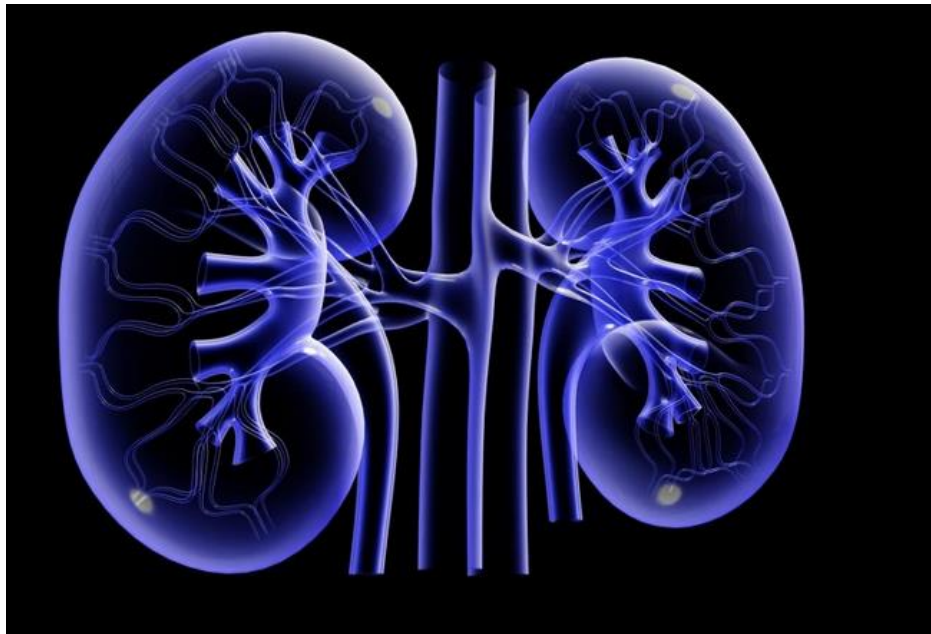




ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

*Τμήμα Βιοτεχνολογίας
Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας
ΠΜΣ: 'Βιολογία Συστημάτων'*

**“ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗΣ
ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗΣ ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ
ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ”**



Παναγιώτα Β. Τζανή-Τζανοπούλου

Μεταπτυχιακή διατριβή

Επιβλέπων: **Χατζόπουλος Πολυδεύκης**, Καθηγητής

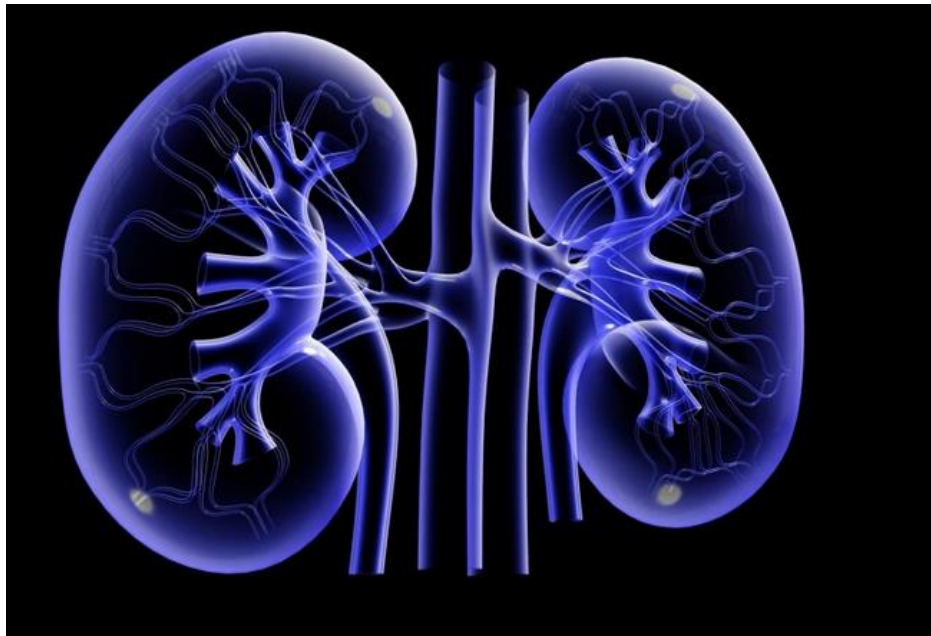
Αθήνα, 2016



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

*Τμήμα Βιοτεχνολογίας
Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας
ΠΜΣ: 'Βιολογία Συστημάτων'*

**“ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗΣ
ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗΣ ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ
ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ”**



Παναγιώτα Β. Τζανή-Τζανοπούλου

Μεταπτυχιακή διατριβή

Επιβλέπων: **Χατζόπουλος Πολυδεύκης**, Καθηγητής

Αθήνα, 2016



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

*Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας
ΠΜΣ: 'Βιολογία Συστημάτων'*

**ΤΙΤΛΟΣ: "ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗΣ
ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗΣ ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ
ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ"**

Παναγιώτα Β. Τζανή-Τζανοπούλου

Μεταπτυχιακή διατριβή

Επιβλέπων: **Χατζόπουλος Πολυδεύκης**, Καθηγητής

Επιβλέπων: **Χατζόπουλος Πολυδεύκης**, Καθηγητής

Μέλη εξεταστικής επιτροπής:

Χατζόπουλος Πολυδεύκης, Καθηγητής
Μηλιώνη Δήμητρα, Επίκουρη καθηγήτρια
Κούρτη Ιωάννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πρόβλεψη της επιδείνωσης της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας, καθώς και η έγκαιρη διάγνωση της νόσου αποτελούν δύο ιατρικά θέματα που απασχολούν την επιστημονική κοινότητα. Οι διαθέσιμες κλινικές μέθοδοι δεν επαρκούν για την πλήρη και ακριβή κάλυψη των παραπάνω ζητημάτων. Με σκοπό να προσεγγιστεί το συγκεκριμένο ζήτημα, αναλύθηκαν τα δεδομένα πρωτεομικής και μεταβολομικής από δείγματα ούρων ασθενών που παρουσίασαν επιδείνωση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας σε συνάρτηση με τα αντίστοιχα δείγματα ασθενών με σταθερή κλινική εικόνα. Η μέτρηση των πρωτεϊνών στα δείγματα έγινε με τη χρήση φασματομετρίας μάζας υψηλής ανάλυσης και η μέτρηση των μεταβολιτών έγινε με χρήση των τεχνικών φασματομετρίας μάζας και φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Σε πρώτη φάση προσδιορίστηκαν οι πρωτεΐνες και οι μεταβολίτες που παρουσίαζαν διαφορετική έκφραση και ήταν στατιστικώς σημαντικές, στα άτομα με επιδείνωση σε σχέση με τα υπόλοιπα άτομα που είχαν σταθερή κλινική εικόνα. Σε δεύτερη φάση έγινε προσπάθεια συνδυασμού των δεδομένων πρωτεομικής και μεταβολομικής των ατόμων με επιδείνωση. Σκοπός της συγκεκριμένης προσπάθειας ήταν η ανίχνευση των βιοχημικών μονοπατιών τα οποία μεταβάλλονται κατά την επιδείνωση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας. Στην συγκεκριμένη εργασία έγινε προσπάθεια να διαλευκανθούν και να ερμηνευθούν οι μηχανισμοί που διέπουν την παθοφυσιολογία της νόσου.

Η ανάλυση των δεδομένων και η εύρεση των βιοχημικών μονοπατιών που συμμετέχουν στην χρόνια νεφρική ανεπάρκεια έγινε χρησιμοποιώντας τις διαθέσιμες βάσεις δεδομένων (Kegg, Reavtome, Impala). Στη συνέχεια έγινε απεικόνιση των μονοπατιών χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PathVisio. Τα αποτελέσματα της μελέτης και η πρόβλεψη που έγινε για τα μονοπάτια, ελέγχθηκαν για την εγκυρότητά τους με βάση τα μέχρι στιγμής βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν την χρόνια νεφρική ανεπάρκεια.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αποτελούν ουσιαστικά μια πρόβλεψη των βιοχημικών μεταβολών που επισυμβαίνουν στους ασθενείς με επιδείνωση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας και δύναται να δώσουν ώθηση σε νέες ερευνητικές μελέτες και πειράματα. Η ευρωπαϊκή ερευνητική ομάδα συνεργατών που ασχολείται με τη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (Clinical and system omics for the identification of the Molecular DEterminants of established Chronic Kidney Disease - iMODE-CKD) παρείχε τα δεδομένα για τη συγκεκριμένη μελέτη. Η συνδυαστική ανάλυση που έγινε επιτρέπει την ταυτοποίηση βιολογικών διαδικασιών που εμπλέκονται στην εξέλιξη της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας με μεγαλύτερη ακρίβεια. Αν είχε χρησιμοποιηθεί μόνο ή πρωτεομική ή μόνο η μεταβολομική ανάλυση δεν θα ήμασταν τόσο σίγουροι για τις προβλέψεις!

Επιστημονική περιοχή: Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Πανεπιστημίου Αθηνών

Λέξεις κλειδιά: Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια, Βιοδείκτες, Μεταβολομική, Πρωτεομική, Ανάλυση μεγάλου όγκου δεδομένων, βιολογία συστημάτων.

Abstract

Title: “*Integration of proteomics and metabolomics data from urine samples of patients with CKD progression and non-progression*”

The objective of this analysis was to use the available pathway analysis software for the identification of processes that involve deregulated proteins and metabolites characteristic for CKD progression. In addition it was the investigate the correlation between metabolites and proteins that are involved in progression of CKD by searching the literature. Detection of early stages as well as prediction of kidney disease progression remains a challenge with the currently available clinical methods. For the identification of biomarkers associated with the progression of Chronic Kidney Disease (CKD). We mainly focused on the integration of obtained -omics data for the identification of proteolytic events specific for the kidney.

In this study, we demonstrated that integration of proteomics and peptidomics data can predict peptides that originate from kidney, opening new research avenues for future experiments. This ultimately, may lead to the discovery of novel molecular targets for therapeutic interventions. To confirm the validity of our findings, we currently aim at detecting shortlisted peptide candidates in kidney tissue using targeted proteomics approaches.

This analysis illustrates the significance of metabolomics and proteomics data, for the understanding of molecular processes that take place in CKD progression. The identified metabolic pathways may provide useful information for further experiments on CKD progression. For example, such data can be used to predict novel targets for validation. Further analysis of larger sample cohort is required in order to shed light on CKD progression.

Research location: Biomedical Research Foundation Academy of Athens (BRFAA)

Key words: Chronic Kidney Disease, biomarkers, proteomics, metabolomics, data integration, urine, systems biology

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Νεφρική Λειτουργία

1.2 Νεφρική Ανεπάρκεια

1.2.1 Οξεία Νεφρική Ανεπάρκεια

1.2.2 Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια

1.2.3 Στάδια Χρόνιας Νεφρικής Ανεπάρκειας

1.3 Διάγνωση Χρόνιας Νεφρικής Ανεπάρκειας

1.4 Πρόγνωση της επιδείνωσης της Χρόνιας Νεφρικής Ανεπάρκειας

1.5 Θεραπευτική Αντιμετώπιση

1.6 Βιοδείκτες

1.7 Ομικές Τεχνολογίες και Ανάλυση Δεδομένων

1.7.1 Πρωτεομική

1.7.2 Μεταβολομική

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Σκοπός

2.2 Δεδομένα

2.2.1 Κλινικά δεδομένα ασθενών

2.2.2 Ανίχνευση μεταβολιτών-πρωτεϊνών

2.2.3 Ανάκτηση των ειδικών κωδικών μεταβολιτών-πρωτεϊνών

2.3 Βάσεις δεδομένων

2.3.1 Impala

2.3.2 Reactome

2.3.3 Kegg

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Σηματοδοτικά μονοπάτια που προέκυψαν από την ανάλυση των δεδομένων

3.1.1 Αποτελέσματα από τη χρήση του Impala

3.1.2 Αποτελέσματα από τη χρήση του Reactome και απεικόνιση των μονοπατιών με τη χρήση του προγράμματος PathVisio

3.1.3 Αποτελέσματα από τη χρήση του Kegg

3.2 Σύγκριση των σηματοδοτικών μονοπατιών που βρέθηκαν από το Reactome και το Kegg

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Νεφρική Λειτουργία

Νεφρική λειτουργία καλείται η διαδικασία ρύθμισης του ισοζυγίου του ύδατος καθώς και των ανόργανων ιόντων στον ανθρώπινο οργανισμό. Περιλαμβάνει επίσης την απέκκριση μέσω των ούρων, των μεταβολικών παραπροϊόντων και των ξένων προς τον οργανισμό χημικών ουσιών. Οι νεφροί είναι ένα ζεύγος οργάνων που βρίσκονται στο κάτω μέρος του θώρακα, εκατέρωθεν της σπονδυλικής στήλης και συμμετέχουν στην νεφρική λειτουργία. Οι νεφροί αποτελούνται από ένα εκατομμύριο λειτουργικές μονάδες, τους νεφρώνες (**Εικόνα 1**). Ο κάθε νεφρώνας αποτελείται από το σπείραμα και το νεφρικό σωληνάριο. Το σπείραμα φιλτράρει το πλάσμα του αίματος αποδίδοντας τα πρωτογενή ούρα και το νεφρικό σωληνάριο επαναπορροφά περίπου το 99% από τα πρωτογενή ούρα. Σε χρονικό διάστημα μιας ημέρας, 700-900 λίτρα πλάσματος ρέουν διαμέσου των νεφρών και παράγονται 150-180 λίτρα διηθήματος. Έτσι 1-1,5 λίτρα ούρων παράγονται καθημερινά.

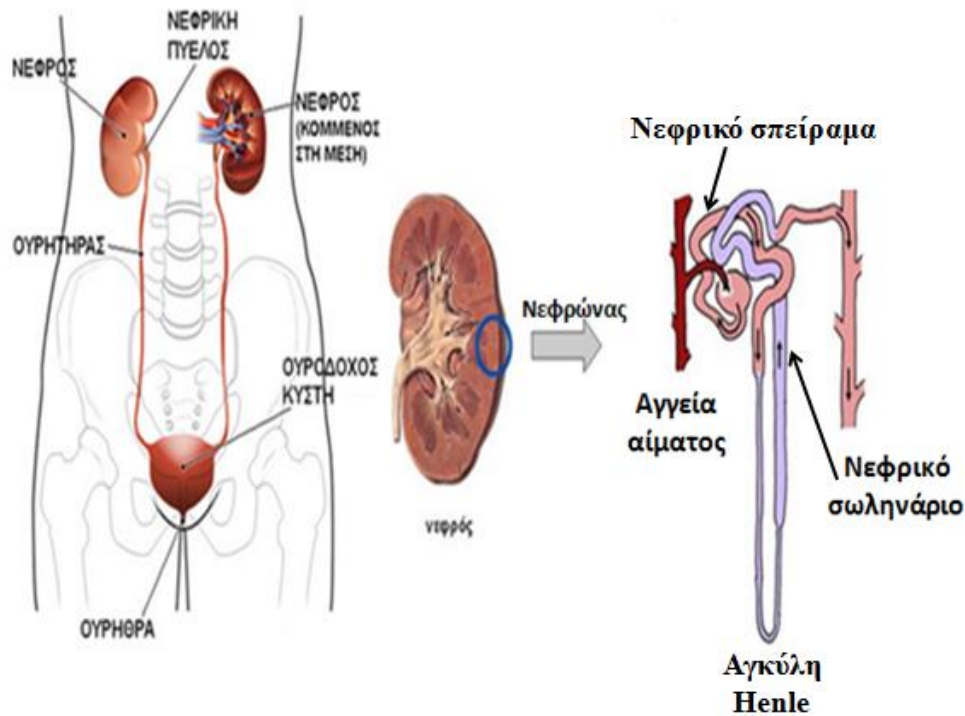
Τα ανθρώπινα ούρα αποτελούν ένα πολύπλοκο βιολογικό υγρό αφού περιέχουν πάνω από 3.000 διαφορετικούς μεταβολίτες, οι οποίοι μπορούν να ταξινομηθούν σε 230 διαφορετικές χημικές ομάδες [1]. Στον ανθρώπινο οργανισμό συναντώνται μόλις 356 διαφορετικές χημικές ομάδες μεταβολιτών! Ο όρος μεταβόλωμα αφορά το σύνολο των μεταβολιτών ενός οργανισμού που συμπεριλαμβάνουν ορμόνες, βιταμίνες και άλλα μόρια. Η βάση δεδομένων Urine Metabolome Database (Βάση Δεδομένων του Μεταβολώματος των Ούρων) περιλαμβάνει πληροφορίες για την ονοματολογία, την χημική δομή και την περιεκτικότητα των μεταβολιτών που υπάρχουν στα ούρα.

Οι πρωτεΐνες που συναντώνται στα ούρα προκύπτουν από τη σπειραματική διήθηση των πρωτεϊνών του πλάσματος ή από την έκκριση πρωτεϊνών από τα επιθηλιακά κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων ή ακόμα και από την απόρριψη ολόκληρων κυττάρων κατά μήκος του ουροποιητικού συστήματος. Οι πρωτεΐνες που εισέρχονται στον σωληνοειδή αυλό

εκκρίνονται σε ελάχιστες ποσότητες στα ούρα εφόσον η επαναπορρόφηση που πραγματοποιείται από τα νεφρικά σωληνάκια ενός υγιούς ατόμου είναι της τάξης του 99%, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Οι πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους διαπερνούν εύκολα το σπείραμα και φτάνουν στα νεφρικά σωληνάκια. Ωστόσο, μικρός αριθμός από τις πρωτεΐνες μεσαίου μοριακού βάρους και ελάχιστες από τις πρωτεΐνες υψηλού μοριακού βάρους διαπερνούν το σπείραμα.

Πρωτέωμα καλείται το σύνολο των πρωτεϊνών που υπάρχει σε έναν οργανισμό. Το πρωτέωμα των ούρων είναι οι συγκεκριμένες ομάδες πρωτεϊνών που υπάρχουν στα ούρα φυσιολογικών ατόμων. Το πρωτέωμα των ούρων παρουσιάζει σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα εξεταζόμενα άτομα και ανάμεσα στα δύο φύλα [2]. Οι χαμηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνες είναι δύσκολο να ταυτοποιηθούν με τις υπάρχουσες μεθόδους ανίχνευσης, ενώ οι πρωτεΐνες που τελικά ανιχνεύονται έχουν μεγάλο μοριακό βάρος (30-60 kDa) και μεσαίο μοριακό βάρος (4-10 kDa) [3].

Κατά τη διάρκεια παρατεταμένης αστιτίας, στους νεφρούς επιτελείται η βιοχημική διαδικασία της γλυκονεογένεσης και παράγεται γλυκόζη, η οποία απελευθερώνεται στην αιματική κυκλοφορία. Οι νεφροί λειτουργούν επίσης ως ενδοκρινείς αδένες και εκκρίνουν ερυθροποιητίνη, ρενίνη και 1,25-διϋδροξυβιταμίνη D₃.



Εικόνα 1. Απεικόνιση (αριστερά) της θέσης των νεφρών στο ανθρώπινο σώμα. Βρίσκονται κάτω από το θώρακα και ανάμεσα στην σπονδυλική στήλη. Απεικόνιση επίσης των τμημάτων από τα οποία αποτελείται του ουροποιητικού σύστημα (νεφροί, ουρητήρας, ουροδόχος κύστη, ουρήθρα). Απεικόνιση (δεξιά) της εσωτερικής δομής ενός νεφρώνα, ο οποίος αποτελείται από το νεφρικό σπείραμα, στο οποίο διηθούνται 125ml πλάσματος /mlm καθημερινά, την αγκύλη του Henle, όπου γίνεται αραιώση των παραγόμενων ούρων και του νεφρικού σωληναρίου, όπου γίνεται επαναπορρόφηση του 99% του νερού στο σώμα. Έτσι τα ούρα φτάνουν στην ουροδόχο κύστη συμπυκνωμένα και αποβάλλονται. (τροποποίηση εικόνας <http://www.poulakis-urology.com/general-introduction-stenosi>).

1.2 Νεφρική Ανεπάρκεια

Νεφρική ανεπάρκεια καλείται η αδυναμία των νεφρών να επιτελέσουν σωστά και αποτελεσματικά την νεφρική λειτουργία, δηλαδή τις διαδικασίες της διήθησης του πλάσματος, της επαναπορρόφησης του νερού και της ρύθμισης των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα σε περίπτωση αστίας, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Η νεφρική ανεπάρκεια μπορεί να είναι οξεία ή χρόνια.

1.2.1 Οξεία νεφρική ανεπάρκεια

Η οξεία νεφρική ανεπάρκεια αποτελεί ένα έντονο και αιφνίδιο επεισόδιο νεφρικής προσβολής, το οποίο αφορά κυρίως άτομα μεγάλης ηλικίας. Η οξεία νεφρική ανεπάρκεια μπορεί να είναι παροδική και να διαρκέσει κάποιες ημέρες ή και εβδομάδες πριν την

αποκατάσταση ή μπορεί να μεταπέσει σε Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. Τα συμπτώματα της οξείας νεφρικής ανεπάρκειας είναι η αδυναμία παραγωγής ούρων καθώς και η συσσώρευση στον οργανισμό παραπροϊόντων του μεταβολισμού, υγρών και ηλεκτρολυτών [4]. Τα αίτια της οξείας νεφρικής ανεπάρκειας μπορεί να είναι προνεφρικά, δηλαδή ελαττωμένη αιματική ροή στο νεφρό από σοβαρή αιμορραγία λόγω τραυματισμού ή σοβαρής λοίμωξης ή νεφρικά, δηλαδή απόφραξη μιας νεφρικής αρτηρίας από σπειραματονεφρίτιδα ή ενδογενείς-εξωγενείς τοξίνες. Μπορεί, επίσης να είναι και μετανεφρικά, δηλαδή να προκαληθεί απόφραξη του ουροποιητικού συστήματος λόγω διόγκωσης του προστάτη ή ύπαρξης πέτρας στο ουροποιητικό σύστημα ή ακόμη και κάποιου τραυματισμού. Η οξεία νεφρική ανεπάρκεια συναντάται πιο συχνά σε ασθενείς που νοσηλεύονται σε νοσοκομεία και μονάδες εντατικής θεραπείας.

1.2.2 Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια

Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια (ΧΝΑ) καλείται η παθολογική κατάσταση κατά την οποία επιτελείται σταδιακή απώλεια της νεφρικής λειτουργίας. Η ΧΝΑ αποτελεί ένα παγκόσμιο πρόβλημα υγείας καθώς έχει αναφερθεί ότι ένα ποσοστό της τάξης του 8-16% του παγκόσμιου πληθυσμού ενδέχεται να εμφανίσει τη νόσο σε κάποιο βαθμό [5]. Μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία, ωστόσο τα περισσότερα περιστατικά έχουν καταγραφεί για άτομα ηλικίας 60-65 χρονών [6]. Αυτό, μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι στις συγκεκριμένες ηλικίες παρουσιάζεται αύξηση των κρουσμάτων διαβήτη και υπέρτασης [7], οι οποίες σχετίζονται με την εμφάνιση νεφρικών δυσλειτουργιών και αποτελούν τις πιο συχνές αιτίες εκδήλωσης χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας. Η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια μπορεί να προκληθεί τόσο από την αύξηση της πίεσης και της γλυκόζης στο αίμα τα οποία είναι τα πιο κοινά αίτια, αλλά και από άλλους παράγοντες. Αυτοί μπορεί να είναι, η παχυσαρκία, το κάπνισμα [8], οι συστημακές λοιμώξεις [9] και τα αυτοάνοσα νοσήματα [10]. Οι συστημακές λοιμώξεις εμφανίζονται κυρίως στις αναπτυσσόμενες χώρες και μπορεί να προκαλούνται από βακτήρια (φυματίωση σε Ινδία και Μέση Ανατολή, στρεπτόκοκκος στην Αφρική), ιούς (Ηπατίτιδα Β και C, AIDS στην Αφρική) και πρωτόζωα (ελονοσία στην Αφρική και λεισμανίαση στην Αφρική και την Ασία) [11]. Στις αναπτυσσόμενες χώρες,

επίσης, η επιβάρυνση του περιβάλλοντος με χημικά όπως το κάδμιο, ο μόλυβδος, ο υδράργυρος έχει συσχετισθεί με την εμφάνιση χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας [12].

Η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια είναι χρόνια πάθηση και δεν παρουσιάζει σαφή συμπτώματα σε αρχικά στάδια. Διακρίνεται από πέντε στάδια και θεωρείται μη αναστρέψιμη, εφόσον δεν υπάρχει αποτελεσματικός και ενδεδειγμένος τρόπος πρόγνωσης της πορείας και της εξέλιξης της νόσου. Για τη διάγνωση ενός ατόμου με ΧΝΑ απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ανίχνευση νεφρικής δυσλειτουργίας-βλάβης για διάστημα μεγαλύτερο των τριών μηνών [10] ή/και μείωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης σε επίπεδα μικρότερα από $60\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ για διάστημα μεγαλύτερο των 3 μηνών με ή χωρίς νεφρική βλάβη [13]. Νεφρική βλάβη ορίζουμε οποιαδήποτε δομική και λειτουργική διαταραχή συμβαίνει στους νεφρούς. Ρυθμό σπειραματικής διήθησης ορίζουμε τον όγκο του πλάσματος που διηθείται στη μονάδα του χρόνου. Η νεφρική βλάβη ανιχνεύεται μέσω της χημικής ανάλυσης των ούρων ή μέσω απεικόνισης του νεφρού με ακτινογραφίες ή υπερήχους καθώς και μέσω βιοψίας του νεφρικού ιστού. Οι εκατομμύρια νεφρώνες που συναντώνται στους νεφρούς εκφυλίζονται σταδιακά κατά την εξέλιξη και επιδείνωση της ΧΝΑ και έτσι οι διαδικασίες της διήθησης και επαναπορρόφησης δεν επιτελούνται με ακρίβεια και αποτελεσματικότητα. Στα αρχικά στάδια της νόσου όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι ασθενείς δεν εμφανίζουν σαφή συμπτώματα που να προδιαθέτουν την ύπαρξη της νόσου και την εξέλιξη που μπορεί να έχει σε ένα άτομο. Η νόσος εξελίσσεται χωρίς να γίνεται αντιληπτή και τα συμπτώματα της νεφρικής δυσλειτουργίας γίνονται σταδιακά εντονότερα. Μερικά από τα συμπτώματα της νόσου είναι η σταδιακή μείωση παραγωγής ούρων, το οίδημα στα κάτω άκρα, η κούραση, η υπνηλία, οι έμετοι, η ναυτία, η ανορεξία, η απώλεια βάρους και οι συχνοί πονοκέφαλοι [14].

Η επιδείνωση της ΧΝΑ σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων και αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας [15, 16] που βαθμιαία μπορεί να οδηγήσουν στο τελικό στάδιο νεφρικής νόσου (end-stage renal disease, ESDR, στάδιο 5). Στο τελευταίο στάδιο της ΧΝΑ ο ασθενής δεν παράγει σχεδόν καθόλου ούρα και είναι αναγκαίο να υποβληθεί σε υποκατάσταση νεφρών είτε με αιμοκάθαρση ή με περιτοναϊκή κάθαρση ή με

μεταμόσχευση νεφρών. Αξίζει να σημειωθεί ότι ορισμένοι ασθενείς συνίσταται να υποβληθούν σε εξωνεφρική κάθαρση, πριν φτάσουν στο τελικό στάδιο νεφρικής νόσου, στην περίπτωση που παρουσιάσουν συμπτώματα ουραιμίας [13]. Επιπρόσθετες διαταραχές που συνοδεύουν τη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια είναι η γνωστική δυσλειτουργία [17], η διαταραχή της σωματικής λειτουργίας [18], οι λοιμώξεις του κυκλοφορικού συστήματος [19] και η οξεία νεφρική ανεπάρκεια [20].

1.2.3 Στάδια Χρόνιας Νεφρικής Ανεπάρκειας

Η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως διακρίνεται από πέντε στάδια. Το κάθε στάδιο διακρίνεται από τη σταδιακή εξασθένηση της νεφρικής λειτουργίας. Το κάθε στάδιο, λοιπόν διακρίνεται από έναν συγκεκριμένο ρυθμό σπειραματικής διήθησης, ο οποίος με την εξέλιξη της νόσου μειώνεται. Η **Εικόνα 2** δείχνει αυτή τη μεταβολή στο ρυθμό σπειραματικής διήθησης ανάλογα με το στάδιο στο οποίο βρίσκεται ο ασθενής.

ΣΤΑΔΙΟ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΡΣΔ (mL/min/1.73 m ²)
1	Νεφρική βλάβη με φυσιολογικό ή αυξημένο ΡΣΔ	≥90
2	Νεφρική βλάβη με μειωμένο ΡΣΔ	60–89
3	Περισσότερη μείωση στο ΡΣΔ	30–59
4	Οξεία μείωση στο ΡΣΔ	15–29
5	Απόπτωση νεφρού	<15 Διάλυση

Εικόνα 2. Καταγραφή της μείωσης του Ρυθμού Σπειραματικής Διήθησης σε συνάρτηση με το στάδιο της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας και σύντομη περιγραφή των σταδίων. Ο ΡΣΔ είναι ο όγκος του πλάσματος που διηθείται στη μονάδα του χρόνου.

1.3 Διάγνωση Χρόνιας Νεφρικής Ανεπάρκειας

Υπάρχουν διάφοροι κλινικοί τρόποι διάγνωσης της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας και κατηγοριοποίησης των ασθενών σε ένα από τα προαναφερθέντα πέντε στάδια. Κάποιοι από αυτούς τους τρόπους είναι ο υπολογισμός του ρυθμού σπειραματικής διήθησης (estimated Glomerular Filtration Rate, eGFR), η εμφάνιση πρωτεϊνουρίας ή αλβουμινουρίας, η εκτίμηση στο πλάσμα των επιπέδων κρεατινίνης και η βιοψία στον νεφρικό ιστό [21-23]. Παρόλα αυτά, όπως φαίνεται στην καταγραφή της **Εικόνας 3.**, η μείωση στο ΡΣΔ-GFR μπορεί να ανιχνευθεί-υπολογισθεί μόνο όταν ο ασθενής θα βρίσκεται σε προχωρημένο στάδιο της νόσου και η λειτουργία των νεφρών έχει μειωθεί σημαντικά [24]. Επίσης η άμεση μέτρηση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης είναι χρονοβόρα διαδικασία και η βιοψία δεν παύει να είναι μια επεμβατική μέθοδος με μετεγχειρητικές επιπλοκές. Τέλος, σε πολλούς ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, τα επίπεδα πρωτεϊνουρίας εμφανίζουν ποικιλομορφία. Για τους παραπάνω λόγους, υπάρχει επιτακτική ανάγκη για εύρεση νέων βιοδεικτών που θα είναι περισσότερο ευαίσθητοι και ικανοί να κάνουν διάγνωση της νόσου στα αρχικά στάδια, αλλά και να προβλέπουν την εξέλιξη της νόσου στον εκάστοτε ασθενή. Άτομα υψηλού κινδύνου, όπως αυτά με διαβήτη, υπέρταση, οικογενειακό ιστορικό χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας ή αυτοάνοσα νοσήματα με πιθανότητα προσβολής των νεφρών θα μπορούν να χρησιμοποιούν εύκολα και με μεγάλη ευαισθησία διαγνωστικά τεστ για την ανίχνευση της πρωτεϊνουρίας. Έτσι, με τους νέους βιοδείκτες θα μπορεί να γίνεται άμεση και αποτελεσματική διάγνωση της νόσου στα αρχικά στάδια της ασθένειας [9].

Τρόποι διάγνωσης	Περιορισμοί
<ul style="list-style-type: none"> •Υπαρξη αλβουμιουρίας-πρωτεϊνουρίας •Αλλαγές στην κρεατινίνη του πλάσματος •Μέτρηση του Ρυθμού Σπειραματικής Διήθησης ΡΣΔ eGFR (estimated Glomerular Filtration Rate) 	<ul style="list-style-type: none"> •Έλλειψη αλβουμιουρίας έχει καταγραφεί σε αρκετούς ασθενείς με ΧΝΑ •Μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ ασθενών •Με τη μέτρηση του ΡΣΔ δεν μπορεί να επιτευχθεί διάγνωση για τα πρώτα στάδια της ασθένειας (έλλειψη ευαισθησίας)
Βιοψία	Επεμβατική μέθοδος με πιθανές επιπλοκές

Εικόνα 3. Καταγραφή των σημερινών τρόπων διάγνωσης της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας αλλά και των περιορισμών που τις διέπουν. Σημειώνεται ότι μέχρι σήμερα δεν υπάρχει αποτελεσματικός και ενδεδειγμένος τρόπος πρόγνωσης της εξέλιξης της νόσου και υπάρχει επιτακτική ανάγκη για ανακάλυψη νέων βιοδεικτών.

Για την εκτίμηση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης προτιμάται όχι ο άμεσος τρόπος, αλλά ο έμμεσος μέσω υπολογισμού του με χρήση κατάλληλων εξισώσεων. Κατά τον υπολογισμό του ΡΣΔ-GFR με τη χρήση μαθηματικών εξισώσεων λαμβάνονται υπόψη τα επίπεδα κρεατινίνης στο αίμα, η ηλικία, το φύλο όπως και η φυλή των ατόμων. Οι μαθηματικές εξισώσεις που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση του ΡΣΔ-GFR είναι οι παρακάτω [13]:

- **Τύπος Cockcroft-Gault**

$GFR (ml/min) = (140 - \text{ηλικία}) * \text{βάρους} / 72 * \text{κρεατ ορού (mg/dl)}$ (*0,85 αν η ασθενής είναι γυναίκα)

- **Τύπος MDRD (Modification of Diet in Renal Disease)**

$GFR (ml/min/1.73m^2) = 186.3 * \text{κρεατ ορού (mg/dl)}^{-1.154} * \text{ηλικ.}^{-0.203}$ (*0.742 αν η ασθενής είναι γυναίκα, *1.212 αν ο ασθενής είναι της μαύρης φυλής)

ή

$GFR (ml/min/1.73m^2) = 170 * \text{κρεατ ορού (mg/dl)}^{-0.999} * \text{ηλικ.}^{-0.176} * \text{ουρία}^{-0.17} * \text{αλβουμίνη}^{-0.318}$ (*0.762 αν η ασθενής είναι γυναίκα, *1.18 αν ο ασθενής είναι της μαύρης φυλής)

Τελευταία έχουν αναπτυχθεί δύο ακόμα εξισώσεις για τον υπολογισμό του ΡΣΔ-GFR. Η εξίσωση CKD-EPI [25, 26] είναι πιο ακριβής σε σχέση με την MDRD, ειδικά σε υψηλά επίπεδα GFR ($>60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$). Παράλληλα, λαμβάνοντας υπόψη τα επίπεδα κρεατινίνης αλλά και κυστατίνης C σε μια εξίσωση [27], προκύπτει μια πιο ακριβής εκτίμηση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης.

1.4 Πρόγνωση της επιδείνωσης της Χρόνιας Νεφρικής Ανεπάρκειας

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω οι ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια εμφανίζουν ποικιλομορφία. Η νόσος μπορεί να εμφανιστεί σχεδόν σε κάθε ηλικία μεγαλύτερη των 30 χρόνων και τόσο τα συμπτώματα όσο και οι διαθέσιμοι βιοδείκτες να μην μπορούν να βοηθήσουν αποτελεσματικά στην πρόγνωση της εξέλιξης της νόσου! Έχει παρατηρηθεί ότι περισσότεροι ασθενείς φτάνουν μέχρι και το τρίτο στάδιο της νόσου, δηλαδή εμφανίζουν σταδιακή νεφρική βλάβη και μειωμένο ρυθμό σπειραματικής διήθησης. Ωστόσο σε κάποιους ασθενείς παρατηρείται γρήγορη επιδείνωση της νόσου μέσα σε διάστημα κάποιων μηνών.

Ως επιδείνωση ορίζουμε την κατάσταση συνεχούς ελάττωσης της νεφρικής λειτουργίας που υπολογίζεται μέσα από τη μέτρηση του ΡΣΔ-GFR ή της κρεατινίνης του πλάσματος. Ο ρυθμός ελάττωσης της σπειραματικής διήθησης παρουσιάζεται σταθερός με τη πάροδο του χρόνου σε ένα συγκεκριμένο άτομο, αλλά παρουσιάζει ποικιλομορφία ανάμεσα σε διαφορετικά άτομα. Έχει υπολογιστεί ότι η μείωση του ΡΣΔ-GFR σε κάποιους ασθενείς με σπειραματικές ασθένειες, διαβητική νεφρική νόσο ή πολυκυστική νόσο των νεφρών, είναι αυξημένη. Ενώ ο ΡΣΔ-GFR σε κάποιες άλλες περιπτώσεις, όπως σε ασθενείς με υπερτασική νεφροπάθεια ή διαμεσοσωληναριακή ασθένεια των νεφρών δεν παρουσιάζει δραματική μείωση. Ο ΡΣΔ σχετίζεται επίσης με κάποια άλλα μη μεταβλητά χαρακτηριστικά όπως είναι η φυλή, το φύλο και η ηλικία. Ένας ασθενής αфро-αμερικάνικης φυλής, αρσενικού γένους, μεγαλύτερης ηλικίας και με μικρότερα αρχικά επίπεδα νεφρικής λειτουργίας έχει μεγαλύτερες πιθανότητες να εμφανίσει μεγαλύτερη μείωση στον ΡΣΔ-GFR. Ο διαφορετικός ρυθμός ελάττωσης του GFR μπορεί να σχετίζεται και με κάποια μεταβλητά χαρακτηριστικά των ασθενών, όπως είναι τα υψηλά επίπεδα πρωτεϊνουρίας (ή

λευκωματουρίας), ο φτωχός γλυκαιμικός έλεγχος, η υψηλή αρτηριακή πίεση, η νικοτίνη και η πίσσα που περιέχονται στα τσιγάρα και οι χαμηλές συγκεντρώσεις αλβουμίνης στο πλάσμα του αίματος [13] .

Από όλα τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι η κατηγοριοποίηση των ασθενών σε κάποιο από τα στάδια της νόσου δεν αρκεί για να προβλεφθεί και ο ρυθμός με τον οποίο θα μειώνεται η σπειραματική διήθηση στους νεφρούς του ασθενούς! Θα πρέπει να συνυπολογίζονται και όλοι οι παραπάνω παράγοντες μεταβλητοί και μη. Επίσης με εκτενέστερες μελέτες επιδιώκεται η εύρεση νέων βιοδεικτών οι οποίοι θα μπορούν να προβλέψουν με ακρίβεια την εξέλιξη της νόσου! Έτσι οι ασθενείς θα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο κατηγορίες: αυτούς που διατρέχουν υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης τελικού σταδίου νεφρικής νόσου (ESRD) και αυτούς που έχουν μικρές πιθανότητες να εμφανίσουν επιδείνωση.

Πρόσφατα, έχουν ανιχνευθεί ορισμένοι βιοδείκτες που σχετίζονται με την πρόγνωση της επιδείνωσης της χρόνιας νεφρικής. Αυτοί οι βιοδείκτες είναι η πρωτεΐνη KIM- 1 (kidney injury molecule-1) [28], η σχετιζόμενη με τη ζελατινάση των ουδετερόφιλων λιποκαλίνη (NGAL), η κυστατίνη C [29] και η πρωτεΐνη L-FABP (liver-type fatty acid binding protein). Ο πιο σημαντικός και ευαίσθητος βιοδείκτης, θεωρείται ο NGAL. Παρόλα αυτά είναι εξαιρετικά δύσκολο, ένας μεμονωμένος βιοδείκτης να είναι σε θέση να προβλέψει την επιδείνωση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας. Αντίθετα, ένα σύνολο βιοδεικτών πιστεύεται ότι θα μπορεί να προβλέψει με μεγαλύτερη ακρίβεια και ευαισθησία την πορεία που μπορεί να έχει η νόσος σε έναν ασθενή. Μια πρωτεομική ανάλυση ούρων, εντόπισε μια ομάδα 273 πρωτεϊνών στα ούρα, η οποία μπορεί να αποτελέσει ικανό διαγνωστικό δείκτη σε συνδυασμό με την αλβουμινουρία [30].

Οι νεφρολόγοι σήμερα, είναι σε θέση να πραγματοποιούν αποτελεσματική θεραπεία σε ασθενείς που έχουν διαγνωσθεί έγκαιρα με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια [31, 32]. Με κατάλληλους προγνωστικούς βιοδείκτες θα μπορούν ακόμα να δώσουν τη δυνατότητα θεραπείας ανάλογα με τις ανάγκες του ασθενούς [29]. Για παράδειγμα, ασθενείς με αυξημένο

κίνδυνο επιδείνωσης, θα εισέρχονται σε κατάλληλη νεφρολογική κλινική για να κάνουν περισσότερο επιθετική θεραπεία [9, 33], σε σχέση με άλλους ασθενείς που δεν διατρέχουν τόσο μεγάλο κίνδυνο και θα πρέπει να υπόκεινται σε πιο συντηρητική θεραπεία. Οι ασθενείς που θα πρέπει να υπόκεινται σε επιθετική θεραπεία θα είναι άτομα με μη ελεγχόμενη υπέρταση, με επίμονη αλβουμινουρία, με $\text{P}\Sigma\Delta\text{-eGFR} < 30 \text{ mL/min/1.73m}^2$ ή/και με ραγδαία ελάττωση νεφρικής λειτουργίας ($> 5 \text{ mL/min/1.73m}^2$).

1.5 Θεραπευτική Αντιμετώπιση

Από τη στιγμή που ένα άτομο διαγνωσθεί με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, θα πρέπει να υπάρχει ένα κλινικό σχέδιο δράσης, ανάλογα με το στάδιο της νόσου στο οποίο βρίσκεται το άτομο [13]. Έτσι, άτομα που κατηγοριοποιούνται στο πρώτο και το δεύτερο στάδιο της νόσου, βάσει πάντα των επιπέδων $\text{P}\Sigma\Delta\text{-GFR}$ θα πρέπει να λαμβάνουν κατάλληλη θεραπεία για να αποφευχθεί περαιτέρω επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας. Επίσης θα πρέπει να ελέγχεται αν η νεφρική βλάβη σε αυτά τα στάδια οφείλεται σε άλλους αναστρέψιμους παράγοντες, όπως μια λοίμωξη των νεφρών, μια απόφραξη του ουροποιητικού συστήματος ή ένα αυτοάνοσο νόσημα. Στην τελευταία περίπτωση θα μπορούσε να εφαρμοστεί κατάλληλη θεραπεία για την σταθεροποίηση της κατάστασης του ασθενούς. Σε άτομα που βρίσκονται στο τρίτο στάδιο όμως, θα πρέπει να εκτιμάται η πιθανότητα επιδείνωσης της νόσου καθώς και να θεραπεύονται τυχόν επιπλοκές [9]. Τέλος, άτομα τέταρτου και πέμπτου σταδίου θα πρέπει να προετοιμάζονται και να υπόκεινται αντίστοιχα, σε υποκατάσταση νεφρικής λειτουργίας. Η υποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας μπορεί να γίνει μέσω εξωνεφρικής κάθαρσης ή μέσω μεταμόσχευσης ένα διαγνωσθούν ταυτόχρονα συμπτώματα ουραιμίας [13].

Άτομα που έχουν διαγνωσθεί με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, αλλά έχουν βρεθεί επίσης με μικρό κίνδυνο για επιδείνωση μπορεί να υπόκεινται σε πιο συντηρητική μορφή θεραπείας, χωρίς φάρμακα. Έχει προταθεί ότι η λήψη συμπληρωμάτων όξινου ανθρακικού νατρίου σταθεροποιεί τυχόν επιδείνωση ή απώλεια της νεφρικής λειτουργίας στους ασθενείς με $\text{P}\Sigma\Delta\text{-eGFR} < 30 \text{ mL/min/1.73m}^2$ και χαμηλά επίπεδα όξινου ανθρακικού νατρίου στο αίμα [34]. Η συντηρητική θεραπεία θα μπορούσε να περιλαμβάνει για παράδειγμα, κάποιες

αλλαγές στον τρόπο ζωής των ασθενών, όπως η απεμπόληση βλαβερών συνηθειών όπως το κάπνισμα [35] ή/και η κακή, πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά, διατροφή ([36], [37]). Η επίδραση της περιορισμένης πρόσληψης πρωτεϊνών στη διατροφή έχει μελετηθεί επίσης ως πιθανή μορφή θεραπείας για την χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, ωστόσο με αμφιλεγόμενα αποτελέσματα. Παρόλα αυτά, ύστερα από αποτελέσματα μετα-ανάλυσης, η αυστηρή ή η μικρή πρόσληψη πρωτεϊνών στη διατροφή δύναται να ελαττώσει τις πιθανότητες εμφάνισης νεφρικής δυσλειτουργίας και θνησιμότητας. Η παρατήρηση έγινε με κλινικές δοκιμές [38], όμως ο κίνδυνος υποσιτισμού την καθιστά ακόμα αμφιλεγόμενη για ασθενείς χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας.

Η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια σχετίζεται με υψηλή αρτηριακή πίεση σε μη διαβητικούς ασθενείς. Ορισμένα φάρμακα που δρουν ως αναστολείς του ενζύμου μετατροπής της αγγειοτενσίνης αποτελούν τα πιο μελετημένα και αποτελεσματικά φάρμακα μείωσης του ρυθμού επιδείνωσης της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας [39-41]. Παράγοντες, όπως οι ανταγωνιστές των υποδοχέων αγγειοτενσίνης είναι φάρμακα που χορηγούνται όταν οι ασθενείς που λαμβάνουν τα φάρμακα αναστολής του ενζύμου μετατροπής της αγγειοτενσίνης εμφανίζουν συμπτώματα βήχα ή αγγειοιδήματος [42, 43]. Ο συνδυασμός των δυο φαρμάκων οδηγεί σε ελάττωση των επιπέδων πρωτεΐνουρίας [44]. Ακόμη, η επιπλέον θεραπεία με φάρμακα που αποτελούν ανταγωνιστές των διαύλων ασβεστίου πιθανά να μειώνει περαιτέρω τα επίπεδα πρωτεΐνουρίας [45]. Στο τελικό στάδιο της νεφρικής νόσου ωστόσο, είναι απαραίτητη η υποκατάσταση της λειτουργίας των νεφρών με τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης ή της περιτοναϊκής διάλυσης ή ακόμα και της μεταμόσχευσης. Όταν ένας ασθενής υποβάλλεται στη διαδικασία της αιμοκάθαρσης, μια τεχνητή συσκευή διάλυσης αφαιρεί τις άχρηστες ουσίες από το αίμα και αποκαθιστά την ισορροπία των ηλεκτρολυτών και του νερού στο σώμα. Όταν όμως ο ασθενής υποβάλλεται στη διαδικασία της περιτοναϊκής διάλυσης, χρησιμοποιείται περιτόναιο και καθετήρας. Το περιτόναιο είναι ένας υμένας που λειτουργεί ως ημιδιαπερατή μεμβράνη μέσω της οποίας διηθούνται υγρά και διαλυμένες ουσίες του αίματος, όπως ηλεκτρολύτες, γλυκόζη, ουρία, γλυκόζη, και άλλα μικρά μόρια. Ο καθετήρας τοποθετείται στο περιτόναιο και έχει κατεύθυνση προς το

εξωτερικό του σώματος του ασθενούς. Τέλος η διαδικασία της μεταμόσχευσης γίνεται σπάνια στις αναπτυσσόμενες χώρες εξαιτίας μη καταλληλότητας των διαθέσιμων νεφρικών μοσχευμάτων.

1.6 Αναγνώριση βιοδεικτών

Για την εξεύρεση των κατάλληλων βιοδεικτών διάγνωσης και την πρόγνωσης της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας επιλέγεται η μέθοδος συλλογής και ανάλυσης των ούρων ή του πλάσματος. Τα συγκεκριμένα βιολογικά υγρά παραλαμβάνονται εύκολα και διαθέτουν μεγάλη ποικιλότητα σε βιοχημικές ουσίες. Η βιοψία νεφρικού ιστού για την πρόγνωση ή τη διάγνωση της νόσου δε συνίσταται εφόσον αποτελεί μια χειρουργική επέμβαση με πιθανές παρενέργειες [46-48]. Τα ούρα αντιθέτως έχουν χαρακτηριστεί ως "υγρή βιοψία" των νεφρών και περιέχουν μια πληθώρα μεταβολιτών και πρωτεϊνών για ανάλυση. Τα ούρα είναι πιο εύκολα διαχειρίσιμα βιολογικά υγρά σε σχέση με το αίμα. Η συλλογή τους είναι γρήγορη και απλή και μπορούν να αποθηκευτούν στην κατάψυξη για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς σημαντική αλλοίωση της βιοχημικής τους σύστασης [49].

Η αναγνώριση βιοδεικτών στα ούρα για μια συγκεκριμένη ασθένεια παρουσιάζει ωστόσο κάποιες δυσκολίες. Το πρωτόμα των ούρων αλλάζει κατά τη διάρκεια της ημέρας εξαιτίας μεταβολικών/ καταβολικών διεργασιών, ορμονικών αλλαγών, μεταβολών στη διαίτα ή ακόμα και της άσκησης [50]. Η δειγματοληψία λοιπόν, πρέπει να γίνεται τις ίδιες χρονικές στιγμές μέσα στη μέρα, με προτίμηση τη λήψη των δεύτερων πρωινών ούρων [51].

Η διαδικασία εύρεσης βιοδεικτών για την χρόνια νεφρική ανεπάρκεια περιλαμβάνει κυρίως την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό μια πρωτεΐνης κάθε φορά. Ωστόσο, η πολυπλοκότητα της νόσου και η συσχέτισή της και με άλλες παθήσεις, θέτουν υπό αμφισβήτηση την παραπάνω διαδικασία [52]. Οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στη νόσο περιλαμβάνουν εκτός από τη μείωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης, ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, αυξημένο οξειδωτικό στρες, φλεγμονές, διαταραχές στην πήξη του αίματος, ασβεστοποίηση των αγγείων λόγω ελαττωμένου μεταβολισμού ασβεστίου και φωσφόρου [53-56].

1.7 Ομικές τεχνολογίες και Ανάλυση Δεδομένων

Η μελέτη της παθοφυσιολογίας πολύπλοκων ασθενειών όπως είναι και η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια απαιτεί τη χρήση ομικών τεχνολογιών και την άντληση πληροφοριών από τις βάσεις δεδομένων που υπάρχουν για τη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. Οι ομικές τεχνολογίες δίνουν τη δυνατότητα μιας ολιστικής προσέγγισης του προβλήματος. Οι ομικές τεχνολογίες εφαρμόζονται στα πλαίσια ενός νέου κλάδου της βιολογίας, που ονομάζουμε Βιολογία Συστημάτων. Σε κάθε βιολογικό πρόβλημα που προσεγγίζεται με αυτή τη μέθοδο κάθε τι που μελετάται λογίζεται όχι σαν μια ανεξάρτητη οντότητα, αλλά ως ένα σύνολο πραγμάτων που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και δημιουργούν ένα σύστημα μελέτης [57]. παρουσιάζοντας με τον τρόπο αυτό μια πιο σφαιρική εικόνα του συστήματος, ικανή να εκδηλώσει φαινόμενα που υπό άλλες περιπτώσεις δε θα ήταν εύκολο να παρατηρηθούν. Ο στόχος για τον κλάδο της Βιολογίας Συστημάτων είναι η συλλογή των δεδομένων από τις επιμέρους μελέτες που γίνονται με ομικές τεχνολογίες έτσι ώστε να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή μοντέλων, τα οποία θα μπορούσαν να κάνουν μια ακριβή πρόβλεψη και απεικόνιση της λειτουργίας του συστήματος.

1.7.1. Πρωτεομική

Πρωτεομική καλείται ο κλάδος της Βιολογίας Συστημάτων που μελετά την λειτουργία όλων των εκφραζόμενων πρωτεϊνών του υπό μελέτη συστήματος. Ο όρος πρωτέομα εισήχθη πρώτη φορά για να περιγράψει το σύνολο των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα ενός συγκεκριμένου κυττάρου. Σήμερα περιλαμβάνει όχι μόνο το σύνολο των πρωτεϊνών που εκφράζονται στα κύτταρα, αλλά και τις αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν μεταξύ αυτών σε δομικό και βιοχημικό επίπεδο [58]. Η ανάπτυξη της μεθόδου της Φασματομετρίας Μάζας (Mass Spectrometry-MS) δίνει σήμερα τη δυνατότητα αναγνώρισης και ταυτοποίησης πρωτεϊνών από ένα σύνθετο μίγμα με μεγάλη ακρίβεια και εκπληκτική ευαισθησία. Με τη μέθοδο της Φασματομετρίας Μάζας προσδιορίζεται το μοριακό βάρος μια πρωτεΐνης, ακόμα και αν αυτό είναι πολύ μικρό, της τάξης των 100-200 Da. Οι πρωτεΐνες για να μετρηθούν ιονίζονται έτσι ώστε να βρίσκονται στην αέρια φάση.

Ένα φασματομέτρο περιλαμβάνει μια πηγή ιονισμού, έναν αναλυτή μάζας που μετρά τη μάζα των πρωτεϊνών σε συνάρτηση με το φορτίο τους (m/z) και έναν ανιχνευτή των ιόντων που υπάρχουν σε κάθε τιμή μάζας. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι ιονισμού είναι με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray ionization - ESI) και λέιζερ (matrix-assisted laser desorption/ionization -MALDI). Με MALDI αναλύονται κυρίως πιο απλά δείγματα, ενώ με ESI και υγρή χρωματογραφία μάζας (Liquid chromatography, LC), τα πιο σύνθετα [59].

1.7.2 Μεταβολομική

Η μεταβολομική στοχεύει στην ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των μεταβολιτών ενός μελετώμενου βιολογικού συστήματος (ιστός, κύτταρο, όργανο, βιολογικό υγρό, οργανισμός). Το σύνολο των μεταβολιτών ενός βιολογικού συστήματος το ονομάζουμε μεταβόλωμα. Οι μεταβολίτες είναι μικρού μοριακού βάρους βιοχημικά μόρια, τα οποία προκύπτουν ύστερα από τη δράση ενζύμων-πρωτεϊνών. Η μεταβολομική είναι ουσιαστικά η μελέτη των βιοχημικών μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν οι μεταβολίτες. Το μεταβόλωμα αντιπροσωπεύει τους μεταβολίτες που υπήρχαν στο μελετώμενο σύστημα τη στιγμή που έγινε η μέτρηση. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται κυρίως για την μελέτη του μεταβόλωματος είναι η Φασματομετρία Μάζας (Mass spectrometry) που αναφέρθηκε προηγουμένως και η Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Φασματοσκοπία (NMR Spectroscopy). Η Πυρηνική Μαγνητικού Συντονισμού Φασματοσκοπία (NMR) μπορεί να ανιχνεύει βιοχημικά μόρια μικρού μοριακού βάρους, της τάξης των 20-200 Da. Η μέτρηση με NMR, στηρίζεται στην απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από τους πυρήνες των ατόμων των μορίων. Οι μετρήσεις που γίνονται με τη μέθοδο MS αντίθετα, στηρίζονται στην ικανότητα ιονισμού των μορίων. Η ανίχνευση των μορίων με τη μέθοδο MS, γίνεται εφόσον αυτά έχουν μοριακό βάρος μεταξύ 100-500 Da. Οι δύο τεχνικές μέτρησης των μεταβολιτών είναι συμπληρωματικές. Έτσι, γίνεται επαρκής μέτρηση όλων των διαφορετικών μοριακών βαρών των μεταβολιτών. Η πρόκληση για την Βιολογία Συστημάτων είναι να συνδυαστούν τα

δεδομένα πρωτεομικής και μεταβολομικής για την καλύτερη και πληρέστερη κατανόηση του υπό μελέτη βιολογικού συστήματος.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Σκοπός

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η χρήση των διαθέσιμων βάσεων δεδομένων για την ανεύρεση σηματοδοτικών μονοπατιών που περιλαμβάνουν πρωτεΐνες και μεταβολίτες οι οποίοι μεταβάλλονται κατά την επιδείνωση της Χρόνιας Νεφρικής Ανεπάρκειας. Η συνδυαστική ανάλυση του πρωτεόματος και του μεταβολόματος στόχο είχε την εύρεση των πιθανών μονοπατιών καθώς και βιοδεικτών που μπορεί να εμπλέκονται στην επιδείνωση της νόσου. Αυτή η προσέγγιση, εκτός από καινοτόμος πιστεύεται ότι θα προσδώσει μεγαλύτερη εγκυρότητα στις προβλέψεις μας και ώθηση σε μελλοντικά

πειράματα. Σε δεύτερο στάδιο διερευνήθηκε η σχέση μεταξύ των μεταβολικών και των πρωτεϊνών που ανιχνεύθηκαν έτσι ώστε να αποδειχθεί η εγκυρότητα των ευρημάτων.

2.2 Δεδομένα

2.2.1 Κλινικά Δεδομένα Ασθενών

Η ανάλυση μας βασίστηκε σε δεδομένα ασθενών που παρουσίασαν επιδείνωση της νόσου σε πιο σοβαρό στάδιο, ακόμα και στο τελικό στάδιο νεφρικής νόσου από τη στιγμή που διαγνώστηκαν και μέχρι να λήξει η περίοδος λήψης δειγμάτων και ασθενών όπου η κατάσταση τους δε παρουσίασε σημαντική επιδείνωση στο ίδιο χρονικό διάστημα. Στην αρχική επίσκεψή τους, όλοι οι ασθενείς είχαν διαγνωσθεί με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και είναι πιθανό άτομα που αρχικά κατατάσσονταν στο ίδιο στάδιο, να εμφάνισαν εν τέλει διαφορές ως προς την επιδείνωσή τους. Οι ασθενείς που μελετήθηκαν ήταν 64 σε αριθμό. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιελάμβανε 32 ασθενείς, οι οποίοι δεν παρουσίασαν επιδείνωση της Χρόνιας Νεφρικής Ανεπάρκειας (Non-progressors) και τα δείγματά τους αποτέλεσαν δείγματα ελέγχου για τα πειράματα που ακολούθησαν. Η δεύτερη κατηγορία περιελάμβανε 32 ασθενείς που παρουσίασαν επιδείνωση της Χρόνιας Νεφρικής Ανεπάρκειας (Progressors). Ο ακόλουθος πίνακας (**Πίνακας 1**) υποδεικνύει την ηλικία, το φύλο και το ιατρικό προφίλ των ατόμων που μελετήθηκαν. Επίσης δείχνει το στατιστικό τεστ (Student's T-test) που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δεδομένων και την εύρεση του p-Value

	Όλα τα δείγματα	Ασθενείς με σταθερή κλινική εικόνα	Ασθενείς με επιδείνωση	Στατιστική επεξεργασία, p-Value
--	-----------------	------------------------------------	------------------------	---------------------------------

	n=64	n=32	n=32	[t-test, 2-tailed, paired]	
Φύλο[Θ/Α]	19/45	9/23	10/22	0.8	
Ηλικία [χρόνια]	64±15	63±16	66±15	0.4	
Δείκτης μάζας σώματος [BMI]	29±5	28±4	30±5	0.1	
Σφυγμός [min]	68±12	67±11	69±12	0.5	
Συστολική αρτηριακή πίεση [mmHg]	138±18	133±18	142±18	0.1	
Διαστολική αρτηριακή πίεση [mmHg]	79±8	80±6	78±10	0.5	
Διαβήτης [Y/N]	20/42	9/23	11/21	0.6	
Αρχικά επίπεδα κρεατινίνης ορού [mg/dl]	1.7±0.5	1.6±0.5	1.7±0.6	0.3	
Αρχικός Ρυθμός σπειραματικής διήθησης eGFR [ml/min/1.72]	44±16	46±15	42±16	0.3	
Τελευταία παρακολούθηση της κρεατινίνης ορού [mg/dl]	2.1±1.3	1.6±0.5	2.7±1.5	5.9E-04	
Τελευταία παρακολούθηση Ρυθμού Σπειραματικής Διήθησης eGFR [ml/min/1.72]	38±17	47±15	29±15	9.8E-05	
Χρήση φαρμάκων	ACEi and ARB [Y/N]	55/14	24/8	31/1	0.02
	Στατίνες [Y/N]	48/16	20/12	28/4	0.03
	Αντιπηκτικά [Y/N]	10/54	3/29	7/25	0.1
	Βιταμίνη D [Y/N]	25/39	8/24	17/15	0.03
Αρχικό στάδιο ασθενών	II	10	6	4	0.4
	III	41	21	20	
	IV	13	5	8	
	All	64	32	32	

Πίνακας 1: Παρουσίαση των κλινικών δεδομένων ασθενών με Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση.

2.2.2 Ανίχνευση μεταβολιτών – πρωτεϊνών

Οι μεταβολίτες ανιχνεύθηκαν ύστερα από ανάλυση των δειγμάτων με Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συστονισμού (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy – NMR). Από το σύνολο των 768 μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν και ήταν σχετικοί για την νεφρική λειτουργία, μόλις 31 επιλέχθηκαν ως διαφορεικά εκφραζόμενοι και στατιστικώς σημαντικοί (p-Value<0,05) για την ανάλυση. Από τους 31 μεταβολίτες, οι 8 βρέθηκαν υπερεκφραζόμενοι και οι 23 υποεκφραζόμενοι στους ασθενείς που παρουσίασαν

επιδείνωση της Χρόνιας Νεφρικής Ανεπάρκειας (Progressors) σε σχέση με τους ασθενείς που παρουσίασαν σταθερή κλινική εικόνα (Non-Progressors). Οι μεταβολίτες που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και το πρότυπο έκφρασής τους (Regulation Trend) είναι διαθέσιμα στον **Συμπληρωματικό Πίνακα 1**.

Οι πρωτεΐνες ανιχνεύθηκαν ύστερα από ανάλυση των δειγμάτων με υγρή χρωματογραφία και φασματοσκοπία μάζας (Liquid chromatography–mass spectrometry, LC-MS). Από το σύνολο των πρωτεϊνών που ανιχνεύθηκαν μόλις 142 επιλέχθηκαν ως διαφορετικά εκφραζόμενες και στατιστικώς σημαντικές ($p\text{-Value}<0,05$) για την ανάλυση. Από τις 142 πρωτεΐνες, οι 34 βρέθηκαν υπερκφραζόμενες και οι 108 υποεκφραζόμενες στους ασθενείς που παρουσίασαν επιδείνωση της Χρόνιας Νεφρικής Ανεπάρκειας (Progressors) σε σχέση με τους ασθενείς που παρουσίασαν σταθερή κλινική εικόνα (Non-Progressors). Οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και το πρότυπο έκφρασής τους (Regulation Trend) είναι διαθέσιμα στον **Συμπληρωματικό Πίνακα 1**.

2.2.3. Ανάκτηση των ειδικών κωδικών πρωτεϊνών και μεταβολιτών

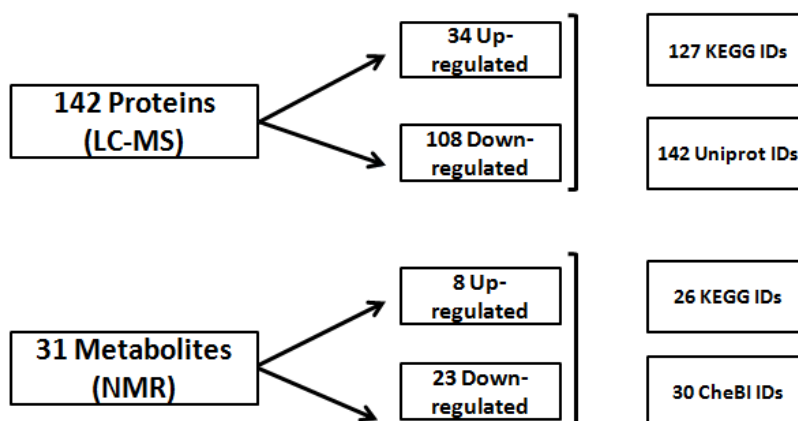
Το πρώτο βήμα για την ανάλυση των μονοπατιών ήταν να ανακτηθούν οι ειδικοί κωδικοί των πρωτεϊνών και μεταβολιτών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι βάσεις δεδομένων UniProt και Human Metabolite Data Base (HMDB) για τις πρωτεΐνες και τους μεταβολίτες αντίστοιχα.

Οι κωδικοί που ανακτήθηκαν ήταν κατάλληλοι, ώστε να αναγνωρίζονται από την εκάστοτε βάση δεδομένων που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των μονοπατιών. Οι κωδικοί Kegg τόσο για τις πρωτεΐνες όσο και για τους μεταβολίτες ήταν οι κατάλληλοι να χρησιμοποιηθούν στην βάση δεδομένων Kegg. Ενώ οι κωδικοί Uniprot Accession για τις πρωτεΐνες και CheBI για τους μεταβολίτες ήταν οι αναγνωρίσιμοι από τις βάσεις δεδομένων Impala και Reactome (**Εικόνα 4**)

Software	Protein input	Metabolite input
KEGG	KeggIDs	Kegg IDs
REACTOME	UniProt IDs	CheBI IDs
IMPALA	UniProt IDs	CheBI IDs

Εικόνα 4. Παρουσίαση των ειδικών κωδικών που πρέπει να έχουν οι πρωτεΐνες και οι μεταβολίτες για να αναγνωριστούν από τις βάσεις δεδομένων, Kegg, Impala, Reactome.

Για τους 31 μεταβολίτες ανακτήθηκαν 30 κωδικοί CheBI και 26 κωδικοί Kegg συνολικά. Για τις 142 πρωτεΐνες ανακτήθηκαν 142 UniProt Accession κωδικοί και 127 Kegg κωδικοί (Εικόνα 5)



Εικόνα 5. Οι διαφορικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες και μεταβολίτες που επιλέχθηκαν για την ανάλυση ήταν 142 και 31 αντίστοιχα. Στην εικόνα παρουσιάζεται το πρότυπο διαφοροποίησης των μορίων καθώς και ο αριθμός των ειδικών κωδικών που ανακτήθηκαν.

2.3 Βάσεις Δεδομένων

2.3.1 Impala

Η βάση δεδομένων Impala αποτελεί ένα εργαλείο με το οποίο μπορούμε να κάνουμε συνδυαστική ανάλυση δεδομένων πρωτεομικής, γενωμικής και μεταβολομικής. Δίνει τη δυνατότητα εύρεσης των στατιστικά σημαντικών τιμών (p-Values) των μεταβολιτών και των γονιδίων, χρησιμοποιώντας τη στατιστική μέθοδο Fisher. Οι μεταβολίτες πρέπει να εισάγονται στο σύστημα με τη μορφή ChEBI, Kegg ή HMDB κωδικών. Τα γονίδια και οι πρωτεΐνες πρέπει να εισάγονται με τη μορφή Uniprot, Ensemble, Unigene ή RefSeq κωδικών. Η βάση δεδομένων Impala διαθέτει δεδομένα από πολλές άλλες βάσεις δεδομένων και η ανάλυση που γίνεται σε αυτήν δεν περιλαμβάνει γραφική απεικόνιση των μονοπατιών

Τα δεδομένα των πρωτεϊνών και των μεταβολιτών αναλύθηκαν αρχικά στη συγκεκριμένη βάση. Οι πρωτεΐνες εισήχθησαν με τη μορφή Uniprot και οι μεταβολίτες με τη μορφή ChEBI. Έπειτα έγινε η ανάλυση και από τα μονοπάτια που προέκυψαν, επιλέχθηκαν εκείνα τα οποία περιείχαν ταυτόχρονα πρωτεΐνες και μεταβολίτες από το σετ των δεδομένων μας. Στη συνέχεια αποκλείστηκαν τα μονοπάτια, τα οποία δεν ήταν στατιστικά σημαντικά και κρατήθηκαν εκείνα με $p\text{-Value} < 0,05$. Τέλος, έγινε ταξινόμηση των μονοπατιών σε ομάδες ("Pathway groups") με βάση τα μόρια που περιείχαν. Πολλά από τα μονοπάτια στα οποία καταλήξαμε περιείχαν τις ίδιες πρωτεΐνες και μεταβολίτες (ή αρκετά μόρια κοινά) γι αυτό κρίθηκε αναγκαίο να ταξινομηθούν σε ομάδες. Οι ομάδες μονοπατιών ή αλλιώς "Pathway groups" είναι διαθέσιμες στον **Συμπληρωματικό Πίνακα 1**.

2.3.2 Reactome

Για την ανάλυση των δεδομένων μας χρησιμοποιήθηκε επίσης η βάση δεδομένων Reactome. Η συγκεκριμένη βάση δεδομένων έχει δημιουργηθεί σύμφωνα με πληροφορίες από άλλες βάσεις δεδομένων, όπως είναι οι: NCBI Gene, Ensembl, UniProt καθώς και οι: KEGG Compound and ChEBI small molecule, PubMed, και Gene Ontology. Έχει ως στόχο να συγκεντρώσει όλες τις πληροφορίες για τα βιολογικά μόρια και να τις απεικονίσει γραφικά σε σηματοδοτικά μονοπάτια. Στο σύστημα εισαγάγαμε τις πρωτεΐνες με τους κωδικούς UniProt και τους μεταβολίτες με τους κωδικούς CheBI. Από τα συνολικά μονοπάτια που

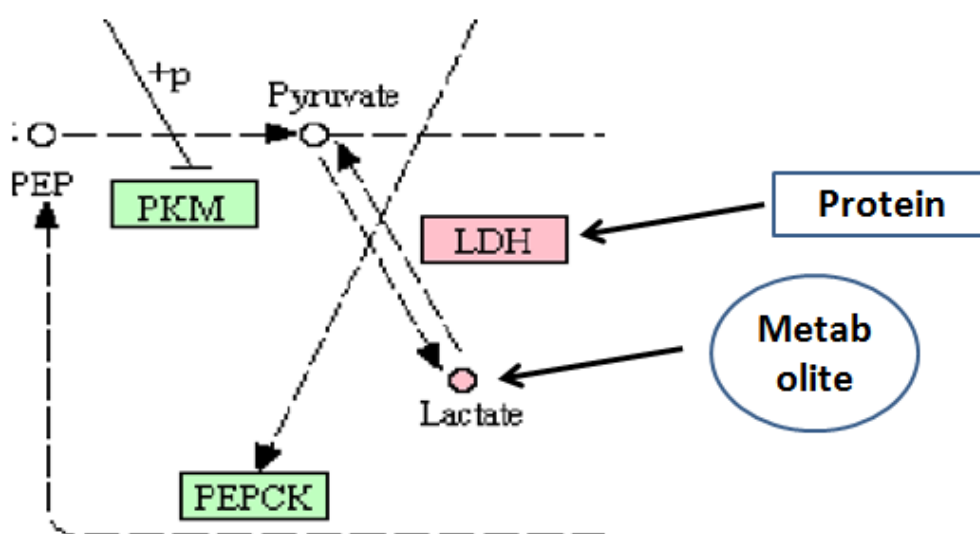
βρέθηκαν, κρατήθηκαν μόνο τα στατιστικώς σημαντικά με $pValue < 0,05$ και αποκλείστηκαν εκείνα που είχαν $pValue > 0,05$. Από την ανάλυσή μας αποκλείστηκαν επίσης εκείνα τα μονοπάτια, τα οποία περιείχαν μόνο μεταβολίτες ή μόνο πρωτεΐνες των δεδομένων μας, και όχι πρωτεΐνες και μεταβολίτες ταυτόχρονα. Τελικά κρατήθηκαν τα μονοπάτια τα οποία ήταν στατιστικώς σημαντικά και παρείχαν ταυτόχρονα πρωτεΐνες και μεταβολίτες που μας ενδιέφεραν. Για την διευκόλυνση της ανάλυσης τα μονοπάτια στα οποία καταλήξαμε ταξινομήθηκαν σε ομάδες ανάλογα με τα μόρια που περιείχαν. Όπως και στην ανάλυση με *Impala*, βρέθηκαν κοινά μόρια σε διάφορα μονοπάτια γι αυτό και αποφασίσαμε να τα ταξινομήσουμε σε ομάδες μονοπατιών- “Pathway groups” ανάλογα με τα μόρια που περιείχαν. Οι ομάδες μονοπατιών ή αλλιώς “Pathway groups” είναι διαθέσιμες στον **Συμπληρωματικό Πίνακα 1**.

2.3.3 Kegg

Για την ανάλυση των δεδομένων μας χρησιμοποιήθηκε επίσης η βάση δεδομένων KEGG. Είναι μια βάση δεδομένων που βοηθά στην κατανόηση των βιολογικών διαδικασιών που συμβαίνουν σε ένα κύτταρο ή έναν οργανισμό σε μοριακό επίπεδο. Τα δεδομένα που φέρει έχουν προέλθει από πειράματα αλληλούχισης γονιδιώματος και άλλες υψηλής απόδοσης πειραματικές τεχνολογίες. Δίνει τη δυνατότητα γραφικής απεικόνισης των βιολογικών μονοπατιών. Οι επιλογές “Mapper” και “Search&Color Pathway” χρησιμοποιήθηκαν για την συγκεκριμένη ανάλυση. Οι κωδικοί KEGG τόσο για τις πρωτεΐνες όσο και για τους μεταβολίτες εισήχθησαν επίσης στο σύστημα. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης μας έδωσαν μια σειρά από μονοπάτια. Στη συνέχεια αποκλείσαμε τα μονοπάτια που είχαν $pValue > 0,05$ και κρατήσαμε μόνο τα στατιστικώς σημαντικά με $pValue < 0,05$ τα οποία περιείχαν μεταβολίτες και πρωτεΐνες από το σετ δεδομένων μας. Οι γραφικές αναπαραστάσεις των μονοπατιών εξετάστηκαν περεταίρω έτσι ώστε να διαπιστώσουμε την ακριβή συσχέτιση των μορίων. Εξετάστηκε εάν τα μόρια είχαν άμεση ή έμμεση συσχέτιση ή βρίσκονταν στο

μονοπάτι χωρίς να συσχετίζονται. Έτσι ταξινομήσαμε τα μονοπάτια σε τρεις ομάδες, ανάλογα με την απόσταση-συσχέτιση που είχαν τα μόρια μέσα σε αυτά. Οι ομάδες των μονοπατιών είναι διαθέσιμες στον **Συμπληρωματικό Πίνακα 1**. Πληροφορίες για τις τρεις ομάδες μονοπατιών παρατίθενται παρακάτω:

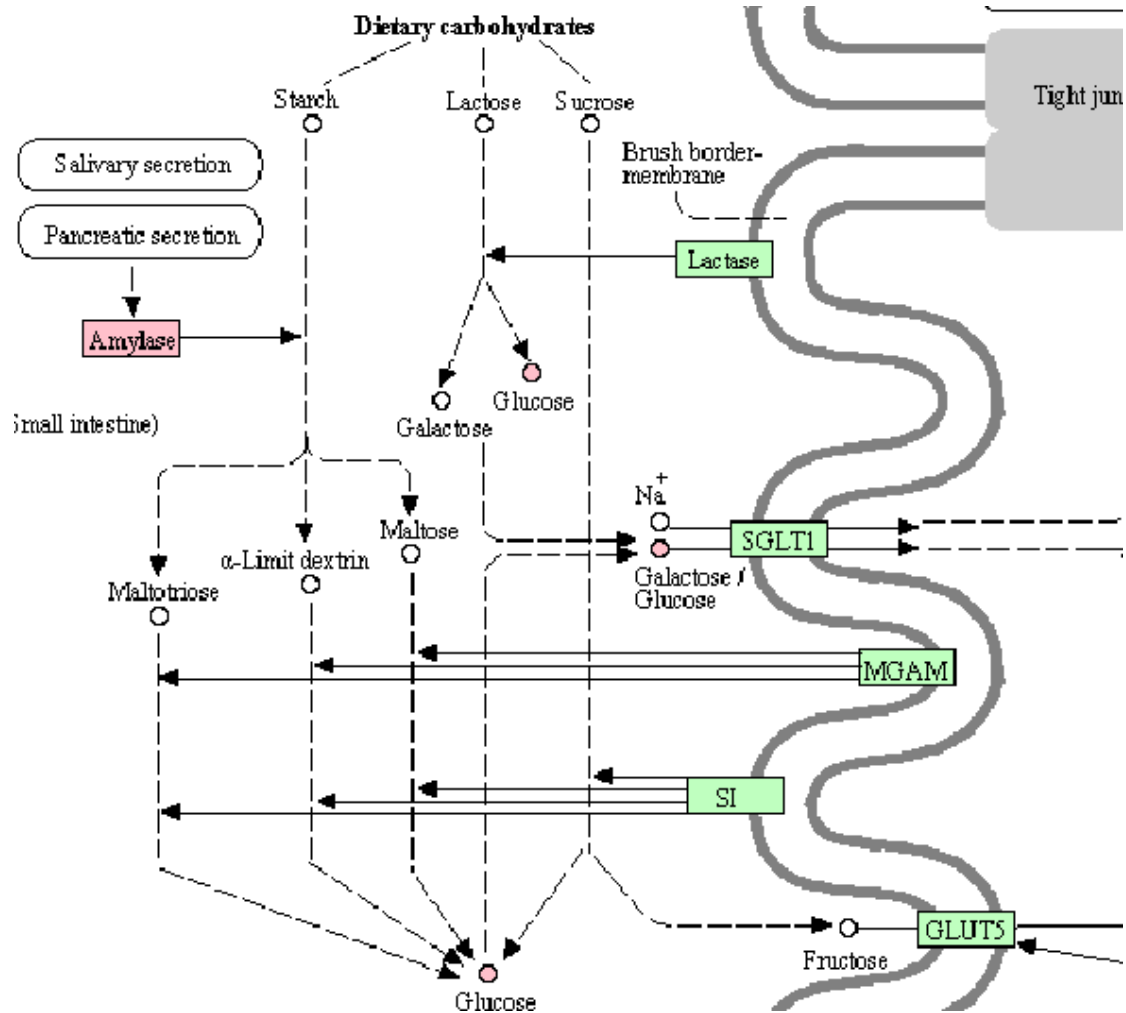
- 1. Άμεση συσχέτιση μορίων (Direct Interaction between molecules).** Σε αυτή την ομάδα περιλαμβάνονται μονοπάτια στα οποία βρέθηκε τουλάχιστον μια πρωτεΐνη με έναν μεταβολίτη να συσχετίζονται άμεσα μεταξύ τους. Ένα παράδειγμα παρατίθεται στην **Εικόνα 6.**, όπου η L-γαλακτική αφυδρογονάση (L-lactate dehydrogenase- LDH) καταλύει τη σύνθεση πυροσταφυλικού οξέος (pyruvic acid) από γαλακτικό οξύ (lactate). Η LDH παρουσιάζει άμεση σύνδεση-συσχέτιση με το γαλακτικό οξύ. Τόσο η πρωτεΐνη LDH όσο και ο μεταβολίτης γαλακτικό οξύ είναι μόρια από το σετ δεδομένων μας και όπως φαίνεται στην Εικόνα 3., είναι χρωματισμένα με ροζ χρώμα.



Εικόνα 6: Μερική απεικόνιση του μονοπατιού σηματοδότησης της γλυκαγόνης ‘Glucagon Signaling Pathway’ (Kegg mapper, partial image of Glucagon Signaling Pathway). Οι Μεταβολίτες (Metabolites) απεικονίζονται με κύκλο και οι Πρωτεΐνες (Proteins) με τετράγωνα. Τα μόρια που υπάρχουν στο σετ δεδομένων μας απεικονίζονται με ροζ χρώμα. Σημειώνεται ότι τα μόρια που απεικονίζονται με πράσινο δεν υπήρχαν στο σετ δεδομένων μας, αλλά χρωματίζονται από τη βάση δεδομένων Kegg.

- 2. Έμμεση συσχέτιση μορίων (Indirect interaction between molecules).** Τα μονοπάτια που έχουν καταταχθεί σε αυτή την ομάδα περιέχουν πρωτεΐνες και μεταβολίτες από το σετ δεδομένων μας, οι οποίες συνδέονται έμμεσα μεταξύ τους σε τουλάχιστον μια αντίδραση.

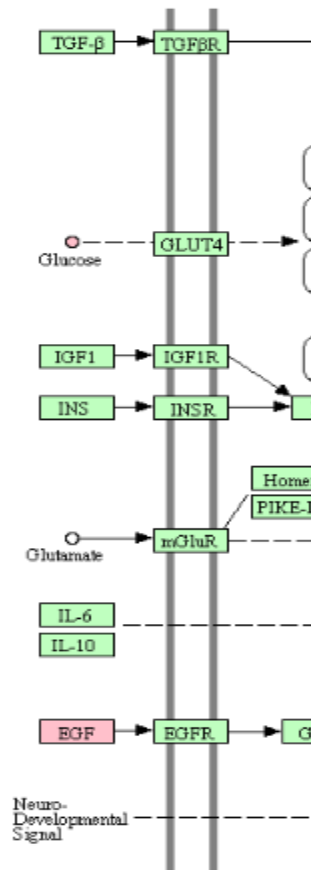
Έτσι παρουσιάζουν έμμεση λειτουργική συσχέτιση. Όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 7.**, η αμυλάση (amylase) παρουσιάζει έμμεση σύνδεση με την γλυκόζη (glucose) στο Μονοπάτι Πέψης και Απορρόφησης Υδατανθρακών (Carbohydrate Digestion and Absorption Pathway).



Εικόνα 7: Μερική απεικόνιση του Μονοπατιού Πέψης και Απορρόφησης Υδατανθρακών (Carbohydrate Digestion and Absorption Pathway) από το Kegg mapper. Οι μεταβολίτες απεικονίζονται με κύκλο και οι πρωτεΐνες με τετράγωνα. Τα μόρια του σετ δεδομένων μας απεικονίζονται με ροζ χρώμα. Σημειώνεται ότι τα μόρια που απεικονίζονται με πράσινο δεν υπήρχαν στο σετ δεδομένων μας, αλλά χρωματίζονται από τη βάση δεδομένων Kegg. Η αμυλάση (amylase) παρουσιάζει έμμεση σύνδεση με την γλυκόζη (glucose).

3. Μόρια που υπάρχουν στο ίδιο μονοπάτι, αλλά δεν εμφανίζουν καμία σύνδεση (Participating in the same process, yet not connected). Σε αυτή την ομάδα περιλαμβάνονται μονοπάτια που περιέχουν μόρια από το σετ δεδομένων μας, αλλά τα τελευταία δεν παρουσιάζουν καμία συσχέτιση. Ένα παράδειγμα απεικονίζεται στην **Εικόνα 8.** Στο Μονοπάτι Σηματοδότησης FOXO (FOXO Signaling Pathway) συμμετέχουν μόρια από το σετ δεδομένων μας, όπως είναι ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Pro-epidermal

growth factor - EGF) και η γλυκόζη. Παρόλα αυτά τα δυο μόρια δεν εμφανίζουν καμία μοριακή συσχέτιση μεταξύ τους στο συγκεκριμένο μονοπάτι.



Εικόνα 8: Μερική απεικόνιση του Μονοπατιού Σηματοδότησης FOXO (FOXO Signaling Pathway) από το Kegg mapper. Οι μεταβολίτες απεικονίζονται με κύκλο και οι πρωτεΐνες με τετράγωνα. Τα μόρια του σετ δεδομένων μας απεικονίζονται με ροζ χρώμα. Ο αυξητικός επιδερμικός παράγοντας EGF δεν παρουσιάζει σύνδεση με την γλυκόζη στο συγκεκριμένο μονοπάτι. Σημειώνεται ότι τα μόρια που απεικονίζονται με πράσινο δεν υπήρχαν στο σετ δεδομένων μας, αλλά χρωματίζονται από τη βάση δεδομένων Kegg.

3. Αποτελέσματα

3.1 Μονοπάτια που βρέθηκαν από την ανάλυση των δεδομένων

3.1.1 Αποτελέσματα από την χρήση Impala

Αναλύσαμε τα δεδομένα μας χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων Impala, με τον τρόπο που αναφέρθηκε παραπάνω. Βρέθηκαν 1355 μονοπάτια συνολικά. Από τα 1355, κρατήσαμε

322 τα οποία περιείχαν μεταβολίτες και πρωτεΐνες από τη λίστα των δεδομένων μας και ήταν στατιστικά σημαντικά ($pValue < 0,05$). Από τα 322 μονοπάτια αναφέρονται χαρακτηριστικά εκείνα με το μικρότερο $pValue$ που αποτελούν τα πιο σημαντικά. Τα μονοπάτια με το μικρότερο $pValue$ είναι τα ακόλουθα:

1. 'Μονοπάτι μεταφοράς γλυκόζης, χολικών αλάτων, σακχάρων, οργανικών οξέων, μεταλλικών ιόντων και αμινικών ενώσεων' ('Transport of glucose and other sugars_ bile salts and organic acids_ metal ions and amine compounds'),
2. 'Μονοπάτι πέψης και απορρόφησης των πρωτεϊνών' ('Protein digestion and absorption'),
3. 'Μονοπάτι εξωκυττάριας οργάνωσης' ('Extracellular matrix organization')
4. 'Μονοπάτι σύνθεσης και ανακύκλωσης γλουταθειόνης' ('Glutathione synthesis and recycling')

Όλα τα μονοπάτια είναι διαθέσιμα στον **Συμπληρωματικό Πίνακα 1**.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως στις μεθόδους, ταξινομήσαμε τα μονοπάτια σε ομάδες ανάλογα με το είδος των μορίων που περιείχαν. Τα 322 μονοπάτια χωρίστηκαν σε 31 ομάδες μονοπατιών (pathway groups) συνολικά. Η λίστα των ομάδων των μονοπατιών είναι διαθέσιμη στον **Συμπληρωματικό Πίνακα 1**.

Σημειώνεται επίσης ότι η βάση δεδομένων Impala δε δίνει τη δυνατότητα γραφικής απεικόνισης των μονοπατιών και έτσι παρατίθενται με τις ονομασίες τους στον **Συμπληρωματικό Πίνακα 1**.

3.1.2 Αποτελέσματα από τη χρήση Reactome και απεικόνιση των μονοπατιών με τη χρήση του προγράμματος PathVisio

Ύστερα από την ανάλυση των δεδομένων μας στο Reactome προέκυψαν 678 μονοπάτια. Αρχικά αποκλείσαμε τα μονοπάτια, τα οποία δεν ήταν στατιστικώς σημαντικά ($p > 0,05$) και κρατήσαμε εκείνα τα οποία ήταν στατιστικώς σημαντικά με $p\text{Value} < 0,05$. Τα μονοπάτια που κρατήσαμε ήταν 78 σε αριθμό. Από τα 78 μονοπάτια, αποκλείσαμε εκείνα τα οποία περιείχαν μόνο πρωτεΐνες ή μόνο μεταβολίτες από τη λίστα των δεδομένων μας και όχι και τα δύο μαζί. Καταλήξαμε σε 20 μονοπάτια, τα οποία ήταν στατιστικώς σημαντικά και περιείχαν ταυτόχρονα πρωτεΐνες και μεταβολίτες από τη λίστα των δεδομένων μας. Τέλος, όπως και στην ανάλυση με Impala, ταξινομήσαμε τα μονοπάτια σε ομάδες μονοπατιών (“Pathway groups”) ανάλογα με τα μόρια που περιείχαν. Μερικά μονοπάτια αποτελούνται από τα ίδια μόρια (ή περίπου τα ίδια μόρια) και γι αυτό αποφασίστηκε να εξεταστούν το καθένα ξεχωριστά ως προς τα μόρια που περιέχουν και να ταξινομηθούν σε ομάδες. Έτσι καταλήξαμε σε 12 ομάδες μονοπατιών (12 pathway groups). Οι ομάδες μονοπατιών καθώς και τα μονοπάτια που περιέχονται σε αυτά είναι διαθέσιμα στον **Συμπληρωματικό Πίνακα 1**.

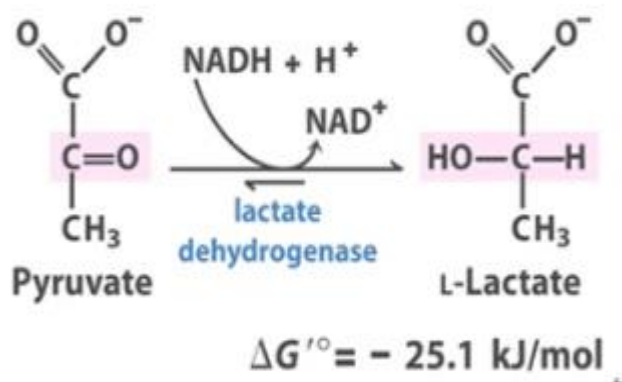
Η βάση δεδομένων Reactome, δίνει τη δυνατότητα γραφικής απεικόνισης των μονοπατιών και έτσι ήταν δυνατό να εξετάσουμε τα μονοπάτια και να βρούμε τα μόρια που συσχετίζονται άμεσα. Ελέγξαμε το κάθε μονοπάτι ξεχωριστά και εντοπίσαμε τα μόρια από τη λίστα των δεδομένων μας. Στη συνέχεια, εξετάσαμε τη σχέση των μεταβολιτών και των πρωτεϊνών σε κάθε μονοπάτι. Εντοπίσαμε τα μόρια που συνδέονται άμεσα σε μια βιοχημική αντίδραση και τα απεικονίσαμε εκ νέου, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PathVisio.

Τα 20 μονοπάτια εξετάστηκαν το κάθε ένα ξεχωριστά και βρέθηκαν 4 μονοπάτια τα οποία περιείχαν μεταβολίτες και πρωτεΐνες που συσχετίζονταν άμεσα μεταξύ τους. Τα μονοπάτια αυτά ήταν:

1. ‘Μεταβολισμός πυροσταφυλικού και Κύκλος του Κιτρικού οξέος’ (‘Pyruvate metabolism and Citric Acid Cycle’ - **Εικόνα 10**)
2. ‘Σύνθεση Γλουταθειόνης’ (‘Glutathione Conjugation’- **Εικόνα 11**),

3. 'Βιοσύνθεση κολλαγόνου και τροποποιητικά ένζυμα' ('Collagen biosynthesis and modifying enzymes' –**Εικόνα 12**) και
4. 'Καταβολισμός Χολίνης' ('Choline Catabolism' **Εικόνα 14**)

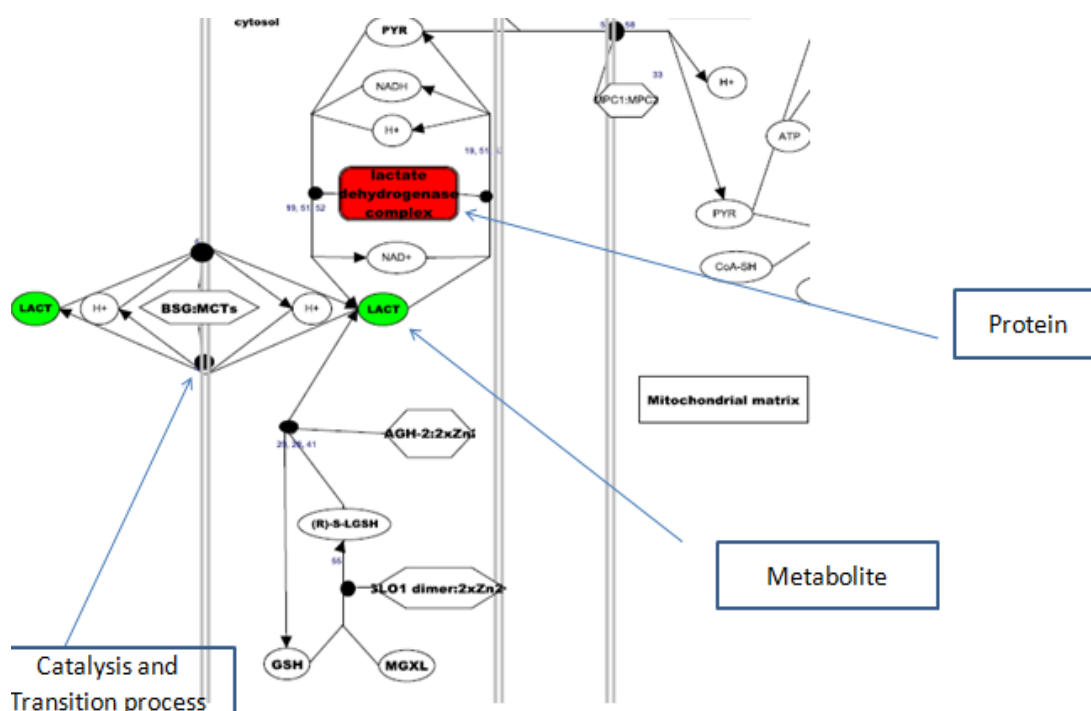
Το πρώτο μονοπάτι είναι, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το μονοπάτι Μεταβολισμού του πυροσταφυλικού οξέος και ο Κύκλος του Κιτρικού οξέος. Τα μόρια που ανιχνεύθηκαν στο συγκεκριμένο μονοπάτι και αλληλεπιδρούν άμεσα μεταξύ τους είναι το L-γαλακτικό και η L-γαλακτική αφυδρογονάση Β-αλυσίδας (LDHB). Η L-γαλακτική αφυδρογονάση Β-αλυσίδας (LDHB) είναι μέρος του τετραμερούς LDH. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 6., η αφυδρογονάση L-γαλακτικού (LDH) καταλύει την αλληλομετατροπή του πυροσταφυλικού και του γαλακτικού με ταυτόχρονη ενδομετατροπή των NADH και NAD⁺.



Εικόνα 9. Μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος (Pyruvate) σε L-γαλακτικό (L-lactate).
http://www.proteopedia.org/wiki/index.php/User:Kelly_Roark/Sandbox1

Προκειμένου να παρουσιάσουμε το πρότυπο διαφοροποίησης των μορίων που βρήκαμε, σχεδιάσαμε το μονοπάτι μεταβολισμού του πυροσταφυλικού οξέος και Κύκλου του Κιτρικού οξέος ('Pyruvate metabolism and Citric Acid Cycle'), χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PathVisio. (**Εικόνα 10**). Τα μόρια που βρέθηκαν υπο-εκφραζόμενα στους ασθενείς με επιδείνωση της Χρόνιας Νεφρικής Ανεπάρκειας σε σχέση με αυτούς που παρουσίασαν σταθερή κλινική εικόνα, απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα. Αυτά που

βρέθηκαν υπερ-εκφραζόμενα στους ασθενείς με επιδείνωση της Χρόνιας Νεφρικής Ανεπάρκειας σε σχέση με αυτούς που παρουσίασαν σταθερή κλινική εικόνα, απεικονίζονται με πράσινο χρώμα. Το L-γαλακτικό οξύ (L-lactic acid) βρέθηκε υπερ-εκφραζόμενο στους ασθενείς που παρουσίασαν επιδείνωση της νόσου και η LDHB βρέθηκε υπο-εκφραζόμενη.



Εικόνα 10. Απεικόνιση του μονοπατιού ‘Μεταβολισμός πυροσταφυλικού οξέος και Κύκλος του Κιτρικού οξέος’ (‘Pyruvate metabolism and Citric Acid Cycle’) με τη χρήση του προγράμματος PathVisio. Τα υπο-εκφραζόμενα μόρια που ανιχνεύθηκαν στο μονοπάτι και ανήκουν στο σετ δεδομένων μας, απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα. Τα υπερ-εκφραζόμενα μόρια που ανιχνεύθηκαν στο μονοπάτι και ανήκουν στο σετ δεδομένων μας, απεικονίζονται με πράσινο χρώμα. Με κυκλικό σχήμα απεικονίζονται οι μεταβολίτες και με ορθογώνιο, οι πρωτεΐνες. Οι μαύροι κύκλοι αντιπροσωπεύουν τη διαδικασία της κατάλυσης και τα βέλη, την κατεύθυνση της αντίδρασης. Σημειώνεται ότι οι πρωτεΐνες και οι μεταβολίτες που δεν απεικονίζονται με χρώμα δεν ανήκουν στο σετ των δεδομένων μας.

Στο μονοπάτι ‘Σύνθεση της Γλουταθειόνης’ (‘Glutathione conjugation’) βρέθηκε επίσης άμεση συσχέτιση μεταξύ μεταβολιτών και πρωτεϊνών. Τα μόρια τα οποία συμμετέχουν στο μονοπάτι και υπάρχουν στη λίστα των δεδομένων μας είναι τα ακόλουθα: γ-γλουταμυλτρανσφεράση (gamma-glutamyl transpeptidase 3, GGT3_HUMAN) και L-

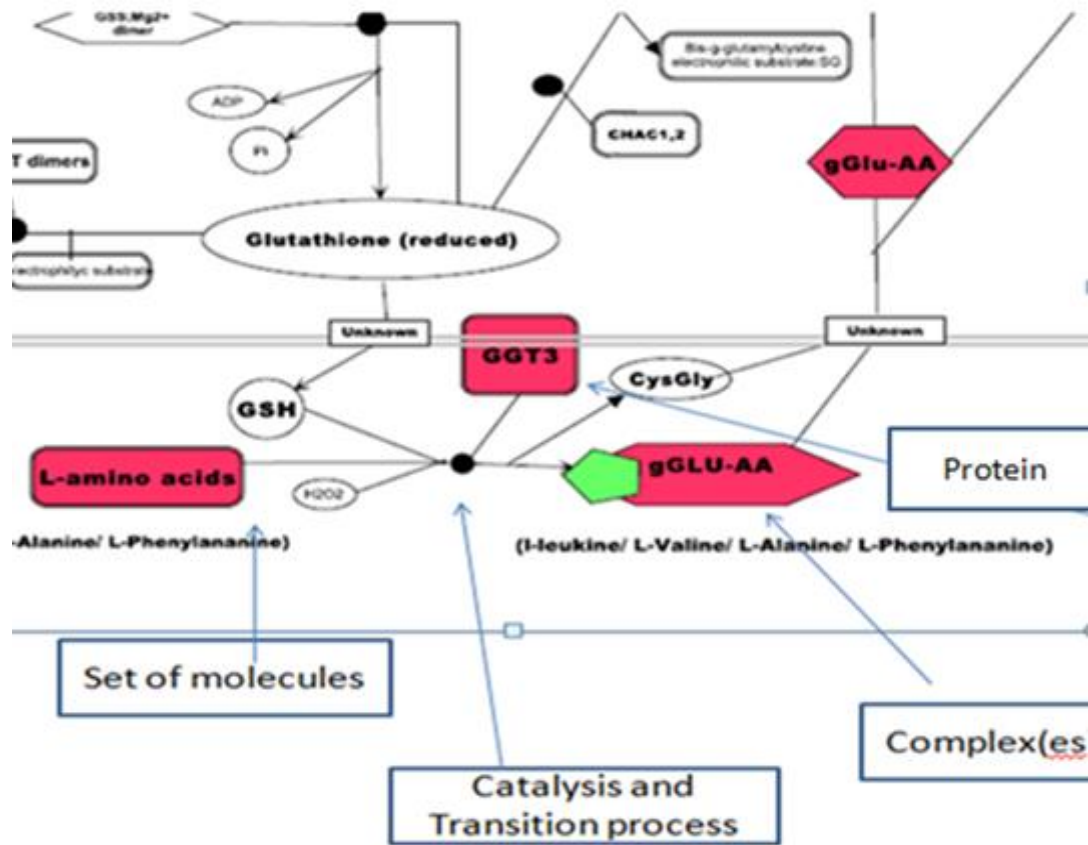
αμινοξέα λευκίνη, βαλίνη, φαινυλανανίνη, αλανίνη (L-amino acids L-Leucine, L-Valine, L-Phenylalanine, L-Alanine).

Η γ-γλουταμυλτρανσφεράση (GGT3_HUMAN) βρίσκεται σε πολλούς ιστούς του ανθρώπινου σώματος. Η γ-γλουταμυλτρανσφεράση-GGT3 ενεργοποιεί την εξωκυτταρική αποικοδόμηση της γλουταθειόνης-GSH και καταλύει τη μεταφορά της ομάδας γαταμυλ- της γλουταθειόνης σε ένα L-αμινοξύ και το σχηματισμό ενός διπεπτιδικού υποδοχέα. Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από τρία αμινοξέα, γλουταμινικό, κυστεΐνη και γλυκίνη. Οι αντιδράσεις που καταλύονται από την GGT3 είναι:

(5-L-glutamyl)-peptide + amino acid → peptide + 5-L-glutamyl amino acid and

Glutathione + Water → Cysteinyl glycine + L-Glutamic acid.

Προκειμένου να απεικονίσουμε την αλλαγή στην έκφραση των μορίων από τη λίστα των δεδομένων μας, σχεδιάσαμε το μονοπάτι της 'Σύνθεσης της Γλουταθειόνης' ('Glutathione Conjugation'), χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PathVisio (**Εικόνα 11**). Η GGT3 βρέθηκε υπο-εκφραζόμενη στους ασθενείς με επιδείνωση της Χρόνιας Νεφρικής Ανεπάρκειας. Η L-λευκίνη (CHEBI ID: 15603) βρέθηκε υπερ-εκφραζόμενη, ενώ τα υπόλοιπα αμινοξέα L-αλανίνη (16977), L-φαινυλανανίνη (17295) και L-βαλίνη (16414) βρέθηκαν υπο-εκφραζόμενα.



Εικόνα 11. Απεικόνιση του μονοπατιού Σύνθεσης της Γλουταθειόνης ('Glutathione Conjugation') με τη χρήση του προγράμματος PathVisio. Τα υπο-εκφραζόμενα μόρια που ανιχνεύθηκαν στο μονοπάτι και ανήκουν στο σετ δεδομένων μας, απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα. Τα υπερ-εκφραζόμενα μόρια που ανιχνεύθηκαν στο μονοπάτι και ανήκουν στο σετ δεδομένων μας, απεικονίζονται με πράσινο χρώμα. Με κυκλικό σχήμα απεικονίζονται οι μεταβολίτες και με ορθογώνιο, οι πρωτεΐνες. Με εξάγωνο απεικονίζονται τα σύμπλοκα μορίων μεταβολιτών (σημειώνεται ότι τα σύμπλοκα περιέχουν υπο-εκφραζόμενα καθώς και υπερ-εκφραζόμενα μόρια, για παράδειγμα η L-λευκίνη είναι υπερ-εκφραζόμενη ενώ τα υπόλοιπα αμινοξέα υπο-εκφραζόμενα) Οι μαύροι κύκλοι αντιπροσωπεύουν τη διαδικασία της κατάλυσης και τα βέλη, την κατεύθυνση της αντίδρασης. Σημειώνεται ότι οι πρωτεΐνες και οι μεταβολίτες που δεν απεικονίζονται με χρώμα δεν ανήκουν στο σετ των δεδομένων μας.

Το τρίτο μονοπάτι που βρέθηκε να περιέχει μόρια από τη λίστα των δεδομένων μας τα οποία παρουσιάζουν άμεση συσχέτιση μεταξύ τους είναι η 'Σύνθεση του κολλαγόνου και των τροποποιητικών ενζύμων' ('Collagen biosynthesis and modifying enzymes'). Τα μόρια από τη λίστα των δεδομένων μας τα οποία συμμετέχουν στο μονοπάτι είναι:

Collagen type XVII (COIA1_HUMAN),

Procollagen C-Endopeptidase Enhancer (PCOC1_HUMAN),

Collagen, Type XV (COFA1_HUMAN),

κατάλυσης και τα βέλη, την κατεύθυνση της αντίδρασης. Σημειώνεται ότι οι πρωτεΐνες και οι μεταβολίτες που δεν απεικονίζονται με χρώμα δεν ανήκουν στο σετ των δεδομένων μας.

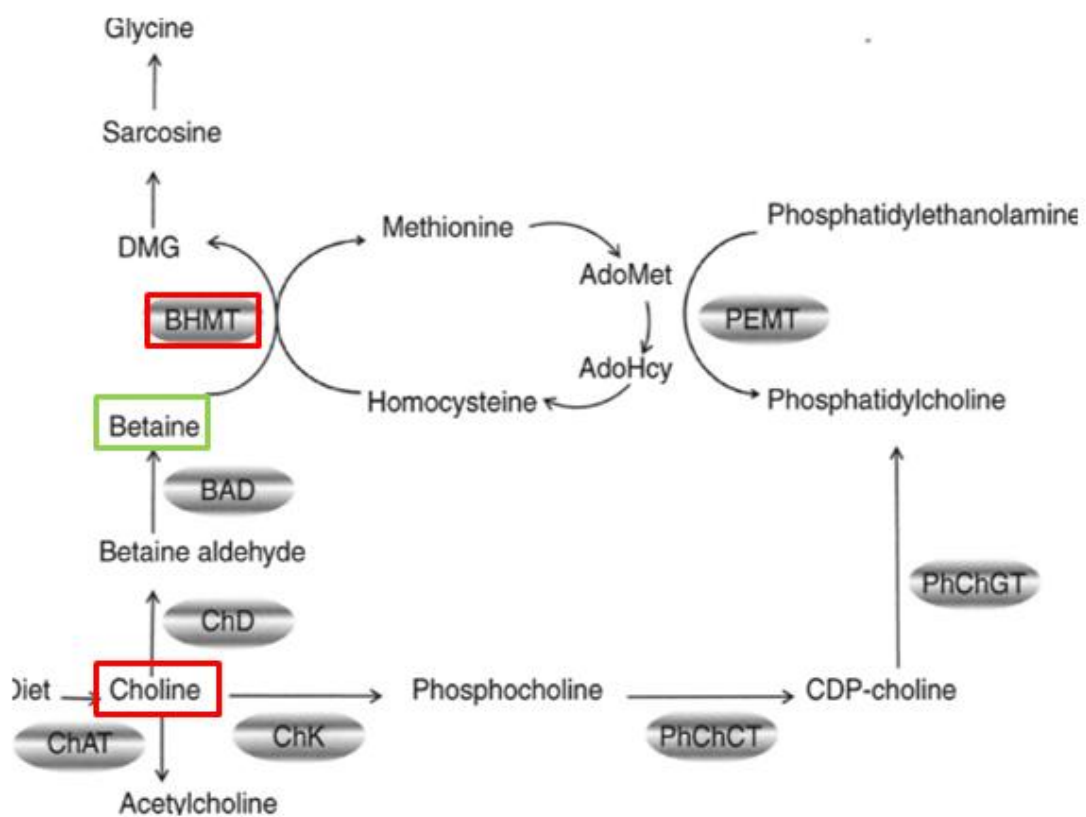
Στο μονοπάτι του Καταβολισμού της Χολίνης ('Choline Catabolism'), βρέθηκαν επίσης μόρια από τη λίστα των δεδομένων μας να αλληλεπιδρούν άμεσα μεταξύ τους. Τα μόρια τα οποία βρέθηκαν στο συγκεκριμένο μονοπάτι ήταν:

S-Μεθυλοτρανσφεράση της ομοκυστεΐνης της βεταΐνης Betaine-homocysteine (S-methyltransferase 1, BHMT),

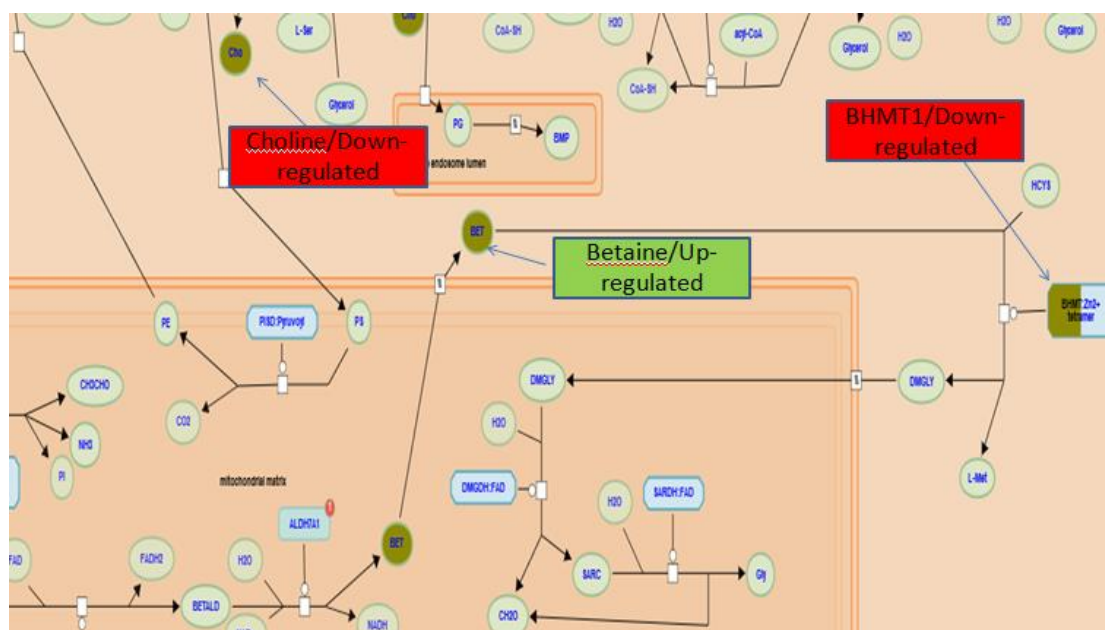
Χολίνη (choline, Cho) και

Βεταΐνη (betaine BET).

Η BET και η BHMT1 βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν άμεσα μεταξύ τους στο βιοχημικό μονοπάτι Καταβολισμού της Χολίνης. Η BHMT μετατρέπει την BET σε διμέθυλο-γλυκίνη (DMGLY) και L-μεθειονίνη (L-Methionine, L-Met) (**Εικόνα 13**). Η BHMT1 αφαιρεί μια μεθυλική ομάδα από την βεταΐνη και τη μεταφέρει στην ομοκυστεΐνη. Όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 14.**, η βεταΐνη είναι υπερ-εκφραζόμενη στους ασθενείς που παρουσίασαν επιδείνωση της Χρόνιας Νεφρικής Ανεπάρκειας, σε σχέση με αυτούς που είχαν σταθερή κλινική εικόνα. Σε αντίθεση, η χολίνη και η BHMT1 βρέθηκαν υπο-εκφραζόμενες στους ασθενείς που παρουσίασαν επιδείνωση της Χρόνιας Νεφρικής Ανεπάρκειας, σε σχέση με αυτούς που είχαν σταθερή κλινική εικόνα. Η χολίνη και η βεταΐνη παρουσιάζουν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης στους ασθενείς με επιδείνωση της νόσου.



Εικόνα 13. Μεταβολισμός της Χολίνης (Choline metabolism). Τα μόρια που ανήκουν στο σετ δεδομένων μας και βρέθηκαν υπο-εκφραζόμενα, παρουσιάζονται σε κόκκινο πλαίσιο. Τα μόρια που ανήκουν στο σετ δεδομένων μας και βρέθηκαν υπερ-εκφραζόμενα, παρουσιάζονται σε πράσινο πλαίσιο.
<http://www.nature.com/pr/journal/v73/n6/full/pr201354a.html>



Εικόνα 14. Παρουσίαση του μονοπατιού καταβολισμού της χολίνης ('Choline Catabolism') με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων, Reactome. Το πρότυπο έκφρασης των μορίων παρουσιάζεται στα τετράγωνα σχήματα. Τα μόρια που βρέθηκαν υπο-εκφραζόμενα παρουσιάζονται με κόκκινο χρώμα, ενώ αυτά που βρέθηκαν υπερ-εκφραζόμενα, παρουσιάζονται με πράσινο.

3.1.3 Αποτελέσματα από τη χρήση Kegg

Προκειμένου να κάνουμε την ανάλυση δεδομένων, χρησιμοποιώντας τη βάση Kegg, έπρεπε να βρούμε τους κωδικούς Kegg που αντιστοιχούσαν στις πρωτεΐνες και τους μεταβολίτες που θέλαμε να μελετήσουμε. Βρήκαμε 127 κωδικούς Kegg για τις πρωτεΐνες και 26 κωδικούς Kegg για τους μεταβολίτες, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 5**. Ύστερα από την ανάλυση που κάναμε, χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων Kegg, μπορέσαμε να απομονώσουμε συνολικά, 131 βιοχημικά μονοπάτια, στα οποία υπήρχαν τα μόρια από το σετ δεδομένων μας. Από τα 131 μονοπάτια, κρατήσαμε τα 23, τα οποία περιείχαν ταυτόχρονα μεταβολίτες και πρωτεΐνες από το σετ δεδομένων μας. Στη συνέχεια ταξινομήσαμε τα μονοπάτια σε τρεις ομάδες ανάλογα με τη συσχέτιση που παρουσίαζαν οι μεταβολίτες και οι πρωτεΐνες μας μέσα σε αυτά. Αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθήσαμε, παρατίθεται στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι. Τα μονοπάτια καθώς και οι ομάδες στις οποίες χωρίστηκαν τα μονοπάτια, είναι διαθέσιμα στον **Συμπληρωματικό Πίνακα 1**.

Στην πρώτη ομάδα περιλαμβάνονται τα μονοπάτια στα οποία βρέθηκαν μεταβολίτες και πρωτεΐνες από το σετ των δεδομένων μας να αλληλεπιδρούν άμεσα μεταξύ τους. Τα μονοπάτια αυτά είναι τα ακόλουθα:

‘Μεταβολισμός πυροσταφυλικού οξέος’ (‘Pyruvate metabolism’) (**Εικόνα 15**),

‘Γλυκόλυση-Γλυκνεογένεση’ (‘Glycolysis-Glyconeogenesis’) (**Εικόνα 16**),

‘Πέψη και Απορρόφηση Πρωτεϊνών’ (‘Protein Digestion and Absorption’),

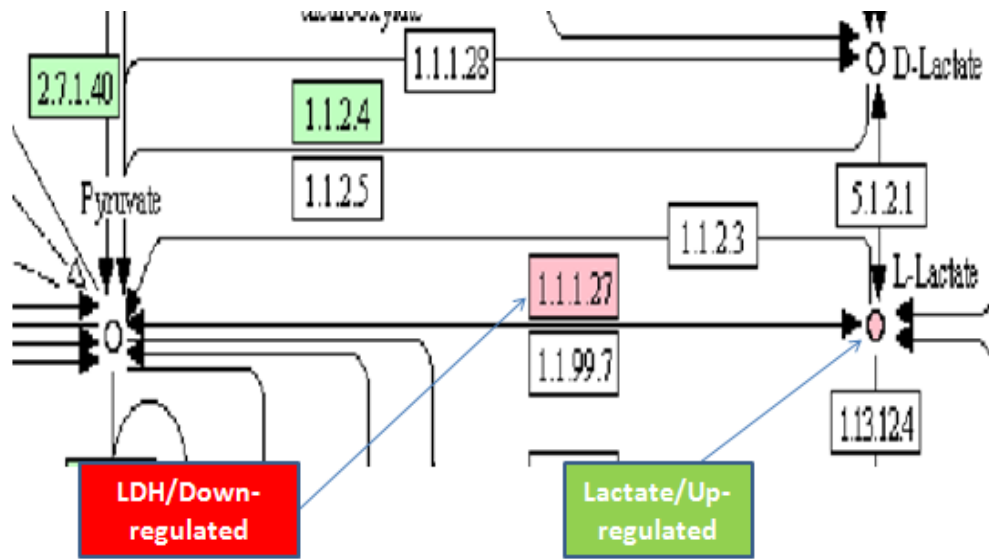
‘Σηματοδοτικό μονοπάτι Γλυκαγόνης’ (‘Glucagon Signaling Pathway’) (**Εικόνα 17**) και

‘Μεταβολισμός Γλυκίνης, Σερίνης, Θρεονίνης’ (‘Glycine, Serine and Threonine Metabolism’) (**Εικόνα 18**)

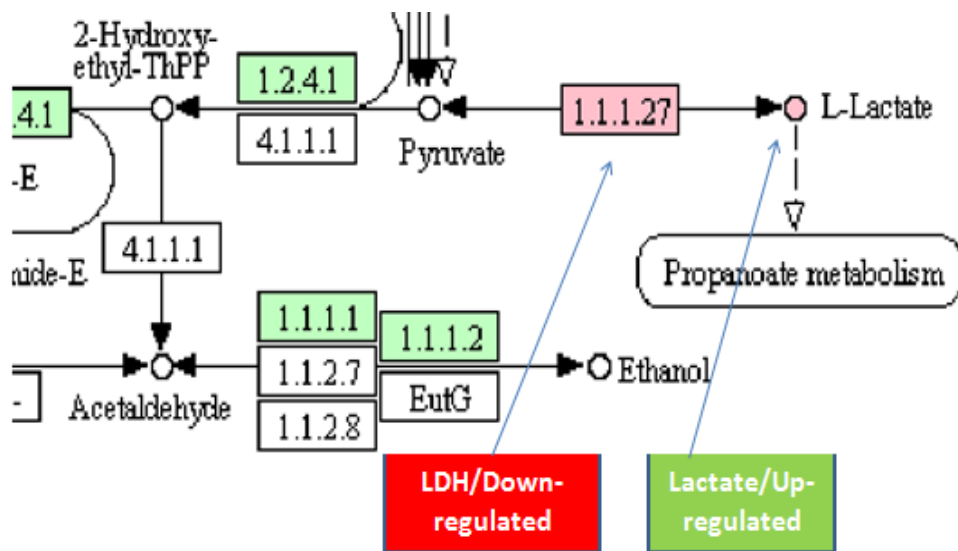
Οι εικόνες των μονοπατιών που εξάχθηκαν από τη βάση δεδομένων Kegg αναφέρονται ως ‘**Kegg mapper images**’ και περιλαμβάνονται στον **Συμπληρωματικό Πίνακα 2**.

Στα μονοπάτια, ‘Μεταβολισμός πυροσταφυλικού οξέος’ (**Εικόνα 15**), ‘Γλυκόλυση-Γλυκνεογένεση’(**Εικόνα 16**) και ‘Σηματοδοτικό μονοπάτι Γλυκαγόνης’(**Εικόνα 17**) βρήκαμε τον μεταβολίτη L-γαλακτικό (L-lactate (CHEBI ID= 422) να αλληλεπιδρά άμεσα με την πρωτεΐνη L-γαλακτική αφυδρογονάση (LDH, L-lactate dehydrogenase). Αυτά τα μόρια βρέθηκαν επίσης να σχετίζονται άμεσα σε βιοχημικές αντιδράσεις, στα μονοπάτια που προέκυψαν από την ανάλυση με τη χρήση του προγράμματος Reactome. Ο βιοχημικός τους ρόλος αναφέρεται παραπάνω.

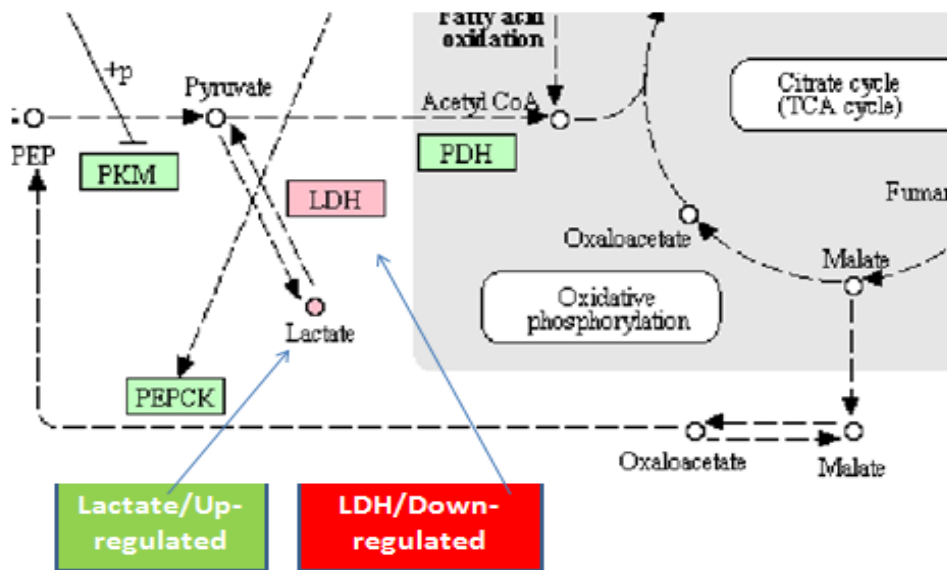
Όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 15**.,το L-γαλακτικό είναι υπερ-εκφραζόμενο στους ασθενείς που παρουσίασαν επιδείνωση της Χρόνιας Νεφρικής Ανεπάρκειας και η L-γαλακτική αφυδρογονάση, υπο-εκφραζόμενη. Το ίδιο πρότυπο έκφρασης για τα δύο μόρια, βρέθηκε ύστερα από την ανάλυση που κάναμε στο **Reactome (Εικόνα 7)**.



Εικόνα 15. Μερική απεικόνιση του μονοπατιού ‘Μεταβολισμός Πυροσταφυλικού οξέος’ (Kegg mapper partial image of Pyruvate metabolism pathway). Οι μεταβολίτες απεικονίζονται με κυκλικό σχήμα και οι πρωτεΐνες/ένζυμα με τετράγωνο σχήμα. Τα μόρια που απεικονίζονται με ροζ χρώμα είναι αυτά που υπάρχουν στο σετ δεδομένων μας. Σημειώνεται ότι, οι πρωτεΐνες (τετράγωνα) που απεικονίζονται με πράσινο χρώμα δεν υπάρχουν στο σετ δεδομένων μας, αλλά χρωματίζονται κατά αυτό τον τρόπο από το πρόγραμμα Kegg. Τα μόρια από το σετ των δεδομένων μας που αλληλεπιδρούν άμεσα μεταξύ τους, καθώς και το πρότυπο έκφρασής τους υποδεικνύονται στα μεγάλα τετράγωνα.



Εικόνα 16. Μερική απεικόνιση του μονοπατιού ‘Γλυκόλυση-Γλυκονογένεση’ (Kegg mapper partial image of Glycolysis-Glyconeogenesis pathway). Οι μεταβολίτες απεικονίζονται με κυκλικό σχήμα και οι πρωτεΐνες/ένζυμα με τετράγωνο σχήμα. Τα μόρια που απεικονίζονται με ροζ χρώμα είναι αυτά που υπάρχουν στο σετ δεδομένων μας. Σημειώνεται ότι, οι πρωτεΐνες (τετράγωνα) που απεικονίζονται με πράσινο χρώμα δεν υπάρχουν στο σετ δεδομένων μας, αλλά χρωματίζονται κατά αυτό τον τρόπο από το πρόγραμμα Kegg. Τα μόρια από το σετ των δεδομένων μας που αλληλεπιδρούν άμεσα μεταξύ τους, καθώς και το πρότυπο έκφρασής τους υποδεικνύονται στα μεγάλα τετράγωνα.



Εικόνα 17. Μερική απεικόνιση του μονοπατιού ‘Σηματοδοτικό μονοπάτι Γλυκαγόνης’ (Kegg mapper partial image of Glucagon Signaling pathway). Οι μεταβολίτες απεικονίζονται με κυκλικό σχήμα και οι πρωτεΐνες/ένζυμα με τετράγωνο σχήμα. Τα μόρια που απεικονίζονται με ροζ χρώμα είναι αυτά που υπάρχουν στο σετ δεδομένων μας. Σημειώνεται ότι, οι πρωτεΐνες (τετράγωνα) που απεικονίζονται με πράσινο χρώμα δεν υπάρχουν στο σετ δεδομένων μας, αλλά χρωματίζονται κατά αυτό τον τρόπο από το πρόγραμμα Kegg. Τα μόρια από το σετ των δεδομένων μας που αλληλεπιδρούν άμεσα μεταξύ τους, καθώς και το πρότυπο έκφρασής τους υποδεικνύονται στα μεγάλα τετράγωνα.

Ένα ακόμη μονοπάτι στο οποίο βρέθηκαν μόρια από τη λίστα δεδομένων μας, να αλληλεπιδρούν άμεσα μεταξύ τους ήταν το μονοπάτι ‘Μεταβολισμός Γλυκίνης, Σερίνης, Θρεονίνης’ (‘Glycine, Serine and Threonine Metabolism pathway’). Όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 18.**, η μεθυλοτρανσφεράση της ομοκυστεΐνης της βεταΐνης (Betaine-homocysteine S-methyltransferase 1, BHMT-2.1.1.5) συνδέεται βιοχημικά άμεσα με την βεταΐνη και έμμεσα με την χολίνη. Το ένζυμο BHMT καθώς και η χολίνη βρέθηκαν υπο-εκφραζόμενα στους ασθενείς που παρουσίασαν επιδείνωση της Χρόνιας Νεφρικής Ανεπάρκειας, ενώ η βεταΐνη βρέθηκε υπερ-εκφραζόμενη. Αυτά τα ευρήματα συμφωνούν με τα δεδομένα που προέκυψαν από την ανάλυση των δεδομένων μας στο πρόγραμμα Reactome. Η πρωτεΐνη BHMT μετατρέπει την βεταΐνη διμεθυλο-γυκίνη. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η BHMT υπο-εκφράζεται στους ασθενείς με Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια, επομένως η βεταΐνη συσσωρεύεται στα κύτταρα. Η βιοχημική σχέση BHMT με βεταΐνης επιβεβαιώθηκε με την ανάλυση που έγινε με το πρόγραμμα Reactome.

3.2 Σύγκριση των σηματοδοτικών μονοπατιών που βρέθηκαν από το Reactome και το Kegg

Σε αυτό το σημείο της ανάλυσης προσπαθήσαμε να συγκρίνουμε τα μονοπάτια που βρέθηκαν ύστερα από την ανάλυση των δεδομένων μας με τις βάσεις Reactome και Kegg και να ανιχνεύσουμε ομοιότητες μεταξύ τους. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι η βάση δεδομένων Impala περιλαμβάνει κυρίως τα βιοχημικά μονοπάτια από άλλες βάσεις δεδομένων, όπως η Kegg και Reactome. Γι αυτό το λόγο αποτελεί μια πιο γενική ανάλυση και δεν χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη φάση της ανάλυσης.

Η σύγκριση των μονοπατιών που βρέθηκαν από τις βάσεις Reactome και Kegg είναι σημαντική για δύο λόγους:

- i) Υπάρχουν πολλές ομοιότητες μεταξύ των διαφορετικών λογισμικών και ως εκ τούτου για να αφαιρέσουμε τις επικαλύψεις μεταξύ τους, έπρεπε να φιλτράρουμε τα αποτελέσματά μας.
- ii) Εάν ένα βιοχημικό μονοπάτι ανιχνευθεί πολλές φορές στα διάφορα λογισμικά που χρησιμοποιούμε για την ανάλυση των δεδομένων μας, πρέπει να το θεωρήσουμε σημαντικό ή/και πιθανό μονοπάτι που συμμετέχει στην επιδείνωση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας.

Τα μονοπάτια τα οποία βρέθηκαν και στα δύο λογισμικά ύστερα από την ανάλυση των δεδομένων μας ήταν τα παρακάτω:

1. ‘Μεταβολισμός του πυροσταφυλικού οξέος’
2. ‘Γλυκόλυση και Γλυκονεογέννεση’
3. ‘Μεταβολισμός της Χολίνης’

Σημειώνεται ότι οι δύο βάσεις δεδομένων χρησιμοποιούν διαφορετικά στατιστικά τεστ. Η βάση Reactome χρησιμοποιεί την Υπογεωμετρική δοκιμή, ενώ η βάση Kegg, χρησιμοποιεί χ^2 τεστ ή Fisher’s τεστ.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα εργασία είχε ως κύριο στόχο, την εφαρμογή κατάλληλης μεθοδολογίας μελέτης που να επιτρέπει τον συνδυασμό δεδομένων πρωτεομικής και μεταβολομικής, με σκοπό την εξαγωγή ολοκληρωμένων συμπερασμάτων για το σύστημα μελέτης μας. Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχουν διαθέσιμες μέθοδοι αναφοράς που να υποδεικνύουν έναν ενδεδειγμένο τρόπο μελέτης για τον συνδυασμό δεδομένων πρωτεομικής και μεταβολομικής. Γι αυτό, η ανάλυσή μας αποτέλεσε μια καινοτόμο προσέγγιση και όπως ήταν αναμενόμενο παρουσίασε αρκετές δυσκολίες. Απώτερος στόχος της έρευνας ήταν, η ερμηνεία των μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα στην επιδείνωση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας καθώς και η πρόβλεψη βιοδεικτών που θα συμβάλλουν στην αποτελεσματική πρόγνωση και αντιμετώπιση της νόσου. Η συνδυαστική ανάλυση δεδομένων πρωτεομικής και μεταβολομικής ενισχύει ακόμη περισσότερο την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων και μπορεί να κάνει μια ασφαλή πρόβλεψη για μελλοντικούς βιοδείκτες.

Στη πλειονότητα των δημοσιευμένων μελετών που σχετίζονται με τη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, εξετάζονται ασθενείς κάποιου συγκεκριμένου σταδίου και τις περισσότερες φορές συγκρίνονται είτε με υγιή άτομα είτε με ασθενείς που βρίσκονται σε κάποιο άλλο στάδιο της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας. Η έρευνα όμως σχετικά με την πρόγνωση της επιδείνωσης της νόσου, απαιτεί την ύπαρξη δεδομένων από ασθενείς που διαγνώστηκαν με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια από το πρώτο κιάλας στάδιο (baseline data) και για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα πολλών ετών. Με τον συχνό έλεγχο των ασθενών αυτών, είμαστε σε θέση να παρακολουθούμε τις αλλαγές που επισυμβαίνουν καθ' όλη τη διάρκεια της επιδείνωσης και να μπορούμε να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα για την αιτιολογία της επιδείνωσης. Είναι άλλωστε γνωστό στην επιστημονική κοινότητα ότι, η επιδείνωση της νόσου δεν εμφανίζει το ίδιο πρότυπο σε όλους τους ασθενείς που πάσχουν από χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. Σε μερικούς ασθενείς, η επιδείνωση σταματά στο στάδιο III ή και νωρίτερα, ενώ

σε άλλους προχωρά μέχρι και το στάδιο V, όπου εκεί χρειάζεται υποκατάσταση των οργάνων προκειμένου να μη καταλήξει ο ασθενής. Η εύρεση, λοιπόν, των κατάλληλων βιοδεικτών που θα μπορούν να κατηγοριοποιούν τους ασθενείς σύμφωνα με τον κίνδυνο επιδείνωσης αποτελεί μια πραγματική πρόκληση για την επιστημονική κοινότητα!

Η παρούσα εργασία στόχο είχε να συμβάλει προς την εκπλήρωση του παραπάνω σκοπού. Η αποσαφήνιση των βιοχημικών μονοπατιών που συμμετέχουν στην επιδείνωση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας και περιλαμβάνουν διαφορετικά εκφραζόμενους μεταβολίτες και πρωτεΐνες στους ασθενείς με επιδείνωση πιστεύεται ότι θα βοηθήσει σημαντικά στην πρόβλεψη πιθανών βιοδεικτών. Η ανάλυση μας βασίστηκε, λοιπόν, σε δεδομένα πρωτεομικής και μεταβολομικής από ασθενείς που παρουσίασαν επιδείνωση της νόσου σε πιο σοβαρό στάδιο από τη στιγμή που διαγνώστηκαν και μέχρι να λήξει η περίοδος λήψης δειγμάτων και ασθενών όπου η κατάσταση τους δε παρουσίασε σημαντική επιδείνωση στο ίδιο χρονικό διάστημα.

Πρώτο βήμα στη μελέτη αυτή, ήταν η επεξεργασία των δεδομένων μας, πριν την ανάλυση, με κατάλληλα στατιστικά τεστ (Student's t-test) και ο αποκλεισμός των πρωτεϊνών και των μεταβολιτών που είχαν $pValue > 0,05$, δηλαδή δεν ήταν στατιστικώς σημαντικά. Δεύτερο βήμα ήταν, η επεξεργασία των πρωτεϊνών και των μεταβολιτών που τελικά κρατήσαμε και είχαν $pValue < 0,05$ (ήταν δηλαδή στατιστικώς σημαντικά). Γι αυτό το σκοπό έγινε ταξινόμηση του μεγάλου όγκου δεδομένων, από τα περισσότερο σημαντικά μόρια (μικρότερο $pValue$) προς τα λιγότερο σημαντικά. Επόμενο βήμα ήταν η εύρεση των πρωτεϊνών και των μεταβολιτών με διαφορική έκφραση στους ασθενείς με επιδείνωση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας σε σχέση με τους ασθενείς χωρίς επιδείνωση. Η εύρεση του προτύπου έκφρασης των μορίων έγινε μέσα από τον υπολογισμό του λογαρίθμου της σχετικής έκφρασης (\log_2 Fold Change, $Fold\ Change = \frac{final\ value - initial\ value}{initial\ value}$). Τα μόρια με αρνητικό λογάριθμο θεωρήθηκαν υπο-εκφραζόμενα στους ασθενείς με επιδείνωση σε σχέση με τους ασθενείς χωρίς επιδείνωση, ενώ τα μόρια με θετικό λογάριθμο, θεωρήθηκαν υπερ-εκφραζόμενα. Τελευταίο βήμα στην επεξεργασία των δεδομένων μας,

πριν την ανάλυση, ήταν η ανάκτηση των κατάλληλων κωδικών των πρωτεϊνών και των μεταβολιτών, χρησιμοποιώντας τις βάσεις δεδομένων UniProt και Human Metabolite Data Base (HMDB) για τις πρωτεΐνες και τους μεταβολίτες αντίστοιχα.

Για την εύρεση των βιοχημικών μονοπατιών που συμμετέχουν στην επιδείνωση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας χρησιμοποιήσαμε τις διαθέσιμες βάσεις δεδομένων: Impala, Reactome και Kegg. Εισάγοντας τους κατάλληλους κωδικούς πρωτεϊνών και μεταβολιτών στις συγκεκριμένες βάσεις, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, προσπαθήσαμε να κάνουμε συνδυαστική ανάλυση των δεδομένων μας και να καταλήξουμε στα μονοπάτια εκείνα που παρουσιάζουν σημαντική συμμετοχή στην επιδείνωση της νόσου.

Ύστερα από την ανάλυση των δεδομένων μας, χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων Reactome, καταλήξαμε σε τέσσερα σημαντικά μονοπάτια, το πρώτο από τα οποία ήταν το μονοπάτι ‘Μεταβολισμού του πυροσταφυλικού οξέος στον κύκλο του κιτρικού οξέος’. Το L-γαλακτικό οξύ (L-lactic acid) είναι ένας μεταβολίτης που αλληλεπιδρά άμεσα με την L-γαλακτική αφυδρογονάση (LDHB) στο μονοπάτι. Το L-γαλακτικό οξύ (L-lactic acid) βρέθηκε υπερ-εκφραζόμενο στους ασθενείς που παρουσίασαν επιδείνωση της νόσου και η LDHB βρέθηκε υπο-εκφραζόμενη. Το γαλακτικό, όπως είναι γνωστό, παράγεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στους ανθρώπινους μύες [60]. Όπως γνωρίζουμε από την βιβλιογραφία, η πρόσληψη μετοφορμίνης από ασθενείς με Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια μπορεί να προκαλέσει γαλακτική οξέωση [61]. Η συσσώρευση γαλακτικού οξέος είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα στα διάφορα στάδια της Χρόνιας Νεφρικής Ανεπάρκειας. Η συσσώρευση γαλακτικού οξέος συνδυάζεται με χαμηλά επίπεδα γλυκόζης στον ορό του αίματος, κάτι που οδηγεί σε αύξηση του αναερόβιου μεταβολισμού στους ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια [62]. Τα αποτελέσματά μας σε συνδυασμό με τις βιβλιογραφικές αναφορές μαρτυρούν άμεση συσχέτιση της επιδείνωσης της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας με το μονοπάτι μεταβολισμού του πυροσταφυλικού οξέος.

Ένα ακόμη μονοπάτι που βρέθηκε από την ανάλυση των δεδομένων μας με τη βάση Reactome, ήταν το μονοπάτι ‘Σύνθεσης του κολλαγόνου και των τροποποιητικών ενζύμων’. Τα

μόρια από τη λίστα των δεδομένων μας τα οποία συμμετέχουν στο μονοπάτι αναφέρονται αναλυτικά στην ενότητα των αποτελεσμάτων. Τα μόρια που συμμετείχαν στο μονοπάτι ήταν τόσο πρωτεΐνες όσο και μεταβολίτες από τη λίστα των δεδομένων μας, τα οποία είχαν βρεθεί υπο-εκφραζόμενα στους ασθενείς με επιδείνωση. Χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων peptickd database, και ανατρέχοντας στις αντίστοιχες δημοσιευμένες μελέτες [63], [64] βρήκαμε ότι η πιο σημαντική μοριακή αλλαγή που επισυμβαίνει στην χρόνια νεφρική ανεπάρκεια είναι η μείωση των επιπέδων των μορίων κολλαγόνου τύπου XV και VI, κάτι που συμφωνεί με τα δικά μας ευρήματα. Αυτή η μείωση, υποδεικνύει ότι ο εξωκυτταρικός σκελετός επηρεάζεται κατά την επιδείνωση της νόσου.

Στο μονοπάτι του Καταβολισμού της Χολίνης, βρέθηκαν επίσης μόρια από τη λίστα των δεδομένων μας να αλληλεπιδρούν άμεσα μεταξύ τους. Τα μόρια τα οποία βρέθηκαν στο συγκεκριμένο μονοπάτι αναφέρονται αναλυτικά στην ενότητα αποτελέσματα. Η βεταΐνη (BET) και η S-Μεθυλοτρανσφεράση της ομοκυστεΐνης της βεταΐνης (BHMT) βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν άμεσα μεταξύ τους στο βιοχημικό μονοπάτι Καταβολισμού της Χολίνης. Η BHMT1 αφαιρεί μια μεθυλική ομάδα από την βεταΐνη και τη μεταφέρει στην ομοκυστεΐνη. Η βεταΐνη είναι υπερ-εκφραζόμενη στους ασθενείς με επιδείνωση. Σε αντίθεση, η χολίνη και η BHMT1 βρέθηκαν υπο-εκφραζόμενες στους ασθενείς με επιδείνωση. Η χολίνη και η βεταΐνη παρουσιάζουν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης στους ασθενείς με επιδείνωση της νόσου. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη διαφορετική ωσμωρύθμιση που επισυμβαίνει στα κύτταρα των ασθενών με επιδείνωση [62].

Η βεταΐνη δρα συνεργιστικά με τη χολίνη, το φολικό οξύ, τη βιταμίνη B12 και το αμινοξύ, μεθειονίνη. Η βεταΐνη είναι ένα απαραίτητο βιοχημικό συστατικό που συμβάλλει στη σωστή λειτουργία των κυττάρων του ανθρώπινου οργανισμού. Η βεταΐνη επίσης υποβοηθά την παραγωγή καρνιτίνης και βοηθά στη σωστή λειτουργία και προστασία των νεφρών. Η ανεπάρκεια της χολίνης βρέθηκε σε ασθενείς που παρουσιάζουν σημαντική επιδείνωση της νόσου σε σχέση με τους υπόλοιπους ασθενείς. Η βιβλιογραφική έρευνα που

ακολούθησε υποδεικνύει ότι η ανεπάρκεια σε χολίνη οδηγεί στη συσσώρευση λιπαρών οξέων στο ήπαρ καθώς και σε αιμορραγική νέκρωση των νεφρών [65].

Ύστερα από την ανάλυση των δεδομένων μας, χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων Kegg, καταλήξαμε σε ορισμένα μονοπάτια τα οποία κρίθηκαν σημαντικά βάσει των κριτηρίων που αναφέρονται στην ενότητα των αποτελεσμάτων. Τα στατιστικώς σημαντικά μονοπάτια που βρέθηκαν ήταν αυτά του ‘Μεταβολισμού του πυροσταφυλικού οξέος’, της ‘Γλυκόλυσης-Γλυκνεογέννεσης’, της ‘Πέψης και Απορρόφησης Πρωτεϊνών’, του ‘Σηματοδοτικού μονοπατιού της Γλυκαγόνης’ και του ‘Μεταβολισμού της Γλυκίνης, Σερίνης, Θρεονίνης’. Στα μονοπάτια, ‘Μεταβολισμός πυροσταφυλικού οξέος’, ‘Γλυκόλυση-Γλυκνεογέννεση’ και ‘Σηματοδοτικό μονοπάτι Γλυκαγόνης’ βρήκαμε τον μεταβολίτη L-γαλακτικό να αλληλεπιδρά άμεσα με την πρωτεΐνη L-γαλακτική αφυδρογονάση. Αυτά τα μόρια βρέθηκαν επίσης να σχετίζονται άμεσα σε βιοχημικές αντιδράσεις, στα μονοπάτια που προέκυψαν από την ανάλυση με τη χρήση του προγράμματος Reactome. Τα κοινά μονοπάτια που βρέθηκαν ύστερα από την ανάλυση των δεδομένων στις βάσεις Kegg και Reactome θεωρούνται τα πιο σημαντικά αποτελέσματα της ανάλυσης! Το L-γαλακτικό βρέθηκε υπερ-εκφραζόμενο στους ασθενείς που παρουσίασαν επιδείνωση της νόσου και η L-γαλακτική αφυδρογονάση, υπο-εκφραζόμενη. Το ίδιο πρότυπο έκφρασης για τα δύο μόρια, βρέθηκε ύστερα από την ανάλυση που κάναμε στο Reactome.

Ένα ακόμη μονοπάτι στο οποίο βρέθηκαν μόρια από τη λίστα δεδομένων μας, να αλληλεπιδρούν άμεσα μεταξύ τους ήταν το μονοπάτι ‘Μεταβολισμού Γλυκίνης, Σερίνης, Θρεονίνης’. Η μεθυλοτρανσφεράση της ομοκυστεΐνης της βεταΐνης (Betaine-homocysteine S-methyltransferase 1, BHMT-2.1.1.5) συνδέεται βιοχημικά άμεσα με την βεταΐνη και έμμεσα με την χολίνη. Το ένζυμο BHMT καθώς και η χολίνη βρέθηκαν υπο-εκφραζόμενα στους ασθενείς που παρουσίασαν επιδείνωση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας, ενώ η βεταΐνη βρέθηκε υπερ-εκφραζόμενη. Αυτά τα ευρήματα συμφωνούν με τα δεδομένα που προέκυψαν από την ανάλυση των δεδομένων μας στο πρόγραμμα Reactome. Η πρωτεΐνη BHMT μετατρέπει την βεταΐνη σε διμέθυλο-γυκίνη. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η

BHMT υπο-εκφράζεται στους ασθενείς με Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια, επομένως η βεταΐνη συσσωρεύεται στα κύτταρα. Η βιοχημική σχέση BHMT και βεταΐνης επιβεβαιώθηκε με την ανάλυση που έγινε με το πρόγραμμα Reactome. Μια πιθανή εξήγηση, που μένει να επιβεβαιωθεί πειραματικά, είναι ότι η συσσώρευση βεταΐνης ίσως επηρεάζει τα επίπεδα της χολίνης, δρώντας ως βρόγχος ανατροφοδότησης.

Συμπερασματικά λοιπόν, η παρούσα εργασία παρουσιάζει μια νέα μεθοδολογία για τη πρόβλεψη βιοχημικών διαδικασιών που συμβαίνουν στους νεφρούς ατόμων που παρουσιάζουν σοβαρή επιδείνωση της νόσου. Η ανάλυσή μας, επέτρεψε σημαντική ελάττωση του αριθμού των πρωτεϊνών και των μεταβολιτών καθώς και των βιοχημικών μονοπατιών, επιτρέποντας την εστίαση σε περισσότερο σημαντικά μόρια και μονοπάτια. Η εκτίμησή μας είναι πως τα κοινά μονοπάτια που βρέθηκαν ύστερα από την ανάλυση των δεδομένων στις βάσεις Reactome και Kegg, δηλαδή τα μονοπάτια **Μεταβολισμού του πυροσταφυλικού οξέος, Γλυκόλυσης και Γλυκονεογέννεσης και Μεταβολισμού της Χολίνης**, κατέχουν σημαντικό ρόλο στην επιδείνωση της νόσου και μπορούν να αποτελέσουν μελλοντικούς στόχους πειραμάτων. Εκτιμούμε επίσης, ότι τα μόρια που εμπλέκονται στις διαδικασίες αυτές μπορούν να οδηγήσουν σε περαιτέρω προσεγγίσεις για την εύρεση προγνωστικών βιοδεικτών για την επιδείνωση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας και για την ανίχνευση νέων μοριακών στόχων για θεραπευτικές παρεμβάσεις κατά την αντιμετώπιση της νόσου.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

1. Bouatra, S., et al., *The human urine metabolome*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e73076.
2. Ko, G.J., et al., *Dietary protein intake and chronic kidney disease*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2016.
3. Sun, W., et al., *Human urine proteome analysis by three separation approaches*. Proteomics, 2005. **5**(18): p. 4994-5001.
4. Bellomo, R., J.A. Kellum, and C. Ronco, *Acute kidney injury*. Lancet, 2012. **380**(9843): p. 756-66.
5. Jha, V., et al., *Chronic kidney disease: global dimension and perspectives*. Lancet, 2013. **382**(9888): p. 260-72.
6. Abajo, M., et al., *Mineral metabolism factors predict accelerated progression of common carotid intima-media thickness in chronic kidney disease: the NEFRONA study*. Nephrol Dial Transplant, 2016.
7. Levey, A.S. and J. Coresh, *Chronic kidney disease*. Lancet, 2012. **379**(9811): p. 165-80.
8. Brosnahan, G. and M. Fraer, *Chronic kidney disease: whom to screen and how to treat, part 1: definition, epidemiology, and laboratory testing*. South Med J, 2010. **103**(2): p. 140-6.
9. James, M.T., B.R. Hemmelgarn, and M. Tonelli, *Early recognition and prevention of chronic kidney disease*. Lancet, 2010. **375**(9722): p. 1296-309.
10. Levey, A.S., et al., *Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)*. Kidney Int, 2005. **67**(6): p. 2089-100.
11. Barsoum, R.S., *Chronic kidney disease in the developing world*. N Engl J Med, 2006. **354**(10): p. 997-9.
12. Lin, J.L., et al., *Environmental lead exposure and progression of chronic renal diseases in patients without diabetes*. N Engl J Med, 2003. **348**(4): p. 277-86.
13. National Kidney, F., *K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification*. Am J Kidney Dis, 2002. **39**(2 Suppl 1): p. S1-266.
14. Almutary, H., A. Bonner, and C. Douglas, *Symptom burden in chronic kidney disease: a review of recent literature*. J Ren Care, 2013. **39**(3): p. 140-50.
15. Levin, A., *Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic kidney disease prior to dialysis*. Semin Dial, 2003. **16**(2): p. 101-5.

16. Menon, V., A. Gul, and M.J. Sarnak, *Cardiovascular risk factors in chronic kidney disease*. *Kidney Int*, 2005. **68**(4): p. 1413-8.
17. Hailpern, S.M., et al., *Moderate chronic kidney disease and cognitive function in adults 20 to 59 years of age: Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III)*. *J Am Soc Nephrol*, 2007. **18**(7): p. 2205-13.
18. Wilhelm-Leen, E.R., et al., *Frailty and chronic kidney disease: the Third National Health and Nutrition Evaluation Survey*. *Am J Med*, 2009. **122**(7): p. 664-71 e2.
19. James, M.T., et al., *Risk of bloodstream infection in patients with chronic kidney disease not treated with dialysis*. *Arch Intern Med*, 2008. **168**(21): p. 2333-9.
20. Hsu, C.Y., et al., *The risk of acute renal failure in patients with chronic kidney disease*. *Kidney Int*, 2008. **74**(1): p. 101-7.
21. Levey, A.S., et al., *National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification*. *Ann Intern Med*, 2003. **139**(2): p. 137-47.
22. Hallan, S.I., et al., *Combining GFR and albuminuria to classify CKD improves prediction of ESRD*. *J Am Soc Nephrol*, 2009. **20**(5): p. 1069-77.
23. Gansevoort, R.T., et al., *Lower estimated GFR and higher albuminuria are associated with adverse kidney outcomes. A collaborative meta-analysis of general and high-risk population cohorts*. *Kidney Int*, 2011. **80**(1): p. 93-104.
24. Khan, Z. and M. Pandey, *Role of kidney biomarkers of chronic kidney disease: An update*. *Saudi J Biol Sci*, 2014. **21**(4): p. 294-9.
25. Levey, A.S., et al., *A new equation to estimate glomerular filtration rate*. *Ann Intern Med*, 2009. **150**(9): p. 604-12.
26. Stevens, L.A., et al., *Comparative performance of the CKD Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) and the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study equations for estimating GFR levels above 60 mL/min/1.73 m²*. *Am J Kidney Dis*, 2010. **56**(3): p. 486-95.
27. Inker, L.A., et al., *Estimating glomerular filtration rate from serum creatinine and cystatin C*. *N Engl J Med*, 2012. **367**(1): p. 20-9.
28. Jungbauer, C.G., et al., *N-acetyl-ss-D-glucosaminidase and kidney injury molecule-1: New predictors for long-term progression of chronic kidney disease in patients with heart failure*. *Nephrology (Carlton)*, 2016. **21**(6): p. 490-8.
29. Fassett, R.G., et al., *Biomarkers in chronic kidney disease: a review*. *Kidney Int*, 2011. **80**(8): p. 806-21.
30. Ovrehus, M.A., et al., *Urinary proteomics in chronic kidney disease: diagnosis and risk of progression beyond albuminuria*. *Clin Proteomics*, 2015. **12**(1): p. 21.

31. Juncos, L.I. and J. Caputo, *Combination therapy in chronic kidney disease? Ther Adv Cardiovasc Dis*, 2015. **9**(4): p. 147-52.
32. Fink, H.A., et al., *Screening for, monitoring, and treatment of chronic kidney disease stages 1 to 3: a systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force and for an American College of Physicians Clinical Practice Guideline*. *Ann Intern Med*, 2012. **156**(8): p. 570-81.
33. Tseng, C.L., et al., *Survival benefit of nephrologic care in patients with diabetes mellitus and chronic kidney disease*. *Arch Intern Med*, 2008. **168**(1): p. 55-62.
34. de Brito-Ashurst, I., et al., *Bicarbonate supplementation slows progression of CKD and improves nutritional status*. *J Am Soc Nephrol*, 2009. **20**(9): p. 2075-84.
35. Shankar, A., R. Klein, and B.E. Klein, *The association among smoking, heavy drinking, and chronic kidney disease*. *Am J Epidemiol*, 2006. **164**(3): p. 263-71.
36. Stengel, B., et al., *Lifestyle factors, obesity and the risk of chronic kidney disease*. *Epidemiology*, 2003. **14**(4): p. 479-87.
37. Wang, Y., et al., *Association between obesity and kidney disease: a systematic review and meta-analysis*. *Kidney Int*, 2008. **73**(1): p. 19-33.
38. Fouque, D. and M. Laville, *Low protein diets for chronic kidney disease in non diabetic adults*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2009(3): p. CD001892.
39. Jafar, T.H., et al., *Angiotensin-converting enzyme inhibitors and progression of nondiabetic renal disease. A meta-analysis of patient-level data*. *Ann Intern Med*, 2001. **135**(2): p. 73-87.
40. Agodoa, L.Y., et al., *Effect of ramipril vs amlodipine on renal outcomes in hypertensive nephrosclerosis: a randomized controlled trial*. *JAMA*, 2001. **285**(21): p. 2719-28.
41. Hou, F.F., et al., *Efficacy and safety of benazepril for advanced chronic renal insufficiency*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(2): p. 131-40.
42. Dominiak, M., [Commentary to the article: ONTARGET Investigators, Yusuf S, Teo KK, Pogue J et al. Telmisartan, ramipril, or both in patients at high risk for vascular events. *N Engl J Med* 2008; 358: 1547-59]. *Kardiol Pol*, 2008. **66**(6): p. 705-6; discussion 707.
43. Mann, J.F., et al., *Effect of telmisartan on renal outcomes: a randomized trial*. *Ann Intern Med*, 2009. **151**(1): p. 1-10, W1-2.
44. Kunz, R., et al., *Meta-analysis: effect of monotherapy and combination therapy with inhibitors of the renin angiotensin system on proteinuria in renal disease*. *Ann Intern Med*, 2008. **148**(1): p. 30-48.
45. Maki, D.D., et al., *Long-term effects of antihypertensive agents on proteinuria and renal function*. *Arch Intern Med*, 1995. **155**(10): p. 1073-80.

46. Pejcic, M., S. Stojnev, and V. Stefanovic, *Urinary proteomics--a tool for biomarker discovery*. Ren Fail, 2010. **32**(2): p. 259-68.
47. Glorieux, G., et al., *New insights in molecular mechanisms involved in chronic kidney disease using high-resolution plasma proteome analysis*. Nephrol Dial Transplant, 2015. **30**(11): p. 1842-52.
48. Filip, S., et al., *Advances in urinary proteome analysis and applications in systems biology*. Bioanalysis, 2014. **6**(19): p. 2549-69.
49. Mischak, H., et al., *Urinary proteomics based on capillary electrophoresis-coupled mass spectrometry in kidney disease: discovery and validation of biomarkers, and clinical application*. Adv Chronic Kidney Dis, 2010. **17**(6): p. 493-506.
50. Fliser, D., S. Wittke, and H. Mischak, *Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry for clinical diagnostic purposes*. Electrophoresis, 2005. **26**(14): p. 2708-16.
51. Weissinger, E.M., et al., *Proteomic patterns established with capillary electrophoresis and mass spectrometry for diagnostic purposes*. Kidney Int, 2004. **65**(6): p. 2426-34.
52. Schanstra, J.P. and H. Mischak, *Proteomic urinary biomarker approach in renal disease: from discovery to implementation*. Pediatr Nephrol, 2015. **30**(5): p. 713-25.
53. Bansal, S., et al., *Advanced glycation end products enhance reactive oxygen and nitrogen species generation in neutrophils in vitro*. Mol Cell Biochem, 2012. **361**(1-2): p. 289-96.
54. Basta, G., A.M. Schmidt, and R. De Caterina, *Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes*. Cardiovasc Res, 2004. **63**(4): p. 582-92.
55. Nguyen-Khoa, T., et al., *Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment*. Nephrol Dial Transplant, 2001. **16**(2): p. 335-40.
56. Afsar, B., et al., *An update on coronary artery disease and chronic kidney disease*. Int J Nephrol, 2014. **2014**: p. 767424.
57. Cisek, K., et al., *The application of multi-omics and systems biology to identify therapeutic targets in chronic kidney disease*. Nephrol Dial Transplant, 2015: p. 1-9.
58. Aebersold, R. and M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics*. Nature, 2003. **422**(6928): p. 198-207.
59. Tyers, M. and M. Mann, *From genomics to proteomics*. Nature, 2003. **422**(6928): p. 193-7.
60. Andersen, L.W., et al., *Etiology and therapeutic approach to elevated lactate levels*. Mayo Clin Proc, 2013. **88**(10): p. 1127-40.

61. Duong, J.K., et al., *Metformin therapy in patients with chronic kidney disease*. *Diabetes Obes Metab*, 2012. **14**(10): p. 963-5.
62. Qi, S., et al., *A pilot metabolic profiling study in serum of patients with chronic kidney disease based on (1) H-NMR-spectroscopy*. *Clin Transl Sci*, 2012. **5**(5): p. 379-85.
63. Kistler, A.D., et al., *Urinary proteomic biomarkers for diagnosis and risk stratification of autosomal dominant polycystic kidney disease: a multicentric study*. *PLoS One*, 2013. **8**(1): p. e53016.
64. Milongo, D., et al., *Pretransplant urinary proteome analysis does not predict development of chronic kidney disease after liver transplantation*. *Liver Int*, 2015. **35**(7): p. 1893-901.
65. Zeisel, S.H., *Dietary choline: biochemistry, physiology, and pharmacology*. *Annu Rev Nutr*, 1981. **1**: p. 95-121.

