



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΜΕΤΡΗΣΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΧΡΟΝΙΑΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ
ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΜΕ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

ΜΑΡΚΑΚΗ ΠΑΥΛΙΝΑ

ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ,

Τ.Ε.Ι ΑΘΗΝΑΣ

ΑΘΗΝΑ 2018



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΜΕΤΡΗΣΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΧΡΟΝΙΑΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ
ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΜΕ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

ΜΑΡΚΑΚΗ ΠΑΥΛΙΝΑ

ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ,

Τ.Ε.Ι ΑΘΗΝΑΣ

ΑΘΗΝΑ 2018



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΚΑΙ

ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗΣ

**ΜΕΤΡΗΣΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΧΡΟΝΙΑΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ
ΜΕ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

ΜΑΡΚΑΚΗ ΠΑΥΛΙΝΑ

ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ,

Τ.Ε.Ι ΑΘΗΝΑΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ: Ευρύκλεια Λιανίδου, Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας –
Κλινικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗ: Ιερώνυμος Ζωιδάκης, Μεταδιδακτορικός Ερευνητής,
Εργαστήριο Πρωτεομικής, Τομέας Βιοτεχνολογίας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών
Ακαδημίας Αθηνών

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

- Ευρύκλεια Λιανίδου: Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Χρήστος Κρούπης: Επίκουρος Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας - Μοριακής Βιολογίας, Π.Γ.Ν. «Αττικόν», Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Ανδρέας Σκορίλας, Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΑΘΗΝΑ 2018

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η διπλωματική αυτή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Πρωτεομικής του τομέα Βιοτεχνολογίας στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) στα πλαίσια του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Ειδίκευσης «Κλινική Βιοχημεία – Μοριακή Διαγνωστική» του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το Συντονιστή του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος, Καθ. Ανδρέα Σκορίλα για την ευκαιρία που μου έδωσε να παρακολουθήσω το συγκεκριμένο μεταπτυχιακό πρόγραμμα, καθώς και την Καθηγήτρια Ευρύκλεια Λιανίδου για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία στον τομέα της πρωτεομικής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Δρ. Ιερώνυμο Ζωιδάκη στο ΙΙΒΕΑΑ για τη συνεχή καθοδήγησή και στήριξή του, για τη βοήθεια και υπομονή που μου προσέφερε κατά την διάρκεια των πειραμάτων της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς και όλους τους διδακτορικούς και μεταδιδακτορικούς ερευνητές του εργαστηρίου για την ομαλή συνεργασία και στήριξή τους.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου για την υπομονή τους όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου και κυρίως για την ψυχολογική και οικονομική στήριξή τους, καθώς και όλους τους φίλους που στάθηκαν δίπλα μου σε έναν ακόμα σημαντικό αγώνα της ζωής μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	2
1. ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΝΟΣΟΣ (Χ.Ν.Ν)	3
1.1 ΟΥΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	3
1.1.1 Οι νεφροί.....	4
1.1.2 Ανατομία και Φυσιολογία των Νεφρών	4
1.1.3 Λειτουργία των νεφρών	7
1.2 ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ (Χ.Ν.Ν).....	8
1.4 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	11
1.5 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ	13
1.6 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΛΗΨΗ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ	15
1.7 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ.....	16
1.7.2 Βιοδείκτες που σχετίζονται με τη Χ.Ν.Ν στην κλινική πρακτική.....	17
1.7.3 Βιοδείκτες που σχετίζονται με τη Χ.Ν.Ν σε πειραματικό στάδιο.....	17
2. ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ	21
2.1 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ.....	21
2.1.1 Ιστορική εξέλιξη.....	23
2.1.2 Διάταξη φασματόμετρου μάζας.....	25
2.1.3 Αρχή Λειτουργίας Τετραπολικού Αναλυτή Μαζών	27
2.1.4 Συνδυασμοί μεθόδων ανάλυσης	28
2.2 ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ (Multiple Reaction Monitoring, MRM)	29
3. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	32
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	33
4.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ	33
4.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ MULTIPLE REACTION MONITORING (MRM).....	34
4.2.1 Επιλογή πρωτεοτυπικών πεπτιδίων και σταθερά επισημασμένα με ισότοπα συνθετικά πεπτίδια	35

4.2.2 Απομόνωση πρωτεΐνης από το πλάσμα.....	35
4.2.3 Ρύθμιση LC/MS.....	36
4.2.4 Στατιστική Ανάλυση.....	37
5.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	39
5.1 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΘΗΚΟΓΡΑΜΜΑΤΑ	44
5.1.1 Πρωτεΐνη GPX3 (<i>Glutathione peroxidase 3</i>)	45
5.1.2 Πρωτεΐνη HBB (Hemoglobin subunit beta).....	46
5.1.3 Πρωτεΐνη IGHΑ1 (Ig alpha-1 chain C region).....	47
5.1.4 Πρωτεΐνη TFAM (Transcription factor A, mitochondrial).....	48
5.1.5 Πρωτεΐνη WDFY4 (WD repeat- and FYVE domain-containing).....	49
5.2 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ROC	50
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	53
7.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	55
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	61

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Χρόνια Νεφρική Νόσος (Χ.Ν.Ν) αποτελεί μείζον πρόβλημα της δημόσιας υγείας. Σήμερα, η διάγνωση της Χ.Ν.Ν βασίζεται στην ανίχνευση της μείωσης του εκτιμώμενου ρυθμού σπειραματικής διήθησης (eGFR) καθώς και της παρουσίας αλβουμινουρίας. Παρ' όλα αυτά, οι παραπάνω δείκτες δεν ενδείκνυνται για την αξιολόγηση της προόδου της νόσου. Ακριβέστερα, ο δείκτης eGFR υποδηλώνει την τρέχουσα κατάσταση της λειτουργίας των νεφρών και δεν παρουσιάζει ιδιαίτερα πιθανή προγνωστική αξία παρά μόνο σε προχωρημένα στάδια. Αντιθέτως, η αλβουμινουρία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη της εξέλιξης της Χ.Ν.Ν, σε συνδυασμό ή όχι με τον eGFR, έχοντας όμως χαμηλή ακρίβεια. Ωστόσο, η αποτελεσματική πρόγνωση της εξέλιξης της νόσου είναι ζωτικής σημασίας για την διαχείρισή της και για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας. Στόχος της μελέτης μας ήταν ο έλεγχος συγκεκριμένων πρωτεϊνών του πλάσματος που είναι πολύ πιθανό να συσχετίζονται άμεσα με τη σοβαρότητα και την εξέλιξη της Χ.Ν.Ν μέσω στοχευμένης πρωτεομικής ανάλυσης που βασίζεται σε LC-MRM.

Για την ανάπτυξη της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν δείγματα πλάσματος από 46 ασθενείς διαφορετικών σταδίων της Χ.Ν.Ν. Έγινε επιλογή 39 πρωτεϊνών του πλάσματος, εφόσον βρέθηκαν να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ ασθενών που εμφανίζουν εξέλιξη της νόσου και ασθενών που δεν εμφανίζουν εξέλιξη αυτής. Στη συνέχεια αναπτύχθηκε η μέθοδος LC-MRM και έγιναν αναλύσεις ποσοτικοποίησης, με βάση τις οποίες επιλέχθηκε ένα πεπτίδιο με τρεις μεταπτώσεις για κάθε πρωτεΐνη. Τελικά μόνο 2 από τις πρωτεΐνες, βρέθηκε ότι συσχετίζονται σημαντικά με την εξέλιξη της Χ.Ν.Ν.

Μέσα από τη συγκεκριμένη μελέτη παρουσιάζεται η δυνατότητα της τεχνικής LC-MRM για την ταυτόχρονη μέτρηση αρκετών πρωτεϊνών του πλάσματος, που πιθανά θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν στην πρόγνωση της εξέλιξης της Χ.Ν.Ν. Η ίδια μέθοδος εφαρμόζεται σήμερα σε 488 δείγματα.

ABSTRACT

Chronic Kidney Disease (CKD) is a major public health problem. Today, the diagnosis of Chronic Kidney Disease is currently based on detecting the reduction in the estimated glomerular filtration rate (eGFR) and the presence of albuminuria. However, these indicators are not suitable in assessing the progress of the disease. In particular, eGFR indicator suggests the current state of kidney function and it does not present prognostic potential but only in advanced stages. Instead albuminuria can be used to predict the progression of Chronic Kidney Disease, whether or not combined with eGFR, but is of low accuracy. Nevertheless, the effective prognosis of the disease is vital for its management and as well as for the appropriate treatment. The aim of the following study is to test the specific plasma proteins which may be related to the severity and progression of Chronic Kidney Disease through the development of LC-MRM.

In order to develop the method, plasma samples from 46 patients with different stages of Chronic Kidney Disease were used. A choice of 39 plasma proteins was chosen as long as they were found to differ significantly between patients presenting with disease progression and patients who did not present Chronic Kidney Disease progression. Subsequently, the LC-MRM method was developed in order to perform quantification assays in which one peptide with three transitions each was selected for each protein. Finally, only 2 of the proteins were found to correlate significantly with the progression of Chronic Kidney Disease.

Through this study the opportunity of the LC-MRM method for the simultaneous measurement of several plasma proteins that could help in the prognosis of Chronic Kidney Disease is presented. The same method is currently applied to 488 samples.

1. ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΝΟΣΟΣ (Χ.Ν.Ν)

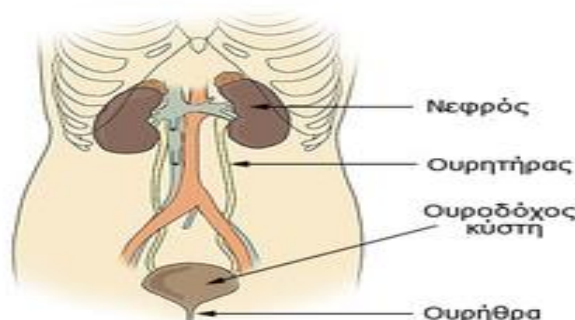
1.1 ΟΥΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Το ουροποιητικό σύστημα έχει σκοπό την παραγωγή των ούρων και στη συνέχεια την αποβολή αυτών από τον οργανισμό. Μέσω των ούρων αποβάλλονται προϊόντα της ανταλλαγής της ύλης τα οποία είναι είτε άχρηστα είτε βλαβερά για τον οργανισμό (**Εικόνα 1.1**).

Τα όργανα του ουροποιητικού συστήματος είναι τα εξής:

- Οι δύο νεφροί, αριστερός και δεξιός οι οποίοι παράγουν τα ούρα και κατ' επέκταση αποτελούν την εκκριτική μοίρα του ουροποιητικού συστήματος.
- Οι νεφρικοί κάλυκες (μικροί και μεγάλοι), καθώς και η νεφρική πύελος. Τα παραπάνω απαντώνται σε κάθε νεφρό.
- Οι δύο ουρητήρες, ένας για κάθε νεφρό.
- Η ουροδόχος κύστη στην οποία συγκεντρώνονται τα ούρα έως ότου αυτά αποβληθούν από τον οργανισμό μέσω της ούρησης.
- Η ουρήθρα δια μέσω της οποίας αποβάλλονται εν τέλει τα ούρα στο περιβάλλον κατά την ούρηση.

Οι νεφρικοί κάλυκες με τη νεφρική πύελο, ο ουρητήρας, η ουροδόχος κύστη και η ουρήθρα αποτελούν την αποχετευτική μοίρα του ουροποιητικού συστήματος, τη μοίρα εκείνη διά μέσου της οποίας διέρχονται και αποβάλλονται τα ούρα [1].



Εικόνα 1.1 Το ουροποιητικό σύστημα (πηγή: <http://www.easypedia.gr>)

1.1.1 Οι νεφροί

Οι νεφροί είναι ζωτικά όργανα τα οποία φιλτράρουν το πλάσμα του αίματος κατακρατώντας είτε αποβάλλοντας διάφορες ουσίες από τον οργανισμό. Οι νεφροί είναι απαραίτητο όργανο για τον οργανισμό αφού ρυθμίζουν σημαντικές λειτουργίες του σώματος και ελέγχουν την ομοιοστάση των υγρών του σώματος.

1.1.2 Ανατομία και Φυσιολογία των Νεφρών

Οι νεφροί, δεξιός και αριστερός, φέρονται σχεδόν κάθετα σε επαφή με την πρόσθια επιφάνεια του πίσω τοιχώματος της κοιλίας. Βρίσκονται κατά βάση πίσω από το περιτόναιο, σε έναν χώρο που ονομάζεται οπισθοπεριτοναϊκός. Όσον αφορά τη θέση τους, δεξιά και αριστερά από τη σπονδυλική στήλη, αντιστοιχεί στο ύψος του 12ου θωρακικού μέχρι τον 3ο οσφυϊκό σπόνδυλο. Ο δεξιός νεφρός βρίσκεται χαμηλότερα από τον αριστερό διότι δέχεται πίεση από το ήπαρ, το οποίο βρίσκεται από πάνω του.

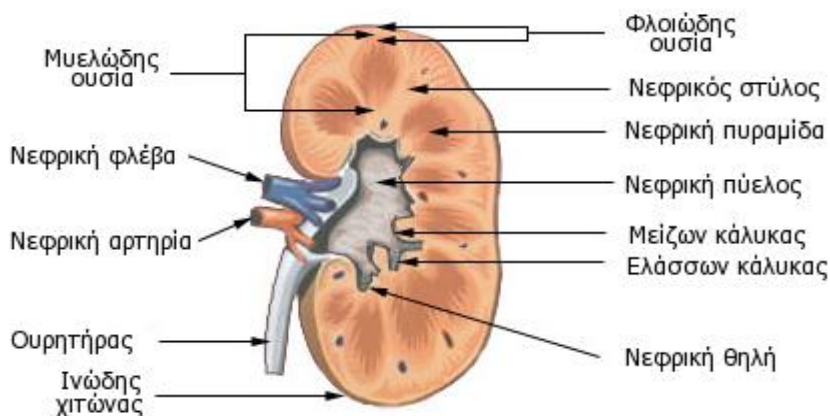
Ο κάθε νεφρός ζυγίζει περίπου 140-150 g και το σχήμα του που μοιάζει με μεγάλο φασόλι. Κάθε νεφρός εμφανίζει δύο επιφάνειες, την πρόσθια και την πίσω επιφάνεια, δύο πόλους ή άκρα, τον άνω και τον κάτω, καθώς και δύο χείλη, το έσω και το έξω. Το έσω χείλος έχει κοίλο σχήμα και είναι στραμμένο προς τη σπονδυλική στήλη. Στο μέσο περίπου του έσω χείλους υπάρχει μια εντομή και αποτελεί την πύλη του νεφρού, μέσα από την οποία εισέρχεται η νεφρική αρτηρία και εξέρχεται η νεφρική φλέβα και ο ουρητήρας. Η πύλη του νεφρού οδηγεί σε μία κοιλότητα, τη νεφρική κοιλία. Στο σημείο αυτό εντοπίζονται οι νεφρικοί κάλυκες, η νεφρική πύελος και τα στελέχη των νεφρικών αγγείων.

Κάθε νεφρός από έξω προς τα μέσα έχει τα εξής περιβλήματα που τον περιβάλλουν και τον στηρίζουν στη θέση του:

- Περιτόναιο: καλύπτει ένα μέρος της πρόσθιας επιφάνειας κάθε νεφρού.
- Νεφρική περιτονία

- Περινεφρικό λίπος: βρίσκεται περισσότερο στην πίσω επιφάνεια κάθε νεφρού.
- Ινώδης χιτώνας: αποτελεί ισχυρό περίβλημα γύρω από το νεφρό.

Όσον αφορά την κατασκευή του νεφρού, κάθε ένας από αυτούς αποτελείται από δύο διαφορετικές ουσίες με διαφορετικό χρώμα και σύσταση. Η φλοιώδης ουσία είναι κοκκώδης και βρίσκεται προς την περιφέρεια του νεφρού, ενώ η δεύτερη ουσία είναι γραμμωτή και βρίσκεται προς το μέσον του νεφρού και ονομάζεται μυελώδης ουσία. Η μυελώδης ουσία αποτελείται από 7-20 κωνικού σχήματος περιοχές, που λέγονται νεφρικές ή μαλπιγγιανές πυραμίδες. Η διαφορά στην εμφάνιση μεταξύ των δύο ουσιών του νεφρού οφείλεται στη διαφορετική πορεία, που έχουν σε κάθε μία από αυτές τα ουροφόρα σωληνάρια. Στη φλοιώδη ουσία τα ουροφόρα σωληνάρια έχουν σπειροειδή πορεία ενώ στη μυελώδη ουσία η πορεία είναι ευθεία (**Εικόνα 1.2**).



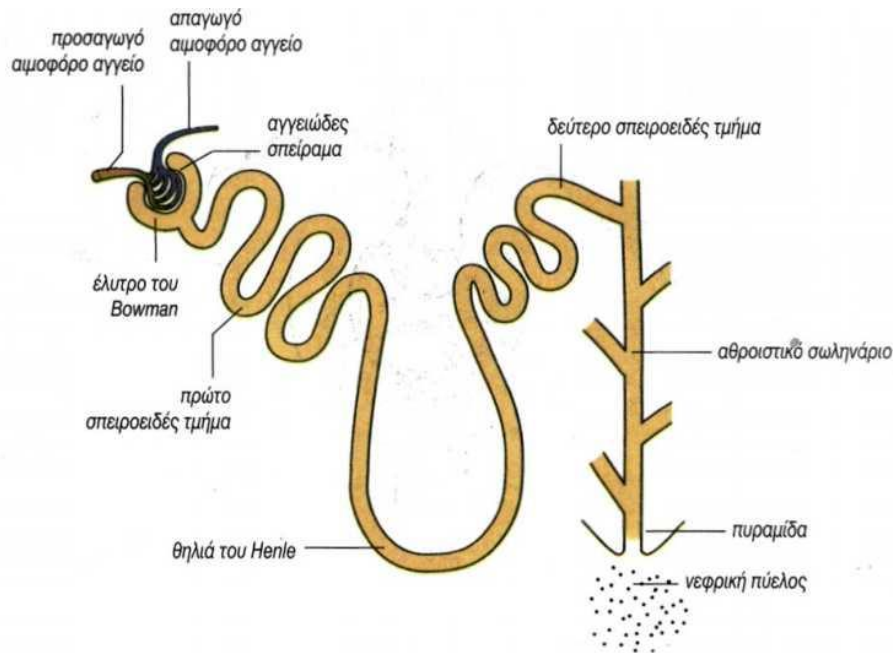
Εικόνα 1.2 Η δομή του Νεφρού (πηγή: <http://www.easypedia.gr>)

Στο μικροσκόπιο κάθε νεφρός φαίνεται να αποτελείται από τους **νεφρώνες**, τα αγγεία και το διάμεσο συνδετικό ιστό. Όμως τη λειτουργική μονάδα του νεφρού αποτελούν οι νεφρώνες και κάθε νεφρός περιέχει περίπου ένα εκατομμύριο νεφρώνες. Καθένας από τους νεφρώνες αποτελείται με τη σειρά του από το νεφρικό ή μαλπιγγιανό σωματίο και από το ουροφόρο σωληνάριο (**Εικόνα 1.3**).

Το νεφρικό σωμάτιο. Κάθε ουροφόρο σωληνάριο ξεκινά από τη φλοιώδη ουσία με ένα τυφλό το οποίο έχει εμπτυχθεί και αποτελεί το έλυτρο του Bowman. Μέσα στην κοιλότητα της εμπτύξεως μπαίνουν τα τριχοειδή της νεφρικής αρτηρίας τα οποία διακλαδίζονται σαν δίκτυ, και για το λόγο αυτό ονομάζονται θαυμάσιο δίκτυο ή αγγειώδες σπείραμα. Επομένως, είναι εύκολο το νερό και τα άχρηστα προϊόντα του μεταβολισμού να περάσουν από την κυκλοφορία στην αρχική κοιλότητα του ουροφόρου σωληναρίου. Το έλυτρο του Bowman με το αγγειώδες σπείραμά του αποτελεί ένα νεφρικό σωμάτιο.

Το ουροφόρο σωληνάριο. Κάθε ουροφόρο σωληνάριο είναι ένας μικροσκοπικός σωλήνας, μήκους 5,5 cm περίπου, που αρχίζει από το έλυτρο του Bowman και ακολουθώντας πορεία άλλοτε ευθεία και άλλοτε σπειροειδή και αφού ενωθεί και με άλλα σωληνάρια εκβάλλει τελικά σε ένα τρήμα της θηλής της νεφρικής πυραμίδας. Τα ευρύτερα σωληνάρια που σχηματίζονται από τη συνένωση των ουροφόρων σωληναρίων λέγονται αθροιστικά σωληνάρια. Έτσι στο μήκος των ουροφόρων σωληναρίων που φτάνει τα 100 χιλιόμετρα γίνεται η παραγωγή των ούρων, αποτελώντας την ζωτικής σημασίας απεκκριτική λειτουργία του οργανισμού.

Συν τοις άλλοις, κύριο συστατικό των ούρων αποτελεί το νερό, στο οποίο είναι διαλυμένες διάφορες οργανικές και ανόργανες ουσίες που αποτελούν τελικά προϊόντα του μεταβολισμού διαφόρων ουσιών του κυττάρου. Πολλές από αυτές είναι βλαβερές για τον οργανισμό και αν παραμείνουν σε αυτόν μπορεί να προκαλέσουν σοβαρές διαταραχές ιδίως στο νευρικό σύστημα. Ωστόσο οι νεφροί έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν την ποσότητα των ουσιών που αποβάλλονται με τα ούρα προκειμένου να διατηρήσουν σταθερή τη σύσταση των υπόλοιπων υγρών του σώματος [1].



Εικόνα 1.3 Η δομή του νεφρώνα (πηγή: <http://ebooks.edu.gr>)

1.1.3 Λειτουργία των νεφρών

Ο κάθε νεφρός αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό μικρών και πολύπλοκων στην πορεία τους σωληναρίων που ονομάζονται νεφρόνια. Από το κάθε νεφρόνιο παράγεται ένα μικρό ποσό ούρων και επομένως τα ούρα που τελικά αποβάλλονται είναι το άθροισμα των ούρων που παράγει το κάθε νεφρόνιο των δύο νεφρών. Κάθε νεφρόνιο αποτελείται από την ουροφόρο κοιλότητα, το πρώτο σπειροειδές τμήμα, τη θηλιά του Henle, το δεύτερο σπειροειδές τμήμα τάξεως και το αθροιστικό σωληνάριο.

Η ουροφόρος κοιλότητα αποτελείται από δύο μεμβράνες, την εσωτερική και εξωτερική, οι οποίες μαζί δημιουργούν το έλυτρο του Bowman. Ωστόσο, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η εσωτερική μεμβράνη του ελύτρου του Bowman έρχεται σε επαφή με το τοίχωμα των τριχοειδών αγγείων. Παράλληλα η μεμβράνη αυτή και το τοίχωμα των τριχοειδών μπορούν να διαπεραστούν από όλα τα συστατικά του πλάσματος εκτός των πρωτεϊνών. Έτσι κάτω από την επίδραση της πίεσεως του αίματος ένα μεγάλο μέρος από το πλάσμα που φθάνει στα τριχοειδή περνά το

τοίχωμα των τριχοειδών και την εσωτερική μεμβράνη του ελύτρου του Bowman και μπαίνει στην ουροφόρο κοιλότητα. Το υγρό το οποίο μαζεύεται στην ουροφόρο κοιλότητα ονομάζεται πρόουρο και από αυτό θα παραχθούν τα ούρα.

Ένα μέρος από το πρόουρο δεν καταλήγει στα ούρα, αλλά επιστρέφει στην κυκλοφορία. Η επιστροφή αυτή επιτυγχάνεται στα υπόλοιπα τμήματα του νεφρονίου. Δηλαδή το πρόουρο κινείται από την ουροφόρο κοιλότητα προς το αθροιστικό σωληνάριο και καθώς περνά από περιοχή σε περιοχή, τα κύτταρα της μεμβράνης του ουροφόρου σωληναρίου προσλαμβάνουν το μεγαλύτερο ποσό από τις ουσίες του προούρου και τις επιστρέφουν στο αίμα. Η λειτουργία αυτή λέγεται ενεργητική επαναρρόφηση και είναι εκλεκτική λειτουργία, δηλαδή κάποιες ουσίες επαναρροφώνται ενώ κάποιες άλλες καθόλου. Εκτός από την επαναρρόφηση στο ουροφόρο σωληνάριο γίνεται και απέκκριση. Δηλαδή τα κύτταρα του ουροφόρου σωληναρίου μπορούν να πάρουν ουσίες από την κυκλοφορία και να τις μεταφέρουν στο πρόουρο, ώστε ν' αποβληθούν τελικά με τα ούρα.

Οι παραπάνω λειτουργίες, επαναρρόφηση και απέκκριση ρυθμίζονται από ορμόνες, όπως η αλδοστερόνη. Πέραν όμως των ορμονών, υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί που επιδρούν στη λειτουργία των νεφρών ρυθμίζοντας την ποσότητα των επαναρροφούμενων και αποβαλλομένων ουσιών. Επομένως, ενώ η σύσταση των ούρων μπορεί να διαφέρει, η σύσταση του αίματος και των υπόλοιπων υγρών του σώματος παραμένει σχετικά σταθερή [2].

1.2 ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ (Χ.Ν.Ν)

Σήμερα, η Χ.Ν.Ν αποτελεί ένα παγκόσμιο πρόβλημα δημόσιας υγείας το οποίο αυξάνεται συνεχώς. Αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες θανάτου στο γενικό πληθυσμό, καρδιαγγειακών κυρίως προβλημάτων, νεοπλασιών και υποσιτισμού [3,4].

Ωστόσο, η Χ.Ν.Ν χαρακτηρίζεται από την προοδευτική απώλεια της νεφρικής λειτουργίας, με το τελικό στάδιο να είναι το επονομαζόμενο « end-stage renal disease » (**ESRD**). Σε αυτό το στάδιο οι ασθενείς καταφεύγουν σε μία θεραπεία

αποκατάστασης, αιμοδιάλυση(HD), περιτοναϊκή διάλυση(PD) ή μεταμόσχευση νεφρού [4,5].

1.2.1 Συνέπειες Χρόνιας Νεφρικής Νόσου

Η Χ.Ν.Ν δεν έχει ειδικά συμπτώματα. Αναγνωρίζεται μέσω παθολογικών ευρημάτων όπως μέσω της αύξησης της κρεατινίνης του ορού ή μέσω της ανίχνευσης πρωτεΐνης στα ούρα. Ωστόσο, η απώλεια της ρυθμιστικής ικανότητας των νεφρών εκδηλώνεται με διαταραχές της εσωτερικής ομοιόστασης του ύδατος, των ηλεκτρολυτών, της οξεοβασικής ισορροπίας, του ασβεστίου και του φωσφόρου.

Πέραν όμως των εξωκρινών διαταραχών, η απώλεια της νεφρικής λειτουργίας συνοδεύεται και από αδυναμία των νεφρών να επιτελέσουν τις ενδοκρινείς λειτουργίες. Για παράδειγμα, ελαττώνεται η παραγωγή της ερυθροποιητίνης με αποτέλεσμα την εμφάνιση αναιμίας. Επίσης, η αρτηριακή πίεση αυξάνεται λόγω παραγωγής αγγειοδραστικών ορμονών που δημιουργούνται από τους νεφρούς μέσω του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης [6,7].

Η πλήρης αδυναμία των νεφρών να επιτελέσουν τις ομοιοστατικές τους λειτουργίες σε συνδυασμό με την κατακράτηση τοξικών ουσιών του μεταβολισμού προκαλεί σε όλα τα κυτταρικά συστήματα και όργανα δυσλειτουργίες. Το σύνολο των κλινικών εκδηλώσεων της συστηματικής δηλητηρίασης από τη βαριά νεφρική βλάβη χαρακτηρίζεται ως «ουραιμικό σύνδρομο» [6,8].

Όλα τα συστήματα του ανθρώπινου οργανισμού πλήττονται από την παρουσία του ουραιμικού συνδρόμου. Από το καρδιαγγειακό σύστημα εκδηλώνεται υπέρταση, μυοκαρδιοπάθεια, καρδιακή ανεπάρκεια, περικαρδίτιδα και σε κάποιες περιπτώσεις πνευμονικό οίδημα. Συν τοις άλλοις, οι μεταβολικές και ηλεκτρολυτικές διαταραχές περιλαμβάνουν διαταραχές της οξεοβασικής ισορροπίας, του φωσφόρου, του ασβεστίου, νεφρική οστεοδυστροφία, υπερκαλιαιμία, δυσανεξία στους υδατάνθρακες και υπερλιπιδαιμία. Ωστόσο, δε λείπουν διαταραχές στο γαστρεντερικό σύστημα όπως, γαστρίτιδα και

οισοφαγίτιδα, αιματολογικές διαταραχές όπως αναιμία και ουραιμική αιμορραγική διάθεση [8,9,10].

Παρά ταύτα η ένταση των επιπλοκών αυτών της νεφρικής δυσλειτουργίας ποικίλει ανάλογα με το βαθμό ελάττωσης της νεφρικής λειτουργίας.

1.3 ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ

Αυτή τη στιγμή ο καλύτερος διαθέσιμος δείκτης παρακολούθησης της νεφρικής λειτουργίας είναι ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης (eGFR), ο οποίος υπολογίζει το σύνολο των φιλτραρισμένων υγρών μέσω της συνολικής λειτουργίας των νεφρών ανά μονάδα του χρόνου [11].

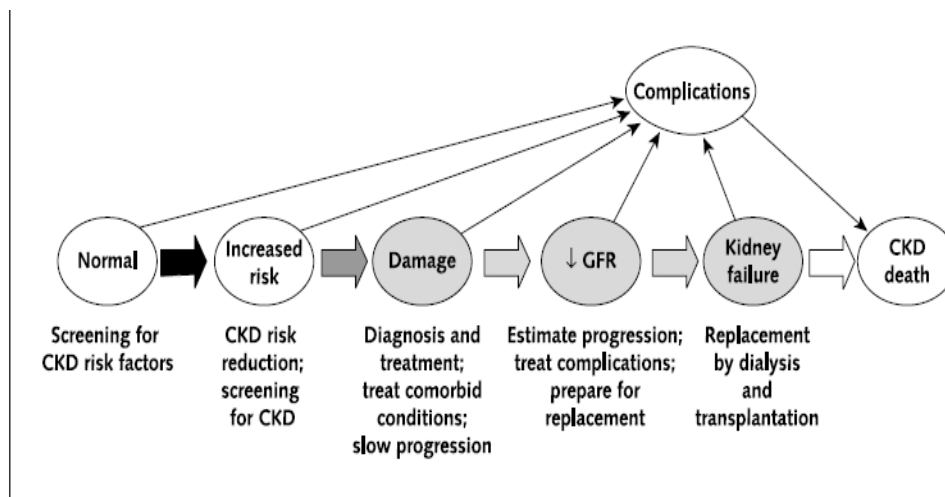
Αυτός ο δείκτης χρησιμοποιείται για τη Σταδιοποίηση της Χ.Ν.Ν. Σύμφωνα λοιπόν, με τον GFR διακρίνονται πέντε στάδια της Χ.Ν.Ν τα οποία παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1.1**. Στον πίνακα 1.1 αναγράφεται επίσης και η ενέργεια που ακολουθείται σε κάθε ένα από τα πέντε στάδια, ενώ η θεραπεία είναι εξατομικευμένη σε κάθε περίπτωση αφού εξαρτάται από την αρχική αιτία της νόσου, όπως είναι για παράδειγμα ο σακχαρώδης διαβήτης [11-13].

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.1 Περιγραφή και ενέργειες που ακολουθούνται ανά στάδιο [11,12].

ΣΤΑΔΙΑ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	GFR(mL/min/1.73 m ²)	ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ
1	NB με GFR	>90	Διάγνωση και θεραπεία, μείωση της επιδείνωσης
2	NB με ήπια GFR	60-89	Υπολογισμός της επιδείνωσης
3	NB με μέτρια GFR	30-59	Εκτίμηση και θεραπεία των επιπλοκών
4	NB με σοβαρή GFR	15-29	Προετοιμασία για υποκατάσταση
5	Νεφρική Ανεπάρκεια	<15 ή σε αιμοδιάλυση	Υποκατάσταση

*NB=ΝΕΦΡΙΚΗ ΒΛΑΒΗ

Πέρα από τον GFR υπάρχουν και άλλοι δείκτες που μπορούν να συσχετιστούν με τη Χρόνια Νεφρική Νόσο, όπως η εύρεση πρωτεϊνών στα ούρα. Παρ' όλα αυτά η πρωτεϊνουρία θεωρείται ανεξάρτητος δείκτης για την επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας και της καρδιαγγειακής νόσου. Ως εκ τούτου, οι κατευθυντήριες γραμμές στο Ηνωμένο Βασίλειο έχουν προσαρτήσει το γράμμα "P" στο στάδιο της Χ.Ν.Ν, εάν η απώλεια πρωτεΐνης είναι σημαντική [14].



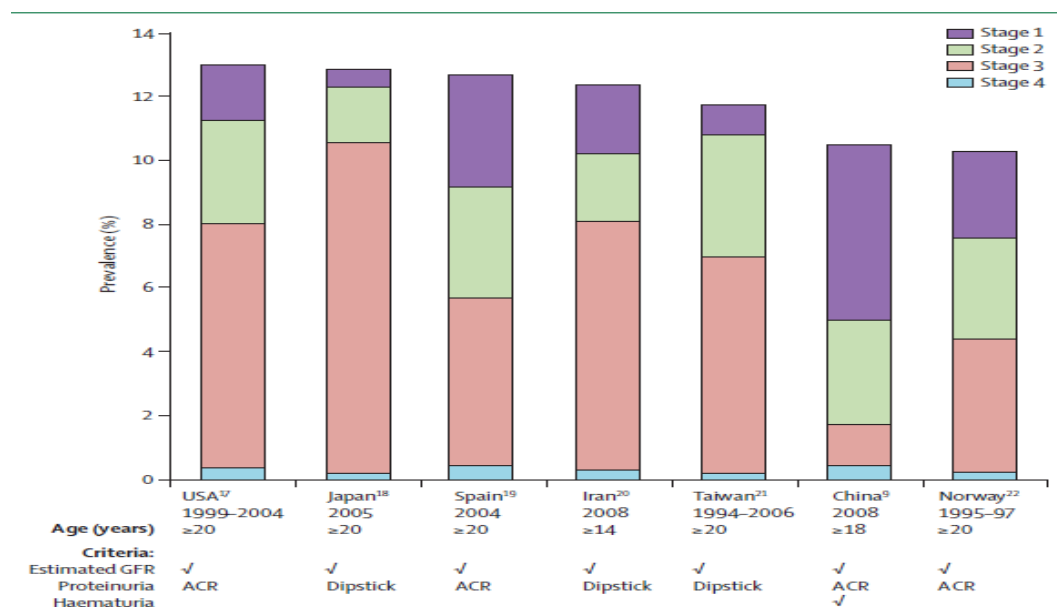
Εικόνα 1.4 Πρότυπο μοντέλο των σταδίων στην αρχή και κατά την πρόοδο της Χ.Ν.Ν και θεραπευτικών επεμβάσεων [15].

1.4 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Είναι γνωστό ότι η Χ.Ν.Ν ενδημεί σε ολόκληρο τον κόσμο και σύμφωνα με τον GFR νοσούν όσοι εμφανίζουν $GFR < 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$. Επομένως, η κατά προσέγγιση επικράτηση της Χ.Ν.Ν είναι περίπου 2,5-11,2% του ενήλικου πληθυσμού σε όλη την Ευρώπη, την Ασία, την Βόρεια Αμερική και την Αυστραλία. Ωστόσο, η επικράτηση της νόσου αυξάνεται ακόμη περισσότερο υπό την παρουσία μικρό-λευκωματουρίας και μακρό-λευκωματουρίας, περίπου σε 10,5-13,1% (**Εικόνα 1.5**). Επίσης, στις αναπτυγμένες χώρες η συχνότητα νοσηρότητας αυξάνει με την πάροδο της ηλικίας, ενώ παράλληλα κρίσιμος είναι και ο ρόλος του σακχαρώδους διαβήτη, της υπέρτασης και της παχυσαρκίας που όμως ποικίλλουν στη συχνότητα μεταξύ των διαφόρων πληθυσμών (**Εικόνα 1.6**). Στις

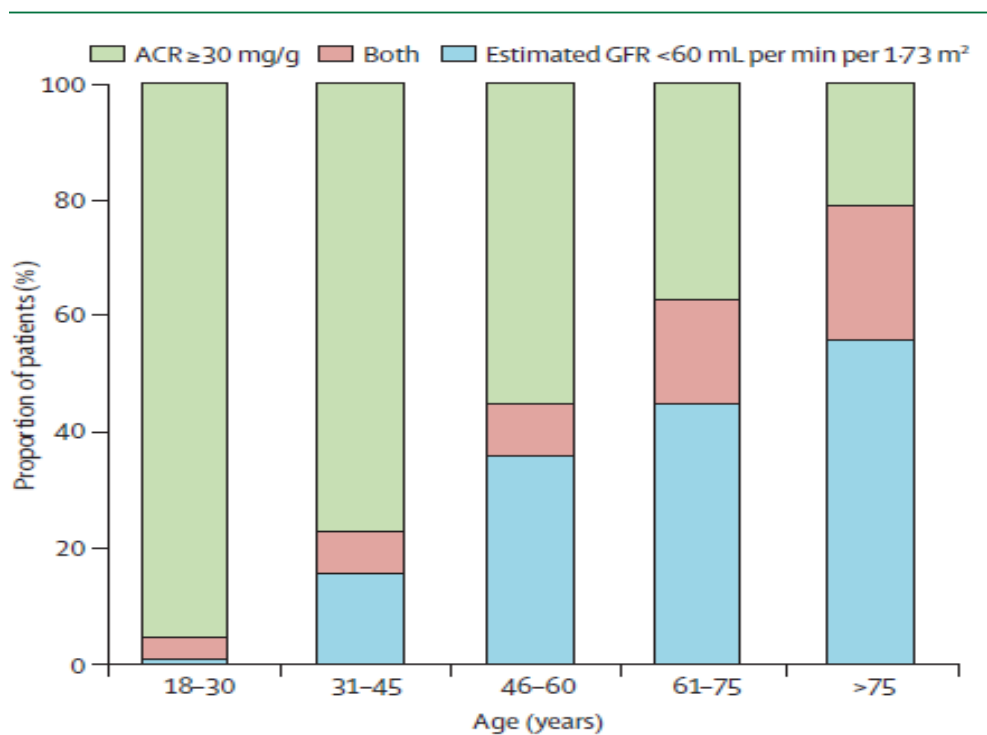
αναπτυσσόμενες χώρες όμως, η Χ.Ν.Ν μπορεί να οφείλεται και σε μόλυνση που προκαλείται από βακτήρια, ιούς και παράσιτα. Τέλος, δεν είναι απίθανη η μόλυνση από την έκθεση σε χημικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένου του μόλυβδου, του καδμίου και του ψευδαργύρου.

Δυστυχώς, ενώ στις αναπτυσσόμενες χώρες που δεν υπάρχει η δυνατότητα αιμοδιάλυσης ή μεταμόσχευσης νεφρού οι άνθρωποι πεθαίνουν από τελικό στάδιο Νεφρικής Ανεπάρκειας (ESRD), οι άνθρωποι στις αναπτυγμένες χώρες πεθαίνουν από καρδιαγγειακές επιπλοκές παρά τη θεραπεία αποκατάστασης [16-18].



Εικόνα 1.5 Εκτιμήσεις της επικράτησης της Χ.Ν.Ν βασισμένες στον πληθυσμό [18].

*ACR=Λόγος αλβουμίνης - κρεατινίνης *GFR=δείκτης σπειραματικής διήθησης



Εικόνα 1.6 Ποσοστά των ασθενών με Χ.Ν.Ν που προσδιορίστηκαν βάσει της αναλογίας: λευκωματίνη-κρεατινίνη ή/ και τον εκτιμώμενο ρυθμό σπειραματικής διήθησης [18].

* ACR=Λόγος αλβουμίνης-κρεατινίνης * GFR=δείκτης σπειραματικής διήθησης

1.5 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Μερικοί ασθενείς χωρίς νεφρική βλάβη με φυσιολογικά ή αυξημένα επίπεδα GFR, βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο για εμφάνιση της νόσου. Τα αίτια εμφάνισης Χ.Ν.Ν ποικίλουν με το Σακχαρώδη Διαβήτη να είναι η συχνότερη αιτία πρόκλησης Χ.Ν.Ν. Έτσι λοιπόν, οι παράγοντες κινδύνου κατατάσσονται σε τέσσερεις κατηγορίες όπως φαίνεται στον **Πίνακα 1.2**.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.2 Κατάταξη των παραγόντων κινδύνου [20-22].

ΚΑΤΑΤΑΞΗ	ΟΡΙΣΜΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΙΝΔΥΝΟΥ
Κατηγορία I Σακχαρώδης Διαβήτης	Οι παρεμβάσεις μειώνουν σίγουρα τον κίνδυνο
Κατηγορία II Υπέρταση	Οι παρεμβάσεις είναι αρκετά πιθανό να μειώσουν τον κίνδυνο
Κατηγορία III Αυτοάνοσα Νοσήματα	Η τροποποίηση μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο
Κατηγορία IV Οικογενειακό ιστορικό, Ηλικία, Φυλή, Εθνικότητα	Παράγοντες που δε μπορούν να υποστούν τροποποίηση

Παρακάτω φαίνονται κάποια παραδείγματα παραγόντων κινδύνου για τη Χρόνια Νεφρική Νόσο (**Πίνακας 1.3**).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.3 Τύποι και Παραδείγματα παραγόντων κινδύνου για Χ.Ν.Ν [20-22].

	ΟΡΙΣΜΟΣ	Παραδείγματα
Παράγοντες που καθιστούν τον νεφρό ευπαθή	Τα άτομα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα και ευπαθή ώστε να υποστούν νεφρική βλάβη	Οικογενειακό ιστορικό, Μεγάλη ηλικία
Παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την έναρξη της νεφρικής βλάβης	Άμεση προσβολή του νεφρού	ΣΔ, Υπέρταση, Αυτοάνοσα νοσήματα, Συστηματικές λοιμώξεις, Ουρολοιμώξεις, Νεφροτοξικά φάρμακα
Παράγοντες επιδείνωσης	Αιτίες που επιταχύνουν την εξέλιξη της νεφρικής βλάβης	Λευκωματουρία, Μη ρυθμιζόμενη υπέρταση, Φτωχός γλυκαιμικός έλεγχος, Κάπνισμα

1.6 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΛΗΨΗ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ

Όσον αφορά την πρώιμη διάγνωση της Χ.Ν.Ν, αυτή είναι επιθυμητή αφού χάρη στις επεμβάσεις που μπορούν γίνουν μειώνεται ο κίνδυνος καρδιαγγειακών επεισοδίων και η εξέλιξη της νόσου. Ωστόσο, ένα screening test θα ήταν ιδιαίτερα σημαντικό αφού στα πρώτα στάδια της νόσου δεν υπάρχουν συμπτώματα με αποτέλεσμα η διάγνωση να γίνεται σε προχωρημένα στάδια. Ένας έλεγχος για πρωτεϊνουρία θα ήταν ιδιαίτερα ελκυστικός διότι είναι εύκολη η δειγματοληψία και μπορεί να προβλέψει τη καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνησιμότητα. Πολύ πιθανόν να είναι και ένας καλύτερος δείκτης από τη μέτρηση του GFR, η μείωση του οποίου ξεκινάει σε μετέπειτα στάδια της νόσου. Ωστόσο, η μέτρηση του GFR θα μπορούσε να είναι αποτελεσματικότερη αν πραγματοποιούνταν σε άτομα-στόχους που πάσχουν από υπέρταση, διαβήτη ή είναι άνω των πενήντα-πέντε ετών. Αντίστοιχα, είναι σημαντικό να γίνεται παράλληλα και μέτρηση της κρεατινίνης του ορού, η οποία είναι ιδιαίτερα αυξημένη σε ασθενείς με Χ.Ν.Ν καθώς και να υπολογίζεται η αναλογία αλβουμίνης ούρων-κρεατινίνης ούρων. Επομένως, μπορεί να υπολογιστεί ένα «risk score» βασισμένο σε συγκεκριμένες πληροφορίες (φύλο, ηλικία, υπέρταση, διαβήτη, αναιμία, καρδιαγγειακά νοσήματα) για κάθε ένα από τα άτομα που ελέγχεται, προκειμένου να βελτιωθεί η πρώιμη διάγνωση της νόσου [18,23,24].

Συν τοις άλλοις, δεν είναι αρκετή μόνο η πρώιμη διάγνωση αλλά και η πρόληψη και αυτή συνεπάγεται έναν υγιεινό τρόπο ζωής ώστε να προλαμβάνονται οι κύριες αιτίες εμφάνισης της Χ.Ν.Ν, όπως είναι η αυξημένη αρτηριακή πίεση, ο διαβήτης και η παχυσαρκία. Σε έναν τέτοιο υγιεινό τρόπο ζωής περιλαμβάνονται τα εξής:

- Διατροφικές συνήθειες φτωχές σε αλάτι και λιπαρά και περισσότερη κατανάλωση Ω3 λιπαρών.
- Περιορισμένη κατανάλωση αλκοόλ.

Άσκηση σε φυσιολογικά πλαίσια (συνίσταται βάρδια για περίπου 30'-1h καθημερινά).

Αποχή από το κάπνισμα.

Τακτικός έλεγχος υπό την επίβλεψη ιατρού [23,25].

1.7 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ

Ως βιοδείκτη ορίζουμε ένα καθορισμένο χαρακτηριστικό το οποίο μετρήθηκε ως ένας δείκτης από φυσιολογικές βιολογικές διαδικασίες, παθολογικές διαδικασίες, ή από απαντήσεις στην έκθεση μίας επέμβασης, συμπεριλαμβανομένων και θεραπευτικών επεμβάσεων [26].

Οι βιοδείκτες χωρίζονται σε διάφορες κατηγορίες και ειδικότερα στους (α) Διαγνωστικούς (**Diagnostic**), (β) Προγνωστικούς (**Prognostic**), (γ) Προβλεπτικούς (**Predictive**) βιοδείκτες.

(α) Ως Διαγνωστικός βιοδείκτης χαρακτηρίζεται εκείνος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ή επιβεβαίωση της παρουσίας μίας νόσου ή μία κατάσταση που μας ενδιαφέρει ή της αναγνώρισης εκείνων των ατόμων με έναν υπότυπο της νόσου.

(β) Ως Προγνωστικός βιοδείκτης χαρακτηρίζεται εκείνος που χρησιμοποιείται για να αναγνωρίσει τη μειωμένη ή αυξημένη πιθανότητα μίας κλινικής εκδήλωσης , όπως ενός θανάτου, μίας υποτροπής, μίας επανεμφάνισης ή εξέλιξης της νόσου σε έναν αναγνωρισμένο πληθυσμό που πάσχει.

(γ) Ως Προβλεπτικός βιοδείκτης χαρακτηρίζεται εκείνος που χρησιμοποιείται για να αναγνωρίσει τα άτομα εκείνα που έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα από παρόμοια άτομα που δεν εκφράζουν το συγκεκριμένο βιοδείκτη, να επηρεάζονται ευνοϊκά ή όχι ύστερα από την έκθεσή τους σε ένα φάρμακο ή έναν περιβαλλοντικό παράγοντα [26].

1.7.1 Χαρακτηριστικά ενός αποτελεσματικού βιοδείκτη

Ένας αποτελεσματικός βιοδείκτης θα πρέπει να παρέχει μετρήσεις που να συνδέονται ισχυρά με την παθολογία της νόσου και στη συγκεκριμένη περίπτωση με τη Χρόνια Νεφρική Νόσο. Παράλληλα, θα πρέπει να είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι και ειδικοί για τη νόσο, ενώ απαραίτητη είναι η ισχυρή σύνδεση με ιστοπαθολογικά αποτελέσματα που προκύπτουν από τις αντίστοιχες βιοψίες και την εξέλιξη της

νόσου. Επιπλέον, η μέθοδος μέτρησης του βιοδείκτη είναι επιθυμητό να δίνει αποτελέσματα σε μικρό χρονικό διάστημα και να είναι μη επεμβατική για τον ασθενή. Ιδανικά, όσον αφορά τη Χρόνια Νεφρική Νόσο, είναι αναγκαία η ανίχνευση βιοδεικτών στα πρώιμα στάδια [27].

1.7.2 Βιοδείκτες που σχετίζονται με τη Χ.Ν.Ν στην κλινική πρακτική.

Σήμερα, για τη διάγνωση της Χ.Ν.Ν, πέρα από τον GFR χρησιμοποιούνται ως δείκτες, η κρεατινίνη ορού (sCr) και η συστατίνη C (CysC) σε συνδυασμό με το ρυθμό σπειραματικής διήθησης, οι οποίοι σχετίζονται κυρίως με την εξέλιξη της νόσου.

Ωστόσο, ένας από τους πιο ευαίσθητους δείκτες είναι η Αλβουμινουρία η οποία προηγείται της νεφρικής δυσλειτουργίας, με αποτέλεσμα να έχει καθοριστεί ότι υπάρχει μία πολύ δυνατή σύνδεση με την πρόοδο της νόσου και με τα αντίστοιχα αποτελέσματα. Βέβαια, ενώ ο δείκτης αυτός χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη υπόκεινται σε περιορισμούς όσον αφορά την ειδικότητα και την ευαισθησία [28].

1.7.3 Βιοδείκτες που σχετίζονται με τη Χ.Ν.Ν σε πειραματικό στάδιο

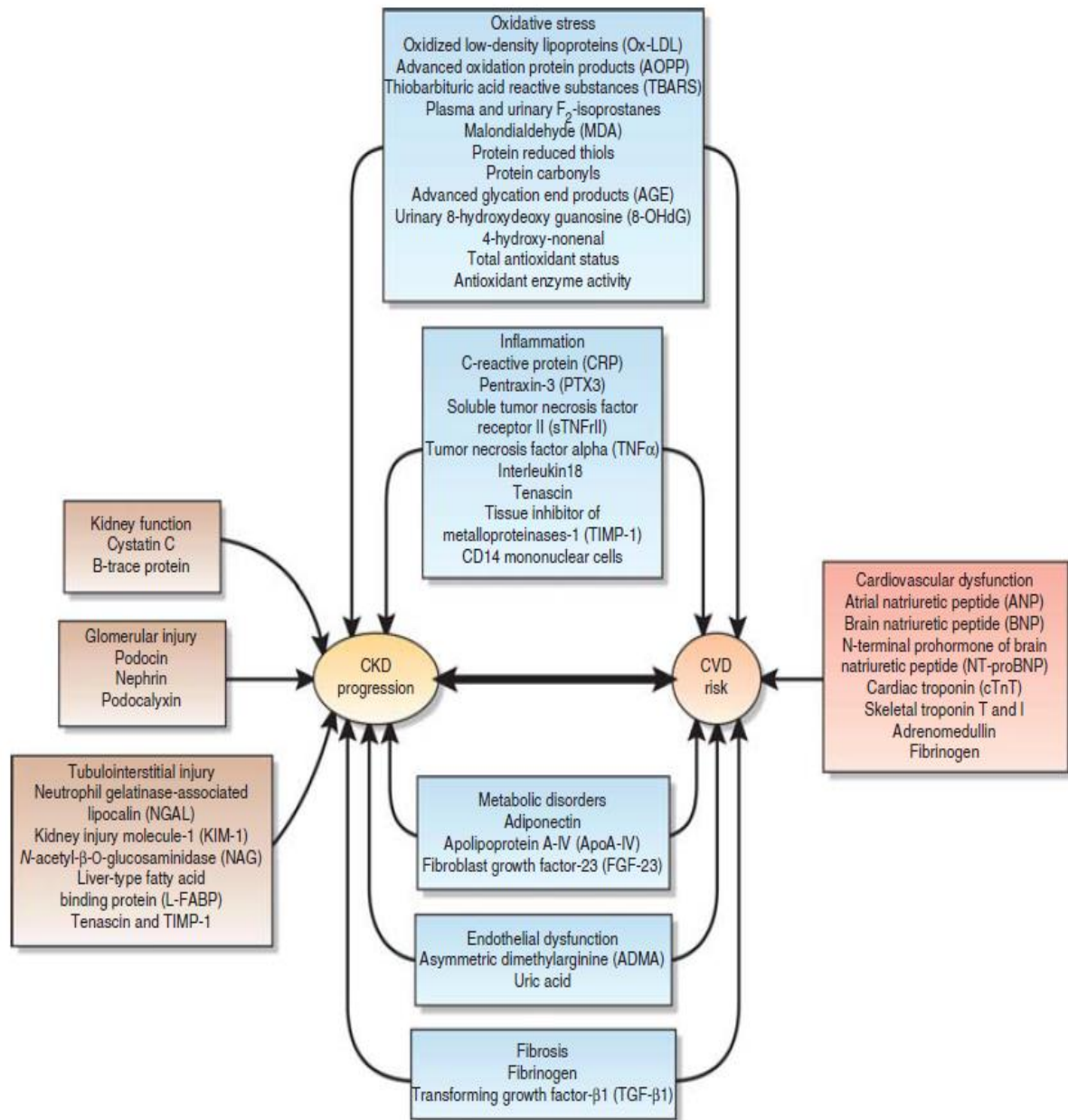
Οι έρευνες για την εύρεση νέων βιοδεικτών που σχετίζονται με τη διάγνωση αλλά κυρίως με την εξέλιξη της νόσου αυξάνονται με την πάροδο του χρόνου. Σύμφωνα με διάφορες μελέτες που πραγματοποιούνται καθημερινά, έχουν προκύψει αρκετοί δείκτες που υπόσχονται άμεση πρόγνωση της εξέλιξης της νόσου, ενώ παράλληλα πραγματοποιούνται και μελέτες που αφορούν άλλες νόσους που σχετίζονται όμως με τη Χρόνια Νεφρική Νόσο (**Εικόνα 1.7**). Τέτοιοι δείκτες μπορούν να ανιχνευτούν σε διάφορα βιολογικά υλικά, όπως στο πλάσμα, τα ούρα, το σάλιο και δείγματα που προέρχονται από την διαδικασία της εκπνοής [27-31]. Παρακάτω, διακρίνονται κάποιοι από τους **προγνωστικούς** βιοδείκτες.

- **ADMA (Asymmetric Dimethyl arginine)**
Πρόκειται για ένα μεταβολίτη της L-arginine ο οποίος εμφανίζεται στην ανθρώπινη κυκλοφορία. Φαίνεται ότι αύξηση της ADMA αναστέλλει τη σύνθεση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) μειώνοντας την ενδοθηλιακή λειτουργία και κατ' επέκταση την ομαλή νεφρική λειτουργία. Πρόκειται για έναν ισχυρό βιοδείκτη που προβλέπει την υψηλή θνησιμότητα στη Χρόνια Νεφρική Νόσο [27,28,31].
- **KIM-1 (Kidney Injury Molecule-1)**
Πρόκειται για μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία αυξάνεται στα σωληνώδη επιθηλιακά κύτταρα των νεφρών ύστερα από ισχαιμικό shock ή τοξική βλάβη. Δεν ανιχνεύεται σε φυσιολογικούς νεφρούς και ούρα. Ωστόσο, μπορεί να αποτελέσει πιθανό βιοδείκτη πρόγνωσης για τη Χ.Ν.Ν λόγω καταστροφής των σωληναρίων και δείκτη πρώιμης ανίχνευσης Χ.Ν.Ν άγνωστης αιτιολογίας [27,31].
- **NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin)**
Αποτελεί πρωταρχικό μόριο στην ανάπτυξη των νεφρών και επάγει την μετατροπή των εμβρυϊκών μεσεγγυματικών κυττάρων σε επιθηλιακά κύτταρα, διαμορφώνοντάς τα σε σωληνώδη κύτταρα, ενώ παράλληλα ολοκληρώνει το σχηματισμό των νεφρώνων. Τα επίπεδα έκφρασης αυτού του μορίου φαίνεται να σχετίζονται με το στάδιο της νεφρικής δυσλειτουργίας αποτελώντας έτσι έναν πολλά υποσχόμενο προγνωστικό βιοδείκτη [27,29,31].
- **B2MG (B2 Micro globulin)**
Αποτελεί μικρό μόριο που ανήκει στα τάξης I – HLA μόρια και βρίσκεται σε όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα του σώματος. Αφθονεί σε Λεμφοκύτταρα και Μονοκύτταρα. Χαρακτηριστικό του αποτελεί ότι φιλτράρεται από το σπείραμα και μεταβολίζεται στα εγγύς σωληνάκια. Αυξάνεται στη Χ.Ν.Ν προκαλώντας αυτοανοσία και πρόωρη γήρανση [27].
- **L-FABP (Fatty acid binding protein)**
Πρόκειται για μία πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των lipid-binding proteins με πρωταρχικό ρόλο τη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων και την ενδοκυττάρια μεταφορά, ενώ εκφράζεται σε διάφορους ιστούς, όπως στους νεφρούς. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η αλβουμίνη

φιλτράρεται στο σπείραμα και επανααρροφάται στα εγγύς σωληνάρια. Μετά την επαναπορρόφηση η κυτοσολική αλβουμίνη απελευθερώνει λιπαρά οξέα τα οποία στη συνέχεια δεσμεύονται στην L-FABP τα οποία στη συνέχεια μετακινούνται στα λυσοσώματα. Τα δεσμευμένα από την L-FABP λιπαρά οξέα είναι συνήθως κατανεμημένα στα κυτοσολικά περοξισώματα, μέσα στα οποία το μέγεθος των λιπαρών οξέων περιορίζεται. Στη Χ.Ν.Ν τα λιπαρά οξέα υπερφορτώνουν τα εγγύς σωληνάρια αποτέλεσμα την εμφάνιση πρωτεϊνουρίας [30,31].

- **miRNA, ncRNA, lncRNA , lincRNA Biomarkers**

Πρόκειται για πολλά υποσχόμενα μόρια αφού η ανίχνευσή τους αλλά και ο βιολογικός τους ρόλος μπορούν να τα ορίσουν ως βιοδείκτες για διάφορες νόσους. Τα miRNAs είναι μικρά (μήκους 21-23 νουκλεοτιδίων), ενδογενή αντί-νοσηματικά μη κωδικοποιητικά RNA τα οποία ενεργούν ως μετά-μεταφραστικοί καταστολείς της γονιδιακής έκφρασης. Συγκεκριμένα, βρίσκονται σε πολλά σημεία και συστατικά των νεφρών, όπως στην παραγωγή της ρενίνης και στο νερό της ομοιόστασης. Έχουν βρεθεί miRNAs που ρυθμίζουν την ίνωση των νεφρών μέσω άμεσης παρεμπόδισης ή διέγερσης της έκφρασης των γονιδίων καθώς και μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού TGF-β. Μελέτες σε πειραματικά μοντέλα έδειξαν ότι διαφορετική ιστική έκφραση ειδικών miRNAs (miR-145, -143, -126, -223, -155, -125b) που αντικατοπτρίζονται από τα επίπεδα τους στο πλάσμα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως μη επεμβατικοί δείκτες αγγειακής αβεστοποίησης και καρδιαγγειακών επιπλοκών στην Χ.Ν.Ν. Επίσης έχουν βρεθεί 211 ncRNAs που εμφανίζουν σημαντικές διαφορές στην εξωσωματική τους αφθονία ($P\text{-adj} < 0.1$) στο στάδιο 1 της Χ.Ν.Ν, 153 ncRNAs στο στάδιο 2 της Χ.Ν.Ν, 221 ncRNAs στο στάδιο 3 της Χ.Ν.Ν ,117 ncRNAs στο στάδιο 4 της Χ.Ν.Ν. Επιπροσθέτως έχουν ανιχνευτεί 16miRNAs εκ των οποίων τα 9 αυξάνονται σημαντικά (let-7c-5p, miR-222-3p, miR-27a-3p, miR-27b-3p, miR-296-5p, miR-31-5p, miR-3687, miR-6769b-5p και miR-877-3p) και τα 7 μειώνονται σημαντικά (miR-133a, miR-133b, miR-15a-5p, miR-181a-5p, miR-34a-5p, miR-181c-5p και miR1-2) σε ασθενείς με Χ.Ν.Ν σε σχέση με υγιή άτομα. [27].



Εικόνα 1.7 Βιοδείκτες και παράγοντες που σχετίζονται με την εξέλιξη της Χρόνιας Νεφρικής Νόσου (CKD) και Νεφρικής Καρδιαγγειακής Νόσου (CVD) [31].

2. ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ

Η πρωτεομική ασχολείται με την ανάλυση πρωτεϊνών σε μεγάλη κλίμακα (π.χ. κυτταρικές σειρές και ιστοί) και περιλαμβάνει τρία κύρια πεδία. Πρώτον, το χαρακτηρισμό πρωτεϊνών σε μεγάλη κλίμακα και τις μετά-μεταφραστικές τους τροποποιήσεις, όπως είναι η φωσφορυλίωση και η γλυκοζυλίωση, τροποποιήσεις ιδιαίτερα σημαντικές για τη λειτουργία των πρωτεϊνών διότι καθορίζουν την ενεργότητα, τη σταθερότητα και τη θέση τους. Δεύτερον, τη σύγκριση επιπέδων των πρωτεϊνών σε διαφορετικά βιολογικά δείγματα με πιθανή εφαρμογή στη διάγνωση διάφορων ασθενειών. Τρίτον, τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών με τεχνικές όπως είναι η φασματομετρία μάζας. Λόγω της δυσκολίας πρόγνωσης της λειτουργίας μιας πρωτεΐνης με βάση την ομολογία της με άλλες πρωτεΐνες ή ακόμα και με τρισδιάστατες δομές, ο προσδιορισμός των συστατικών μιας πρωτεΐνης είναι σημαντικός για την ανάλυση της λειτουργίας της. Μετά από την επανάσταση στη μοριακή βιολογία, η πρωτεομική είναι χρήσιμη για την κατανόηση της βιοχημείας των πρωτεϊνών.

2.1 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ

Η Φασματομετρία μάζας είναι μια μέθοδος η οποία επιτρέπει την λεπτομερή ανάλυση πρωτεϊνών. Χρησιμοποιείται για τη μελέτη ιονισμένων μορίων σε αέρια φάση με στόχο τον ποσοτικό (μέτρηση σχετικών μοριακών μαζών οργανικών ενώσεων και βιοπολυμερών) και ποιοτικό προσδιορισμό συστατικών ενός μείγματος, την αναγνώριση άγνωστων συστατικών, την ποσοτική ανάλυση γνωστών υλικών, τη μελέτη δραστηρότητας σε αέρια φάση, το χαρακτηρισμό φυσικών ιδιοτήτων των ιόντων και την απόκτηση δομικών πληροφοριών. Επίσης με τη φασματομετρία μάζας επιτυγχάνεται ο εντοπισμός μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων.

Αρχή μεθόδου

Η φασματομετρία μάζας βασίζεται στον διαχωρισμό των μαζών φορτισμένων σωματιδίων (κυρίως κατιόντων) με την βοήθεια κατάλληλης διάταξης και την

εύρεση της αντιστοιχίας των μαζών των λαμβανομένων ιόντων με, με την δομή της πρόδρομης ένωσης. Είναι μία τεχνική με πολύ υψηλά επίπεδα ειδικότητας και ευαισθησίας. Οι αναλύσεις μπορούν συχνά να ολοκληρωθούν με πολύ μικρές ποσότητες, απαιτώντας ποσότητες υλικού, συχνά μικρότερες από *picogram* (10^{-12} γραμμάρια). Ακριβέστερα, η φασματομετρία μάζας βασίζεται στην παραγωγή δέσμης ιοντικών θραυσμάτων (fragments) με βομβαρδισμό των εξεταζόμενων μορίων συνήθως με ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας. Τα παραγόμενα θραύσματα στη συνέχεια διαχωρίζονται με εφαρμογή ηλεκτρικού ή μαγνητικού πεδίου ή με άλλες μεθόδους. Ο διαχωρισμός των ιόντων γίνεται με βάση το λόγο μάζας προς φορτίο (m/z) κάθε ιοντικού θραύσματος. Όπως γίνεται επομένως σαφές η φασματομετρία δεν μετράει απευθείας μάζα αλλά το λόγο μάζα προς φορτίο [32-34].

Η λειτουργία του φασματόμετρου μάζας συνοψίζεται στα παρακάτω βήματα:

1. δημιουργία ιόντων (μόρια που έχουν ηλεκτρικό φορτίο) σε αέρια φάση.
2. διαχωρισμός των ιόντων στο χώρο ή το χρόνο ανάλογα με το **λόγο μάζα προς φορτίο (m/z)**.
3. μέτρηση της ποσότητας των ιόντων (κάθε λόγου μάζας προς φορτίου).

Οι τέσσερις σημαντικοί παράμετροι της τεχνικής είναι η **μάζα**, το **φορτίο**, η **ταχύτητα** και η **ένταση**.

Η αποτελεσματικότητα με την οποία διαχωρίζονται τα ιόντα στο φασματόμετρο μάζας εξαρτάται από την **Διακριτική ικανότητα** (Resolving Power, **R**), που ορίζεται ως **$R = m/\Delta m$**

Όπου: **m** είναι η μάζα των ιόντων και **Δm** είναι η διαφορά μάζας μεταξύ δύο ευδιάκριτων κορυφών στο φάσμα των μαζών [32-34].

2.1.1 Ιστορική εξέλιξη

Οι βασικές αρχές της φυσικής που διέπουν την ανάπτυξη ενός φασματόμετρου μάζας ερευνήθηκαν εντατικά στα τέλη του 19ου αιώνα και στις αρχές του 20ου αιώνα, κυρίως στην Ευρώπη και στο Ηνωμένο Βασίλειο. Η φασματομετρία μάζας βασίστηκε στην ανακάλυψη του γερμανού φυσικού Wilhelm Wien το 1898, ο οποίος διαπίστωσε την επιρροή του μαγνητικού πεδίου σε δέσμη φορτισμένων σωματιδίων.

Το 1906 ο J.J. Thompson τιμήθηκε με βραβείο Nobel Φυσικής σε αναγνώριση των μεγάλων πλεονεκτημάτων των πειραματικών και θεωρητικών ερευνών του, σχετικά με την αγωγιμότητα του ηλεκτρισμού σε αέρια. Ο J.J. Thompson ήταν αυτός που ανακάλυψε το ηλεκτρόνιο και καθόρισε τον λόγο μάζας προς το φορτίο του.

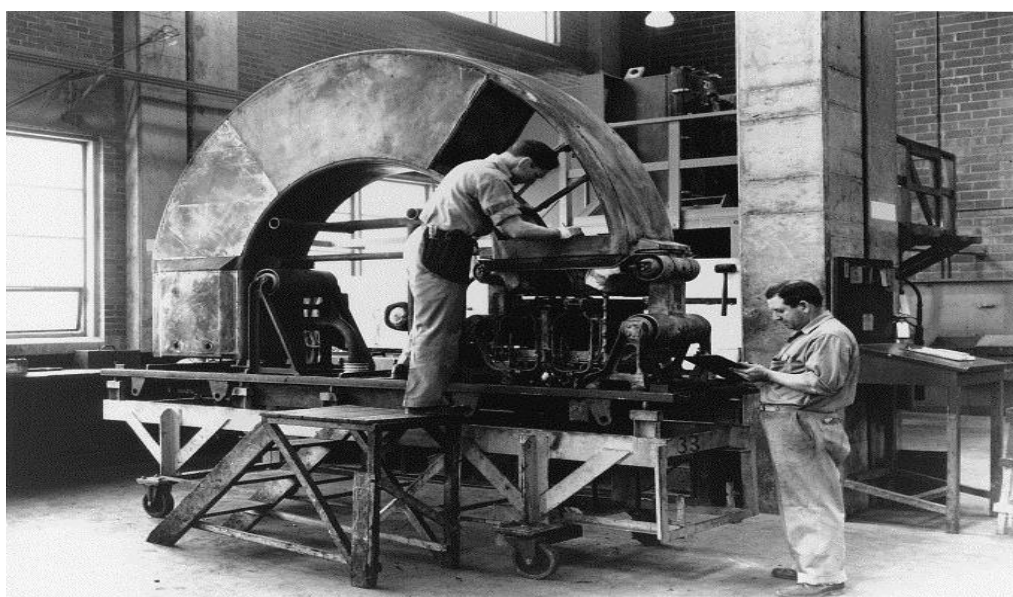
Το 1912 κατασκευάστηκε το πρώτο φασματόμετρο μάζας (parabola spectrometer) από τον J.J. Thompson και αναλύθηκαν τα φάσματα των O_2 , N_2 , CO , CO_2 και $COCl_2$. Το 1918 ο A.J. Dempster ανέπτυξε την πηγή ιοντισμού με πρόσκρουση ηλεκτρονίων και το πρώτο φασματόμετρο μαγνητικής εστίασης. Το 1919 αναπτύχθηκε από τον F.W. Aston το πρώτο φασματόμετρο μάζας για τη μελέτη ισοτόπων, το οποίο χρησιμοποιούσε ηλεκτροστατικά και μαγνητικά πεδία προκειμένου να διαχωρίσει ισοτοπικά ιόντα (Βραβείο Nobel Χημείας, 1922). Μέχρι το 1930 η φασματομετρία μάζας είχε εδραιωθεί ως τεχνική για τον διαχωρισμό ατομικών ιόντων με βάση την μάζα τους. Το πρώτο φασματόμετρο μάζας τύπου TOF (Time of Flight) κατασκευάστηκε το 1946 (**Εικόνα 2.1**).

Από τα τέλη της δεκαετίας του 1950 μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 1960, ο Klaus Biemann χρησιμοποίησε την φασματομετρία μάζας για τη μέτρηση των μοριακών βαρών μικρών μορίων για την επαλήθευση της δομής τους. Στα τέλη της δεκαετίας του 1960 προέκυψαν δύο σημαντικά τεχνολογικά ευρήματα που βοήθησαν την αλληλούχιση πεπτιδίων χρησιμοποιώντας φασματομετρία μάζας. Το πρώτο ήταν η εφεύρεση του χημικού ιοντισμού, μία μέθοδος ιοντισμού που προκαλούσε πολύ μικρή θραυσματοποίηση στα ιόντα των πεπτιδίων. Το δεύτερο ήταν η ανάπτυξη μεθόδων σύνδεσης του αέριου χρωματογράφου στο

φασματόμετρο μάζας (GC-MS), οι οποίες επέτρεψαν τον διαχωρισμό των μορίων στο φασματόμετρο μάζας.

Στα τέλη της δεκαετίας του 1960 και στις αρχές της δεκαετίας του 1970 οι τεχνικές φασματομετρίας μάζας για την αλληλούχιση πεπτιδίων και πρωτεϊνών άρχισαν να αναπτύσσονται με ταχείς ρυθμούς. Στα μέσα της δεκαετίας του 1970, αναπτύχθηκε το φασματόμετρο μάζας με τριπλό τετράπολο και ο Donald Hunt άρχισε να αναπτύσσει μια στρατηγική προσδιορισμού αλληλουχίας πεπτιδίων βασισμένη σε δίδυμη φασματομετρία μάζας (tandem mass spectrometry). Το 1981 ο Michael Barber και οι συνεργάτες του εισήγαγαν τον ιοντισμό ροής ατόμων μεγάλης ταχύτητας (FAB), μια μέθοδο μαλακού ιοντισμού που δεν απαιτούσε παραγωγοποίηση.

Ακόμη και μετά την εφεύρεση της τεχνικής FAB που πρόσφερε βελτιώσεις στην ικανότητα ανάλυσης βιομορίων, οι εφαρμογές ήταν ακόμη περιορισμένες. Δύο νέες τεχνικές ιοντισμού για βιομόρια προέκυψαν στα τέλη της δεκαετίας του '80 που άλλαξαν τα δεδομένα μέχρι εκείνη την εποχή: 1) ο ιοντισμός εκρόφησης υποβοηθούμενος από υλικό μήτρας και laser (MALDI) που αναπτύχθηκε από τους Michael Karas και Franz Hillenkamp και 2) ο ιοντισμός ηλεκτροψεκασμού (ESI) που αναπτύχθηκε από τον John Fenn (Βραβείο Nobel Χημείας, 2002). Αυτή η νέα και ισχυρή ικανότητα ανάλυσης βιομορίων, οδήγησε σε βελτιωμένες διεργασίες για ανάλυση αλληλουχίας πεπτιδίων και πρωτεϊνών [36].

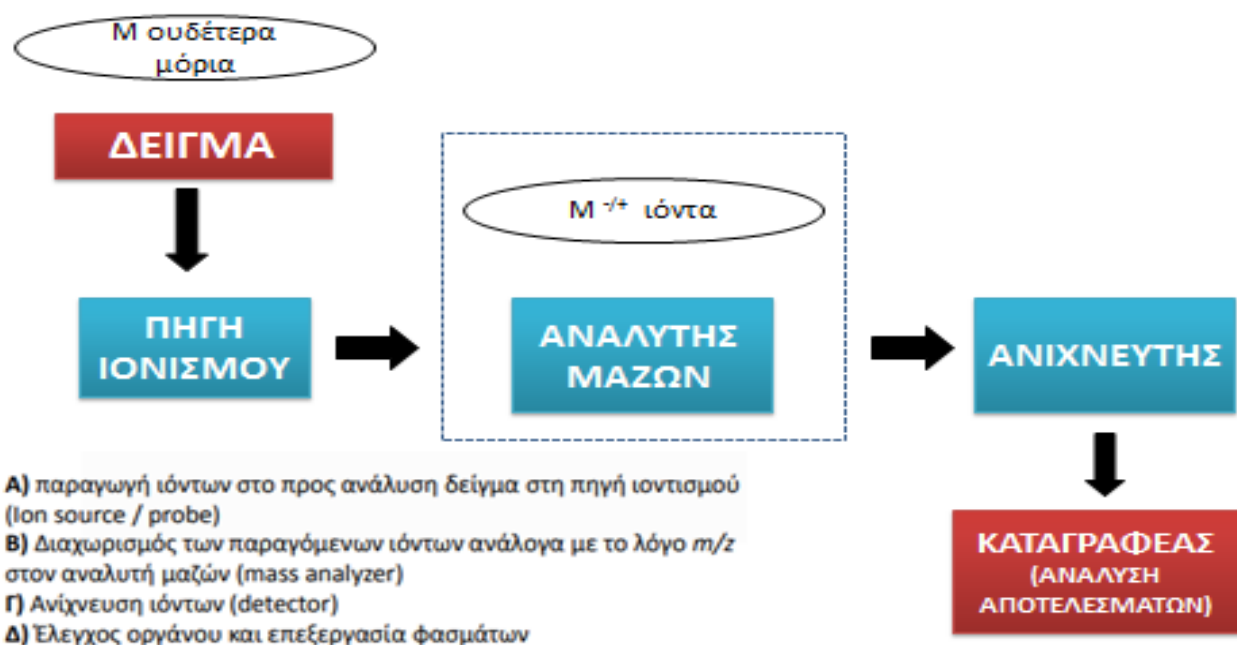


Εικόνα 2.1 Απεικόνιση του πρώτου φασματόμετρου μάζας Time of Flight το 1946.

2.1.2 Διάταξη φασματομέτρου μάζας

Ένα φασματομέτρο μάζας αποτελείται από τρία βασικά συστήματα:

- 1) Πηγή Ιονισμού
- 2) Αναλυτή μάζας
- 3) Ανιχνευτή (**Εικόνα 2.2**).



Εικόνα 2.2 Φασματομέτρο μάζας

Πηγές Ιονισμού

Για την ανάλυση ενός δείγματος με φασματομετρία μάζας είναι απαραίτητος ο ιονισμός του αναλυτή, δεδομένου ότι τα περισσότερα υπό ανάλυση δείγματα δε φέρουν φορτίο. Παρακάτω παρατίθενται ορισμένες μέθοδοι ιονισμού:

- Ιοντισμός πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (Electron impact - EI)
- Χημικός ιοντισμός (Chemical ionization - CI)
- Ηλεκτροψεκασμός (Electrospray - ESI)
- Φωτοϊοντισμός (Photoionization)
- Ιοντισμός πεδίου (Field ionization)
- Χημικός ιοντισμός υπό ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure Chemical Ionization - APCI)
- Θερμοψεκασμός (Thermospray - TSP)
- Ιοντισμός μέσω πρόσκρουσης με σωματίδια χαμηλής ενέργειας (Low –energy Particle Impact)
- Ιοντισμός ροής ατόμων μεγάλης ταχύτητας (Fast Atom Bombardment – FAB)
- Ιοντισμός εκρόφησης από επιφάνειες (Desorption from Surfaces)
- Ιοντισμός εκρόφησης υποβοηθούμενος από πλάσμα (Plasma Desorption – PD)
- Ιοντισμός εκρόφησης υποβοηθούμενος από υλικό μήτρας και laser (Laser Ionization – Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – MALDI)
- Θερμικός Ιοντισμός (Thermal Ionization)
- Ιοντισμός μέσω επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (Inductively Coupled Plasma - ICP) [34].

Αναλυτές μάζας

Ένας αναλυτής μάζας διαχωρίζει τα ιόντα με βάση το λόγο μάζα προς φορτίο (m/z) και το ιοντικό ρεύμα που καταγράφεται αντιστοιχεί σε ένα μόνο λόγο m/z κάθε στιγμή. Οι αναλυτές μάζας κατατάσσονται σε 1) Συνεχείς και 2) Παλμικούς αναλυτές μάζας.

1) Συνεχείς αναλυτές μάζας

- Τετραπολικός αναλυτής μαζών ή τετράπολο (quadrupole - Q)
- Αναλυτές μαγνητικού τομέα (magnetic sector)

2) Παλμικοί αναλυτές μάζας

- Τετραπολική παγίδα ιόντων (ion trap - IT)
- Αναλυτές μαζών χρόνου πτήσης (Time Of Flight - TOF)
- Αναλυτής κυκλοτρονικού συντονισμού ιόντων με μετασχηματισμό Fourier (Fourier-transform Ion Cyclotron Resonance - FTICR)

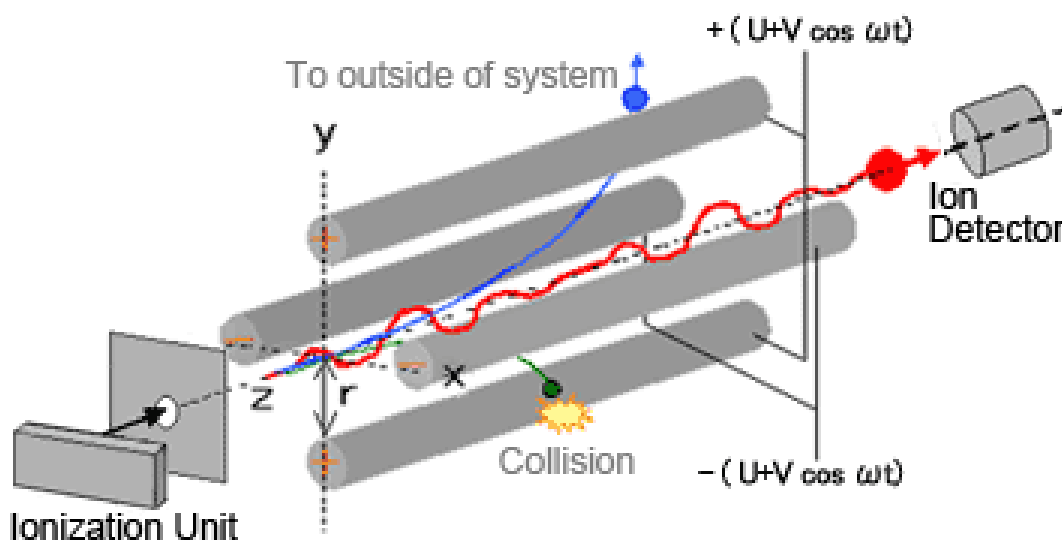
Ανιχνευτές

Τα ιόντα διαχωρίζονται στον αναλυτή (mass analyzer) με βάση το λόγο μάζας προς φορτίο και μετά συλλέγονται από έναν ανιχνευτή (detector). Οι ανιχνευτές κατηγοριοποιούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: 1) ανιχνευτές που αυξάνουν την ένταση του σήματος που φτάνει σε αυτούς (Φώτο-πολλαπλασιαστές, ηλεκτρονικοί πολλαπλασιαστές) και 2) ανιχνευτές που μετρούν άμεσα το φορτίο που φτάνει σε αυτούς, όπως είναι οι φωτογραφικές πλάκες [35].

2.1.3 Αρχή Λειτουργίας Τετραπολικού Αναλυτή Μαζών

Αποτελεί μία από τις νεώτερες μεθόδους διαχωρισμού μαζών. Το τετραπολικό φίλτρο μαζών, αποτελείται από τέσσερις παράλληλους πόλους ή ράβδους. Ο διαχωρισμός μαζών βασίζεται στην κίνηση των ιόντων που επιτυγχάνεται με την υπέρθεση ενός εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου με συχνότητα στην περιοχή των ραδιοκυμάτων (RF, radiofrequency), σε ένα συνεχές (DC) ηλεκτρικό πεδίο. Το DC-RF πεδίο εφαρμόζεται στις τέσσερις παράλληλες ράβδους (**Εικόνα 2.3**). Τα ιόντα με παράλληλη κατεύθυνση στις ράβδους, αναγκάζονται να κινηθούν σε μία τροχιά ταλάντωσης ανάμεσα στους άξονες X και Y. Όταν το πλάτος της ταλάντωσης του ιόντος παραμένει σταθερό στο χρόνο, η τροχιά χαρακτηρίζεται ως σταθερή, ενώ αν το πλάτος της ταλάντωσης αυξάνει με την πάροδο του χρόνου, η τροχιά χαρακτηρίζεται ως ασταθής. Όπως είναι προφανές, μία σταθερή τροχιά έχει σαν αποτέλεσμα την δίοδο ενός ιόντος διαμέσου του χώρου καθ' όλο το μήκος των ράβδων, ενώ αντίθετα, αν η τροχιά είναι ασταθής, το ιόν τελικά προσκρούει πάνω στις ράβδους, εξουδετερώνεται και δεν κατορθώνει να φτάσει στον ανιχνευτή (που βρίσκεται στο άλλο άκρο των ράβδων). Συνεπώς μόνο ιόντα με συγκεκριμένη m/z κατορθώνουν να φτάσουν στον ανιχνευτή. Η μάζα m είναι ανάλογη του V και η διακριτική ικανότητα μπορεί να ρυθμιστεί με την μεταβολή του U . Επιπλέον, λόγω

της θερμικής κίνησης των ιόντων, η ανεξαρτησία της διακριτικής ικανότητας από την μάζα ισχύει μόνο για επαρκή χρόνο παραμονής στο τετραπολικό πεδίο και αρκετά στενή κατανομή ταχυτήτων στον άξονα Z.



Εικόνα 2.3 Τετραπολικός Αναλυτής Μάζας [35].

Η διαπερατότητα των ιόντων δια μέσου του τετραπολικού φίλτρου μειώνεται με την αύξηση της διακριτικής ικανότητας (αύξηση του U). Η σάρωση της κλίμακας μαζών συνήθως γίνεται είτε με μεταβολή της κυκλικής συχνότητας ω , ή με παράλληλη μεταβολή των εντάσεων των πεδίων U και V (amplitude), κρατώντας τον λόγο U/V σταθερό. Τα πλεονεκτήματα του τετραπολικού φίλτρου μαζών είναι το μικρό κόστος και η αναπαραγωγιμότητα των λαμβανομένων φασμάτων μάζας. Μειονεκτήματα του είναι η χαμηλή διακριτική ικανότητα (1 amu) και η εξάρτηση της διαπερατότητας ενός ιόντος από την μάζα του [35].

2.1.4 Συνδυασμοί μεθόδων ανάλυσης

Η φασματομετρία μαζών χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τεχνικές διαχωρισμού όπως η Αέρια Χρωματογραφία (gas chromatography, GC) και η υγρή χρωματογραφία (liquid chromatography, LC) λόγω της μεγάλης της ευαισθησίας

και της ικανότητάς της να αναγνωρίζει χημικές ενώσεις. Σε αυτό το συνδυασμό περιλαμβάνονται συνήθως και τεχνικές ιονισμού. Επίσης χρησιμοποιείται ο συνδυασμός δύο ή περισσότερων ίδιων σταδίων ανάλυσης μαζών.

LC-MS

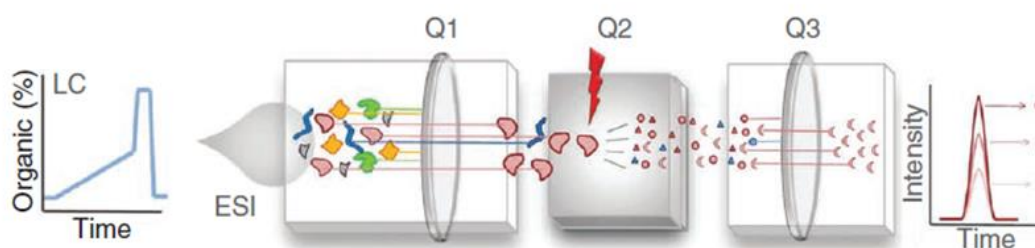
Τα δείγματα διαλύονται αρχικά σε κατάλληλο διαλύτη και στη συνέχεια το διάλυμα εισάγεται στο φασματογράφο μάζας με μια κατάλληλη αντλία [π.χ., υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)]. Μετέπειτα το υγρό ψεκάζεται ώστε να φτιαχτούν σταγονίδια τα οποία περνώντας από μια σειρά διαδικασιών θα αφαιρέσουν το διαλύτη και θα μείνουν στερεά σωματίδια (δείγμα) που θα ιονιστούν [35,37].

2.2 ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ (Multiple Reaction Monitoring, MRM)

Η πολλαπλή αντίδραση ανίχνευσης (MRM) χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ειδικών, προκαθορισμένων μορίων με γνωστές ιδιότητες θραυσματοποίησης σε πολύπλοκα υποστρώματα. Χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με LC-MS, όπου η χρωματογραφική στήλη συνδέεται με την πηγή ηλεκτροψεκασμού του φασματόμετρου μάζας. Το MRM ή αλλιώς SRM εκμεταλλεύεται τη μοναδική ικανότητα του τριπλού τετράπολου (QQQ) να δρα ως φίλτρο μαζών και να ελέγχει επιλεκτικά ένα συγκεκριμένο μοριακό ιόν και στη συνέχεια ένα ή περισσότερα ιοντικά θραύσματα που προκύπτουν από το διαχωρισμό σύγκρουσης (collisional dissociation) του πρόδρομου ιόντος. Ο αριθμός των ιόντων που φτάνει στον ανιχνευτή υπολογίζεται με την πάροδο του χρόνου, με αποτέλεσμα ένα χρωματογραφικό ίχνος που θα έχει ως συντεταγμένες το χρόνο κατακράτησης και την ένταση του σήματος. Διάφορα τέτοια ζεύγη πρόδρομων-ιοντικών θραυσμάτων, τα οποία καλούνται SRM transitions (μεταπτώσεις), μπορούν να μετρούνται διαδοχικά και επανειλημμένα σε μια περιοδικότητα που γρήγορα θα συγκρίνονται με τη χρωματογραφική έκλυση του

μορίου. Για κάθε μετάπτωση λαμβάνεται μία χρωματογραφική κορυφή, επιτρέποντας έτσι την ποσοτικοποίηση πολλαπλών μορίων.

Όσον αφορά την πρωτεομική, η τεχνική MRM μετράει πεπτιδία τα οποία παράγονται από την ενζυματική πέψη του πρωτεώματος που προκύπτει από τις αντίστοιχες πρωτεΐνες. Μοριακά ιόντα επιλέγονται με κριτήριο τη μάζα του στοχευμένου πεπτιδίου και διέρχονται από τον πρώτο αναλυτή μάζας Q1. Στη συνέχεια θραυματοποιούνται στοχευμένα στους πεπτιδικούς δεσμούς με διαχωρισμό σύγκρουσης στο δεύτερο αναλυτή Q2. Μετέπειτα ένα ή περισσότερα μοναδικά ιοντικά θραύσματα που προκύπτουν από το πρόδρομο στοχευμένο πεπτίδιο μετρώνται από ένα τρίτο αναλυτή μάζας Q3 (**Εικόνα 2.4**). Η ενσωμάτωση των χρωματογραφικών κορυφών για κάθε μετάπτωση υποστηρίζει τη σχετική ποσοτικοποίηση ή στην περίπτωση χρήσης των βαριά επισημασμένων ισοτόπων πεπτιδίων αναφοράς, την απόλυτη ποσοτικοποίηση των στοχευμένων πεπτιδίων που απελευθερώνονται από την πρωτεΐνη και φορτώνονται στο LC-MS (**Εικόνα 2.5**) Η κατάλληλη επιλογή των SRM μεταπτώσεων αποτελεί μία ειδική διαδικασία για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ενός στοχευμένου πεπτιδίου σε πολύπλοκα δείγματα [38-40].

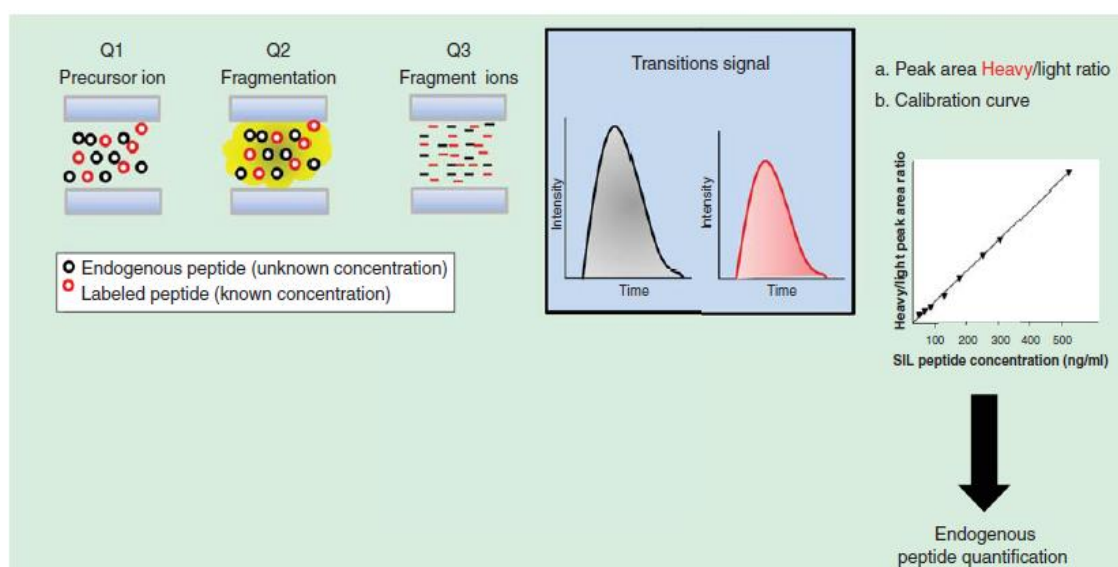


Εικόνα 2.4 SRM. Μοριακά ιόντα ενός συγκεκριμένου μορίου επιλέγονται στον αναλυτή Q1 και θραυματοποιούνται στον Q2. ESI, ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό. Μοριακά ιόντα ενός ή περισσότερων ανεπιθύμητων πεπτιδίων απομονώνονται και θραυματοποιούνται μαζί με το μόριο το οποίο έχουμε επιλέξει. Στη συνέχεια, ένα συγκεκριμένο ιοντικό θραύσμα του στοχευμένου μορίου (transition) επιλέγεται και οδηγείται στον ανιχνευτή. Ο αριθμός των στοχευμένων ιοντικών θραυσμάτων μετράται με την πάροδο του χρόνου, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός SRM ίχνους για κάθε μετάπτωση. Στη δεξιά εικόνα, οι τρεις μεταπτώσεις δηλώνουν τα τρία διαφορετικά θραύσματα του στοχευμένου μορίου [38].

Συνοπτικά, για ένα πείραμα SRM που βασίζεται στην πρωτεομική ανάλυση απαιτούνται τα εξής βήματα:

- επιλογή μίας λίστας πρωτεϊνών προς στόχευση που βασίζεται στην ειδική βιβλιογραφία ή/και προηγούμενα πειράματα
- επιλογή των στοχευμένων μοναδικών πεπτιδίων που αντιπροσωπεύει το σύνολο των πρωτεϊνών
- επιλογή του συνόλου των κατάλληλων SRM μεταπτώσεων για κάθε πεπτίδιο προς στόχευση
- την επικύρωσή τους
- τη βελτιστοποίηση των παραμέτρων της τεχνικής SRM

με αποτέλεσμα την ανίχνευση και τελικά απόλυτη ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών [38-40].



Εικόνα 2.5 Ποσοτικοποίηση βιοδεικτών με τη χρήση σταθερών-βαριά επισημασμένων πεπτιδίων αναφοράς και τριπλού τετράπολου οργάνου με την MRM διαδικασία. Στο πρώτο τετράπολο Q1, πρόδρομα ιόντα επιλέγονται, θραυσματοποιούνται στο Q2 και τα τελικά θραυσματοποιημένα ιόντα μετρώνται στο τρίτο τετράπολο Q3. Οι τιμές των ζευγών m/z που αντιπροσωπεύουν το πρόδρομο και τα ιοντικά θραύσματα ονομάζεται transition (μετάπτωση). Η ένταση της κάθε μετάπτωσης καταγράφεται και η αναλογία στην μετάπτωση του επισημασμένου πεπτιδίου υπολογίζεται, έτσι ώστε να επιτευχθεί η απόλυτη ποσοτικοποίηση [40].

3. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Με αφορμή την εργασία που δημοσιεύτηκε το 2015, (Glorieux, G. et al. New insights in molecular mechanisms involved in chronic kidney disease using high-resolution plasma proteome analysis. *Nephrology Dialysis Transplantation* 30, 1842–1852) ύστερα από την ανάλυση του πρωτεώματος στο πλάσμα με LC-MS/MS, 39 πρωτεΐνες βρέθηκαν να είναι σταθερές και πιθανόν να αποτελούν προγνωστικούς βιοδείκτες για τη Χρόνια Νεφρική Νόσο.

Έτσι, για τις 39 αυτές πρωτεΐνες ακολουθείται πολλαπλή αντίδραση ανίχνευσης (MRM) με τελικό σκοπό την ανίχνευση εκείνων των πρωτεϊνών που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε υγιή άτομα και άτομα που πάσχουν από Χρόνια Νεφρική Νόσο στα διάφορα στάδια. Αυτή η διαδικασία στοχεύει στην σχετική ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών στο πλάσμα.

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ

Ο πληθυσμός που χρησιμοποιήθηκε για την συγκεκριμένη μελέτη αποτελούταν από 53 ασθενείς του Νεφρολογικού Τμήματος Μεταμοσχεύσεων και Αιμοκάθαρσης του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Γάνδης. Από αυτούς τους ασθενείς κλινικά και MRM δεδομένα υπάρχουν για τους 46 ασθενείς. Ωστόσο μόνο 2 έχουν ταξινομηθεί ως ασθενείς με νεφρική νόσο τελικού σταδίου (ESRD) στο πρώτο σημείο μέτρησης (αρχική τιμή). Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τυποποιημένες διαδικασίες λειτουργίας (<http://edrn.nci.nih.gov/resources/standard-operatingprocedures/standard-operating-procedures>) πριν από την αιμοκάθαρση, και την προσθήκη αντιπηκτικών παραγόντων το 2008 και οι ασθενείς παρακολουθήθηκαν μέχρι το 2016. Τα δείγματα πλάσματος με αντιπηκτικό παράγοντα K₂-EDTA υποβλήθηκαν σε επεξεργασία αμέσως μετά συλλογή και αποθηκεύτηκαν στους -80°C, αφού χωρίστηκαν σε μικρότερες ποσότητες (10mL). Η ολική πρωτεΐνη των ούρων, η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη και η συγκέντρωση κρεατινίνης προσδιορίστηκαν από το εργαστήριο του νοσοκομείου με τυποποιημένες διαδικασίες. Συγκεκριμένα, η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη μετρήθηκε με ELISA στον αναλυτή ADVIA 1800 και η συγκέντρωση της κρεατινίνης μετρήθηκε με τη μέθοδο Jaffe κατά την οποία σε αλκαλικό περιβάλλον η κρεατινίνη αντιδρά με πικρικά ανιόντα προς σχηματισμό έγχρωμης ένωσης κιτρινοπορτοκαλόχρους χρώματος. Η αύξηση της απορρόφησης στα 490nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της κρεατινίνης. Ο εκτιμώμενος eGFR υπολογίστηκε με βάση την κρεατινίνη του ορού χρησιμοποιώντας την εξίσωση CKD-EPI. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις απαιτήσεις των τοπικών επιτροπών δεοντολογίας. Όλα τα άτομα έδωσαν γραπτή συγκατάθεση για τη λήψη των δειγμάτων.

4.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ MULTIPLE REACTION MONITORING (MRM)

Η ανάπτυξη της μεθόδου με σκοπό την αξιολόγηση νέων βιοδεικτών στο πλάσμα που σχετίζονται με τη Χρόνια Νεφρική Νόσο, αναπτύχθηκε βάση της τεχνικής Multiple Reaction Monitoring (MRM) με την παρακάτω διαδικασία.

- Για όλα τα δείγματα συμπεριλαμβανομένων και των δειγμάτων της ομάδας ελέγχου πραγματοποιήθηκε μέτρηση ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο BRADFORD [41] και ενζυματική πέψη με Θρυψίνη.
- Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε προκαταρτικό πείραμα με τη χρήση ενός φυσιολογικού δείγματος και εμφάνιση των πιθανών πεπτιδίων.
- Για καθεμιά από τις 39 πρωτεΐνες που προέκυψαν ύστερα από την ανάλυση του πρωτεώματος στο πλάσμα με LC-MS/MS [4] έγινε επιλογή ενός μόνο πρωτεοτυπικού πεπτιδίου, μοναδικό για την κάθε πρωτεΐνη με τη χρήση του λογισμικού SKYLINE.
- Στη συνέχεια για κάθε πρωτεοτυπικό πεπτίδιο έγινε παραγγελία του αντίστοιχου σταθερά επισημασμένου με ισότοπα συνθετικού πεπτιδίου.
- Κατόπιν πραγματοποιήθηκε έλεγχος των πεπτιδίων όσον αφορά την καθαρότητα τους με τη μέθοδο MALDI.
- Παράλληλα δημιουργήθηκε standard curve για κάθε πρωτεΐνη ξεχωριστά ώστε να γίνει η επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσής τους που θα χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση.
- Υπολογίστηκε το CV% (Coefficient Variation) για τον έλεγχο της αναπαραγωγιμότητας.
- Εξετάστηκε η γραμμική συσχέτιση της θεωρητικής και πειραματικής τιμής για τον έλεγχο της ακρίβειας καθώς και η επαναληψιμότητα στις μετρήσεις των επισημασμένων πεπτιδίων.
- Συν τοις άλλοις, όσες πρωτεΐνες πέρασαν επιτυχώς τους περαιτέρω ελέγχους μετρήθηκαν παράλληλα με τα δείγματα και έτσι επιτεύχθηκε σχετική ποσοτικοποίηση της κάθε πρωτεΐνης στο κάθε δείγμα.
- Τέλος, έγιναν οι απαραίτητες στατιστικές δοκιμασίες για την αξιολόγηση των πιθανών νέων βιοδεικτών.

4.2.1 Επιλογή πρωτεοτυπικών πεπτιδίων και σταθερά επισημασμένα με ισότοπα συνθετικά πεπτίδια

Για τους 39 υποψήφιους βιοδείκτες της Χ.N.N επιλέχθηκαν πρωτεοτυπικά πεπτίδια από το PeptideAtlas (www.peptideatlas.org) με βάση το σκορ τους και των αριθμό των παρατηρήσεων σε δείγματα πλάσματος. Τα κατάλληλα ζεύγη ιονισμένων πρόδρομων μορίων/θραυσμάτων για το κάθε πεπτίδιο επιλέχθηκαν με την χρήση του λογισμικού Skyline και της βιβλιοθήκης με φάσματα από πρωτεΐνες ανθρώπου (2016_09_22_human_consensus_final_true_lib) η οποία λήφθηκε από το NIST (National Institute of Standards and Technology, <http://www.nist.gov/>). Οκτώ πρωτεΐνες εξαιρέθηκαν, λόγω έλλειψης διαθέσιμων πληροφοριών για τα φάσματα πρωτεοτυπικών πεπτιδίων. Η τελική επιλογή έγινε με βάση την ποιότητα των φασμάτων MS/MS του κάθε πεπτιδίου (**Πίνακας 3.1_Παράρτημα**). Ακατέργαστα, συνθετικά, επισημασμένα με ισότοπα πεπτίδια (N15 και C13 επισημασμένη αργινίνη ή λυσίνη) πανομοιότυπα με τα ενδογενή αγοράστηκαν από την JPT Peptide Technologies για την ποσοτικοποίηση και την διασφάλιση της υψηλής ειδικότητας της ανάλυσης. Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη χρήση του λογισμικού Skyline και όλα τα φάσματα ελέγχθηκαν προκειμένου να εξασφαλισθεί η ποιότητα και η ακρίβεια της επιλογής των κορυφών. Η κοινή ψηλότερη κορυφή με το μεγαλύτερο εμβαδόν (ενδογενή και συνθετικά) χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της αναλογίας ενδογενών/συνθετικών (Light/Heavy) πεπτιδίων.

4.2.2 Απομόνωση πρωτεΐνης από το πλάσμα

Για να μπορεί να γίνει η μέτρηση των βιοδεικτών στο πλάσμα με τη μέθοδο MRM είναι απαραίτητη η απομόνωση των πρωτεϊνών από το δείγμα. Για να επιτευχθεί αυτό στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε το εξής πρωτόκολλο:

Όλα τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 1000g για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου (25⁰C) προκειμένου να ληφθεί το υπερκείμενο. Χρησιμοποιήθηκε από κάθε

δείγμα ποσότητα 10 μL . Στη συνέχεια έγινε μέτρηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο πλάσμα με τη μέθοδο **BRADFORD** (συνήθης αραιώση 1:100) και λήφθηκε εκείνη η ποσότητα του πλάσματος που αντιστοιχούσε σε 100 mg πρωτεΐνης [41]. Έγινε προσθήκη απιονισμένου νερού έως ότου ο όγκος πλησιάσει τα 10 μL . Κατόπιν, σε κάθε δείγμα προστέθηκε αποδιατακτικό ρυθμιστικό διάλυμα (8M Urea, 0,05M NH_4HCO_3) με pH 8.00 το οποίο είναι το βέλτιστο για την πέψη με τη θρυψίνη. Ακολούθησε αναγωγή με 2 μL DTE (dithioerythritol - διθειο ερυθριτόλη) 100mM στο αποδιατακτικό ρυθμιστικό διάλυμα και επώαση στους 37°C για 30 min. Ύστερα, ακολούθησε αλκυλίωση με 2,2 μL IAM (iodoacetamide – ιωδοακεταμίδιο) 550mM στο αποδιατακτικό ρυθμιστικό διάλυμα και επώαση για 30 min στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα τα δείγματα αραιώθηκαν με 75 μL NH_4HCO_3 50mM προκειμένου να μειωθεί η συγκέντρωση της Ουρίας. Ακολούθησε προσθήκη 2 μL Θρυψίνης σε αναλογία θρυψίνης-πρωτεΐνης: 1:100. Η Θρυψίνη 500 ng/ μl είχε προηγουμένως διαλυθεί σε 50mM NH_4HCO_3 . Ακολούθησε επώαση για 16-18 h (overnight). Την επόμενη ημέρα, μετά τη θρυψινοποίηση έγινε προσθήκη 1 μL μυρμηκικού οξέος 10% v/v για την επίτευξη όξυνσης των δειγμάτων σε pH 3.00 και ακολούθησε αφαλάτωση με τη χρήση **ZIP-TIP**. Τέλος, τα δείγματα αποξηράνθηκαν με φυγοκέντρηση υπό κενό (SpeedVac) για 1 έως 2 h.

Για την ανάλυση των δειγμάτων με LC/MS (MRM) τα δείγματα επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε κατάλληλο όγκο κινητής φάσης A (με απιονισμένο νερό και 0,1% μυρμηκικό οξύ 10% v/v) σε μια τελική συγκέντρωση πρωτεΐνης 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Τέλος, εμπλουτίστηκαν με μίγμα επισημασμένων πεπτιδίων αναφοράς (τελική συγκέντρωση περίπου 5ng/ μl από κάθε πεπτίδιο).

4.2.3 Ρύθμιση LC/MS

Η υγρή χρωματογραφία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός συστήματος με νάνο-αντλία Agilent 1200 (Agilent Technologies, Inc.), σε συνδυασμό με νάνο-στήλη C18 (150mm x 75 μm , μέγεθος σωματιδίων 5 μm) από την Agilent. Ο διαχωρισμός των πεπτιδίων και η έκλουση επιτεύχθηκε με διαβάθμιση για 40min σε 5-45% ακετονιτρίλιο (0.1% μυρμηκικό οξύ) / νερό (0,1% μυρμηκικό οξύ) με ένα

ρυθμό ροής 300nL/min. Ενέθηκαν 6μL από κάθε δείγμα, που αντιστοιχούν σε 3μg ολικής πρωτεΐνης.

Τα θρυψινοποιημένα πεπτίδια του πλάσματος αναλύθηκαν σε AB/MDS Sciex 4000 QTRAP και η πηγή ιονισμού που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο ηλεκτροψεκασμός ρυθμιζόμενος από το λογισμικό Analyst 1.5 (Sciex). Το φασματόμετρο μάζας ήταν σε λειτουργία MRM (Multiple Reaction Monitoring) με το πρώτο (Q1) και το τρίτο (Q3) τετράπολο ρυθμισμένα στις 0.7 μονάδες μάζας. Καταγράφηκαν δύο έως τέσσερις μεταπτώσεις για κάθε πεπτίδιο. Η βέλτιστη ενέργεια σύγκρουσης για κάθε ζεύγος υπολογίσθηκε αυτόματα από το λογισμικό Skyline.

4.2.4 Στατιστική Ανάλυση

Δεδομένα από την μέθοδο SRM (Selected Reaction Monitoring) που ελήφθησαν από το QTRAP4000 αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Analyst 1.5 (AB Sciex), καθώς και το λογισμικό Skyline για την σχετική ποσοτικοποίηση.

Η επιλογή των κορυφών καθώς και η ολοκλήρωση έγιναν με βάση 2 κριτήρια:

- Παρόμοιο χρόνο έκλουσης και
- Υψηλή συγγένεια με τα αντίστοιχα φάσματα της βιβλιοθήκης από την βάση δεδομένων.

Όλα τα δεδομένα ελέγχθηκαν χειροκίνητα με το λογισμικό Skyline ώστε να εξασφαλισθεί η σωστή ανίχνευση κορυφής, η επιλογή της κατάλληλης περιοχής μίας κορυφής και η ακριβής ολοκλήρωση. Η περιοχή της κορυφής για κάθε πεπτίδιο αντιστοιχεί σε 3μg ολικής πρωτεΐνης πλάσματος. Πραγματοποιήθηκε σχετική ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων προκειμένου να ληφθούν τιμές συγκέντρωσης σε ng/mL για κάθε δείγμα κάθε πρωτεΐνης. Η σχετική ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε λαμβάνοντας υπόψη τα μοριακά βάρη των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών, τον λόγο των ενδογενών πεπτιδίων προς τα συνθετικά πεπτίδια (Light/Heavy). Οι υπολογισμοί για την σχετική ποσοτικοποίηση (Ratio L/H) πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό Microsoft Excel 2010.

Η στατιστική ανάλυση για την επιλογή των στατιστικά σημαντικών πρωτεϊνών έγινε με βάση την μη παραμετρική στατιστική δοκιμασία Mann Whitney καθώς και την μη παραμετρική στατιστική δοκιμασία Kruskal-Wallis για ανεξάρτητα δεδομένα με τη χρήση του λογισμικού IBM SPSS Statistics 25,0. Διαγράμματα Box-plot πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό Microsoft Excel 2010. Οι καμπύλες ROC και η ανάλυση συσχέτισης κατά Pearson πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό IBM SPSS Statistics 25,0.

5.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι 39 υποψήφιοι πρωτεϊνικοί βιοδείκτες που εξετάστηκαν για την σχετική ποσοτικοποίηση και βρέθηκαν να σχετίζονται σημαντικά με το τελικό στάδιο της Χ.Ν.Ν (ESRD) προέκυψαν μέσα από την εργασία των Glorieux et al., 2015 [4]. Οι πρωτεΐνες αυτές είτε εμπλέκονται σε φλεγμονώδεις διεργασίες είτε επρόκειτο για πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια, υποδοχείς, μεταφορείς ιόντων και μετάλλων, ένζυμα και αναστολείς [4]. Από τις 39 πρωτεΐνες, φασματικές πληροφορίες για τα πρωτεοτυπικά πεπτίδια ήταν διαθέσιμες μόνο για τις 31, ενώ για τις υπόλοιπες 8 δεν υπήρχαν αντίστοιχες πληροφορίες. Επομένως, αυτές οι 8 πρωτεΐνες δεν συμπεριλήφθηκαν για περαιτέρω ανάλυση ενώ για τις υπόλοιπες 31 αναπτύχθηκαν δοκιμασίες ανίχνευσης με MRM και ελέγχθηκαν για την αναπαραγωγιμότητα, την επαναληψιμότητα και την ακρίβεια της ανίχνευσης πεπτιδίων.

Όσον αφορά τα ενδογενή πεπτίδια, η αναπαραγωγιμότητα της ανάλυσης εκτιμήθηκε μέσα από τον υπολογισμό του συντελεστή CV (Coefficient Variation) των ανιχνευόμενων επιπέδων της έντασης σήματος για το κάθε πεπτίδιο μέσα από διαδοχικές μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν για 10 συνεχόμενες ημέρες σε 5 δείγματα ποιοτικού ελέγχου. Τα δείγματα ελέγχου παρασκευάστηκαν με συγκέντρωση 2 δειγμάτων πλάσματος Χ.Ν.Ν και σε διαφορετικές ποσότητες.

Από τα 31 πεπτίδια που αξιολογήθηκαν τα 2 είχαν $CV < 20\%$ στα 5 δείγματα ελέγχου και τις 10 ημέρες. Κατόπιν, εξετάστηκε η συσχέτιση μεταξύ της θεωρητικής και της πειραματικής ανίχνευσης επιπέδων έντασης των δειγμάτων για τα 26 αναπαραγώγιμα ανιχνευόμενα πεπτίδια. Η παραπάνω ανάλυση έδειξε ότι 24 ενδογενή πεπτίδια είχαν υψηλή συσχέτιση μεταξύ πειραματικής και θεωρητικής ανίχνευσης επιπέδων έντασης ($r \geq 0.7$), ενώ 2 πεπτίδια είχαν μη ικανοποιητικά αποτελέσματα και τελικά αποκλείστηκαν.

Συν τοις άλλοις, εξετάστηκε η επαναληψιμότητα στις μετρήσεις των επισημασμένων πεπτιδίων αναφοράς. Σε κάθε ένα από τα δείγματα ποιοτικού ελέγχου προστέθηκε ισόποση συγκέντρωση μίγματος επισημασμένων πεπτιδίων αναφοράς. Από τα 31 επισημασμένα πεπτίδια αναφοράς που αξιολογήθηκαν, τα 26 είχαν $CV < 20\%$ και στα 5 δείγματα ελέγχου.

Τέλος, έγινε έλεγχος της γραμμικής συσχέτισης μεταξύ της θεωρητικής και της πειραματικής ανίχνευσης επιπέδων έντασης σε σειριακές αραιώσεις δειγμάτων για τα 26 αναπαραγώγιμα ανιχνευόμενα επισημασμένα πεπτίδια αναφοράς. Η παραπάνω ανάλυση έδειξε ότι 24 επισημασμένα πεπτίδια αναφοράς είχαν υψηλή συσχέτιση μεταξύ πειραματικής και θεωρητικής ανίχνευσης επιπέδων έντασης ($r \geq 0.9$), ενώ 2 πεπτίδια είχαν μη ικανοποιητικά αποτελέσματα και άρα αποκλείστηκαν (Πίνακας 5.1).

Επομένως, η ανάλυση συνεχίστηκε σε 46 δείγματα πλάσματος από ασθενείς με Χρόνια Νεφρική Νόσο για τις 24 πρωτεΐνες οι οποίες πέρασαν επιτυχώς τις προαναφερθείσες δοκιμές ελέγχου ποιότητας. Μέσω της χειρωνακτικής ανάλυσης των ληφθέντων δεδομένων MRM αποκαλύφθηκαν και 4 πρωτεΐνες με χαμηλής ποιότητας φάσματα των επισημασμένων πεπτιδίων αναφοράς, οι οποίες και εξαιρέθηκαν από την ανάλυση.

Πίνακας 5.1 Αναπαραγωγιμότητα και αναλύσεις συσχέτισης για την τελική λίστα των 20 πρωτεϊνών.

ID Πρωτεΐνης	Όνομα Πρωτεΐνης	Ενδογενή Πεπτίδια						Επισημασμένα Πεπτίδια Αναφοράς	
		CVs από 10 ημέρες για κάθε ένα από τα 5 δείγματα ελέγχου					Συσχέτιση κατά Pearson μεταξύ πειραματικής και θεωρητικής ανίχνευσης επιπέδων έντασης	CV για 50 δείγματα αναφοράς	Συσχέτιση κατά Pearson μεταξύ πειραματικής και θεωρητικής ανίχνευσης επιπέδων έντασης
		1	2	3	4	5			
Q9Y2D8	Afadin- and alpha-actinin-binding protein	14.4	14.3	14.8	18.0	12.2	0.93	13.8	0.92
P02760	Protein AMBP	16.3	15.8	22.7	8.0	19.3	0.99	12.9	0.98
P61769	Beta-2-microglobulin	11.9	16.5	19.2	7.5	18.6	0.78	16.7	0.99

P00736	Complement C1r subcomponent	13.4	8.5	5.0	7.8	6.1	0.92	13.4	0.96
P00746	Complement factor D	16.3	19.9	8.1	20.0	8.4	0.96	17.6	0.92
Q6P4Q7	Metal transporter CNNM4	5.3	10.8	14.2	12.3	13.3	0.93	25.1	0.98
Q96RU3	Formin-binding protein 1	16.1	9.5	18.0	10.5	15.7	0.99	19.9	0.97
P22352	Glutathione peroxidase 3	13.6	9.1	10.6	8.7	18.7	0.88	11.1	0.97
P68871	Hemoglobin subunit beta	5.4	5.7	8.7	8.1	8.1	0.98	13.2	0.98
P01876	Ig alpha-1 chain C region	17.2	11.6	17.3	16.6	10.4	0.99	19.6	0.93
Q14643	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1	17.9	15.5	11.7	15.2	17.2	0.95	13.4	0.98
P61626	Lysozyme C	14.4	7.7	10.4	15.4	14.6	0.98	17.7	0.95
Q99797	Mitochondrial intermediate peptidase	18.4	10.4	14.6	14.0	18.9	0.96	11.0	1.00
O95248	Myotubularin-related protein 5	15.5	10.4	12.3	13.7	5.9	0.87	16.4	0.99
P36955	Pigment epithelium-derived factor	17.2	17.3	13.5	15.3	19.7	0.78	11.5	0.97
O43395	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp3	17.2	18.5	18.6	14.2	17.4	0.75	15.7	0.96
P42331	Rho GTPase-activating protein 25	16.2	9.7	11.1	16.0	12.3	0.93	13.5	0.93
Q8TAD8	Smad nuclear-interacting protein 1	12.1	12.7	12.8	14.3	14.6	0.69	16.8	0.99
Q00059	Transcription factor A, mitochondrial	11.0	9.6	8.0	7.2	7.5	0.90	12.5	1.00
Q6ZS81	WD repeat- and FYVE domain-	19.8	11.3	12.5	11.5	10.8	0.84	14.4	0.98

	containing protein 4							
--	----------------------	--	--	--	--	--	--	--

Τελικά, 20 μόνο πρωτεΐνες αναλύθηκαν περαιτέρω με το λογισμικό Skyline για 46 δείγματα ασθενών, των οποίων οι κλινικές πληροφορίες αναφέρονται παρακάτω (Πίνακες 5.2 και 5.3). Από τις 20 πρωτεΐνες εξαιρέθηκαν 15 είτε λόγω κακής ποιότητας φασμάτων, είτε για βιβλιογραφικούς λόγους, είτε επειδή υπήρχε ένα μόνο διαθέσιμο και προτεινόμενο πρωτεοτυπικό πεπτίδιο με αποτέλεσμα μόνο οι πρωτεΐνες GPX3, TFAM, HBB, WDFY4 και IGHA1 να αναλυθούν περαιτέρω (Πίνακας 5.4).

Πίνακας 5.2 : Κλινικά δεδομένα ασθενών αναλυτικά για κάθε στάδιο της ΧΝΝ. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση για την ηλικία, BMI, κρεατινίνη ορού και eGFR

	XNN-1	XNN-2	XNN-3	XNN-4	XNN-5 ESRD
Σύνολο Ασθενών (46)	7	5	22	10	2
Ηλικία (Χρόνια)	32.0 (±9.5)	54.2 (±6.8)	64.8 (±13.5)	71.1 (±14.1)	67.5 (±304)
Άνδρες /Γυναίκες	1/6	1/4	12/10	6/4	1/1
BMI	24.0 (±5.5)	27.7 (±4.0)	27.0 (±4.3)	30.2 (±4.7)	24.2
κρεατινίνη ορού	0.77 (±0.13)	0.97 (±0.12)	1.54 (±0.31)	2.38 (±0.70)	3.9 (±0.43)
eGFR (mL/min/1,73m ²)	109.7 (±21.4)	70.6 (±6.8)	42.6 (±8.2)	25.0 (±4.2)	13.1 (±2.0)

Πίνακας 5.3 Κλινικά δεδομένα ασθενών των ομάδων XNN1-2, XNN3, XNN4-5. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση για την ηλικία, BMI, κρεατινίνη ορού και eGFR

	XNN-1-2 Group A	XNN-3 Group B	XNN-4 Group C
Σύνολο Ασθενών (46)	12	22	12
Ηλικία (Χρόνια)	41.5 (±14.0)	64.8 (±13.5)	70.5 (±15,8)
Άνδρες /Γυναίκες	2/10	12/10	7/5
BMI	25.5 (±5.1)	27.0(±4.3)	29.2 (±5.1)
κρεατινίνη ορού	0.86 (±0.16)	1.54 (±0.31)	2.63 (±0.88)
eGFR (mL/min/1,73m ²)	93.4 (±25.2)	42.6 (±8.2)	23.0 (±6.3)

Πίνακας 5.4 Οι 5 πρωτεΐνες που αναλύθηκαν.

N	ID Πρωτεΐνης	Όνομα Πρωτεΐνης	Συντομογραφία Πρωτεΐνης
1	Q6ZS81	sp Q6ZS81 WDFY4_HUMAN WD repeat- and FYVE domain-containing protein 4	WDFY4
2	P68871	sp P68871 HBB_HUMAN Hemoglobin subunit beta	HBB
3	Q00059	sp Q00059 TFAM_HUMAN Transcription factor A, mitochondrial	TFAM
4	P01876	sp P01876 IGHA1_HUMAN Ig alpha-1 chain C region	IGHA1
5	P22352	sp P22352 GPX3_HUMAN Glutathione peroxidase 3	GPX3

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε κυρίως με τις ομάδες ασθενών σταδίων XNN1-2 (Group A), XNN3(Group B) και XNN4-5(Group C) τελικού σταδίου (ESRD). Η πρώτη ομάδα φέρει μικρές έως καθόλου αλλοιώσεις στους νεφρούς καθώς και στις τιμές του eGFR, η δεύτερη φέρει μεγαλύτερες αλλοιώσεις στους νεφρούς και στις τιμές του eGFR, ενώ η Τρίτη ομάδα φέρει ακόμη μεγαλύτερες αλλοιώσεις.

Συνεπώς, σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των πρωτεϊνών μεταξύ των τριών ομάδων μπορεί να καθορίσουν έναν ενδεχομένως καλό βιοδείκτη για την πρόγνωση της εξέλιξης της ασθένειας.

5.1 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΘΗΚΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

Για καθεμία από τις παραπάνω 5 πρωτεΐνες έγινε στατιστικός έλεγχος σημαντικότητας με το μη παραμετρικό τεστ *Mann Whitney* μεταξύ των τριών ομάδων (GROUPS). Στο Group A ανήκουν οι ασθενείς με ΧΝΝ σταδίων 1 και 2, στο Group B ανήκουν οι ασθενείς με ΧΝΝ σταδίου 3 και τέλος στο Group C ανήκουν οι ασθενείς με ΧΝΝ σταδίων 4 και 5 (ESRD). Ωστόσο, πραγματοποιήθηκε και το μη παραμετρικό τεστ *Kruskal-Wallis* για περισσότερα από 2 ανεξάρτητα δεδομένα, το οποίο όπως φαίνεται και παρακάτω επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα του μη παραμετρικού τεστ Mann Whitney (**Πίνακας 5.5**). Τα τεστ πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού IBM SPSS Statistics 25,0.

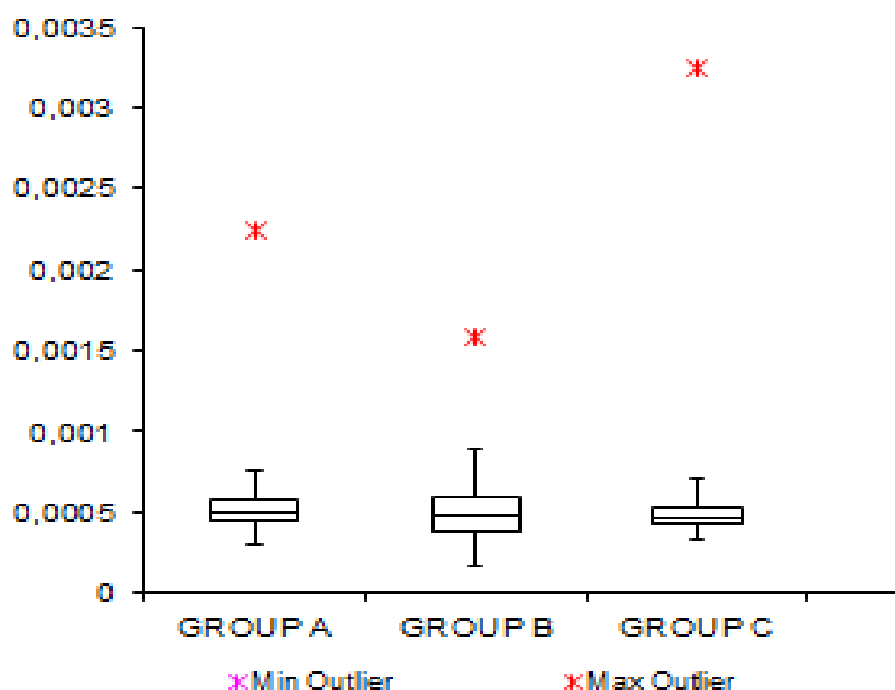
Πίνακας 5.5 Αποτελέσματα μη παραμετρικών τεστ Mann-Whitney και Kruskal-Wallis μεταξύ των τριών ομάδων που περιλαμβάνουν ασθενείς με ΧΝΝ.

ID ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ	ΠΡΩΤΕΙΝΗ	Mann – Whitney p Value A vs B	Mann – Whitney p Value A vs C	Mann - Whitney p Value B vs C	Kruskal-Wallis p Value A vs B vs C
P22352	GPX3 (Ratio L/H)	0,746	0,603	0,914	0,904
P68871	HBB (Ratio L/H)	0,052	0,094	0,857	0,115
P01876	IGHA1 (Ratio L/H)	0,665	0,050	0,012	0,031
Q00059	TFAM (Ratio L/H)	0,182	0,299	0,54	0,344
Q6ZS81	WDFY4 (Ratio L/H)	0,011	0,729	0,084	0,028

5.1.1 Πρωτεΐνη GPX3 (*Glutathione peroxidase 3*)

Τα δείγματα των ασθενών δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων της πρωτεΐνης **GPX3** μεταξύ των ομάδων ΧΝΝ1-2 (GROUP A), ΧΝΝ3 (GROUP B) και ΧΝΝ4-5 (GROUP C) τελικού σταδίου (ESRD), με **p-value > 0,05** (Εικόνα 5.12).

Protein GPX3

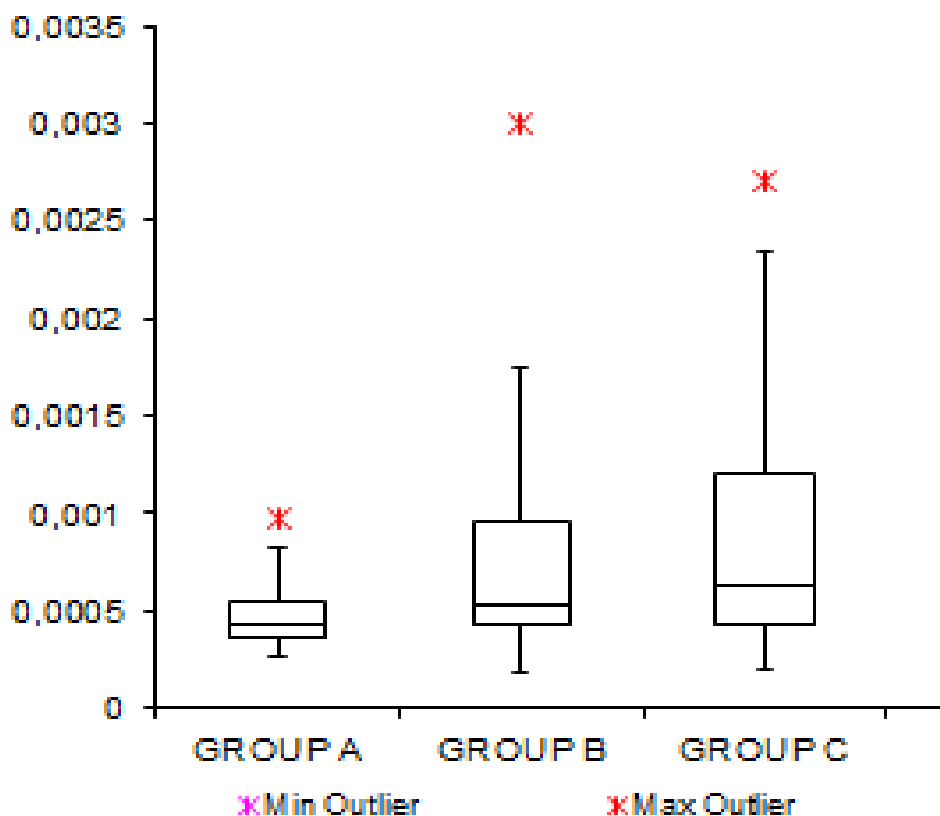


Εικόνα 5.12 Θηκόγραμμα απεικόνισης των επιπέδων της πρωτεΐνης GPX3 σε κάθε μία από τις τρεις ομάδες ασθενών που πάσχουν από ΧΝΝ. Άξονας Ψ: Λόγος ενδογενούς-πεπτιδίου αναφοράς.

5.1.2 Πρωτεΐνη HBB (Hemoglobin subunit beta)

Τα δείγματα των ασθενών δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων της πρωτεΐνης **HBB** μεταξύ των ομάδων ΧΝΝ1-2 (GROUP A), ΧΝΝ3 (GROUP B) και ΧΝΝ4-5 (GROUP C) τελικού σταδίου (ESRD), με **p-value > 0,05** (Εικόνα 5.13).

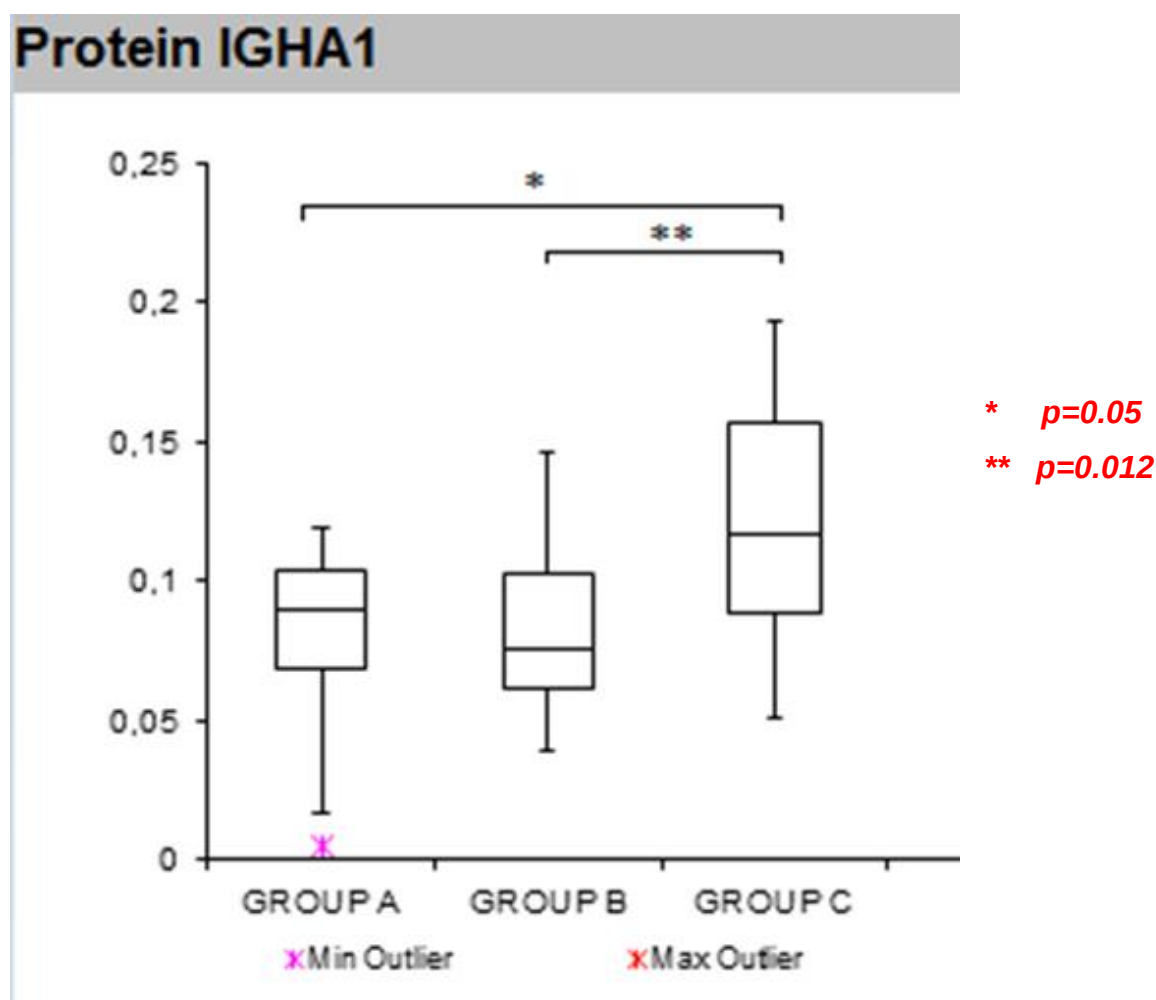
Protein HBB



Εικόνα 5.13 Θηκόγραμμα απεικόνισης των επιπέδων της πρωτεΐνης HBB σε κάθε μία από τις τρεις ομάδες ασθενών που πάσχουν από ΧΝΝ. Άξονας Ψ: Λόγος ενδογενούς-πεπτιδίου αναφοράς.

5.1.3 Πρωτεΐνη IGHA1 (Ig alpha-1 chain C region)

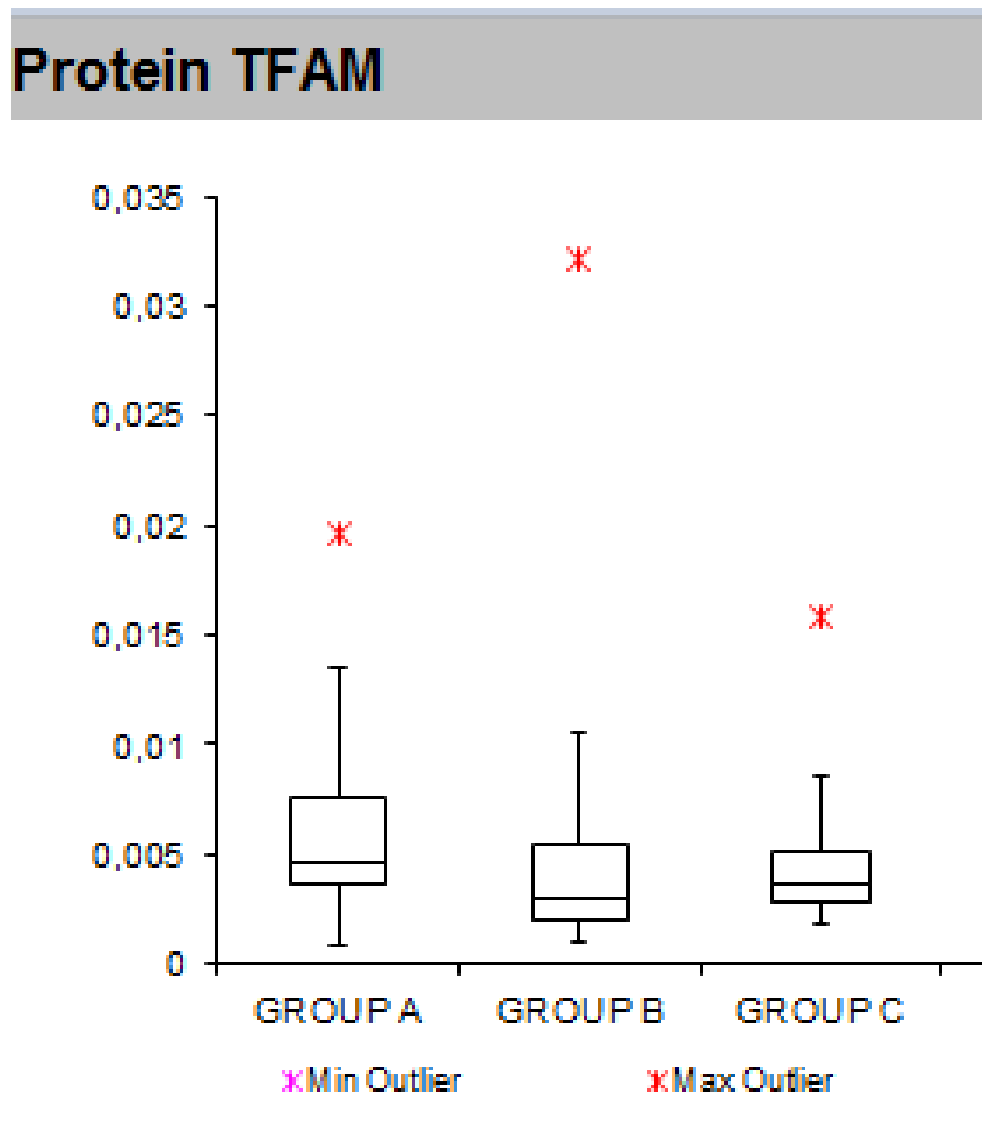
Τα δείγματα των ασθενών έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων της πρωτεΐνης **IGHA1** μεταξύ των ομάδων ΧΝΝ1-2 (GROUP A) και ΧΝΝ4-5 (GROUP C) τελικού σταδίου (ESRD) καθώς και μεταξύ των ομάδων ΧΝΝ3 (GROUP B) και ΧΝΝ4-5 τελικού σταδίου (ESRD) με **p-value < 0,05**. Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν υπήρξε μεταξύ των ομάδων ΧΝΝ1-2 ΚΑΙ ΧΝΝ3 με **p-value > 0,05** (Εικόνα 5.14).



Εικόνα 5.14 Θηκόγραμμα απεικόνισης των επιπέδων της πρωτεΐνης IGHA1 σε κάθε μία από τις τρεις ομάδες ασθενών που πάσχουν από ΧΝΝ. Άξονας Ψ: Λόγος ενδογενούς-πεπτιδίου αναφοράς.

5.1.4 Πρωτεΐνη TFAM (Transcription factor A, mitochondrial)

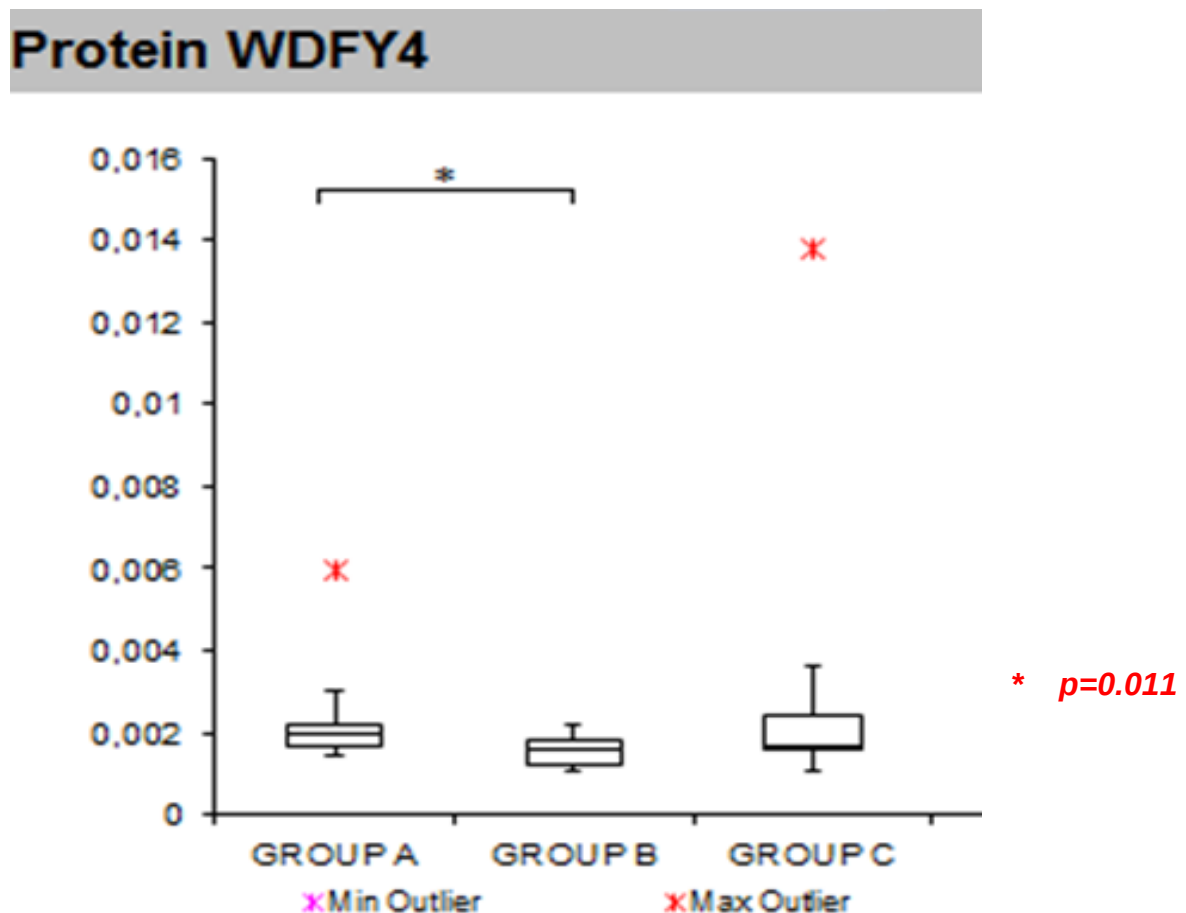
Τα δείγματα των ασθενών δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων της πρωτεΐνης **TFAM** μεταξύ των ομάδων ΧΝΝ1-2 (GROUP A), ΧΝΝ3 (GROUP B) και ΧΝΝ4-5 (GROUP C) τελικού σταδίου (ESRD), με **p-value > 0,05** (Εικόνα 5.15).



Εικόνα 5.15 Θηκόγραμμα απεικόνισης των επιπέδων της πρωτεΐνης TFAM σε κάθε μία από τις τρεις ομάδες ασθενών που πάσχουν από ΧΝΝ. Άξονας Ψ: Λόγος ενδογενούς-πεπτιδίου αναφοράς.

5.1.5 Πρωτεΐνη WDFY4 (WD repeat- and FYVE domain-containing)

Τα δείγματα των ασθενών έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων της πρωτεΐνης **WDFY4** μεταξύ των ομάδων ΧΝΝ1-2 (GROUP A) και ΧΝΝ3 (GROUP B) με **p-value < 0,05**. Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν υπήρξε μεταξύ των ομάδων ΧΝΝ1-2 και ΧΝΝ4-5 (GROUP C) τελικού σταδίου (ESRD) καθώς και μεταξύ των ομάδων ΧΝΝ3 και ΧΝΝ4-5 τελικού σταδίου (ESRD) με **p-value > 0,05** (Εικόνα 5.16).



Εικόνα 5.16 Θηκόγραμμα απεικόνισης των επιπέδων της πρωτεΐνης WDFY4 σε κάθε μία από τις τρεις ομάδες ασθενών που πάσχουν από ΧΝΝ. Άξονας Ψ: Λόγος ενδογενούς-πεπτιδίου αναφοράς.

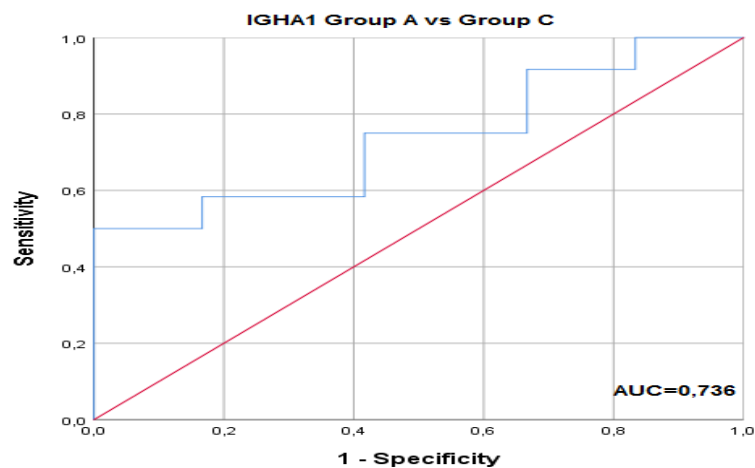
5.2 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ROC

Για τις τρεις στατιστικά σημαντικές διαφορές που βρέθηκαν μεταξύ των ομάδων των δύο πρωτεϊνών IGHA1 και WDFY4 σχεδιάστηκαν καμπύλες ROC με το στατιστικό πρόγραμμα IBM SPSS Statistics 25,0. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης IGHA1 φαίνεται να αυξάνονται με το στάδιο της νόσου σε αντίθεση με τα επίπεδα της πρωτεΐνης WDFY4 η οποία όσον αφορά τα πρώτα στάδια της νόσου φαίνεται να μειώνεται. Για τις καμπύλες ROC που σχεδιάστηκαν χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές ύστερα από σχετική ποσοτικοποίηση (Ratio L/H). Όσον αφορά τις καμπύλες ROC σημαντική είναι η επιφάνεια που βρίσκεται κάτω από την καμπύλη, AUC (Area Under Curve) και ανάλογα με τις τιμές που παίρνει είναι δυνατόν να καθορίσουμε τη διαγνωστική αξία.

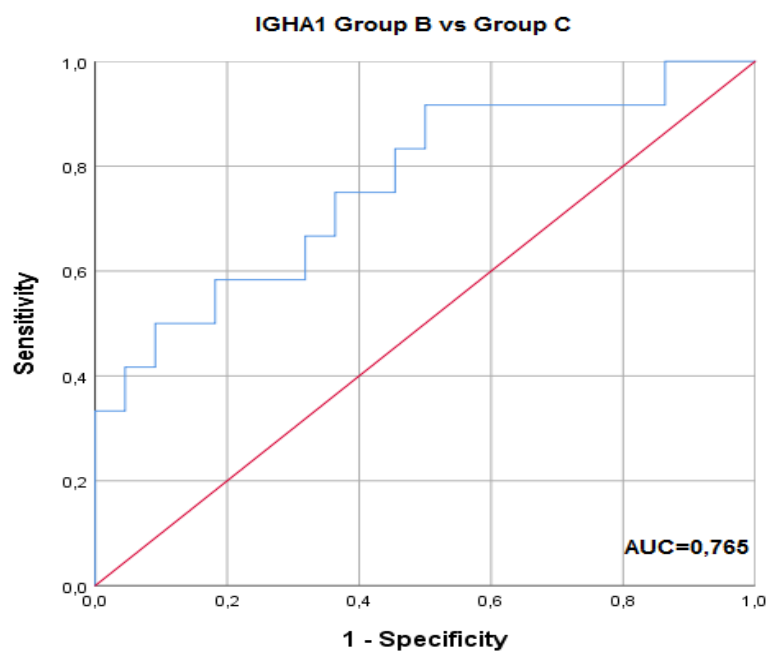
Δηλαδή όταν η AUC παίρνει τιμές:

- **0,9-1** : εξαιρετική διαγνωστική αξία
- **0,8-0,9** : πολύ καλή διαγνωστική αξία
- **0,7-0,8** : καλή διαγνωστική αξία
- **0,6-0,7** : μέτρια διαγνωστική αξία
- **0,5-0,6** : χαμηλή διαγνωστική αξία
- **< 0,5** : μηδενική διαγνωστική αξία

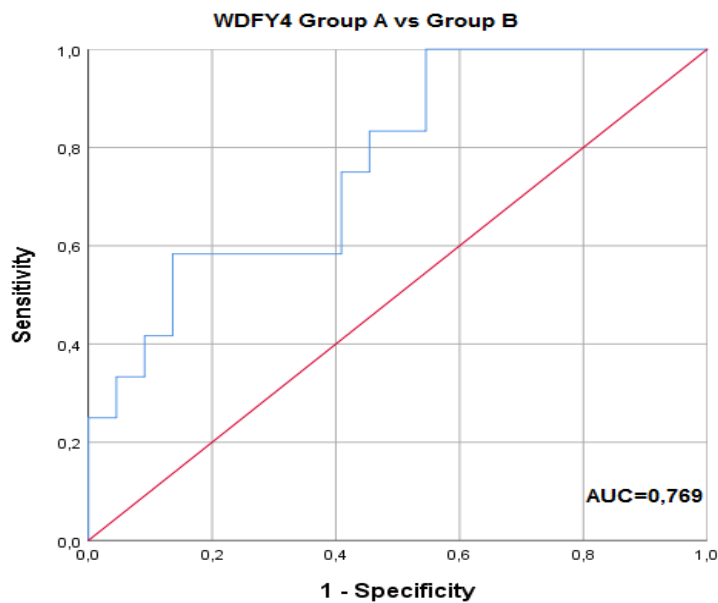
Παρακάτω αναγνωρίζονται οι καμπύλες ROC για κάθε μία από τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων των δύο πρωτεϊνών IGHA1 και WDFY4.



Εικόνα 4.17 Καμπύλη ROC για τη στατιστική σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων ΧΝΝ1-2 και ΧΝΝ4-5 της πρωτεΐνης IGHA1.



Εικόνα 5.18 Καμπύλη ROC για τη στατιστική σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων ΧΝΝ3 και ΧΝΝ4-5 της πρωτεΐνης IGHA1.



Εικόνα 5.19 Καμπύλη ROC για τη στατιστική σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων ΧΝΝ1-2 και ΧΝΝ3 της πρωτεΐνης WDFY4.

Και στις τρεις περιπτώσεις η επιφάνεια κάτω από την καμπύλη (AUC) είναι μεταξύ 0,7 – 0,8 που σημαίνει Καλή Διαγνωστική Ακρίβεια.

Οι τιμές για τα όρια λήψης απόφασης (cut-off values) επιλέχθηκαν έτσι ώστε η ευαισθησία και η ειδικότητα να είναι εξίσου υψηλές με βάση το μεγαλύτερο Youden Index (Ευαισθησία + Ειδικότητα -1) (**Πίνακας 5.6**).

Πίνακας 5.6: Τιμές περιοχών κάτω από την καμπύλη, ευαισθησία, ειδικότητα και όρια λήψης απόφασης για κάθε πρωτεΐνη ξεχωριστά.

	IGHA1 Group A vs Group C	IGHA1 Group B vs Group C	WDFY4 Group A vs Group B
Περιοχή AUC	0,736	0,765	0,769
Ευαισθησία(Sensitivity)	75%	75%	75%
Ειδικότητα(Specificity)	58,3%	63,6%	59,1%
Όρια λήψης απόφασης (cut-off values)	0,90	0,90	0,002

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η Χρόνια Νεφρική Νόσος αποτελεί μία από τις κύριες αιτίες θανάτου στο γενικό πληθυσμό επομένως απαραίτητη καθίσταται η εύρεση νέων βιοδεικτών για την πρόγνωση της εξέλιξης της νόσου. Με αφορμή λοιπόν, την εργασία που δημοσιεύτηκε το 2015, (Glorieux, G. et al. New insights in molecular mechanisms involved in chronic kidney disease using high-resolution plasma proteome analysis. *Nephrology Dialysis Transplantation* 30, 1842–1852) οι πρωτεΐνες που τελικά ελέγχθηκαν για την μελλοντική τους αξία ως βιοδείκτες πρόγνωσης της εξέλιξης της νόσου είναι οι εξής: WDFY4 (WD repeat- and FYVE domain-containing protein 4), HBB (Hemoglobin subunit beta), TFAM (Transcription factor A, mitochondrial), IGHA1 (Ig alpha-1 chain C region) και GPX3 (Glutathione peroxidase 3).

WDFY4: Πρόκειται για μια πολύ μεγάλη συντηρημένη πρωτεΐνη με άγνωστη λειτουργία, αλλά εκφράζεται κυρίως σε πρωτογενείς και δευτερογενείς ανοσοποιητικούς ιστούς [42].

IGHA1: Η IGH A1 ανήκει στην κύρια κατηγορία ανοσοσφαιρινών την IgA και βρίσκεται σε εκκρίσεις του σώματος. Υψηλές τιμές Ig ανοσοσφαιρινών στο αίμα έχουν αναφερθεί επανειλημμένα σε ασθενείς με καρκίνο και έχουν προταθεί ως δείκτες με διαφορετικά μοτίβα ρύθμισης σε πολυάριθμους καρκίνους [43].

Τα αποτελέσματα από τα θηκογράμματα έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά μόνο μεταξύ των groups των πρωτεϊνών IGH A1 και WDFY4. Παρά ταύτα, αυτές οι διαφορές δεν υπήρχαν και στα τρία groups των πρωτεϊνών. Συνέπεια των παραπάνω είναι οι συγκεκριμένοι δείκτες να μην μπορούν να αποτελέσουν χρήσιμους βιοδείκτες για την πρόγνωση της εξέλιξης της Χρόνιας Νεφρικής Ανεπάρκειας. Συν τοις άλλοις, και από τις τρεις καμπύλες ROC που σχεδιάστηκαν για τις τρεις στατιστικά σημαντικές διαφορές η επιφάνεια κάτω από την καμπύλη AUC κυμαίνεται μεταξύ 0,7-0,8 πράγμα που σημαίνει καλή διαγνωστική αξία, όχι

όμως τόσο υψηλή ώστε η μέθοδος να μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην καθημερινή πρακτική για την πρόγνωση της νόσου αφού η ευαισθησία και η ειδικότητα κυμαίνονται σε όχι τόσο υψηλά επίπεδα όσο θα ήταν επιθυμητό.

ΣΤΟΧΟΣ ΓΙΑ ΤΟ ΜΕΛΛΟΝ

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη συγκεκριμένη μελέτη δεν ήταν τα επιθυμητά. Ωστόσο, λόγω του ότι η μέθοδος Multiple Reaction Monitoring (MRM) αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη μέθοδο με υψηλή ευαισθησία, ειδικότητα και αποδοτικότητα θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί εκ νέου στο μέλλον σε πολλά περισσότερα δείγματα ώστε να ποσοτικοποιηθούν νέοι πιθανοί βιοδείκτες που να σχετίζονται με την πρόγνωση της εξέλιξης της Χ.Ν.Ν.

7.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 3.1 Λίστα 31 πρωτεϊνών με τα επιλεγμένα πρωτεοτυπικά πεπτίδια τους.

N	ID Πρωτεΐνης	Όνομα Πρωτεΐνης	Συντομογραφία Πρωτεΐνης	Πρωτεοτυπικό Πεπτίδιο
1	P24592	sp P24592 IBP6_HUMAN Insulin-like growth factor-binding protein 6	IBP6	R.NPGTSTTPSQPNSAGVQDTEMGP <u>C</u> R.R
2	P61626	sp P61626 LYSC_HUMAN Lysozyme C OS=Homo sapiens	LYSC	R.STDYGIFQINSR.Y
3	P61769	sp P61769 B2MG_HUMAN Beta-2-microglobulin	B2MG	K.SNFLN <u>C</u> YVSGFHPSDIEVDLLK.N
4	P00746	sp P00746 CFAD_HUMAN Complement factor D	CFAD	R.DVAPGTL <u>C</u> DVAGWGIVNHAGR.R
5	P41222	sp P41222 PTGDS_HUMAN Prostaglandin-H2 D-isomerase	PTGDS	R.WFSAGLASNSSWL.R.E
6	O43395	sp O43395 PRPF3	PRPF3	R.LPIGNTIQPSQAATFMNDAIEK.A

		RPF3_HUMAN N U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp3		
7	Q6ZS81	sp Q6ZS81 WDFY4_HUMAN N WD repeat- and FYVE domain- containing protein 4	WDFY4	K.TVQTLWQQLVAQR.Q
8	P09871	sp P09871 C1S_HUMAN Complement C1s subcomponent	C1S	K.GFQVVVTLR.R
9	Q9Y2D8	sp Q9Y2D8 ADIP_HUMAN Afadin- and alpha-actinin- binding protein	ADIP	R.VDDSTGTVISDVEEDAGELSR.E
10	Q96PV6	sp Q96PV6 LENG8_HUMAN N Leukocyte receptor cluster member 8	LENG8	R.TAWALGNYHRR.F
11	P02760	sp P02760 AMBP_HUMAN N Protein	AMBP	R.TVAACNLPIVR.G

		AMBP		
12	Q9BYW2	sp Q9BYW2 SETD2_HUMAN Histone-lysine N-methyltransferase SETD2	SETD2	K.TLEHLPIPTK.N
13	P00736	sp P00736 C1R_HUMAN Complement C1r subcomponent	C1R	R.WVATGIVSWGIGCSR.G
14	P68871	sp P68871 HBB_HUMAN Hemoglobin subunit beta	HBB	R.LLVVYPWTQRF
15	Q6P4Q7	sp Q6P4Q7 CNNM4_HUMAN Metal transporter CNNM4	CNNM4	K.SELPVVDETTTLLNER.N
16	Q00059	sp Q00059 TFAM_HUMAN Transcription factor A, mitochondrial	TFAM	K.SWEEQMIEVGR.K
17	Q14643	sp Q14643 ITPR1_HUMAN Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type	ITPR1	R.LQDIVSALEDRL

		1		
18	P36955	sp P36955 P EDF_HUMAN <i>Pigment epithelium- derived factor</i>	PEDF	K.LAAAVSNFGYDLY R .V
19	P01876	sp P01876 IG HA1_HUMAN <i>Ig alpha-1 chain C region</i>	IGHA1	R.DASGVTFWTPSSG K .S
20	Q96RU3	sp Q96RU3 F NBP1_HUMA <i>N Formin- binding protein 1</i>	FNBP1	K.FEAWLAEVEG R .L
21	Q6F5E8	sp Q6F5E8 L R16C_HUMA <i>N Leucine- rich repeat- containing protein 16C</i>	LR16C	R.GEELGGAEGDTSSPDPA G .S
22	P04196	sp P04196 H RG_HUMAN <i>Histidine-rich glycoprotein</i>	HRG	R.VENTTVYYLVLDVQESD C SVLS R .K
23	P00748	sp P00748 F A12_HUMAN <i>Coagulation factor XII</i>	FA12	K.GPDAH C Q R .L
24	P42331	sp P42331 R HG25_HUMA <i>N Rho</i>	RHG25	R.DNYSLLSYI C R .F

		GTPase-activating protein 25		
25	Q8TAD8	<i>sp Q8TAD8 SNIP1_HUMAN</i> N Smad nuclear-interacting protein 1	SNIP1	R.VKPYIIDLGSGNGTFLNNK.R
26	Q96L12	<i>sp Q96L12 CALR3_HUMAN</i> N Calreticulin-3	CALR3	R.FYAISAR.F
27	P35228	<i>sp P35228 NOS2_HUMAN</i> Nitric oxide synthase, inducible	NOS2	K.AAC <u>E</u> TFDVR.G
28	P22352	<i>sp P22352 GPX3_HUMAN</i> Glutathione peroxidase 3	GPX3	K.FLVGPDGIPIMR.W
29	Q07343	<i>sp Q07343 PDE4B_HUMAN</i> N cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4B	PDE4B	K.SLELYR.Q
30	O95248	<i>sp O95248 MTMR5_HUMAN</i> N Myotubularin-	MTMR5	R.MSYLLLPLDSSK.S

		<i>related protein</i> 5		
31	Q99797	<i>sp Q99797 M</i> <i>IPEP_HUMA</i> <i>N</i> <i>Mitochondrial</i> <i>intermediate</i> <i>peptidase</i>	MIPEP	R.NFTSAGDHIIDGLHAESPDDLVR.E

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Κατρίτσης Ε.Δ., Κελέκης Δ.Αν., Κούβελας Η.Δ. Στοιχεία Ανατομίας-Στοιχεία Φυσιολογίας, Ίδρυμα Ευγενίδου,σελ 107-111, 208-211. Αθήνα, 2007, ISBN: 978-960-337-072-7.
- 2) Vander J. A., Sherman J. and Luciano D. Φυσιολογία του Ανθρώπου - Μηχανισμοί της Λειτουργίας του Οργανισμού, 8η Έκδοση, Αθήνα, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2011, Τόμος 2ος, Τμήμα 3ο, κεφ. 16, σελ. 680-682.
- 3) Mihai, S. et al. Proteomic Biomarkers Panel: New Insights in Chronic Kidney Disease. *Disease Markers* 2016, (2016).
- 4) Glorieux, G. et al. New insights in molecular mechanisms involved in chronic kidney disease using high-resolution plasma proteome analysis. *Nephrology Dialysis Transplantation* 30, 1842–1852 (2015).
- 5) Dalrymple, L. S. et al. Chronic kidney disease and the risk of end-stage renal disease versus death. *Journal of General Internal Medicine* **26**, 379–385 (2011).
- 6) Βλαχογιάννη Γ.Ι. Κλινική Νεφρολογία και Υπέρταση, Αθήνα, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2009. ISBN: 9789603999287
- 7) Locatelli, F., Fishbane, S., Block, G. A. & MacDougall, I. C. Targeting Hypoxia-Inducible Factors for the Treatment of Anemia in Chronic Kidney Disease Patients. *American Journal of Nephrology* 45, 187–199 (2017).
- 8) Kalim, S., Karumanchi, S. A., Thadhani, R. I. & Berg, A. H. Protein Carbamylation in kidney disease: Pathogenesis and clinical implications. *American Journal of Kidney Diseases* 64, 793–803 (2014).
- 9) Wong, L. L. et al. Insights from Screening a Racially and Ethnically Diverse Population for Chronic Kidney Disease. *American Journal of Nephrology* 45, 200–208 (2017).
- 10) Hassan, M. O. et al. Correlation between volume overload, chronic inflammation, and left ventricular dysfunction in chronic kidney disease patients. *Clinical Nephrology* 86, 131–135 (2016).
- 11) Webster, A. C., Nagler, E. V., Morton, R. L. & Masson, P. Chronic Kidney Disease. *The Lancet* 389, 1238–1252 (2017).
- 12) K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification: *Am J Kidney Dis.* 2002 Feb; 39.

- 13) KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Anemia in Chronic Kidney Disease: *American Journal of Kidney Diseases*, Vol 47, No 5, 2006.
- 14) Taler, S. J. et al. KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for management of blood pressure in CKD. *American Journal of Kidney Diseases* 62, 201–213 (2013).
- 15) Levey, A. S. et al. National Kidney Foundation Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification. *Annals of Internal Medicine* **139**, 137–147+I36 (2003).
- 16) Locatelli, F. & Pozzoni, P. Chronic kidney disease in the elderly: is it really a premise for overwhelming renal failure? *Kidney international* 69, 2118–20 (2006)
- 17) Coresh, J., Selvin, E., LA, S. & Al, E. Prevalence of chronic kidney disease in the united states. *JAMA* 298, 2038–2047 (2007).
- 18) .James, M. T., Hemmelgarn, B. R. & Tonelli, M. Early recognition and prevention of chronic kidney disease. *The Lancet* 375, 1296–1309 (2010).
- 19) Bru ck, K. et al. CKD Prevalence Varies across the European General Population. *Journal of the American Society of Nephrology* 27, 2135–2147 (2016).
- 20) KDOQI Clinical Practice Guidelines on Hypertension and Antihypertensive Agents in Chronic Kidney Disease: *Am J Kidney Dis.* 2004 May; 43
- 21) Tsai, W.-C. et al. Risk Factors for Development and Progression of Chronic Kidney Disease. *Medicine* 95, e3013 (2016).
- 22) Hoefield, R. A. et al. Factors associated with kidney disease progression and mortality in a referred CKD population. *American Journal of Kidney Diseases* 56, 1072–1081 (2010).
- 23) KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder *Kidney Disease: Improving Global Outcomes CKD-MBD Work Group. Kidney Int* 2009.
- 24) Hallan, S. I. et al. Screening strategies for chronic kidney disease in the general population: follow-up of cross sectional health survey. *BMJ (Clinical research ed.)* 333, 1047 (2006).
- 25) Kazancioğlu, R. Risk factors for chronic kidney disease: an update. *Kidney International Supplements* 3, 368–371 (2013).
- 26) FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndPointS, and other Tools) Recourse, 2017.

- 27) Rysz, J., Gluba-Brzózka, A., Franczyk, B., Jabłonowski, Z. & Ciałkowska-Rysz, A. Novel Biomarkers in the Diagnosis of Chronic Kidney Disease and the Prediction of Its Outcome. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 1702 (2017).
- 28) Lopez-Giacoman, S. & Madero, M. Biomarkers in chronic kidney disease, from kidney function to kidney damage. *World journal of nephrology* 4, 57–73 (2015).
- 29) Wasung, M. E., Chawla, L. S. & Madero, M. Biomarkers of renal function, which and when? *Clinica Chimica Acta* 438, 350–357 (2015).
- 30) Xu, Y., Xie, Y., Shao, X., Ni, Z. & Mou, S. L-FABP: A novel biomarker of kidney disease. *Clinica Chimica Acta* 445, 85–90 (2015).
- 31) Fassett, R. G. et al. Biomarkers in chronic kidney disease: a review. *Kidney International* 80, 806–821 (2011).
- 32) Andersen, J. S. & Mann, M. Functional genomics by mass spectrometry. *FEBS letters* 480, 25–31 (2000).
- 33) Sparkman O. David, 2000, Mass spectrometry desk reference, Pittsburgh Global View Pub.
- 34) http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/mass-spectrometry.html
- 35) E. De Hoffmann, V. Stroobant. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, Third edition, England, 2007, ISBN: 978-0-470-03310-4
- 36) Yates, J. R. A century of mass spectrometry: From atoms to proteomes. *Nature Methods* 8, 633–637 (2011).
<http://www.shimadzu.com/an/lcms/support/intro/lib/lctalk/61/61intro.html>
- 37) Picotti, P. & Aebersold, R. Selected reaction monitoring–based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions. *Nature Methods* 9, 555–566 (2012).
- 38) Lemoine, J. et al. The current status of clinical proteomics and the use of MRM and MRM(3) for biomarker validation. *Expert review of molecular diagnostics* 12, 333–42 (2012).
- 39) Gallien, S., Duriez, E. & Domon, B. Selected reaction monitoring applied to proteomics. *Journal of Mass Spectrometry* 46, 298–312 (2011).
- 40) Mermelekas, G., Vlahou, A. & Zoidakis, J. SRM/MRM targeted proteomics as a tool for biomarker validation and absolute quantification in human urine. *Expert review of molecular diagnostics* 15, 1441–54 (2015).
- 41) Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254 (1976).

- 42) 1.Zhang, Y., Bo, L., Zhang, H., Zhuang, C. & Liu, R. E26 transformation-specific-1 (ETS1) and WDFY family member 4 (WDFY4) polymorphisms in Chinese patients with rheumatoid arthritis. *International Journal of Molecular Sciences* 15, 2712–2721 (2014).
- 43) J. Zhao et al., Identification of potential plasma biomarkers for esophageal squamous cell carcinoma by a proteomic method. *International journal of clinical and experimental pathology*. 8, 1535–44 (2015).