



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΜΣ "ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ"



Μεταπτυχιακή εργασία

**Συνδυασμός πρωτεϊνικών και πεπτιδικών δεδομένων με σκοπό την
ταυτοποίηση νεφρικών πρωτεασών που εμπλέκονται στην
επιδείνωση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας**

Καπέτσης Ν. Γεώργιος

Επιβλέπων καθηγητής: **Χατζόπουλος Πολυδεύκης**

ΑΘΗΝΑ 2016



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΜΣ "ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ"

Μεταπτυχιακή εργασία

**Συνδυασμός πρωτεϊνικών και πεπτιδικών δεδομένων με σκοπό την
ταυτοποίηση νεφρικών πρωτεασών που εμπλέκονται στην
επιδείνωση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας**

Καπέτσης Ν. Γεώργιος

Επιβλέπων καθηγητής: **Χατζόπουλος Πολυδεύκης**

Αθήνα 2016

Μεταπτυχιακή εργασία

**Συνδυασμός πρωτεϊνικών και πεπτιδικών δεδομένων με σκοπό την
ταυτοποίηση νεφρικών πρωτεασών που εμπλέκονται στην
επιδείνωση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας**

Καπέτσης Ν. Γεώργιος

Επιβλέπων καθηγητής: **Χατζόπουλος Πολυδεύκης**

Τριμελής επιτροπή: **Χατζόπουλος Πολυδεύκης**

Μηλιώνη Δήμητρα

Κούρτη Άννα

Περίληψη

Η ανίχνευση στα αρχικά στάδια καθώς και η πρόβλεψη της εξέλιξης της νεφρικής νόσου παραμένει μια πρόκληση σύμφωνα με τις διαθέσιμες κλινικές μεθόδους. Για την αντιμετώπιση αυτού του ζητήματος, ερευνήθηκε το πρωτόμα και το πεπτίδομα σε δείγματα ούρων και πλάσματος αίματος με τη χρήση φασματομετρίας μάζας υψηλής ανάλυσης για την αναγνώριση βιολογικών δεικτών που σχετίζονται με τη χρόνια νεφρική νόσο (XNN). Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στον συνδυασμό των δεδομένων που προέκυψαν από τις διαφορετικές ομικές προσεγγίσεις για την ταυτοποίηση πρωτεολυτικών γεγονότων, συγκεκριμένων για τους νεφρούς. Αυτό περιλάμβανε τη πρόβλεψη πρωτεασών που εμπλέκονται στην επιδείνωση της XNN, συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό στη διαλεύκανση των μηχανισμών που διέπουν την παθοφυσιολογία της νόσου.

Τα ακόλουθα σύνολα δεδομένων που προέρχονται από δημοσιευμένες εργασίες καθώς και από εν εξελίξει εργασίες συνεργατών χρησιμοποιήθηκαν στην συνδυαστική ανάλυσή μας: i) πεπτίδια ύστερα από θρυψινοποίηση πρωτεϊνών στα ούρα και ii) φυσικά απαντόμενα πεπτίδια στα ούρα από μελέτες σχετικά με τη πρόγνωση της επιδείνωσης της XNN, iii) πεπτίδια ύστερα από θρυψινοποίηση πρωτεϊνών στο πλάσμα από μια μελέτη σχετική με τη κατηγοριοποίηση της XNN σε στάδια, iv) φυσικά απαντόμενα πεπτίδια στο πλάσμα που δε σχετίζονται με κάποια νόσο και v) πεπτίδια ύστερα από θρυψινοποίηση πρωτεϊνών από τη βάση δεδομένων Peptide Atlas. Η πρόβλεψη των πρωτεασών πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού Proteasix (proteasix.org).

Κατά την ανάλυση, εκτιμήθηκαν η συχνότητα (δηλαδή το ποσοστό των δειγμάτων στα οποία ανιχνεύθηκε το πεπτίδιο) και η κάλυψη της πρωτεϊνικής ακολουθίας για κάθε ένα από τα πεπτίδια των 5 διαφορετικών σετ. Τα πεπτίδια θεωρήθηκαν νεφρο-ειδικά εάν ανιχνεύονταν μονάχα ως φυσικά απαντόμενα στα ούρα. Τα νεφρο-ειδικά (33 πεπτίδια) εξετάστηκαν περαιτέρω για τυχόν διαφορετική έκφραση κατά την επιδείνωση της XNN και για όσα βρέθηκαν ως διαφορετικά εκφραζόμενα (13 πεπτίδια) πραγματοποιήθηκε πρόβλεψη για τις πρωτεάσες που είναι υπεύθυνες για την παραγωγή τους. Συνολικά προβλέφθηκαν 8 πρωτεάσες να στοχεύουν 6 διαφορετικά πεπτίδια και πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της ρύθμιση ενεργότητας των πρωτεασών σύμφωνα με τη ρύθμιση των αντίστοιχων πεπτιδίων κατά την επιδείνωση της XNN.

Στη παρούσα μελέτη, παρουσιάσαμε ότι ο συνδυασμός πρωτεϊνικών και πεπτιδικών δεδομένων μπορεί να προβλέψει πεπτίδια που προέρχονται από τα νεφρά και να αυξήσει την εμπιστοσύνη στις προβλέψεις πρωτεασών, παρουσιάζοντας νέες ερευνητικές προοπτικές για μελλοντικά πειράματα. Αυτό, τελικά, πιθανά να οδηγήσει στην ανακάλυψη νέων μοριακών στόχων για θεραπευτικές παρεμβάσεις. Για την επιβεβαίωση της εγκυρότητας των ευρημάτων μας, στοχεύουμε στην ανίχνευση των πεπτιδίων σε δείγματα νεφρικού ιστού με τη χρήση στοχευμένης πρωτεομικής προσέγγισης.

Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών

Λέξεις-κλειδιά: Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, βιοδείκτες, ούρα, βιολογία συστημάτων, πρωτεομική, πεπτιδομική, συνδυαστική ανάλυση, πρωτεάσες

Integration of proteomics and peptidomics data towards identifying kidney-specific proteolytic events associated with Chronic Kidney Disease progression

Abstract

Detection of early stages as well as prediction of kidney disease progression remains a challenge with the currently available clinical methods. To address this issue, we investigated the proteome and peptidome of urine and plasma samples using high resolution mass spectrometry, 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. This includes prediction of proteases related to CKD progression, hence contributing to the elucidation of mechanisms underlying disease pathophysiology.

The following datasets originating from published but also ongoing work from our collaborators, were used for data integration: i) urine tryptic peptides and ii) urine naturally occurring peptides from studies related to the prognosis of CKD progression; iii) plasma tryptic peptides from a study related to CKD staging; iv) plasma naturally occurring peptides not specific for any disease and v) tryptic peptides from the Peptide Atlas database. Protease prediction was performed using Proteasix software (proteasix.org).

Peptide frequency (i.e. the percentage of samples in which the peptide was detected) and protein sequence coverage for each of the 5 datasets was assessed. Peptides were considered as kidney-specific if they have been detected only as naturally occurring in urine and not in plasma. The 33 kidney-specific peptides were further examined for putative differential expression in CKD progressors vs non-progressors, and those found as differentially expressed (13 peptides) were used for the prediction of proteases, responsible for their generation. In total, 8 proteases were predicted to target 6 kidney-specific and differentially expressed peptides. Furthermore, we attempted to assess the activity regulation trend of the predicted proteases in CKD progression, based on the regulation trend of the peptides that they target.

In this study, we demonstrated that integration of proteomics and peptidomics data can predict peptides that originate from kidney and increase the confidence in protease predictions, 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.

Biomedical Research Foundation Academy of Athens

Key-words: Chronic Kidney Disease, biomarkers, urine, systems biology, proteomics, peptidomics, data integration, proteases

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
A.1. Οι νεφροί.....	8
A.2. Νεφρική ανεπάρκεια.....	9
A.2.1.Οξεία νεφρική ανεπάρκεια.....	10
A.2.2. Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια.....	10
A.2.2.1. Διάγνωση, στάδια και κατηγοριοποίηση ασθενών...12	
A.2.2.2. Επιδείνωση νόσου και η πρόβλεψή της.....14	
A.2.2.3. Θεραπευτική αντιμετώπιση.....17	
A.3. Συμμετοχή πρωτεασών στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια.....	19
A.4. Αναγνώριση βιοδεικτών.....	22
A.5. Πρωτεομική- Πεπτιδομική- Συνδυασμός δεδομένων.....	23
A.6. Σκοπός της εργασίας.....	25
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	26
B.1. Δεδομένα.....	26
B.1.1. Δεδομένα από δείγματα ούρων πεπτιδομικής προσέγγισης.....	26
B.1.2. Δεδομένα από δείγματα πλάσματος πεπτιδομικής προσέγγισης.....	26
B.1.3. Δεδομένα από δείγματα ούρων πρωτεομικής προσέγγισης.....	27
B.1.4. Δεδομένα από δείγματα πλάσματος πρωτεομικής προσέγγισης.....	27
B.1.5. Δεδομένα από Peptide Atlas.....	28
B.2. Πρόβλεψη νεφρο-ειδικών πεπτιδίων.....	28
B.3. Πρόβλεψη πρωτεασών-εκτίμηση ρύθμισης πρωτεολυτικής ενεργότητας...29	

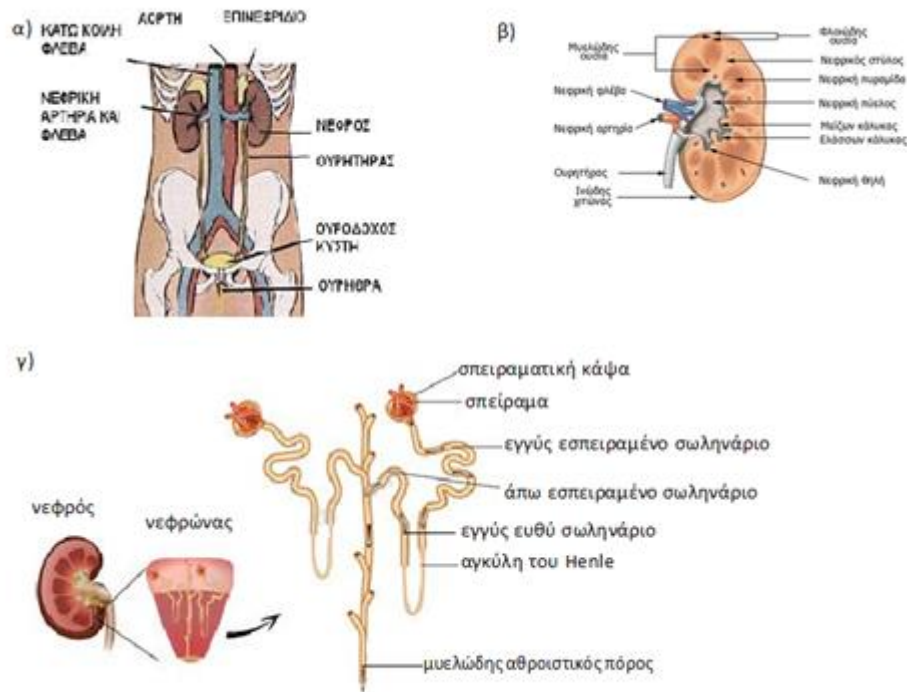
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	31
Γ.1. Αναγνώριση πεπτιδίων συγκεκριμένων για τους νεφρούς.....	31
Γ.2 Πρόβλεψη πρωτεασών με διαφορετική ενεργότητα σε ασθενείς χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας με επιδείνωση της νόσου.....	40
Γ.3. Εκτίμηση της ρύθμισης ενεργότητας προβλεπόμενων πρωτεασών.....	43
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	45
Ε. ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ.....	53
ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	58

A. Εισαγωγή

A.1. Οι νεφροί

Οι νεφροί, είναι ένα ζευγάρι οργάνων, που βρίσκονται στο κάτω μέρος του θώρακα, εκατέρωθεν της σπονδυλικής στήλης. Συμμετέχουν σε βασικές ρυθμιστικές λειτουργίες, όπως η ρύθμιση του ισοζυγίου του ύδατος και των ανόργανων ιόντων, η απομάκρυνση μεταβολικών παραπροϊόντων και ξένων χημικών ουσιών από το αίμα και η απέκκρισή τους στα ούρα. Συμμετέχουν, επίσης, στη διαδικασία της γλυκονεογένεσης, με τη παραγωγή και απελευθέρωση γλυκόζης στην αιματική ροή κατά τη διάρκεια παρατεταμένης νηστείας, ενώ λειτουργούν και ως ενδοκρινείς αδένες εκκρίνοντας τελικά τρεις ορμόνες, την ερυθροποιητίνη, τη ρενίνη και την 1,25-διϋδροξυβιταμίνη D₃. Επηρεάζουν αλλά και επηρεάζονται από όλα σχεδόν τα λειτουργικά συστήματα του οργανισμού. Ο νεφρός στον άνθρωπο περιλαμβάνει ένα εκατομμύριο λειτουργικές μονάδες, τους νεφρώνες, οι οποίοι αποτελούνται από 2 μέρη, το σπείραμα που φιλτράρει το πλάσμα του αίματος αποδίδοντας τα πρωτογενή ούρα και το νεφρικό σωληνάριο που επαναπορροφά περισσότερο από το 99% από τα πρωτογενή ούρα. Μέσα σε χρονικό διάστημα 24 ωρών, περίπου 900 λίτρα πλάσματος ρέουν διαμέσου των νεφρών, παράγεται διήθημα περίπου 150-180 λίτρων που οδηγεί τελικά σε έναν όγκο 1-1.5 λίτρων τελικών ούρων. Οι πρωτεΐνες στα ούρα μπορεί να προέρχονται είτε από τη σπειραματική διήθηση πρωτεϊνών του πλάσματος, είτε μέσω έκκρισης από τα επιθηλιακά κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων είτε μέσω απόρριψης ολόκληρων κυττάρων κατά μήκος του ουροποιητικού συστήματος. Όλες οι πρωτεΐνες που φτάνουν στον σωληνοειδή αυλό εκκρίνονται σε μικρές ποσότητες υπό φυσιολογικές συνθήκες στα ούρα λόγω της αποτελεσματικότητας της επαναπορρόφησης που πραγματοποιείται από τα επιθηλιακά κύτταρα των εγγύς σωληναρίων. Υπό κανονικές συνθήκες, οι πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους περνούν ελεύθερα μέσω του σπειράματος ενώ σχεδόν καμία από τις πρωτεΐνες υψηλού μοριακού βάρους και μόνο ένα μικρό κλάσμα πρωτεϊνών μεσαίου μοριακού βάρους φθάνουν μέχρι τα νεφρικά σωληνάρια.

Εικόνα 1. α) Η θέση των νεφρών στο εσωτερικό του σώματος, β) η δομή στο εσωτερικό του νεφρού και γ) η δομή στο εσωτερικό του νεφρώνα.



Διάφορα νοσήματα όπως σακχαρώδης διαβήτης, αρτηριακή υπέρταση, ρευματοειδής αρθρίτιδα, συστηματικός ερυθηματώδης λύκος ή η λήψη ορισμένων φαρμάκων όπως αντιβιοτικά ή αντιφλεγμονώδη πιθανά να επηρεάσουν τη δομή και τη λειτουργία των νεφρών προκαλώντας σοβαρές διαταραχές. Αν και το σώμα είναι εξοπλισμένο με δύο νεφρούς, ο οργανισμός μπορεί να λειτουργήσει κανονικά ακόμα και με έναν υγιή νεφρό.

A.2. Νεφρική ανεπάρκεια

Η νεφρική ανεπάρκεια αποτελεί μια διαταραχή της φυσιολογικής λειτουργίας των νεφρών κατά την οποία οι νεφροί αδυνατούν να φιλτράρουν ικανοποιητικά τα απόβλητα του μεταβολισμού από το αίμα. Η νόσος διακρίνεται σε δυο μορφές, την οξεία και τη χρόνια.

A.2.1. Οξεία νεφρική ανεπάρκεια

Η οξεία αποτελεί ένα ξαφνικό επεισόδιο νεφρικής βλάβης και μπορεί να συμβεί μέσα σε λίγες μέρες ακόμα και ώρες. Μπορεί να οφείλεται σε αίτια προνεφρικά (ελαττωμένη αιματική ροή στο νεφρό) όπως σοβαρή αιμορραγία λόγω τραυματισμού, σοβαρής λοίμωξης, σε αίτια νεφρικά (απόφραξη νεφρικής αρτηρίας, σπειραματονεφρίτιδα, ενδογενείς-εξωγενείς τοξίνες) και σε μετανεφρικά (απόφραξη ουροποιητικού συστήματος) λόγω διόγκωσης του προστάτη, πέτρας του ουροποιητικού ή κάποιου τραυματισμού. Είναι συχνή σε ασθενείς που νοσηλεύονται σε νοσοκομεία, σε μονάδες εντατικής θεραπείας και ιδιαίτερα σε ενήλικες μεγάλης ηλικίας. Έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση στο σώμα άχρηστων προϊόντων του μεταβολισμού, υγρών και ηλεκτρολυτών προκαλώντας σοβαρά προβλήματα [1]. Είναι σημαντικό πως σε ορισμένες περιπτώσεις, η οξεία νεφρική ανεπάρκεια είναι αναστρέψιμη και οι ασθενείς μπορεί να επανέλθουν στη πρότερη υγιή κατάστασή τους.

A.2.2. Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια

Αντίθετα, η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (ΧΝΑ) είναι μια μη αναστρέψιμη, παθολογική κατάσταση που χαρακτηρίζεται από τη σταδιακή απώλεια της νεφρικής λειτουργίας. Απαραίτητη προϋπόθεση για το χαρακτηρισμό της νόσου ως χρόνιας είναι η ύπαρξη νεφρικής βλάβης για διάστημα μεγαλύτερο των 3 μηνών [2] ή/και η 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[3]. Ως ρυθμός σπειραματικής διήθησης ορίζεται ο όγκος του πλάσματος που διηθείται στη μονάδα του χρόνου. Η νεφρική βλάβη καθορίζεται από δομικές και λειτουργικές διαταραχές των νεφρών και μπορεί να ανιχνευτεί μέσω ανάλυσης ούρων, με βιοψία νεφρικού ιστού ή με τεχνικές απεικόνισης (ακτινογραφία, υπέρηχος). Οι νεφρώνες, τα μικροσκοπικά φίλτρα των νεφρών, εκφυλίζονται σταδιακά με αποτέλεσμα να μην μπορούν να επιτελέσουν σωστά το ρόλο τους. Στα αρχικά στάδια της νόσου είναι πιθανό οι ασθενείς να μην παρουσιάσουν κάποιο σύμπτωμα. Καθώς η νόσος, όμως, εξελίσσεται και γίνεται πιο σοβαρή, είναι πιθανό

να εμφανιστούν συμπτώματα όπως: μειωμένη παραγωγή ούρων, οίδημα κάτω άκρων, κούραση, υπνηλία, ναυτία ή/και εμετοί, ανορεξία, απώλεια βάρους, πονοκέφαλος και προβλήματα ύπνου[4]. Θεωρείται ως ένα παγκόσμιο πρόβλημα δημόσιας υγείας, καθώς υπάρχουν υποψίες πως ένα ποσοστό της τάξης του 8-16% του συνολικού πληθυσμού εμφανίζει χρόνια νεφρική ανεπάρκεια κάποιου βαθμού[5]. Παρόλο που μπορεί να παρουσιαστεί σε οποιαδήποτε ηλικία, τόσο η επίπτωση (συχνότητα νέων κρουσμάτων) όσο και ο επιπολασμός (συχνότητα στον γενικό πληθυσμό) της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας, παρουσιάζουν ραγδαία αύξηση σε άτομα ηλικίας άνω των 65 και 60 αντίστοιχα [6]. Αυτό, πιθανώς να οφείλεται πως σε αυτές τις ηλικίες παρουσιάζεται αύξηση των κρουσμάτων διαβήτη και υπέρτασης[7], οι οποίες αποτελούν τις περισσότερο κοινές αιτίες των ασθενειών στους νεφρούς. Άλλοι παράγοντες κινδύνου είναι η παχυσαρκία, το κάπνισμα[8], ενώ κυρίως στις αναπτυσσόμενες χώρες, ως παράγοντες κινδύνου εμφανίζονται οι συστηματικές λοιμώξεις[9] και τα αυτοάνοσα νοσήματα[2]. Οι λοιμώξεις μπορεί να οφείλονται σε βακτήρια (φυματίωση σε Ινδία και Μέση Ανατολή, στρεπτόκοκκος στην Αφρική), ιούς (HIV, ηπατίτιδα Β και C στην Αφρική) και παράσιτα (λεϊσμανίαση στην Αφρική και στην Ασία και ελονοσία στην Αφρική) [10]. Στις αναπτυσσόμενες χώρες, επίσης, η επιβάρυνση του περιβάλλοντος με χημικά όπως ο μόλυβδος, το κάδμιο και ο υδράργυρος και η περιστασιακή έκθεση των ατόμων σε αυτά, έχει συσχετισθεί με την εμφάνιση χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας [11]. Η επιδείνωση της ΧΝΑ σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων, με αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας [12, 13] και σταδιακά μπορεί να οδηγήσει στο τελικό στάδιο νεφρικής νόσου (end-stage renal disease, ESRD). Στο σημείο αυτό, οι νεφροί καθίστανται πλήρως ανεπαρκείς και οι ασθενείς είναι επιτακτικό να υποβληθούν σε υποκατάσταση των νεφρών. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με αιμοκάθαρση ή με περιτοναϊκή κάθαρση ή με μεταμόσχευση νεφρών. Αξίζει να αναφερθεί πως ορισμένοι ασθενείς πρέπει να υπόκεινται σε εξωνεφρική κάθαρση, πριν φτάσουν στο τελικό στάδιο νεφρικής νόσου, σε περίπτωση που παρουσιάζουν συμπτώματα ουραιμίας[3]. Πρόσθετες διαταραχές που συχνά συνοδεύουν τη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια είναι η γνωστική δυσλειτουργία [14], η διαταραχή της σωματικής λειτουργίας [15], οι λοιμώξεις του κυκλοφορικού συστήματος [16] και η οξεία νεφρική ανεπάρκεια [17].

A.2.2.1 Διάγνωση, στάδια και κατηγοριοποίηση των ασθενών

Προς το παρόν, οι διαθέσιμες κλινικές μέθοδοι για τη διάγνωση και τη κατηγοριοποίηση των ασθενών σε ένα από τα 5 στάδια της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας, βασίζονται στην εκτίμηση των επιπέδων πρωτεϊνουρίας/αλβουμινουρίας ή/και στην εκτίμηση-υπολογισμό του ρυθμού σπειραματικής διήθησης (estimated Glomerular Filtration Rate, eGFR) [18-20]. Η μέτρηση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης αποτελεί μια αρκετά χρονοβόρα διαδικασία. Για το λόγο αυτό, προτιμάται ο υπολογισμός του μέσω κατάλληλων εξισώσεων. Κατά τον υπολογισμό του GFR λαμβάνονται υπόψη τα επίπεδα κρεατινίνης στο αίμα, η ηλικία, το φύλο καθώς και η φυλή των ατόμων. Οι παρακάτω εξισώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως και παρέχουν αξιόπιστες εκτιμήσεις του GFR στους ενήλικες [3]:

- **Τύπος Cockcroft-Gault**

$GFR (ml/min) = (140 - \text{ηλικία}) * \text{βάρος} / 72 * \text{κρεατ ορού (mg/dl)}$ (*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)

Τα τελευταία χρόνια, δύο ακόμα εξισώσεις έχουν αναπτυχθεί και φαίνεται πως είναι αρκετά χρήσιμες. Η εξίσωση CKD-EPI [21, 22] είναι περισσότερο ακριβής από την MDRD, ειδικά σε υψηλά επίπεδα GFR (>60 mL/min/1.73 m²). Παράλληλα, λαμβάνοντας υπόψη ταυτόχρονα τα επίπεδα κρεατινίνης αλλά και της κυστατίνης C σε μια εξίσωση [23], προκύπτει πιο ακριβής εκτίμηση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης συγκριτικά με τη περίπτωση όπου οι δείκτες αυτοί εξετάζονται ξεχωριστά.

Τα στάδια της νόσου χαρακτηρίζονται από τις εξής τιμές eGFR[3]:

Πίνακας Α1. Τα στάδια της Χρόνιας Νεφρική Νόσου

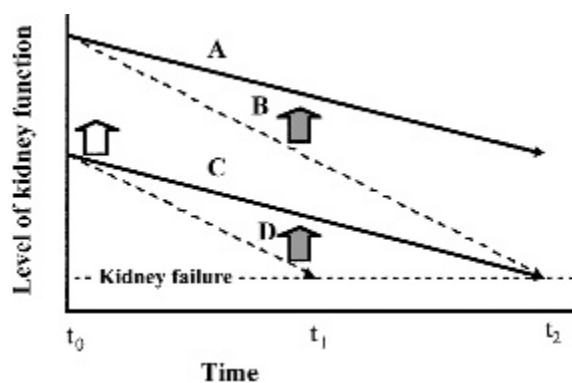
Στάδιο νόσου	Επίπεδα eGFR (mL/min/1.73 m ²)
1	≥ 90
2	60-89
3	30-59
4	15-29
5	<15

Παρόλα αυτά, υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί στη χρήση αυτών των μετρήσεων [24], καθώς η μείωση στο ρυθμό σπειραματικής διήθησης είναι ανιχνεύσιμη μόνο όταν η λειτουργία των νεφρών έχει ήδη ελαττωθεί σημαντικά[25], ενώ τα επίπεδα πρωτεϊνουρίας εμφανίζουν ποικιλομορφία μεταξύ διαφορετικών ασθενών. Για το λόγο αυτό, κρίνεται αναγκαία η ανίχνευση νέων βιοδεικτών, περισσότερο ευαίσθητων, ικανών να αναγνωρίζουν τη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια στα αρχικά της στάδια.

Λόγω της μεγάλης συχνότητας εμφάνισης της νόσου, την απουσία συμπτωμάτων μέχρι την επιδείνωσή της, τη διαθεσιμότητα θεραπειών για τη πρόληψη της επιδείνωσης εφόσον η διάγνωση γίνει σε αρχικό στάδιο, έχει προταθεί η πραγματοποίηση διαγνωστικών ελέγχων σε τμήματα του πληθυσμού. Παρόλο που μια τέτοια διαδικασία μπορεί να είναι ιδιαίτερα δαπανηρή και ως συνέπεια αμφιλεγόμενη ως προς την πραγματική της αξία, εφόσον περιοριστεί σε άτομα με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας, θα μπορούσε να προσφέρει αρκετά. Έτσι, διαγνωστικά τεστ για την ανίχνευση πρωτεϊνουρίας (λευκωματουρίας) σε άτομα με υπέρταση, διαβήτη, οικογενειακό ιστορικό χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας ή κληρονομική ασθένεια των νεφρών, αυτοάνοσα νοσήματα με πιθανότητας εμπλοκής των νεφρών θα μπορούσε να οδηγήσει σε διάγνωση ασθενών που βρίσκονται στα αρχικά στάδια πριν την εκδήλωση συμπτωμάτων [9].

A.2.2.2 Επιδείνωση νόσου και η πρόβλεψή της

Εκτός όμως από τη διάγνωση της ασθένειας στα αρχικά της στάδια, κρίνεται επιτακτική και η ανάγκη εκτίμησης της επιδείνωσης της νόσου. Η επιδείνωση ορίζεται ως η ελάττωση των επιπέδων νεφρικής λειτουργίας όπως υπολογίζεται ύστερα από μέτρηση του GFR, της κάθαρσης κρεατινίνης ή της κρεατινίνης του πλάσματος σε ασθενείς ύστερα απο κατ' εξακολούθηση εξετάσεις για τη νεφρική λειτουργία. Υπάρχει καθαρή διάκριση μεταξύ της σοβαρότητας μιας νόσου και του κινδύνου για σοβαρή επιδείνωση. Η σοβαρότητα καθορίζεται από τις μετρήσεις στο επίπεδο λειτουργίας των οργάνων (eGFR), από επιπλοκές σε άλλα συστήματα οργάνων και από τη νοσηρότητα, σύμφωνα με τις οποίες, οι ασθενείς κατατάσσονται σε ένα από τα καθορισμένα στάδια της νόσου. Παρόλο που σε γενικές γραμμές ο κίνδυνος επιδείνωσης μιας νόσου σχετίζεται με τη σοβαρότητα της, εντούτοις εξαρτάται και από τον ρυθμό της εξέλιξης σε πιο προχωρημένο στάδιο. Ασθενείς που βρίσκονται μια δεδομένη χρονική στιγμή σε παρόμοιο στάδιο της νόσου εξαιτίας όμοιων επιπέδων eGFR, μπορεί στη πραγματικότητα να διαφέρουν σημαντικά λόγω διαφορετικού ρυθμού επιδείνωσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι αυτό της παρακάτω εικόνας .



Εικόνα 2. Η ελάττωση της νεφρικής λειτουργίας συναρτήσει του χρόνου. Ο κατακόρυφος άξονας απεικονίζει τα επίπεδα νεφρικής λειτουργίας (**level of kidney function**). Στον οριζόντιο άξονα παρουσιάζεται ο χρόνος (**time**). Η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή απεικονίζει τα επίπεδα νεφρικής λειτουργίας στα πρόθυρα της νεφρικής ανεπάρκειας. Παρουσιάζεται η ελάττωση της νεφρικής λειτουργίας 4

ασθενών (A,B,C,D). Κατά τη χρονική στιγμή ανίχνευσης ότι ο ασθενής πάσχει από χρόνια νεφρική ανεπάρκεια(t_0), οι ασθενείς A-B μεταξύ τους και οι C-D μεταξύ τους, παρουσιάζουν παρόμοια επίπεδα νεφρικής λειτουργίας, με τους C και D να εμφανίζουν τα χαμηλότερα επίπεδα. Επειδή, όμως ασθενείς που την στιγμή t_0 έχουν ίδια επίπεδα νεφρικής λειτουργίας, εμφανίζουν διαφορετικό ρυθμό επιδείνωσης της νόσου, φτάνουν στο επίπεδο της νεφρικής ανεπάρκειας σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα(t_1 και t_2), εκτός από τον ασθενή A που η νόσος δε προοδεύει μέχρι τη νεφρική ανεπάρκεια. Επίσης, είναι δυνατό ασθενείς με διαφορετικά επίπεδα νεφρικής λειτουργίας την t_0 να φτάνουν στο στάδιο νεφρικής βλάβης την ίδια στιγμή (B και C) [3].

Ο ρυθμός ελάττωσης της σπειραματικής διήθησης είναι συχνά σταθερός με τη πάροδο του χρόνου σε ένα άτομο, παρουσιάζει, όμως, μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ διαφορετικών ατόμων. Υπάρχουν ασθενείς με επιδείνωση αρκετά αργή, χρονικού διαστήματος μέχρι και δεκάδων ετών, ενώ σε άλλους παρατηρείται σοβαρή επιδείνωση εντός μερικών μηνών. Παράλληλα, φαίνεται πως ο ρυθμός ελάττωσης του GFR είναι αυξημένος σε μερικές νεφροπάθειες (διαβητική νεφρική νόσος, σπειραματικές ασθένειες, πολυκυστική νόσος των νεφρών) συγκριτικά με κάποιες άλλες (υπερτασική νεφροπάθεια, διαμεσοσωληναριακή ασθένεια των νεφρών). Ο ρυθμός αυτός, επίσης, σχετίζεται με ορισμένα μη μεταβλητά χαρακτηριστικά των ασθενών. Πιο συγκεκριμένα, ασθενείς αфро-αμερικάνικης φυλής, αρσενικού γένους, μεγαλύτερης ηλικίας και με μικρότερα αρχικά επίπεδα νεφρικής λειτουργίας σχετίζονται με πιο γρήγορη ελάττωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης. Ο διαφορετικός ρυθμός ελάττωσης του GFR έχει σχέση και με κάποια μεταβλητά χαρακτηριστικά των ασθενών ανεξαρτήτως της νεφρικής ασθένειας. Αυτά είναι τα υψηλά επίπεδα πρωτεϊνουρίας (ή λευκωματουρίας), το κάπνισμα, ο φτωχός γλυκαιμικός έλεγχος, η υψηλή αρτηριακή πίεση και οι χαμηλές συγκεντρώσεις αλβουμίνης στο πλάσμα του αίματος [3].

Σε κάθε περίπτωση, ο χαρακτηρισμός των ασθενών πρέπει να πραγματοποιείται λαμβάνοντας υπόψη όχι μόνο το στάδιο στο οποίο βρίσκονται μια δεδομένη χρονική στιγμή αλλά και τον πιθανό ρυθμό επιδείνωσης που θα παρουσιάσουν. Με τον τρόπο αυτό, οι ασθενείς θα κατηγοριοποιούνται καλύτερα ανάλογα με το

κίνδυνο ανάπτυξης τελικού σταδίου νεφρικής νόσου (ESRD). Μέχρι σήμερα, δεν έχουν ανιχνευθεί κατάλληλοι βιοδείκτες για την αξιολόγηση της επιδείνωσης της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας. Σε κλινικό επίπεδο, η πρωτεϊνουρία/αλβουμινουρία (παρουσία πρωτεϊνών/αλβουμίνης στα ούρα), σε συνδυασμό με τον eGFR [19], αποτελεί τον πιο ευαίσθητο δείκτη επιδείνωσης της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας. Πρόσφατα, έχουν ανιχνευθεί ορισμένοι βιοδείκτες για τη πρόγνωση τόσο της επιδείνωσης της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας, όσο και της συνοσηρότητας των καρδιαγγειακών παθήσεων και της θνησιμότητας. Ανάμεσα σε αυτούς συγκαταλέγονται η σχετιζόμενη με τη ζελατινάση των ουδετερόφιλων λιποκαλίνη (NGAL), η πρωτεΐνη KIM- 1 (kidney injury molecule-1)[26], η πρωτεΐνη L-FABP (liver-type fatty acid binding protein). Από τους βιοδείκτες αυτούς, περισσότερο υποσχόμενος όσον αφορά τη πρόγνωση της επιδείνωσης της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας είναι ο NGAL. Για την κυστατίνη C, επίσης, υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να συμβάλλει σημαντικά ως βιοδείκτης της νεφρικής λειτουργίας, της επιδείνωσης της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας και του κινδύνου ανάπτυξης καρδιαγγειακών παθήσεων [27]. Θεωρείται εξαιρετικά δύσκολο, ένας μεμονωμένος βιοδείκτης να είναι σε θέση να ικανοποιήσει τις ανάγκες για την πρόβλεψη της επιδείνωσης της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας. Αντίθετα, ένα εκτεταμένο σύνολο βιοδεικτών ίσως μπορέσει να καλύψει με πιο αποτελεσματικό τρόπο τη πολυπλοκότητα των παθοφυσιολογικών διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα κατά την επιδείνωση της νόσου. Προς αυτή τη κατεύθυνση, ύστερα από πρωτομική ανάλυση ούρων, βρέθηκε ότι μια ομάδα 273 πρωτεϊνών στα ούρα αποτελεί όχι μόνο ικανό διαγνωστικό δείκτη, άλλα η χρήση της σε συνδυασμό με την αλβουμινουρία βελτίωσε τον εντοπισμό ασθενών με ταχεία ελάττωση της νεφρικής λειτουργίας από ότι η χρήση μόνο της αλβουμινουρίας [28]. Καθώς, οι νεφρολόγοι διαθέτουν μεθόδους για τη θεραπεία ασθενών με κίνδυνο επιδείνωσης εφόσον αυτή πραγματοποιηθεί νωρίς [29, 30], κατάλληλοι προγνωστικοί βιοδείκτες θα μπορούσαν να δώσουν τη δυνατότητα θεραπείας ανάλογα με τις ανάγκες του εκάστοτε ασθενούς[27]. Ασθενείς με αυξημένο κίνδυνο επιδείνωσης σε τελικό στάδιο πρέπει να αναφέρονται σε κατάλληλη νεφρολογική κλινική για θεραπεία περισσότερο επιθετική [9, 31]. Αυτοί μπορεί να είναι ασθενείς με eGFR<30mL/min/1.73m², με ραγδαία ελάττωση νεφρικής λειτουργίας (>5

mL/min/1.73m²), με μη ελεγχόμενη υπέρταση, με διαβήτη, με επίμονη αλβουμινουρία. Αντίθετα, άτομα που δε φαίνεται να παρουσιάζουν επιδείνωση, μπορούν να υπόκεινται σε πιο συντηρητική θεραπεία, ελαττώνοντας τον αριθμό των επισκέψεων στην κλινική και επομένως, επιτρέποντας την καλύτερη διαχείριση των διαθέσιμων πόρων[9]. Παρόλο που η πρόοδος της τεχνολογίας στον τομέα της πρωτεομικής, της συλλογής και διατήρησης κατάλληλων δειγμάτων και των αναλυτικών μεθόδων έχει βελτιώσει αισθητά τη διαδικασία αναγνώρισης βιοδεικτών, εμφανίζονται δυσκολίες κατά την επαλήθευση των ευρημάτων και τη μετάβαση τους σε κλινικό επίπεδο. Αυτές έγκεινται στο γεγονός ότι απαιτούνται κλινικές δοκιμές σε μεγάλους, ετερογενείς πληθυσμούς για μεγάλα χρονικά διαστήματα καθώς και στο ότι πρέπει να γίνει ακριβής συσχετισμός των βιοδεικτών με την ανάπτυξη τελικού σταδίου νεφρικής νόσου και την θνησιμότητα. Έτσι, η όλη διαδικασία για την κλινική διάθεση βιοδεικτών πρόγνωσης της επιδείνωσης της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας παραμένει στάσιμη.

A.2.2.3 Θεραπευτική αντιμετώπιση

Για κάθε ασθενή πρέπει να υπάρχει ένα κλινικό σχέδιο παρακολούθησης και δράσης, σύμφωνα με το στάδιο της νόσου στο οποίο κατηγοριοποιείται ο ασθενής βάσει των επιπέδων GFR [3]:

Πίνακας A2. Το κλινικό σχέδιο παρακολούθησης και δράσης των ασθενών

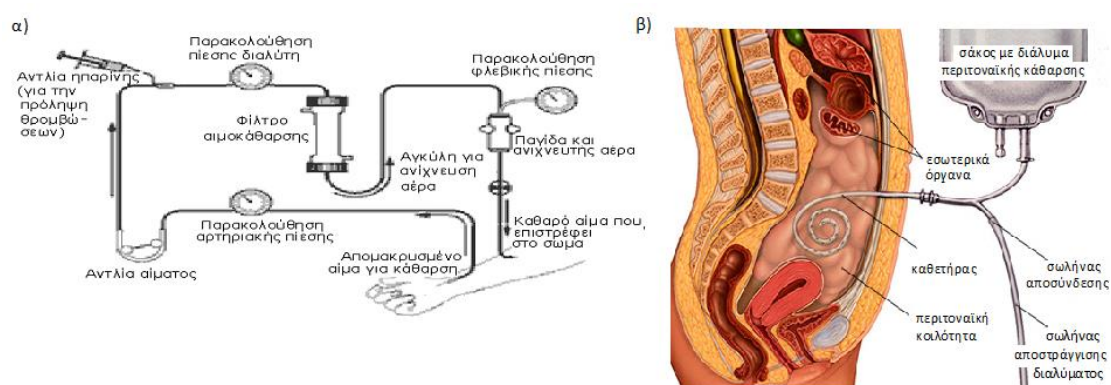
Στάδιο	Ενέργειες
1	Διάγνωση, θεραπεία, μείωση επιδείνωσης
2	Υπολογισμός επιδείνωσης
3	Εκτίμηση και θεραπεία επιπλοκών
4	Προετοιμασία για υποκατάσταση
5	Υποκατάσταση νεφρικής λειτουργίας

Αρχικά, η διαχείριση της νόσου πρέπει να περιλαμβάνει την ταυτοποίηση τυχόν αναστρέψιμων διαταραχών όπως απόφραξη του ουροποιητικού συστήματος, λοίμωξη ή αυτοάνοσο νόσημα που ύστερα από κατάλληλη θεραπεία θα μπορούσε να σταθεροποιήσει την κατάσταση λειτουργίας των νεφρών. Ανεξάρτητα, όμως, από την αιτία, πρωταρχικός στόχος για όλους τους ασθενείς πρέπει να είναι η εκτίμηση και θεραπεία των παραγόντων συ-νοσηρότητας, η πρόληψη της εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων και η ελάττωση του ρυθμού εξέλιξης-επιδείνωσης της νόσου, η οποία συνεπάγεται καθυστέρηση, ή ακόμα και πρόληψη της νεφρικής ανεπάρκειας και άλλων επιπλοκών [9]. Σε τελικό στάδιο είναι υποχρεωτική η υποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας είτε μέσω εξωνεφρικής κάθαρσης είτε με μεταμόσχευση σε περίπτωση ύπαρξης συμπτωμάτων ουραιμίας[3]. Το σχέδιο δράσης για την αντιμετώπιση της ασθένειας σε άτομα για τα οποία η πρόγνωση για την επιδείνωση δεν τα καθιστά ως υψηλού κινδύνου, μπορεί να μην εμπεριέχει τη χρήση φαρμάκων αλλά να είναι πιο συντηρητική. Σε τέτοιου είδους θεραπείες, στόχος είναι η αλλαγή του τρόπου ζωής των ασθενών. Πιο συγκεκριμένα, καθώς το κάπνισμα [32] και η παχυσαρκία [33] σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με τη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και τη θνησιμότητα, οι ασθενείς ενθαρρύνονται να διακόψουν το κάπνισμα, να ελαττώσουν το βάρος τους στη περίπτωση που κρίνονται υπέρβαροι ή να το διατηρήσουν εάν κρίνονται φυσιολογικοί και να ξεκινήσουν άσκηση εφόσον είναι εφικτό [34]. Η επίδραση του περιορισμού της πρόσληψης πρωτεϊνών στη διατροφή των ασθενών έχει μελετηθεί ως πιθανή συντηρητική αντιμετώπιση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας, ωστόσο τα αποτελέσματα είναι αμφιλεγόμενα. Σύμφωνα με αποτελέσματα μετα-ανάλυσης, η αυστηρή ή μικρή πρόσληψη πρωτεϊνών στη διατροφή μπορεί να ελαττώσει τις πιθανότητες εμφάνισης νεφρικής ανεπάρκειας ή θνησιμότητας. Η παρατήρηση αυτή πραγματοποιήθηκε σε κλινικές δοκιμές [35], ωστόσο λόγω των κινδύνων υποσιτισμού και της ανάγκης για επιπλέον διατροφική παρακολούθηση, συνήθως δεν προτείνεται σε ασθενείς χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας. Επίσης, υποστηρίζεται πως η λήψη συμπληρωμάτων όξινου ανθρακικού νατρίου οδήγησε σε ελάττωση του ρυθμού απώλειας νεφρικής λειτουργίας και επιδείνωσης της νόσου σε ασθενείς με

eGFR<30 mL/min/1.73m² και χαμηλά επίπεδα όξινου ανθρακικού νατρίου στο αίμα [36]. Για τα άτομα που η κατάστασή τους και η πρόγνωση της επιδείνωσής τους επιβάλλει την επίσκεψη σε νεφρολογική κλινική, η συνταγογράφηση των φαρμάκων πρέπει να γίνεται ύστερα από κατάλληλη εκτίμηση των συνοδευόμενων με τη νεφρική ασθένεια νοσημάτων. Όσον αφορά τους μη διαβητικούς ασθενείς, κύριο στόχο της θεραπείας αποτελεί η αντιμετώπιση της υψηλής αρτηριακής πίεσης. Οι αναστολείς του ενζύμου μετατροπής της αγγιοτενσίνης αποτελούν τους πιο μελετημένους υπερτασικούς παράγοντες για τη μείωση της επιδείνωσης της ΧΝΑ και παρουσιάζουν τα καλύτερα αποτελέσματα συγκριτικά με τα υπόλοιπα υπερτασικά φάρμακα [37-39]. Παράγοντες, όπως οι ανταγωνιστές των υποδοχέων αγγιοτενσίνης αποτελούν μια καλή εναλλακτική λύση σε περίπτωση που οι ασθενείς εμφανίζουν συμπτώματα βήχα ή/και αγγειοιδήματος κατά τη χρήση των αναστολέων του ενζύμου μετατροπής της αγγιοτενσίνης [40, 41] ενώ ο συνδυασμός των δυο κατηγοριών υπερτασικών φαρμάκων οδήγησε σε ελάττωση των επιπέδων πρωτεϊνουρίας σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι ο κάθε παράγοντας ξεχωριστά [42]. Αρκετοί ασθενείς χρειάζεται να λαμβάνουν αρκετά υπερτασικά φάρμακα για τον έλεγχο της αρτηριακής πίεσης ανάλογα με τα συνοδά νοσήματα. Τα θειαζιδικά διουρητικά ή τα διουρητικά αγκύλης μπορούν να βοηθήσουν στην ελάττωση της αρτηριακής πίεσης ενώ τα διουρητικά αγκύλης συμβάλλουν επίσης στον έλεγχο της υπερκαλιαιμίας και της υδατικής υπερφόρτωσης του εξωκυττάριου όγκου καθώς ελαττώνεται ο eGFR [43]. Παράλληλα, η επιπλέον θεραπεία με ανταγωνιστές των διαύλων ασβεστίου πιθανά να μειώσει περαιτέρω τα επίπεδα πρωτεϊνουρίας [44]. Όσον αφορά τους ασθενείς χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας με διαβήτη, προτείνεται η χρήση υπερτασικών φαρμάκων και κυρίως αναστολέων του ενζύμου μετατροπής της αγγιοτενσίνης για τον έλεγχο της αρτηριακής πίεσης. Καθώς ο φτωχός γλυκαιμικός έλεγχος έχει συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο διαβητικής νεφροπάθειας και ραγδαία επιδείνωση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας, ο πιο αυστηρός έλεγχος μέσω χορήγησης σουλφονουλουρίας ή/και ινσουλίνης μπορεί να έχει θετικές συνέπειες [45, 46]. Ωστόσο, υπάρχει κίνδυνος εμφάνισης υπογλυκαιμικών επεισοδίων σε ασθενείς με χαμηλό ρυθμό σπειραματικής διήθησης καθώς οι παραπάνω παράγοντες απαιτούν νεφρική κάθαρση. Στο τελικό στάδιο νεφρικής νόσου, είναι υποχρεωτική η υποκατάσταση

των νεφρών μέσω αιμοκάθαρσης ή περιτοναϊκής διάλυσης είτε μεταμόσχευσης. Κατά την αιμοκάθαρση χρησιμοποιείται μια τεχνητή συσκευή διάλυσης (τεχνητός νεφρός) για την αφαίρεση των αποβλήτων από το αίμα, την αποκατάσταση και διατήρηση της ισορροπίας των ηλεκτρολυτών και την εξάλειψη της περίσσειας των υγρών από το σώμα. Στη περίπτωση περιτοναϊκής διάλυσης, χρησιμοποιείται το περιτόναιο (υμένας που επαλείφει τα τοιχώματα της κοιλιάς και τα σπλάγχνα που βρίσκονται στην κοιλιά και στην πύελο) ως μεμβράνη κατά μήκος της οποίας ανταλλάσσονται από το αίμα υγρά και διαλυμένες ουσίες (ηλεκτρολύτες, ουρία, γλυκόζη, αλβουμίνη, οσμωτικώς δραστικά σωματίδια και άλλα μικρά μόρια). Απαιτείται η χρήση καθετήρα με τη μια άκρη του να τοποθετείται στο περιτόναιο και την άλλη να εξέρχεται από το σώμα του ασθενούς. Διάλυμα περιτοναϊκής κάθαρσης διοχετεύεται στο περιτόναιο και η περιτοναϊκή μεμβράνη φιλτράρει τις άχρηστες ουσίες μέσα σ' αυτό το διάλυμα. Το διάλυμα που περιέχει τις άχρηστες ουσίες παροχετεύεται από το περιτόναιο μετά από αρκετές ώρες και αντικαθίσταται με φρέσκο διάλυμα. Η υποκατάσταση μέσω μεταμόσχευσης είναι αρκετά σπάνια στις αναπτυσσόμενες χώρες λόγω της σπανιότητας στη διαθεσιμότητα των κατάλληλων μοσχευμάτων.

Εικόνα 3. Οι διαδικασίες α) αιμοκάθαρσης και β) περιτοναϊκής διάλυσης.



A.3. Συμμετοχή πρωτεασών στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια

Οι πρωτεάσες (ή πρωτεϊνάσες ή πεπτιδάσες) είναι πρωτεολυτικά ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών που συνδέουν τα αμινοξέα σε μια πολυπεπτιδική αλυσίδα. Συμμετέχουν σε ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών

βιολογικών διαδικασιών συμπεριλαμβανομένης της αποδόμησης πρωτεϊνών, της κυτταρικής διαίρεσης και της ανοσολογικής απόκρισης. Επιπλέον, η δράση τους έχει συσχετισθεί με διάφορες ασθένειες όπως ο καρκίνος, οι φλεγμονές και καρδιαγγειακές παθήσεις [47, 48]. Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν τη πιθανή συμμετοχή των πρωτεασών στην ανεπάρκεια της νεφρικής λειτουργίας, αλλά ο υποτιθέμενος ρόλος τους δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί. Ιδιαίτερη μελετημένη είναι η οικογένεια των εξωκυττάρων μεταλλοπρωτεϊνών ή μεταλλοπρωτεασών εξωκυττάριας ουσίας (matrix metalloproteinases, MMPs), η οποία αποτελείται από 28 πρωτεΐνες που χρησιμοποιούν ψευδάργυρο στον καταλυτικό μηχανισμό τους. Οι MMPs εμπλέκονται στην αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας. Προκειμένου να αποφευχθεί η εκτεταμένη πρωτεόλυση και καταστροφή των ιστών, η πρωτεολυτική ενεργότητα των MMPs ρυθμίζεται σε φυσιολογικές καταστάσεις μέσω δύο μηχανισμών, είτε με ρύθμιση της μεταγραφής και μετάφρασής τους μέσω αυξητικών παραγόντων, κυτοκινών φλεγμονής, ορμονικών ερεθισμάτων είτε μέσω των ενδογενών αναστολέων τους (TIMPs). Αλλαγές στα πρότυπα ενεργότητας των μεταλλοπρωτεϊνών πιθανά να συμμετέχουν στη παθοφυσιολογία διαφόρων νεφρικών ασθενειών. Τόσο η αύξηση όσο και η ελάττωση της ενεργότητας ή/και της έκφρασης διαφόρων μεταλλοπρωτεϊνών έχουν συσχετισθεί με νεφρικές ασθένειες συμπεριλαμβανομένης της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας. Ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις τα ευρήματα των μελετών έρχονται σε αντιπαράθεση μεταξύ τους, καθιστώντας δύσκολη την ασφαλή εξαγωγή συμπερασμάτων. Άλλη οικογένεια πρωτεϊνών που έχει συσχετισθεί με τη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια είναι η ADAM (A Disintegrin And Metalloenzymes) οικογένεια[49], στην οποία περιλαμβάνονται 21 πρωτεΐνες, οι περισσότερες εκ των οποίων συνδέονται με τη μεμβράνη και είναι υπεύθυνες για το κόψιμο αυξητικών παραγόντων ή χημοκινών. Συμμετέχουν στην επούλωση πληγών, στην ανάπτυξη και στις φλεγμονές[50-52]. Η απουσία ή η υπερέκφραση ορισμένων ενζύμων της οικογένειας ADAM (κυρίως της πρωτεάσης ADAM17) μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη διαφόρων τύπων χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας[53] Επίσης, άλλες πρωτεάσες όπως η Ν αμινοπεπτιδάση [54], η διπεπτιδυλική πεπτιδάση IV [55] και οι πρωτεάσες πήξης [56] έχουν συσχετισθεί με νεφρικές ασθένειες.

A.4 Αναγνώριση βιοδεικτών

Τα κατάλληλα δείγματα νεφρικών ιστών για τη πραγματοποίηση πειραματικών αναλύσεων δεν είναι εύκολα διαθέσιμα. Για το λόγο αυτό, η χρήση βιολογικών υγρών όπως τα ούρα και το πλάσμα αίματος είναι περισσότερο κατάλληλη για την αναγνώριση βιοδεικτών, ειδικών για τη διάγνωση και για τη πρόγνωση ασθενειών συγκριτικά με τις νεφρικές βιοψίες, χάρη στη μη διεισδυτική συλλογή τους[57-59]. Τα ούρα έχουν χαρακτηριστεί ως "υγρή βιοψία" των νεφρών και της ουρογεννητικής οδού και παρουσιάζουν ορισμένα πλεονεκτήματα ως πηγή βιοδεικτών μέσω πρωτεομικής. Εκτός από την εύκολη και χωρίς επεμβατικές διαδικασίες συλλογή τους, άλλα πλεονεκτήματα είναι ότι τα ούρα είναι λιγότερο πολύπλοκα από το αίμα με αποτέλεσμα η προετοιμασία των δειγμάτων να είναι πιο απλή, μπορούν να αποθηκευθούν για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία -20 °C χωρίς σημαντική αλλοίωση του πρωτεόματός τους [60]. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι η φύλαξή τους ακόμα και για 3 ημέρες στους 4 °C ή για 6 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου δεν είχε κάποια σημαντική επίπτωση στο πρωτέομα των δειγμάτων [61]. Το πρωτέομα του ουροποιητικού συστήματος είναι αρκετά σταθερό, πιθανότατα λόγω του μεγάλου χρονικού διαστήματος που μεσολαβεί μεταξύ της διέλευσης των ούρων στην ουροδόχο κύστη και τη συλλογή τους, το οποίο επιτρέπει την επαρκή πρωτεολυτική επεξεργασία των ούρων από τις ενδογενείς πρωτεάσες στους 37 °C. Παρόλα αυτά, η αναγνώριση βιοδεικτών σχετικών με μια ασθένεια στα ούρα εμφανίζει κάποιες δυσκολίες, καθώς παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στο πρωτέομα κατά τη διάρκεια της ημέρας. Αυτές οι αλλαγές προκαλούνται από μεταβολές στη διαίτα, από μεταβολικές ή καταβολικές διεργασίες, από τον κερκαδικό ρυθμό, από την άσκηση καθώς και από τα επίπεδα διαφόρων ορμονών[62]. Το πρόβλημα αυτό περιορίζεται σε κάποιο βαθμό καθώς η δειγματοληψία πραγματοποιείται τις ίδιες χρονικές στιγμές, με προτίμηση τη λήψη των δεύτερων πρωινών ούρων[63].

Προς το παρόν, η πλειονότητα των μελετών σχετικά με την αναγνώριση βιοδεικτών για τη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια επικεντρώνεται στο ρόλο μιας πρωτεΐνης κάθε φορά. Η μοριακή πολυπλοκότητα αυτής της νόσου, όμως, είναι τέτοια που θέτει υπό αμφισβήτηση την αποτελεσματικότητα των μεμονωμένων βιοδεικτών[64]. Οι

μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων, διαταραχές στην πήξη του αίματος, ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, ασβεστοποίηση των αγγείων λόγω ελαττωμένου μεταβολισμού ασβεστίου και φωσφόρου, αυξημένο οξειδωτικό στρες και φλεγμονές [65-68]. Έτσι, με σκοπό τη μελέτη της παθοφυσιολογίας πολύπλοκων ασθενειών όπως η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και ώστε να γίνει καλύτερη εκμετάλλευση των διαθέσιμων δεδομένων από διάφορες ομικές προσεγγίσεις, προτείνεται μια ολιστική προσέγγιση βιολογίας συστημάτων. Η προσέγγιση αυτή έχει ως στόχο τη μελέτη και κατανόηση των βιολογικών συστημάτων εξετάζοντάς τα ως μια ενιαία οντότητα, χωρίς να επικεντρώνεται περισσότερο στα επιμέρους τμήματά της [69], 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.

A.5 Πρωτεομική- Πεπτιδομική- Συνδυασμός δεδομένων

Οι ομικές τεχνολογίες- προσεγγίσεις χρησιμοποιούνται ευρέως στα πλαίσια της βιολογίας συστημάτων. Η πρωτεομική είναι η μεγάλης κλίμακας μελέτη των πρωτεϊνών ενός κυττάρου, ιστού ή ολόκληρου οργανισμού ενώ πρωτέομα καλείται το σύνολο των πρωτεϊνών. Το πρωτέομα ενός δείγματος μελετάται αφού προηγουμένως έχει υποστεί θρυψινοποίηση, κατεργασία με ειδικό ένζυμο δηλαδή (θρυψίνη), που διασπά τις πρωτεΐνες σε μικρότερα τμήματα- πεπτίδια, ώστε να καταστεί δυνατή η ανάλυσή τους. Η πεπτιδομική (peptidomics) αποτελεί ένα αρκετά νέο τομέα, παρακλάδι της πρωτεομικής, που ασχολείται με τη μελέτη των ενδογενώς παραγόμενων πρωτεϊνικών τμημάτων. Οι δυο αυτές ομικές προσεγγίσεις χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην ανίχνευση βιοδεικτών για διάφορες ασθένειες μεταξύ των οποίων και οι νεφρικές[70]. Κύρια διαφορά των 2 προσεγγίσεων είναι ότι στη πεπτιδομική δεν πραγματοποιείται κάποιου είδους θραύση των πεπτιδικών τμημάτων όπως συμβαίνει στην πρωτεομική όπου υπάρχει θρυψινοποίηση πριν την ανάλυση. Επομένως, η πεπτιδομική μελετάει πεπτίδια που απαντώνται φυσικά σε

ένα δείγμα ενώ η πρωτεομική μελετά πεπτίδια που τεχνητά έχουν δημιουργηθεί μέσω πρωτεόλυσης με το ένζυμο θρυψίνη.

Όπως η πρωτεομική, έτσι και η πεπτιδομική χρησιμοποιεί αναλυτικές μεθόδους όπως η φασματομετρία μάζας για την ανάλυση των δειγμάτων. Λόγω του μεγάλου όγκου δεδομένων που προκύπτει ύστερα από την ανάλυση των δειγμάτων, απαιτείται στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω κατάλληλων βιοπληροφορικών εργαλείων. Σημαντικό στοιχείο των ομικών τεχνολογιών, είναι ότι η ανάλυση των δειγμάτων είναι τόσο ποιοτική όσο και ποσοτική, γεγονός που δίνει επιπλέον πληροφορίες για τις ιδιότητες του εξεταζόμενου συστήματος.

Αναπόσπαστο στοιχείο των περισσότερων σύγχρονων ερευνητικών προγραμμάτων βιοϊατρικής αποτελεί η εφαρμογή τεχνολογιών υψηλής απόδοσης, η οποία παράγει έναν αρκετά μεγάλο όγκο δεδομένων. Κύριο μέλημα, επομένως, αποτελεί η ανάλυση του μεγάλου όγκου δεδομένων, ο οποίος πολλές φορές μπορεί να προέρχεται από διαφορετικές ερευνητικές μεθόδους. Ο συνδυασμός ετερογενών δεδομένων είναι γνωστός στη διεθνή βιβλιογραφία ως data integration, ενώ ο όρος χρησιμοποιείται και στη περίπτωση συνδυαστικής ανάλυσης δεδομένων που έχουν προέλθει από διαφορετικές ομικές προσεγγίσεις. Απαιτεί τη χρήση κατάλληλων υπολογιστικών προγραμμάτων για την κανονικοποίηση των δεδομένων και την κατασκευή μοντέλων που αποτυπώνουν το σύνολο των δεδομένων και καθιστά ικανή την ανίχνευση υποκείμενων φαινομένων, ακόμα και βιολογικών αρχών που δεν γίνονται αντιληπτά κατά την εξέταση μεμονωμένων σετ δεδομένων[71, 72]. Τα δεδομένα αυτά συγκεντρώνονται σε εξειδικευμένες βάσεις δεδομένων. Πρόσφατα, δημιουργήθηκε εξειδικευμένη βάση με δεδομένα πρωτεομικής και πεπτιδομικής που σχετίζονται με τη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και την επιδείνωσή της [73], ενισχύοντας τη διαθεσιμότητα δεδομένων για συνδυαστική ανάλυση.

A.6. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ταυτοποίηση φυσικά απαντόμενων νεφρικών πεπτιδίων και βασιζόμενοι σε αυτά τα δεδομένα, η πρόβλεψη πρωτεασών που σχετίζονται με την επιδείνωση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας. Η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια αποτελεί μια σοβαρή νόσο που πλήττει μεγάλο τμήμα του παγκόσμιου πληθυσμού. Μέχρι σήμερα, δεν έχουν ανιχνευθεί βιοδείκτες κατάλληλοι για τη πρόγνωση της επιδείνωσης της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας. Η πιθανή συμμετοχή των πρωτεασών στη παθοφυσιολογία της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης πολυάριθμων ερευνητικών εργασιών. Για το λόγο αυτό, προσπαθήσαμε να ελέγξουμε αν υπάρχουν νεφρικές πρωτεάσες που εμφανίζουν διαφορετική έκφραση μεταξύ ασθενών χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας που εμφάνισαν επιδείνωση και ασθενών όπου δεν υπήρξε επιδείνωση με τη προοπτική της περαιτέρω χρήσης τους ως προγνωστικούς βιοδείκτες. Πιο συγκεκριμένα, έγινε συνδυαστική ανάλυση πρωτεϊνικών και πεπτιδικών δεδομένων τα οποία προέρχονταν από δείγματα ούρων και πλάσματος αίματος, ξεπερνώντας με τον τρόπο αυτό την ανάγκη ανάλυσης δειγμάτων νεφρικού ιστού. Τα δείγματα αυτά προέρχονταν από ασθενείς χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας που εμφάνισαν επιδείνωση και από ασθενείς που δεν εμφάνισαν επιδείνωση. Στόχος ήταν η αναγνώριση πεπτιδικών τμημάτων που εμφανίζονται μόνο στο σετ πεπτιδικών δεδομένων από δείγματα ούρων και εκφράζονται διαφορετικά μεταξύ των δυο κατηγοριών ασθενών. Τέλος, τα νεφροειδικά και διαφορετικά εκφραζόμενα πεπτιδικά τμήματα χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω για τη πρόβλεψη των πρωτεασών που είναι υπεύθυνα για τη παραγωγή των πεπτιδίων αυτών μέσω του εργαλείου βιοπληροφορικής Proteasix. Παράλληλα, έγινε και προσπάθεια εκτίμησης της τάσης ενεργότητας των προβλεπόμενων πρωτεασών ανάλογα με την τάση έκφρασης των παραγόμενων από αυτά, πεπτιδικών τμημάτων, ώστε να προσδιορισθούν οι αλλαγές που παρατηρούνται κατά την επιδείνωση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας.

B. Υλικά και Μέθοδοι

B.1. Δεδομένα

B.1.1 Δεδομένα από δείγματα ούρων πεπτιδομικής προσέγγισης

Τα δεδομένα πεπτιδομικής από δείγματα ούρων (μάζες και ακολουθίες πεπτιδίων) λήφθηκαν από τη βάση δεδομένων Human Urine Proteome Database [74, 75]. Όλα τα δεδομένα προήλθαν από προηγούμενες μελέτες και από ανώνυμα δείγματα. Συνολικά, δεδομένα από 1721 ασθενείς με αρχικά υπολογισμένο ρυθμό σπειραματικής διήθησης (eGFR) $<60 \text{ mL/min/1.73m}^2$ χρησιμοποιήθηκαν. Από αυτούς, οι 214 έφτασαν σε τιμή $\text{eGFR} \geq 60 \text{ mL/min/1.73m}^2$ μέσα σε διάστημα 3 ετών, ενώ το 65% από το σύνολο των ασθενών εμφάνισε σακχαρώδη διαβήτη. Οι συνεργάτες του ερευνητικού προγράμματος iMode-CKD πραγματοποίησαν ανάλυση των παραπάνω δειγμάτων μέσω τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (CE-MS, Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry) και μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) συζευγμένης με διαδοχική φασματομετρία μάζας (MS-MS, Mass Spectrometry- Mass Spectrometry). Η ταυτοποίηση των πεπτιδίων έγινε με τη χρήση της βάσης δεδομένων SEQUEST. Στη συνέχεια πραγματοποίησαν στατιστική ανάλυση (Wilcoxon test, P-value <0.05) για την αναγνώριση διαφορικά εκφραζόμενων πεπτιδίων μεταξύ ασθενών όπου η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια εμφάνισε επιδείνωση και ασθενών χωρίς επιδείνωση. Μόνο πεπτίδια με συχνότητα τουλάχιστον 70% σε μια από τις δυο κατηγορίες ασθενών (με ή χωρίς επιδείνωση) χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση για τη διαφορική έκφραση.

B.1.2. Δεδομένα από δείγματα πλάσματος πεπτιδομικής προσέγγισης

Οι συνεργάτες στο ερευνητικό πρόγραμμα iMode-CKD ανέλυσαν το πεπτίδομα (σύνολο φυσικά απαντόμενων πεπτιδίων) από δείγματα πλάσματος αίματος. Πιο συγκεκριμένα, 132 δείγματα πλάσματος (17 από ασθενείς καρδιαγγειακών παθήσεων, 53 από ασθενείς χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας που υποβάλλονταν σε

θεραπεία αιμοκάθαρσης και 62 δείγματα υγιών ατόμων) αναλύθηκαν μέσω CE-MS και HPLC-MS/MS. Η ταυτοποίηση των πεπτιδίων έγινε με τη χρήση της βάσης δεδομένων SEQUEST.

B.1.3. Δεδομένα από δείγματα ούρων πρωτεομικής προσέγγισης

Πραγματοποιήθηκε συλλογή δειγμάτων ούρων από ασθενείς ηλικίας 17 έως 89 ετών στη νεφρολογική κλινική του πανεπιστημιακού νοσοκομείου της Γάνδης (Βέλγιο) κατά τη χρονική περίοδο 17/1/2011 μέχρι 7/7/2015. Ο αρχικός πληθυσμός ασθενών ήταν 491, αποκλείστηκαν όμως στη συνέχεια ασθενείς που είτε είχαν υποστεί μεταμόσχευση νεφρού, είτε υποβάλλονταν σε θεραπεία νεφρικής υποκατάστασης (αιμοκάθαρση ή περιτοναϊκή κάθαρση), είτε δεν υπήρχαν επαρκή δεδομένα από μεταγενέστερες εξετάσεις τους (τουλάχιστον 3 μετρήσεις κρεατινίνης στο αίμα και 2 χρόνια παρακολούθησης). Επίσης, αποκλείστηκαν ασθενείς με κληρονομική νεφροπάθεια, με κακοήθειες ή με παρουσία διαμεσοσωληνιακών ασθενειών. Ως αποτέλεσμα, ο τελικός αριθμός ασθενών που εξετάστηκαν έφτανε τους 64. Οι συνεργάτες του ερευνητικού προγράμματος iMode-CKD πραγματοποίησαν ανάλυση των παραπάνω δειγμάτων ούρων μέσω υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με διαδοχική φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry).

B.1.4. Δεδομένα από δείγματα πλάσματος πρωτεομικής προσέγγισης

Όλες οι πεπτιδικές αλληλουχίες ύστερα από θρυψινοποίηση των πρωτεϊνών, που αναγνωρίστηκαν στο πρωτόμα πλάσματος να σχετίζονται με αλλαγές στα στάδια της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας λήφθηκαν από την παρακάτω μελέτη [58]. Στη συγκεκριμένη μελέτη, πραγματοποιήθηκε σύγκριση του πρωτεόματος στο πλάσμα αίματος μεταξύ 14 ασθενών χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας σταδίου 2-3 και 15 ασθενών σταδίου 5 (τελικό στάδιο νεφρικής νόσου) που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση με υψηλής ανάλυσης υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με διαδοχική φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, 333 πρωτεΐνες

εμφάνισαν διαφορετική έκφραση μεταξύ των δυο εξεταζόμενων ομάδων. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε και επαλήθευση ορισμένων αποτελεσμάτων μέσω της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA σε ασθενείς διαφόρων σταδίων χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας.

B.1.5. Δεδομένα από Peptide Atlas

Όλες οι πεπτιδικές αλληλουχίες ύστερα από θρυψινοποίηση, που αναγνωρίστηκαν στο πλάσμα αίματος και στα ούρα λήφθηκαν από τη βάση δεδομένων Peptide Atlas[76, 77], θεωρώντας ότι αποτελεί αξιόπιστη πηγή διαθέσιμη στο κοινό σχετικά με δεδομένα πρωτεομικής. Τα δεδομένα αυτά, έχουν προέλθει από ένα μεγάλο αριθμό πειραμάτων πρωτεομικής με τη χρήση διαδοχικής φασματομετρίας μάζας (MS/MS).

B.2. Πρόβλεψη νεφρο-ειδικών πεπτιδίων

Για κάθε ένα από τα παραπάνω σετ δεδομένων, η κάλυψη της πρωτεϊνικής ακολουθίας και η συχνότητα (δηλαδή το ποσοστό των δειγμάτων στο σετ δεδομένων στο οποίο ανιχνεύθηκε το πεπτίδιο) των πεπτιδίων λήφθηκαν υπόψη. Με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού στη γλώσσα προγραμματισμού R, σχεδιάστηκαν γραφήματα που παρουσίαζαν την κάλυψη και τη συχνότητα των υπό μελέτη πεπτιδίων. Η συχνότητα κάθε πεπτιδίου παρουσιάστηκε σε κλίμακα χρωμάτων. Πιο συγκεκριμένα, i) πεπτίδια με χρώμα μπλε βρέθηκαν σε ποσοστό τουλάχιστον >75% επί των δειγμάτων, ii) με χρώμα πράσινο σε ποσοστό 50%-75%, iii) με χρώμα κόκκινο σε ποσοστό 25%-50%, iv) με χρώμα πορτοκαλί σε ποσοστό <25% ενώ v) με μαύρο χρώμα απεικονίζονται αλληλουχίες που δεν υπήρχαν διαθέσιμες πληροφορίες για τη συχνότητα εμφάνισής τους (ισχύει για τα δεδομένα που λήφθηκαν από τη βάση δεδομένων Peptide Atlas).

Τα κριτήρια αποκλεισμού για το χαρακτηρισμό ενός πεπτιδίου από το σετ δεδομένων πεπτιδομικής από δείγματα ούρων ως νεφρο-ειδικού είναι τα παρακάτω: i) η συχνότητα του πεπτιδίου ήταν μικρότερη από 50% (χρωματισμένα με κόκκινο ή πορτοκαλί χρώμα), ii) η φυσικά απαντόμενη πεπτιδική ακολουθία

εμφάνιζε επικάλυψη με πεπτίδια που είχαν προκύψει ύστερα από θρυψινοποίηση, iii) πανομοιότυπη αλληλουχία εμφανιζόταν σε δεδομένα φυσικά απαντόμενων πεπτιδίων σε δείγματα ούρων και πλάσματος αίματος, iv) ολόκληρη η πεπτιδική ακολουθία ενός φυσικά απαντόμενου πεπτιδίου στα ούρα εμφανιζόταν ως μέρος ενός μεγαλύτερου πεπτιδικού τμήματος από το σετ των φυσικά απαντόμενων πεπτιδίων στο πλάσμα. Γενικά, ένα πεπτίδιο χαρακτηρίστηκε ως νεφρο-ειδικό εάν ανιχνευόταν μόνο ως φυσικά απαντόμενο στα ούρα και σε κανένα άλλο σετ -- δεδομένων. Η μερική επικάλυψη στην αλληλουχία μεταξύ πεπτιδίων του σετ δεδομένων πεπτιδομικής στα ούρα και του σετ δεδομένων πεπτιδομικής στο πλάσμα αίματος έγινε αποδεκτή, ωστόσο στην περίπτωση αυτή, η πρόβλεψη χαρακτηρίστηκε ως χαμηλής εμπιστοσύνης.

Τα νεφρο-ειδικά πεπτίδια χαρακτηρίστηκαν περαιτέρω ως διαφορετικά εκφραζόμενα, εάν παρουσίαζαν διαφορετική έκφραση μεταξύ ασθενών χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας με επιδείνωση συγκριτικά με ασθενείς όπου η νόσος δεν εμφάνιζε επιδείνωση στο σετ δεδομένων με τα φυσικά απαντόμενα πεπτίδια στα ούρα.

B.3. Πρόβλεψη πρωτεασών -εκτίμηση ρύθμισης πρωτεολυτικής ενεργότητας

Τα διαφορετικά εκφραζόμενα, φυσικά απαντόμενα στα ούρα πεπτίδια, χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω για τη πρόβλεψη πρωτεασών που πιθανά συμμετέχουν στην παραγωγή τους. Η πρόβλεψη πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού προγράμματος Proteasix (proteasix.org)[78]. Το πρόγραμμα αυτό είναι ελεύθερα προσβάσιμο και επιτρέπει την *in silico* πρόβλεψη συμμετοχής πρωτεασών κατά την παραγωγή φυσικά απαντόμενων πεπτιδίων. Λήφθηκαν υπόψη μόνο πρωτεάσες για τις οποίες η πρόβλεψη χαρακτηριζόταν ως υψηλής εμπιστοσύνης (high confidence) από το πρόγραμμα. Ο χαρακτηρισμός αυτός αφορούσε περιπτώσεις όπου το "κόψιμο" ενός πεπτιδικού τμήματος από μια πρωτεάση σε μια συγκεκριμένη θέση είτε είχε παρατηρηθεί πειραματικά είτε είχε προβλεφθεί με μεγάλη πιθανότητα να συμβεί. Η ρύθμιση της ενεργότητας των πρωτεασών

εκτιμήθηκε βάση της τάσης έκφρασης των πεπτιδίων που προβλέφθηκε ότι έχουν ως στόχο. Με τον τρόπο αυτό, η μειωμένη αφθονία των φυσικά απαντόμενων πεπτιδίων στα ούρα σε ασθενείς χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας με επιδείνωση συγκριτικά με ασθενείς χωρίς επιδείνωση, οδήγησε στην εκτίμηση για μειωμένη ενεργότητα των σχετιζόμενων πρωτεασών. Αντίθετα, αυξημένη αφθονία των πεπτιδίων λήφθηκε ως ενισχυμένη πρωτεολυτική ενεργότητα. Είναι άξιο αναφοράς, πως η εκτίμηση της ρύθμισης της ενεργότητας των πρωτεασών πραγματοποιήθηκε μόνο για τις πρωτεάσες που είχαν ως στόχο πεπτίδια, για τα οποία και οι δύο θέσεις κοπής, αμινο- και καρβοξυ-τελική είχαν αναγνωρισθεί ως στόχοι πρωτεασών από το πρόγραμμα Proteasix.

Γ. Αποτελέσματα

Γ.1. Αναγνώριση πεπτιδίων συγκεκριμένων για τους νεφρούς

Πραγματοποιήθηκε εξέταση του πρωτεόματος και του πεπτιδόματος από δείγματα ούρων και πλάσματος αίματος για τη πρόβλεψη φυσικά απαντόμενων πεπτιδίων που προέρχονται ειδικά από τους νεφρούς. Για να συμβεί αυτό, δεδομένα από διάφορες ομικές προσεγγίσεις εξετάστηκαν συνδυαστικά. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν δεδομένα από ούρα και πλάσμα αίματος για πεπτίδια που απαντώνται φυσικά (πεπτιδομική προσέγγιση) αλλά και ύστερα από θρυψινοποίηση (πρωτεομική προσέγγιση). Λήφθηκαν υπόψη η κάλυψη της πρωτεϊνικής ακολουθίας από το κάθε πεπτίδιο, η συχνότητα εμφάνισης κάθε πεπτιδίου καθώς και η σχέση του πεπτιδίου με την επιδείνωση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας. Ένα πεπτίδιο θεωρήθηκε ως νεφρο-ειδικό εάν αναγνωριζόταν μονάχα ως φυσικά απαντόμενο στα ούρα (πεπτιδομική προσέγγιση) και δεν συμφωνούσε με κάποιο από τα κριτήρια αποκλεισμού, όπως αυτά περιγράφηκαν στην ενότητα Υλικά-Μέθοδοι.

Ένας από τους κύριους στόχους της έρευνας ήταν η αναγνώριση πρωτεολυτικών γεγονότων που λαμβάνουν μέρος αποκλειστικά στους νεφρούς (νεφρο-ειδικά πεπτίδια) και σχετίζονται με την επιδείνωση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας. Για το σκοπό αυτό, ως κύριοι στόχοι της παρούσας ανάλυσης θεωρήθηκαν 18 πρωτεΐνες (**Πίνακας Γ1**), για τις οποίες φυσικά απαντόμενα πεπτίδια στα ούρα είχαν βρεθεί ως διαφορετικά εκφραζόμενα μεταξύ ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια που εμφάνιζαν επιδείνωση και άλλων όπου δεν εμφάνιζαν επιδείνωση.

Πίνακας Γ1. Η λίστα των 18 πρωτεϊνών που αποτέλεσαν τους κύριους στόχους της ανάλυσης. Για τις παρακάτω πρωτεΐνες, τουλάχιστον ένα διαφορεικά εκφραζόμενο πεπτίδιο ανιχνεύθηκε μεταξύ ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια που εμφάνιζαν επιδείνωση και άλλων όπου δεν εμφάνιζαν επιδείνωση.

Ταυτότητα πρωτεΐνης σε Uniprot	Όνομα εισόδου πρωτεΐνης	Σύμβολο πρωτεΐνης	Όνομα πρωτεΐνης
Q8NA66	CNBD1_HUMAN	CNBD1	Cyclic nucleotide-binding domain-containing protein 1
P02452	CO1A1_HUMAN	COL1A1	Collagen alpha-1(I) chain
P08123	CO1A2_HUMAN	COL1A2	Collagen alpha-2(I) chain
P02458	CO2A1_HUMAN	COL2A1	Collagen alpha-1(II) chain
P02461	CO3A1_HUMAN	COL3A1	Collagen alpha-1(III) chain
Q01955	CO4A3_HUMAN	COL4A3	Collagen alpha-3(IV) chain
P12107	COBA1_HUMAN	COL11A1	Collagen alpha-1(XI) chain
P13942	COBA2_HUMAN	COL11A2	Collagen alpha-2(XI) chain
Q05707	COEA1_HUMAN	COL14A1	Collagen alpha-1(XIV) chain
Q07092	COGA1_HUMAN	COL16A1	Collagen alpha-1(XVI) chain
Q17RW2	COOA1_HUMAN	COL24A1	Collagen alpha-1(XXIV) chain
P02671	FIBA_HUMAN	FGA	Fibrinogen alpha chain
P54710	ATNG_HUMAN	FXVD2	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit gamma
P68871	HBB_HUMAN	HBB	Hemoglobin subunit beta
P15941	MUC1_HUMAN	MUC1	Mucin-1
P08590	MYL3_HUMAN	MYL3	Myosin light chain 3
P07911	UROM_HUMAN	UMOD	Uromodulin
O15240	VGF_HUMAN	VGF	Neurosecretory protein VGF

Ύστερα από συνδυαστική ανάλυση των δεδομένων από τις διαφορετικές ομικές προσεγγίσεις, προβλέφθηκε ένα σύνολο 33 πεπτιδίων ως ειδικά για τα νεφρά, που ανήκουν στις 11 από τις 18 αρχικά εξεταζόμενες πρωτεΐνες (**Πίνακας Γ2** και **Συμπληρωματικός Πίνακας 1**). Από αυτό το σύνολο των 33 νεφρο-ειδικών πεπτιδίων, 13 βρέθηκαν ως διαφορετικά εκφραζόμενα μεταξύ ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια που εμφάνιζαν επιδείνωση και ασθενών όπου δεν εμφάνιζαν επιδείνωση (**Πίνακας Γ2** και **Συμπληρωματικός Πίνακας 1**).

Πίνακας Γ2. Ο αριθμός των προβλεπόμενων νεφρο-ειδικών πεπτιδικών αλληλουχιών. Τα πεπτίδια διακρίνονται σε μη διαφορετικά εκφραζόμενα πεπτίδια και σε διαφορετικά εκφραζόμενα πεπτίδια μεταξύ ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια που εμφάνιζαν επιδείνωση και ασθενών όπου δεν εμφάνιζαν επιδείνωση.

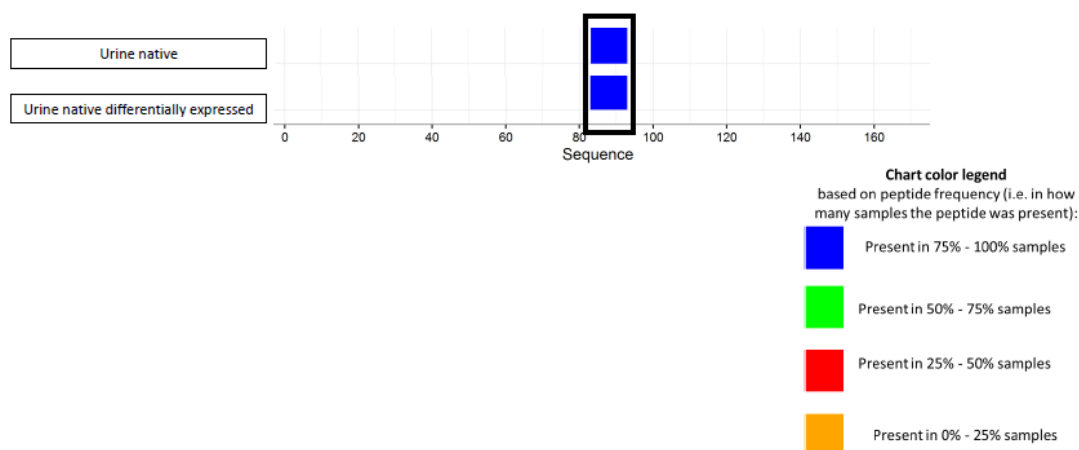
Ταυτότητα πρωτεΐνης σε Uniprot	Όνομα γονιδίου	Όνομα πρωτεΐνης	Μή διαφορεικά εκφραζόμενα πεπτίδια	Διαφορικά εκφραζόμενα πεπτίδια
H0YAN5	CNBD1	Cyclic nucleotide-binding domain-containing protein 1	0	1
P12107-3	COL11A1	Collagen alpha-1(XI) chain	2	1
P13942-5	COL11A2	Collagen alpha-2(XI) chain	0	1
Q07092-2	COL16A1	Collagen alpha-1(XVI) chain	2	2
P02452	COL1A1	Collagen alpha-1(I) chain	1	1
P08123	COL1A2	Collagen alpha-2(I) chain	3	1
Q17RW2	COL24A1	Collagen alpha-1(XXIV) chain	0	1
P02458-1	COL2A1	Collagen alpha-1(II) chain	1	0
P02461	COL3A1	Collagen alpha-1(III) chain	10	3
Q01955-2	COL4A3	Collagen alpha-3(IV) chain	1	1
P15941	MUC1	Mucin-1 subunit alpha	0	1

Τα περισσότερα νεφρο-ειδικά πεπτίδια για τα οποία υπήρξε πρόβλεψη μέσω της ανάλυσης μας, αποτελούν τμήματα διαφόρων τύπων κολλαγόνων.

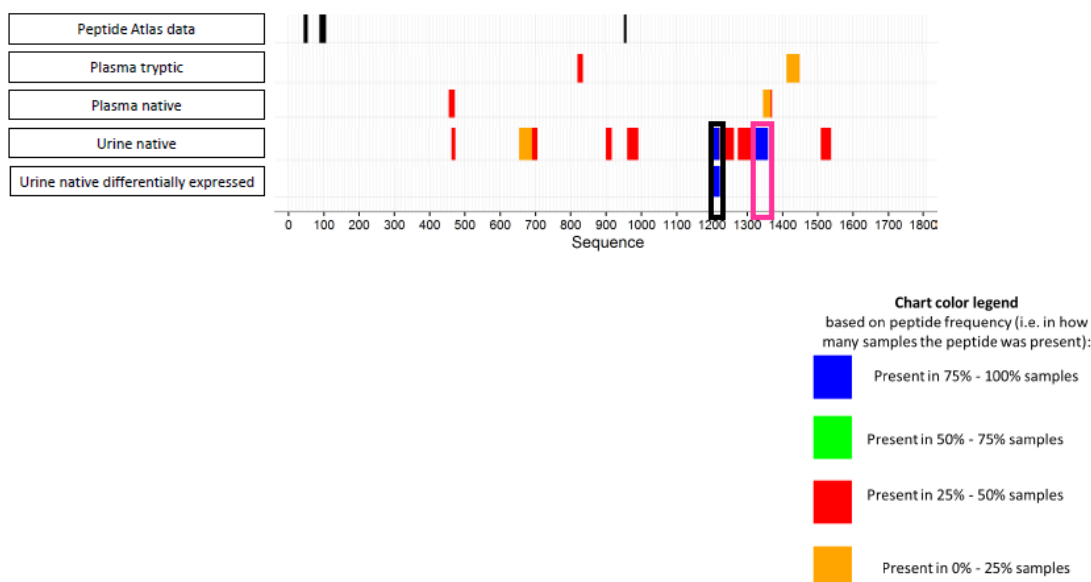
Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται σε μορφή γραφήματος οι ειδικές για τους νεφρούς πεπτιδικές αλληλουχίες. Ένα πεπτίδιο θεωρήθηκε νεφρο-ειδικό αν ήταν παρών μόνο ως φυσικά απαντόμενο στα ούρα και σε καμία άλλη από τις κατηγορίες δεδομένων. Επιπλέον, χαρακτηριζόταν ως διαφορεικά εκφραζόμενο εάν εμφάνιζε σημαντική διαφορά στην αφθονία σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια που εμφάνιζαν επιδείνωση συγκριτικά με εκείνους όπου δεν εμφάνιζαν επιδείνωση στα δεδομένα πεπτιδομικής στα ούρα. Η συχνότητα εμφάνισης παρουσιάζεται στα γραφήματα με δείκτη χρώματος, όπου: α) πεπτίδια με χρώμα μπλε βρέθηκαν σε ποσοστό τουλάχιστον >75% επί των δειγμάτων, β) με χρώμα πράσινο σε ποσοστό 50%-75%, γ) με χρώμα κόκκινο σε ποσοστό 25%-50%, δ) με χρώμα πορτοκαλί σε ποσοστό <25% ενώ ε) με μαύρο χρώμα απεικονίζονται αλληλουχίες που δεν υπήρχαν διαθέσιμες πληροφορίες για τη συχνότητα εμφάνισής τους. Οι αλληλουχίες που χαρακτηρίζονται ως νεφρο-ειδικές σημαίνονται στο εσωτερικό

ενός μαύρου κουτιού (πρόβλεψη υψηλής εμπιστοσύνης) ή ενός ροζ κουτιού στη περίπτωση μερικής επικάλυψης πεπτιδίων που βρίσκονταν στα δεδομένα πεπτιδομικής στα ούρα και στο πλάσμα αίματος (πρόβλεψη χαμηλής εμπιστοσύνης). Ο οριζόντιος άξονας αναπαριστά την αμινοξική ακολουθία της εκάστοτε πρωτεΐνης και το κάθε πεπτίδιο παρουσιάζεται υπό τη μορφή παραλληλόγραμμου που καλύπτει συγκεκριμένη περιοχή της πρωτεϊνικής ακολουθίας. Στον κατακόρυφο άξονα παρουσιάζονται τα διάφορα σετ δεδομένων που μελετήθηκαν στη παρούσα εργασία. Η γραμμή "Peptide Atlas data" περιέχει τα δεδομένα που λήφθηκαν από την ομώνυμη βάση δεδομένων. Οι γραμμές "Plasma tryptic" και "Urine tryptic" παρουσιάζουν τα δεδομένα πρωτεομικής προσέγγισης σε δείγματα πλάσματος αίματος και ούρων αντίστοιχα. Στις γραμμές με ένδειξη "Plasma native" και "Urine native" παρουσιάζονται τα δεδομένα πεπτιδομικής προσέγγισης σε δείγματα πλάσματος αίματος και ούρων. Τέλος, η γραμμή "Urine native differentially expressed" περιέχει τα πεπτίδια τα οποία εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά στην αφθονία τους μεταξύ ασθενών χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας με επιδείνωση και ασθενών χωρίς επιδείνωση. Περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τα σετ δεδομένων που μελετήθηκαν, παρουσιάζονται στην ενότητα Υλικά-Μέθοδοι. Για λόγους ευκολίας στην ανάγνωση και κατανόηση των γραφημάτων, για πεπτίδια που βρίσκονται σε παραπλήσιες θέσεις και επικαλύπτονται μεταξύ τους, επιλέχθηκε η εμφάνιση των πεπτιδίων ανάλογα με το βαθμό συχνότητας τους. Ισχύει, δηλαδή, η εξής σειρά προτεραιότητας των επικαλυπτόμενων πεπτιδίων: μπλε> πράσινο> κόκκινο> πορτοκαλί. Σε ορισμένες περιπτώσεις πρωτεϊνών, δεν υπήρχαν διαθέσιμα δεδομένα για ένα ή περισσότερα σετ δεδομένων με εξαίρεση το σετ πεπτιδομικής στα ούρα, στο οποίο βασίστηκε η ανάλυση.

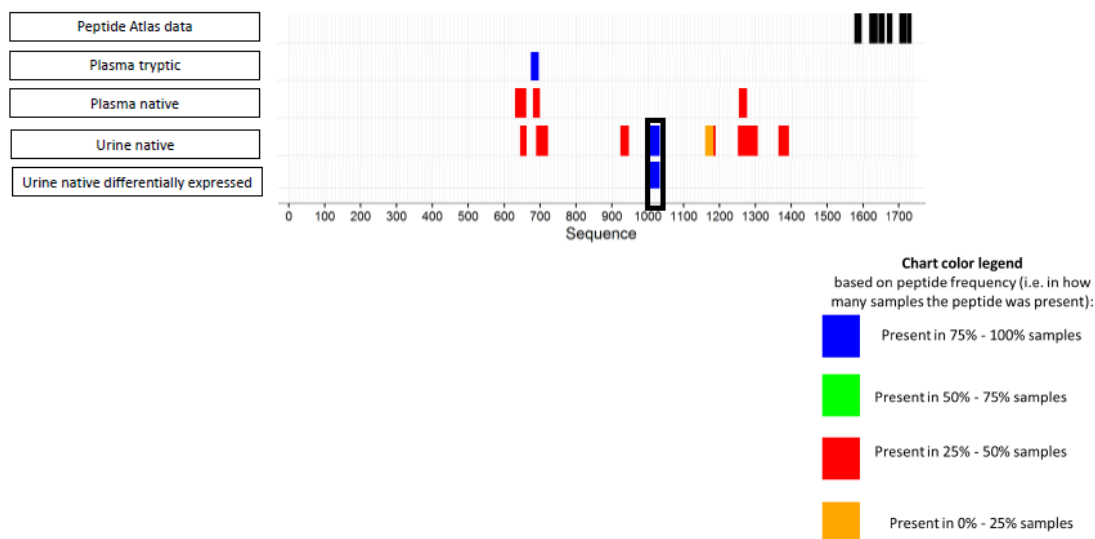
Εικόνα Γ1. Η συνδυαστική ανάλυση πρωτεϊνικών και πεπτιδικών δεδομένων για την πρωτεΐνη Cyclic nucleotide-binding domain-containing protein 1. Ανιχνεύθηκε ένα διαφορεικά εκφραζόμενο, νεφρο-ειδικό πεπτίδιο. Περιγραφή στο κείμενο παραπάνω.



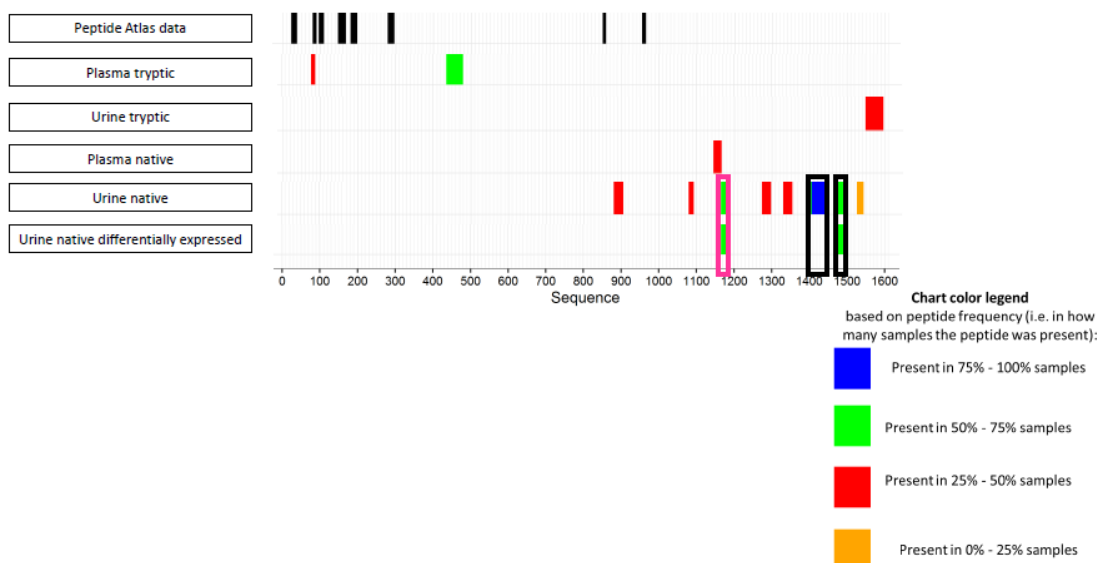
Εικόνα Γ2. Η συνδυαστική ανάλυση πρωτεϊνικών και πεπτιδικών δεδομένων για την πρωτεΐνη Collagen alpha-1(XI) chain. Ανιχνεύθηκαν 3 νεφρο-ειδικά πεπτίδια (τα 2 ήταν διαφορεικά εκφραζόμενα). Περιγραφή στο κείμενο παραπάνω.



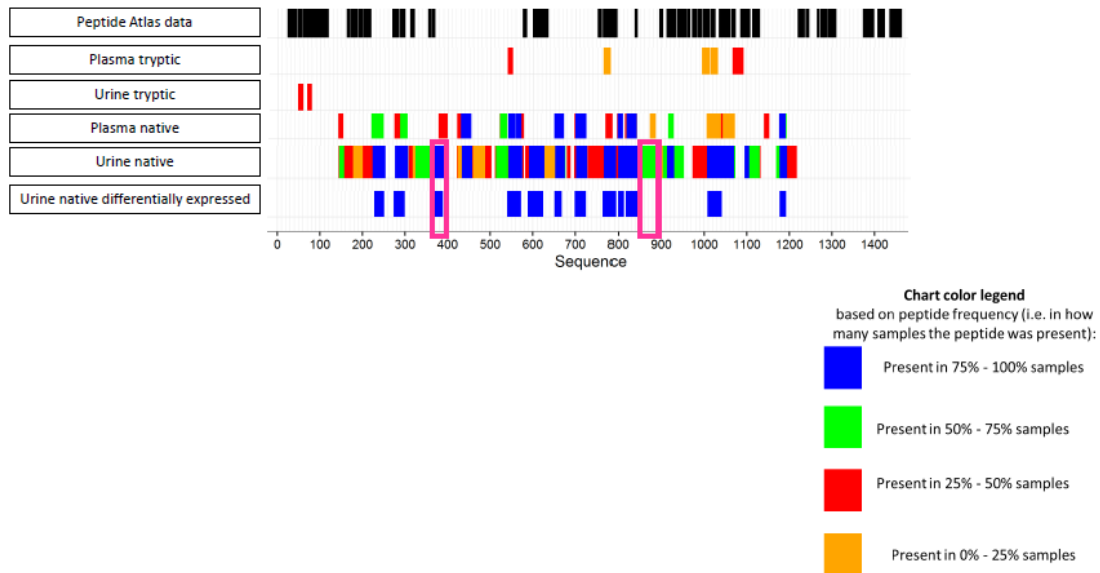
Εικόνα Γ3. Η συνδυαστική ανάλυση πρωτεϊνικών και πεπτιδικών δεδομένων για την πρωτεΐνη Collagen alpha-2(XI) chain. Ανιχνεύθηκε ένα μη διαφορικά εκφραζόμενο, νεφρο-ειδικό πεπτίδιο. Περιγραφή στο κείμενο παραπάνω.



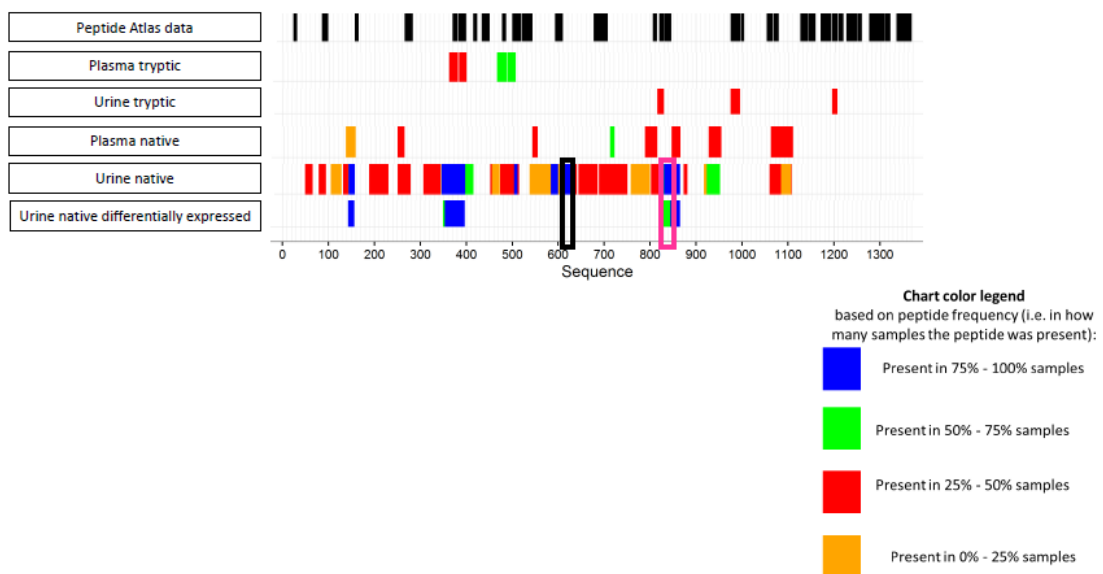
Εικόνα Γ4. Η συνδυαστική ανάλυση πρωτεϊνικών και πεπτιδικών δεδομένων για την πρωτεΐνη Collagen alpha-1(XVI) chain. Ανιχνεύθηκαν 4 νεφρο-ειδικά πεπτίδια (τα 2 ήταν διαφορικά εκφραζόμενα). Περιγραφή στο κείμενο παραπάνω.



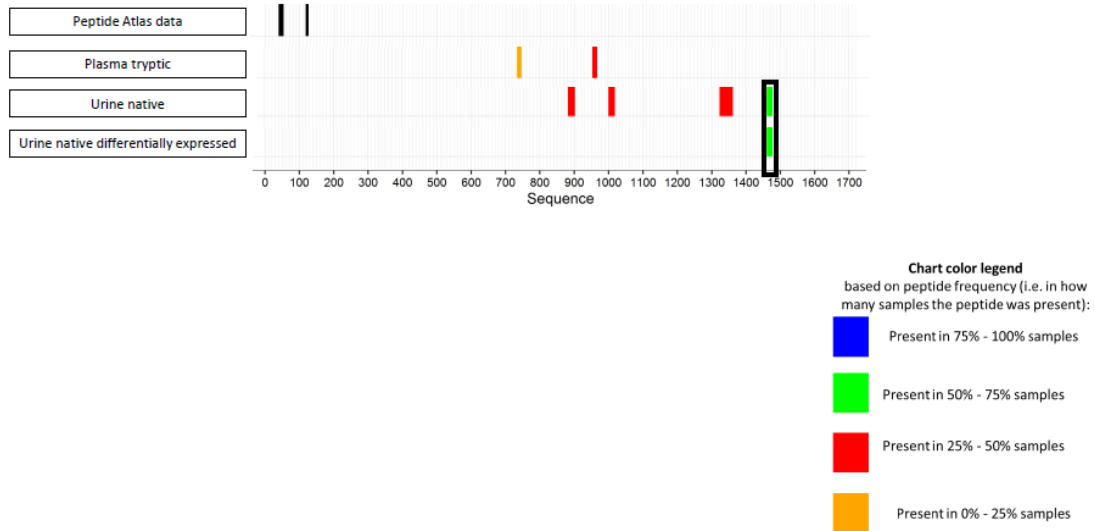
Εικόνα Γ5. Η συνδυαστική ανάλυση πρωτεϊνικών και πεπτιδικών δεδομένων για την πρωτεΐνη Collagen alpha-1(I) chain. Ανιχνεύθηκαν 2 νεφρο-ειδικά πεπτίδια (το 1 ήταν διαφορεικά εκφραζόμενο). Περιγραφή στο κείμενο παραπάνω.



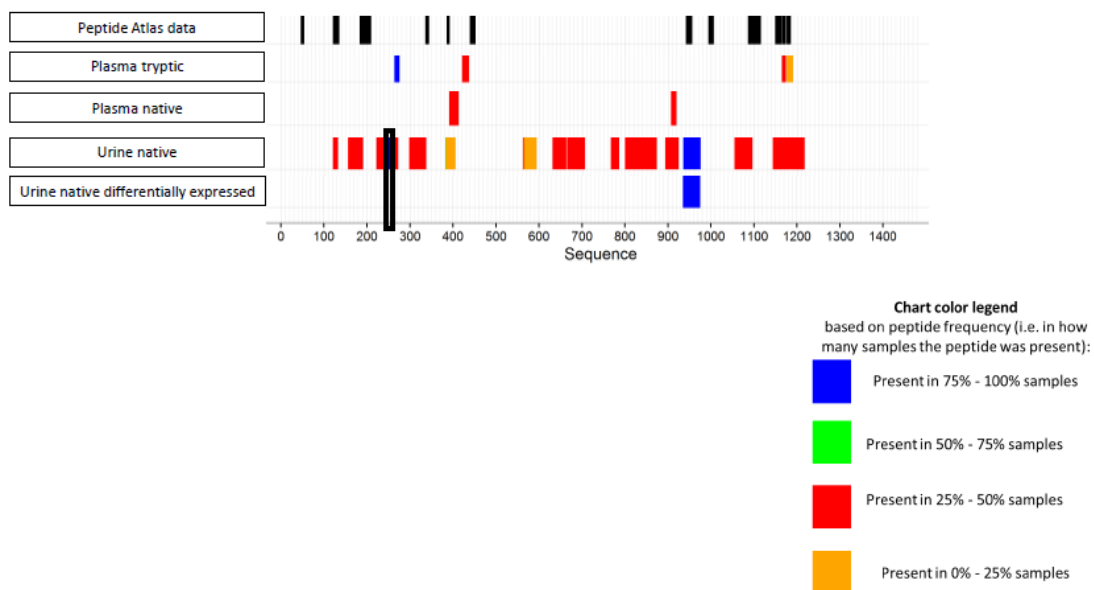
Εικόνα Γ6. Η συνδυαστική ανάλυση πρωτεϊνικών και πεπτιδικών δεδομένων για την πρωτεΐνη Collagen alpha-2(I) chain. Ανιχνεύθηκαν 4 νεφρο-ειδικά πεπτίδια (το 1 ήταν διαφορεικά εκφραζόμενο). Περιγραφή στο κείμενο παραπάνω.



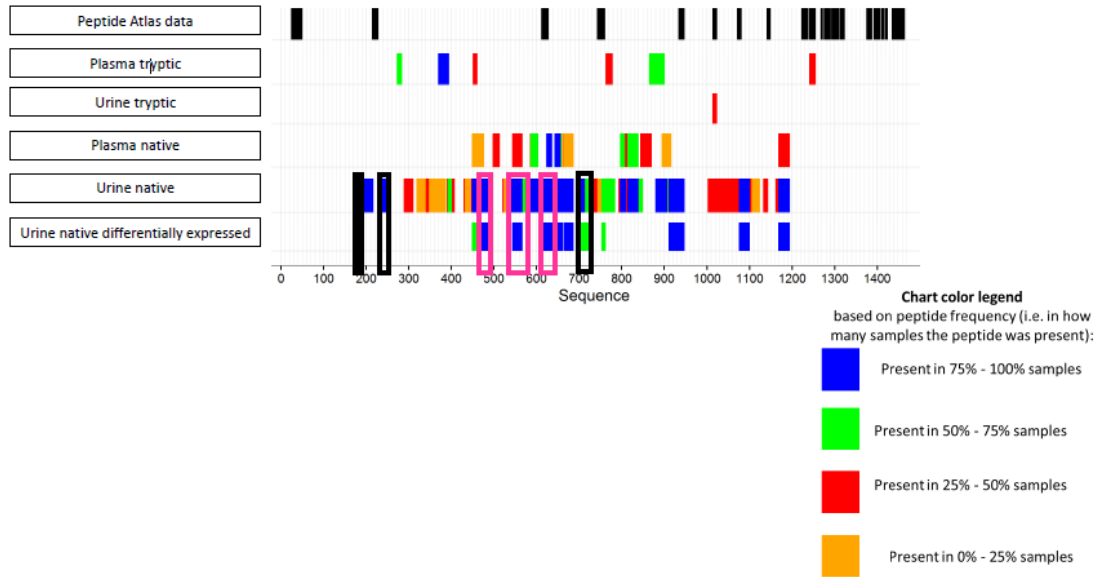
Εικόνα Γ7. Η συνδυαστική ανάλυση πρωτεϊνικών και πεπτιδικών δεδομένων για την πρωτεΐνη Collagen alpha-1(XXIV) chain. Ανιχνεύθηκε ένα διαφορικά εκφραζόμενο, νεφρο- ειδικό πεπτίδιο). Περιγραφή στο κείμενο παραπάνω.



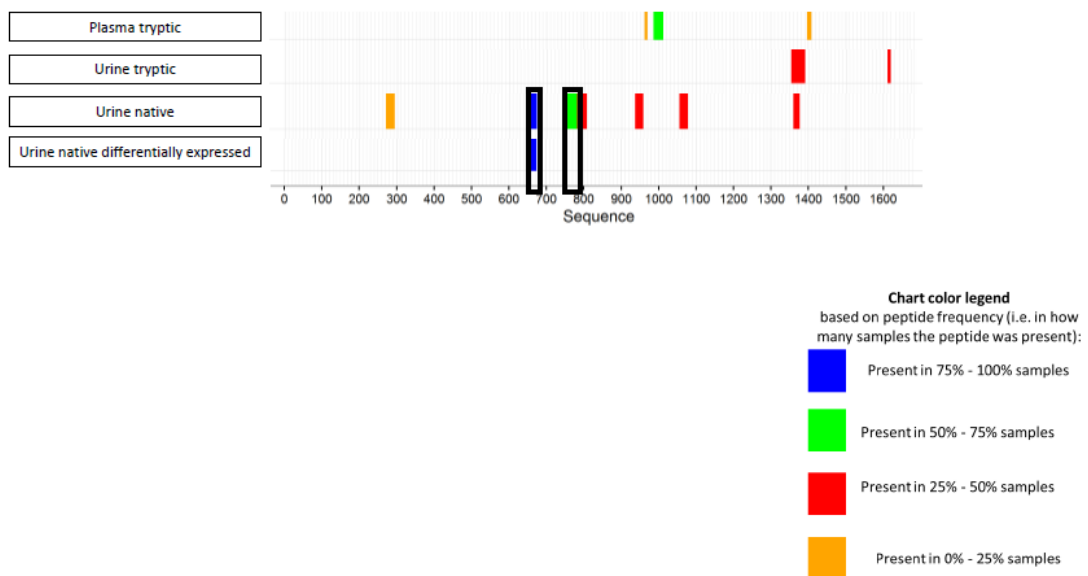
Εικόνα Γ8. Η συνδυαστική ανάλυση πρωτεϊνικών και πεπτιδικών δεδομένων για την πρωτεΐνη Collagen alpha-1(II) chain. Ανιχνεύθηκε ένα μη διαφορικά εκφραζόμενο, νεφρο-ειδικό πεπτίδιο. Περιγραφή στο κείμενο παραπάνω.



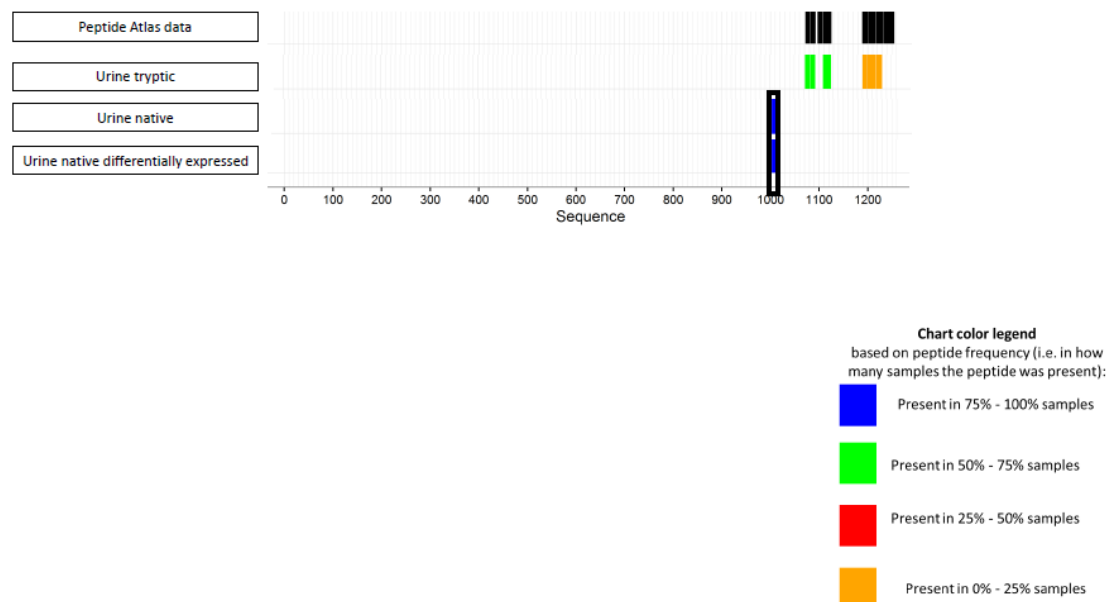
Εικόνα Γ9. Η συνδυαστική ανάλυση πρωτεϊνικών και πεπτιδικών δεδομένων για την πρωτεΐνη Collagen alpha-1(III) chain. Ανιχνεύθηκαν 13 νεφρο-ειδικά πεπτίδια (τα 3 ήταν διαφορετικά εκφραζόμενα). Περιγραφή στο κείμενο παραπάνω.



Εικόνα Γ10. Η συνδυαστική ανάλυση πρωτεϊνικών και πεπτιδικών δεδομένων για την πρωτεΐνη Collagen alpha-3(IV) chain. Ανιχνεύθηκαν 2 νεφροειδικά πεπτίδια (το 1 ήταν διαφορετικά εκφραζόμενο). Περιγραφή στο κείμενο παραπάνω.



Εικόνα Γ11. Η συνδυαστική ανάλυση πρωτεϊνικών και πεπτιδικών δεδομένων για την πρωτεΐνη Mucin-1 subunit alpha. Ανιχνεύθηκε ένα διαφορετικά εκφραζόμενο, νεφρο- ειδικό πεπτίδιο. Περιγραφή στο κείμενο παραπάνω.



Γ.2. Πρόβλεψη πρωτεασών με διαφορετική ενεργότητα σε ασθενείς χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας με επιδείνωση της νόσου

Ένα σύνολο 13 διαφορετικά εκφραζόμενων, νεφρο-ειδικών πεπτιδίων υποβλήθηκε σε περαιτέρω ανάλυση μέσω του εργαλείου βιοπληροφορικής Proteasix. Το εργαλείο αυτό είναι ικανό να προβλέπει πρωτεάσες που πιθανά λαμβάνουν μέρος στη παραγωγή συγκεκριμένων πεπτιδικών αλληλουχιών. Από τις πρωτεάσες που προβλέφθηκαν, λήφθηκαν υπόψη μόνο εκείνες για τις οποίες η κοπή της πεπτιδικής ακολουθίας σε συγκεκριμένη θέση είτε προβλέπεται με μεγάλη πιθανότητα να συμβεί (πρόβλεψη υψηλής εμπιστοσύνης) είτε έχει, προηγουμένως, παρατηρηθεί πειραματικά. Συνολικά, 8 πρωτεάσες που έχουν ως στόχο 6 πεπτιδικές αλληλουχίες προβλέφθηκαν μέσω του εργαλείου Proteasix. Από τις 6 πεπτιδικές αλληλουχίες, οι 3 αποτελούν διαφορετικά τμήματα της πρωτεΐνης Collagen alpha-1(III). Για λόγους

καλύτερης διάκρισης, τα 3 αυτά πεπτιδικά τμήματα χαρακτηρίστηκαν αυθαίρετα "a", "b" και "c".

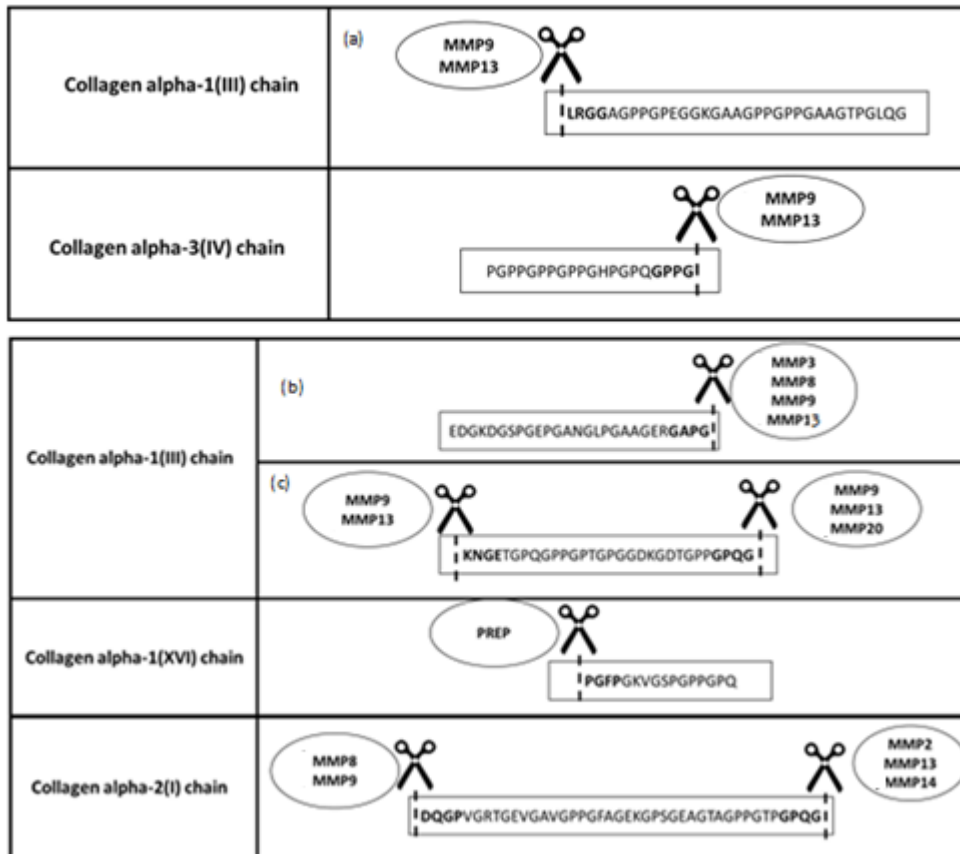
Πίνακας Γ3. Τα νεφρο-ειδικά και διαφορεικά εκφραζόμενα πεπτιδικά πεπτιδικά για τα οποία το πρόγραμμα Proteasix προέβλεψε πιθανές πρωτεάσες που συμβάλλουν στην παραγωγή τους και οι αλληλουχίες τους (από το αμινοτελικό-N άκρο στα αριστερά προς το καρβοξυ-C τελικό άκρο στα δεξιά).

Πεπτιδίο στόχος	Αλληλουχία (N---C)
Collagen alpha-1(III) a	LRGGAGPPGREGGKGAAGPPGPPGAAGTPGLQG
Collagen alpha-1(III) b	EDKDGSPGEPGANGLPGAAGERGAPG
Collagen alpha-1(III) c	KNGETGPQGGPTGPGGDKGDTGPPGPQG
Collagen alpha-1(XVI)	PGFPGKVGSPGPPGPQ
Collagen alpha-2(I)	DQGPVGRTEVGAVGPPGFAGEKGPSGEAGTAGPPGTPGPQG
Collagen alpha-3(IV)	PGPPGPPGPPGHPGPQGGPPG

Πίνακας Γ4. Οι 8 πρωτεάσες που προβλέφθηκαν μέσω του βιοπληροφορικού εργαλείου Proteasix, τα πεπτιδικά στόχοι τους και το άκρο του πεπτιδίου που αποτελεί στόχο τους.

Πρωτεάση	Πεπτίδιο-στόχος	Άκρο πεπτιδίου-στόχος
MMP2	Collagen alpha-2(I)	C-τελικό
MMP3	Collagen alpha-1(III)b	C-τελικό
MMP8	Collagen alpha-1(III)b Collagen alpha-2(I)	C-τελικό N-τελικό
MMP9	Collagen alpha-1(III)a Collagen alpha-1(III)b Collagen alpha-1(III)c Collagen alpha-2(I) Collagen alpha-3(IV)	N-τελικό C-τελικό, N-τελικό, C-τελικό N-τελικό C-τελικό
MMP13	Collagen alpha-1(III)a Collagen alpha-1(III)b Collagen alpha-1(III)c Collagen alpha-2(I) Collagen alpha-3(IV)	N-τελικό C-τελικό N-τελικό, C-τελικό C-τελικό C-τελικό
MMP14	Collagen alpha-2(I)	C-τελικό
MMP20	Collagen alpha-1(III)c	C-τελικό
PREP	Collagen alpha-1(XVI)	N-τελικό

Εικόνα Γ12. Τα φυσικά απαντόμενα και νεφροειδικά πεπτίδια για τα οποία υπήρξε πρόβλεψη ότι αποτελούν στόχο συγκεκριμένων πρωτεασών, οι αλληλουχίες τους και οι πρωτεάσες που τα στοχεύουν. Το ψαλίδι υποδεικνύει τη πρωτεόλυση των πεπτιδίων σε συγκεκριμένη θέση. Τα σημεία κοπής των πεπτιδικών ακολουθιών σημειώνονται με έντονους χαρακτήρες.

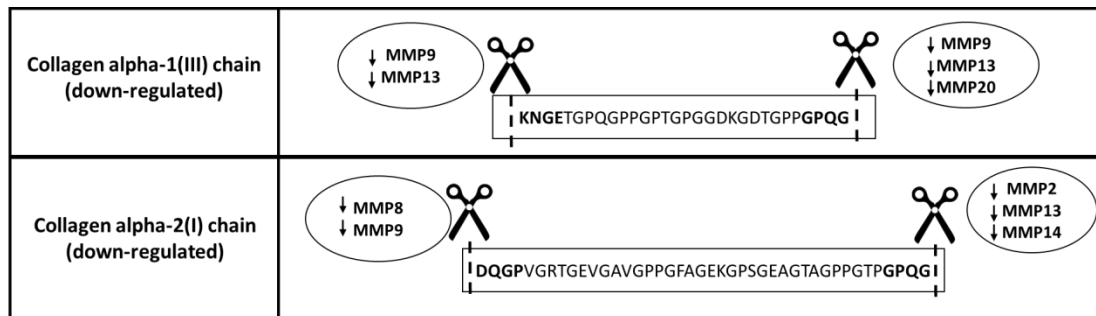


Γ.3. Εκτίμηση της ρύθμισης ενεργότητας προβλεπόμενων πρωτεασών

Η εκτίμηση της ρύθμισης της ενεργότητας των πρωτεασών πραγματοποιήθηκε μόνο για τις πρωτεάσες που είχαν ως στόχο πεπτίδια, για τα οποία και οι δύο θέσεις κοπής, αμινο- και καρβοξυ-τελική, είχαν αναγνωριστεί ως στόχοι πρωτεασών από το πρόγραμμα Proteasix. Έγινε η υπόθεση ότι όσο περισσότερο εμφανίζεται ένα πεπτίδιο σε ένα δείγμα, οι υπεύθυνες για την παραγωγή του πρωτεάσες θα εμφανίζουν αυξημένη ενεργότητα και το αντίστροφο. Επομένως, οι πρωτεάσες που είναι υπεύθυνες για την παραγωγή ενός πεπτιδίου μοιράζονται την ίδια τάση ρύθμισης με το παραγόμενο πεπτίδιο. Σύμφωνα με τη ρύθμιση των νεφρο-ειδικών και διαφορεικά εκφραζόμενων πεπτιδίων, όπως αυτή προέκυψε κατά την ανάλυση δειγμάτων ούρων και πλάσματος αίματος, τα πεπτίδια Collagen alpha-1(III) (c) και Collagen alpha-2(I) εμφανίζονται ελαττωμένα σε ασθενείς ΧΝΑ με επιδείνωση

συγκριτικά με ασθενείς ΧΝΑ χωρίς νεφρική επιδείνωση. Τα δυο αυτά πεπτίδια ήταν τα μόνα για τα οποία υπήρξε πρόβλεψη συμμετοχής πρωτεασών στην κοπή και των δύο άκρων τους. Επομένως, οι πρωτεάσες MMP2, MMP8, MMP9, MMP13, MMP14, MMP20 που προβλέφθηκαν ότι στοχεύουν τα δυο αυτά πεπτίδια, εκτιμήθηκε πως θα εμφανίζουν ελαττωμένη ενεργότητα σε ασθενείς ΧΝΑ με επιδείνωση συγκριτικά με ασθενείς ΧΝΑ χωρίς επιδείνωση.

Εικόνα Γ13. Οι πρωτεάσες που προβλέφθηκαν ότι στοχεύουν τα νεφρο-ειδικά και διαφορεικά εκφραζόμενα πεπτίδια μαζί με την εκτίμηση της ρύθμισης της ενεργότητάς τους. Οι πρωτεάσες βρίσκονται στο εσωτερικό των κύκλων, ενώ εκτιμώμενη ρύθμιση της ενεργότητάς τους σε ασθενείς ΧΝΑ με επιδείνωση συγκριτικά με ασθενείς χωρίς επιδείνωση απεικονίζεται με τη μορφή βέλους. Τα σημεία κοπής των πεπτιδικών ακολουθιών σημειώνονται με έντονους χαρακτήρες. Τα δυο αυτά πεπτίδια εμφάνισαν αρνητική ρύθμιση (down-regulated) ως προς την αφθονία τους σε ασθενείς ΧΝΑ με επιδείνωση. ↑: αυξημένη ρύθμιση, ↓: μειωμένη ρύθμιση.



Δ. Συζήτηση

Ο κύριος στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η πρόβλεψη πεπτιδίων που απαντώνται φυσικά και προέρχονται από τους νεφρούς (δηλαδή συγκεκριμένα για τους νεφρούς) και βασιζόμενοι σε αυτά τα δεδομένα, η περαιτέρω πρόβλεψη πρωτεασών που σχετίζονται με την επιδείνωση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας. Πρώτο βήμα στη διαδικασία αυτή ήταν η σύγκριση ήδη υπαρχόντων καθώς και πρόσφατα δημιουργημένων δεδομένων πρωτεομικής και πεπτιδομικής από δείγματα πλάσματος αίματος και ούρων. Λήφθηκαν υπόψη η κάλυψη της πρωτεϊνικής ακολουθίας από τα πεπτίδια, η συχνότητα καθώς και η ειδικότητα τους ως προς την επιδείνωση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας.

Στη πλειονότητα των δημοσιευμένων μελετών που σχετίζονται με τη ΧΝΑ, εξετάζονται ασθενείς κάποιου σταδίου και τις περισσότερες φορές είτε συγκρίνονται με ένα υγιές τμήμα του πληθυσμού είτε με ασθενείς που βρίσκονται σε κάποιο άλλο στάδιο της νόσου. Η μελέτη, όμως, για την πρόγνωση της επιδείνωσης της νόσου απαιτεί την ύπαρξη δεδομένων για ασθενείς από την πρώτη στιγμή που διαγνώστηκαν (baseline data) και για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα αρκετών ετών κατά το οποίο τα ίδια άτομα υποβάλλονται τακτικά σε έλεγχο. Με τον τρόπο αυτό, εξασφαλίζεται η παρακολούθηση των αλλαγών που πραγματοποιούνται καθ' όλη τη διάρκεια επιδείνωσης της νόσου. Η ανάλυση μας βασίστηκε σε δεδομένα ασθενών ΧΝΝ που παρουσίασαν επιδείνωση 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 κατά το ίδιο χρονικό διάστημα. Στην αρχική επίσκεψή τους, όμως, όλοι οι ασθενείς είχαν διαγνωσθεί με ΧΝΑ και είναι πιθανό άτομα που αρχικά κατατάσσονταν στο ίδιο στάδιο, να εμφάνισαν εν τέλει διαφορές ως προς την επιδείνωσή τους. Στόχος ήταν η αναγνώριση πεπτιδίων που παρουσίαζαν διαφορεική έκφραση μεταξύ των δυο κατηγοριών ασθενών και πιθανά υποδήλωναν την εκδήλωση διαφορετικών μηχανισμών που οδηγούσε σε διαφορετική εξέλιξη της νόσου.

Η συγκεκριμένη προσέγγιση συνδυασμού πρωτεϊνικών και πεπτιδομικών δεδομένων για τη μελέτη της επιδείνωσης της ΧΝΑ και τη πρόγνωση της, είναι καινοτόμος και δεν έχει αναφερθεί προηγουμένως στη βιβλιογραφία. Έγινε η υπόθεση ότι για ένα πεπτίδιο που βρίσκεται ενδογενώς στα ούρα αλλά απουσιάζει από το πλάσμα του αίματος, η παραγωγή του θα πρέπει να επιτελείται στους νεφρούς. Όπως αναφέρθηκε ξανά, οι νεφροί είναι υπεύθυνοι για το φιλτράρισμα του αίματος ενώ στα ίδια όργανα και πιο συγκεκριμένα στα νεφρικά σωμάτια, πραγματοποιείται η πρώτη φάση της παραγωγής των ούρων. Με το σκεπτικό αυτό, έγινε η σύγκριση μεταξύ πλάσματος αίματος και ούρων ώστε να αναδειχθούν τα πεπτίδια που είναι μοναδικά για τα ούρα. Παράλληλα, εξετάστηκαν δεδομένα τόσο πρωτεϊνικά όσο και πεπτιδικά, ώστε να αποκλειστούν εκείνα τα οποία παράγονται μέσω της επίδρασης του ενζύμου θρυψίνη, το οποίο χρησιμοποιείται κατά την πρωτεομική προσέγγιση.

Η ανάλυση οδήγησε στην πρόβλεψη 33 συγκεκριμένων για τους νεφρούς πεπτιδίων, από τα οποία, τα 13 παρουσίασαν διαφορετική έκφραση μεταξύ ασθενών χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας στους οποίους η νόσος εμφάνιζε επιδείνωση και ασθενών όπου δεν παρουσιαζόταν επιδείνωση. Η πλειονότητα των πεπτιδίων αποτελούν τμήματα κολλαγόνων και εμφανίζονταν μειωμένα στην περίπτωση ασθενών με επιδείνωση. Το κολλαγόνο αποτελεί βασικό συστατικό της εξωκυττάριας ουσίας και τα δεδομένα της εργασίας μας υποστηρίζουν τη μειωμένη διάσπαση των διαφόρων τύπων κολλαγόνων κατά την εξέλιξη της ΧΝΝ. Η συσσώρευση του κολλαγόνου συνδέεται με την επιδείνωση της ΧΝΝ σε αρκετές περιπτώσεις και μπορεί να οδηγήσει σε αντικατάσταση του παρεγχύματος της εξωκυττάριας ουσίας με ινώδη ιστό (κυρίως κολλαγόνο I, III, IV) [79] και τελικά σε σκλήρυνση του σπειράματος και των αγγείων και σε διαμεσοσωληναριακή ίνωση [80]. Όλες οι παραπάνω διαδικασίες έχουν ως αποτέλεσμα τη σταδιακή απώλεια της νεφρικής λειτουργίας και τη νεφρική ανεπάρκεια.

Η πρόβλεψη των πρωτεασών που εμπλέκονται στη παραγωγή των νεφροειδικών και διαφορετικά εκφραζόμενων πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εξειδικευμένου βιοπληροφορικού εργαλείου Proteasix, σύμφωνα με το οποίο, οδηγηθήκαμε στη πρόβλεψη 8 πρωτεασών που εμπλέκονται στη παραγωγή των 6

από τα 13 διαφορεικά εκφραζόμενα, νεφρο-ειδικά πεπτίδια. Έγινε προσπάθεια να εκτιμηθεί η συμμετοχή των προβλεπόμενων πρωτεασών στην παθοφυσιολογία της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Τα ευρήματα στη βιβλιογραφία παρουσιάζονται στον **Συμπληρωματικό Πίνακα 2**. Είναι άξιο αναφοράς, πως η πλειονότητα των δημοσιευμένων μελετών αναφέρεται στην έκφραση των πρωτεασών και όχι στην ενεργότητα. Παρόλα αυτά, όμως, αλλαγές στην ενεργότητα μιας πρωτεάσης μπορεί να πραγματοποιηθεί ακόμα και σε περίπτωση όπου η έκφρασή της παραμένει σταθερή. Αυτό, έχει παρατηρηθεί σε μια μελέτη [81], όπου η ενεργότητα της πρωτεάσης MMP9 ήταν αυξημένη ενώ δε παρατηρούταν κάποια αλλαγή στα επίπεδα έκφρασής της. Για το λόγο αυτό, ο πιο κατάλληλος τρόπος για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων σχετικά με τη ρύθμιση μιας πρωτεάσης είναι η μέτρηση της καταλυτικής της ενεργότητας.

Η πλειονότητα των πρωτεασών ανήκουν στην οικογένεια των εξωκυττάρων μεταλλοπρωτεϊνών (Matrix Metalloproteinases. MMPs), υπεύθυνη για την αποδόμηση των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας [82]. Οι MMPs έχουν μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό σε δείγματα ούρων και πλάσματος αίματος σχετικά με τη συμμετοχή τους στη παθοφυσιολογία της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας. Παρόλα αυτά, η ανάλυση δειγμάτων νεφρικού ιστού εμφανίζεται σχετικά σπάνια σε μελέτες, με αποτέλεσμα ο ακριβής ρόλος των MMPs στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια να μην έχει ξεκαθαριστεί ακόμα. Η συνολική ενεργότητα των MMPs σε δείγματα ούρων έχει παρατηρηθεί [83] πως είναι αυξημένη σε ασθενείς με διαβητική νεφροπάθεια συγκριτικά με υγιείς αλλά είναι μειωμένη σε ασθενείς αυτής της νόσου που εμφανίζουν επιδείνωση σε σχέση με αυτούς όπου δε πραγματοποιείται επιδείνωση. Αυτά τα δεδομένα έρχονται σε συμφωνία με την υπόθεσή μας για μειωμένη ενεργότητα των MMPs κατά την επιδείνωση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας.

Από τα 6 πεπτίδια, που προέκυψε ύστερα από την ανάλυση ότι παράγονται μέσω πρωτεόλυσης, τα 2 θεωρούνται τα περισσότερο αξιόπιστα για τη πρόβλεψη των πρωτεασών που σχετίζονται με τη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. Στα δυο αυτά πεπτίδια, προβλέφθηκαν πρωτεάσες και για τις δυο θέσεις κοπής της πεπτιδικής ακολουθίας (άμινο-τελικής και καρβόξυ-τελικής) ύστερα από την επιβολή των

αυστηρών στατιστικών κριτηρίων. Επιπλέον, αυτά τα 2 πεπτίδια έχει αναφερθεί [84] πως εμφανίζονται σε μειωμένη ποσότητα σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια συγκριτικά με υγιή άτομα, υποδεικνύοντας τη σχέση τους με τη νεφρική βλάβη. Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια που εμφανίζουν επιδείνωση θα πρέπει να παρουσιάζουν και μεγαλύτερη νεφρική βλάβη συγκριτικά με τους ασθενείς χωρίς επιδείνωση, τα δεδομένα συμφωνούν (σε ένα βαθμό) με τα αποτελέσματά μας, προσδίδοντας ακόμα μεγαλύτερη αξιοπιστία στις προβλέψεις μας. Τα πεπτίδια αυτά, μαζί με τις προβλεπόμενες για τη παραγωγή τους πρωτεάσες, μπορεί να αποτελούν μια αρκετά αξιόπιστη εικόνα, όσον αφορά τους πρωτεολυτικούς μηχανισμούς που σχετίζονται με τη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια.

Στα πλαίσια της διερεύνησης της ρύθμισης της ενεργότητας των προβλεπόμενων πρωτεασών, πραγματοποιήθηκε η υπόθεση ότι τα τμήματα των πεπτιδίων καθώς και οι πρωτεάσες που είναι υπεύθυνες για την παραγωγή τους θα εμφανίζουν παρόμοιες τάσεις ρύθμισης. Έτσι, η αυξημένη ή μειωμένη παρουσία των πεπτιδίων σε ασθενείς με επιδεινωμένη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια συγκριτικά με αυτούς στους οποίους η νόσος δεν εμφανίζει επιδείνωση, θα σημαίνει πως οι υπεύθυνες για τα συγκεκριμένα αυτά πεπτίδια πρωτεάσες θα παρουσιάζουν αντίστοιχα αυξημένη ή μειωμένη ενεργότητα. Εκτίμηση της ενεργότητας των πρωτεασών πραγματοποιήθηκε μόνο στη περίπτωση των 2 πεπτιδίων για τα οποία υπήρξε πρόβλεψη συμμετοχής πρωτεασών και στα δύο άκρα τους (αμινο- και καρβοξυτελικό άκρο) Σύμφωνα με τα δεδομένα της ανάλυσης των δειγμάτων ούρων και πλάσματος αίματος, καθώς τα 2 αυτά πεπτίδια εμφανίζονται μειωμένα σε ασθενείς ΧΝΑ με επιδείνωση συγκριτικά με αυτούς χωρίς επιδείνωση, η ενεργότητα των αντίστοιχων πρωτεασών θα εμφανίζεται ελαττωμένη στους ασθενείς με επιδείνωση. Εκτίμηση της ενεργότητας δεν πραγματοποιήθηκε για τις πρωτεάσες που στοχεύουν πεπτίδια για τα οποία υπήρξε πρόβλεψη μόνο για τη μια θέση κοπής. Συνολικά, 6 πρωτεάσες, οι MMP3, MMP8, MMP9, MMP13, MMP14 και MMP20, προβλέφθηκε πως έχουν ως στόχο τα δυο αυτά πεπτίδια και εκτιμήθηκε πως η ενεργότητα τους θα εμφανίζεται μειωμένη κατά την εξέλιξη της νόσου. Όμως, ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε σε 2 από αυτές, τις MMP9 και MMP13, οι οποίες

συμμετέχουν στην παραγωγή και των δυο πεπτιδίων. Πιο συγκεκριμένα, στοχεύουν και τις δύο θέσεις κοπής (N- και C-τελική) στο τμήμα της πεπτιδικής αλυσίδας collagen alpha-1 (III), ενώ σχετικά με το τμήμα της πεπτιδικής αλυσίδας collagen alpha-2 (I), η MMP9 έχει ως στόχο τη N-τελική περιοχή και η MMP13 τη C-τελική περιοχή.

Η MMP9, γνωστή και ως 92 kDa τύπου IV κολλαγενάση (type IV collagenase), έχει μελετηθεί εκτενώς σε πλάσμα αίματος και σε ούρα. Οι προβλέψεις της παρούσας εργασίας υποδεικνύουν μειωμένη ενεργότητα της συγκεκριμένης πρωτεάσης σε δείγματα νεφρικού ιστού ασθενών ΧΝΑ. Τα ευρήματα στη βιβλιογραφία, όμως, σχετικά με την ενεργότητα της MMP9 είναι μέχρι ένα βαθμό αντικρουόμενα. Υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν μειωμένη ενεργότητα της MMP9 σε δείγματα αίματος ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια [85] και ασθενών με σπειραματονεφρίτιδα [86] συγκριτικά με υγιή άτομα. Αντίθετα, άλλες μελέτες, υποστηρίζουν αυξημένη ενεργότητα της MMP9 σε δείγματα ούρων, αίματος, σάλιου και αρτηριών ασθενών διαφόρων νεφροπαθειών και άλλων νόσων που σχετίζονται με τους νεφρούς όπως χρόνια νεφρική ανεπάρκεια με διαβήτη, διαβήτη τύπου 1 με νεφροπάθεια και ρετινοπάθεια, επίμονη αλβουμιουρία και σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 με αλβουμιουρία [81, 87-89]. Αντικρουόμενες απόψεις, όμως, επικρατούν και στο θέμα μελετών που συγκεντρώθηκαν στην έκφραση της MMP9. Αρκετές υποστηρίζουν αυξημένη έκφραση σε νεφροπάθειες όπως χρόνια νεφρική ανεπάρκεια [90-94], διαβητική νεφροπάθεια [95], τύπος 2 διαβήτη με αλβουμιουρία [88], νεφρίτιδα λύκου [96], διαβητική νεφροπάθεια [87], τύπος 1 διαβήτη με ρετινοπάθεια και νεφροπάθεια [89] καθώς και σε μη διαβητικούς ασθενείς στεφανιαίας νόσου με αυξημένη πτώση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης [97]. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, μειωμένη έκφραση έχει υποστηρικτεί σε μελέτες ασθενών με IgA νεφροπάθεια, μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα [98], χρόνια νεφρική ανεπάρκεια [85] και σπειραματονεφρίτιδα [85].

Αξίζει να αναφερθεί, πως μόνο μια μελέτη [86] εξέτασε τα επίπεδα έκφρασης της MMP9 σε ανθρώπινο νεφρικό ιστό. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής υπέδειξαν

μειωμένα επίπεδα έκφρασης σε ασθενείς με σπειραματονεφρίτιδα συγκριτικά με υγιή άτομα, το οποίο βρίσκεται σε συμφωνία με τη δική μας πρόβλεψη.

Όσον αφορά την MMP13, γνωστή ως κολλαγενάση 3 (collagenase 3), δεν υπάρχουν δημοσιευμένα αποτελέσματα σχετικά με την εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης ή ενεργότητας σε ανθρώπινα δείγματα που να δηλώνουν τη συμμετοχή της στη παθοφυσιολογία της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας.

Εκτός από τις MMP9 και MMP13, 4 άλλες πρωτεάσες προβλέφθηκαν ότι έχουν ως στόχο τους τα δύο πιο αξιόπιστα πεπτίδια της ανάλυσής μας. Αυτές είναι οι MMP2, MMP8, MMP14 και MMP20. Η MMP2 αποτελεί μαζί με την MMP9, τη περισσότερο μελετημένη πρωτεάση αναφορικά με τη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. Όλες οι μελέτες σχετικά με την ενεργότητα της MMP2 αναφέρουν πως παρουσιάζεται αυξημένη στο αίμα ασθενών με σπειραματονεφρίτιδα [86], χρόνια νεφρική ανεπάρκεια [85], διαβήτη τύπου 1 με νεφροπάθεια και ρετινοπάθεια και σε δείγμα αρτηριών ασθενών με διαβητική νεφροπάθεια [87]. Αρκετές είναι και οι μελέτες που ασχολήθηκαν με την έκφραση της MMP2 και η πλειονότητά [85, 86, 88, 91-93, 96-104] τους ανέφερε πως παρουσιάζεται αύξηση στα επίπεδα έκφρασής της ενώ μόνο μια πρότεινε ελάττωση των επιπέδων σε ασθενείς με IgA νεφρίτιδα [98]. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν μείωση των επιπέδων έκφρασης στα αρχικά στάδια χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας, (στάδια 1-2) [105] και αύξηση στα τελευταία στάδια [101].

Η ενεργότητα της MMP8 έχει βρεθεί πως παρουσιάζεται αυξημένη στο αίμα ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 [88], όπως αυξημένη έχει βρεθεί και η έκφρασή της στα ούρα ασθενών χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας [94]. Παρόλα αυτά, αναφέρεται πως τόσο η ενεργότητα όσο και τα επίπεδα έκφρασης ρυθμίζονται αρνητικά στο αίμα ασθενών με σπειραματονεφρίτιδα [86]. Η MMP20 έχει συσχετισθεί με τη γήρανση των νεφρών αλλά όχι με τη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια σε πειράματα μεταγραφομικής [106]. Όσον αφορά την MMP14, δεν βρέθηκαν δημοσιευμένες μελέτες σχετικά με τη συμμετοχή της στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια.

Σύμφωνα με τα κριτήρια που εφαρμόσαμε στην ανάλυσή μας, προβλέφθηκε, επίσης (με υψηλή πιστότητα) η συμμετοχή 5 πρωτεασών στη παραγωγή 4 άλλων πεπτιδικών τμημάτων. Τα πεπτιδικά, αυτά, τμήματα ανήκουν στις πρωτεΐνες collagen alpha-1(III) (δύο διαφορετικές πεπτιδικές αλληλουχίες), collagen alpha-1(XVI) και collagen alpha-3(IV), ενώ οι πρωτεάσες που τα έχουν ως στόχο είναι οι προαναφερθείσες MMP8, MMP9, MMP13 καθώς και οι MMP3 και προλυλ-ενδοπεπτιδάση (PREP). Παρόλα αυτά, για τις δύο τελευταίες, δε πραγματοποιήθηκε κάποια πρόβλεψη για την τάση ενεργότητάς τους, καθώς μόνο η μία θέση αποκοπής του πεπτιδίου (N-τελική ή C-τελική) αναγνωρίστηκε από κάποια πρωτεάση. Κατά την υπάρχουσα βιβλιογραφία, τα επίπεδα έκφρασης της MMP3 παρουσιάζονται αυξημένα σε διαβητικούς ασθενείς με νεφρολογική βλάβη [107] καθώς και σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο με μειωμένο ρυθμό σπειραματικής διήθησης. Παράλληλα, τα επίπεδα έκφρασης της PREP παρουσίασαν αύξηση σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια.

Καθώς τα αποτελέσματα της ανάλυσής μας αποτελούν προβλέψεις, περαιτέρω πειραματικές μελέτες απαιτούνται για την επαλήθευση τους. Τέτοιες μελέτες μπορεί να περιλαμβάνουν απεικονιστικές τεχνικές μέσω MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) φασματομετρία μάζας(MS), ή τεχνικές στοχευμένης πρωτεομικής (targeted proteomics) μέσω φασματομετρίας μάζας MRM (Multiple Reaction Monitoring) ικανές να ταυτοποιήσουν την παρουσία των νεφρο-ειδικών πεπτιδίων της ανάλυσής μας σε δείγματα νεφρικού ιστού. Η απεικόνιση ενδογενών πεπτιδίων με τη χρήση MALDI-IMS έχει προηγουμένως αναφερθεί στη βιβλιογραφία [108], ενώ η συγκεκριμένη μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί και κατά τη μελέτη πρωτεασών που συνδέονται με την επιδείνωση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας [109]. Ωστόσο, είναι πιθανό η χαμηλή αφθονία των ενδογενών πεπτιδίων να αποτελέσει ανασταλτικό παράγοντα κατά την απόπειρα ανίχνευσής τους μέσω MALDI-IMS. Αντίθετα, όσον αφορά τη στοχευμένη πρωτεομική, ενώ η μέθοδος παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων θραυσματοποίησης ιόντων (MRM) χαρακτηρίζεται από υψηλό βαθμό ευαισθησίας και ειδικότητας, εντούτοις τα διαθέσιμα πρωτόκολλα περιορίζονται στην ανίχνευση πεπτιδίων ύστερα από θρυψινοποίηση των αντίστοιχων πρωτεασών. Επομένως, προτού εφαρμοστεί για

την ταυτοποίηση φυσικά απαντόμενων πεπτιδίων, απαιτείται η βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου.

Συμπερασματικά, η παρούσα εργασία παρουσιάζει μια νέα μεθοδολογία για τη πρόβλεψη πρωτεολυτικών γεγονότων, ειδικών για τους νεφρούς. Η ανάλυσή μας, επέτρεψε σημαντική ελάττωση του αριθμού των προβλεπόμενων πρωτεασών, επιτρέποντας τη συγκέντρωση της προσοχής στους περισσότερο υποσχόμενους στόχους, τις πρωτεάσες MMP9, MMP13. Η εκτίμηση μας είναι πως οι πρωτεάσες αυτές εμφανίζουν μειωμένη ενεργότητα σε ασθενείς ΧΝΑ που παρουσιάζουν επιδείνωση συγκριτικά με ασθενείς χωρίς επιδείνωση καθώς τα νεφρο-ειδικά πεπτίδια που στοχεύουν εμφανίζονται σε μειωμένη αφθονία στους ασθενείς με επιδείνωση. Η προσέγγιση αυτή, πιθανά να οδηγήσει στην αναγνώριση προγνωστικών βιοδεικτών για την επιδείνωση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας και επιπλέον, στην ανίχνευση νέων μοριακών στόχων για θεραπευτικές παρεμβάσεις κατά την αντιμετώπιση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας.

Ε. Συμπληρωματικά δεδομένα

Συμπληρωματικός Πίνακας 1. Η λίστα των 33 νεφρο-ειδικών πεπτιδίων όπως αυτή προέκυψε από την ανάλυσή μας. Δίνονται πληροφορίες για την αλληλουχία των πεπτιδίων (Sequence), για τη πρωτεΐνη στην οποία ανήκουν (Prot_Accession-Prot_Symbol), για τη μάζα τους (Mass), το χρόνο τους κατά την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (Capillary Electrophoresis time), τη θέση τους στην αντίστοιχη πρωτεϊνική ακολουθία (Start AA- Stop AA), τη συχνότητα εμφάνισης τους (Frequency), τη πιθανή επικάλυψή τους με πεπτίδια από το σετ πεπτιδομικής στο πλάσμα αίματος (Peptide position of the overlapping plasma peptide), το βαθμό εμπιστοσύνης της πρόβλεψης λόγω επικάλυψης ή μη (prediction confidence) και για το αν βρέθηκαν ως διαφορετικά εκφραζόμενα στο σετ πεπτιδομικής στα ούρα ματαξύ ασθενών ΧΝΑ με ή χωρίς επιδείνωση. (Differentially expressed in CKD progressors vs. non-progressors).

Peptide_ID	Sequence	Prot_Accession	Prot_Symbol	Prot_Name	StartAA	StopAA	Prediction confidence	Differentially expressed in CKD progressors vs. non-progressors	Frequency	Peptide position of the overlapping plasma peptide
24449	QTAKPTFGHLT	H0YAN5	CNBD1	Cyclic nucleotide-binding domain-containing protein 1; CNBD1	83	93	High	YES	≥75%	
69681	pGpGKEKENDVGMpGpG	P12107-3	COL11A1	Collagen alpha-1(XI) chain; COL11A1	1203	1223	High	YES	≥75%	
102725	GNEGpSGPPGpAGSPGEGRAAGSGGpKpPG	P13942-5	COL11A2	Collagen alpha-2(XI) chain; COL11A2	1003	1033	High	YES	≥75%	
41833	pGpGKDGAPGRpGAP	Q07092-2	COL16A1	Collagen alpha-1(XVI) chain; COL16A1	1475	1490	High	YES	50%-75%	
48520	QGrRGpGPPGpGpG	Q17RW2	COL2A1	Collagen alpha-1(XXIV) chain	1461	1477	High	YES	50%-75%	
110913	LRGGAGpPGEGGKGAAGpGpGpGAAAGTPGLQG	P02461	COL3A1	Collagen alpha-1(III) chain	694	726	High	YES	50%-75%	
61039	PGpPGPPGpGHPGpQGpPG	Q01955-2	COL4A3	Collagen alpha-3(IV) chain; COL4A3	655	674	High	YES	≥75%	
8342	TTLASHSTK	P15941	MUC1	Mucin-1 subunit alpha; MUC1	1003	1011	High	YES	≥75%	
41770	GPpGpAGERGHpGpG	Q07092-2	COL16A1	Collagen alpha-1(XVI) chain; COL16A1	1401	1416	High	NO	50%-75%	
132834	AGERGHPGAPGpSGpGLPGVPGSMGDMVNYDEK	Q07092-2	COL16A1	Collagen alpha-1(XVI) chain; COL16A1	1406	1440	High	NO	≥75%	
24958	GPpGPDGNKGEpG	P08123	COL1A2	Collagen alpha-2(I) chain	613	625	High	NO	≥75%	
26113	GppGPDGNKGEpG	P08123	COL1A2	Collagen alpha-2(I) chain	613	625	High	NO	≥75%	
41434	GpSGPpGPDGNKGEpG	P08123	COL1A2	Collagen alpha-2(I) chain	610	625	High	NO	50%-75%	
41431	GPpGKpGDDGEAGKpG	P02458-1	COL2A1	Collagen alpha-1(II) chain; COL2A1	246	261	High	NO	≥75%	
70633	AGpGPPGpGpGTSQHpGSpGSpG	P02461	COL3A1	Collagen alpha-1(III) chain	176	198	High	NO	50%-75%	
53435	GPpGpGTSGHpGSpGSpG	P02461	COL3A1	Collagen alpha-1(III) chain	180	198	High	NO	50%-75%	
69769	DGESGRpGRpGERLpGpG	P02461	COL3A1	Collagen alpha-1(III) chain	230	249	High	NO	≥75%	
70413	DGESGRpGRpGERLpGpG	P02461	COL3A1	Collagen alpha-1(III) chain	230	249	High	NO	≥75%	
16854	GpEGGKGAAGpG	P02461	COL3A1	Collagen alpha-1(III) chain; COL3A1	702	714	High	NO	≥75%	
114438	pGTPGFPPGERGNSGEHGEIGLpGLpGLpGT	Q01955-2	COL4A3	Collagen alpha-3(IV) chain; COL4A3	752	781	High	NO	50%-75%	
38617	GPPGpGKVGSPGpG	Q07092-2	COL16A1	Collagen alpha-1(XVI) chain; COL16A1	1165	1180	Low	YES	50%-75%	1144-1166
78792	GpQQVrGepGPPGpAGAAGpAGNpG	P02452	COL1A1	Collagen alpha-1(I) chain	365	389	Low	YES	≥75%	378-399
143947	DOGPVGRtGEVgAVGpGfAGEKGPpSGEAGTAGpGpTpGpQG	P08123	COL1A2	Collagen alpha-2(I) chain	824	865	Low	YES	50%-75%	844-863
94807	EDGKDGSpGpGpGANGLpGAAGERGApG	P02461	COL3A1	Collagen alpha-1(III) chain; COL3A1	463	489	Low	YES	≥75%	448-477
107460	KNGETGpQGPPGPTGpGGDKGDTGpGpGpG	P02461	COL3A1	Collagen alpha-1(III) chain	610	639	Low	YES	≥75%	623-627
127402	GPAGDDGVGDKGEDpGpGpGPPGpSGEAGpPPGpPG	P12107-3	COL11A1	Collagen alpha-1(XI) chain; COL11A1	1324	1360	Low	NO	50%-75%	1340-1370
127899	GpAGDDGVGDKGEDpGpGpGPPGpSGEAGpPPGpPG	P12107-3	COL11A1	Collagen alpha-1(XI) chain; COL11A1	1324	1360	Low	NO	≥75%	1340-1370
116543	NVGApGAKGARGSGpGpGATGfNGAAGRvGpGpG	P02452	COL1A1	Collagen alpha-1(I) chain	855	888	Low	NO	50%-75%	874-888
60816	RMpGSpGpGpGSDKpGpGpG	P02461	COL3A1	Collagen alpha-1(III) chain; COL3A1	536	555	Low	NO	50%-75%	543-567
35535	GSpGpGSDKpGpGpG	P02461	COL3A1	Collagen alpha-1(III) chain	540	555	Low	NO	≥75%	543-567
32470	SpGpGSDKpGpGpG	P02461	COL3A1	Collagen alpha-1(III) chain	541	555	Low	NO	50%-75%	543-567
15887	GpGSDKpGpGpG	P02461	COL3A1	Collagen alpha-1(III) chain; COL3A1	544	555	Low	NO	50%-75%	543-567
84126	GpGSGESGRpGpGpGpGpG	P02461	COL3A1	Collagen alpha-1(III) chain; COL3A1	552	575	Low	NO	50%-75%	543-567

Συμπληρωματικός Πίνακας 2. Τα ευρήματα στη βιβλιογραφία σχετικά με τη συμμετοχή των προβλεπόμενων πρωτεασών στην παθοφυσιολογία της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας. Παρουσιάζονται πληροφορίες για τα υπό μελέτη δείγματα (sample), για τις αντίστοιχες πρωτεάσες, για τη ρύθμιση της έκφρασης (expression level) και της ενεργότητάς τους (activity) καθώς και για τις ομάδες ατόμων για τις οποίες υπήρξε σύγκριση (control- case) σε κάθε μελέτη

Reference	Sample	Protease	Expression Level	Activity	Control	Case
Liu, B.C., et al., 2006	urine	MMP2	up		healthy	CKD
Liu, B.C., et al., 2006	urine	MMP9	up		healthy	CKD
Butte, A.J., et al., 2011	serum	PREP	up		healthy	CKD
Hsu, T.W., et al., 2013	serum	MMP2,3,9	up		CAD with smaller eGFR decline	CAD with greater eGFR decline
Tashiro, K., et al., 2014	urine	MMP9	up		healthy	DN patients with macroalbuminuria
Gluba-Brzozka, A., et al., 2014	blood	MMP2	up		healthy	CKD
Pulido-Olmo, H., et al., 2016	plasma	MMP9	unchanged	up	normoalbuminuria	resistant albuminuria
Musial, K., et al., 2015	urine	MMP2,9	up		healthy	CKD
Musial, K., et al., 2015	plasma	MMP2,9	up		healthy	CKD
Altamtam, N., et al., 2012	urine	overall MMP		up (not significant)	diabetes mellitus	DKD
Altamtam, N., et al., 2012	urine	overall MMP		up	healthy	DKD
Altamtam, N., et al., 2012	urine	overall MMP		down	non progressive DKD	progressive DKD
van der Zijl, N.J., et al., 2010	urine	MMP8,9		up	healthy	type 2 diabetes mellitus (T2DM) with albuminuria
Thraillkill, K.M., et al., 2007	urine	MMP2	up		healthy	type 1 diabetes
Thraillkill, K.M., et al., 2007	plasma	MMP2	up	up	healthy	type 1 diabetes
Zakiyanov, O., et al., 2012	plasma	MMP2	down		healthy	CKD(1-2)
Musial, K. and D. Zwolinska, 2011	serum	MMP2,9	up		healthy	children with CKD on conservative treatment
Musial, K. and D. Zwolinska, 2011	serum	MMP2,9	up		children with CKD (2-3)	children with CKD (4-5) on conservative treatment
Peiskerova, M., et al., 2009	serum	MMP2	down		healthy	CKD 1-2
Peiskerova, M., et al., 2009	serum	MMP2	up		healthy	CKD 5
Chung, A.W., et al., 2009	arteries	MMP2,9		up	healthy	diabetic CKD
Chang, H.R., et al., 2006	plasma	MMP2	up	up	healthy	CKD
Chang, H.R., et al., 2006	plasma	MMP9	down	down	healthy	CKD
Musial, et al., 2015	serum	MMP2,9	up		healthy	pre-dialysis CKD children
Musial, et al., 2015	urine	MMP2,9	up		healthy	pre-dialysis CKD children
Musial, K. and D. Zwolinska, 2013	serum	MMP8,9	up		healthy	CKD
Bauvois, B., et al., 2007	plasma	MMP2,9	down		healthy	IgAN
Bauvois, B., et al., 2007	plasma	MMP2	up		healthy	MN
Bauvois, B., et al., 2007	plasma	MMP9	down		healthy	MN
Bauvois, B., et al., 2007	plasma	MMP2	up		healthy	MCNS, FSGS
Wheeler, H.E., et al., 2009	kidney	MMP20				
Lods, N., et al., 2003	serum	MMP2	up	up	healthy	glomerulonephritis
Lods, N., et al., 2003	serum	MMP8,9	down	down	healthy	glomerulonephritis
Lods, N., et al., 2003	urine	MMP2,9	up		healthy	glomerulonephritis
Lods, N., et al., 2003	kidney	MMP2	up		healthy	glomerulonephritis
Lods, N., et al., 2003	kidney	MMP9	down		healthy	glomerulonephritis
Caseiro, A., et al., 2012	saliva	MMP9	up		healthy	T1D patients with retinopathy and nephropathy
Caseiro, A., et al., 2012	urine	MMP9	up		healthy	T1D patients with retinopathy and nephropathy
Caseiro, A., et al., 2012	saliva	MMP2	up(NOT significant)		healthy	T1D patients with retinopathy and nephropathy
Caseiro, A., et al., 2012	serum	MMP2		up	healthy	T1D patients with retinopathy and nephropathy
Caseiro, A., et al., 2012	serum	MMP2		up	healthy	T1D patients with retinopathy
Caseiro, A., et al., 2012	serum	MMP2		up	healthy	T1D patients without chronic complications
Caseiro, A., et al., 2012	saliva	MMP9		up	healthy	T1D patients with retinopathy and nephropathy
Caseiro, A., et al., 2012	saliva	MMP9		up	healthy	T1D patients with retinopathy
Caseiro, A., et al., 2012	urine	MMP9		up	healthy	T1D patients with retinopathy and nephropathy
Jiang, Z., et al., 2010	serum	MMP2,9	up		healthy	systematic lupus erythematosus with lupus nephritis
Jiang, Z., et al., 2010	serum	MMP9	up		healthy	systematic lupus erythematosus without lupus nephritis
Ban, C.R., et al., 2010	serum	MMP3	up		non diabetic	type 2 diabetes mellitus with macroalbuminuria
Smith, E.R., et al., 2012	serum	MMP2	up		healthy	CKD 3-4
Musial, K. and D. Zwolinska, 2014	serum	MMP2	up		primary nocturnal enuresis	CKD 1-2
Musial, K. and D. Zwolinska, 2014	serum	MMP2	up		primary nocturnal enuresis	CKD 3-4
Musial, K. and D. Zwolinska, 2014	serum	MMP2	up		primary nocturnal enuresis	CKD 5
Musial, K. and D. Zwolinska, 2014	serum	MMP2	up		CKD 1-2	CKD 5
Musial, K. and D. Zwolinska, 2014	serum	MMP2	up		CKD3-4	CKD 5
Pawlak, K., et al., 2011	serum	MMP9	up		healthy	CKD 3
Pawlak, K., et al., 2011	serum	MMP9	up		healthy	CKD 4
Pawlak, K., et al., 2011	serum	MMP9	up		CKD 1-2	CKD 3
Pawlak, K., et al., 2011	serum	MMP9	up		CKD 1-2	CKD 4
Pawlak, K., et al., 2011	serum	MMP9	down		CKD 3	CKD 5
Pawlak, K., et al., 2011	serum	MMP9	down		CKD 4	CKD5

Συμπληρωματικοί Πίνακες 3-8. Τα δεδομένα για τα πεπτίδια από τα 5 εξεταζόμενα σετ δεδομένων (i) πεπτίδια ύστερα από θρυψινοποίηση πρωτεϊνών στα ούρα, ii) φυσικά απαντόμενα πεπτίδια στα ούρα, iii) πεπτίδια ύστερα από θρυψινοποίηση πρωτεϊνών στο πλάσμα, iv) φυσικά απαντόμενα πεπτίδια στο πλάσμα και v) πεπτίδια ύστερα από θρυψινοποίηση πρωτεϊνών από τη βάση δεδομένων Peptide Atlas) καθώς και τα διαφορετικά εκφραζόμενα πεπτίδια μεταξύ ασθενών ΧΝΝ με επιδείνωση συγκριτικά με ασθενείς ΧΝΝ χωρίς επιδείνωση δεν παρουσιάζονται στην έντυπη μορφή της παρούσας εργασίας λόγω αρκετά μεγάλου όγκου. Οι πίνακες είναι διαθέσιμοι στην ψηφιακή μορφή της εργασίας.

ΣΤ. Βιβλιογραφία

1. Bellomo, R., J.A. Kellum, and C. Ronco, *Acute kidney injury*. Lancet, 2012. **380**(9843): p. 756-66.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Jha, V., et al., *Chronic kidney disease: global dimension and perspectives*. Lancet, 2013. **382**(9888): p. 260-72.
6. *National kidney and urologic diseases information clearinghouse (NKUDIC)*.]. Available from: www.kidney.niddk.nih.gov/kudiseases/pubs/kustats/.
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. Barsoum, R.S., *Chronic kidney disease in the developing world*. N Engl J Med, 2006. **354**(10): p. 997-9.
11. 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.
12. Levin, A., *Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic kidney disease prior to dialysis*. Semin Dial, 2003. **16**(2): p. 101-5.

13. Menon, V., A. Gul, and M.J. Sarnak, *Cardiovascular risk factors in chronic kidney disease*. *Kidney Int*, 2005. **68**(4): p. 1413-8.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. Levey, A.S., et al., *A new equation to estimate glomerular filtration rate*. *Ann Intern Med*, 2009. **150**(9): p. 604-12.
22. 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.
23. 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.
24. Glassock, R.J. and C. Winearls, *Screening for CKD with eGFR: doubts and dangers*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2008. **3**(5): p. 1563-8.

25. 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.
26. 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.
27. Fassett, R.G., et al., *Biomarkers in chronic kidney disease: a review*. Kidney Int, 2011. **80**(8): p. 806-21.
28. 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.
29. Juncos, L.I. and J. Caputo, *Combination therapy in chronic kidney disease?* Ther Adv Cardiovasc Dis, 2015. **9**(4): p. 147-52.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. Stengel, B., et al., *Lifestyle factors, obesity and the risk of chronic kidney disease*. Epidemiology, 2003. **14**(4): p. 479-87.
34. Wang, Y., et al., *Association between obesity and kidney disease: a systematic review and meta-analysis*. Kidney Int, 2008. **73**(1): p. 19-33.
35. Fouque, D. and M. Laville, *Low protein diets for chronic kidney disease in non diabetic adults*. Cochrane Database Syst Rev, 2009(3): p. CD001892.
36. 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.

37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. Einhorn, L.M., et al., *The frequency of hyperkalemia and its significance in chronic kidney disease.* Arch Intern Med, 2009. **169**(12): p. 1156-62.
44. 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.
45. *Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group.* BMJ, 1998. **317**(7160): p. 703-13.
46. Ohkubo, Y., et al., *Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-year study.* Diabetes Res Clin Pract, 1995. **28**(2): p. 103-17.
47. Choi, K.Y., et al., *Protease-activated drug development.* Theranostics, 2012. **2**(2): p. 156-78.
48. Castro, H.C., et al., *Looking at the proteases from a simple perspective.* J Mol Recognit, 2011. **24**(2): p. 165-81.

49. Shen, L., et al., *Von Willebrand factor, ADAMTS13 activity, TNF-alpha and their relationships in patients with chronic kidney disease*. *Exp Ther Med*, 2012. **3**(3): p. 530-534.
50. Pollheimer, J., V. Fock, and M. Knofler, *Review: the ADAM metalloproteinases - novel regulators of trophoblast invasion?* *Placenta*, 2014. **35 Suppl**: p. S57-63.
51. van der Vorst, E.P., et al., *A disintegrin and metalloproteases: molecular scissors in angiogenesis, inflammation and atherosclerosis*. *Atherosclerosis*, 2012. **224**(2): p. 302-8.
52. Weber, S. and P. Saftig, *Ectodomain shedding and ADAMs in development*. *Development*, 2012. **139**(20): p. 3693-709.
53. Gööz, M., *ADAM Proteases as Novel Therapeutic Targets in Chronic Kidney Disease*. *Chronic Kidney Disease*. 2012: InTech.
54. Moon, P.G., et al., *Proteomic analysis of urinary exosomes from patients of early IgA nephropathy and thin basement membrane nephropathy*. *Proteomics*, 2011. **11**(12): p. 2459-75.
55. Sun, A.L., et al., *Dipeptidyl peptidase-IV is a potential molecular biomarker in diabetic kidney disease*. *Diab Vasc Dis Res*, 2012. **9**(4): p. 301-8.
56. Madhusudhan, T., B.A. Kerlin, and B. Isermann, *The emerging role of coagulation proteases in kidney disease*. *Nat Rev Nephrol*, 2016. **12**(2): p. 94-109.
57. Pejcic, M., S. Stojnev, and V. Stefanovic, *Urinary proteomics--a tool for biomarker discovery*. *Ren Fail*, 2010. **32**(2): p. 259-68.
58. 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.
59. Filip, S., et al., *Advances in urinary proteome analysis and applications in systems biology*. *Bioanalysis*, 2014. **6**(19): p. 2549-69.
60. 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.

61. Theodorescu, D., et al., *Discovery and validation of new protein biomarkers for urothelial cancer: a prospective analysis*. *Lancet Oncol*, 2006. **7**(3): p. 230-40.
62. Fliser, D., S. Wittke, and H. Mischak, *Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry for clinical diagnostic purposes*. *Electrophoresis*, 2005. **26**(14): p. 2708-16.
63. 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.
64. 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.
65. 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.
66. 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.
67. 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.
68. Afsar, B., et al., *An update on coronary artery disease and chronic kidney disease*. *Int J Nephrol*, 2014. **2014**: p. 767424.
69. 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.
70. Di Meo, A., M.D. Pasic, and G.M. Yousef, *Proteomics and peptidomics: moving toward precision medicine in urological malignancies*. *Oncotarget*, 2016.
71. Lapatas, V., et al., *Data integration in biological research: an overview*. *J Biol Res (Thessalon)*, 2015. **22**(1): p. 9.
72. Gligorijevic, V. and N. Przulj, *Methods for biological data integration: perspectives and challenges*. *J R Soc Interface*, 2015. **12**(112).

73. Krochmal, M., et al., *PeptiCKDdb-peptide- and protein-centric database for the investigation of genesis and progression of chronic kidney disease*. Database (Oxford), 2016. **2016**.
74. Siwy, J., et al., *Human urinary peptide database for multiple disease biomarker discovery*. Proteomics Clin Appl, 2011. **5**(5-6): p. 367-74.
75. Stalmach, A., et al., *Recent advances in capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry for clinical proteomic applications*. Electrophoresis, 2013. **34**(11): p. 1452-64.
76. Desiere, F., et al., *The PeptideAtlas project*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Database issue): p. D655-8.
77. Farrah, T., et al., *The state of the human proteome in 2012 as viewed through PeptideAtlas*. J Proteome Res, 2013. **12**(1): p. 162-71.
78. Klein, J., et al., *Proteasix: a tool for automated and large-scale prediction of proteases involved in naturally occurring peptide generation*. Proteomics, 2013. **13**(7): p. 1077-82.
79. Norman, J.T. and L.G. Fine, *Progressive renal disease: fibroblasts, extracellular matrix, and integrins*. Exp Nephrol, 1999. **7**(2): p. 167-77.
80. Becker, G.J. and T.D. Hewitson, *The role of tubulointerstitial injury in chronic renal failure*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2000. **9**(2): p. 133-8.
81. Pulido-Olmo, H., et al., *Role of matrix metalloproteinase-9 in chronic kidney disease: a new biomarker of resistant albuminuria*. Clin Sci (Lond), 2016. **130**(7): p. 525-38.
82. Zhao, H., et al., *Matrix metalloproteinases contribute to kidney fibrosis in chronic kidney diseases*. World J Nephrol, 2013. **2**(3): p. 84-9.
83. Altemtam, N., M.E. Nahas, and T. Johnson, *Urinary matrix metalloproteinase activity in diabetic kidney disease: a potential marker of disease progression*. Nephron Extra, 2012. **2**: p. 219-32.
84. Good, D.M., et al., *Naturally occurring human urinary peptides for use in diagnosis of chronic kidney disease*. Mol Cell Proteomics, 2010. **9**(11): p. 2424-37.

85. Chang, H.R., et al., *Relationships between circulating matrix metalloproteinase-2 and -9 and renal function in patients with chronic kidney disease*. Clin Chim Acta, 2006. **366**(1-2): p. 243-8.
86. Lods, N., et al., *Angiotensin-converting enzyme inhibition but not angiotensin II receptor blockade regulates matrix metalloproteinase activity in patients with glomerulonephritis*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(11): p. 2861-72.
87. Chung, A.W., et al., *Matrix metalloproteinase-2 and -9 exacerbate arterial stiffening and angiogenesis in diabetes and chronic kidney disease*. Cardiovasc Res, 2009. **84**(3): p. 494-504.
88. van der Zijl, N.J., et al., *Urinary matrix metalloproteinase-8 and -9 activities in type 2 diabetic subjects: A marker of incipient diabetic nephropathy?* Clin Biochem, 2010. **43**(7-8): p. 635-9.
89. Caseiro, A., et al., *Protease profiling of different biofluids in type 1 diabetes mellitus*. Clin Biochem, 2012. **45**(18): p. 1613-9.
90. Pawlak, K., M. Mysliwiec, and D. Pawlak, *Peripheral blood level alterations of MMP-2 and MMP-9 in patients with chronic kidney disease on conservative treatment and on hemodialysis*. Clin Biochem, 2011. **44**(10-11): p. 838-43.
91. Liu, B.C., et al., *Application of antibody array technology in the analysis of urinary cytokine profiles in patients with chronic kidney disease*. Am J Nephrol, 2006. **26**(5): p. 483-90.
92. Musial, K., A. Bargenda, and D. Zwolinska, *Urine survivin, E-cadherin and matrix metalloproteinases as novel biomarkers in children with chronic kidney disease*. Biomarkers, 2015. **20**(3): p. 177-82.
93. Musial, K. and D. Zwolinska, *Matrix metalloproteinases (MMP-2,9) and their tissue inhibitors (TIMP-1,2) as novel markers of stress response and atherogenesis in children with chronic kidney disease (CKD) on conservative treatment*. Cell Stress Chaperones, 2011. **16**(1): p. 97-103.
94. Musial, K. and D. Zwolinska, *New markers of apoptosis in children on chronic dialysis*. Apoptosis, 2013. **18**(1): p. 77-84.
95. Tashiro, K., et al., *Levels of urinary matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and renal injuries in patients with type 2 diabetic nephropathy*. J Clin Lab Anal, 2004. **18**(3): p. 206-10.

96. Jiang, Z., T. Sui, and B. Wang, *Relationships between MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 levels and their pathogenesis in patients with lupus nephritis*. *Rheumatol Int*, 2010. **30**(9): p. 1219-26.
97. Hsu, T.W., et al., *Progression of kidney disease in non-diabetic patients with coronary artery disease: predictive role of circulating matrix metalloproteinase-2, -3, and -9*. *PLoS One*, 2013. **8**(7): p. e70132.
98. Bauvois, B., et al., *Specific changes in plasma concentrations of matrix metalloproteinase-2 and -9, TIMP-1 and TGF-beta1 in patients with distinct types of primary glomerulonephritis*. *Nephrol Dial Transplant*, 2007. **22**(4): p. 1115-22.
99. Thrailkill, K.M., et al., *Matrix metalloproteinase-2 dysregulation in type 1 diabetes*. *Diabetes Care*, 2007. **30**(9): p. 2321-6.
100. Gluba-Brzozka, A., et al., *Markers of increased cardiovascular risk in patients with chronic kidney disease*. *Lipids Health Dis*, 2014. **13**: p. 135.
101. Peiskerova, M., et al., *Fibroblast growth factor 23 and matrix-metalloproteinases in patients with chronic kidney disease: are they associated with cardiovascular disease?* *Kidney Blood Press Res*, 2009. **32**(4): p. 276-83.
102. Musial, K., A. Bargenda, and D. Zwolinska, *Urine matrix metalloproteinases and their extracellular inducer EMMPRIN in children with chronic kidney disease*. *Ren Fail*, 2015. **37**(6): p. 980-4.
103. Smith, E.R., et al., *Elastin degradation is associated with progressive aortic stiffening and all-cause mortality in predialysis chronic kidney disease*. *Hypertension*, 2012. **59**(5): p. 973-8.
104. Musial, K. and D. Zwolinska, *Novel indicators of fibrosis-related complications in children with chronic kidney disease*. *Clin Chim Acta*, 2014. **430**: p. 15-9.
105. Zakiyanov, O., et al., *Determinants of circulating matrix metalloproteinase-2 and pregnancy-associated plasma protein-A in patients with chronic kidney disease*. *Clin Lab*, 2012. **58**(5-6): p. 471-80.
106. Wheeler, H.E., et al., *Sequential use of transcriptional profiling, expression quantitative trait mapping, and gene association implicates MMP20 in human kidney aging*. *PLoS Genet*, 2009. **5**(10): p. e1000685.

107. Ban, C.R., et al., *Serum MMP-7 is increased in diabetic renal disease and diabetic diastolic dysfunction*. Diabetes Res Clin Pract, 2010. **87**(3): p. 335-41.
108. Chatterji, B. and A. Pich, *MALDI imaging mass spectrometry and analysis of endogenous peptides*. Expert Rev Proteomics, 2013. **10**(4): p. 381-8.
109. Smith, A., et al., *alpha-1-Antitrypsin detected by MALDI imaging in the study of glomerulonephritis: Its relevance in chronic kidney disease progression*. Proteomics, 2016. **16**(11-12): p. 1759-66.

Εικόνα 1 α, παράθεση από

<http://www.nephrologia.gr/neph/articles/article.jsp?categoryid=3126&context=103&globalid=10126&articleid=3187>,

Εικόνα 1 β, παράθεση από <http://akarafotias.blogspot.gr/2012/11/blog-post.html>

Εικόνα 1 γ, παράθεση από <http://www.kidneychat.com/kidney-anatomy.html>)

Εικόνα 3 β, παράθεση από

<http://www.mayoclinic.org/tests-procedures/peritoneal-dialysis/home/ovc-20202856>