



HELLENIC REPUBLIC
National and Kapodistrian
University of Athens



ArthritisHeal



PharmaGnose
Natural Products Approaches

Χαρακτηρισμός της ενεργότητας της νόσου στη Ρευματοειδή Αρθρίτιδα βάσει του λιποπρωτεϊνικού και λιπιδικού προφίλ

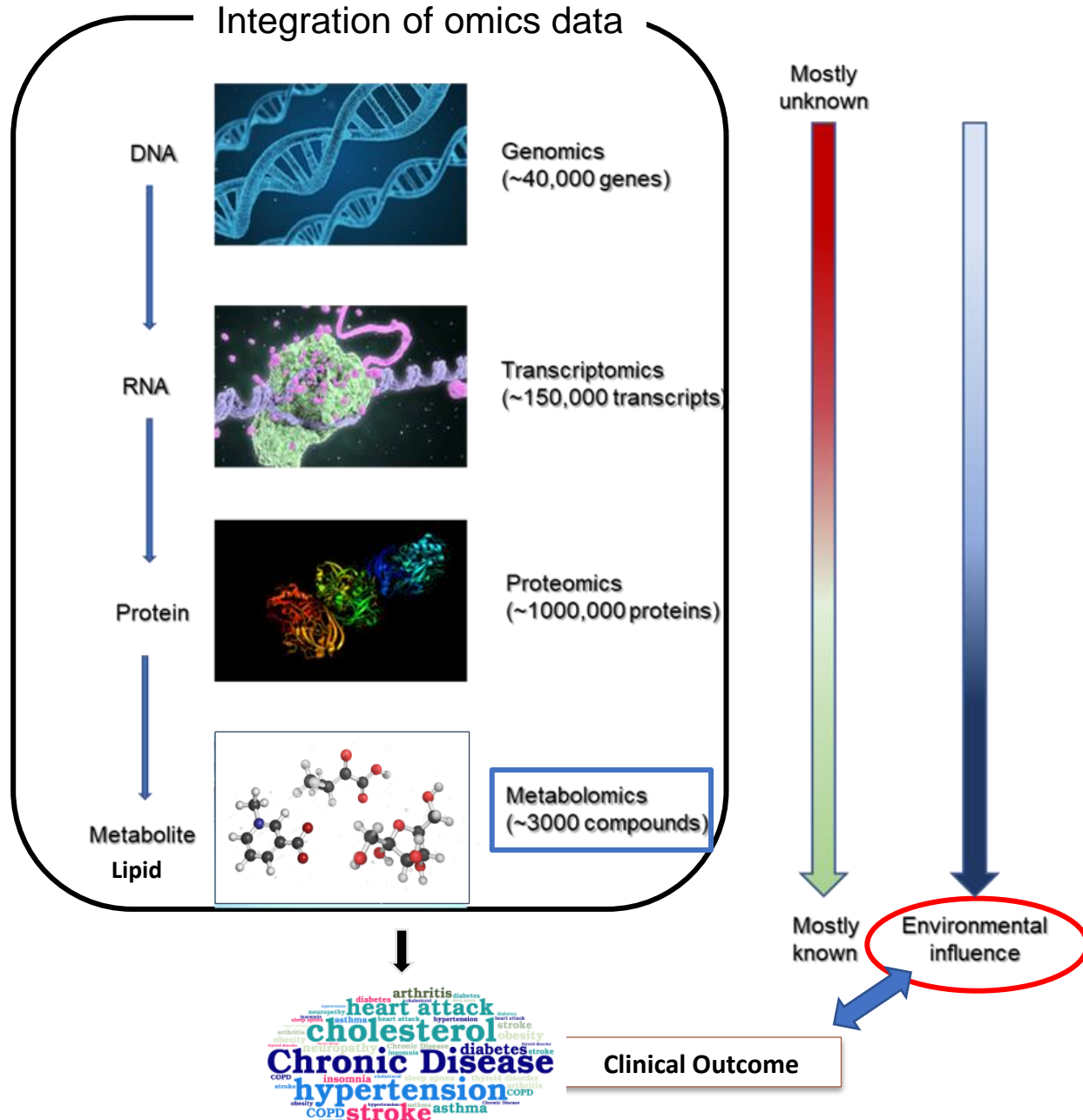
Κωνσταντίνα Ισμήνη Τσέζου

Καθ. Ε. Μικρός

Καθ. Π.Γ.Βλαχογιαννόπουλος

09.11.2022

Τεχνικές -Ομικής

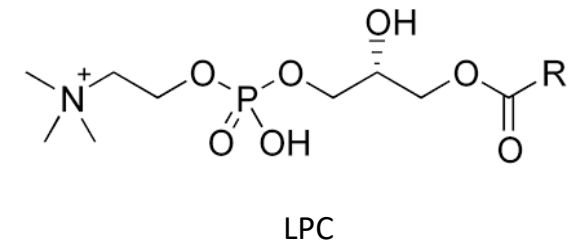


Η μεταβολομική περιγράφει το συνολικό αποτύπωμα των μεταβολιτών μια δεδομένη χρονική στιγμή ενός βιολογικού συστήματος.

Οι μεταβολίτες είναι τα ενδιάμεσα ή/και τα τελικά προϊόντα του μεταβολισμού, που είναι μόρια με χαμηλό μοριακό βάρος (<1.5 kDa)



Η λιπιδομική είναι η ολιστική μελέτη των λιπιδίων και των σχετικών μορίων σε ένα βιολογικό σύστημα, η οποία εξετάζει τη σύσταση, τη δομή, τις λειτουργίες τους σε μια συνθήκη.





Τεχνικές Μεταβολομικής

Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (^1H NMR)



- ✓ Μη καταστροφική ανίχνευση (μM έως mM)
- ✓ Πολύ καλή επαναληψιμότητα
- ✓ Ελάχιστος χειρισμός δείγματος
- ✓ Ποσοτικοποίηση
- ✓ Πληροφορίες για τη δομή μορίων
- ✗ Χαμηλή ευαισθησία
- ✗ Μεγάλη ποσότητα δείγματος
- ✗ Ανίχνευση μέχρι 200 μεταβολίτες

Φασματομετρία Μάζας (MS)



- ✓ Υψηλή ευαισθησία
- ✓ Ανίχνευση >1000 μεταβολιτών σε ένα πείραμα
- ✓ Q-TOF: Υψηλή ανάλυση και ακριβής προσδιορισμός μάζας
- ✓ Triple Quadrupole: Ποσοτικοποίηση (όχι απόλυτη)
- ✓ Υψηλή ειδικότητα
- ✗ Καταστροφική ως προς το δείγμα
- ✗ Περίπλοκη η ταυτοποίηση μεταβολιτών
- ✗ Θόρυβος στο φάσμα
- ✗ Κακή επαναληψιμότητα
- ✗ Δύσκολη ανάπτυξη μεθοδολογίας



Μελέτης μεταβολομικής στην ΡΑ

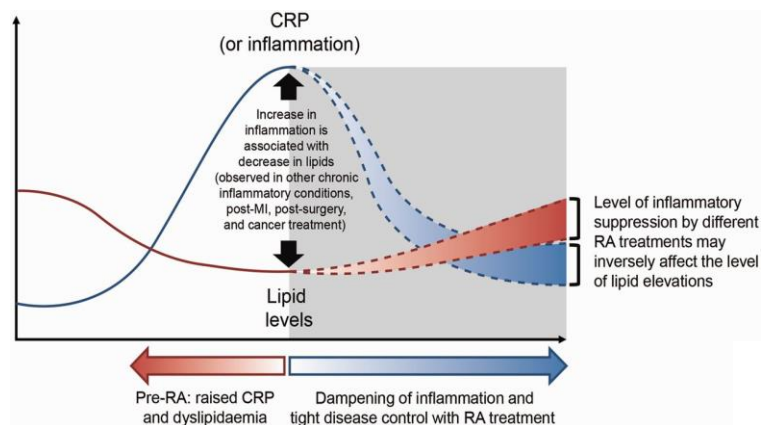
Πολλές μελέτες μεταβολομικής στη ΡΑ με χρήση ορού, πλάσματος, ούρων και αρθρικού υγρού

Πρώτη μελέτη μεταβολομικής στη ΡΑ (Lauridsen et al., 2010)

Αλλαγές στους μεταβολίτες:

- ✓ Πριν και μετά τη θεραπεία
- ✓ Σε ανταποκρινόμενους και μη
- ✓ Ενεργή ΡΑ και ασθενείς σε ύφεση
- ✓ Προσδιορισμός διαφορών στο μεταβολικό προφίλ άλλων τύπων αρθρίτιδας (RA, OA, PsA)

Περιορισμένες πληροφορίες σχετικά με τα είδη λιπιδίων στην ΡΑ



Reference	Matrix	Instruments	Disease Activity and/or Severity	Patients Treated?	Biomarker Categories *	Results
Rantapää-Dahlqvist 1991 [50]	Plasma	ELISA and radioimmunoassay kit	Median	Yes	D	↑ lipoprotein (a) ↓ cholesterol, HDL
Lauridsen 2010 [44]	Plasma	¹ H-NMR	Mixed: DAS28 active (5.0), in remission (2.6)	N/A	D, M	↑ cholesterol C-21, lactate, acetylated glycoprotein, unsaturated lipid ↓ HDL
Chandrasekharan 2018 [36]	Plasma	LC-MS	DAS28 (2.7)	Yes (mixed)	D, Ri	↑ L-ornithine, ADMA, SDMA ↓ L-citrulline
Sasaki 2019 [32]	Plasma	CE-Q-TOF-MS	Mixed: DAS28-ESR active (>3.2), inactive (<3.2)	No biologicals	D, M	↑ N,N-dimethylglycine, urea ↓ guanidoacetic acid, histidine, homoarginine or N6,N6,N6-trimethyllysine
Kishikawa 2021 [60]	Plasma	CE-TOF-MS	N/A	N/A	D	↑ ethanolamine phosphate, ATP, GDP, ADP, 6-aminohexanoic acid, taurine

Ο μεταβολισμός στη ΡΑ παρουσιάζει διαταραχές στα αμινοξέα, στους μεταβολίτες του κύκλου τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA), στο γαλακτικό οξύ, στη γλυκόζη και στη χοληστερόλη, καθώς και στα λιπίδια

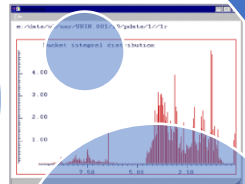
						↓ methionine, cholesterol, asparagine, threonine
						↑ lactic acid
Ouyang 2011 [29]	Serum	¹ H-NMR	N/A	Yes (mixed)	D	↑ glucose, creatinine, pyruvate, citrate, proteinogenic AAs, glycerides, phosphocholine
Young 2013 [43]	Serum	¹ H-NMR	N/A	Naive for DMARDs	D, M	↑ 3-hydroxybutyrate, lactate, acetylglucine, taurine, glucose ↓ LDL-CH3, LDL-CH2, alanine, methylguanidine, lipids
Jiang 2013 [26]	Serum	GC-TOF-MS and UPLC-QTOF-MS	Mixed: active, mild, or moderate	N/A	D, M	↑ homoserine, glyceraldehyde, lactic acid, dihydroxyfumaric acid, aspartic acid ↓ 4,8-dimethylnonanoyl carnitine



Workflow: Ανάλυση δεδομένων λιπιδιομικής

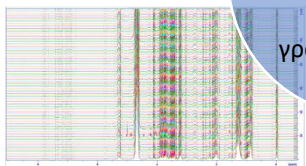


Συλλογή
Δεδομένων
NMR ή Mass
Spec

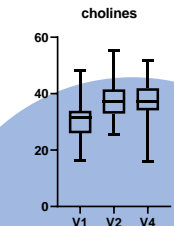


Μετατροπή
Φασματικής
πληροφορίας σε
Αριθμητική,
Κανονικοποίηση

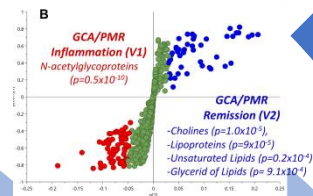
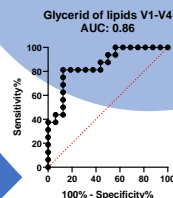
Μαθηματική
Επεξεργασία
(βαθμονόμηση,
διόρθωση
φάσης,
γραμμής βάσης)



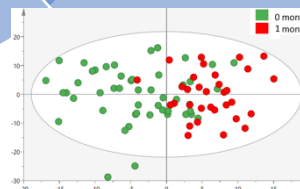
Συλλογή Δεδομένων NMR



Μονοπαραμετρική
T-test, ROC, AUC
Θηκογράμματα,



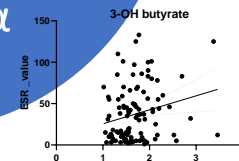
Πολυπαραμετρική Μη
επιβλεπόμενη: PCA
Επιβλεπόμενες:
PLS-DA, oPLS-DA, PLS



Στατιστική Ανάλυση

Principal component analysis (PCA)
Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA)
Orthogonal partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA)

1.ο Διερεύνηση
Βιοχημικών
Μονοπατιών
2.ο Συνδυασμός
με κλινικά
δεδομένα



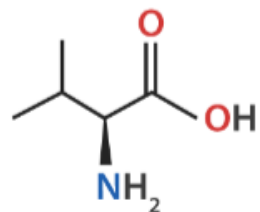
Μοριακοί Μηχανισμοί & Βιοδείκτες

- ✓ Διάγνωση
- ✓ Παρακολούθηση
- ✓ Πρόγνωση
- ✓ Απόκριση
- ✓ Κίνδυνος
- ✓ Ασφάλεια

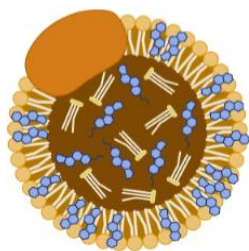


Σκοπός της μελέτης μας

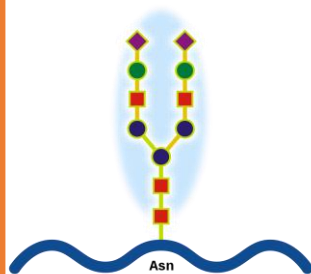
- ✓ Χαρακτηρισμός του λιποπρωτεϊνικού και λιπιδικού προφίλ σε ασθενείς με Ρευματοειδή αρθρίτιδα
- ✓ Ανακάλυψη βιοδεικτών που ξεχωρίζουν ασθενείς με RA στην έξαρση και ύφεση της νόσου



41 μεταβολίτες



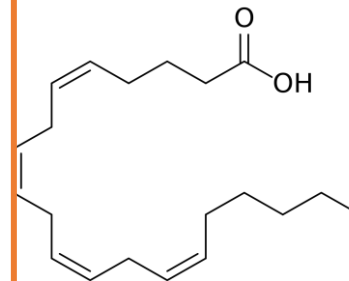
4 λιποπρωτεΐνες και
>100 υποκατηγορίες



Γλυκοπρωτεΐνη
A & B



15 ομάδες λιπιδίων
>700 είδη λιπιδίων



>40 οξυλιπίνες
(PUFA)

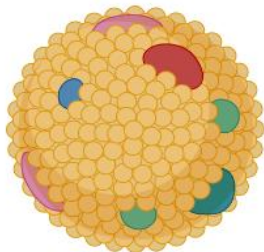
Plasma
RA: 156
Ctr: 46



Οι λιποπρωτεΐνες

Bruker IVDr B.I.LISA Lipoprotein Subclass Analysis
Ποσοτικοποίηση 112 λιποπρωτεϊνών

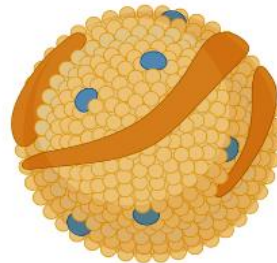
HDL lipoprotein



LDL lipoprotein



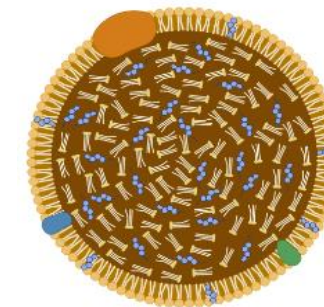
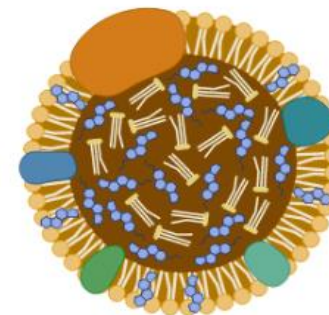
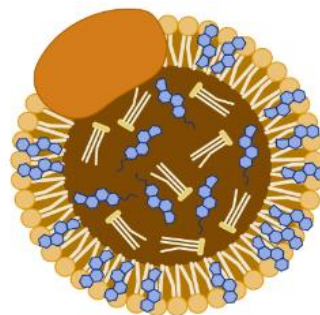
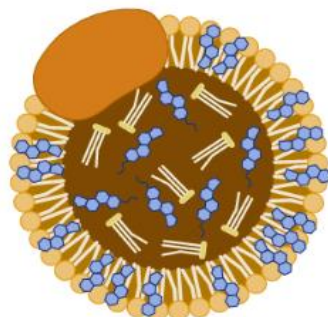
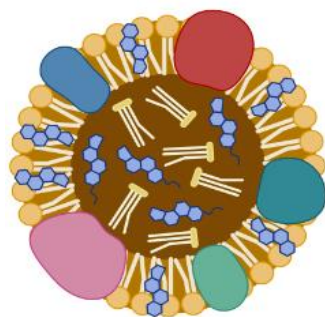
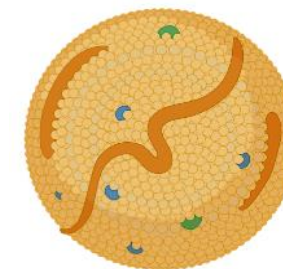
IDL lipoprotein



VLDL lipoprotein



Chylomicron



Diameter (nm)

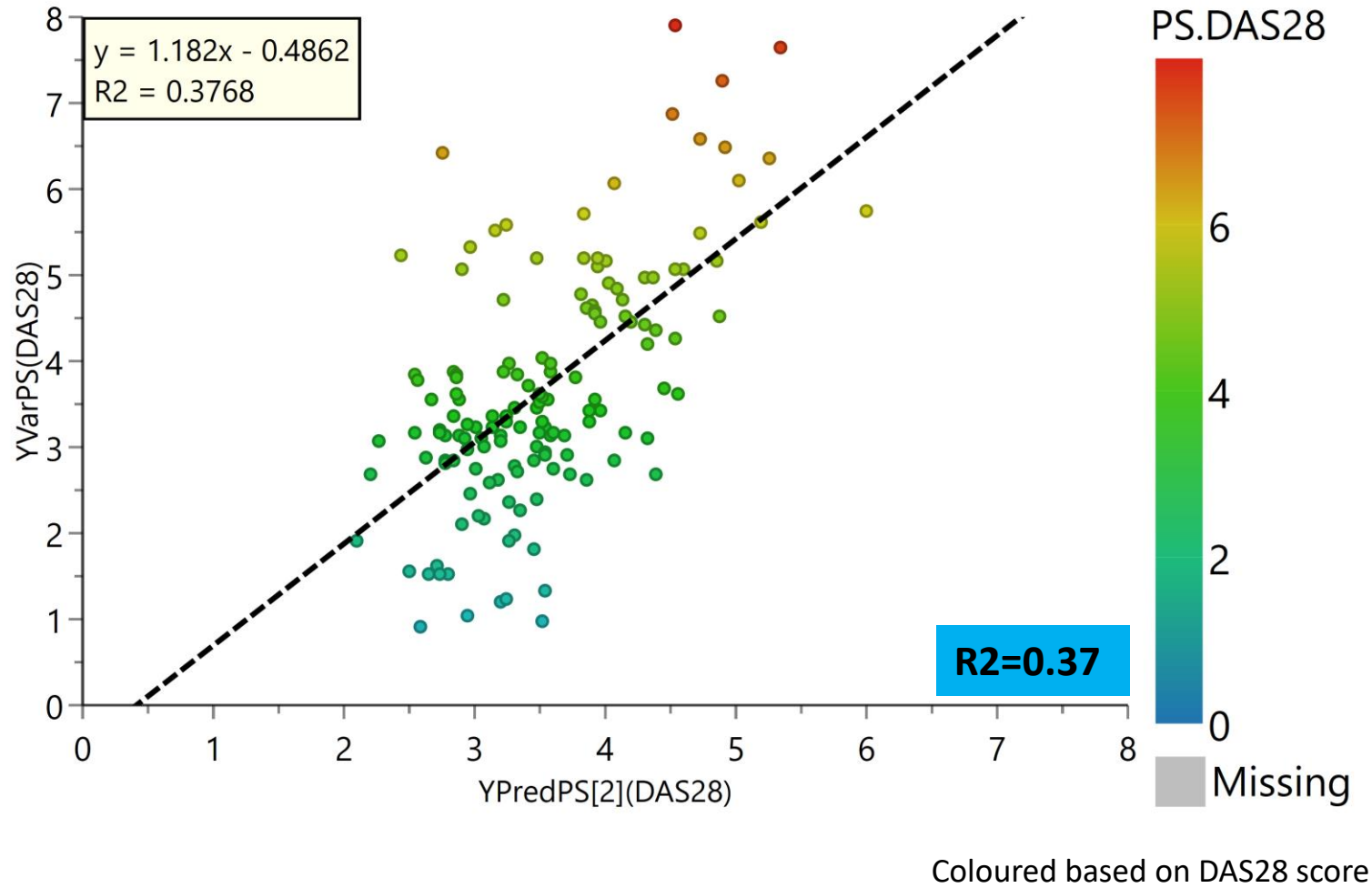
Density (g/mL)

Smaller size/diameter
Larger density

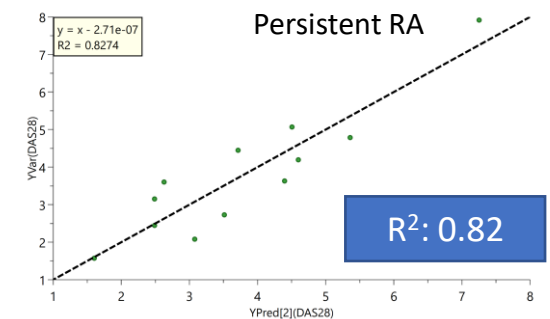
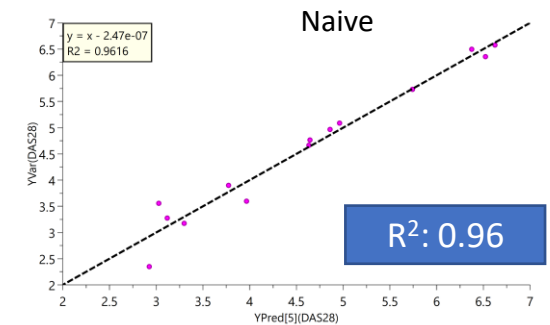
Larger size/diameter
Smaller density



Πολυπαραμετρική συσχέτιση του λιποπρωτεϊνικού προφίλ με το DAS28



DAS28 classification	DAS28 Scale	n
Remission	<2.6	33
Low activity	2.6 – 3.2	41
Moderate Activity	>3.2 – 5.1	66
High Activity	>5.1	21
Total		156



Μονοπαραμετρική συσχέτιση του λιποπρωτεϊνικού προφίλ με κλινικούς παράγοντες

DAS28	CRP	ESR	VAS	
				TPTG
	*	*		TPCH
*	**	*		TPA1
		*		TPA2
				TPAB
				LDHD
				ABA1
				TBPN
				IDPN
				IDTG
				IDCH
				IDFC
				IDPL
				IDAB

Συσχέτιση λιποπρωτεϊνών με:

- Δείκτη ενεργότητας της νόσου DAS28
- Δείκτες φλεγμονής CRP και TKE
- Κλίμακα VAS

Θετική συσχέτιση (κοκκινο) χαρακτηρίζει την έξαρση

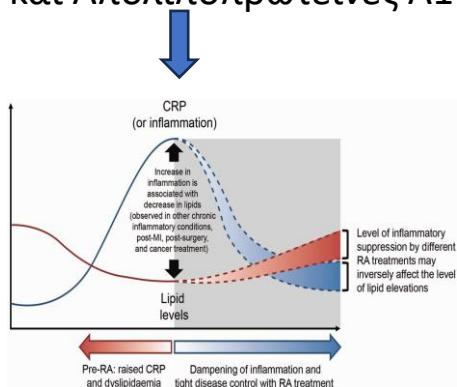
Αρνητική συσχέτιση (μπλε) χαρακτηρίζει την ύφεση

DAS28	CRP	ESR	VAS	
				TPTG
	*	*		TPCH
*	**	*		TPA1
		*		TPA2
				TPAB
				LDHD
				ABA1
				TBPN
				IDPN
				IDTG
				IDCH
				IDFC
				IDPL
				IDAB

Στην έξαρση της PA:

↑ Συνολικά Τριγλυκερίδια (TPTG)

↓ Συνολική Χοληστερόλη (TPCH), LDL-Χοληστερόλη (LDCH) και HDL- Χοληστερόλη (HDCH), και Απολιποπρωτείνες A1 και A2



DAS28	CRP	ESR	VAS	
*				LDCH
*				LDTG
*				LDFC
*				LDPL
				LDAB
				LDPN
				L1PN
*				L2PN
				L3PN
		*		L4PN
				L5PN
				L6PN
			*	L1TG
				L2TG
				L3TG
				L4TG
				L5TG
*		*		L6TG
				L1CH
*				L2CH
*				L3CH
		*		L4CH
		*		L5CH
				L6CH
				L1FC
*				L2FC
*				L3FC
				L4FC
				L5FC
				L6FC
				L1PL
*				L2PL
*				L3PL
		*		L4PL
				L5PL
				L6PL
				L1AB
*				L2AB
				L3AB
		*		L4AB
				L5AB
				L6AB

LDL TGs
LDL-6 Τριγλυκερίδια
 LDL μικρής διαμέτρου
 Μεγάλης πυκνότητας

LDL-2&3
 LDL μεγάλου/μεσαίου
 μεγέθους
 Μικρής πυκνότητας

Χοληστερόλη
 Φωσφολιπίδια
 Απολιποπρωτείνες

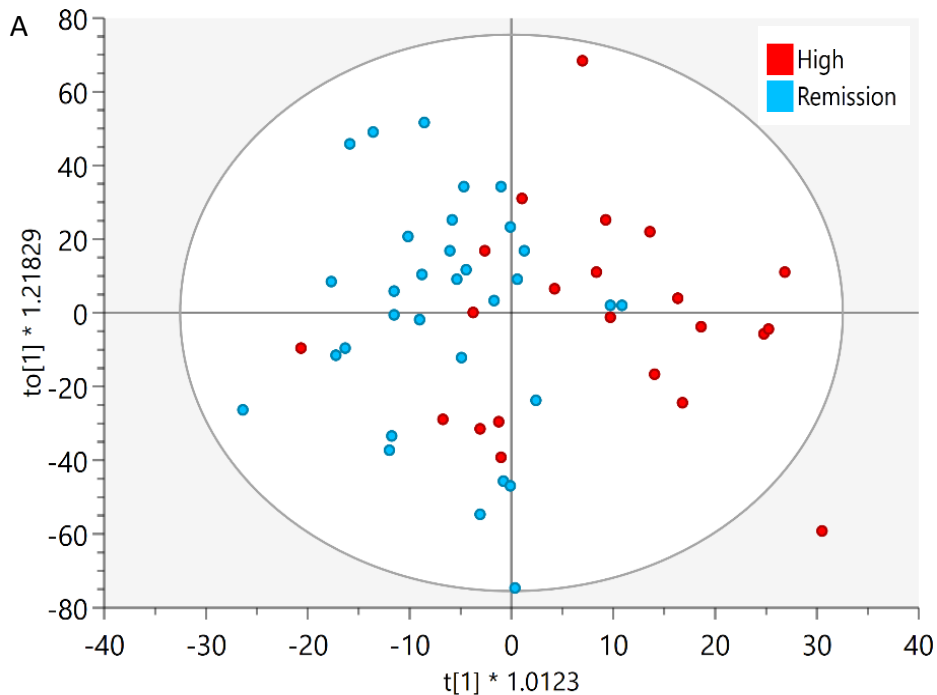
DAS28	CRP	ESR	VAS	
*	*			HDCH
				HDTG
	*			HDFC
	*			HDPL
*	**	*		HDA1
	*	*		HDA2
				H1TG
				H2TG
				H3TG
				H4TG
				H1CH
				H2CH
				H3CH
***	**	*	**	H4CH
				H1FC
				H2FC
				H3FC
				H4FC
				H1PL
				H2PL
				H3PL
*	**	*		H4PL
				H1A1
				H2A1
***	***	*	*	H3A1
				H4A1
				H1A2
				H2A2
				H3A2
*	*	*	*	H4A2

HDL-4
 HDL μικρης διαμέτρου
 Μεγάλης πυκνότητας

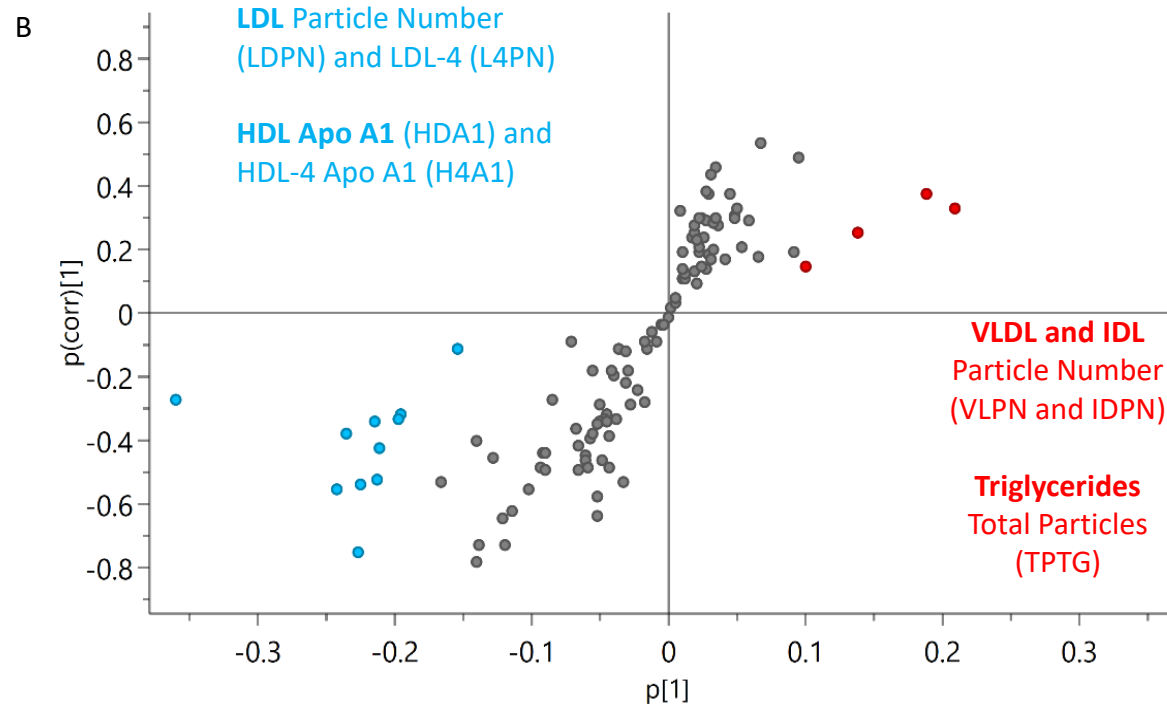
Χοληστερόλη
 Φωσφολιπίδια
 Απολιποπρωτείνες A1



Σύγκριση λιποπρωτεϊνών ανά ζεύγη: Υφεση vs Υψηλό DAS28



Το προφίλ λιποπρωτεϊνών ενός αποτυπώνεται σε μια κουκίδα



Οι λιποπρωτεΐνες που ευθύνονται για τον διαχωρισμό των ομάδων (VIPs)

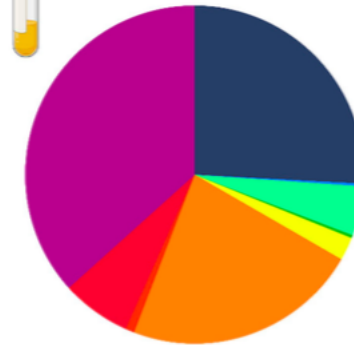


Στοχευμένη λιπιδομική μελέτη (LIPIDYZER)

Στοχευμένη τεχνική **φασματομετρίας μάζας**
Ποσοτικοποιεί είδη και ομάδες λιπιδίων (nmol/mL)

- CE: Cholesterol esters
- CER: Ceramides
- DAG: Diacylglycerides
- TAG: Triacylglycerides
- DCER: Dihydroceramides
- FFA: Free fatty acids
- HCER: Hexosylceramides
- LCER: Lactosylceramide

LPC: Phospholipase C
LPE: Lysophosphatidylethanolamine
PA: Phosphatidic acid
PC: Phosphatidylcholine
PG: Phosphatidylglycerol
PI: Phosphatidylinositol
PS: Phosphatidylserine
SM: Sphingomyelin



Μονοπαραμετρική συσχέτιση λιπιδικού προφίλ με κλινικούς δείκτες

DAS28	CRP	ESR	VAS	
				CE(14:0)
				CE(14:1)
				CE(15:0)
	*	*		CE(16:0)
				CE(16:1)
				CE(17:0)
**	**	***		CE(18:0)
				CE(18:1)
***	**	***		CE(18:2)
		*		CE(18:3)
				CE(18:4)
				CE(20:3)
			*	CE(20:4)
				CE(20:5)
	*	*		CE(22:5)
				CE(22:6)
				FFA(14:0)
				FFA(15:0)
				FFA(16:0)
				FFA(16:1)
				FFA(18:1)
				FFA(18:2)
				FFA(18:3)
				FFA(20:1)
				FFA(20:2)
	*		*	FFA(22:4)
				FFA(22:5)
				FFA(22:6)
				DAG(16:0/16:0)
*				DAG(16:0/18:1)
				DAG(16:0/18:2)
				DAG(16:1/18:1)
*				DAG(18:1/18:1)
				DAG(18:1/18:2)
*			***	DAG(18:2/20:4)

**Εστέρες
Χοληστερόλης**

Διγλυκερίδια

Θετική συσχέτιση (κοκκινο) χαρακτηρίζει την έξαρση

Αρνητική συσχέτιση (μπλε) χαρακτηρίζει την ύφεση

DAS28	CRP	ESR	VAS	
				CER(16:0)
**	*	*	***	CER(18:0)
			*	CER(20:0)
				CER(22:0)
		**		CER(24:0)
			*	CER(24:1)
				HCER(16:0)
**	**	****		HCER(22:0)
**	**	****		HCER(24:0)
				HCER(24:1)
				LCER(16:0)
				SM(16:0)
				SM(18:0)
			*	SM(18:1)
				SM(20:1)
				SM(22:1)
***	**	***		SM(24:0)
				SM(24:1)

Κεραμίδια

Εξοκυλοκεραμίδια

Σφυγγομυελίνες

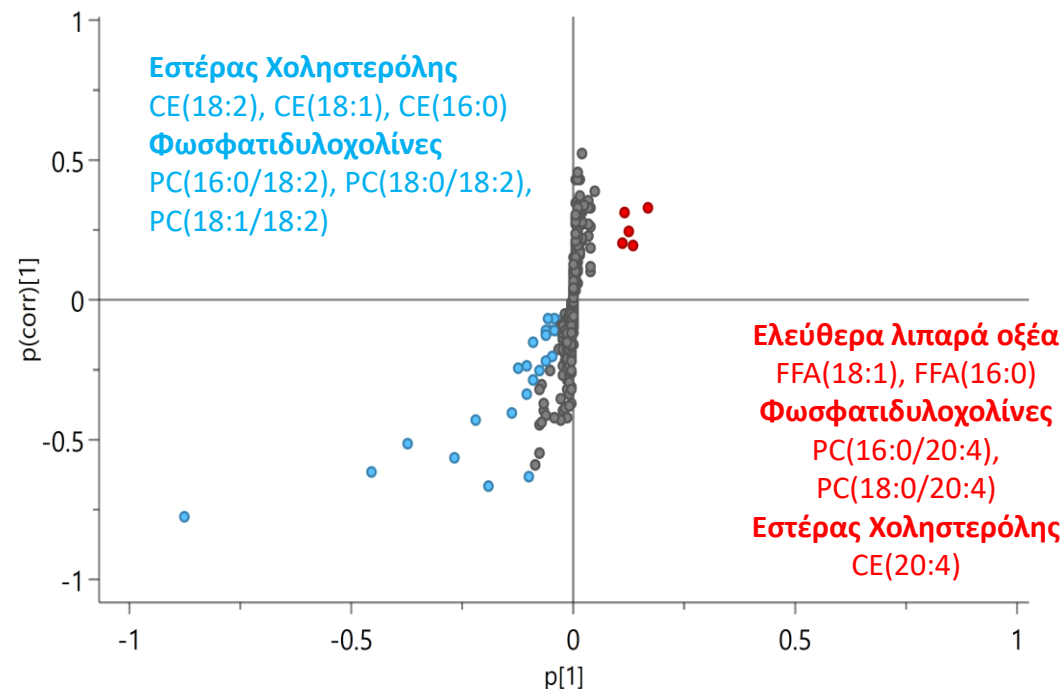
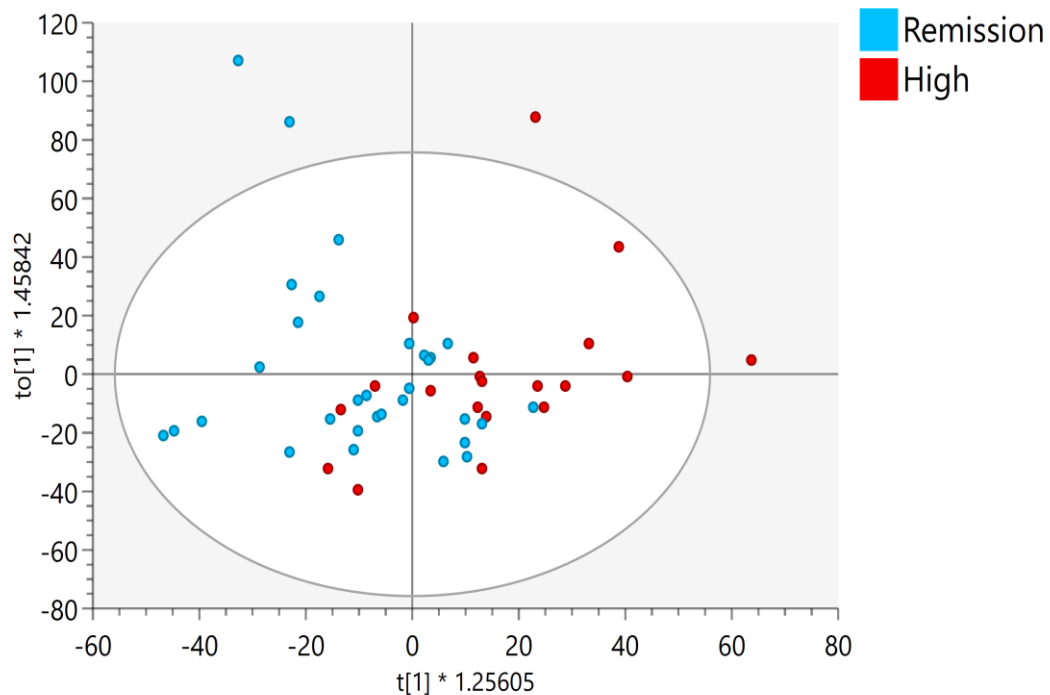
DAS28	CRP	ESR	VAS	
*	***	**		LPC(16:0)
**	****	***		LPC(18:0)
*	**	*		LPC(18:1)
	*			LPC(20:4)
	***			LPE(18:1)
				PA(34:4)
				PC(16:0/18:1)
*	*	****		PC(16:0/18:2)
				PC(16:0/20:3)
			**	PC(16:0/20:4)
				PC(18:0/18:1)
*	**	***		PC(18:0/18:2)
	*		*	PC(18:0/20:4)
				PC(18:1/18:1)
*	**	**		PC(18:1/18:2)
**	***	***		PC(18:2/18:2)

**Λυσο-
φωσφατιδυλοχολίνες**

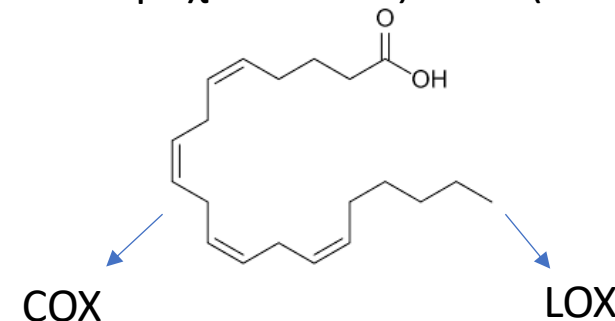
Φωσφατιδυλοχολίνες



Σύγκριση λιπιδίων: Υφεση vs Υψηλό DAS28



Αραχιδονικό οξύ 20:4(ω-6)





Δείκτες που προβλέπουν την ύφεση

Λιποπρωτεΐνες

	AUC	Pval
H4A1	0.797101	0.000346
Histidine	0.779315	0.006223
H4CH	0.776021	0.000274
H4A2	0.751647	0.001775
H4PL	0.731225	0.002416

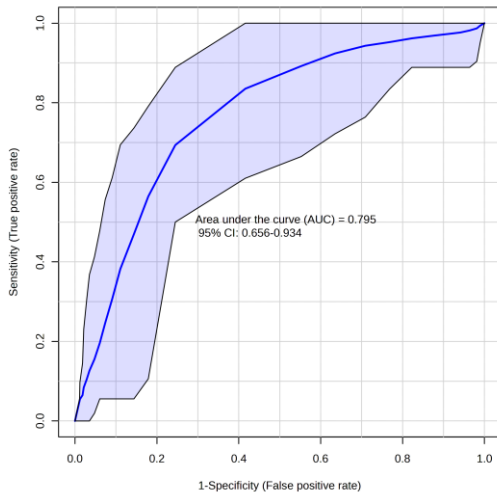
	AUC	Pval
L1PN/L1CH	0.818182	2.30E-05
L1CH/L1AB	0.816864	2.26E-05
LDCH/LDTG	0.815547	3.00E-05
LDTG/LDPL	0.810277	4.75E-05
L6TG/L6PL	0.807642	7.90E-06

Λιπίδια

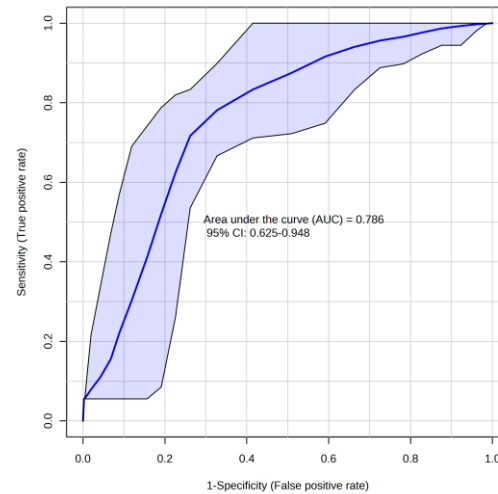
	AUC	Pval
CER(18:0)	0.768182	0.000643
CE(18:0)	0.728788	0.013382
PC(18:2/18:2)	0.724242	0.019496
SM(24:0)	0.722727	0.002649
TAG55:5-FA20:4	0.719697	0.008457

	AUC	Pval
CER(18:0)/SM(24:0)	0.877273	1.72E-07
CE(18:0)/CER(18:0)	0.866667	8.82E-08
CE(16:0)/CER(18:0)	0.860606	8.37E-06
CE(18:2)/CER(18:0)	0.859091	1.85E-06
CER(18:0)/HCER(22:0)	0.851515	6.10E-06

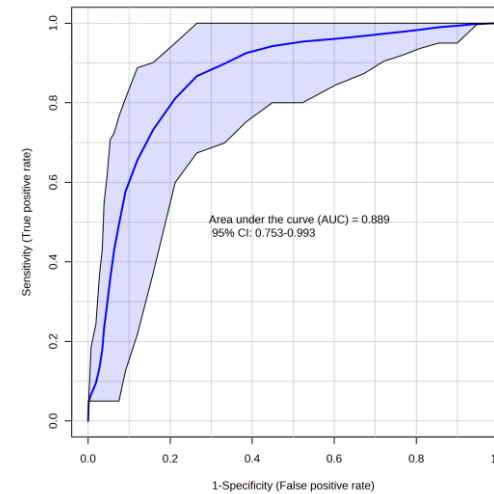
Multi ROC



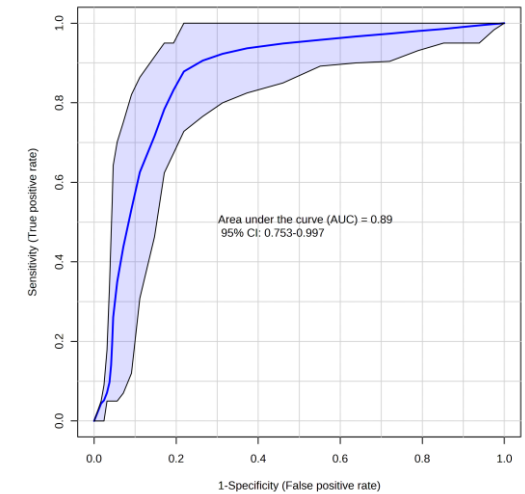
Multi ROC



Multi ROC



Multi ROC





Δείκτες έξαρσης και ύφεσης στην ΡΑ

	Έξαρση	Ύφεση
Λιποπρωτείνες	LDL-6 TAG	HDL-4 Apolipoprotein A1 and A2 LDL-2 and 3
Λιπίδια	Ceramides • CER(18:0) Triacylglycerides ΛΟΓΟΙ ΛΙΠΙΔΙΩΝ CER(18:0)/SM(24:0) CE(18:0)/CER(18:0)	Lysophosphatidylcholine • LPC(16:0), LPC(18:0) Cholesterol Esters • CE(18:0), CE(18:2) Phosphatidylcholine • PC(PC(16:0/18:3) PC(18:0/18:2),PC(18:1/18:2),PC(18:3/18:2) SM(24:0)

Ευχαριστίες

Επιστημονικοί Υπεύθυνοι

Καθ. Παναγιώτης Γ. Βλαχογιαννόπουλος

Καθ. Εμμανουήλ Μικρός

Καθ. Αθανάσιος Γ. Τζιούφας

Συνεργάτες στη Φαρμακευτική ΕΚΠΑ

Δρ. Δήμητρα Μπενάκη

Δρ. Κατερίνα Ηλιού

Συνεργάτες στο LUMC

Dr. Martin Giera

Mohan Ghorasaini

Συλλογή δειγμάτων

Δρ. Λουκάς Χατζής

Δρ. Άριελ Αργυροπούλου

Δρ. Βίλυ Κουλούρη