

MASTEROPPGAVE I LEGEMIDDELANALYSE

FOR GRADEN MASTER I FARMASI

# Bestemmelse av Bradykinin 1-5 i fullblod fra gris

*Metodeimplementering ved bruk av LC-MS/MS for å bestemme  
nivået av bradykinin 1-5 i blod fra gris før og etter sepsis*

**Knut Fredrik Seip**



Avdeling for farmasøytisk kjemi

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Vår 2010

# **Bestemmelse av bradykinin 1-5 i fullblod fra gris**

*Metodeimplementering ved bruk av LC-MS/MS for å bestemme nivået av bradykinin 1-5 i blod fra gris før og etter sepsis*

**Knut Fredrik Seip**

Arbeidet ble utført i perioden februar 2009 til mai 2010 ved faggruppen for legemiddelanalyse, Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo

Veildere:

Professor Léon Reubsæet, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo  
Professor Harald Thidemann Johansen, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo  
Post doc. Trine Grønhaug Halvorsen, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo  
Professor Erik Waage Nielsen, Immunologisk institutt, Rikshospitalet

## Forord

Først og fremst vil jeg takke mine veiledere, professor Leon Reubsaet, professor Harald Thidemann Johansen og post doc. Trine Grønhaug Halvorsen for meget god veiledning og oppfølging under arbeidet med oppgaven.

I tillegg vil jeg takke professor Erik Waage Nielsen og resten av teamet rundt icatibantstudien på Rikshospitalet i Oslo. Dere har raskt stilt opp med ekstra prøver når det har vært nødvendig og dere har alltid vært imøtekommende og behjelpelige når jeg har vært innom. De faglige diskusjonene vi har hatt har vært svært givende og inspirerende. En takk rettes også til de 22 grisene som ofret livet for at dette prosjektet skulle bli en realitet.

Til sist vil jeg takke hele avdelingen for legemiddelanalyse og ikke minst de andre masterstudentene jeg har delt kontor med for å ha skapt et godt sosialt og inkluderende miljø. Dere har æren for en stor del av inspirasjonen bak arbeidet med denne oppgaven.

# Innhold

FORORD .....	3
INNHold .....	4
<b>1. SAMMENDRAG .....</b>	<b>7</b>
<b>2. FORKORTELSER OG BEGREP.....</b>	<b>8</b>
<b>3. INNLEDNING .....</b>	<b>10</b>
3.1 BAKGRUNN.....	10
3.2 PROBLEMSTILLING.....	11
<b>4. TEORI .....</b>	<b>12</b>
4.1 AMINOSYRER, PEPTIDER OG PROTEINER .....	12
4.2 BRADYKININ.....	13
4.2.1 <i>Struktur</i> .....	13
4.2.2 <i>Biologisk forekomst</i> .....	14
4.2.3 <i>Biologisk funksjon</i> .....	16
4.2.4 <i>Analyse av bradykinin</i> .....	18
4.3 TEKNIKKER FOR PRØVEOPPARBEIDELSE .....	18
4.3.1 <i>Fullblod som prøvematriks</i> .....	18
4.3.2 <i>Felling og inaktivering av blod</i> .....	19
4.3.3 <i>Fast-fase-ekstraksjon</i> .....	20
4.4 LC-MS / LC-MS/MS .....	22
4.4.1 <i>Væskrokromatografi</i> .....	22
4.4.2 <i>Massespektroskopi</i> .....	24
<b>5. MATERIALER OG METODE .....</b>	<b>31</b>
5.1 UTSTYR, KJEMIKALIER OG PEPTIDER .....	31

---

5.2	TILLAGING AV LØSNINGER.....	33
5.2.1	<i>Peptidløsninger</i> .....	33
5.2.2	<i>Løsninger til bruk under fast-fase-ekstraksjon</i> .....	34
5.2.3	<i>Mobilfaser</i> .....	35
5.2.4	<i>Løsninger brukt under in-vitro forsøk av bradykinindannelse</i> .....	36
5.3	PRØVEOPPARBEIDELSE.....	36
5.3.1	<i>Prøvetaking, proteinfelling og inaktivering av blod</i> .....	36
5.3.2	<i>Fast-fase-ekstraksjon</i> .....	37
5.4	ANALYSE.....	39
5.4.1	<i>LC-MS oppsett og metode</i> .....	39
5.4.2	<i>LC-MS/MS oppsett og metode</i> .....	41
5.5	PARTIELL VALIDERING.....	44
5.5.1	<i>Linearitet, repeterbarhet og nøyaktighet</i> .....	45
5.5.2	<i>LOD/LOQ</i> .....	46
5.5.3	<i>Utbytte</i> .....	47
5.6	BIOLOGISKE PRØVER.....	47
5.6.1	<i>In-vitro forsøk av bradykinindannelse</i> .....	47
5.6.2	<i>Analysen av prøver fra gris før og etter sepsis</i> .....	48
<b>6.</b>	<b>RESULTATER OG DISKUSJON</b> .....	<b>50</b>
6.1	INNLEDENDE FORSØK.....	50
6.1.1	<i>Valg av intern standard</i> .....	50
6.1.2	<i>Optimalisering av analysemetoden</i> .....	51
6.2	PRØVEOPPARBEIDELSE.....	53
6.2.1	<i>Test av ulike syrekomponenter i vaske- og elueringsløsningene</i> .....	56

---

6.2.2	<i>Test av løsemiddelstyrke som gir eluering</i> .....	57
6.2.3	<i>Optimalisering av vaske- og prøvepåsettelsesvolum</i> .....	58
6.2.4	<i>Optimalisering av elueringsvolum</i> .....	60
6.3	FORBEREDENDE FORSØK TIL BIOLOGISKE PRØVER.....	61
6.3.1	<i>Overføring av metoden til LC-MS/MS</i> .....	61
6.3.2	<i>Test av metoden på humant fullblod</i> .....	65
6.4	PARTIELL VALIDERING .....	68
6.4.1	<i>Linearitet</i> .....	68
6.4.2	<i>Repeterbarhet</i> .....	70
6.4.3	<i>Nøyaktighet</i> .....	71
6.4.4	<i>LOD/LOQ</i> .....	71
6.4.5	<i>Utbytte</i> .....	72
6.5	BIOLOGISKE PRØVER .....	73
6.5.1	<i>In-vitro forsøk av bradykinindannelse</i> .....	73
6.5.2	<i>Sammenlikning av BK1-5 nivået før og etter sepsis hos gris</i> .....	78
6.6	FEILKILDER.....	82
<b>7.</b>	<b>KONKLUSJON</b> .....	<b>84</b>
	<b>KILDELISTE</b> .....	<b>86</b>
	<b>VEDLEGG 1</b> .....	<b>91</b>
	<b>VEDLEGG 2</b> .....	<b>93</b>
	<b>VEDLEGG 3</b> .....	<b>97</b>
	<b>VEDLEGG 4</b> .....	<b>98</b>
	<b>VEDLEGG 5</b> .....	<b>99</b>

## 1. Sammendrag

Som del av en omfattende dyreeksperimentell studie på Rikshospitalet i Oslo, der ulike intervensjoner blir gjort på griser påført sepsis, ble det sett på bradykinin-eksponeringen og bradykinins betydning i patogenesen. For å oppnå dette har det i denne oppgaven blitt utviklet en LC-MS/MS-metode for bestemmelse av den stabile bradykininmetabolitten BK1-5 (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe) i fullblod, basert på tidligere arbeid av Murphey et al.[1, 2].

En prøveopparbeidelsesteknikk i to trinn er utviklet og tatt i bruk. Den endelige metoden baserer seg på en inaktivering og felling av blod rett etter prøvetakning ved bruk av etanol, og videre opprensning gjennom SPE, med C18 som sorbentmateriale og blandinger av 20 mM HCOOH og MeOH som vaske- og elueringsløsninger.

Analysene ble under metodeutviklingen foretatt med en singelkvadрупol LC-MS, men ble senere overført til en trippelkvadрупol LC-MS/MS, for å få lavere LOQ. En SRM-metode for bestemmelse av BK1-5 gjennom  $m/z$ -overgangen  $287,00^{(2+)} \rightarrow 254,05$  ( $b_2$ ) ble utviklet. BK1-6 ble brukt som intern standard. Kromatografien utføres ved hjelp av gradienteluering med 20 mM HCOOH og MeOH i mobilfasene, på en BioBasic C8-kolonne.

Metoden ble testet ut på humane prøver og prøver fra griser inkludert i icatibantstudiet på Rikshospitalet. En partiell validering av metoden ble utført og viste god linearitet ( $r^2 > 0,999$ ) og akseptabel repeterbarhet (12,8-15,2 %), med en LOQ på 50 pg/mL blod, men med et noe lavt utbytte (19,1-48,2 %) og variabel nøyaktighet (1,2-54,4 %). De biologiske prøvene viste en tydelig økning i signalet for BK1-5 fra før til etter sepsis, noe som ikke er påvist tidligere, fra en udetekterbar mengde ( $< 50$  pg/mL) til en snittkonsentrasjon på  $1,62 \pm 0,95$  ng/mL blod, noe som tyder på at bradykinin blir dannet under patogenesen. Resultatene danner grunnlag for, og viser at implementering av denne metoden kan være svært nyttig i videre forskning på bradykinin og dets metabolitter, og deres betydning i en rekke ulike sykdommer.

## 2. Forkortelser og begrep

---

<b>ACE</b>	Angiotensinkonverterende enzym (Angiotensin converting enzyme)
<b>ACN</b>	Acetonitril
<b>APCI</b>	Atmosfærisk trykk kjemisk ionisasjon (atmospheric pressure chemical ionization)
<b>Arg</b>	Trebokstavforkortelse for aminosyren arginin
<b>BK1-5</b>	De fem første aminosyrene av bradykinin, et stabilt nedbrytningsprodukt fra bradykinin <i>in vivo</i>
<b>BK1-6</b>	De seks første aminosyrene av bradykinin
<b>C1 INH</b>	C1 inhibitor, en hemmer i blant annet kallikrein-kinin systemet
<b>C8</b>	Hydrokarbonkjede med 8 karbonatomer
<b>C18</b>	Hydrokarbonkjede med 18 karbonatomer
<b>CH<sub>3</sub>COOH</b>	Eddiksyre
<b>CID</b>	Kollisjonsindusert fragmentering (Collision induced dissociation)
<b>CPN</b>	Karboxypeptidase N
<b>Da</b>	Dalton, molekylvektenhet
<b>DXS</b>	Dekstransulfat
<b>EDTA</b>	Etylendiamintetraeddiksyre
<b>ESI</b>	Elektrosprayionisasjon (electrospray ionization)
<b>Faktor XII</b>	Hageman faktor, en faktor i kallikrein-kinin kaskaden og det interne koagulasjonssystemet
<b>Faktor XIIa</b>	Hageman faktor (aktivert form)
<b>Gly</b>	Trebokstavforkortelse for aminosyren Glysin
<b>HCl</b>	Saltsyre (hydrochloric acid)
<b>HCOOH</b>	Maursyre, metansyre (formic acid)
<b>HK</b>	Høymolekylært kininogen, forløperprotein for bradykinin
<b>Kallikrein</b>	Peptidaser (enzymer som spalter peptidbindinger) involvert i dannelsen av blant annet bradykinin
<b>LC</b>	Væskrokromatografi (liquid chromatography)
<b>LK</b>	Lavmolekylært kininogen, forløperprotein for lys-bradykinin
<b>LOD</b>	Deteksjonsgrense (Limit of Detection)
<b>LOQ</b>	Kvantifiseringsgrense (Limit of Quantification)

---



---

<b>m/z</b>	Forholdet masse / ladning
<b>Lys</b>	Trebokstavforkortelse for aminosyren Lysin
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MRM</b>	Multiple reaction monitoring
<b>MS</b>	Massespektroskopi
<b>MS/MS</b>	Tandem MS
<b>Phe</b>	Trebokstavforkortelse for aminosyren fenylalanin
<b>Pro</b>	Trebokstavforkortelse for aminosyren prolin
<b>rpm</b>	Runder per minutt (rounds per minute)
<b>RSD</b>	Relativt standardavvik (relative standard deviation)
<b>S/N</b>	Signal-støyforhold (Signal to noise ratio)
<b>Ser</b>	Trebokstavforkortelse for aminosyren serin
<b>SIM</b>	Selected ion monitoring
<b>SPE</b>	Fast-fase-ekstraksjon (Solid-phase-extraction)
<b>Spiket</b>	Beskriver at noe er tilsatt prøven
<b>SRM</b>	Single reaction monitoring
<b>T240</b>	Prøvetidspunkt fire timer etter inngrep (bakteriell infusjon) (se vedlegg 5)
<b>T-basis</b>	Prøvetidspunkt før noen inngrep er gjort
<b>TFA</b>	Trifluoreddiksyre (Trifluoroacetic acid)
<b>TIC</b>	Total ion count
<b>t-PA</b>	Vevsplasminogenaktivator (tissue plasminogen activator)
<b>Uspiket</b>	Motsatte av spiket, beskriver at prøvene ikke er tilsatt et eller flere bestemte stoffer

---

## 3. Innledning

### 3.1 Bakgrunn

Bradykinin er et nonapeptid dannet via kontaktaktivering, fra kininogener, ved hjelp av kallikrein. Peptidet utøver flere biologiske effekter, hovedsakelig gjennom bradykinin B<sub>2</sub> reseptoren[3], hvorav dens vasodilatoriske og trolig kardioprotektive effekt er mest studert[4, 5]. En rekke andre tilstander har også blitt assosiert med bradykininfrigjøring, som inflammasjonstilstander og ødemdannelse, i tillegg til ulike sykdommer som allergier, astma, diabetes, visse typer kreft, arvelig angioødem og sepsis[3, 6-9].

Sepsis og septisk sjokk er tilstander forbundet med høy dødelighet. Den kraftige systemiske inflammasjonen som oppstår fører til frigjøring av en rekke mediatorer, med påfølgende økt permeabilitet fra blodårer, kraftig væsketap og ødemdannelser, hvorav bradykinin antas å spille en viktig rolle[6, 9, 10]. En studie som pågår på Rikshospitalet i Oslo, med tittelen ”The Impact of Icatibant on regional and systemic capillary leakage in a porcine modell of *Neisseria Meningitidis* sepsis”, ser på B<sub>2</sub> antagonistens icatibant sin evne til å redusere kapillærlekkasjen i septiske tilstander, samt undersøke legemidlets effekt på hemodynamikk, kumulativ væskebalanse og inflammasjonsrespons i gris (se vedlegg 5). I forbindelse med dette studiet er det interessant å se på bradykinineksponeringen ved sepsis hos de aktuelle grisene, noe som er et av fokusområdene for denne oppgaven.

Bradykinin har en relativt kort virketid *in vivo*, med 16 sekunder som den laveste målte halveringstiden for peptidet[11]. Dette skyldes hurtig nedbrytning fra enzymer som ACE og CPN i blod[12]. Tilstedeværelsen av både forløperproteinene til bradykinin, høymolekylært kininogen, og nedbrytningsenzymer i blod, samt at prosessen for bradykinin generering starter ved kontaktaktivering rett etter at prøvetakning er foretatt, skaper en analytisk utfordring når metoder skal utvikles for å

bestemme nivået på en god måte. Murphey et al. har gjennom metabolismestudier kommet frem til en stabil metabolitt bestående av de fem første aminosyrene i bradykinin, kalt BK1-5[1], og utviklet en metode for å bestemme denne i blod[2]. Nivået av BK1-5 vil, grunnet en betydelig lengre halveringstid, være et sikrere mål på bradykinineksponeringen over en viss tid enn en måling av bradykinin i seg selv.

Implementering av en slik metode vil være et svært nyttig verktøy for videre forskning på bradykinin og dets metabolitter, samt en rekke tilstander der bradykinin er antatt å spille en rolle. I tillegg kan det vise seg å være et godt hjelpemiddel i diagnostisering av sykdommer forbundet med forhøyede bradykininnivåer, som for eksempel arvet angioødem, eller kartlegging av risiko for bivirkninger ved bruk av ACE-hemmere.

## 3.2 Problemstilling

Målet for denne oppgaven var å utvikle og implementere en stabil og robust metode for bestemmelse av BK1-5 i blod, basert på metoden nevnt ovenfor, og bruke denne på blodprøver fra et utvalg av grisene fra icatibantstudiet på Rikshospitalet, for å undersøke bradykinins rolle ved sepsis.

Følgende hoved- og delmål ble dermed satt for denne oppgaven:

- Implementere en metode for bestemmelse av BK1-5 i fullblod basert på tidligere arbeid av Murphey et al.[2]
  - Sette opp en prøveopparbeidelsesmetode som gir god opprensning og akseptabelt utbytte av BK1-5 i blod
  - Sette opp en LC-MS/MS SRM-metode for bestemmelse av BK1-5 i blod med akseptabel deteksjonsgrense
- Undersøke om bradykinin kan være en viktig mediator i sepsis ved å bestemme BK1-5 nivået før og etter sepsis er induisert.

## 4. Teori

### 4.1 Aminosyrer, peptider og proteiner

Proteiner og peptider eksisterer i alle celler og utøver flere livsviktige oppgaver som enzymatisk katalyse av kjemiske reaksjoner, transport og lagring av ulike stoffer, bevegelse av celler, muskler og vev, mekanisk støtte i celler, vev, sener, hud og ben, immunfunksjoner vha. antistoffer, sansing og overføring av nerveimpulser, genregulatoriske funksjoner, ernæring med mer[13, 14]. En celledes proteinuttrykk styres av genomet, som inneholder informasjon om aminosyresekvensen til alle aktuelle proteiner og peptider[15].

Proteiner og peptider er polymerer av aminosyrer, bundet kovalent sammen i en peptidbinding, og varierer over et stort spenn i størrelse og biologisk rolle.

Aminosyrene består av en karboksylgruppe og en aminogruppe bundet til det samme karbonatomet, og en varierende sidekjede. Variasjonen i sidekjeden muliggjør dannelsen av større molekyler med svært ulike egenskaper[16]. Det er totalt 20 ulike aminosyrer som fungerer som byggestener i naturlig forekommende proteiner og peptider, og de deles gjerne inn i fire grupper ut fra sidekjedenes kjemiske egenskaper: aminosyrer med uladete hydrofobe sidekjerder, uladete hydrofile sidekjerder, negativt ladete sidekjerder og positivt ladete sidekjerder[14]. De ulike egenskapene dette gir med tanke på polaritet og type ladninger på molekylene gjør peptid- og proteinanalyser langt mer komplekst enn analyse av enklere og mer definerte substanser, som for eksempel mange legemidler, noe som det er viktig å ta hensyn til både under prøveopparbeidelse og kromatografi.

Et protein kan ofte inneha en stor størrelse grunnet en lang kjede av aminosyrer, og vil folde seg til bestemte konformasjoner. Disse konformasjonene har en viss fleksibilitet og kan endres noe ved interaksjoner med andre molekyler, noe som er viktig for proteinets funksjon[13]. Store molekyler som proteiner folder seg slik at

den frie energien blir minimert, og de ulike nivåene i denne strukturen har fått en egen inndeling[13, 16]. Primærstrukturen til et protein består av aminosyrekjeden, bundet sammen med peptidbindinger. Sekundærstrukturen vil vise hvordan denne kjeden foldes inn i strukturer som  $\alpha$ -helix, der N-H grupper i peptidbindingene danner hydrogenbindinger til C=O i en nærliggende peptidbinding, slik at en helixformasjon dannes, og  $\beta$ -sheets der polypeptidkjeder binder seg til en annen kjede i proteinet ved hjelp av hydrogenbindinger, slik at en båndstruktur dannes. Disse foldingene vil være en del av tertiærstrukturen som beskriver hele den tredimensjonale strukturen til proteinet, og kvarternærstrukturen som viser konformasjonen til et protein sammen med subenheter, dersom proteinet har dette[13, 16].

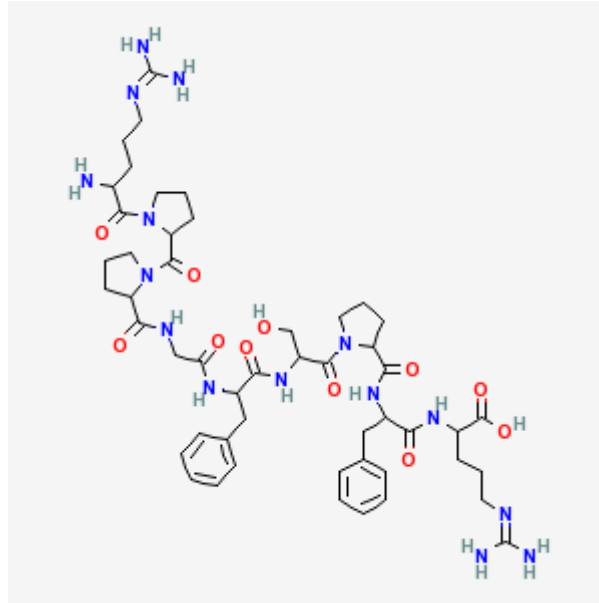
## 4.2 Bradykinin

Bradykinin fikk sitt navn i 1948 etter at det ble vist at ekstrakter av giften fra *B. jararaca* eller trypsin, sammen med globulinfraksjonen av plasma fra hund, førte til produksjon av en substans som ga en treg og forsinket kontraksjon av ileum fra marsvin[17]. Navnet bradykinin er satt sammen fra gresk, hvorav kinin betyr bevegelse og brady betyr treg, og ble gitt utfra denne observasjonen[7].

### 4.2.1 Struktur

Den korrekte aminosyresekvensen for peptidet bradykinin ble kjent i 1960 ved hjelp av degraderingsstudier som viste at naturlig bradykinin hadde samme struktur som et tidligere syntetisert nonapeptid[18]. Dette nonapeptidet, som nå er kjent som bradykinin, har aminosyresekvensen  $\text{H-L-Arg-L-Pro-L-Pro-Gly-L-Phe-L-Ser-L-Pro-L-Phe-L-Arg-OH}$  (se Figur 1) og hadde fra før av vist seg å ha bradykininliknende egenskaper i ulike biologiske tester[19].

Bradykinin har en molekylærvækt på 1060,21 og kan maksimalt inneha tre positive ladninger, hvorav en er på aminoenden og de andre to på sidekjedene til arginin.



Figur 1: Strukturen til bradykinin.[20]

#### 4.2.2 Biologisk forekomst

Dannelsen av bradykinin skjer via en prosess kalt kontaktaktivering.

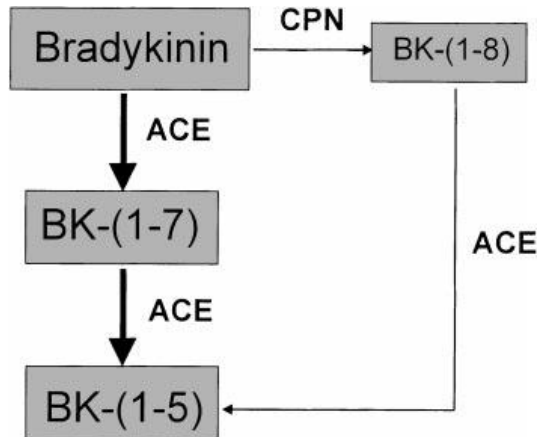
Kontaktaktiveringsprosessen starter trolig ved at faktor XII i blodet autoaktiveres av spormengder av den aktive formen, faktor XIIa, ved binding til negativt ladde overflater[21, 22]. Faktor XIIa, fører så til spalting av proenzymet prekallikrein til aktivt plasmakallikrein, i en prosess som blir katalysert av høymolekylært kininogen (HK)[23, 24]. Høymolekylært kininogen er også substrat for plasmakallikrein og vil spaltes på to steder inne i proteinet, slik at peptidet bradykinin på ni aminosyrer frigjøres[7, 25]. For at en slik kaskade skal kunne utvikles må en tilstrekkelig mengde faktor XIIa og plasmakallikrein dannes for å kunne overkomme den inhibitoriske kapasiteten i plasma, som i hovedsak utgjøres av C1-inhibitor (C1 INH)[26, 27].

To typer kininogener er beskrevet, hvorav høymolekylært kininogen frigir bradykinin ved spalting, mens den andre typen, lavmolekylært kininogen, frigir lys-bradykinin, også kalt kallidin[28, 29] (et decapeptid med tilsvarende struktur som bradykinin med en ekstra lysylgruppe ved N-terminalen). Konsentrasjonen i plasma av de ulike typene er hhv. 80 µg/mL (670 nM) og 60 µg/mL (880 nM) for HK og LK[29], noe som gjør

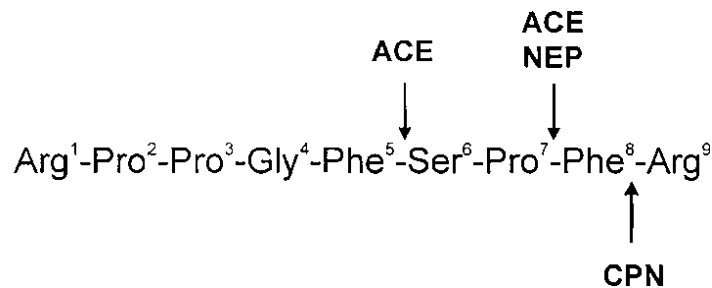
at potensialet for bradykinindannelse i plasma er svært høyt. Plasmakallikrein vil hovedsakelig stå for spaltningen av HK, mens vevskallikrein spalter både HK og LK[25, 30]. Dannelse av bradykinin fra lys-bradykinin skjer ved avspalting av lysin ved hjelp av aminopeptidaser[7].

Bradykinin blir raskt metabolisert *in vivo* av en gruppe enzymer kalt kininaser, hvorav ACE (angiotensinkonverterende enzym) og CPN (karboxypeptidase N) er vist å være sentrale aktører[12]. Halveringstiden til bradykinin er svært rask, som vist av Ferreira et al. og McCarthy et al., som har målt denne til hhv. 17 sekunder i blod fra katt og 16 sekunder i blod fra hund[11, 31]. Under *in vivo* betingelser og konsentrasjoner av bradykinin nært opp til det man kan forvente *in vivo*, har det blitt vist at ACE står for den viktigste degraderingsveien, mens det under høyere konsentrasjoner av bradykinin er CPN som står for dette. Dette er trolig grunnet at Michaelis-Menten konstanten for nedbrytningsenzymene overstiges ved høye konsentrasjoner, slik at kinetikken går over til 0. orden[32].

Degraderingsstudier med ACE sammen med bradykinin har vist en kløyving på to steder, hver på to aminosyrer av gangen, der det først blir dannet et heptapeptid BK1-7 som raskt blir spaltet videre til pentapeptidet BK1-5, og etterlater seg to avspaltningsprodukter på to aminosyrer hver, hhv. Phe-Arg og Ser-Pro[33-35]. Studier er også gjort der man har klargjort mekanismen for degradering med CPN, som spalter av arginin fra c-terminalen og danner des-Arg<sup>9</sup>-Bradykinin[36, 37], for så å videre bli spaltet av ACE ned til BK1-5, via dennes tripeptidaseaktivitet (se Figur 2 og 3) [12, 32, 35]. Videre nedbrytning av BK1-5 til enkeltaminosyrer er en noe tregere prosess og enzymene involvert er ennå ikke karakterisert[8]. BK1-5 har vist seg å være en stabil plasmametabolitt av bradykinin med en halveringstid på rundt 90 minutter[1].



Figur 2: Nedbrytningsveiene til bradykinin og hvilke enzymer som står for nedbrytningen. Tykkere piler betyr at dette er den dominerende veien. ACE: angiotensinkonverterende enzym, CPN: karboxypeptidase N.[32]



Figur 3: Aminosyresekvensen til bradykinin og der hvor enzymene spalter molekylet. CPN: karboxypeptidase N, ACE: angiotensinkonverterende enzym, NEP: neutral endopeptidase.[32]

### 4.2.3 Biologisk funksjon

Bradykinin og lys-bradykinin, samt metabolittene der en arginin er fjernet fra C-terminalen, har til nå vist seg å utøve sin funksjon gjennom to reseptorer kalt B<sub>1</sub> og B<sub>2</sub>, som begge er G-proteinkoblede[3, 38, 39]. Av disse typene ser det ut til at B<sub>2</sub> reseptoren hovedsakelig har høy affinitet for bradykinin og lys-bradykinin, mens B<sub>1</sub> først og fremst binder des-arg<sup>9</sup> metabolittene[3, 40, 41]. Begge reseptorene har også vist seg å ha konstitutiv aktivitet i bestemte celletyper[42, 43]. Både B<sub>1</sub> og B<sub>2</sub> reseptorene kan være uttrykt på samme type celler, der vaskulære glattmuskel- og endotelceller, fibroblaster, epitelceller, nerveceller og visse tumorceller ser ut til å være de viktigste[3, 7, 44-47]. Uttrykket av B<sub>1</sub> reseptoren vil normalt være lavt for så



å oppreguleres under patologiske tilstander som for eksempel inflammasjon eller potensielt skadende stimuli, og mesteparten av den fysiologiske aktiviteten under normale tilstander utøves derfor av B<sub>2</sub> reseptoren[7, 45, 48].

Bradykinin har flere roller i homeostasen, hvorav dens rolle som vasodilator, trolig mediert gjennom B<sub>2</sub> reseptoren, og dermed en mulig blodtrykksregulerende effekt, er mest kjent[4, 5]. Noe av den gunstige blodtrykksenkende effekten til ACE-hemmere kan skyldes redusert nedbrytning av bradykinin og dermed fremme dennes vasodilatoriske effekt[5]. I tillegg til de vasoaktive egenskapene vil bradykinin inducere frigjørelsen av t-PA fra endotelceller, samt hemme trombinindusert plateaggregering, og dermed ha betydning for fibrinolyse[49-51]. Ved inflammasjon spiller også bradykinin en viktig rolle ved at den frigir en rekke mediatorer og er med på å forårsake flere av de vanlige inflammasjonssymptomene som rødhet, lokal oppvarming, hevelse og smerte[3, 7, 52]. Vasodilatasjon kombinert med stimulering av proteiner som regulerer funksjonen til endotelbarriæren, forårsaket av bradykinin og andre inflammatoriske mediatorer, fører til økt eksudasjon fra blodårer og dermed flere av disse symptomene[3].

Bradykinin kan spille en sentral rolle i ødemdannelse, noe som kan ses gjennom bivirkningsprofilen til ACE-hemmere, samt ved sykdommen hereditært angioødem[3, 5]. Denne sykdommen skyldes en mangel på funksjonelt C1 INH, som er en av de viktige plasmahemmerene for kallikrein-kinin systemet og dermed for dannelsen av bradykinin[53, 54]. En slik mangel fører til ukontrollert fristetning av bradykinin og anfallsvis ødemdannelse, som i verste fall kan være dødelige. B<sub>2</sub> antagonisten icatibant er nylig registrert som legemidlet Firazyr<sup>®</sup> i Norge til bruk mot anfall av hereditært angioødem[55], og er under utprøving for andre sykdommer. Kliniske studier har vist at bradykinin kan spille en viktig rolle i sepsis [6, 9], som nettopp er kjennetegnet ved en systemisk inflammasjonsprosess og kraftig plasmaeksudasjon, altså symptomer som stemmer godt med kjente effekter av bradykinin.

Dyreeksperimentelle studier av sepsis baserer seg blant annet på infusjon av

mikroorganismer, og en slik utprøving på griser påført sepsis, er grunnlag for denne oppgaven (se vedlegg 5).

#### 4.2.4 Analyse av bradykinin

Den korte halveringstiden til bradykinin fører til at en nøyaktig bestemmelse av nivået er vanskelig å oppnå. Metoder er derfor utviklet for å bestemme nivået av den stabile metabolitten BK1-5 som vil gi en indikasjon på bradykinineksponeringen over en viss tid, og det endogene nivået er her målt til å ligge rundt  $44,2 \pm 7,1$  fmol/mL blod[2]. Kontaktaktiveringsprosessen fører til at nydannelse av bradykinin skjer ved hjelp av enzymene i blod straks prøvetaking begynner, samt at nedbrytningsenzymenes tilstedeværelse i plasma fører til videre nedbrytning. Dette gjør at nødvendige tiltak for å inaktivere disse enzymene må utføres for å få korrekte målinger (se 5.3.1)[2].

### 4.3 Teknikker for prøveoppbeidelse

En biologisk prøve består gjerne av flere komponenter, hvorav kun et fåtall er av interesse. Andre komponenter i prøvematriksen kan skape problemer i analysen ved at de kan interferere med separasjonen av de analyttene man ønsker å analysere, gi egne responser i kromatogrammet eller ødelegge analyseinstrumentene[56]. I tillegg kan andre prøvekomponenter enn analytten føre til suppresjon av deteksjonssignalet (matrikseffekt)[57, 58]. Ved å utføre en prøveoppbeidelse kan man oppnå en langt lavere deteksjonsgrense under selve analysen, både fordi prøven er bedre opprenset, men også fordi man ofte oppkonsentrerer prøven underveis. I denne oppgaven ble fast-fase-ekstraksjon (SPE) basert på omvendt-fase, samt en proteinfelling av blod, brukt som prøveoppbeidelsesteknikker. Disse er derfor beskrevet spesifikt nedenfor.

#### 4.3.1 Fullblod som prøvematriks

Blod utgjør en viktig del av sirkulasjonssystemet ved å frakte oksygen, næringsstoffer, avfallstoffer, samt en rekke andre molekyler og celler til ulike vev og

organer i kroppen[15]. I tillegg har blodet andre funksjoner, som å bidra til å opprettholde kroppstemperaturen, frakte hormoner og andre signalmolekyler, samt å utøve en sentral rolle i immunsystemet gjennom hvite blodceller og koagulasjonssystemet[15, 16].

Blodet består hovedsakelig av celler (erythrocytter og leukocytt), som utgjør rundt 45 %, og blodplater, suspendert i en væske kalt plasma. Plasmavolumet består av omtrent 10 % faste stoffer oppløst i vann, hvorav 10 % er uorganiske salter, 20 % små organiske molekyler og 70 % plasmaproteiner, samt en liten andel andre substanser som er til stede i spormengder[16]. Blodets proteinuttrykk er i stor grad dominert av noen få proteiner som albumin og globuliner, som utgjør en stor andel av den totale proteinvekten[59]. Et relativt kraftig buffersystem basert på bikarbonat holder blodets pH tilnærmet konstant rundt 7,4, noe som er nødvendig for å opprettholde normal celle- og enzymfunksjon[16].

Analytisk sett er blod en kompleks blanding som inneholder molekyler med stor variasjon i størrelse, polaritet og hydrofobisitet. Varierende grad av prøveopparbeidelse er derfor nødvendig dersom man skal utføre bioanalytiske metoder der dette er prøvematriks.

### **4.3.2 Felling og inaktivering av blod**

Tilsetning av et fellingsreagens som for eksempel acetonitril, trikloreddiksyre, metanol eller etanol vil føre til at celler og proteiner felles ut av prøveløsningen, noe som gir en grov men betydelig opprensning av prøvematerialet. Supernatanten som blir igjen etter sentrifugering vil være en blanding av fellingsreagenset og blodplasma.

I tillegg til å interferere direkte med analyser kan bestanddelene i blod indirekte påvirke analyttene, noe som er tilfellet ved analyser av bradykinin og dets metabolitter. Blod kan ofte inneholde både forløperproteiner og nedbrytningsenzymmer for en rekke stoffer, og dersom forholdene ligger til rette for det kan dermed både nydannelse og nedbrytning av analyttene forekomme. Tilsetning av et fellingsreagens

vil i dette tilfellet fjerne det meste av proteinene i prøven slik at blodet vil være inaktivert i forhold til disse reaksjonene.

I denne oppgaven benyttes etanolisk plasmasupernatant, som er opparbeidet på Rikshospitalet i Oslo. Dette er dannet fra fullblod tilsatt etanol, slik at både celler og proteiner har felt ut. Etter sentrifugering sitter man igjen med en klar væskeløsning som utgjøres av tilnærmet proteinfritt plasma, samt etanol[2]. Denne løsningen sikrer at blodet er inaktivert med tanke på nydannelse og nedbrytning av analytten fra forløperproteiner og nedbrytningsenzymmer (se 4.2.2). Graden av uønskede forbindelser i prøvematriksen er fortsatt høy, samt at prosessen fører til en fortykning av prøven slik at videre prøveoppbehandling vil være nødvendig både for å oppnå ytterligere opprensning og for å nå ønsket nivå av oppkonsentrering.

### 4.3.3 Fast-fase-ekstraksjon

Fast-fase-ekstraksjon (SPE) er en prøveoppbehandlingss metode som benyttes til å isolere, rense og oppkonsentrere ønskede forbindelser fra en væske[56].

Ekstraksjonsmetoden baserer seg på at en løsning som inneholder analytten trekkes gjennom et stasjonært sorbentmateriale. Funksjonelle grupper på sorbenten vil gjøre at analytten isoleres i sorbentfasen mens forurensninger vaskes ut. Ved å endre sorbentmateriale, sammensetning av væskefasene, samt volum av sorbent og væskefase, vil man kunne oppnå ulik grad av selektivitet i interaksjonen med analyttene man ønsker å isolere. Selektive ekstraksjoner vil gi godt opprensede og oppkonsentrerte prøver siden sorbenten her vil ha stor affinitet til analytten men ikke til andre uønskede komponenter[60].

Ekstraksjonsprosessen utføres normalt i flere trinn i følgende rekkefølge:

1. Kondisjonering: Her aktiveres sorbentmaterialet ved at overflaten fuktes. Dette vil øke det aktive overflatearealet, noe som gir større kontaktflate med prøveløsningen og muliggjør bedre isolering av analyttene når prøven påsettes. Løsemidler med høy løsemiddelstyrke for den aktuelle sorbenten brukes til

kondisjoneringen, etterfulgt av en vaskeløsning med lav styrke, som fjerner rester av kondisjoneringensløsningen som ellers kan interferere med retensjonen av analyttene.

2. **Prøvepåsettelse:** Her trekkes prøveløsningen gjennom sorbenten. Løsningens sammensetning med tanke på pH, løsemiddelstyrke og motjoner (ved bruk av ionebyttersorbenter) bør favorisere retensjon av analytten.
3. **Vask:** Dette trinnet er ment til å vaske ut komponenter som sitter svakere på sorbenten enn analyttene. Løsemiddelstyrken bør være sterk nok til å eluere ut eventuelle forurensninger, men ikke så sterk at analyttene også elueres ut. Analytten bør sitte godt nok til at mengden vaskeløsning kan tilsvare minst 20 ganger volumet av sorbenten uten at analyttene elueres ut[60].
4. **Eluering:** Her skal interaksjonen mellom analytten og sorbenten brytes slik at analytten elueres ut av sorbenten, mens forurensninger som sitter sterkere bundet helst bør bli værende igjen. Til dette brukes en væske med løsemiddelstyrke som er sterk nok til at analytten blir eluert ut, men svak nok til at de fleste forurensninger blir sittende igjen. Elueringsvolumet bør også være så lite som mulig for å sikre en god oppkonsentrering.

Biologiske prøvematrikser er ofte vandige, noe som gjør at ekstraksjonsprinsippet omvendt-fase-SPE er godt egnet, siden vann her vil ha svak løsemiddelstyrke. Her vil analyttene retarderes ved hjelp av upolare interaksjoner (van der Waals krefter og dispersjonskrefter) med funksjonelle grupper på sorbenten (ofte hydrokarbonkjeder). Prinsippet tilsvarende det for omvendt-fase-kromatografi (se s. 23). Analytten bør være på mest mulig uladet form for å sikre lav polaritet og dermed bedre retensjon på sorbenten. Dette gjøres gjerne ved å justere pH i prøveløsningen og vaskeløsningen ved hjelp av en buffer. Sterke løsemidler for omvendt-fase-ekstraksjon vil være organiske løsemidler som metanol og acetonitril. Metanol er det mest brukte elueringsmidlet, og styrken kan varieres ved å øke styrken eller volumandelen av den organiske delen i en blanding av organisk og vandig løsning[56].

## 4.4 LC-MS / LC-MS/MS

LC-MS står for liquid chromatography – mass spectrometry, og er en teknikk for separasjon og deteksjon av substanser. Hovedprinsippet består av at analyttene separeres ved hjelp av væskechromatografi og blir deretter detektert ved hjelp av en masseanalysator. Bruken av masseanalysator som detektor kan i tillegg til å detektere analyttene også gi strukturinformasjon samt at det gir analyser med god sensitivitet og høy selektivitet.

Bruk av MS/MS der man også har et fragmenteringstrinn muliggjør ytterligere bedring i sensitivitet og selektivitet, samt at det kan gi mer utfyllende strukturinformasjon.

### 4.4.1 Væskechromatografi

Kromatografi er en fysisk separasjonsmetode som baserer seg på en analytts evne til å fordele seg mellom en stasjonær og en mobil fase, i et gitt system.

Væskechromatografi utføres ved hjelp av HPLC som typisk består av følgende deler:

- Mobilfasereservoir
- En eller flere pumper med tilhørende blandekammer
- Degasser
- Autoinjektor
- Kolonne

Flere ulike separasjonsteknikker kan benyttes, hvorav omvendt-fase-kromatografi ble brukt under arbeidet med denne oppgaven, og kun dette prinsippet vil bli omtalt her.

### *Omvendt-fase-kromatografi*

Omvendt-fase-kromatografi er den viktigste separasjonsteknikken i væskekromatografi og er mye brukt for separasjon av peptider [56]. Prinsippet består i at man har en hydrofob stasjonærfase og en mobilfase av mer hydrofil karakter. Mobilfasen består av vann med varierende mengde organisk modifikator og eventuelt bufferkomponenter. De aktive gruppene på stasjonærfasen består av sidekjeder av hovedsakelig hydrofob karakter, som oftest hydrokarbonkjeder av ulik lengde.

Interaksjonen mellom analytt og stasjonærfase vil i omvendt-fase-kromatografi hovedsakelig bestå av van der Waalske krefter og dispersjonskrefter. Polare analytter vil først og fremst ha affinitet til mobilfasen og gå raskt gjennom kolonnen med lite eller ingen retensjon, mens mer hydrofobe stoffer vil interagere med stasjonærfasen i økende grad med økende hydrofobisitet, og dermed bli retardert ulikt. Siden mange molekyler har en viss grad av hydrofob karakter, og dermed muligheten for å danne slike interaksjoner, kan omvendt-fase-kromatografi brukes til å gi god separasjon av en rekke analytter. Peptider er gjerne store og har en betydelig andel av hydrofobe bestanddeler i aminosyresekvensen, noe som gjør omvendt-fase-kromatografi til en godt egnet teknikk i peptidanalyse.

Mobilfasens og stasjonærfasens polaritet vil påvirke retensjonen gjennom kolonnen. Økende grad av organisk modifikator i mobilfasen vil gjøre denne mer hydrofob og redusere retensjonen av analytter. Ofte utnyttes dette prinsippet ved at man øker mengden organisk modifikator underveis (gradienteluering), slik at lite hydrofobe analytter blir tilstrekkelig retardert med lav mengde organisk modifikator, mens sterkt hydrofobe analytter kommer tidligere i kromatogrammet enn de ellers ville gjort, noe som gjør at man unngår lang analysetid og brede signaltopper.

Graden av hydrofobisitet av stasjonærfasen påvirkes av de aktive gruppene. En reduksjon i lengden på hydrokarbonkjedene vil gi mindre område for analytter å binde seg, og dermed lavere hydrofobisitet i stasjonærfasen og mindre retensjon av hydrofobe analytter.

#### 4.4.2 Massespektroskopi

Masseanalysatorer detekterer ioner basert på forholdet mellom masse ( $m$ ) og ladning ( $z$ ),  $m/z$ . Instrumentet består gjerne av tre hoveddeler: en ionekilde, en masseanalysator og en detektor. I tillegg kommer vakuumpumper og fokuseringselementer som sikrer at analyttene er til stede under vakuum og at de blir transportert gjennom instrumentet.

En masseanalysator er avhengig av at analytten er på ionisk form for å kunne gi deteksjon, samt at analytten er til stede under vakuum. For å oppnå dette trenger man teknikker for å få analytten ionisert og over i gassfase, og senere over i vakuuet i masseanalysatoren. Det finnes flere muligheter for å utføre denne prosessen når væskechromatografi er brukt som separasjonsprinsipp, hvorav elektroprayionisasjon (ESI) og atmosfærisk trykk kjemisk ionisasjon (APCI) er de mest vanlige[61]. I denne oppgaven var det ESI som ble benyttet, og kun denne vil bli beskrevet her.

Etter ionekilden blir analyttene separert i masseanalysatoren utfra forholdet  $m/z$ , enten i et magnetisk eller elektrostatisk felt[56]. Singelkvadrupol og trippelkvadrupol ble brukt som masseanalysatorer i denne oppgaven, og disse blir beskrevet videre nedenfor.

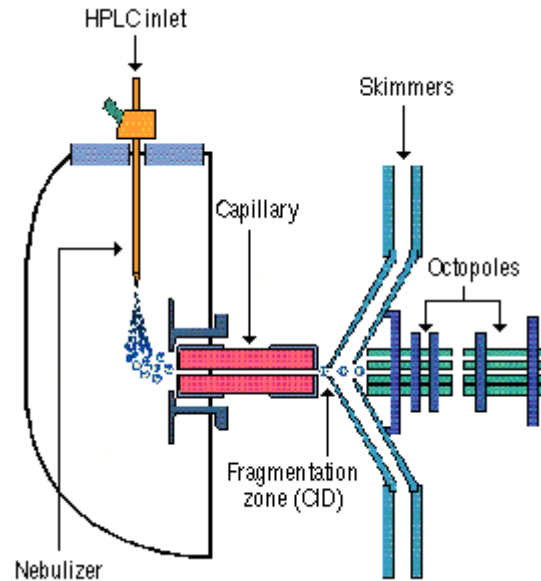
Selve detektoren vil detektere mengden ioner som slipper gjennom masseanalysatoren for hver  $m/z$ -verdi denne er innstilt på. Mengden ioner som treffer detektoren vil gi et signal i form av strøm som så blir målt.

Massespektroskopi gir høy selektivitet og sensitivitet sammenliknet med flere andre metoder, i tillegg til mulighetene for å få relativt detaljert strukturinformasjon gjennom massespektrene. Dette gjør massespektroskopi til en velegnet metode innen mange områder der dette er viktige parametere. Karakterisering av proteiner og peptider, miljøanalyser, farmasøytiske analyser, kliniske analyser, rettsmedisinske og rettstoksikologiske analyser og dopinganalyser er noen av de aktuelle områdene[56, 62, 63].



### *Elektrosprayionisasjon*

ESI som ioniseringsteknikk for MS ble utviklet av Fenn et al. i 1989[64]. Prinsippet er illustrert i Figur 4 og baserer seg på at analyttene blir ført på ladet form med mobilfasen inn i et trangt kapillær, hvor nitrogen gass blir tilført. Nitrogen gassen vil sammen med et elektrisk potensial på 3-5 kV mellom utløpet fra kapillæret og en motelektrode som omgir denne, nebulisere væskestrømmen slik at det dannes små, ladde dråper[65]. Ved hjelp av en tørke gass (oftest nitrogen) vil væsken i disse dråpene gradvis fordampe og pumpes ut av systemet, noe som igjen fører til at dråpestørrelsen minker. Dette vil øke ladningstettheten i dråpene, noe som vil gjøre dråpene ustabile, slik at de deles opp i mindre dråper gjennom en prosess kalt coulomb explosion. Etter hvert som denne prosessen gjentas vil ionene frigjøres fra væskefasen, og ved hjelp av et elektrisk potensial med motsatt polaritet i forhold til ionene, samt linser og skimmere som bidrar til å fokusere ionestrømmen, fraktes over i gradvis høyere vakuum, før det når masseanalysatoren. Polariteten til det elektriske potensialet bestemmes utfra ladningen til analyttene man ønsker å detektere, og man opererer med positive og negative mode ESI, avhengig av om man ønsker deteksjon av henholdsvis positivt eller negativt ladde molekyler. Av disse er positive mode vanligst for peptidanalyser siden positive ladninger ofte favoriserer fragmentering og bedrer kromatografien for peptider[63]. Små peptider med masser rundt 250-2500 Da, som bradykinin og dets metabolitter, vil vanligvis være i en blanding av enkelt, dobbelt eller trippelt ladde ioner, avhengig av antall mulige ladninger og størrelse, mens større peptider normalt vil inneha flere ladninger[63].



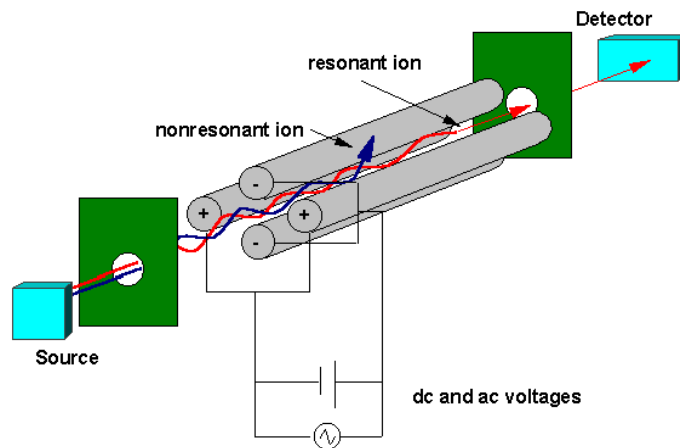
Figur 4: Figuren viser prinsippet for elektrosprayionisasjon.[66]

ESI regnes for å være en mild ionisasjonsteknikk, noe som betyr at prosessen fragmenterer ioner i liten grad. Dette gjør at man som oftest vil detektere enten protonerte eller deprotonerte molekyllioner. Teknikken muliggjør også flere ladninger på et molekyl noe som gjør analyser av store molekyler mulig i massespektrometre med begrenset massedeteksjonsområde[61, 63].

### *Singelkvadrupol*

MS-systemer basert på kvadrupolprinsippet er den mest brukte typen masseanalysator[56]. Prinsippet baserer seg på at man har fire parallelle metallstenger som parvis er koblet sammen med hvert sitt elektriske felt, slik at stengene som sitter ovenfor hverandre har lik feltstyrke. Et elektrisk potensial basert på både likestrøm ( $U$ ) og en varierende vekselstrømkilde ( $V$ ) påføres stengene etter formelen  $U + V \cos \omega t$  for det ene paret og  $-U + V \cos \omega t$  for det andre paret. Ved å variere dette potensialet vil ionene påvirkes på vei gjennom kvadrupolen proporsjonalt med avstanden fra kvadrupolstengene[67]. Et positivt ion vil tiltrekkes av negativt ladde kvadrupolstenger og frastøtes fra de positivt ladde, mens det motsatte vil skje med et negativt ion. Små ioner vil være lett påvirkelige av en høy frekvens og høy styrke i

vekselstrømmen, mens større ioner blir mer påvirket av lavere frekvenser. Likestrømpotensialet vil føre til at små ioner blir ytterligere påvirket av frekvensene i vekselstrømmen og kan dermed kollidere med stengene, mens større ioner ikke blir påvirket av denne frekvensen i samme grad, og blir sentrert mellom elektrodene, noe som utgjør et såkalt high-pass massefilter. Store ioners lave påvirkning fra vekselstrømpotensialet fører til at disse derimot lett kan påvirkes av likestrømpotensialet og kollidere med kvadrupolstengene som mindre ioner vil kunne passere, og man har dermed et såkalt low-pass massefilter. Dette fører til at kun ioner i et bestemt  $m/z$ -område vil oppnå en stabil oscillering gjennom kvadrupolen og vil dermed slippe gjennom til detektoren, avhengig av frekvensen til de elektriske feltene ( $\omega$ ) og ratioen mellom styrken på vekselstrøm- og likestrømfeltet ( $V/U$ )(se Figur 5)[67].



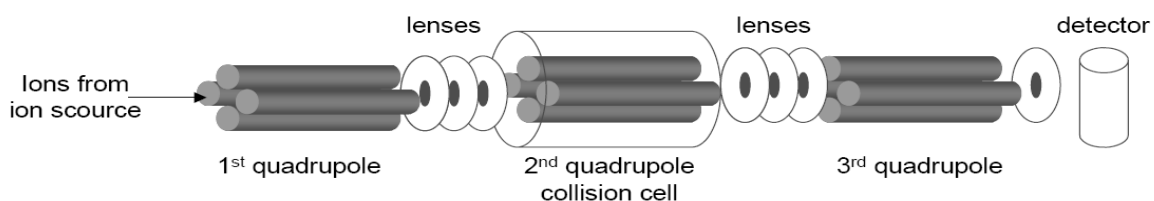
Figur 5: Figuren viser en enkel oversikt over kvadrupolprinsippet med banen for et resonant og ikke-resonant ion gjennom kvadrupolen.[68]

Kvadrupolen kan stilles inn til å stadig variere hvilke masser den slipper gjennom, over et definert område (scan mode). Denne metoden gir mye strukturinformasjon og man vil kunne se den fulle bestanddelen av det som kommer inn i masseanalysatoren, men dette vil gå på bekostning av følsomheten. En annen metode er å se på en enkelt

eller noen få enkeltmasser, såkalt SIM-mode (Selected Ion Monitoring). Kvadrupolen vil dermed kun slippe gjennom de utvalgte massene, noe som vil øke følsomheten til instrumentet betydelig og muliggjøre deteksjon av analytter med lavere konsentrasjon enn det som kan detekteres ved scan-mode.

### *Trippelkvadrupol*

En trippelkvadrupol baserer seg på de samme prinsippene som en singelkvadrupol for å slippe ioner gjennom masseanalysatoren til deteksjon. Forskjellen ligger i at man her har koblet tre kvadrupoler sammen i en rekke, hvor den andre kvadrupolen fungerer som en kollisjonscelle (se Figur 6). Man får dermed først en utvelgelse av ioner i første kvadrupol (første MS-trinn), deretter kollisjon og fragmentering i andre kvadrupol, etterfulgt av en tredje kvadrupol som foretar en ny utvelgelse av ioner (andre MS-trinn). Den andre kvadrupolen vil her kun ha et vekselstrømpotensial som frakter ionene mellom første og tredje kvadrupol[63, 67]. Denne kvadrupolen vil kunne fylles med en nøytral kollisjons-gass som fører til fragmentering av ionene som slipper gjennom første kvadrupol via kollisjonsindusert fragmentering (CID). Den tredje kvadrupolen vil dermed måle  $m/z$ -verdiene til fragmentene av ionene som ble selektert ut av første kvadrupol. Dette muliggjør analyser som kan gi betydelig mer strukturinformasjon og høyere sensitivitet enn ved bruk av et singelkvadrupolinstrument.



*Figur 6: Figuren viser en enkel skisse over prinsippet i en trippelkvadrupol.[69]*

Ved å variere bruken av SIM- og scan-mode på de to analyserende kvadrupolene kan man oppnå en rekke ulike metoder for deteksjon av analytter. I denne oppgaven ble

metodene product ion scan og single/multiple reaction monitoring (SRM/MRM) brukt og kun disse vil bli beskrevet her.

Product ion scan, også kalt daughter ion scan, baserer seg på at første kvadrupol kun slipper gjennom utvalgte  $m/z$ -verdier man ønsker å fragmentere. Disse massene blir deretter fragmentert i andre kvadrupol og fragmentspekteret blir detektert av tredje kvadrupol som er innstilt på scan-mode. Dette gjør at man kan se fragmenteringsspekteret til de valgte ionene.

SRM/MRM baserer seg på at både første og siste kvadrupol er innstilt på å kun slippe gjennom utvalgte  $m/z$ -verdier. Man velger dermed å fragmentere bestemte ioner og deretter analysere kun et eller flere valgte fragmenter. Denne metoden vil være svært selektiv overfor de analyttene man ønsker å analysere og sensitiviteten vil være høy, men man mister mye strukturinformasjon.

### *Kollisjonsindusert fragmentering (CID) av peptider*

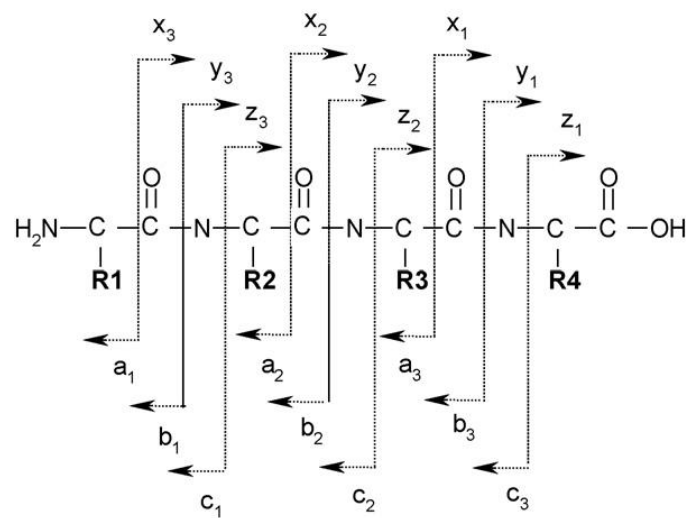
Massespektrometere basert på ionefelle eller tandem-MS prinsippet, dvs. to masseanalytatorer koblet sammen med en kollisjonscelle mellom, har den fordelen at de kan fragmentere ioner og måle  $m/z$ -verdiene til fragmentationene.

Trippelkvadrupolen som nevnt ovenfor, er et eksempel på en type tandem-MS der dette kan utnyttes. Prosessen foregår ved at ioner kolliderer med gassatomer fra en inert gass og blir tilført kinetisk energi som fører til fragmentering[63].

Fragmenteringen kan gi økt informasjon om strukturen til analyttene[70], og man kan også dra nytte av den økte sensitiviteten man får ved å velge ut ett eller flere fragmenter fra et bestemt ion og analysere på disse (SRM/MRM), noe som vil gi en effektiv fjerning av eventuell interferens fra andre stoffer[71].

Flere former for fragmentering av peptider kan oppstå, hvorav den vanligste skjer ved peptidbindingene mellom aminosyrene i peptidkjeden, og vil føre til at man sitter igjen med et N-terminal fragment og et C-terminal fragment, kalt hhv. b- og y-ion[63, 71]. Disse fragmentene som dannes får navn etter hvordan binding som brytes, samt om det er N- eller C-terminalfragmentet. De vanligste fragmentationene ved N-

terminalen får navn  $a_n$ ,  $b_n$ , og  $c_n$ , mens de korresponderende C-terminalfragmentene får navn  $x_n$ ,  $y_n$ ,  $z_n$  (se Figur 7)[70, 72]. For at fragmentene skal detekteres er de også avhengig av at de beholder minst en ladning på molekylet[63]. Ved å bruke høyere kollisjonsenergi kan man få dannet større grad av fragmentering, og andre typer fragmentering, blant annet brudd i bindingene til sidekjedene og interne fragmenter fra doble brudd[63, 70, 71]. Typen brudd og fragmentene som dannes er avhengig av flere faktorer, hvorav størrelsen på peptidet, ladningsfordelingen, typen sidekjedene og posisjonen av disse, spiller en stor rolle[63, 70, 72].



Figur 7: Figuren viser vanlige fragmenteringsmønstre av peptider etter CID fragmentering og nomenklaturen til de gjenværende fragmentene. [71]

## 5. Materialer og metode

### 5.1 Utstyr, kjemikalier og peptider

Følgende tabeller viser en oversikt over peptider (Tabell 1), kjemikalier (Tabell 2) og utstyr (Tabell 3) brukt under arbeidet med denne oppgaven.

Tabell 1: Peptider brukt under arbeidet med oppgaven.

<i>Peptid</i>	<i>Leverandør</i>
Bradykinin 1-5	Bachem AG, Bubendorf, Sveits
Bradykinin 1-6	Bachem AG, Bubendorf, Sveits
Icatibant (30 mg/mL)	Jerini AG, Berlin, Tyskland

Tabell 2: Kjemikalier brukt under arbeidet med oppgaven.

<i>Kjemikalie</i>	<i>Kvalitet</i>	<i>Leverandør</i>
Metanol, CH <sub>3</sub> OH	HPLC-kvalitet (gradient grade)	VWK international, Leuven, Belgia
Eddiksyre, CH <sub>3</sub> COOH	100 %, analysekvalitet	Prolabo, Paris, Frankrike
Maursyre, HCOOH	>98 %, analysekvalitet	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Acetonitril, CH <sub>3</sub> CN	LC-MS kvalitet	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Vann	LC-MS kvalitet	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Trifluoreddiksyre	≥98 %, reagent grade	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, USA
Saltsyre, HCl	37 %, analysekvalitet	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH, Etanol	96 %	Arcus, Oslo, Norge
Dekstransulfat (natriumsalt)		Merck eurolab, Briare le Canal, Frankrike
EDTA · 2H <sub>2</sub> O (dinatriumsalt)		Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sverige

Tabell 3: Utstyr brukt under arbeidet med oppgaven.

<i>LC-MS</i>	<i>Type</i>	<i>Leverandør</i>
<b>Pumper</b>	2x LC-10AD vp	Shimadzu, Kyoto, Japan
<b>Degasser</b>	DGU-14A	Shimadzu, Kyoto, Japan
<b>Autosampler</b>	SIL-10AD vp	Shimadzu, Kyoto, Japan
<b>Detektor</b>	LC-MS-2010A	Shimadzu, Kyoto, Japan
<b>Software</b>	LCMS solution v. 2.04	Shimadzu, Kyoto, Japan
<b>Kolonne</b>	Biobasic C8 50x1 mm, 5µm i.d.	Thermo scientific, Rockford, IL, USA
<b>Systemkontrollenhet</b>	SCL-10AVP	Shimadzu, Kyoto, Japan
<i>LC-MS/MS</i>		
<b>Pumpe</b>	LPG-3400M	Dionex corp. Sunnyvale, CA, USA
<b>Degasser</b>	SR-3000	Dionex corp. Sunnyvale, CA, USA
<b>Autosampler</b>	WPS-3000TRS	Dionex corp. Sunnyvale, CA, USA
<b>Detektor</b>	TSQ Quantum Access	Thermo scientific, Rockford, IL, USA
<b>Software</b>	Chromeleon v. 6.80 SR6	Dionex corp. Sunnyvale, CA, USA
	Xcalibur v. 2.0.7 SP1	Thermo scientific, Rockford, IL, USA
<b>Kolonne</b>	Biobasic C8 50x1 mm, 5 µm i.d.	Thermo scientific, Rockford, IL, USA
<i>Annet utstyr</i>		
<b>Inndampningsenhet</b>	Reacti-therm III	Pierce, Rockford, IL, USA
<b>Vakuumanifold</b>	N/A	Supelco analytical, Bellefonte, PA, USA
	AASP VAC-ELUT	Analytichem international inc., Harbor City, CA, USA
<b>Vakuumpumpe</b>	N/A	Nerliens Kemisk-Tekniske aktieselskap, Oslo, Norge
<b>SPE-kolonner</b>	Bond-elut C18, 100 mg, 1 mL	Varian inc. Palo Alto, CA, USA
	Resprep C18, 100 mg, 1 mL	Restek, Bellefonte, PA, USA
<b>Automatpipetter</b>	Finnpipette®	Thermo electron corp. Cheshire, UK
		Labsystems, Helsinki, Finland
<b>Vialer</b>	Protein LoBind tube 1,5 mL	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland
	Plastibrand® 1,5 mL	Brand GMBH, Wertheim, Tyskland



---

<b>Ultralydbad</b>	Ultrasonic Cleaner	VWR international, Leuven, Belgia
<b>Sentrifuge</b>	Centrifuge 5804	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland
<b>Vortex-mixer</b>	Vibrofix VF1 electronic IKA <sup>®</sup> MS3 digital	Janke&Kunkel IKA-Werk, Staufen, Tyskland IKA Works inc., Wilmington, NC, USA
<b>Pipettespisser</b>	Finntip <sup>®</sup>	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
<b>Vannrenseanlegg</b>	Easypure UV	Barnstead, Dubuque, IA, USA
<b>Vekt</b>	XS 205 dualrange	Mettler-Toledo, Oslo, Norge
<b>Blodprøverør</b>	Vacurette <sup>®</sup> 9 mL	Greiner labortechnik GMBH, Kremsmuenster, Østerrike

---

## 5.2 Tillaging av løsninger

### 5.2.1 Peptidløsninger

BK1-5 stamløsning på 1 mg/mL ble laget ved å veie inn 0,50 mg av peptidet og løse dette i 0,50 mL ionebyttet vann i LoBind eppendorfrør.

BK1-6 stamløsning på 1 mg/mL ble laget ved å veie inn 0,25 mg av peptidet og løse dette i 0,25 mL ionebyttet vann i LoBind eppendorfrør.

Ønskede konsentrasjoner av peptidene og eventuelle blandinger av peptidene ble laget ved å videre fortynne stamløsningene i ionebyttet vann til nye konsentrasjoner og blande ulike fortynninger med hverandre til riktig blandingsforhold.

Alle peptidløsningene ble fryst ned og lagret ved -32 °C, kun tint opp ved behov og fryst ned igjen like etter bruk.

## 5.2.2 Løsninger til bruk under fast-fase-ekstraksjon

### *Vaskeløsninger*

20 mM mausyreøsning ble laget ved å tilsette 755  $\mu\text{L}$  100 % mausyre til 1 L ionebyttet vann.

0,1 % TFA-løsning ble laget ved å løse en 1 mL ampulle med 100 % TFA i 9 mL ionebyttet vann, noe som gir en 10 % løsning. Deretter ble 1 mL av denne fortynnet i 99 mL ionebyttet vann. Løsningene ble oppbevart i kjøleskap og brukt i inntil en uke grunnet dårlig holdbarhet.

0,1 %  $\text{CH}_3\text{COOH}$ -løsning ble laget ved å løse 0,1 mL 100 %  $\text{CH}_3\text{COOH}$  til 99 mL ionebyttet vann.

### Elueringsløsninger

Tabell 4 viser tillagingen av ulike elueringsløsninger brukt under arbeidet med denne oppgaven.

Tabell 4: Ulike elueringsløsninger og tillagingen av disse.

<i>Blanding</i>	<i>Blandingsforhold</i>	<i>Tillaging</i>
<b>0,1 % TFA : MeOH</b>	80:20 (v/v)	8 mL 0,1 % TFA ble blandet med 2 mL MeOH
<b>0,1 % TFA : MeOH</b>	70:30 (v/v)	7 mL 0,1 % TFA ble blandet med 3 mL MeOH
<b>0,1 % TFA : MeOH</b>	60:40 (v/v)	6 mL 0,1 % TFA ble blandet med 4 mL MeOH
<b>0,1 % TFA : MeOH</b>	50:50 (v/v)	5 mL 0,1 % TFA ble blandet med 5 mL MeOH
<b>0,1 % TFA : MeOH</b>	40:60 (v/v)	4 mL 0,1 % TFA ble blandet med 6 mL MeOH
<b>0,1 % TFA : ACN</b>	90:10 (v/v)	9 mL 0,1 % TFA ble blandet med 1 mL ACN
<b>0,1 % TFA : ACN</b>	80:20 (v/v)	8 mL 0,1 % TFA ble blandet med 2 mL ACN
<b>0,1 % TFA : ACN</b>	70:30 (v/v)	7 mL 0,1 % TFA ble blandet med 3 mL ACN
<b>0,1 % TFA : ACN</b>	60:40 (v/v)	6 mL 0,1 % TFA ble blandet med 4 mL ACN
<b>0,1 % TFA : ACN</b>	50:50 (v/v)	5 mL 0,1 % TFA ble blandet med 5 mL ACN
<b>20 mM HCOOH : MeOH</b>	80:20 (v/v)	8 mL 20 mM HCOOH ble blandet med 2 mL MeOH
<b>20 mM HCOOH : MeOH</b>	70:30 (v/v)	7 mL 20 mM HCOOH ble blandet med 3 mL MeOH
<b>20 mM HCOOH : MeOH</b>	60:40 (v/v)	6 mL 20 mM HCOOH ble blandet med 4 mL MeOH
<b>20 mM HCOOH : MeOH</b>	50:50 (v/v)	5 mL 20 mM HCOOH ble blandet med 5 mL MeOH
<b>20 mM HCOOH : MeOH</b>	40:60 (v/v)	4 mL 20 mM HCOOH ble blandet med 6 mL MeOH
<b>20 mM HCOOH : ACN</b>	90:10 (v/v)	9 mL 20 mM HCOOH ble blandet med 1 mL ACN
<b>20 mM HCOOH : ACN</b>	80:20 (v/v)	8 mL 20 mM HCOOH ble blandet med 2 mL ACN
<b>20 mM HCOOH : ACN</b>	70:30 (v/v)	7 mL 20 mM HCOOH ble blandet med 3 mL ACN
<b>20 mM HCOOH : ACN</b>	60:40 (v/v)	6 mL 20 mM HCOOH ble blandet med 4 mL ACN
<b>20 mM HCOOH : ACN</b>	50:50 (v/v)	5 mL 20 mM HCOOH ble blandet med 5 mL ACN

### 5.2.3 Mobilfaser

Mobilfase A består av 20 mM HCOOH og MeOH i forholdet 95:5 (v/v). Mobilfase B har tilsvarende sammensetning i forholdet 5:95 (v/v).

20 mM HCOOH ble laget ved å løse 755  $\mu$ L 100 % HCOOH i 1 L ionebyttet vann.

Mobilfase A ble laget ved å blande 25 mL MeOH med 475 mL 20 mM HCOOH.

Mobilfase B ble laget ved å blande 475 mL MeOH med 25 mL 20 mM HCOOH.

Begge mobilfasene ble satt på ultralydbad etter tillaging for å fjerne eventuell luft fra blandingen.

#### **5.2.4 Løsninger brukt under in-vitro forsøk av bradykinindannelse**

Dekstransulfatløsning ble laget ved å løse 5,0 mg dekstransulfat i 1,0 mL destillert vann til en konsentrasjon på 5 mg/mL.

EDTA-løsning ble laget ved å løse 58,5 mg EDTA i 1,0 mL destillert vann til en konsentrasjon på 200 mM.

### **5.3 Prøveopparbeidelse**

#### **5.3.1 Prøvetaking, proteinfelling og inaktivering av blod**

Prøvetakingen foregår på Rikshospitalet i Oslo på griser involvert i icatibantstudien (se vedlegg 5). Totalt to prøver med arterielt blod blir tatt fra hver gris, første ved T-Basis (før noen inngrep er gjort), andre ved T240 (fire timer etter inngrep med bakteriell infusjon). Fra noen av grisene blir det også hentet ut ekstra prøver for å ha som kontroll.

Metoden for denaturering av kallikrein og kininaser i blod, beskrevet nedenfor, for å hindre degradering og nydanning av bradykinin etter at prøven er tatt, er hentet fra tidligere arbeid gjort av Murphey et al. i 2001[2]. Dette blir foretatt rett etter prøvetakning på Rikshospitalet i Oslo, av personell der (se vedlegg 1 for en oversikt over prøvene).

1. 50 mL Corning-rør fylles med 15 mL 96 % etanol

2. Rørene surres med parafilm og plasseres i fryser på -20 °C.
3. Rørene settes på is rett før prøvetaking
4. 5 mL arterielt blod trekkes ut med sprøyte og overføres umiddelbart til den kalde etanolen, blandes og settes på is
5. Røret puttes i en pose med is og står i 1 time
6. Prøven sentrifugeres kaldt ved 1500 rpm i 25 min
7. Supernatanten avpippeteres og rundt 16 mL overføres til 2 Corning-rør på 15 mL
8. Prøvene fryses ved -70 °C og sendes til Farmasøytisk institutt for videre analyser

### 5.3.2 Fast-fase-ekstraksjon

For å ytterligere rense opp den etanoliske supernatanten som gjenstår fra blodprøvene, benyttes SPE med en C18 SPE-kolonne. Den endelige prosedyren er som følger:

1. 10 µL 1 µg/mL (tilsvarer 10 ng) BK1-6 (intern standard) tilsettes 4 mL av den etanoliske supernatanten (10 µL 10 µg/mL (tilsvarer 100 ng) BK1-6 tilsettes prøvene fra gris for å minimere bidraget fra en koeluerende forurensning)
2. 4 mL etanolisk supernatant med intern standard dampes inn til tørrhet under nitrogen ved 60 °C
3. Prøven reløses i 3 mL 20 mM HCOOH-løsning
4. Hele prøveløsningsvolumet påsettes en Resprep C18 SPE-kolonne med 100 mg pakkemateriale og volum på 1 mL, kondisjonert med først 1 mL metanol og deretter 1 mL 20 mM HCOOH
5. Kolonnen vaskes med 3 mL 20 mM HCOOH

6. Analytten elueres ut med 1 mL 50 % MeOH : 50 % 20 mM HCOOH
7. Eluatet dampes inn til tørrhet under nitrogen ved 60 °C
8. Prøven reløses i 50 µL mobilfase A

### *Forsøk med ulik type syre i vaske- og elueringsløsningene*

Ulike syrekomponenter som 0,1 % TFA og 20 mM HCOOH ble testet i vaske- og elueringsløsningene i trinn 3-6 i prosedyren ovenfor, for å se hva som var best egnet i den endelige prosedyren. Testene hadde som formål å gi høyt utbytte, samt så rene kromatogrammer som mulig. Forsøkene ble utført på standardløsninger av BK1-5 og BK1-6 i vann på hhv. 20 ng/mL og 200 ng/mL.

### *Forsøk med ulik type og mengde organisk modifikator*

For å teste andelen organisk modifikator i elueringsløsningen som var best egnet for å oppnå god eluering av BK1-5 og BK1-6, ble forsøk gjort med ACN og MeOH, i ulike mengde, i kombinasjon med både 0,1 % TFA og 20 mM HCOOH, på BK1-5 og BK1-6 standardløsninger i ionebyttet vann, med konsentrasjoner på hhv. 20 ng/mL og 200 ng/mL. To paralleller ble gjort for hver type elueringsmiddel.

Med ACN som organisk modifikator ble andelen 10 %, 20 %, 30 %, 40 % og 50 % ACN i kombinasjon med både 20 mM HCOOH og 0,1 % TFA testet.

Med MeOH som organisk modifikator ble andelen 20 %, 30 %, 40 %, 50 % og 60 % MeOH i kombinasjon med både 20 mM HCOOH og 0,1 % TFA testet.

### *Forsøk med ulike mengder prøvepåsettelses- og vaskevolum*

Den nødvendige mengden vask- og prøvepåsettelsesvolum, og dettes betydning for graden av forurensninger i prøven, samt utbytte av BK1-5 og BK1-6, ble testet på humant heparinisert fullblod, først opparbeidet etter metoden i 5.3.1, spiket med BK1-5 og BK1-6, med konsentrasjoner på hhv. 20 ng/mL og 200 ng/mL i ionebyttet vann. Prosedyren ble her foretatt på fire forskjellige måter som vist i tabell 5, med et

varierende vaskevolum og volum som tørrstoffet i punkt 3 i prosedyren ble reløst i. Alle prøvene ble foretatt med to paralleller av hver.

*Tabell 5: Tabellen viser de ulike variasjonene i vask- og prøvepåsettelsesvolum som ble testet.*

<i>Forsøk</i>	<i>Vaskevolum</i>	<i>Prøvepåsettelsesvolum</i>
1	1 mL	1 mL
2	1 mL	3 mL
3	3 mL	1 mL
4	3 mL	3 mL

### *Forsøk med ulike mengder elueringsvolum*

Mengden elueringsvolum som var nødvendig for å oppnå tilstrekkelig eluering ble testet med fokus på å få mest mulig utbytte av BK1-5 og BK1-6 ved bruk av minst mulig volum. Ulike forsøk ble foretatt over to forskjellige dager, hvorav fraksjoner på 1 mL ble tatt ut av et totalt elueringsvolum på 5 mL første dagen, slik at man kunne se hvor mye BK1-5 og BK1-6 som ble eluert ut for hver fraksjon. Dette ble i neste omgang innsnevret til totalt fire fraksjoner på 0,5 mL med et totalt elueringsvolum på 2 mL for å finne det optimale elueringsvolumet. To paralleller ble utført for alle forsøkene, og stamløsninger av BK1-5 og BK1-6 i ionebyttet vann med konsentrasjoner på hhv. 20 ng/mL og 200 ng/mL ble brukt.

## 5.4 Analyse

### 5.4.1 LC-MS oppsett og metode

Følgende tabeller (Tabell 6-8) viser parametre for oppsettet av LC-MS-systemet for metoden brukt i denne oppgaven.

Tabell 6: Kromatografiske parametere for LC-MS-metoden.

<i>Kromatografiske parametere</i>	
<b>Mobilfase A</b>	5 % MeOH, 95 % 20 mM HCOOH
<b>Mobilfase B</b>	95 % MeOH, 5 % 20 mM HCOOH
<b>Kolonne</b>	BioBasic C8 50x1 mm 5 µm
<b>Injeksjonsvolum</b>	20 µL
<b>Flow</b>	50 µL/min

Tabell 7: Gradient brukt i LC-MS-metoden.

<i>Gradient</i>	
<b>0 min</b>	0 % mobilfase B
<b>0-10 min</b>	0-55 % mobilfase B
<b>10-12 min</b>	55 % mobilfase B
<b>12-13 min</b>	55-0 % mobilfase B
<b>13-20 min</b>	0 % mobilfase B (rekondisjonering)

Tabell 8: MS-parametere for LC-MS-metoden.

<i>MS-parametere (singelkvadrupol)</i>	
<b>Ionisering</b>	ESI positive mode
<b>Nebulisatorgass</b>	Nitrogen (N <sub>2</sub> )
<b>Hastighet på nebulisatorgass</b>	1,5 L/min
<b>Tørkegass</b>	Nitrogen (N <sub>2</sub> )
<b>Hastighet på tørkegass</b>	10-20 L/min
<b>Blokktemperatur</b>	200 °C
<b>Kapillærtemperatur</b>	225 °C
<b>Kildespenning</b>	4,5 kV
<b>Kapillærspenning</b>	15 V
<b>Scanintervall</b>	1,0 sek
<b>m/z i SIM-mode</b>	287
	331



Både mobilfasen og kolonnen brukt i denne oppgaven har vært mye brukt på laboratoriet på avdelingen for legemiddelanalyse i forbindelse med peptidanalyser, og ble dermed også brukt som utgangspunkt i denne metoden. Gradienten er laget etter den som er brukt av Murphey et al. i lignende forsøk[2], men med visse forandringer grunnet bruk av MeOH i stedet for ACN. De ulike  $m/z$ -verdiene som det er aktuelt å analysere på ble fastsatt ved hjelp av en analyse av BK1-5 og BK1-6 standarder i scan-mode, og  $m/z$  287 for BK1-5 og 331 for BK1-6 ble deretter implementert i et SIM-program for videre analyser.

### *Optimalisering av LC-MS-metoden*

For å optimalisere LC-MS metoden ble to ulike mobilfaser testet i forhold til signalintensitet for de aktuelle  $m/z$ -verdiene. Dette ble gjort ved hjelp av analyser av enkle linearitetskurver med fire punkter (500 pg/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mL og 10 ng/mL) og to paralleller av hver for BK1-5, ved bruk av mobilfaser bestående av 20 mM maursyre som syrekomponent i den ene typen og 0,1 % eddiksyre i den andre. BK1-6 ble ikke testet på denne måten siden denne kun skal ha en fast konsentrasjon i alle prøvene, men noen få ulike konsentrasjoner av BK1-6 sammen med BK1-5 ble testet for å finne en egnet tilsetningsmengde. Begge mobilfasetyperne hadde MeOH som organisk komponent, og forholdet mellom organisk og vandig løsemiddel var på 5:95 for mobilfase A og 95:5 for mobilfase B i begge typene.

### **5.4.2 LC-MS/MS oppsett og metode**

Følgende tabeller (Tabell 9-11) viser parametre for oppsettet av LC-MS/MS-systemet for den endelige metoden brukt i denne oppgaven.

Tabell 9: Kromatografiske parametere for LC-MS/MS-metoden.

<i>Kromatografiske parametere</i>	
<b>Mobilfase A</b>	5 % MeOH, 95 % 20 mM HCOOH
<b>Mobilfase B</b>	95 % MeOH, 5 % 20 mM HCOOH
<b>Kolonne</b>	BioBasic C8 50x1 mm 5 µm
<b>Injeksjonsvolum</b>	20 µL
<b>Flow</b>	50 µL/min

Tabell 10: Gradient brukt i LC-MS/MS-metoden.

<i>Gradient</i>	
<b>0 min</b>	0 % mobilfase B
<b>0-12 min</b>	0-65 % mobilfase B
<b>12-15 min</b>	65 % mobilfase B
<b>15-15,1 min</b>	65-100 % mobilfase B
<b>15,1-18 min</b>	100 % mobilfase B (vask)
<b>18-18,1 min</b>	100-0 % mobilfase B, ↑flow 100 µL/min
<b>18,1-27 min</b>	0 % mobilfase B, flow 100 µL/min (rekondisjonering)
<b>27-27,1 min</b>	0 % mobilfase B, ↓flow 50 µL/min (rekondisjonering)
<b>27,1-28</b>	0 % mobilfase B (rekondisjonering)

Tabell 11: MS-parametere for LC-MS/MS-metoden.

<b>MS-parametere (trippelkvadrupol)</b>	
<b>Ionisering</b>	ESI positive mode
<b>Kapillærtemperatur</b>	270 °C
<b>Sheath gas</b>	Nitrogen (N <sub>2</sub> )
<b>Sheath gas pressure</b>	10 mTorr
<b>Tørkegass</b>	Nitrogen (N <sub>2</sub> )
<b>Tørkegasshastighet</b>	5-10 L/min
<b>Kildespenning</b>	4 kV
<b>Kollisjonsgass</b>	Argon
<b>Kollisjonsgasstrykk</b>	1,5 mTorr
<b>Scanintervall</b>	1,0 sek
<b>m/z-overganger og tilhørende kollisjonsenergi</b>	287,00 -> 254,05 15 V
	331,00 -> 120,21 30 V
	435,70 -> 132,10 30 V

Det kromatografiske systemet i trippelkvadrupolmetoden er stort sett satt opp på samme måte som for singelkvadrupolmetoden, men med noen justeringer i gradienten, grunnet bruk av en lavtrykksgradientpumpe, påfølgende endringer i dødvolum og observasjon av ustabil retensjonstid med den tidligere gradientmetoden. Gradienten inneholder her også et lengre vaskeprogram siden de biologiske prøvene som ble analysert ved hjelp av dette instrumentet ble antatt å være mer skitne enn standardprøvene analysert på singelkvadrupol.

MS-metoden som er brukt ble laget ved at de aktuelle massene det skulle analyseres for først ble detektert ved hjelp av fullscan, gjennom direkte injeksjon av standarder av BK1-5, BK1-6 og icatibant. Deteksjonsparametrene og kollisjonsenergi ble deretter optimalisert med hensyn på disse peptidene, først ved hjelp av parent ion scan, for å finne fragmenteringsmønsteret, og videre gjennom SRM for de overgangene som viste høyest intensitet. I metoden blir det for BK1-5 analysert for masseovergangen 287,00 -> 254,05 og for BK1-6 331,00 -> 123,21. I tillegg er

overgangen 435,70 -> 132,10 inkludert for icatibant, slik at det skal være mulig å få et signal for dette i de prøvene der legemidlet er gitt (se 5.6.2).

### *Optimalisering av LC-MS/MS-metoden*

Metoden ble testet på humant heparinisert fullblod som har ligget frosset ned og deretter gjennomgått prosedyren under 5.3.1. To av prøvene ble spiket med BK1-5 til to ulike konsentrasjoner (hhv. 0,5 ng/mL blod og 1 ng/mL blod), og en prøve forble uspiket, før de gjennomgikk prøveoppbeidelsen beskrevet under 5.3.2. Dette ble gjort for å teste metoden opp mot en reell matris for å se om den fungerte tilfredsstillende. Kun en parallell av hver prøve ble analysert.

## 5.5 Partiell validering

Validering av en bioanalytisk metode er nødvendig for å vise at metoden er egnet til å utføre de oppgavene den er ment til. Grunnet begrenset mengde av prøvemateriale og begrenset kapasitet på utstyr til prøveoppbeidelse, samt at store deler av metoden brukt i denne oppgaven er basert på tidligere mer eller mindre validerte metoder[1, 2], foretas det her kun en partiell validering på linearitet, repeterbarhet, nøyaktighet, LOD/LOQ og utbytte.

Valideringsprøvene ble alle opparbeidet fra etanolisk supernatant fra totalt 4 griser, tillaget ved Rikshospitalet i Oslo, fra blodprøver hentet ut før noen inngrep var foretatt (T-basis). Prøvene ble først blandet sammen (pooled) for at alle skulle stamme fra samme utgangspunkt, og deretter fordelt på sentrifugerør med 4 mL i hver, før prosedyren for prøveoppbeidelse beskrevet under 5.3.2 ble foretatt.

Oppsettet for validering er laget med utgangspunkt i FDA sin ”Guidance for industry: Bioanalytical Method Validation”[73], men noen nedskjæringer i antall paralleller er gjort grunnet begrenset prøvemateriale. Blankprøver med mobilfase A ble analysert med jevne mellomrom og etter alle prøver med høy mengde BK1-5, for å sikre minimal påvirkning fra carryovereffekt. I tillegg ble flere standardprøver, fordelt

utover analysedagen, analysert for å påse at metoden fungerte som forventet for kjente prøver. Alle prøvene ble analysert ved hjelp av LC-MS/MS-metoden beskrevet under 5.4.2.

### 5.5.1 Linearitet, repeterbarhet og nøyaktighet

Lineariteten beskriver forholdet mellom respons fra instrumentet og mengden analytt i prøven for et utvalg konsentrasjoner over et konsentrasjonsområde. Resultatene måles ved hjelp av en regresjonslinje og regresjonskoeffisienten  $r^2$ , som vil beskrive lineariteten over det aktuelle området. Metoden som er brukt baserer seg på prinsippet for standard tilsetning. Dette er gjort siden det er en viss mulighet for deteksjon av endogent nivå av BK1-5 i prøvene. Ti prøver er analysert over konsentrasjonsområdet 50 pg/mL – 50 ng/mL (se Tabell 12), i tillegg til to nullprøver (tilsatt kun intern standard) og en blankprøve (ren opparbeidet matriks uten intern standard)

Repeterbarhet er en type presisjonsanalyse der det foretas flere analyser under samme betingelser over relativt kort tid. Analysen beskriver hvor nær hverandre de ulike responsmålingene ligger, og bestemmes etter relativt standardavvik (RSD) for repeterbarhetsprøvene for hvert konsentrasjonsnivå. Totalt 15 prøver ble analysert, med fem paralleller av hhv. lav, middels og høy konsentrasjon (se Tabell 12).

Nøyaktighet beskriver avviket fra den sanne verdi for et utvalg konsentrasjoner, og angis som prosentvis avvik i forhold til denne. Verdiene som blir målt i prøvene blir sammenliknet med verdien beregnet utfra linearitetskurven. Dette er ikke en optimal metode å utføre nøyaktighetsanalyser på, men siden det ikke er mulig å teste denne opp mot eksisterende metoder eller foreta en beregning av en sann verdi på andre måter, ble det bestemt å gjøre det på denne måten. Gjennomsnittsverdien av analysene skal ligge innenfor kravene oppført i tabell 12. Totalt 9 prøver ble analysert, bestående av tre paralleller av hhv. lav, middels og høy konsentrasjon (se Tabell 12).

Tabell 12: Oversikt over de ulike valideringsprøvene, med konsentrasjon, antall prøver (*n*) og prøvenes formål beskrevet. Kravene til resultatene står i parentes etter formålet.

<i>Konsentrasjon</i>	<i>n</i>	<i>Formål (Krav)</i>
<b>50 pg/mL</b>	2	Linearitet ( $r^2 > 0,99$ ) Repeterbarhet (20 %)
<b>50 pg/mL</b>	3	Repeterbarhet (20 %) Nøyaktighet (20 %)
<b>250 pg/mL</b>	2	Linearitet ( $r^2 > 0,99$ )
<b>1 ng/mL</b>	2	Linearitet ( $r^2 > 0,99$ ) Repeterbarhet (15 %)
<b>1 ng/mL</b>	3	Repeterbarhet (15 %) Nøyaktighet (15 %)
<b>10 ng/mL</b>	2	Linearitet ( $r^2 > 0,99$ )
<b>50 ng/mL</b>	2	Linearitet ( $r^2 > 0,99$ ) Repeterbarhet (15 %)
<b>50 ng/mL</b>	3	Repeterbarhet (15 %) Nøyaktighet (15 %)

### 5.5.2 LOD/LOQ

Deteksjonsgrensen (LOD) er den laveste konsentrasjonen man med sikkerhet kan detektere i en prøve med analysemetoden, og blir beregnet som  $S/N$  (signal-/støyforhold) = 3.

Kvantifiseringsgrensen (LOQ) er den laveste konsentrasjonen man med sikkerhet kan kvantifisere i en prøve med analysemetoden med akseptabelt presisjonsnivå. LOQ utgjør normalt det laveste punktet i linearitetskurven og skal ha  $S/N = 5$  eller mer, med repeterbarhet og nøyaktighet innenfor 20 %.

LOD/LOQ-beregningene ble foretatt på det laveste konsentrasjonspunktet under valideringsanalysene, her 50 pg/mL, siden dette vil gi mest like forhold som konsentrasjonene ved LOD og LOQ. Støyhøyden i området rundt det forventede området for BK1-5 ble målt og forholdet mellom det gjennomsnittlige signalet for fem BK1-5 analyser og støyhøyden ble beregnet (S/N).

### 5.5.3 Utbytte

Utbytte beskriver forholdet mellom responsen fra en opparbeidet prøve der en kjent mengde analytt er tilsatt og en ren standard. Dette vil gi et mål på effektiviteten til prøveoppbeidelsesprosessen.

Beregningen av utbytte ble gjort ved å sammenlikne nivået på spikede prøver, fratrukket nivået i blankprøver, med standarder i konsentrasjoner som tilsvarer den teoretiske mulige sluttkonsentrasjonen ved maksimalt utbytte. Dette ble beregnet for alle konsentrasjonene i linearitetskurven. Utbytteberegningen ble foretatt opp mot kalibreringsprøvene analysert før analyse av de biologiske prøvene fra gris (se 5.6.2) og er dermed ikke basert på samme datagrunnlag som prøvene nevnt ovenfor.

## 5.6 Biologiske prøver

### 5.6.1 In-vitro forsøk av bradykinindannelse

For å studere dannelsen av BK1-5 i humane blodprøver ble totalt 5 ulike eksperimenter utført, som i teorien bør stimulere eller hemme bradykininfrisetting og påfølgende BK1-5 dannelse i ulik grad. Disse forsøkene ble utført som en test på at metoden fungerte etter forventningene til BK1-5 dannelse i ulike miljøer.

#### *Eksperiment 1:*

5 mL blod ble tilsatt rett i 15 mL iskald etanol med påfølgende henstand i 1 time på is. Dette tilsvarer metoden under 5.3.1.

### *Eksperiment 2:*

5 mL blod ble tilsatt en glassbeholder med påfølgende henstand i 1 time ved romtemperatur slik at blodet koagulerte. Deretter ble 15 mL iskald etanol tilsatt og prøven ble blandet godt. Prøven ble deretter satt på is i 1 time.

### *Eksperiment 3:*

5 mL blod ble tilsatt et sentrifugerør med 50  $\mu$ L 5 mg/mL dekstransulfat (DXS). Dette gir en sluttkonsentrasjon på 50  $\mu$ g/mL DXS. Prøven ble blandet godt og satt i romtemperatur i 1 time. Deretter ble 15 mL iskald etanol tilsatt, med påfølgende henstand på is i 1 time.

### *Eksperiment 4:*

4,5 mL blod ble tilsatt et sentrifugerør med 0,5 mL EDTA (200 mM), noe som gir en sluttkonsentrasjon på 20 mM EDTA. Prøven ble blandet godt og satt i romtemperatur i 1 time. Deretter ble 15 mL iskald etanol tilsatt, med påfølgende henstand på is i 1 time.

### *Eksperiment 5:*

5 mL frosset citratplasma ble tint og tilsatt et sentrifugerør med 50  $\mu$ L DXS (5 mg/mL), noe som gir en sluttkonsentrasjon på 50  $\mu$ g/mL. Prøven ble blandet og satt i romtemperatur i 10 min. Deretter ble 15 mL iskald etanol tilsatt, med påfølgende henstand på is i 1 time.

Alle prøvene ble etter henstand på is sentrifugert kaldt ved 1500 rpm i 25 min, hvorav den etanoliske supernatanten ble avpipettert og fryst ved  $-70$  °C. Prøvene ble deretter opparbeidet og analysert i to paralleller etter metodene beskrevet i 5.3.2 og 5.4.2

## **5.6.2 Analyser av prøver fra gris før og etter sepsis**

Icatibantstudien på Rikshospitalet i Oslo (se vedlegg 5) vurderer legemiddelet icatibant sin effekt på griser injisert med bakterien *Neisseria Meningitidis*, slik at



sepsis induseres. I den forbindelse er det interessant å se på nivået av BK1-5 i disse grisene for å kunne si noe om bradykinins rolle under sepsis. Prøver fra totalt 22 griser ble mottatt fra Rikshospitalet, hvorav 8 hadde fått icatibant. Av disse ble tre ekskludert og en var fra et innledende pilotprosjekt, og de var derfor ikke nødvendig å analysere. Hver gris hadde prøver tatt på to forskjellige tidspunkt, T-basis (før noen inngrep var gjort) og T240 (4 timer etter inngrep). En oversikt over prøvene er vist i vedlegg 1.

To paralleller av hver prøve ble opparbeidet etter prosedyren beskrevet under 5.3.2, bortsett fra at BK1-6 ble tilsatt slik at prøven ble spiket med peptidløsning som inneholdt 100 ng i stedet for 10 ng under punkt 1, som en metode for å minimere effekten av en delvis koeluerende forurensning ved BK1-6 signalet. Prøvene ble deretter analysert etter metoden beskrevet under 5.4.2 (totalt fire prøver fra hver gris, to fra hvert prøvetakningstidspunkt) over en tidsperiode på litt i underkant av 3 døgn i strekk. En kalibreringskurve ble laget rett før de reelle prøvene ble analysert, med fem punkter og to paralleller for hvert punkt, av samme typen som linearitetsanalysen under valideringen (se 5.5.1). En blankprøve ble analysert etter hver fjerde prøve, slik at det mellom hver gris ble kontrollert for eventuell carryover eller andre urenheter. Standardprøver som inneholdt BK1-5 og BK1-6 ble også analysert med jevne mellomrom under hele analysen for å sikre at systemet fungerte som forventet. I tillegg ble det analysert prøver fra to griser (totalt 8 prøver) der intern standard ikke ble tilsatt, for å ha som kontroll.

## 6. Resultater og diskusjon

### 6.1 Innledende forsøk

#### 6.1.1 Valg av intern standard

Bradykinin 1-6 (BK1-6) ble valgt som intern standard, siden denne er relativt lik BK1-5 strukturmessig, med kun en aminosyre ekstra ved C-terminalen. Den ekstra aminosyren er serin, noe som gjør BK1-6 litt mer polart enn BK1-5, til tross for en økende molekylstørrelse, slik at det får noe kortere retensjonstid. Tidligere metabolismestudier på bradykinin har ikke vist noen forekomst av BK1-6 som et produkt i metabolismen hos menneske eller rotte[1] [32, 74], og det er dermed lite trolig at det vil være endogent til stede i blod fra gris. Dette stemmer også overens med de nedbrytningsveiene til bradykinin man kjenner til, der BK1-6 ikke vil være et naturlig mellomprodukt (se 4.2.2). Enkle stabilitetsstudier på BK1-6 i vandig løsning plassert i romtemperatur, viste ingen nevneverdig nedbrytning over en tidsperiode på fire døgn, der det ble sett en signalintensitet for 75 ng/mL BK1-6 på  $23092 \pm 2441$  i referanseprøvene mot  $20896 \pm 883$  i prøvene som hadde stått lagret i romtemperatur. Peptidet antas derfor å være stabilt. Bruk av isotopmerket intern standard eller deutererte forbindelser ble også vurdert, men ville blitt unødvendig dyrt. Derfor fremsto BK1-6 som det beste valget til intern standard.

Testanalyser av BK1-5 og BK1-6 sammen i vandig løsning, viste at peptidene oppfører seg relativt likt (se Figur 11-14 under 6.2.2 og 6.2.4) og gir stabile analytt/intern standard forhold ( $1,90 \pm 0,08$  basert på ni paralleller på en analysedag). På vandige standarder ga en BK1-6 konsentrasjon på 200 ng/mL et relativt høyt og tydelig signal som vil være egnet til bruk som intern standard for hele området det blir testet for i linearitetskurvene (50 pg/mL – 50 ng/mL). Tar man høyde for en 20 ganger oppkonsentrering i prøveopparbeidelsen tilsvarer dette et utgangspunkt på 10

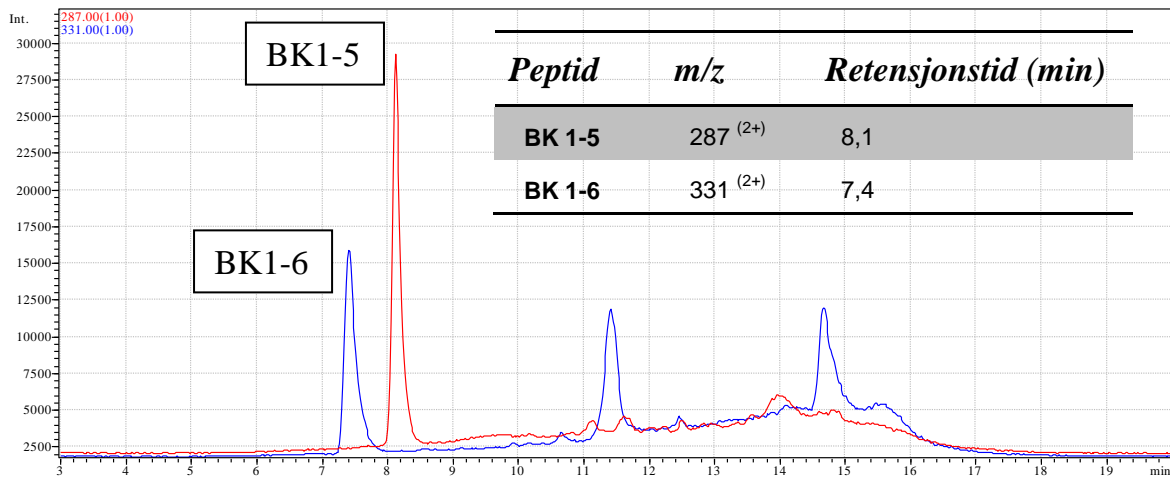
ng/mL blod, dersom det ikke forekommer noe utbyttetap, noe som førte til at dette ble valgt som den egnede mengden å tilsette prøvene.

### 6.1.2 Optimalisering av analysemetoden

Retensjonstidene for BK1-5 og BK1-6 ble målt til hhv. 8,1 og 7,4 minutter i vandig standardløsning og toppene viste god separasjon fra hverandre (se Figur 8).

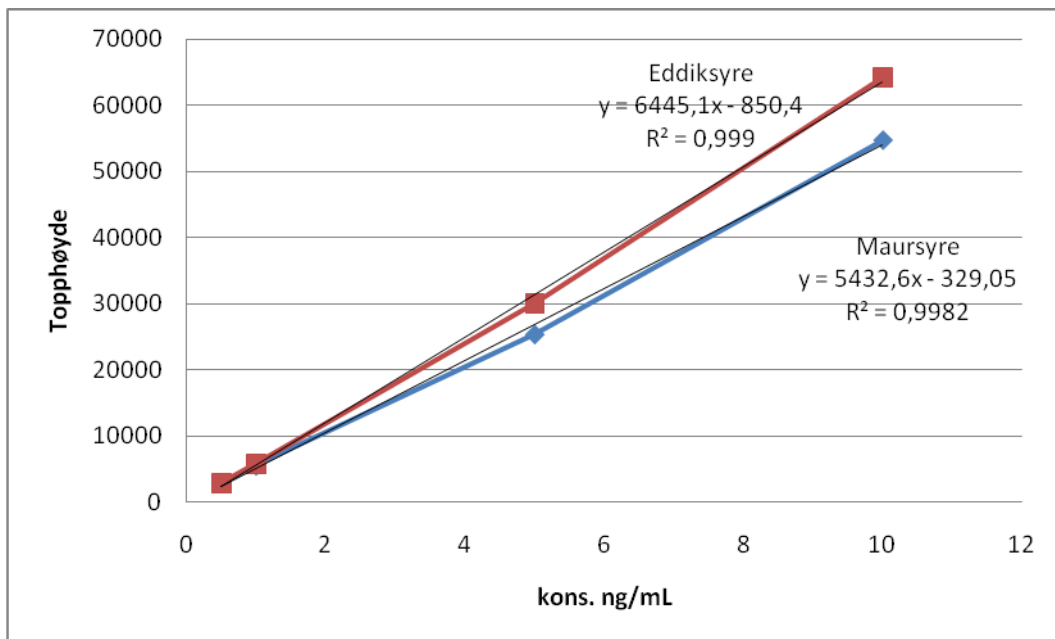
Parametrene for separasjon ble som forklart under 5.4.2 basert på tidligere arbeid fra Murphey et al.[2], med noen mindre justeringer. Grunnet generell mangel på acetonitril i den første fasen av oppgaven, ble den organiske komponenten i mobilfasen endret til metanol, og gradienten noe forandret fra metoden den var basert på, for å kompensere for metanols lavere løsemiddelstyrke. Dette viste seg å separere analyttene godt med akseptabel retensjonstid (se Figur 8). Noen ulike variasjoner av gradienten ble også testet som et forsøk på å separere BK1-5 fra en koeluerende forurensning (se 6.2), men disse variasjonene viste generelt dårligere kromatografi enn den beskrevet under 5.4.1. Derfor ble gradienten som først ble forsøkt (beskrevet i Tabell 7) brukt videre.

Maursyre ble brukt som bufferkomponent for å sikre at peptidene var tilstrekkelig ionisert, slik at de kunne gi en god respons i massespektrometeret. Ved hjelp av noen få analyser, der et fullt scan over det aktuelle masseområdet ble foretatt, kom det frem at  $m/z$  287 for BK1-5 og 331 for BK1-6 var de dominerende verdiene, noe som tilsvarer at begge peptidene hadde to ladninger. Signalet for enladede forbindelser ble kun observert ved svært høye konsentrasjoner og tre ladninger var ikke detekterbart. Disse ble dermed vurdert som uegnet å se etter i en SIM-analyse, og kun én  $m/z$ -verdi ble analysert for hvert peptid (se Figur 8).



Figur 8: Kromatogram over en vandig standard med konsentrasjonen 20 ng/mL BK1-5 og 200 ng/mL BK1-6. Toppene lenger ut i kromatogrammet er forurensninger fra mobilfasekomponentene. Tabellen viser hvilken m/z-verdi det blir analysert på for hvert peptid, antall ladninger på peptidene og retensjonstiden.

Linearitetskurver ble utført med både 0,1 % eddiksyre og 20 mM maursyre i mobilfasen (se s.41 under 5.4.1). I den opprinnelige metoden var 0,1 % eddiksyre brukt, men av praktiske og tidsbesparende hensyn, grunnet utbredt bruk av mobilfase med metanol og 20 mM maursyre på laboratoriet, var det ønskelig å se om 20 mM maursyre ville gi like gode resultater. Analysene viste god linearitet ( $r^2 > 0,99$  for begge kurvene), men eddiksyre ga en noe brattere linearitetskurve og dermed bedre intensitet for BK1-5 (se Figur 9). Maursyre ble likevel valgt som mobilfasekomponent etter at det viste seg at denne separerte BK1-5 fra en koeluerende forurensning introdusert gjennom SPE-prosedyren (se 6.2)



Figur 9: Figuren viser to linearitetskurver og tilhørende  $r^2$ -verdi, en for maursyre og en for eddiksyre i mobilfasen, der topphøyde er plottet mot konsentrasjonen BK1-5 i standardløsningene. Kun en parallell er foretatt for hvert punkt.

## 6.2 Prøveopparbeidelse

Det første leddet i prøveopparbeidelsesprosedyren, for å inaktivere blod (se 5.3.1), er allerede en etablert teknikk beskrevet i flere artikler[1, 2]. I de biologiske prøvene som skal analyseres er dette trinnet allerede gjort på forhånd av personalet på Rikshospitalet, grunnet nødvendigheten av å utføre prosedyren raskt etter prøvetakning, for å hindre nydannelse og videre nedbrytning av bradykinin. Dette trinnet ble dermed ikke testet eller optimalisert noe videre.

Ved bruk av SPE for videre opprensning av prøvematriks er det ønskelig å oppnå en selektiv eluering av de aktuelle analyttene der minimalt med forurensninger er med i det endelige ekstraktet, samtidig som man opprettholder et høyt utbytte av de ønskede komponentene under ekstraksjonen. To aktuelle metoder for SPE på BK1-5 ble funnet i litteraturen, en basert på en kolonne av typen Varian Nexus Absolute[2], mens den andre var en noe enklere prosedyre, egentlig ment for analyser av bradykininmetabolitter i urin, basert på ekstraksjon med en C18 kolonne[1]. C18 gir

---

vanligvis en relativt uspesifikk opprensning av prøvematerialet i motsetning til et mer spesifikt pakkemateriale som i Nexus Abselute, men grunnet et høyt prisnivå på Nexus Abselute og lignende kolonner, ble C18 testet ut i begynnelsen basert på metoden nevnt ovenfor.

De innledende forsøkene på vandige standarder av BK1-5 og BK1-6 viste et relativt høyt utbytte av begge stoffene ( $73 \pm 15$  % for BK1-5,  $91 \pm 14$  % for BK1-6,  $n=5$ ), noe som tydet på at egnetheten til C18 som SPE-materiale virket god.

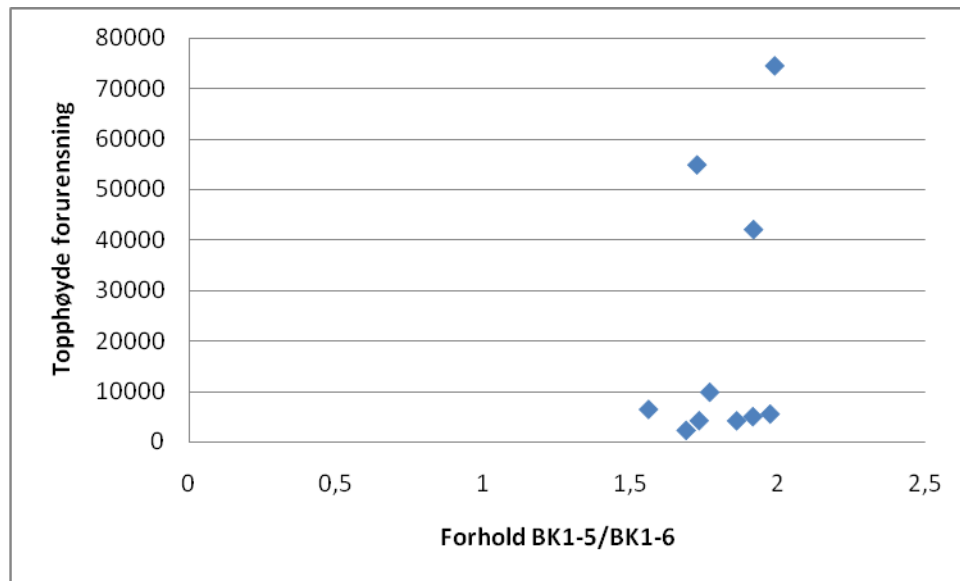
En utfordring som oppstod under innføringen av SPE var en relativt høy grad av forurensninger som ble introdusert i de vandige standardprøvene, etter at disse hadde gjennomgått prosedyren. Den ene av disse forurensningene hadde samme  $m/z$ -verdi som, og koeluerte med BK1-5, i tillegg til å vise betydelige forskjeller i intensitet fra en analyse til neste, noe som ga svært varierende topphøyder. Tabell 13 viser en rekke kilder som ble testet for å finne ut hvor denne forurensningen kom fra, samt om forurensningen kunne observeres i resultatene fra disse testanalysene.

Tabell 13: Tabellen viser kildene som ble undersøkt etter mistanke om at de kunne introdusere en forurensning til prøvene, samt om forurensningen kunne observeres i resultatene av testanalysene.

<b>Testet:</b>	<b>Synlig forurensning:</b>
<b>Inndampningsutstyr</b>	Nei
<b>Kjemikaliene som er brukt i prosedyren</b>	Nei
<b>Analyse av hver fraksjon i SPE-prosedyren</b>	Ja, i alle
<b>Forskjellige typer SPE-kolonne:</b>	
- Resprep C18	Ja
- Varian bond elut C18	Ja
- Varian bond elut reservoir (uten pakkemateriale)	Ja
<b>Ulike typer vakuummanifold</b>	
- Supelco (ukjent merke, gammel modell)	Ja
- Analytichem AASP VAC-ELUT	Ja
<b>Vakuummanifolden med kun de mest nødvendige delene på</b>	Ja
<b>Ulike syrekomponenter i kontakt med SPE-kolonnematerialet (i 5 min):</b>	
- 10 mM HCl	Ja
- 0,1 % CH <sub>3</sub> COOH	Ja
- 20 mM HCOOH	Ja
- Kun vann	Ja

Forurensningen ble utfra testresultatene antatt å stamme fra materialet i vakuummanifolden eller SPE-kolonnene. Den koeluerende forurensningen ble deretter forsøkt separert fra BK1-5. Dette ble gjort ved å forsøke noen små endringer i gradienten, noe som viste seg å gi langt dårligere kromatografi enn utgangspunktet. En endring av syrekomponenten i mobilfasen i den kromatografiske metoden fra 0,1 % eddiksyre til 20 mM maursyre viste seg, i motsetning til gradientendringene, å gi en akseptabel separasjon. Forurensningen koeluerte etter disse endringene derimot med signalet fra BK1-6, men siden disse har ulik  $m/z$ -verdi var dette av mindre betydning. Betydningen av denne forurensningen med tanke på undertrykking av signalet for BK1-6 ble likevel testet ved å plote topphøyden av forurensningen mot forholdstallet

mellom BK1-5 og BK1-6. Dersom denne forurensningen hadde påvirket signalet til BK1-6 ville topphøyden til BK1-6 variert avhengig av intensiteten til forurensningen, og man ville sett en trend i plottet der forholdstallet mellom BK1-5 og BK1-6 hadde forskjøvet seg med økende topphøyde fra forurensningen. Utfra figur 10 kan man ikke se noen slik påvirkning av BK1-6 signalet, selv om topphøyden fra forurensningen varierer mye.



Figur 10: Figuren viser forholdet BK1-5/BK1-6 plottet mot topphøyden av en forurensning som koeluerer med BK1-6,  $n=10$ .

### 6.2.1 Test av ulike syrekomponenter i vaske- og elueringsløsningene

Siden TFA har dårlig holdbarhet, krever en mer omfattende tillagingsprosess og at det kan forårsake ioneundertrykking ved massespektroskopi[61, 75], ble maursyre testet som en alternativ syrekomponent (se s.38 under 5.3.2). I tillegg var det en mistanke om at TFA kunne bidra til å frigjøre en del substanser fra plastmaterialet i SPE-utstyret, og dermed introdusere forurensninger til prøven. Resultatene var jevnt over svært like, og det så ikke ut til at den ene typen var bedre enn den andre. Dette førte til at 20 mM maursyre ble brukt videre i prosedyren fremfor 0,1 % TFA.

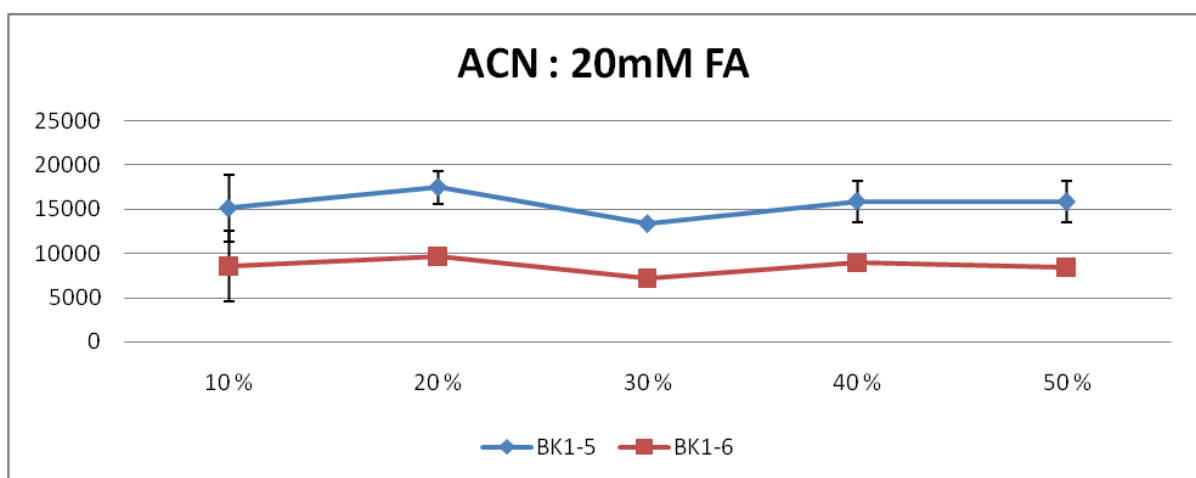


## 6.2.2 Test av løsemiddelstyrke som gir eluering

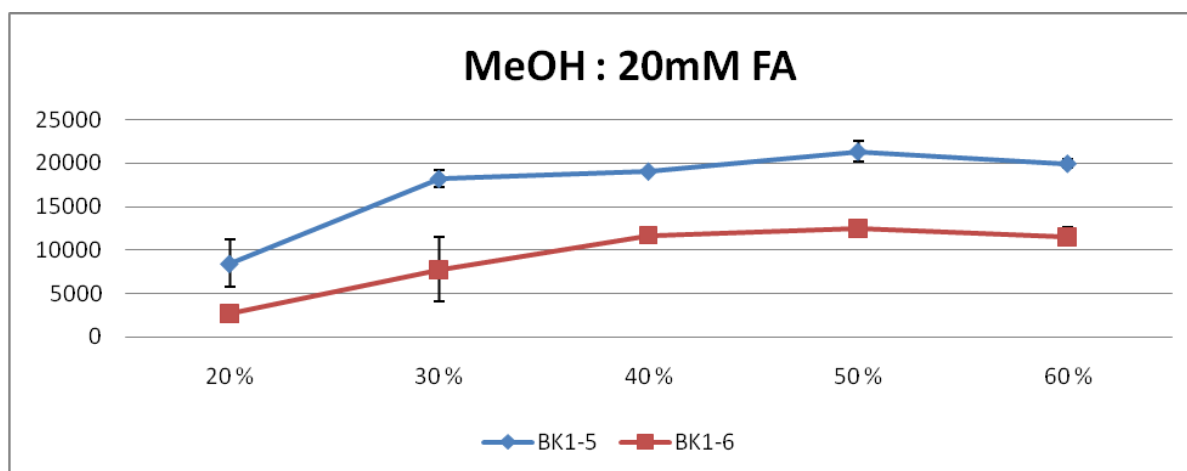
Ulike forhold av metanol eller acetonitril blandet med 20 mM maursyre ble testet som elueringsløsning (se s. 38 under 5.3.2) og ga resultater som vist i figur 11 og 12.

Metanol gir en klar stigning med økende styrke frem til rundt 50 % metanolinnhold.

Acetonitril er mer uforutsigbar ved at den gir en middels høy eluering ved alle mengdeforhold testet. Utbyttet fra eluering med metanol ligger her høyere enn acetonitril etter at platået er nådd, og metanol blir derfor brukt videre som elueringsmiddel i forholdet 50:50 metanol og 20 mM maursyre.



Figur 11: Figuren viser et plot over prosentandelen acetonitril i elueringsløsningen og den detekterte topphøyden fra de påfølgende analysene.  $n=2$ . Standardavviket for hvert punkt er angitt (der dette ikke er synlig skyldes det at standardavviket er svært lavt)



Figur 12: Figuren viser et plot over prosentandelen av metanol i elueringsløsningen og den detekterte topphøyden fra de påfølgende analysene.  $n=2$ . Standardavviket for hvert punkt er angitt (der dette ikke er synlig skyldes det at standardavviket er svært lavt)

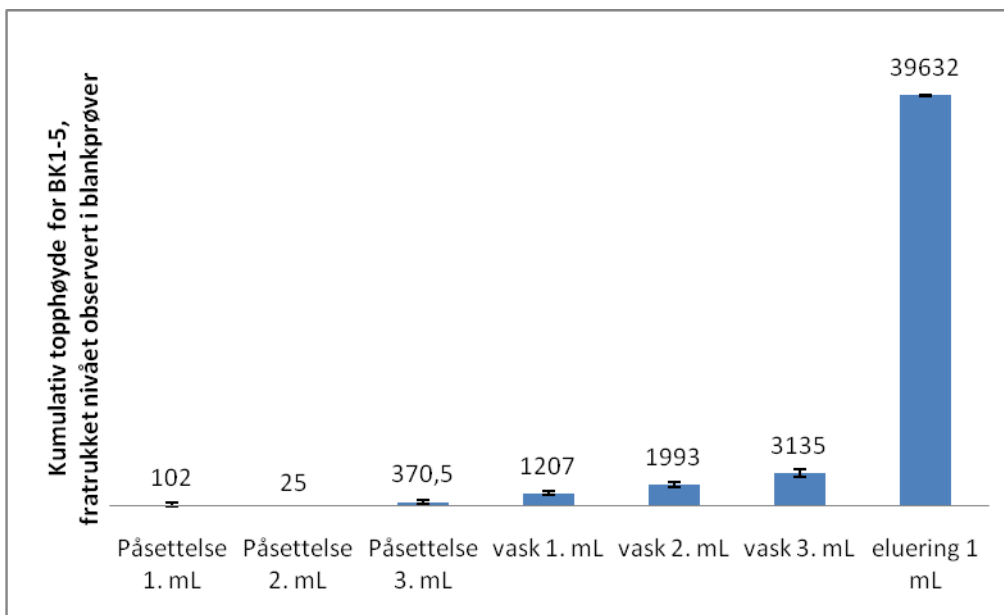
Av Figur 11 og 12 kan man se at eluering oppstår selv ved relativt lave konsentrasjoner av organisk løsemiddel. Normalt er det ønskelig å benytte seg av en viss andel organiske løsemidler i vaskeløsningene under SPE. På denne måten kan forurensninger som er hydrofobe nok til å ikke kunne vaskes ut med ren vandig fase, vaskes ut med vaskeløsninger med litt organisk innhold, men ikke så mye at det vil forårsake eluering av analyttene. Observasjonen av at en viss grad av eluering oppstår ved lavt metanol eller acetonitrilinnhold fører til at vaskeløsningene i denne metoden ble valgt å være uten organisk innhold, for å sikre optimalt utbytte.

### 6.2.3 Optimalisering av vaske- og prøvopåsettelsesvolum

For å teste hvor mange trinn som var nødvendig under SPE-prosedyren ble det testet om det var mulig å redusere volumet prøvene ble reløst i etter inndamping, og dermed også prøvopåsettelsesvolumet, samt om volumet av vaskeløsning kunne reduseres (se s. 38 under 5.3.2). En slik reduksjon ville vært gunstig siden det både ville vært tidsbesparende, i tillegg til at det ville redusert løsemiddelforbruket under ekstraksjonsprosessen. Fra prøvene kunne man se en klar sammenheng mellom

andelen vaske- og prøvepåsettelsesvolum og andelen forurensninger i fronten av kromatogrammet (se vedlegg 4). Prøvene der lave volumer var brukt var tidvis svært blakket og kunne dermed ikke injiseres i analyseapparatene, selv etter sentrifugering. Bruk av 3 mL ved både vask og prøvepåsettelse ga de reneste prøvene, og utgangspunktet ble derfor opprettholdt.

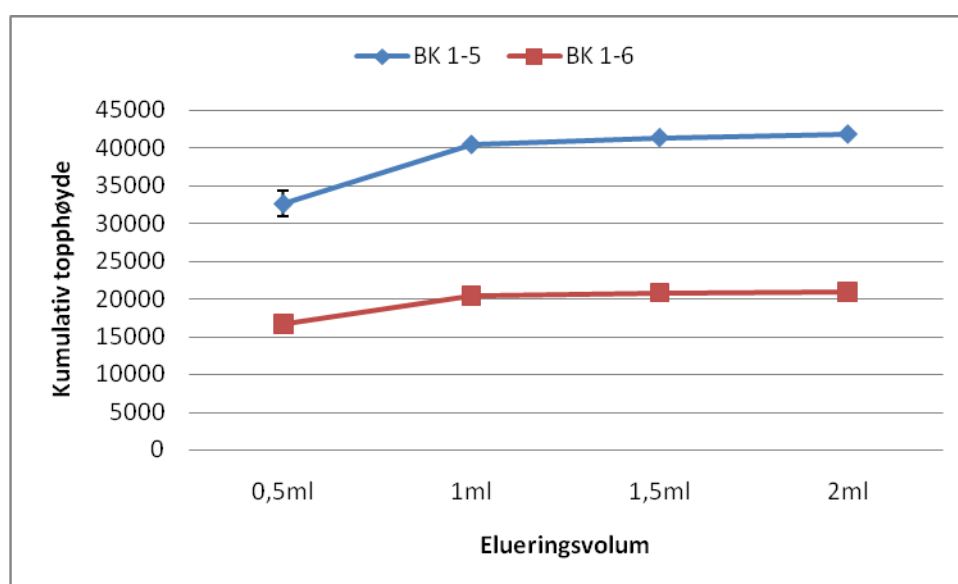
Ved å analysere enkeltfraksjonene fra hvert enkelt ledd i SPE-prosedyren på vandige standardprøver, ble det kontrollert om væskevolumet som forbrukes før eluering forårsaker gjennombrudd av BK1-5 eller BK1-6. Resultatene viser lite gjennombrudd selv der 3 mL løsning er brukt både under prøvepåsettelse og vask, der den totale kumulative topphøyden fra alle foregående trinn utgjør 7,9 % av topphøyden sett ved eluering (se Figur 13). Grunnet en lav topp rundt kvantifiseringsgrensen for BK1-5 i blankprøvene ble gjennomsnittet av nivået observert i disse trukket fra topphøyden under beregningen av gjennombrudd.



Figur 13: Figuren viser kumulativ topphøyde basert på gjennomsnittet av to paralleller for BK1-5 for alle prøvepåsettelses- og vaskevolum, med fradrag for den gjennomsnittlige responsen i blankprøver. Standardavviket for hvert punkt er angitt. Topphøyden fra påfølgende eluering er vist som sammenlikningsgrunnlag.

## 6.2.4 Optimalisering av elueringsvolum

For å oppnå best mulig utbytte er det viktig at så mye som mulig av de aktuelle analyttene elueres ut, men et stort overskudd av elueringsvolum vil både føre til at inndampingen i neste trinn tar lengre tid, samt at risikoen for at andre mer hydrofobe forurensninger elueres ut samtidig er større. Dette forsøket viser hvor stort volum elueringsløsning som er nødvendig for å oppnå tilstrekkelig eluering av analytten fra sorbenten i SPE-kolonnen (se s. 39 under 5.3.2). Grafen i figur 14 viser her at mesteparten elueres ut allerede ved bruk av 0,5 mL, men at man får en viss økning opp mot 1 mL elueringsløsning. En volumøkning utover dette er unødvendig siden økningen i utbytte vil være så godt som fraværende. Derfor ble det vedtatt å benytte 1 mL elueringsløsning.



Figur 14: Figuren viser et plot over mengden elueringsløsning brukt og den kumulative topphøyden for BK1-5 og BK1-6 i de påfølgende analysene.  $n=2$ . Standardavviket for hvert punkt er angitt (der dette ikke er synlig skyldes det at standardavviket er svært lavt)

## 6.3 Forberedende forsøk til biologiske prøver

### 6.3.1 Overføring av metoden til LC-MS/MS

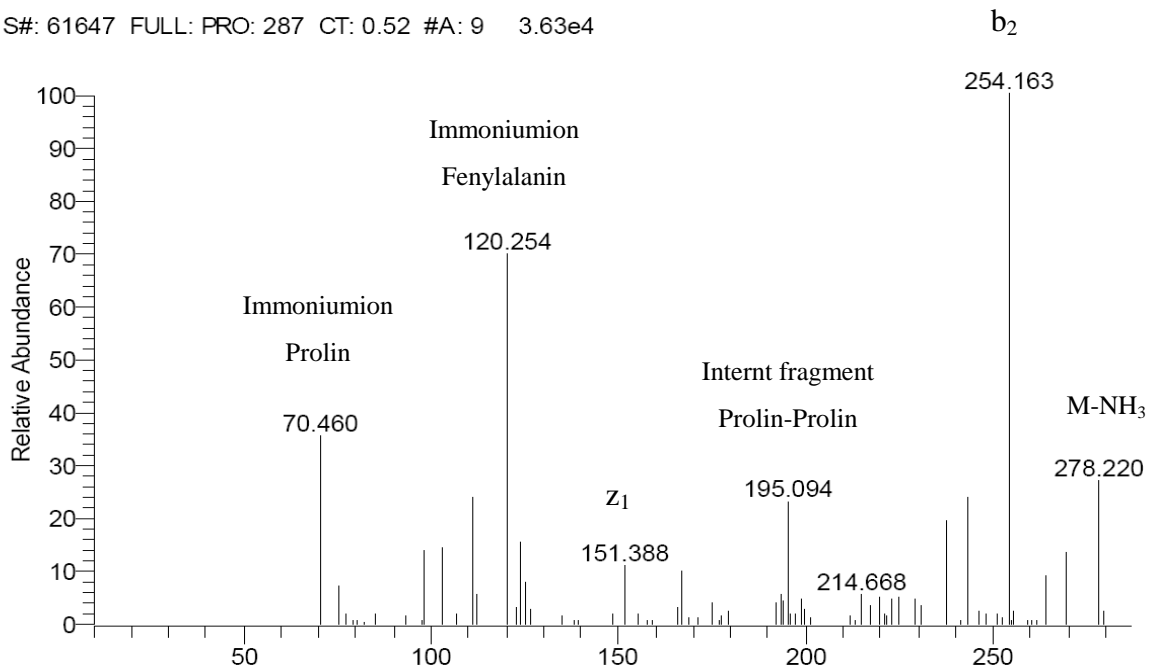
En SRM-metode basert på trippelkvadrupolprinsippet har fordeler fremfor singelkvadrupol ved at den kan gi en betydelig lavere deteksjonsgrense og er mer spesifikk. Begge disse egenskapene var ønskelige å oppnå for denne metoden, både for å kunne se så lave konsentrasjoner av BK1-5 som mulig, for dermed å kunne detektere en økning fra endogent nivå, samt at bedre spesifisitet gir renere kromatogrammer.

Ved overføring av metoden til trippelkvadrupol var det nødvendig å estimere en mer nøyaktig  $m/z$ -verdi enn den brukt ved singelkvadrupol, samt se på fragmenteringsmønsteret til analyttene. Kun et fragment ble valgt ut for hvert peptid, siden det kun ble oppdaget en overgang for hver som ga tilstrekkelig intensitet til at det var ønskelig å inkludere denne i en SRM-metode. Flere overganger gir normalt en sikrere identifikasjon av den aktuelle analytten, men kan nedsette sensitiviteten. Siden peptidene som analyseres er relativt små vil det ofte være færre fragmenteringer som oppstår enn for større peptider, og kun den dominerende ble derfor valgt ut (se Tabell 14). Figur 15 og 16 viser fragmenteringsmønsteret til BK1-5 og BK1-6, der den mulige identiteten til fragmentene, basert på teoretiske verdier fra et søk med ProteinProspector[76], er markert.

*Tabell 14: Oversikt over analyserte peptider,  $m/z$ -overganger, ladninger på molekylet (der det er mer enn en) og kollisjonsenergi for LC-MS/MS-metoden*

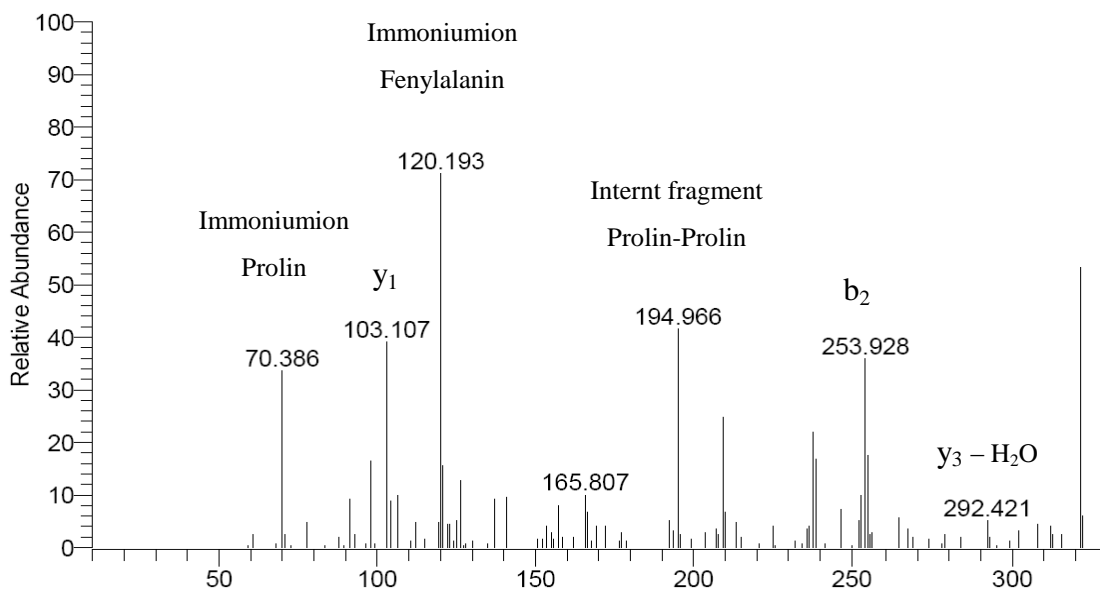
<i>Peptid</i>	<i>Overgang</i>	<i>Kollisjonsenergi</i>
<b>BK1-5</b>	287,00 <sup>(2+)</sup> -> 254,05	15V
<b>BK1-6</b>	331,00 <sup>(2+)</sup> -> 120,21	30V
<b>Icatibant</b>	435,70 <sup>(3+)</sup> -> 132,10 <sup>(3+)</sup>	30V

S#: 61647 FULL: PRO: 287 CT: 0.52 #A: 9 3.63e4



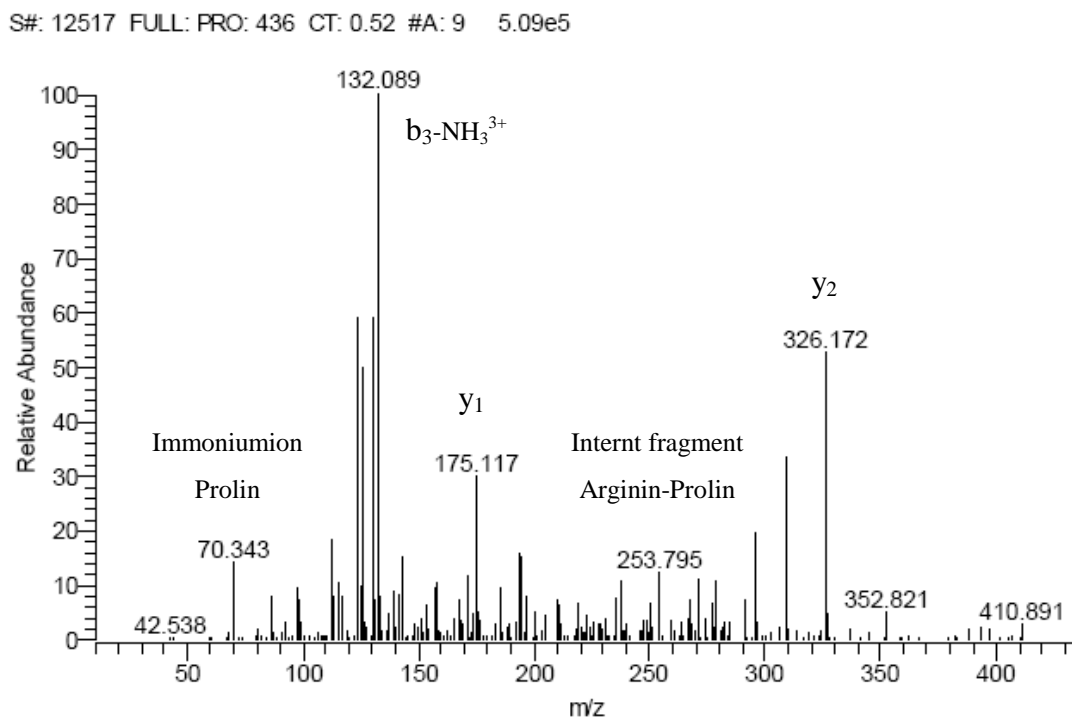
Figur 15: Figuren viser et massespektrum over fragmenteringsmønsteret til BK1-5, hvor mulige fragmenter er angitt. M = molekylionet for BK1-5

S#: 61657 FULL: PRO: 331 CT: 0.52 #A: 9 4.48e4



Figur 16: Figuren viser et massespektrum over fragmenteringsmønsteret til BK1-6, hvor mulige fragmenter er angitt.

Grunnet at det var ønskelig å kunne bruke metoden til å se om icatibant var gitt eller ikke, ble også en ekstra overgang for denne lagt til i metoden (se Tabell 14), og fragmenteringsmønsteret for denne, samt mulig identitet for fragmentene er vist i figur 17. Analyse av icatibant har ikke vært fokus for utviklingen av metoden, og det er ikke foretatt noen egne optimaliseringstrinn for denne, siden inkluderingen ble innført på et sent tidspunkt. Dosen icatibant som gis er svært høy, noe som kan ha innvirkning på analysen av de andre komponentene i prøven. Dette gjorde det interessant å kunne detektere om det var gitt icatibant, dersom det hadde vist seg at disse prøvene avvok fra de resterende.



Figur 17: Figuren viser et massespektrum over fragmenteringsmønsteret til icatibant, hvor mulige fragmenter er angitt. Der fragmentene har mer enn en ladning er dette markert.

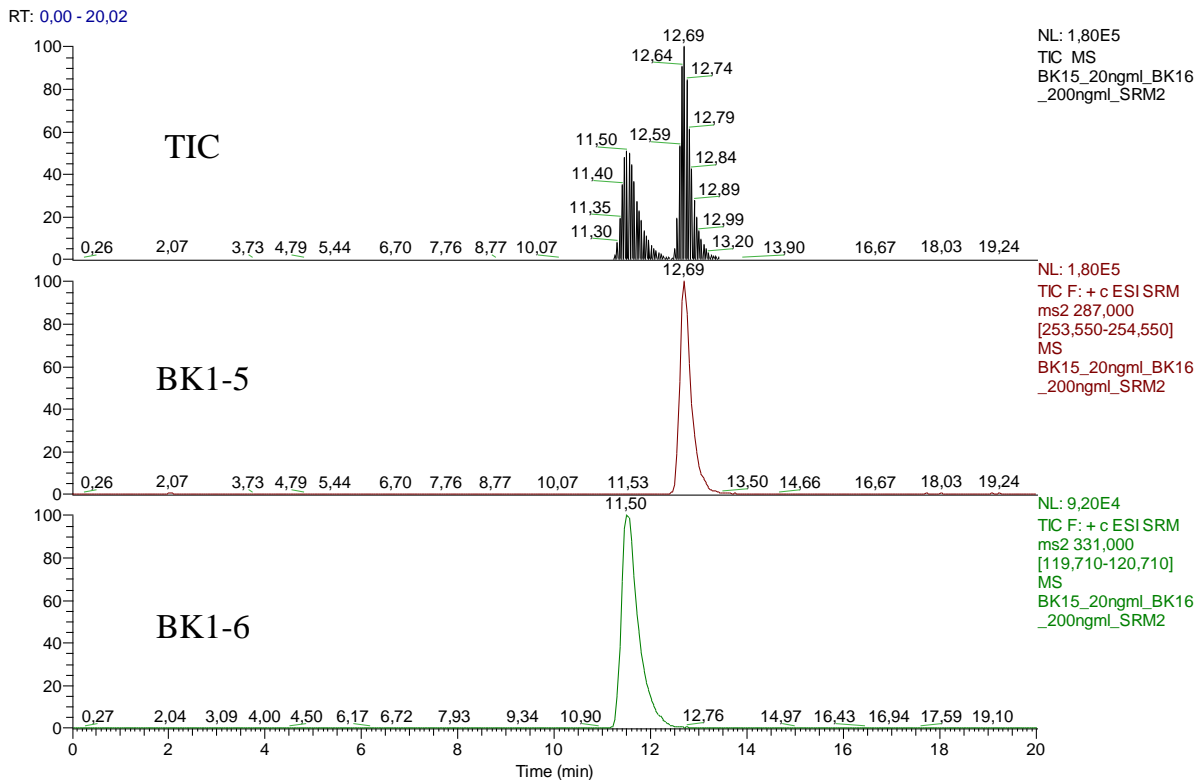
For den kromatografiske metoden for alle forbindelser måtte det tas hensyn til en viss endring i retensjonstider grunnet bruk av en lavtrykksgradientpumpe som gir økt dødvolum i systemet (se Tabell 15), noe som førte til at gradienten måtte endres noe i forhold til metoden brukt på singelkvadrupol. Metoden viste seg å fortsatt gi god

separasjon mellom BK1-5 og BK1-6, samt tydelige signaler og langt mindre støy enn tidligere (se Figur 18). I tillegg ble det oppdaget en relativt ustabil retensjonstid for både BK1-5 og BK1-6 i mange av prøvene, der retensjonstiden gradvis ble kortere fra prøve til prøve. Gradienten ble derfor utvidet med to minutter mens stigningstallet ble beholdt, for å være sikker på at analyttene ble eluert ut i stigningsområdet til gradienten og ikke etter at plataet ble nådd, siden dette ofte er nødvendig for å få stabil retensjonstid. En utvidet vaskeprosedyre mot slutten av gradienten ble også innført for å sikre at kolonnen var godt nok vasket og rekondisjonert før neste prøve, noe som ble vurdert til å være av betydning ved analyse av de trolig mer forurensede biologiske prøvene.

*Tabell 15: Oversikt over analyserte peptider og tilhørende retensjonstid for LC-MS/MS-metoden.*

<i>Peptid</i>	<i>Retensjonstid (min)</i>
<b>BK1-5</b>	12,40-12,70
<b>BK1-6</b>	11,30-11,60
<b>Icatibant</b>	16,20-16,75





Figur 18: Kromatogram over en vandig standard med konsentrasjonen 20 ng/mL BK1-5 og 200 ng/mL BK1-6 analysert med LC-MS/MS-metoden, der den totale ionestrømmen (TIC) og ioneuttrekk for BK1-5 og BK1-6 vises.

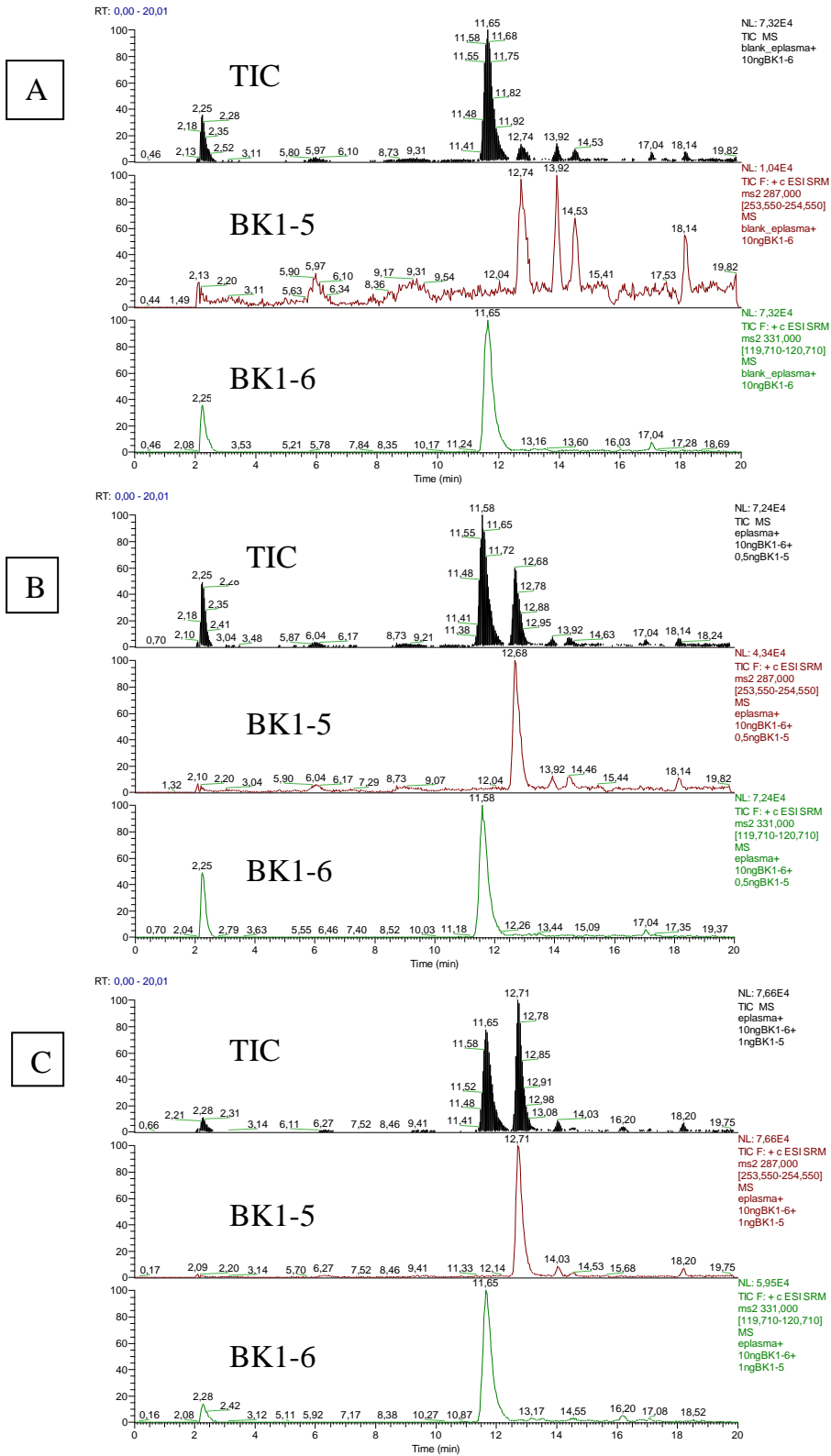
### 6.3.2 Test av metoden på humant fullblod

For å utføre en test av metoden ble det analysert en rekke prøver basert på humant heparinisert fullblod. Grunnet begrenset prøvemateriale fra gris ble dette brukt som erstatning, og siden blod ofte varierer i liten grad mellom arter ble dette vurdert til å være en akseptabel surrogatmatriks. Prøvene var derimot hentet fra et lager med nedfrosne blodprøver og var dermed fryst ned direkte etter prøvetakning, noe som betydde at de ikke hadde gjennomgått prosedyren for inaktivering av blod slik den skal utføres (se 5.3.1). Prosedyren ble foretatt rett etter at prøvene var tint opp, men et nøyaktig endogent mål for BK1-5 vil ikke kunne være mulig å observere, grunnet en stor sannsynlighet for økt dannelse av bradykinin og videre nedbrytning til BK1-5 fra kontaktaktivering etter prøvetakning, og en eventuell videre nedbrytning av BK1-5 i prøven.

---

Resultatene fra prøven viste et relativt tydelig signal for BK1-5 som var over kvantifiseringsgrensen, selv der dette ikke var tilsatt, og analysene av prøver spiket med ulike mengder BK1-5 antydte at det ville være en relativt god lineær korrelasjon mellom ulike konsentrasjoner (se Figur 19). Ved å foreta en enkel sammenlikning med standardprøver så det ut til at utbyttet ville ligge på rundt 50-60 %, men grunnet relativt få paralleller og få konsentrasjonspunkter kan man ikke si dette med sikkerhet.

Analysene av disse prøvene ble foretatt for å ha et utgangspunkt for hvilke konsentrasjonspunkter som burde tas med i linearitetskurven under validering av metoden, der spesielt en konsentrasjon som antas å ligge nær LOQ var interessant å finne. Utfra de humane prøvene så det ut til at en mengde på 50 pg/mL blod burde gi en topp som lå litt over nivået for LOQ, og denne mengden ble dermed valgt som laveste konsentrasjonspunkt for valideringsanalysen (se 5.5)



Figur 19: Kromatogrammer over resultater fra analyser på humant plasma, der TIC og ioneuttrekk for BK1-5 og BK1-6 vises. A: Prøve kun tilsatt intern standard. B: Prøve spiket med 0,5 ng BK1-5 C: Prøve spiket med 1 ng BK1-5.

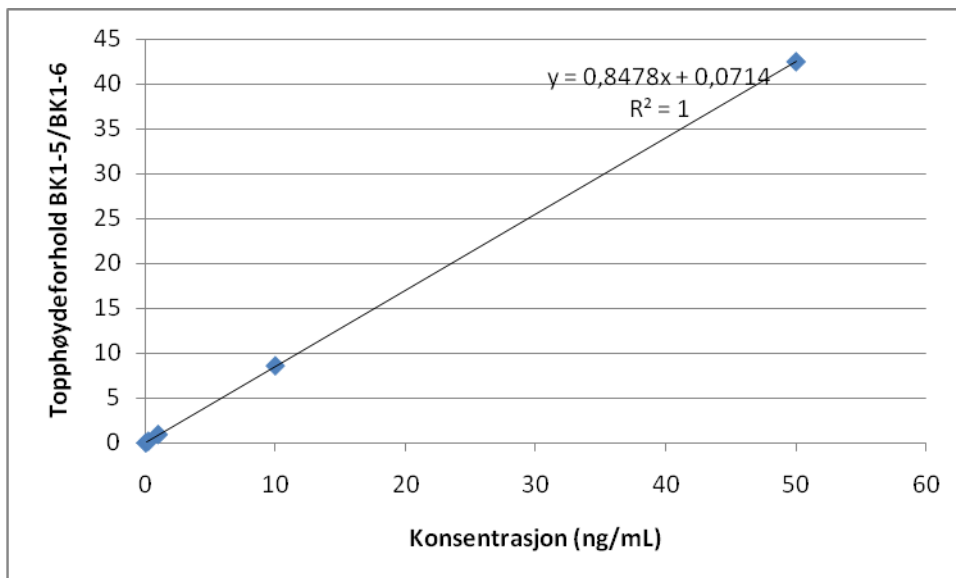
## 6.4 Partiell Validering

Valideringsprøvene ga totalt sett resultater som var relativt avvikende fra resultatene forespeilet gjennom optimaliseringsprosedyrer og tester på human etanolisk plasmasupernatant. Prøvene fra gris viste, i forhold til vandige standarder og de humane prøvene (se Tabell 15, Figur 18 og 19), relativt store variasjoner mellom parallellene, en langt mer ustabil retensjonstid, og en retensjonstid som var markant annerledes ( $11,00 \pm 0,25$  min for BK1-5 og  $10,64 \pm 0,08$  min for BK1-6,  $n=15$ ). De humane prøvene har derimot fulgt mønsteret observert i de vandige prøvene, og har gitt resultater som forventet, men det er ikke foretatt noen validering på disse, siden dette kun var brukt som surrogatmatriks i mangel på nok prøvemateriale fra gris. I tillegg ble det observert et signal med samme overgang som for BK1-6 med en elueringstid noe tidligere, men som fortsatt førte til delvis koeluering med BK1-6, noe som kan ha påvirket resultatene her. Dette er kun observert i prøvene fra gris, og er ikke til stede i noen av de humane prøvene. For å minimere dette i senere prøver blir en tidobbel mengde BK1-6 tilsatt prøvene, slik at konsentrasjonen av BK1-6 ender på 100 ng/mL blod.

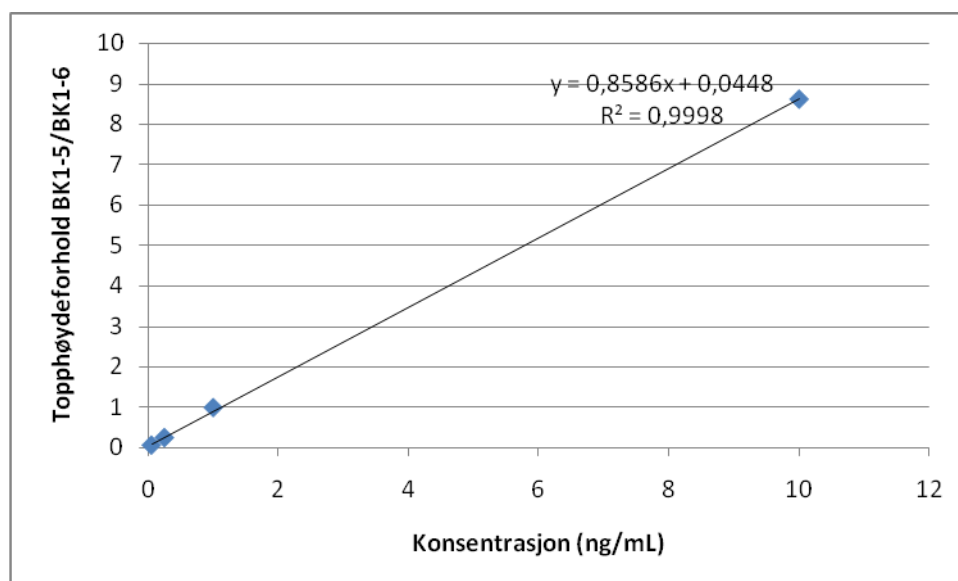
### 6.4.1 Linearitet

Linearitetsberegningene foretatt på spikede etanoliske blodprøver fra gris viste en god linearitet med  $r^2$ -verdi nært opp til 1 (se Figur 20). En god linearitetskurve bør ha  $r^2$ -verdier som er over 0,99, noe som ble oppnådd både ved analyse av vandige standarder og ved de analysene gjort her. Utfra resultatene i de biologiske prøvene fra gris (se 6.5.2) kan man se at BK1-5 nivået ligger i det nedre området av kurven, og at nødvendigheten av et punkt med konsentrasjoner helt opp i 50 ng/mL blod kan diskuteres. Punktet ble tatt med grunnet uvisshet i mengden BK1-5 dannelse som kunne forventes etter sepsis. Grunnet et stort potensial for bradykininfrigjøring, som forklart under 4.2.2, samt observasjon av en stor kapillærlekkasje hos grisene under forsøkene i icatibantstudiet (se vedlegg 5), var det en teoretisk mulighet for en massiv BK1-5 generering. Dermed ble det ansett som nødvendig å inkludere et stort område i

linearitetsanalysene, noe som også fører til at de høyeste konsentrasjonene får stor betydning for kurveforløpet. Dersom det øverste punktet fjernes vil likevel lineariteten være god, men beregningen oppfyller da ikke kravet om fem ulike konsentrasjonspunkter (se Figur 21). Det hadde med fordel kunnet inkluderes flere punkter i det aktuelle området for å få en linearitetskurve som var bedre tilpasset de nivåene som ble observert. De uspikede prøvene viste ingen respons for BK1-5, noe som kan tyde på enten et lavt BK1-5 nivå i de aktuelle prøvene eller at utbyttet var relativt lavt. Dette førte til at behovet for å justere resultatene etter endogene nivåer falt bort. Standardprøver viste ingen nevneverdige avvik under analyseprosedyren som skulle tilsi at metoden ikke fungerte optimalt.



Figur 20: Linearitetsberegning fra prøver spiket med BK1-5 i området 50 pg-50 ng/mL blod. n=2



Figur 21: Linearitetskurven fra figur 20 med punktet for 50 ng/mL blod fjernet, slik at området som dekkes er fra prøver spiket med BK1-5 i området 50 pg-10 ng/mL.  $n=2$

#### 6.4.2 Repeterbarhet

For de tre konsentrasjonene som ble målt ligger resultatene rundt de aksepterte kravene for repeterbarhet, med kun prøvene spiket til en BK1-5 konsentrasjon på 1 ng/mL blod, liggende så vidt over grensen på 15 % (se Tabell 16).

Tabell 16: Tabell over repeterbarhetsanalysene som viser tilsatt mengde BK1-5 til prøver slik at man får en høy, en lav og en middels konsentrasjon, og korresponderende relativt standardavvik mellom de fem parallellene.

<i>Tilsatt mengde BK1-5 til 1mL blod</i>	<i>Relativt standardavvik mellom fem målinger</i>
50 pg	12,8 %
1 ng	15,2 %
50 ng	14,2 %

### 6.4.3 Nøyaktighet

Nøyaktigheten er relativt god for de to øverste verdiene, men i den lave enden av skalaen er den godt utenfor kravene på 20 % (se Tabell 17). Dette kan skyldes svakheter ved linearitetskurven, noe som ofte vil påvirke de lavere verdiene mest, og kan ses ved at skjæringspunktet med y-aksen der  $x=0$  ligger en god del over nullpunktet.

*Tabell 17: Tabell over nøyaktighetsanalysene som viser tilsatt mengde BK1-5 til prøvene, og det korresponderende prosentvise avviket i forhold til verdien beregnet utfra linearitetskurven.*

<i>Tilsatt mengde BK1-5 til 1mL blod</i>	<i>Prosentvis avvik i forhold til linearitetskurven</i>
50 pg	54,4 %
1 ng	9,0 %
50 ng	1,2 %

### 6.4.4 LOD/LOQ

Støyhøyden rundt elueringstiden til BK1-5 ble beregnet til rundt 600, og basert på gjennomsnittlig topphøyde for prøvene spiket til en BK1-5 konsentrasjon på 50 pg/mL blod, fratrukket nivået i blankprøver, utgjorde dette en S/N verdi på 6,7. Ved bruk av grenser for LOD som  $S/N=3$  og LOQ som  $S/N=5$ , ble LOD og LOQ beregnet. Utfra avlesning på linearitetskurven for de fire nederste punktene (se Figur 21), viste det seg at konsentrasjonene lå omtrent på null, noe som viser at linearitetskurven ikke er optimal for de nedre verdiene. Dersom kurven hadde vært fullstendig lineær og gått gjennom origo ville en LOD på 22 pg/mL og en LOQ på 37 pg/mL være trolige verdier basert på at 50 pg/mL gir en S/N verdi på 6,7 (se Tabell 18). Siden dette er utenfor området som er beregnet, samt at det er vist svakheter i linearitetskurven i det nedre området settes LOQ til den nederste klart observerbare verdien som er målt, dvs. 50 pg/mL, noe som ligger litt over den humane endogene konsentrasjonen for BK1-5 på rundt 25 pg/mL  $\pm$  4 pg/mL (utregnet fra verdier

rapportert av Murphey et al. i 2001 på  $44,2 \pm 7,1$  fmol/mL[2]). Dette skulle tilsi at endogene nivåer i teorien bør være mulig å detektere i en del tilfeller.

Tabell 18: Tabellen viser trolige verdier for LOD og LOQ for BK1-5.

LOD for BK1-5	22 pg/mL
LOQ for BK1-5	37 pg/mL

### 6.4.5 Utbytte

Utbytteberegningen viste et utbytte langt lavere enn antatt utfra de verdiene som ble forespeilet fra analysene av humane prøver, der utbyttet så ut til å ligge rundt 50-60 % (se 6.3.2). I tillegg ble det her oppdaget en relativt stor nedgang i utbytte etter hvert som konsentrasjonen i prøvene øker (se Tabell 19), noe som kan tyde på en eventuell metning i for eksempel ekstraksjonskolonner under SPE eller andre konsentrasjonsavhengige tap i mengde BK1-5. En annen mulig forklaring for lavt utbytte kan være at stabiliteten til BK1-5 og BK1-6 ikke er optimal i prøver fra gris under prøveopparbeidelsen. Deler av det lave utbyttet i prøvene tilsatt BK1-5 til en konsentrasjon på 50 ng/mL blod kan forklares med at det ble observert en stor andel carryover i påfølgende blankprøver med mobilfase A, noe som tyder på at denne konsentrasjonen var i høyeste laget for hva systemet kunne håndtere. Målingen for 50 pg/mL blod viste ingen signal for BK1-5, trolig grunnet en feil under prøveopparbeidelsen, og kunne ikke reanalyseres, grunnet mangel på prøvemateriale.

Tabell 19: Tabellen viser utbytte for de ulike mengdene BK1-5 som ble tilsatt prøvene. Nivået i uspikeprøver er her trukket fra.

Tilsatt mengde BK1-5 til 1mL blod	Utbytte
50 pg	Ikke detektert noen respons for denne mengden
250 pg	48,2 %
1 ng	38,1 %
10 ng	28,6 %
50 ng	19,1 %



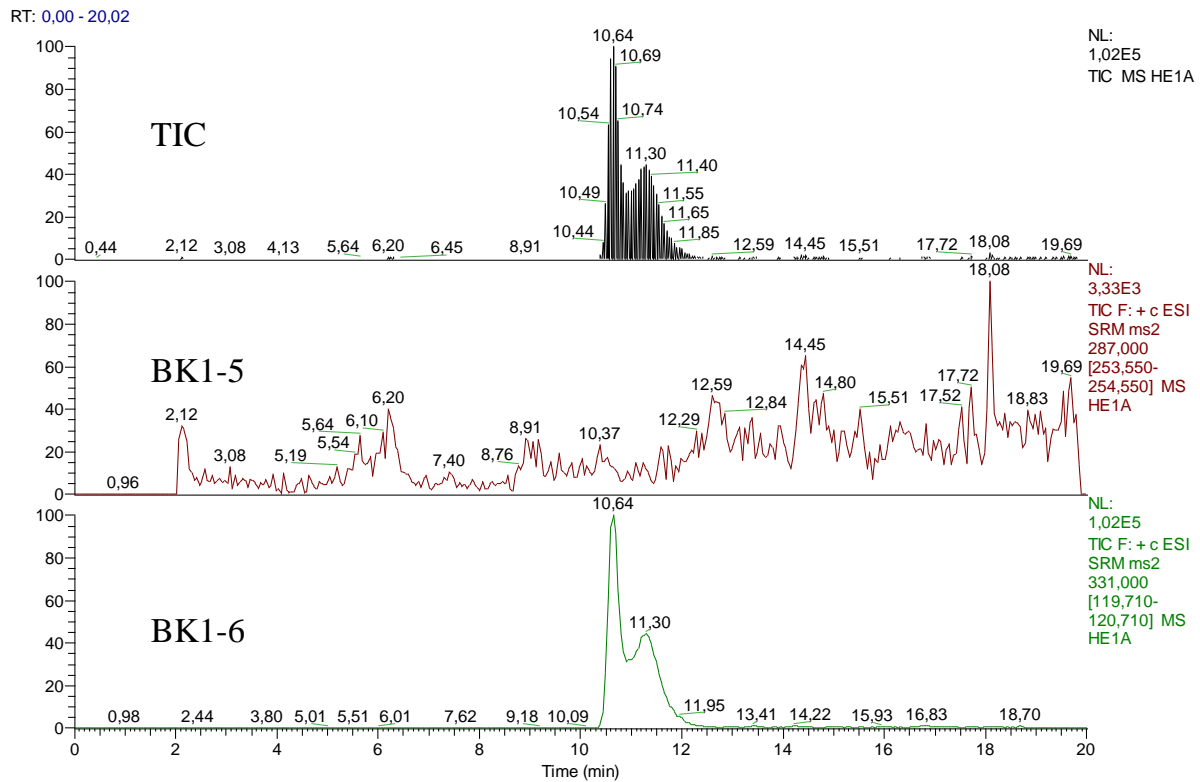
## 6.5 Biologiske prøver

### 6.5.1 In-vitro forsøk av bradykinindannelse

Fem ulike *in vitro* forsøk ble gjort for å se metodens evne til å detektere bradykininnivåer i blod utsatt for ulike behandlinger som fører til stimulering eller hemming av bradykinin og BK1-5 dannelsen. En slik test av metoden var nyttig å utføre før de reelle biologiske prøvene fra icatibantstudiet på Rikshospitalet ble analysert, siden dette gir en indikasjon på at metoden fungerer tilfredsstillende.

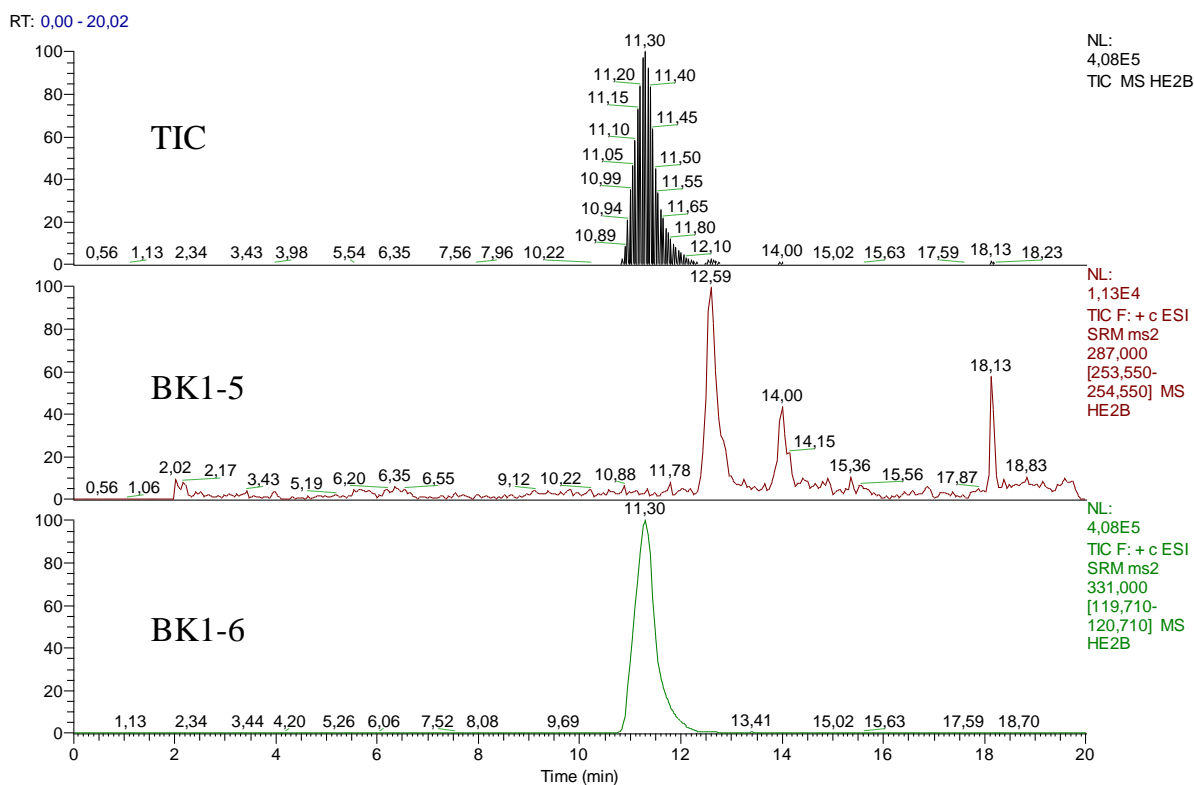
For de tre første prøvene i analysen oppstod det en feil med kromatografien for BK1-6, noe som førte til et dobbelt signal. De resterende prøvene fungerte som forventet. Siden dette var ment som en enkel test på metoden for å se om den ga resultater som stemte overens med forventningene var det ikke nødvendig med noen nøyaktig kvantitativ analyse av BK1-5 nivået. Tillaging av en kalibreringskurve ble derfor ikke utført, og betydningen av det doble signalet for BK1-6 var mindre kritisk for resultatet av disse analysene.

Eksperiment 1 var ment som en form for kontrollprøve, der prosedyren for inaktivering av blod beskrevet i 5.3.1, følges nøyaktig. Av resultatene kan man ikke se noe signal som er høyt nok til at det passerer deteksjonsgrensen i området der BK1-5 er forventet (rundt 12,6 min) (se Figur 22).



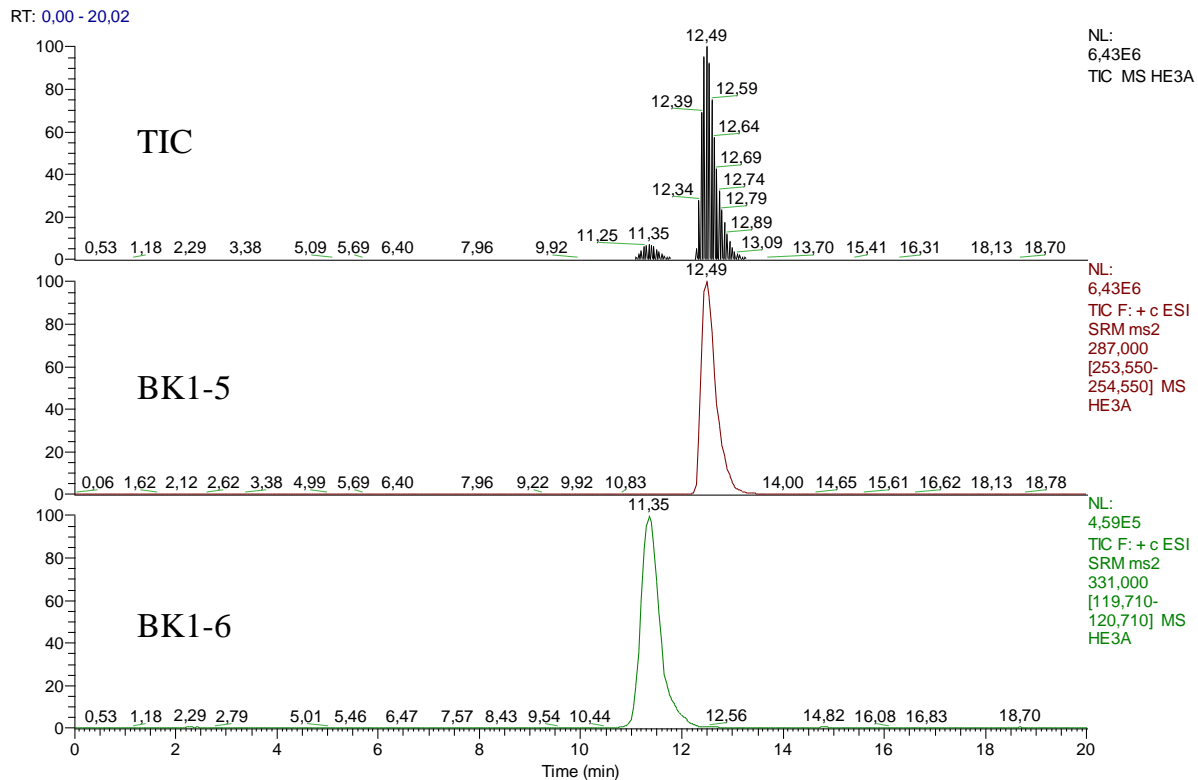
Figur 22: Kromatogram fra den ene parallellen av eksperiment 1, der TIC og ioneuttrekk for BK1-5 og BK1-6 vises.

Figur 23 viser resultatene av koagulasjonsprosessen i eksperiment 2. Her ser man tydelig en markant økning i nivået av BK1-5 som følge av at kontaktaktivering har startet etter kontakt med den negativt ladde overflaten til glasskolben blodet ble oppbevart i. Tophøyden for BK1-5 er her, i motsetning til i eksperiment 1, godt synlig og langt over kvantifiseringsgrensen.



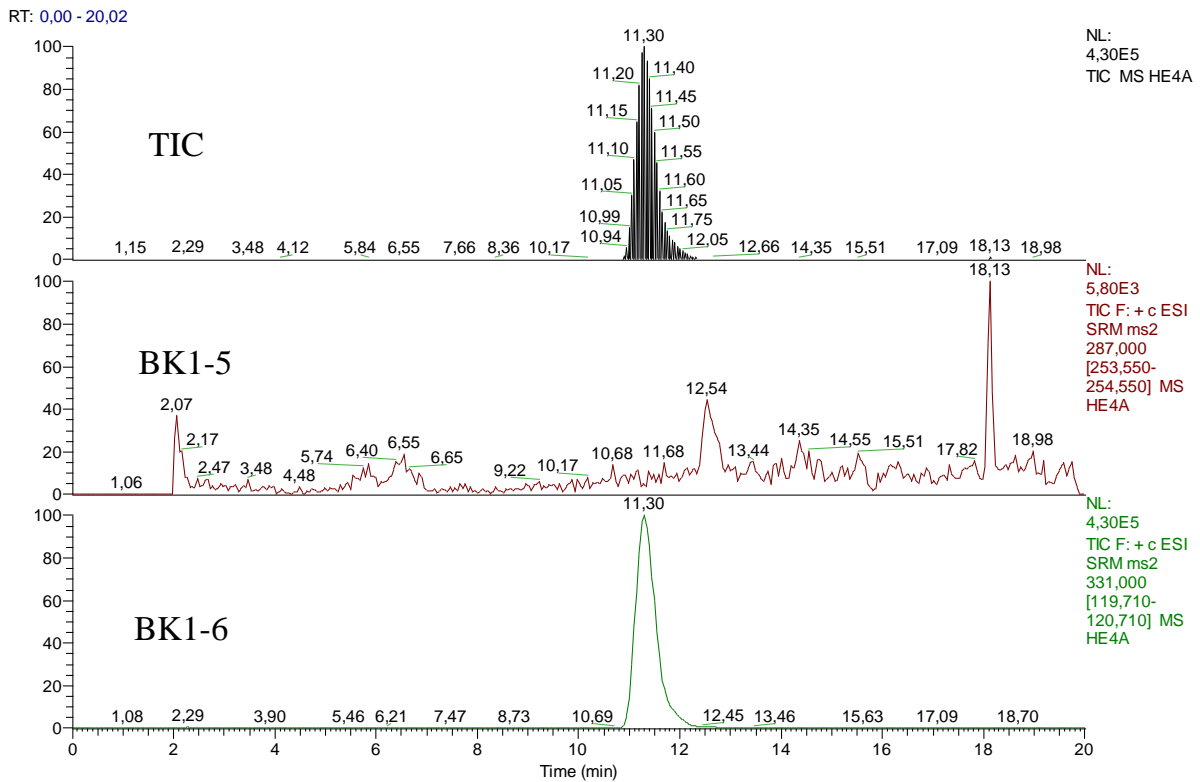
Figur 23: Kromatogram over en av parallellene til eksperiment 2, der TIC og ioneuttrekk for BK1-5 og BK1-6 vises.

Figur 24 viser her følgene av tilsetning av DXS til prøven (eksperiment 3). DXS har en sterk negativ overflate og er med dette en kraftig aktivator av kontaktaktiveringsprosessen. Av resultatene ser man at man får et kraftig signal for BK1-5, som utgjør omtrent 600 ganger intensiteten ved eksperiment 2. Prøvene viste også en markant carryover-effekt i den påfølgende blankprøven. Dette viser noe av det store potensialet for bradykininfrigjøring i blod, og DXS sin evne til å indusere kontaktaktiveringskaskaden.



Figur 24: Kromatogram over den ene av parallellene til eksperiment 3, der TIC og ioneuttrekk for BK1-5 og BK1-6 vises.

I eksperiment 4 ble det tilsatt EDTA, som er en chelator for metallioner. En rekke enzymer er avhengig av ulike metallioner for å utøve sin effekt, blant annet ACE som er avhengig av  $Zn^{2+}$ . EDTA vil her hemme effekten av ACE og dermed redusere omdannelsen av bradykinin til BK1-5, noe som vil resultere i et lavere nivå av BK1-5 enn om prosessen hadde foregått uten EDTA (eksperiment 2). Koagulasjonsprosessen vil også hemmes, men dette på trinn lenger ut i kaskaden enn trinnene avhengig for selve kontaktaktivering og dannelsen av bradykinin. Fra resultatene vist i figur 25 ser man at BK1-5 er til stede, men i et relativt lavt nivå. Det er en større mengde i forhold til kontrollen i eksperiment 1, men i forhold til eksperiment 2, der EDTA ikke var tilsatt, ser man en klar reduksjon.



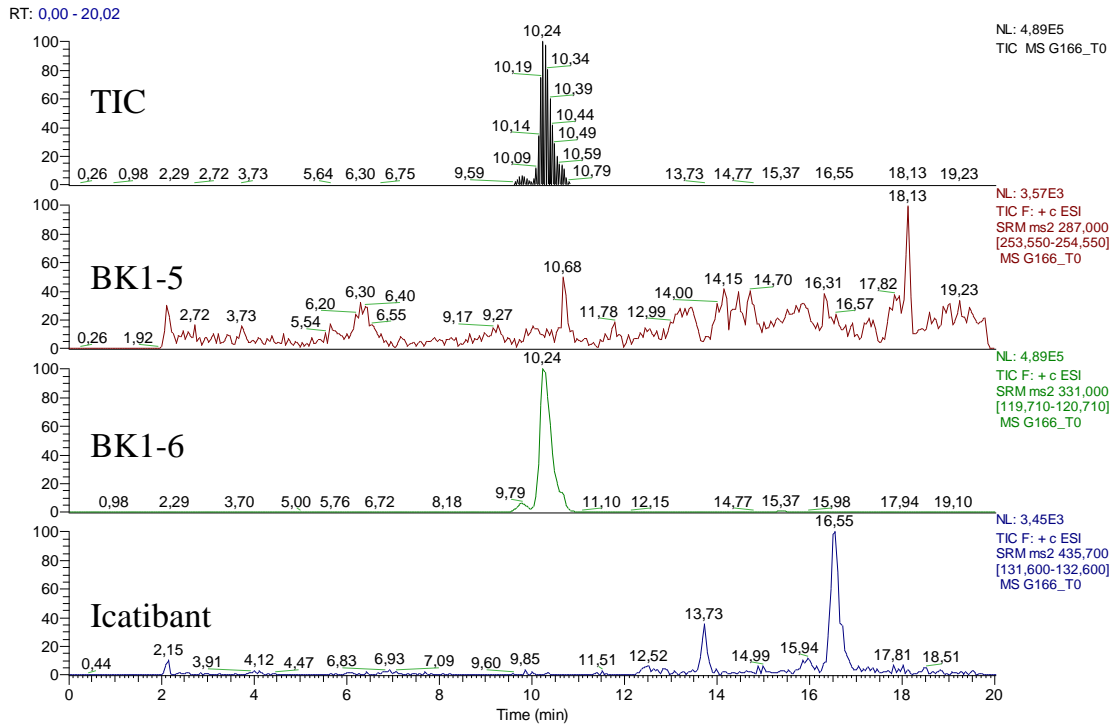
Figur 25: Kromatogram over en av parallellene til eksperiment 4, der TIC og ioneuttrekk for BK1-5 og BK1-6 vises.

Eksperiment 5 kunne ikke analyseres grunnet en sterk misfarging av løsningen som følge av citrat i prøven. Citrat er en chelator for metallioner, slik at en effekt tilsvarende EDTA ville kunne være å forvente. Resultatet ville dermed trolig vært en effekt av den kraftige aktiveringen fra DXS som sett i eksperiment 3, kombinert med en trolig hemming av BK1-5 dannelse fra bradykinin som i eksperiment 4.

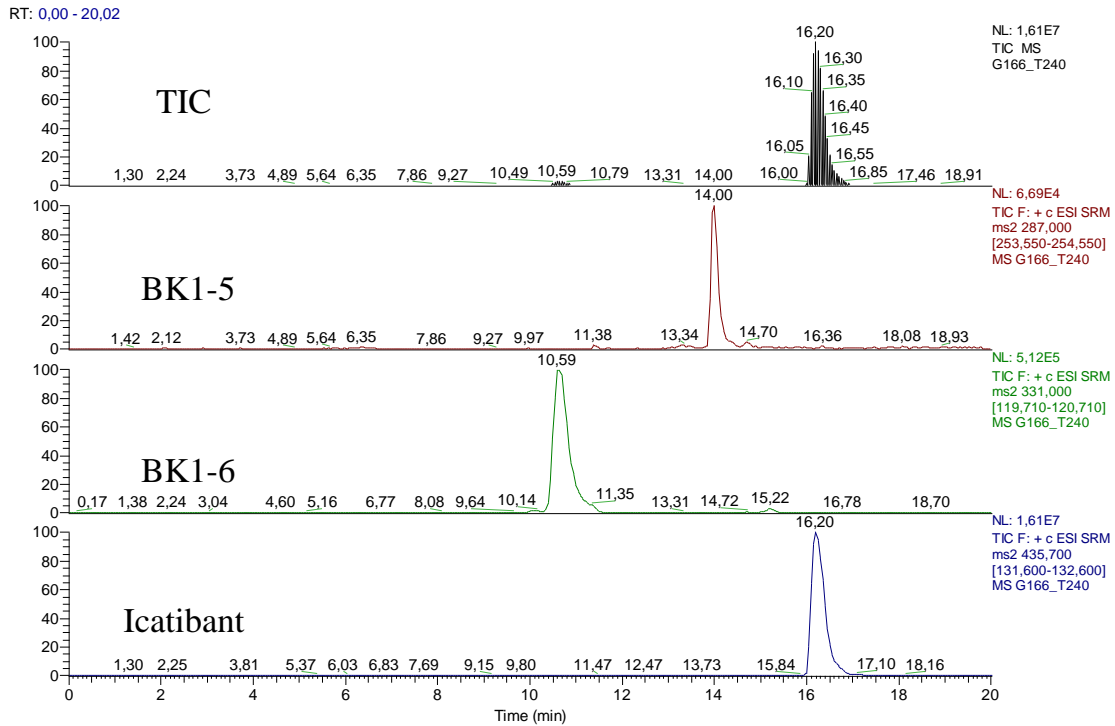
Analysene viste at metoden fungerer godt med stabile retensjonstider, lite forurensninger og god separasjon mellom signalene. Parallellene viste minimalt med variasjon i BK1-5/BK1-6 forholdet og resultatene fra eksperimentene fulgte de forventede resultatene godt. Metoden ser derfor, ut fra disse dataene, ut til å fungere bra for humane prøver, med en deteksjonsgrense som trolig ligger nært det man kan forvente som endogent nivå.

### 6.5.2 Sammenlikning av BK1-5 nivået før og etter sepsis hos gris

Analysene foretatt på prøvene fra gris fra icatibantstudiet viste en klar forskjell mellom prøvene for T-basis og T240, der man kan se en markant økning i et signal med  $m/z$ -overgang som skulle tilsi BK1-5 (se Figur 26 og 27). De fleste prøvene ga ikke noe detekterbart signal ved T-basis, og i de få der dette ble sett var det under kvantifiserbar grense. Retensjonstiden er dog noe ulik det som har blitt observert i standarder og de fleste humane prøver (se Tabell 15), med en tid på  $14,00 \pm 0,03$  minutter i prøvene fra gris gjort i dette forsøket (et lignende signal ble observert i figur 23 i eksperimentet der koagulert blod ble analysert). En lav topp rundt 10,65-10,70 minutter ble observert i de fleste prøvene og kunne utfra retensjonstider observert i kalibreringsprøvene (se vedlegg 3) tenkes å være BK1-5, men denne sammenfaller ikke med økningen i signalene observert i T240-prøvene (se Figur 26 og 27). Det delvis koeluerende signalet ved BK1-6 (beskrevet under 6.4) er fortsatt synlig, men er minimal i forhold til signalet fra tilsatt BK1-6 etter en tidobling i tilsatt mengde. Alle standardprøvene som ble analysert med jevne mellomrom under analyseperioden viste at metoden fungerte som forventet, uten noen nevneverdige avvik i verken retensjonstid eller BK1-5/BK1-6 forhold. Tabell over resultatene fra alle analysene av de biologiske prøvene fra gris er vist i vedlegg 2.

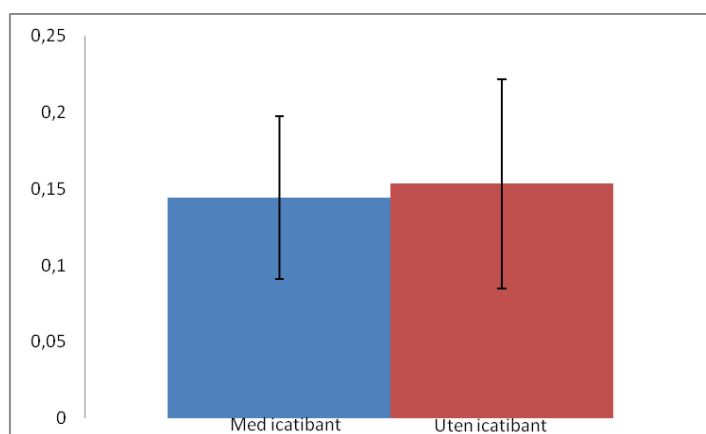


Figur 26: Kromatogram over den ene T-Basis prøven fra gris nummer 166. Både TIC og ioneuttrekk for BK1-5, BK1-6 og icatibant vises.



Figur 27: Kromatogram over den ene T240 prøven fra gris nummer 166. Både TIC og ioneuttrekk for BK1-5, BK1-6 og icatibant vises.

Icatibant kan tydelig observeres i de prøvene der dette er gitt, med en kraftig respons (se Figur 27) som også fører til relativt mye carryover i påfølgende blankprøver med mobilfase A, og er mulig årsaken til en topp med icatibants  $m/z$ -overgang, samt en noe tregere retensjonstid enn forventet, i de fleste prøvene som fulgte første prøve med icatibant (se Figur 26). Noen klar angivelse av mengde er derfor ikke mulig å estimere, men responsen gir et tydelig svar på hvor icatibant er gitt og ikke, et svar som også er bekreftet fra forsøksoversikten hos Rikshospitalet. En sammenlikning av BK1-5 nivået i grisene der icatibant er gitt mot der det ikke er gitt viser ingen signifikant forandring i BK1-5 nivået, noe som heller ikke var forventet (se Figur 28).



*Figur 28: Sammenlikning av BK1-5/BK1-6 forholdet for griser ved T240, der icatibant er gitt og ikke, med tilhørende standardavvik. (n=8 for gruppen med icatibant og 10 for gruppen uten)*

Ved disse analysene ser man også en del av den samme tendensen som ble sett under valideringsforsøket med relativt store avvik mellom parallellene. Retensjonstiden for BK1-5 var her relativt konstant i de fleste prøvene bortsett fra i kalibreringskurven der tilsatt BK1-5 viste både en annen retensjonstid og en langt større variasjon enn i prøvene med endogent BK1-5 (se vedlegg 3). BK1-6 viste stor variasjon i retensjonstid for alle prøvene tatt fra gris, og en delvis koeluerende topp med samme  $m/z$ -overgang, som også ble sett under valideringen, var å observere i samtlige prøver (også i kontrollprøvene uten tilsatt intern standard), men utgjorde her et minimalt bidrag grunnet en økning i tilsatt mengde BK1-6 med en faktor på ti.



Basert på de store avvikene sett her mellom paralleller og på retensjonstider, sammenliknet med standardprøver og humane prøver, ser det ut til at det er en bestanddel i de opparbeidede prøvene fra gris som interferer betydelig med analysen. En mulig forklaring kan være at BK1-5 og BK1-6 bindes svakt til denne bestanddelen, noe som fører til at retensjonstiden er lenger og at signalet varierer avhengig av bindingsgraden. Grunnet en del synlige partikler i prøvene før prøveoppbeidelsen vil det her også være en viss forskjell i andelen partikler som har blitt med i hver parallell. De større partiklene vil synke til bunns og det vil være en høyere sannsynlighet for at en større andel av disse er kommet med i det andre prøveuttaket, noe som kan gi forskjeller i de to parallellene. En annen mulig forklaring på forskjellen i retensjonstid kan være tilstedeværelsen av en ulik enantiomer av BK1-5 hos gris enn den som finnes hos menneske og i standardene brukt under oppgaven. Endringer i bradykininmetabolismen er sett som følge av bakteriell påvirkning i en tidligere studie[77], og det kan ikke utelukkes at bakteriell påvirkning av kallikrein-kinin-systemet kan ha forårsaket en mulig endring i BK1-5 her. Tilstedeværelsen av et lignende signal i de humane prøvene som hadde gjennomgått koagulasjon (se Figur 23) kan tyde på at dette er en prosess som også er til stede hos mennesker, men som skjer gradvis over tid eller når prøvene blir utsatt for ulike stimuli. Dette er alle teorier det kunne vært interessant å utforske videre i senere forsøk.

Mangel på optimale kalibreringskurver grunnet forskjell i retensjonstid på BK1-5 mellom kalibrering og de biologiske prøvene, samt store variasjoner i resultater mellom parallellene, gjør det vanskelig å trekke noen konkrete slutninger fra resultatene når det gjelder mengde BK1-5. Et visst estimat, vist i vedlegg 2, er foretatt utfra avlesning av kalibreringskurven gjort i forbindelse med dette forsøket (utfra likningen  $y=0,0654x + 0,0599$  med en  $r^2$ -verdi på 0,9995) (se vedlegg 3) og et gjennomsnitt av de to parallellene. Ved å gjøre et estimat for BK1-5 responsen ved T240 på gjennomsnittet av alle prøvene, ender man på en beregnet konsentrasjon på  $1,62 \pm 0,95$  ng/mL utfra kalibreringskurven. T-basis prøvene var i alle tilfeller under kvantifiserbar grense, selv om noen av dem kan detekteres, noe som vil tilsi at

konsentrasjonen er lavere enn 50 pg/mL blod. Selv om man utfra disse forsøkene ikke kan tallfeste økningen utgjør det en betydelig forskjell. Det ser dermed ut til at bradykinineksponeringen under sepsis er relativt kraftig økt i forhold til det normale nivået, noe som tyder på at bradykinin kan spille en viss rolle i sepsis.

*Tabell 20: Tabell over beregnet konsentrasjon av BK1-5 ved T-basis og T240 for gjennomsnittet av alle prøvene.*

<i>Tid</i>	<i>Gjennomsnittlig beregnet konsentrasjon</i>
<b>T-Basis</b>	<50 pg/mL (under kvantifiseringsgrense i alle tilfeller)
<b>T240</b>	1,62 ± 0,95 ng/mL

## 6.6 Feilkilder

Den begrensede mengden prøvemateriale fra gris førte til at humant blod ble brukt som surrogatmatriks, og samtlige optimaliseringsforsøk ble dermed gjort på enten denne eller på vandige standarder av de aktuelle peptidene. Dette er ikke en fullgod erstatning for blod fra gris. Selv om blod ofte er relativt likt mellom arter kan likevel forskjeller av betydning for både kromatografi og deteksjon oppstå, noe som kom tydelig frem under analyse av prøver fra gris i denne oppgaven (se 6.4 og 6.5.2.) Dersom fler prøver hadde vært tilgjengelig hadde det vært en fordel å utføre en grundigere optimalisering og validering av metoden opp mot blodprøver fra gris.

Mangel på stabilitetstester av BK1-5 og BK1-6 i aktuell matriks, under prøveopparbeidelse og analyse i valideringen er en betydelig begrensning. Dette ble ikke foretatt grunnet det store antallet prøver som kreves for å utføre en grundig test av stabiliteten, noe som ikke var tilgjengelig. Det kan dermed tenkes at noe av det lave utbyttet observert hos spesielt prøver fra gris (se 6.4.5) kan skyldes et stabilitetsproblem.

---

En rekke av prøvene måtte tidvis stå nedfrost etter opparbeidelse over lengre tid før de kunne bli analysert, grunnet periodevise nedetider for instrumentene. Spesielt kritisk var dette for valideringsprøvene som helst bør være ferske, men grunnet begrenset prøvemateriale kunne de ikke lages på nytt.

## 7. Konklusjon

I denne oppgaven har det blitt utviklet en metode for deteksjon av Bradykinin 1-5 i fullblod basert på tidligere arbeid av Murphey et al.[1, 2]. Metoden baserer seg på en inaktivering og felling av fullblod ved hjelp av etanol, videre opprensning gjennom SPE og påfølgende analyse ved hjelp av LC-MS/MS. Utover deteksjon av BK1-5 har metoden også vist seg å være egnet for deteksjon av bradykinin 1-6, som her er brukt som intern standard, i tillegg til icatibant, et legemiddel brukt i forbindelse med arereditært angioødem for å hemme bradykinins virkning gjennom bradykinin B<sub>2</sub> reseptoren[55].

Metoden har gjennom en rekke forsøk vist seg å fungere godt på humant blod, både spiket og uspiket, der konsentrasjoner nær endogent nivå er detektert. En test med humane blodprøver, gjennom et utvalg *in vitro* eksperimenter, som skulle stimulere og hemme bradykinin og BK1-5 dannelse, viste at metoden fungerte som forventet. Metoden så dermed ut til å oppfylle målene om en stabil og robust metode, satt i startfasen av oppgaven.

Prøver analysert på blod fra gris viste derimot visse avvik fra de humane prøvene og standardene, ved at disse hadde variable retensjonstider og relativt store variasjoner mellom parallellene. Valideringsforsøkene som ble gjort på disse prøvene falt noe utenfor de kravene som var satt for noen av parametrene, spesielt nøyaktighet og utbytte, til tross for at de innledende forsøkene, gjort på humant blod som surrogatmatriks, viste lovende resultater. Metoden kunne likevel brukes til å se tendenser i prøvene fra griser inkludert i icatibantstudiet på Rikshospitalet i Oslo, noe som var det andre hovedmålet for denne oppgaven.

De biologiske prøvene fra griser i icatibantstudien viste at bradykinin og BK1-5 ble dannet i betydelige mengder etter at grisene hadde blitt påført sepsis, sett ved at prøvene tatt ved T-basis viste minimale eller ingen tegn til BK1-5, mens prøvene tatt

---

ved T240 viste et klart signal. Sammenlikning av BK1-5 dannelse der icatibant var gitt og ikke, viste ingen klare forskjeller.

Selv om prøvene gjort på blod fra gris ikke viste seg å fungere optimalt med metoden som var satt opp, og at man dermed ikke kan bruke dataene til å gi et klart svar på konsentrasjonsforskjeller, kan man likevel se en økning fra en udetekterbar mengde (<50 pg/mL) ved T-basis til en konsentrasjon på  $1,62 \pm 0,95$  ng/mL ved T240. Denne økningen tilsier at bradykinineksponeringen har vært betydelig økt under sepsis og at bradykinin blir dannet under patogenesen.

For å få en optimal analysemetode for prøver tatt fra gris krever metoden noe mer optimalisering på aktuell matriks, noe som ikke var mulig her grunnet begrenset prøvemateriale. Det er likevel trolig mer aktuelt for senere forskning at metoden fungerer optimalt på humant blod, noe denne metoden ser ut til å gjøre, selv om dette må bekreftes gjennom validering på human matriks. Implementering og bruk av metoden utviklet her kan vise seg svært nyttig i videre forskning på bradykinin og dets metabolitter, og deres rolle i ulike sykdommer, noe det er nødvendig å gjøre ytterligere forskning på.

## Kildeliste

1. Murphey, L.J., et al., *Metabolism of bradykinin in vivo in humans: Identification of BK1-5 as a stable plasma peptide metabolite*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2000. **294**(1): p. 263-269.
2. Murphey, L.J., et al., *Quantification of BK1-5, the stable bradykinin plasma metabolite in humans, by a highly accurate liquid-chromatographic tandem mass spectrometric assay*. Anal Biochem, 2001. **292**(1): p. 87-93.
3. Leeb-Lundberg, L.M., et al., *International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences*. Pharmacol Rev, 2005. **57**(1): p. 27-77.
4. Wang, D.Z., L. Chao, and J. Chao, *Hypotension in transgenic mice overexpressing human bradykinin B2 receptor*. Hypertension, 1997. **29**(1 Pt 2): p. 488-93.
5. Linz, W., et al., *Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors*. Pharmacol Rev, 1995. **47**(1): p. 25-49.
6. Karlsrud, T.S., et al., *Cleavage of plasma high molecular weight kininogen in surgical ICU patients*. Intensive Care Medicine, 1996. **22**(8): p. 760-765.
7. Bhoola, K.D., C.D. Figueroa, and K. Worthy, *Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases*. Pharmacol Rev, 1992. **44**(1): p. 1-80.
8. Joseph, K. and A.P. Kaplan, *Formation of bradykinin: a major contributor to the innate inflammatory response*. Adv Immunol, 2005. **86**: p. 159-208.
9. Asmis, L.M., et al., *Contact system activation in human sepsis - 47kD HK, a marker of sepsis severity?* Swiss Medical Weekly, 2008. **138**(9-10): p. 142-149.
10. Groeneveld, A.B., W. Bronsveld, and L.G. Thijs, *Hemodynamic determinants of mortality in human septic shock*. Surgery, 1986. **99**(2): p. 140-53.
11. Mccarthy, D.A., D.E. Potter, and Nicolaid.Ed, *An in Vivo Estimation of Potencies and Half-Lives of Synthetic Bradykinin and Kallidin*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1965. **148**(1): p. 117-&.
12. Sheikh, I.A. and A.P. Kaplan, *Mechanism of digestion of bradykinin and lysylbradykinin (kallidin) in human serum. Role of carboxypeptidase, angiotensin-converting enzyme and determination of final degradation products*. Biochem Pharmacol, 1989. **38**(6): p. 993-1000.
13. Alberts, B., et al., *Essential Cell Biology*. 2 ed. 2004, New York: Garland Science.
14. Hauge, J.G., R.K. Aakvaak, and T.B. Christensen, *Biokjemi: En grunnbok*. 4 ed. 2001, Oslo: Universitetsforlaget.
15. Widmaier, E.P., H. Raff, and K.T. Strang, *Vander's Human Physiology: The Mechanisms og Body Function*. 10 ed. 2006, New York: McGraw-Hill.

16. Nelson, D.L. and M.M. Cox, *Lehninger: Principles of Biochemistry*. 4 ed. 2005, New York: W. H. Freeman and Company.
17. Rocha, E.S.M., W.T. Beraldo, and G. Rosenfeld, *Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin*. *Am J Physiol*, 1949. **156**(2): p. 261-73.
18. Elliott, D.F., G.P. Lewis, and E.W. Horton, *The Structure of Bradykinin - a Plasma Kinin from Ox Blood*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1960. **3**(1): p. 87-91.
19. Boissonnas, R.A., et al., *Synthesis and Biological Activity of Peptides Related to Bradykinin*. *Experientia*, 1960. **16**(7): p. 326-326.
20. *Bradykinin - PubChem Public Chemical Database*, National Center for Biotechnology Information.
21. Silverberg, M. and A.P. Kaplan, *Enzymatic-Activities of Activated and Zymogen Forms of Human Hageman-Factor (Factor-Xii)*. *Blood*, 1982. **60**(1): p. 64-70.
22. Tankersley, D.L. and J.S. Finlayson, *Kinetics of Activation and Autoactivation of Human Factor-Xii*. *Biochemistry*, 1984. **23**(2): p. 273-279.
23. Mandle, R.J., R.W. Colman, and A.P. Kaplan, *Identification of prekallikrein and high-molecular-weight kininogen as a complex in human plasma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1976. **73**(11): p. 4179-83.
24. Griffin, J.H. and C.G. Cochrane, *Mechanisms for the involvement of high molecular weight kininogen in surface-dependent reactions of Hageman factor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1976. **73**(8): p. 2554-8.
25. Reddigari, S. and A.P. Kaplan, *Cleavage of human high-molecular weight kininogen by purified kallikreins and upon contact activation of plasma*. *Blood*, 1988. **71**(5): p. 1334-40.
26. Pixley, R.A., M. Schapira, and R.W. Colman, *The Regulation of Human Factor-Xiia by Plasma Proteinase-Inhibitors*. *Journal of Biological Chemistry*, 1985. **260**(3): p. 1723-1729.
27. Mcconnel.Dj, *Inhibitors of Kallikrein in Human Plasma*. *Journal of Clinical Investigation*, 1972. **51**(7): p. 1611-&.
28. Jacobsen, S. and M. Kriz, *Some data on two purified kininogens from human plasma*. *Br J Pharmacol Chemother*, 1967. **29**(1): p. 25-36.
29. Sainz, I.M., R.A. Pixley, and R.W. Colman, *Fifty years of research on the plasma kallikrein-kinin system: From protein structure and function to cell biology and in-vivo pathophysiology*. *Thrombosis and Haemostasis*, 2007. **98**(1): p. 77-83.
30. Mulleresterl, W., et al., *Limited Proteolysis of Human Low-Molecular-Mass Kininogen by Tissue Kallikrein - Isolation and Characterization of the Heavy and the Light-Chains*. *European Journal of Biochemistry*, 1985. **149**(1): p. 15-22.
31. Ferreira, S.H. and J.R. Vane, *Disappearance of Bradykinin and Eledoisin in Circulation and Vascular Beds of Cat*. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 1967. **30**(2): p. 417-&.

32. Kuoppala, A., et al., *Inactivation of bradykinin by angiotensin-converting enzyme and by carboxypeptidase N in human plasma*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000. **278**(4): p. H1069-74.
33. Sheikh, I.A. and A.P. Kaplan, *Studies of the digestion of bradykinin, Lys-bradykinin, and des-Arg9-bradykinin by angiotensin converting enzyme*. *Biochem Pharmacol*, 1986. **35**(12): p. 1951-6.
34. Dorer, F.E., et al., *Hydrolysis of bradykinin by angiotensin-converting enzyme*. *Circ Res*, 1974. **34**(6): p. 824-7.
35. Kaplan, A.P., I. Sheikh, and M.H. Frensch, *Assessment of histamine release and kinin formation in man: identification of kinin degradation products and characterization of a lymphocyte-dependent histamine releasing factor*. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1985. **77**(1-2): p. 64-8.
36. Erdos, E.G. and E.M. Sloane, *An Enzyme in Human Blood Plasma That Inactivates Bradykinin and Kallidins*. *Biochemical Pharmacology*, 1962. **11**(Jul): p. 585-&.
37. Sheikh, I.A. and A.P. Kaplan, *Studies of the digestion of bradykinin, lysyl bradykinin, and kinin-degradation products by carboxypeptidases A, B, and N*. *Biochem Pharmacol*, 1986. **35**(12): p. 1957-63.
38. Brabe, J., et al., *Receptors for bradykinin in intestinal and uterine smooth muscle*. *Can J Physiol Pharmacol*, 1977. **55**(6): p. 1270-85.
39. Regoli, D., J. Barabe, and W.K. Park, *Receptors for bradykinin in rabbit aortae*. *Can J Physiol Pharmacol*, 1977. **55**(4): p. 855-67.
40. Bastian, S., et al., *Stable expression of human kinin B1 receptor in 293 cells: pharmacological and functional characterization*. *Br J Pharmacol*, 1997. **122**(2): p. 393-9.
41. Hess, J.F., et al., *Differential pharmacology of cloned human and mouse B2 bradykinin receptors*. *Mol Pharmacol*, 1994. **45**(1): p. 1-8.
42. LeebLundberg, L.M.F., S.A. Mathis, and M.C.S. Herzig, *Antagonists of Bradykinin That Stabilize a G-Protein-Uncoupled State of the B2 Receptor Act as Inverse Agonists in Rat Myometrial Cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 1994. **269**(42): p. 25970-25973.
43. Leeb-Lundberg, L.M., et al., *The human B1 bradykinin receptor exhibits high ligand-independent, constitutive activity. Roles of residues in the fourth intracellular and third transmembrane domains*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(12): p. 8785-92.
44. Figueroa, C.D., et al., *Differential distribution of bradykinin B-2 receptors in the rat and human cardiovascular system*. *Hypertension*, 2001. **37**(1): p. 110-120.
45. Bhoola, R., et al., *Kinin receptor status in normal and inflamed gastric mucosa*. *Immunopharmacology*, 1997. **36**(2-3): p. 161-5.
46. Ricupero, D.A., et al., *Des-Arg(10)-kallidin engagement of the B1 receptor stimulates type I collagen synthesis via stabilization of connective tissue growth factor mRNA*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(17): p. 12475-80.



47. Wu, J., et al., *Identification of bradykinin receptors in clinical cancer specimens and murine tumor tissues*. International Journal of Cancer, 2002. **98**(1): p. 29-35.
48. Davis, A.J. and M.N. Perkins, *Induction of B1 receptors in vivo in a model of persistent inflammatory mechanical hyperalgesia in the rat*. Neuropharmacology, 1994. **33**(1): p. 127-33.
49. Smith, D., M. Gilbert, and W.G. Owen, *Tissue plasminogen activator release in vivo in response to vasoactive agents*. Blood, 1985. **66**(4): p. 835-9.
50. Brown, N.J., et al., *Bradykinin stimulates tissue plasminogen activator release from human forearm vasculature through B-2 receptor-dependent, NO synthase-independent, and cyclooxygenase-independent pathway*. Circulation, 2000. **102**(18): p. 2190-2196.
51. Hasan, *Bradykinin and its metabolite, Arg-Pro-Pro-Gly-Phe, are selective inhibitors of alpha-thrombin-induced platelet activation (vol 94, pg 517, 1996)*. Circulation, 1996. **94**(7): p. 1794-1794.
52. Elliott, D.F., E.W. Horton, and G.P. Lewis, *Actions of Pure Bradykinin*. Journal of Physiology-London, 1960. **153**(3): p. 473-480.
53. Nielsen, E.W., et al., *Activation of the complement, coagulation, fibrinolytic and Kallikrein-Kinin systems during attacks of hereditary angioedema*. Scandinavian Journal of Immunology, 1996. **44**(2): p. 185-192.
54. Nussberger, J., et al., *Plasma bradykinin in angio-oedema*. Lancet, 1998. **351**(9117): p. 1693-1697.
55. *Firazyr SPC*. 2009, Statens Legemiddelverk: Oslo.
56. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Legemiddelanalyse*. 2004, Bergen: Fagbokforlaget.
57. Taylor, P.J., *Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry*. Clin Biochem, 2005. **38**(4): p. 328-34.
58. King, R., et al., *Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization*. J Am Soc Mass Spectrom, 2000. **11**(11): p. 942-50.
59. Bodzon-Kulakowska, A., et al., *Methods for samples preparation in proteomic research*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007. **849**(1-2): p. 1-31.
60. Blevins, D.D., et al., *Handbook of Sorbent Extraction Technology*, Palo Alto: Varian inc.
61. Lim, C.K. and G. Lord, *Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2002. **25**(5): p. 547-557.
62. Niessen, W.M., *State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry*. J Chromatogr A, 1999. **856**(1-2): p. 179-97.
63. Liebler, D.C., *Introduction to Proteomics: Tools for the New Biology*. 2002, Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.
64. Fenn, J.B., et al., *Electrospray Ionization for Mass-Spectrometry of Large Biomolecules*. Science, 1989. **246**(4926): p. 64-71.

65. Niessen, W.M.A., *Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening*. Journal of Chromatography A, 2003. **1000**(1-2): p. 413-436.
66. Schaap, P. *Mass spectrometry of peptides and proteins*. 2002 [cited 2010 22.04]; Available from: [http://www.ctu.edu.vn/~dvxe/Bioinformatic%20course/mod2/mod2\\_0.html#Literature](http://www.ctu.edu.vn/~dvxe/Bioinformatic%20course/mod2/mod2_0.html#Literature).
67. Lemière, P., *Mass Analysers for LC-MS*. LC-GC Europe, 2001. **Guide to LC-MS**.
68. Tissue, B.M. *CHP - Quadrupole Mass Spectrometry*. 2000 [cited 2010 29.03]; Available from: <http://www.files.chem.vt.edu/chem-ed/ms/quadrupo.html>.
69. Reubsæet, L., *Mass analysers in LC-MS, kompendium til FRM5310*, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.
70. Johnson, R.S., S.A. Martin, and K. Biemann, *Collision-Induced Fragmentation of (M+H)+Ions of Peptides - Side-Chain Specific Sequence Ions*. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 1988. **86**: p. 137-154.
71. van den Broek, I., et al., *Quantitative bioanalysis of peptides by liquid chromatography coupled to (tandem) mass spectrometry*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008. **872**(1-2): p. 1-22.
72. Johnson, R.S., et al., *Novel Fragmentation Process of Peptides by Collision-Induced Decomposition in a Tandem Mass-Spectrometer - Differentiation of Leucine and Isoleucine*. Analytical Chemistry, 1987. **59**(21): p. 2621-2625.
73. *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. 2001, U.S department of Health and Human services: Food and Drug Administration: Rockville.
74. Marshall, P., et al., *Study of bradykinin metabolism in human and rat plasma by liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry and orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2002. **16**(3): p. 220-8.
75. Apffel, A., et al., *Enhanced sensitivity for peptide mapping with electrospray liquid chromatography-mass spectrometry in the presence of signal suppression due to trifluoroacetic acid-containing mobile phases*. J Chromatogr A, 1995. **712**(1): p. 177-90.
76. *ProteinProspector v 5.5.0*. 1996 [cited 2010 27.04]; Available from: <http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>.
77. Bengtson, S.H., et al., *Activation of TAFI on the surface of Streptococcus pyogenes evokes inflammatory reactions by modulating the kallikrein/kinin system*. J Innate Immun, 2008. **1**(1): p. 18-28.

## Vedlegg 1

Vedlegget er utviklet på Rikshospitalet i Oslo og viser en oversikt over prøvene som er tatt i icatibantstudien. Oversikten viser dato og klokkeslett for når prøvene er tatt, hvilken gris det er tatt fra, om prøven er tatt ved T-basis (før noen inngrep er gjort) eller T240 (etter fire timer), når prøvene ble sentrifugert, antall rør de er plassert i og volumet av disse. Prøvene der det ikke er noen informasjon er ekskludert fra studien av ulike årsaker. Fra gris 178, 179 og 181 er det hentet ut ekstra prøver til bruk som teknisk kontroll.

DATO	Gris		Prøve	Prøve tatt	Prøve sentrifugert	Frosset		
						Ant rør	Volum pr.rør	Plassert
04.12.2008	G-155	5.Pilot-icatibant	T0			3	5,5ml	Eske-1
15.01.2009	G162	1.Icatibant	TBasis	10:00	11:05	2	~8ml	Eske-1
15.01.2009	G162	1.Icatibant	T240	14:15	15:15	2	~8ml	Eske-1
22.01.2009	G163	2.Icatibant	Tbasis	09:40	10:40	2	~8ml	Eske-1
22.01.2009	G163	2.Icatibant	T240	14:50	15:50	2	~8ml	Eske-1
28.01.2009	G164	3.Icatibant	TBasis	09:40	10:40	2	~8ml	Eske-1
28.01.2009	G164	3.Icatibant	T240	13:57	15:00	2	~8ml	Eske-1
29.01.2009	G165	4.Icatibant	TBasis	10:00	11:05	2	~8ml	Eske-1
29.01.2009	G165	4.Icatibant	T240	14:15	15:15	2	~8ml	Eske-1
04.02.2009	G166	5.Icatibant	TBasis	09:20	09:30	2	~8ml	Eske-2
04.02.2009	G166	5.Icatibant	T240	13:30	14:30	2	~8ml	Eske-2
05.02.2009	G167	6.Icatibant						
05.02.2009	G167	6.Icatibant						
11.02.2009	G168	7.Icatibant	TBasis	09:55	11:00	2	~8ml	Eske-2
11.02.2009	G168	7.Icatibant	T240	14:05	15:05	2	~8ml	Eske-2
12.02.2009	G169	8.Icatibant	TBasis	09:20	10:25	2	~8ml	Eske-2
12.02.2009	G169	8.Icatibant	T240	13:35	14:35	2	~8ml	Eske-2
25.02.2009	G170	9.Icatibant	TBasis	09:40	10:40	2	~8ml	Eske-2

25.02.2009	G170	9.Icatibant	T240	13:45	15:30	2	~8ml	Eske-2
26.02.2009	G171	10.Icatibant	TBasis			2	~8ml	Eske-2
26.02.2009	G171	10.Icatibant	T240			2	~8ml	Eske-2
03.03.2009	G172	11.Icatibant	TBasis	09:10	10:10	2	~8ml	Eske-3
03.03.2009	G172	11.Icatibant	T240	13:20	14:20	2	~8ml	Eske-3
04.03.2009	G173	12.Icatibant	TBasis	09:10	10:10	2	~8ml	Eske-3
04.03.2009	G173	12.Icatibant	T240	13:20	14:20	2	~8ml	Eske-3
05.03.2009	G174	13.Icatibant	TBasis	09:20	10:25	2	~8ml	Eske-3
05.03.2009	G174	13.Icatibant	T240	14:30	15:35	2	~8ml/~5ml	Eske-3
11.03.2009	G175	14.Icartibant	Tbasis	09:35	14:35	2	~8ml	Eske-3
11.03.2009	G175	14.Icartibant	T240	13:35	14:35	2	~8ml	Eske-3
12.03.2009	G176	15.Icartibant	TBasis	915	1015	2	~8ml	Eske-4
12.03.2009	G176	15.Icartibant	T240	13:35	13:35	2	~8ml	Eske-4
19.03.2009	G177	16.Icartibant	TBasis	09:15	10:15	2	~8ml	Eske-4
19.03.2009	G177	16.Icartibant	T240	13:25	14:25	2	~8ml	Eske-4
24.03.2009	G178	17.Icartibant	TBasis	09:15	10:15	2	~8ml	Eske-4
24.03.2009	G178	17.Icatibant	TBasis	09:15	10:15	2	~8ml	Eske 5 (tekn. Ktr)
25.03.2009	G179	18.Icatibant	TBasis	09:30	10:30	2	~8ml	Eske-4
25.03.2009	G179	18.Icatibant	TBasis	09:30	10:30	2	~8ml	Eske 5 (tekn. Ktr)
25.03.2009	G179	18.Icatibant	T240			2	~8ml	Eske-4
25.03.2009	G179	18.Icatibant	T240			2	~8ml	Eske 5 (tekn. Ktr)
26.03.2009	G180	19.Icatibant	TBasis					
26.03.2009	G180	19.Icatibant	TBasis					
01.04.2009	G181	20.Icatibant	TBasis	09:00	10:15	2	~8ml	Eske-4
01.04.2009	G181	20.Icatibant	TBasis	09:00	10:15	2	~8ml	Eske 5 (tekn. Ktr)
01.04.2009	G181	20.Icatibant	T240	13:15	14:15	2	~8ml	Eske-4
01.04.2009	G181	20.Icatibant	T240	13:15	14:15	2	~8ml	Eske 5 (tekn. Ktr)
02.04.2009	G182	21.Icatibant	TBasis	09:15	10:30	2	~8ml	Eske-4
02.04.2009	G182	21.Icatibant	T240	13:15	14:15	2	~8ml	Eske-4

EKSKLUDERT  
EKSKLUDERT

EKSKLUDERT  
EKSKLUDERT

## Vedlegg 2

Vedlegget viser en tabell over resultatene etter analyse av prøvene av griser i icatibantstudien. Tabellen viser retensjonstid og målt topphøyde for både BK1-5 og BK1-6, samt forholdet mellom disse. I tillegg er konsentrasjonen beregnet for gjennomsnittet av de to parallellene der dette var mulig, basert på kalibreringskurven gjort i forbindelse med dette forsøket. Prøvene der icatibant er observert vises også i oversikten. For tre av prøvene (en av G165 T0 og begge parallellene av G165 T240) oppstod det en feil i kromatografien som førte til et dobbeltsignal for BK1-6, og det har dermed ikke blitt utført videre beregninger med disse. En av parallellene til G168 T240 mangler intern standard. Det lave signalet for BK1-6 i den ene parallellen til G169 T0, G172 T0 og G176 T0, skyldes at disse ved en feil ble reløst i dobbel mengde mobilfase A i trinn 8 i prosedyren under 5.3.2.

Prøve	retensjonstid BK1-5	retensjonstid BK1-6	topphøyde BK1-5	topphøyde BK1-6	BK1-5/BK1-6	Konsentrasjon BK1-5 (ng/mL)	icatibant
G162 Tbas		10,29		429898	0		
G162 Tbas		10,39		429175	0		
G162 T240	14,00	10,94	69391	379309	0,183	1,03	ja
G162 T240	14,05	11,00	24782	344379	0,072		ja
G163 Tbas		10,79		443418	0		
G163 Tbas		10,80		383760	0		
G163 T240	14,05	11,05	68792	267367	0,257	2,53	
G163 T240	14,00	11,05	71993	371748	0,194		
G164 Tbas		10,29		483400	0		
G164 Tbas		10,29		472064	0		
G164 T240	14,05	10,84	54613	401362	0,136	1,44	
G164 T240	14,00	10,89	71090	412643	0,172		

<b>G165 Tbas</b>		10,34		507557	0		
<b>G165 Tbas</b>							
<b>G165 T240</b>	14,00		3362383				ja
<b>G165 T240</b>	14,00		2267245				ja
<b>G166 Tbas</b>		10,24		488606	0		
<b>G166 Tbas</b>		10,19		448927	0		
<b>G166 T240</b>	14,00	10,59	66457	510929	0,130	1,09	ja
<b>G166 T240</b>	14,00	10,64	56396	427667	0,132		ja
<b>G168 Tbas</b>		9,99		472393	0		
<b>G168 Tbas</b>		10,19		360438	0		
<b>G168 T240</b>	13,95	10,69	81651	426484	0,191	2,01	ja
<b>G168 T240</b>	13,95		105009				ja
<b>G169 Tbas</b>		10,59		238896	0		
<b>G169 Tbas</b>		10,19		413085	0		
<b>G169 T240</b>	14,00	10,74	104455	385319	0,271	1,87	
<b>G169 T240</b>	14,05	10,74	41210	442931	0,093		
<b>G170 Tbas</b>		10,89		270727	0		
<b>G170 Tbas</b>		10,64		308763	0		
<b>G170 T240</b>	14,05	10,89	12925	307864	0,042	0,15	
<b>G170 T240</b>	14,05	10,89	35901	364733	0,098		
<b>G171 Tbas</b>		10,04		516536	0		
<b>G171 Tbas</b>		10,34		537726	0		
<b>G171 T240</b>	14,00	10,74	62179	361996	0,172	1,79	ja
<b>G171 T240</b>	14,00	10,74	72803	399531	0,182		ja
<b>G172 Tbas</b>		10,69		272199	0		
<b>G172 Tbas</b>		10,34		505234	0		
<b>G172 T240</b>	14,00	10,59	54800	472692	0,116	1,62	
<b>G172 T240</b>	14,00	10,69	86456	400576	0,216		
<b>G173 Tbas</b>	14,05	10,74	1520	444595	0,003		

<b>G173 Tbas</b>	14,05	10,79	1470	441000	0,003		
<b>G173 T240</b>	14,00	10,94	23420	477666	0,049	0,09	
<b>G173 T240</b>	14,05	10,94	29363	355986	0,082		
<b>G174 Tbas</b>	14,00	10,74	1393	423954	0,003		
<b>G174 Tbas</b>	14,00	10,54	1084	525045	0,002		
<b>G174 T240</b>	13,95	10,74	72643	398061	0,182	0,73	ja
<b>G174 T240</b>	14,05	10,59	15900	493000	0,032		ja
<b>G175 Tbas</b>	14,00	10,49	1251	441388	0,003		
<b>G175 Tbas</b>	14,05	10,54	1620	520280	0,003		
<b>G175 T240</b>	13,95	10,95	98170	474372	0,207	2,04	ja
<b>G175 T240</b>	14,00	11,00	61281	341056	0,180		ja
<b>G176 Tbas</b>		10,89		205695	0		
<b>G176 Tbas</b>		10,34		460046	0		
<b>G176 T240</b>	13,95	10,69	74381	507889	0,146	1,62	
<b>G176 T240</b>	13,95	10,64	94766	512071	0,185		
<b>G177 Tbas</b>	14,00	10,09	1252	545523	0,002		
<b>G177 Tbas</b>	14,00	10,24	1462	497676	0,003		
<b>G177 T240</b>	13,95	10,39	60709	538014	0,113	0,69	ja
<b>G177 T240</b>	14,00	10,54	42130	434681	0,097		ja
<b>G179 Tbas</b>		10,44		525463	0		
<b>G179 Tbas</b>		10,39		530126	0		
<b>G179 T240</b>	13,95	10,84	102291	427311	0,239	2,74	
<b>G179 T240</b>	14,00	10,89	93719	393574	0,238		
<b>G181 Tbas</b>		10,54		477685	0		
<b>G181 Tbas</b>		10,59		476950	0		
<b>G181 T240</b>	14,00	10,84	47976	460851	0,104	0,76	
<b>G181 T240</b>	14,00	10,89	59218	516311	0,115		
<b>G182 Tbas</b>		10,04		530987	0		
<b>G182 Tbas</b>		10,54		446473	0		

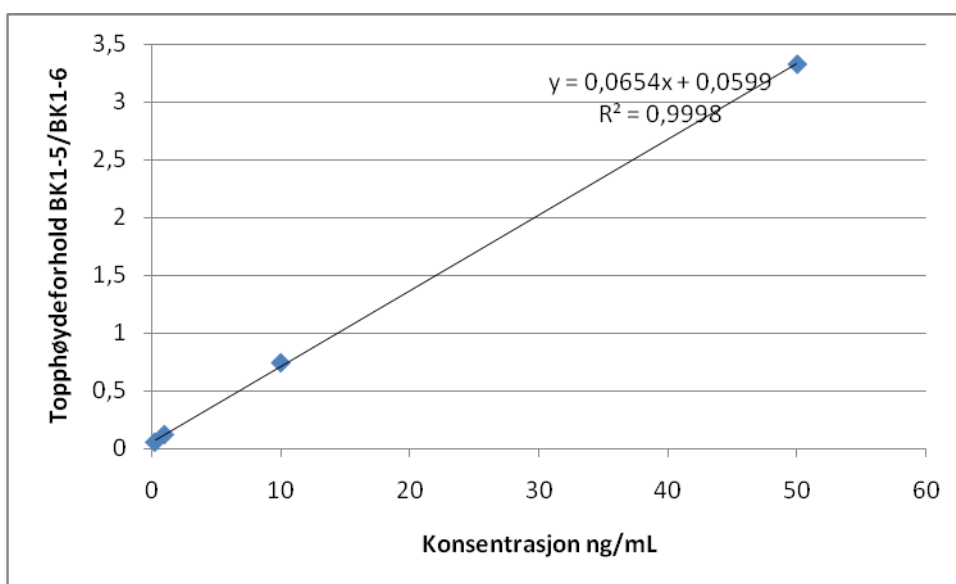
<b>G182 T240</b>	14,00	10,49	90543	480840	0,188	1,47
<b>G182 T240</b>	14,00	10,64	63061	508270	0,124	



## Vedlegg 3

Vedlegget viser en tabell over resultatene fra kalibreringen, samt kalibreringskurven til analysene på prøver fra griser i icatibantstudiet, beskrevet under 5.6.2 og diskutert under 6.5.2. De lave verdiene for 50 pg/mL skyldes trolig en feil under opparbeidelsen av disse, og disse er dermed ikke brukt i kalibreringskurven. Forskjellen på å ta dette punktet med eller ikke ville uansett vært minimal.

prøve (ng)	retensjonstid BK1-5	retensjonstid BK1-6	topphøyde BK1-5	topphøyde BK1-6	BK1-5/BK1-6
blank	10,93		854		
blank + IS	11,03	10,34	1775	438476	0,00404811
blank + IS	10,68	10,14	1031	442756	0,0023286
0,05	11,33	10,49	1351	565683	0,00238826
0,05	10,48	9,69	1528	511263	0,00298868
0,25	10,83	9,99	15803	266162	0,05937361
0,25	10,63	9,99	20868	392712	0,05313818
1	10,58	9,84	54982	496119	0,11082422
1	11,03	10,14	54494	410144	0,13286553
10	10,58	10,09	343103	489074	0,70153596
10	10,93	10,34	309198	394481	0,78380961
50	10,98	10,39	1353256	400814	3,37626929
50	10,14	10,63	1383376	423182	3,26898592



## Vedlegg 4

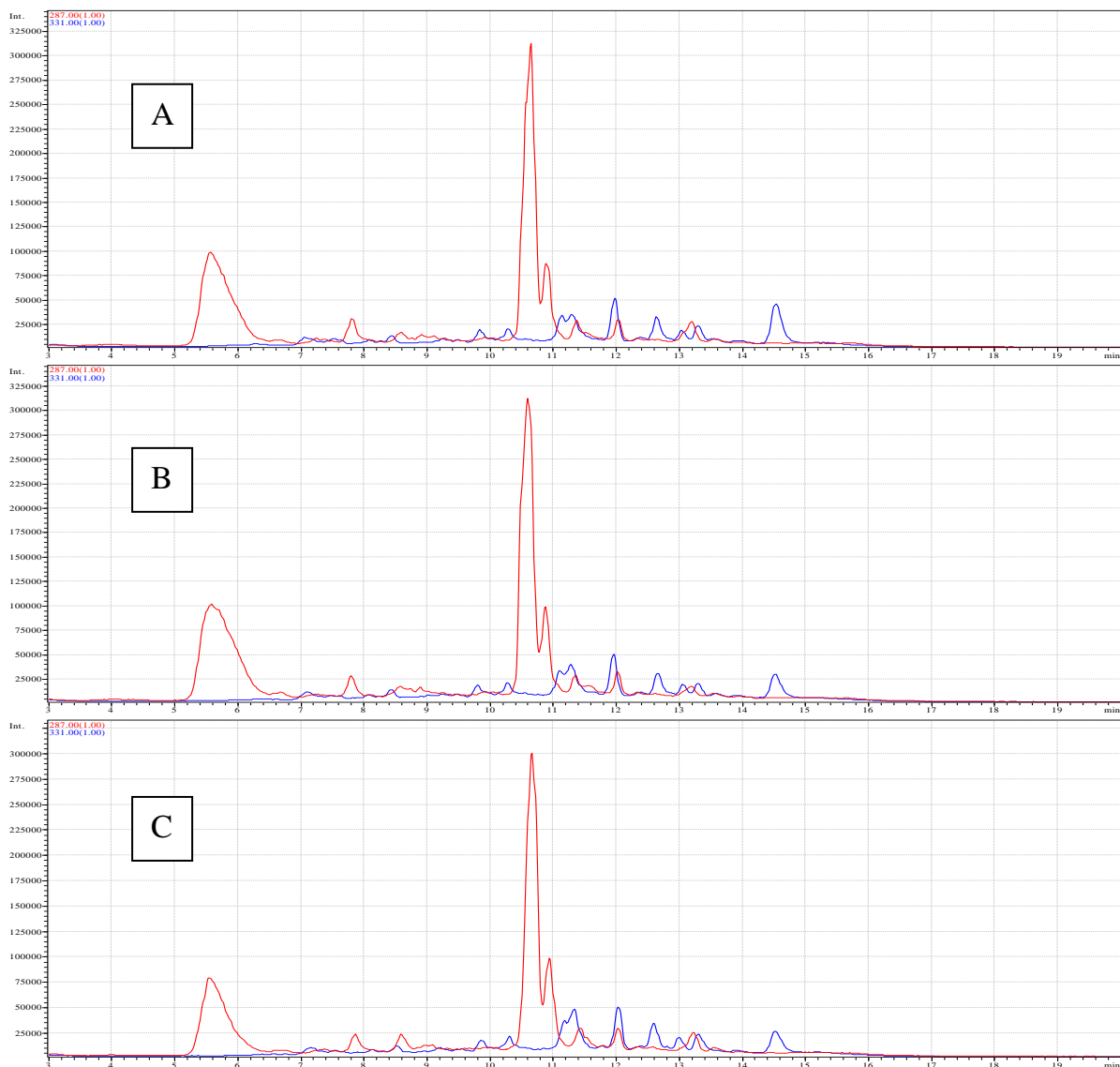
Vedlegget viser nedgangen i forurensninger ved å benytte høyere andel vaske- og prøvepåsettelsesvolum under prøveopparbeidelsen, som beskrevet under 6.2.3.

Nedgangen i størrelsen på forurensningstoppen i fronten av kromatogrammet blir tydelig redusert med økende volum. En av to paralleller fra hver analyse blir vist her.

A: 1 mL prøvepåsettelsesvolum, 3 mL vaskevolum

B: 3 mL prøvepåsettelsesvolum, 1 mL vaskevolum

C: 3 mL prøvepåsettelsesvolum, 3 mL vaskevolum (endelig prosedyre)



## Vedlegg 5

Vedlegget viser forsøksprotokollen til icatibantstudiet på Rikshospitalet i Oslo.

### PROTOCOL

#### 1. PROJECT TITLE:

**“The Impact of Icatibant on regional and systemic capillary leakage in a porcine model of *Neisseria Meningitidis* sepsis.”**

#### 2. RESPONSIBLE PERSONS

Technicians: Anne Pharo, Julie Katrine Lindstad  
PhD students: Andreas Barratt-Due MD, Bernt Christian Hellerud MD,  
Ebbe Thorgersen MD, Andrey Sokolov MD  
Postdocs: Albert Castellheim MD, PhD,  
Senior supervisor: Petter Brandtzaeg, MD, PhD, professor  
Tor Inge Tønnesen, MD, PhD, professor  
Harald Tidemann Johansen, PhD, professor  
Principle investigator: Erik Waage Nielsen MD, PhD professor  
Tom Eirik Mollnes MD, PhD, professor

Authors: the responsible persons and all others involved in the project and fulfilling the criteria for co-authorship.

#### 3. BACKGROUND:

Severe sepsis and septic shock are associated with both a relative and an absolute intravascular volume deficit. This volume deficit occurs in the absence of obvious fluid loss and is due to vasodilatation and alterations in the endothelial barrier. It causes a reduction of the cardiac preload and cardiac output resulting in a deteriorated tissue perfusion and organ oxygenation. Inflammatory cascading reactions including a variety of mediators that occur in sepsis, induce increased microvascular permeability and capillary leakage, which results in interstitial fluid accumulation, loss of protein and tissue edema (1,2).

Our group has studied porcine sepsis with live E-coli (3), and heat-inactivated *Neisseria meningitidis* (manuscript submitted). During four hours, the pigs received either  $5.7 \times 10^{10}$  or  $1.1 \times 10^{11}$  bacteria in total, both leading to a substantial capillary leakage. Even though the pigs received lactated Ringer's solution to a total of about 1/3 their body weight; hematocrit rose, and fluid extravasation was demonstrated by increased wet/dry ratios in muscle, lungs and jejunum. In the lungs peak inspiratory pressures and oxygen need increased.

Considering the incidence of sepsis and septic shock and the high rate of mortality in these patients, this animal study might be important to improve our understanding of blocking bradykinin, one of the main candidate mediators for capillary leakage, in a clinical situation. Thus, the purpose of this study is to investigate the effects of a potent and selective bradykinin type 2 receptor antagonist, Icatibant, on capillary leakage and maintenance of plasma volume in septic shock.

#### 4. THE AIM OF THE STUDY:

1. To evaluate whether Icatibant reduce regional and systemic capillary leakage in porcine septicemia caused by escalating doses of *Neisseria meningitidis* administered intravenously.
2. To evaluate whether Icatibant have any additional beneficial impact on
  - haemodynamics
  - inflammatory response

#### 5. ANIMAL EXPERIMENTAL PROCEDURE:

##### 5.1 Study design:

##### 5.1.1. Prospective, randomized, blinded placebo-controlled animal study

The animals will be divided into two different groups, group 1 "treatment group" and group 2 "placebo group", with 8 animals in each group. There will also be performed experiments on two animals (group 3) which will serve as negative controls.

Group	Treatment	Number of animals
1	<i>Neisseria meningitidis</i> + Icatibant	8
2	<i>Neisseria meningitidis</i> + Ringer acetate	8
3	Ringer acetate + ?	2

### **5.1.2 Randomization, coding, decoding**

The test drugs will be blinded with a code (“A”, “B”) unknown to the investigators and any person involved in the evaluation of the trial. Decoding will be performed not earlier than that the database has been verified and closed.

The assignment of solution “A”, “B” to each individual animal will be randomized except from the two negative controls which will not be allocated blindly.

## **5.2 Animals**

In the experiment Norwegian landrace pigs of either sex with a body weight of 30± 2 kg will be investigated. The pigs will be transported to animal housing facilities the day before experiment and kept in the animal department with free access to water. The experiments will be performed in adherence to the Norwegian laboratory animal regulations and the University Animal Care Committee.

## **5.3 Premedication**

The pigs will be pre-medicated with ketamine (1000 mg), atropine (1 mg), and Azaperon/Stressnil (80 mg) intramuscularly at the animal housing facilities before transport to laboratory. After premedication and before transportation a venous line will be inserted to an ear vein. The animals will be kept warm with blankets during transport for about 15 minutes. During transport from animal housing facilities to the laboratory repeated doses of 50 to 100 mg pentobarbital sodium will be injected intravenously, if needed, until clinical adequate response.

## **5.4 Exclusion criteria**

Pigs with haemoglobin < 5 g/dL or SaO<sub>2</sub> < 90 % with FiO<sub>2</sub> = 0.30 after surgery or mean arterial pressure (MAP) < 55 and/or heart rate (HR) >150 after surgery and stabilization, will be excluded from the study. Animals dying before T180 will be excluded.

## **5.5 Anesthesia and surgery**

### **5.5.1 Tracheostomy**

At the laboratory, animals will be placed in supine position. An intravenous infusion of morphine (1mg/kg/hr) will be started. When needed, repeated doses of 50 to 100 mg

pentobarbital sodium will be injected intravenously until sufficient anaesthesia. After assuring adequate debt of anesthesia tracheostomy will be performed and an endotracheal tube (inner diameter of 7.0) will be inserted to it. Immediately after, anaesthesia will be supplemented by 1% isoflurane in air-oxygen. Pavulon 2mg/mL will be used as nevro-muscular blockage.

### **5.5.2 Mechanical ventilation**

Mechanical ventilation will be started initially as follow; fresh gas flow: 8 liter/minute, tidal volume: 10 mL/kg, respiratory rate: 15 per minute, Inspiratory/expiratory time ratio: 1:2, positive end-expiratory pressure (PEEP): 5 cm H<sub>2</sub>O, and inspiratory oxygen concentration: 30%. During the course of the experiment the respirator settings may be adjusted to maintain a normal pH (7.40), SaO<sub>2</sub> > 94%, PaO<sub>2</sub> > 8. The ventilator settings and PaCO<sub>2</sub> will be adjusted to reach or approach a normal pH.

When appropriate, the fresh gas flow will be lowered gradually to achieve a flow of 2 liter/min. Accordingly the amount of inhaled Isoflurane will be adjusted to achieve an end tidal Isoflurane of 1.2-1.5 during catheterization and 1.0 during the course of observation.

### **5.5.3 Intravascular catheters**

A pulmonary artery catheter, 16 F (Baxter Edwards Laboratories, Irvine, CA, USA) with heating filament and pulse oximetry for recording of continuous cardiac output, central venous pressure (CVP), pulmonary artery occlusion pressure (PaOP) and , conitinous temperature monitoring will be inserted via the external jugular vein and guided into a distal pulmonary artery by pressure wave-form analysis. Pressure transducers will be zero referenced to mid-chest level. Three central venous lumina of the pulmonary artery catheter introducer will be used for continuous infusion of morphine (1mg/kg/hr) and volume therapy.

A picco catheter will be inserted in the right or left femoral artery, for intermittent blood sampling and continuous recording of arterial pressure, stroke volume variance (SVV), intrathoracic blood volume index (ITBI) and extravascular lung water (EVLW). Pressure transducer will be zero referenced to mid-chest level.

### **5.5.4 Urinary catheter and temperature monitoring filament**

A urinary catheter for continuous urinary output measurements will be inserted in to the urinary bladder via a cystotomi. After the completion of surgery and insertion of catheters, the animals will be placed on their right side, remaining in this position for the rest of experiment.

### **5.6 Treatment**

Infusion of icatibant or placebo (randomly and blinded) will start after induction of anaesthesia and surgery, and when the pig is stabilized. First a bolus of Icatibant 0.25 mg/kg/5 minutes (7.5mg) will be given followed by a continuous infusion of 1 mg/kg/hour for the whole experiment.

### **5.7 Sildenafil**

Through a nasogastric tube it will be given sildenafil, 25mg/tablet, 50mg as profylaxis against pulmonary hypertension (Appendix 1). The two tablets will be in a suspension of sodiumchloride, 9mg/ml, 15ml.

### **5.8 Infusion of *Neisseria meningitidis***

*Neissera meningitidis* of the strain B:15:P1.7,16:L3,7,9 belonging to the multilocus sequence type (ST)-32 clone (previously electrophoretic type 5) will be used. This reference strain was originally isolated from a woman admitted to Ullevål University Hospital, Oslo with lethal meningococcal infection in 1976 and is the prototype bacterium of the clone causing the long-lasting Norwegian epidemics. The bacteria are grown overnight on Colombia-agar, resuspended in sterile phosphate buffered saline (PBS), heat inactivated at 56°C for 30 minutes and frozen at -70oC until used. Heat inactivated bacteria will be used for safety reasons. Heat inactivation gives only minor alterations to the bacterial membrane and the biological activity is preserved (4).

The bacteria will be stored frozen in aliquots and warmed up to room temperature immediately before the experiment. The suspension will not be washed before infusion. Bacterial concentrations will be determined by bacterial genome DNA quantification, with real-time polymerase chain reaction (PCR) (LightCycler; Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Bacterial DNA will be quantified in plasma samples from all pigs. In addition, bacterial DNA will be also quantified in parallel whole blood samples.

The infusion will start after the bolus of Icatibant has been given. Appendix 2 shows the infusion rate. In detail the concentrations of bacteria in the infusion fluid are  $1.5 \times 10^7$  the two first hours,  $1.5 \times 10^8$  the next two hours and  $1.5 \times 10^9$  the last hour. The start infusion will be 3 mL/hr. A stepwise increase by 50% every 30 min will lead to a total concentration of  $7 \times 10^{10}$  bacteria given after 4 hrs.

### **5.9.1 Volume therapy and resuscitation**

When the pigs go into sepsis they get a substantial pulmonary hypertension and become haemodynamic unstable (phase 1). Previous experience has shown us that it may be necessary to use norepinephrine in order to combat this phase/period of illness development. Thereafter the pig will be more stabilized and we will resuscitate with only using volume (phase 2).

### **5.9.2 Background infusion.**

- a) When the animals reach the laboratory, an intravenous infusion with Ringer acetate, 1000ml, will be given during the first two hours to compensate for food deprivation and loss of sympathetic tone according to the induction of anesthesia.
- b) Thereafter a background infusion of RA, 200ml/h (6,6ml/kg/h) will start and continue the rest of the experiment.

### **5.9.3 Volume-resuscitation**

Stroke volume variance (SVV) will be the main guiding parameter concerning volume resuscitation. If  $SVV > 10-12$ , RA will be given to decrease SVV to  $< 7$ .

All other parameters will also be taken in consideration whether volume therapy is needed, and decision will be done on broad clinical foundations.

### **5.9.4 Norepinephrine-resuscitation**

To combat critical pulmonary hypertension during phase 1, small incremental doses of 10 ug norepinephrine will be used.

This will be the case if:

1. MPAP increase rapidly and approximate the level of MAP



2. Sudden fall of MAP
3. Sudden fall of endtidal CO<sub>2</sub>

### **5.10 Euthanizing**

By the end of the experiment, the animals will be euthanized by intravenous injection of 500mg pentobarbital sodium, 30mg morphine and 40mmol potassium chloride.

## **6. RECORDING OF PHYSIOLOGIC PARAMETERS, HEMODYNAMICS AND OXYGENATION.**

### **6.1 Hemodynamic parameters will be monitored continuously. The measured and calculated parameters to be registered are;**

- Heart rate (HR),
- Middle systemic arterial pressure (MAP),
- Middle pulmonary artery pressure (MPAP),
- SvO<sub>2</sub>,
- Central venous pressure (CVP), pulmonary artery occlusion pressure (PAOP) and stroke volume variance (SVV\*) as preload indicators,
- Systemic vascular resistance index (SVRI) and pulmonary vascular resistance index (PVRI) as afterload indicators,
- Left ventricle stroke work index (LVSWI) and right ventricle stroke work index (RVSWI) as indicators for heart contractility.
- cardiac index (CI)

*\*The SVV expresses the variation of beat to beat stroke volume around the mean during the respiratory cycle and is calculated by the equation  $SVV = (SV_{max} - SV_{min}) / SV_{mean}$ . The algorithm used during this investigation utilises a continuously sliding time window of 30 seconds to calculate the mean SV (SV<sub>mean</sub>). The time window is divided in four 7.5 s periods; within each 7.5 s, the highest (SV<sub>max</sub>) and the lowest (SV<sub>min</sub>) values of stroke volume will be used to calculate SVV.*

### **6.2 Lung function parameters and respirator settings will be monitored and registered as follow:**

- Peak inspiratory pressure (PIP),
- peak end expiratory pressure (PEEP),
- tidal volume ( $V_T$ ),
- frequency of respiration,
- $FiO_2$ .
- Endtidal  $CO_2$

### **6.3 Blood gases**

Arterial and mixed venous blood will be sampled in heparinized syringes and immediately analyzed (System 860 including co-oximetry system 835, Bayer Diagnostics) to determine blood gases, hydrogen ion activity (pH),  $paCO_2$ ,  $paO_2$ , and the calculated variables base excess, standard bicarbonate, and oxygen saturation.

## **7 COLLECTION AND ANALYSIS OF SAMPLES**

### **7.1 Biopsies**

Prior to start one muscle biopsy (from thigh muscle, about 1 cm X 1 cm X 1 cm) will be taken in deep anesthesia. After the animal is euthanized, biopsies will be taken from muscle, right and left lung.

### **7.2 Blood samples**

Blood samples will be obtained as detailed in a separate scheme (appendix 1). Baseline sample (T-basis) is obtained at stabilization after anaesthesia induction and surgery. After administration of sildenafil and 15 minutes after bolus of icatibant T0 is obtained. Thereafter samples are collected 30, 60, 120, 180, 240 and 300min after T0 (T30, T60, T120, T180, T240 and T300 respectively).

### **7.3 Vascular leakage**

**a) Albumin, protein and hematocrit:** The amount of protein leakage from the intravascular compartment will be estimated by measurement of albumin concentrations in plasma at each

time point. Hematocrit will be used to correct for changes in plasma volume. The amount of protein leakage out of the intravascular compartment will be estimated by calculating the relative changes of albumin content in plasma from the starting point of the experiment. Relative changes of plasma volume ( $\Delta$ plasma) at each time point (Tx) compared to the starting point (T0) of the experiment will be accounted for by the use of Boumonts formula :  
$$\% \Delta P = (100/100 - \text{Hct1}) \times ((100)(\text{Hct1} - \text{Hct2})/\text{Hct2})$$
. Relative changes in albumin content from T0(%) =  $((\text{AlbuminTx} + (\text{AlbuminTx} \times \Delta\text{plasma}) - \text{AlbuminT0})/\text{AlbuminT0}) \times 100$ .

**b) Wet-dry ratio:** The amount of fluid accumulation in the tissues will be estimated by wet/dry ratio. A muscle biopsy will be taken at 0 and 300 minutes, and biopsies from both lungs and the jejunum will be taken at 240 minutes. All biopsies will be placed in pre-weighed containers. The biopsies will then be weighed and dried at 70 °C until stable weight. Wet/dry ratio of the tissues will be calculated exclusive of blood (3).

**c) Weight:** The weight difference from immediately after arrival the laboratory and just after euthanizing will be measured. This will be used both as an internal control and also as a surrogate for gained fluid balance.

**d) Ascites:** The amounts of ascites will be measured postmortem, before biopsies of internal organs are obtained. The amount of fluid, including the gelatinous materials generated, will be collected by suction and manually removed.

#### 7.4 Hematology and coagulation

Hematological parameters are obtained from the hospital's routine hematology laboratory, by CELL-DYN 4000 flow cytometer (Abbot Diagnostics, Illinois, USA). Hemoglobin/Hct, platelets, total leukocyte count, granulocytes and monocytes/lymphocytes (the latter impossible to discriminate in porcine blood) are differentially counted. Thrombin activation in citrate plasma is measured by thrombin-antithrombin complex (TAT) by a Human Enzyme Immunoassay kit (Dade Behring, Siemens, Erlangen, Germany) in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) documented to cross-react with porcine TAT. Plasminogen

activator inhibitor 1 (PAI-1) will be measured by a porcine PAI-1 activity ELISA (Molecular Innovations, MI, USA).

## **7.5 Inflammatory mediators**

### **7.5.1 Cytokines**

The cytokines TNF- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and IL-12 will be analyzed in EDTA plasma with R&D Quantikine Porcine Immunoassay kits. IL-10 will be analyzed in EDTA plasma with BioSource Swine Immunoassay Kit.

### **7.5.2 Flowcytometric analysis**

Whole blood anticoagulated with EDTA will be stained with a FITC-conjugated mouse anti pig antibody, MCA 2309F from AbD Serotec (Oxford, UK).

## **8. Other metabolites**

For quantification of the bradykinin metabolite BK1-5, 5.0 ml venous blood will be collected in 15 ml chilled ethanol. The sample is left at 4°C for 1 h, centrifuged at 1500g for 25 min and the supernatant stored at -70°C until further analysis

## **9. EQUIPMENT**

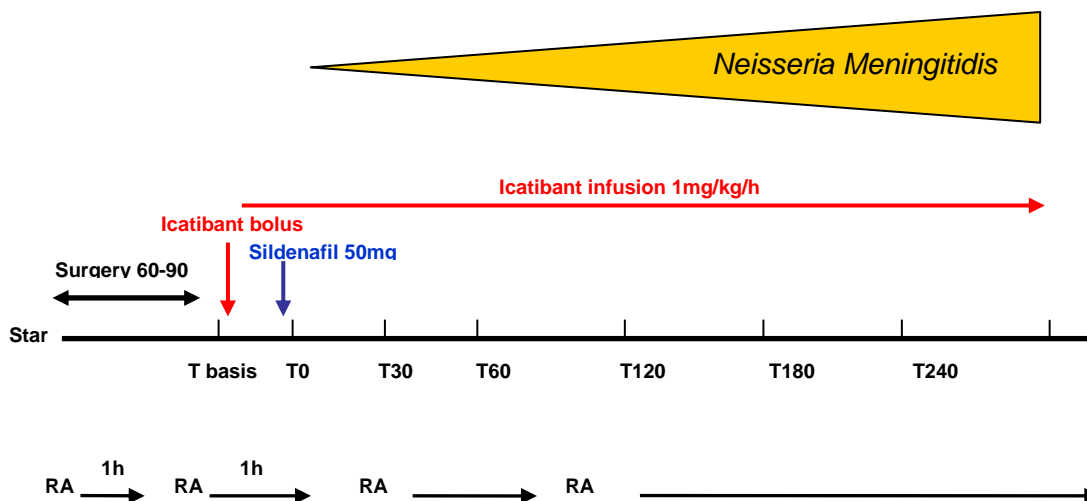
- Siemens KION Anesthesia Workstation
- Pumps (syringe pumps and roller pump)
- Syringes
- Tracheal tube
- Pulmonary artery catheter
- Vigilance monitoring unit
- Warm air-filled blanket and double layer sleeping mat
- Equipment for diathermia
- Equipment for surgery

## REFERENCES

1. Groeneveld AB, Bronsveld W, Thijs LG. Hemodynamic determinants of mortality in human septic shock. *Surgery* 1986; 99: 140-53.
2. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001; 345: 1368-77.
3. Castelheim A, Thorgersen EB, Hellerud BC, Pharo A, Johansen HT, Brosstad F, Gaustad P, Brun H, Fosse E, Tonnessen TI et al.: New Biomarkers in an Acute Model of Live *Escherichia coli*-induced Sepsis in Pigs. *Scandinavian Journal of Immunology* 68:75-84, 2008
4. Sprong T, Brandtzaeg P, Fung M, Pharo AM, Hoiby EA, Michaelsen TE, Aase A, van der Meer JWM, van Deuren M, Mollnes TE: Inhibition of C5a-induced inflammation with preserved C5b-9-mediated bactericidal activity in a human whole blood model of meningococcal sepsis. *Blood* 102:3702-3710, 2003.

## Appendix 1. Time schedule

The registration time points are as follows; **T- basis , T0 T30, T60, T120, T180, T240 and T300**



## Appendix 2. Infusjon of bacteria → speed, ml/h

	Concentration: 1,5x10(7)/ml	Concentration: 1,5x10(8)/ml	Concentration: 1,5x10(9)/ml
T0	3ml/h		
T30	6ml/h		
T60	12ml/h		
T90	24ml/h		
T120		6ml/h	
T150		12ml/h	
T180		24ml/h	
T210		48ml/h	
T240			9,6ml/h
T270			9,6ml/h
Σ ml	22,5 ml	45ml	9,6ml
Σ bact	0,34x10(9) bact	6,75x10(9)bact	1,44x10(10)bakt
Σ bact. Total	2,1x 10(10)bact		

## Appendix 3. Picture of intravenous lines

