente connessi giacché esistono interazioni fra i due sistemi ad almeno due livelli: uno biochimico e uno fisiopatologico (fig. 4). Il primo è dato dal fatto che l'enzima ACE è presente in entrambi i sistemi e svolge quindi una funzione strategica per regolarne il bilancio. ACE genera Ang II attivo e, contemporaneamente, inattiva la BK; quindi il suo effetto è proipertensivo e gli ACE-inibitori sono efficaci composti antipertensivi [20]. L'aumento pressorio causato dall'ACE è legato quindi da una parte ad un aumento dell'angiotensina II e dall'altro alla degradazione della bradichinina. Mentre Ang II è un potente vasocostrittore che causa anche liberazione di aldosterone e ritenzione di Na^+ [21] mediante attivazione del recettore AT1, BK è un agente vasodilatante che stimola l'escrezione di Na^+ attivando il recettore B2. L'interazione fisiopatologica tra i due sistemi è data perciò dal fatto che hanno funzioni diametralmente opposte sulla pressione arteriosa; questo permette quindi un doppio controllo dei valori della pressione sistemica.

Fig. 4 Interazioni recettoriali dei sistemi callicreina-chinina e renina-angiotensina.



Tecniche utilizzate per la quantificazione dei peptidi

In letteratura sono presenti diversi tentativi di quantificare i peptidi bioattivi nei fluidi biologici e la tecnica solitamente usata è il dosaggio radio-immunologico (RIA) [22, 23]. Questo metodo tuttavia, pur presentando una notevole sensibilità, non è abbastanza selettivo a causa della cross-reattività, dato che gli anticorpi che vengono usati non sono in grado di discriminare tra peptidi correlati strutturalmente. L'accurata quantificazione presenta quindi dei limiti e i dati vanno interpretati con cautela [24]. I valori riportati in letteratura riferiscono concentrazioni di Ang II dell'ordine delle femtomoli per millilitro di plasma [25-27], mentre le concentrazioni di bradichinina misurate secondo il metodo radio-immunoenzimatico, variano largamente tra femtomoli e picomoli per millilitro di

plasma [22, 23, 28]. Questa variazione è probabilmente dovuta a diversi fattori tra cui possiamo ricordare la rapida degradazione e l'attività paracrina del peptide. Una tecnica quantitativa molto più selettiva prevede l'utilizzo della spettrometria di massa. Recentemente sono stati pubblicati dei lavori in cui viene descritto un metodo di analisi quantitativa per la BK nel dializzato del tessuto muscolare di ratto [29] e per il metabolita stabile BK1-5 nel sangue umano, utilizzando la cromatografia liquida interfacciata con la spettrometria di massa (LC-MS) [30]. Un lavoro ancora più recente descrive un metodo di quantificazione per la BK nel plasma umano utilizzando la spettrometria di massa tandem e riporta concentrazioni di BK dell'ordine di ng/ml [31]. Attualmente la spettrometria di massa è il metodo d'elezione per quanto riguarda la quantificazione dei peptidi. Questa tecnica è in grado di separare peptidi di differenti masse che co-eluiscono e inoltre anche specifici frammenti molecolari possono essere identificati e usati per la quantificazione [24].

Dosaggio Radioimmunologico (RIA)

Il dosaggio radioimmunologico è un metodo analitico che unisce la specificità di una reazione immunologica (con formazione di un complesso antigene-anticorpo) con la sensibilità di un metodo radiochimico. Questa tecnica è stata descritta per la prima volta dai dottori Yalow e Berson nel 1959, che la utilizzarono per la prima volta nel dosaggio dei livelli plasmatici di insulina nell'uomo. Da allora, il dosaggio radioimmunologico si è sviluppato ed è diventato la tecnica di routine per dosaggio di ormoni, farmaci, vitamine, enzimi, virus, markers tumorali, e un'infinità di altre sostanze sia in campo clinico che nella ricerca. I tre componenti chiave di un dosaggio RIA sono:

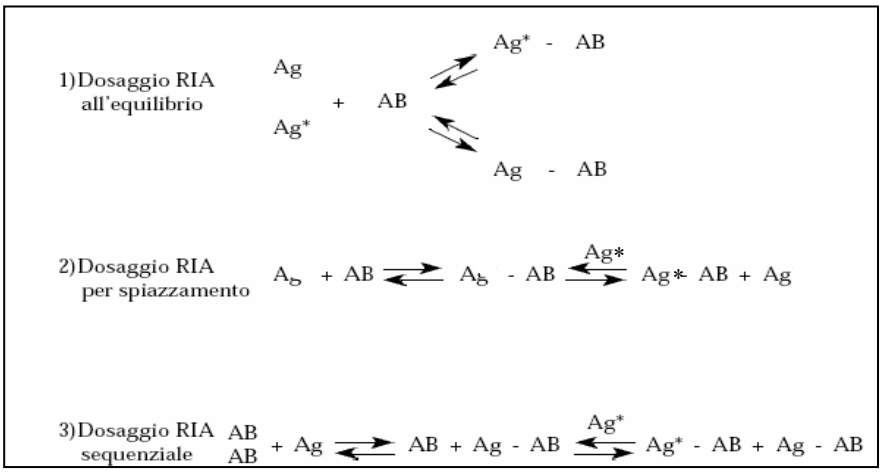
- *L'anticorpo (antisiero)*: è una proteina sierica, prodotta dalle cellule linfoidi che appartiene alla famiglia delle immunoglobuline. Questo ha la capacità di reagire con l'antigene o con una configurazione antigenica responsabile della sua produzione. Gli anticorpi utilizzati nel dosaggio radioimmunologico devono essere specifici, sensibili, e avere una costante di affinità accettabile.
- *L'antigene*: In immunologia, l'antigene viene definito una sostanza capace di indurre la produzione di anticorpi. Nel dosaggio RIA, l'antigene corrisponde spesso al composto (presente nel campione del paziente) che deve essere misurato e al quale si legherà l'anticorpo.
- *L'antigene marcato*: può essere identico all'antigene che deve essere misurato nel campione del paziente (o possedere una capacità legante simile) pur non essendo necessaria un'identica attività biologica. Inoltre esso contiene uno o più atomi di un particolare isotopo radioattivo. La validità di un dosaggio RIA dipende da un identico comportamento immunologico dell'antigene nel campione in esame con l'antigene degli standards di riferimento.

L'isotopo più comunemente utilizzato per la formazione dell'antigene marcato è lo Iodio 125 (^{125}I). Questo ha un'emivita di 60 giorni, ed emette radiazioni di tipo gamma. Il trizio (^{3}H) viene utilizzato tuttora per il dosaggio di numerosi steroidi e farmaci. Esso emette radiazioni beta (questo richiede un sistema per la rilevazione a scintillazione liquida), e ha un'emivita di 12 anni. Il cobalto emette radiazioni gamma, ha una emivita di 267 giorni e viene utilizzato solo per il dosaggio della cobalamina (vitamina B12). Esistono tre tipi generali di RIA che utilizzano nella reazione l'antigene marcato (Fig. 5). Questi sono:

Dosaggio all'equilibrio: Questa tecnica prevede l'incubazione simultanea di antigene, antigene marcato, e anticorpo ed è la forma più comune del RIA.

- *Dosaggio per competizione di legame*: Con questa tecnica, l'antigene non marcato (Ag) forma i complessi con l'anticorpo (Ab). Quindi viene aggiunto l'antigene marcato (Ag*) ai complessi Ag-Ab, che spiazza l'antigene non marcato (Ag) dai complessi formati. Quando la concentrazione dell'antigene nel campione aumenta, la quantità di peptide marcato capace di legarsi all'anticorpo diminuisce. La concentrazione del peptide nel campione viene valutata sulla base di una curva standard costruita riportando il segnale radioattivo (CPM: colpi per minuto) in funzione della concentrazione dell'antigene standard.
- *Dosaggio sequenziale*: In questo sistema, si mette a reagire l'antigene non marcato o il campione in esame con una quantità misurata di anticorpo. Poiché questa reazione avviene in eccesso di anticorpo saranno disponibili ancora siti leganti anticorpali. Si aggiunge quindi l'antigene marcato, che andrà a saturare i restanti siti anticorpali liberi. Per alcuni composti questo metodo offre una maggiore sensibilità, ma risente della riduzione del range di concentrazione che può essere misurato[32].
-

Fig. 5 Tipi di dosaggio RIA.



Una fondamentale esigenza di qualsiasi dosaggio RIA è quella di separare l'antigene libero, marcato e non marcato, dall'antigene legato all'anticorpo specifico. Idealmente, questa procedura dovrebbe essere netta (fornire una completa separazione delle frazioni libera e legata), non influenzata dal siero o altre sostanze non specifiche, riproducibile, tecnicamente semplice, rapida, poco costosa, e non dovrebbe interferire con la reazione antigene-anticorpo. La tecnica di separazione del doppio anticorpo ha ottenuto un notevole successo nel RIA. Il metodo si propone di precipitare il prodotto solubile della prima reazione (Antigene-Anticorpo1) con l'aggiunta di un secondo anticorpo diretto contro l'Anticorpo1. Questo causa la formazione di un immunocomplesso insolubile (Antigene-Anticorpo1-Anticorpo2). Le diluizioni o le concentrazioni del primo anticorpo usato nel RIA sono in genere basse. Il precipitato formato col secondo anticorpo può essere così troppo piccolo per un lavoro accurato e per la separazione. Per questa ragione, per aumentare la massa del precipitato, alla miscela di reazione vengono aggiunti siero normale di coniglio, siero normale di porcellino d'India o gamma globulina. Il precipitato formato può essere quindi raccolto per centrifugazione.

Cromatografia liquida interfacciata con spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS)

L'accoppiamento LC-MS (liquido-massa) è stato sviluppato solo negli ultimissimi anni, a causa della difficoltà di introdurre un liquido in un sistema ad alto vuoto come quello dello spettrometro di massa (MS), ma ha potenzialmente una straordinaria capacità diagnostica. L'interfacciamento tra un sistema cromatografico e un rivelatore non convenzionale come MS è spesso definito *ifenazione*. La miscela di eluenti che costituiscono la fase mobile viene scelta in base alle caratteristiche dell'analita interessato. Il sistema di ionizzazione usato dallo strumento è la ionizzazione electrospray (ESI). Esso prevede l'applicazione di una tensione ionizzante lungo l'ago nebulizzatore collegato all'uscita del cromatografo LC. Si ha la formazione di una nebulizzazione molto fine da cui il solvente può essere rapidamente rimosso. Le piccole particelle vengono quindi ionizzate da una scarica a corona a pressione atmosferica e trascinate dal flusso continuo delle particelle e da un basso potenziale elettrico che spinge le particelle cariche positivamente, attraverso un piccolo orifizio, verso lo spettrometro di massa sotto vuoto. Si ottiene quindi uno spettro massa/carica (*m/z*) dell'analita, caratterizzato dal picco della molecola meno un elettrone, oppure dal picco della specie deprotonata, cioè peso molecolare meno 1 unità di massa atomica (u.m.a.), o ancora da picchi relativi a frammenti della molecola originaria. L'informazione che si ottiene dal rivelatore a spettrometria di massa può essere gestita effettuando una lettura

in scansione o una lettura solitamente caratterizzata dal picco dello *ione molecolare*, corrispondente al peso molecolare (PM) in Single Ion Monitoring (SIM);

Uno strumento a triplo quadrupolo, oltre alle funzionalità dello strumento a singolo quadrupolo, ne possiede ulteriori. È possibile operare infatti in "product ion scan", dove il primo quadrupolo seleziona uno ione di rapporto *m/z* fissato, dopo la frammentazione il terzo quadrupolo effettua una scansione su un determinato range di massa. Nella modalità "parent ion scan" invece è il terzo quadrupolo che è sintonizzato permanentemente su un dato *m/z*, mentre il primo quadrupolo lavora in scansione su un range di massa. Questa modalità permette di individuare classi di molecole strutturalmente simili. Nella modalità "neutral loss scan" invece, entrambi i quadrupoli lavorano in scansione. È possibile così individuare facilmente classi di molecole che hanno in comune una parte della struttura. Le modalità "parent ion scan" e "product ion scan" sono utili soprattutto per studi sul metabolismo. Un'ulteriore modalità, "single ion monitoring" (SRM) viene utilizzata per l'analisi quantitativa nei sistemi accoppiati con la cromatografia liquida o la gas cromatografia. In questo caso l'identità della molecola è nota a priori ed il primo quadrupolo è fissato su di un valore determinato di *m/z*, mentre il terzo su quello di un frammento. Questa modalità permette di aumentare la specificità del sistema di rivelazione. Nel caso venga selezionato più di un frammento si parla di "multiple reaction monitoring" (MRM) [33].

Il procedimento di sviluppo e validazione di un metodo analitico deve necessariamente affrontare le problematiche legate al cosiddetto *effetto matrice* [34], ossia un'alterazione dell'efficienza della ionizzazione dovuta alla presenza di sostanze coeluenti che può seriamente compromettere l'affidabilità dei risultati. Questo problema si osserva soprattutto quando si devono analizzare analiti presenti in una matrice biologica

complessa. Il metodo più efficace per tenere sotto controllo tale effetto è l'utilizzo di uno standard interno. Quest'ultimo è una molecola che viene aggiunta al campione da analizzare prima del processo estrattivo e segue poi tutte le fasi preparative a cui viene sottoposto lo stesso campione. Lo standard interno deve essere scelto in base a determinate caratteristiche, infatti deve essere: puro, non presente nel campione, deve dare un picco cromatografico ben risolto e inoltre deve essere aggiunto al campione ad un livello di concentrazione simile a quello dell'analita e dare un segnale paragonabile a questo. L'effetto matrice, tenendo conto dello standard interno, (NMF=normalized matrix factor) viene calcolato come rapporto tra Area analita/Area I.S in presenza e in assenza di matrice. Se NMF risulta uguale a 1, non si ha l'effetto matrice; se NMF è > 1 si ha il cosiddetto enhancement ionization, ossia un potenziamento del segnale dell'analita; se NMF è < 1 si ha l'effetto di soppressione ionica ossia un abbassamento del segnale. Il metodo sviluppato deve infine essere sottoposto a validazione. La validazione di un metodo bioanalitico è lo studio necessario a dimostrare che un metodo per la determinazione quantitativa di un analita in una matrice biologica è adatto al suo scopo [35]. I parametri fondamentali per la validazione di un metodo bioanalitico sono: *selettività*, *accuratezza*, *precisione*, *recupero*, *range di linearità*, e *stabilità* dell'analita nei campioni fortificati. La *selettività* è la capacità di un metodo analitico di differenziare e quantificare l'analita in presenza di altri componenti nel campione; l'*accuratezza* descrive la vicinanza del valore medio ottenuto, al valore vero (concentrazione) dell'analita. Essa viene determinata con l'analisi in replicato di campioni contenenti quantità note di analita e il valore medio ottenuto dovrebbe essere compreso entro il 15% del valore vero; La *precisione* descrive la vicinanza delle misure individuali quando il metodo è applicato ripetutamente. La precisione determinata ad

ogni livello di concentrazione non dovrebbe eccedere il 15% del coefficiente di variazione (CV) mentre la più bassa concentrazione quantificabile (LLOQ) non dovrebbe essere superiore al 20% del CV; Il *recupero* dell'analita viene misurato comparando i risultati analitici dei campioni estratti con quelli ottenuti da campioni standard non estratti che rappresentano il 100% del recupero. Il recupero di un analita e dello standard interno deve essere consistente, preciso e riproducibile. La *curva di calibrazione* rappresenta la relazione tra la risposta dello strumento e concentrazioni conosciute dell'analita. Dovrebbe essere preparata nella stessa matrice biologica dei campioni aggiungendo alla matrice concentrazioni note di analita. Il punto più basso nella curva di calibrazione rappresenta l'LLOQ e questo deve avere una risposta almeno 5 volte maggiore a quella del bianco. Il picco della concentrazione che rappresenta l'LLOQ deve essere identificabile, discreto, e riproducibile con una precisione del 20% e un'accuratezza compresa tra 80% e 120%; la *stabilità* di un analita in una matrice biologica è funzione delle condizioni di stoccaggio, delle sue proprietà chimiche e della matrice. Essa deve essere valutata durante la raccolta e la preparazione del campione, a lungo termine, a breve termine e dopo cicli di congelamento e scongelamento.

SCOPO DEL LAVORO

Nell'ambito di uno studio sui meccanismi patogenetici dell'ipertensione, presso il Settore di Farmacologia del Dipartimento di Biologia Animale è stato selezionato, mediante la tecnica di inbreeding (accoppiamento tra ratti consanguinei), un ceppo di ratti con bassi livelli urinari di callicreina. E' stato ipotizzato che questo ceppo avesse concentrazioni di chinine più basse rispetto ad un ceppo a callicreina urinaria normale utilizzato come controllo (NC). In accordo con questa ipotesi, i ratti a bassa escrezione urinaria di callicreina (BC), mostrano una maggiore sensibilità a sviluppare ipertensione in seguito a stimoli esterni quali eccesso di sale nella dieta [9] o somministrazione di cadmio [36]. Inoltre il ceppo di ratti BC presenta un alterato fenotipo renale con polidipsia, poliuria e un aumento dei livelli di GFR [37]. Per queste ragioni, è possibile che un difetto nel KKS possa aver causato un aumento della sensibilità all'Ang II endogena nei ratti BC. In effetti è possibile che a causa della loro ridotta callicreina urinaria, questi animali presentino dei cambiamenti sistemici nel sistema chinina-callicreina, ed in tal modo, non siano più in grado di compensare gli effetti vasocostrittori del RAS. Al fine di valutare come la diminuzione della callicreina influenzi la produzione dei principali mediatori del RAS e del KKS, è importante vedere come variano le concentrazioni plasmatiche dei due peptidi nel ceppo di ratti a callicreina urinaria normale e in quello a bassa callicreina urinaria. Lo scopo del presente lavoro è quindi quello di trovare un metodo quantitativo selettivo e ad elevata sensibilità per il dosaggio della bradichinina e dell'angiotensina II nel plasma dei due ceppi di ratti sopra menzionati. In letteratura sono presenti diversi tentativi per

quantificare i peptidi bioattivi nei fluidi biologici e la tecnica usata solitamente è il dosaggio radio-immunologico (RIA) che presenta però il problema della cross-reattività. I valori riportati in letteratura riferiscono concentrazioni di Ang II dell'ordine delle femtomoli per millilitro di plasma [25-27], mentre le concentrazioni di bradichinina misurate secondo il metodo radio-immunoenzimatico, variano largamente tra femtomoli e picomoli per millilitro di plasma [22, 23, 28]. Negli ultimi anni sta riscontrando notevole successo in campo analitico l'analisi quantitativa mediante spettrometria di massa. Quest'ultima è una tecnica molto più selettiva, essendo anche in grado di distinguere peptidi di massa diversa che co-eluiscono.

MATERIALI E METODI

Sostanze utilizzate

I solventi di grado HPLC e gli standard dei peptidi utilizzati in questo lavoro sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich (Milano, Italia). Sar-D-Phe^{8}-des-Arg^{9} – bradykinin usato come standard interno e i kits RIA sono stati acquistati dalla Phoenix Pharmaceuticals (Karlsruhe, Germany). L'aprotinina è stata acquistata da MP Biochemicals (Verona, Italia). Il plasma bovino è stato ottenuto da Innovative Research (Novi, MI, USA). L'acqua Milli Q deionizzata e bidistillata è stata preparata con un apparecchio Milli Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). Le colonnine STRATA X (100 mg/ml) usate per l'estrazione in fase solida (SPE) sono state acquistate dalla ditta Phenomenex (Torrance, CA, USA) e montate su un sistema da vuoto VacElut (Supelco at Sigma Aldrich, Milano, Italia).

Animali utilizzati

Per questo studio sono stati utilizzati 46 ratti. Di questi, 23 ratti erano a bassa callicreina urinaria (BC) e provenivano da una linea selezionata nel Settore di Farmacologia del Dipartimento di Biologia Animale dell'Università degli Studi di Sassari, con la tecnica di inbreeding tra ratti consanguinei sulla base dei livelli urinari di callicreina [38, 39] e 23 erano a callicreina urinaria normale (NC) e appartevano al ceppo Wistar Morini (Reggio Emilia, Italia). Tutti i 46 ratti utilizzati in questo studio erano del peso corporeo di 300-320 g. I ratti a callicreina normale (in media 29,2±2,4 nKat/24h) sono stati utilizzati come controllo dei ratti a bassa callicreina (in media 10,3±3,2 nKat/24h). Tutti i ratti utilizzati in questo lavoro sono stati stabulati a temperatura (24±1°C) ed umidità

(60% ±5) costanti, con un ciclo luce-buio di 12 ore (condizioni di stabulazione riportate nell'art. 5 del D.L. del 27/1/92 n°116) e con libero accesso all'acqua e al cibo (dieta standard per ratti di Mucedola, Milano, Italia). Tutte le procedure sono state eseguite nel rispetto degli standard stabiliti dalla "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (Institute of Laboratory Animal Resources National Academy of Science, Bethesda, Md). Per la determinazione della callicreina urinaria (U_{Kall}), una settimana prima dell'esperimento, venivano raccolte le urine basali di tutti i ratti stabulati in gabbie metaboliche singole per 24 ore. Durante la raccolta i ratti avevano libero accesso all'acqua ma non al cibo.

Valutazione dell'attività della callicreina urinaria

L'attività della callicreina urinaria è stata misurata, in entrambi i ceppi di ratti, utilizzando un substrato sintetico, H-D-Val-Leu-Arg-pNA (S2266) (Chromogenix-Instrumentation Laboratory, Milano, Italia), seguendo la metodica di Amundsen et al. 1979 [40], modificata aggiungendo al buffer d'incubazione (TRIS-buffer pH 8,2, ICN, Milano, Italia) un inibitore della tripsina della soia (SBTI, 300 μg/ml Sigma-Aldrich, Milano, Italia) allo scopo di inibire gli enzimi tripsino-simili, contenuti nelle urine [41]. Poiché le urine contengono diverse proteasi tripsino-simili che potrebbero potenzialmente idrolizzare l'S2266, l'aggiunta di SBTI, che inibisce la maggior parte delle proteasi ma non la callicreina ghiandolare, è necessaria per migliorare la specificità della metodica.

La metodica si basa sull'idrolisi del substrato S2266, da parte della callicreina urinaria, con rilascio di paranitroanilina (pNA), che è proporzionale alla concentrazione di callicreina. L'aumentata densità ottica, proporzionale alla velocità di formazione della

pNA viene misurata a 405 nm con metodo spettrofotometrico (Spettrofotometro Beckman 530) contro il suo bianco al quale veniva aggiunta aprotinina (Trasylol buffer, Sigma-Aldrich, Milano, Italia), un inibitore della callicreina ghiandolare. L'attività della callicreina veniva espressa in nKat/ml di urine intendendo per 1 kat la capacità dell'enzima di rilasciare 1 mole di pNA/sec.

Prelievo di sangue dai ratti

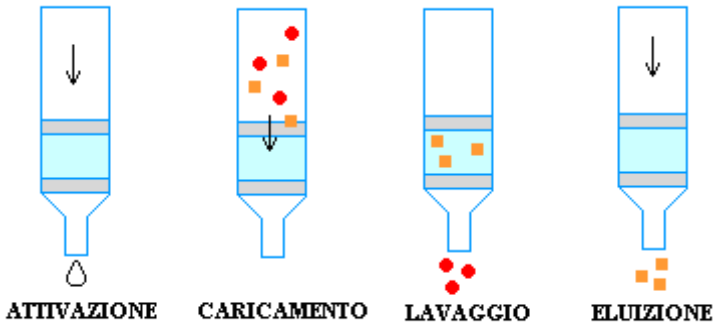
I ratti sono stati anestetizzati con etere e i prelievi effettuati dal cuore con l'utilizzo di un ago e camicia. Per prevenire la coagulazione durante il prelievo, l'ago è stato avvinato con eparina. Il sangue è stato raccolto in provette contenenti EDTA. Dopo aver agitato lentamente le provette per evitare la coagulazione, il sangue è stato trasferito in provette contenenti l'inibitore della callicreina, aprotinina (0,6TIU/ml sangue) e centrifugato a 2700 rpm per 15 minuti a 4°C. Il plasma raccolto è stato aliquotato in eppendorf da 2 ml e conservato in freezer a –80°C prima di procedere con la metodica estrattiva.

Estrazione in fase solida (SPE) della bradichinina e dell'angiotensina II dal plasma di ratto

1 ml di ciascun campione di plasma (addizionato di 20 µl di soluzione di standard interno per la bradichinina) è stato acidificato con un uguale quantità di acido trifluoroacetico di grado HPLC all'1% in H_2O (Buffer A). Il plasma acidificato è stato centrifugato a 14500 rpm per 20 minuti a 4°C e il surnatante così ottenuto è stato sottoposto ad estrazione in fase solida utilizzando colonnine Strata X collocate su un sistema Speed-Vac. La colonnina è stata equilibrata con 1 ml di acetonitrile al 60%

contenente acido trifluoroacetico all'1% (Buffer B) seguito da 3 ml di Buffer A. Nei passaggi successivi non si è utilizzato il vuoto. La soluzione di plasma acidificato è stata caricata sulla colonnina SPE pre-trattata. La colonnina è stata quindi lavata con 2 ml di Buffer A. Dopo aver fatto andare a secco la colonnina, il peptide è stato eluito lentamente con 2 ml di Buffer B e raccolto in apposite eppendorf. (Fig 6).

Fig. 6 Schema di estrazione in fase solida (SPE).

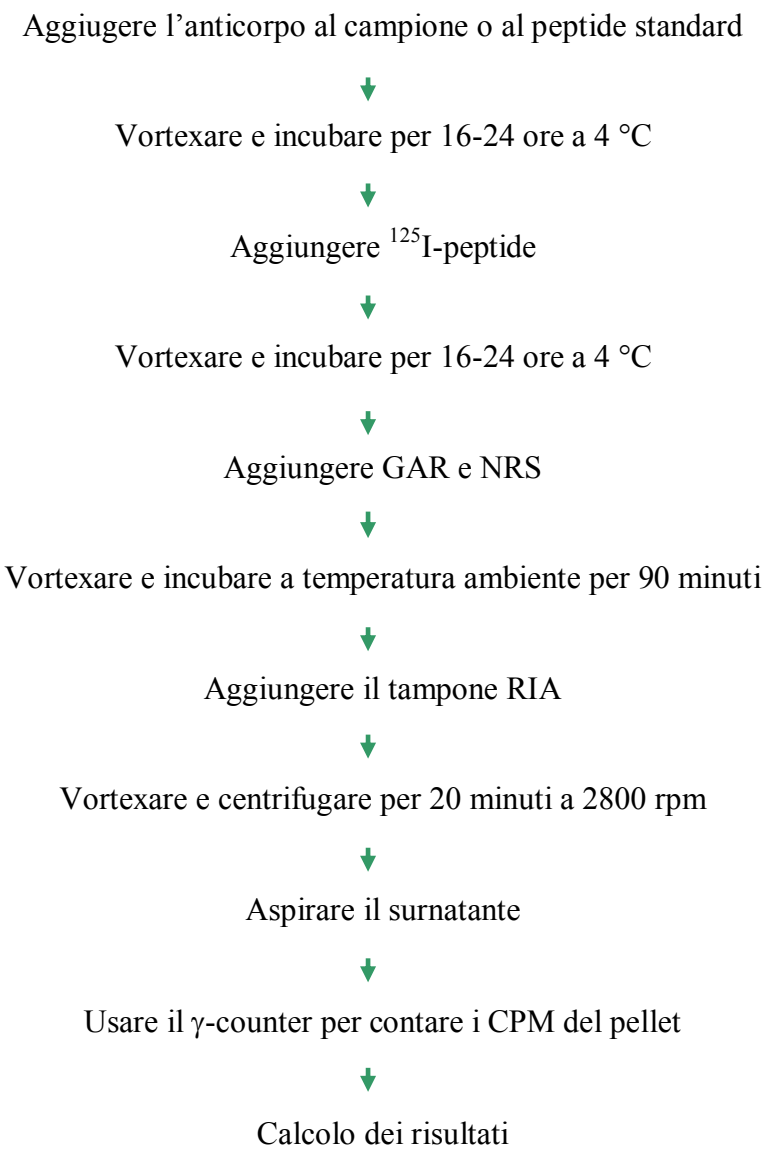


Per portare a secco il campione abbiamo seguito due diverse procedure a seconda che esso dovesse essere analizzato secondo la tecnica immunoenzimatica RIA o mediante LC-MS/MS. I campioni per l'analisi in RIA sono stati portati a secco utilizzando la combinazione di una centrifuga concentratrice (Speedvac) con un liofilizzatore secondo la metodica prevista dalla ditta produttrice del Kit RIA. Inizialmente i campioni sono stati collocati nello Speedvac per rimuovere lo strato organico per circa 20 minuti e in seguito congelati nel freezer a –80°C prima di venire collocati nel liofilizzatore fino all'ottenimento di una polvere. La procedura suddetta si è rivelata di lunga durata impiegando circa due giorni e mezzo per portare completamente a secco i campioni e poter essere quindi analizzati secondo la metodica RIA. I campioni per l'analisi in LC-MS/MS sono stati invece portati a secco sotto un flusso di azoto.

Dosaggio RIA

Sono stati utilizzati due kit RIA: uno per il dosaggio dell'angiotensina II e uno per quello della bradichinina. Entrambi i dosaggi si basano sulla competizione di legame. I due kit contenevano il tampone RIA, lo standard del peptide, rabbit antiserum specifico per il peptide, il peptide marcato con ^{125}I, goat anti-rabbit IgG serum (GAR), normal rabbit serum (NRS) e il controllo positivo. Il protocollo di dosaggio utilizzato è schematizzato in figura 7.

Fig. 7 Schema del protocollo di dosaggio RIA.



Dosaggio LC-MS/MS

Le analisi LC-MS/MS sono state effettuate utilizzando un sistema HPLC ProStar TM 300 (Varian, Palo Alto, CA, USA) interfacciato con uno spettrometro di massa triplo quadrupolo Varian 310-MS. E' stata utilizzata una precolonna Polaris C18-A (10x2 mm ID) e una colonna Varian Polaris C18-A, 5 μm, 100 x 2,0 mm. L'eluizione dei peptidi è stata effettuata in gradiente con l'utilizzo di due solventi: acqua con acido formico allo 0,1% (solvente A) e acetonitrile (solvente B). Il gradiente utilizzato è il seguente: dopo 3 min di solvente B al 5% , in 0,5 min si passa dal 5 al 20% e si mantiene costante al 20% per 3,5 minuti. In seguito il solvente B ritorna dal 20 al 5% in un minuto e rimane costante per 4 minuti. La durata totale della corsa è di 12 minuti con un flusso di 0,3 mL/min. Il detector è accoppiato al cromatografo HPLC mediante un'interfaccia elettrospray (ESI) che lavora in modalità ESI positiva. I parametri ottimizzati per i peptidi sono i seguenti: voltaggio del capillare, 5000 V; temperatura e pressione dell'azoto rispettivamente 200°C e 50 PSI; voltaggio dell'eletromoltiplicatore, 1500 V. Per operare in modalità MS/MS, è stato utilizzato l'argon come gas di collisione ad una pressione di 2 mTorr nella cella di collisione. Per l'ottimizzazione dei parametri del detector è stata fatta un'infusione diretta delle soluzioni standard utilizzando una connessione a T.

Analisi LC-MS/MS della bradichinina

Nelle fasi iniziali dello sviluppo del metodo, abbiamo ottimizzato i parametri dello strumento con l'infusione di una soluzione standard di bradichinina e individuato le frammentazioni principali della nostra molecola e le transizioni caratteristiche. Analizzando lo spettro di massa dell'analita è evidente lo ione più abbondante bi-carica a *m/z* 531,5 e la transizione migliore è quella 531,5→531,5 mentre, come transizione di

conferma abbiamo usato la 531,5→70. E' stata utilizzata una soluzione di stoccaggio di bradichinina standard (100 µg/ml) per preparare due soluzioni di lavoro da 10 µg/ml (una per preparare gli standard per la curva di calibrazione e l'altra per preparare i quality control QC). Le soluzioni suddette sono state preparate in metanolo/acqua/acido formico (50:50:0,1, v/v/v) e conservate a -80°C prima dell'uso. I campioni standard sono stati preparati nel plasma bovino e i campioni QC nel plasma di ratto. E' stata preparata una soluzione di BK 1000 ng/mL in plasma bovino che è stata utilizzata per la preparazione di 6 concentrazioni standard di bradichinina: 10, 25, 50, 100, 250 e 500 ng/mL. Come standard interno è stato utilizzato l'analogo della bradichinina resistente alla proteolisi Sar-D-Phe^{8}-des-Arg^{9}-bradykinin. Le soluzioni di standard interno sono state preparate in metanolo/acqua/acido formico (50:50:0,1, v/v/v) alla concentrazione di 5 µg/mL e conservate a -80°C.

Validazione del metodo:

La validazione del metodo è stata fatta secondo le linee guida della Food and Drug Administration (FDA) per la validazione dei metodi bioanalitici [42]. Sono state preparate sei concentrazioni standard per la curva di calibrazione in un range da 10 a 500 ng/mL. Ciascuna concentrazione standard è stata iniettata tre volte e per ognuna è stato calcolato il rapporto delle aree tra peptide e standard interno ($A_{PEPTIDE}/A_{IS}$). Le curve di calibrazione sono state costruite mettendo in relazione il rapporto delle aree con il rapporto delle concentrazioni ($C_{PEPTIDE}/C_{IS}$). L'accuratezza e la precisione sono state valutate analizzando le soluzioni QC (10, 25, 200 e 400 ng/mL) ciascuna per tre volte nell'arco dello stesso giorno (intra-day) e in giorni diversi (inter-day). L'accuratezza viene espressa in termini di errore relativo percentuale (%RE, calcolato secondo la formula: (valore misurato-valore atteso)/valore atteso X 100) mentre la

precisione viene calcolata come deviazione standard relativa (%RSD, calcolato secondo la formula: deviazione standard/valore medio X 100). L'effetto matrice è stato valutato usando sei diversi lotti di plasma bovino e di ratto fortificati in modo tale da contenere 10ng/ml di BK. Le aree dei picchi dei composti endogeni ed esogeni che co-eluiscono con l'analita o con lo standard interno dovrebbero essere inferiori al 20% dell'area del picco dello standard alla più bassa concentrazione quantificabile (LLOQ) e inferiori al 5% della risposta dello standard interno. La selettività del dosaggio è stata valutata analizzando sei diversi lotti di plasma bovino, con e senza standard interno. Il recupero del metodo è stato valutato comparando le aree dei picchi dei campioni di plasma bovino fortificati con una quantità nota di BK, prima e dopo l'estrazione. Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato a tre diverse concentrazioni (10, 25 e 200 ng/mL). Gli esperimenti di stabilità sono stati effettuati nel plasma di ratto: per valutare la stabilità in condizioni di congelamento/scongelamento, due campioni QC alle concentrazioni di 10 e 200 ng/mL sono stati sottoposti a tre cicli successivi di scongelamento a temperatura ambiente e ricongelamento a -80°C per almeno 12 ore. La stabilità a lungo termine è stata valutata sui campioni QC, dopo 90 giorni di conservazione in freezer a -80°C. Inoltre è stata valutata la stabilità della bradichinina nelle soluzioni di stoccaggio dopo due mesi di conservazione a -80°C , nelle soluzioni di lavoro dopo 24 h a temperatura ambiente e dopo un mese di conservazione a -20°C. Le deviazioni relative sono state calcolate confrontando le risposte ottenute nelle suddette condizioni con soluzioni preparate di fresco a concentrazioni identiche. Tutti i test di stabilità sono stati eseguiti in triplicato. Gli analiti sono considerati stabili quando la concentrazione di analita è compresa in un range tra l'85 e il 115 % della concentrazione iniziale.

Analisi LC-MS/MS dell'angiotensina II

Le soluzioni standard di angiotensina II sono state preparate in metanolo/acqua/acido formico (50:50:0,1, v/v/v) e conservate a -80°C prima dell'uso. Nelle fasi iniziali dello sviluppo del metodo, abbiamo ottimizzato i parametri dello strumento con l'infusione di una soluzione standard di angiotensina II. Abbiamo quindi individuato le frammentazioni principali della nostra molecola e le transizioni caratteristiche. Analizzando lo spettro di massa dell'analita è evidente lo ione più abbondante bi-carica a *m/z* 524 e la transizione migliore è quella 524,5→524,5 mentre, come transizione di conferma abbiamo usato la 349,6→255,2. Il plasma di ratto estratto è stato quindi iniettato nelle condizioni strumentali ottimizzate per l'angiotensina II.

Analisi statistica

I risultati ottenuti sono stati espressi come media ± deviazione standard (DS) e le differenze tra i due ceppi sono state valutate tramite il t-test di Student. I valori di $P<0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi. Per l'elaborazione dei dati ci si è avvalsi del software SPSS v 17.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nell'ambito di uno studio sui meccanismi patogenetici dell'ipertensione, è stato selezionato un ceppo di ratti presso il settore di Farmacologia del Dipartimento di Biologia Animale dell'Università di Sassari. Il ceppo BC selezionato, mediante la tecnica di inbreeding, sulla base dei bassi livelli urinari di callicreina attualmente presenta valori di callicreina urinaria (10,3±3,2 nKat/24h) circa due volte più bassi rispetto al ceppo NC (29,2±2,4 nKat/24h) utilizzato come controllo. Il ceppo BC, nel corso degli anni ha sviluppato modificazioni fenotipiche che hanno portato ad ipotizzare una riduzione delle chinine rispetto al ceppo di controllo e di conseguenza dei cambiamenti sistemici nel KKS, tale da non essere più in grado di compensare gli effetti vasocostrittori del RAS. Per verificare questa ipotesi, si è cercato di mettere a punto un metodo analitico preciso e selettivo per la quantificazione dei due principali peptidi implicati nei sistemi KKS e RAS: la bradichinina e l'angiotensina II. Come descritto in precedenza, la tecnica solitamente usata per quantificare i peptidi bioattivi nei fluidi biologici è il dosaggio radio-immunologico (RIA) [22, 23]. Questo metodo manca però della selettività necessaria per discriminare tra peptidi correlati strutturalmente ed è quindi soggetto al problema della cross-reattività e conseguentemente, i risultati ottenuti da questo dosaggio vanno interpretati con cautela.

Dosaggio RIA della bradichinina

I risultati del dosaggio della BK, ottenuti con il kit RIA della Phoenix Pharmaceuticals mostrano concentrazioni molto variabili da campione a campione e tra i due gruppi non è evidente nessuna differenza statisticamente rilevante. In letteratura si riportano valori di concentrazione plasmatica che variano largamente tra femtomoli e picomoli per

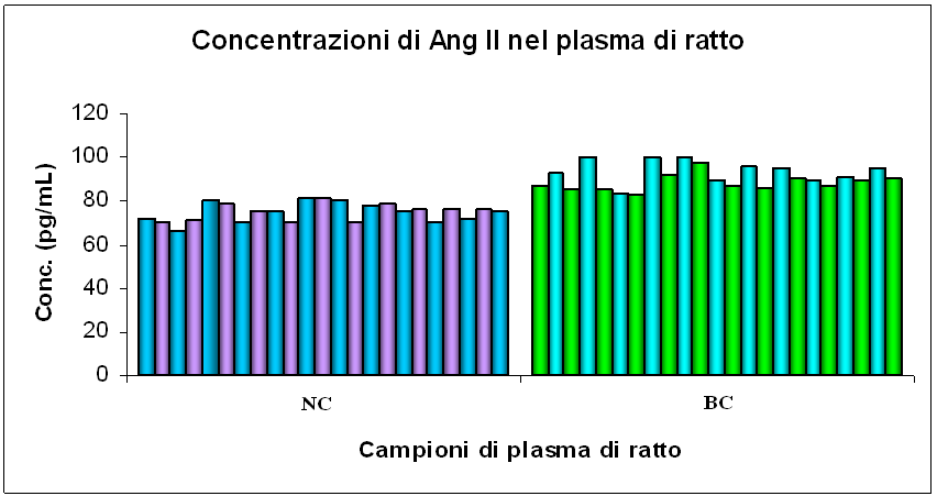
millilitro di plasma. Questa ampia distribuzione dei risultati rende difficile fare confronti e interpretare i risultati ottenuti da diversi laboratori in campioni di sangue di soggetti sani o con patologie. In effetti l'alta variabilità di questi risultati può essere spiegata almeno in parte dalle diverse performances analitiche dei vari Kit RIA e soprattutto dalla differente affinità e specificità degli anticorpi. E' di importanza fondamentale anche il trattamento del sangue durante la preparazione del campione. Ad esempio, durante le fasi di prelievo è necessario evitare l'uso di contenitori in vetro che si sono dimostrati responsabili di una aumentata produzione di BK. E' inoltre necessario aggiungere degli inibitori delle proteasi (es. aprotinina) che impediscano l'attività di alcuni enzimi, callicreine plasmatiche e altre serin proteasi [5]. L'aprotinina da noi aggiunta nella fase di preparazione del campione ha in particolar modo lo scopo di inibire la sintesi ex-novo della bradichinina. Infatti essa è in grado di inibire la callicreina, enzima responsabile della sintesi della bradichinina a partire dal precursore chininogeno ad alto peso molecolare (HMWK). Il kit RIA utilizzato non ha dato risultati soddisfacenti in quanto abbiamo ottenuto valori non riproducibili e non attendibili, perciò non è stato possibile ottenere un'analisi quantitativa specifica e selettiva per la nostra molecola con l'utilizzo di questa tecnica.

Dosaggio RIA dell'angiotensina II

I valori di angiotensina II da noi ottenuti utilizzando il kit RIA della Phoenix Pharmaceuticals concordano con quelli riportati in letteratura e sono dell'ordine delle femtomoli per millilitro di plasma [25-27]. Il dosaggio RIA è stato ripetuto più volte per verificarne l'esattezza e i risultati ottenuti sono rappresentati in figura 8. I livelli di

angiotensina II nel plasma di ratto erano significativamente più alti nei BC (90±8 pg/mL) se confrontati con quelli misurati nei NC (74±9 pg/mL).

Fig. 8 Concentrazione di angiotensina II nel plasma dei ratti analizzati.

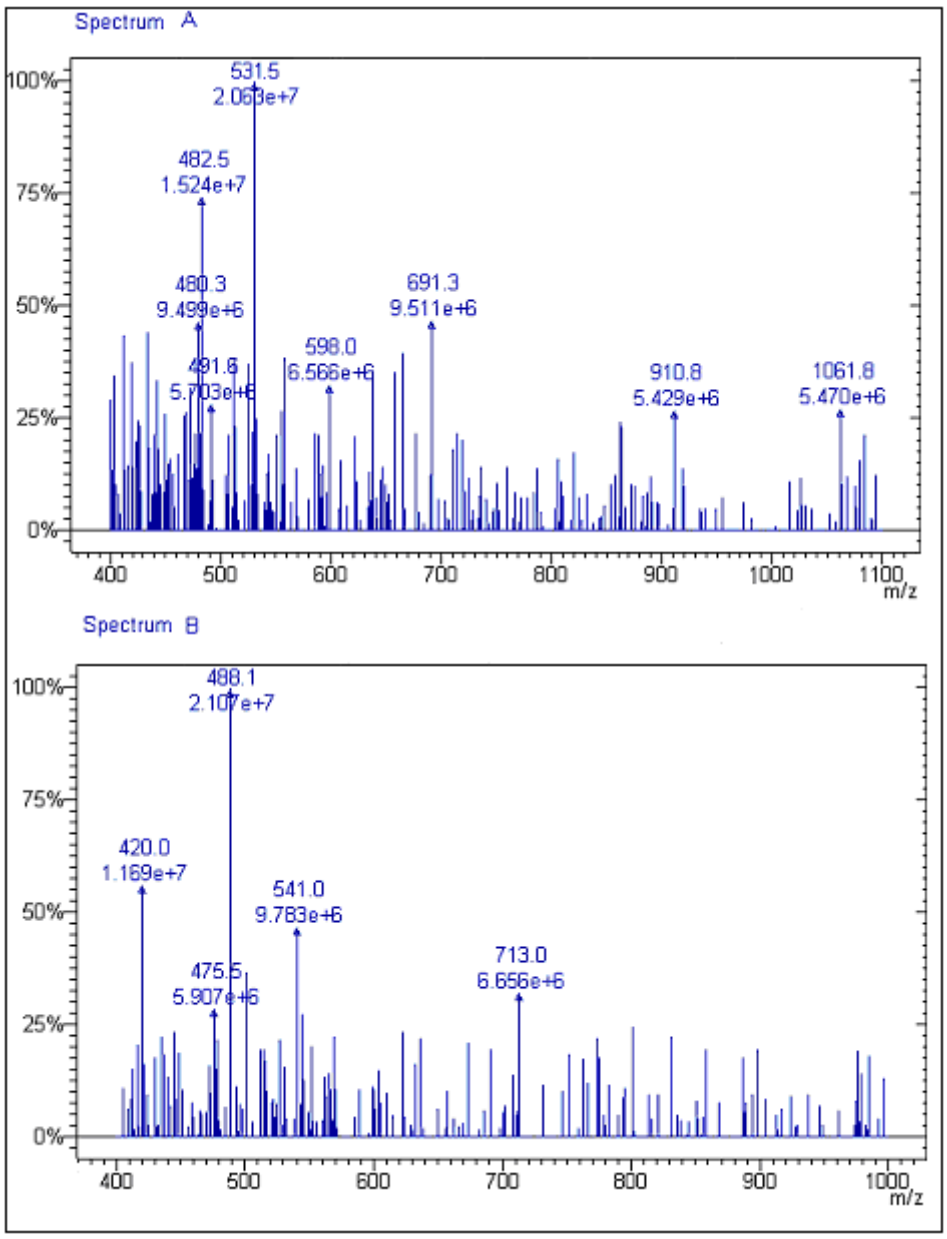


Confrontando le concentrazioni ottenute nei due ceppi è evidente una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi, confermando quindi l'ipotesi di partenza. Riteniamo che queste diverse concentrazioni plasmatiche di Ang II siano alla base anche della diversa risposta pressoria ottenuta nel ceppo BC rispetto al gruppo di controllo, a seguito di somministrazione intra-cerebro-ventricolare di Cadmio [43]. Tale risposta sembra essere proprio una conseguenza dei cambiamenti delle concentrazioni sistemiche di Ang II e di un conseguente aumento dell'attività del RAS a livello cerebrale.

Analisi LC-MS/MS della bradichinina

La preparazione del campione mediante estrazione in fase solida, è un fattore chiave per ottenere un dosaggio accurato e preciso della bradichinina nel plasma. La precipitazione delle proteine con acetonitrile è il metodo più semplice e veloce. Nelle fasi iniziali dello sviluppo del metodo abbiamo utilizzato questa tecnica, tuttavia abbiamo osservato un basso recupero e grosse interferenze di background, probabilmente dovute ad un'insufficiente pulizia del campione. Abbiamo utilizzato diverse colonnine SPE e abbiamo notato che la colonnina Strata X era quella più adatta al nostro scopo. Per la separazione cromatografica è stato ottimizzato un gradiente di eluizione usando una colonna HPLC Polaris C18A. Sono stati testati diversi gradienti di acetonitrile e acido formico allo 0,1 % al flusso costante di 0,3 mL/min fino ad ottenere quello che ci dava la migliore separazione analitica tra BK, IS ed eventuali interferenti. L'acetonitrile è stato preferito al metanolo in quanto forniva una migliore sensibilità e un rumore di fondo più basso. Gli spettri di massa sono stati acquisiti mediante infusione diretta di una soluzione di ciascuno standard in HCOOH allo 0,1%, lavorando in modalità ESI positiva e ESI negativa. Questi test preliminari hanno dimostrato che la frammentazione dello ione molecolare è migliore lavorando in modalità ESI positiva. La Fig 11A mostra lo spettro di massa della bradichinina alla concentrazione di 100 ng/ml dove è evidente che lo ione più abbondante corrisponde allo ione bi-molecolare *m/z* 531,5. La Fig 11B mostra lo spettro di massa dello standard interno Sar-D-Phe^{8}-des-Arg^{9}-bradykinin, che presenta un profilo simile al suo analogo con la prevalenza dello ione bi-carica.

Fig. 11 Spettri di massa di bradichinina standard (A) e di Sar-D-Phe[8]-des-Arg[9]-bradykinin (B).



La transizione 531,5 → 531,5 è stata scelta come transizione per la quantificazione della BK, mentre la transizione 531,5 → 70 è stata usata come transizione di conferma. Dato che la bradichinina è un peptide endogeno, esso è presente nel plasma di ratto, per cui è stato necessario utilizzare una matrice surrogata che non contenesse bradichinina per costruire le curve di calibrazione. In letteratura sono presenti diversi esempi

dell'utilizzo di matrici surrogate per la quantificazione di composti endogeni [31,44]. In questo studio è stato utilizzato il plasma bovino come matrice surrogata, in quanto è risultata la matrice più pulita. Il dosaggio LC-MS/MS è stato reso più difficile a causa della natura della molecola analizzata, infatti, oltre ad avere un'emivita molto breve, la bradichinina è suscettibile di legami aspecifici con la superficie dei contenitori di raccolta del sangue (es. vetro), specialmente quando la molecola è presente in soluzione a basse concentrazioni, come descritto anche in alcuni lavori presenti in letteratura [23, 24, 28, 45]. Per ovviare a questo problema abbiamo utilizzato vials di polipropilene.

Validazione del metodo:

Le curve di calibrazione sono state costruite in un range da 10 a 500 ng/mL. Il coefficiente di correlazione (r^2), la pendenza e l'intercetta, ottenuti dopo tre corse sono rispettivamente 0,995±0,007, 0,092±0,02, -0,1098±0,05. Il più basso limite di quantificazione (LLOQ), definito come la più bassa concentrazione misurabile con una precisione migliore del 20% e un'accuratezza entro ±20% della concentrazione teorica, è di 10ng/mL. L'accuratezza (%RE) e la precisione (%RSD) sono rispettivamente comprese tra –2,5 e 9,6% e tra 8,8 e 15,8% (tabella 1).

L'effetto matrice è stato valutato preparando dei campioni che contenessero una concentrazione finale di BK di 10 ng/mL in sei diversi lotti plasma bovino e di ratto: il %RE nei sei lotti bovini di plasma è compreso tra –8,2 e +6,2% (tabella 2). Ciò dimostra che la concentrazione misurata di bradichinina non è affetta da errori significativi in seguito all'uso di un'altra matrice. Nel plasma di ratto abbiamo ottenuto %RE compresi tra –3,5 e +14,5%RE.

Tabella 1. Accuratezza intra-e inter-day (% RE) e precisione (% RSD).

QC i.d.	QC concentrazione nominale (ng/mL)	Risultati intra-day (n=6)		Risultati inter-day (n=6)	
		% RE	% RSD	% RE	% RSD
LLOQ	10	4,7	10,3	9,6	15,8
Bassa	25	-1,6	11,9	5,7	13,2
Media	200	-2,5	9,9	-1,5	9,7
Alta	400	6,8	8,8	8,0	10,6

Tabella 2. Effetto matrice.

Matrice Plasma	Conc. Aggiunta (ng/mL)	Conc. media determinata (ng/mL,n=3)	Media % RE (n=3)
Bovino	10	10,62	6,2
	10	9,18	-8,2
	10	10,28	2,8
	10	9,68	-3,2
	10	9,22	-7,8
	10	9,60	-4,0
Ratto	10	11,05	10,5
	10	10,82	8,2
	10	10,20	2,0
	10	10,60	6,0
	10	9,65	-3,5
	10	11,45	14,5

La selettività è stata valutata in sei diversi lotti di plasma di ratto effettuando analisi con e senza lo standard interno. Analizzando sei campioni di plasma, abbiamo verificato la selettività del metodo in quanto non erano presenti sostanze interferenti al tempo di migrazione del nostro analita. Il recupero medio dell'estrazione SPE era maggiore dell'80% in tutte le concentrazioni testate. Le figg. 12-13 mostrano i cromatogrammi di una soluzione standard e del plasma di ratto a cui è stata aggiunta BK 100ng/mL.

Fig. 12 Cromatogramma di una soluzione standard di bradichinina e standard interno alla concentrazione di 100 ng/ml.

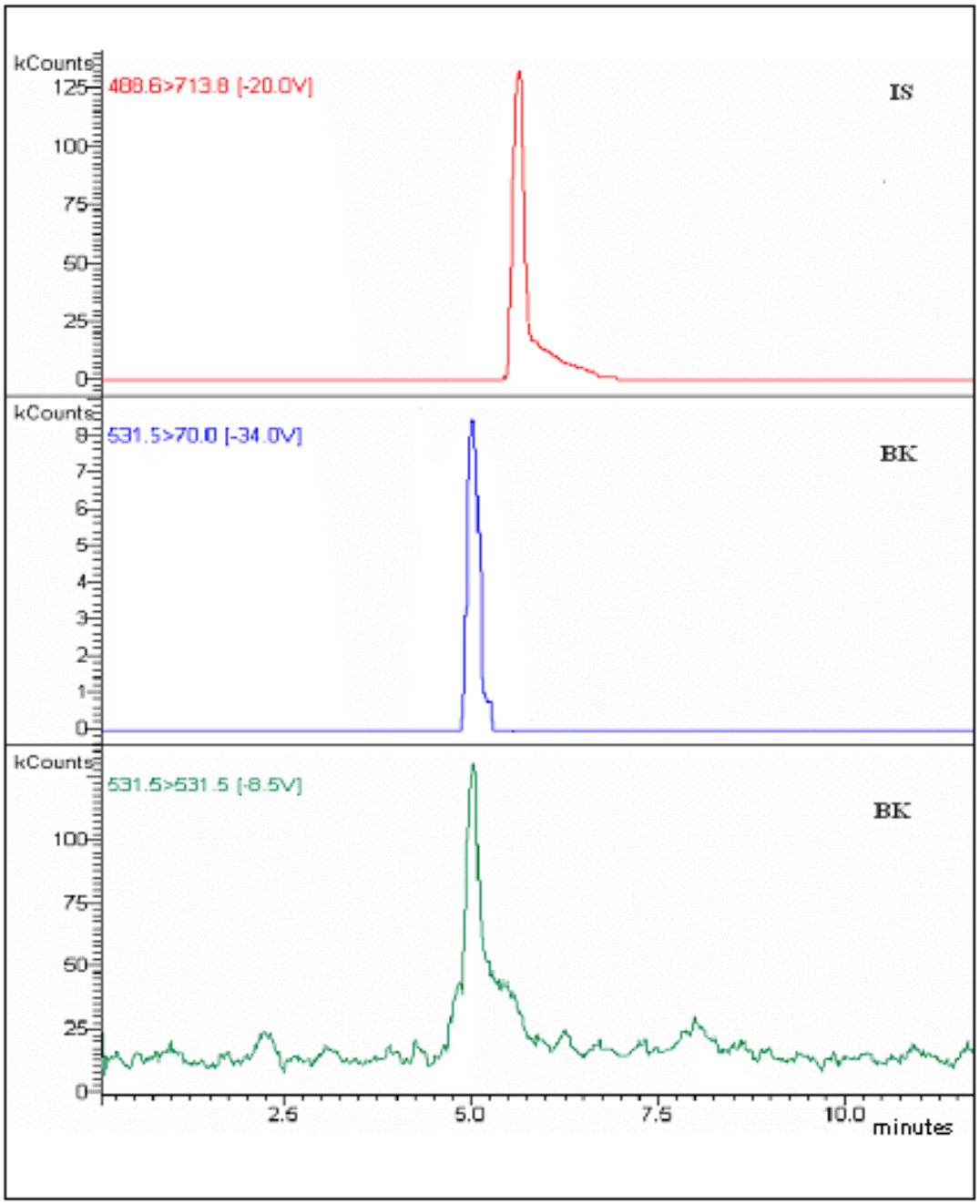
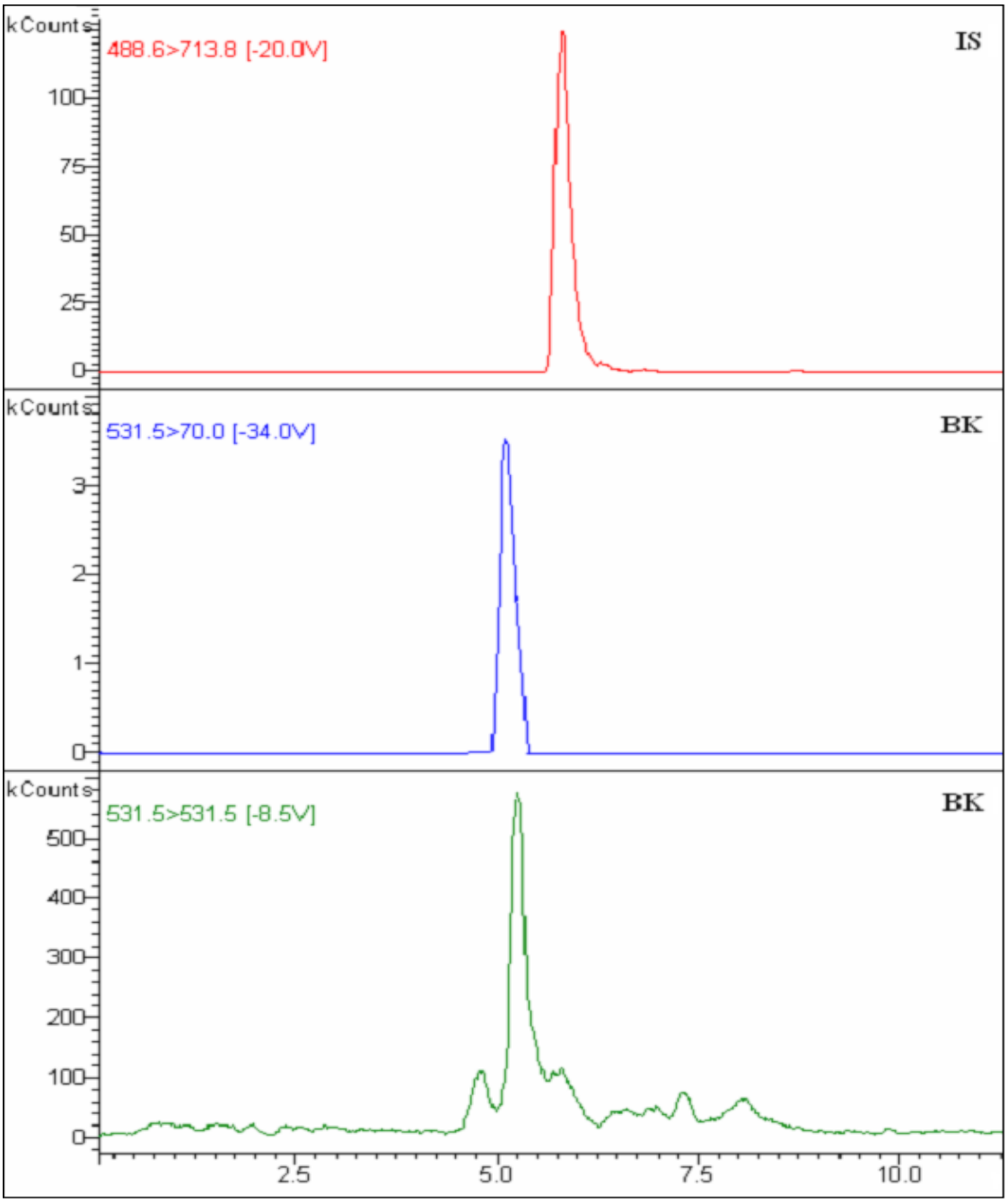


Fig. 13 Cromatogramma del plasma di ratto fortificato con una soluzione di bradichinina e standard interno alla concentrazione di 100 ng/ml.

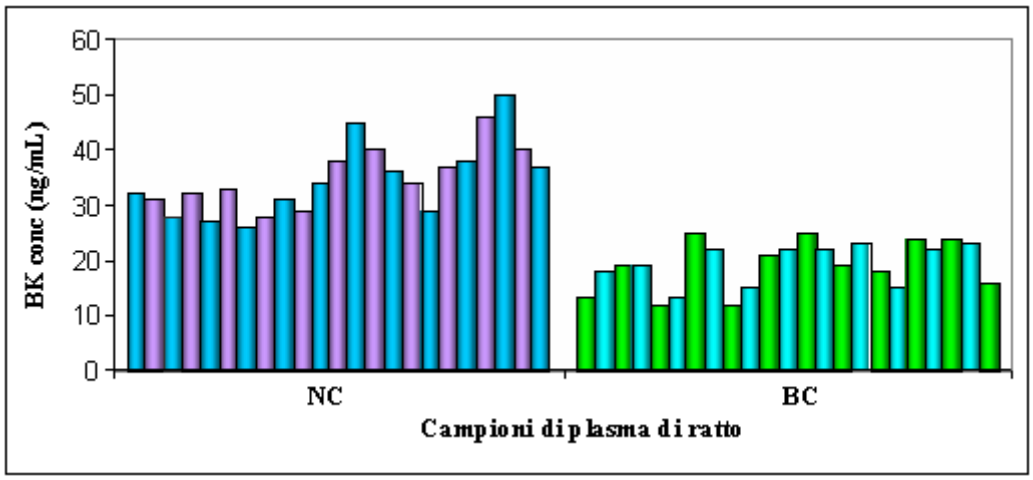


I risultati delle prove di stabilità mostrano che la bradichinina è stabile dopo tre cicli di congelamento-scongelamento (-7,3 < %RE medio < -1,3) e anche dopo 90 giorni a -80°C (-4 < %RE medio < 2,8). I risultati della stabilità per le soluzioni di stoccaggio e di lavoro sono stati ottenuti confrontando i rapporti delle aree BK/IS delle soluzioni di stabilità con i rapporti delle aree BK/IS di soluzioni preparate a fresco. La soluzione di stoccaggio conservata a -80°C per due mesi in metanolo/acqua/acido formico (50:50:0,1, v/v/v) è risultata stabile secondo il criterio di accettazione del ±10%. Nelle soluzioni di lavoro la bradichinina è risultata stabile dopo un mese a -20°C (%RE medio = -0,1%) mentre si degrada rapidamente dopo 24 ore a temperatura ambiente.

Applicazione del metodo al plasma di ratto:

Il metodo descritto è stato utilizzato con successo per la determinazione della bradichinina nei campioni di plasma dei BC e dei NC. La fig. 14 mostra le concentrazioni di bradichinina nel plasma dei 46 ratti analizzato in questo lavoro (23 BC e 23 NC). La concentrazione di BK nel plasma dei ratti a bassa callicreina è risultata più bassa rispetto a quella misurata nel plasma dei ratti di controllo: i ratti BC hanno una concentrazione di BK media di 19.2±0.92ng/mL, contro una concentrazione media nei ratti NC di 34,3±1,29 ng/mL. E' evidente un decremento di un fattore 2 dei livelli di bradichinina nei ratti BC rispetto ai ratti NC e ciò conferma l'ipotesi di partenza di una correlazione tra i livelli di bradichinina plasmatica e quelli della callicreina urinaria. Le concentrazioni di bradichinina misurate con il metodo LC-MS/MS descritto in questo lavoro, sono più alte di un fattore 100 rispetto a quelle riportate in letteratura e misurate con il metodo radioimmunoenzimatico che riferiscono concentrazioni di BK dell'ordine di pg/mL [22, 23], mentre sono dello stesso ordine di grandezza di quelle riportate in un lavoro in cui è stata effettuata l'analisi con la tecnica LC-MS/MS [31].

Fig.14 Concentrazione di bradichinina nel plasma dei ratti analizzati.

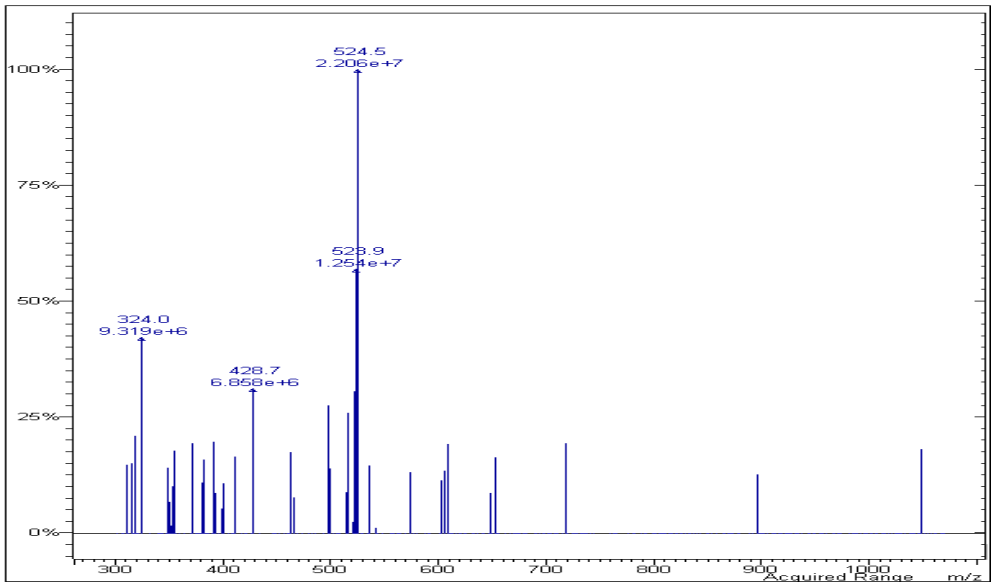


D'altra parte diversi fattori possono influenzare la formazione *ex vivo* della bradichinina; ad esempio il trauma vascolare e le superfici cariche negativamente dei contenitori di raccolta del sangue sono in grado di attivare il sistema chinina-callicreina, e molti altri fattori non sono ancora ben conosciuti, per cui è molto importante la procedura di pre-trattamento del campione [44].

Analisi LC-MS/MS dell'angiotensina II

Gli spettri di massa per l'Ang II sono stati acquisiti mediante infusione diretta di una soluzione standard in HCOOH allo 0,1%, lavorando in modalità ESI positiva e ESI negativa. Questi test preliminari hanno dimostrato che la frammentazione dello ione molecolare è migliore lavorando in modalità ESI positiva. La Fig 9 mostra lo spettro di massa dell'Ang II alla concentrazione di 100 ng/ml dove è evidente che lo ione più abbondante corrisponde allo ione bi-molecolare *m/z* 524,5.

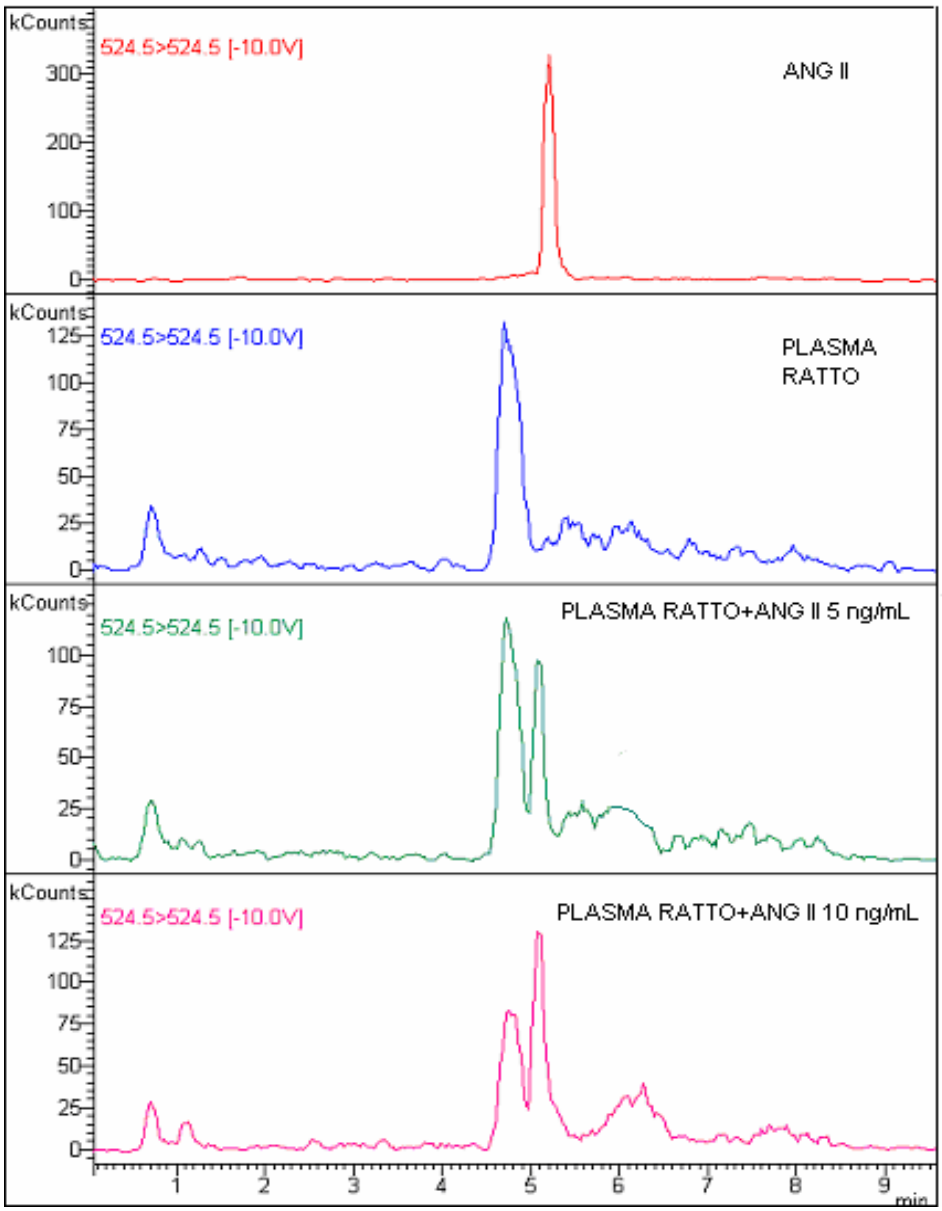
Fig. 9 Spettro di massa di Angiotensina II standard.



L'iniezione in colonna di una soluzione standard di Ang II 100 ng/mL, dava origine ad un cromatogramma con un picco ben risolto al tempo di ritenzione di 5 minuti. In realtà, una volta iniettato l'estratto di plasma, abbiamo osservato un picco con un tempo di ritenzione di 4,6 minuti nella transizione principale, mentre, nella transizione usata come conferma non era presente nessun picco. Tale risultato richiedeva un'ulteriore conferma di identità. Per verificare se il picco era effettivamente quello relativo alla

molecola di nostro interesse, abbiamo aggiunto piccolissime quantità di Ang II standard al plasma estratto e l'abbiamo iniettato in colonna. Contrariamente alle aspettative, si è formato un picco con un tempo di ritenzione di 5 minuti che si affiancava al precedente e che aumentava con l'aumentare della concentrazione di standard iniettato (Fig. 10). È quindi evidente, che il picco che appariva nell'estratto di plasma, alla transizione scelta per la quantificazione del peptide, non corrispondeva all'Ang II ma a qualche interferente presente in matrice.

Fig. 10 Cromatogrammi alla transizione principale relativa ad Ang II.



I risultati ottenuti per l'angiotensina II suggeriscono che i valori fisiologici del peptide sono al di sotto del limite di rilevabilità del metodo LC-MS/MS sviluppato. Per l'angiotensina II, ci siamo quindi attenuti ai valori ottenuti tramite il dosaggio RIA.

Analisi statistica:

I risultati ottenuti per i due peptidi sono stati analizzati utilizzando il software statistico SPSS v 17 e i valori del t-test sono riportati in tabella 3. Come possiamo notare i valori del p-value sono < 0.05.

Tabella 3. Risultati del t-test.

Peptides	T	df	p-value	Mean Difference	Std. Error Difference
BK	-9.483	39.784	9.22E-12	-15.087	1.591
AngII	11.403	42.033	1.91E-14	16.261	1.426

CONCLUSIONI

In questo studio abbiamo voluto mettere a punto un nuovo metodo analitico per la quantificazione dell'angiotensina II e della bradichinina nei due ceppi di ratti BC e NC per verificare l'ipotesi secondo cui la differenza dei livelli urinari di callicreina osservata tra i due ceppi fosse associata ad un alterazione dell'equilibrio tra i due sistemi KKS e RAS. La necessità di costruire un nuovo metodo analitico deriva dal fatto che i lavori già presenti in letteratura utilizzano prevalentemente la tecnica RIA per la quantificazione dei peptidi nelle matrici biologiche. Attualmente gli studi effettuati utilizzando la spettrometria di massa per l'analisi delle proteine stanno riscontrando notevole successo, in quanto, pur presentando una sensibilità inferiore a quella del metodo RIA, sono dotati di una maggiore selettività ed in tal modo permettono di superare il problema della cross-reattività tipico dei metodi immunoenzimatici. In questo studio abbiamo effettuato il dosaggio della bradichinina e dell'angiotensina II sia con il metodo RIA che con quello LC-MS/MS, sugli stessi campioni. Per l'angiotensina II, il metodo LC-MS/MS costruito presenta un limite di sensibilità superiore alla concentrazione del peptide nel plasma. Per la bradichinina, il metodo LC-MS/MS sviluppato è risultato adatto al suo scopo. Abbiamo quindi descritto un metodo RIA per la quantificazione dell'angiotensina II nel plasma di ratto e inoltre abbiamo costruito e validato un nuovo metodo LC-MS/MS capace di misurare i valori plasmatici di bradichinina nel range da 10 a 500 ng/mL.

Inoltre, riguardo le correlazioni tra i livelli della callicreina urinaria e le concentrazioni plasmatiche dei principali mediatori del RAS e del KKS, il nostro studio ha confermato che la diminuzione delle concentrazioni plasmatiche di BK si accompagna ad aumenti

delle concentrazioni plasmatiche di Ang II sottolineando le interazioni presenti tra i due sistemi nel controllo della pressione arteriosa.

BIBLIOGRAFIA

[1] L. Annunziato, G. Di Renzo, Trattato di farmacologia, Idelson-Gnocchi srl. editore, 2010.

[2] C. Casella, V. Taglietti, Principi di Fisiologia, La Goliardica Pavase editore, 2002.

[3] K. D. Bhoola, C. D. Figueroa, K. Worthy, Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases, Pharmacol. Rev. 44 (1992) 1-80.

[4] M. E. Moreau, N. Garbacki, G. Molinaro, N. J. Brown, F. Marceau, A. Adam, The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets, J. Pharmacol. Sci. 99 (2005) 6-38.

[5] C. J. Blais, Jr. F. Marceau, J. L. Rouleau, A. Adam, The kallikrein-kininogen-kinin system: lessons from the quantification of endogenous kinins, Peptides 21 (2000) 1903-1940.

[6] L. M. F. Leeb-Lundberg, F. Marceau, W. Muller-Esterl, D. J. Pettibone, B. L. Zuraw, Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanism to pathophysiological consequences, Pharmacol. Rev. 57 (2005) 27-77.

[7] P. M. Vanhoutte, Endotelium and control of vascular function. State of the art lecture. Hypertension 13 (1989) 658-667.

[8] Goodman, Gilman, Le basi farmacologiche della terapia. McGraw-Hill Editore, 2003.

[9] P. Madeddu, M. V. Varoni, M. P. Demontis, J. Chao, J. A. Simson, N. Glorioso, V. Anania, Kallikrein-kinin system and blood pressure sensitivity to salt, Hypertension 29 (1997) 471-477.

[10] W. Linz, B. A. Scholkens, Role of bradykinin in the cardiac effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors, J. Cardiovasc. Pharmacol. 20 (1992) 83-90.

[11] N. J. Brown, J. V. Gainer, C. M. Stein, D. E. Vaughan, Bradykinin stimulates tissue plasminogen activactor release in human vasculature, Hypertension 33 (1999) 1431-1435.

[12] A. A. Hasan, S. Amenta, A. H. Schmaier, Bradykinin and its metabolite, Arg-Pro-Pro-Gly-Phe, are selective inhibitors of α-thrombin-induced platelet activation, Circulation 94 (1996) 517-528.

[13] P. Dominiak, M. Simon, A. Blochl, P. Brenner, Changes in peripheral sympathetic outflow of pithed spontaneously hypertensive rats after bradykinin and Des-Arg-bradykinin infusions: influence of converting enzyme inhibition, J. Cardiovasc. Pharmacol. 20 (1992) 35-38.

[14] J. H. Schwieler, P. Hjemdahl, Influence of angiotensin-converting enzyme inhibition on sympathetic neurotransmission: possible roles of bradykinin and prostaglandins, J. Cardiovasc. Pharmacol. 20 (1992) 39-46.

[15] P. Madeddu, Receptor antagonists of bradykinin: a new tool to study the cardiovascular effects of endogenous kinins, Pharmacol. Res. 28 (1993) 107-128.

[16] F. M. Bumpus, K. J. Catt, A. T. Chiu, M. DeGasparo, T. Goodfriend, A. Husain, M. J. Peach, D. G. Taylor, P. B. M. W. M. Timmermans, Nomenclature for angiotensin receptors. A report of the nomenclature committee of the council for high blood pressure research, Hypertension 17 (1991) 720-721.

[17] T. Inagami, Molecular biology and signaling of angiotensin receptors: an overview, J. Am. Soc. Nephrol. 10 (1999) 2-7.

[18] R. Ardaillou, Angiotensin II receptors, J. Am. Soc. Nephrol. 10 (1999) 30-39.

[19] M. Horiuchi, M. Akishita, V. J. Dzau, Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. Hypertension 33 (1999) 613-621.

[20] J. R. Vane, The history of inhibitors of angiotensin converting enzyme, J. Physiol. Pharmacol. 50 (1999) 489-498.

[21] J. E. Hall, A. C. Guyton, M. J. Smith, T. G. Coleman, Blood pressure and renal function during chronic changes in sodium intake: role of angiotensin, Am. J. Physiol., 239 (1980) 271-280.

[22] U. Hilgenfeldt, R. Linke, U. Riester, W. Konig, G.Breipohl, Strategy of measuring bradykinin and kallidin and their concentration in plasma and urine, Anal. Biochem. 228 (1995) 35-41.

[23] D. J. Campbell, Towards understanding the kallikrein-kinin system: insights from measurement of kinin peptides, Braz. J. Med. Biol. Res. 33 (2000) 665-677.

[24] I. Van den Broek, R. W. Sparidans, J. H. Schellens, J. H. Beijnen, Quantitative bioanalysis of peptides by liquid chromatography coupled to (tandem) mass spectrometry, J. Chromatogr. B 872 (2008) 1-22.

[25] K. Shimamoto, M. Nakagawa, O. Rimura, In vivo concentrations of kinins and angiotensins, Horm. Metab. Res. Suppl. 22 (1990) 75-79.

[26] D.J. Campbell, A.C. Lawrence, A. Towrie, A. Kladis, A. J. Valentijn, Differential regulation of angiotensin peptide levels in plasma and kidney of the rat, Hypertension 18 (1991)763-773.

[27] A.C.R. Mendes, A.J. Ferreira, S.V.B. Pinheiro, R.A.S. Santos, Chronic infusion of angiotensin (1-7) reduces heart angiotensin II levels in rats, Regul. Pept. 125 (2005) 29-34.

[28] A. Pellacani, H. R. Brunner, J. Nussberger, Antagonizing and measurement: approaches to understanding of hemodynamic effects of kinins, J. Cardiovasc. Pharmacol. 20 (1992) S28-34.

[29] S. R. Wilson, F. Boix, A. Holm, P. Molander, E. Lundanes, T. Greibrokk, Determination of bradykinin and arg-bradykinin in rat muscle tissue by microdialysis and capillary column-switching liquid chromatography with mass spectrometric detection, J. Sep. Sci. 28 (2005) 1751-1758.

[30] L. J. Murphey, D. L. Hachey, D. E. Vaughan, N. J. Brown, J. D. Morrow, Quantification of BK1-5, the stable bradykinin plasma metabolite in humans, by a highly accurate liquid-chromatographic tandem mass spectrometric assay, Anal. Biochem. 292 (2001) 87-93.

[31] I. Van de broek, R. W. Sparidans, J. H. Schellens, J.H: Beijnen, Quantitative assay for six potential breast cancer biomarker peptides in human serum by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. B 878 (2010) 590-602.

[32] K. Wilson, J. Walker, Biochimica e biologia molecolare: Principi e tecniche, Raffaello Cortina Editore, 2006.

[33] I. Lavagnini, F. Magno, R. Deraglia, P. Traldi, Quantitative applications of mass spectrometry, Wiley Ed. 2006.

[34] B. K. Matuszewski, Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC-MS bioanalysis, J. Chromatogr. B 830 (2006) 293-300.

[35] R. Bethem, J. Boison, J. Gale, D. Heller, S. Lehotay, J. Loo, S. Musser, P. Price, S. Stein, Establishing the fitness for purpose of mass spectrometric methods, J. Am. Soc. Mass Spectrum 14 (2003) 528-541.

[36] M. V. Varoni, D. Palomba, M. Satta, A. Satta, V. Anania, Different response of intracerebroventricular cadmium administration on blood pressure in normal and low urinary kallikrein rats, Pharmacol. Res. 47 (2003) 157-162.

[37] P. Madeddu., C. P. Vio, S. Straino, M. B. Salis, A. F. milia, C. Emanueli, Renal phenotype of low kallikrein rats, Kidney Int. 59 (2001) 2233-2242.

[38] P. Madeddu, M. V. Varoni, M. P. Demontis, P. Pinna Parpaglia, N. Glorioso, V. Anania, Blood pressure sensitivity to salt in rats with low urinary kallikrein excretion, Immunopharmacology 33 (1996) 301-304.

[39] P. Madeddu, M. V. Varoni, M. P. Demontis, P. Pinna Parpaglia, N. Glorioso, V. Anania, Urinary kallikrein: a marker of blood pressure sensitivity to salt, Kidney Int. 49 (1996) 1422-1427.

[40] E. Amundsen, J. Putter, P. Friberger, M. Knos, M. Larsbraten, G. Claeson, Methods for the determination of glandular kallikrein by means of chromogenic tripeptide substrate, Adv. Exp. Med. Biol.120 (1979) 83-95.

[41] J. W. Jenzano, J. C. Coffey, W. D. Heizer, R. L. Lundblad, A. G. Scicli, The assay of glandular kallikrein and prekallikrein in human mixed saliva, Arch. Oral. Biol. 9 (1988) 641-644.

[42] http:// www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.htm, Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CEDR), Center for Veterinary Medicine (CVM), BP, May 2001.

[43] M. V. Varoni, D. Palomba, N. P. Macciotta, E. Antuofermo, G. Deiana, E. Baralla, V. Anania, M. P. Demontis, Brain renin-angiotensin system modifies the blood

pressure response to intracerebroventricular cadmium in rats, Drug and Chem. Toxicol. 33 (2010) 302-309.

[44] H. Li, MJ. Rose, L. Tran, J. Zhang, LP. Miranda, CA. James, BJ. Sasu, Development of a method for the sensitive and quantitative determination of hepcidin in human serum using LC-MS/MS, J. Pharmacol. Toxicol. Methods 59 (2009) 171-80.

[45] J. Yi, C. Kim, C. A. Gelfand, Inhibition of intrinsic proteolytic activities moderates preanalytical variability and instability of human plasma, J. Proteome Res. 6 (2007) 1768-1781.

Pubblicazioni:

M.V. Varoni, D. Palomba, N.P. Macciotta, E. Antuofermo,G. Deiana, E. Baralla, V. Anania, M.P. Demontis, Brain Renin-angiotensin system modifies the blood pressure response to intracerebroventricular cadmium in rats, Drug and Chem.Toxicol. 33 (2010) 302-309.

E. Baralla, M. Nieddu , G. Boatto, M.V. Varoni, D. Palomba, MP. Demontis, V. Pasciu, V. Anania, Quantitative assay for bradykinin in rat plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, J. Pharm. Biomed. Anal. (2011) 557-561. Epub 2010 Oct 8.