

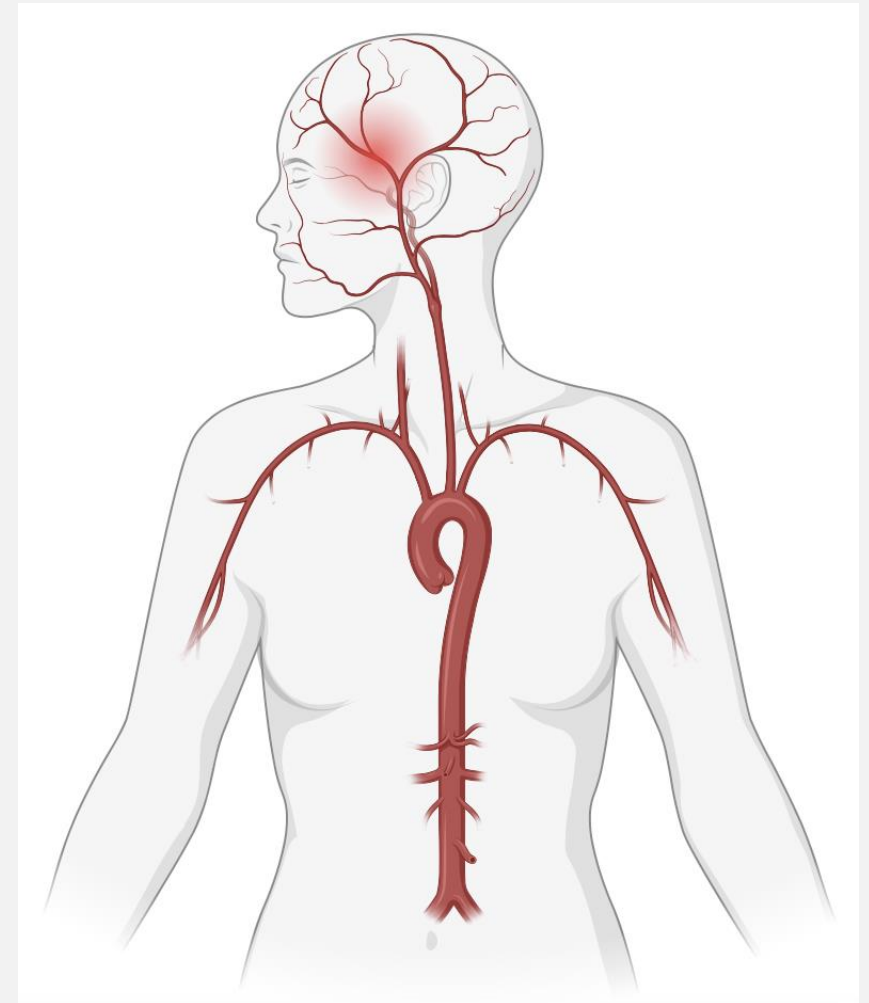
**ΑΝΑΛΥΣΗ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ
CYTOF, ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ ΚΑΙ ΜΙΚΡΩΝ ΛΙΠΙΔΙΚΩΝ ΜΕΣΟΛΑΒΗΤΩΝ ΣΤΑ ΠΡΩΙΜΑ
ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΜΕ ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΡΕΥΜΑΤΙΚΗ ΠΟΛΥΜΥΑΛΓΙΑ ΚΑΙ
ΓΙΓΑΝΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΡΘΗΡΙΤΙΔΑ**

Παλαμηδάς Δ.Α.¹, Παπαδάκη Μ.², Πασχαλίδης Ν.³, Παύλου Ε.², Χατζής Λ.^{1,2}, Αργυροπούλου Ο.¹,
Πάλλα Π.¹, Γαλάνη Ι.², Γουλές Α.¹, Ανδρεάκος Ε.², Τζιούφας Α.Γ.^{1,2}

1. Εργαστήριο Παθολογικής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
2. Εργαστήριο Ανοσολογίας, Κέντρο Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής & Μεταφραστικής Έρευνας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών
3. Μονάδα CyTOF, Κέντρο Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής & Μεταφραστικής Έρευνας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

Εισαγωγή – Γιγαντοκυτταρική Αρτηρίτιδα (GCA)

- Αυτοάνοσο νόσημα, που προσβάλλει τα μεγάλα αγγεία ατόμων άνω των 50 ετών
- Συμπτώματα: πυρετός, πονοκέφαλος, χωλότητα των γνάθων, ρευματική πολυμυαλγία (PMR)
- Συννοσηρότητες απειλητικές για τη ζωή: Απώλεια όρασης, ανεύρυσμα αορτής
- Διάγνωση: Βιοψία κροταφικής αρτηρίας και υψηλοί δείκτες φλεγμονής (ESR, CRP)
- PET-CT, Υπέρηχος Κροταφικών αρτηριών
- Θεραπεία: Γλυκοκορτικοειδή (GCs), Tocilizumab (IL-6R)

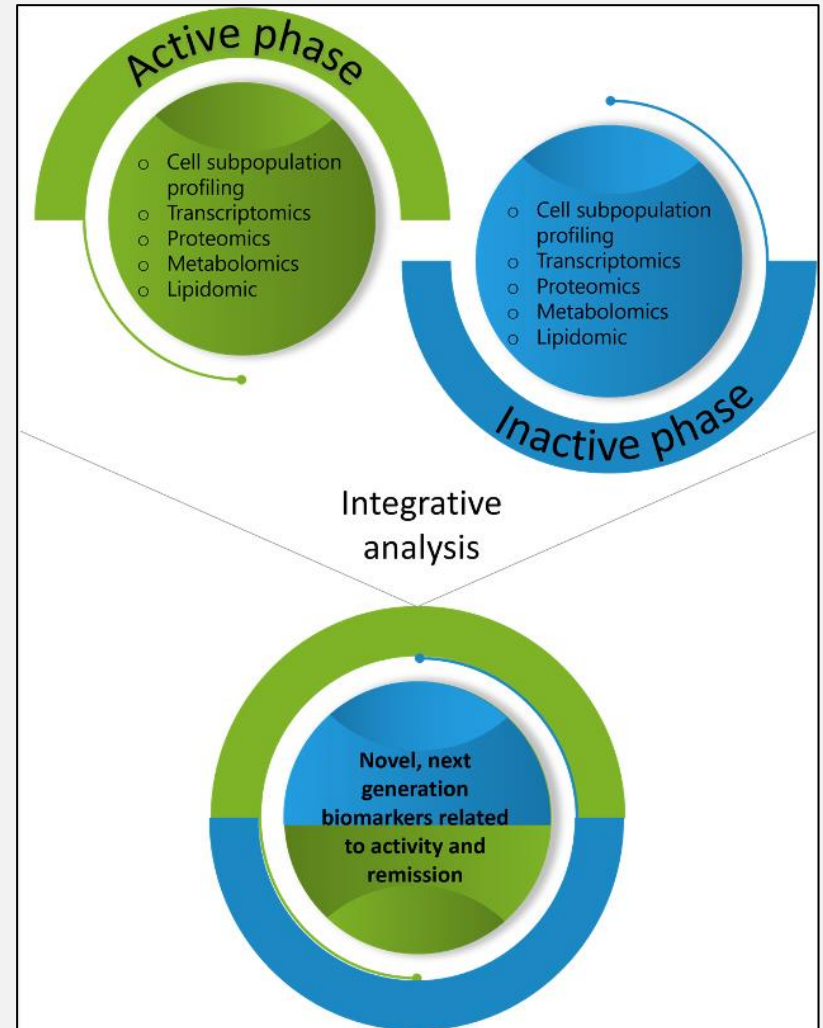


Βιοδείκτες στην GCA

- ✓ Νέοι βιοδείκτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες ενεργότητας της νόσου, και ως εργαλεία επιλογής θεραπείας.

Πρόταση για την ταυτοποίηση νέων βιοδεικτών επόμενης γενιάς στη GCA που διαθέτουν δύο χαρακτηριστικά:

- συνδέονται άμεσα με τον παθογενετικό μηχανισμό
- προέρχονται από την ενσωμάτωση πολλαπλών βιολογικών δεδομένων υψηλής απόδοσης σε δύο χρονικά σημεία κατά την ενεργότητα και την ύφεση της νόσου



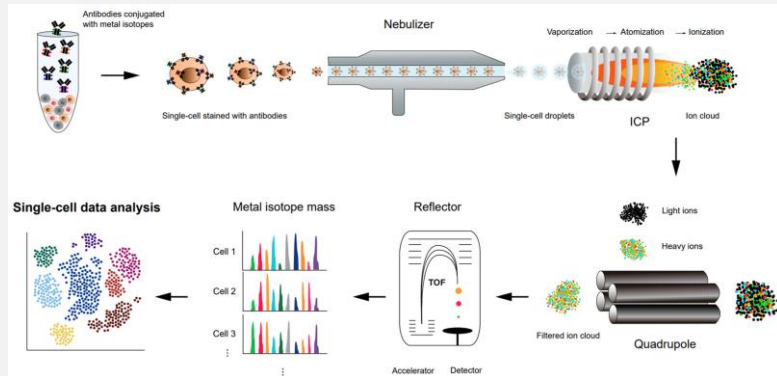
Σκοπός της Μελέτης

- ✓ Να μελετήσει την επίδραση της θεραπείας με GCs στο ανοσολογικό προφίλ των ασθενών κατά την πρώιμη φάση της φλεγμονώδους απόκρισης
- ✓ Να περιγράψει το προφίλ των ανοσοποιητικών κυττάρων κατά τη διάγνωση της νόσου και να ανιχνεύσει διαφορές μεταξύ GCA και PMR, με στόχο επίσης να διερευνήσει τους πιο απορυθμισμένους άξονες φλεγμονωδών κυττάρων στη νόσο
- ✓ Να διερευνήσει την έκφραση κυτταροκινών του πλάσματος και μικρών λιπιδικών μεσολαβητών κατά την ενεργότητα και την ύφεση της νόσου

Μέθοδοι

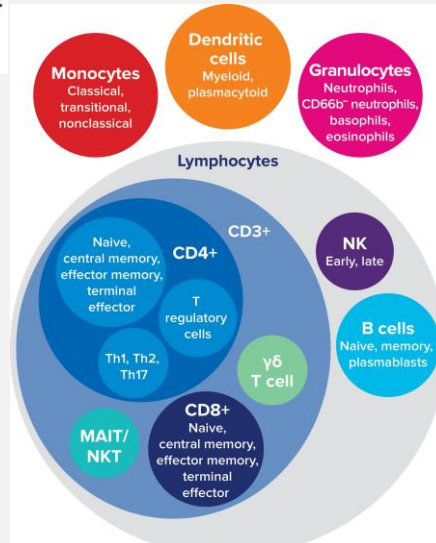
A. Ανάλυση CyTOF

Σύνοψη διαδικασίας Κυτταρομετρίας Μάζας CyTOF (Cytometry by Time Of Flight)

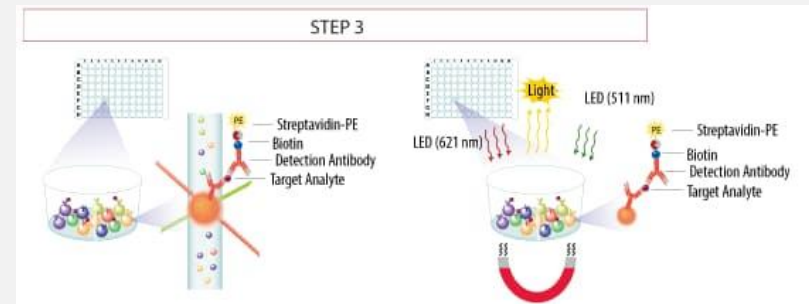
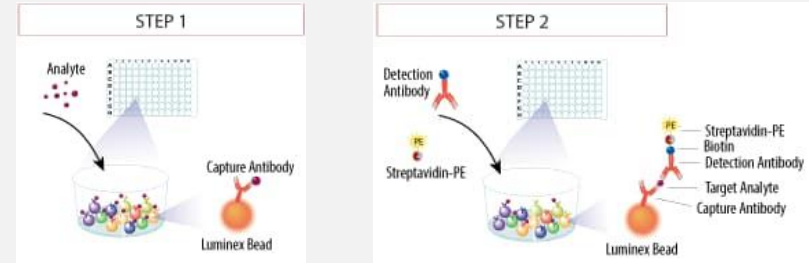


MaxPar Immune profiling kit

- ✓ 30 δείκτες σήμανσης ανοσοκυττάρων
- ✓ Τουλάχιστον 37 ανοσοφαινότυποι προς ταυτοποίηση



B. Luminex Assay



21-target customized panel for the Luminex immunoassay

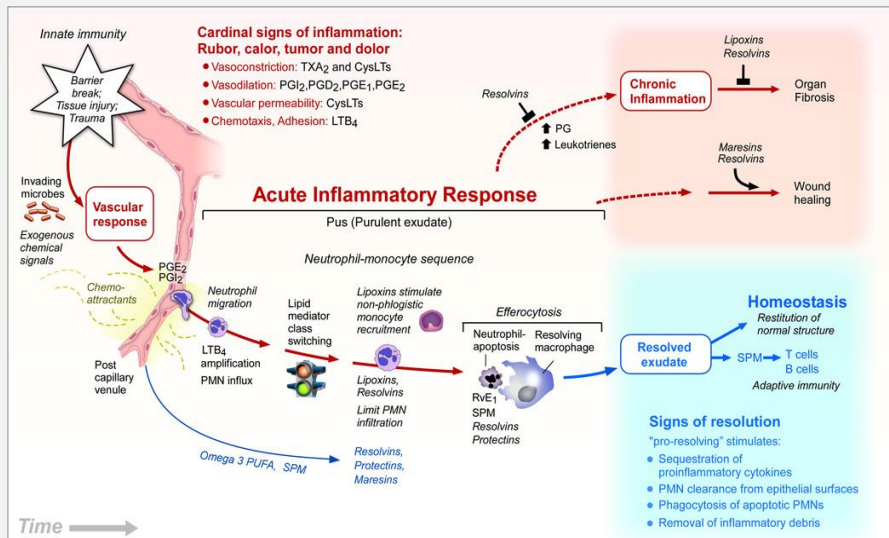
I-TAC	GM-CSF	Fractalkine
IFN-γ	MIP-1a	MIP-1b
MIP-3A	TNF-α	IL-1-β
IL-2	IL-4	IL-5
IL-6	IL-7	IL-8
IL-10	IL-12	IL-13
IL-17A	IL-21	IL-23

Luminex Assay

- ✓ 21 κυτταροκίνες/χυμοκίνες
- ✓ Πολλαπλή/Ταυτόχρονη ταυτοποίηση αναλυτών στο ίδιο δείγμα ορού

Μέθοδοι Γ. Μέτρηση Μικρών Λιπιδικών Μεσολαβητών

- ✓ Τα γλυκοκορτικοειδή ρυθμίζουν τα δίκτυα μικρών λιπιδίων (LMs) με αμοιβαία τροποποίηση των ισομορφών της 15-λιποξυγενάσης που επηρεάζουν την επίλυση της φλεγμονής (*Rao et al., PNAS, 2023*)
- ✓ Οι φλεγμονώδεις λιπιδικοί μεσολαβητές είναι υψηλοί στην COVID-19 (*Andreakos et al., 2020*)
- ✓ Η δεξαμεθαζόνη επάγει την παραγωγή LMs που προέρχονται από ω3 οδηγώντας στην επίλυση της αλλεργικής φλεγμονής των αεραγωγών (*Pyrillou et al., JACI, 2018*)



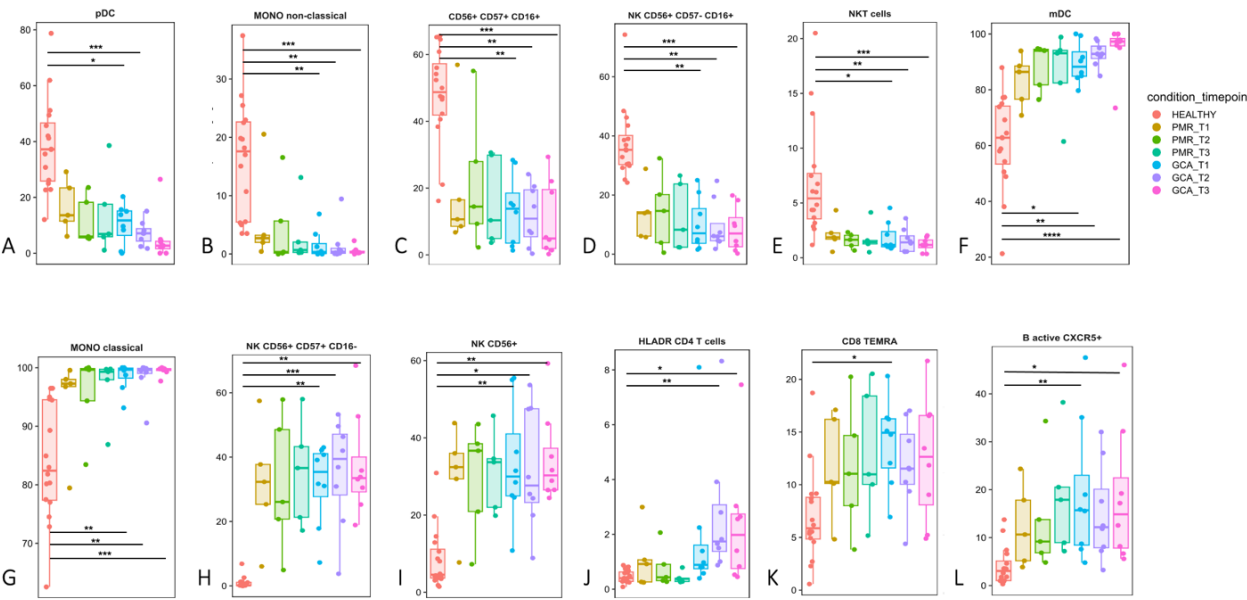
Serhan CN. Nature 2014

- ✓ LC MS/MS
- ✓ Υγρή χρωματογραφία με φασματομετρία μάζας
- ✓ Μέτρηση 25 βασικών μικρών λιπιδικών διαμεσολαβητών (φλεγμονωδών και αντι-φλεγμονωδών)

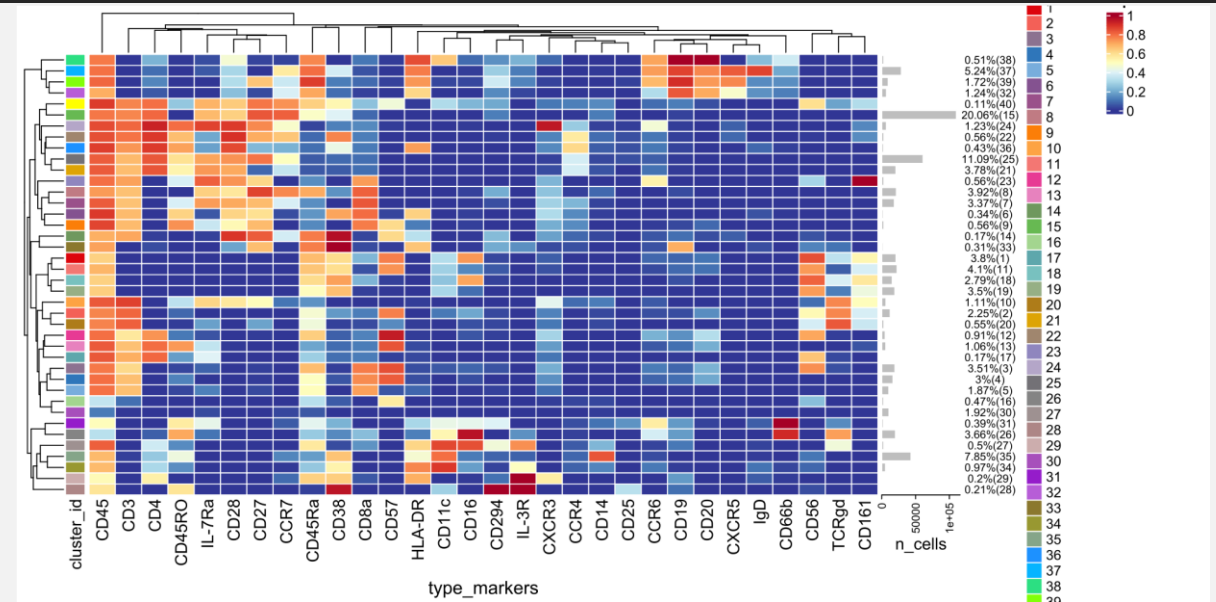


Αποτελέσματα Α. Ανάλυση CyTOF

✓ Εντοπίστηκαν 40 φαινότυποι ανοσοκυττάρων στα δείγματα που μελετήθηκαν (Εικόνα 1).



Εικόνα 2: Διαγράμματα των στατιστικά σημαντικών διαφορών στους υποπληθυσμούς/φαινοτύπους ανοσοκυττάρων μεταξύ δειγμάτων με ΓΑ (n=8) και υγιών δοτών (n=16). Κάθε τύπος κυττάρου εμφανίζεται ως το ποσοστό της κύριας κατηγορίας ανοσοκυττάρων που ανήκουν και όχι των συνολικών περιφερικών μονοπύρηνων κυττάρων που μετρήθηκαν με κυτταρομετρία μάζας (CyTOF). Α. πλάσμακυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα (pDCs), Β. Μη κλασικά Μονοκύτταρα, C. CD56+ CD57+ CD16+ κύτταρα, D. CD56+ CD57- CD16+ NK κύτταρα, E. NKT κύτταρα, F. μελοειδή δενδριτικά κύτταρα (mDCs), G. Κλασικά Μονοκύτταρα, H. CD56+ CD57+ CD16- NK κύτταρα, I. CD56+ NK κύτταρα, J. HLADR+ CD4+ Τ κύτταρα, K. CD8+ TEMRA Τ κύτταρα, L. CXCR5+ Β κύτταρα. Η στατιστική σημαντικότητα υποδεικνύεται με αστέρια ως εξής: * 0,01<p<0,05; ** 0,001<p<0,01; *** 0,0001<p<0,001



Εικόνα 1: Heatmap (χάρτης θερμότητας) των διάμεσων εντάσεων δεικτών (arcsinh, μετασχηματισμένη διάμεση έκφραση δείκτη που υπολογίζεται σε κύτταρα περιφερικού αίματος που αναλύθηκαν με κυτταρομετρία μάζας (CyTOF), n=55) των 30 μεμβρανικών δεικτών στους 40 κυτταρικούς υποπληθυσμούς/φαινοτύπους που ελήφθησαν μέσω του προγράμματος ανάλυσης FlowSOM. Η ιεραρχική ομοιότητα μεταξύ των 40 υποπληθυσμών σημειώνεται με ένα δένδrogramma στα αριστερά (Ευκλείδεια απόσταση - μέση σύνδεση). CyTOF: Cytometry by time of flight

✓ Για τους κύριους τύπους ανοσοκυττάρων που εντοπίστηκαν [CD4, CD8, TCRgd κύτταρα, NK κύτταρα, Β κύτταρα, Μονοκύτταρα και Δενδριτικά Κύτταρα] δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ασθενών με PMR και GCA στα χρονικά σημεία T1-T3.

✓ Η ανάλυση των υποπληθυσμών/φαινοτύπων ανοσοκυττάρων αποκάλυψε σημαντικές διαφορές σε ορισμένους κυτταρικούς φαινοτύπους μεταξύ ασθενών με GCA και υγιών δοτών (Εικόνα 2).

Αποτελέσματα

B. Luminex Assay

✓ Δεν εντοπίστηκαν διαφορές στα επίπεδα κυταροκινών μεταξύ ασθενών με GCA και PMR

Ωστόσο παρατηρήθηκαν:

➤ **Ασθενείς GCA vs Υγιών δοτών:**

ITAC, TNF-α, MIP-3α, IFN-γ (T1, T2), IL-2 (T2), IL-7 → **αυξημένα** επίπεδα

IL-8, IL-21, IL-23 → **μειωμένα** επίπεδα

➤ **Ασθενείς PMR vs Υγιών δοτών :**

ITAC, TNF-α, MIP-3α, IL-6 (T1), IL-7 → **αυξημένα** επίπεδα

IL-21, IL-4 (T2) → **μειωμένα** επίπεδα

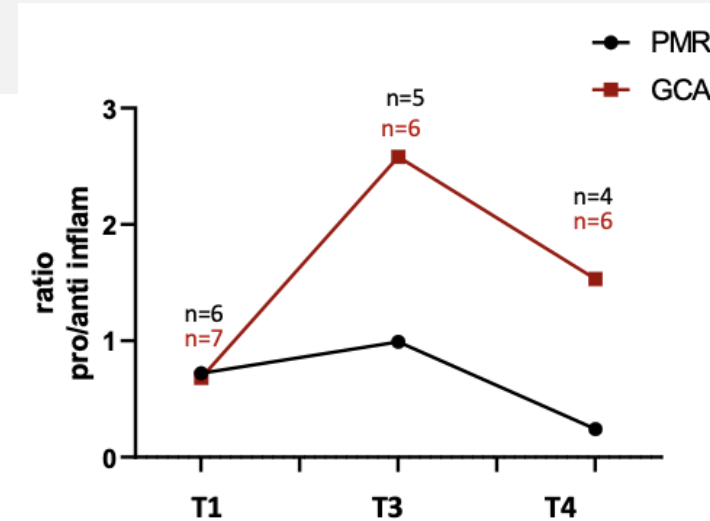
Αποτελέσματα

Σ. Λιπιδομική- Μικροί Λιπιδικοί Μεσολαβητές

Λόγος: $\frac{\text{average (pg/ml) of prostaglandins (PGE}_2, 6\text{K-PGF}_{1\text{A}}), \text{thromboxane (TXB}_2), \text{leukotrienes (LTB}_4\text{) (φλεγμονώδη)}}{\text{average (pg/ml) of lipoxins, maresins, protectins, resolvins D and E series (αντι-φλεγμονώδη: SPMs)}}$

- Κατά την ενεργό νόσο (T1) → Οι PMR και GCA ασθενείς εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα του λόγου φλεγμονωδών/ αντι-φλεγμονωδών LMs
- Μετά από 96 ώρες θεραπείας με GCs (T3) Οι GCA ασθενείς εμφανίζουν (x2) επικράτηση των φλεγμονωδών LMs.
- Μετά από 6 μήνες θεραπείας με GCs (T4) Οι GCA ασθενείς εμφανίζουν ακόμη επικράτηση των φλεγμονωδών LMs (x1.5) σε σύγκριση με τους PMR ασθενείς οι οποίοι έχουν ακόμη χαμηλότερο λόγο από την έναρξη της παθογένειας της PMR

median		PRO	ANTI	pro/anti
T1	PMR	83.27	115.55	0.72
	GCA	62.35	92.15	0.68
T3	PMR	61.57	62.06	0.99
	GCA	363.65	141.06	2.58
T4	PMR	46.31	193.07	0.24
	GCA	63.01	41.18	1.53



Συμπεράσματα

- ✓ Η ταχεία κλινική βελτίωση των ασθενών με ΓΑ και ΡΠ, μετά την έναρξη της θεραπείας με GCs σχετίζεται με διακριτές διαφορές φαινοτύπων ανοσοκυττάρων και όχι των κύριων τύπων ανοσοκυττάρων.
- ✓ Τα αυξημένα επίπεδα φλεγμονωδών LMs στους ασθενείς με GCA μετά από 6 μήνες θεραπείας με GCs, υποδηλώνουν την υποκείμενη ιστική βλάβη και αναδιαμόρφωση.
- ✓ Η ενσωμάτωση των πολλαπλών ομικών τεχνολογιών δύναται να προσφέρει νέα δεδομένα στην παθοφυσιολογία της GCA, αλλά και να προτείνει νέους βιοδείκτες ανταπόκρισης στην θεραπεία με GCs
- ✓ Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών για την επικύρωση αυτών των ευρημάτων.