



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

*Modulo richiesta assegno*

<b>TUTOR</b>	<b>Uberto Pagotto</b>
--------------	-----------------------

<b>TITOLO DEL PROGETTO</b>			
Sviluppo e validazione di metodi di quantificazione di steroidi endogeni ed esogeni in derivati ematici mediante cromatografia liquida - spettrometria di massa			
ASSEGNO FINANZIATO DA PROGETTO COMPETITIVO <i>(barrare la casella corrispondente)</i>	<input checked="" type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO	<i>Punti</i>
SE IL FINANZIAMENTO È COMPETITIVO L'ENTE FINANZIATORE	MUR, PRIN2020, grant agreement 2020ERLB52.		
PROGETTO/ATTIVITÀ A SCOPO COMMERCIALE <i>(es. sperimentazione profit)</i>	<input type="checkbox"/> SI	<input checked="" type="checkbox"/> NO	
CARATTERISTICHE DEL PROGETTO <i>(biomedico/osservazionale/clinico-interventistico/multidisciplinare)</i>	Biomedico		
STATO DI APPROVAZIONE DEL PROGETTO DA PARTE DEL COMITATO ETICO <i>(se necessario per il tipo di studio barrare o evidenziare la casella corrispondente)</i>	<input type="checkbox"/> Ottenuto	<input checked="" type="checkbox"/> Da ottenere	
<b>DESCRIZIONE DEL PROGETTO</b> <i>(max 800 parole)</i>			<i>Punti</i>
<b>Stato dell'Arte e Razionale</b> <p>I farmaci corticosteroidi rappresentano il 15-23% delle intere prescrizioni farmacologiche in Italia. Alcuni di questi sono prescritti dagli Endocrinologi per sostituire la funzione surrenalica deficitaria o per test diagnostici. Altri sono impiegati a scopo anti-infiammatorio e immunosoppressivo. Ad oggi, non è chiaro come la composizione corporea, la funzionalità renale ed epatica possano influenzare la cinetica di questi farmaci.</p> <p>L'affidabilità del test al desametonone (DEX), impiegato per la diagnosi di ipercortisolismo, è sovente inficiata da interferenze sull'assorbimento del farmaco. In patologie causate da deficit surrenalici, il trattamento con glucocorticoidi esogeni può produrre un sovradosaggio, determinando un ipercortisolismo iatrogeno, o un insufficiente dosaggio, che induce uno stato di iperandrogenismo. Tali condizioni possono a loro volta peggiorare il quadro patologico. Ad oggi, la mancanza di efficienti strategie di monitoraggio e di significativi marcatori per predire la sovraesposizione da corticosteroidi, e la presenza di effetti avversi riducono spesso l'adeguatezza di terapia personalizzata.</p> <p>Nelle patologie non endocrine trattate con glucocorticoidi, la minima dose efficace è definita in base ai parametri infiammatori. Non vengono presi in considerazione i livelli circolanti di farmaco, la residua funzione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e le alterazioni del ritmo circadiano. Inoltre, sono poco chiari i tempi di decalage del cortisonico per non incorrere in insufficienza surrenalica.</p> <p>Il monitoraggio dei livelli di steroidi esogeni richiede frequenti prelievi ematici, difficilmente praticabili in pazienti fragili o a domicilio. Inoltre, i centri in grado di misurare gli steroidi esogeni ed endogeni in Italia sono limitati in numero, rendendo tale possibilità largamente inaccessibile.</p> <p>Ancora oggi, in Italia, gli steroidi vengono misurati a scopi clinici mediante metodi immunometrici obsoleti, la cui scarsa specificità provoca spesso misdiagnosi ed inappropriate scelte terapeutiche, determinando un drammatico aumento dei costi della sanità. Negli ultimi 15 anni, per sopperire a questi limiti, il gruppo di ricerca di Endocrinologia del Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche dell'Università di Bologna, si è avvalso della tecnologia di</p>			



## DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC-MS/MS) per sviluppare metodi quantitativi per gli ormoni steroidei multianalitici, economici e, soprattutto, altamente sensibili e specifici, applicati a fluidi quali siero, plasma, saliva e terreni di coltura in vitro.

Le gocce di sangue su cartoncino (dried blood spot, DBS) da puntura del dito costituiscono una valida alternativa ai prelievi venosi. Il DBS richiede infatti un campionamento minimamente invasivo che può essere effettuato autonomamente a domicilio dal paziente, anche molteplici volte nell'arco della giornata, e può essere recapitato al laboratorio via posta.

La LC-MS/MS si è già dimostrata utile per dosare DEX, metilprednisolone (MPS), prednisone (PNS) e prednisolone (PNL) in siero e saliva, tuttavia, solo pochi studi hanno valutato steroidi endogeni ed esogeni simultaneamente.

### **Obiettivi**

Nell'ambito del più ampio progetto intitolato "Analisi avanzata mediante cromatografia liquida/spettrometria di massa tandem sull'andamento degli steroidi esogeni ed endogeni, svelandone le azioni metaboliche per migliorare gli esiti cardiovascolari ed immunitari" finanziato dal MIUR mediante il programma PRIN2020, obiettivo del presente assegno di ricerca è quello di sviluppare metodi LC-MS/MS multianalitici rivolti alla misurazione simultanea di steroidi endogeni ed esogeni in derivati ematici quali DBS.

Una volta validati, tali dispositivi analitici permetteranno di soddisfare gli obiettivi del progetto, ovvero di indagare la farmacocinetica dei principali farmaci glucocorticoidi e di studiare al contempo la perturbazione dello steroidoma endogeno da essi indotta in pazienti affetti da varie patologie endocrine e non endocrine che richiedano un trattamento a base di corticosteroidi.

### **Metodologia (descrizione del campione, principali tecniche utilizzate, aspetti biostatistici, fattibilità...)**

Verranno sviluppati metodi LC-MS/MS per la misurazione in DBS e siero di cortisolo, cortisone, 21deossicortisolo, 11 deossicortisolo, aldosterone, corticosterone, 11deossicorticosterone, 17OHprogesterone, 17OHpregnenolone, deidroepiandrosterone solfato, androstenedione, testosterone, idrocortisone, cortone acetato, DEX, MPS, PNS e PNL. Verrà utilizzata la piattaforma disponibile al CRBA costituita da HPLC Serie 200 (PerkinElmer) e API 4000 Q-Trap (Sciex). La raccolta dei DBS verrà messa a punto su carta Whatman. La quantificazione verrà condotta mediante standard interno isotopico. I metodi verranno validati secondo linee-guida internazionali.

A seguire, verrà condotto un confronto tra campioni appaiati di DBS e siero da sangue venoso, per valutare la distribuzione degli analiti tra siero ed eritrociti e per calcolare le concentrazioni sieriche equivalenti.

### **Risultati attesi**

Al completamento del primo anno di assegno, ci si aspetta di avere definito due o più pannelli analitici che includano farmaci e steroidi endogeni, e di aver messo a punto e ottimizzato la raccolta e conservazione del DBS, l'estrazione di steroidi da DBS, la separazione cromatografica e la rivelazione MS. Ci si aspetta inoltre di aver condotto gli esperimenti di ripetibilità e linearità utili alla pre-validazione dei metodi.

Ci si aspetta che lo studio generi nuove conoscenze circa la farmacocinetica dei glucocorticoidi usati in patologie endocrinologiche e non, utili a definire approcci terapeutici personalizzati e a ridurre e monitorare gli effetti avversi. L'applicazione della LC-MS/MS all'analisi quantitativa dei DBS rappresenta un'importante innovazione per la medicina di laboratorio e per l'accesso alle cure di popolazioni fragili.

## **DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ DELL'ASSEGNISTA**

(per i **nuovi** assegni: max 400 parole; competenze richieste, scansione temporale della formazione, scansione temporale dell'attività, obiettivi primari e secondari)

(per i **rinnovi**: max 600 parole – da integrare con la relazione dell'assegnista; formazione raggiunta, attività effettuata, obiettivi raggiunti/competenze acquisite, formazione ancora da acquisire (se pertinente), scansione temporale dell'attività durante il rinnovo)

**Punti**



## DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

E' necessario che l'assegnista abbia competenze in chimica analitica, cromatografia liquida ad alta pressione, spettrometria di massa e relative tecniche di preparazione del campione.

Nei primi 12 mesi di studio, l'assegnista collaborerà allo sviluppo di metodi per la quantificazione di steroidi in dried blood spot (DBS). Nella prima fase, verrà sviluppato il metodo analitico. In particolare, impiegando standard analitici opportunamente selezionati tra quelli disponibili sul mercato per le caratteristiche di purezza, si occuperà della messa a punto di metodi di rivelazione in spettrometria di massa tandem. Per ciascuno standard e isotopo verranno definite le condizioni di ionizzazione e frammentazione più sensibili e specifiche. A seguire, verranno sviluppati i metodi cromatografici per molteplici pannelli di molecole, testando diverse colonne cromatografiche, fasi mobili e condizioni separative. Verranno quindi definiti preliminarmente la sensibilità del metodo e l'intervallo di quantificazione. Nella seconda fase verranno ottimizzati i protocolli di raccolta e conservazione dei DBS, nonché quelli relativi all'estrazione degli steroidi, mediante sedute di comparazione di diversi solventi e condizioni di incubazione. Infine, verrà messa a punto la curva di calibrazione ottimizzando la concentrazione di ciascun isotopo impiegato come standard interno, e rifinando l'intervallo di quantificazione sulla base dei segnali osservati negli estratti di DBS.

Una volta sviluppato il metodo, si procederà con gli esperimenti utili a definire la prestazione dello stesso in termini di precisione, accuratezza, sensibilità, recupero ed effetto matrice. Il metodo si riterrà validato quando questi parametri verranno ritenuti soddisfacenti sulla base delle indicazioni delle principali linee guida.

Inoltre, l'assegnista collaborerà alle altre attività del gruppo di ricerca di endocrinologia.

**SE RINNOVO, SI RICORDA DI ALLEGARE ANCHE LA RELAZIONE DELL'ASSEGNIATA CON LA SUA PRODUZIONE SCIENTIFICA.**

*Scheda attività assistenziale (se prevista)*

<b>ATTIVITÀ ASSISTENZIALI DELL'ASSEGNIATA/ N. ORE SETTIMANA</b>
Non prevista.
<b>AZIENDA SANITARIA PRESSO CUI SI SVOLGERÀ L'ATTIVITÀ</b>

Si ricorda che, come previsto dagli Accordi sull'impiego nell'attività assistenziale dei Titolari di assegni di ricerca, sottoscritti tra l'Università di Bologna e le Aziende Ospedaliere di riferimento, una volta stipulato il contratto con il vincitore della selezione, il tutor deve consegnare alla Direzione Medica Ospedaliera la relativa modulistica, nella quale andranno riportate le attività qui segnalate.