

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO– BICOCCA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Medicina Sperimentale

Dottorato di Ricerca in Tecnologie Biomediche XXIII Ciclo

Coordinatore: Chiar.ma Prof.ssa Marina Del Puppo



**INDAGINI MOLECOLARI
MEDIANTE SPETTROMETRIA DI MASSA
IN FLUIDI BIOLOGICI E TESSUTI**

Candidato:

Dott.ssa Veronica Mainini

Matricola 070410

Tutor: Chiar.mo Prof. Fulvio MAGNI

Ad Andrea
che ha supportato e sopportato questo progetto
e
a Lucia
con me in ogni passo ... fino a 5400 mt

*"... e le mie gambe han camminato tanto...
... e la mia faccia ha preso tanto vento ...
... e coi miei occhi ho visto tanta vita ...
... e le mie orecchie tanta ne han sentita ...
... e le mie mani hanno applaudito il mondo
perchè il mondo è il posto dove ho visto te ..."*

*- DOVE HO VISTO TE -
SAFARI
Lorenzo Cherubini*

Il lavoro di Dottorato è stato svolto presso:

- Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi di Milano-Bicocca (Monza, Italy)
- Campo base Monte Everest (parete sud, Nepal)
- Mass Spectrometry Research Center, Vanderbilt University (Nashville, TN, USA)

In collaborazione con:

- Clinica Ostetrica e Ginecologica, Ospedale San Gerardo (Monza, Italy)
- Istituto Auxologico Italiano (Milano e Verbania, Italy)
- Vanderbilt University (Nashville, TN, USA)

Finanziato da:

- PRIN 2004-2006, FIRB n. RBRN07BMCT
- FAR 2004-2008 (ex-60% MURST)
- Boehringer Ingelheim, Banca Intesa San Paolo, A.DeMari, CutAway srl, Sport Specialist, EuroTech, Moccagatta Pogliani & Associati, DiaTecne, FMS, GE Healthcare, InterCure, Microlife, Omron, Oridion, Pollution, Rotem, Sapio life, Seda SpA, SensorMedics, Spacelabs Healthcare, srLabs, Tecnoel srl, TensioMed, Webbit srl. Fondazione Cariplo (progetto 2009-2483) e MIUR (PRIN 2008N73CJ5_004).On behalf of HIGHCaRe investigators.

INDICE

1	INTRODUZIONE	
1.1	PROTEOMICA	p. 1
1.1.1	Proteomica d'espressione	p. 3
1.1.1.2	Approccio Bottom-up e Top-Down in proteomica	p. 5
1.1.1.3	Tecnologia Mudpit	p. 6
1.1.1.4	Approccio SELDI e ClinProt	p. 7
1.1.2	Proteomica quantitativa	p. 10
1.2	SPETTROMETRIA DI MASSA	p. 11
1.2.1	Spettrometria di massa MALDI-TOF	p. 14
1.2.2	Accoppiamento Cromatografia Liquida - Spettrometria di Massa	p. 24
1.3	TECNICHE BIOINFORMATICHE	p. 32
1.3.1	Mascot	p. 35
1.4	ROTTURA PREMATURA PRETERMINE DELLE MEMBRANE AMNIOCORIALI	p. 37
1.4.1	Definizione e rilevanza clinica	p. 38
1.4.2	Classificazione	p. 38
1.4.3	Anatomia strutturale delle membrane fetali	p. 39
1.4.4	Eziopatogenesi	p. 40
1.4.4.1	Stress Meccanico	p. 40
1.4.4.2	Ruolo delle citochine	p. 42
1.4.4.3	Infiammazione e infezione	p. 43
1.4.4.4	Ormoni	p. 45
1.4.4.5	Fattori nutrizionali e comportamentali	p. 46
1.4.4.6	Fattori genetici	p. 46
1.4.4.7	Fattori iatrogeni	p. 47
1.4.4.8	Altri fattori associati	p. 48
1.4.5	Diagnosi	p. 50
1.4.5.1	Diagnosi clinica	p. 50
1.4.5.2	Diagnosi biochimica	p. 50
1.4.6	Fattori di rischio e potenziali indici predittivi di rottura prematura delle membrane	p. 51
1.4.6.1	Marcatori clinici	p. 51

1.4.6.2	Marcatori biochimici	p. 51
1.4.6.3	Marcatori di infezione intrauterina	p. 51
1.4.7	Complicanze della pPROM	p. 52
1.4.7.1	Complicanze feto/neonatali	p. 52
1.4.7.2	Complicanze materne	p. 54
1.4.8	Conduzione clinica delle pazienti con pPROM	p. 54
1.4.8.1	Protocollo di conduzione clinica	p. 55
1.4.9	PROM a termine	p. 56
1.4.9.1	Eziopatogenesi	p. 56
1.4.9.2	Gestione clinica	p. 57
1.4.10	PROM e pPROM: problemi aperti	p. 58
1.5	PROGETTO HIGHCARE	p. 60
1.5.1	FISIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA DELL'ALTA QUOTA	p. 61
1.5.2	Altitudine ed ipossia ipobarica	p. 61
1.5.3	Acclimatamento	p. 63
1.5.3.1	Adattamenti immediati	p. 64
1.5.3.2	Adattamenti tardivi	p. 65
1.5.3.3	Sistema endocrino-metabolico ed altitudine	p. 68
1.5.4	Patologie d'altitudine	p. 73
1.5.4.1	Mal di montagna acuto (AMS)	p. 73
1.5.4.2	Edema cerebrale acuto (HACE)	p. 76
1.5.4.3	Edema polmonare acuto (HAPE)	p. 77
1.5.4.4	Mal di montagna subacuto	p. 79
1.5.4.5	Mal di montagna cronico (CMS)	p. 79
1.5.5	Farmaci antiipertensivi	p. 80
1.5.5.1	Sistema renina-angiotensina	p. 80
1.5.5.2	Farmaci antagonisti del recettore dell'angiotensina II	p. 81
1.6	SPETTROMETRIA DI MASSA IMAGING	p. 82
2	SCOPO DELLA TESI	p. 87
3	MATERIALI E METODI	p. 90
3.1	ROTTURA PREMATURA PRETERMINE DELLE MEMBRANE AMNIOCORIALI	p. 91
3.1.1	Popolazione in studio	p. 91

3.1.2	Procedure operative per la raccolta dei campioni	p. 92
3.1.3	Materiali	p. 92
3.1.4	Strumenti	p. 93
3.1.5	Software	p. 93
3.1.6	Metodi	p. 94
3.1.6.1	Preparazione dei campioni mediante ClinProt	p. 95
3.1.6.2	Analisi MALDI-TOF	p. 96
3.1.7	ClinProTools	p. 98
3.1.7.1	Algoritmo genetico	p. 102
3.1.7.2	Support Vector Machine	p. 103
3.1.7.3	Quick Classifier	p. 103
3.1.7.4	Supervised Neural Network	p. 104
3.1.8	Analisi HPLC-ESI-MS/MS	p. 104
3.1.9	Identificazione delle molecole di interesse	p. 106
3.2	PROGETTO HIGHCaRe	p. 107
3.2.1	Popolazione in studio	p. 107
3.2.2	Disegno dello studio	p. 107
3.2.3	Procedura operativa per la raccolta dei campioni	p. 108
3.2.4	Materiali	p. 109
3.2.5	Strumenti	p. 109
3.2.6	Software	p. 110
3.2.7	Metodi	p. 110
3.2.7.1	Preparazione dei campioni mediante ClinProt	p. 111
3.2.7.2	Analisi MALDI-TOF	p. 112
3.2.7.3	Analisi HPLC-ESI MS/MS	p. 113
3.2.7.4	Identificazione delle molecole di interesse	p. 113
3.3	SPETTROMETRIA DI MASSA IMAGING ED UTILIZZO DI DETERGENTI	p. 115
3.3.1	Tessuti analizzati	p. 115
3.3.2	Materiali	p. 115
3.3.3	Strumenti	p. 116
3.3.4	Software	p. 116
3.3.5	Metodi	p. 116

3.3.5.1	Preparazione dei tessuti	p. 117
3.3.5.2	Aalisi MALDI-TOF	p. 118
3.3.5.3	Elaborazione statistica	p. 118
4	RISULTATI	p. 120
4.1	OTTIMIZZAZIONE E RIPRODUCIBILITA' DEL METODO CLINPROT	p. 121
4.2	RISULTATI PROGETTO pPROM	p. 124
4.2.1	Dati clinici	p. 125
4.2.2	Analisi proteomica	p. 126
4.2.2.1	Definizione dello spettro medio nelle 3 classi in studio	p. 126
4.2.2.2	Confronto fra le popolazioni in studio	p. 130
4.2.2.3	Biomarker discovery	p. 131
4.2.2.4	Caratterizzazione delle molecole di interesse	p. 135
4.3	RISULTATI PROGETTO HIGHCaRe	p. 139
4.3.1	Dati clinici	p. 140
4.3.2	Analisi proteomica	p. 141
4.3.2.1	Effetto del farmaco sul proteoma urinario a livello del mare	p. 141
4.3.2.2	Effetto del farmaco sul proteoma urinario in condizioni di ipossia ipobarica	p. 142
4.3.2.3	Effetto dell'esposizione all'ipossia ipobarica sul proteoma urinario	p. 144
4.3.3	Caratterizzazione delle molecole di interesse	p. 151
4.4	RISULTATI DETERGENTI E SPETTROMETRIA DI MASSA IMAGING	p. 154
4.4.1	Definizione delle concentrazioni ottimali per i detergenti	p. 155
4.4.2	Modalità di deposito dei detergenti	p. 156
4.4.3	Presenza di interferenti dovuti ai detergenti	p. 158
4.4.4	Effetto dei detergenti sul tessuto epatico murino	p. 158
4.4.5	Compatibilità delle matrici con lo spotter acustico	p. 161
4.4.6	Variabilità inter-sezione	p. 162
4.4.7	Effetto dei detergenti sulla sensibilità degli studi di proteomica condotti mediante IMS	p. 162
4.4.7.1	Tessuto epatico	p. 162

4.4.7.2	Topi ICR	p. 165
5	DISCUSSIONE	p. 169
6	BIBLIOGRAFIA	p. 187

*PROTEOMICA &
SPETTROMETRIA DI MASSA*

1.1 Proteomica

La presente trattazione riguarda l'impiego della Spettrometria di Massa per lo studio del proteoma e del peptidoma dei fluidi biologici e dei tessuti in campo clinico.

Negli ultimi anni la genomica ha fornito un'enorme quantità di dati ed informazioni in grado di correlare i livelli di espressione genica, ed in particolare le sue variazioni con diverse patologie^{1,2}. Tuttavia appare ormai chiaro che le informazioni riguardanti il genoma, come ad esempio l'eventuale delezione di alcuni geni in un cromosoma oppure la variazione dei livelli di espressione di determinati geni, non sono in grado di fornire tutti i dati necessari per comprendere in maniera completa il fenotipo cellulare. Infatti il genoma si può definire "statico" in quanto rimane essenzialmente costante nel tempo ed identico in ogni cellula che compone un organismo, per questo il solo studio delle variazioni dei livelli di espressione genica non è in grado di fornire una descrizione completa dei processi dinamici che avvengono all'interno di una cellula.

In seguito alla trascrizione da DNA ad RNA messaggero quest'ultimo può subire processi di maturazione differenti, detti di *splicing* alterativo, che portano alla formazione di differenti prodotti genici prima di essere tradotti in una sequenza aminoacidica; inoltre, dopo la traduzione, molte proteine subiscono modificazioni post-traduzionali, come ad esempio glicosilazioni e fosforilazioni. Tali modificazioni non sono determinate in maniera diretta dal genoma ma giocano un ruolo fondamentale nella modulazione dell'attività delle proteine (Fig. 1.1).



Fig. 1.1: Dal singolo gene alle diverse proteine: i meccanismi dello *splicing* alternativo (per gentile concessione dell'autore, Prof. A. Hughes).

Per questi motivi all'interno dell'organismo umano è stimata la presenza di 30.000-40.000 geni, mentre il numero di proteine codificate è pari a circa 2 milioni. Questo significa che, statisticamente, l'informazione di un singolo gene può portare alla codifica di circa 50 specie proteiche differenti.

Poiché sono le proteine ad essere direttamente coinvolte nei diversi

processi biochimici che si svolgono all'interno di una cellula e che possono essere

alla base di una patologia, è parsa chiara la necessità di effettuare studi approfonditi sulle proteine presenti all'interno della cellula o in un tessuto patologico al fine di ottenere informazioni utili a comprendere gli eventi biochimici che avvengono all'interno delle cellule in risposta a determinati stimoli di varia natura oppure che portano alla loro "trasformazione" in cellule affette da una determinata patologia³.

Con il termine Proteomica si indica l'insieme delle proteine codificate da un determinato genoma, ovvero si intende l'insieme delle tecnologie e degli approcci utilizzati per lo studio delle proteine. La proteomica rappresenta dunque la disciplina che si occupa dello studio, ovvero dell'analisi su larga scala, del proteoma di un sistema biologico vivente in determinate condizioni ambientali⁴.

Lo scopo principale della proteomica è colmare il divario tra le informazioni che derivano dalla sequenza del genoma e il fenotipo della cellula tramite lo studio dei prodotti genici e delle loro interazioni. La proteomica, inoltre, ha aperto prospettive di notevole interesse in diversi campi della medicina, della biologia, della biochimica, della farmacologia e della tossicologia, in quanto consente di ottenere un quadro completo relativo sia alle proteine presenti all'interno del sistema biologico in studio, che alle loro possibili modificazioni avvenute in seguito a stimoli di diversa natura.

L'obiettivo a lungo termine della proteomica è quello di dare non solo un nome ad una proteina, ma associare ad essa anche una serie di caratteristiche strutturali, biochimiche e funzionali ed inserirla correttamente all'interno dei differenti *pathway* cellulari in modo da poter analizzare in maniera completa situazioni fisiologiche o patologiche complesse, effetti tossici di farmaci ed agenti inquinanti, interazioni fra stimoli di varia natura tramite l'analisi di fluidi biologici come liquor, siero ed urine, e materiali biologici più complessi come organi, tessuti e cellule.

La proteomica può essere a sua volta suddivisa in differenti discipline:

- Proteomica classica (o di espressione): studia il *pattern* di espressione delle proteine espresse dalle cellule, dai tessuti o presenti nei fluidi biologici;
- Proteomica funzionale: studia le interazioni fisiche e funzionali fra le proteine ed i *pathway* nei quali esse sono coinvolte;
- Proteomica strutturale: si occupa di determinare la struttura tridimensionale delle proteine.

1.1.1 Proteomica d' espressione

Recentemente sta aumentando l'interesse per l'applicazione della proteomica alla diagnostica clinica ed alla medicina preventiva. Lo scopo finale è quello di identificare marcatori di malattia, che possano essere utilizzati per migliorare l'accuratezza della diagnosi clinica, anche senza conoscere necessariamente i meccanismi fisiopatologici della stessa patologia. Il processo di scoperta di biomarcatori coinvolge l'analisi di campioni umani o provenienti da modelli animali, con approcci quali profiling di proteine, analisi lipidiche, metabolomica o studi morfologici. Poiché le proteine sono deputate alla maggior parte dei processi biologici degli organismi, la spettrometria di massa (MS), grazie alla sua elevata sensibilità e specificità, è stata riconosciuta come uno strumento indispensabile per gli studi di proteomica.

Gli studi proteomici tradizionali cominciarono sviluppando e catalogando liste dell'intero repertorio proteico cellulare ⁵. Attualmente le mappe del proteoma dei tessuti, delle colture cellulari e dei fluidi biologici (medium di colture cellulari, siero, plasma, urine e CSF) sono ottenute con elettroforesi bidimensionale e identificazione mediante spettrometria di massa grazie alla tecnica denominata Peptide Mass Fingerprinting (PMF). Tale tecnica è costituita da tre passaggi principali:

- a. Estrazione di tutti i costituenti proteici dal materiale di studio (tessuto, linee cellulari o fluidi biologici) seguita dalla separazione della miscela di proteine con un efficace sistema elettroforetico, come gel bidimensionale (2-DE) o elettroforesi capillare.
- b. Generazione di informazioni strutturali tramite spettrometria di massa tipo Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight (MALDI-TOF) dopo idrolisi enzimatica in gel delle proteine di interesse.
- c. Identificazione delle molecole di interesse mediante strumenti bioinformatici che permettono il confronto delle masse sperimentali dei peptidi proteolitici ottenuti con quelle teoriche attese dalla sequenza amminoacidica delle proteine presenti nei database e derivante da una digestione virtuale con uno specifico enzima.

Non tutte le proteine possono però essere identificate attraverso la PMF. Infatti, un'elevata percentuale di proteine non è tuttora inserita nei database con la completa sequenza amminoacidica, inoltre le piccole proteine spesso non forniscono un numero sufficiente di peptidi triptici per un'identificazione univoca e le miscele proteiche non sono sempre facilmente interpretabili con questa tecnica. Nella maggior parte di questi casi, viene condotto un ulteriore passaggio analitico con la ionizzazione ESI (ElectroSpray Ionization) che, nell'analisi del proteoma, è complementare a quella

MALDI. La soluzione contenente i peptidi derivanti dalla digestione enzimatica in gel viene introdotta nello spettrometro mediante ESI o nanoESI dinamica, oppure senza una preliminare separazione cromatografica (ESI o nanoESI statica). Dopo aver ottenuto lo spettro di massa, lo strumento può automaticamente selezionare uno o più ioni e promuovere la loro frammentazione mediante Collision Induced Decomposition (CID), utilizzando gas quali azoto o argon. Vengono così ottenuti spettri di massa MS/MS, dai quali si possono ottenere informazioni complete o parziali sulla sequenza amminoacidica. Inoltre, mediante questa metodica, è possibile caratterizzare numerose modificazioni post-traduzionali come ad esempio la fosforilazione⁶. Tuttavia il principale scopo delle indagini proteomiche è quello di identificare proteine che presentano differenze quali/quantitative tra diverse condizioni fisiologiche al fine di individuare potenziali biomarcatori.

Esistono essenzialmente due strategie per la ricerca di biomarcatori proteici nell'organismo. La prima prevede di effettuare la ricerca direttamente nei tessuti dove la concentrazione di tali markers è più elevata, rendendo più facile l'analisi in spettrometria di massa. Numerosi biomarcatori sono stati identificati utilizzando questa strategia ed integrando 2DE e MS⁷. Oggigiorno vengono continuamente sviluppati nuovi approcci per ottenere un profilo quantitativo delle proteine usando la spettrometria di massa e superando alcune limitazioni della tecnica 2DE, uno dei più promettenti nuovi approcci è rappresentato dalla Spettrometria di Massa Imaging⁸. L'altro approccio è costituito dalla ricerca diretta dei marcatori nei fluidi periferici dove la loro concentrazione dovrebbe essere relativamente bassa. Attualmente la spettrometria di massa è utilizzata anche per studiare il profilo proteico dei fluidi biologici come siero, plasma, urine e medium di colture cellulari. Su queste basi sono stati identificati specifici markers per diverse patologie⁹⁻¹⁰. Purtroppo la diagnosi basata su marcatori singoli è ormai ampiamente riconosciuta come non risolutiva poiché la maggior parte delle malattie deriva da alterazioni poligeniche¹¹⁻¹². Nessuno dei marcatori fino ad oggi individuati nel siero, come il CA 125 per il carcinoma ovarico, può essere utilizzato da solo per uno screening. I risultati ottenuti in studi retrospettivi hanno dimostrato come la diagnosi di cancro possa essere resa molto più accurata combinando modelli predittivi multivariati con i marker tumorali preesistenti¹³. Questi dati hanno indubbiamente aumentato l'interesse nei confronti della ricerca di biomarcatori multipli da usare a scopo diagnostico. Per esempio, recentemente è stato riportato un metodo molto interessante per la rilevazione del cancro al polmone allo stadio precoce¹⁴. Per prima cosa sono

state identificate proteine differentemente espresse nel medium di coltura ottenuto da cellule primarie di cancro al polmone e di tessuto normale adiacente bronchiale. Successivamente alcune di queste proteine sono state ricercate nel plasma col metodo ELISA, consentendo di elaborare un cluster proteico con livelli di specificità e sensibilità più elevati di qualunque altro marcatore singolo. Tuttavia la maggior parte dei comuni metodi utilizzabili per l'analisi di proteine multiple richiede anticorpi ben caratterizzati e con specificità ed affinità note. L'approccio proteomico basato sulla spettrometria di massa permette di superare questo limite, poiché non è necessaria una conoscenza a priori di quali proteine possano essere modificate nella patologia. I campioni biologici, a causa della loro complessità, sono in genere purificati prima dell'analisi in massa. Per tale scopo l'elettroforesi bidimensionale (2D-PAGE) è la tecnica più largamente utilizzata. Sfortunatamente questo tipo di approccio si rivela molto lungo e laborioso, e questo limita la sua applicazione nell'ambito della proteomica clinica. Per ovviare ai limiti di questa tecnologia sono emersi numerosi nuovi approcci.

1.1.1.2 Approccio Bottom-up e Top-Down in proteomica

Gli esperimenti di proteomica spesso implicano l'analisi simultanea di alcune migliaia di specie proteiche derivanti da campioni biologici complessi. La separazione dei peptidi e delle proteine è dunque l'elemento chiave dell'analisi proteomica, in quanto permette di semplificare miscele proteiche complesse e portare le molecole alla sorgente di ionizzazione¹⁵⁻¹⁷.

La scelta della metodologia di separazione dipende dal fine sperimentale e dal livello a cui si desidera indagare le proteine. Due sono gli approcci proteomici usati: l'approccio bottom-up e quello top-down¹⁸.

Nell'approccio bottom-up, le miscele proteiche complesse sono digerite enzimaticamente in miscele peptidiche ancora più complesse, che verranno in seguito frazionate mediante vari step cromatografici prima di essere sottoposte ad indagini in spettrometria di massa tandem (MS/MS). Gli spettri MS/MS sono registrati in modo da rilevare il maggior numero di peptidi possibili ed i risultati sottoposti alla ricerca in banca dati al fine di identificare le proteine presenti nelle miscele originali. Questo approccio è altamente informativo e adatto ad essere automatizzato¹⁹. Queste procedure tipicamente identificano un numero molto limitato di peptidi per proteina ma sufficienti per identificare il gene da cui la proteina viene trascritta. Questo approccio funziona bene per quegli organismi in cui l'assunzione che un gene codifichi per una proteina è

valida mentre è meno efficace per gli eucarioti superiori, dove processi come lo splicing alternativo, l'RNA editing e le modificazioni post-traduzionali fanno corrispondere ad un singolo gene diverse specie proteiche. Dunque le strategie basate sui peptidi permettono l'identificazione dei geni da cui derivano le proteine ma non identificano adeguatamente le differenti isoforme funzionali delle proteine ²⁰.

Nella strategia top-down, invece, lo studio si focalizza sulla proteina intatta e le differenti isoforme possono essere isolate prima della loro identificazione e caratterizzazione mediante spettrometria di massa. La frammentazione delle proteine non avviene in soluzione ma in fase gassosa, direttamente nello spettrometro di massa, in modo da creare una serie di ioni indicativi della sequenza. La differenza nei valori m/z degli ioni frammento definiscono la posizione e la sequenza degli amminoacidi nella proteina ²¹. Molti sono i metodi e gli spettrometri usati per questo tipo di analisi. Un esempio è costituito dall'ESI-FTMS capace di analizzare proteine intatte grazie alla sua elevata risoluzione. Le proteine sono frammentate attraverso la tecnica ECD (Electron Capture Dissociation). In effetti la spettrometria FTMS in seguito all'alta risoluzione permette di usare miscele semplici di proteine riducendo la dipendenza dell'approccio proteomico dai metodi separativi e restituisce dati che consentono di rilevare errori nella sequenza amminoacidica e modificazioni post-traduzionali ²².

1.1.1.3 Tecnologia MUDPIT

Negli ultimi anni sono state sviluppate numerose tecniche alternative per la ricerca di biomarcatori, in grado di ovviare ad alcune limitazioni della 2DE.

La tecnologia ideale dovrebbe avere le seguenti caratteristiche:

- elevata sensibilità e specificità
- applicabile su larga scala
- poco invasiva
- poco costosa

Un metodo alternativo per l'analisi di complesse miscele proteiche è rappresentato dalla tecnologia MUDPIT (MULTIdimensional Protein Identification Technology) (Tab. 1.1). Essa può essere definita come un approccio di tipo bottom-up automatizzato, in cui il problema della complessità viene risolto a livello peptidico ¹⁸, in quanto i peptidi vengono usati come marcatori della sequenza proteica.

	2DGE	MudPIT
VANTAGGI	<ul style="list-style-type: none"> - possibilità di automatizzazione - disponibilità di gel pre-cast - analisi quantitativa - ampiamente utilizzata dai ricercatori 	<ul style="list-style-type: none"> - possibilità di analizzare tutte le proteine - minore quantità di campione richiesta - elevato potere di separazione dei peptidi - elevato numero di proteine identificate
SVANTAGGI	<ul style="list-style-type: none"> - richiede elevate quantità di campione - le proteine di membrana sono difficili da rilevare - sconsigliata per proteine con pI estremi e/o poco abbondanti 	<ul style="list-style-type: none"> - non può dare informazioni quantitative in maniera diretta - non sono disponibili sistemi commerciali

Tab. 1.1 Confronto fra i metodi di separazione basati su gel 2D gel elettroforesi e MudPIT

Il primo passaggio della strategia MUDPIT prevede la digestione proteolitica delle miscele proteiche in miscele peptidiche. I peptidi risultanti vengono separati in una fase iniziale da una colonna cromatografica a forte scambio cationico (SCX) e in una seconda fase da una a fase inversa (RP) ²³. La colonna RP è costituita generalmente da silice fusa ed ha un diametro anche inferiore ai 100 µm in modo da permettere un'eluizione a nano flussi (≈100-300 nl/min). I peptidi sono staccati dalla colonna SCX verso la fase RP tramite una serie di iniezioni addizionali di soluzioni saline a molarità crescente. Un gradiente RP separa i peptidi e li trasporta allo spettrometro di massa. Dal momento che ciascuna fase separa i peptidi attraverso proprietà chimiche ortogonali, viene raggiunto un grado elevatissimo di risoluzione nella separazione peptidica ²¹.

1.1.1.4 Approccio SELDI e CLINPROT

Una delle soluzioni più interessanti alla ricerca di marcatori proteici in fluidi biologici, nonché uno dei metodi che consentono di ovviare ai problemi che la tecnologie legate alla 2D-E pongono, è indubbiamente rappresentata dalla tecnica SELDI, la quale si basa sulla combinazione di un sistema di prefrazionamento del campione tramite superfici funzionalizzate (ProteinChip) con l'analisi MALDI-TOF. Solo un gruppo di proteine presenti nel campione biologico possono venir trattenute dalla superfici attivate e quindi rilevate dal MALDI-TOF (SELDI-TOF) ²⁴⁻²⁶. I profili spettrali ottenuti vengono poi processati con opportuni software di indagine statistica per l'identificazione di segnali differentemente espressi nelle popolazioni di studio e l'elaborazione di modelli

predittivi basati su marcatori multipli (Fig. 1.2).

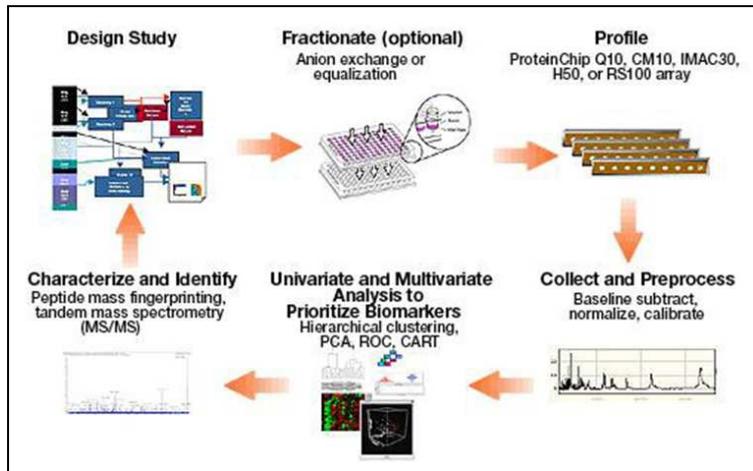


Fig. 1.2: Principio della tecnologia ProteinChip SELDI-TOF (per gentile concessione di BIO-RAD).

Esistono diverse tipologie di prefrazione che permettono di catturare specifici gruppi di proteine e peptidi: a fase inversa, a scambio ionico, ad affinità metallica oppure sfruttando substrati biologici come anticorpi, proteina A, recettori, ligandi o enzimi. Pur essendo relativamente recente, il numero di pubblicazioni relative a questa metodica è notevole, soprattutto in campo oncologico.

Si stima che la concentrazione dei markers tumorali nei fluidi periferici (siero, plasma e urine) sia piuttosto bassa, nell'ordine delle picomoli al litro (pmol/l). La sensibilità dell'analisi, per spettrometri di massa di tipo MALDI-TOF, è nell'ordine delle fmol e, con alcuni accorgimenti, delle amol; appare evidente quindi la possibilità di poter rilevare tracce anche molto ridotte di sostanze in matrici biologiche complesse e quindi di identificare marcatori biologici.

Una valida alternativa alla tecnologia SELDI è rappresentata dall'uso di biglie magnetiche ricoperte da superfici funzionalizzate (ClinProtTM)²⁷. Tali biglie permettono la pre-purificazione del campione prima dell'analisi in spettrometria di massa (Fig. 1.3). Anche in questo caso esistono diversi tipi di superfici attive che possono essere utilizzate sia singolarmente che in sequenza.

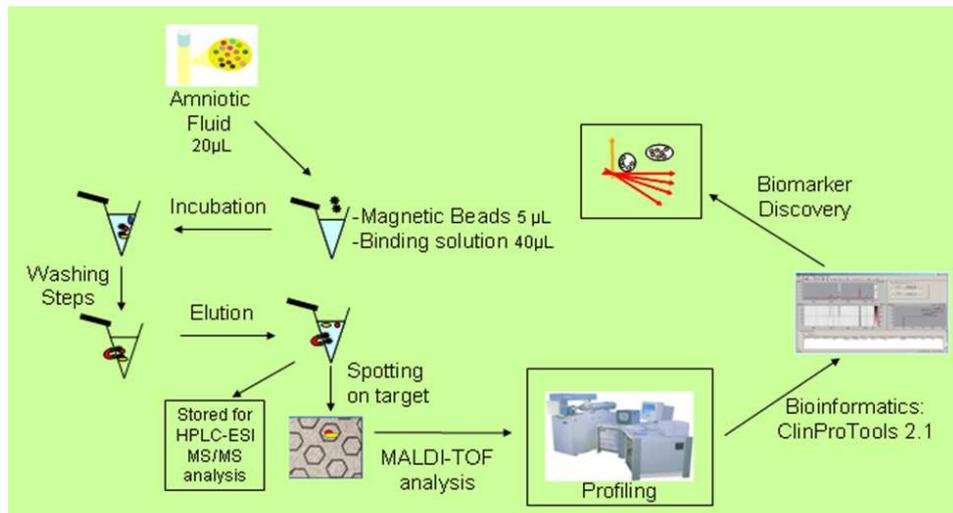


Fig. 1.3: ClinProt™ workflow.

I due approcci descritti si basano essenzialmente sugli stessi principi ma il ClinProt permette di utilizzare solo una frazione del campione per l'analisi al MALDI-TOF, cosicché una parte dell'analita resta disponibile per ulteriori approcci analitici con altre strumentazioni e tecnologie. Entrambe le tecniche possono essere facilmente applicate ad un vasto numero di campioni con l'ausilio di un Robot. La possibilità di identificare con successo un profilo proteomico alterato in diverse patologie con la metodica ClinProt è già stato riportato^{27,28}. La metodica è stata applicata soprattutto in campo oncologico. Uno studio sul carcinoma orale (ORC)²⁷ applicato a campioni di plasma in eparina raccolti da 29 controlli e 57 pazienti ha portato all'individuazione di 6 segnali differentemente regolati nelle popolazioni in esame; il picco con maggior valenza diagnostica e risultante sovraespresso nei pazienti ORC (sensibilità 100% e specificità 97%) è stato identificato come un frammento della catena α del fibrinogeno, proteina già descritta in diverse patologie neoplastiche quali tumori al seno, al polmone e melanoma. Sebbene questi dati potrebbero suggerire un'aspecificità del marcatore, si deve comunque considerare che si tratta di un frammento di una proteina, il cui aumento potrebbe non essere per forza correlato con l'effettiva concentrazione della proteina intatta. Un altro lavoro interessante è stato svolto sul cancro colon-rettale²⁹; per lo studio sono stati raccolti e purificati con biglie magnetiche ad interazione idrofobica i sieri di 66 pazienti e 50 controlli. I profili proteomici ottenuti hanno portato all'individuazione di un cluster di segnali in grado di separare le classi in esame con valori di sensibilità e specificità rispettivamente del 95.2% e del 90.0%. Uno studio interessante descrive la combinazione delle tecnologie ClinProt e SELDI nell'individuazione di biomarcatori per il cancro della vescica. Grazie a questo approccio

è stata descritta l'overespressione della calcium-binding protein S100S8, nonché di altri due possibili biomarcatori non ancora caratterizzati con m/z 5.75 KDa e 6.89 KDa.

1.1.2 Proteomica quantitativa

Oltre all'identificazione iniziale del fenotipo d'espressione ed alla caratterizzazione proteica, un parametro chiave dell'analisi proteomica è la quantificazione della proteina di interesse. La quantificazione infatti è uno strumento fondamentale per la comprensione degli effetti trascrizionali, traduzionali e post-traduzionali che condizionano la sintesi e la funzione delle proteine ¹⁸.

Negli ultimi anni la proteomica quantitativa mediante spettrometria di massa si è principalmente focalizzata sulla determinazione dell'espressione proteica differenziale e non sulla quantificazione assoluta poiché molte applicazioni della scoperta di target farmacologici e della valutazione degli eventi segnale sono legati più all'abbondanza relativa delle proteine che non a quella assoluta. In proteomica la maggioranza dei metodi quantitativi coinvolgono la marcatura di peptidi con isotopi stabili sia mediante vie biosintetiche che chimiche. I peptidi possono così non solo essere identificati ma anche quantificati ³⁰.

Esistono principalmente tre diversi approcci quantitativi:

- a) marcatura isotopica metabolica: prevede l'incorporazione di marcatori isotopici durante i processi di metabolismo cellulare e sintesi proteica; uno delle più usate è la SILAC (Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture) ³¹.
- b) marcatura chimica: le più utilizzate sono la tecnologia ICAT (Isotope-Coded Affinity Tag), ICPL (Isotope Coded Protein Labelling), ITRAQ (Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification) e l'incorporazione di O¹⁸ durante taglio enzimatico della proteina;
- c) quantificazione assoluta: la misura della quantità esatta di una proteina o peptide richiede a differenza di quella relativa un valutazione qualitativa prima di quella quantitativa in modo che l'entità da misurare sia definita. Esempi sono l'utilizzo di uno standard interno ³² e la tecnica VICAT (Visible Isotope-Code Affinity Tags) ³³.

Il metodo di marcatura chimica delle proteine più utilizzato è l'ICAT ³⁴. Tale metodo prevede l'introduzione di un marcante costituito da isotopi stabili nelle proteine ottenute da una condizione normale ed una patologica. Le due popolazioni di proteine, marcate ciascuna con un differente isotopo, vengono miscelate, estratte con una colonna di

affinità ed infine analizzate attraverso LC-ESI-MS/MS. Successivamente le proteine vengono identificate e la loro differenza di espressione viene valutata sulla base della diversa intensità degli ioni prodotti dalla spettrometro. Una metodologia di marcatura innovativa nel campo della proteomica è poi rappresentata dalla tecnologia ICPL, basata sulla marcatura isotopica di tutti i gruppi aminoacidici liberi nelle proteine. Questo approccio fornisce una quantificazione altamente riproducibile ed accurata, estese informazioni sulla sequenza proteica, tra cui modificazioni post-traduzionali e isoforme, e la compatibilità con tutte le tecniche di separazione attualmente disponibili³⁵.

1.2 Spettrometria di Massa

La spettrometria di massa è una tecnologia indispensabile per l'identificazione delle proteine negli studi di proteomica; l'ampio utilizzo di questa tecnica deriva dalla sua capacità di risolvere problemi strutturali che non sono del tutto risolvibili mediante altre tecniche ³⁶. Tale tecnologia inoltre è caratterizzata da elevata selettività, che permette di rivelare una sostanza presente in miscela con molte altre, ed elevata sensibilità (nell'ordine delle femto (10^{-15}) o atto (10^{-18}) moli); questo la rende la tecnica d'elezione per l'analisi di sostanze presenti in basse concentrazioni in matrici complesse quali quelle di origine biologica. In seguito alla produzione di strumenti a costo relativamente contenuto, dalle dimensioni limitate e dal più facile utilizzo, la spettrometria di massa ha riscontrato una sempre crescente applicazione nel campo della proteomica e nel campo della ricerca biomedica per la determinazione della struttura delle macromolecole, in particolare delle proteine.

Lo spettrometro di massa può essere definito come uno strumento analitico in grado di separare molecole e determinarne la massa molecolare in seguito a ionizzazione delle stesse. Tale strumento, inoltre, è in grado di fornire informazioni strutturali qualitative, ed in alcuni casi anche quantitative, di una grande varietà di composti. La spettrometria di massa nasce nel 1899 a seguito degli studi condotti dal fisico inglese J. J. Thomson, il quale ha evidenziato che all'interno di un tubo posto sotto vuoto, al quale si applichi una differenza di potenziale, si ha la formazione di elettroni e radiazioni positive ³⁷. Studi successivi effettuati da A.J. Dempster ³⁸⁻³⁹ e F.W. Aston ⁴⁰⁻⁴¹ hanno permesso di sviluppare la spettrometria di massa.

Uno spettrometro di massa separa le particelle cariche in funzione del loro rapporto

massa/carica (m/z); l'iniziale necessità di formare ioni del campione in fase gassosa per i processi di separazione e rivelazione, ha reso la spettrometria di massa inaccessibile per lungo tempo all'analisi di macromolecole come acidi nucleici e proteine. Questo limite era dovuto al fatto che il processo di ionizzazione avveniva per riscaldamento e bombardamento con particelle, processi che causano nella maggior parte dei casi la distruzione del campione biologico ⁴². Attualmente esistono tecniche di ionizzazione cosiddette *soft*, ovvero che non causano la distruzione degli acidi nucleici e delle proteine, e che rendono possibile l'analisi di queste macromolecole biologiche ⁴³ in fase solida, liquida oppure gassosa. In particolare, intorno al 1988 sono nate due nuove tecniche di ionizzazione *soft* differenti fra loro e tuttora ampiamente utilizzate negli studi di proteomica; la tecnica MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) ⁴⁴ messa a punto da F. Hillenkamp mediante la quale le proteine vengono ionizzate in seguito ad incorporazione in una matrice capace di assorbire nell'UV e la tecnica ESI (*ElectroSpray Ionization*) ⁴⁵ messa a punto da J.B. Fenn mediante la quale le proteine in soluzione vengono ionizzate e desorbite ad opera di un intenso campo elettrico.

Queste due nuove tecniche hanno consentito l'utilizzo della spettrometria di massa come strumento per le analisi di proteomica ⁴⁶, per l'analisi di peptidi bloccati all'N-terminale, per il sequenziamento di peptidi e, soprattutto, per l'analisi delle modificazioni post-traduzionali, come fosforilazioni ⁴⁷ e glicosilazioni ⁴⁸ che svolgono un ruolo chiave nella regolazione dell'attività delle proteine e non sono prevedibili sulla sola base genomica. Infatti per alcune di queste modificazioni post-traduzionali sono conosciute le sequenze consenso, ma la loro presenza deve essere sempre confermata sperimentalmente.

Uno spettrometro di massa è sostanzialmente composto da quattro elementi:

- Sistema di introduzione del campione
- Sorgente di ionizzazione
- Analizzatore di massa (o selettore)
- Rivelatore (o *detector*)

Il sistema di introduzione del campione è molto importante nei casi in cui la sorgente di ionizzazione operi in condizioni di alto vuoto. In questo caso il sistema di introduzione del campione deve essere costruito in modo tale da non fare perdere il vuoto alla sorgente quando il campione da analizzare viene introdotto nello strumento. Nella sorgente di ionizzazione vengono prodotti gli ioni i quali vengono poi accelerati verso l'analizzatore che li separa in base al rapporto massa/carica e li convoglia al *detector*

dove vengono rivelati (Fig. 1.4).

Lo strumento è interfacciato ad un *computer* che ne costituisce il sistema di controllo, in quanto interagisce con questo a diversi livelli permettendo di controllarne i vuoti, modificare i parametri per l'acquisizione e la rivelazione dei dati e di elaborare i dati ottenuti. Il sistema di introduzione del campione viene detto *on-line* nel caso in cui sia interfacciato direttamente con un sistema di separazione come ad esempio un HPLC o un gas cromatografo, mentre viene detto *off-line* se il campione viene introdotto nello strumento senza l'utilizzo dell'interfaccia con un sistema di separazione.

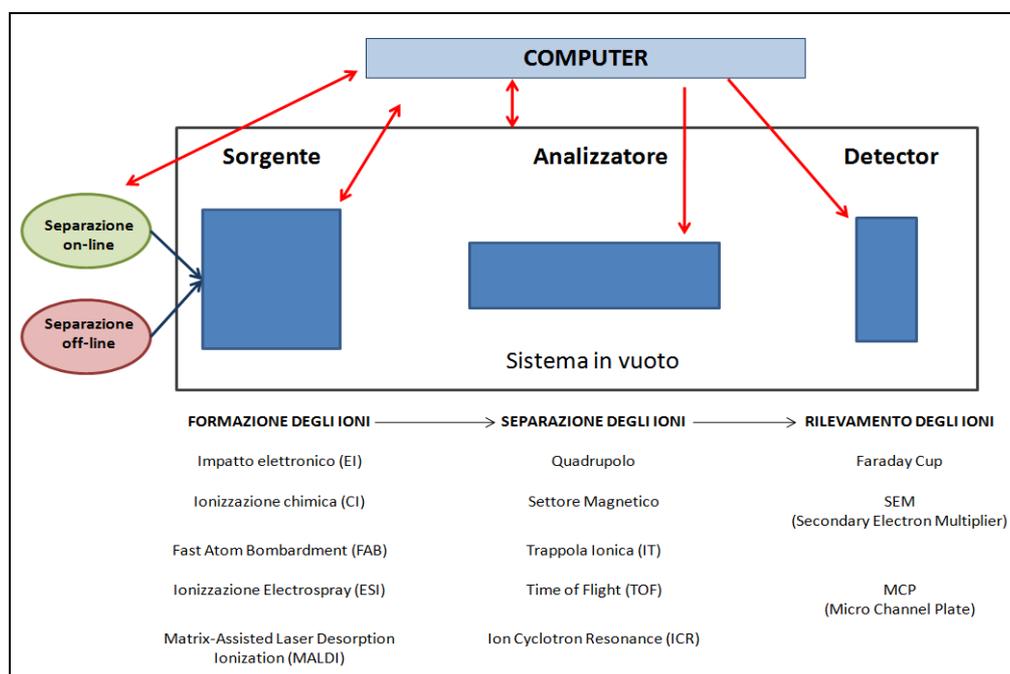


Fig. 1.4: Schema di uno spettrometro di massa e possibili sorgenti, analizzatori e detector.

Per quanto riguarda la sorgente ionica, questa differisce a seconda della tecnica di ionizzazione utilizzata; la scelta del metodo di ionizzazione corretto per un dato campione è di fondamentale importanza poiché da questo dipendono la natura degli ioni che vengono generati (ione positivo o negativo, ione monovalente, multivalente, etc.) e la loro abbondanza all'interno dello spettro generato.

Le tecniche attualmente disponibili sono numerose e differiscono molto l'una dall'altra, questo ha così generato particolari varianti della spettrometria di massa che vengono utilizzate in base alla natura del campione da analizzare. La principale caratteristica che differenzia fra loro le diverse sorgenti è l'energia con cui vengono generati gli ioni: esistono sorgenti definite *hard*, le quali operano ad elevata energia e portano ad una frammentazione spinta del campione, e sorgenti definite *soft*, che invece operano a

minore energia e producono una frammentazione molto più limitata del campione. La frammentazione del campione all'interno della sorgente ionica può essere uno strumento utile per ottenere informazioni sulla struttura del composto in analisi soprattutto nel caso si tratti di molecole organiche di piccole dimensioni, mentre per quanto riguarda l'analisi di proteine l'interpretazione degli spettri ottenuti mediante frammentazione della molecola in sorgente può fornire informazioni sulla sequenza aminoacidica utili per la sua identificazione, anche se questo tipo di analisi risulta ancora complicato ⁴⁹.

1.2.1 Spettrometria di Massa MALDI – TOF

Questa tecnica analitica consente l'analisi di *routine* di biopolimeri con massa da 1 a 500 kDa anche se in teoria l'intervallo di masse analizzabili è illimitato. In questa tecnica le molecole dell'analita vengono incorporate, tramite co-cristallizzazione, in una matrice che solitamente è costituita da una piccola molecola organica in grado di assorbire la lunghezza d'onda del laser. A seguito dell'assorbimento d'energia indotto dal laser, la matrice passa ad uno stato eccitato e l'energia viene utilizzata per generare ioni molecolari che vengono accelerati verso l'analizzatore a tempo di volo. Attualmente la spettrometria di massa MALDI-TOF ha assunto un ruolo fondamentale nel campo della proteomica poiché presenta un'elevata sensibilità, permette analisi molto rapide ed ha una buona tolleranza alla presenza nel campione di sali non volatili e tamponi comunemente utilizzati in biologia. La tecnica del desorbimento laser per l'analisi di campioni solidi, ed in particolare di peptidi, è relativamente recente. Questa tecnica per l'analisi di biopolimeri è stata utilizzata per la prima volta nel 1976 e prevedeva la produzione di peptidi intatti in fase gassosa allo scopo di analizzarli con uno spettrometro di massa ⁵⁰. Per riuscire a volatilizzare tali molecole si dovevano considerare due parametri fisici fondamentali: la lunghezza d'onda di assorbimento e la volatilità dei peptidi. Inoltre questo metodo aveva il difetto di non consentire l'analisi di peptidi con peso superiore ai 1000 Da.

La tecnica di ionizzazione in seguito a desorbimento laser assistito da matrice è stata introdotta alla fine degli anni 80; il gruppo di Karas e Hillenkamp ed il gruppo di Tanaka, hanno proposto nello stesso anno l'aggiunta al campione di un largo eccesso di matrice (generalmente in rapporto 100:1 o 10.000:1) in grado di assorbire la lunghezza d'onda del laser preservando l'analita ed aiutandolo nel processo di ionizzazione ^{51,52}. In seguito sono stati ottenuti notevoli miglioramenti soprattutto dovuti all'osservazione ed

agli esperimenti empirici piuttosto che alle conoscenze chimico-fisiche riguardo a questa tipologia di ionizzazione. Infatti il reale meccanismo della ionizzazione MALDI è ancora oggi un importante argomento di ricerca e discussione.

La spettrometria di massa MALDI-TOF viene spesso utilizzata nelle fasi iniziali dei progetti di proteomica durante le quali viene eseguito uno *screening* per l'identificazione di un gran numero di candidati proteici per successive e più approfondite analisi; in questa fase risultano essere molto importanti la produttività ed il numero di proteine identificate positivamente. Per questa prima fase si ricorre in genere al mappaggio dei peptidi ottenuti in seguito a digestione enzimatica mediante spettrometria di massa MALDI-TOF poiché, oltre ai vantaggi precedentemente evidenziati, questi strumenti possiedono un'elevata risoluzione, cruciale per questo tipo di approccio, ed inoltre offrono la possibilità di automatizzare l'analisi fino all'identificazione della proteina. Le due caratteristiche che rendono automatizzabile le analisi per l'identificazione delle proteine mediante questa tipologia di strumenti sono il loro relativamente facile utilizzo, e la facile interpretazione degli spettri ottenuti in quanto con la tecnica di ionizzazione MALDI si ottengono quasi esclusivamente ioni monocarica $[M+H]^+$ [161] (Tab 1.2).

Prima di essere analizzato, il campione deve essere depositato, su di un *target* metallico, insieme ad una apposita matrice; l'evaporazione del solvente in cui sono disciolti campione e matrice, provoca la co-cristallizzazione del campione con la matrice stessa, che è generalmente costituita da un acido organico debole. Esistono diversi tipi di matrice ognuna delle quali viene scelta in base al tipo di analisi da effettuare, quindi in base al campione in analisi ed al tipo di laser che si utilizza per la ionizzazione. La matrice ha il compito di assorbire la lunghezza d'onda del laser, proteggere l'analita, evitare l'aggregazione delle molecole di analita per ottenere ioni molecolari e desorbire l'analita in maniera indipendente dalle sue caratteristiche intrinseche.

Tipologia di Campione	Ioni Positivi	Ioni Negativi
Bassa Polarità	$M^+ // [M+H]^+$	$M^- // [M-H]^-$
Media Polarità	$M^+ [M+H]^+ // [M+Cat]^+ [2M+H]^+$ MW > 3000: $[M+nH]^{n+}$, n = 2, 3	$M^- [M-H]^- // [2M-H]^-$ MW > 3000: $[M-nH]^{n-}$, n = 2, 3
Alta Polarità	$[M+H]^+ [M+Cat]^+ // [2M+H]^+$ $[2M+Cat]^+$ MW > 3000: $[M+nH]^{n+}$, n = 2, 3	$[M-H]^- // M^- [2M-H]^-$ MW > 3000: $[M-nH]^{n-}$, n = 2, 3
Ionico K^+A^-	$K^+ // [K_n+A_{n-1}]^+ [KA]^+$	$A^- // [A_n+K_{n-1}]^- [KA]^-$
Cat: Cationizzazione mediante Li^+ , Na^+ , K^+ ed altri ioni metallici		
An: Anionizzazione mediante Cl^- , Br^- , I^- , HSO_4^- ed altri anioni		
Addotti con la matrice si possono formare con tutti i tipi di analiti, es. . $[M+H+matrice]^+$.		

Tab. 1.2: Principali ioni formati con la tecnica di ionizzazione MALDI.

Esistono diverse matrici, ognuna adatta ad una particolare esigenza analitica (Tab 1.3). Ad esempio l'acido α -Ciano-4-Idrossicinnamico (HCCA) è adatto per analisi di peptidi o proteine con massa inferiore a 10 KDa e quindi per la maggior parte degli studi di proteomica, mentre l'acido Sinapinico (SA) è utilizzato per rilevare proteine intere o peptidi con massa superiore ai 10 KDa (Fig. 1.5).

MATRICE	APPLICAZIONI
Acido α -ciano-4-idrossicinnamico (CHCA)	Peptidi (<10kDa), lipidi, carboidrati
Acido Sinapinico o acido Trans-3,5-dimetossi-4-idrossi cinnamico	Peptidi e proteine di grosse dimensioni (10-150 kDa), glicoproteine, proteine di membrana
Acido 2,5-diidrossi benzoico (DHB)	Peptidi, proteine, carboidrati, glicoproteine, glicolipidi, polimeri, lipidi, molecole organiche
Acido 3-idrossipicolinico (HPA)	Oligonucleotidi > 3.5 kDa
2,4,6-triidrossiacetofenone (THAP)	Oligonucleotidi < 3.5 kDa
Acido picolinico (PA)	Oligonucleotidi
Miscele di PA e HPA	Oligonucleotidi > 10 kDa
6-azo2-tiotimina (ATT)	DNA

Tab. 1.3: Matrici più utilizzate per le analisi MALDI-TOF e loro applicazioni.

Una volta selezionata la matrice opportuna, si procede con la scelta del metodo di cristallizzazione da adottare in quanto anch'esso varia a seconda dell'analita e della tipologia di analisi da eseguire e può influenzare la riuscita dell'analisi. Esistono alcune indicazioni riguardo al metodo da adottare, ma in generale è sempre l'esperienza dell'operatore a determinare il tipo di deposito da utilizzare.

I due metodi maggiormente utilizzati per le analisi di peptidi preparati in soluzione sono il *double layer* ed il *dried droplet*. Il metodo *double layer* consiste nel formare un primo strato di matrice sul quale viene in seguito depositato il campione ed infine depositare sopra al campione un ulteriore strato di matrice. Questo tipo di deposito presenta il vantaggio di fornire cristalli di piccole dimensioni ed omogenei, per questo motivo viene spesso utilizzato per analisi che richiedono una grande precisione in quanto fornisce misure molto riproducibili da uno sparo di laser all'altro. Presenta tuttavia il difetto di una preparazione laboriosa.

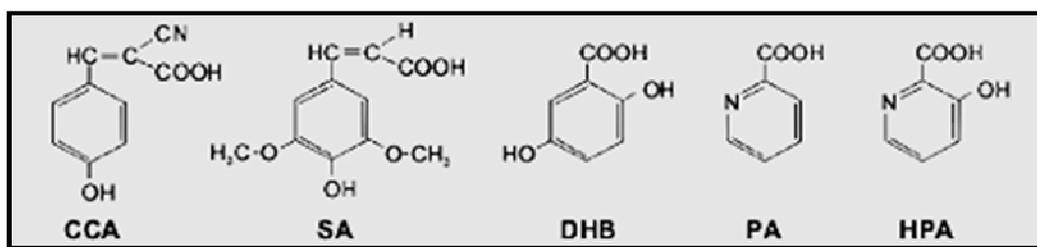


Fig. 1.5: Formula di struttura di alcune fra le matrici più utilizzate per le analisi MALDI-TOF

Il metodo *dried droplet* invece prevede che la matrice venga miscelata con l'analita ed in seguito questa miscela venga depositata sul *target*. Questo metodo genera cristalli di dimensioni maggiori ed eterogenei. Lo svantaggio di questo tipo di deposito risiede proprio nell'eterogeneità dei cristalli e nella loro maggiore dimensione in quanto queste caratteristiche influenzano la ionizzazione dell'analita. Maggiori sono le dimensioni dei cristalli, maggiore sarà la loro resistenza agli impulsi laser, per questo come risultato si otterranno misure lievemente meno precise. Il vantaggio nell'utilizzo di questo metodo di deposito risiede nella sua facilità di esecuzione e quindi nella possibilità di eseguirlo in maniera automatizzata.

Una volta eseguito il deposito è possibile inoltre, quando necessario, eseguire una desalificazione del campione direttamente sul *target* mediante l'aggiunta di acqua acidificata sul deposito. L'acqua viene in seguito allontanata, insieme ai sali, ed il

campione viene fatto ricristallizzare per aggiunta di matrice.

Un altro parametro importante per il desorbimento e la ionizzazione dell'analita è la lunghezza d'onda del laser (Tab. 1.4); la sua scelta dipende soprattutto dalla matrice utilizzata e dalla natura dell'analita.

LASER	LUNGHEZZA D'ONDA	ENERGIA (kcal/mol)	ENERGIA (eV)	DURATA DELL'IMPULSO
Azoto	337 nm	85	3.68	< 1 ns- pochi ns
Nd: YAG μ3	355 nm	80	3.49	5 ns
Nd: YAG μ4	266 nm	107	4.66	5 ns
XeCl	308 nm	93	4.02	25 ns
KrF	248 nm	115	5.00	25 ns
ArF	193 nm	148	6.42	15 ns
Er:YAG	2.94 μ m	9.7	0.42	85 ns
CO₂	10.6 μ m	2.7	0.12	100 ns + 1 μ s coda

Tab. 1.4: Tipi di laser maggiormente utilizzati per le analisi MALDI-TOF e loro caratteristiche.

Una volta effettuato il deposito, il *target* viene inserito all'interno dello strumento mediante un sistema di introduzione del campione che permette il mantenimento del vuoto sia all'interno della sorgente di ionizzazione che del tubo di volo, impedendo così l'ingresso nello spettrometro a molecole di ossigeno, azoto ed altri gas presenti nell'aria. La presenza di queste molecole, infatti, provocherebbe collisioni con le molecole dell'analita con una conseguente variazione del loro tempo di volo. Inoltre determinerebbe la frammentazione delle stesse e la possibilità di reazioni chimiche indesiderate, come ad esempio ossidazioni.

Il processo di desorbimento/ionizzazione, può essere scomposto in diverse fasi: la prima fase è costituita dall'assorbimento dell'energia del fascio di fotoni della luce laser da parte della matrice. Solitamente il laser emette ad una lunghezza d'onda nel campo dell'IR o dell'UV; in seguito all'assorbimento di energia, la matrice ionizza e subisce un cambiamento di fase passando dallo stato solido a quello di gas supercompressso.

Durante il cambiamento di fase la matrice cede la carica ad alcune molecole di analita mediante il trasferimento di un protone. In seguito al cambiamento di fase la matrice si espande a velocità supersonica ed in fase gassosa avviene l'ulteriore ionizzazione delle molecole di analita (Fig. 1.6).

Nonostante rimangano ancora da



Fig. 1.6: La formazione di ioni in una sorgente MALDI. (per gentile concessione dell'autore, Prof. C. Hendrickson)

chiarire alcuni aspetti sul processo di ionizzazione MALDI, questo è conosciuto soprattutto nelle sue fasi fondamentali: la protonazione, la deprotonazione e la cationizzazione avvengono in fase gassosa. Inoltre è noto che la ionizzazione avviene in due fasi distinte chiamate ionizzazione primaria e ionizzazione secondaria⁵³; i processi della ionizzazione primaria sono dovuti ad una associazione fra un meccanismo di foto-ionizzazione, imputabile ai

protoni adsorbiti dalla matrice, ed un meccanismo termico dovuto all'elevata temperatura presente nel plasma d'espansione che è di circa 500K.

Il processo di ionizzazione primaria dà come risultato la formazione di molecole di matrice allo stato eccitato:



Il processo di ionizzazione secondaria ha luogo nel plasma di espansione per un processo di trasferimento protonico in fase gassosa⁵⁴; durante questo tipo di trasferimento protonico possono avvenire due tipi di reazione:

reazione Matrice-Matrice:



e reazione Matrice-Analita:



Durante entrambi i processi di ionizzazione il parametro determinante per la ionizzazione dell'analita è l'affinità protonica. Le proteine ed i peptidi hanno un'affinità protonica pari a circa 240 kcal/mol⁶, mentre la maggior parte delle matrici comunemente utilizzata ha valori di affinità protonica inferiori, che al massimo raggiungono le 223 kcal/mol. Essendo la reazione di protonazione di peptidi e proteine favorita dal punto di vista termodinamico, questa reazione risulta essere preponderante. Il processo è esotermico e l'energia liberata può causare la frammentazione dell'analita

^{55,56}. Questo permette inoltre di spiegare il processo di frammentazione degli ioni metastabili che viene descritto come una conseguenza dell'aumento di temperatura durante il processo di desorbimento ⁵⁷. Se al contrario viene utilizzata una matrice con un' affinità protonica uguale o superiore a quella dell'analita, si avrà una diminuzione della frammentazione.

Una volta formati, gli ioni dell'analita subiscono un' accelerazione verso il tubo di volo. Tale accelerazione viene impressa mediante l'applicazione di un campo elettrico, di potenziale (V), il quale fornisce ad ogni ione la medesima energia cinetica (E_C) pari a zeV dove z rappresenta la carica dello ione, mentre e rappresenta la carica di un elettrone ($1,602 \times 10^{-19}$ C).

Essendo l'energia cinetica :

$$E_C = \frac{1}{2}mv^2$$

si ricava che:

$$E_C = zeV$$

Da queste equazioni è possibile ricavare la velocità (v) ed il tempo di percorrenza (t) di uno ione all'interno del tubo di volo di lunghezza L :

$$zeV = \frac{1}{2}mv^2$$

da cui:

$$t = L\sqrt{\frac{m}{2zeV}}$$

e :

$$v = \sqrt{\frac{2zeV}{m}}$$

Risulta quindi evidente che la velocità è inversamente proporzionale alla massa dello ione. Considerando ioni monocarica, quelli con massa maggiore impiegheranno un tempo maggiore a raggiungere il rivelatore rispetto a quelli con massa minore.

In conclusione gli ioni vengono separati in base al tempo impiegato a percorrere il tubo di volo. Infatti il tempo di volo è il parametro che viene realmente registrato dallo strumento che, mediante un'apposita calibrazione, fornisce come risultato il valore di m/z degli ioni. Tale parametro è influenzato dalla lunghezza stessa del tubo di volo la quale, a sua volta, determina il potere risolutivo dello strumento. Infatti, più è lungo il percorso che gli ioni devono percorrere, migliore sarà la separazione di ioni con massa simile. La nascita concettuale dell'analizzatore a tempo di volo risale al 1946 ⁵⁸, ma l'elettronica di acquisizione e rivelazione non erano ancora sufficientemente sviluppate

per poter rendere utilizzabile questo tipo di analizzatore. Solamente una decina di anni dopo questo poté essere utilizzato efficacemente⁵⁹.

Nonostante fosse noto da tempo, questo tipo di analizzatore iniziò ad essere maggiormente utilizzato in seguito allo sviluppo della sorgente MALDI.

In particolare, esistono due tipologie di analizzatori a tempo di volo: lineare e *reflectron* (Fig. 1,7). L'analizzatore lineare è più semplice dal punto di vista costruttivo, ma ha minor potere risolutivo, mentre il *reflectron* è più complesso, anche dal punto di vista teorico, ma fornisce una risoluzione maggiore anche se non è utilizzabile per tutti gli analiti.

In un analizzatore *reflectron*, viene accoppiato al normale tubo di volo uno specchio elettrostatico che ha il compito di rallentare, riaccelerare e rifocalizzare gli ioni mediante un gradiente crescente di potenziali generati da una serie di anelli o griglie. Il *reflectron* svolge una duplice funzione: aumenta lo spazio che gli ioni devono percorrere per raggiungere il rivelatore ed annulla le piccole differenze di energia cinetica che ioni aventi la stessa massa possono acquisire a causa di piccole disomogeneità del campo elettrico applicato. Tutto questo contribuisce ad aumentare il potere risolutivo dello strumento; questo tipo di analizzatore può così arrivare ad avere potere risolutivo fino a 25.000, però è adatto unicamente per molecole con massa inferiore a 5.000 Da, come ad esempio peptidi, mentre l'analizzatore lineare virtualmente non possiede limiti per quanto riguarda il range di massa analizzabile. Un'altra differenza che si riscontra fra un analizzatore a tempo di volo lineare ed uno *reflectron* è che il primo può essere utilizzato solamente per analisi MS mentre con il secondo sono possibili anche delle analisi MS/MS, che consentono di ottenere informazioni parziali sulla sequenza di peptidi e proteine.

Nel tempo sono state apportate delle modifiche all'analizzatore lineare, queste hanno portato ad un aumento della risoluzione di questo analizzatore ed allo sviluppo del *reflectron*. Come già visto, in seguito alla formazione degli ioni in sorgente, questi vengono accelerati verso il tubo di volo; questo processo non avviene in continuo, ma gli ioni vengono prodotti ed accelerati a pacchetti discreti. Questi pacchetti vengono accelerati verso il tubo di volo mediante un potenziale decrescente (nel caso di ioni positivi) il quale conferisce a tutti gli ioni la medesima energia cinetica. Gli ioni però all'interno della sorgente non si formano tutti alla stessa distanza dall'inizio del tubo di volo a causa del ritardo che si ha fra la ionizzazione e l'estrazione, questo comporta una piccola differenza nei loro tempi di volo dell'ordine del centinaio di nanosecondi. A

questa differenza inoltre va sommata la differenza nel tempo di volo dovuta alla non perfetta omogeneità del campo elettrico applicato. Questi due fenomeni, sommati alle collisioni che possono avvenire fra gli ioni durante il processo di ionizzazione/desorbimento e che causano una dispersione dell'energia cinetica, fanno sì che l'analizzatore lineare abbia una risoluzione bassa e generi dei picchi allargati.



Fig. 1.7: Schema di analizzatori a tempo di volo lineare (a) e *reflectron* (b). (per gentile concessione dell'autore Prof. Naldrett).

La risoluzione al problema della differente distanza dall'ingresso del tubo di volo è stata ottenuta mediante l'estrazione ritardata. Tale metodica si basa sul principio secondo il quale ioni con velocità iniziali differenti possono essere focalizzati mediante l'uso di potenziali di accelerazione appropriati. L'introduzione di un ritardo comune a tutti gli ioni che si formano in sorgente ne permette la focalizzazione nello spazio correggendo la perdita di risoluzione⁶⁰. L'introduzione di lenti per l'estrazione ritardata ha portato così ad un aumento della risoluzione da 1.000 a 5.000 per gli analizzatori a tempo di volo lineari e ad un considerevole aumento della risoluzione, anche per gli analizzatori *reflectron*.

L'analizzatore a tempo di volo *reflectron* inoltre consente di effettuare analisi MS/MS. Le analisi MS/MS eseguibili su peptidi e proteine con uno spettrometro di massa MALDI-TOF con *reflectron*, sono di due tipi: ISD (*In Source Decay*) e PSD (*Post Source Decay*). Nell'analisi ISD è di fondamentale importanza il ruolo svolto dall'estrazione ritardata la quale, trattenendo gli ioni in sorgente, aumenta la probabilità di collisione, e quindi di frammentazione, degli ioni dell'analita all'interno della sorgente stessa. Gli ioni frammento così generati vengono rifocalizzati dalle lenti di estrazione ed in seguito all'accelerazione acquisiscono tutti la medesima energia cinetica iniziale e vengono

analizzati in modalità *reflectron*⁶¹. Con questo tipo di analisi è possibile ottenere informazioni sulla sequenza all'N-terminale di proteine pure ed intatte oltre che di peptidi.

Per ottenere invece informazioni sulla sequenza di peptidi, si può utilizzare la tecnica del PSD. Negli spettrometri di massa MALDI-TOF con *reflectron* è possibile ottenere informazioni strutturali dalle frammentazioni degli ioni metastabili all'interno del tubo di volo. Tali ioni accumulano, durante il processo di ionizzazione, una quantità di energia interna tale da portare alla loro frammentazione all'interno del tubo di volo⁶². Questi ioni prodotti non possono essere separati da un analizzatore lineare poiché vengono generati all'interno del tubo di volo in assenza di campi elettrici e quindi avranno la stessa velocità dello ione *parent*. Questi frammenti possiedono energie cinetiche differenti che variano a seconda delle loro dimensioni, quindi possono essere separati mediante l'utilizzo del *reflectron*, che svolge il ruolo di rifocalizzare gli ioni in base alla loro energia. Ioni con rapporto m/z maggiore penetrano più a fondo nel *reflectron* e raggiungono il rivelatore più tardi rispetto a ioni con m/z minore; pertanto la separazione in base al rapporto massa/carica dei frammenti viene effettuata solo dal *reflectron*.

Tale tecnica è anche utile per lo studio di peptidi recanti modificazioni post-traduzionali come la fosforilazione⁶³. Fino a poco tempo fa non esistevano *reflectron* in grado di rifocalizzare tutti i frammenti in un singolo step, quindi per rifocalizzare i frammenti in tutto il range di massa era necessario ridurre progressivamente il potenziale applicato al *reflectron*, acquisire più spettri corrispondenti ai diversi intervalli di massa ed in sede di analisi, con l'utilizzo di opportuni programmi, incollare i segmenti per ottenere lo spettro totale; questo richiede l'utilizzo di una grande quantità di campione. Attualmente, con l'utilizzo di *reflectron* a gradiente quadratico, è possibile rifocalizzare tutti i frammenti in un unico passaggio minimizzando la quantità di campione necessaria.

Per consentire analisi di questo tipo, alcuni spettrometri MALDI-TOF possiedono un *ion selector* posto subito dopo la sorgente in grado di selezionare solo lo ione *parent* di interesse.

La tecnica MALDI-TOF MS presenta tuttavia alcuni svantaggi tra cui la soppressione ionica, a causa della quale la copertura di sequenza delle proteine risulta minore rispetto a quella ottenuta con altri spettrometri. Tale fenomeno è dovuto alla differente capacità di ionizzare dei diversi peptidi in una miscela. Alcuni di essi, ad esempio quelli particolarmente ricchi in residui acidi, ionizzano meglio di altri provocandone la soppressione nello spettro di massa finale. Questo è anche il motivo per cui l'intensità

del segnale nello spettro ottenuto con ionizzazione MALDI non può essere utilizzata come misura quantitativa dell'abbondanza di un peptide nel campione.

Un ulteriore svantaggio è la scarsa frammentazione ottenibile con la metodica PSD, che attualmente non può competere con quella ottenibile mediante analizzatori a quadrupolo o a trappola ionica.

1.2.2 Accoppiamento Cromatografia Liquida–Spettrometria di Massa

L'accoppiamento Cromatografia Liquida-Spettrometria di Massa (LC-MS) è uno strumento potente per diversi tipi di analisi, quali per esempio l'analisi di metaboliti e, nel campo della proteomica, l'analisi di peptidi e proteine⁶⁴. Con questo approccio vengono combinate l'efficiente separazione dei componenti del campione di partenza (per esempio una miscela di peptidi derivanti da digestione enzimatica) con l'identificazione sensibile di ogni singolo analita mediante spettrometria di massa e ricerca in banca dati. Questa metodologia è ormai largamente utilizzata ed ha aperto la possibilità di interfacciare sistemi separativi come l'HPLC con analizzatori di massa di grandi potenzialità come la trappola ionica, il quadrupolo accoppiato al TOF (Q-TOF) ed il triplo quadrupolo (Q-q-Q). Esistono diversi metodi per interfacciare la cromatografia liquida alla spettrometria di massa, ma è stato l'accoppiamento con la sorgente di ionizzazione *electrospray* a rendere la tecnica LC-MS una procedura abbastanza sensibile per analizzare peptidi e proteine in studi di proteomica⁶⁵.

La ionizzazione *electrospray* viene prodotta tramite l'applicazione di un'intensa differenza di potenziale all'estremità di un capillare attraverso il quale si ha il flusso della soluzione contenente l'analita.

La nebulizzazione ed il processo di evaporazione del solvente vengono coadiuvati da due flussi di gas inerte, solitamente azoto. Un flusso è coassiale al flusso dell'analita (chiamato *nebulizer*), l'altro invece è controcorrente rispetto al flusso dell'analita e riscaldato (chiamato *drying gas*). Attraverso tali flussi gli ioni si formano in soluzione e passano in fase gassosa grazie alla differenza di potenziale applicata.

Il processo di ionizzazione avviene completamente a pressione atmosferica al contrario di quanto avviene nella sorgente MALDI nella quale gli ioni si formano in condizioni di vuoto spinto. Anche questa tecnica di ionizzazione nasce negli anni 60, ma è alla fine degli anni 80 che suscita un grande interesse soprattutto perchè si dimostra utile per l'analisi di peptidi e proteine⁶⁶⁻⁶⁷.

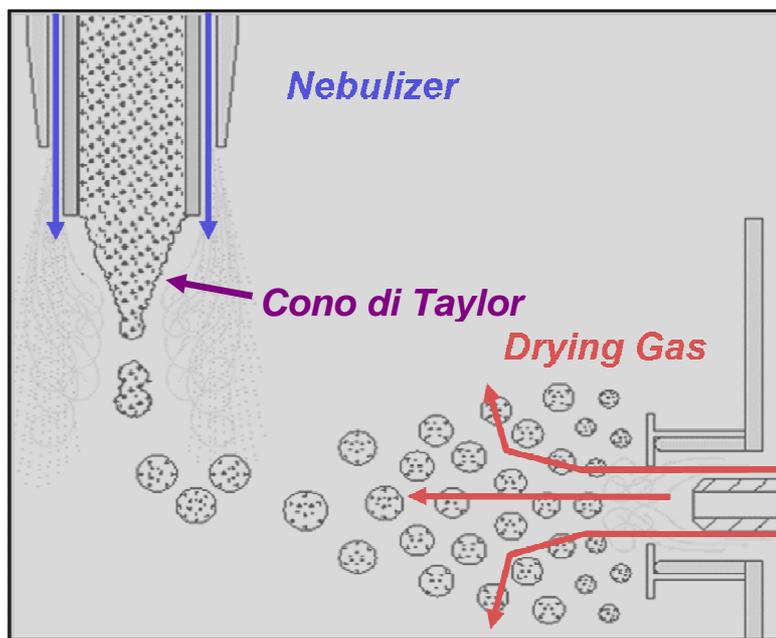


Fig. 1.8: Schema di una sorgente di ionizzazione ESI.
(adattata per gentile concessione di Bruker Daltonik GmbH)

Analizzando in maniera più dettagliata il processo di ionizzazione *electrospray* sono state proposte due teorie differenti per la sua spiegazione. La differenza di potenziale applicata tra il capillare, all'interno del quale passa l'analita in soluzione, ed il controlettrodo, che si trova a qualche centimetro dalla sorgente, provoca la formazione di gocce di piccole dimensioni e cariche che all'estremità del capillare assumono la forma di un cono detto cono di Taylor (Fig. 1.8). La sorgente è riscaldata ed al suo interno il solvente evapora dalle gocce formatesi facendone diminuire il diametro, e di conseguenza anche la loro superficie esterna, fino al momento in cui l'energia di repulsione coulombiana, dovuta alle cariche dello stesso segno, è uguale alla tensione superficiale. A questo punto si verificherà l'esplosione delle gocce, la quale provoca la formazione di gocce di dimensioni minori. La dimensione critica, definita come il momento in cui l'energia di repulsione coulombiana è pari alla tensione superficiale prende il nome di raggio di Rayleigh e l'equazione che lega la carica della goccia Q con il suo raggio R è:

$$Q^2 = 64\pi^2\epsilon^0\gamma R^3$$

dove:

Q = carica della goccia

γ = tensione superficiale del liquido

ϵ^0 = permittività nel vuoto

R = raggio della goccia

Il passaggio che avviene in seguito, ovvero il passaggio dalla fase liquida a quella gassosa mediante una “esplosione” delle gocce cariche rimane ancora controversa e per la sua spiegazione sono state proposte due differenti teorie o modelli: il modello della carica residua o modello di Dole ed il modello dell’evaporazione degli ioni o modello di Iribarne e Thomson^{66,68}.

Secondo il modello di Dole la goccia madre, in seguito alle esplosioni coulombiane, genera gocce figlie che a loro volta vanno incontro allo stesso processo fino a quando non si arriva ad avere una singola molecola carica per goccia.

Secondo il modello di Iridarne e Thomson invece, il passaggio degli ioni in fase gassosa avviene a partire dalle gocce figlie che hanno una densità di carica Q sufficientemente elevata, che corrisponde ad un determinato raggio R:

$$Q = 10^{-17} \text{ C}$$

$$R < 10 \text{ nm}$$

Gli ioni vengono emessi dalle gocce figlie in seguito all’evaporazione del solvente; durante il processo la densità di carica rimane costante e questo permette al fenomeno di ripetersi. Attualmente nessuno dei due modelli può essere considerato non corretto, anzi la teoria predominante è che il processo di ionizzazione *Electrospray* avvenga secondo il modello di Dole per molecole di grandi dimensioni e secondo il modello di Iridarne e Thomson per le molecole di piccole dimensioni .

Poiché le cariche acquisite sono statisticamente distribuite tra i siti disponibili dell’analita, tale tecnica porta spesso alla formazione di ioni a cariche multiple di formula $[M+nH]^{n+}$ senza frammentazione; se la specie è policarica, dal punto di vista dello spettrometro di massa si comporta come una specie “a massa più bassa” poiché nel rapporto massa/carica, quest’ultima non sarà più uguale a 1, come avviene generalmente nelle sorgenti MALDI, ma può assumere valori differenti, a seconda della molecola che si sta analizzando. All’aumentare di z, il rapporto m/z diminuisce e quindi questo processo ha anche l’effetto di abbassare i valori di massa/carica fino a valori facilmente analizzabili da differenti tipi di analizzatori.

Per quanto riguarda la ionizzazione *electrospray*, la quantità di corrente ionica che viene misurata dallo spettrometro è proporzionale alla concentrazione di analita. IN presenza di basse concentrazioni di campione diventa cruciale una diminuzione del flusso per aumentare la sensibilità dell’analisi.

Per rispondere a questa esigenza esistono due tipologie di sorgenti *electrospray*: la

sorgente micro- *electrospray* e la sorgente nano- *electrospray* ⁶⁹⁻⁷⁰. Di particolare interesse è la sorgente nano- *electrospray* mediante la quale è possibile analizzare un campione utilizzando un flusso all'interno della sorgente di 50-500 nl/min. In questo tipo di sorgente il capillare metallico della sorgente *electrospray* è sostituito da un capillare in silice fusa avente un diametro interno di 10-15 µm; il capillare è rivestito esternamente da un sottile strato metallico in modo che possa condurre corrente. La peculiarità di questo tipo di sorgente è rappresentata dalla ridotte dimensioni delle gocce di analita che si vengono a formare. Tali gocce hanno una densità di carica superiore ed un rapporto superficie/volume maggiore, i quali permettono un desorbimento degli ioni più veloce se confrontato con la sorgente *electrospray*. Un'altra caratteristica della sorgente, anch'essa dovuta alle ridotte dimensioni delle gocce, è che non necessita dell'utilizzo dei gas di solvatazione, inoltre la distanza fra il capillare ed il controlettrodo è minore e variabile e la differenza di potenziale applicata è minore, circa 1000 V, in modo da evitare scariche a corona all'interno della sorgente.

Tipicamente, in strumenti con questo tipo di sorgente ionica, fra la sorgente e l'analizzatore di massa vi è una zona che costituisce l'interfaccia; questa assicura la transizione e la focalizzazione degli ioni nel passaggio dalla sorgente, che lavora a pressione atmosferica, e l'analizzatore di massa che si trova invece sotto alto vuoto. Nella prima parte dell'interfaccia generalmente vi è un capillare di vetro avente le estremità ricoperte da un materiale conduttore. A tali estremità è applicata una differenza di potenziale tale da favorire l'attraversamento del capillare da parte degli ioni. Per la focalizzazione del fascio di ioni vengono utilizzate delle lenti elettrostatiche, le quali generano una differenza di potenziale. Gli ioni vengono così trasportati all'analizzatore sotto l'effetto dei gradienti di pressione e potenziale.

Al processo di focalizzazione degli ioni contribuiscono fortemente anche altri elementi come ad esempio esapoli od ottapoli, ovvero delle barre metalliche alle quali è applicato un potenziale in radiofrequenza che permette la focalizzazione del fascio di ioni al centro delle barre e trasmettono un fascio di ioni monocinetico verso l'analizzatore. Inoltre nell'interfaccia si trovano anche degli *skimmer*, che hanno il ruolo di facilitare la definitiva eliminazione dei solventi che possono essere presenti all'interno dello strumento in forma gassosa (Fig. 1.9).

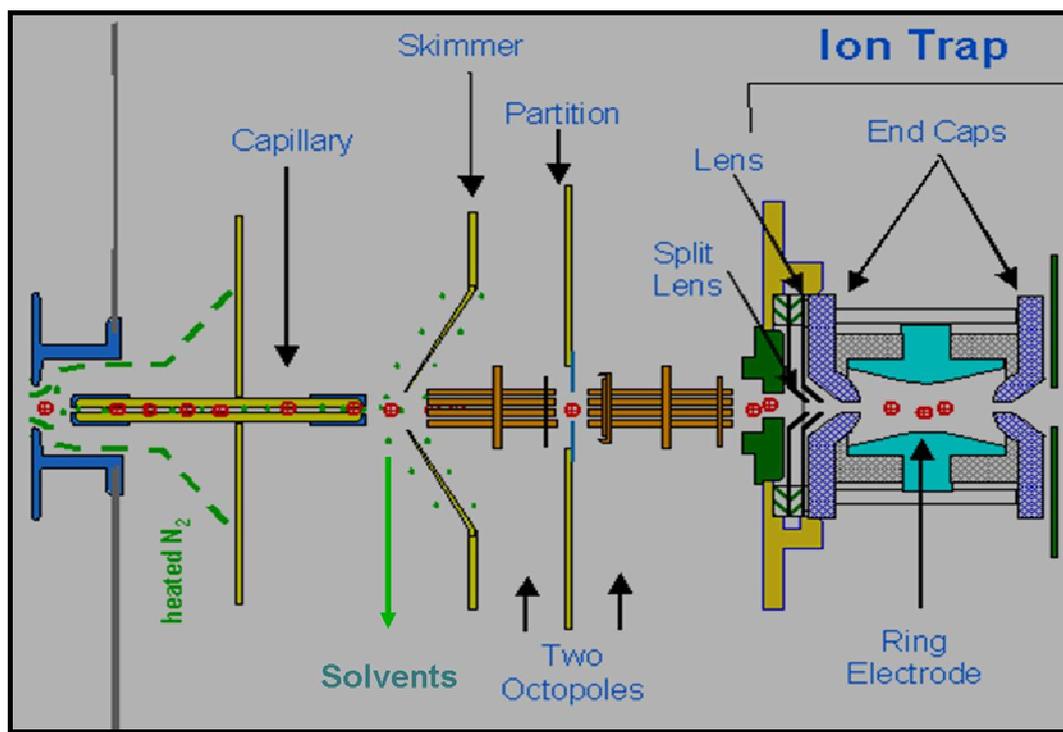


Fig. 1.9: Esempio di schema di interfaccia per ESI-IT.
(per gentile concessione di Bruker Daltonik GmbH)

La differenza di potenziale generata fra la sorgente ed i componenti dell'interfaccia accelera gli ioni che così accumulano anche energia interna. In funzione dell'accelerazione e dell'energia interna acquisita, tali ioni possono frammentarsi in seguito alla collisione con molecole di gas residue all'interno dello strumento. Sfruttando questa peculiarità è possibile favorire o meno questa frammentazione aumentando o diminuendo l'energia con la quale si convogliano gli ioni verso l'analizzatore. Diminuendo la tensione di accelerazione diventa possibile lo studio di grandi complessi non covalenti, come ad esempio complessi proteici, mediante ionizzazione *electrospray*.

Un analizzatore di massa spesso utilizzato in strumenti con sorgente ionica *electrospray* è la trappola ionica. Tale analizzatore differisce dalla maggior parte dei comuni analizzatori per il fatto che gli ioni non lo attraversano, ma vengono confinati ed accumulati al suo interno prima di essere inviati al rivelatore in seguito ad una loro scansione. La trappola ionica è costituita da due elettrodi semisferici, detti elettrodi a calotta, ai quali viene applicato un potenziale superficiale, ed un elettrodo ad anello al quale viene applicato un voltaggio a radiofrequenza. La trappola ionica si può immaginare come un cilindro avente il volume di circa 1 cm^3 ; gli ioni entrano ed escono

dalla trappola attraverso dei fori presenti sugli elettrodi a calotta .

All'interno della trappola è presente elio il quale svolge il ruolo di "raffreddare" gli ioni, ovvero ne riduce l'energia cinetica in modo che questi, sotto l'effetto del campo elettrico, rimangano all'interno della trappola seguendo orbite stabili fino al momento in cui una data radiofrequenza non causi una destabilizzazione di tale orbita, la quale porta gli ioni a fuoriuscire dalla trappola ed andare al rivelatore (Fig. 1.10).

Per stabilizzare e destabilizzare le orbite degli ioni all'interno della trappola viene utilizzato un campo elettrico generato da corrente alternata.

La trappola ionica presenta un' altra peculiarità: in essa possono avvenire i processi di isolamento degli ioni precursore e la loro frammentazione. Gli ioni frammento generati vengono in seguito trattenuti all'interno della trappola ed inviati al rivelatore seguendo lo stesso procedimento riportato in precedenza. Poiché è possibile di eseguire l'isolamento e la frammentazione degli ioni all'interno di uno stesso spazio, in teoria, non vi è limite al numero di esperimenti MS/MS che possono essere effettuati fino al momento in cui non viene superato il limite di sensibilità dello strumento. La trappola ionica può essere paragonata, per il suo funzionamento, ad un analizzatore a quadrupolo che operi solamente in modalità di radiofrequenza; il potenziale applicato agli elettrodi comporta una sola componente sinusoidale: $\varphi_0 = \cos \omega t$.

Le traiettorie che gli ioni compiono all'interno della trappola sono descritte dalle equazioni differenziali di Mathieu, in cui le soluzioni instabili corrispondono agli ioni espulsi dalla trappola e le soluzioni stabili agli ioni trattenuti invece al suo interno.

Per quanto riguarda invece il processo di frammentazione degli ioni precursore, questo è provocato dalla regolazione della frequenza della corrente alternata sull'elettrodo a calotta di uscita degli ioni in modo che coincida con la frequenza di risonanza degli ioni precursore; così facendo gli ioni precursore entrano in collisione con le molecole di elio presente all'interno della trappola che svolge anche il ruolo di gas di collisione.

L'utilizzo di una sorgente ionica *electrospray* e di analizzatori di massa in grado di eseguire esperimenti MS/MS accoppiati con la tecnica della cromatografia liquida, sta diventando una tecnica sempre più utilizzata per l'identificazione di proteine in quanto purificazione, separazione e concentrazione del campione avvengono in un unico passaggio. Questa tecnica, denominata LC-MS/MS, consiste nella digestione di una proteina seguita dalla separazione LC in microflusso dei frammenti peptidici; mano a mano che ciascun peptide è eluito, viene automaticamente selezionato e frammentato all'interno dello spettrometro di massa.



Fig. 1.10: Struttura di una trappola ionica.
(reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Drug Discovery, Gary L. et al, 2:140-150, copyright 2003).

L'identificazione dei peptidi avviene poi con l'aiuto di appositi algoritmi che mettono in correlazione i dati sugli spettri MS e MS/MS ottenuti con le sequenze presenti in *database* proteici. Tale sistema combinato è in grado di assicurare un'alta specificità di ricerca in *database*, poiché oltre alle informazioni su m/z dei peptidi si hanno anche informazioni di sequenza che aumentano la “confidenza” dell'identificazione e permettono eventualmente di eseguire allineamenti con sequenze già note. Inoltre, costituiscono una soluzione sensibile e rapida per la determinazione di modificazioni post-traduzionali delle proteine quali fosforilazioni e glicosilazioni oppure di sostituzioni aminoacidiche in grado di creare differenti isoforme della stessa proteina.

L'ottenimento di informazioni sulla sequenza dei peptidi è possibile in quanto, all'interno dello spettrometro, questi frammentano secondo processi noti. Una prima nomenclatura degli ioni frammento generati dai peptidi è stata proposta all'inizio degli anni '80 da Roepstorff e Fohlmann⁷¹. E' stato osservato che i peptidi frammentano principalmente a livello del legame peptidico formando ioni chiamati di tipo b ed y. Altri frammenti possono generarsi mediante rottura in altre zone del legame oppure su altri legami generando ioni chiamati di tipo a, c, x, z (Fig. 1.11 a e b). Brevemente, se la carica è trattenuta nella zona N-terminale del peptide, i frammenti ottenuti per frammentazione a bassa energia vengono indicati con le lettere a, b, e c a seconda della zona del legame

peptidico che si rompe, mentre se la carica viene trattenuta nella zona C-terminale del peptide i frammenti vengono indicati con le lettere x, y e z a seconda della zona del legame peptidico che si rompe.



Fig. 1.11: Meccanismo di frammentazione di peptidi
all'interno di uno spettrometro di massa

E' inoltre possibile la formazione di altri frammenti, v e w, i quali sono invece il risultato di una frammentazione ad elevata energia delle catene laterali degli aminoacidi⁷². Per poter risalire alla sequenza aminoacidica di un peptide si devono conoscere le regole di frammentazione. Principalmente, lavorando con analizzatori a trappola ionica, si ottengono ioni di tipo b ed y. La differenza di massa fra due frammenti peptidici

consecutivi e dello stesso tipo, fornisce la massa corrispondente ad uno dei 20 aminoacidi. Inizialmente il sequenziamento dei peptidi veniva effettuato mediante il cosiddetto sequenziamento *de novo* che consiste nello studio degli spettri MS/MS al fine di determinare l'esatta sequenza dei peptidi triptici isolati e frammentati. L'interpretazione manuale degli spettri MS/MS è lunga e laboriosa ma attualmente sono a disposizione degli operatori programmi che aiutano ad elaborare dei dati e a velocizzare l'operazione di sequenziamento dei peptidi. Inoltre sono attualmente disponibili anche algoritmi per la ricerca in banca dati a partire dai dati sperimentali ottenuti da esperimenti MS/MS. Tutto questo porta alla possibilità di identificare una proteina con elevata confidenza statistica anche se si possiedono dati MS/MS relativi ad uno solo dei peptidi che la compongono.

1.3. Tecniche Bioinformatiche

Il problema fondamentale che la ricerca biologica si trova oggi ad affrontare è quello di riuscire a gestire ed organizzare l'immensa quantità di dati provenienti da studi di genetica, biochimica e proteomica che devono in qualche modo essere integrati. Per soddisfare tale necessità è nata la bioinformatica; questa disciplina è in grado di mettere in relazione dati sperimentali su sequenze geniche e proteiche con la loro struttura e funzione all'interno di una cellula o di un *pathway* biochimico ben definito.

Le tecniche bioinformatiche, composte da *software* ed algoritmi matematici sempre più sofisticati, devono essere quindi in grado di esplorare ed interrogare le estese banche dati di interesse biologico, in continua fase di ampliamento. Queste metodologie diventeranno presto parte integrante dei sistemi clinici di raccolta ed elaborazione delle informazioni. Anche l'industria farmaceutica è particolarmente attenta allo sviluppo di tecniche bioinformatiche in grado di dare un senso a sequenze e strutture di proteine ed acidi nucleici, nodo cruciale per lo sviluppo di nuovi farmaci, vaccini, marcatori diagnostici e molecole dalle capacità terapeutiche più efficaci. In studi di proteomica che prevedono un'analisi in spettrometria di massa, il dato grezzo che si ottiene è una lista di valori di m/z (*mass list*) riferite a peptidi, per quanto riguarda l'approccio *Peptide Mass Fingerprinting*, o ad una specifica sequenza amminoacidica, nel caso di approccio *Sequence Tags*. A questo livello interviene la bioinformatica, in quanto le *mass list* devono essere confrontate, mediante l'uso di appositi software ed algoritmi, con i dati contenuti nei *database* proteici esistenti in *internet*, ognuno dei quali è diverso e

specifico per una determinata esigenza analitica.

Le banche dati più utilizzate sono:

- Swiss-Prot: nata nel 1986, è una banca dati di sequenze proteiche sviluppata in modo specifico per la loro identificazione e caratterizzazione. Attualmente è gestita in collaborazione dallo Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) e dall'European Bioinformatics Institute (EBI). Il livello di ridondanza del *database* è minimo e fornisce oltre al nome della proteina anche un elevato numero di informazioni supplementari. Le diverse proteine sono suddivise all'interno di Swiss-Prot in *entries* che a loro volta contengono due tipi di informazioni: i *core data* (dati fondamentali) e le *annotation*. I primi sono rappresentati dalla sequenza amminoacidica, le referenze bibliografiche importanti ed i dati tassonomici. Le *annotation* contengono invece dati accessori come funzione, eventuali modificazioni post-traduzionali o varianti amminoacidiche, la presenza e localizzazione di elementi di struttura secondaria o terziaria, importanti nella formazione di domini funzionali, e molti altri ancora. Ulteriori strumenti per avere informazioni utili negli studi di proteomica sono forniti dal server proteomico ExPASy (Expert Protein Analysis System), anch'esso gestito dal SIB, dedicato all'analisi di sequenze e strutture proteiche.
- TrEMBL: è un *database* di sequenze proteiche supplementare a Swiss-Prot; infatti contiene tutte le traduzioni delle sequenze geniche codificanti presenti in EMBL (banca dati di sequenze nucleotidiche) ma non ancora presenti in Swiss-Prot in quanto necessitano di ulteriori verifiche.

NCBI: è una banca dati di sequenze proteiche non identiche, gestito dal National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizzabile mediante strumenti di ricerca come BLAST ed Entrez. Le *entries* sono state compilate dalla traduzione di GenBank (*database* di sequenze nucleotidiche) e da numerose altre banche dati, tra cui anche Swiss-Prot e PDB (Protein Data Bank).

Per poter effettuare ricerche in queste banche dati, partendo da dati ottenuti con spettrometria di massa esistono diversi programmi utilizzabili in *internet* a partire dal sito che li gestisce. Il principio di funzionamento di questi programmi è fondamentalmente lo stesso: la lista di masse ottenuta sperimentalmente viene confrontata, mediante un algoritmo matematico, con i dati contenuti nel *database* scelto per la ricerca. Tali dati possono essere valori di massa di peptidi ottenuti per digestione simulata (digestione *in silico*) con uno specifico enzima, nel caso di analisi *Peptide Mass Fingerprinting*, oppure per frammentazione di sequenze amminoacidiche, nel caso di analisi *Sequence Tags*.

Esempi di questo tipo di motori di ricerca sono *Mascot*, utilizzabile dal sito di *Matrix Science Ltd.*, e *Profound*, gestito invece dalle università Rockefeller e di New York. E' inoltre possibile acquistare le licenze per l'utilizzo su *server* locali di tali programmi in modo da rendere le ricerche più complete, soprattutto per analisi MS/MS, in quanto la versione *on-line* spesso ha un limite massimo di dati inseribili.

Il futuro sviluppo degli studi di proteomica dipende in buona parte dall'evoluzione di piattaforme bioinformatiche sempre più performanti e versatili.

1.3.1 Mascot

Mascot è un potente motore di ricerca che utilizza, confrontandoli con banche dati di sequenze proteiche primarie, dati provenienti da analisi in spettrometria di massa per identificare una proteina. Uno dei vantaggi di Mascot è quello di poter integrare al suo interno diversi metodi di ricerca, ognuno adatto ad una determinata esigenza analitica. I metodi principali sono:

- 1) *Peptide Mass Fingerprint* in cui i dati inseriti sono i valori di massa di peptidi provenienti dalla digestione enzimatica di una o più proteine.
- 2) *MS/MS Ion Search* che usa invece dati grezzi provenienti da analisi MS/MS per ottenere informazioni su una o più sequenze amminoacidiche.
- 3) *Sequence Query* in cui ad uno o più peptidi, utilizzati per il PMF, possono essere associate informazioni parziali sulla sequenza, sulla composizione amminoacidica, sui valori di massa/carica di ioni provenienti da analisi MS/MS o altri ancora.

Nel primo caso, il *Peptide Mass Fingerprint*, il dato da inserire nel programma è la lista di valori di massa dei peptidi provenienti da digestione enzimatica, ottenuti per esempio con MALDI-TOF. Per poter effettuare la ricerca si devono fornire al programma informazioni supplementari su come è stata condotta l'analisi.

E' infatti possibile scegliere la banca dati su cui effettuare la ricerca, la tassonomia dell'organismo da cui la proteina di interesse proviene, l'enzima utilizzato ed il numero di siti di taglio che questo può aver saltato durante la digestione enzimatica. Si può inoltre selezionare un intervallo di pesi molecolari (PM) entro il quale far avvenire la ricerca; impostare questo parametro permette di incrementare il potere della ricerca, velocizzando l'identificazione e diminuendo la frequenza di falsi positivi, ma non porta ad un' identificazione corretta se l'analita è un frammento di una proteina più grande. Si devono poi fornire i valori delle masse dei peptidi ottenuti sperimentalmente eliminando, se possibile, quelli provenienti da contaminanti come l'autolisi della tripsina o la matrice.

Un'ulteriore informazione richiesta da *Mascot* è l'eventuale presenza di modificazioni fisse introdotte durante la preparazione del campione, ad esempio l'alchilazione dei gruppi SH delle cisteine. Tali modificazioni infatti alterano i valori di massa dei peptidi coinvolti che altrimenti non verrebbero riconosciuti durante la ricerca in banca dati. Anche la presenza di modificazioni post-traduzionali può essere aggiunta come parametro per la ricerca, in modo da evidenziare, ad esempio, peptidi fosforilati o glicosilati che si ipotizza siano presenti all'interno della proteina.

Una variabile molto importante per l'identificazione corretta della proteina è la tolleranza ovvero la misura dello scarto massimo che ci può essere tra i dati sperimentali, che in caso di PMF sono rappresentati dai valori di m/z dei peptidi osservati nello spettro MS, e quelli teorici, ottenuti mediante digestione simulata. La tolleranza può essere espressa in Dalton, in percentuale o in parti per milione (ppm). Minore è il valore di tolleranza utilizzato per la ricerca, maggiore è l'affidabilità del risultato ottenuto, mentre un margine di errore troppo ampio potrebbe portare all'identificazione di un falso positivo e non della proteina corretta. Anche in caso di ricerca *MS/MS Ion Search* i parametri da inserire sono gli stessi del PMF, ma in questo caso i valori sono quelli di massa dello ione *parent* e dei frammenti generati a partire da quest'ultimo durante l'analisi. Anche i valori di tolleranza da inserire saranno perciò due: quello per il peptide *parent* e quello per i singoli ioni frammento che insieme influenzeranno l'identificazione finale. Può inoltre essere specificato il tipo di spettrometro di massa con il quale si è effettuata l'analisi, poiché da questo dipende il tipo di frammentazione avvenuta e la carica degli ioni. Una terza possibilità offerta da *Mascot* è quella di effettuare ricerche "ibride", denominate *Sequence Query*, in cui ad uno o più valori di massa di peptidi vengono associati dati supplementari come informazioni sulla composizione amminoacidica o valori di massa di ioni frammento ottenuti mediante analisi MS/MS. In tutti e tre i casi, l'algoritmo di *Mascot*, chiamato *MOWSE (MOlecular Weight SE arch) scoring algorithm* [43] classifica le proteine risultanti dalla ricerca in banca dati in base ad uno *score* che rappresenta una misura della probabilità assoluta (P) che la proteina identificata sia frutto di un evento casuale (un falso positivo) e non la proteina effettivamente analizzata. Lo *score* è quindi definito come:

$$score = -10 \cdot \text{Log}_{10}(P)$$

In questo modo una proteina identificata con uno *score* alto, ad esempio 200, avrà una probabilità molto bassa, 10^{-20} , di essere un falso positivo. Conoscendo la dimensione

del *database* utilizzato, è possibile definire un valore soglia di probabilità oltre il quale si ritiene attendibile (o significativo) il risultato della ricerca. Questo valore soglia è comunemente fissato per le analisi PMF a 0.05 (score di 69), il che significa che la probabilità che la proteina identificata sia un falso positivo è minore o uguale al 5%. Nel caso di analisi MS/MS, non solo viene dato uno score alla proteina identificata, ma anche ad ogni singolo ione riconosciuto (*Ion Score*) per ognuno dei quali ci sarà un valore soglia variabile in base a diversi parametri tra cui la lunghezza della sequenza e la soglia scelta per lo ione *parent*.

*ROTTURA PREMATURA PRETERMINE
DELLE MEMBRANE AMNIOCORIALI*

1.4.1 Definizione e rilevanza clinica

La rottura spontanea delle membrane amniocoriali si definisce prematura (PROM) se avviene prima dell'insorgenza del travaglio di parto. Nel caso in cui tale rottura si verifichi prima del termine della gravidanza (sotto le 37 settimane gestazionali) e in assenza di travaglio si parla di rottura pretermine prematura delle membrane (pPROM). La rottura delle membrane viene inoltre definita bassa se avviene a livello del polo inferiore del sacco amniocoriale, alta se avviene al di fuori di questa zona.

La pPROM ha un'incidenza di circa il 3% di tutte le gravidanze, anche se l'incidenza riportata in letteratura è molto variabile. Questo dipende dalla carenza di una terminologia standard sull'argomento e dalla diversa incidenza della patologia nelle varie popolazioni. Il parto prematuro è dovuto nel 40-45% dei casi ad insorgenza spontanea di travaglio di parto (a membrane intatte), nel 25-30% dei casi a rottura pretermine prematura delle membrane e nel 30-35% dei casi ad esecuzione di taglio cesareo o induzione di travaglio su indicazione materna o fetale ⁷³.

La pPROM si verifica in meno dell'1% dei casi sotto le 24 settimane, nel 2-5% dei casi tra 24 e 33 settimane, nel 3-8% dei casi tra 34 e 36 settimane mentre la PROM a termine ha un'incidenza dell'8-10%. La prematurità è responsabile del 75% delle morti neonatali e di oltre il 50% degli handicap a lungo termine; nonostante, infatti, la maggior parte dei nati pretermine sopravviva, rimane alto il rischio di complicazioni a livello respiratorio, gastrointestinale e cerebrale ⁷³. È stato infatti calcolato che il 10% delle morti perinatali sono direttamente o indirettamente attribuibili a pPROM ⁷⁴. Inoltre, da uno studio retrospettivo condotto da Johanson, emerge una significativa diminuzione della sopravvivenza quando la prematurità è conseguenza di una rottura prematura pretermine delle membrane amniocoriali rispetto ai parti prematuri conseguenti ad insorgenza spontanea o iatrogena di travaglio, mentre non si riscontrano differenze, rispetto all'outcome, tra i neonati sopravvissuti ⁷⁵.

1.4.2 Classificazione

Da un punto di vista clinico risulta estremamente rilevante, per la sopravvivenza del feto, l'epoca gestazionale alla quale avviene la rottura delle membrane. Rispetto a questo è stata recentemente proposta una nuova classificazione che differenzia la rottura prematura delle membrane in "previable PROM" (prima delle 23-24 settimane gestazionali, limite di vitalità per il feto), pPROM lontane dal termine (dall'epoca di

vitalità per il feto fino a circa 32 settimane gestazionali), ed infine le pPROM vicino al termine (approssimativamente tra le 32 e le 36 settimane gestazionali) ⁷⁷.

1.4.3 Anatomia strutturale delle membrane fetali

Le membrane che circondano la cavità amniotica sono composte da amnios e corion, strettamente aderenti, che includono cellule epiteliali, mesenchimali e trofoblasti, immersi in una matrice di collagene. Esse contengono il liquido amniotico, secernono sostanze trofiche e proteggono il feto da infezioni provenienti dall'apparato genitale.

L'**amnios**, che non contiene vasi o nervi e riceve nutrimento dal liquido amniotico, è composto da cinque strati distinti:

- *epitelio amniotico*: rappresenta lo strato più interno, a contatto con il liquido amniotico che circonda il feto; è formato da uno strato unico di cellule appiattite o cubiche in grado di produrre collagene di tipo III e IV e glicoproteine non collageniche (laminina e fibronectina) che costituiscono la membrana basale;
- *membrana basale*;
- *strato compatto di tessuto connettivo*: forma lo scheletro fibroso dell'amnios ed è costituito da fibre collagene interstiziali (tipo I e III) disposte in fasci paralleli, in modo da mantenere l'integrità dell'amnios; le fibre collagene di tipo V e VI creano invece le connessioni tra questo strato e la membrana basale; la componente cellulare è poco rappresentata;
- *strato fibroblastico*: presenta cellule mesenchimali produttrici di collagene e macrofagi immersi in una matrice extracellulare;
- *strato spongioso o zona spongiosa*: separa l'amnios dal corion e contiene collagene di tipo III, proteoglicani idratati e glicoproteine responsabili della caratteristica mobilità tra i due foglietti, della resistenza alle forze di stiramento e dell'assorbimento degli stress fisici. Questo strato permette infatti all'amnios di scivolare sul sottostante corion, che è invece stabilmente aderente alla decidua materna.

Il **corion** è più sottile dell'amnios, ma ha una maggiore resistenza alla tensione. E' costituito da due strati:

- *epitelio cellulare* con la relativa membrana basale;
- *strato di tessuto connettivo* corionico ricco in fibrille collagene, adeso alla decidua capsulare.



Fig. 1.12: Rappresentazione schematica della struttura delle membrane fetali a termine di gravidanza. Viene mostrata la composizione di ogni strato della matrice extracellulare ed i siti di produzione delle metalloproteasi della matrice con i rispettivi inibitori tissutali. (New Engl J Med 1998; 338: 664).

1.4.4 Eziopatogenesi

L'eziologia della PROM è complessa e multifattoriale. Diversi studi sulle membrane fetali, effettuati con sequenze complementari di DNA ed immunocitochimica quantitativa, hanno evidenziato un'alterazione dei pathways coinvolti nella regolazione dello sviluppo e della crescita, nel rimodellamento della matrice extracellulare e nell'infiammazione della decidua⁷⁷. In ogni paziente possono, quindi, essere evidenziati uno o più processi fisiopatologici; fra questi l'infezione corioidale e l'infiammazione sembrano giocare un ruolo importante nell'eziologia, soprattutto per età gestazionali precoci.

1.4.4.1 Stress meccanico

Le membrane fetali sono normalmente molto resistenti, soprattutto nelle prime fasi della gravidanza. Resistenza ed elasticità sono garantite dai cinque diversi tipi di collagene

che costituiscono le membrane: i tipi 1, 3, 5, 6 sono organizzati in tripla elica a dare α -catene, mentre il tipo 4 forma strutture globulari.

Nella patogenesi della rottura delle membrane sono coinvolti diversi processi tra cui lo stress meccanico (connesso, per esempio, a sovra distensione uterina) ed i processi biochimici, quali la distruzione del collagene della matrice extracellulare di amnios e corion e la morte cellulare programmata delle cellule delle membrane fetali, nonché l'alterazione dei processi di sviluppo e regolazione della crescita ed infiammazione della decidua. Il mantenimento della forza tensiva delle membrane coinvolge un equilibrio bilanciato tra sintesi e degradazione delle componenti proteiche della matrice extracellulare: il collagene è prodotto dai fibroblasti, mentre le metalloproteasi della matrice (MMPs), che appartengono ad una famiglia di proteasi Zn-dipendenti, sono gli enzimi deputati al catabolismo della matrice extracellulare e la loro azione è modulata da specifici inibitori (TIMPS).

In prossimità del termine della gravidanza l'equilibrio tra enzimi inibitori ed enzimi attivati si sposta a favore dei processi catabolici, favorendo così l'indebolimento delle membrane, già agevolato dal loro stiramento che consegue all'aumento del volume uterino e dalle frequenti sollecitazioni provocate dalle normali contrazioni dell'utero e dai movimenti fetali. Le membrane in cui si è verificata una PROM mostrano la stessa diminuzione del contenuto in collagene dell'amnios in epoche gestazionali molto precoci, ed inoltre un'attività collagenolitica aumentata del doppio rispetto alle membrane normali.

Un contenuto ridotto del collagene delle membrane è stato correlato all'insorgenza di PROM ed all'aumento dell'età gestazionale⁷⁸. La PROM a termine potrebbe pertanto essere considerate una variante fisiologica, piuttosto che un evento patologico. Precedenti studi di espressione proteica suggeriscono che alterazioni delle collagenasi interstiziali della matrice (MMP-1, MMP-8) e degli inibitori tissutali di numerose metalloproteasi (TIMP-3 e TIMP-4) potrebbero essere responsabili di pPROM^{79,80}. In particolare nel liquido amniotico dei casi di pPROM è stato dimostrato un aumento delle metalloproteasi della matrice 1, 8 e 9, ed una riduzione degli inibitori tissutali delle metalloproteasi 1 e 2⁸¹.

French e colleghi hanno riscontrato un incremento notevole dei livelli di MMP-9 in corrispondenza dell'area di rottura delle membrane. MMP-9, presente nell'epitelio amniotico, nel corion ed inoltre nelle cellule deciduali, degrada il collagene di tipo IV e V giocando così un ruolo fondamentale nella preparazione delle membrane alla rottura⁸².

Anche l'eccessiva distensione uterina dovuta a polidramnios, gravidanze plurigemellari e contrazioni induce uno stiramento delle membrane ed aumenta il rischio di pPROM. La distensione meccanica delle membrane provoca la liberazione di numerosi fattori tra cui la prostaglandina E2 (che incrementa l'irritabilità uterina, diminuisce la sintesi di collagene e stimola la produzione di MMP-1 e MMP-3) e l'interleuchina 8 (che ha azione chemiotattica per i neutrofili e stimola l'attività collagenasica), fattori che rappresentano maggiormente i cambiamenti biochimici provocati da forze fisiche⁸³.

1.4.4.2 Ruolo delle citochine

Le citochine sono una famiglia di almeno 100 tipi differenti di proteine solubili a basso peso molecolare (8-80 kD), a cui appartengono le interleuchine (da IL-1 a IL-18), gli interferoni (IFN), i fattori stimolanti le colonie (CSF), i fattori di necrosi tumorale (TNF), i fattori di crescita e le chemochine. Rappresentano il principale meccanismo attraverso cui le popolazioni cellulari coinvolte nell'immunità e nell'infiammazione comunicano tra loro.

Diversi esperimenti hanno dimostrato che le citochine sono coinvolte anche nell'induzione del travaglio e del parto pretermine.

La relazione tra infezione e PROM prevede il coinvolgimento del sistema immunitario e di mediatori della risposta infiammatoria, come citochine, metalloproteasi, prostaglandine. L'invasione batterica coriodecduale e la concomitante liberazione di endotossine ed esotossine batteriche favoriscono la produzione di citochine proinfiammatorie come IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α le quali stimolano il rilascio delle prostaglandine da parte delle cellule amniotiche, corioniche e deciduali, la chemiotassi e l'attivazione dei granulociti neutrofili e la successiva sintesi di metalloproteasi dalle cellule del corion.

Le prostaglandine stimolano le contrazioni uterine, mentre le metalloproteasi determinano la rottura delle membrane ed il rimodellamento della matrice extracellulare del collagene della cervice^{84,85}. In particolare la produzione di IL-8 da parte dei fibroblasti attivati e dei macrofagi gioca un ruolo fondamentale nella dilatazione cervicale. Tale citochina stimola infatti la chemiotassi, l'attivazione e la degranolazione dei granulociti neutrofili, con il conseguente rilascio di varie proteasi tra cui le collagenasi.

A fini diagnostici e terapeutici risulta particolarmente importante l'associazione tra elevazione di IL-6 nel liquido amniotico e parto pretermine in assenza di un'infezione

clinicamente manifesta, a dimostrazione dell'utilità dell'interleuchina come marker biochimico per identificare gestanti con infezione latente e perciò a maggior rischio di parto pretermine. E' inoltre significativa la correlazione tra elevati livelli di IL-6 e fallimento della terapia tocolitica, di grande utilità nella conduzione clinica del parto pretermine⁸⁶. Harirah e altri hanno invece studiato il ruolo della metalloproteasi-9 (MMP-9) e di IL-6 come potenziali indici predittivi di infezione intraamniotica⁸⁷.

MMP-9, che sembra giocare un ruolo importante nel travaglio patologico, è la principale metalloproteasi coinvolta nel travaglio fisiologico. Nel corso della gravidanza fisiologica risulta al limite della rilevabilità fino al travaglio, mentre, ad esempio, MMP-2 e MMP-3 sono espresse costitutivamente e possono essere rilevate nel liquido amniotico e nelle membrane⁸⁸. Si ritiene che la MMP-9 sia l'enzima finale che interviene nel rimodellamento della matrice extracellulare e, a differenza di altre metalloproteasi, la sua produzione e rilascio sono indotte da specifici fattori, quali ad esempio microrganismi. Proprio per questo motivo sembra essere un indice affidabile per diagnosticare un'infezione^{89,90}.

L'invasione batterica coriodecduale stimola la decidua e le membrane fetali a produrre sia citochine (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α) che fattori stimolanti le colonie granulocitarie; questo fenomeno non determina necessariamente una precoce positività del liquido amniotico nè una risposta infiammatoria fetale, bensì può provocare un aumento dei livelli di queste citochine anche nel sangue materno per effetto dell'infiammazione generalizzata. Numerosi studi hanno riportato un marcato incremento dei livelli sierici di IL-6 e IL-8 in pazienti con pPROM⁹¹⁻⁹⁴. Inoltre, IL-6 e IL-8 possono essere dosate non solo nel siero, ma anche nelle urine e ciò fornisce l'opportunità di stimare queste citochine facilmente in una routine pratica.

In pazienti con sintomi di travaglio pretermine o pPROM, alti livelli di citochine proinfiammatorie sono presenti anche nelle secrezioni cervicali e vaginali e sono associati, in modo significativo, ad infezioni del liquido amniotico e parto pretermine. Numerosi lavori mostrano una correlazione positiva tra la concentrazione di IL-6 nel liquido amniotico (marker di infezione intrauterina), nel secreto cervicale e conseguente parto pretermine⁹⁵.

1.4.4.3 Infiammazione e infezione

L'infezione coriodecduale e l'infiammazione sembrano giocare un ruolo importante nell'eziologia. L'infezione intrauterina sia sintomatica che asintomatica induce una

risposta infiammatoria intraamniotica che include il rilascio di numerose citochine e chemochine che, di volta in volta, possono innescare contrazioni pretermine e/o rottura delle membrane ⁹⁶.

L'infiammazione intra-amniotica è presente nel 42% delle pazienti con pPROM e rappresenta un fattore di rischio sia per il parto prematuro che per il manifestarsi di outcome materno-fetali avversi. Tale tipo di infiammazione, inoltre, è stata trovata nel 23% delle gestanti con coltura negativa su liquido amniotico. Le cause di infiammazione in pazienti con coltura negativa possono essere: infezioni che sfuggono alle normali tecniche microbiologiche, infezioni intrauterine extra-amniotiche o cause di infiammazioni non infettive ⁹⁷. Infatti anche il sanguinamento, lo stress ossidativo con liberazione di radicali liberi, il danno vascolare con conseguente ischemia uteroplacentare e l'autoimmunità possono dare luogo ad infiammazione. L'emorragia coriodecduale o uteroplacentare può condurre ad un'insufficienza vascolare uteroplacentare ed all'ipossiemia fetale, con conseguente aumento del CRH, reclutamento macrofagico, rilascio delle citochine e stimolazione diretta delle proteasi e dei prostanoidi mediante la produzione della trombina.

La contaminazione microbica della cavità amniotica rappresenta, tuttavia, la causa principale dell'instaurarsi di uno stato infiammatorio con conseguenti travaglio pretermine e PROM. Esiste un'evidente associazione tra infezioni del tratto genitale superiore e PROM. Probabilmente i microrganismi dalla vagina, seguendo un percorso ascendente, raggiungono lo spazio coriodecduale, invadono la decidua materna e le membrane fetali e, in seguito, il liquido amniotico ed il feto.

Vi è un'indiretta evidenza che le infezioni a livello del tratto genitale provocano la rottura delle membrane: nel liquido amniotico dei casi di pPROM sono più frequentemente presenti microrganismi ed il tasso di corionamniosite è più alto rispetto ai casi di parto pretermine con membrane intatte e ai casi di PROM a termine ⁹⁸.

I dati epidemiologici dimostrano un'associazione tra la colonizzazione del tratto genitale da parte di Streptococchi β -emolitici del gruppo B, Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, S. Aureus e microrganismi responsabili della vaginosi batterica (anaerobi vaginali, Gardnerella vaginalis, Mobiluncus e mycoplasmi genitali) ed un aumentato rischio di rottura prematura pretermine delle membrane.

1.4.4.4 Ormoni

Progesterone ed estradiolo diminuiscono le concentrazioni di MMP-1 e MMP-3 ed incrementano quelle degli inibitori tissutali delle MMPs. La relaxina, ormone proteico che regola il rimodellamento del connettivo, è prodotta nella decidua e nella placenta, contrasta l'effetto inibitorio di progesterone ed estradiolo aumentando l'attività di MMP-3 e MMP-9 nelle membrane fetali. Lo stress materno e fetale stimolano il rilascio di ormoni adrenergici di origine ipotalamica che provocano un aumento dell'espressione placentare, deciduale ed amniocoriale di CRH (ormone ipotalamico che induce il rilascio della corticotropina ipofisaria) il quale favorisce la stimolazione paracrina dei prostanoidi (prostaglandine) amnio-corio-deciduali, con conseguente comparsa delle contrazioni uterine ⁷⁶.



Fig. 1.13: Diagramma schematico dei vari meccanismi ritenuti responsabili della rottura prematura pretermine delle membrane fetali. (New Engl J Med 1998; 338: 669).

1.4.4.5 Fattori nutrizionali e comportamentali

Carenze alimentari (vitamina C e zinco) ed abitudine al fumo contribuiscono ad incrementare il rischio di partorire prematuramente. La vitamina C (acido ascorbico) è una vitamina idrosolubile ad azione antiossidante con un ruolo importante nella sintesi del collagene, nell'infiammazione (previene la perossidazione lipidica delle membrane)⁹⁹ e per le funzioni di difesa immunologia. La sua carenza sembra indurre l'espressione e l'attività di metalloproteasi extracellulari e può quindi condizionare una diminuzione della forza e dell'elasticità delle membrane; inoltre la sua diminuzione altera l'attività immunologica nelle infezioni genitali; in particolare può inibire la chemiotassi dei polimorfonucleati (PMN), la fagocitosi e la funzione antibatterica a livello del liquido amniotico¹⁰⁰. Recentemente si è dimostrato che 100 mg di vitamina C aggiunti alla dieta proteggono dal rischio di PROM, in quanto la vitamina C interviene nel metabolismo del collagene e favorisce il suo deposito nei tessuti fetali, incluse le membrane amniocoriali. In particolare si è visto che, con tale supplementazione, la concentrazione plasmatica di vitamina C non differisce da quella del gruppo controllo, ma risulta aumentata la concentrazione leucocitaria di tale sostanza, indice diretto del suo deposito. Infatti una dose di 100 mg di acido ascorbico in combinazione con l'introito dietetico normale di 65 mg di vitamina C è sufficiente a mantenere la concentrazione leucocitaria maggiore di 18 µg, concentrazione tale da ridurre significativamente la PROM¹⁰¹.

Anche il fumo incrementa il rischio di pPROM alterando il pattern citochinico, la funzione leucocitaria, l'assorbimento di nutrienti e persino il corretto sviluppo e la funzione placentare (ischemia e ipossia cronica). La nicotina infatti impedisce il rilascio del Platelet Activating Factor (PAF) acetilidrolasi da parte dei macrofagi deciduali: questo enzima è necessario per convertire il PAF, potente mediatore proinfiammatorio, in liso-PAF, forma biologicamente inattiva. Il PAF stimola la prostaglandina E2 e l'insorgenza di contrazioni uterine¹⁰².

1.4.4.6 Fattori genetici

Alcuni studi hanno evidenziato una correlazione fra geni materni e pPROM. In particolare è stato dimostrato che la biosintesi di alcune citochine quali TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 nella decidua materna e nelle membrane fetali, in risposta ad eventi infiammatori o ischemici, è sotto il controllo di determinati geni, le cui varianti polimorfiche possono associarsi ad un'aumentata trascrizione delle citochine stesse.

Pertanto, un gene identificato come predisponente al parto pretermine potrebbe venire utilizzato come test di screening nella popolazione ostetrica ¹⁰³. I geni candidati di interesse per lo screening della popolazione predisposta a sviluppare un parto pretermine sono numerosi. Il più interessante sembra essere PI3, gene che codifica l'inibitore 3 delle proteinasi. Tale gene è espresso in modo maggiore nel parto pretermine con corionamniosite, seguito dalla pPROM senza corionamniosite. La PI3 è una proteina presente nell'amnion, nelle cellule dell'epitelio, nella decidua, nel trofoblasto intermedio, nei macrofagi e nei neutrofili, che aumenta in caso di corionamniosite. Nelle pPROM, invece, è espressa in modo minore, in quanto, in questi casi, il suo gene è down regolato. E' stato osservato che la produzione di PI3 nelle membrane fetali protegge il tessuto dal danno che potrebbe essere causato dall'aumento dell'elastasi neutrofila che si verifica nel liquido amniotico delle pazienti con pPROM. Dunque, pazienti che non producono adeguate quantità di PI3 possono essere predisposte a pPROM. Tuttavia il meccanismo che controlla l'espressione del gene che codifica PI3 deve essere ancora chiarito ¹⁰⁴.

Nella pPROM sembra coinvolta la over-espressione di numerosi geni pro infiammatori come MIP-1 α , IL-11, TNF- α e del ligando per "ephrinrelated receptor tyrosine kinase ligand", anche in assenza di un'infezione identificabile ¹⁰⁵.

È da sottolineare inoltre l'alterazione dell'espressione di geni coinvolti nel rimodellamento della matrice extracellulare come "relaxin", "biglycan", "hyaluronan binding proteins" e "stromelysin-3". In particolare nella pPROM è stato riscontrato un aumento dell'espressione della metalloproteasi MMP-11 e MMP-8 ^{106,107}.

Nonostante queste importanti acquisizioni scientifiche le basi genetiche del parto pretermine e della pPROM sono complesse e non possono essere spiegate solo dalla presenza di un gene polimorfico.

1.4.4.7 Fattori iatrogeni

La pPROM si verifica spontaneamente nel 98% dei casi; nel 2% dei casi è invece iatrogena. Il numero di procedure invasive per indicazioni diagnostiche e terapeutiche sta aumentando, non solo per l'incremento delle amniocentesi genetiche per età materna, prelievi dei villi coriali, ma anche per fetoscopie operative e interventi quali la conizzazione ed il cerchiaggio cervicale. Queste tecniche possono portare ad una perdita temporanea o permanente di liquido amniotico. Se tale perdita persiste e diventa clinicamente rilevante, si considera questo evento una pPROM iatrogena

(iPROM). Una iPROM complica circa l'1-2% delle amniocentesi genetiche, il 4% degli amniodrenaggi, il 6% delle procedure laser fetoscopiche per la "twin-to-twin trasfusion syndrome".

1.4.4.8 Altri fattori associati

Il rischio di pPROM è più elevato anche in caso di difetti localizzati delle membrane ed esposizione delle stesse all'ambiente vaginale per incontinenza cervico-segmentaria ed in caso di diminuita consistenza della cervice. La diminuita consistenza della cervice e dei tessuti sovrastanti, oltre alla distensione meccanica uterina (esercitata da contrazioni, polidramnios o gravidanze multiple), determina l'aumento delle MMPs, dell'IL-8 e delle prostaglandine E2 favorendo ancora una volta la pPROM ed il parto pretermine⁸³.

Altri fattori associati a pPROM includono basso livello socio-economico, infezioni sessualmente trasmesse, sanguinamento vaginale in gravidanza, gravidanza multipla, abruptio placentae, consumo di cocaina, pregressa pPROM, precedenti interventi sulla cervice o lacerazioni¹⁰⁸.

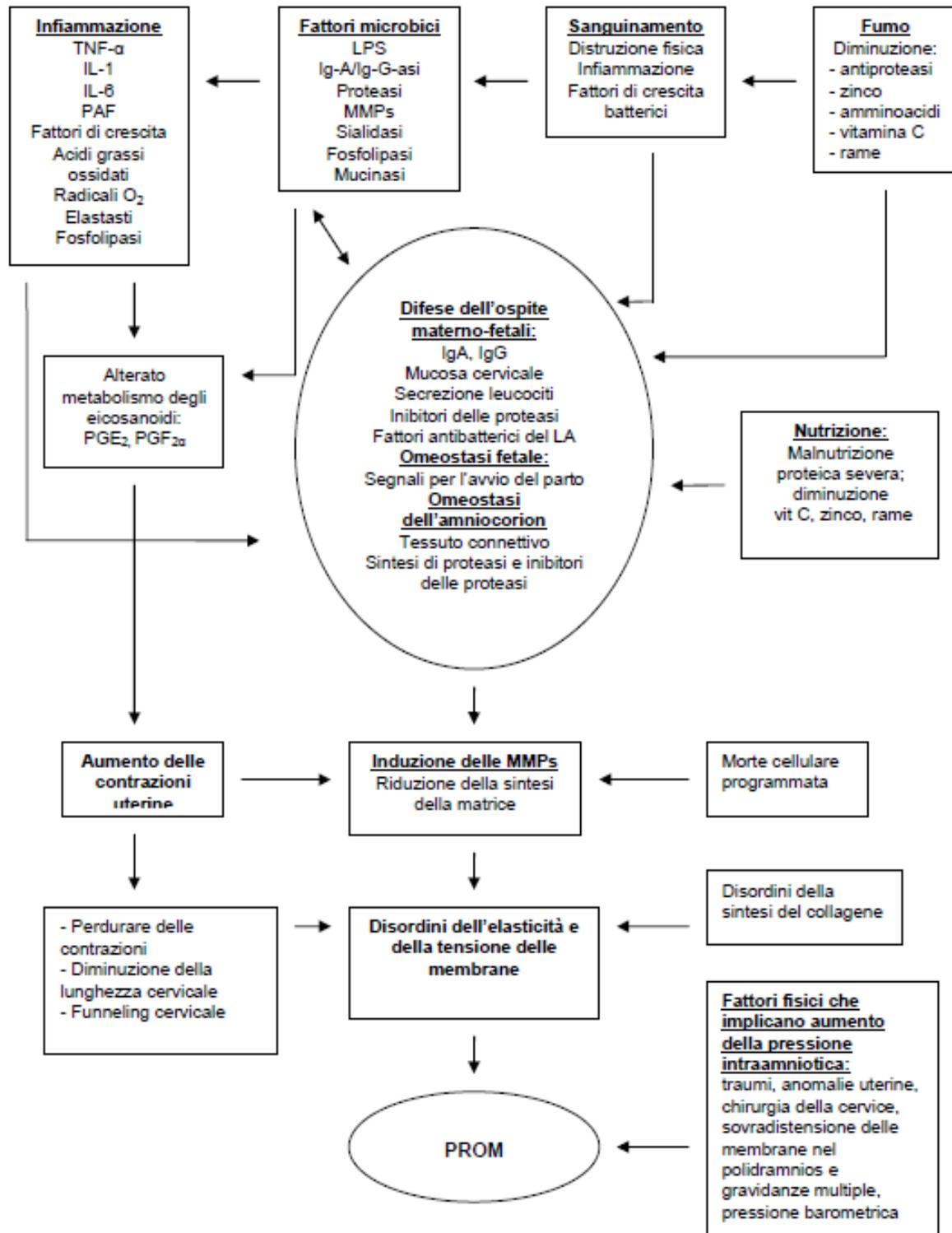


Fig. 1.14: Meccanismi coinvolti nell'eziopatogenesi della pPROM e del parto pretermine.

1.4.5 Diagnosi

La diagnosi di PROM si basa sul sospetto clinico, sulla raccolta dell'anamnesi e sull'esecuzione di alcuni test di conferma.

1.4.5.1 Diagnosi clinica

La diagnosi clinica di PROM si basa sulla visualizzazione diretta, durante l'esame con speculum sterile, di liquido amniotico che si raccoglie nel fornice vaginale posteriore o sul riscontro obiettivo di perdita di liquido dai genitali o di passaggio di liquido amniotico attraverso l'orifizio uterino esterno. L'esame con speculum sterile consente anche la valutazione della dilatazione cervicale e l'esecuzione di tamponi cervico-vaginali per confermare o escludere tramite coltura la presenza di microrganismi patogeni (Gram Positivi e Gram Negativi, Gardnerella vaginalis, Trichomonas vaginalis, Ureaplasma urealyticum, Chlamydia trachomatis).

1.4.5.2 Diagnosi biochimica

Per un'ulteriore conferma del dato clinico oppure per accertare o escludere una PROM sospetta, sebbene clinicamente asintomatica, è possibile effettuare diversi test biochimici sul fluido vaginale. Si può, ad esempio, esaminare il pH del fluido (Nitrazina test): a membrane integre il pH del fluido vaginale è compreso tra 4.5 e 5.5; quando è presente il liquido amniotico diventa almeno 6.5-7.0. L'accuratezza diagnostica del Nitrazina Test è del 90-98%. E' possibile eseguire un'altra semplice valutazione strisciando e lasciando seccare per almeno dieci minuti una goccia di liquido su un vetrino portaoggetti: in presenza di liquido amniotico compare una tipica arborizzazione a foglia di felce (Ferning Test). Tale test ha un'accuratezza diagnostica dell'85-98%.

Sono stati suggeriti altri test basati sul dosaggio della prolattina vaginale, dell' α -feto proteina (AFP), della gonadotropina corionica umana (HCG), della fibronectina fetale (fFN) e della diamino ossidasi (DAO), dell'IGFBP-1 (insulinlike growth factor binding protein-1). La positività ad uno di questi test non è tuttavia specifica per la diagnosi di rottura delle membrane, pertanto essi dovrebbero essere utilizzati solamente nei casi di pPROM altamente sospetta, ma non verificabile con i test sopra menzionati.

La fFN ha il potenziale di essere un test diagnostico con un alto valore prognostico negativo nel determinare la pPROM, infatti il liquido amniotico contiene alti livelli di fFN (circa 50,000 ng/ml). Eriksen e altri hanno confrontato la fFN con il Ferning e il Nitrazina test nel determinare la rottura delle membrane a termine ed hanno riportato una

sensibilità del 98,2% con una specificità del 26,8%, un valore predittivo positivo dell'87,5% ed un valore predittivo negativo del 75% ¹⁰⁹.

1.4.6 Fattori di rischio e potenziali indici predittivi di rottura prematura delle membrane

Lo sviluppo di un metodo di screening per identificare le donne a rischio più elevato di partorire prematuramente, è stato oggetto di studio da parte di diversi ricercatori. Attualmente si ritiene che l'utilizzo combinato di marker clinici e biochimici possa contribuire ad identificare le gravidanze a maggior rischio di PROM e parto pretermine, prevenendo le complicanze legate a questo evento.

1.4.6.1 Marcatori clinici

I marker clinici di pPROM e parto pretermine sono:

- alterazioni della lunghezza cervicale ¹¹⁰;
- perdite ematiche vaginali ¹¹¹;
- fattori di rischio materni (pregresso parto pretermine, pregressa PROM, valori di emoglobina < 11 g/dl, gravidanze plurigemellari, vaginosi batterica) ¹¹²⁻¹¹⁴.

1.4.6.2 Marcatori biochimici

I principali marker biochimici di pPROM e parto pretermine sono:

- citochine pro infiammatorie ⁹¹;
- proteasi sieriche e cervicovaginali ¹¹⁵;
- CRH
- fibronectina fetale e IGFBP-1 cervicovaginali ¹¹⁶⁻¹¹⁷;
- proteina C reattiva ¹¹⁸⁻¹²¹.

1.4.6.3 Marcatori di infezione intrauterina

L'analisi diretta del liquido amniotico è il metodo più accurato per stabilire la presenza o l'assenza di infiammazione o di infezione intraamniotica. In caso di infezione intrauterina, oltre a contenere batteri, il fluido amniotico presenta una bassa concentrazione di glucosio, una conta dei globuli bianchi elevata ed un aumento di "granulocyte-colony-stimulating factor" (G-CSF), TNF- α , IL-1, IL-6, MMP-9. Per rilevare questi marker di infezione intraamniotica è tuttavia necessario ricorrere all' amniocentesi, che è una procedura invasiva; inoltre non è dimostrato che l'esecuzione

di tale esame migliori l'outcome della gravidanza, anche in donne con sintomi di travaglio pretermine.

A livello delle secrezioni cervico-vaginali sono considerati marker di infezione la vaginosi batterica e alti livelli di G-CSF, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e fibronectina fetale.

Nel siero invece, in caso di infezione, si elevano i livelli di G-CSF, IL-6, TNF- α e PCR. Le concentrazioni di ferritina sierica raddoppiano entro una settimana dalla rottura delle membrane, indicando probabilmente una progressiva infezione intrauterina¹²².

1.4.7 Complicanze della pPROM

L'impatto della pPROM sul neonato e sull'outcome della gravidanza è strettamente correlato all'età gestazionale al momento della rottura; le complicanze della pPROM sono infatti tanto più frequenti e gravi quanto più bassa è l'epoca di gravidanza a cui si presenta e l'epoca gestazionale del parto. La pPROM si associa ad una breve latenza tra la rottura delle membrane ed il parto: nel 50% dei casi il travaglio insorge entro 24 ore dalla rottura e nell'80-90% dei casi entro 7 giorni; di conseguenza il parto pretermine e le complicanze della prematurità sono le cause più importanti della mortalità e morbilità perinatale.

1.4.7.1 Complicanze feto/neonatali

- Morte neonatale

Se il parto avviene prima del raggiungimento dell'epoca di vitalità per il feto risulta letale. Le percentuali di incidenza sono estremamente variabili perché dipendono dalle popolazioni considerate e dalle diverse età gestazionali. In media per la pPROM prima delle 24 settimane la percentuale è pari al 60-70%¹²³⁻¹²⁴.

- Morte fetale

È primariamente correlata ad abruptio, prolasso del funicolo, compressione del funicolo o infezione. Il rischio medio di morte fetale dopo pPROM del secondo trimestre è circa del 10% ed è inversamente correlato all'età gestazionale alla rottura ed al volume residuo di liquido amniotico.

- Corionamniosite

Nel neonato prematuro determina, oltre alle complicanze acute come sepsi, enterocolite necrotizzante e malattie polmonari, un rischio aumentato di leucomalacia periventricolare (PVL) e di emorragia peri-intraventricolare, spesso seguita da idrocefalo post-emorragico, condizioni cliniche a loro volta responsabili di deficit neurologici a

lungo termine, ritardo mentale e paralisi cerebrale. Inoltre l'infezione pre-natale è la complicanza che limita maggiormente l'intervallo di latenza. Se durante il periodo di latenza si manifesta infezione clinica è indicato procedere con il parto ^{125,126}. La corionamniosite è diagnosticata istopatologicamente ed è la più comune alterazione che si riscontra nelle pPROM del secondo trimestre. Tuttavia l'eziologia è ancora poco chiara ed eterogenea ^{127,128}.

- *Sindrome da risposta infiammatoria fetale*

La sindrome da risposta infiammatoria fetale è una condizione subclinica frequentemente presente nel travaglio pretermine e nella rottura pretermine prematura delle membrane ed è associata ad un'aumentata mortalità e morbilità perinatale. La sua presenza è definita da elevate concentrazioni plasmatiche fetali di IL-6 (in genere si considera un cut-off di 11 pg/mL). E' noto che l'invasione microbica della cavità amniotica sia presente nel 10% delle pazienti con travaglio pretermine e nel 30% delle pazienti con pPROM ^{129,130}. I microrganismi dalla cavità amniotica o dal compartimento materno possono raggiungere il feto e stimolare la biosintesi di citochine pro infiammatorie ¹⁰⁰.

- *Distacco intempestivo di placenta (Abruptio placentae)*

È più frequente nelle gravidanze complicate da pPROM del secondo trimestre, in quanto si realizza nel 44% dei casi, rispetto allo 0,8% della popolazione generale ostetrica. Il rischio è maggiore in caso di bassa età gestazionale alla rottura e in caso di sanguinamento vaginale verificatosi prima o dopo la PROM ^{131,132}.

- *Prolasso del funicolo*

Ha un'incidenza di circa il 2%.

- *Ipoplasia polmonare*

Consiste nella riduzione del numero di cellule polmonari, vie aeree ed alveoli, principalmente dovuta, in caso di pPROM, ad alterazioni della normale pressione del liquido amniotico e dell'uscita del fluido polmonare durante la fase canalicolare dello sviluppo polmonare (che termina quasi a 26 settimane). Il gold standard per la diagnosi di ipoplasia polmonare è il peso polmonare all'autopsia. L'incidenza dell' ipoplasia polmonare in caso di pPROM del secondo trimestre varia dal 13 al 28% ¹³³⁻¹³⁴. Il tasso di mortalità dei neonati con questo problema è 70-95% ^{135,136}.

- *Sindrome da compressione fetale*

In caso di PROM precoce l'asimmetria della pressione uterina e la restrizione dei movimenti fetali possono portare ad alterazione della posizione degli arti fino a

deformità e a difetti cranio-facciali di severità variabile, originariamente descritti nel contesto delle agenesie renali. La frequenza media di deformità scheletriche è del 7%. La durata della latenza e la severità dell'oligoidramnios aumentano indipendentemente il rischio di anomalie scheletriche e agiscono in modo sinergico ¹³⁴.

- Altre morbidità

Altre morbidità neonatali sono simili a quelle del parto pretermine e sono correlate all'età gestazionale in cui si verifica la pPROM; esse includono la sindrome da distress respiratorio, la displasia broncopolmonare, l'emorragia intraventricolare, l'enterocolite necrotizzante, la sepsi e retinopatia della prematurità. Per quanto riguarda le morbidità a lungo termine, circa il 63-84% dei sopravvissuti dopo PROM del secondo trimestre risulta privo di sequele neurologiche ¹²⁷.

1.4.7.2 Complicanze materne

- Taglio cesareo

Il tasso di tagli cesarei aumenta in relazione alle più comuni alterazioni della frequenza cardiaca fetale (connesse a oligoidramnios e corionamniosite) ed all'abruptio. Una classica incisione uterina potrebbe essere necessaria per ridurre il trauma fetale a basse età gestazionali (oligoidramnios, mal posizione fetale e caratteristiche del segmento uterino inferiore costituiscono un fattore di rischio).

- Placenta ritenuta

Il rischio di andare incontro ad esplorazione uterina o al curettage è 9-18% e più facilmente se la rottura si verifica prima delle 20 settimane.

- Endometrite post-partum

Si verifica circa nel 13% dei casi. La sepsi materna post-partum (0,8%) e la morte (1/1000) sono poco comuni. Il rischio di infezione materna è inversamente proporzionale al periodo di latenza.

1.4.8 Conduzione clinica delle pazienti con pPROM

La conduzione iniziale deve comprendere la conferma della diagnosi, la determinazione dell'età gestazionale, la valutazione ecografica, l'identificazione di eventuali processi infettivi materni e/o fetali e la valutazione dell'attività contrattile (mediante monitoraggio cardiotocografico) e del benessere fetale. La diagnosi si avvale della combinazione tra anamnesi accurata, segni clinici e/o strumentali e test biochimici addizionali.

1.4.8.1 Protocollo di conduzione clinica

Il protocollo clinico attualmente utilizzato presso l'Ospedale San Gerardo di Monza prevede:

Ricovero al momento della diagnosi o del trasferimento da altri centri e riposo per 7 giorni.

- Nella prima settimana tutte le pazienti ricevono una profilassi antibiotica con Ampicillina – Acido Clavulanico 2 gr e.v. ogni 8 ore.
- Le colture genitali e la coltura vagino-rettale per la ricerca dello Streptococco β -emolitico di gruppo B (GBS) sono effettuate al momento del ricovero e le colture genitali ripetute ogni due settimane; in caso di risultati positivi per germi potenzialmente patogeni (inclusi Gram Positivi e Gram Negativi, Gardnerella vaginalis, Trichomonas vaginalis, Ureaplasma urealyticum, Chlamydia trachomatis) viene iniziato un trattamento antibiotico mirato.
- Rinvio al domicilio per i casi con esordio prima della 24^a settimana (riposo, monitoraggio della temperatura corporea) e controllo settimanale ospedaliero ultrasonografico e degli indici di flogosi (leucociti e PCR).
- Se la gravidanza si prolunga o la PROM insorge dopo la 24^a settimana la paziente viene ricoverata in ospedale generalmente fino al momento del parto.
- Ogni paziente riceve terapia corticosteroidica (Betametasone 12 mg i.m. ripetuto dopo 24 ore) per l'induzione della maturità polmonare fetale almeno una volta tra la 24^a e la 32^a settimana. Non è prevista la ripetizione di tale terapia che viene riconsiderata per la comparsa di indici sospetti di parto imminente se l'epoca gestazionale è inferiore a 28-30 settimane. Durante la terapia corticosteroidica viene ripetuta la terapia antibiotica per 3 giorni, anche in assenza di altra indicazione clinica.
- La terapia tocolitica viene effettuata nelle 48 ore necessarie per l'induzione della maturità polmonare fetale entro la 34^a settimana. Può essere prolungata per la presenza di attività contrattile uterina in assenza di segni clinici di corionamniosite, distacco di placenta, o di sofferenza fetale entro la 32^a settimana.

L'espletamento del parto è considerato in presenza di:

- Corionamniosite clinica o altre complicanze controindicanti la conduzione conservativa;
- Sofferenza fetale (diagnosticata come tachicardia con variabilità ridotta/assente, decelerazioni variabili gravi o tardive ripetitive, profilo biofisico < 6 per 2 volte nello stesso giorno);
- Distacco della placenta;
- Travaglio di parto;
- Prolasso di funicolo o piccole parti fetali;
- Presenza di oligoidramnios persistente a 32 settimane;
- 34 settimane.

“Timing” del parto:

- Il parto **prima delle 32 settimane** gestazionali (sg) è associato a complicanze neonatali, inclusa morbidità severa e morte neonatale. In questi casi un management di tipo conservativo, ove possibile, è sempre indicato.
- Nelle **pPROM > 34 sg** non è indicato un management conservativo in quanto aumenta il rischio di infezione.
- **Tra le 32 e le 34 sg** è indicato un management conservativo con corticosteroidi e antibiotico terapia.

1.4.9 PROM a termine

La PROM (rottura delle membrane a termine, ma prima dell'insorgenza del travaglio) si verifica in circa l'8% delle gravidanze. Nel 50% dei casi il parto è espletato entro cinque ore dalla rottura e nel 95% dei casi entro 28 ore. Il rischio di infezione intrauterina aumenta con la latenza tra la rottura delle membrane e il parto. Un altro potenziale rischio è la compressione del funicolo. Obiettivo del management deve essere minimizzare il rischio di infezione intrauterina, senza aumentare l'incidenza di taglio cesareo.

1.4.9.1 Eziopatogenesi

Si pensa che nel corso delle ultime fasi della gestazione la combinazione di fattori fisici e biochimici favorisca l'indebolimento delle membrane. Questi fattori sarebbero particolarmente attivi nella zona sopracervicale. In tale area l'indebolimento delle membrane è stato associato a fattori biochimici ed istologici compatibili con il

rimodellamento del collagene, la distruzione del collagene della matrice extracellulare e l'apoptosi. In particolare è stato dimostrato che, a termine di gravidanza, le membrane fetali nella zona sopracervicale mostrino segni di degenerazione, sia a livello dello strato epiteliale sia nello strato compatto di tessuto connettivo dell'amnios, oltre a risultare molto più interessate da apoptosi cellulare, se confrontate con i siti più distali. Da questo lavoro emerge anche un possibile ruolo dell'attivazione della via intrinseca del processo di apoptosi nell'area sopracervicale delle membrane nel determinare la rottura delle membrane a termine di gravidanza ¹³⁷.

L'analisi di amnios e corion provenienti da casi di rottura delle membrane a termine ha mostrato la presenza di molte cellule apoptotiche in aree adiacenti al sito di rottura, mentre tali cellule sono poco rappresentate nelle altre zone ¹³⁸. Nella PROM a termine aumenta anche l'attività collagenasica ¹³⁹.

Le membrane che si rompono prematuramente sembrano mostrare difetti focali, più che un generale indebolimento. L'area vicino al sito di rottura è stata descritta come una zona limitata di morfologia profondamente alterata, caratterizzata da rigonfiamento marcato e distruzione della rete di collagene fibrillare all'interno degli strati compatto, fibroblastico e spongioso dell'amnios ¹⁴⁰. L'alterazione di questa zona potrebbe precedere e favorire la rottura delle membrane. La rottura prematura delle membrane potrebbe tuttavia rappresentare un'accelerazione o un'esagerazione dei processi che conducono alla rottura spontanea durante il travaglio (indebolimento generalizzato causato da contrazioni uterine e stiramenti ripetuti).

1.4.9.2 Gestione clinica

E' opportuno confermare l'avvenuta rottura delle membrane con un esame speculare (che permette anche l'eventuale esecuzione di un tampone cervicale), mentre il numero delle visite vaginali deve essere il più possibile limitato. E' quindi opportuno effettuare la visita solo in presenza di travaglio inarrestabile, di alterazioni patologiche gravi del battito cardiaco fetale suggestive di un prolasso, o qualora si consideri indicata un'induzione di travaglio. E' necessario controllare la temperatura corporea ogni sei ore, verificando contemporaneamente anche le caratteristiche organolettiche del liquido amniotico (colore e odore). L'NST deve essere eseguito ogni 12 ore. In caso di sospetto clinico o di certezza di infezione è indicato indurre il travaglio.

L'induzione potrà inoltre essere presa in considerazione qualora dopo 24 ore dalla PROM non sia insorta un'attività contrattile. La stessa dovrà però essere anticipata in

tutti i casi in cui vi sia indicazione ad accelerare i tempi, come, ad esempio, in presenza di liquido tinto, di alterazioni del battito cardiaco fetale, di febbre materna, ecc.

Le pazienti con basso e medio Bishop Score (≤ 6) sono indotte con prostaglandine vaginali. In caso di Bishop Score favorevole (≥ 7) l'induzione è espletata mediante perfusione ossitocica, preceduta da completamento dell'amnioressi nelle PROM alte.

Dopo due ore dalla rottura delle membrane, qualora non sia iniziata l'attività contrattile, è opportuno praticare una profilassi antibiotica con ampicillina 1g x 3 i.m. fino al parto; in presenza di specifici indicatori di infezione (rialzo termico, LA maleodorante, positività dei tamponi colturali ecc.) è indicato proseguire la terapia in puerperio.

1.4.10 PROM e pPROM: problemi aperti

Come emerge dalla precedente trattazione, l'eziologia della rottura prematura delle membrane, certamente complessa e multifattoriale, non risulta ancora completamente chiarita. In particolare saranno necessarie ulteriori indagini in merito ai seguenti aspetti:

- *ruolo dell'infiammazione/infezione intrauterina*, che in molti lavori di ricerca è stata associata alla pPROM, sia come fattore che favorisce la rottura delle membrane sia come complicanza della stessa;
- *ruolo di altri meccanismi come il danno vascolare, autoimmunitario e lo stress ossidativo* che possono contribuire alla genesi della pPROM in quanto causa di infiammazione intrauterina;
- *eventuali differenze nei meccanismi eziopatogenetici responsabili della PROM pretermine e della PROM a termine*; sembra infatti che l'infezione coriodecidual e l'infiammazione siano maggiormente implicate nell'origine della pPROM, in particolare ad età gestazionali precoci ¹⁴¹, mentre, con il progredire della gravidanza, sembra acquistare maggior rilevanza la riduzione del contenuto di collagene delle membrane fetali ⁷⁸.

Dal punto di vista diagnostico un rapido ed accurato riconoscimento dell'infiammazione intrauterina, indipendentemente dalla sua causa, è fondamentale per lo sviluppo di interventi clinici finalizzati al miglioramento degli outcome. I test attualmente disponibili per la diagnosi di infiammazione intrauterina (come il livello di glucosio del liquido amniotico, la conta dei globuli bianchi o dei neutrofili e la colorazione di Gram) non sono tuttavia rapidi, sensibili o specifici. Per impostare un'adeguata gestione clinica, inoltre, è necessaria un'accurata diagnosi di rottura delle membrane, che risulta di facile attuazione, anche con l'ausilio dei soli criteri clinici, nei casi sintomatici, ma che è

potenzialmente insidiosa nei casi dubbi o clinicamente silenti, come si verifica, ad esempio, nella rottura “alta” delle membrane.

I test biochimici per la diagnosi di PROM attualmente a disposizione hanno spesso dei limiti di applicabilità, rappresentati dall’alta percentuale di falsi positivi, dovuti per esempio a contaminazione con sangue materno, e falsi negativi, oppure a valori di accuratezza diagnostica non sempre soddisfacenti. Vi sono quindi dei casi di pPROM che restano indeterminati, e ciò influisce negativamente sulla possibilità di intraprendere tempestivamente un trattamento adeguato, in grado di ridurre le complicanze.

Ancora oggi la maggior parte degli sforzi clinici è incentrata sul trattamento delle pPROM dopo che si sono verificate, anche se, senza dubbio, l’adozione di una strategia preventiva nei confronti della pPROM potrebbe portare ad una netta riduzione delle sue complicanze

Infine, la scelta della gestione clinica ottimale delle pazienti con PROM deve basarsi sulla valutazione dei rischi legati al proseguimento della gravidanza e di quelli connessi alla prematurità “iatrogena”, che deriva dalla scelta di indurre il parto prima del termine della gravidanza. Se la pPROM si verifica prima della 30a settimana di gestazione, in assenza di compromissione materna o fetale, è in genere comunemente accettata la gestione clinica conservativa, al fine di consentire la maturazione fetale. In caso di pPROM tra la 34a e la 37a settimana il management della paziente è più controverso, in quanto, in caso di proseguimento della gravidanza, il vantaggio per il feto risulta incerto. E’ stato riportato che dopo la 34a settimana, in caso di conduzione di attesa, il rischio di infezione intrauterina supera il beneficio per il feto ¹⁴². Anche la decisione di far nascere elettivamente un bambino prima del termine va tuttavia attentamente soppesata, poiché anche la lieve prematurità determina un discreto carico di salute e la necessità di cure particolari. In caso di rottura prematura delle membrane amniocoriali a termine di gravidanza vi sono due possibili gestioni cliniche: l’induzione o la conduzione di attesa. Nel primo caso si induce il travaglio al momento della diagnosi di PROM o entro 6-8 ore dalla rottura delle membrane, nel secondo caso, invece, si attende l’insorgenza spontanea del travaglio. Anche in caso di PROM a termine vi è un rischio di infezione intrauterina, che aumenta con la latenza tra rottura delle membrane e parto. Un altro potenziale rischio è la compressione del funicolo. Non si conoscono altri fattori prognostici che permettano di discriminare i casi di pPROM che avranno esiti favorevoli e quelli che andranno incontro a complicanze, né strumenti in grado di predire la latenza tra la rottura delle membrane e il parto.

PROGETTO HIGHCaRe

1.5.1 Fisiologia e fisiopatologia dell'alta quota

Le prime osservazioni scientifiche sulla fisiopatologia dell'altitudine nascono nella seconda metà del XVIII secolo in un contesto socio-culturale in cui la montagna rappresentava una fonte di leggende e superstizioni e gli unici a spingersi ad alte quote erano i cacciatori o i cercatori di cristalli. Fino al 1700 infatti sono riportati solamente alcuni episodi sporadici relativi all'ascesa dei monti alpini. Nel 1760, tuttavia, il naturalista svizzero Horace de Saussure, deciso a determinarne l'altitudine, offre un premio a chi sia in grado di scoprire una via di ascesa al Monte Bianco. Dopo numerosi anni di tentativi ed esplorazioni, il giorno 8 Agosto 1786, un medico ed un cercatore di cristalli, Michel Gabriel Paccard e Jacques Balmat, sono i primi a raggiungere la vetta del Monte Bianco, determinando la nascita dell'alpinismo moderno. Nel 1950 Maurice Herzog e Louis Lechenal scalano per primi una vetta superiore agli 8000mt, l'Annapurna¹⁴³. Da allora con l'aumento della popolarità degli sport estremi e la facilità di spostamento milioni di persone ogni anno si recano in montagna e raggiungono quote considerevoli incorrendo anche in problemi di salute ad esse associati.

1.5.2 Altitudine ed ipossia ipobarica

L'aria atmosferica è una miscela gassosa composta principalmente da azoto (78%) ed ossigeno (21%) oltre che da piccole percentuali di altri gas (anidride carbonica, argon, neon, elio ed altri) e vapore acqueo¹⁴⁴. La composizione dell'aria rimane costante a qualsiasi altitudine mentre la pressione barometrica diminuisce in maniera quasi esponenziale con l'altitudine. Anche la temperatura decresce con l'aumentare della quota, in media circa 0.65°C ogni 100 mt, mentre l'umidità decresce ancor più rapidamente, dimezzandosi a 2000 mt e riducendosi ad un quarto attorno ai 4000 mt¹⁴³.

La pressione parziale dell'ossigeno (PO_2), la cui concentrazione nell'aria rimane costante, si riduce per il diminuire della pressione barometrica: tale condizione si definisce ipossia ipobarica. Sul Monte Bianco (4807 mt) la pressione parziale di ossigeno è pari alla metà di quella misurata a livello del mare mentre in cima all'Everest è pari ad un terzo.

Nelle regioni equatoriali, quindi anche nell' Himalaya e nelle Ande, la pressione atmosferica si mantiene un po' più elevata rispetto ai poli terrestri.



Fig. 1.15: Rapporto tra altitudine e pressione barometrica.
(Fisiologia applicata allo sport. II ed. Mc Ardle et al. Casa ed. ambrosiana).

Dal punto di vista biologico e fisiologico si possono classificare quattro diversi livelli di quota ¹⁴⁶:

- A. BASSA QUOTA (livello del mare – 1500mt) pressione barometrica compresa fra 760 e 611 mmHg, PO₂ da 159 a 128 mmHg, adattamenti fisiologici assenti o trascurabili, desaturazione arteriosa di O₂ minima (2%) eventuali modificazioni del consumo massimo di O₂ non significative, assenza di fisiopatologie specificamente associate alla quota.
- B. MEDIA QUOTA (da 1500 a 3500 mt) pressione barometrica compresa fra 611 e 526mmHg, PO₂ da 128 a 110 mmHg, adattamenti fisiologici modesti, riduzione massima del VO₂ del 10-15%, rari ma possibili casi di mal di montagna acuto.
- C. ALTA QUOTA (da 3500 a 5500 mt) pressione barometrica compresa fra 526 e 379 mmHg, PO₂ da 110 a 79 mmHg, adattamenti fisiologici notevoli ed indispensabili (iperventilazione, aumento della frequenza cardiaca, poliglobulia), riduzione massima del VO₂ dall' 85 al 55%, fisiopatologia specifica ben rappresentata (mal di montagna acuto, edema cerebrale, edema polmonare).
- D. ALTISSIMA QUOTA(oltre i 5500 mt) pressione barometrica da 379 a 237 mmHg a 9000 mt, PO₂ da 79 a 50 mmHg, adattamenti fisiologici complessi con

progressivo deterioramento organico, riduzione massima del VO_2 inferiore al 20%, fisiopatologia frequente e conclamata.

Il passaggio di ossigeno dai polmoni al sangue è funzione della differenza esistente tra la pressione di O_2 negli alveoli polmonari (100mmHg) e quella nel sangue che arriva ai polmoni stessi (40mmHg). Questo gradiente di pressione, che a livello del mare è 60 mmHg, è sufficiente ad assicurare il passaggio di O_2 dai polmoni al sangue, garantendo un'adeguata ossigenazione dei tessuti e degli organi. L'esposizione all'ipossia ipobarica provoca una diminuzione del gradiente pressorio e riduce l'efficacia del passaggio dell'ossigeno dagli alveoli al sangue. L'ipossia non rappresenta tuttavia l'unico fattore di stress per l'organismo esposto ad altitudine, ad alte quote infatti si associano anche la riduzione della temperatura, la riduzione dell'umidità dell'aria e l'aumento dell'irraggiamento solare. I primi effetti patologici legati alla quota si verificano sopra ai 3000 mt, ove la saturazione di ossigeno scende sotto la soglia del 90% e dove possono insorgere complicanze anche gravi, definite ipobaropatie.

1.5.3 Acclimatemento

L'acclimatemento o acclimatazione all'altitudine è un processo di adattamento fisiologico che si attua come risposta all'esposizione a breve o lungo termine alla ridotta pressione atmosferica, senza o con un'adeguata correzione della riduzione della pressione parziale di O_2 (ipossia ipobarica)¹⁴⁶. Un'esposizione improvvisa ad una pressione parziale di ossigeno molto bassa, come quella che si trova sopra gli 8000 metri, condurrebbe alla perdita di coscienza e alla morte in pochi minuti. Tutte le vette del mondo, Everest compreso, sono state scalate da alpinisti esperti senza l'aiuto dell'ossigeno grazie al processo di acclimatazione del corpo umano all'ambiente ipossico ed in particolare alle modificazioni, rapide o lente, che permettono di sopravvivere in condizioni estreme. L'intensità della risposta del corpo umano dipende dall'intensità dell'ipossia, tuttavia esiste una notevole variabilità da individuo ad individuo sia per quanto riguarda la capacità che le tempistiche dell'acclimatazione. L'acclimatazione è mediata da meccanismi atti a sostenere la distribuzione dell'ossigeno nell'organismo quali per esempio: aumento della ventilazione, aumento della portata cardiaca e della concentrazione dell'emoglobina ed altre modificazioni metaboliche.

1.5.3.1 Adattamenti immediati

Il primo adattamento che si verifica durante l'esposizione acuta alla condizione di ipossia ipobarica e' associato al sistema respiratorio. A livello fisiologico, infatti, la respirazione controlla l'adeguata ossigenazione di tutti gli organi e dei tessuti e l'eliminazione dell'anidride carbonica che si forma durante i processi metabolici.

In particolare, la risposta immediata dell'organismo umano esposto all'ipossia ipobarica implica un aumento della ventilazione: quando la pressione parziale di O₂ raggiunge valori inferiori a 60 mmHg, i glomi aortico e carotideo, recettori presenti a livello della carotide e dell'arco aortico, stimolano il centro del respiro con conseguente aumento della profondità e della frequenza degli atti respiratori. La risposta dei recettori all'ipossia avviene attraverso una scarica afferente che stimola i centri respiratori bulbari i quali attiveranno i muscoli respiratori. Tuttavia la stessa risposta è variabile e i soggetti in grado di rispondere in maniera più vivace si adeguano meglio all'ambiente ipossico, presentando minori disturbi. Nel contempo però, l'aumento della ventilazione provoca riduzione della pressione parziale di anidride carbonica (CO₂) con conseguente inibizione della ventilazione. Questa alternanza di stimoli opposti provoca il cosiddetto respiro periodico (respiro di Cheyne-Stokes), costituito da fasi di iperventilazione che si succedono a fasi di ipoventilazione e a volte di apnea. Il massimo aumento della ventilazione si raggiunge a 7.000-7.500 m sul livello del mare, con un valore di pressione barometrica di 280-300 mmHg. A tale quota, la PO₂ alveolare è 28-30 mmHg e quella del sangue arterioso è 25-27 mmHg. Oltre tale altitudine la ventilazione polmonare diminuisce più o meno rapidamente e si possono registrare irregolarità nel ritmo, nella ampiezza e nella frequenza del respiro. La diminuzione della pressione di ossigeno nell'aria inspirata determina una riduzione della pressione di ossigeno nel sangue arterioso e quindi una riduzione della saturazione dell'emoglobina. Fino a circa 3000 metri comunque, l'emoglobina si mantiene satura di ossigeno, a riposo, per più del 90%. A quote superiori la saturazione dell'emoglobina e quindi la quantità di ossigeno trasportata ai tessuti, si abbassa notevolmente sia a riposo che, in modo più accentuato, durante sforzo fisico ¹⁴⁷. La valutazione della saturazione dell'emoglobina può essere un indice utile e semplice per valutare lo stato di acclimatazione di un soggetto. Le popolazioni che risiedono in alta quota mantengono la loro saturazione emoglobinica più alta rispetto ai non residenti esposti ad alta quota ma il meccanismo alla base di ciò non è ancora del tutto chiaro ¹⁴⁸.

Anche il sistema cardio-circolatorio e' coinvolto nella fase di acclimatamento precoce mentre gli altri sistemi (renale, ematico, tissutale) entrano in gioco più tardivamente. In particolare, per quanto concerne il sistema cardiovascolare, si riscontra un aumento della portata cardiaca: in alta quota si riduce la concentrazione di O₂ nel sangue circolante ed il cuore reagisce aumentando la frequenza dei battiti a riposo in modo da far arrivare un maggior volume di sangue ai tessuti periferici; la tachicardia raggiunge il limite massimo verso i 7-8.000 m. La tachicardia in risposta all'esercizio (frequenza cardiaca massima) invece si riduce, mentre durante uno sforzo sottomassimale la frequenza cardiaca aumenta di più rispetto a ciò che si verifica per uno sforzo simile a livello del mare. La tachicardia permette pertanto l'aumento della portata cardiaca (sangue circolante in un minuto) senza che vi siano sostanziali modifiche della gittata sistolica (quantità di sangue espulsa dal cuore per ogni battito cardiaco), che anzi tende a diminuire leggermente a causa della deplezione di volume circolante che si verifica normalmente in ambiente ipossico. Anche la pressione arteriosa tende ad aumentare con l'altitudine anche se le variazioni della risposta pressoria sono diverse fra gli individui. Nei soggetti ipertesi già a livello del mare per esempio la risposta pressoria in quota e' notevole mentre nelle popolazioni normalmente residenti alle alte quote i valori pressori sono più bassi rispetto ai residenti a livello del mare ¹⁴⁹.

1.5.3.2 Adattamenti tardivi

Oltre i 3000 mt e con l'esposizione prolungata alla condizione di ipossia ipobarica si instaurano ulteriori adattamenti volti a migliorare le funzioni cellulari e fisiologiche.

L'esposizione all'ambiente ipossico ha un effetto vasocostrittivo a livello delle arterie polmonari. Fino a certi livelli l'aumento della pressione arteriosa polmonare e' un meccanismo compensatorio che permette di migliorare la perfusione polmonare. Tuttavia esiste una notevole variabilità individuale e in quelle persone in cui la risposta è accentuata ed eccessiva l'ipertensione polmonare presente a riposo e sotto sforzo predispone allo sviluppo di edema polmonare. Durante un'esposizione prolungata all'ambiente ipossico si possono osservare vere e proprie modificazioni anatomiche a livello delle arterie polmonari, con un aumento dello strato muscolare e del tessuto fibroso delle pareti che possono rendere meno reversibile la situazione di ipertensione polmonare ¹⁵¹.

Oltre al sistema respiratorio anche il rene e' coinvolto negli adattamenti tardivi nell'esposizione all'alta quota. L'iperventilazione, che si attua come adattamento

all'esposizione acuta all'ipossia ipobarica, determina un aumento della pressione parziale di ossigeno a livello alveolare ed una concomitante riduzione della pressione parziale di anidride carbonica. Pertanto il gradiente pressorio che regola la diffusione dell'anidride carbonica dal sangue venoso verso gli alveoli aumenta portando ad una maggior perdita di questo gas da parte dell'organismo. A 5000 mt di altitudine, per esempio, la pressione alveolare dell'anidride carbonica e' pari a circa 24 mmHg rispetto ai 40 mmHg a livello del mare.

Nel sangue il pH e' definito dal rapporto fra ioni bicarbonato (HCO_3) e anidride carbonica (CO_2) ed e' normalmente pari a 20/1. Nel caso in cui la diffusione dell'anidride carbonica a livello alveolare aumenti ed il livello metabolico si mantenga costante, si puo' osservare una riduzione della CO_2 nel sangue ed un aumento del rapporto HCO_3/CO_2 da cui deriva un aumento del pH plasmatico, ovvero una condizione di alcalosi. Se l'alcalosi e' primariamente legata ad un adattamento di tipo respiratorio e' detta alcalosi respiratoria ¹⁴³.

L'iperventilazione e' un processo che inizia in fase acuta e si mantiene durante tutto il tempo dell'esposizione all'alta quota pertanto l'organismo che rimane per tempo prolungato in quota deve fronteggiare una situazione di alcalosi respiratoria cronica. L'organismo pero' ha una tolleranza minima alle variazioni del pH ematico e quindi per riportare il pH a 7.4 l'eccesso di CO_2 nel sangue dovuto all'iperventilazione viene corretto a livello renale mediante una riduzione del riassorbimento dei bicarbonati. I reni infatti eliminano i bicarbonati con le urine correggendo sia il pH ematico sia il rapporto HCO_3/CO_2 . Bisogna sottolineare che il rapporto 20/1 si ottiene riducendo la disponibilita' dei bicarbonati, condizione definita anche come acidosi metabolica. A 5000 mt di altitudine la pressione parziale della CO_2 alveolare e' dimezzata e quindi per riportare il rapporto HCO_3/CO_2 a 20/1 e' necessario dimezzare la concentrazione plasmatica di HCO_3 . La principale conseguenza funzionale dell'eliminazione di bicarbonati con le urine e' data dal fatto che in ipossia cronica l'organismo possiede una minor capacita' di tamponamento nei confronti dell'acidosi, in particolare nei confronti della produzione di acido lattico.

L'equilibrio respiratorio pertanto risulta particolarmente perturbato durante la fase di assestamento del pH. L'ipossia induce iperventilazione, ma se questa e' troppo marcata porta ad alcalosi, la quale puo' inibire l'attivita' respiratoria. Il soggetto tende quindi a non iperventilare ma cosi facendo si accumula anidride carbonica e quindi il soggetto torna ad iperventilare. La continua alternanza di iperventilazione e sospensione della

respirazione viene definita respiro periodico o di Cheyne-Stokes. Il respiro periodico è particolarmente evidente nel sonno, quando l'attività respiratoria già di per sé risulta irregolare ¹⁵¹.

In seguito alla riduzione dei bicarbonati si ha anche una riduzione della capacità di tamponamento nel sangue. Questo determina una limitazione della produzione di acido lattico, anche se la via glicolitica anaerobia è perfettamente funzionante, poiché l'accumulo di acido lattico determinerebbe una maggior deviazione del pH verso l'acidosi. Questa situazione è stata definita anche come paradosso del lattato ed è stato associato ad una minor capacità delle catecolamine di innescare glicolisi anaerobica ¹⁵² oppure alla riduzione dell'attività motoria corticale ¹⁵³.

Infine il sistema cardiovascolare ed i parametri ematologici giocano un ruolo importante nella fase tardiva dell'acclimatamento. Per quanto concerne il sistema cardiovascolare nei meccanismi tardivi di adattamento, si osserva una riduzione della portata e della frequenza cardiaca durante lo sforzo. Per quanto concerne invece i parametri ematologici l'ipossiemia cronica induce la produzione renale di eritropoietina, la quale stimola il midollo osseo a produrre una maggiore quota di globuli rossi. Un effettivo aumento del numero di globuli rossi si verifica dopo circa 10 giorni di soggiorno in alta quota e si stabilizza dopo circa 3 settimane. Anche questa risposta all'ipossia è molto variabile tra individui. Se la risposta adattativa è esagerata può portare ad un aumento eccessivo dell'ematocrito (> 60%) conducendo ad una maggior viscosità del sangue con possibile predisposizione alla tromboembolia e all'ischemia dei tessuti per la maggior fatica del sangue a circolare nei vasi piccoli ed ad ossigenarsi ¹⁴³.

L'ipossia, inoltre, determina la liberazione di 2,3 difosfoglicerato (2,3DPG) dai globuli rossi ed il suo aumento nel sangue. La curva di dissociazione dell'emoglobina è tale per cui, fino a valori di pressione parziale di ossigeno alveolare superiori a 60 mmHg, la saturazione si mantiene superiore al 90%. Per valori inferiori, invece, si desatura rapidamente (Figura 1.16). Alcune sostanze, come l'anidride carbonica, l'idrogenione (acidosi) e il 2,3 DPG facilitano il distacco dell'ossigeno dall'emoglobina e quindi la sua disponibilità per i tessuti. La ridotta affinità dell'emoglobina per l'ossigeno potrebbe ostacolare il loro legame a livello polmonare, ma in alta quota, come già detto, il sangue diventa alcalino a causa dell'iperventilazione e quindi il legame è favorito ¹⁵⁴.



Fig. 1.16: Relazione fra pH e dissociazione dell'emoglobina a diverse condizioni di PO₂.
(per gentile concessione dell'autore, Prof. Frisancho AR).

Infine, durante l'esposizione prolungata alla quota, si sviluppa una perdita di volume del tessuto muscolare senza diminuzione del numero di capillari sanguigni. Questo fenomeno favorisce l'ossigenazione dei muscoli stessi.

Nel processo di acclimatamento l'organismo attua numerosi meccanismi diversi, i quali agiscono in maniera diversa e a volte opposta. L'equilibrio dei sistemi favorisce e permette l'adattamento.

1.5.3.3 Sistema endocrino-metabolico e altitudine

Il sistema endocrino-metabolico gioca un ruolo molto importante a vari livelli nell'acclimatamento in condizioni di ipossia ipobarica, sia in fase acuta sia in fase cronica.

Le ghiandole surrenali regolano la risposta dell'organismo in diverse condizioni di stress fra cui anche l'esposizione all'ipossia ipobarica. In particolare e' stato riscontrato un aumento della secrezione degli ormoni surrenalici nelle prime 48 ore in quota ed una tendenza alla loro normalizzazione dopo alcuni giorni di esposizione. Tuttavia se il soggetto e' esposto a quote elevate (oltre i 5000 mt) i livelli ormonali plasmatici possono persistere per periodi di tempo prolungati (fino a 5 settimane) e tendono a normalizzarsi in circa 72 ore dopo il rientro a bassa quota ¹⁵⁵.

Il sistema adrenergico gioca un ruolo cruciale in risposta all'alterazione dell'omeostasi dovuta alla drammatica caduta dell'ossigeno che si verifica durante l'esposizione all'ipossia ipobarica sia in fase acuta che in fase tardiva. In particolare in fase acuta il livello di epinefrina ematica e' notevolmente aumentato in quota ¹⁵⁶ in maniera direttamente proporzionale al grado di severita' dell'ipossia ed inversamente proporzionale alla saturazione di ossigeno. La risposta dell'epinefrina all'ipossia

ipobarica è mediata attraverso i recettori β -adrenergici e determina aumento della frequenza e della portata cardiaca, vasodilatazione, broncodilatazione e maggiore cessione di ossigeno ai tessuti. Ma l'azione dell'epinefrina si estende anche al muscolo ed al fegato, ove agisce sulla glicogenolisi ed incrementa l'utilizzazione dei carboidrati e, di conseguenza, la produzione di acido lattico. L'utilizzazione dei carboidrati costituisce un meccanismo importante nella fase iniziale dell'acclimatazione poiché risulta essere un sistema in grado di produrre più energia con una spesa energetica minore rispetto al metabolismo dei lipidi. Un altro effetto importante dovuto allo stimolo β -adrenergico è l'incremento del metabolismo basale¹⁵⁷. I valori di epinefrina aumentano in relazione sia all'intensità dell'esercizio sia al grado di ipossia e l'incremento è lineare per tutta la durata dell'esercizio submassimale durante ipossia acuta, mentre rimane costante durante esposizione cronica. E' evidente dunque che esiste un meccanismo adattativo allo stress indotto dallo stimolo ipossico e dall'esercizio dovuto all'attività surrenalica stimolata dal SSN.

In fase di acclimatazione invece i livelli ematici di epinefrina declinano progressivamente sino a raggiungere i valori basali. E' interessante notare che, alla caduta dei livelli di epinefrina, si associa un incremento dei valori di ossigenazione; questo indica che la concentrazione ematica di questo ormone è correlata sia alla capacità di trasportare l'ossigeno che alla severità dell'ipossia. Tale situazione si ripercuote a livello cardiaco, infatti la concomitante riduzione dei recettori β cardiaci e dei livelli di epinefrina determina un abbassamento della frequenza e dell'output cardiaco.

La norepinefrina (sia urinaria che ematica) presenta un comportamento totalmente diverso dall'epinefrina. I livelli di norepinefrina, infatti, sono simili a quelli rilevati a quota mare durante l'esposizione acuta, mentre aumentano durante l'acclimatazione. La concentrazione urinaria infatti aumenta gradualmente nei primi 6-7 giorni e rimane elevata fino al 21° giorno di esposizione (4300 m). Tale incremento dipende da un aumentato tono simpatico e, soprattutto, è legato alla risposta del sistema simpatico (che aumenta) e surrenalica (che si riduce) durante esposizione all'ipossia cronica. I meccanismi coinvolti in tale fenomeno non sono del tutto conosciuti, infatti il sistema simpatico continua ad incrementare la sua attività anche quando la saturazione di ossigeno migliora. E' ipotizzabile che vi sia una relazione fra riduzione del volume plasmatico ed aumento dei livelli di norepinefrina, in quanto è noto che l'ipovolemia determina un incremento dell'attività simpatica mediata dall'attivazione dei recettori di

pressione o barocettori. Tale risposta, inoltre, provoca un incremento della pressione arteriosa durante il periodo di acclimatazione. Il rilascio a livello neuronale di norepinefrina si correla ad un' aumentata vasocostrizione, con conseguente aumento delle resistenze periferiche e della pressione arteriosa durante l'acclimatazione¹⁵⁸.

Il sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS) e' coinvolto nella regolazione del volume plasmatico, del metabolismo del sodio e della pressione arteriosa, pertanto risulta particolarmente coinvolto nella risposta di adattamento all'ipossia ipobarica, sia in fase acuta che in fase cronica.

In condizioni fisiologiche la renina, enzima sintetizzato a livello delle cellule iuxtaglomerulari renali, scinde l'angiotensinogeno prodotto dal fegato in angiotensina I, la quale per azione dell'enzima di conversione per l'angiotensina (ACE) viene convertita ad angiotensina II. La secrezione della renina è controllata dalla pressione delle arteriole renali e della concentrazione di sodio nella macula densa ma risente anche di altri stimoli esterni quali per esempio disidratazione, emorragia o elevata concentrazione di sodio. Alcuni ormoni ne stimolano la produzione, come per esempio la noradrenalina, mentre altri ne inibiscono la sintesi come per esempio l'aldosterone, ormone sintetizzato a livello della ghiandola surrenale che agisce indirettamente favorendo il riassorbimento del sodio e l'espansione del volume plasmatico. I farmaci beta-bloccanti agiscono come antiipertensivi inibendo la sintesi della renina.

L'esposizione acuta alla quota determina una riduzione della secrezione di aldosterone che si accompagna ad un aumento dei livelli ematici di potassio. D'altro canto, l'esposizione acuta all'alta quota determina un aumento dei livelli ematici di renina ed una riduzione dei livelli dell' ACE. Il meccanismo che sta alla base di tale riduzione è verosimilmente collegato all'aumento del volume ematico centrale. Tale situazione determina uno stimolo per i recettori di volume che provoca una riduzione sia dell'ACE che dell'aldosterone. L'incremento della produzione di renina durante l'esposizione acuta alla quota è stato posto in relazione all'aumento dell'attività del sistema simpatico. Per quanto concerne invece l'esposizione cronica all'ipossia ipobarica e' stato osservato che, dopo circa dieci giorni di esposizione i livelli di renina tendono a ritornare pari a quelli misurati a livello del mare mentre i livelli ematici di aldosterone ed ACE tendono a diminuire significativamente per poi risalire gradualmente ai valori basali misurati a livello del mare.

La letteratura recente, tuttavia, ha presentato dati contrastanti sulla risposta dell'ACE all'ipossia. Infatti, in alcuni studi eseguiti in camera ipobarica, i livelli di ACE non erano significativamente modificati, mentre da uno studio eseguito durante esposizione prolungata all'ipossia risulta un aumento della attività dell'ACE ^{159,160}.

L'elevata variabilità della risposta individuale all'esposizione alla quota è particolarmente interessante in quanto alcuni soggetti soffrono di AMS, HAPE o addirittura HACE ad altitudini relativamente basse (3000mt) mentre altri soggetti possono scalare vette superiori ad 8000mt senza ausilio di ossigeno. Tale variabilità ha suggerito il possibile coinvolgimento di una componente genetica ed in particolare alcuni studi hanno focalizzato l'attenzione sui polimorfismi caratterizzanti l'enzima ACE. E' noto inoltre che l'ipossia determina un aumento dell'espressione di ACE e che l'utilizzo di farmaci ACE-inibitori, ovvero bloccanti i recettori per l'angiotensina II, determina un'attenuazione della risposta vasocostrittiva polmonare all'ipossia.

Numerosi studi riportano l'effetto dell'acclimatamento in alta quota sul metabolismo glucidico. In risposta ad un fattore di stress quale l'ipossia ipobarica d'alta quota, il metabolismo glucidico diventa soggetto al controllo dei due maggiori sistemi neurormonali: il sistema simpatico-surrenalico e l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene. Sia le catecolamine che il cortisolo, attraverso l'aumentata fuoriuscita di glucosio dal fegato e la diminuita entrata di glucosio nel muscolo, innalzano la concentrazione glicemica nel sangue, dove l'azione delle catecolamine, principalmente dell'epinefrina, è più veloce di quella del cortisolo. E' stato evidenziato che un soggiorno di 2 giorni a 4.550 m induce una marcata intolleranza al glucosio sia nei maschi che nelle femmine probabilmente riconducibile all'aumento del cortisolo plasmatico.

Gli studi eseguiti in alta quota hanno mostrato che l'omeostasi del glucosio è influenzata dall'ipossia, sia in modo acuto che dopo un'esposizione più prolungata. In risposta all'ipossia acuta (ore) la concentrazione plasmatica di glucosio a digiuno non cambia, ma aumenta dopo tre giorni di ipossia. Inoltre, dopo acclimatamento, la glicemia a digiuno è comparabile a quella rilevata a livello del mare. La concentrazione plasmatica di insulina aumenta durante l'esposizione ad ipossia ipobarica acuta e si normalizza solamente dopo 15-20 giorni di soggiorno ^{161,162}. L'aumento contemporaneo di glicemia ed insulinemia indica una resistenza insulinica che può essere localizzata sia nel fegato sia nei tessuti periferici (muscolo scheletrico e tessuto adiposo). Nel primo caso sarebbe favorita la produzione epatica di glucosio, nel secondo una diminuzione della clearance glicemica, in entrambi i casi come meccanismo compensatorio.

La leptina è un peptide prodotto dal tessuto adiposo in risposta all'assunzione di cibo, in grado di ridurre l'appetito. Come dimostrano numerosi studi condotti sia in quota sia in camera ipobarica, l'ipossia ha un effetto anoressizzante il quale potrebbe determinare l'inappetenza e la riduzione dell'introito calorico che si accompagnano all'AMS. In particolare è stato osservato che nei soggetti con calo dell'appetito in quota i livelli di leptina aumentano mentre rimangono invariati nei soggetti esposti ad ipossia ipobarica ma con appetito normale^{163,164}. Inoltre i soggetti con livelli aumentati di leptina sviluppavano AMS. Bisogna comunque sottolineare che la regolazione della leptina è legata anche a altri fattori quali il freddo e l'esercizio fisico. Un dato interessante è che i soggetti che soffrono della sindrome delle Apnee Ostruttive nel Sonno (OSAS) e che vanno incontro a importanti fenomeni di desaturazione notturna hanno alti livelli di leptina rispetto a obesi di pari peso ma non affetti da OSAS.

Infine, per quanto riguarda il peso corporeo, è noto che esso rimane stabile per tutto il periodo in cui esiste un bilancio fra introito calorico e dispendio energetico. L'introito calorico è controllato in modo tale che il nostro organismo possa mantenere stabile la quantità di energia disponibile. L'ipotalamo, che è la chiave di controllo di questo importante e complesso sistema, modifica l'introito calorico e la spesa energetica. Durante una condizione quale l'ipossia d'alta quota, molti fattori contribuiscono a modificare questo sistema.

Infatti risulta difficile se non impossibile mantenere il bilancio energetico durante l'esposizione cronica all'ipossia ipobarica ed il calo di peso è dovuto a varie cause fra cui le più importanti sono: l'aumento del dispendio energetico e la riduzione dell'introito calorico.

La riduzione dell'introito calorico è causata dal cambiamento del profilo dell'appetito, ma fra i meccanismi che appaiono coinvolti nella riduzione dell'appetito esistono delle sostanze che controllano la sazietà quali la leptina, la colecistochinina e le citochine, come già ricordato. Anche l'aumentato dispendio energetico a riposo può influenzare il bilancio energetico in senso negativo. Infatti, come è stato evidenziato da Butterfield, alla quota di 4300 m il metabolismo basale viene incrementato rispetto a quello misurato a livello mare^{165,166}. Tale fenomeno a riposo probabilmente è dovuto all'aumento della frequenza respiratoria in risposta all'ipossia ipobarica ed all'incremento dell'attività beta-adrenergica. Infatti, l'utilizzo di farmaci beta-bloccanti determina una riduzione del metabolismo basale.

Parecchi studi hanno dimostrato che il calo di peso appare proporzionale al tempo e alla quota raggiunti: 3% a 3000 m., 3-3,5% in 8 giorni a 4300 m., 5% in 5 settimane a 4000-7000 m. e 10% dopo 3 mesi a 5300-8000 m. Questo indica che il calo di peso è funzione sia dell'altitudine raggiunta che della durata dell'esposizione.

In particolare durante il soggiorno in alta quota si modifica la composizione corporea. Infatti, numerosi studi hanno evidenziato che il calo ponderale risulta essere prevalentemente a carico della massa grassa, anche se durante una esposizione prolungata, si verifica anche una riduzione della massa muscolare ¹⁶⁷.

La perdita di acqua durante l'esposizione all'alta quota non è maggiore di quella a livello mare in assenza di mal di montagna ¹⁶⁶. Anche se la ritenzione idrica in quota è correlata alla comparsa dell' AMS.

1.5.4 Patologie d'altitudine

L'esposizione all'ipossia ipobarica comporta il rischio di alcune complicazioni di carattere medico comuni a nativi, residenti e soggetti che si recano occasionalmente in alta quota. Alcuni di questi problemi sono di lieve entità, si risolvono spontaneamente nel corso di alcune ore o giorni e sono dipendenti dalla velocità ascensionale; altri sono invece di maggior gravità e costituiscono un serio pericolo per la vita ¹⁶⁸.

I quadri patologici di maggior rilevanza sono rappresentati da:

- Mal di montagna acuto: colpisce generalmente i frequentatori occasionali dell'alta quota e comprende forme di diversa gravità sostanzialmente riconducibili a tre sindromi distinte. Tali sindromi sono definite come segue: mal di montagna acuto (AMS – Acute Mountain Sickness), edema polmonare da alta quota (HAPE – High Altitude Pulmonary Edema), edema cerebrale da alta quota (HACE – High Altitude Cerebral Edema) ¹⁶⁹.
- Mal di montagna subacuto: è una forma di globale deterioramento fisico che colpisce chi sta molte settimane in quota ¹⁷⁰.
- Mal di montagna cronico: colpisce i residenti in alta quota oppure coloro che, per motivi di studio o sportivi, stazionano per tempi prolungati ad altissime quote ¹⁷⁰.

1.5.4.1 Mal di montagna acuto (AMS)

L' AMS è una sindrome neurologica dovuta all'ipossia, caratterizzata di sintomi aspecifici e quindi molto soggettiva. Insorge generalmente dopo rapide ascese a quote superiori ai 2500 metri e ha abitualmente un decorso favorevole risolvendosi spontaneamente con l'acclimatazione in pochi giorni. In alcuni casi tuttavia, se non

riconosciuta, può evolvere nelle forme più gravi di edema cerebrale e/o polmonare. Nelle Alpi, la prevalenza dell' AMS tra gli alpinisti varia dal 5-9% a 3000 m fino al 40-50% a 4559 m (Capanna Margherita). Nel Nepal, l' AMS colpisce il 50% dei trekkers che salgono camminando a quote oltre i 4000 metri in 5 o 6 giorni, mentre colpisce l'84% di quelli che raggiungono in aereo la quota di 3860 metri ¹⁷¹. L'AMS è caratterizzata da un gruppo di sintomi ad ampio spettro causati principalmente dall'ipossia, ma anche in minima parte dalla riduzione della pressione parziale di anidride carbonica secondaria alla iperventilazione che compare come adattamento fisiologico in quota ¹⁷².

I sintomi compaiono gradualmente, generalmente 6-12 ore dopo l'arrivo in quota per risolversi in 1- 3 giorni se si evita un'ulteriore salita. Talvolta l' AMS si manifesta più tardivamente, 1-2 giorni dopo l'arrivo. Uomini e donne sono colpiti in ugual misura. Esistono pochi dati sulla prevalenza dell'AMS nei ragazzi, ma sembrerebbe che essi non presentino un rischio maggiore rispetto agli adulti. Alcune persone presentano una maggior suscettibilità a sviluppare l' AMS. I segni e i sintomi sono cefalea, astenia e stanchezza, perdita dell'appetito, nausea e vomito, malessere, vertigini, difficoltà di concentrazione, sbadigli frequenti, attacchi d'ansia, insonnia e respiro periodico notturno, edemi periferici.

Fino ad alcuni anni fa si riteneva che l'AMS fosse dovuta ad una forma lieve di edema cerebrale. Le persone colpite da AMS, in conseguenza a variazioni circolatorie ed ormonali (in particolare associate al sistema renina-angiotensina-aldosterone) indotte dall'ipossia non compensata da meccanismi di adattamento, presentavano ritenzione idrica con una riduzione del volume delle urine (oliguria), aumento del passaggio dei liquidi dai vasi all'interstizio e ritenzione di sodio ed acqua. Ne conseguiva un accumulo di liquidi (edema) in distretti quali il cervello, i polmoni o anche la zona periorbitale o le estremità. A ciò contribuiva anche un incremento della permeabilità dell'endotelio, cioè del tessuto che costituisce la parete dei vasi sanguigni. Ipotesi più recenti suggeriscono invece che l'ipossia induca vasodilatazione dei vasi cerebrali e sia responsabile della cefalea, probabilmente attraverso l'attivazione del sistema trigeminovascolare. La somministrazione di agonisti della 5-idrossitriptamina sarebbe in grado di prevenire la sintomatologia dell'AMS. Le tecniche di risonanza magnetica utilizzate per studiare i soggetti colpiti da AMS dimostrano in tutti i soggetti colpiti da AMS un certo grado di rigonfiamento cerebrale, ma non consentono di differenziare tra un' iperemia indotta dalla vasodilatazione ed un edema cerebrale, questo ultimo peraltro escluso almeno

nelle prime 6-10 ore di esposizione all'ipossia. Inoltre, l'esame del liquido cefalorachidiano non evidenzia condizioni infiammatorie nè un aumento della permeabilità della barriera emato-encefalica.

L'AMS sembra dipendere principalmente dall'altitudine e dalla velocità di ascesa: infatti la salita e soprattutto la permanenza a quote elevate senza un' adeguata acclimatazione possono favorire la comparsa del mal di montagna e la probabilità che compaia è maggiore se si trascorre la notte in quota. Non è stato ancora chiarito quali siano i fattori predisponenti in soggetti sani. Verosimilmente caratteristiche individuali genetiche e anche presenza di infezioni intercorrenti. Di sicuro esistono dei fattori favorenti: tra questi il freddo e l'esercizio fisico eccessivo. E' importante sapere che l'allenamento e la capacità di performance al livello del mare non prevengono il mal di montagna ^{173,174}.

Prevenzione

E' importante salire lentamente senza affaticarsi troppo e coprirsi bene: il freddo ed uno sforzo fisico eccessivo favoriscono la comparsa di AMS. Se si prevede di trascorrere la notte sopra i 3000 metri, l'avvicinamento deve essere fatto il più possibile a piedi. Se si usano impianti di risalita, è opportuno non partire direttamente dalla pianura, ma programmare una notte a quota intermedia. Le persone suscettibili dovrebbero salire più lentamente, per favorire una migliore acclimatazione ¹⁷⁵.

E' importante alimentarsi adeguatamente (consigliata dieta leggera e ricca di carboidrati) e bere molti liquidi. Sconsigliato assumere alcolici e sedativi e fumare.

E' possibile una profilassi in soggetti sensibili con acetazolamide alla dose di 250 mg/die, iniziando 1-2 giorni prima dell'ascesa e continuando per 3-5 giorni. Gli effetti collaterali sono dati dalla comparsa saltuaria di parestesie periferiche (formicolii agli arti e al viso) e talora nausea e diarrea, oltre ad alterazione del gusto delle bevande gassate, ma il farmaco è in generale ben tollerato ^{176,177}.

Trattamento

Nei casi lievi il riposo ed il progressivo processo di acclimatazione consentono una regressione della sintomatologia in 1-2 giorni. Quando compaiono sintomi lievi bisogna fermarsi a quella quota fino a quando i sintomi non sono regrediti. In presenza di sintomi non bisogna mai proseguire l'ascensione in quota. I casi lievi-moderati possono essere trattati con acetazolamide alla dose di 250-500 mg/die, mentre il farmaco di scelta nei casi gravi o associati a HACE è il desametasone, il quale riduce significativamente i sintomi dell'AMS senza però modificare le alterazioni dell'organismo

in quota. Per tale ragione la discesa è imperativa e va immediatamente effettuata nei casi più gravi. Utile la somministrazione di ossigeno ^{178,179}.

1.5.4.2 Edema cerebrale acuto (HACE)

E' una sindrome neurologica rara ma molto grave e potenzialmente fatale. Si manifesta in genere inizialmente con i sintomi dell'AMS nelle 24-48 ore precedenti (ma non è obbligatorio), poi con cefalea resistente agli analgesici, ottundimento della coscienza, apatia, difficoltà a camminare per perdita della coordinazione dei movimenti (atassia), allucinazioni, disturbi del giudizio, mancanza di appetito, nausea e, meno frequentemente, vomito. Se non riconosciuta tempestivamente nel giro di 12 ore questa patologia può evolvere in uno scompenso ipossico cerebrale con stato confusionale, sonnolenza e coma. Generalmente si verifica un aumento della temperatura corporea (> 38°C). Talvolta è presente anche il quadro dell' HAPE.

L' HACE è raro sotto i 4000 metri (0.001% a quote inferiori a 2500 metri) mentre ha una prevalenza dello 0.5-1.5% tra i 4000 e i 5000 metri. I primi disturbi a comparire sono anche gli ultimi a scomparire, perciò una vittima di HACE può rimanere atassica per un po' di tempo, anche dopo trattamento ¹⁸⁰. L' HACE sembra essere causato da edema cerebrale di origine vasogena, cioè causato da vasodilatazione cerebrale, che avverrebbe soprattutto a livello dell'ipotalamo, con perdita dei meccanismi di autoregolazione vascolare, rottura della barriera emato-encefalica ed aumento della permeabilità sangue-cervello. Anche in questa situazione si verificherebbe un alterato riassorbimento di sali per disfunzione dei meccanismi di passaggio del sodio. Di conseguenza si osserva un aumento della pressione del liquido cefalo-rachidiano. Studi eseguiti mediante risonanza magnetica in soggetti con HACE hanno evidenziato come reperto morfologico specifico, micro-emorragie da distruzione della barriera emato-encefalica con depositi di emosiderina nel tessuto cerebrale ¹⁸¹. L'edema vasogenico probabilmente avviene quale conseguenza di una combinazione di vari fattori. L'aumento della pressione cerebrale capillare induce una perdita del controllo del tono vascolare ed un'alterazione della permeabilità attraverso la liberazione di mediatori chimici indotta dall'ipossia (bradichinine, istamina, ossido nitrico, acido arachidonico e fattori di crescita vascolare endoteliale) ^{172, 182}.

Prevenzione

Per la prevenzione dell'HACE, valgono le norme comportamentali e farmacologiche già illustrate per la prevenzione dell'AMS.

Trattamento

Trattandosi di una condizione generalmente fatale, è necessario un trattamento tempestivo, anche solo nel sospetto clinico, che consiste nella rapida discesa a quote inferiori, se possibile con evacuazione mediante elicottero, somministrazione di ossigeno durante il trasporto, eventualmente a pressione positiva, e terapia farmacologica con desametasone intramuscolo o endovena ad alte dosi. Il sacco iperbarico può essere un utile presidio temporaneo ¹⁸².

1.5.4.3 Edema polmonare acuto (HAPE)

L'HAPE è una complicanza che può manifestarsi a quote superiori a 3500-4000 metri, dopo una salita rapida in soggetti non acclimatati. La prevalenza nella popolazione generale di alpinisti è inferiore allo 0.2% se si sale lentamente ma è del 6% con una salita rapida a 4500 metri. Negli individui suscettibili che salgono rapidamente in alta quota la prevalenza risulta essere del 60-70%. L' HAPE può colpire a quote più basse anche individui non suscettibili durante o subito dopo una malattia infettiva respiratoria. Inoltre può capitare in abitanti in alta quota al ritorno dopo un soggiorno a quote inferiori (il cosiddetto "HAPE da ritorno"). Colpisce maggiormente gli uomini rispetto alle donne ed è spesso associata ad uno sforzo. L'edema polmonare acuto si può manifestare alcuni giorni dopo l'arrivo, da 1 a 4 mediamente. ¹⁶⁹ La forma polmonare può essere isolata o associata alla forma neurologica (HACE). E' spesso preceduta da AMS in vari stadi di gravità. Si manifesta con dispnea (mancanza di fiato) anche a riposo e ridotta tolleranza allo sforzo, maggiore di quanto ci si aspetterebbe a quella quota. Quando insorge durante la notte, obbliga il soggetto colpito alla posizione seduta. Il respiro si fa molto frequente e "rumoroso" per la presenza di liquido negli alveoli polmonari e può anche comparire emissione di escreato screziato di sangue. Altri sintomi e segni della malattia sono: costrizione toracica, astenia, cefalea, perdita di appetito, nausea, vomito, tosse stizzosa, tachicardia, iperventilazione, cute pallida e fredda, labbra cianotiche. Spesso compare febbre, raramente superiore a 38.3°C. Si verificano confusione, delirio, coma, può avere esito fatale in breve tempo. L'inizio può essere subdolo, diagnosticabile solo con la radiografia del torace. Da notare, comunque, come la tosse stizzosa possa essere frequente in quota (secchezza ambientale, minor umidità) e non essere dovuta ad una fase iniziale di HAPE ¹⁸³.

Il meccanismo principale dello sviluppo di HAPE sembra essere l'aumento della pressione arteriosa polmonare (da circa 20 mmHg a 70 mmHg, valore molto più elevato

rispetto all'incremento massimo che avviene in quota -circa 35 mmHg - in chi non sviluppa la patologia) per eccessiva vasocostrizione dei vasi polmonari. Sembra che la vasocostrizione avvenga inoltre in maniera disomogenea, creando una perfusione polmonare regionalmente disomogenea durante ipossia nei soggetti colpiti dall'HAPE. L'ipertensione polmonare causerebbe rottura da stress dei capillari sovradistesi, stravasamento di liquidi nell'interstizio del polmone con edema inizialmente interstiziale poi alveolare. Sembra inoltre esservi un'ulteriore causa individuata nel meccanismo di trasporto del sodio. Certamente una disfunzione endoteliale dei vasi gioca un ruolo importante nella genesi della risposta ipertensiva polmonare alla ipossia, attraverso la sintesi esagerata di fattori vasocostrittori (endoteline) e quella ridotta di sostanze vasodilatatrici, così come una iperattività simpatica¹⁸⁴.

L' HAPE è più frequente in chi è già stato colpito precedentemente, verosimilmente per la presenza di una predisposizione individuale anatomico-funzionale. Probabilmente il meccanismo di predisposizione coinvolge un'alterata produzione dell'ossido nitrico endogeno, poiché gli individui suscettibili presentano più bassi livelli di ossido nitrico nell'aria espirata in condizioni di ipossia.

Prevenzione

Ascesa rapida e permanenza in quota sono situazioni favorevoli all'insorgenza della patologia. Quindi, anche per la prevenzione dell'HAPE, valgono le norme comportamentali e farmacologiche già illustrate per la prevenzione dell'AMS. Nei soggetti suscettibili ad HAPE (già colpiti dalla sindrome in precedente occasione) è consigliata una salita in quota lenta, 300 metri al giorno sopra i 2000 metri. Inoltre si può utilizzare la nifedipina come premedicazione dal giorno precedente la salita, eventualmente associata all' acetazolamide (500 mg/die).

Trattamento

Nel caso la patologia predominante del mal di montagna sia l'edema polmonare, il trattamento si basa sull'uso di farmaci in grado di ridurre la pressione polmonare mediante un meccanismo di vasodilatazione arteriosa, quali la nifedipina o il tadalafil, eventualmente associati al desametasone, come per il trattamento dell'HACE^{179,185}. Anche in questo caso, trattandosi di un'emergenza, si deve somministrare ossigeno ed organizzare una rapida discesa. Il sacco iperbarico può essere molto utile anche in questa occasione, con erogazione di O₂ nell'attesa comunque di scendere a quote più basse¹⁸⁶.

1.5.4.4 Mal di montagna subacuto

E' una forma di globale deterioramento fisico che colpisce soggetti residenti a bassa quota che si trasferiscono in quota per periodi lunghi (settimane o mesi). Negli ultimi anni sono state descritte due differenti sindromi negli uomini, la forma "adulta" e la forma "infantile".

La forma "infantile" è causata dall' ipertensione polmonare persistente dovuta alla bassa concentrazione di O₂ nell'aria. All' iniziale vasocostrizione ipossica dei vasi sanguigni polmonari, fa seguito successivamente una grave malattia vascolare polmonare, che comunque rimane reversibile alla rimozione dell'ipossia. E' stata dimostrata una suscettibilità individuale e di razza. I Tibetani e i Ladakhi sono i più adattati, le popolazioni andine Quechua presentano una risposta intermedia all'ipossia, mentre la popolazione Han risulta la più esposta. La sindrome è caratterizzata da difficoltà respiratoria, cianosi, difficoltà ad alimentarsi, letargia, sudorazione eccessiva, Nello stadio più avanzato della malattia compaiono sintomi di scompenso cardiaco destro.

La forma "adulta" presenta un inizio subdolo con progressiva mancanza di respiro e gonfiore (edema) periferico. Dopo circa 10 giorni, la malattia appare evidente caratterizzata da edemi periferici imponenti, ascite, insonnia, incapacità a sostenere fatica fisica, perdita di appetito fino all'anoressia e al deperimento organico, depressione, amnesie, irritabilità, cefalea nucale, dolore articolare e/o alle estremità. La sola ipertensione polmonare (come nel caso del bambino) non sembra essere in grado di spiegare il quadro clinico. Probabilmente entrano in gioco, oltre ad una suscettibilità individuale, anche una disfunzione miocardica, problemi renali e neuroendocrini.

La terapia consiste nel prevedere discese periodiche a quote inferiori, un adeguato acclimatamento precedente, eventuali cicli di ossigeno-terapia, dieta e apporto di liquidi adeguati, eventuale terapia farmacologia con analgesici ed ipnotici per favorire il ritmo sonno-veglia¹⁷².

1.5.4.5 Mal di montagna cronico (CMS)

Circa 140 milioni di persone vivono permanentemente a quote superiori a 2500 metri, nel continente nord,centro e sudamericano, in Africa orientale ed in Asia. In conseguenza dell'ambiente ipossico, i residenti sviluppano numerose risposte fisiologiche di adattamento, in particolare un aumento della concentrazione dell'emoglobina per aumento della produzione di globuli rossi nel sangue ed un aumento della pressione nell' arteria polmonare, situazioni entrambe potenzialmente

fatali per l'individuo. Questi due aspetti dell'adattamento cronico dell'individuo alla quota identificano le principali caratteristiche cliniche del mal di montagna cronico o malattia di Monge. Tale patologia colpisce residenti ad alta quota, soprattutto se non facenti parte di etnie con caratteristiche genetiche favorevoli. Si verifica un controllo anomalo della respirazione, cianosi delle labbra e delle estremità con scarsa capacità fisica. Predominano generalmente i sintomi neuropsichici quali cefalea, scarsa concentrazione, vertigini, sonnolenza e depressione mentale. Caratteristica è anche un'eccessiva sudorazione. Si osserva un vero e proprio deterioramento fisico, con cambiamenti strutturali e funzionali del muscolo cardiaco e scheletrico, con perdita di massa muscolare, riduzione della capacità contrattile cardiaca e della capacità di prestazione, riduzione delle capacità metaboliche.

Il quadro clinico del CMS scompare gradualmente dopo la discesa a quote inferiori, per rimanifestarsi al ritorno in alta quota ¹⁷².

1.5.5 Farmaci antiipertensivi

1.5.5.1 Sistema renina-angiotensina

Il sistema renina-angiotensina ha un ruolo importante nella regolazione della pressione arteriosa sia a breve sia a lungo termine. L'attivazione del rilascio di renina da parte del rene è provocato da fattori che riducono la pressione, tra cui diminuzioni della volemia effettiva.

La renina è un enzima che agisce sull'angiotensinogeno catalizzando la formazione di un decapeptide, l'angiotensina I. Questa molecola è successivamente scissa dall'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE, Angiotensin Converting Enzyme) nell'octapeptide Angiotensina II. L'angiotensina II esercita la sua attività mediante meccanismi finalizzati a riportare la pressione arteriosa verso valori normali. In particolare può agire determinando un aumento delle resistenze periferiche e regolando a breve termine la pressione. Inoltre può inibire l'escrezione renale di sodio e acqua ¹⁸⁷. Le modificazioni sulla funzionalità renale indotte dall'angiotensina II rivestono un ruolo importante nella stabilizzazione a lungo termine della pressione arteriosa in rapporto alle oscillazioni relative all'assunzione di sodio con la dieta.

Numerosi farmaci antiipertensivi esplicano la loro azione agendo sul sistema renina-angiotensina. Fra questi ricordiamo: farmaci inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina, antagonisti del recettore dell'angiotensina II, inibitori della renina,

Altri farmaci antiipertensivi sono invece: diuretici, simpaticolitici, vasodilatatori e calcio-antagonisti.

1.5.5.2 Farmaci antagonisti del recettore dell'angiotensina II

Il primo farmaco appartenente a questa categoria fu il Losartan, approvato nel 1995 dall'FDA. Ad oggi sono cinque le molecole approvate dall'FDA e commercializzate ad uso antiipertensivo: Candesartan, Ibesartan, Valsartan, Eprosartan e Telmisartan.

Dal punto di vista farmacologico queste molecole si legano al recettore con un'elevata affinità e selettività (10000 volte > per il recettore AT₁ rispetto ad AT₂). In questa maniera esse inibiscono in modo potente e selettivo gli effetti dell'angiotensina II fra cui: la contrazione delle cellule muscolari lisce, le risposte pressorie rapide, le risposte pressorie a lenta insorgenza, il rilascio di vasopressina, la secrezione di aldosterone, il rilascio di catecolamine dal surrene, lo stimolo alla trasmissione noradrenergica, l'aumento del tono simpatico, le variazioni della funzione renale, l'ipertrofia e l'iperplasia cellulare. In particolare queste molecole riducono l'attivazione dei recettori AT₁ inibendo gli effetti dell'angiotensina II, indipendentemente rispetto alla via che porta alla sintesi della stessa (per biosintesi dall'angiotensina I e via alternativa non ACE dipendente). Inoltre attivano indirettamente i recettori AT₂ e stimolano il rilascio di renina, che porta ad un aumento significativo dei livelli di angiotensina II.

Il Telmisartan presenta un'emivita di 24 ore ed un picco plasmatico circa 30-60 minuti dopo l'assunzione del farmaco per via orale. Viene eliminato dal torrente circolatorio soprattutto attraverso secrezione biliare e la sua clearance è influenzata dall'insufficienza epatica, ma non da quella renale. La dose consigliata per il trattamento di un paziente affetto da ipertensione è di 40-80 mg/die ¹⁸⁸.

SPETTROMETRIA DI MASSA IMAGING

La Spettrometria di Massa Imaging basata sulla ionizzazione MALDI (MALDI-IMS) permette di analizzare componenti sia endogeni che esogeni presenti nei tessuti, mantenendo nel contempo la loro orientazione spaziale¹⁸⁹. Tale tecnologia consente di analizzare una sezione intatta di tessuto e di correlare le informazioni relative alla composizione molecolare con la localizzazione spaziale per ogni molecola rilevata^{8,190}. Con questa tecnica l'integrità tissutale è mantenuta e, quindi, è possibile localizzare specificamente le molecole direttamente nel tessuto ed analizzare regioni di interesse. La tecnologia MALDI, inoltre, consente di acquisire gli spettri di massa molto rapidamente, i più recenti spettrometri sono in grado infatti di acquisire circa 1000 spettri al secondo.

A tal fine, i campioni di tessuto da analizzare vengono congelati e tagliati mediante l'utilizzo di un criostato in sezioni molto sottili (5-20 μm), che vengono singolarmente incollate mediante essiccazione sulla superficie di appositi vetrini conduttivi.

Per effettuare l'analisi in spettrometria di massa la matrice viene depositata sulla sezione di interesse ed il campione è quindi pronto per l'analisi (Fig. 1.17).

La IMS è stata largamente applicata allo studio delle proteine e, a differenza delle tradizionali tecnologie proteomiche, consente di mantenere integro il tessuto di interesse, quindi di localizzare le proteine di interesse all'interno del tessuto e di correlare i risultati con l'analisi istologica.

Esistono fondamentalmente due protocolli sperimentali per questa tecnologia: profiling ed imaging, a seconda del livello di risoluzione spaziale che si vuole ottenere.

Il profiling consiste nell'analizzare aree discrete del tessuto in esame e sottoporre i profili proteici ottenuti ad analisi biostatistica. Solitamente si utilizzano 5-20 spot di matrice, ognuno dal diametro approssimativo di 0.5 – 1.0 mm. Questi esperimenti sono pensati per effettuare una comparazione tra due o più gruppi, per esempio tessuto normale-patologico o controllo-trattato, in sezioni relativamente omogenee. Vengono perciò utilizzati un elevato numero di campioni per avere una significatività statistica ed algoritmi sofisticati per il data mining e la classificazione dei tessuti¹⁹¹⁻¹⁹³.

La tecnica denominata imaging, invece, richiede l'analisi di tutto il campione secondo uno schema ordinato. Gli spettri di massa vengono acquisiti ad intervalli ben precisi, che definiscono la risoluzione dell'immagine finale (per esempio ogni 50 μm sia sull'asse x che sull'asse y). Si può così ottenere una mappa bidimensionale dell'intensità di ogni singolo ione in funzione delle sue coordinate x-y, in modo da poter velocemente rilevare differenze nell'espressione o nella localizzazione di un

peptide/proteina all'interno dello stesso tessuto o di tessuti diversi¹⁹⁴⁻¹⁹⁵. L'applicazione della IMS allo studio delle proteine presenta numerosi vantaggi fra cui la capacità di misurare la massa di proteine intatte con elevata accuratezza, la capacità di individuare le proteine nel loro stato biologico nativo rilevandone anche le modificazioni post-traduzionali, la capacità di localizzare le proteine direttamente nel tessuto di interesse generando un'informazione specifica e definendone la localizzazione. Infine, permette di ottenere informazioni con elevata sensibilità sotto i 20 kDa.

E' importante tuttavia sottolineare che la IMS è stata applicata anche allo studio di altre molecole, quali farmaci¹⁹⁶⁻¹⁹⁸, lipidi¹⁹⁹, proteine sottoposte a digestione enzimatica²⁰⁰ oltre che a proteine intatte²⁰¹⁻²⁰⁴.

La spettrometria di massa imaging è una tecnologia relativamente recente, nasce nel laboratorio del Professor Caprioli intorno al 1997²⁰⁵.

Nonostante siano trascorsi più di dieci anni dalle prime pubblicazioni l'ottimizzazione dei protocolli e delle metodiche rimane ancora una sfida importante. La preparazione del campione per l'analisi imaging infatti consiste di numerosi step e l'ottimizzazione delle varie procedure (taglio del campione, trattamento e lavaggio, deposizione della matrice) deve essere specificatamente mirata al tessuto di interesse. Ogni tessuto infatti presenta una composizione molecolare ed una struttura caratteristiche, che devono essere considerate attentamente per effettuare correttamente l'analisi di imaging. Inoltre, la IMS richiede supporti informatici e tecnologie che si sono sviluppate solamente negli ultimissimi anni, limitandone parzialmente l'applicazione. Lo sviluppo di computer in grado di processare dati importanti (centinaia di Gigabytes) e di strumentazioni in grado di effettuare analisi molto veloci (laser con frequenze pari a 1000 Hz) è infatti recentissimo.

Tali potenziamenti tecnologici hanno permesso di migliorare sensibilmente il workflow della IMS, di rendere più robuste le analisi, di migliorare la qualità delle immagini, la modalità di deposizione della matrice, l'acquisizione e le fasi di processing dei dati.

Per quanto concerne la deposizione della matrice per esempio, il primo prototipo di spotter automatizzato era limitato da una risoluzione spaziale di 200 µm. Attualmente sono disponibili spotter che raggiungono una risoluzione spaziale di 150 µm con tempi di deposizione molto brevi. Recentemente è stato proposto un metodo di deposizione automatizzata della matrice che genera gocce di piccole dimensioni mediante uno spray vibrazionale. Questo strumento permette di controllare anche l'umidità ed il tempo di asciugatura della matrice (per evitare la delocalizzazione degli analiti di interesse)²⁰⁶. E'

inoltre possibile deporre la matrice sul tessuto mediante sublimazione, creando in meno di 10 minuti un layer estremamente omogeneo con cristalli di dimensioni inferiori al micron ²⁰⁷. Questa tecnica permette di ottenere immagini con risoluzione spaziale limitata solamente dal diametro del laser utilizzato (attualmente 30 μm per laser Nd:YAG). Sebbene la sublimazione sia stata riportata soprattutto per l'analisi di lipidi endogeni è possibile estendere l'analisi a molecole di massa superiore se si effettua una reidratazione del layer.

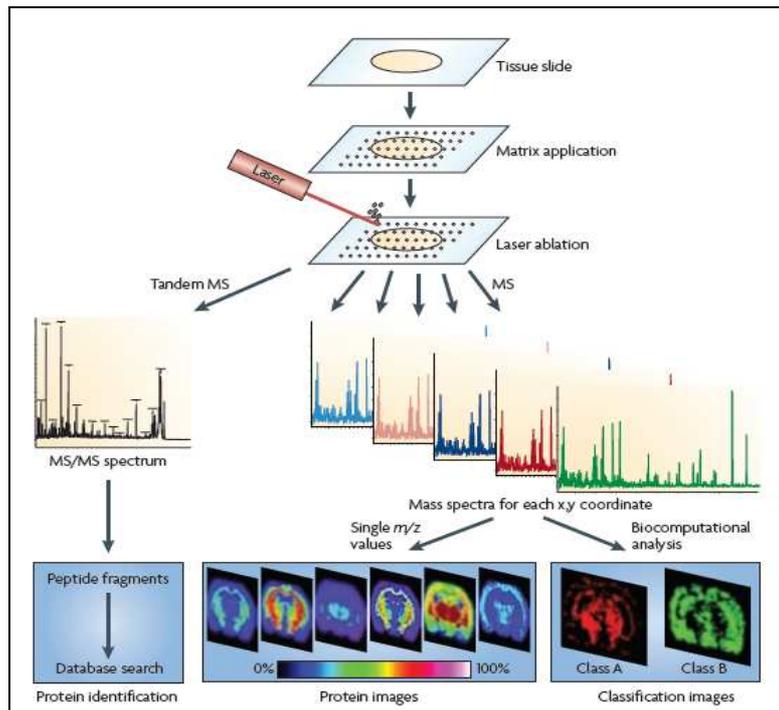


Fig. 1.17: Procedura per un esperimento MALDI-IMS. La sezione di tessuto di interesse viene preparata al criostato e posta su di un target apposito per l'analisi in MALDI. La matrice viene applicata sulla superficie del tessuto in relazione alla risoluzione spaziale necessaria. Gli spettri di massa sono ottenuti da ogni spot di matrice o dall'intera sezione e possono essere utilizzati per definire pattern discriminatori fra due classi di interesse o processati per creare immagini bidimensionali di ioni specifici. (Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nat Rev. Cancer, 10(9): 640, copyright 2010)

L'analisi delle proteine mediante IMS è sempre stata limitata dall'utilizzo dei laser ad azoto, che presentavano una frequenza di acquisizione di 20-50Hz per un massimo di 20 milioni di spari. I nuovi laser Nd:YAG raggiungono invece frequenze pari a 1kHz per più di un bilione di spari generando spettri di massa di elevata qualità. Attualmente sono anche presenti dei prototipi con frequenza laser pari a 5kHz.

Gli avanzamenti tecnologici nel campo informatico sono stati ugualmente rapidi ed interessanti. Attualmente sono disponibili software ed hardware in grado di integrare il processing degli spettri con la visualizzazione ed il processing delle immagini derivate dalle analisi IMS.

Tali avanzamenti tecnologici hanno permesso di migliorare sensibilmente la qualità e la rapidità delle analisi IMS.

Nonostante le limitazioni strumentali ed informatiche la IMS ha permesso di ottenere risultati importanti in molteplici campi già da parecchi anni. Per esempio sono stati ottenuti risultati incoraggianti, relativi all'applicazione della tecnologia IMS, a scopo diagnostico per la definizione di pattern molecolari volti a differenziare diversi tumori e sottotipi tumorali nel carcinoma prostatico²⁰⁸, ovarico²⁰⁹ e polmonare²¹⁰. In tali studi, proteine caratteristiche di diversi tipi o sottotipi tumorali sono state identificate ed in seguito validate mediante analisi di immunohistochimica e/o western blot, ed hanno portato ad un sensibile miglioramento dell'accuratezza diagnostica. Alcune ricerche effettuate con IMS per lo studio di tessuti provenienti da pazienti affetti da carcinoma polmonare²¹¹ e glioma²¹², hanno permesso inoltre di stratificare i pazienti con prognosi favorevole o sfavorevole con elevata accuratezza (>92%). Infine, è stato possibile identificare marcatori correlati con la risposta del paziente ad un determinato regime terapeutico in studi relativi al carcinoma mammario, in risposta al trattamento con paclitaxel nell'uomo²¹³, e con erlotinib e/o trastuzumab sul modello animale²¹⁴.

SCOPO DELLA TESI

La proteomica clinica è un campo di ricerca in espansione. Le tecnologie ad oggi disponibili permettono di investigare le proteine nei fluidi biologici e nei tessuti a scopo diagnostico, prognostico, terapeutico ed allo scopo di approfondire e chiarire i meccanismi patogenetici associati ad una specifica malattia.

Scopo del lavoro di ricerca è quello di valutare l'applicazione di diversi approcci proteomici allo studio di fluidi biologici e tessuti con diversi obiettivi.

In particolare il lavoro di ricerca si è sviluppato intorno a tre tematiche:

A- Rottura prematura pretermine delle membrane amniocoriali: il fluido amniotico riflette direttamente la condizione fetale e rappresenta quindi il fluido ideale per la valutazione di alcune patologie della gravidanza, in particolar modo quelle in cui l'ambiente intrauterino e l'interfaccia materno-fetale sono coinvolti nella patogenesi. Per questo motivo è stato raccolto il fluido amniotico di pazienti sottoposte ad amniocentesi genetica e di pazienti affette da rottura prematura e rottura prematura pretermine delle membrane amniocoriali (PROM e pPROM). Scopo di questa parte di lavoro è stata la ricerca di peptidi e/o proteine la cui diversa espressione permetta di separare le tre classi sulla base dell'analisi del profilo proteico ottenuto. Inoltre, si è cercato di identificare le proteine maggiormente espresse nel gruppo delle pPROM per la loro valutazione quali possibili marcatori di questa patologia o delle sue complicanze.

B- Ipossia ipobarica in alta quota: Lo studio HIGHCaRe (HIGH altitude Cardiovascular Research) è stato condotto con lo scopo di valutare gli effetti cardiorespiratori, metabolici, ematologici e neurologici dell'ipossia ipobarica prolungata in alta quota e l'efficacia di interventi correttivi farmacologici e non farmacologici. L'esposizione all'ipossia ipobarica in alta quota è una condizione particolarmente interessante, non solo perché permette di comprendere meglio i meccanismi che regolano l'adattamento all'alta quota e l'eziopatogenesi del male acuto di montagna (AMS), ma anche perché rappresenta un modello per esplorare la fisiopatologia di alcune malattie connesse con l'ipossia tissutale quali lo scompenso cardiaco, la malattia polmonare ostruttiva cronica, l'ipertensione associata alla sindrome delle apnee notturne e l'obesità severa e per provare alcuni trattamenti terapeutici utili a curarle. Questo richiede strategie di trattamento farmacologico e non farmacologico che potrebbero essere

applicate non solo per contrastare i sintomi legati all'AMS ma anche per curare alcune patologie croniche associate all'ipossiemia. In particolare il sistema renina-angiotensina-aldosterone è coinvolto nella patogenesi di numerose malattie cardiovascolari ed i farmaci che interagiscono con questo sistema, soprattutto quelli che agiscono mediante blocco dei recettori dell'angiotensina, potrebbero risultare vantaggiosi in queste condizioni. Scopo di questa ricerca è di esplorare il proteoma urinario al fine di valutare la presenza di peptidi e/o proteine la cui espressione risulti alterata nelle urine degli stessi soggetti esposti a diverse altitudini e pressioni parziali di ossigeno: bassa quota (140 mt slm, pressione $O_2 \approx 150$ mmHg, pressione barometrica ≈ 750 mmHg), alta quota (3400 mt slm, pressione $O_2 \approx 110$ mmHg, pressione barometrica ≈ 500 mmHg) ed altissima quota (5400 mt slm, pressione $O_2 \approx 80$ mmHg, pressione barometrica ≈ 380 mmHg). In questo lavoro si riportano i risultati ottenuti dall'analisi proteomica delle urine raccolte dai soggetti arruolati in questo studio. Inoltre, si valutano gli effetti del blocco selettivo del recettore AT1 dell'angiotensina II, per opera del trattamento con farmaco telmisartan, sul proteoma urinario.

C- Spettrometria di massa imaging: la spettrometria di massa imaging è una tecnologia relativamente recente la cui applicazione allo studio delle proteine presenta numerosi vantaggi fra cui la capacità di misurare la massa di proteine intatte con elevata accuratezza, di individuare le proteine nel loro stato biologico nativo rilevandone anche le modificazioni post-traduzionali, di localizzare le proteine direttamente nel tessuto di interesse generando un'informazione specifica e definendone la localizzazione ed, infine, di ottenere informazioni con elevata sensibilità sotto i 20 kDa. Nonostante siano trascorsi più di dieci anni dalle prime pubblicazioni l'ottimizzazione dei protocolli e delle metodiche rimane ancora una sfida importante. La preparazione del campione per l'analisi imaging infatti consiste di numerosi passaggi e l'ottimizzazione delle varie procedure deve essere specificatamente mirata al tessuto di interesse. Ogni tessuto infatti presenta una composizione molecolare ed una struttura caratteristiche, che devono essere considerate attentamente per effettuare correttamente l'analisi imaging. Scopo del lavoro di ricerca è valutare l'utilizzo di detergenti al fine di migliorare la sensibilità dell'analisi IMS applicata allo studio di proteine.

MATERIALI E METODI

3.1 Rottura prematura pretermine delle membrane amniocoriali

3.1.1 Popolazione in studio

Lo studio è stato condotto su donne con gravidanza singola ammesse alla Clinica Ostetrica e Ginecologica dell'Ospedale San Gerardo di Monza con diagnosi di pPROM (< 37 settimane di età gestazionale, EG, gruppo 1) e PROM a termine fuori travaglio (gruppo 2, > 37 settimane EG). E' stato inoltre selezionato un gruppo controllo di pazienti con gravidanza fisiologica, che sono state sottoposte ad amniocentesi genetica su indicazione di età materna (<16 settimane EG, gruppo 3). I criteri di inclusione ed esclusione dallo studio sono riportati in tabella 3.1.

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell' Azienda Ospedaliera San Gerardo di Monza. Tutte le donne incluse nello studio hanno sottoscritto un consenso informato.

GRUPPO	CRITERI DI INCLUSIONE	CRITERI DI ESCLUSIONE
pPROM	- pazienti con pPROM < 37 settimane EG	- pazienti che espletano il parto prima della raccolta del liquido - gravidanza multipla, malformazioni fetali gravi, aneuploidia fetale - sanguinamento vaginale
PROM	- pazienti con PROM > 37 settimane EG	- pazienti in cui si ponga diagnosi di travaglio di parto con l'ausilio di criteri clinici sulle caratteristiche della cervice e con la valutazione della presenza di contrazioni uterine regolari - gravidanza multipla, liquido amniotico tinto di meconio, malformazioni fetali gravi, aneuploidia fetale, malformazioni uterine, perdite ematiche.
AMNIOCENTESI	- pazienti sottoposte ad amniocentesi genetica fra la 16a e la 18a settimana di EG	- gravidanza multipla - gravidanza con presenza di malformazioni fetali - gravidanza con sospetto di infezione a trasmissione materno-fetale

Tab. 3.1: Criteri di inclusione ed esclusione utilizzati per lo studio.

3.1.2 Procedure operative per la raccolta dei campioni

Sono stati prelevati campioni di liquido amniotico di 35 pazienti ammesse alla Clinica Ostetrica e Ginecologica dell'Ospedale San Gerardo di Monza (gruppo 1, pPROM = 10 pazienti; gruppo 2, PROM = 9 pazienti; gruppo 3, amniocentesi = 16 pazienti).

Nei gruppi 1 e 2 sono stati prelevati almeno 2 ml di liquido amniotico dal fornice vaginale posteriore dopo posizionamento di speculum sterile, con l'ausilio di una siringa da 20 ml su cui sia innestato un catetere vescicale (Nelaton) 14 CH tagliato alla lunghezza di circa 15 cm. Il liquido raccolto è stato in seguito trasferito in provetta Gravindex.

Per evitare la contaminazione del campione di liquido amniotico lo speculum è stato inserito senza usare gel ed è stata evitata l'esplorazione vaginale digitale, peraltro controindicata in questa categoria di pazienti, almeno fino all'insorgenza, vera o sospetta, del travaglio. Nel gruppo 3 invece, il liquido è raccolto sterilmente dalla cavità uterina con procedura di amniocentesi transaddominale eco-guidata. Dai 20 ml di liquido amniotico raccolti in corso di amniocentesi sono separati 2 ml per l'esecuzione delle analisi proteomiche.

Entro mezz'ora dalla procedura di raccolta tutti i campioni sono stati centrifugati a 2000 rpm per dieci minuti a temperatura ambiente per rimuovere i detriti cellulari. Il surnatante è stato suddiviso in 5 aliquote contenenti almeno 100 µl ciascuna, stoccate in microprovette Eppendorf da 0,5 ml e in 2 aliquote da almeno 1 ml stoccate in microprovette Eppendorf da 1,5 ml. Tutte le aliquote sono state congelate a -80°C e conservate presso L'Unità Operativa di Ostetricia dell'Ospedale San Gerardo di Monza fino al momento dell'analisi, che è stata invece effettuata presso il Dipartimento di Medicina Sperimentale dell'Università degli Studi di Milano-Bicocca. I campioni sono stati trasferiti da una struttura all'altra in ghiaccio secco.

3.1.3 Materiali

Tutte le soluzioni acquose per l'analisi ClinProt/MALDI-TOF sono state preparate utilizzando acqua deionizzata presente nel Profiling kit MB-HIC C8 (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany).

- Metanolo, CH₃OH (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA).
- Acetonitrile, CH₃CN (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

- Soluzione di matrice 6,2 g/L 4-HCCA (4-Hydroxy- α -cyanocinnamic acid, Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany) in Metanolo/Acetonitrile/H₂O 50:40:10.
- Biglie Magnetiche MB-HIC C8 (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany).
- MB-HIC binding solution presente nel kit (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany).
- MB-HIC wash solution presente nel kit (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany).
- Elution Solution (Acetonitrile/ H₂O 50:50).
- Protein mix 1 (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany) in 0,1% TFA.
- MTP 384 target plate ground steel F (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany).
- Tutte le soluzioni acquose per l'analisi LC-ESI-MS/MS sono state preparate utilizzando H₂O CHROMASOLV Plus per HPLC (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA).
- Soluzione acquosa 0,1% di TFA (acido trifluoroacetico, Fluka Chemie, Buchs, Switzerland).
- Soluzione acquosa 0,01% HCOOH (acido formico, Carlo Erba, Milan, Italy).
- Soluzione acquosa 0,05% di HCOOH.
- Soluzione Acetonitrile/ H₂O 80:20 con 0,05% di HCOOH.

3.1.4 Strumenti

- Clin Prot Robot TM (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany).
- Spettrometro di massa MALDI-TOF Reflex IV TM (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany).
- Spettrometro di massa Esquire 3000 Plus (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany).
- HPLC Ultimate 3000 (Dionex Corporation, Sunnyvale, California, USA).
- Vortex (Apparecchi Scientifici E. Pasquali, Milano, Italy).
- Centrifuga Mini Spin (Eppendorf, Hamburg, Germany).
- Centrifuga da vuoto HETOVAC VR-I (Heto Lab. Equipment, Allerod, Denmark).
- Bilancia Gibertini E42-B.
- Sonicatore Branson 2510.

3.1.5 Software

- FlexControl TM 1.1 (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany) per il controllo dello Spettrometro di Massa MALDI-TOF.
- FlexAnalysis TM 2.4 (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany) per l'elaborazione degli spettri acquisiti al MALDI-TOF.

- ClinProTools TM 2.1 (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany) per l'indagine statistica degli spettri e la visualizzazione delle differenze.
- Clin Prot Robot TM software (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany) per l'impostazione della preparazione dei campioni da parte del robot.
- DataAnalysis TM 3.0 (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany) per l'elaborazione degli spettri ottenuti dallo Spettrometro Esquire 3000 Plus.
- Esquire Control TM 5.3 (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany) per la gestione dello Spettrometro di Massa Esquire 300 Plus.
- Data Analysis TM 3.3 (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany) per l'elaborazione dei dati ottenuti dall' analisi μ HPLC-ESI MS/MS
- Biotools TM 3.0 (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany) per effettuare le ricerche in banca dati.
- Chromeleon 6.80 SP2 Build 2280 (Dionex Corporation 1228, Titan Way, Sunnyvale, CA 94085, USA) per la gestione della strumentazione HPLC.

3.1.6 Metodi

I campioni di liquido amniotico sono stati preparati mediante tecnologia ClinProt con biglie magnetiche ad interazione idrofobica (MB-HIC C8) e successivamente analizzati mediante spettrometria di massa MALDI-TOF. Gli spettri ottenuti mediante analisi in massa sono stati rielaborati mediante il software ClinProTools 2.1, al fine di rilevare peptidi e/o proteine differentemente espresse nei tre gruppi in studio (figura 3.1).

Infine la caratterizzazione delle molecole di interesse è stata condotta sottoponendo le frazioni di eluato raccolte dalle precedenti analisi di profiling ad un'analisi HPLC-ESI MS/MS ed elaborando i dati ottenuti mediante il software Biotools.

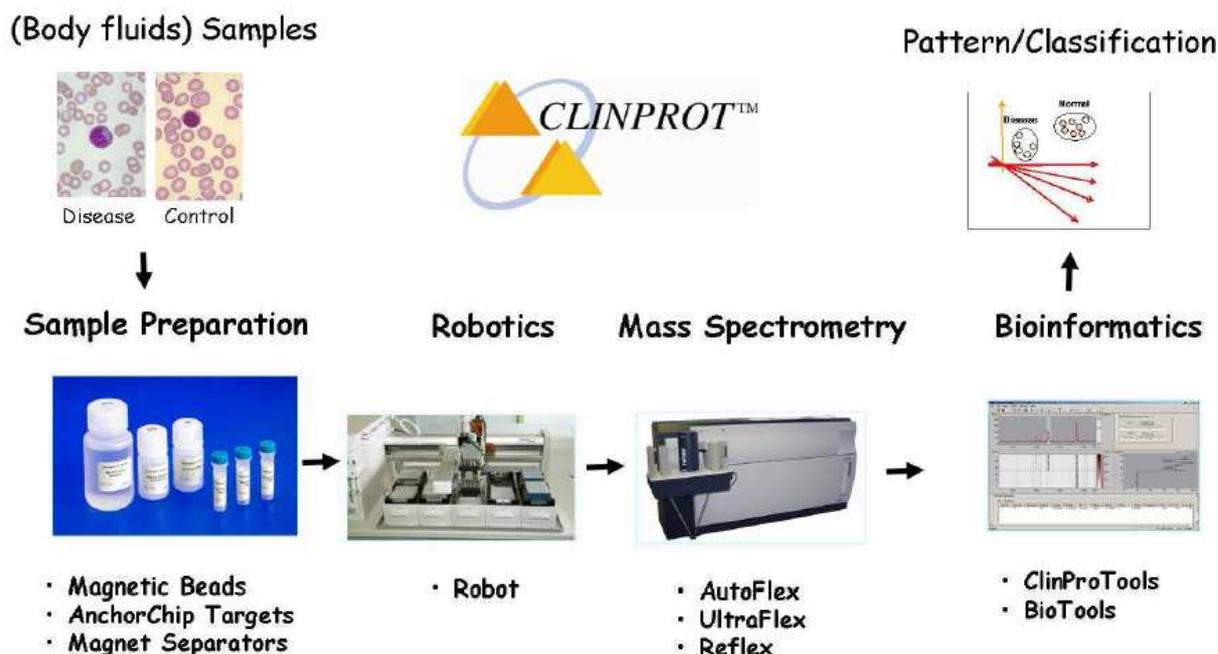


Fig. 3.1: ClinProt workflow
(per gentile concessione di Bruker Daltonik GmbH).

3.1.6.1 Preparazione dei campioni mediante ClinProt

Il protocollo valutato ed ottimizzato manualmente è stato adattato ed automatizzato al ClinProtRobot, il quale permette di purificare fino a 96 campioni in circa 2 ore. L'automazione, oltre a rendere più veloce ed economico il processo di purificazione, permette di ottenere una maggiore riproducibilità nella preparazione dei campioni.

Tutti i reagenti per l'esperimento vengono portati a temperatura ambiente, caricati sulle apposite strip ed inseriti nel ClinProt Robot; i campioni di liquido amniotico da analizzare vengono scongelati e, dopo centrifugazione, se ne prelevano 27 μ l che vengono trasferiti manualmente su una piastra da PCR (polymerase chain reaction) da 96 pozzetti.

Si procede impostando sul software del robot la posizione di ogni campione da trattare ed il protocollo di preparazione; a questo punto è possibile iniziare la procedura automatizzata di preparazione dei campioni, che è costituita dalle seguenti fasi:

- **Binding** (legame): il campione (20 μ l) viene miscelato con una sospensione di biglie magnetiche C8 (5 μ l) assieme ad una soluzione di legame (40 μ l), al fine di ottenere l'estrazione delle proteine dalla matrice biologica.
- **Washing** (lavaggio): mediante l'aggiunta di una soluzione di lavaggio (45 μ l per due volte e 15 μ l per una volta), vengono eliminate le proteine legate in modo aspecifico ed i

sali che possono interferire con la successiva analisi in Spettrometria di Massa; questa fase viene ripetuta 3 volte.

- **Elution** (eluizione) che permette, attraverso una soluzione al 50% di acetonitrile (5 μ l), di rompere il legame tra le proteine e le biglie.

I peptidi così ottenuti rimangono in soluzione e vengono miscelati in rapporto 1 : 2 con una soluzione di matrice (6.2 g/L 4-HCCA in metanolo/acetonitrile/H₂O 50:40:10). Infine, dopo deposito sul target GroundSteel ed evaporazione del solvente con cristallizzazione del campione, si inizia l'analisi con MALDI-TOF Reflex IV. Ogni campione in studio è stato purificato in doppio e depositato in quadruplo per garantire la riproducibilità dell'analisi e migliorare la robustezza statistica dei risultati.

La componente di peptidi/proteine eluita da ogni campione e non utilizzata per l'analisi MALDI-TOF viene riunita con gli altri eluati del gruppo di appartenenza e portata a secco, in maniera tale da poter essere utilizzata per la successiva caratterizzazione dei composti di interesse mediante LC-ESI MS/MS.

3.1.6.2 Analisi MALDI-TOF

Prima di procedere all'analisi MALDI-TOF dei campioni, lo spettrometro viene calibrato utilizzando una miscela di calibranti (Protein Mix 1).

L'acquisizione degli spettri dei campioni viene svolta in modalità lineare in un intervallo di massa da 1000 a 10000 m/z , in cui la potenza del laser ed i parametri dello strumento vengono adattati a seconda delle caratteristiche del campione, grazie all'implementazione di metodi automatici di acquisizione che permettono non solo di acquisire automaticamente gli spettri relativi ad ogni campione in studio ma anche di valutare la qualità di ogni spettro acquisito e di scartare tutti quelli che presentano scarsa risoluzione e basso rapporto segnale/rumore. Nell'impostazione del metodo automatico di acquisizione è infatti possibile ottimizzare i seguenti parametri:

- La potenza, intesa come % del valore massimo del laser per ottenere il desorbimento e la ionizzazione dei campioni.
- Il numero di shots (pacchetti di fotoni emessi dal laser) da utilizzare per acquisire gli spettri.
- Eventuali shots da utilizzare per eliminare l'eccesso di matrice dai depositi prima dell'acquisizione vera e propria.
- La risoluzione, la soglia s/n e l'intensità minima che i picchi devono avere per essere accettati nella sommatoria uno spettro.

- Il numero di spettri da includere nella sommatoria finale di ogni singolo campione.
- La sottrazione della linea di base e lo smoothing dei picchi.
- Il range di massa in cui valutare i suddetti parametri.

L'acquisizione viene eseguita sommando più spettri ottenuti da acquisizioni successive in posizioni diverse del pozzetto in cui è stato depositato il campione; in questo modo si riesce a migliorare il rapporto segnale/rumore di fondo dello spettro. Poiché la matrice non cristallizza in modo uniforme è importante che venga analizzato tutto il pozzetto contenente il campione per poter ottenere il maggior numero di informazioni e il più possibile riproducibili.

Lo strumento, inoltre, viene precedentemente impostato su questi valori:

- ion source 1 = 20 kV
- ion source 2 = 18,25 kV
- lens = 8,70 kV
- pulsed ion extraction = 400 ns
- matrix suppression = 700 Da.

La ionizzazione avviene in un sistema ad alto vuoto, il laser utilizzato è ad azoto e la sua frequenza è pari a 10 Hz.

Una volta conclusa l'analisi in lineare viene effettuata una misurazione in reflectron per ottenere le masse accurate dei possibili marcatori eventualmente individuati nello studio di profiling. L'acquisizione viene in questo caso effettuata manualmente.

Per questo tipo di analisi, lo strumento viene impostato con i seguenti parametri:

- ion source 1 = 20 kV
- ion source 2 = 16.75 kV
- lens = 8,90 kV
- pulsed ion extraction = 400 ns

Gli spettri ottenuti sono stati inizialmente rielaborati con il FlexAnalysis 2.4. Il software consente l'elaborazione degli spettri acquisiti con lo spettrometro di massa MALDI-TOF secondo diversi aspetti. Innanzitutto, permette di visualizzare tutti gli spettri acquisiti singolarmente o su più finestre, in modo da eseguire una prima analisi prettamente visiva degli spettri e delle differenze di segnale. Qualora siano presenti profili non soddisfacenti (segnali poco intensi e in scarso numero, rumore di fondo elevato oppure shots insufficienti) o non acquisiti in automatico dallo spettrometro, è eventualmente possibile riacquisirli manualmente inserendo nuovamente il target nello spettrometro. Dopo aver controllato tutti i profili spettrali, è possibile eseguire un riallineamento di

questi con uno spettro già acquisito e calibrato in una precedente analisi; non è fondamentale infatti che le masse misurate in lineare siano accurate, ma piuttosto che i picchi ottenuti da diversi campioni in differenti analisi siano fra loro sovrapponibili.

I profili spettrali ottenuti vengono infine rielaborati col software ClinProTools 2.1 per l'analisi statistica e l'individuazione delle differenze proteiche delle popolazioni in esame.

3.1.7 ClinProTools

ClinProTools™ comprende tutte le funzioni principali di valutazione e rilevazione di gruppi di biomarcatori, in quanto permette di:

- visualizzare un elevato numero di spettri come classi di dati ;
- creare dei modelli predittivi per la selezione dei picchi in base sia all'ispezione manuale, sia utilizzando metodi statistici multipli per il riconoscimento di possibili biomarker;
- convalidare dei modelli di un cluster diagnostico utilizzando campioni di prova, determinando la sensibilità e la specificità dello stesso;
- classificare campioni sconosciuti utilizzando il modello di analisi.

Di seguito viene riportata la schermata del ClinProTools (Fig. 3.2), dove sono visualizzate le 4 finestre principali contenenti le informazioni relative ai profili spettrali studiati.

A.. Spectra View, mostra uno spettro medio o singolo di tutti i profili spettrali relativi a due o più classi. L'asse x riporta i valori di m/z , mentre l'asse y i valori di intensità relativa dei picchi secondo un' unità arbitraria. Tutti i singoli spettri di una classe presentano lo stesso colore, che è indicato anche nella Gel View. Il software è in grado di effettuare una ricalibrazione automatica degli spettri caricati. Inoltre, è possibile visualizzare lo spettro medio della classe in una colorazione più scura rispetto ai corrispondenti spettri singoli. Inoltre, selezionando il comando di "peak calculation" il software effettua un calcolo dell'area/intensità dei picchi di ogni spettro, i quali vengono evidenziati con delle bande verticali blu.

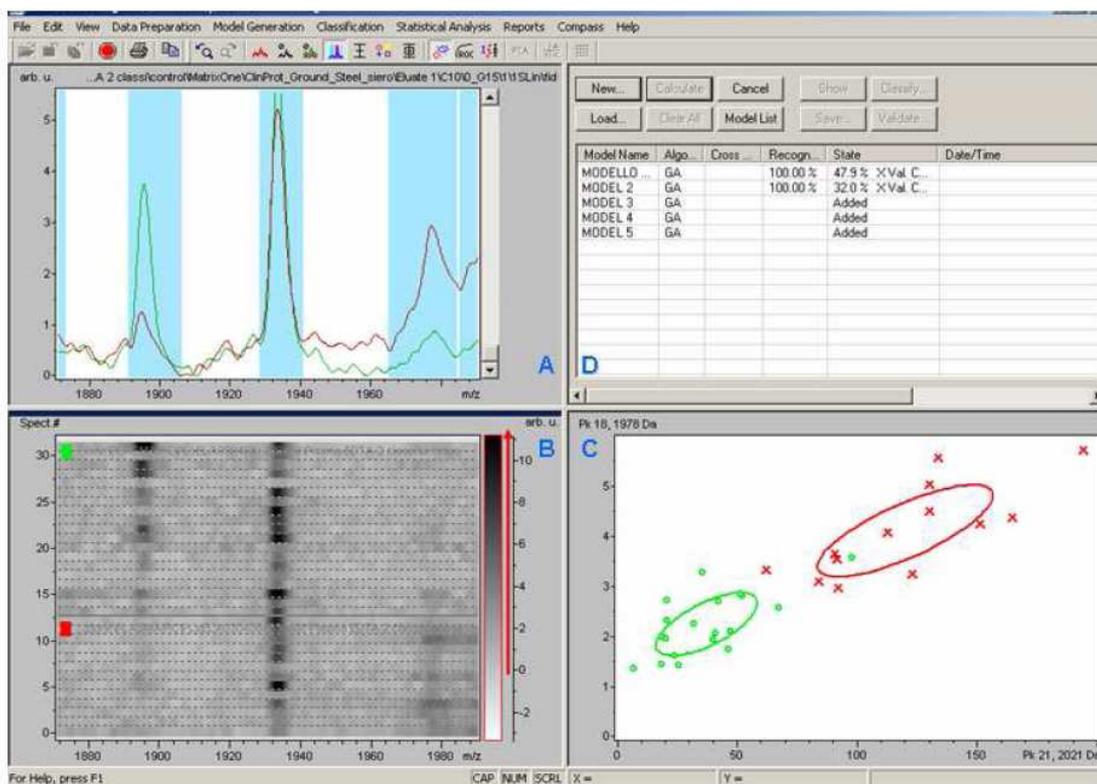


Fig. 3.2: Maschera di lavoro del software ClinProTools (per gentile concessione di Bruker Daltonik GmbH).

Nel caso in cui si abbia, invece, un modello di classificazione ottenuto con gli algoritmi forniti dal software, i picchi inclusi nel modello sono marcati con bande rosse. In ogni caso, la finestra Spectra View permette di includere ed escludere manualmente gli spettri non processati dal software o determinati picchi, nonché di selezionare i segnali più statisticamente significativi, evidenziandoli con bande verticali verdi, al fine di utilizzarli nella costruzione di un modello di classificazione. Infine, è possibile visualizzare in questa finestra anche alcune informazioni statistiche relative a tutti i picchi in esame o ad un numero ristretto di essi (es. media e deviazione standard, distribuzione dei picchi).

Dopo aver effettuato il calcolo dell'area/intensità dei picchi è possibile mediante il comando "Report" ottenere un "Peak Statistic Report", ovvero un elenco di tutti i picchi rilevati dal software durante la "Peak Statistic Calculation" (ricalibrazione degli spettri, calcolo degli spettri medi e calcolo dei picchi) nell'ordine dal più discriminante a quello meno differente a livello di espressione nelle diverse classi. Sulla base di un t-test/Anova per insiemi di dati parametrici ed un Wilcoxon/Kruskal-Wallis per distribuzioni non parametriche, viene calcolato per ogni picco il valore di *p-value*,

indicativo della probabilità che la differenza di espressione trovata nelle popolazioni in esame non sia fondata su un evento casuale. Se il p-value è $< 0,05$ il segnale è statisticamente significativo ai fini di una buona separazione, mentre se il p-value è $> 0,05$ il segnale non permette una discriminazione delle classi. Nella tabella sono riportati anche il numero del picco, il valore di massa, la media delle aree di ogni classe e la differenza tra queste (DAve) ed, infine, le deviazioni standard di ogni classe in esame (StdDev).

Confrontando ogni picco in base al relativo potere di separazione, questo strumento statistico fornisce quindi tutte le differenze fra le classi analizzate.

B. Gel/Stack View: rappresenta un'immagine virtuale di gel (pseudo-gel) in cui sono mostrati tutti i segnali dei campioni che costituiscono le due classi in analisi. La Gel/Stack View è costituita da due finestre, Gel View e Stack View, che possono essere facilmente visualizzate ed interscambiate. La finestra Gel View visualizza tutti gli spettri delle classi come un gel virtuale. Sull'asse x sono riportati i valori di m/z, mentre sull'asse y i singoli spettri in successione. L'intensità dei picchi invece è espressa mediante una scala lineare di colore grigio. Questa finestra mostra i picchi degli spettri sotto forma di spot di diversa densità; sono comunque disponibili diverse scale di colorazione per rilevare anche le minime differenze di intensità.

La finestra Stack View, invece, mostra tutti gli spettri delle classi in un'immagine 3D. L'asse x riporta i valori di m/z, l'asse y le intensità dei picchi in unità arbitrarie e l'asse z l'ordine di caricamento degli spettri.

C. Peak Statistics View, consiste di tre finestre, 2D Peak Distribution View, ROC Curve View e Single Peak Variance View. Tutte queste finestre possono essere facilmente visualizzate ed interscambiate dopo aver eseguito il comando di "peak calculation".

La finestra "2D Peak Distribution View" mostra la distribuzione dei primi due picchi statisticamente significativi, rilevati dal software, in tutti gli spettri delle classi in esame. Il numero ed il valore m/z di questi picchi sono indicati sugli assi x e y. Solitamente l'asse x riporta i valori di area/intensità del primo picco, che presenta infatti minore p-value, mentre l'asse y i valori di area/intensità del secondo picco. È comunque possibile sostituire questi due picchi scelti automaticamente dal software con altri segnali a piacere e valutarne la distribuzione e la capacità discriminante sulle classi in studio. Tutti i segnali appartenenti alla stessa classe sono indicati con lo stesso simbolo e

colore (es. croce rossa per la prima classe, cerchio verde per la seconda classe). Le ellissi rappresentano la deviazione standard delle aree/intensità dei picchi o l'intervallo di confidenza del 95%. La finestra ROC Curve View mostra la curva ROC (Receiver Operating Characteristic curve) relativa ad un determinato picco precedentemente selezionato. La curva ROC offre una visione grafica della specificità e sensibilità di un test e, nel caso di questo software, fornisce una stima della capacità discriminante del picco. L'asse x riporta la specificità in termini di falsi positivi, mentre l'asse y la sensibilità; in entrambi gli assi i valori rientrano in un range da 0 a 1. Prima di configurare una curva ROC, il software chiede di impostare la classe che deve essere considerata come riferimento positivo. Questa funzione è possibile solo nel caso di due classi in esame.

Sotto il grafico della curva ROC viene riportato anche il valore AUC, che rappresenta l'area sotto la curva, cioè la capacità del picco di classificare correttamente i soggetti controllo e i pazienti. Un valore AUC uguale a 0 indica una capacità discriminante del picco nulla, mentre un valore AUC uguale a 1 un'ottima capacità discriminante.

La finestra Single Peak Variance View mostra tre tipologie di dati statistici relativi ad un determinato picco precedentemente selezionato: media e deviazione standard, distribuzione del picco e "box and whiskers".

D. Model List View, in questa finestra è possibile impostare diversi algoritmi matematici (Genetic Algorithm, Support Vector Machine, QuickClassifier e Supervised Neural Network) al fine di creare modelli di classificazione per le popolazioni in esame. Per ogni modello sono riportati il nome, il tipo di algoritmo utilizzato, i valori di "Cross Validation" (indice predittivo di bontà del modello per future classificazioni) e "Recognition Capability" (capacità del cluster di classificare correttamente i campioni con cui è stato elaborato). Per la validazione di un modello, l'insieme dei dati di prova rappresentano le classi che possono essere scelte dall'utente. La validazione determina la specificità e la sensibilità del modello ottenuto con l'insieme di dati prova e la capacità di previsione del modello in base alla percentuale dei dati di prova correttamente classificati. In conclusione, campioni sconosciuti potranno essere classificati usando un modello di analisi precedentemente costruito, ottenendo una previsione della classe di appartenenza.

3.1.7.1 Algoritmo genetico

L'Algoritmo Genetico individua insiemi di picchi (cluster) per differenziare le classi attraverso un sistema di coincidenze e selezioni. Le procedure genetiche sono ispirate alla teoria dell'evoluzione di Darwin, per cui in un processo evolutivo vi è una selezione naturale che predilige la specie più idonea.

L'algoritmo genetico utilizza i meccanismi base che guidano lo sviluppo: "cross over" cromosomico e mutazioni che aumentano la diversità nella specie, seguita dalla sopravvivenza del più idoneo (riducendo così notevolmente i passaggi necessari per confrontare le combinazioni dei picchi quando una prova sistematica di tutte le combinazioni può essere effettuata). Qui le combinazioni dei picchi sono indicate con il termine "modello"; un modello è utilizzato per differenziare fra le due classi degli spettri. Nella procedura genetica questo modello è considerato come "cromosoma logico" con i picchi considerati come "geni".

L'algoritmo genetico si sviluppa da una popolazione iniziale di modelli che si basano su un numero variabile di picchi. Vengono poi selezionati i modelli più idonei, mentre quelli meno predittivi sono scartati. L'idoneità è definita dal gruppo di tecniche e dai calcoli per la selezione. I modelli selezionati verranno sottoposti a ricombinazione (crossing over), dove una coppia di modelli viene ad un certo punto tagliata, alternata e poi unita. Ciò può essere seguito da una mutazione, dove un singolo picco viene preso dal modello ed è sostituito da un altro picco. L'idoneità dei modelli è ancora determinata per selezione. Con i modelli più idonei (ovvero migliori dei loro progenitori) viene effettuata nuovamente la ricombinazione così da ottenere una nuova generazione. Il processo si ripete fino ad ottenere il modello migliore. I picchi statisticamente significativi o che sono scelti dall'utente dopo ispezione interattiva dei dati possono essere inclusi per differenziare le classi in studio.

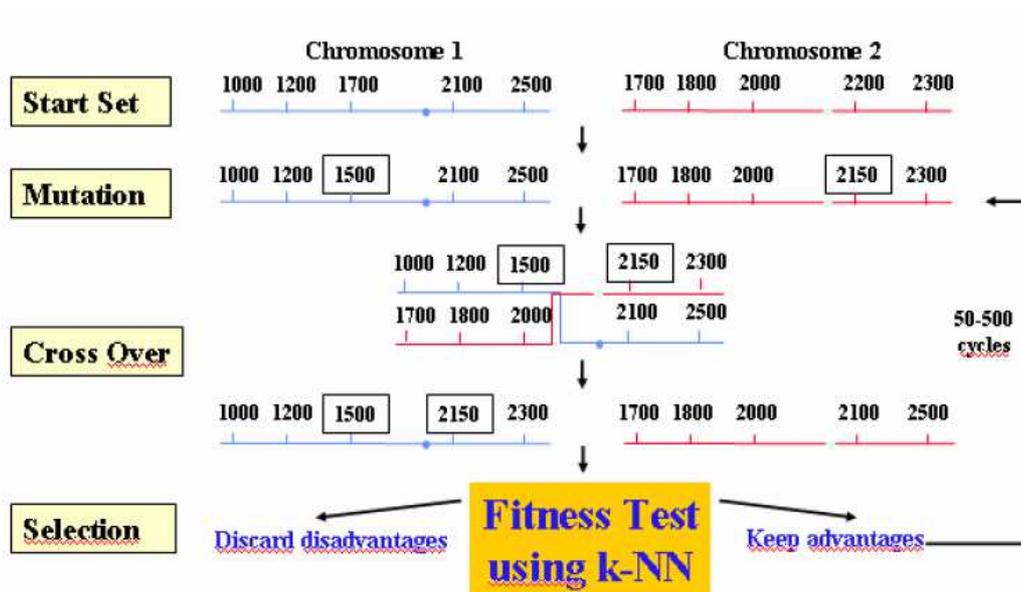


Fig. 3.3: Workflow esplicativo dell'Algoritmo Genetico (per gentile concessione di Bruker Daltonik GmbH).

3.1.7.2 Support Vector Machine

L'algoritmo Support Vector Machine seleziona invece una combinazione di picchi che gli permettano di separare le popolazioni in esame attraverso l'utilizzo di un vettore.

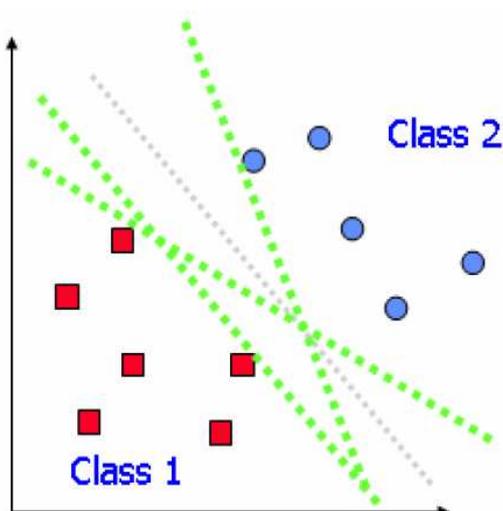


Fig. 3.4: Rappresentazione grafica del funzionamento dell'algoritmo Support Vector Machine (per gentile concessione di Bruker Daltonik GmbH).

3.1.7.3 Quick Classifier

L'algoritmo QuickClassifier (QC) seleziona tutte le aree/intensità dei picchi con relativi valori di p-value e calcola la media pesata di questi. Opera, quindi, un confronto dei valori delle medie pesate ed indica sia l'insieme di picchi in grado di fornire una migliore separazione sia la probabilità di corretta classificazione per ogni popolazione in esame. La classe con il più alto indice di probabilità rappresenta la classe predittiva.

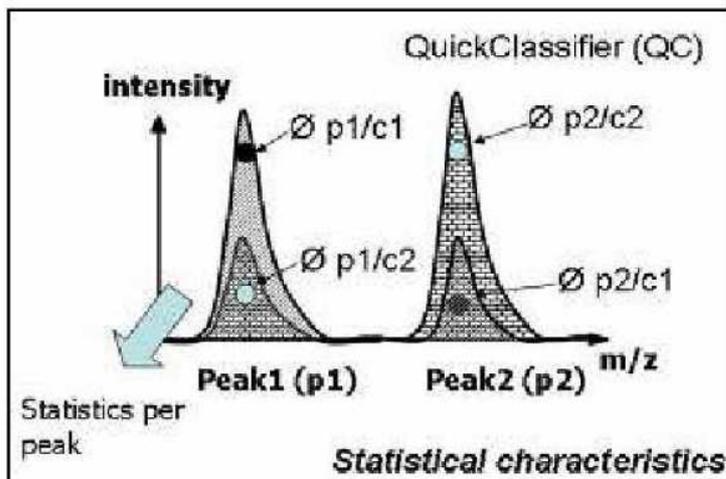
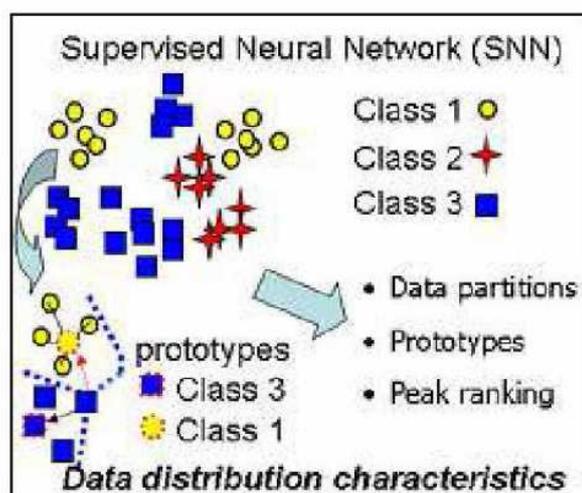


Fig. 3.5: Principio di funzionamento dell' algoritmo Quick Classifier (per gentile concessione di Bruker Daltonik GmbH).

3.1.7.4 Supervised Neural Network

Supervised Neural Network (SNN) seleziona gli spettri che sono identificativi di ogni classe in esame e che sono quindi in grado di fornire una buona separazione. Tutti questi spettri sono chiamati prototipi.

Fig. 3.6: Principio di funzionamento dell' algoritmo Supervised Neural Network (per gentile concessione di Bruker Daltonik GmbH).



3.1.8 Analisi HPLC-ESI MS/MS

I segnali selezionati mediante ClinProTools in grado di discriminare le popolazioni in esame sono stati caratterizzati mediante analisi in HPLC-ESI MS/MS.

Le frazioni degli eluati non utilizzate per gli studi di profiling al MALDI-TOF sono state riunite e portate a secco con centrifuga da vuoto HETOVAC VR-I. E' stata ottenuta una frazione a secco per ognuna delle classi in studio. In seguito ogni frazione è stata risospesa appena prima dell' analisi in 50 μ l di H₂O/TFA 0,1%, una aliquota di 20 μ l è

stata iniettata con autocampionatore in HPLC-ESI MS/MS mentre i rimanenti sono stati conservati a -20°C per eventuali analisi successive .

Le analisi HPLC sono state eseguite con le seguenti condizioni operative:

- Colonna: Zorbax 300 SB-C18 150x0.075mm-3.5µm-
- Quantità di campione iniettata: 20 µl
- Fase mobile loading pump: H₂O + 0,1% HCOOH
- Fase mobile A micro pump: H₂O + 0,05% HCOOH
- Fase mobile B micro pump: 20/80 H₂O /Acetonitrile + 0,05% HCOOH
- Gradiente (tabella 3.2).

MINUTI	FLUSSO (µl/min)	% FASE A	% FASE B
0	0.3	98	2
5	0.3	98	2
30	0.3	30	71
35	0.3	2	98
40	0.3	2	98
45	0.3	98	2

Tab. 3.2: Gradiente utilizzato per l'analisi HPLC

Lo spettrometro di massa è stato programmato in modo tale da registrare cicli completi costituiti da una scansione di massa, seguita da tre scansioni consecutive MS/MS dei tre ioni più intensi rilevati in ogni scansione MS. Gli spettri MS/MS sono limitati a due scansioni consecutive per ione precursore e con successiva esclusione degli stessi per mezzo minuto.

Le condizioni operative dello spettrometro erano le seguenti:

- Voltaggio del capillare: 1100 V
- Dry Gas: 4 psi
- Dry Temperature: 200°C
- Fragmentation Amplitude: 0,7 V
- Gas di collisione: elio
- Modalità di analisi: polarità positiva
- Range di m/z: 200 - 3000 m/z.

3.1.9 Identificazione delle molecole di interesse

I dati ottenuti dall'analisi LC-ESI MS/MS sono stati rielaborati col software DataAnalysisTM 3.3, mediante il quale è possibile visualizzare i cromatogrammi relativi all'acquisizione in massa, gli spettri MS e MS/MS.

Tramite il cromatogramma estratto di un singolo ione (EIC) è stato possibile individuare a quale tempo di ritenzione è stato eluito il marker di interesse. Visualizzando lo spettro di massa dello ione parent si valuta se il rapporto m/z coincide con quello ottenuto all'analisi in reflectron al MALDI-TOF e si procede con l'elaborazione del relativo spettro MS/MS. Una volta assegnati i valori di m/z agli ioni presenti nello spettro MS/MS si procede alla ricerca in banca dati col motore di ricerca Mascot per l'identificazione.

I parametri utilizzati per l'identificazione delle molecole di interesse sono i seguenti:

- Database: NCBIInr (v. 20101209)
- Taxonomy: Homo sapiens
- Enzyme: none
- Missed Cleavage: 0
- Fixed modifications: none
- Variable modifications: none
- Protein Mass: non specificata
- Peptide tol: ± 2 Da
- MS/MS tol: ± 1 Da
- Peptide charge: 2+ and 3+
- Instrument: ESI-Trap

3.2 Progetto HIGHCaRe

3.2.1 Popolazione in studio

Lo studio è stato condotto su 47 volontari sani di origine caucasica, di cui 32 uomini e 15 donne, che vivono abitualmente a bassa quota (tra 0 e 500 mt slm). I criteri di esclusione dal progetto erano: presenza di malattie cardiovascolari o angioedema, gravidanza, esposizione a terapia cronica cardiovascolare, esposizione ripetuta ad altitudini superiori ai 3000 mt negli 8 mesi precedenti la spedizione, pregressa diagnosi di AMS (male acuto di montagna). Atleti che svolgono sport a livello professionistico non sono stati inclusi nello studio. Tutti i soggetti in studio sono stati sottoposti ad un check-up generale per verificare il loro stato di salute, il quale includeva test da sforzo ed ecocardiogramma.

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell' Istituto Auxologico Italiano ed è stato condotto in accordo con la dichiarazione di Helsinki. Tutti i soggetti in studio hanno sottoscritto un consenso informato.

3.2.2 Disegno dello studio

La popolazione è stata suddivisa in maniera randomizzata ed in cieco in due gruppi, il primo trattato con placebo ed il secondo sottoposto invece a trattamento con Telmisartan (Micardis, Boeringher Ingelheim) 80mg/die.

Le urine dei soggetti sono state raccolte con diverse tempistiche (Fig. 3.7) per valutare la risposta allo stimolo ipossico in differenti condizioni (normossia, ipossia lieve o grave, ipossia grave acuta e cronica):

- T0: prima del trattamento, a 140 mt slm;
- T1: dopo 6 settimane di trattamento con farmaco o placebo, a 140 mt slm;
- T2: a 3500 mt slm, esposizione ad ipossia ipobarica lieve in alta quota;
- T3: a 5400 mt slm, esposizione in altissima quota ad ipossia ipobarica acuta;
- T4: a 5400 mt slm, esposizione in altissima quota ad ipossia ipobarica cronica;
- T5: al rientro dalla spedizione, 140 mt slm;
- T6: dopo 3 mesi dalla spedizione e dalla sospensione del trattamento con farmaco o placebo, a 140 mt slm.

In dettaglio, tutti i prelievi a livello del mare (T0, T1, T5, T6) sono stati condotti all'Istituto Auxologico di Milano (140 mt slm). Il 9 Settembre i soggetti in studio sono stati trasferiti per mezzo aereo da Milano (140 mt slm) a Kathmandu (1355 mt slm) dove sono rimasti

per 3 giorni. In seguito sono stati trasferiti via aereo ed elicottero a Namche Bazar (3400 mt slm) dove sono rimasti per 3 giorni per effettuare i prelievi T2. Dopo 5 giorni di cammino i soggetti arruolati hanno raggiunto il Campo Base del Monte Everest (5400 mt slm), dove sono rimasti per 11 giorni e sono stati sottoposti ai prelievi T3 e T4. Entro i successivi 6 giorni i soggetti sono rientrati a Milano dove sono stati sottoposti ai prelievi T5 ancora sotto trattamento. Dopo circa 3 mesi dal rientro e sospensione del trattamento, i soggetti sono stati sottoposti ai prelievi T6.

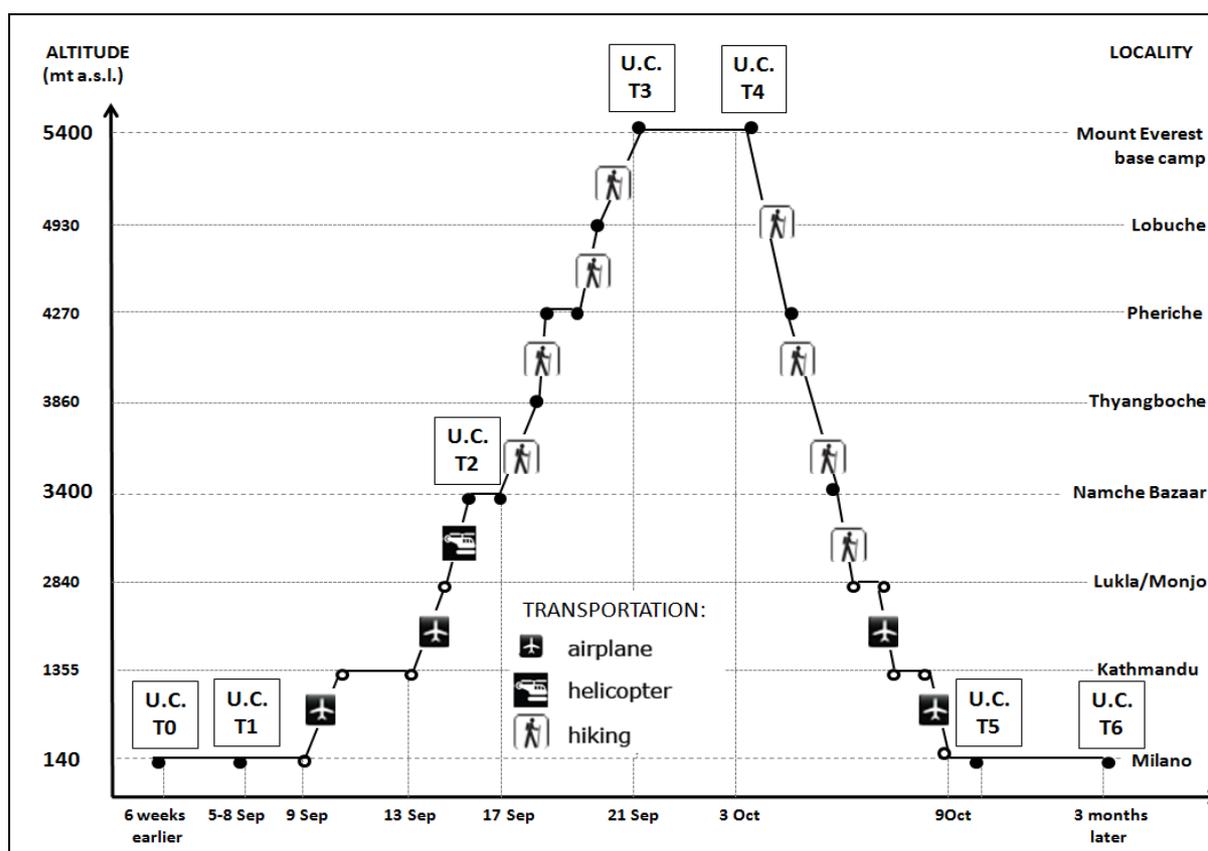


Fig. 3.7: Tappe di prelievo del progetto HIGHCaRe. (U.C. = urine collection) (adattato con il permesso dell'autore, da Piperno A. et al, Blood 2010, 13 Dec, ahead of print)

3.2.3 Procedura operativa per la raccolta dei campioni

Per ogni soggetto in studio è stato raccolto il mitto intermedio della seconda urina del mattino. L'urina è stata centrifugata a 3000 rpm per 10 minuti per eliminare il particolato. Il surnatante è stato prelevato e suddiviso in 2 aliquote da 2 mL.

3.2.4 Materiali

Tutte le soluzioni acquose per l'analisi ClinProt/MALDI-TOF sono state preparate utilizzando acqua deionizzata presente nel Profiling kit MB-HIC C8 (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany).

- Acetonitrile, CH₃CN (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).
- Soluzione di matrice 0.3 g/L 4-HCCA (4-Hydroxy- α -cyanocinnamic acid, Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany) in Acetone/Etanol 1:3.
- Biglie Magnetiche MB-HIC C8 (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany).
- MB-HIC binding solution presente nel kit (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany).
- MB-HIC wash solution presente nel kit (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany).
- Elution Solution (Acetonitrile/ H₂O 50:50).
- Protein mix 1 (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany) in 0,1% TFA.
- MTP AnchorChip™ 600/384 target (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany).
- Tutte le soluzioni acquose per l'analisi LC-ESI-MS/MS sono state preparate utilizzando H₂O CHROMASOLV Plus per HPLC (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA).
- Soluzione acquosa 0,1% di TFA (acido trifluoroacetico, Fluka Chemie, Buchs, Switzerland).
- Soluzione acquosa 0,01% HCOOH (acido formico, Carlo Erba, Milan, Italy).
- Soluzione acquosa 0,05% di HCOOH.
- Soluzione Acetonitrile/ H₂O 80:20 con 0,05% di HCOOH

3.2.5 Strumenti

- Clin Prot Robot™ (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany).
- Spettrometro di massa MALDI-TOF Reflex IV™ (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany).
- Spettrometro di massa Esquire 3000 Plus (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany).
- HPLC Ultimate 3000 (Dionex Corporation, Sunnyvale, California, USA).
- Vortex (Apparecchi Scientifici E. Pasquali, Milano, Italy).
- Centrifuga Mini Spin (Eppendorf, Hamburg, Germany).
- Centrifuga da vuoto HETOVAC VR-I (Heto Lab. Equipment, Allerod, Denmark).
- Bilancia Gibertini E42-B.
- Sonicatore Branson 2510.
- Contenitori a vapori di azoto (Cryoshippers MVE Biological Systems, Cleveland, Ohio, USA) per la conservazione dei campioni in quota fino al rientro in Italia.

3.2.6 Software

- FlexControl TM 1.1 (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany) per il controllo dello Spettrometro di Massa MALDI-TOF.
- FlexAnalysis TM 2.4 (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany) per l'elaborazione degli spettri acquisiti al MALDI-TOF.
- ClinProTools TM 2.1 (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany) per l'indagine statistica degli spettri e la visualizzazione delle differenze.
- Clin Prot Robot TM software (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany) per l'impostazione della preparazione dei campioni da parte del robot.
- DataAnalysis TM 3.0 (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany) per l'elaborazione degli spettri ottenuti dallo Spettrometro Esquire 3000 Plus.
- Esquire Control TM 5.3 (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany) per la gestione dello Spettrometro di Massa Esquire 300 Plus.
- Data Analysis TM 3.3 (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany) per l'elaborazione dei dati ottenuti dall' analisi μ HPLC-ESI MS/MS
- Biotools TM 3.0 (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany) per effettuare le ricerche in banca dati.
- Chromeleon 6.80 SP2 Build 2280 (Dionex Corporation 1228, Titan Way, Sunnyvale, CA 94085, USA) per la gestione della strumentazione HPLC.
- MedCalc v 10.2 (MedCalc Software, Belgium) per la costruzione dei grafici e l'elaborazione statistica con il test one-way ANOVA.

3.2.7 Metodi

I campioni di urina sono stati purificati mediante tecnologia ClinProt con biglie magnetiche ad interazione idrofobica (MB-HIC C8) e successivamente analizzati mediante spettrometria di massa MALDI-TOF. Gli spettri ottenuti mediante analisi in massa sono stati rielaborati mediante il software ClinProTools 2.1, al fine di rilevare peptidi e/o proteine differientemente espresse nelle classi in studio.

Infine la caratterizzazione delle molecole di interesse è stata condotta sottoponendo ad analisi HPLC-ESI MS/MS le frazioni di eluato raccolte dalle precedenti analisi di profiling ed elaborando i dati ottenuti mediante il software Biotools.

3.2.7.1 Preparazione dei campioni mediante ClinProt

Il protocollo valutato ed ottimizzato manualmente è stato adattato per l'utilizzo automatizzato con ClinProtRobot, il quale permette di ottenere fino a 96 purificazioni in circa 2 ore. L'automazione, oltre a rendere più veloce ed economico il processo di purificazione, permette di ottenere una maggiore riproducibilità nella preparazione dei campioni.

Tutti i reagenti per l'esperimento vengono portati a temperatura ambiente, caricati sulle apposite strip ed inseriti nel ClinProt Robot; i campioni da analizzare vengono scongelati e, dopo centrifuga, se ne prelevano 18 μ l che vengono trasferiti manualmente su una piastra da PCR (polymerase chain reaction) da 96 pozzetti.

Si procede impostando sul software del robot la posizione di ogni campione da trattare ed il protocollo di preparazione; a questo punto è possibile iniziare la procedura automatizzata di preparazione dei campioni, che è costituita dalle seguenti fasi:

- **Binding** (legame): il campione (10 μ l) viene miscelato con una sospensione di biglie magnetiche C8 (5 μ l) assieme ad una soluzione di legame (20 μ l), al fine di ottenere l'estrazione delle proteine dalla matrice biologica.
- **Washing** (lavaggio): mediante l'aggiunta di una soluzione di lavaggio (45 μ l), vengono eliminate le proteine legate in modo aspecifico ed i sali che possono interferire con la successiva analisi in Spettrometria di Massa; questa fase viene ripetuta 3 volte.
- **Elution** (eluizione) che permette, attraverso una soluzione al 50% di acetonitrile (5 μ l), di rompere il legame tra le proteine e le biglie.

I peptidi così ottenuti rimangono in soluzione e vengono miscelati in rapporto 1 : 10 con una soluzione di matrice (0.3 g/L 4-HCCA in acetone/etanolo 1:3). Infine, dopo deposito sul target AnchorchipTM ed evaporazione del solvente con cristallizzazione del campione, si inizia l'analisi con MALDI-TOF Reflex IV. Il processo di cristallizzazione è stato condotto nel robot controllando temperatura ed umidità mediante l'ausilio di un umidificatore per ambiente. Le condizioni ottimali per una cristallizzazione efficiente sono state individuate a 28-29 °C con il 42-45% di umidità. Ogni campione in studio è stato purificato in doppio e depositato in quadruplo per garantire la riproducibilità dell'analisi e migliorare la robustezza statistica dei risultati.

La componente di peptidi/proteine eluita da ogni campione e non depositata è stata riunita con gli altri eluati del gruppo di appartenenza e portata a secco, in maniera tale da poter essere utilizzata per la successiva caratterizzazione delle molecole di interesse mediante LC-ESI MS/MS.

3.2.7.2 Analisi MALDI-TOF

Prima di procedere all'analisi MALDI-TOF dei campioni, lo spettrometro viene calibrato utilizzando una miscela di calibranti (Protein Mix 1).

L'acquisizione degli spettri dei campioni viene svolta in modalità lineare in un range di massa da 1000 a 10000 m/z , in cui la potenza del laser ed i parametri dello strumento vengono adattati a seconda delle caratteristiche del campione, grazie all'implementazione di metodi automatici di acquisizione che permettono non solo di acquisire automaticamente gli spettri relativi ad ogni campione in studio ma anche di valutare la qualità di ogni spettro acquisito e di scartare tutti quelli che presentano scarsa risoluzione e basso rapporto segnale/rumore. Nell'impostazione del metodo automatico di acquisizione è infatti possibile ottimizzare i seguenti parametri:

- La potenza, intesa come % del valore massimo del laser per ottenere il desorbimento e la ionizzazione dei campioni.
- Il numero di shots (pacchetti di fotoni emessi dal laser) da utilizzare per acquisire gli spettri.
- Eventuali shots da utilizzare per eliminare l'eccesso di matrice dai depositi prima dell'acquisizione vera e propria.
- La risoluzione, la soglia s/n e l'intensità minima che i picchi devono avere per essere accettati nella sommatoria uno spettro.
- Il numero di spettri da includere nella sommatoria finale di ogni singolo campione.
- La sottrazione della linea di base e lo smoothing dei picchi.
- Il range di massa in cui valutare i suddetti parametri.

L'acquisizione viene eseguita sommando spettri ottenuti da acquisizioni successive in posizioni diverse del pozzetto in cui è stato depositato il campione; in questo modo si riesce a migliorare il rapporto segnale/rumore di fondo dello spettro. Poiché la matrice non cristallizza in modo uniforme è importante che venga analizzato tutto il pozzetto contenente il campione per poter ottenere il maggior numero di informazioni e il più possibile riproducibili.

Lo strumento, inoltre, viene precedentemente impostato sui valori già descritti per l'acquisizione dei fluidi amniotici nello stesso intervallo di massa (paragrafo 3.1.6.2).

Una volta conclusa l'analisi in lineare viene effettuata una misurazione in reflectron per ottenere le masse accurate dei possibili marcatori eventualmente individuati nello studio di profiling. L'acquisizione viene in questo caso effettuata manualmente, con i parametri già descritti per i fluidi amniotici (paragrafo 3.1.6.2).

Gli spettri ottenuti vengono inizialmente rielaborati con FlexAnalysis 2.4. Tale software consente l'elaborazione degli spettri acquisiti con lo spettrometro di massa MALDI-TOF secondo diversi aspetti. Innanzitutto, permette di visualizzare tutti gli spettri acquisiti singolarmente o su più finestre, in modo da eseguire una prima analisi prettamente visiva degli spettri e delle differenze di segnale. Dopo aver controllato tutti i profili spettrali, è stato effettuato un riallineamento di questi con uno spettro già acquisito e calibrato in una precedente analisi; non è fondamentale infatti che le masse misurate in lineare siano accurate, ma piuttosto che i picchi ottenuti da diversi campioni in differenti analisi siano fra loro sovrapponibili.

I profili spettrali ottenuti vengono infine rielaborati col software ClinProTools 2.1 per l'analisi statistica e l'individuazione delle molecole di interesse.

3.2.7.3 Analisi HPLC-ESI MS/MS

I segnali di interesse, selezionati mediante ClinProTools e diversamente espressi nelle classi in studio, sono stati caratterizzati mediante analisi in HPLC-ESI MS/MS.

Le frazioni di eluati non utilizzate per gli studi di profiling al MALDI-TOF sono riunite e portate a secco con centrifuga da vuoto HETOVAC VR-I. Si ottiene quindi una frazione a secco per ognuna delle classi in studio. In seguito ogni frazione viene risospesa appena prima dell'analisi HPLC-ESI MS/MS in 50 μ l di H₂O/TFA 0,1%, una aliquota da 20 μ l è stata iniettata con autocampionatore in HPLC-ESI-MS/MS mentre i rimanenti sono STATI conservati a -20°C per eventuali analisi successive.

Le analisi HPLC sono state eseguite con le condizioni operative già descritte nel paragrafo 3.1.8.

3.2.7.4 Identificazione delle molecole di interesse

I dati ottenuti dall'analisi LC-ESI MS/MS sono stati rielaborati col software DataAnalysisTM 3.3, mediante il quale è possibile visualizzare i cromatogrammi relativi all'acquisizione in massa, gli spettri MS e MS/MS.

Tramite il cromatogramma estratto di un singolo ione (EIC) è possibile individuare ricercare a quale tempo di ritenzione è stato eluito il marker di interesse. Visualizzando lo spettro di massa dello ione parent si valuta se il rapporto m/z coincide con quello ottenuto all'analisi in reflectron al MALDI-TOF e si procede quindi a elaborarne il relativo spettro MS/MS. Una volta assegnati i valori di m/z ai picchi dello spettro si procede alla ricerca in banca dati col motore di ricerca Mascot per l'identificazione.

I parametri utilizzati per l'identificazione delle molecole di interesse sono i seguenti:

- Database: SwissProt v_2010
- Taxonomy: Homo sapiens
- Enzyme: none
- Missed Cleavage: 0
- Fixed modifications: none
- Variable modifications: none
- Protein Mass: non specificata
- Peptide tol: ± 2 Da
- MS/MS tol: ± 1 Da
- Peptide charge: 2+ and 3+
- Instrument: ESI-Trap

3.3 Spettrometria di Massa Imaging ed utilizzo di detergenti

3.3.1 Tessuti analizzati

Per lo studio relativo all'utilizzo dei detergenti per migliorare la sensibilità dei segnali ottenuti dall'analisi di proteine mediante spettrometria di massa imaging sono stati utilizzati topi ICR wild-type. I topi al primo giorno postnatale (P1) o dopo 12 settimane di vita sono stati sacrificati per asfissia da CO₂ secondo le linee guida IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee). I topi P1 sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80°C fino al momento dell'analisi. I topi adulti invece sono stati sottoposti a rimozione del fegato, il quale è stato immediatamente congelato in azoto liquido e conservato a -80°C fino al momento dell'analisi.

3.3.2 Materiali

Tutte le soluzioni acquose sono state preparate usando acqua milliQ (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

- Acetonitrile (CH₃CN, Fisher Scientific Inc, Fairlawn, NJ, USA)
- Eosina (Fisher Scientific Inc, Fairlawn, NJ, USA)
- TWEEN 20 (Fisher Scientific Inc, Fairlawn, NJ, USA)
- Triton X-100 (Fisher Scientific Inc, Fairlawn, NJ, USA)
- Acido (Sodium Dodecyl Sulphate, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA)
- TWEEN 80 (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA)
- CHAPS (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA)
- Ematossilina (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA)
- Acido Sinapinico (SA, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA), purificato mediante ricristallizzazione, utilizzato come matrice e preparato in concentrazione pari a 18 g/l in per la deposizione automatizzata e 20 g/l per la deposizione manuale in soluzione di Acetonitrile/H₂O/TFA 50:50:0.2.
- Protein mix 1 (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany) in 0,1% TFA.
- Target per sezioni di fegato gold-plated MALDI target (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).
- Target per topi P1 Indium-Tin Oxide coated glass squares (Delta Technologies, StillWater, MN, USA)

3.3.3 Strumenti

- Criostato LEICA CM1950 (LeicaMicrosystem, GmbH, Wetzlar, Germany)
- Spotter acustico automatizzato per la deposizione della matrice, Portrait 630 (Labcyte, Sunnyvale, CA, USA)
- Spettrometro di massa MALDI-TOF Autoflex II (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany).
- Centrifuga Mini Spin (Eppendorf , Hamburg, Germany).
- Centrifuga da vuoto HETOVAC VR-I (Heto Lab. Equipment, Allerod,Denmark).
- Sonicatore Branson 2510.

3.3.4 Software

- FlexControl TM 3.3 (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany) per il controllo dello Spettrometro di Massa MALDI-TOF.
- Flex Imaging TM 2.1 ((Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany), per l'interfaccia fra spettrometro di massa e acquisizione dell'immagine e per l'elaborazione delle immagini.
- FlexAnalysis TM 3.3 (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany) per l'elaborazione degli spettri acquisiti al MALDI-TOF.
- ClinProTools TM 2.2 (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany) per l'analisi statistica.
- Labcyte Portrait 630 versione 1.0.0.29 per la gestione dello spotter acustico Portrait 630 (Labcyte, Sunnyvale, CA, USA)

3.3.5 Metodi

I tessuti in studio sono stati preparati al criostato e la matrice è stata depositata manualmente per lo studio di profiling oppure automaticamente, mediante spotter acustico per le analisi di imaging. La matrice è stata addizionata ai detergenti oppure depositata dopo deposito del detergente sul tessuto in diverse concentrazioni (Tab. 3.3), per valutare un possibile miglioramento della sensibilità analitica dovuto alla presenza di tali composti.

Successivamente i campioni sono stati analizzati mediante spettrometria di massa MALDI-TOF. Gli spettri ottenuti mediante analisi in massa sono stati rielaborati mediante il software ClinProTools 2.1, al fine di rilevare proteine la cui intensità risultava alterata a seguito dell'utilizzo dei detergenti.

Detergent	Molecular Formula	Molecular Weight (g/mol)	Headgroup	Critical Micelle Concentration (mM at 25 °C)	Optimal Concentration	
					(% v/v)	mM
Sodium dodecyl sulfate	C ₁₂ H ₂₅ O ₄ NaS	288.38	Anionic	10	0.05	0.17
CHAPS	C ₃₂ H ₅₈ N ₂ O ₇ S	614.88	Zwitterionic	6.0	-	-
Triton X-100	C ₁₄ H ₂₂ O(OC ₂ H ₄) _n	602.81, n=9 646.43, n=10	Nonionic	0.2	0.05	0.08 0.07
Tween 20	C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆ (avg)	1227.53	Nonionic	0.06	0.1	0.08
Tween 80	C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆ (avg)	1309.68	Nonionic	0.012	0.03	0.022

Tab. 3.3 Caratteristiche molecolari dei detergenti selezionati per lo studio. La concentrazione ottimale è stata definita con i detergenti disciolti in soluzione Acetonitrile/H₂O/TFA 50:50:0.2. (da Mainini V. et al. RCM 2011; 15: 25 (1), 199-204).

3.3.5.1 Preparazione dei tessuti

I tessuti epatici ed i topi P1 interi sono stati montati su un supporto per criostato con una quantità minima di OCT per evitare la contaminazione dei campioni con il polimero.

I tessuti sono stati portati a -20°C e sezionati al criostato. Per ogni tessuto in ogni esperimento sono state preparate sezioni consecutive dello spessore di 12 µm. Le sezioni così preparate sono state depositate su target appositi (gold-plated per le sezioni di fegato ed ITO per i topi P1) conservati a -20°C. Per favorire la corretta adesione del tessuto al target, esso è stato portato a temperatura ambiente, lasciato asciugare all'aria per alcuni minuti ed in seguito posto in essiccatore per circa 30 minuti. A seguito della deidratazione del tessuto il target è stato rimosso dall'essiccatore ed è stato sottoposto a 3 lavaggi seriali, ognuno della durata di 30 secondi, in concentrazioni crescenti di Etanolo (70%, 90% e 95%). Questi lavaggi sono necessari per la rimozione di sali e lipidi presenti nel tessuto; tali molecole rappresentano infatti sostanze interferenti con l'analisi in massa.

A seguito dei lavaggi i tessuti sono stati mantenuti in essiccatore per 2 ore per ottenerne la completa asciugatura.

Infine, 0,5 µl di acido sinapinico sono stati depositati manualmente sul tessuto per l'analisi di profiling.

Sono state valutate due modalità di deposito dei detergenti. Nel primo approccio la matrice è stata addizionata direttamente con la concentrazione di detergente di interesse (0.01%, 0.03%, 0.05% o 0.1%). Nel secondo approccio invece il 0.5 µl di detergente sono stati depositati sul tessuto e lasciati evaporare; 0,5 µl di matrice sono stati depositati in seguito sopra lo spot contenente il detergente.

Per le analisi di imaging, invece, la matrice è stata addizionata con la concentrazione ottimale di detergente (stabilita mediante analisi di profiling) e depositata mediante uno

spotter acustico automatizzato. Tale strumento permette di depositare sul tessuto un array di matrice. Ogni pixel dell'array è costituito da una goccia di matrice e le gocce sono depositate a distanza di 200 μm . In particolare l'array preparato per gli esperimenti di questo progetto è stato depositato in 30 cicli costituiti da una goccia/ciclo, La quantità di matrice depositata per ogni punto dell'array è pari a 5.4 nl (180 pl/goccia x 30 gocce). Una volta depositata la matrice sul tessuto il target è pronto per l'analisi in massa.

3.3.5.2 Analisi MALDI-TOF

Prima di procedere con l'analisi dei campioni, lo spettrometro viene calibrato utilizzando una miscela di calibranti (Protein Mix 1).

L'acquisizione degli spettri dei campioni viene svolta in modalità lineare in un range di massa da 4000 a 25000 m/z . Gli spettri delle sole matrici invece sono stati acquisiti in un range da 1000 a 25000 m/z .

Lo strumento (Autoflex II, Bruker Daltonics) è stato impostato con voltaggio di accelerazione degli ioni pari a 20 kV, voltaggio di estrazione pari a 18.55 kV e lenti a 6.8 kV. Il tempo di "pulsed ion extraction" è stato impostato a 400 ns. La soppressione della matrice a 1100 Da per i campioni e a 700 Da per gli spettri delle sole matrici. La ionizzazione è stata effettuata mediante laser Nd:YAG, con lunghezza d'onda a 355nm e frequenza di 200 Hz.

Per le analisi di profiling condotte sui depositi manuali di matrice sono stati acquisiti manualmente 700 shots totali in 7 posizioni differenti (7 spettri x 100 shots/spettro)

Per le analisi di imaging ogni target è stato sottoposto a scansione ottica con una risoluzione pari a 2400 dpi. Ogni immagine del target è stata importata nel software FlexImaging e per ogni tessuto sono stati utilizzati i punti estremi dell'array per definire le posizioni di acquisizione dell'immagine. Ogni pixel dell'immagine è stato acquisito in maniera automatizzata, impostando lo strumento in maniera tale da sommare 640 shots in 40 posizioni differenti acquisite secondo un pattern casuale (random walk).

3.3.5.3 Elaborazione statistica

L'elaborazione degli spettri e l'analisi statistica sono state condotte mediante il software ClinProTools 2.2.

Le variazioni nell'intensità degli spettri, lo shift delle masse e l'elevato rumore di fondo derivante dall'analisi dei tessuti sono stati normalizzati attraverso l'elaborazione degli spettri mediante ClinProTools. Tutti gli spettri infatti sono stati normalizzati rispetto alla

corrente ionica totale, ricalibrati con 1000 ppm come massimo shift di massa accettato e corrispondenza ad almeno il 30% dei picchi individuati come “calibranti” dal software. La linea di base è stata sottratta secondo l’algoritmo “Top Hat” con un’ampiezza impostata al 10%. I picchi sono stati sottoposti a processo di “smoothing” secondo l’algoritmo Savitsky Golay impostato con un’ampiezza pari a 2 Da e 5 cicli. Il calcolo dei picchi è stato effettuato sulla base dell’intensità dei segnali ed è stato scelto un rapporto segnale/rumore pari a 5.

Per quanto concerne le analisi di profiling gli spettri appartenenti allo stesso campione ed alla stessa preparazione sono stati importati in ClinProTools.

Per le analisi di Imaging effettuate sul tessuto epatico dei topi adulti sono stati selezionati e confrontati mediante ClinProTools circa 450 spettri per ogni sezione. Per quanto concerne invece l’analisi di imaging effettuata sui topi P1 gli spettri appartenenti alla stessa regione sono stati selezionati dopo co-registrazione della colorazione H & E all’immagine della sezione acquisita. In particolare per quanto riguarda lo studio relativo all’area cerebrale sono stati selezionati 250 spettri mentre per lo studio relativo all’area cardiaca sono stati selezionati circa 150 spettri.

L’analisi statistica è stata condotta considerando la diversa intensità di un segnale in due classi statisticamente significativa se il valore di p-value ottenuto dal test ANOVA era inferiore a 0.05 e se, contemporaneamente, il valore di AUC relativo allo studio della curva ROC era superiore a 0.8.

Le immagini relative agli ioni di interesse sono state generate mediante il software FlexImaging.

RISULTATI

4.1 Ottimizzazione e riproducibilità del metodo ClinProt

Nella fase sperimentale iniziale sono state valutate le procedure fornite dalla ditta produttrice delle biglie magnetiche utilizzando differenti tipologie di fasi estrattive su diversi fluidi biologici. È stato scelto in particolare di utilizzare le biglie ad interazione idrofobica C8. Mediante queste biglie è possibile estrarre un elevato numero di peptidi e proteine di interesse. A seguito delle modifiche apportate ai protocolli standard di purificazione, all'automazione delle metodiche ed alla messa a punto dei parametri di acquisizione dello Spettrometro di Massa MALDI-TOF, come descritto nella sezione dei materiali e metodi, è stato possibile ottenere profili spettrali ricchi di segnali sia per quanto concerne l'analisi proteomica dei fluidi amniotici, sia per quanto concerne l'analisi delle urine.

La riproducibilità della metodica tra diverse purificazioni di uno stesso campione e tra depositi multipli dello stesso purificato ($n=4$) è stata valutata utilizzando i fluidi biologici di 3 soggetti controllo. Al fine di verificare che la riproducibilità dei dati analitici non fosse in funzione dell'intervallo di massa (m/z) considerato, per ogni tipo di fluido biologico sono stati scelti tre segnali in regioni spettrali differenti e per ognuno sono stati calcolati la deviazione standard (StdDev) ed il coefficiente di variazione (CV) interpurificazione e interdeposito (Tab 4.1 e 4.2).

A				
CAMPIONE	m/z	Ave	StdDev	CV
1	1424	32.15	2.6	8%
	3316	42.89	6.85	16%
	5085	5.31	1.01	18%
2	1424	35.08	1.79	5%
	3316	36.45	8.14	24%
	5085	6.68	1.33	19%
3	1424	29.29	3.45	12%
	3316	34.23	6.91	20%
	5085	7.58	0.73	9%

B				
CAMPIONE	m/z	Ave	StdDev	CV
1	1424	32.24	3.04	9%
	3316	42.57	7.28	17%
	5085	5.29	1.36	25%
2	1424	37.36	5.64	15%
	3316	36.16	6.42	17%
	5085	7.03	1.19	16%
3	1424	32	1.28	4%
	3316	35.2	6.06	17%
	5085	8.41	0.46	5%

Tab. 4.1: Coefficienti di variazione calcolati su due purificazioni dello stesso campione (pannello A) e su depositi multipli ($n = 4$) della stessa purificazione (pannello B) su campioni di fluido amniotico.

A				
CAMPIONE	m/z	Ave	StdDev	CV
1	1770	89.86	3.72	4%
	3727	10.4	0.94	9%
	6138	4.62	0.19	4%
2	1770	27.57	2.69	10%
	3727	11.86	1.66	14%
	6138	3.31	0.47	14%
3	1770	109.57	8.34	8%
	3727	11.8	2.17	18%
	6138	2.18	0.4	18%

B				
CAMPIONE	m/z	Ave	StdDev	CV
1	1770	92.45	4.02	4%
	3727	10.45	1.52	14%
	6138	5.19	0.91	17%
2	1770	27.66	2.67	10%
	3727	12.08	1.76	15%
	6138	11.97	1.36	11%
3	1770	110.43	8.09	7%
	3727	11.75	2.68	22%
	6138	2.76	0.43	15%

Tab. 4.2: Coefficienti di variazione calcolati su due purificazioni dello stesso campione (pannello A) e su depositi multipli (n = 4) della stessa purificazione (pannello B) su campioni di urina.

RISULTATI PROGETTO pPROM

4.2.1 Dati clinici

Nello studio sono state reclutate 35 pazienti: 10 casi con diagnosi di rottura prematura pretermine delle membrane amniocoriali precedente la 34a settimana di età gestazionale (pPROM, gruppo 1), 9 casi con diagnosi di rottura prematura delle membrane amniocoriali con età gestazionale maggiore di 37 settimane (PROM, gruppo 2) ed, infine, 16 casi controllo, rappresentati da donne sottoposte ad amniocentesi genetica fra la 16a e la 18a settimana di età gestazionale (gruppo 3).

Nel gruppo 1 l'età materna media era 34 ± 6.8 anni, 6 donne su 10 erano nullipare, 7 su 10 caucasiche, 1 africana, 1 asiatica ed 1 sudamericana. L'età gestazionale media al parto era di 30.9 ± 4.2 settimane, mentre il tempo di latenza al parto era di circa 10.1 ± 8.8 giorni. Tre donne su dieci hanno partorito mediante taglio cesareo, sei per parto spontaneo, in un solo caso il parto è stato indotto da prostaglandine.

Nel gruppo 2 l'età materna media era di 31.5 ± 5.5 anni e 6 donne su 9 erano nullipare. L'età gestazionale media al parto era di 39.1 ± 1.2 . Tutte le donne erano di origine italiana ad eccezione di una donna sudamericana. Tutte le donne hanno partorito per parto spontaneo.

Infine, il gruppo 3 era costituito da donne con un'età media di 37.3 ± 2.1 anni. L'età gestazionale media all'analisi era 17.2 ± 0.8 settimane. I cariotipi risultanti dall'amniocentesi erano 46 XX in 12 casi e 46 XY in 4 casi. Una sola paziente fra le 16 in studio ha partorito prematuramente (33.6 settimane EG), mentre le restanti hanno avuto un parto a termine.

Tutte le pazienti con diagnosi di pPROM sono state trattate con terapia antibiotica con Amoxicillina ed Acido Clavulanico. Il ciclo completo di terapia cortisonica con Betametasone per la maturazione del polmone fetale è stato eseguito su 7 pazienti. Tutte le pazienti con diagnosi di PROM hanno ricevuto terapia antibiotica con

Ampicillina. Tutte le terapie sono state somministrate dopo il campionamento del fluido amniotico.

4.2.2 Analisi proteomica

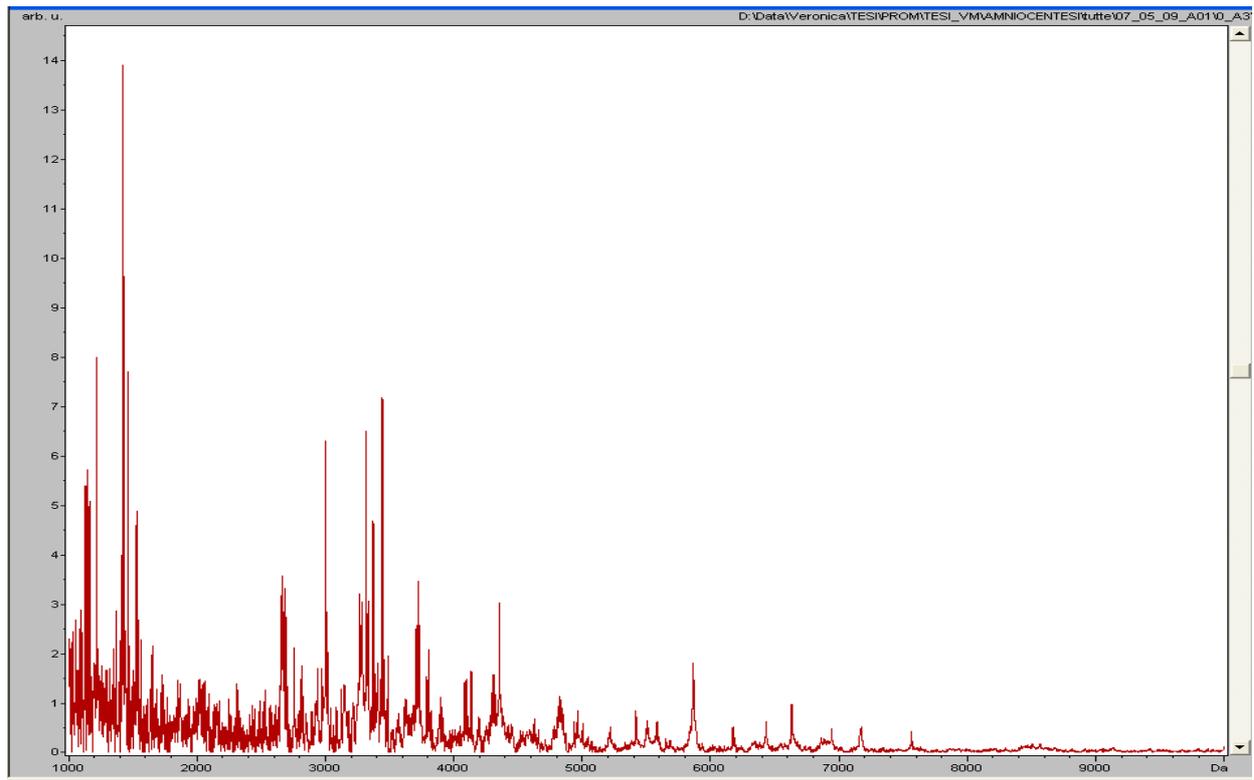
Il liquido amniotico raccolto dalle pazienti è stato analizzato tramite Spettrometria di massa MALDI-TOF dopo prefrazionamento mediante tecnica ClinProt con biglie ad interazione idrofobica MB HIC-C8. Gli spettri così ottenuti sono stati poi confrontati con l'ausilio del software ClinProTools.

Per effettuare il confronto degli spettri ottenuti dalle diverse classi in studio è stato costruito per ogni classe uno spettro medio, rappresentativo della classe in studio. Mediante il software ClinProTools è possibile visualizzare una “Pseudogel View”, ovvero un'immagine virtuale simulante un gel monodimensionale in cui gli spettri di ogni campione sono riportati sull'asse delle Y, i valori m/z sull'asse delle X e l'intensità del segnale è riportata in scala di grigio.

4.2.2.1 Definizione dello spettro medio nelle 3 classi in studio

L' omogeneità del pool di campioni studiati risultava accettabile, così come la riproducibilità della metodica, pertanto è stato possibile ottenere uno spettro medio per ognuna delle classi in studio, nel range di massa da 1000 a 10000 m/z , in modalità lineare per ciascuna delle tre popolazioni (Fig 4.1, 4.2, 4.3).

A



B

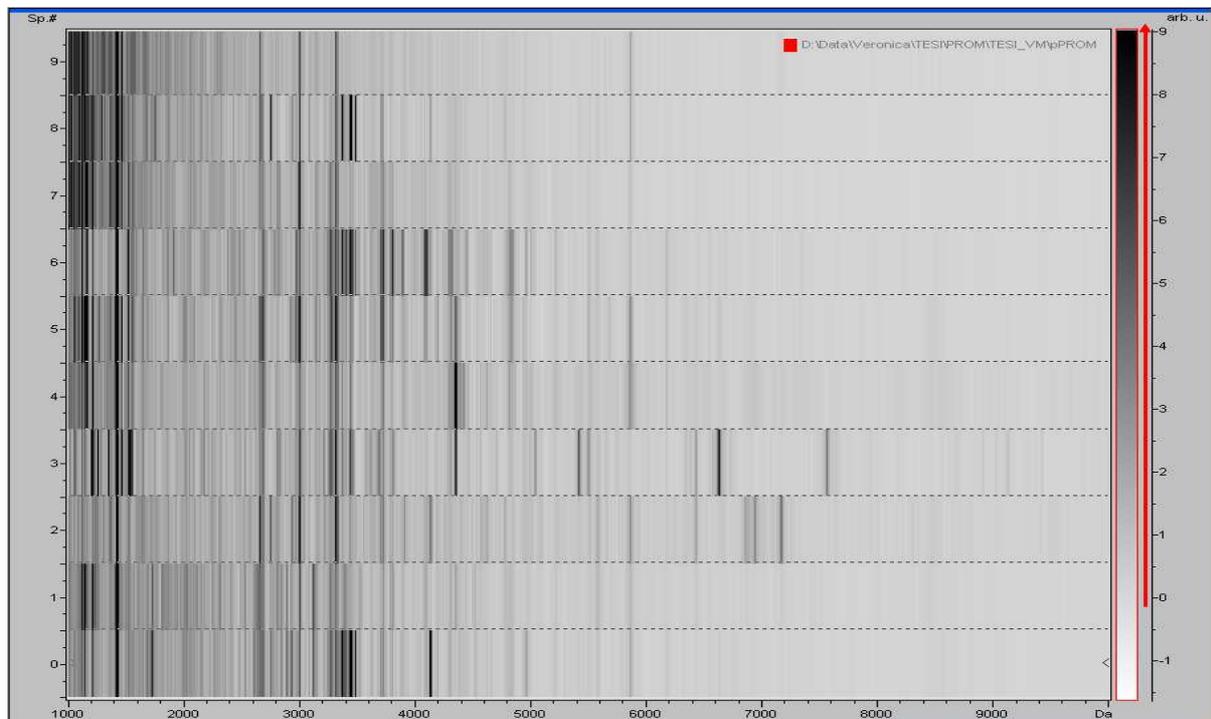
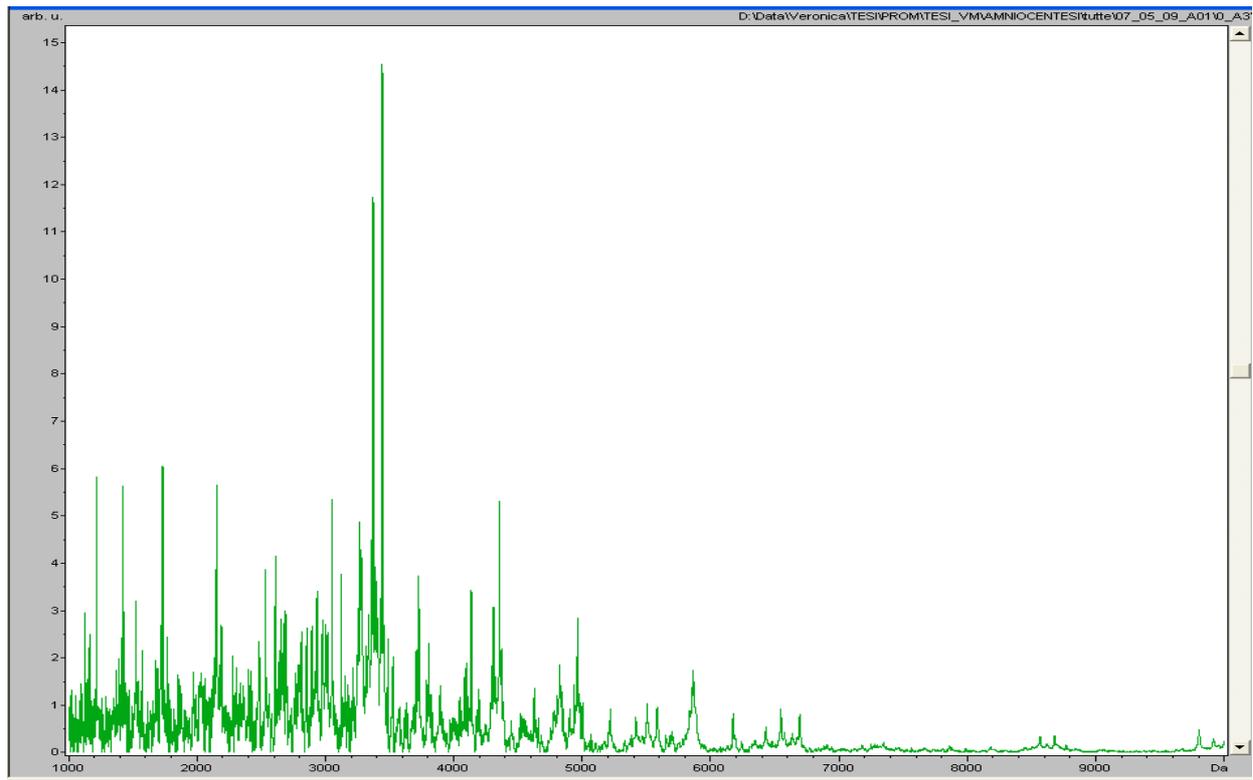


Fig. 4.1: Spectra View (pannello A) e Pseudogel View (pannello B) del profilo proteico medio del fluido amniotico del gruppo 1.

A



B

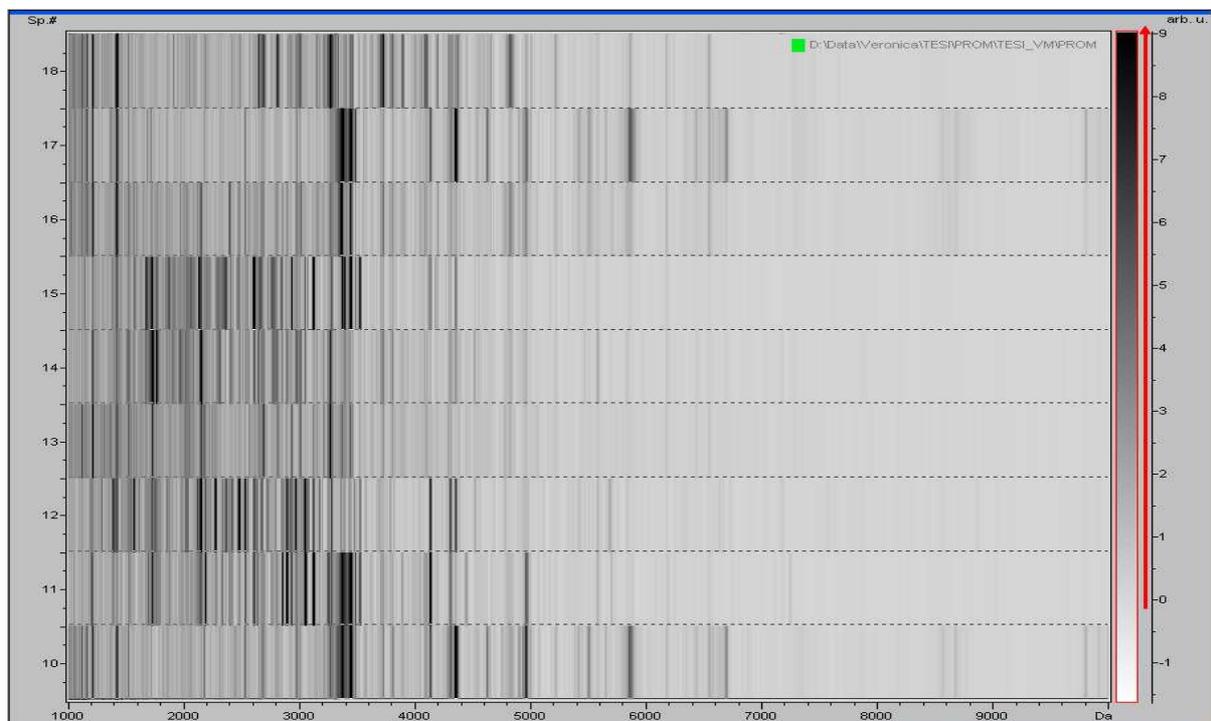
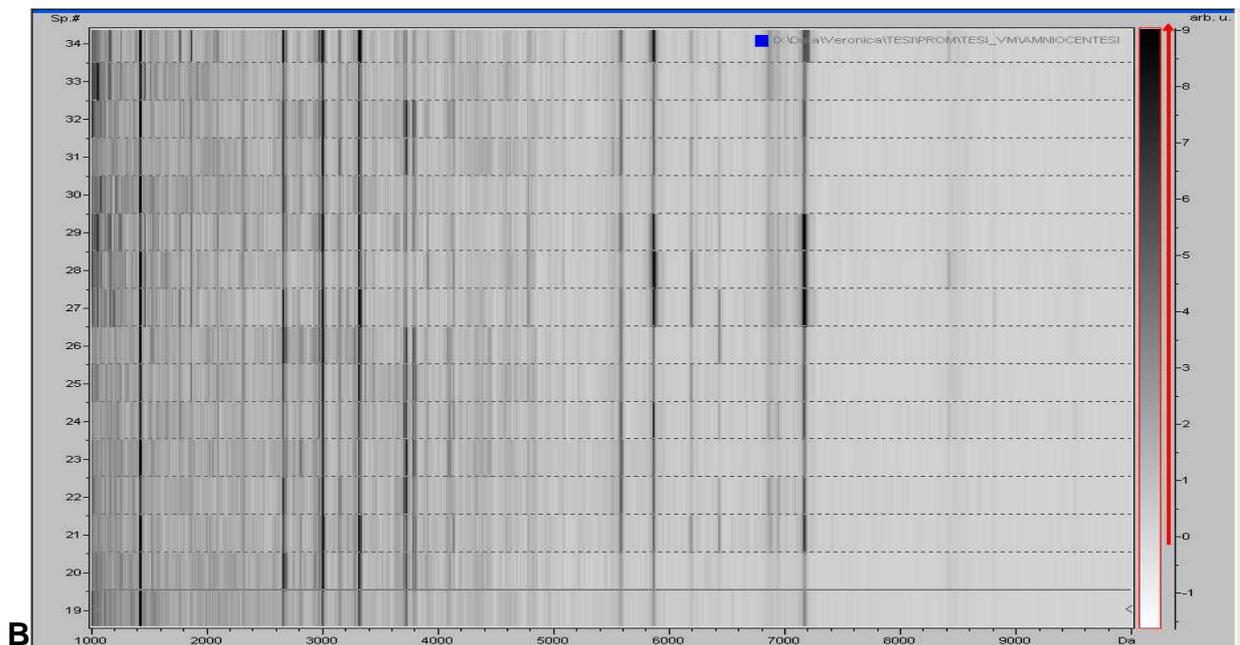
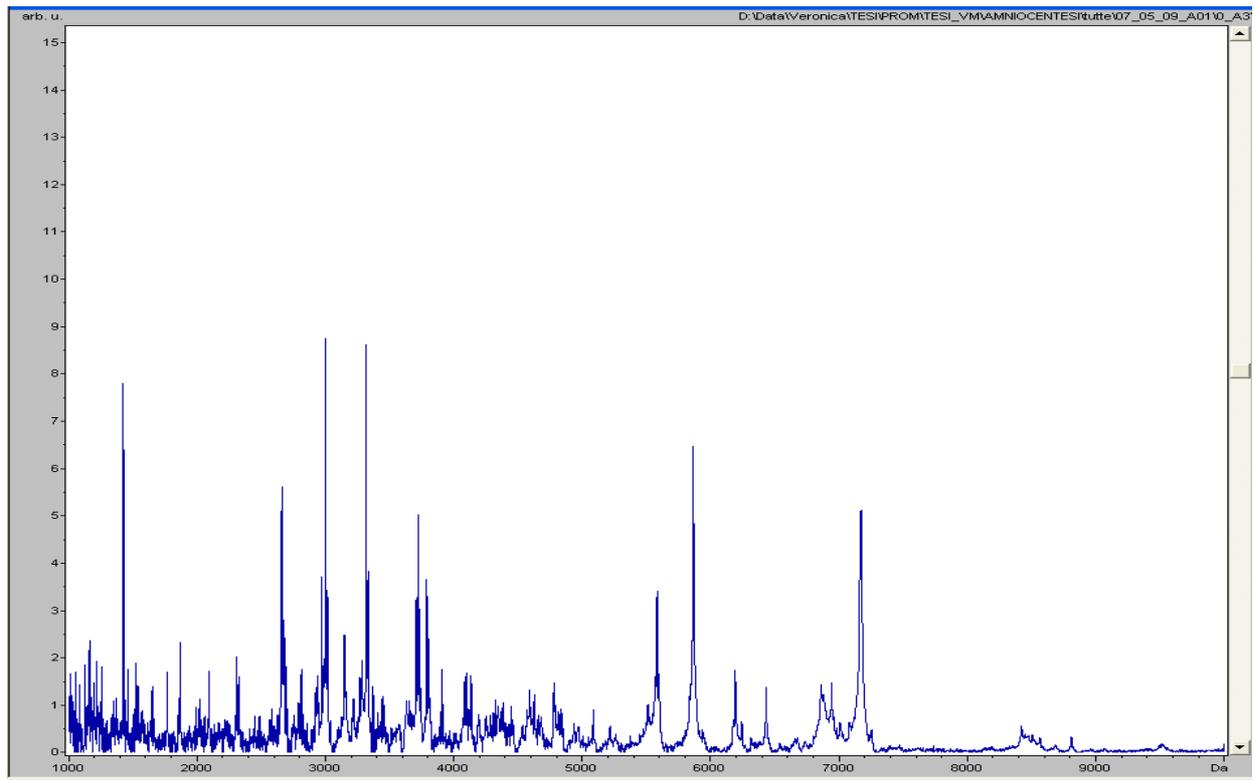


Fig. 4.2: Spectra View (pannello A) e Pseudogel View (pannello B) del profilo proteico medio del fluido amniotico del gruppo 2.

A



B

Fig. 4.3: Spectra View (pannello A) e Pseudogel View (pannello B) del profilo proteico medio del fluido amniotico del gruppo 3.

4.2.2.2 Confronto fra le popolazioni in studio

Confrontando i profili proteici medi dei tre gruppi in studio mediante il software ClinProTools, sono stati rilevati 71 segnali e sono state individuate numerose differenze statisticamente significative tra le diverse popolazioni (Tab 4.2).

Index	Mass	DAve	PTTA	PWKW	PAD	Ave1	Ave2	Ave3	StdDev1	StdDev2	StdDev3	CV1	CV2	CV3
46	5568.81	1.43	< 0.000001	0.000048	0.000751	0.69	0.62	2.05	0.26	0.14	0.36	37.7	22.88	17.65
47	5582.58	2.84	< 0.000001	0.000048	0.000289	0.96	1.17	3.8	0.38	0.39	0.96	39.81	33.11	25.35
15	3000.93	6.21	< 0.000001	0.0000485	0.337	7.17	3.43	9.64	1.84	1.07	2.02	25.74	31.11	20.93
59	6880.78	1.34	< 0.000001	0.0000494	0.000434	0.56	0.32	1.66	0.5	0.13	0.46	88.31	40.23	27.39
58	6859.29	1.54	< 0.000001	0.0000485	0.000209	0.55	0.25	1.79	0.57	0.1	0.54	105.35	39.46	30.21
48	5597.18	1.47	< 0.000001	0.000048	0.002	0.66	0.63	2.1	0.33	0.15	0.56	50.11	24.2	26.82
60	6927.7	0.98	< 0.000001	0.0000538	0.00133	0.47	0.23	1.21	0.41	0.08	0.35	87.44	35.51	28.68
62	7008.76	0.82	< 0.000001	0.0000485	0.00153	0.39	0.24	1.06	0.25	0.06	0.29	62.89	22.72	26.94
52	6241.13	0.68	< 0.000001	0.000048	0.0292	0.38	0.44	1.07	0.18	0.1	0.25	48.18	22.72	23.58
63	7167.87	5.23	< 0.000001	0.000048	0.00000688	0.77	0.36	5.59	1.19	0.12	1.95	155.62	33.71	34.8
61	6940.59	1.51	< 0.000001	0.0000767	0.000317	0.72	0.27	1.77	1.07	0.08	0.57	148.67	31.21	32.15
19	3316.56	6.28	0.00000162	0.0000843	0.748	7.41	3	9.27	2.51	1.19	2.69	33.91	39.7	28.98
69	8809.63	0.37	0.00000301	0.000048	0.164	0.22	0.19	0.56	0.12	0.09	0.15	54.43	46	26.83
5	1424.25	9.42	0.0000532	0.0000875	0.00177	15.94	6.52	8.99	3.83	1.98	2.77	24	30.29	30.84
51	6190.43	1.58	0.0000543	0.000048	0.000134	0.51	0.58	2.1	0.2	0.14	0.94	39.12	23.32	44.79
66	8504.02	0.35	0.0000543	0.0000661	0.0442	0.32	0.29	0.64	0.18	0.15	0.11	55.8	51.36	16.77
65	8420.44	0.67	0.0000942	0.000048	0.00266	0.27	0.21	0.88	0.16	0.09	0.41	57.8	44.7	46.65
10	2659.62	3.33	0.000167	0.000257	0.594	4.51	3.16	6.49	1.25	1.29	1.45	27.67	40.7	22.34
36	4778.82	1.09	0.000167	0.000206	0.18	0.97	1.22	2.06	0.36	0.43	0.58	36.88	34.85	28.19
4	1215.63	6.03	0.000211	0.0000485	0.000489	9.14	6.78	3.11	3.67	2.1	0.73	40.17	31.03	23.58

Tab. 4.2: Peak Statistic Report. Sono riportati i primi 20 segnali differentemente espressi (p-value < 0.05, ANOVA test) nelle tre classi in studio.

Mass = rapporto massa/carica del segnale

DAve = differenza tra le intensità medie delle popolazioni in esame

PTTA = p-value secondo il test Anova

PWKW = p-value secondo il test Kruskal Wallis

PAD = p-value secondo il test Anderson-Darling

Ave 1 = intensità media del gruppo 1 (pPROM)

Ave 2 = intensità media del gruppo 2 (PROM)

Ave 3 = intensità media del gruppo 3 (Amniocentesi)

StdDev 1 = deviazione standard del gruppo 1 (pPROM)

StdDev 2 = deviazione standard del gruppo 2 (PROM)

StdDev 3 = deviazione standard del gruppo 3 (Amniocentesi)

Il software ha permesso inoltre la selezione di due segnali in grado di discriminare le popolazioni in oggetto (Fig 4.4).

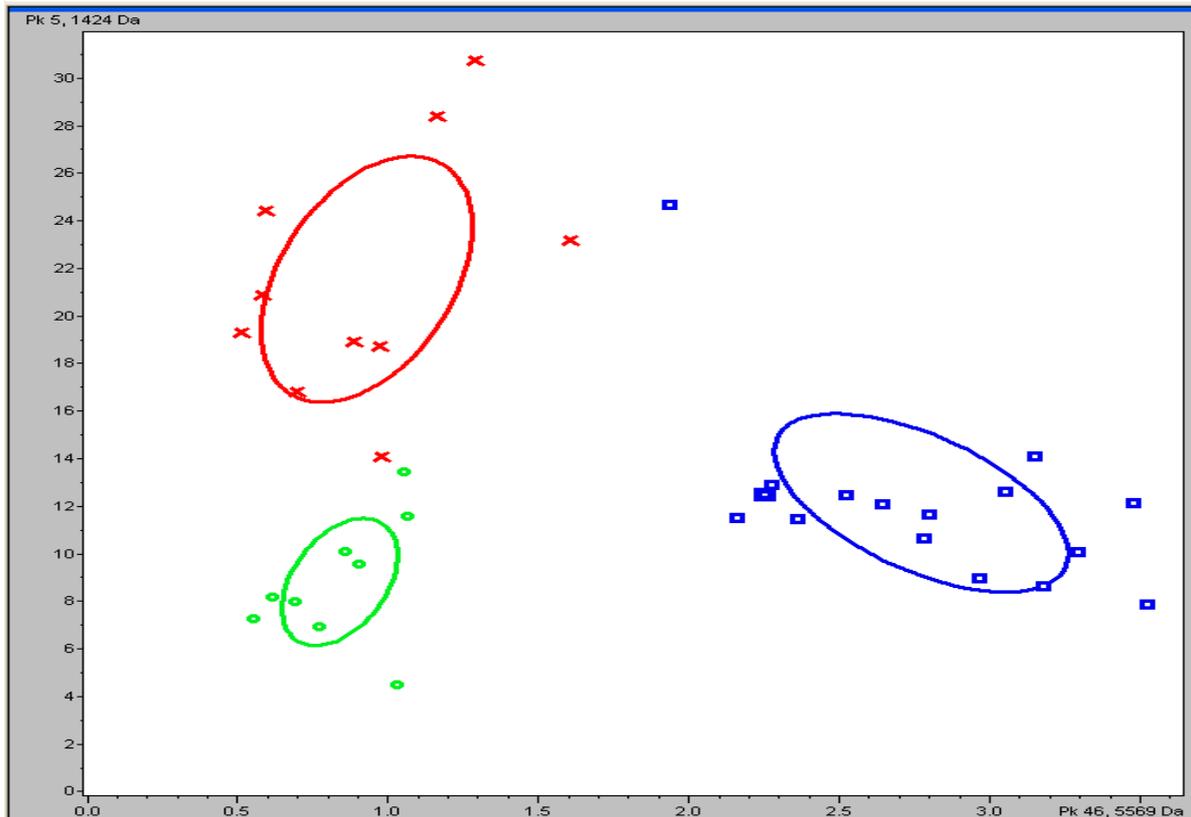


Fig. 4.4: Separazione delle tre classi in studio mediante 2D Peak distribution view.

4.2.2.3 Biomarker discovery

Di particolare interesse per la definizione di potenziali biomarcatori per la pPROM è il confronto tra la popolazione del gruppo 1 (pPROM) e del gruppo 2 (PROM).

Dalla sovrapposizione dei due profili spettrali medi e dall'indagine statistica emergono differenze significative.

In primo luogo dal confronto degli spettri medi ottenuti dalle due classi si nota che sono presenti numerosi picchi la cui espressione è diversa e statisticamente significativa fra le due classi (Tab 4.3).

Considerata la notevole complessità dei profili proteici medi delle due classi in esame la biomarker discovery è stata condotta con il supporto dell'algoritmo genetico (GA).

E' stato inoltre osservato che la modifica di alcuni parametri, sia nel pre-trattamento degli spettri (soglia segnale/rumore, smoothing e sottrazione della linea di base) che

Index	Mass	DAve	PTTA	PWKW	PAD	Ave1	Ave2	StdDev1	StdDev2	CV1	CV2
6	1423.92	9.47	0.00336	0.0015	0.364	16	6.52	4.05	1.98	25.35	30.29
15	3001.07	3.82	0.00753	0.002	0.248	7.25	3.43	1.94	1.07	26.75	31.11
19	3316.71	4.56	0.0139	0.0015	0.122	7.55	2.98	2.62	1.18	34.74	39.43
1	1123.55	2.94	0.0302	0.0485	0.263	7.01	4.07	1.87	1.3	26.69	31.84
5	1407.4	1.88	0.094	0.0968	0.734	5.45	3.56	1.49	0.93	27.34	25.97
21	3356.67	3.08	0.17	0.0338	0.000794	2.04	5.12	0.63	2.95	30.95	57.58
2	1141.35	4.39	0.176	0.0485	0.00116	7.29	2.9	4.38	0.72	60.07	24.93
8	1522.43	2.04	0.243	0.178	0.00367	6.32	4.28	2.24	0.66	35.41	15.45
3	1161.6	3	0.244	0.24	0.187	6.7	3.69	3.57	1.92	53.34	52.08
12	2530.87	2.27	0.244	0.208	0.00184	2.37	4.64	0.69	2.92	29.06	62.99
23	3389.77	2	0.244	0.191	0.067	2.87	4.87	1.41	2.39	49.24	49.08
46	4963.52	1.83	0.244	0.178	0.000332	1.25	3.08	0.62	2.28	49.67	74.01
25	3426.17	1.54	0.244	0.0968	0.0303	2.44	3.98	1.12	1.75	45.8	43.87
36	4308.93	1.21	0.244	0.191	0.361	2.21	3.42	0.89	1.34	40.32	39.07
58	6546.91	0.6	0.244	0.298	0.0019	0.53	1.13	0.24	0.68	45.58	60.59
45	4937.23	0.71	0.292	0.24	0.000419	0.96	1.67	0.28	0.97	28.99	57.99
47	4978.11	0.7	0.298	0.331	0.000902	0.82	1.52	0.23	0.98	28.43	64.8
4	1215.69	2.73	0.31	0.434	0.308	9.51	6.78	3.69	2.1	38.79	31.03
11	2151.85	4.45	0.318	0.24	0.0000083	2.48	6.93	0.59	6.73	23.94	97.12
16	3050.65	4.8	0.376	0.23	< 0.000001	1.47	6.27	0.31	7.83	21.37	124.89
7	1463.07	6.75	0.401	0.208	< 0.000001	9.48	2.73	12.46	0.38	131.46	14.05
22	3371.23	6.47	0.401	0.543	0.00305	5.94	12.4	5.38	10.68	90.65	86.12

Tab. 4.3: Peak Statistic Report. Sono riportati i primi 20 segnali differentemente espressi (p-value < 0.05) nelle due classi in studio.

Mass = rapporto massa/carica del segnale

DAve = differenza tra le intensità medie delle popolazioni in esame

PTTA = p-value secondo il T test

PWKW = p-value secondo il test Wilcoxon

PAD = p-value secondo il test Anderson-Darling

Ave 1 = intensità media del gruppo 1 (pPROM)

Ave 2 = intensità media del gruppo 2 (PROM)

StdDev 1 = deviazione standard del gruppo 1 (pPROM)

StdDev 2 = deviazione standard del gruppo 2 (PROM)

nell'utilizzo degli algoritmi di analisi multivariata, influenzava significativamente l'individuazione del pattern di segnali in grado di discriminare le due classi. Sono stati quindi impostati dei valori che ottimizzassero il numero di picchi calcolati, purché mantenessero un'adeguata risoluzione ed intensità. Gli spettri sono stati quindi sottoposti ad una sottrazione della linea di base di tipo "top hat" al 10% ed i segnali sono stati sottoposti a "smoothing" (Savitsky Golay), impostando la soglia del rapporto segnale/rumore a 5.

L'analisi statistica e manuale degli spettri in studio ha evidenziato numerosi segnali utilizzabili come potenziali biomarcatori fra le due classi ma l'algoritmo GA ha indicato in

particolare 3 segnali di interesse a m/z 1428, m/z 3001 e m/z 3316. Tali segnali sono in grado di discriminare le due popolazioni in studio come emerge dalle 2D Peak distribution view a seguito riportate (Fig. 4.5).

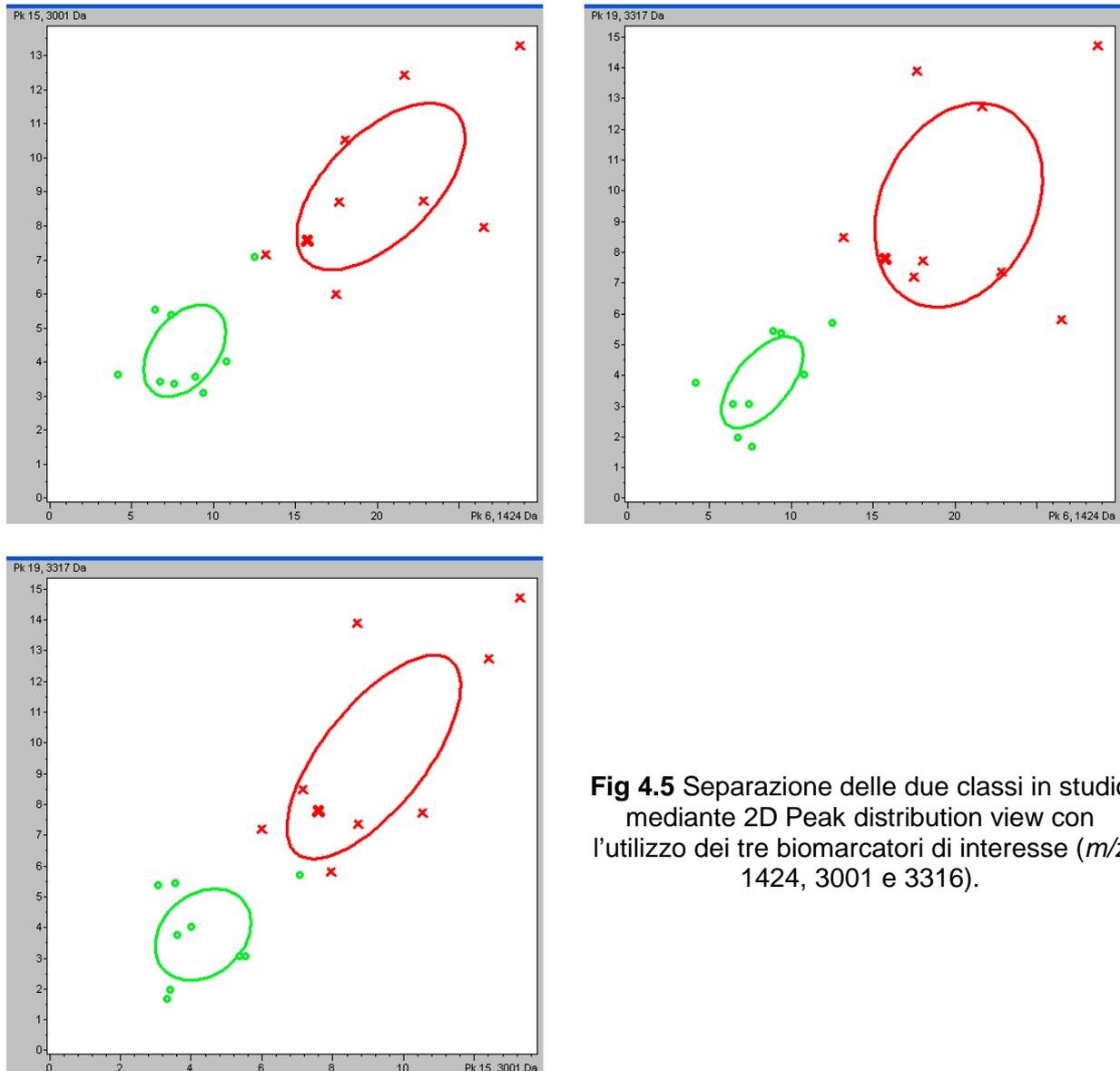


Fig 4.5 Separazione delle due classi in studio mediante 2D Peak distribution view con l'utilizzo dei tre biomarcatori di interesse (m/z 1424, 3001 e 3316).

I tre segnali individuati come potenziali biomarcatori erano up-regolati nel gruppo delle pazienti con diagnosi di pPROM (Fig 4.6).

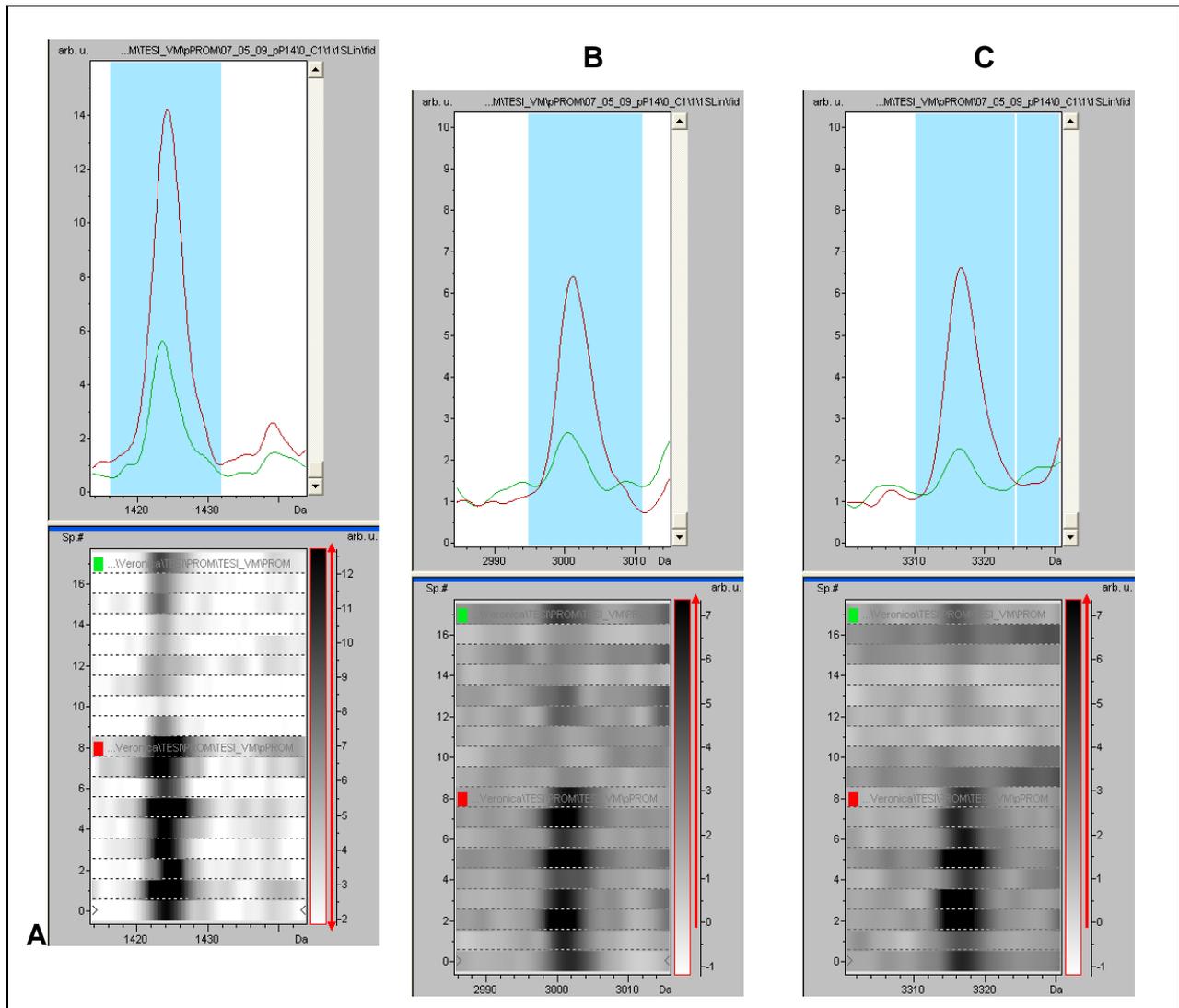


Fig. 4.6: Potenziali biomarcatori di pPROM. Per ogni segnale di interesse (m/z 1428, m/z 3001 ed m/z 3316) sono riportati lo spettro medio delle due classi a confronto e la Pseudogel view.

Infine è stata effettuata l'analisi delle curve ROC sui 3 segnali di interesse per valutarne la capacità discriminante. I valori di AUC per i segnali a m/z 1428 e 3316 erano pari a 1, per il segnale ad m/z 3001 era invece pari a 0,98. Tali risultati indicano un'elevata sensibilità e specificità per questi ioni.

Per ottenere la massa accurata dei marker di interesse e per escludere la presenza di due picchi contigui e non risolti in modalità lineare, la massa esatta dei peptidi di interesse è stata individuata mediante MALDI-TOF MS in modalità reflectron prima dell'analisi degli eluati mediante LC-ESI MS/MS. Le masse accurate dei tre marker sono state utilizzate per identificare i corrispondenti picchi cromatografici nella successiva analisi LC-ESI MS/MS per la caratterizzazione dei biomarcatori.

4.2.2.4 Caratterizzazione delle molecole di interesse

Con lo scopo di caratterizzare i 3 segnali di interesse, potenziali marcatori della pPROM, sono stati iniettati in HPLC-ESI MS/MS gli eluati dei fluidi amniotici ottenuti dopo purificazione ClinProt e non utilizzati per l'analisi MALDI-TOF.

Successivamente, i risultati ottenuti sono stati sottoposti al motore di ricerca MASCOT, che utilizza i dati provenienti dalla spettrometria di massa ed effettua un confronto con le banche dati delle sequenze proteiche primarie.

Mediante HPLC-ESI MS/MS è stato possibile identificare il peptide a m/z 1426.8 (Fig 4.7).

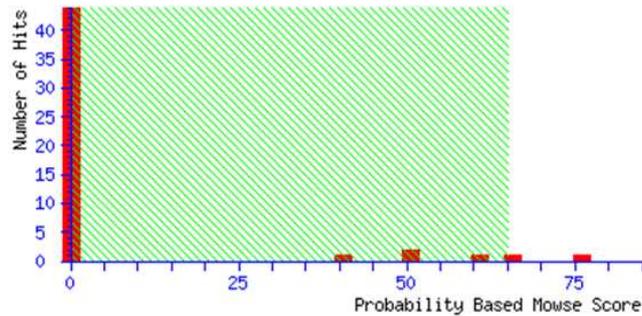
La sequenza di tale peptide corrisponde al frammento Gly₄₅₂LAVPDG₄₆₆PLGLPPKPro₄₆₆ della proteina codificata dal gene KIAA1522 ed espressa soprattutto dal cervello e dal fegato fetali (Fig 4.8).

Lo stesso risultato è stato inoltre confermato dall' analisi LC-ESI dei liquidi amniotici prelevati mediante amniocentesi invasiva nel gruppo 3.



Probability Based Mowse Score

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 65 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Peptide Summary Report

Format As [Help](#)

Significance threshold $p <$ Max. number of hits

Standard scoring MudPIT scoring Ions score or expect cut-off Show sub-sets

Show pop-ups Suppress pop-ups Sort unassigned Require bold red

Error tolerant

1. [gi|1160395559](#) Mass: 107030 Score: 76 Queries matched: 2 emPAI: 0.03

Uncharacterized protein KIAA1522

Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 60	714.44	1426.87	1426.82	0.05	0	76	0.005	1	R.GLAVFDGPLGLPFPK.E
121	870.82	2609.44	2609.20	0.24	0	38	33	2	S.EGQPESSTASNSVVPFPQGGSGRGSPSG.G

Fig. 4.7: Identificazione del biomarcatore a m/z 1426.8 mediante MASCOT.

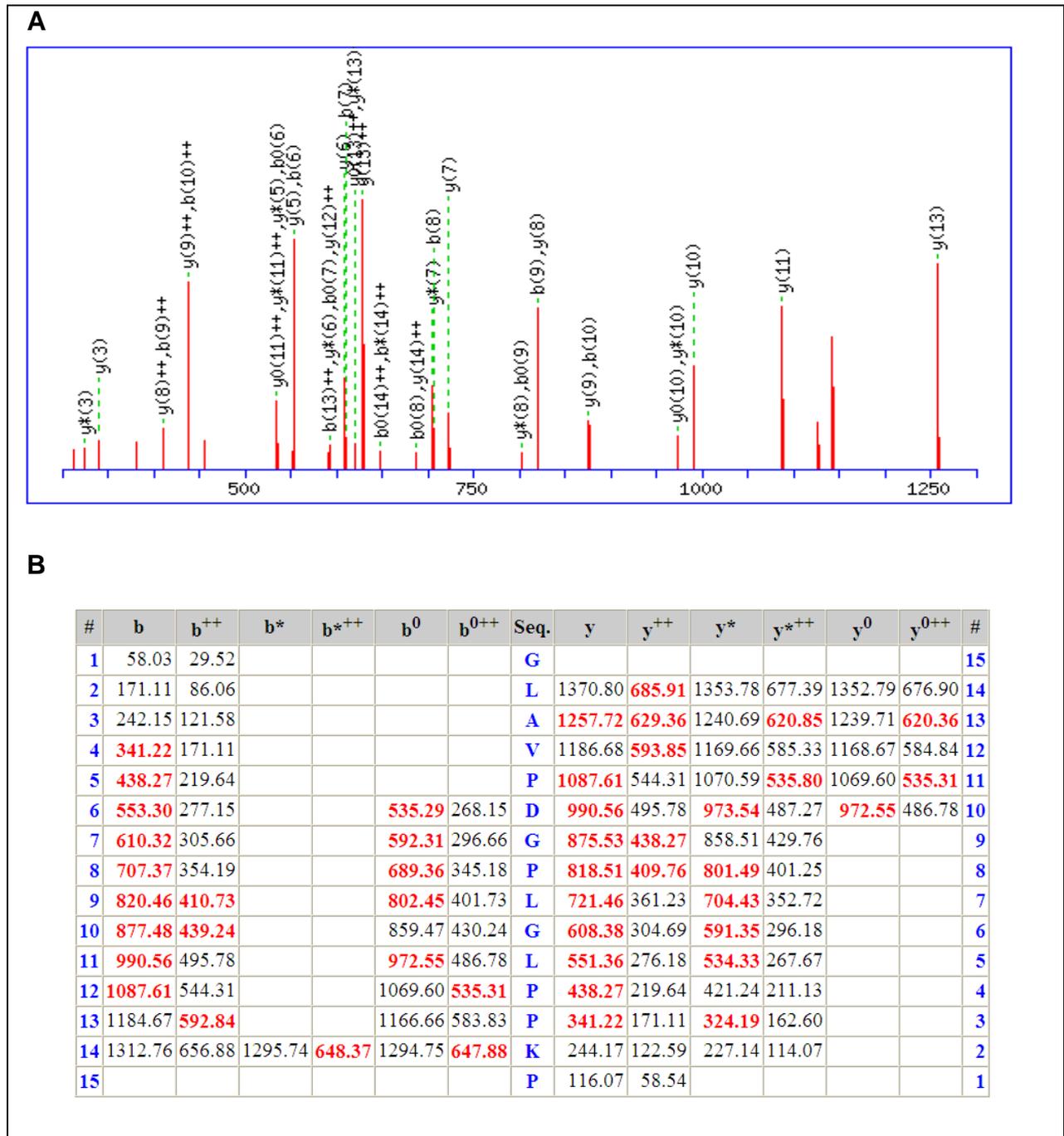


Fig. 4.8: Identificazione del frammento a m/z 1426.8 della proteina KIAA1522. Pannello A: spettro MS/MS. Pannello B: tabella degli ioni frammento attesi per il peptide. In rosso sono riportati gli ioni identificati mediante lo spettro MS/MS ottenuto dall'analisi LC-ESI MS/MS.

Poiché una delle pazienti incluse nel gruppo delle pPROM era stata precedentemente sottoposta ad amniocentesi genetica (paziente n. 5, gruppo 3) abbiamo confrontato il profilo proteico rilevato all' amniocentesi con il profilo medio delle pazienti del gruppo 1. Come si evince dall'analisi della Pseudogel View, in cui sono riportati i campioni dei gruppi 1 e 3, il segnale relativo al frammento di KIAA1522 è presente già alla 16a settimana gestazionale nella paziente considerata (Fig. 4.9).

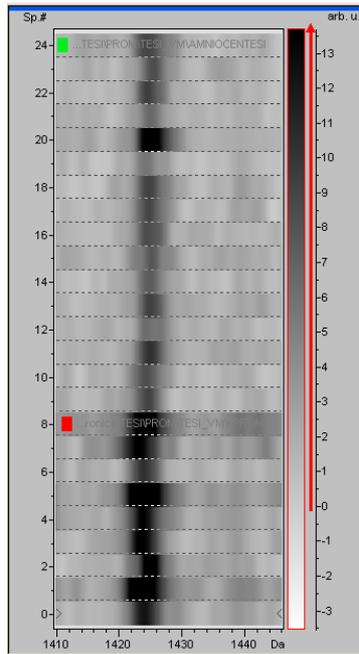


Fig. 4.9: Confronto fra le pseudo gel view del gruppo di pazienti con pPROM (rosso) e delle pazienti sottoposte ad amniocentesi genetica (verde).

Inoltre, rispetto a questo risultato è interessante notare come anche nella 2D Distribution View, dove le classi sono separate tramite i segnali a m/z 1428 e 5589 (Fig. 4.4), un campione tra il gruppo delle amniocentesi, che corrisponde al numero 5, si accosti maggiormente al gruppo delle pPROM.

RISULTATI PROGETTO HIGHCaRe

4.3.1 Dati clinici

Nello studio sono stati reclutati 47 soggetti, 32 uomini e 15 donne, che vivono normalmente a bassa quota (tra 0 e 500 mt slm); 10 di questi soggetti erano alpinisti esperti. Le caratteristiche della popolazione in studio sono riportate in tabella 4.4.

ID	RANDOMIZZAZIONE	SESSO	ETA':	ALTEZZA:	PESO:	BSA:	BMI:
A01	FARMACO	M	48	180	74,0	1,93	22,84
A02	FARMACO	F	39	165	75,0	1,82	27,55
A03	PLACEBO	M	37	170	64,0	1,74	22,15
A04	FARMACO	M	54	180	70,0	1,89	21,60
A05	PLACEBO	M	41	170	63,0	1,73	21,80
A06	FARMACO	M	62	176	93,0	2,09	30,02
A07	PLACEBO	M	49	169	69,0	1,79	24,16
A08	PLACEBO	M	43	182	70,0	1,90	21,13
A09	FARMACO	M	42	182	80,0	2,01	24,15
A10	PLACEBO	M	30	176	68,0	1,83	21,95
E01	FARMACO	M	57	183	94,0	2,16	28,07
E02	PLACEBO	M	52	170	90,0	2,01	31,14
E03	PLACEBO	M	34	178	69,0	1,86	21,78
E04	PLACEBO	M	31	180	63,0	1,80	19,44
E05	PLACEBO	F	35	162	55,0	1,58	20,96
E06	PLACEBO	F	33	173	62,0	1,74	20,72
E07	FARMACO	M	39	176	75,0	1,91	24,21
E08	FARMACO	F	33	150	48,0	1,41	21,33
E09	PLACEBO	M	29	186	60,0	1,81	17,34
E10	PLACEBO	F	29	154	54,0	1,51	22,77
E11	PLACEBO	M	51	180	76,0	1,95	23,46
E12	PLACEBO	F	30	168	50,0	1,56	17,72
E13	PLACEBO	M	32	170	74,0	1,85	25,61
E14	FARMACO	F	26	160	48,0	1,48	18,75
E15	PLACEBO	M	46	175	56,0	1,68	18,29
E16	FARMACO	M	44	177	72,0	1,89	22,98
E17	FARMACO	F	50	156	55,0	1,53	22,60
E18	FARMACO	M	47	178	69,0	1,86	21,78
E19	PLACEBO	F	47	165	60,0	1,66	22,04
E20	FARMACO	F	34	160	54,0	1,55	21,09
E21	FARMACO	M	33	167	63,0	1,71	22,59
E22	PLACEBO	F	30	165	56,0	1,61	20,57
E23	PLACEBO	M	41	175	79,0	1,95	25,80
E24	FARMACO	M	32	185	92,0	2,16	26,88
E25	FARMACO	M	37	183	77,0	1,99	22,99
E26	FARMACO	M	25	185	78,0	2,01	22,79
E27	PLACEBO	M	35	174	74,0	1,88	24,44
E28	FARMACO	M	40	185	89,0	2,13	26,00
E29	FARMACO	F	54	170	57,0	1,66	19,72
E30	PLACEBO	M	68	170	68,0	1,79	23,53
E31	PLACEBO	M	35	168	58,0	1,66	20,55
E32	FARMACO	F	26	162	52,0	1,54	19,81
E33	PLACEBO	F	41	167	56,0	1,62	20,08
E34	FARMACO	M	58	180	79,0	1,99	24,38
E35	FARMACO	M	36	185	85,0	2,09	24,84
E36	PLACEBO	M	52	180	82,0	2,02	25,31
E37	FARMACO	F	47	164	62,0	1,67	23,05

Tab. 4.4: Caratteristiche dei soggetti arruolati nello studio HIGHCaRe. BSA= body surface area BMI=body mass index

L'età media della popolazione era 40.7 ± 10.2 anni, 36.9 ± 8.9 anni per le donne, 42.5 ± 10.4 anni per gli uomini.

E' stata effettuata una randomizzazione in cieco per l'assegnazione del trattamento a farmaco o placebo e 23 soggetti sono stati sottoposti a trattamento con farmaco (15 uomini e 8 donne) Telmisartan (80 mg/die).

Tutti i pazienti sono stati sottoposti alla stessa dieta durante il periodo di permanenza in quota.

4.3.2 Analisi proteomica

Le urine raccolte dai soggetti in studio sono state analizzate mediante Spettrometria di massa MALDI-TOF dopo prefrazionamento tramite tecnica ClinProt con biglie ad interazione idrofobica MB HIC-C8. Gli spettri così ottenuti sono stati poi confrontati con l'ausilio del software ClinProTools.

Per effettuare il confronto degli spettri ottenuti dalle diverse classi in studio è stato costruito per ogni classe uno spettro medio, rappresentativo della classe in studio. Inoltre, per valutare tutti gli spettri in analisi, mediante il software ClinProTools, è stato possibile visualizzare una "Pseudogel View", ovvero un'immagine virtuale simulante un gel monodimensionale in cui gli spettri di ogni campione sono riportati sull'asse delle Y, i valori m/z sull'asse delle X e l'intensità del segnale è riportata in scala di grigio.

4.3.2.1 Effetto del farmaco sul proteoma urinario a livello del mare

Sono stati valutati potenziali effetti determinati dalla somministrazione del farmaco sul proteoma urinario a livello del mare.

In particolare, sono stati selezionati e confrontati gli spettri medi ottenuti ai tempi T0 e T1 (prima del trattamento e dopo 6 settimane di trattamento) dai 23 pazienti assegnati al trattamento farmacologico.

L'analisi degli spettri e l'analisi statistica sono state condotte mediante ClinProTools ed hanno dimostrato che nessun segnale era statisticamente significativo, ovvero diversamente intenso, fra le due classi (Fig.4.10). Il trattamento con Telmisartan, quindi, non determinava alcuna alterazione del proteoma urinario a livello del mare nei soggetti in studio.

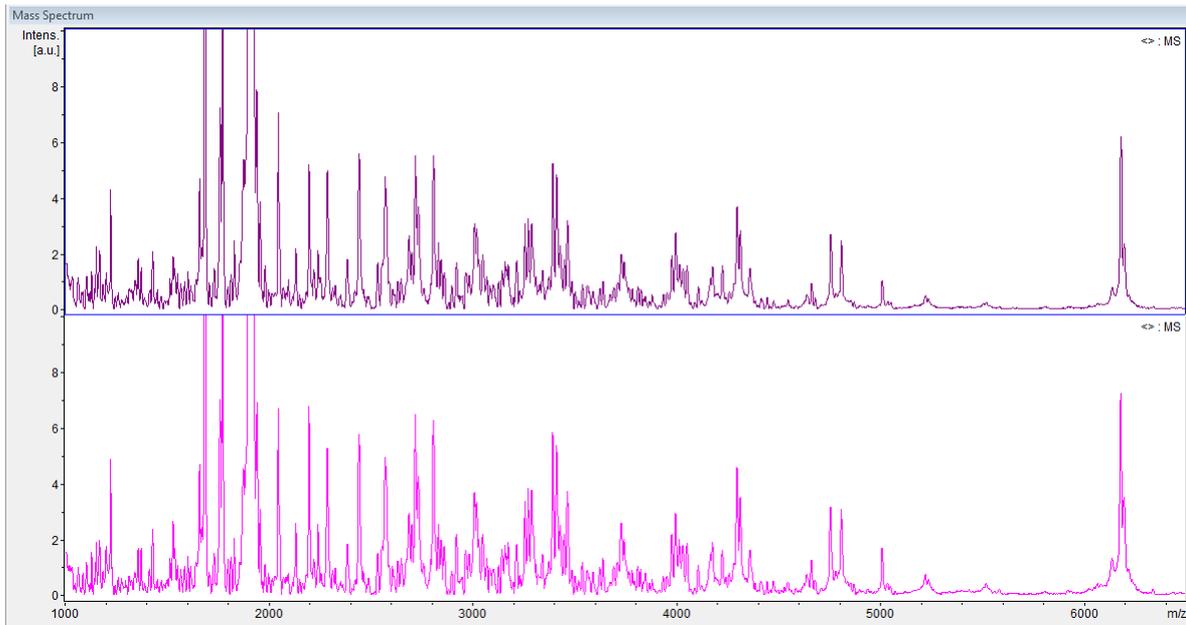


Fig. 4.10: Profilo proteico medio ottenuto dalla popolazione assegnata al trattamento con Telmisartan ai tempi T0 (rosa) e T1 (viola), ovvero prima e dopo il trattamento con il farmaco. Non si osservano differenze statisticamente significative relativamente all'intensità dei segnali fra le due popolazioni.

4.3.2.2 Effetto del farmaco sul proteoma urinario in condizioni di ipossia ipobarica

L'effetto del farmaco sul proteoma urinario è stato valutato confrontando gli spettri dei profili proteici medi ottenuti dalla popolazione sottoposta a trattamento con placebo e con farmaco. L'elaborazione degli spettri e l'analisi statistica sono state condotte mediante il software ClinProTools.

Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative fra gli spettri ottenuti dalle due popolazioni (farmaco vs placebo) né in alta quota, a 3500 mt (T2, Namche Bazaar), né in altissima quota a 5400 mt (T3, Campo base Everest, esposizione acuta) come riportato nelle figure 4.11 e 4.12.

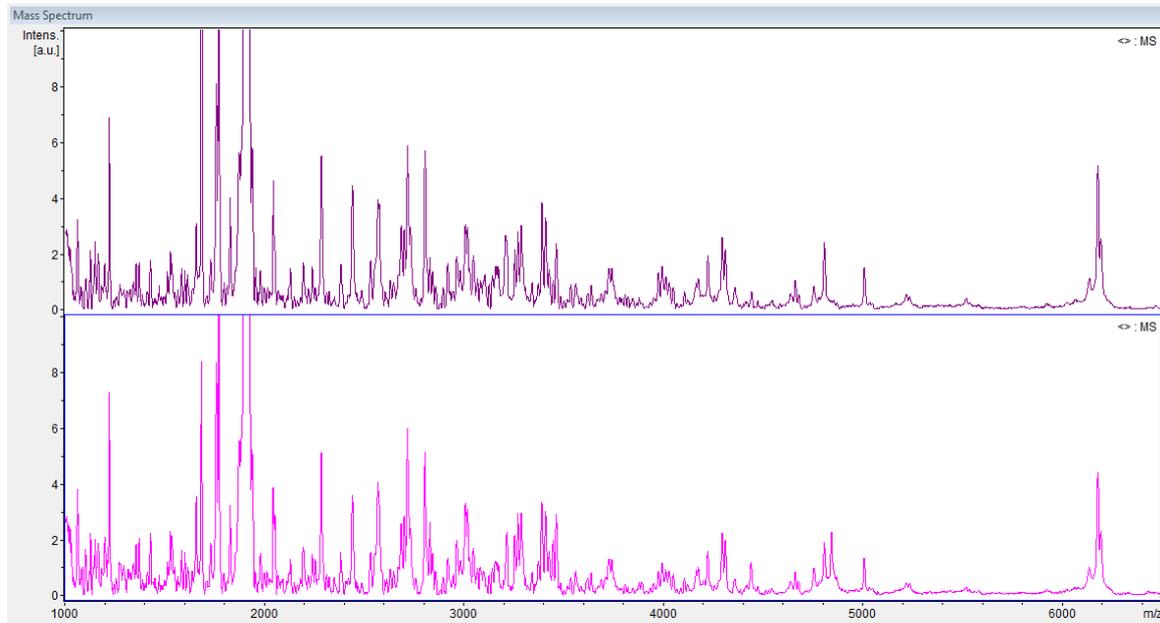


Fig. 4.11: Profilo proteico medio ottenuto dalla popolazione esposta ad ipossia ipobarica in alta quota (T2, 3500 mt, Namche Bazaar) ed assegnata al trattamento con placebo (rosa) o Telmisartan (viola). Non si osservano differenze statisticamente significative relativamente all'intensità dei segnali fra le due popolazioni.

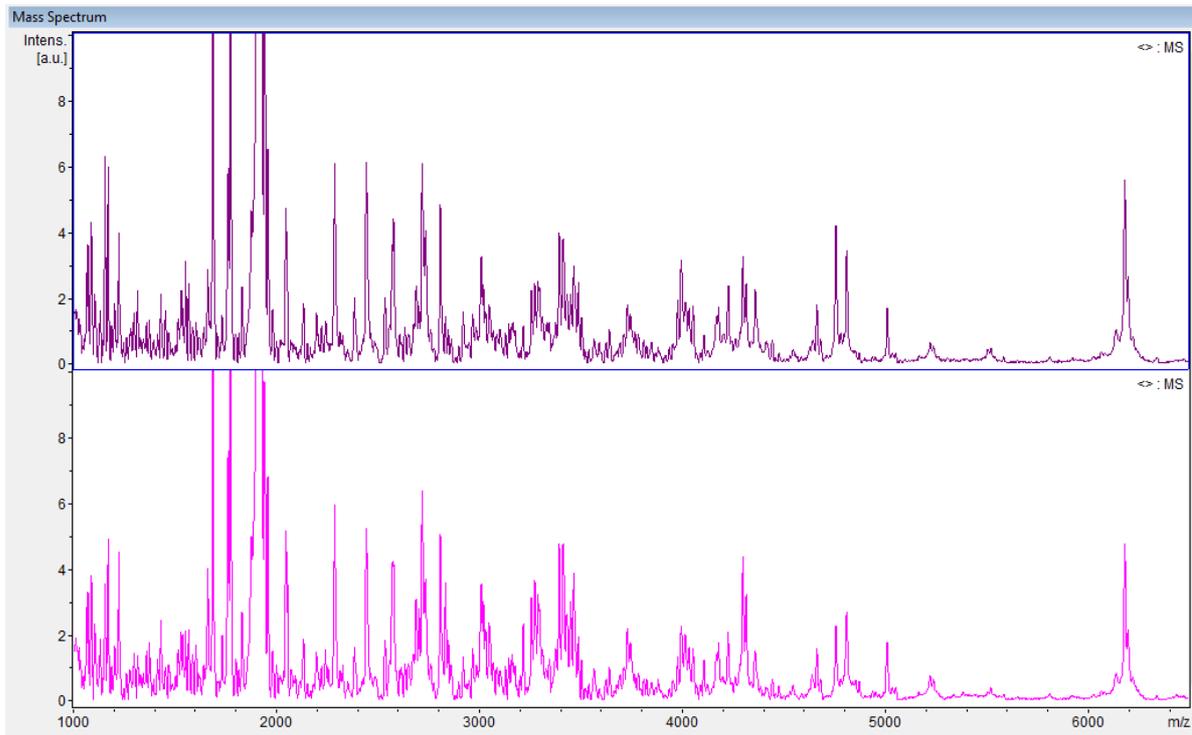


Fig. 4.12: Profilo proteico medio ottenuto dalla popolazione esposta ad ipossia ipobarica in altissima quota (T3, 5400 mt, Campo base Everest) ed assegnata al trattamento con placebo (rosa) o Telmisartan (viola). Non si osservano differenze statisticamente significative relativamente all'intensità dei segnali fra le due popolazioni.

4.3.2.3 Effetto dell'esposizione all'ipossia ipobarica sul proteoma urinario

L'effetto dell'esposizione all'ipossia ipobarica è stato studiato raggruppando per ogni diversa altitudine (bassa quota, alta quota ed altissima quota) i soggetti trattati con placebo e quelli trattati con Telmisartan, in quanto non erano presenti differenze statisticamente significative fra i due gruppi.

Sono stati confrontati gli spettri ottenuti a bassa quota (140 mt, Milano, n=43) con i profili proteici medi ottenuti dall'esposizione della popolazione a condizioni di ipossia ipobarica in alta quota (3500 mt, Namche Bazaar, n=41) ed altissima quota in fase acuta (5400 mt, Campo base Everest, n=38).

Durante la fase di raccolta dei campioni a livello del mare 4 soggetti non hanno raccolto correttamente le urine, pertanto sono stati esclusi dallo studio proteomico.

Inoltre, durante l'escursione in quota alcuni soggetti sono stati sottoposti a trattamento farmacologico (Diamox, Antibiotici,...) a causa di malesseri relativi all'esposizione all'ipossia ipobarica o altro, pertanto sono stati esclusi dallo studio.

Il confronto è stato dunque effettuato fra 43, 41 e 38 soggetti rispettivamente a livello del mare, alta quota ed altissima quota.

I campioni raccolti dopo 11 giorni di permanenza in altissima quota, ovvero in fase di esposizione cronica all'ipossia ipobarica, invece, non sono stati inclusi nel lavoro in quanto, a causa di problemi durante la spedizione dal Nepal, sono pervenuti scongelati al Dipartimento di Medicina Sperimentale.

Dal confronto dei profili proteici medi delle tre classi in esame è emerso che l'espressione di numerosi segnali era significativamente diversa fra le 3 classi in studio (Tab. 4.5).

Index	Mass	DAve	PTTA	PWKW	PAD	Ave1	Ave2	Ave3	StdDev1	StdDev2	StdDev3	CV1	CV2	CV3
81	6474.61	0.17	< 0.000001	< 0.000001	0.236	0.13	0.3	0.22	0.09	0.08	0.12	73.72	27.82	55.22
85	8194.07	0.14	< 0.000001	< 0.000001	0.0000641	0.07	0.2	0.16	0.07	0.08	0.17	101.56	37.67	107.73
47	4014.54	0.94	< 0.000001	< 0.000001	0.0118	1.88	1.31	2.26	0.63	0.4	0.81	33.69	30.5	35.7
19	1953.95	5.64	< 0.000001	< 0.000001	< 0.000001	4.93	1.77	7.41	4.71	1.65	5	95.46	93.06	67.5
1	1005.05	2.54	< 0.000001	< 0.000001	< 0.000001	3.71	6.21	3.67	1.18	2.12	0.91	31.8	34.19	24.69
72	6028.66	0.21	< 0.000001	< 0.000001	0.741	0.25	0.46	0.36	0.17	0.11	0.15	69.62	23.06	42.39
84	6798.27	0.16	0.0000123	< 0.000001	0.00191	0.12	0.28	0.2	0.12	0.11	0.14	98.16	39.51	67.13
86	8818.99	0.11	0.0000108	0.00000491	0.0000139	0.08	0.18	0.13	0.09	0.08	0.13	119.19	41.13	100.01
54	4298.99	1.46	0.0000123	0.0000614	0.0796	4.09	2.63	4.02	1.62	1.09	1.58	39.71	41.38	39.29
48	4032.77	0.73	0.0000123	0.000167	< 0.000001	1.73	1.19	1.92	0.72	0.33	0.96	41.87	28.01	49.79
61	4757.5	2.29	0.0000214	0.000127	< 0.000001	3.47	1.18	3.34	2.68	1.2	3.81	77.26	101.51	114.01
49	4052.7	0.82	0.0000291	0.000079	< 0.000001	1.81	1.06	1.88	0.95	0.49	1.17	52.53	46.31	62.47
71	5925.78	0.19	0.0000343	0.00000681	0.000578	0.23	0.42	0.32	0.15	0.17	0.12	64.69	40.08	38.35
22	2194.8	3.84	0.0000465	0.0000191	< 0.000001	5.94	2.44	2.1	4.5	1.52	0.79	75.76	62.33	37.37
83	6666.65	0.2	0.000072	< 0.000001	0	0.11	0.32	0.21	0.09	0.28	0.13	81.92	88.98	61.32
20	2043.41	2.91	0.0000979	0.00000966	0.00000441	7.64	4.73	5.35	3.1	1.96	1.91	40.54	41.37	35.61
51	4178.52	0.63	0.000133	0.00174	0.0000671	1.85	1.32	1.95	0.71	0.45	0.94	38.34	33.84	48.18
87	8859	0.11	0.000222	0.000023	0.00000156	0.09	0.2	0.16	0.12	0.09	0.18	123.42	41.95	113.57
53	4285.53	0.38	0.000315	0.00243	0.00197	1.26	0.95	1.32	0.51	0.3	0.5	40.4	31.29	37.54
39	3411.39	1.6	0.000335	0.000167	0.166	5.39	3.78	4.86	1.61	1.55	1.67	29.86	41.03	34.43
80	6438.89	0.17	0.000438	< 0.000001	< 0.000001	0.13	0.3	0.24	0.09	0.23	0.25	69.68	78.88	103.39
74	6084.74	0.18	0.000453	0.000111	0.048	0.34	0.52	0.45	0.24	0.11	0.21	70.34	21.06	47.7
30	2731.46	1.12	0.000579	0.00159	0.00000441	4.18	3.34	4.46	1.26	0.89	1.68	30.15	26.58	37.66
43	3728.78	0.68	0.000594	0.000596	0.000234	2.39	1.71	2.27	0.91	0.64	0.81	38.08	37.33	35.53
28	2700.79	1.03	0.000594	0.000154	0.0000591	2.42	3.45	2.91	1.02	1.07	1.59	42.09	31.18	54.56

Tab. 4.5: Peak statistic report. Sono riportati i risultati relativi all'analisi statistica dei primi 20 segnali diversamente espressi nelle 3 classi in studio. Su 87 segnali rilevati nello spettro medio totale 42 presentavano un valore di p-value < 0.05 (ANOVA test).

Mass = rapporto massa/carica del segnale

DAve = differenza tra le intensità medie delle popolazioni in esame

PTTA = p-value secondo il test ANOVA

PWKW = p-value secondo il test Kruskal Wallis

PAD = p-value secondo il test Anderson-Darling

Ave 1/2/3 = intensità media del gruppo 1 (bassa quota), 2 (alta quota) e 3 (altissima quota)

StdDev 1/2/3 = deviazione standard del gruppo 1 (bassa quota), 2 (alta quota) e 3 (altissima quota)

L'analisi manuale degli spettri ha permesso di focalizzare l'attenzione su 6 segnali la cui intensità variava nelle tre classi in studio con diverso andamento. La significatività statistica fra le tre classi è stata valutata con il test ANOVA mediante l'utilizzo del software MedCalc. Tale software ha permesso, inoltre, di costruire un grafico relativo all'andamento dell'intensità del segnale nei tre gruppi in studio.

In particolare, i segnali con m/z 1683 e 2194 presentavano una minore espressione nei campioni ottenuti dalla popolazione esposta a condizioni di ipossia ipobarica, sia in alta che in altissima quota (Fig. 4.13 e 4.14), rispetto a quelli ottenuti a bassa quota.

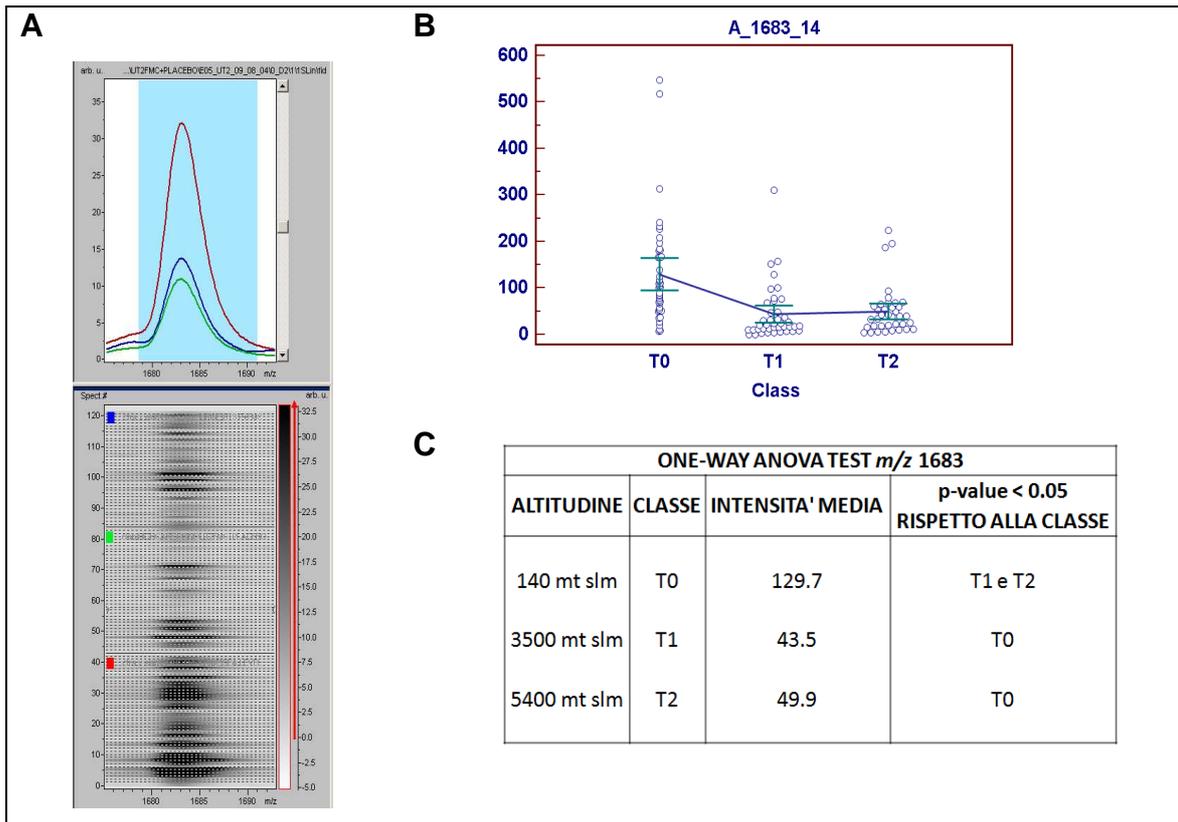


Fig. 4.13: Segnale m/z 1683. Pannello A: Spectra view e Pseudogel view. Pannello B: Variazione dell'intensità del segnale in base all'esposizione all'ipossia ipobarica. Pannello C: Risultati dell'elaborazione statistica mediante test one-way ANOVA. T0 = 140 mt slm (rosso), T1 = 3500 mt slm (verde); T2 = 5400 mt slm (blu).

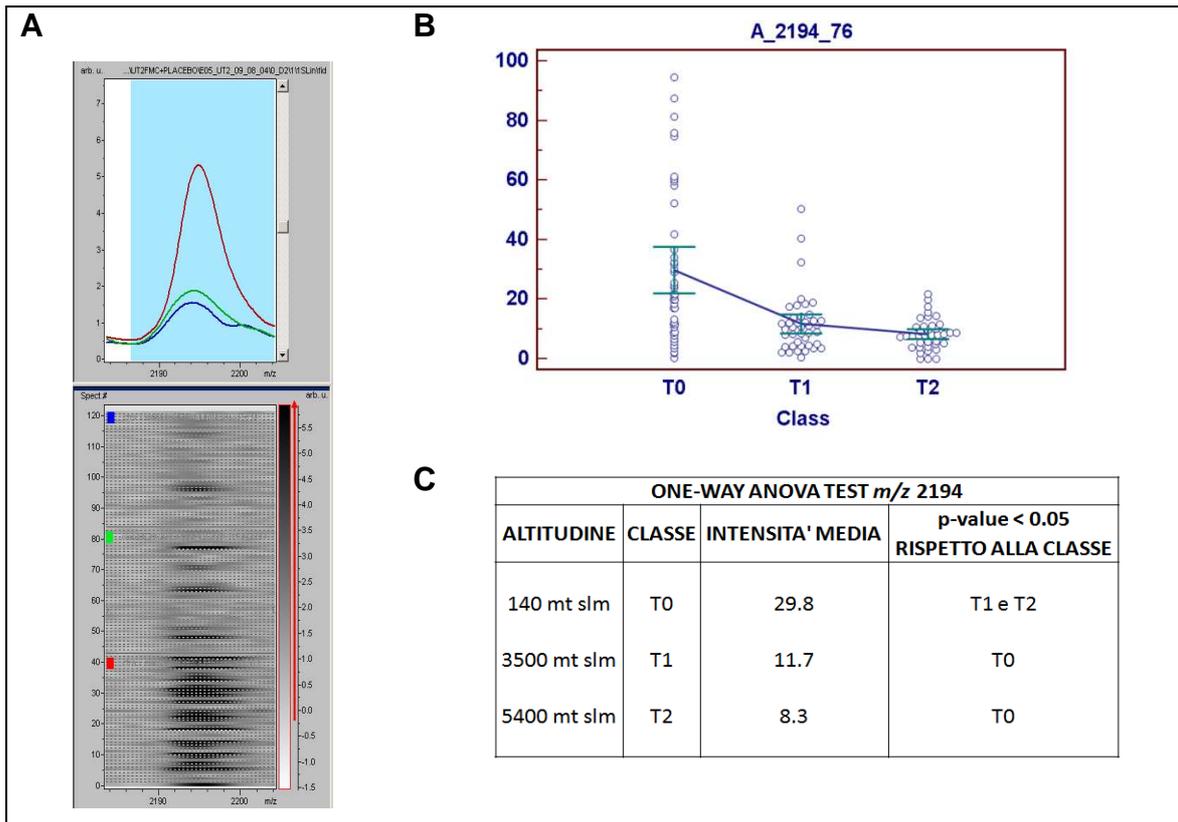


Fig. 4.14: Segnale m/z 2194. Pannello A: Spectra view e Pseudogel view. Pannello B: Variazione dell'intensità del segnale in base all'esposizione all'ipossia ipobarica. Pannello C: Risultati dell'elaborazione statistica mediante test one-way ANOVA. T0 = 140 mt slm (rosso), T1 = 3500 mt slm (verde); T2 = 5400 mt slm (blu).

I segnali con m/z 4298 e 4757, invece, presentavano un andamento diverso. La loro espressione nel proteoma urinario risultava diminuita a seguito dell'esposizione alla condizione di ipossia ipobarica in alta quota rispetto all'espressione a livello del mare. Tuttavia, una volta raggiunta l'altissima quota tali segnali presentano un'intensità comparabile a quella riscontrata a livello del mare (Fig. 4.15 e 4.16)

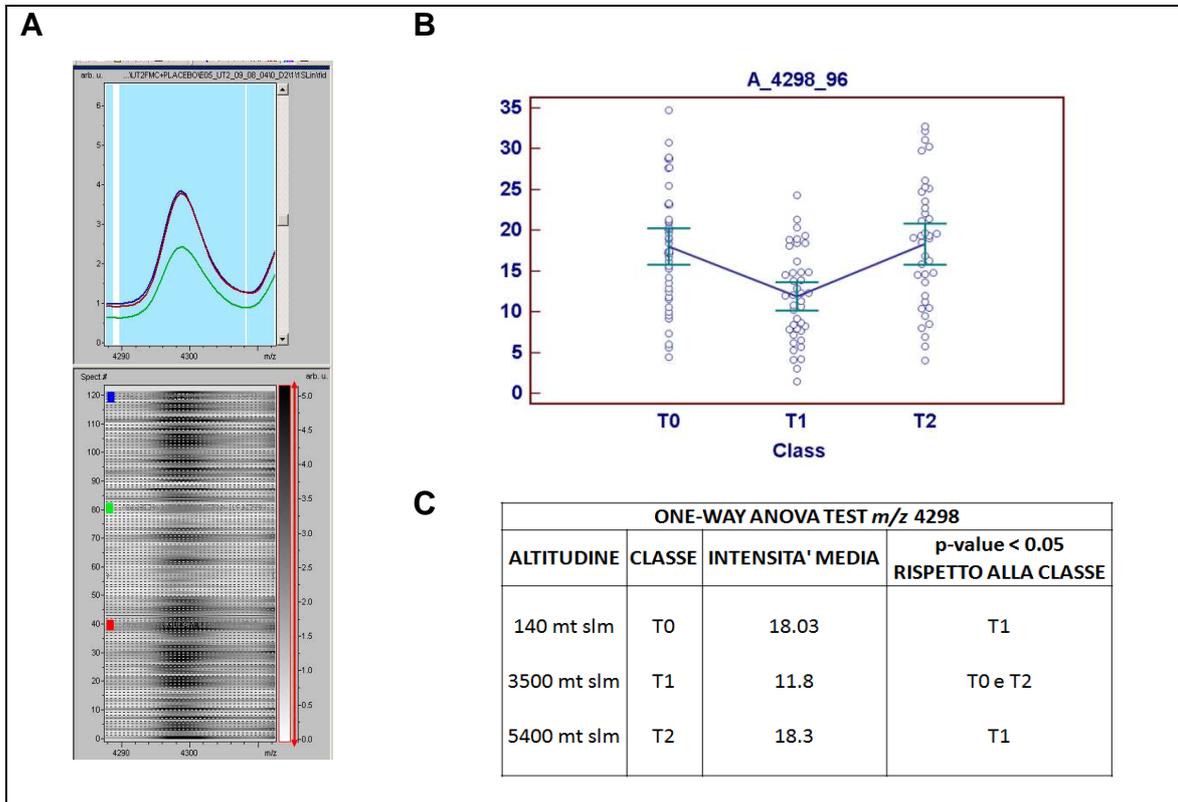


Fig. 4.15: Segnale m/z 4298. Pannello A: Spectra view e Pseudogel view. Pannello B: Variazione dell'intensità del segnale in base all'esposizione all'ipossia ipobarica. Pannello C: Risultati dell'analisi statistica mediante test one-way ANOVA. T0 = 140 mt slm (rosso), T1 = 3500 mt slm (verde); T2 = 5400 mt slm (blu).

A **B**

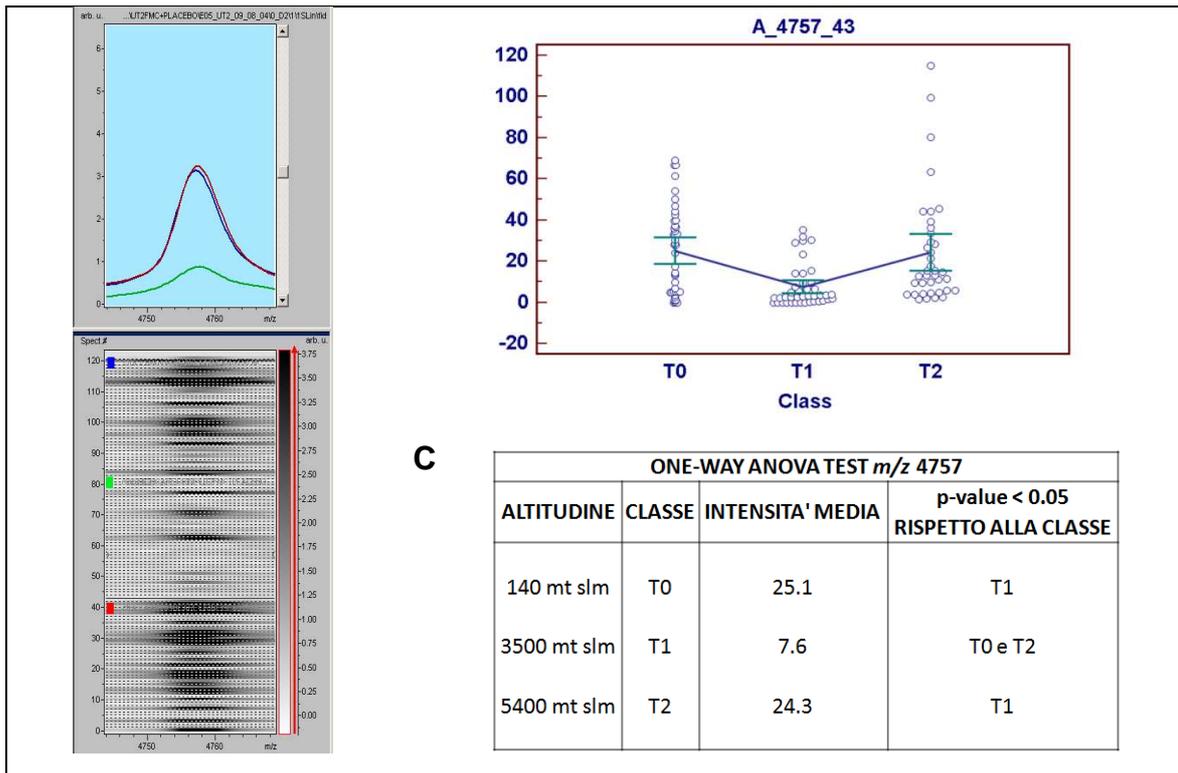


Fig. 4.16: Segnale m/z 4757. Pannello A: Spectra view e gel view.

Pannello B: Variazione dell'intensità del segnale in base all'esposizione all'ipossia ipobarica.

Pannello C: Risultati dell'elaborazione statistica mediante test one-way ANOVA. T0 = 140 mt slm (rosso), T1 = 3500 mt slm (verde); T2 = 5400 mt slm (blu).

Infine, i segnali con m/z 1165 e 1953 presentavano una maggiore espressione in altissima quota rispetto sia al livello del mare sia all'esposizione all'ipossia ipobarica in alta quota (Fig. 4.17 e 4.18).

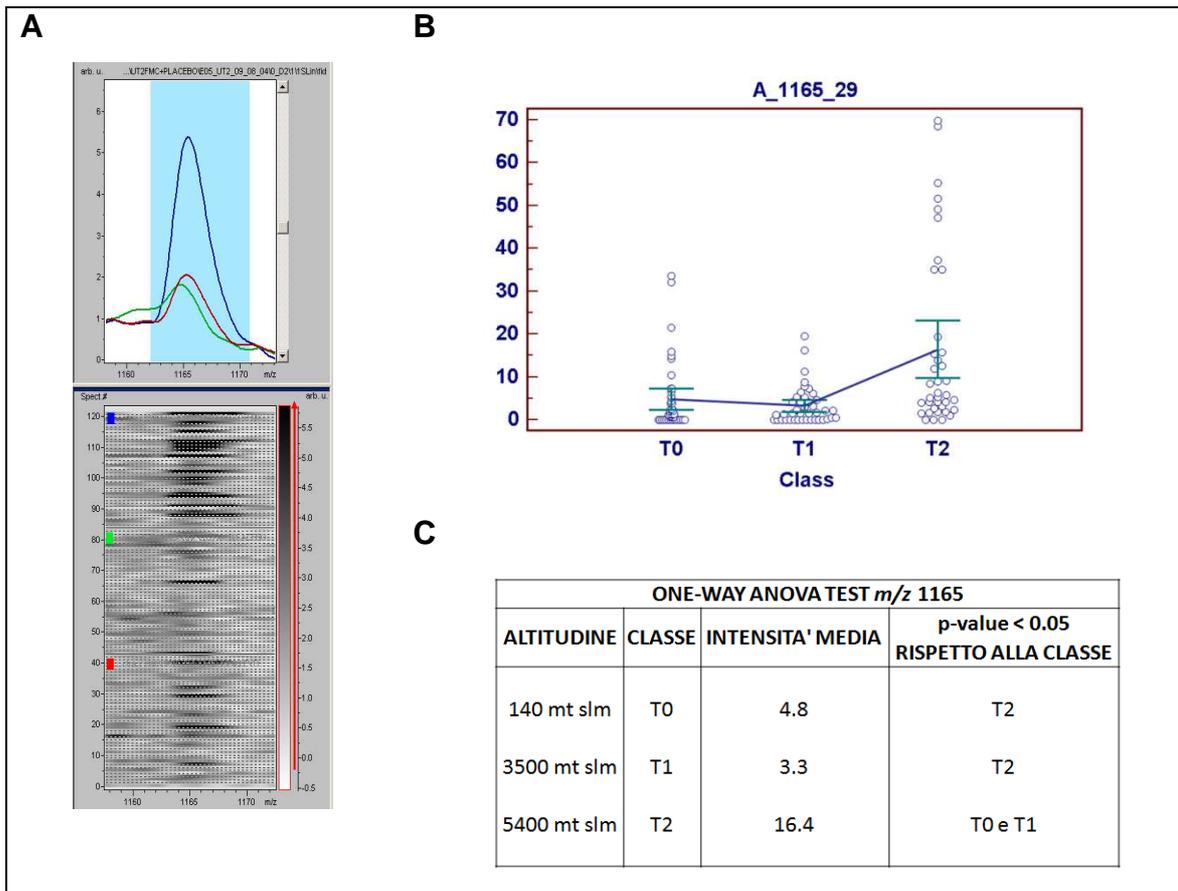


Fig. 4.17: Segnale m/z 1165. Pannello A: Spectra view e gel view.

Pannello B: Variazione dell'intensità del segnale in base all'esposizione all'ipossia ipobarica.

Pannello C: Risultati dell'elaborazione statistica mediante test one-way ANOVA. T0 = 140 mt slm (rosso), T1 = 3500 mt slm (verde); T2 = 5400 mt slm (blu).



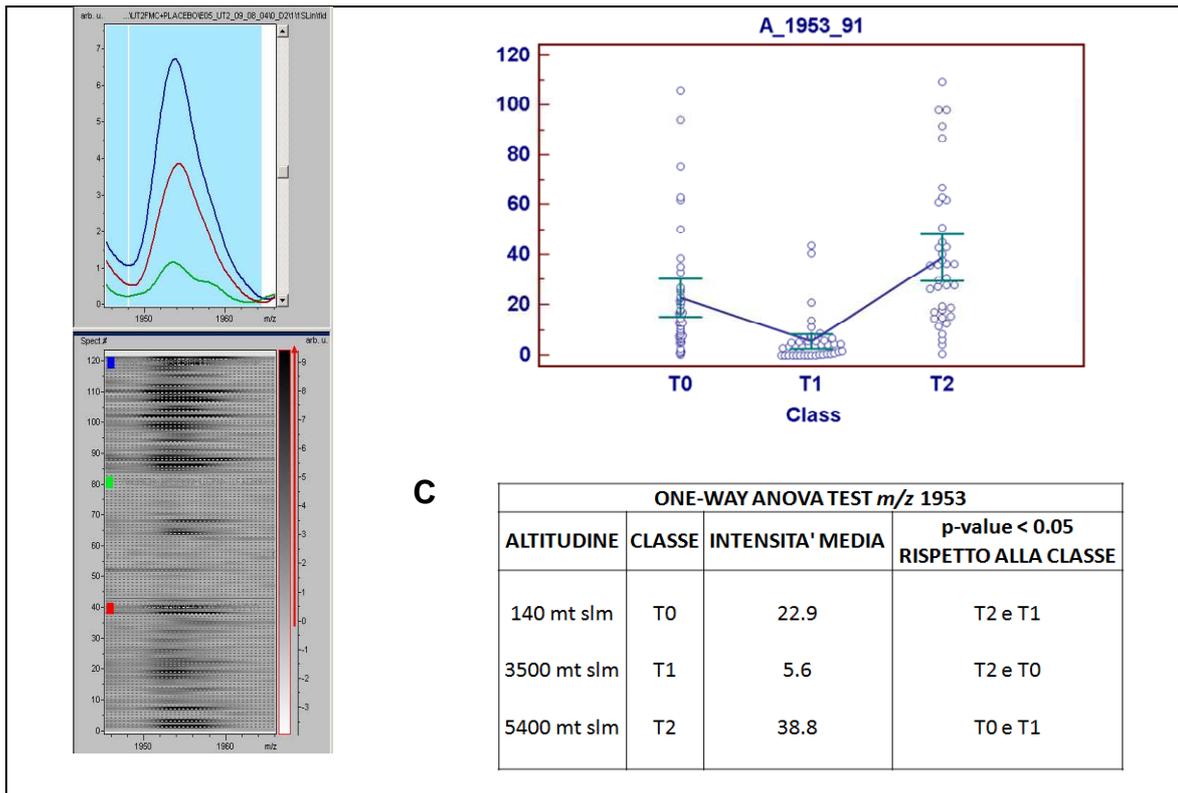


Fig. 4.18: Segnale m/z 1953. Pannello A: Spectra view e gel view.

Pannello B: Variazione dell'intensità del segnale in base all'esposizione all'ipossia ipobarica.
 Pannello C: Risultati dell'elaborazione statistica mediante test one-way ANOVA. T0 = 140 mt slm (rosso), T1 = 3500 mt slm (verde); T2 = 5400 mt slm (blu).

Per ottenere la massa accurata dei marker di interesse e per escludere la presenza di due picchi contigui e non risolti in modalità lineare, la massa esatta dei peptidi di interesse è stata individuata mediante MALDI-TOF MS in modalità reflectron prima dell'analisi degli eluati mediante LC-ESI MS/MS. Le masse esatte sono state utilizzate per identificare i corrispettivi picchi cromatografici nella successiva analisi LC-ESI MS/MS e corrispondono ai seguenti valori di m/z : 1164.57 (1165 lineare), 1681.06 (1683 lineare), 1951.56 (1953 lineare) e 2191.11 (2194 lineare).

4.3.3 Caratterizzazione delle molecole di interesse

Con lo scopo di caratterizzare i segnali di interesse e comprendere il loro ruolo nel processo di adattamento fisiologico all'ipossia ipobarica, sono stati iniettati in HPLC-ESI MS/MS gli eluati delle urine ottenuti dopo purificazione ClinProt e non utilizzati per l'analisi MALDI-TOF. Successivamente, i risultati ottenuti sono stati sottoposti al motore di ricerca MASCOT, che utilizza i dati provenienti dalla spettrometria di massa ed effettua un confronto con le banche dati delle sequenze proteiche primarie. Tale

esperimento ha permesso di identificare numerosi peptidi con un elevato grado di confidenza, tuttavia solamente una delle 6 molecole di interesse è stata identificata. Tale molecola corrisponde al peptide a m/z 1679.9, la cui sequenza corrisponde al frammento $_{592}\text{ValIDQSRVLNLGPITLys}_{606}$ della glicoproteina Uromodulina (Fig. 4.19 e .20).

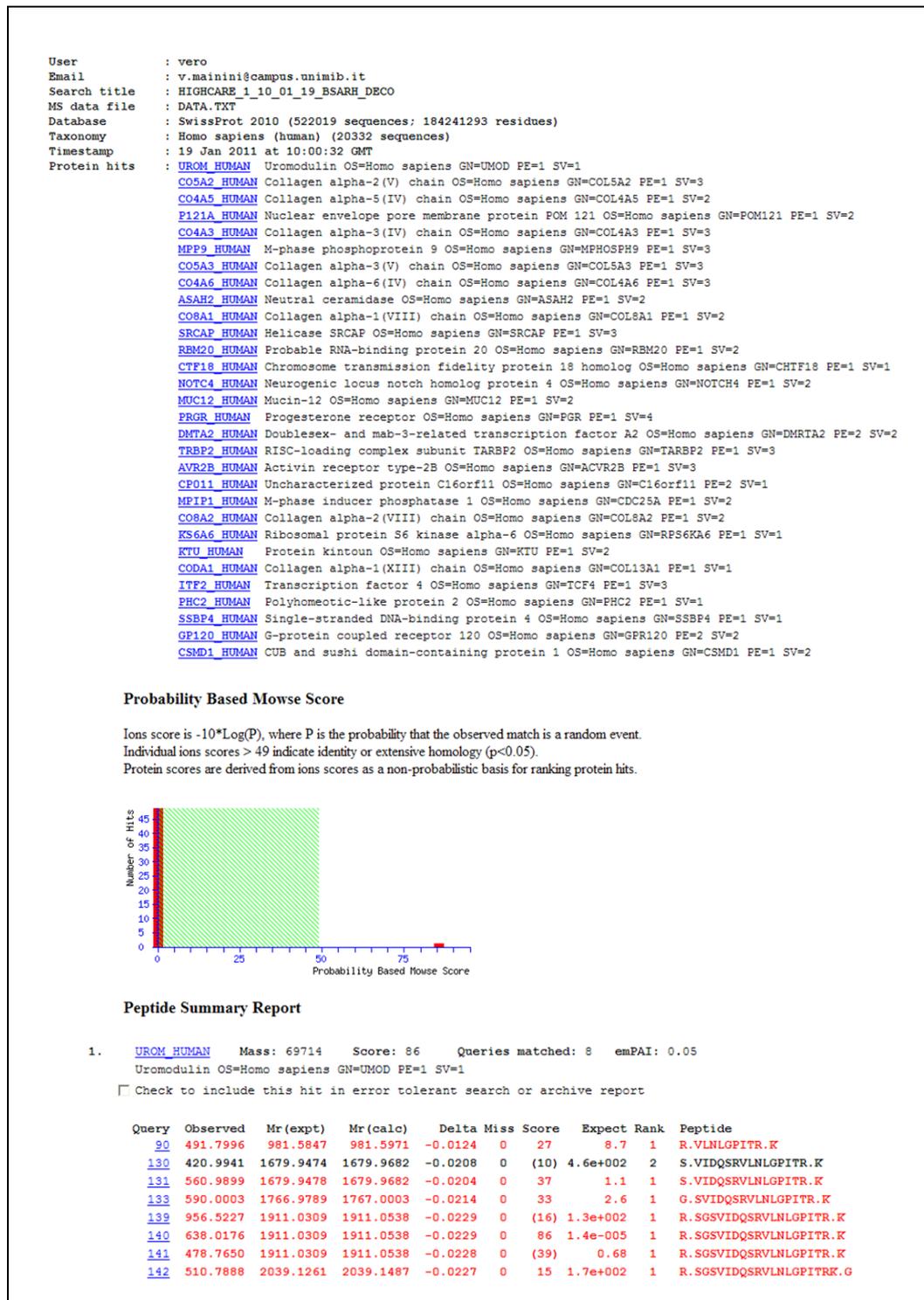


Fig. 4.19:
Identificazione del peptide a m/z 1679.9 mediante MASCOT.

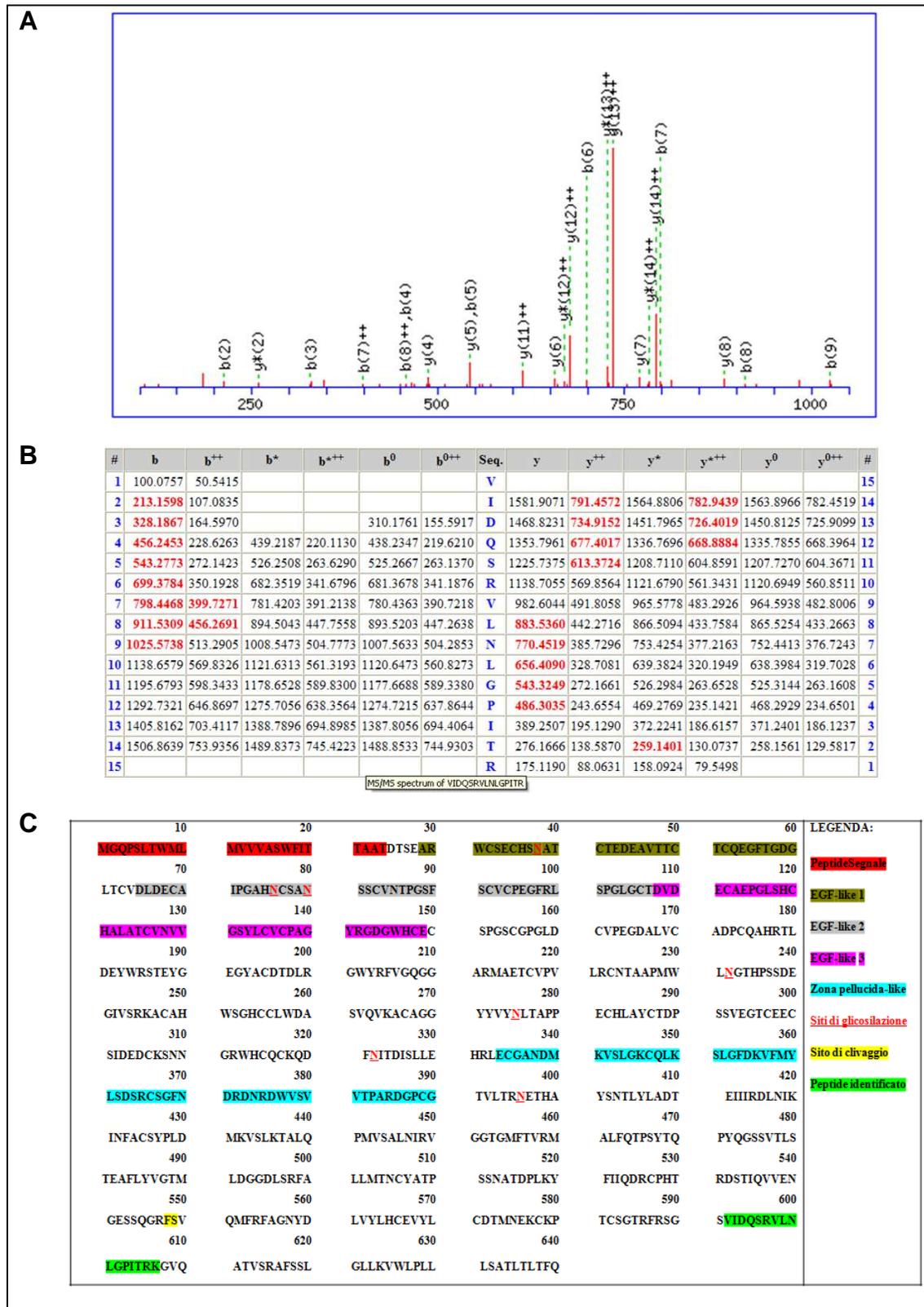


Fig. 4.20: Identificazione del peptide a m/z 1679.9. **Pannello A:** spettro MS/MS; **Pannello B:** Tabella degli ioni frammento attesi per il peptide. In rosso sono riportati gli ioni identificati mediante lo spettro MS/MS ottenuto dall'analisi LC-ESI MS/MS. **Pannello C:** Sequenza dell' uromodulina, siti di interesse e sequenza del peptide identificato.

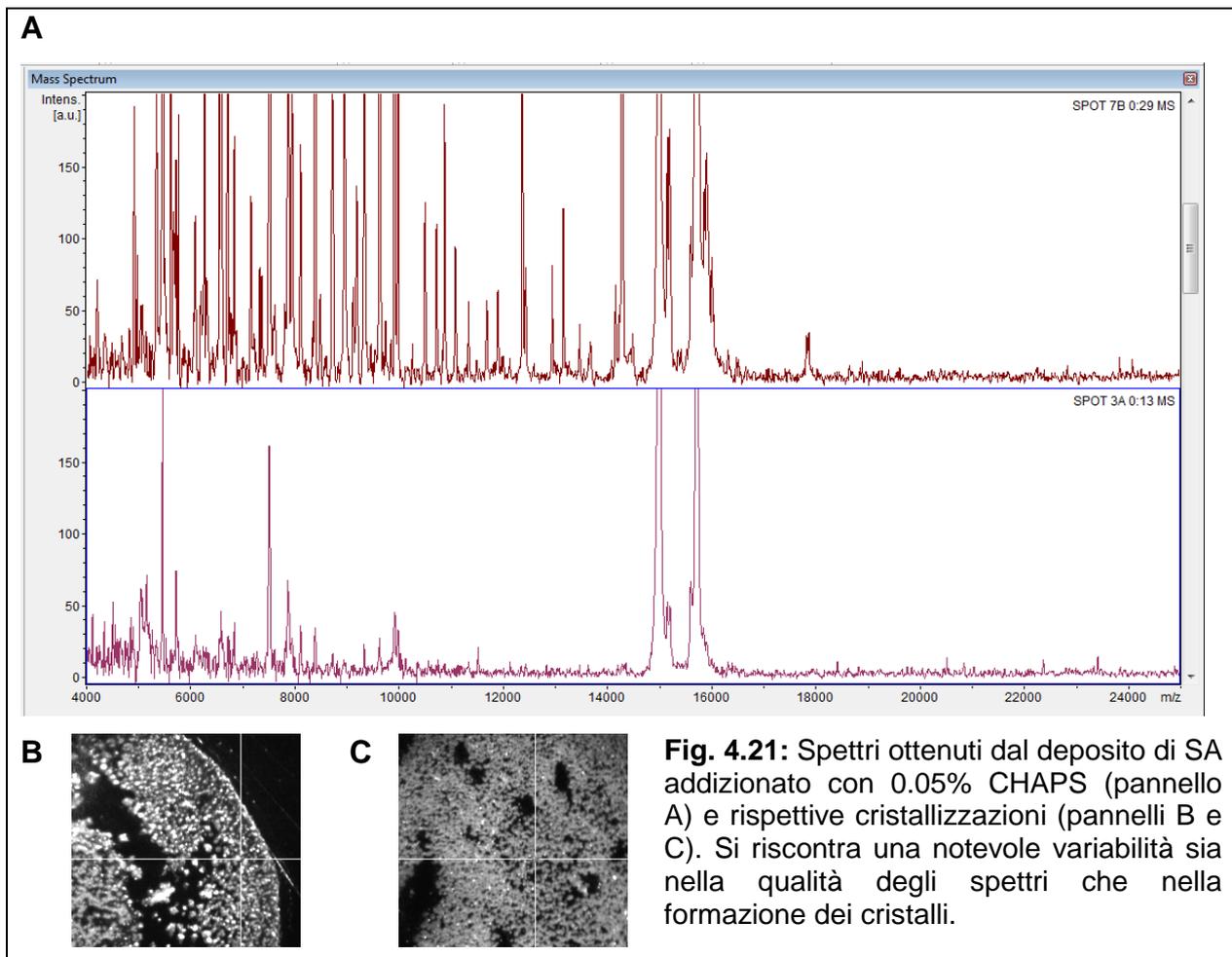
*RISULTATI DETERGENTI
E SPETTROMETRIA DI MASSA IMAGING*

4.4.1 Definizione delle concentrazioni ottimali per i detergenti

Nella prima fase dello studio sono state utilizzate sezioni di tessuto epatico prelevato da topi ICR adulti per definire la compatibilità dei detergenti con la strumentazione MALDI-TOF e la concentrazione ottimale da utilizzare.

Per ogni detergente e per ogni concentrazione (0.01%, 0.03%, 0.05% e 0.1%) la matrice è stata depositata in triplo su cinque sezioni consecutive per un totale di 15 spettri ottenuti e confrontati per ogni concentrazione in analisi.

Per quanto concerne la compatibilità dei detergenti con la spettrometria di massa MALDI-TOF è stato osservato che tutti i surfattanti in studio erano compatibili con la strumentazione e generavano spettri adeguati ad eccezione del CHAPS. Tale detergente infatti mostrava un'elevata variabilità sia per quanto concerne la formazione dei cristalli sia per quanto riguarda l'acquisizione degli spettri (Fig. 4.21); per questo motivo è stato escluso dalle analisi successive.



Tutti gli altri detergenti erano invece compatibili con la strumentazione MALDI-TOF e generavano spettri adeguati, con un elevato numero di segnali, buona risoluzione ed intensità dei picchi.

Tali detergenti sono stati valutati sul tessuto epatico murino per definirne la concentrazione ottimale. Tale concentrazione è stata determinata valutando la corrente ionica totale ed il numero e l'intensità dei segnali rilevati nell'intervallo di massa fra 4000 e 25000 m/z . In particolare, la concentrazione ottimale per ogni detergente corrispondeva a 0.05% per SDS e Triton X-100, 0.1% per il TWEEN20 e 0.03% per TWEEN80 (Tab. 3.3).

4.4.2 Modalità di deposito dei detergenti

Sono state valutate due strategie di applicazione dei detergenti. La prima strategia prevedeva l'aggiunta diretta del detergente nella soluzione di matrice, la seconda invece, prevedeva la deposizione del detergente sul tessuto a cui seguiva, dopo evaporazione, la deposizione della matrice.

Sono stati confrontati 30 spettri ottenuti da 10 sezioni di tessuto consecutive su cui la matrice è stata depositata in triplo in 3 posizioni comparabili. Le sezioni consecutive sono state depositate alternativamente con i due approcci.

Gli spettri ottenuti attraverso le due modalità di deposito sono comparabili per tutti i detergenti. La Figura 4.22 riporta come esempio i risultati ottenuti dalle preparazioni con 0.05% SDS e 0.05% Triton X-100.

L'analisi statistica, condotta sul profilo proteico medio mediante il software ClinProTools, ha confermato che non vi sono differenze statisticamente significative dal confronto dei due approcci.

Entrambi gli approcci sono quindi utilizzabili per includere un detergente nell'applicazione della matrice a sezioni di tessuto.

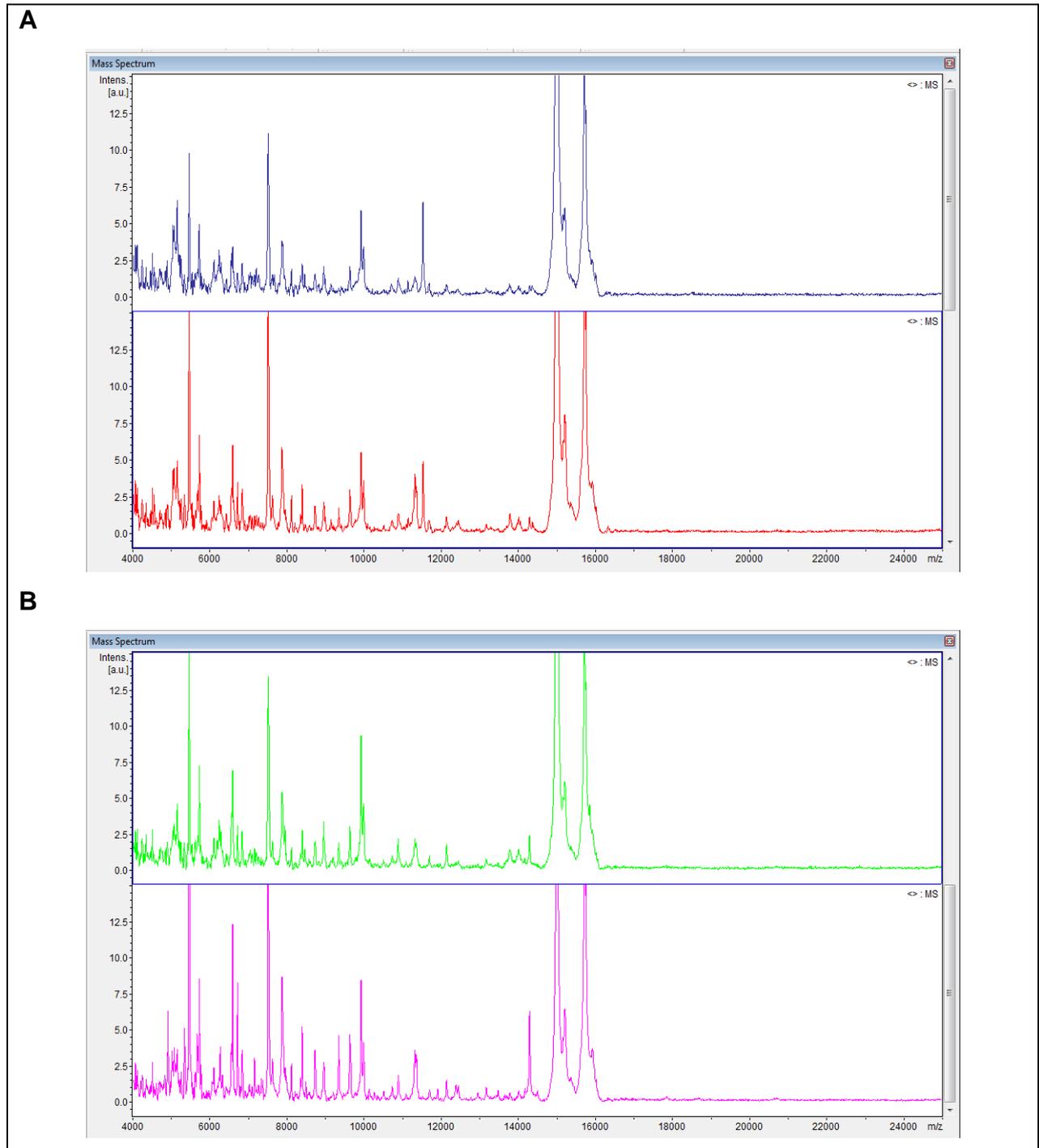


Fig. 4.22: Modalità di deposizione dei detergenti. Pannello A: confronto fra lo spettro medio ottenuto dai depositi effettuati con 0.05% SDS addizionato alla matrice (spettro blu, n=15) o depositato prima della matrice (spettro verde, n=15). Pannello B: confronto fra lo spettro medio ottenuto dai depositi effettuati con 0.05% Triton X-100 addizionato alla matrice (spettro verde, n=15) o depositato prima della matrice (spettro rosa, n=15).

4.4.3 Presenza di interferenti dovuti ai detergenti

Per ognuno dei detergenti in studio è stata valutata la presenza di potenziali segnali interferenti. Con lo scopo di individuare potenziali segnali derivanti da interferenti generati dal detergente stesso sono stati depositati 0,5 µl di matrice addizionata di detergente sul target al di fuori del tessuto.

I risultati hanno dimostrato una linea di base nulla nel range di massa compreso fra 4000 e 25000 m/z , indicando l'assenza di potenziali interferenze dovute all'utilizzo dei detergenti (Fig 4.23).

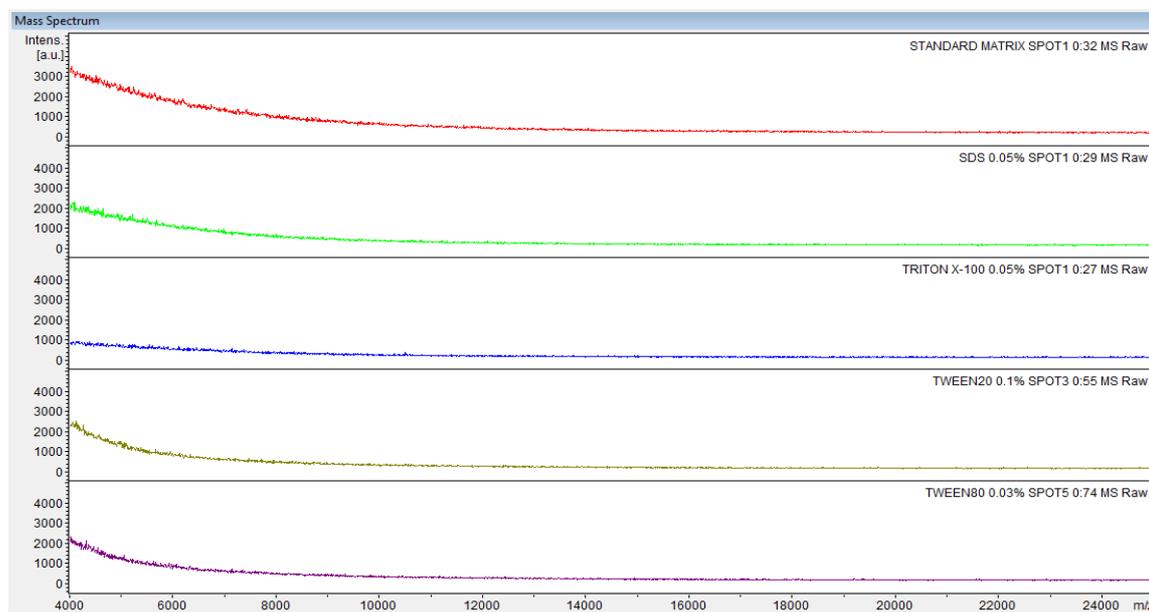


Fig. 4.23: Spettri ottenuti dai depositi della sola matrice senza detergenti (rosso) o addizionata con 0.05% SDS (verde), 0.05% Triton X-100 (blu), 0.1% TWEEN20 (giallo) e 0.03% TWEEN80 (viola).

4.4.4 Effetto dei detergenti sul tessuto epatico murino

I detergenti in studio sono stati confrontati con la preparazione di matrice tradizionale, ovvero senza aggiunta di detergenti, per valutare un loro potenziale effetto sul miglioramento della qualità degli spettri ottenuti dal fegato murino, in termini di numero, risoluzione ed intensità dei segnali.

In particolare sono state analizzate 25 sezioni consecutive di tessuto. Ogni sezione è stata depositata in triplo e la distanza fra matrice tradizionale ed altre matrici non era mai superiore a 36 µm (3 sezioni).

Per ogni detergente e per la matrice tradizionale sono stati ottenuti e confrontati 15 spettri.

Dai risultati è emerso che i detergenti Triton X-100, TWEEN20 e TWEEN80 erano in grado di migliorare notevolmente la sensibilità dell'analisi, soprattutto sui segnali rilevati nel range di massa compreso fra 6000 e 14000 m/z (Fig 4.24).

A

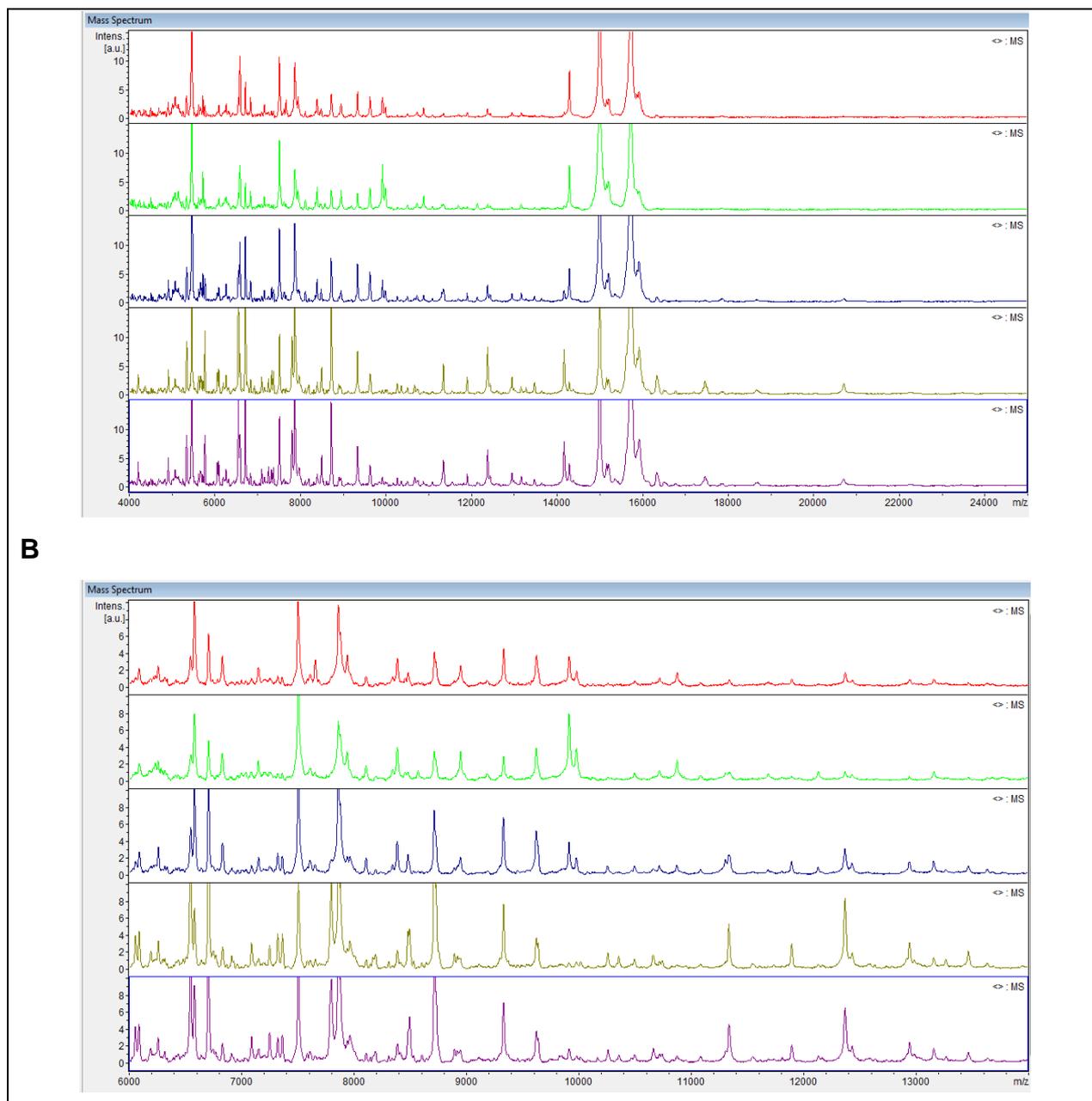


Fig. 4.24: Confronto dello spettro medio ottenuto da profiling condotto su tessuto epatico murino con matrice tradizionale (rosso, $n = 15$) o addizionata con detergenti: 0.05% SDS (verde, $n = 15$), 0.05% Triton X-100 (blu, $n = 15$), 0.1% TWEEN20 (giallo, $n = 15$) e 0.03% TWEEN80 (viola, $n = 15$). Pannello A: m/z 4000-25000, pannello B: zoom nel range di massa da 6000 a 14000 m/z .

Fra tutti i detergenti, il TWEEN20 produceva i migliori spettri dal punto di vista sia del numero che dell'intensità dei segnali osservati su tutto il range di massa considerato.

4.4.5 Compatibilità delle matrici con lo spotter acustico

I risultati emersi dalle analisi di profiling hanno dimostrato una potenziale utilità dell'utilizzo dei detergenti per migliorare la sensibilità delle analisi volte a rilevare le proteine direttamente sulle sezioni di tessuto. Tuttavia la tecnica di profiling è associata ad un deposito manuale della matrice, che implica una variabilità notevole.

Con lo scopo di ridurre la variabilità associata alla tecnica di profiling le matrici addizionate con detergenti e la matrice tradizionale sono state depositate mediante spotter acustico.

La compatibilità delle matrici con la deposizione mediante spotter acustico è legata soprattutto alla tensione superficiale del fluido che viene depositato.

Tutte le matrici in studio sono state sottoposte al deposito mediante spotter acustico, tuttavia le matrici addizionate con TWEEN20 e TWEEN80 non risultavano compatibili con lo spotter (Fig. 4.25).

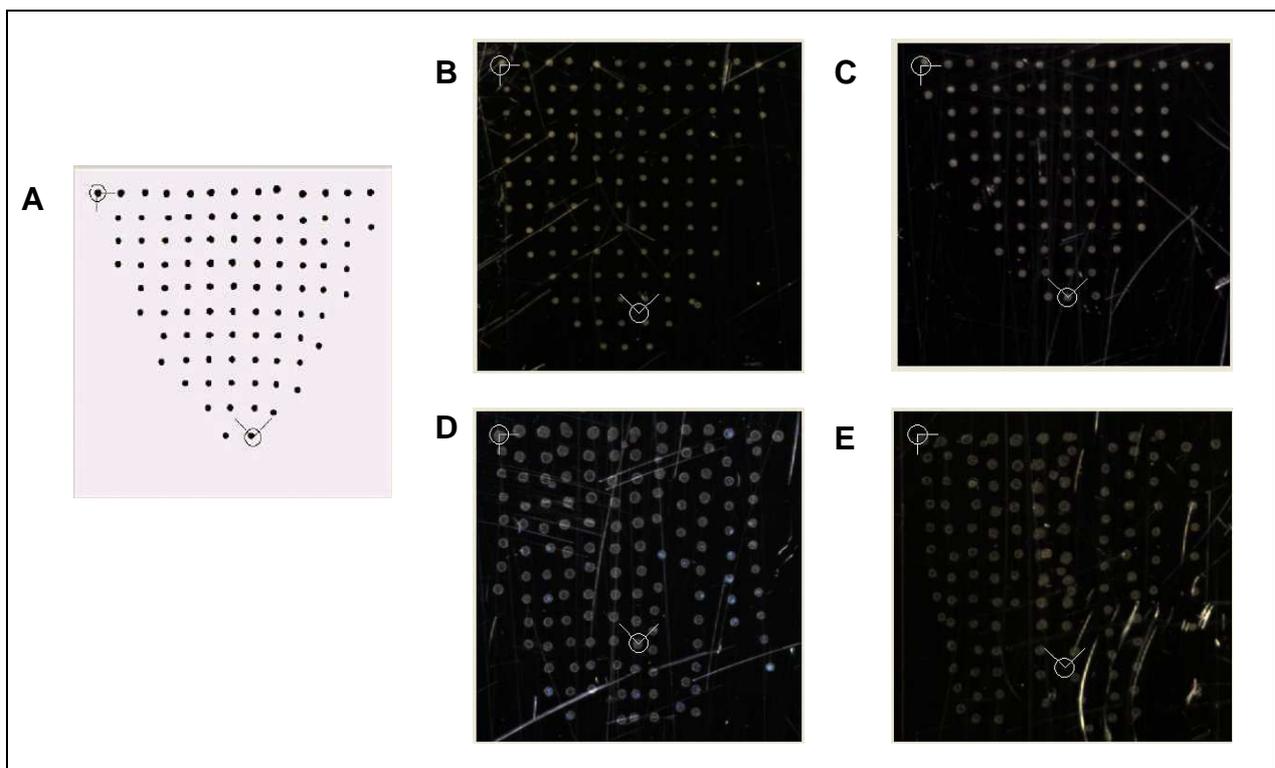


Fig. 4.25: Risultati di calibrazione e compatibilità delle matrici con lo spotter acustico. Un fluido correttamente calibrato determina la formazione di un triangolo come nel caso della matrice tradizionale (A) ed addizionata con 0.05% SDS (B), 0.05% Triton X-100 (C). Le matrici addizionate con 0.1% TWEEN20 (D) e 0.03% TWEEN80 (E) non sono compatibili con la modalità di deposito mediante spotter acustico.

4.4.6 Variabilità inter-sezione

La riproducibilità del deposito su sezioni consecutive depositate con la stessa matrice mediante spotter acustico è stata dimostrata con un esperimento condotto in triplo su 3 sezioni consecutive di tessuto epatico murino depositate con la stessa matrice. L'esperimento è stato condotto con tutte le matrici compatibili con il deposito acustico (matrice tradizionale, addizionata con 0.05% di SDS e addizionata con 0.05% di Triton X-100).

L'elaborazione statistica è stata effettuata confrontando il profilo medio di circa 450 spettri ottenuti dall'intera sezione di tessuto.

Tutte le matrici selezionate hanno dimostrato un'elevata riproducibilità nel numero di picchi rilevati. In particolare per la matrice tradizionale sono stati rilevati 147 ± 9 segnali, per la matrice addizionata con 0.05% SDS 162 ± 5 segnali e per la matrice con Triton X-100 123 ± 7 segnali.

Inoltre, dall'analisi statistica del profilo medio ottenuto da sezioni consecutive di tessuto depositate con la stessa matrice non sono emerse differenze statisticamente significative nell'intensità dei segnali.

4.4.7 Effetto dei detergenti sulla sensibilità degli studi di proteomica condotti mediante IMS

4.4.7.1 Tessuto Epatico

L'effetto dei detergenti sul miglioramento della sensibilità delle analisi di proteomica condotte mediante IMS è stato valutato su 9 sezioni consecutive di tessuto epatico, depositate alternativamente con le diverse matrici in studio (matrice tradizionale ed addizionata con 0.05% SDS o 0.05% Triton X-100) mediante spotter acustico.

L'analisi statistica è stata condotta mediante il software ClinProTools e sono stati considerati significativi quei segnali diversamente espressi nelle due classi in studio che presentavano contemporaneamente valori di AUC > 0.8 ed un p-value < 0.05 per il t-test.

Dal confronto statistico dei profili spettrali ottenuti con la matrice tradizionale e con la stessa matrice addizionata con 0.05% di SDS è emerso che il $59\% \pm 5\%$ dei segnali era differentemente intenso, ed in particolare il 59% di questi ($35\% \pm 1\%$ sul totale dei segnali) risultava essere più intenso nei profili ottenuti mediante matrice addizionata con detergente.

Per quanto riguarda invece il confronto statistico effettuato sui tessuti depositati con matrice tradizionale e addizionata con Triton X-100 è emerso che il 20% \pm 2% dei segnali era diversamente intenso, ed in particolare l'80% di questi (16% \pm 2% sul totale dei segnali) risultava essere più intenso negli spettri ottenuti mediante matrice addizionata con il detergente.

I risultati dimostrano che la matrice addizionata con 0.05% di SDS determina un aumento significativo dell'intensità di numerosi segnali sul range di massa più basso, mentre l'utilizzo del Triton X-100 produce un notevole aumento dell'intensità di numerosi segnali nel range di massa superiore a 11000 m/z (Fig. 4.26).

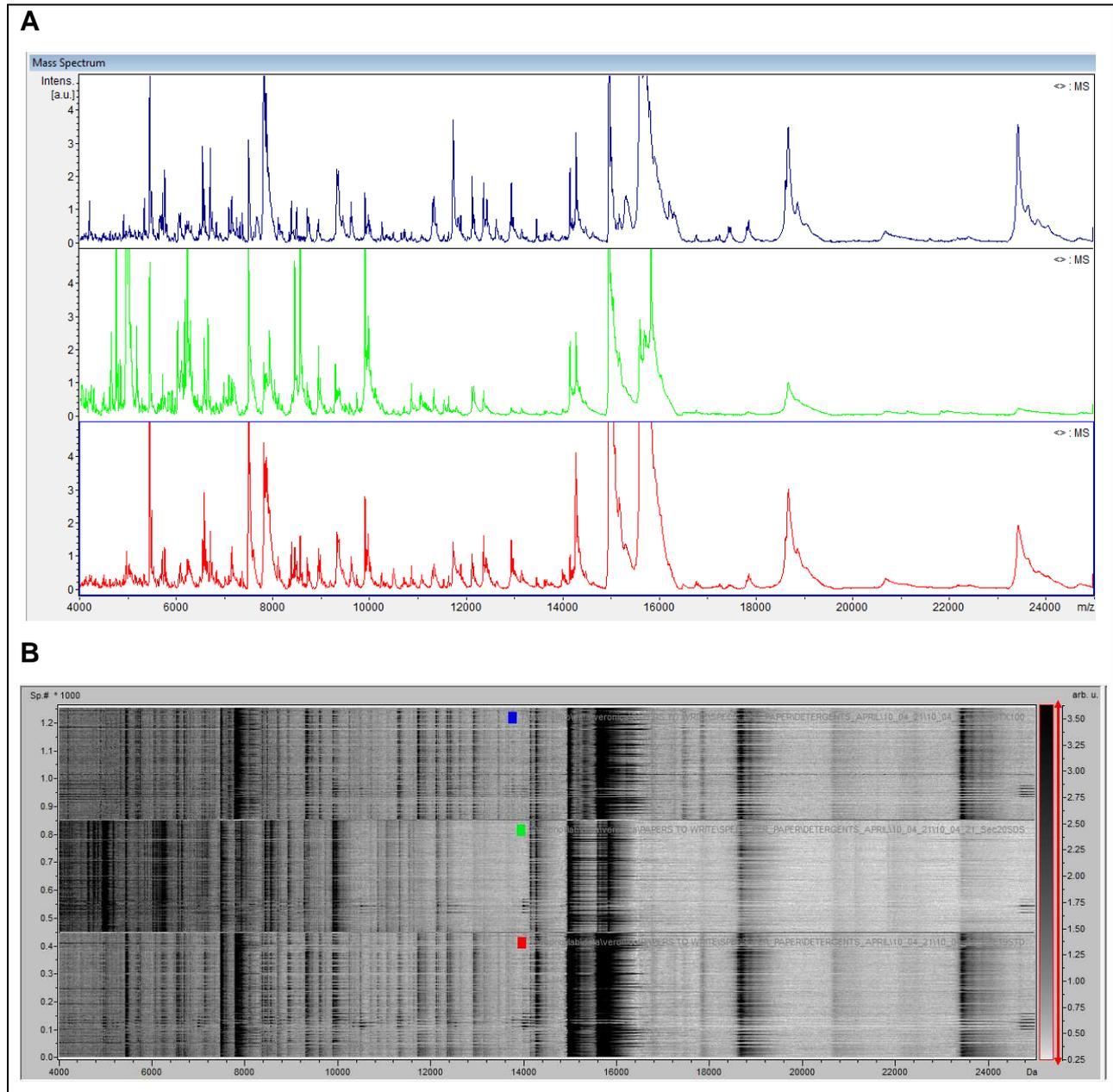


Fig 4.26: Confronto fra gli spettri ottenuti dal tessuto epatico murino con matrice tradizionale (rosso), addizionata con 0.05% SDS (verde) e addizionata con 0.05% Triton X-100.
Pannello A: profilo proteico medio; pannello B: pseudo gel view.

4.4.7.2 Topi ICR

Per valutare l'effetto dei detergenti su molteplici organi contemporaneamente, sono state utilizzate sezioni consecutive di topo ICR sacrificato al primo giorno postnatale (ICRP1).

Tre sezioni consecutive dell'animale intero sono state depositate alternativamente mediante spotter acustico con la matrice senza detergenti e addizionata con 0.05% SDS o 0.05% Triton X-100.

I risultati hanno dimostrato che i diversi detergenti hanno un effetto differente sui diversi organi.

In particolare riportiamo come esempio i risultati ottenuti dal tessuto cerebrale (Fig. 4.27) e dal tessuto cardiaco (Fig 4.28).

Dall'analisi statistica dei profili proteici medi ottenuti dal tessuto cerebrale dei topi ICRP1 depositato con matrice tradizionale e addizionata con Triton X-100 è emerso che il 65% dei segnali presentava una diversa intensità ed in particolare il 65% di questi (42% sul totale dei segnali) risultava essere più intenso negli spettri ottenuti mediante matrice addizionata con il detergente. Il numero totale dei segnali rilevati era 149.

Per quanto riguarda invece il confronto statistico effettuato sui profili medi ottenuti dai tessuti depositati con matrice tradizionale e con la stessa matrice addizionata con 0.05% di SDS, il 69% dei segnali risultava essere diversamente intenso fra le due preparazioni, tuttavia la matrice tradizionale rimaneva ottimale per il 52% dei segnali totali. Il numero totale dei segnali rilevati era 161.

I risultati dimostrano che la matrice addizionata con 0.05% di Triton X-100 determina, rispetto alla matrice tradizionale preparata senza detergenti, un notevole aumento dell'intensità dei segnali su tutto il range di massa ed in particolar modo nel range di massa inferiore a 11000 m/z (Fig. 4.27) sul tessuto cerebrale.

La matrice addizionata con 0.05% di SDS invece non presentava un miglioramento della sensibilità rispetto alla matrice tradizionale.

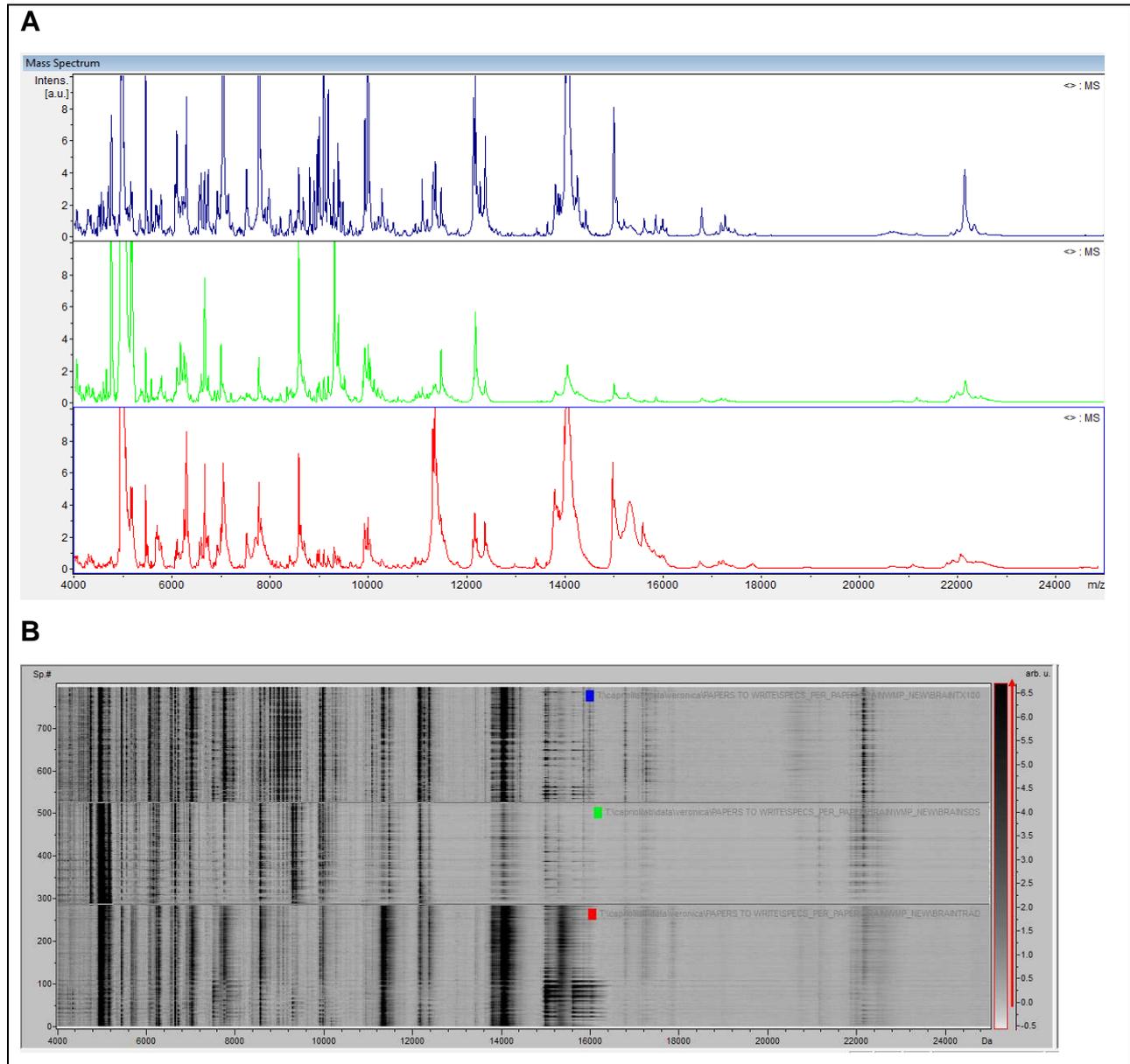


Fig 4.27: Confronto fra gli spettri ottenuti dal tessuto cerebrale con matrice tradizionale (rosso), addizionata con 0.05% SDS (verde) e addizionata con 0.05% Triton X-100.

Pannello A: profilo proteico medio; pannello B: pseudogel view.

L'analisi statistica condotta sui profili proteici medi ottenuti dal tessuto cardiaco dei topi ICRP1 depositato con matrice tradizionale e con la stessa matrice addizionata con 0.05% di SDS ha evidenziato che il 61% dei segnali presentava un'intensità diversa, ed in particolare l' 82% di questi (50% sul totale dei segnali) risultava essere più intenso nei profili ottenuti mediante matrice addizionata con detergente. Il numero totale dei segnali era 112.

Per quanto riguarda invece il confronto statistico effettuato sui profili medi ottenuti dai tessuti depositati con matrice tradizionale e addizionata con Triton X-100 è emerso che il 28% dei segnali era diversamente intenso, ed in particolare il 71% di questi (20% sul totale dei segnali) risultava essere più intenso negli spettri ottenuti mediante matrice addizionata con il detergente. Il numero totale dei segnali era 101.

I risultati dimostrano che entrambe le matrici addizionate con detersivi determinano un notevole miglioramento della sensibilità rispetto all'intensità dei segnali rilevati, tuttavia la matrice addizionata con SDS sembra essere ottimale per il tessuto cardiaco (Fig. 4.28)

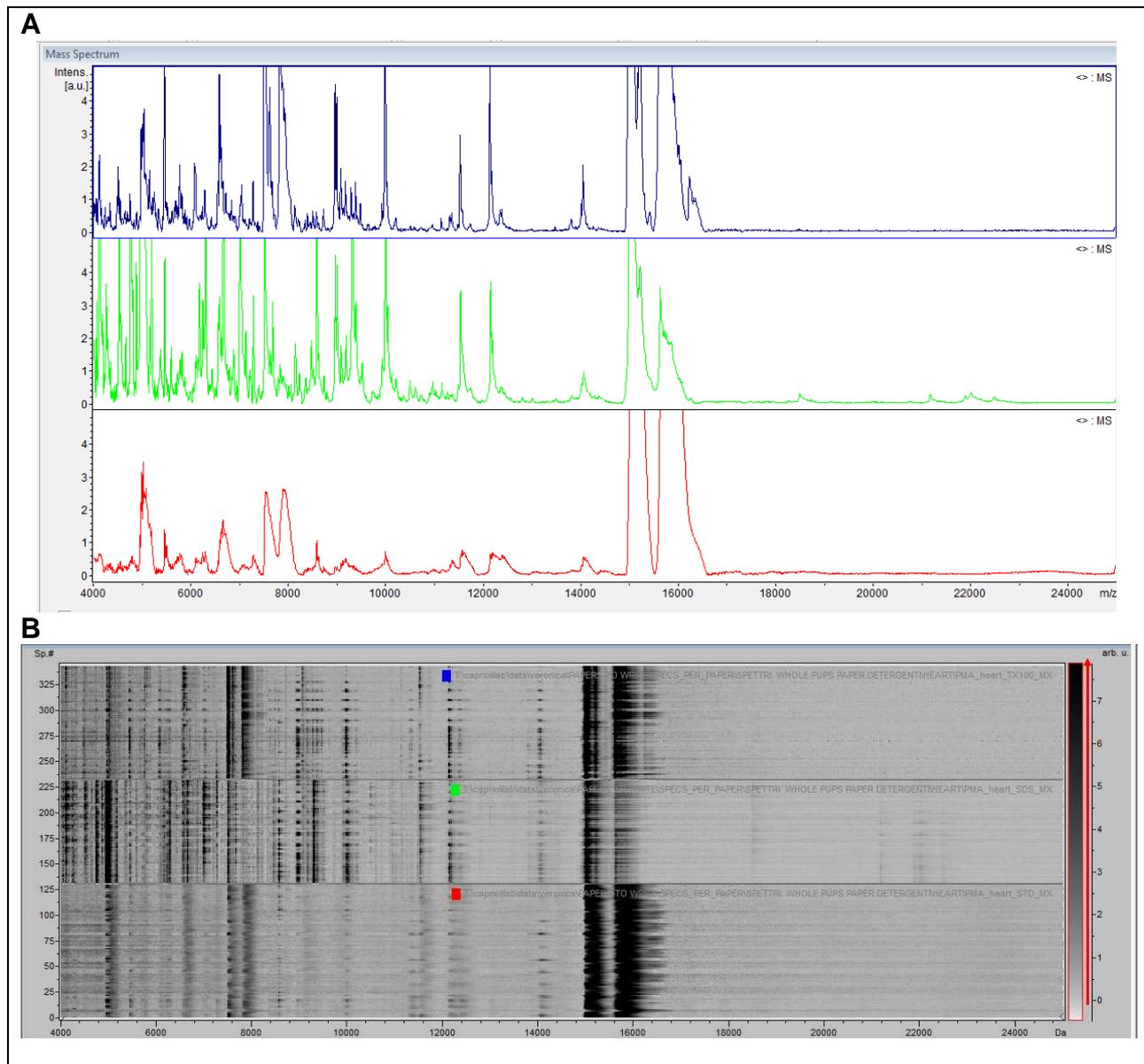


Fig. 4.28: Confronto fra gli spettri ottenuti dal tessuto cardiaco murino con matrice tradizionale (rosso), addizionata con 0.05% SDS (verde) e addizionata con 0.05% Triton X-100. Pannello A: profilo proteico medio; pannello B: pseudogel view.

L'utilizzo dei detergenti addizionati direttamente alla matrice determina un notevole miglioramento dell'intensità di numerose proteine rilevate nel tessuto. La figura 4.29 riporta alcuni esempi di ioni la cui intensità è aumentata grazie all'utilizzo dei surfactanti.

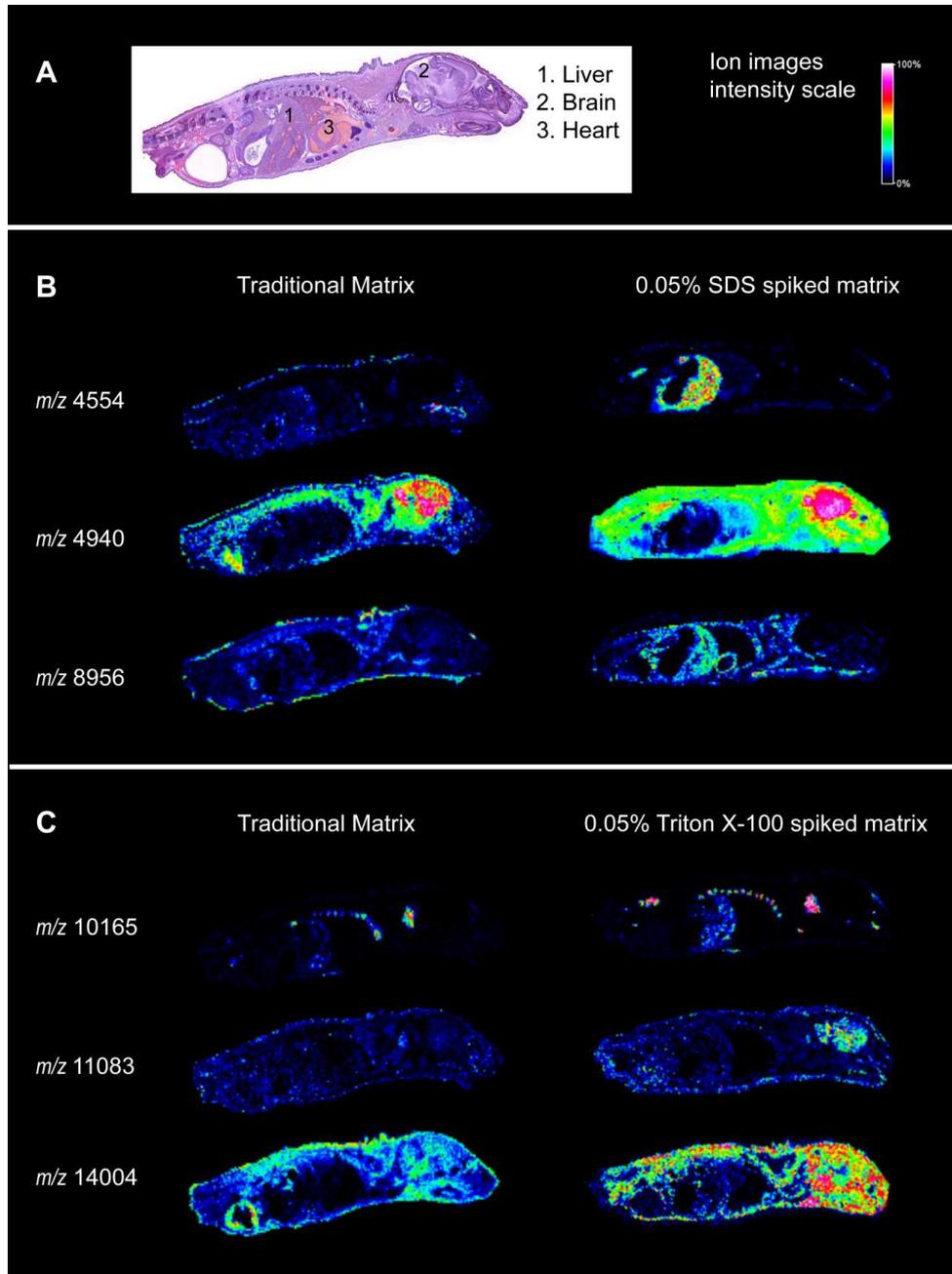


Fig. 4.29: IMS dei topi ICR. Pannello A: colorazione H & E. Pannelli B e C: confronto fra matrice tradizionale senza detergenti e matrice addizionata con 0.05% SDS (B) e con 0.05% Triton X-100 (C). Nel caso degli ioni con *m/z* 4554, 10165 e 11083 l'intensità del segnale è aumentata in un organo specifico, negli altri casi l'intensità del segnale è aumentata ubiquitariamente lungo l'intera sezione. (Mainini V. et al. RCM 2011,25(1):199-204.).

DISCUSSIONE

L'analisi delle proteine costituisce una parte fondamentale della ricerca volta all'approfondimento delle conoscenze delle patologie umane. L'espressione delle proteine, in termini qualitativi, quantitativi ma anche di struttura, modificazioni, interazioni proteina-proteina, distribuzione spaziale rappresenta un aspetto fondamentale del processo di studio di tali molecole ²¹⁵.

In questo lavoro di tesi sono stati valutati diversi approcci proteomici per l'analisi di fluidi biologici e tessuti con diversi scopi quali: individuare potenziali marcatori di pPROM, individuare molecole coinvolte nei processi di adattamento all'esposizione a condizioni di ipossia ipobarica in alta quota, utilizzare detergenti per migliorare la sensibilità dei segnali derivanti da analisi di spettrometria di massa imaging.

Il parto pretermine rappresenta la principale causa di morbidità e mortalità perinatale nel mondo ²¹⁶⁻²¹⁸. La rottura pretermine delle membrane amniocoriali (PROM) è definita come rottura delle membrane amniocoriali con perdita di fluido amniotico prima dell'instaurarsi del travaglio. In particolare la rottura prematura pretermine delle membrane (pPROM), che avviene prima delle 37 settimane di età gestazionale, rappresenta la causa di parto pretermine nel 25-30% dei casi e si verifica in circa il 3% delle gravidanze ^{73,219}. Gli outcome neonatali che si verificano nei casi di PROM e pPROM sono strettamente associati all'età gestazionale al momento del parto.

Le problematiche aperte relativamente a questa patologia riguardano l'approfondimento dei meccanismi di eziopatogenesi, la possibilità di individuare precocemente donne a rischio e la ricerca di marcatori in grado di predire l'inizio della patologia e gli outcome di gravidanza. Identificare potenziali marker che permettano di rilevare uno stato infiammatorio o infettivo della cavità amniotica durante il decorso clinico o anche che possano predire il periodo di latenza al parto permetterebbe di definire strategie preventive e trattamenti mirati ma anche di migliorare gli outcome di gravidanza.

Lo studio proteomico condotto mediante tecnologia ClinProt sui fluidi amniotici ha confermato la fattibilità e l'applicabilità di questa metodica allo studio di tale fluido biologico.

E' stato scelto di analizzare inizialmente il liquido amniotico in quanto, riflettendo direttamente la condizione fetale, rappresenta il fluido biologico ideale per la valutazione di alcune patologie della gravidanza e, in particolar modo, quelle dove l'ambiente intrauterino e l'interfaccia materno fetale sono coinvolti nella patogenesi.

I vantaggi dell'utilizzo della tecnica di proteomica utilizzata sono molteplici: tempi di

preparazione ed analisi brevi (1-2 ore), risultati attendibili e riproducibili, automatizzazione delle metodiche, visualizzazione delle proteine a basso peso molecolare ed individuazione di pattern proteici potenzialmente diagnostici. È inoltre rilevante il fatto che, rispetto alla tecnologia SELDI-TOF, esista la possibilità di conservare direttamente parte dell'eluato

che successivamente può essere utilizzato per la caratterizzazione proteica mediante HPLC-ESI MS/MS.

Lo studio da noi condotto ha dimostrato infatti la riproducibilità della metodica e la possibilità di ottenere spettri adeguati per intensità e numero di segnali sia nei casi in cui il liquido amniotico è stato campionato sterilmente dalla cavità uterina che in quelli in cui la raccolta è stata effettuata con metodica non invasiva dal fornice vaginale posteriore. Inoltre sono stati individuati segnali differentemente espressi nelle tre classi di studio.

In particolare, dal confronto dei gruppi 1 (pPROM) e 2 (PROM) del nostro studio sono stati individuati tre segnali a m/z 1428, 3001 e 3016, in grado di separare le due popolazioni considerate in modo statisticamente significativo. Mediante analisi con HPLC-ESI MS/MS, effettuata sugli eluati delle tre popolazioni, è stato possibile identificare il peptide a m/z 1428. Tale peptide appartiene alla proteina codificata dal gene KIAA1522 sul cromosoma 1, ed espressa soprattutto dal cervello e dal fegato fetale²²⁶.

Il significato di questo risultato è attualmente incerto in quanto non si possiedono informazioni riguardo le funzioni e l'origine di questa proteina.

Tuttavia, di particolare interesse è il fatto che anche un campione appartenente al gruppo delle amniocentesi genetiche esprima in misura nettamente superiore il segnale di interesse, individuato come potenziale marker di pPROM. Tale campione era stato prelevato da una donna completamente asintomatica al momento del prelievo, che nel corso della gravidanza ha sviluppato una pPROM.

A partire da questi risultati si potrebbe ipotizzare che questa proteina sia un potenziale marcatore di un processo materno o fetale correlato alla rottura prematura precoce delle membrane amniocoriali già presente nel liquido amniotico prima del manifestarsi di questa patologia.

Inoltre la presenza di questo segnale all'interno dei gruppi 1 e 3 potrebbe essere indicativa del fatto che la sua esistenza non è influenzata né dalla modalità di campionamento, che nel primo caso è avvenuta in modo non invasivo, mentre nel

secondo caso tramite prelievo sterile dalla cavità uterina, né dall'età gestazionale della gravidanza.

Il fatto che la composizione biologica del liquido amniotico si modifichi durante il corso della gravidanza è descritto in diversi lavori presenti in letteratura. Un articolo pubblicato recentemente su *Journal of Proteome Research* ha riportato che la concentrazione di diversi enzimi e metaboliti, quali per esempio urea e creatinina, aumenta durante la gestazione rispecchiando la maturazione di alcuni apparati fetali come quello renale, polmonare ed intestinale. Un'ulteriore conferma deriva dallo studio che riporta le variazioni di concentrazione dei proteoglicani "Agrin" e "Perlecan" durante la gravidanza⁷⁷.

Si potrebbe forse ipotizzare che i tre segnali in grado di separare il gruppo delle pPROM da quello delle PROM siano spiegabili proprio dalle modificazioni che il liquido amniotico subisce nel corso della gravidanza. Tuttavia il fatto che anche in un'amniocentesi sia stato possibile individuare il segnale ascrivibile al segnale con m/z 1428, induce a pensare che quest'ultimo sia invece strettamente correlato alla presenza della patologia piuttosto che a modificazioni fisiologiche. Di contro, per quanto riguarda gli altri due segnali che non è stato possibile caratterizzare in modo statisticamente significativo, possiamo supporre che siano espressione di proteine che durante il corso della gravidanza non vengono più espresse. Tuttavia per escludere o associare un loro possibile ruolo nella genesi della rottura delle membrane amniocoriali è necessaria un'identificazione certa.

A confermare l'ipotesi che una proteina prodotta dal feto possa essere indice di patologia o sofferenza fetale sono gli studi condotti sulla proteina S100B. Quest'ultima appartiene alla famiglia multigenica delle proteine calcio-dipendenti S100 ed è stata isolata, mediante saggi immunologici, in diversi fluidi biologici (liquido cefalo-rachidiano, sangue, urine e liquido amniotico) come indice di danno cerebrale fetale e neonatale. Il suo livello sembra aumentare prima ancora che il danno cerebrale sia rilevabile con le indagini strumentali. Inoltre, esiste una correlazione tra la sua concentrazione e l'estensione del danno. S100B è prodotta soprattutto a livello del sistema nervoso, ma la sua presenza è stata riportata anche a livello di altre cellule come, ad esempio, gli adipociti, i melanociti, i condrociti, le cellule di Langherans e le cellule di Leyding. Sembra, inoltre, che una quota di S100B sia prodotta dalle placenta e dalle membrane amniocoriali, ma che questo non influenzi il ruolo di questa proteina quale indicatore di patologia²²⁰. Un aumento del livello di tale proteina nel liquido amniotico è stato rilevato

anche in gravidanze complicate con morte intrauterina del feto ed in presenza di alcune patologie quali spina bifida, anencefalia e sindrome di Down. Al contrario sembra non essere presente nel liquido amniotico in condizioni fisiologiche²²¹.

La concentrazione di S100B risulta aumentata anche nel sangue prelevato dal cordone ombelicale di feti con ritardo di crescita intrauterino (IUGR) in correlazione con un'alterazione dell'emodinamica cerebrale ("brain sparing effect") suggerendo il suo possibile ruolo di indicatore di danno cerebrale²²².

Da un altro studio è emerso come la sua concentrazione sia aumentata nel liquido amniotico nei casi di parto pretermine associato a infezione o infiammazione intramniotica sia a membrane intatte che in seguito a pPROM;

Esiste quindi una stretta relazione tra questa proteina, prodotta come KIAA1522 dal cervello fetale, e l'infiammazione intramniotica. Recentemente è stato infine dimostrato il fatto che la concentrazione di S100B non è influenzata dall'età gestazionale; quest'ultimo dato confermerebbe ulteriormente le nostre ipotesi²²³.

In uno studio di Gazzolo e colleghi è riportato inoltre che un livello di S100B superiore a 0,72 µg/l nel siero materno, risulta avere una sensibilità del 100% ed una specificità del 99,3% nel predire l'insorgenza di emorragia intraventricolare neonatale in assenza di segni clinici e strumentali rilevabili²²⁴.

Rispetto ai risultati da noi ottenuti è ipotizzabile un legame tra la presenza della proteina da noi individuata e la rottura pretermine prematura delle membrane, ma non siamo in grado di dire se la proteina sia prodotta dal feto in condizioni di sofferenza o in presenza di infiammazione intramniotica subclinica, come S100B, oppure se sia legata ad un particolare fenotipo fetale responsabile dell'instaurarsi della patologia.

E' certamente necessario confermare questo risultato in una casistica più ampia ed in studi che valutino il liquido amniotico di donne destinate ad avere pPROM o parto pretermine a membrane integre, appartenenti a popolazioni sia a basso che ad alto rischio. Chiarificare l'eziopatogenesi di queste patologie potrebbe, infatti, permettere la prevenzione, la diagnosi precoce ed, eventualmente, l'applicazione di nuove terapie. Tutto questo è di fondamentale importanza in quanto la rottura delle membrane prima del termine della gravidanza (pPROM) è associata a complicanze importanti che si accompagnano ad outcome neonatali sfavorevoli come il parto pretermine, che è conseguenza di questa patologia nel 25-30% dei casi.

Attualmente le conoscenze in merito si limitano all'identificazione di alcuni fattori di rischio per l'instaurarsi della pPROM quali: una storia clinica di pPROM o di parto

pretermine, la contrazione di vaginosi batterica, l'infezione subclinica intrauterina, la lunghezza cervicale inferiore a 2,5 cm, la positività al test per la Fibronectina e numerosi altri fattori. In particolare, da diversi studi condotti emerge la possibilità di una suscettibilità genetica; sono stati infatti identificati polimorfismi genetici sia materni che fetali associati ad un aumentato rischio di pPROM. Esisterebbe, quindi, un sinergismo tra predisposizione genetica e condizioni ambientali ²²⁵.

La possibilità di dosare un marcatore di un processo patologico materno o di danno fetale sarebbe sicuramente utile se potesse essere ottenuta anche mediante raccolta di sangue materno evitando esami invasivi, come è stato effettuato nello studio di Gazzolo e colleghi sopra citato. Anche Chang e colleghi hanno effettuato uno studio sul materno, ma in condizioni di gravidanza fisiologica. In particolare mediante questo studio è stato definito un elenco di 1026 proteine codificate da 754 geni. Il 42% di tali proteine è risultato essere di origine extracellulare, mentre il 26% di membrana. Successivamente nel plasma materno sono state ritrovate il 36% di tutte le proteine individuate ²²⁷. Obiettivo futuro del lavoro potrebbe essere ricercare la proteina KIAA1522 ed altri potenziali marcatori con tecnica Clin Prot e spettrometria di massa MALDI-TOF anche nei plasmi dei tre gruppi appartenenti allo studio con lo scopo di verificare la sua presenza ed, eventualmente, di confermare la sua appartenenza esclusiva al gruppo delle pPROM.

Un limite del nostro studio ad oggi è certamente rappresentato dal fatto di non disporre di un gruppo di controllo di gravidanze fisiologiche con età gestazionale paragonabile a quella dei gruppi 1 e 2. Non è tuttavia eticamente possibile ottenere campioni di liquido amniotico da gravidanze fisiologiche ad eccezione delle amniocentesi genetiche eseguite tra la 16a e la 18a settimana di gravidanza. Uno degli obiettivi futuri del lavoro è il campionamento di liquido amniotico prelevato da donne con gravidanze fisiologiche sottoposte a taglio cesareo elettivo senza complicanze della gravidanza. In questo modo potremo confrontare questi campioni con quelli prelevati delle donne con PROM a termine, paragonabili per età gestazionale. Inoltre campionando il liquido amniotico dal fornice vaginale posteriore in donne con gravidanze fisiologiche in cui viene praticata l'amnioressi allo scopo di indurre il parto e confrontando questi campioni con quelli ottenuti in modo invasivo durante i tagli cesarei elettivi sarà possibile verificare se le due modalità di campionamento, invasivo e non, sono sovrapponibili.

La tecnologia ClinProt è stata applicata anche al progetto HIGHCaRe per lo studio del proteoma urinario. Tale studio fa parte di un progetto più ampio, condotto sulla parete sud del monte Everest, sulla catena Himalayana.

Il progetto HIGHCaRe 2008 si proponeva di valutare il possibile impatto sull'acclimatemento all'ipossia ipobarica in alta quota da parte di un antagonista recettoriale dell'angiotensina II, il Telmisartan. I 47 soggetti in studio, componenti la spedizione, sono stati pertanto randomizzati ad assumere Telmisartan a 80 mg/die o placebo in doppio cieco e sono stati sottoposti ad una serie di valutazioni ematochimiche e di tipo respiratorio e neurologico. Tali misurazioni comprendevano: ecocardiogramma, polisonnografia, monitoraggio dinamico della pressione arteriosa per 24h, valutazione della rigidità arteriosa e dell'impedenzometria toracica, studio della variabilità della pressione arteriosa, della frequenza cardiaca e analisi della sensibilità spontanea del baroriflesso, reattività neuropsicologica, valutazione dei possibili effetti positivi della ventilazione con pressione positiva continua delle vie aeree e respiro controllato, spirometria e misura della diffusione per il monossido di carbonio²²⁸. Inoltre, sono stati sottoposti alla raccolta delle urine per lo studio proteomico, ma anche per l'analisi parallela di altri parametri (quali per esempio osmolarità e sodio), ed al prelievo ematico di notevoli quantità di sangue per lo studio del proteoma (siero e plasma) e per la valutazione di numerosi parametri quali per esempio: leptina, angiotensina, renina, aldosterone, ANF, ADH, Surfactant Binding Protein, tolleranza al glucosio, Hpcidina, Ferritina, Transferrina e numerosi altri.

La disponibilità di una casistica molto ampia (47 soggetti) e di elevate quantità di materiale biologico hanno permesso di effettuare uno studio completo con risultati integrati e multidisciplinari. I primi risultati relativi al metabolismo del ferro, ai polimorfismi genetici dell'enzima ACE (Angiotensin Converting Enzyme), alla regolazione umorale della pressione sanguigna ed all'effetto della ventilazione con pressione positiva continua delle vie aeree sono già stati pubblicati²²⁸⁻²³². Tuttavia l'integrazione dei risultati multidisciplinari raccolti in tutti gli studi richiederà ulteriori sforzi ed adeguate tempistiche.

Anche i risultati riportati in questo lavoro di tesi sono ancora parziali e dovranno essere completati con l'identificazione delle molecole di interesse ed integrati con i risultati provenienti da altri studi inclusi nel progetto.

E' stato scelto di studiare il proteoma urinario in quanto le urine rappresentano un fluido la cui preparazione e conservazione sono note e seguono protocolli robusti ed affidabili

da un punto di vista proteomico. Le urine, inoltre, contengono peptidi e proteine a basso peso molecolare che possono riflettere direttamente la condizione fisiopatologica del rene. Gli adattamenti del rene alla condizione di ipossia ipobarica risultano di notevole interesse sia per comprendere meglio l'adattamento all'alta quota, sia per comprendere i meccanismi che si instaurano nei pazienti affetti da patologie che implicano una consistente ipossia a livello tissutale. Inoltre è stato riportato che, in condizioni fisiologiche, il contenuto proteico urinario origina per il 70% dal rene e dal tratto urinario, e per il 30% dal plasma²³³. Cambiamenti presenti nel proteoma urinario potrebbero pertanto riflettere modificazioni presenti a livello sistemico.

L'adattamento alla condizione di ipossia ipobarica in alta quota è stato studiato da un punto di vista proteomico solamente nel tessuto muscolare. In particolare Gelfi e colleghi hanno proposto due lavori focalizzati sulla modulazione del proteoma del muscolo scheletrico in soggetti Caucasic e nativi Tibetani e Nepalesi esposti ad ipossia ipobarica in alta quota^{234,235}.

Lo studio proteomico descritto in questa tesi è il primo focalizzato sul proteoma dei fluidi biologici in esposizione ad ipossia ipobarica in alta quota.

In primo luogo, nel lavoro di tesi, sono state valutate potenziali alterazioni del proteoma urinario dovute all'inibizione degli effetti dell'angiotensina II mediante trattamento farmacologico con Telmisartan. I risultati ottenuti dall'analisi proteomica hanno dimostrato che il blocco recettoriale altamente selettivo esercitato dal Telmisartan non determinava alcuna alterazione del proteoma urinario nei soggetti in studio né a livello del mare né in alta o altissima quota.

Successivamente, è stato studiato l'effetto dell'esposizione all'ipossia ipobarica raggruppando per ogni diversa altitudine (bassa quota, alta quota ed altissima quota) i soggetti trattati con placebo e quelli trattati con Telmisartan, in quanto non erano presenti differenze statisticamente significative fra i due gruppi.

In particolare, in questa fase dello studio, sono stati confrontati gli spettri ottenuti a bassa quota con i profili proteici medi ottenuti dall'esposizione della popolazione a condizioni di ipossia ipobarica in alta quota (3500 mt, Namche Bazaar) ed altissima quota in fase acuta (5400 mt, Campo base Everest).

I campioni raccolti in altissima quota dopo esposizione cronica all'ipossia ipobarica (11 giorni) non sono stati utilizzati in quanto pervenuti scongelati al Dipartimento di Medicina Sperimentale. Invece, i campioni raccolti al rientro a Milano e a distanza di tre mesi dal rientro sono ancora in fase di studio.

I risultati emersi dal confronto della popolazione a livello del mare ed in condizioni di ipossia ipobarica acuta in alta ed altissima quota hanno dimostrato che l'espressione di numerosi segnali nel profilo proteico urinario era significativamente diversa fra le 3 classi in studio.

In particolare sono stati individuati 6 segnali, la cui intensità variava nelle tre classi in studio con diverso andamento.

I segnali con m/z 1683 e 2194 presentavano una ridotta espressione nella popolazione esposta ad ipossia ipobarica sia in alta che in altissima quota. Tale risultato suggerisce una down-regulation delle due molecole in presenza di ipossia ipobarica, già ad alta quota. Tali molecole potrebbero essere associate ad adattamenti immediati di acclimatamento all'ipossia ipobarica, che si mantengono anche in quota.

I segnali con m/z 4298 e 4757, invece, presentavano un andamento differente. La loro espressione nel proteoma urinario risultava diminuita a seguito dell'esposizione alla condizione di ipossia ipobarica in alta quota rispetto all'espressione a livello del mare. Tuttavia, una volta raggiunta l'altissima quota tali segnali presentavano un'intensità comparabile a quella riscontrata a livello del mare. Tale andamento suggerisce l'ipotesi di un potenziale meccanismo compensatorio del rene, che riporta le due molecole ad un livello fisiologico a seguito probabilmente di un adattamento renale tardivo all'ipossia ipobarica.

Infine, i segnali con m/z 1165 e 1953 presentavano una maggiore espressione in altissima quota rispetto sia al livello del mare sia all'esposizione all'ipossia ipobarica in alta quota.

In particolare, l'espressione del segnale con m/z 1165 rimaneva invariata fra livello del mare ed alta quota ed aumentava significativamente nella popolazione esposta alla condizione di ipossia ipobarica in altissima quota. L'andamento di tale molecola, caratterizzante una condizione di ipossia ipobarica, suggerisce l'ipotesi di un coinvolgimento in un processo di adattamento tardivo.

L'espressione del segnale con m/z 1953 invece diminuiva a Namche Bazaar, quindi ad una prima esposizione all'ipossia ipobarica, ma aumentava sensibilmente in esposizione all'altissima quota, raggiungendo un'espressione significativamente maggiore rispetto a quella riscontrata a livello del mare. Anche in questo caso la molecola è associata all'esposizione in altissima quota all'ipossia ipobarica e potrebbe essere coinvolta in un processo di adattamento tardivo, tuttavia appare down-regolata nella prima fase di esposizione all'ipossia ipobarica in alta quota.

La caratterizzazione di queste molecole e la loro identificazione sono fondamentali per comprendere e definire il loro ruolo nei processi di acclimatazione in quota e di adattamento alla condizione di ipossia ipobarica. Le analisi di caratterizzazione ed identificazione di tali molecole sono ancora in corso.

Ad oggi solamente una delle molecole di interesse è stata identificata con successo. Tale molecola corrisponde al peptide con m/z 1683 (m/z esatto 1679.9), che presentava una down-regulation rispetto al livello del mare, durante l'esposizione all'ipossia ipobarica sia in alta che in altissima quota

Tale peptide è stato identificato come un frammento della proteina Uromodulina, nota anche come glicoproteina urinaria di Tamm-Horsfall (THP), codificata dal cromosoma 16.

L'Uromodulina fu isolata per la prima volta dalle urine di soggetti umani dagli scienziati Tamm e Horsfall, i quali ne riportarono anche la capacità di interagire ed inibire l'emoagglutinazione virale^{236,237}. Trentacinque anni dopo altri due scienziati, Muchmore e Decker, identificarono una glicoproteina nelle urine di donne gravide. Diedero a tale proteina il nome di Uromodulina, a seguito della sua potente attività immunosoppressiva²³⁸. Successivamente il gruppo di Pennica dimostrò che la THP e l'Uromodulina erano la stessa proteina²³⁹. Nello stesso lavoro Pennica dimostrò inoltre che l' Uromodulina non era una proteina specifica delle donne gravide e che la sua escrezione urinaria non era influenzata dal sesso né dall'età del soggetto.

Dal punto di vista strutturale la THP è una proteina che si trova ancorata alla membrana citoplasmatica per mezzo di un glicosilfosfatidilinositolo (ancora GPI). Il precursore della THP è costituito da 640 aminoacidi, di questi 24 ne costituiscono il peptide segnale, 26 il propeptide rimosso nella forma matura e 590 costituiscono la molecola dell' Uromodulina matura. L'Uromodulina presenta sulla porzione N-terminale 3 domini "EGF-like" (epidermal growth factor-like), tipicamente presenti sul dominio extracellulare delle proteine ancorate a membrana e nelle proteine che devono essere secrete. Il primo di questi domini si colloca in posizione Glu₂₈-Val₆₄, mentre il secondo ed il terzo si collocano rispettivamente in posizione Asp₆₅-Thr₁₀₇ e Asp₁₀₈-Glu₁₄₉; tali domini possiedono anche dei potenziali siti di legame con il Calcio. Nella sequenza, fra l'aminoacido Glu₃₃₄ ed Ser₅₈₉, è presente anche un dominio "zona pellucida-like" coinvolto nelle interazioni proteina-proteina.

La THP matura contiene in totale 48 residui di Cisteina, coinvolti in 24 ponti disolfuro, che svolgono un ruolo fondamentale nella definizione della conformazione

tridimensionale della proteina. Inoltre, sono stati individuati 7 siti potenziali di N-glicosilazione (sui residui di Asparagina in posizione 38, 76, 80, 232, 275, 322 e 396), che ne determinano l'elevato contenuto in carboidrati.

Sulla porzione C-terminale della proteina è presente una coda di aminoacidi idrofobici, che svolge una funzione segnale per l'attacco all'ancora GPI sul reticolo endoplasmatico. Dopo il legame al reticolo endoplasmatico la proteina matura è trasportata all'apparato di Golgi, dove i glicani sono completamente processati. Successivamente la THP raggiunge la superficie luminale della cellula e viene definitivamente rilasciata nelle urine mediante clivaggio proteolitico, che avviene fra la Serina in posizione 548 e la Fenilalanina in posizione 549²⁴⁰.

La frazione urinaria di THP dovrebbe presentarsi quindi 66 aminoacidi più corta rispetto alla frazione ancorata alla membrana.

L'uromodulina è la proteina più abbondante presente nelle urine umane in condizioni fisiologiche. E' escreta con le urine in quantità pari a circa 50-100 milligrammi/die, quantità variabile in relazione alla dieta, l'attività fisica ed il volume di urine espulso nelle 24h²⁴¹. Si trova nelle urine sotto forma di polimero ad alto peso molecolare ed è espressa esclusivamente dalle cellule epiteliali del tratto ascendente spesso (TAL) dell'ansa di Henle e dalle cellule epiteliali del tubulo contorto distale (DCT), localizzata prevalentemente sulla membrana cellulare apicale²⁴².

Il ruolo biologico dell' Uromodulina è stato a lungo investigato ma non è ancora del tutto chiarito. Dal punto di vista funzionale è stato dimostrato che la proteina tende ad interagire con i linfociti attraverso i glicani cui si lega, e compete con i recettori dell' uroplachina per l'adesione dell' Escherichia Coli di tipo 1 fimbriato²⁴³. Sulla base di tale osservazione è stato proposto che l' uromodulina abbia un effetto sulla difesa dalle infezioni nel tratto urinario. Tale ipotesi è confermata da uno studio condotto su topi knock-out per il gene dell' uromodulina, i quali mostrarono una predisposizione allo sviluppo di infezioni del tratto urinario²⁴⁴. Studi in vitro hanno inoltre riportato che la THP è in grado di attivare linfociti e neutrofili^{245,246}.

Inoltre, i siti glicosilati dell'uromodulina contengono diversi tipi di glicani. Tale proprietà permette il legame della proteina con numerosi ligandi quali le citochine IL-1 ed IL-2, il TNF²⁴⁷, le immunoglobuline, alcune proteine associate al mieloma, ioni^{248,249} ed è quindi ipotizzabile un suo ruolo attivo anche nell' adesione cellulare e nella trasduzione del segnale.

Uno studio condotto su topi knock-out per il gene dell' uromodulina ha inoltre dimostrato

che la THP ha un ruolo attivo nella prevenzione della formazione di calcoli ²⁵⁰.

L' uromodulina, inoltre, sembra essere in grado di formare una struttura simile ad un gel per regolare il riassorbimento dell'acqua nel TAL ²⁵¹. Se tale processo non funziona correttamente implica un'alterazione sull'osmolarità interstiziale e la capacità di concentrare le urine.

Altre funzioni dell' uromodulina sono state individuate a seguito dell'associazione fra alcune patologie renali e mutazioni presenti sulla proteina stessa (o sul gene che la codifica). Difetti nel gene UMOD, codificante l' uromodulina, possono causare lo sviluppo della HNFJ1 (Familial Juvenile Hyperuricemic Nephropaty Type 1). Tale patologia è caratterizzata da iperuricemia, poliuria, degenerazione renale progressiva e gotta. L'uromodulina è coinvolta nel processo di riassorbimento degli urati nel tubulo prossimale, e quindi regola l'uricemia. Inoltre, un folding alterato della proteina può causarne un accumulo a livello del reticolo endoplasmatico delle cellule tubulari ²⁵²⁻²⁵⁴.

Mutazioni dell' uromodulina sono state associate anche alla MCKD2 (Medullary Cystic Kidney Disease Type 2), patologia caratterizzata dalla formazione di cisti sulla giunzione corticomidollare e da problemi nella corretta concentrazione delle urine ^{252,255,256}.

Infine, mutazioni della THP sono state associate alla GCKDHI (Glomerulocystic Kidney Disease with Hyperuricemia and isosthenuria), un'altra patologia del rene che presenta iperuricemia, bassa escrezione di acido urico e problemi di concentrazione delle urine ²⁵⁵.

Un recente studio ha inoltre localizzato la THP a livello del ciglio primario, deputato al rilevamento del flusso luminale e alla trasduzione del segnale extracellulare attraverso l'orletto a spazzola e vari *pathways* intracellulari. Tale osservazione ha suggerito che l'espressione della proteina potrebbe essere regolata da sensori meccanici o osmosensori, come il ciglio primario ^{242,257}.

Se si considera la sequenza aminoacidica dell' uromodulina si può notare che il peptide rilevato come sottoespresso in alta quota appartiene alla porzione di proteina che ne costituisce l'ancora al GPI in membrana. Non è ancora chiaro come il peptide venga rilasciato nelle urine. In un lavoro di Cavallone e colleghi si riporta l' ipotesi dell'esistenza di una forma di uromodulina senza l'ancora GPI, presente all'interno delle cellule a livello del reticolo endoplasmatico. Questa verrebbe rilasciata dopo clivaggio tramite esocitosi e costituirebbe una via alternativa quantitativamente di minore rilevanza di secrezione della THP urinaria ²⁵⁸.

Si potrebbe ipotizzare che una proteasi particolare, espressa in una determinata condizione patologica del rene, agisca nella degradazione del frammento di uromodulina che rimane adeso alla membrana dopo il clivaggio “fisiologico” operato fra la Serina in posizione 548 e la fenilalanina in posizione 549. Oppure il peptide di interesse potrebbe essere rilasciato dal reticolo endoplasmatico dopo il clivaggio intracellulare dell’ uromodulina.

Rimangono anche da chiarire il meccanismo ed il significato funzionale associati ad una ridotta espressione di questo frammento a livello del proteoma urinario dei soggetti esposti alla condizione di ipossia ipobarica in alta quota.

Nel nostro lavoro abbiamo identificato 3 peptidi appartenenti all’uromodulina ma solamente il peptide con m/z 1679.9 sembra essere down-regolato in quota. La comprensione del meccanismo che porta alla formazione dei diversi frammenti di uromodulina è fondamentale per comprendere se tale frammento è coinvolto attivamente nella regolazione dell’osmolarità urinaria, la quale decresce con l’esposizione all’ipossia ipobarica in quota.

Un altro risultato interessante è dato dal lavoro di Sigdel e colleghi²⁵⁹. In tale lavoro è stata riscontrata una ridotta espressione del peptide a m/z 1679.9 nelle urine di soggetti che presentavano un rigetto dopo trapianto allogenico del rene. Sigdel ipotizzava che tale risultato fosse associato all’attività di specifiche proteasi o inibitori delle proteasi coinvolti nel processo di rigetto. Tuttavia l’ uromodulina è in grado di interagire direttamente ed attivare i linfociti T, principali mediatori del processo di rigetto.

La chiarificazione dei processi di degradazione dell’ uromodulina rimane quindi un obiettivo futuro cruciale per questo progetto, in quanto permetterebbe di comprenderne ruolo e funzioni in relazione all’ esposizione all’ipossia ipobarica in alta quota.

La spettrometria di massa imaging è un tecnologia recente rivolta allo studio dei tessuti. Tale tecnologia permette l’analisi simultanea del contenuto e della distribuzione spaziale di piccole molecole, lipidi, peptidi e proteine direttamente da sezioni di tessuto²⁶⁰. Per questo motivo rappresenta un approccio estremamente utile per valutare il ruolo e la distribuzione di proteine tessuto-specifiche coinvolte nei meccanismi di eziopatogenesi. La letteratura riporta numerosi esempi di applicazione di questa tecnologia, soprattutto con lo scopo di approfondire e delucidare informazioni molecolari relative a numerosi processi di sviluppo fisiologico e patologico²⁶¹⁻²⁶⁴.

Uno degli obiettivi più importanti di questa recente tecnologia, soprattutto nell’ambito

delle sue applicazioni in campo proteomico, è quello di migliorare la sensibilità dell'analisi, ovvero aumentare il numero e l'intensità dei segnali ottenuti dall'analisi diretta delle sezioni di tessuto.

Moltissimi sforzi sono stati dedicati all'ottimizzazione del processo di manipolazione dei campioni, che rappresenta un processo fondamentale di questa tecnologia. In letteratura sono stati pubblicati numerosi studi volti a definire l'effetto dei diversi protocolli di raccolta, conservazione, sezionamento e fissaggio del tessuto sul vetrino sul rilevamento delle proteine presenti nel tessuto. Sono stati riportati numerosi protocolli anche per definire le condizioni ottimali di preparazione e deposizione della matrice ai fini di ottimizzare la qualità degli spettri ottenuti ^{265,266}.

Tuttavia, se confrontata con le metodiche di analisi delle proteine in soluzione, l'analisi proteomica condotta direttamente su sezioni di tessuto intatte sembra meno robusta in termini di qualità degli spettri, sensibilità e riproducibilità. Tali svantaggi analitici sembrano essere dovuti alla difficoltà di estrazione e solubilizzazione delle proteine dalla struttura del tessuto stesso.

Nel lavoro di tesi è stata dimostrata la possibilità di migliorare il processo di solubilizzazione ed estrazione delle proteine dal tessuto mediante l'utilizzo di detergenti. La possibilità di utilizzare detergenti unitamente alla spettrometria di massa MALDI-TOF è stata considerata sin dalle prime applicazioni di tale tecnologia allo studio delle macromolecole biologiche ²⁶⁷. L'utilizzo dei detergenti, infatti, è richiesto in numerose preparazioni di campioni proteici. I primi studi pubblicati a proposito della compatibilità dei detergenti con l'utilizzo della spettrometria di massa MALDI-TOF furono condotti su peptidi e proteine in soluzione e mostrarono che l'utilizzo dei detergenti causava una sensibile riduzione in termini di qualità degli spettri ²⁶⁸⁻²⁶⁹. Tuttavia, alcuni lavori successivi riportarono risultati contrastanti e certi detergenti furono dimostrati non solo compatibili con la MALDI-TOF MS, ma addirittura in grado di migliorare la qualità dei segnali ottenuti. Rosinke riportò che l'SDS ed il CHAPS determinavano una degradazione in termini di qualità dello spettro mentre il Triton X-100 risultava compatibile con l'analisi MALDI, anche se non determinava alcun aumento di intensità dei segnali nello spettro ²⁶⁹. Nel 1997 Bornsen dimostrò invece che la preparazione con Triton X-100 determinava un aumento sensibile dell'intensità del segnale relativo alla fosfolipasi C. In particolare la preparazione tradizionale (senza alcun detergente) presentava un segnale con un'intensità ridotta dell'81% rispetto alla preparazione con Triton X-100. Nello stesso lavoro si dimostrava che l'intensità dei segnali ottenuti da una

miscela standard di proteine preparata senza detergenti erano comparabili a quelli ottenuti in presenza di un pannello di detergenti ed aumentati in presenza di Triton X-100²⁷⁰. Un risultato particolare fu ottenuto dal gruppo di Amado, che osservò una risposta variabile nell'intensità dei segnali in relazione alla concentrazione di detergente utilizzata²⁷¹. Inoltre, alcuni studi interessanti furono condotti per valutare l'effetto dei detergenti su proteine di membrana e per valutare un approccio utile per l'analisi simultanea di peptidi idrofobici ed idrofilici presenti nella stessa miscela^{272,273}.

La compatibilità dei detergenti con analisi MALDI-TOF condotte direttamente su sezioni di tessuto è stata investigata dal gruppo di Leinweber. In un recente lavoro hanno descritto una nuova modalità di deposizione della matrice, in cui numerosi "layer" sono stati utilizzati per co-cristallizzare le proteine e la matrice. In particolare hanno dimostrato un aumento del numero di segnali rilevati oltre i 25000 m/z ²⁷⁴.

Nel lavoro di tesi è stato valutato l'utilizzo di detergenti per studi di IMS condotti direttamente sul tessuto. In particolare è stato considerato un pannello di detergenti con diverse caratteristiche molecolari: anionici (SDS), non ionici (Triton X-100, TWEEN20 e TWEEN80) e zwitterionici (CHAPS).

Gli esperimenti iniziali sono stati condotti mediante profiling, ovvero deposito manuale di pochi microlitri di matrice direttamente sulle sezioni di tessuto di interesse. I primi risultati hanno dimostrato che tutti i detergenti in studio erano compatibili con l'analisi MALDI e generavano spettri di buona qualità, ad eccezione del detergente zwitterionico CHAPS. Tale detergente infatti mostrava un'elevata variabilità sia nella formazione dei cristalli sia nella qualità degli spettri ottenuti, quindi è stato escluso dalle successive analisi.

In seguito sono stati valutati due diversi approcci di deposizione del detergente. Il primo approccio prevedeva che il detergente fosse aggiunto direttamente alla matrice e depositato sul tessuto. Il secondo approccio, invece, prevedeva la deposizione del detergente sul tessuto a cui seguiva, dopo evaporazione, la deposizione della matrice. L'aggiunta diretta del detergente alla matrice implica l'utilizzo di un protocollo meno laborioso e risulterebbe particolarmente utile negli approcci di deposizione automatica e spray manuale. Poiché i due approcci non presentavano differenze statisticamente significative, entrambi sono potenzialmente utilizzabili per includere un detergente nell'applicazione della matrice a sezioni di tessuto.

Nel lavoro di tesi è stato utilizzato il primo approccio, in quanto meno laborioso e più adeguato alla tecnica di deposizione acustica automatizzata della matrice.

Per ognuno dei detergenti in studio in oltre, è stata dimostrata l'assenza di segnali potenzialmente interferenti con l'analisi delle proteine nell'intervallo di massa da 4000 a 25000 m/z . Per tutti i detergenti in studio sono state valutate diverse concentrazioni ed è stata determinata la concentrazione ottimale da aggiungere alla soluzione di matrice per ottenere lo spettro migliore in termini di numero, intensità e risoluzione dei segnali. Le concentrazioni ottimali sono state definite sul tessuto epatico di topi ICR adulti. Tale tessuto è stato scelto soprattutto per l'elevata omogeneità cellulare. Le concentrazioni ottimali dei detergenti in studio erano: 0.05% per SDS e Triton X-100, 0.1% per TWEEN20 e 0.03% per TWEEN80.

Una volta definita la concentrazione ottimale dei detergenti è stato valutato il loro effetto sul tessuto epatico murino di topi ICR. I risultati ottenuti dalle analisi di profiling hanno dimostrato che i detergenti in studio, soprattutto TWEEN20 e TWEEN80, erano in grado di migliorare notevolmente sia il numero che l'intensità dei segnali. Tali risultati hanno dimostrato una potenziale utilità dell'utilizzo dei detergenti per migliorare la sensibilità delle analisi volte a rilevare le proteine direttamente sulle sezioni di tessuto. Tuttavia la tecnica di profiling è associata ad un deposito manuale della matrice, che implica una variabilità notevole e quindi non permette di valutare con robustezza i dati da un punto di vista statistico. La deposizione automatizzata della matrice invece, risulta altamente riproducibile ed affidabile. Le matrici addizionate con detergenti e la matrice tradizionale sono state depositate in maniera automatizzata mediante spotter acustico allo scopo di valutare statisticamente l'effetto dei detergenti sui segnali proteici ottenuti direttamente dalle sezioni di tessuto.

La compatibilità delle matrici con la deposizione mediante spotter acustico è legata soprattutto alla tensione superficiale del fluido che viene depositato e, nonostante TWEEN20 e TWEEN80 avessero dimostrato un notevole aumento dell'intensità dei segnali nelle analisi di profiling, questi due detergenti non erano compatibili con il metodo acustico di deposizione della matrice. I detergenti SDS e Triton X-100, invece, risultavano compatibili con il deposito automatizzato. Tale compatibilità ha permesso di effettuare un confronto statistico dettagliato e robusto fra la matrice tradizionale, preparata senza detergenti, e le matrici preparate con due detergenti ampiamente utilizzati. Sia la matrice tradizionale che le matrici preparate con SDS e Triton X-100 presentavano un'elevata riproducibilità inter-sezione sia nel numero che nell'intensità dei segnali rilevati fino a tre sezioni consecutive. Potenziali differenze osservate fra sezioni consecutive depositate con la matrice tradizionale o con la matrice addizionata

con detergenti erano quindi imputabili all'utilizzo del detergente stesso. Sezioni consecutive di tessuto epatico murino sono state quindi depositate alternativamente con la matrice tradizionale e con la stessa addizionata con SDS e Triton X-100. Rispetto alla matrice preparata senza detergenti, quella addizionata con il detergente SDS determinava un aumento dell'intensità di circa il 35% dei segnali, soprattutto nel range di massa inferiore a 11000 *m/z*. La matrice addizionata con Triton X-100 invece migliorava l'intensità dei segnali soprattutto sopra a 11000 *m/z*. Tale risultato suggerisce un complementarità dell'effetto di tali detergenti sul tessuto epatico.

Risultati differenti sono stati ottenuti sul tessuto cerebrale di topi ICR al primo giorno postnatale, dove la matrice tradizionale rimaneva ottimale rispetto alla stessa addizionata con SDS mentre la matrice addizionata con Triton X-100 generava un aumento notevole dell'intensità di numerosi segnali, la cui intensità era piuttosto debole nel tessuto preparato con la sola matrice tradizionale. I diversi detergenti, quindi, mostravano effetti diversi su tessuti differenti.

Nel tessuto cardiaco, per esempio, entrambe le matrici addizionate con i detergenti generavano un aumento notevole della sensibilità rispetto alla matrice tradizionale. In particolare, la matrice addizionata con SDS aumentava l'intensità del 50% dei segnali rispetto alla matrice tradizionale. Inoltre, sul tessuto cardiaco è stato osservato che la cristallizzazione ottenuta con la matrice tradizionale era particolarmente eterogenea, soprattutto nelle aree ricche di sangue. La presenza di notevoli quantità di emoglobina in queste zone, inoltre, determinava una notevole soppressione dei segnali derivanti da altre proteine. In tali aree, invece, le matrici addizionate con detergenti presentavano una cristallizzazione più uniforme e spettri di migliore qualità.

E' possibile che il diverso effetto dei detergenti sui diversi tessuti sia dovuto alla diversa composizione strutturale e molecolare dei tessuti stessi. Per esempio il tessuto cerebrale presenta un elevato contenuto lipidico e l'utilizzo del detergente non-ionico Triton X-100 aumenta l'intensità di numerosi segnali rispetto al detergente ionico SDS. Al contrario, il tessuto cardiaco è continuamente esposto ad elevate quantità di sangue e presenta un'elevata concentrazione di ioni K^+ e Ca^{2+} , fondamentali per la contrazione muscolare. Questo potrebbe spiegare perché l' SDS rappresenta la scelta ottimale per tale tessuto e per altri tessuti come il fegato, che presenta numerose aree ricche di sangue.

Tali risultati suggeriscono un notevole vantaggio derivante dall'utilizzo dei detergenti per studi di proteomica mediante IMS. L'effetto dei detergenti sembra essere

complementare su alcuni tessuti, tuttavia la selezione del detergente dovrebbe essere effettuata in maniera tessuto-specifica valutando un pannello di diversi detergenti.

BIBLIOGRAFIA

1. Consolandi C, et al. *Polymorphism analysis within the HLA-A locus by universal oligonucleotide array*. Hum Mutat 2004; 24: 428.
2. Bodega B, et al. *Mutations in the coding region of the FOXL2 gene era not a major cause of idiopathic premature ovarian failure*. Mol Hum Reprod 2004; 10: 555.
3. Wilkins MR, et al. *Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it*. Biotechnol Genet Eng Rev 1996; 13: 19.
4. Alessio M, et al. *Atti del Convegno Proteomica: tecnologia per la caratterizzazione del proteoma e lo studio delle interazioni proteina-proteina*, 2001.
5. Magni F, et al. *Expanding the proteome two-dimensional gel electrophoresis reference map of human renal cortex by peptide mass fingerprinting*. Proteomics 2005; 5: 816.
6. Tremolada L, et al. *Characterization of heat shock protein 27 phosphorylation sites in renal cell carcinoma*. Proteomics 2005; 5: 788.
7. Theodorescu D, et al. *Discovery and validation of new protein biomarkers for urothelial cancer: a prospective analysis*. Lancet Oncol 2006; 7:230.
8. Stoeckli M, et al. *Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues*. Nat Med 2001 Apr; 7(4): 493-6.
9. Magni F., et al. *Biomarkers discovery by peptide and protein profiling in biological fluids based on functionalized magnetic beads purification and mass spectrometry*. Blood Transfus. 2010 Jun; 8: s92-7.
10. Bosso N., et al. *Human urine biomarkers of renal cell carcinoma evaluated by ClinProt*. Proteomics Clin Appl. 2008 Jul; 2 (7-8): 1036-46.
11. Baltaci S, et al., *Use of percent free prostate-specific antigen density to improve the specificity for detecting prostate cancer in patients with normal rectal examinations and intermediate prostate-specific antigen levels*. Urol Int 2003; 70: 36.
12. Brawer MK. *Clinical usefulness of assays for complexed prostate-specific antigen*. Urol Clin North Am 2002; 29: 193.
13. Zhang Z, et al., *Combination of multiple serum markers using an artificial neural network to improve specificity in discriminating malignant from benign pelvic masses*. Gynecol Oncol 1999;73: 56.
14. Xiao T, et al., *An approach to studying lung cancer-related proteins in human blood*. Mol Cell Proteomics 2005; 4: 1480.
15. Kleiner, O. et al. *Proteomics of signal transduction pathways*. In: *Signalling Pathways in Liver Diseases*. Springer Verlag, Heidelberg, Germany, 2005; 417–431.
16. Stannard, C. et al. *New paradigms in cellular function and the need for top-down proteomics analyses*. Curr. Proteom. 2004; 1:13–25.
17. Wang, H. et al. *Intact-protein based sample preparation strategies for proteome analysis in combination with mass spectrometry*. Mass Spectrom. Rev. 2005 May-Jun;24(3):413-26.
18. Guerrero, I.C. et al. *Application of Mass Spectrometry in Proteomics*. Bioscience Reports Vol. 25, Nos. 1/2, February/April 2005
19. Link, A. J. *Multidimensional peptide separations in proteomics* Trends Biotechnol. 2002 20:S8–13.
20. Godovac-Zimmermann, J., et al. *Perspectives in spicing up proteomics with splicing*. Proteomics 2005; 5:699–709
21. Lin Dayin, et al. *Large-scale protein identification using mass spectrometry*. Biochimica et Biophysica Acta 2003;1646: 1 – 10
22. Y. Ge,et al. *Top down characterization of larger proteins (45 kDa) by electron capture dissociation mass spectrometry*. J. Am. Chem. Soc. 2002; 124: 672– 678.
23. E. Nägele, et al. *Improved 2D Nano-LC/MS for Proteomics Applications: A Comparative Analysis Using Yeast Proteome*. J of Biomol. Tech. 2004; 15, (2), 134-143
24. Koopmann J, et al. *Serum diagnosis of pancreatic adenocarcinoma using surface-enhanced laser desorption and ionization mass*. Clinical Cancer Research 2004; 10: 860.
25. Petricoin EF, et al., *SELDI-TOF-based serum proteomic pattern diagnostics for early detection of cancer*. Curr Opin Biotechnol 2004; 15: 24.
26. Merchant M., Weinberger SR. *Recent advancements in surface enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry*. Electrophoresis 2000; 21: 164.
27. Cheng AJ, et al. *Oral cancer plasma tumor marker identified with beadbased affinity-fractionated proteomic technology*. Clin Chem 2005; 51: 2236.
28. Tolson JP, et al. *Differential detection of S100A8 in transitional cell carcinoma of the bladder by pair wise tissue proteomic and immunohistochemical analysis*. Proteomics 2006; 6: 697.
29. de Noo ME, et al. *Detection of colorectal cancer using MALDI-TOF serum protein profiling*. Eur J Cancer 2006; 42: 1068

30. Lill, J. *Proteomic tools for quantitation by mass spectrometry* Mass Spectrom. Rev. 2003 22:182–194.
31. Harsha HC, et al. *Quantitative proteomics using stable isotope labeling with amino acids in cell culture*. Nat Protoc. 2008;3(3):505-16.
32. Oda, Y., Huang, K., Cross, F. R., Cowburn, D., and Chait, B. T. *Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1999 96:6591–6596
33. Bottari, P. et al. M. H. *Design and synthesis of visible isotope-coded affinity tags for the absolute quantification of specific proteins in complex mixtures*. Bioconjug. Chem. 2004 15:380–388.
34. Turecek F, et al. *Mass spectrometry in coupling with affinity capture-release and isotope-coded affinity tags for quantitative protein analysis*. J Mass Spectrom 2002; 37: 1.
35. Schmidt A, et al. *A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels*. Proteomics. 2005 Feb;5(3):826.
36. Beverina L, et al., *Two-photon absorption at telecommunications wavelengths in a dipolar chromophore with a pyrrole auxiliary donor and thiazole auxiliary acceptor*. J Am Chem Soc 2005; 127: 7282.
37. Thomson JJ. *Ray of positive electricity and their application to chemical analyses*. London, Longmans Green and Co. 1913.
38. Dempster AJ. *The ionization and dissociation of hydrogen molecules and the formation of H₃*. Phil 1916; 31: 438.
39. Dempster AJ. *A new method of positive ray analysis*. Phys Rev 1918; 11: 316.
40. Aston FW. *A positive ray spectrograph*. Phil Mag 1919; 38: 707.
41. Aston FW. *The mass-spectra of chemical elements*. Phil Mag 1920; 39: 611.
42. Yates JR. *Mass spectrometry and the age of the proteome*. J Mass Spectrom 1998; 33: 1.
43. Morris HR, et al., *Fast atom bombardment: a new mass spectrometric method for peptide sequence analysis*. Biochem Biophys Res Commun 1981; 101: 623.
44. Hillenkamp F, et al. *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers*. Anal Chem 1991; 63: 1193A.
45. Fenn JB, et al. *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. Science 1989; 246: 64.
46. Karas M et al. F, *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*. Anal Chem 1988; 60: 2299.
47. Muller DR, et al. *Mass spectrometric characterization of stathmin isoforms separated by 2D PAGE*. J Mass Spectrom 1999; 34: 336.
48. Packer NH et al. *Glycobiology and proteomics: is mass spectrometry the Holy Grail?*. Electrophoresis 1998; 19: 1872.
49. Katta V., et al. *Applications of in-source fragmentation of protein ions for direct sequence analysis by delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry*. Anal. Chem. 1998; 70(20): 4410-6
50. Posthumus MA, et al., *Laser desorption-mass spectrometry of polar nonvolatile bio-organic molecules*. Anal Chem 1978; 50: 985.
51. Karas M, et al. *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*. Anal Chem 1988; 60: 2299.
52. Tanaka K, et al., *Protein and polymer analyses up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom 1988; 2: 151.
53. Zenobi R et al., *Ion formation in MALDI mass spectrometry*. Mass Spectrom Reviews 1998; 17: 337.
54. Zigilei LV et al. *Velocity distributions of analyte molecules in matrix-assisted laser desorption from computer simulations*. Rapid Commun Mass Spectrom 1998; 12 : 1273.
55. Gross J, *Investigation of the metastable decay of DNA under ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization conditions with post-source decay analysis and hydrogen/deuterium exchange*. J Am Soc Mass Spectrom 1998; 9: 866.
56. Jørgensen TJD, et al. *The proton affinities of seven matrix-assisted laser desorption/ionization matrices correlated with the formation of multiply charged ions*. Eur J Mass Spectrom 1998; 4: 39.
57. Karas M, et al. *Matrix dependence of metastable fragmentation of glycoproteins in MALDI TOF mass spectrometry*. Anal Chem 1995; 67: 675.
58. Stephens WE, *A pulsed mass spectrometer with time dispersion*. Phys Rev 1946; 69: 691.
59. Wiley WC et al. *Time-of-flight mass spectrometer with improved resolution*. Rev Sci Instr 1955; 26: 1150.

60. Cotter RJ. *Time-of-flight mass spectrometry: an increasing role in the life sciences*. Biomed Environ Mass Spectrom 1989; 18: 513.
61. Katta V, et al. *Application of In-Source fragmentation of Protein Ions for Direct Sequence Analysis by Delayed Extraction MALDI-TOF Mass Spectrometry*. Anal Chem 1998; 70: 4410.
62. Spengler B, et al. *Mass spectrometric sequencing of linear peptides by product-ion analysis in a reflectron time-of-flight mass spectrometer using matrix-assisted laser desorption ionization*. Rapid Commun Mass Spectrom 1993; 7: 902.
63. Hoffmann R, et al. *Sequencing of peptides phosphorylated on serines and threonines by post-source decay in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. J Mass Spectrom 1999; 34: 1195-204.
64. Rauli S, et al. *Determination of flunisolide and its principal hydrolytic metabolite in urine and plasma by LC-NICI-MS with a particle beam interface*. Boll Chim Farm 1997; 136: 308.
65. ee ED, et al. *On-line capillary zone electrophoresis-ion spray tandem mass spectrometry for the determination of dynorphins*. J Chromatogr 1988; 458: 313.
66. Dole M. *Molecular beams of Microions*. J Chem Phys, 1968; 49: 2240.
67. Fenn JB. *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. Science 1989; 246: 64.
68. Iribarne JV, et al., *On the evaporation of small ions from charged droplets*. J Chem Phys 1976; 64: 2287.
69. Wilm M, et al. *Analytical properties of the nanoelectrospray ion source*. Anal Chem 1996; 68: 1.
70. Wilm M, et al., *Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry*. Nature 1996; 379: 466
71. Roepstorff P, et al. *Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides*. Biomed Mass Spectrom 1984; 11: 601.
72. Steen H et al. *The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing*. Nat Rev Mol Cell Biol 2004; 5: 699.
73. Goldenberg RL, et al. *Epidemiology and causes of preterm birth*. Lancet 2008; 371:75-84.
74. Allen SR. *Epidemiology of premature rupture of the fetal membranes*. Clin Obstet Gynecol 1991; 34: 685-93.
75. Johanson M, et al.. *Extreme Preterm Birth, Onset of Delivery and its Effects on Infant Survival and morbidity*. Obstet Gynecol 2008;111:42-50.
76. Mercer BM. *Preterm Premature Rupture of the Membranes*. Obstet Gynecol 2003; 101: 178-93.
77. Thadikaran L, et al. *The role of proteomics in the assessment of premature rupture of fetal membranes*. Clin Chim Acta 2005;360:27-36
78. Skinner SJ, et al. *Collagen content of human amniotic membranes : effect of gestation length and premature rupture*. Obstet Gynecol 1981; 57: 487-89.
79. Vadillo-Ortega F, et al. *3rd.Increased matrix metalloproteinase activity and reduced tissue inhibitor of metalloproteinases-1 levels in amniotic fluids from pregnancies complicated by premature rupture of membranes*. Am J Obstet Gynecol 1996; 174: 1371-76
80. Draper D, et al. *Elevated protease activities in human amnion and chorionic correlate with preterm premature rupture of membranes*. Am J Obstet Gynecol 1995; 173: 1506-12.
81. Maymon E, et al. *Human neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase 8) in parturition, premature rupture of membranes, and intrauterine infection*. Am J Obstet Gynecol 2000; 183: 94-99.
82. French JI, et al. *The pathobiology of Premature Rupture of Membranes*. Seminarsin Perinatology 1996; 20: 344-68.
83. Parry S, et al. *Premature rupture of the fetal membranes*. N Engl J Med 1998; 338:663-70.
84. Goldenberg RL, et al. *Intrauterine infection and preterm delivery*. N Engl J Med 2000; 342: 1500-07.
85. Saji F, et al. *Cytokine production in chorioamnionitis*. J Reproductive Immunology 2000; 47: 185-96.
86. El-Bastawissi AJ, et al. *Amniotic fluid interleukin-6 andpreterm delivery: A review*. Obstet Gynecol 2000; 95: 1056-64.
87. Harirah H, et al. *Amniotic fluid matrix metalloproteinase-9 and interleukin-6 in predicting intra-amniotic infection*. Obstet Gynecol 2002; 99: 80-84.
88. Weiss A, et al. *The metalloproteinases (MMPS) in the decidual and fetal membranes*. Front Biosci 2007; 12: 649-59.
89. Locksmith GJ, et al. *Amniotic fluid matrix metalloproteinase-9 levels in women with preterm labor and suspected inta-amniotic infection*. Obstet Gynecol 1999; 94: 1-6.

90. Opendakker G. *On the roles of extracellular matrix remodelling by gelatinase B*. Verh K Acad Geneesk Belg 1997; 59: 489-514.
91. Von Minckwitz G, et al. *Predictive value of serum interleukin-6 and -8 levels in preterm labor or rupture of membranes*. Acta Obstet Gynecol Scand 2000; 79: 667-72.
92. Murtha AP, et al. *Maternal serum interleukin-6 concentrations in patients with preterm premature rupture of membranes and evidence of infection*. Am J Obstet Gynecol 1996; 175: 966-69
93. Shimoya K, et al. *Interleukin-8 level in maternal serum as marker for screening of histological chorioamnionitis at term*. Int J Gynaecol Obstet 1997; 57: 153-59.
94. Jun JK, et al. *Interleukin 6 determinations in cervical fluid have diagnostic and prognostic value in preterm premature rupture of membranes*. Am J Obstet Gynecol 2000; 183: 868-73.
95. Rizzo G, et al. *Interleukin-6 concentrations in cervical secretions in the prediction of intrauterine infection in preterm premature rupture of the membranes*. Gynecol Obstet Invest 1998; 46: 91-95.
96. Jacobsson B, et al. *Microbial invasion and cytokine response in amniotic fluid in a Swedish population of women with preterm prelabor rupture of membranes*. Acta Obstet Gynecol Scand 2003; 82: 423-31.
97. Shim SS, et al. *Clinical significance of intra-amniotic inflammation in patients with preterm premature rupture of membrane*. Am J Obstet Gynecol 2004; 191: 1339-45.
98. Ross SM, et al. *The genesis of amniotic fluid infections*. Ciba Found Symp 1979: 39-53.
99. Kanayama N, et al. *Collagen types in normal and prematurely ruptured membrane.*, Am J Obstet Gynecol 1985; 153: 899-903.
100. Gomez R, et al. *Pathogenesis of preterm labour and preterm premature rupture of membranes associated with intraamniotic infection*. Infect Dis Clin North Am 1997; 11: 135-76.
101. Casanueva E et al. *Vitamin C supplementation to prevent premature rupture of the chorioamniotic membranes: a randomized trial.*, Am J Clin Nutr 2005; 81: 859-63.
102. Woods J, et al. *Vitamins C and E: missing links in preventing preterm premature rupture of membranes?* Am J Obstet Gynecol 2001; 185: 5-10.7
103. Dizon-Towson D. *Preterm labour and delivery: a genetic predisposition*. Pediatr Perinat Epidemiol 2001; 15: 57-62.
104. Tromp G, et al. *Genome-wide expression profiling of fetal membranes reveals a deficient expression of protease inhibitor 3 in premature rupture of membranes*. Am J Obstet Gynecol 2004; 191: 1331-38
105. Tashima LS, et al. *Decidual relaxins: gene and protein up-regulation in preterm premature rupture of the membranes by complementary DNA arrays and quantitative immunocytochemistry*. Am J Obstet Gynecol 2002; 187: 785-97.
106. Buhimschi IA, et al. *Reduction-oxidation (redox) state regulation of matrix metalloproteinase activity in human fetal membranes*. Am J Obstet Gynecol 2000; 182: 458-64.
107. Wang H, et al. *Functionally significant SNP MMP8 promoter haplotypes and preterm premature rupture of membranes (PPROM)*. Hum Mol Genet 2004; 13: 2659-69.
108. Newman RB, et al. *National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. Occupational fatigue and preterm premature rupture of membranes. National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine, Units Network*. Am J Obstet Gynecol. 2001; 184: 438-46.
109. Eriksen NL, et al. *Fetal fibronectin: a method for detecting the presence of amniotic fluid*. Obstet Gynecol 1992; 80:451-54.
110. Rizzo G, et al. *The value of transvaginal ultrasonographic examination of the uterine cervix in predicting preterm delivery in patients with preterm premature rupture of the membranes*. Ultrasound Obstet Gynecol 1998 Jan;11(1):23-9.
111. Ekwo EE, et al. *Unfavorable outcome in penultimate pregnancy and premature rupture of membranes in successive pregnancy*. Obstet Gynecol 1992; 80: 166-72.
112. Lee T, et al. *Preterm premature rupture of membranes: risks of recurrent complications in the next pregnancy among a population-based sample of gravid women*. Am J Obstet Gynecol 2003; 188: 209-13.
113. Mercer BM, et al. *The preterm prediction study: prediction of preterm premature rupture of membrane through clinical findings and ancillary testing. The National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network*. Am J Obstet Gynecol 2000; 183: 738-45.
114. Ferguson S, et al. *Preterm premature rupture of membranes: nutritional and socioeconomic factors*. Obstet Gynecol 2002; 100: 1250-56.

115. Rajabi M, et al. *High levels of serum collagenase in premature labor: a potential biochemical marker.* Gynecol Obstet 1987; 69: 179-86.
116. Lockwood CJ, et al. *Fetal fibronectin in cervical and vaginal secretion as a predictor of preterm delivery.* N Engl J Med 1991; 325: 669-74.
117. Paternoster DM, et al. *Cervical pHIGFBP-1 in the evaluation of the risk of preterm delivery.* Acta Obstet Gynecol.2007;86:151-155.
118. Jaye DL, Waites KB. *Clinical applications of C-reactive protein in pediatrics.* Pediatr Infect Dis J 1997; 16: 735-47.
119. Ghezzi F, et al. *Elevated amniotic fluid C-reactive protein at the time of genetic amniocentesis is a marker for preterm delivery.* Am J Obstet Gynecol 2002; 186: 268-73.
120. Di Naro E, et al. *C-reactive protein in vaginal fluid of patients with preterm premature rupture of membranes.* Acta Obstet Gynecol Scand 2003; 82: 1072-79.
121. Romen Y, Artal R. *C-reactive protein as a predictor for chorioamnionitis in cases of premature rupture of the membranes.* Am J Obstet Gynecol 1984; 150: 546-50.
122. Goldenberg RL, et al. *Plasma ferritin, premature rupture of membranes, and pregnancy outcome.* Am J Obstet Gynecol 1998; 179: 1599-604.
123. Kilbride HW, et al. *Defining limits of survival: lethal pulmonary hypoplasia after midtrimester premature rupture of membranes.* Am J Obstet Gynecol 1996; 175: 675-81.
124. Falk SJ, et al. *Expectant management in spontaneous preterm premature rupture of membranes between 14 and 24 weeks' gestation.* J Perinatol 2004; 24: 611-16.
125. Fortunato SJ, et al. *Active expectant management in very early gestations complicated by premature rupture of the fetal membranes.* J Reprod Med 1994; 39: 13.
126. Kurkinen-Raty M, et al. *Perinatal and neonatal outcome and late pulmonary sequelae in infants born after preterm premature rupture of membranes.* Obstet Gynecol 1998; 92: 408-15.
127. Canavan TP, et al. *An evidence-based approach to the Evaluation and treatment of premature rupture of membranes.* Obstet gynecol surv 2004; 59: 669-77.
128. Beydoun SN, et al. *Premature rupture of the membranes before 28 weeks: conservative management.* Am J Obstet Gynecol 1986; 155: 471-79.
129. Garite T, Freeman R. *Chorioamnionitis in the preterm gestation.* Obstet Gynecol 1982; 59: 539-45.
130. Romero R, et al. *Intra-amniotic infection and the onset of labor in preterm premature rupture of membranes.* Am J Obstet Gynecol 1988; 159: 661-66.
131. Holmgren PA, Olofsson JI. *Preterm premature rupture of membranes and the associated risk for placental abruption. Inverse correlation to gestational length.* Acta Obstet Gynecol Scand 1997; 76: 743-47.
132. Farooqi A, et al. *Survival and 2-year outcome with expectant management of second-trimester rupture of membranes.* Obstet Gynecol 1998; 92: 895-901.
133. Vergani P, et al. *Risk factors for pulmonary hypoplasia in second trimester premature rupture of membranes.* Am J Obstet Gynecol 1994; 170: 1359-64.
134. Rotschild A, et al. *Neonatal outcome after prolonged preterm rupture of the membranes.* Am J Obstet Gynecol 1990; 162: 46-52.
135. Winn HN, et al. *Neonatal pulmonary hypoplasia and perinatal mortality in patients with midtrimester rupture of amniotic membranes – A critical analysis.* Am J Obstet Gynecol 2000; 182: 1638-44.
136. Shumway JB, et al. *Impact of oligohydramnios on maternal and perinatal outcomes of spontaneous premature rupture of the membranes at 18-28 weeks.* J Matern Fetal Med 1999; 8: 20-23.
137. Reti NG, et al. *Why do membranes rupture at term? Evidence of increased cellular apoptosis in the supracervical fetal membranes.* Am J Obstet Gynecol 2007; 484e1-e10.
138. Leppert PC, et al. *Apoptosis in fetal membranes may predispose them to rupture.* J Soc Gynecol Invest 1996; 3: 128a.abstract.
139. Vadillo-Ortega F, et al. *Collagen metabolism in premature rupture of amniotic membranes.* Obstet Gynecol 1990; 75: 84-88.
140. Malak TM, Bell SC. *Structural characteristics of term human fetal membranes: a novel zone of extreme morphological alteration within the rupture site.* Br J Obstet Gynaecol 1994; 101: 375-86.
141. Bendon RW, et al. *Fetal membranes histology in preterm premature rupture of membranes: Comparison in controls, and between antibiotic and placebo treatment. The National Institute of Child Health and Human Development Maternal Fetal Medicine Units Network.* Pediatr Dev Pathol 1999; 2: 552-58.
142. Goldenberg RL, et al. *Delay in delivery: influence of gestational age and the duration of delay on perinatal outcome.* Obstet Gynecol 1984; 64: 480-84.

143. Ferretti G., et al. *Dagli abissi allo spazio* Ed. ermes 2008
144. Zander R. et al. *Our changing atmosphere: Evidence based on long-term infrared solar observations at the Jungfrauoch since 1950*. Sci Total Environ. 2008 Mar 1;391(2-3):184-95.
145. Hackett PH, Roach RC. *High altitude medicine*. In: Auerbach PS, editor. *Wilderness Medicine: Management of Wilderness and Environmental Emergencies*. 3rd ed. St. Louis: Mosby; 1995. 1-37.
146. Hackett PH, Roach RC: *High altitude medicine*. In: Auerbach PS, editor. *Wilderness Medicine: Management of Wilderness and Environmental Emergencies*. 3rd ed. St. Louis: Mosby; 1995. 1-37.
147. Cerretelli P. *Gas exchange at high altitude*. In: West JB ed. *Pulmonary gas exchange*. Volume II: oxygen and environment. Academic Press NY
148. Grocott M, et al. *High-altitude physiology and pathophysiology: implications and relevance for intensive care medicine*. Critical Care 2007; 11: 203-7
149. Hainsworth R, et al. *Cardiovascular adjustment for life at high altitude*. Resp Phys Neur; 2007; 158:204-11
150. Holloway CJ, et al. *Cardiac response to hypobaric hypoxia: persistent changes in cardiac mass, function, and energy metabolism after a trek to Mt. Everest Base Camp*. FASEB J. 2010 Oct 26
151. Fowler AC, et al. *Periodic breathing at high altitude*. IMA J Math Appl Med Biol 2002 Dec; 19 (4): 293-313.
152. Kayser B, et al. *The metabolic and ventilatory response to exercise in Tibetans born at low altitude*. Respir Physiol. 1994 Sep;98(1):15-26.
153. Mazzeo RS, et al. *Sympathetic response during 21 days at high altitude (4,300 m) as determined by urinary and arterial catecholamines*. Metabolism. 1994 Oct;43(10):1226-32
154. Mairbauri H, et al. *Interactions between Hb, Mg, DPG, ATP and Cl determine the change in Hb-O₂ affinity at high altitude*. J appl physiol. 1993 Jan; 74(1):40-8.
155. Sutton JR, et al. *Hypoxia and mountain medicine*. Section II, 1992
156. Mazzeo RS, et al., *Adrenergic contribution during acclimatization to high altitude: perspectives from Pikes Peak*. Exerc Sport Sci Rev 2003, 31 (1):13-8.
157. Mazzeo RS, et al. *Sympathetic response during 21 days at high altitude (4300 m) as determined by urinary and arthelial catecholamines*. Metabolism 1994; 43 (10) 1226-32.
158. R Reeves JT, et al. *Increased arterial pressure after acclimatization to 4300 m: possible role of norepinephrine*. Int J Sports Med 1992; 13 (1):S18-21.
159. Qu Y, et al. *Synergistic effect of the genetic polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system on high-altitude pulmonary edema: a study from Qinghai-Tibet altitude*. Eur J Epidemiol. 2008;23(2):143-52.
160. Bigham AW, et al. *Angiotensin-converting enzyme genotype and arterial oxygen saturation at high altitude in Peruvian Quechua*. High Alt Med Biol. 2008 Summer;9(2):167-78.
161. Benso A. et al. *Endocrine and metabolic responses to extreme altitude and physical exercise in climbers*. Eur J Endocrinol. 2007 Dec;157(6):733-40.
162. Brahmachari HD, et al. *Glucose tolerance at high altitude in man*. IJ Med Res 1973; 31(3):411-15.
163. Tshop M., et al. *Weight loss at high altitude*. Adv Exp Med Biol. 2001;502:237-47.
164. Shukla V, et al. *Ghrelin and leptin levels of sojourners and acclimatized lowlanders at high altitude*. Nutr Neurosci. 2005 Jun;8(3):161-5.
165. Butterfield GE. *Nutrients requirement at high altitude*. Clin Sports Med. 1999 Jul;18(3):607-21, viii.
166. Westerterp KR, et al. *Energy balance at high altitude of 6542 m*. J Appl Physiol. 1994 Aug;77(2):862-6.
167. Kayser B. *Nutrition and energetics of exercise at altitude. Theory and possible practical implications*. Sports Med. 1994 May;17(5):309-23.
168. Hackett PH, et al. *The incidence, importance and prophylaxis of acute mountain sickness*. Lancet 1976 Nov 27;2(7996):1149-55.
169. Schoene RB. *Illnesses at high altitude*. CHEST 2008; 134:402-16.
170. LèON-Velarde L., et al. *Consensus statementa on chronic and subacute high altitude diseases*. High Alt Med Biol. 2005 Summer;6(2):147-57
171. Bartsch P, et al. *Acute mountain sickness: controversies and advances*. High Alt Med Biol. 2004 Summer;5(2):110-24.
172. Clarke C. *Acute mountain sickness: medical problems associated with acute and subacute exposure to hypobaric hypoxia*. Postgrad Med J 2006; 82: 748-53.

173. Roach RC, et al. *Lake Louise AMS Scoring Consensus Committee. The Lake Louise acute mountain sickness scoring system*. In: Hypoxia and Molecular Medicine. Burlington: Charles S Houston, 1993: 272–74.
174. Sampson JB, et al. *Procedures for the measurement of acute mountain sickness*. Aviat Space Environ Med 1983; 54: 1063–73.
175. West JB, et al. *High Altitude Medicine and Physiology*. 4th edn. London: Hodder Arnold, 2007: 40–60.
176. Basnyat B, et al. *Efficacy of low-dose acetazolamide (125 mg BID) for the prophylaxis of acute mountain sickness: a prospective, doubleblind, randomized, placebo-controlled trial*. High Alt Med Biol 2003;4: 45–52.
177. Vurk J., et al. *Acetazolamide improves cerebral oxygenation during exercise at high altitude*. High Alt Med Biol 2006; 7: 290–301.
178. Chan CW, et al. *Effect of sildenafil and acclimatization on cerebral oxygenation at altitude*. Clin Sci 2005; 109: 319–24.
179. Maggiorini M, et al. *Both tadalafil and dexamethasone may reduce the incidence of high-altitude pulmonary edema: a randomized trial*. Ann Intern Med 2006; 145: 497–506.
180. Hackett PH, et al. *The incidence, importance, and prophylaxis of acute mountain sickness*. Lancet 1976; 2: 1149–55.
181. Hackett PH, et al. *High-altitude cerebral edema evaluated with magnetic resonance imaging: clinical correlation and pathophysiology*. JAMA. 1998 Dec 9;280(22):1920-5.
182. Wilson MH, et al. *The cerebral effects of ascent to high altitudes*. Lancet Neurol 2009; 8:175-91.
183. Stream JO, Grissom CK. *Update on high-altitude pulmonary edema: pathogenesis, prevention, and treatment*. Wilderness Environ Med. 2008;19:293–303.
184. Bartsch P, et al. *Physiological aspects of high-altitude pulmonary edema*. J Appl Physiol. 2005;98:1101–1110.
185. Bartsch P, et al. *Prevention of high-altitude pulmonary edema by nifedipine*. N Engl J Med. 1991;325:1284 –1289
186. Lucks AM., et al. *Wilderness Medical Society Consensus Guidelines for the Prevention and Treatment of Acute Altitude Illness*. Wild & Env Med 2010; , 21:146–155.
187. Hall JE, et al. *Blood pressure and renal function during chronic changes in sodium intake: role of angiotensin*. Am J Physiol 1980; 239:F271-80.
188. Goodman & Gilman's *The pharmacological basis of therapeutics 11e*. Mc Graw-Hill Companies Cap. 31-33
189. Chaurand P., et al. *Imaging mass spectrometry: principles and potentials*. Toxicol Pathol, 2005. 33(1): 92-101.
190. Kkhatib-Shahidi, S, et al. *Direct molecular analysis of whole-body animal tissue sections by imaging MALDI mass spectrometry*. Anal Chem 2006, 78, (18), 6448-56.
191. Caldwell RL, Caprioli RM, *Tissue profiling by mass spectrometry: a review of methodology and applications*. Mol Cell Proteomics, 2005. 4(4): 394-401.
192. Chaurand P, et al. *Direct profiling of proteins in biological tissue sections by MALDI mass spectrometry*. Anal Chem, 1999. 71(23): 5263-70.
193. Chaurand P, et al. *Proteomics in diagnostic pathology: profiling and imaging proteins directly in tissue sections*. Am J Pathol, 2004. 165(4):1057-68.
194. Chaurand P, et al. *Imaging mass spectrometry: a new tool to investigate the spatial organization of peptides and proteins in mammalian tissue sections*. Curr Opin Chem Biol, 2002. 6(5): 676-81.
195. Chaurand P, et al. *Integrating histology and imaging mass spectrometry*. Anal Chem, 2004. 76(4): 1145-55.
196. Stoeckli M, et al. *Compound and metabolite distribution measured by MALDI mass spectrometric imaging in whole-body tissue sections*. International Journal of Mass Spectrometry 2007, 260 (2): 195-202.
197. Reyze ML, et al. *Direct analysis of drug candidates in tissue by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry 2003, 38, (10): 1081-1092.
198. Hsieh Y, et al. *Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry for direct measurement of clozapine in rat brain tissue*. Rapid Communications in Mass Spectrometry 2006, 20, (6): 965-972.
199. Puolitaival SM, et al. *Solvent-free matrix dry-coating for MALDI imaging of phospholipids*. J Am Soc Mass Spectrom 2008, 19, (6): 882-6.

200. Groseclose MR, et al. *Identification of proteins directly from tissue: in situ tryptic digestions coupled with imaging mass spectrometry.* J Mass Spectrom 2007, 42, (2): 254-62.
201. Burnum KE, et al. *Imaging mass spectrometry reveals unique protein profiles during embryo implantation.* Endocrinology 2008, 149, (7): 3274-8.
202. Pierson J, et al. *Molecular profiling of experimental Parkinson's disease: direct analysis of peptides and proteins on brain tissue sections by MALDI mass spectrometry.* J Proteome Res 2004, 3, (2), 289-95.
203. Reyzer ML, et al. *Early changes in protein expression detected by mass spectrometry predict tumor response to molecular therapeutics.* Cancer Res 2004, 64, (24), 9093-100.
204. Thibault DB, et al. *MALDI tissue profiling of integral membrane proteins from ocular tissues.* J Am Soc Mass Spectrom 2008, 19, (6), 814-22.
205. Caprioli RM, et al. *Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS.* Anal Chem. 1997 Dec 1;69(23):4751-60.
206. Chughtai C, et al. *Mass Spectrometric Imaging for Biomedical Tissue Analysis.* Chem Rev. 2010; 110:3237-77.
207. Hankin JA, et al., *Sublimation as a method of matrix application for mass spectrometric imaging.* J Am Soc Mass Spectrom 2007, 18, (9), 1646-52.
208. Cazares LH et al. *Imaging mass spectrometry of a specific fragment of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase 2 discriminates cancer from uninvolved prostate tissue.* Clin. Cancer Res.2009; 15: 5541–5551.
209. Lemaire R, et al. *Specific MALDI imaging and profiling for biomarker hunting and validation: fragment of the 11S proteasome activator complex, reg α fragment, is a new potential ovary cancer biomarker.* J. Proteome Res. 2007; 6: 4127–4134.
210. Groseclose MR, et al. *High-throughput proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue microarrays using MALDI imaging mass spectrometry.* Proteomics 2008; 8: 3715–3724.
211. Yanagisawa K, et al. *Proteomic patterns of tumour subsets in non-small-cell lung cancer.* Lancet 2003; 362: 433–439.
212. Schwartz SA, et al. *Proteomic-based prognosis of brain tumor patients using direct-tissue matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry.* Cancer Res.2005; 65: 7674–7681.
213. Bauer JA, et al. *Identification of markers of taxane sensitivity using proteomic and genomic analyses of breast tumors from patients receiving neoadjuvant paclitaxel and radiation.* Clin. Cancer Res.2010; 16,681–690.
214. Reyzer ML, et al. *Early changes in protein expression detected by mass spectrometry predict tumor response to molecular therapeutics.* Cancer Res 2004; 64(1):9093-9100.
215. Seeley EH, Caprioli RM. *Molecular Imaging of proteins in tissues by mass spectrometry.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105(47):18126-31.
216. Hack M, Fanaroff AA. *Outcomes of extremely immature infants - a perinatal dilemma.* N Engl J Med 1993; 329:1649-50.
217. Dammann O, et al. *Lung and brain damage in preterm newborns, and their association with gestational age, prematurity subgroup, infection/inflammation and long term outcome.* BJOG 2005;112(Suppl 1):4-9.
218. Leavitt RP, et al. *Current and future directions of research into prematurity: Report of the symposium on prematurity held on 21-22 November 2005.* Pediatr Res 2006;60:777-80.
219. Callaghan WM, et al. *The contribution of preterm birth to infant mortality rates in the United States.* Pediatrics 2006;118:1566-73.
220. Michetti F, Gazzolo D. *S100B testing in pregnancy.* Clinica Chimica Acta 2003; 335: 1-7
221. Michetti F, Gazzolo D. *S100B Protein in Biological Fluids: A Tool for Perinatal Medicine.* American Ass Clin Chemistry 2002; 48(12):2097-2014.
222. Gazzolo D, et al. *Circulating S100B Protein is Increased in Intrauterine Growth-Retarded Fetuses.* Pediatr Res 2002; 51:215-219.
223. Friel LA, et al. *The calcium binding protein, S100B, is increased in the amniotic fluid of women with intra-amniotic infection/inflammation and preterm labor with intact or ruptured membranes.* J Perinat Med 2007; 35:385-393.
224. Gazzolo D, et al. *High maternal blood S100B concentration in pregnancies complicated by Intrauterine Growth Restriction and Intraventricular Hemorrhage.* Clinical Chemistry 2006; 52(5): 819-826.
225. Mingione MJ, et al. *Prevention of PPROM: current and future strategies.* J Maternal-Fetal and Neonatal Med 2006; 19(12):783-789.
226. Nagase T, et al. *Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XVII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro.* DNA Res. 2000; 7:143-150.

227. Chang-Kyung J, et al. *Proteomics Analysis of Human Amniotic Fluid*. *Molecular & Cellular Proteomics* 2007; 6: 1406-1415.
228. Bussotti M., et al. *La strana storia dello Sherpa e della bombola di monossido di carbonio: ovvero storia di un'avventura scientifica. Uno studio del Progetto HIGHCaRe* 2008. *G Ital Cardiol* 2009;10(2):97-100.
229. Piperno A. et al. *Modulation of hepcidin production during hypoxia-induced erythropoiesis in humans in vivo: data from the HIGHCARE project*. *Blood*. 2010 Dec 13. [Epub ahead of print]
230. Agostoni P, et al. *Continuous positive airway pressure increases haemoglobin O2 saturation after acute but not prolonged altitude exposure*. *Eur Heart J*. 2010 Feb;31(4):457-63.
231. Bilo G, et al. *Effects of hypobaric hypoxia at high altitude on humoral regulation of blood pressure and body fluids. Results of HIGHCaRe project*. *Journal of Hypertension*, 2010. 28: e225–e226
232. Revera M., et al. *Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism is related to pressor response to high altitude hypoxia. Results of HIGHCaRe project*. *Journal of Hypertension*, 2010. 28:e346.
233. Zurbig P. et al. *The human urinary proteome reveals high similarity between kidney aging and chronic kidney disease*. *Proteomics*. 2009 Apr;9(8):2108-17.
234. Viganò A, et al. *Proteins modulation in human skeletal muscle in the early phase of adaptation to hypobaric hypoxia*. *Proteomics*. 2008 Nov;8(22):4668-79.
235. Gelfi C, et al. *New aspects of altitude adaptation in Tibetans: a proteomic approach*. *FASEB J*. 2004 Mar;18(3):612-4.
236. Tamm I, Horsfall FL. *Characterization and separation of an inhibitor of viral hemagglutination present in urine*. *Proc Soc Exp Biol Med* 1950; 74: 108–114
237. Tamm I, Horsfall FL. *A mucoprotein derived from human urine which reacts with influenza, mumps, and Newcastle disease viruses*. *J Exp Med* 1952; 95: 71–97
238. Muchmore AV, Decker JM. *Uromodulin: a unique 85-kilodalton immunosuppressive glycoprotein isolated from urine of pregnant women*. *Science* 1985; 229: 479–481
239. Pennica D, et al. *Identification of human uromodulin as the Tamm–Horsfall urinary glycoprotein*. *Science* 1987; 236: 83–88
240. Devuyst O., et al. *Tamm–Horsfall protein or uromodulin: new ideas about an old molecule*. *Nephrol Dial Transplant* (2005) 20: 1290–1294
241. Kobayashi K, Fukuoka S. *Conditions for solubilization of Tamm–Horsfall protein/uromodulin in human urine and establishment of a sensitive and accurate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method*. *Arch Biochem Biophys* 2001; 388: 113–120
242. Izzi G, et al. *Genetica e nosografia delle malattie renali cistiche*. *G Ital Nefrol* 2010; 27 (S50): S63-69.
243. Orskov I, et al. *TammHorsfall protein or uromucoid is the normal urinary slime that traps type I fimbriated Escherichia coli*. *Lancet* 1980; 1:887.
244. Bates JM, et al. *Tamm–Horsfall protein knockout mice are more prone to urinary tract infection: rapid communication*. *Kidney Int* 2004; 65: 791–797.
245. Yu CL, et al. *Tamm-Horsfall urinary glycoprotein enhances monokine release and augments lymphocyte proliferation*. *Immunopharmacology* 26: 249–258, 1993.
246. Kreft B, et al. *Polarized expression of Tamm Horsfall protein by renal tubular epithelial cells activates human granulocytes*. *Infect Immun* 70: 2650–2656, 2002.
247. Sherblom A, et al. *The lectin-like interaction between recombinant tumor necrosis factor and uromodulin*. *J Biol Chem* 263:5418–5424, 1988
248. Hard K, et al. *The Asn-linked carbohydrate chains of human Tamm-Horsfall glycoprotein of one male. Novel sulfated and novel N-acetylgalactosamine-containing N-linked carbohydrate chains*. *Eur J Biochem* 209: 895–915, 1992.
249. Kumar S, et al. *Tubular Cast Formation and Tamm-Horsfall glycoprotein*. In: *Acute Renal Failure: New concepts and therapeutic strategies*, edited by Goligorsky MS, New York, Churchill Livingstone, 1995, pp 267–286.
250. Mo L, et al. *Tamm–Horsfall protein is a critical renal defense factor protecting against calcium oxalate crystal formation*. *Kidney Int* 2004; 66: 1159–1166.
251. Hoyer JR, et al. *Tamm-Horsfall glycoprotein. Ultrastructural immunoperoxidase localization in rat kidney*. *Invest* 1979; 41:168–173.
252. Hart TC, et al. *Mutations of the UMOD gene are responsible for medullary cystic kidney disease 2 and familial juvenile hyperuricaemic nephropathy*. *J. Med. Genet.* 2002; 39:882-892.
253. Bleyer AJ, et al. *Renal manifestations of a mutation in the uromodulin (Tamm Horsfall protein) gene*. *Am. J. Kidney Dis.* 42:E20-E26(2003).

254. Turner JJO, et al. *UROMODULIN mutations cause familial juvenile hyperuricemic nephropathy*. J Clin Endocrin Met 2003; 88: 1398-1401.
255. Rampoldi L, et al. *Allelism of MCKD, FJHN and GCKD caused by impairment of uromodulin export dynamics*. Hum. Mol. Genet. 2003; 12:3369-3384.
256. Wolf MTF, et al. *Mutations of the Uromodulin gene in MCKD type 2 patients cluster in exon 4, which encodes three EGF-like domains*. Kidney Int. 2003; 1580-7.7
257. Zaucke F. et al. *Uromodulin is expressed in renal primary cilia and UMOD mutations result in decreased ciliary uromodulin expression*. Human Molecular Genetics, 2010; 19(10): 1985–1997.
258. Cavallone D, et al., *Mechanism of Release of Urinary Tamm-Horsfall Glycoprotein from the Kidney GPI-Anchored Counterpart*. Biochemical and Biophysical Research Communications 2001;280: p 110.
259. Sigdel TK, et al., *Urinary Peptidomic Analysis Identifies Potential Biomarkers for Acute Rejection of Renal Transplantation*. Clin Proteom 2009; 5:103–113.
260. Cornett DS, et al. *MALDI imaging mass spectrometry: molecular snapshots of biochemical systems*. Nat. Methods 2007; 4: 828.
261. Herring KD, et al. *Direct tissue analysis by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: application to kidney biology*. Semin. Nephrol. 2007; 27: 597.
262. Hardesty WM, et al. *In situ molecular imaging of proteins in tissues using mass spectrometry*. Anal. Bioanal. Chem. 2008; 391: 899.
263. Grey AC, et al. *MALDI imaging mass spectrometry of integral membrane proteins from ocular lens and retinal tissue*. J. Proteome Res. 2009; 8: 3278.
264. Burnum KE, et al. *Imaging mass spectrometry reveals unique protein profiles during embryo implantation*. Endocrinology 2008; 149: 3274.
265. Schwartz SA, et al. *Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation*. J. Mass Spectrom. 2003; 38: 699
266. Sugiura Y, et al. *Two-step matrix application technique to improve ionization efficiency for matrix-assisted laser desorption/ionization in imaging mass spectrometry*. Anal Chem. 2006 Dec 15;78(24):8227-35.
267. Cohen SL, Chait BT. *Influence of matrix solution conditions on the MALDI-MS analysis of peptides and proteins*. Anal. Chem. 1996; 68: 31.
268. Vorm O, et al. *Proceedings of the 41st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*; San Francisco, CA, May 31-June 4, 1993; p 621
269. Rosinke B, et al. *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (MALDI-MS) of membrane proteins and non-covalent complexes*. J. Mass Spectrom. 1995, 30, 1462-8.
270. Bornsen OK, et al. *Influence of solvents and detergents on matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry measurements of proteins and oligonucleotides*. Rapid Commun. Mass Spectrom. 1997; 11: 603-9.
271. Amado FML, et al. *Analysis of peptide and protein samples containing surfactants by MALDI-MS*. Anal. Chem. 1997; 69: 110
272. Martine C, et al. *Detergent-Friendly Method for Mass Spectrometric Analysis of Integral Membrane Proteins*. Anal. Chem. 2000, 72, 5655-5658
273. Breaux GA, et al. *Surfactant-aided, matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry of hydrophobic and hydrophilic peptides*. Anal. Chem. 2000; 72: 1169.
274. Barbara D. et al. *Improved MALDI-TOF imaging yields increased protein signals at high molecular mass*. J Am Soc Mass Spectrom. 2009 Jan;20(1):89-95.