

DIPARTIMENTO DI FISIOPATOLOGIA CLINICA

PROGETTO

Determinazione quantitativa di piccole molecole in Spettrometria di Massa

RESPONSABILE SCIENTIFICO: Dr.ssa **Giovanna Danza**

COLLABORATORI: M. Serio, M. Mannelli, A. Pieri

L'endocrinologia clinica, così come la ricerca in campo endocrinologico, non può prescindere dal dosaggio quantitativo degli ormoni. E' per questo motivo che i metodi quantitativi in spettrometria di massa in diluizione isotopica (MS-ID), cioè con l'utilizzo di standard interni deuterati, sono da sempre uno strumento indispensabile per questa disciplina. Questi metodi hanno caratteristiche di sensibilità, specificità, precisione ed accuratezza tali da renderli metodi definitivi o di riferimento per il dosaggio di molte piccole molecole come ad esempio gli ormoni steroidei ed altri ormoni non peptidici. Ancora oggi, nonostante il continuo progredire e la sempre maggiore standardizzazione dei metodi di dosaggio immunologici, i metodi MS-ID rimangono insostituibili non solo per il controllo delle metodiche di routine ma anche per il dosaggio di quegli ormoni presenti a basse concentrazioni nel plasma che possono presentare, con i metodi immunologici, problemi di cross-reattività. Ne è un esempio il diidrotestosterone (DHT) il cui dosaggio immunologico, a causa delle interferenze dovute al testosterone, fornisce risultati poco attendibili quando confrontati con quelli ottenuti con il metodo GC/MS-ID.

Sulla base di queste considerazioni nella sezione di Endocrinologia del Dipartimento di Fisiopatologia Clinica stiamo sviluppando un progetto per la messa a punto e la successiva applicazione alla diagnostica clinica di metodi GC/MS-ID o LC/MS-ID per il dosaggio degli ormoni correlati alle patologie ipertensive di tipo endocrino. L'ipertensione arteriosa costituisce uno dei problemi principali di salute pubblica nel mondo occidentale, rappresentando un fattore di rischio maggiore per la malattia cerebrovascolare, per la cardiopatia ischemica e per l'insufficienza renale. La sua prevalenza si aggira intorno al 25% dei soggetti adulti e raggiunge valori del 60% nella popolazione sopra i 60 anni. Le ipertensioni

secondarie (IS) sono presenti in circa il 10-15% dei pazienti ipertesi ed una loro corretta e precoce identificazione, in particolare delle forme endocrine, permette di instaurare la specifica terapia medica. Le IS comprendono principalmente le ipertensioni endocrine a bassa renina, che hanno nell'iperaldosteronismo primitivo (IP) e nella sindrome da apparente eccesso di mineralcorticoidi (AME) gli esempi prototipici, ed i tumori cromaffini quali il feocromocitoma (Feo) ed i paragangliomi (PGL). Esistono tuttavia ancora notevoli difficoltà diagnostiche dovute a problematiche metodologiche dei tests biochimici utilizzati per la diagnosi. Per quanto riguarda l' IP è nostra intenzione mettere a punto una metodica per il dosaggio quantitativo del tetraidroaldosterone 3-alfa glucuronide urinario; la valutazione in MS-ID del rapporto cortisolo/cortisone liberi urinari sarà invece utilizzata sia per la diagnosi di AME sia per una valutazione dell' utilità di questo parametro nell'indirizzare la terapia dei pazienti ipertesi essenziali a bassa renina e con elevata sodio-sensibilità dei valori pressori. Infine intendiamo sviluppare e portare in routine clinica un metodo LC/MS-ID per il dosaggio delle metanefrine plasmatiche che costituiscono un parametro essenziale nella diagnosi dei tumori cromaffini.

Un esempio di utilizzo di metodi quantitativi in spettrometria di massa in un progetto non finalizzato direttamente alla clinica è invece quello del dosaggio quantitativo del colesterolo cellulare nell'ambito dello studio dell'attività enzimatica di seladin-1 in relazione al suo effetto neuroprotettivo. Seladin-1 è un gene recentemente scoperto come down-regolato in quelle zone cerebrali maggiormente colpite dalla patologia di Alzheimer. Si prospetta come un gene multifunzionale in quanto la proteina da esso codificata è anche l'enzima finale della cascata biosintetica del colesterolo. Lo studio da noi intrapreso è volto a delucidare la regolazione ormonale di questo gene e il possibile legame tra la sua funzione neuroprotettiva e la sua attività enzimatica. Nell'ambito di questo studio era necessario servirsi di un metodo per il dosaggio del colesterolo cellulare che garantisse particolari caratteristiche di precisione ed accuratezza per essere in grado di valutare anche piccole variazioni della concentrazione di questa molecola in sistemi cellulari che sono caratterizzati da potenti meccanismi per il mantenimento dell'omeostasi di questo lipide. Il metodo GC/MS da noi messo a

punto ci ha permesso di rilevare con sufficiente accuratezza le variazioni di concentrazione del colesterolo cellulare e di correlarle con le variazioni di espressione di seladin-1. La prospettiva futura è quella di sviluppare un metodo per la determinazione dell'attività enzimatica di questo enzima mediante l'utilizzo di un substrato marcato con deuterio.



Università degli studi di Firenze
Dipartimento di Fisiopatologia Clinica
Sezione di Endocrinologia

**Determinazione quantitativa di piccole
molecole in Spettrometria di Massa**

Giovanna Danza

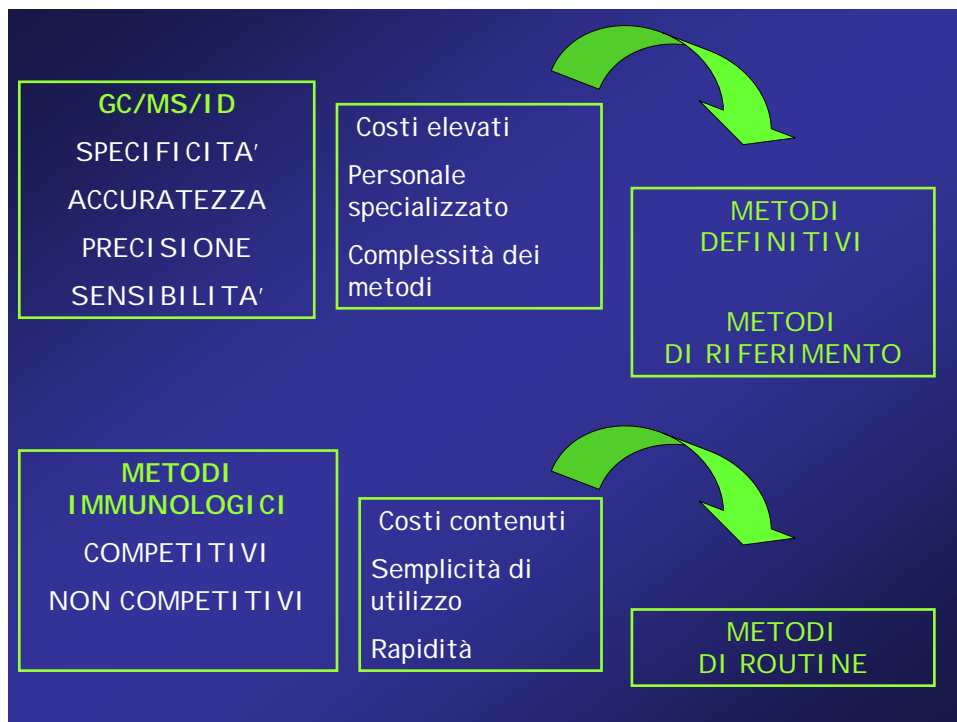
Endocrinologia e Spettrometria di Massa: le basi storiche di un connubio

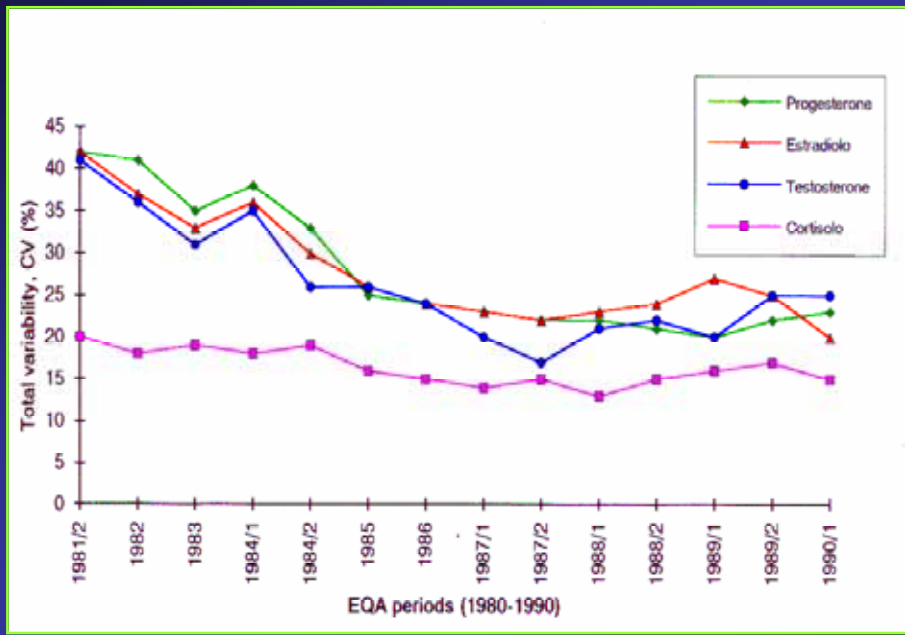
L'endocrinologia clinica non può prescindere dalla misura quantitativa degli ormoni

La GC/MS/ID è divenuta la tecnica elettiva per lo sviluppo di metodi quantitativi di dosaggio degli steroidi

GC/MS/ID

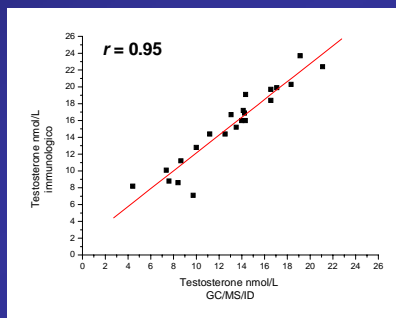
SPECIFICITA'
ACCURATEZZA
PRECISIONE
SENSIBILITA'





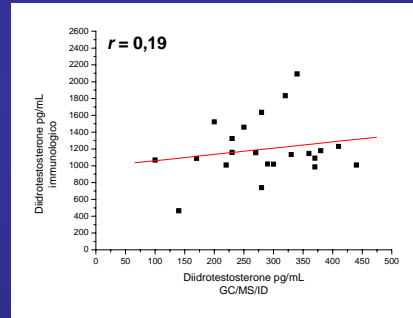
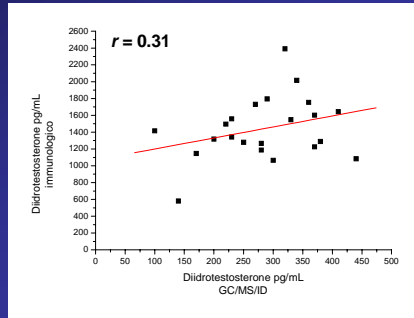
European Male Ageing Study E.M.A.S.

Testosterone



European Male Ageing Study E.M.A.S.

Diidrotestosterone



Sviluppo di metodi non immunologici per la
diagnostica dell'ipertensione endocrina

G. Danza, G. Parenti, M. Serio, M. Mannelli

L'ipertensione arteriosa costituisce uno dei problemi principali di salute pubblica nel mondo occidentale, rappresentando un fattore di rischio maggiore per la malattia cerebrovascolare, per la cardiopatia ischemica e per l'insufficienza renale. La sua prevalenza si aggira intorno al 25% dei soggetti adulti e raggiunge valori del 60% nella popolazione sopra i 60 anni.

ipertensione arteriosa essenziale

90-95%

ipertensione secondaria

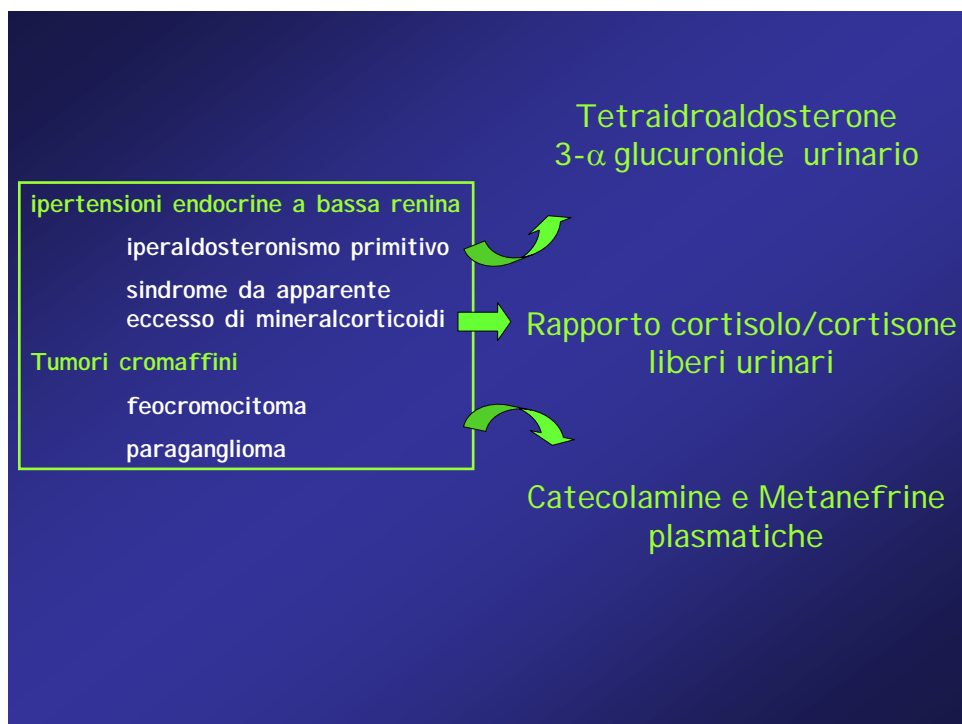
5-10%

ipertensioni endocrine a bassa renina

iperaldosteronismo primitivo
sindrome da apparente
eccesso di mineralcorticoidi

Tumori cromaffini

feocromocitoma
paraganglioma

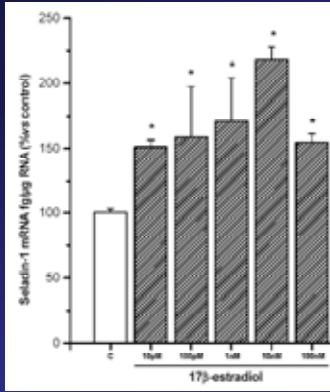


Studio della funzionalità enzimatica di SELADIN-1/DHCR24 in modelli cellulari neuronali

G. Danza, F. Rosati, S. Benvenuti, P. Luciani, M. Serio,
A. Peri

Seladin-1: una proteina "multifunzionale"

- ❑ Ha una funzione neuroprotettiva ed antiapoptotica in modelli cellulari neuronali
- ❑ E' un enzima del tratto post-squalenico della biosintesi del colesterolo che, con attività $\Delta 24$ riduttasica, trasforma il desmosterolo in colesterolo
- ❑ Sembra avere un ruolo oncosoppressivo perchè è coinvolto nella risposta cellulare allo stimolo oncogenico di Ras.



Benvenuti et al.
J Clin Endocrinol Metab.
 2005 ;90(3):1775-82.

