

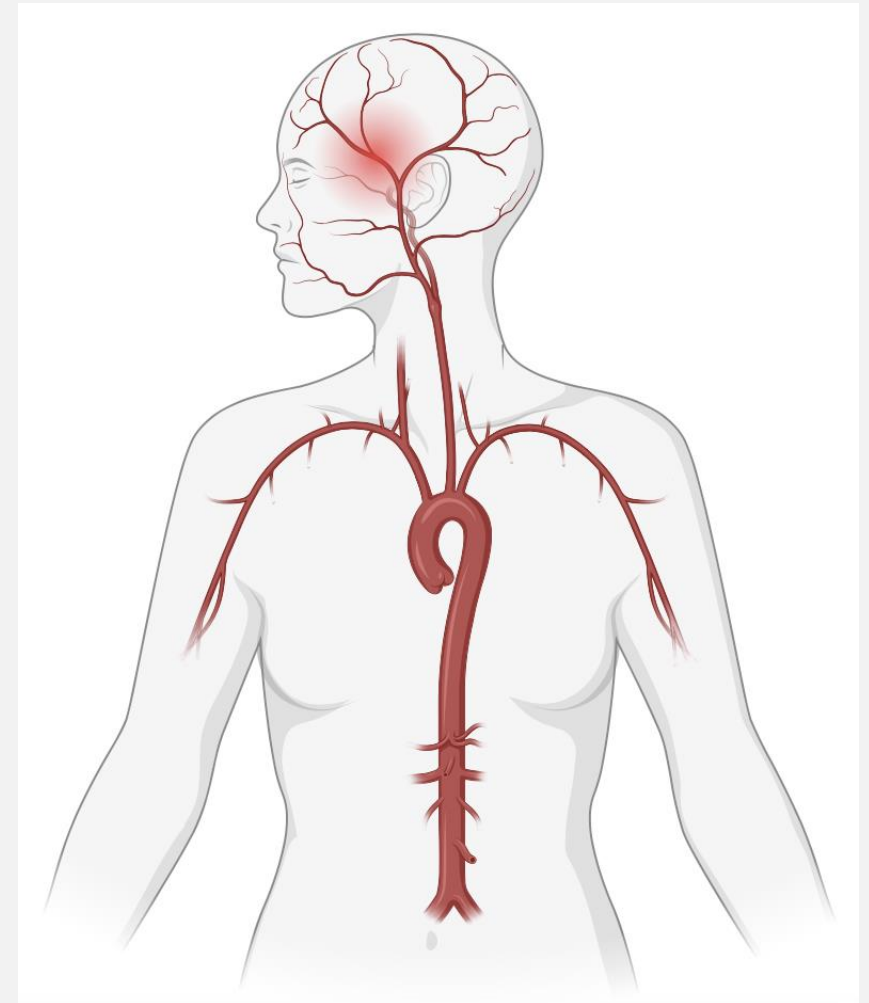
**ΑΝΑΛΥΣΗ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ
CYTOF, ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ ΚΑΙ ΜΙΚΡΩΝ ΛΙΠΙΔΙΚΩΝ ΜΕΣΟΛΑΒΗΤΩΝ ΣΤΑ ΠΡΩΙΜΑ
ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΜΕ ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΡΕΥΜΑΤΙΚΗ ΠΟΛΥΜΥΑΛΓΙΑ ΚΑΙ
ΓΙΓΑΝΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΡΘΗΡΙΤΙΔΑ**

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)
- 2 κλινικοί φαινότυποι: A) νόσος περιορισμένη στις κρανιακές αρτηρίες B) Νόσος εκτεταμένη σε άλλα αγγεία της αορτής και του αορτικού τόξου
- Συννοσηρότητες απειλητικές για τη ζωή: Απώλεια όρασης, ανεύρυσμα αορτής
- Διάγνωση: Βιοψία κροταφικής αρτηρίας, δείκτες φλεγμονής (ESR, CRP)
- PET-CT, Υπέρηχος Κροταφικών αρτηριών
- Θεραπεία: Γλυκοκορτικοειδή (GCs), Tocilizumab (IL-6R) (σε ανθεκτικές/υποτροπιάζουσες μορφές)

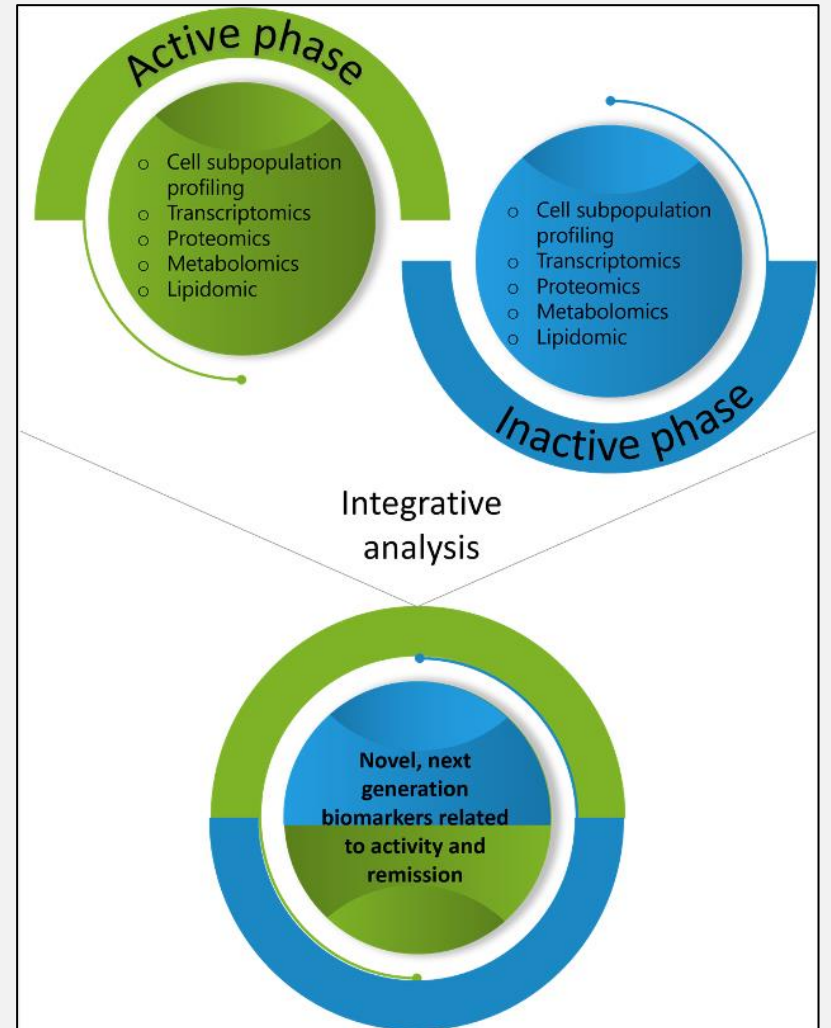


Βιοδείκτες στην GCA

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

Πρόταση για την ταυτοποίηση 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 (ενεργότητα και ύφεση της νόσου)



Σκοπός της Μελέτης

Οι ασθενείς που λαμβάνουν στεροειδή εμφανίζουν άμεση κλινική ανταπόκριση εντός 48 ωρών από την έναρξη της θεραπείας.

Παραταύτα, **κύτταρα** του περιφερικού αίματος, **κυτταροκίνες** που διαμεσολαβούν τη φλεγμονή, καθώς και οι **μικροί λιπιδικοί διαμεσολαβητές** δεν έχουν μελετηθεί στις πρώιμες ώρες θεραπείας ασθενών με στεροειδή.

Συνεπώς ο σκοπός της μελέτης είναι:

✓ Να περιγραφούν οι υποπληθυσμοί των κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος, οι κυκλοφορούσες κυτταροκίνες, και οι μικροί λιπιδικοί μεσολαβητές κατά τη διάγνωση της νόσου, 48 και 96 ώρες μετά τη χορήγηση θεραπείας, σε μία προσπάθεια:

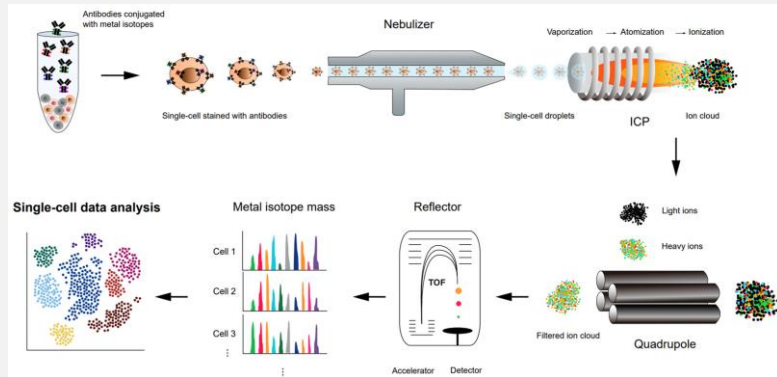
α) ανίχνευσης βιοδεικτών που διαχωρίζουν την PMR από την GCA και

β) ανάδειξης βιοδεικτών νέας γενιάς που χαρακτηρίζουν την έξαρση και ύφεση της νόσου

Μέθοδοι

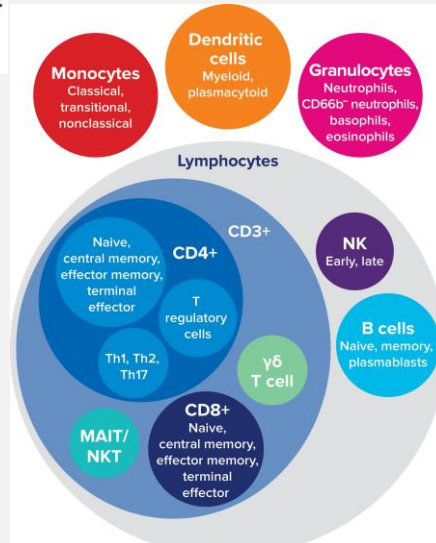
A. Ανάλυση CyTOF

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

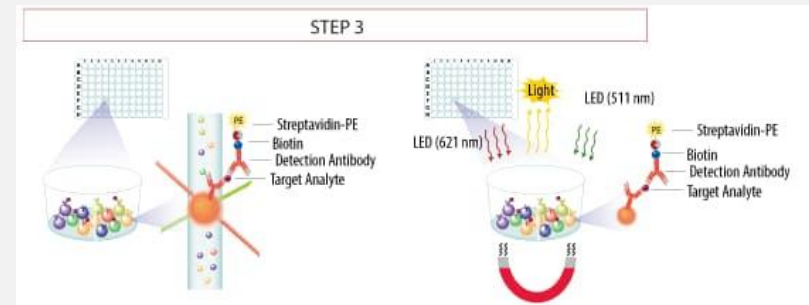
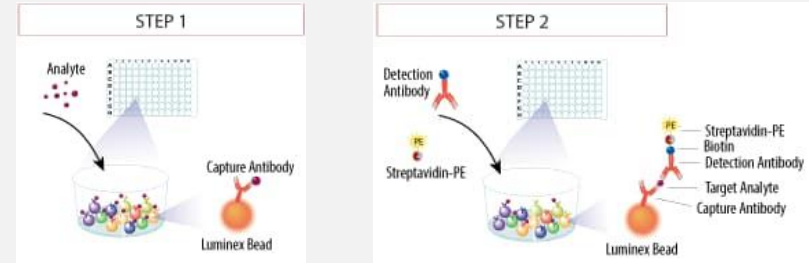


MaxPar Immune profiling kit

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



B. Luminex Assay



21-target customized panel for the Luminex immunoassay

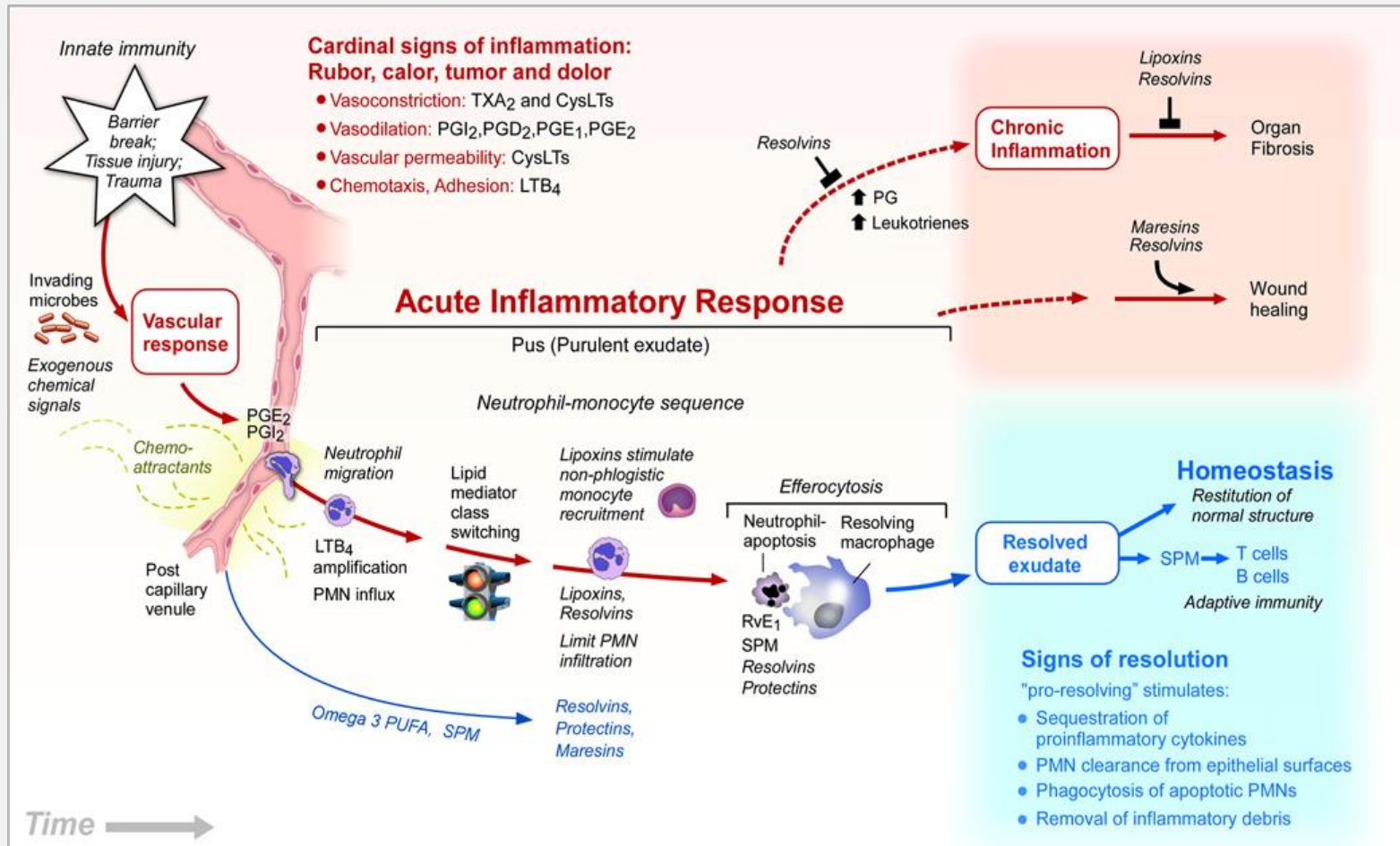
I-TAC	GM-CSF	Fractalkine
IFN- γ	MIP-1a	MIP-1b
MIP-3A	TNF- α	IL-1- β
IL-2	IL-4	IL-5
IL-6	IL-7	IL-8
IL-10	IL-12	IL-13
IL-17A	IL-21	IL-23

Luminex Assay

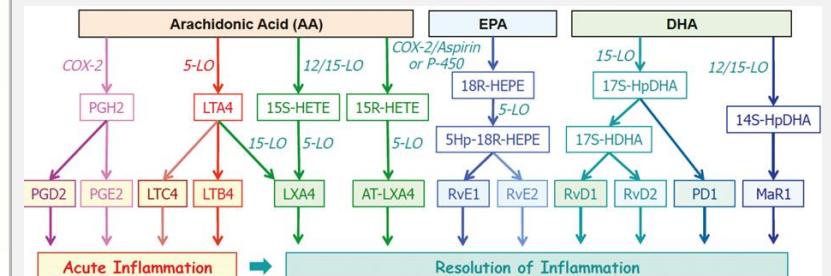
- ✓ 21 κυτταροκίνες/χυμοκίνες
- ✓ Πολλαπλή/Ταυτόχρονη ταυτοποίηση αναλυτών στο ίδιο δείγμα ορού

Μέθοδοι

Γ. Μέτρηση Μικρών Λιπιδικών Μεσολαβητών

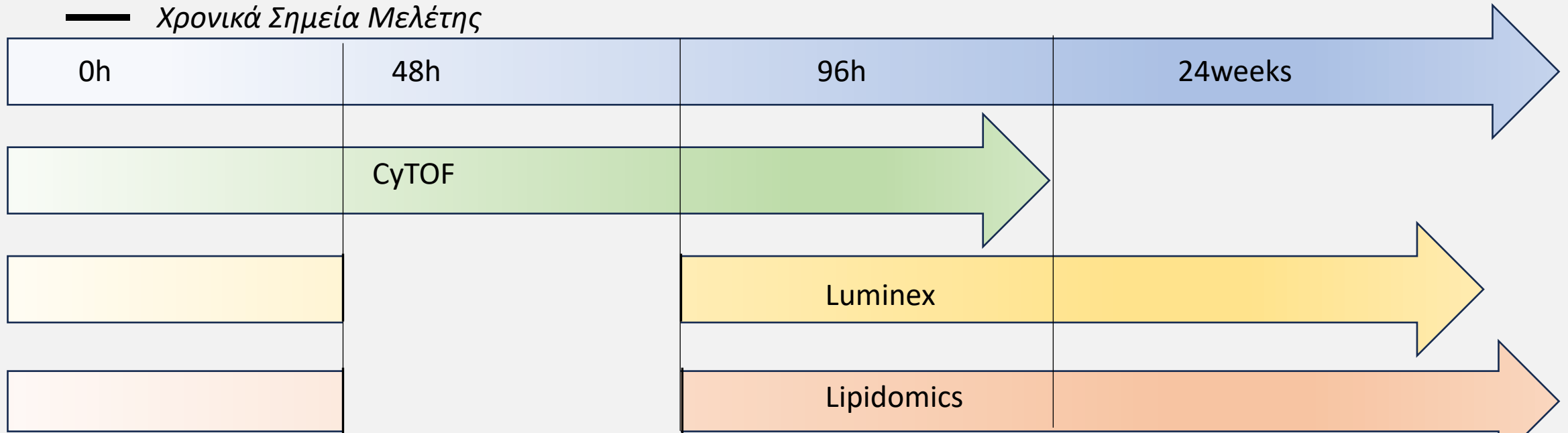


- ✓ LC MS/MS
- ✓ Υγρή χρωματογραφία με φασματομετρία μάζας
- ✓ Μέτρηση 25 βασικών μικρών λιπιδικών διαμεσολαβητών (φλεγμονωδών και αντι-φλεγμονωδών)



Ασθενείς- Χρονικά Σημεία

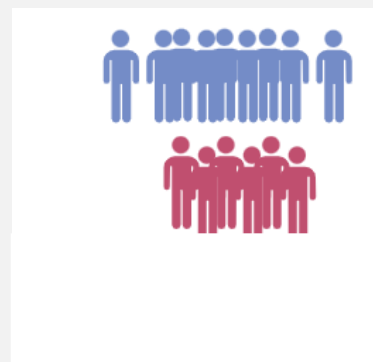
— Χρονικά Σημεία Μελέτης



8 GCA

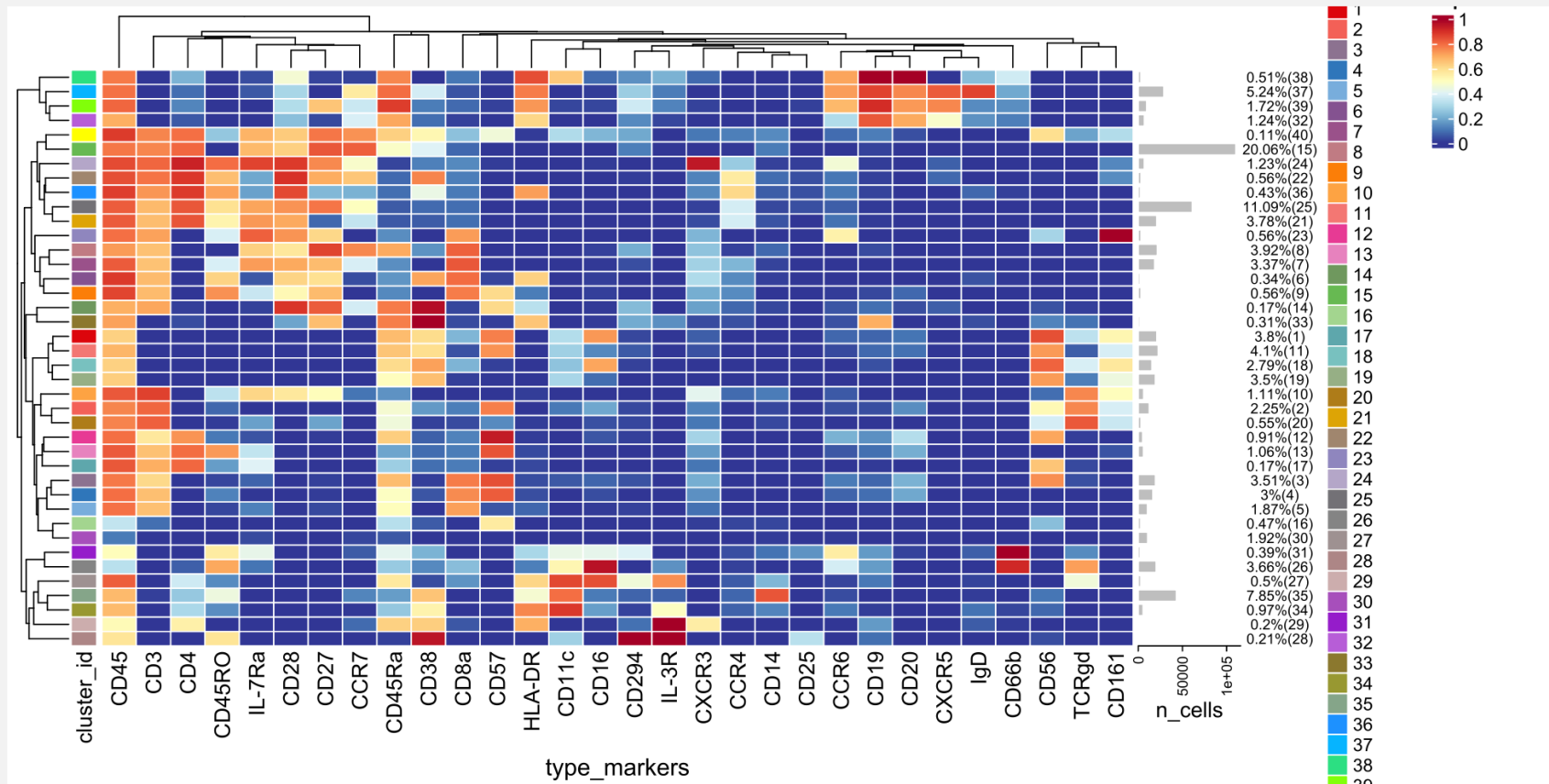
6 PMR

16 HC



Αποτελέσματα Α. Ανάλυση CyTOF

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

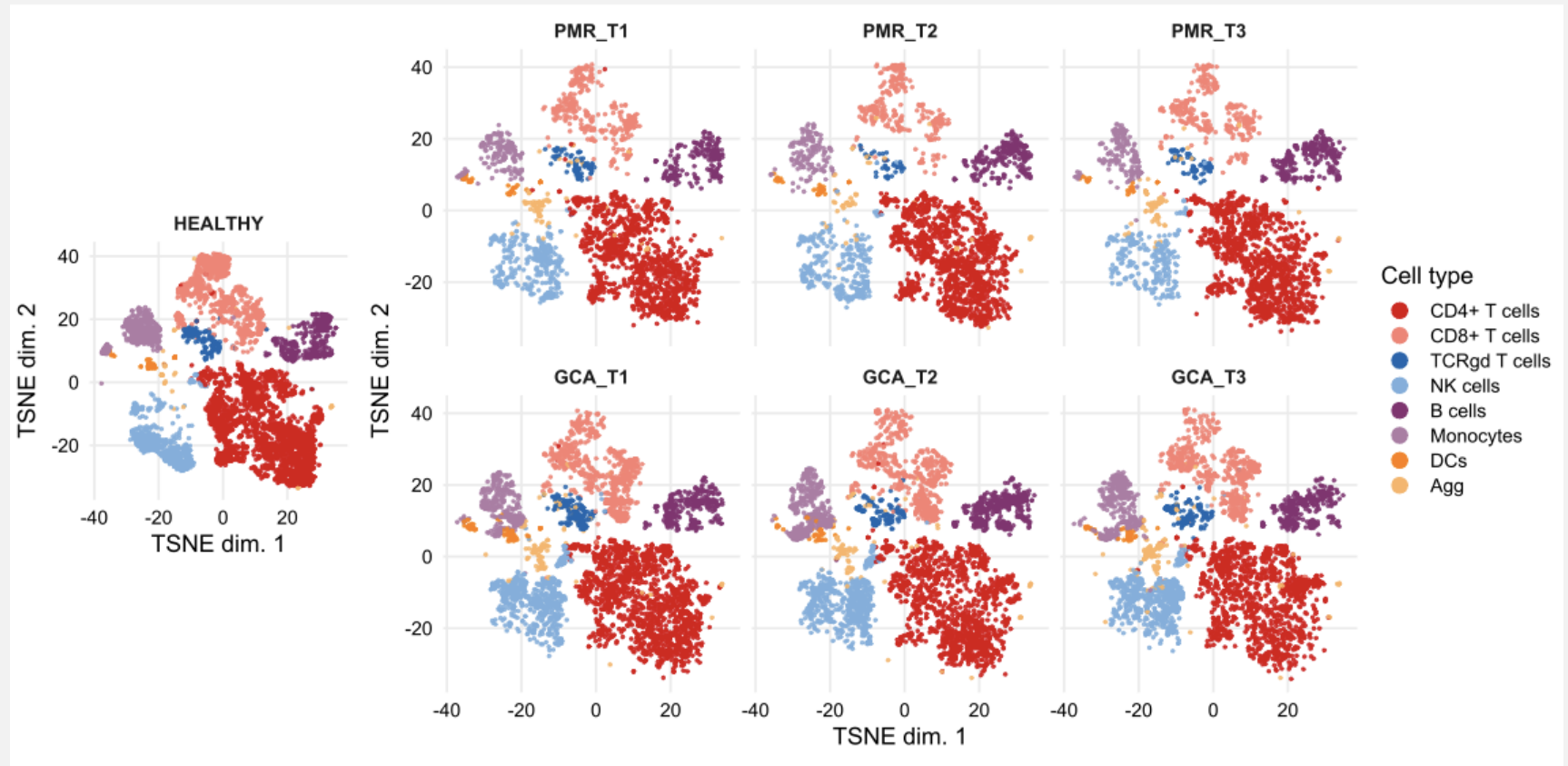


Εικόνα 1: Heatmap (χάρτης θερμότητας) των διαμέσων εντάσεων δεικτών (arcsinh, μετασχηματισμένη διάμεση έκφραση δείκτη που υπολογίζεται σε κύτταρα περιφερικού αίματος που αναλύθηκαν με κυτταρομετρία μάζας (CyTOF), n=55) των 30 μεμβρανικών δεικτών στους 40 κυτταρικούς υποπληθυσμούς/φαινοτύπους που ελήφθησαν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

Αποτελέσματα

Α. Ανάλυση CyTOF

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

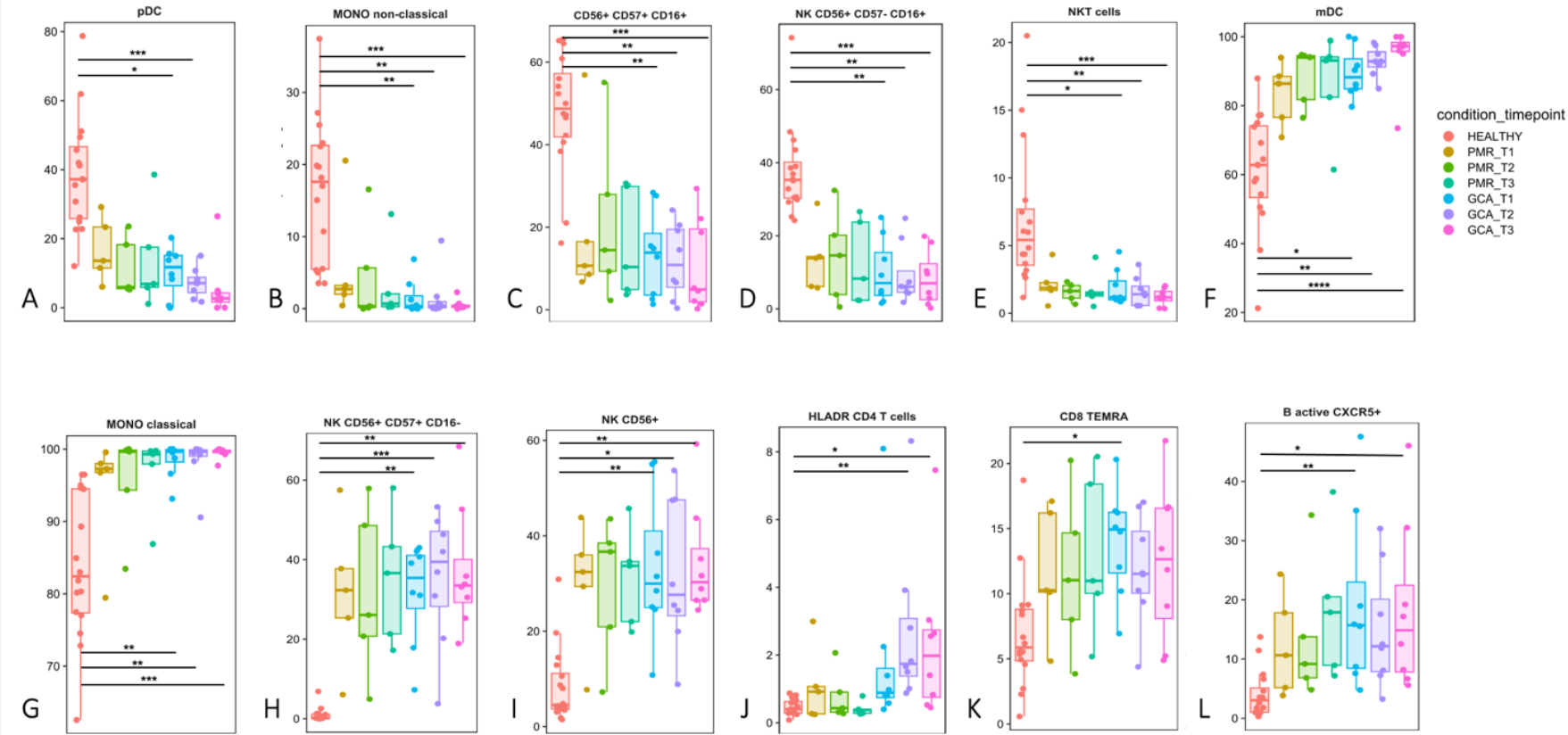


Εικόνα 2: Διαγράμματα tSNE για τους κύριους τύπους ανοσοκυττάρων μεταξύ δειγμάτων με GCA (n=8), PMR (n=6) και HC (n=16).

Αποτελέσματα

Α. Ανάλυση CyTOF

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



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). **A.** πλασμακυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα (pDCs), **B.** Μη κλασσικά Μονοκύτταρα, **C.** CD56+ CD57+ CD16+ κύτταρα, **D.** CD56+ CD57- CD16+ NK κύτταρα, **E.** NKT κύτταρα, **F.** μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα (mDCs), **G.** Κλασσικά Μονοκύτταρα, **H.** CD56+ CD57+ CD16- NK κύτταρα, **I.** CD56+ NK κύτταρα, **J.** HLADR+ CD4+ T κύτταρα, **K.** CD8+ TEMRA T κύτταρα, **L.** CXCR5+ B κύτταρα. Η στατιστική σημαντικότητα υποδεικνύεται με αστερίσκους ως εξής: * 0,01<p<0,05; ** 0,001<p<0,01; *** 0,0001<p<0,001

Αποτελέσματα B. Luminex Assay

Δεν εντοπίστηκαν διαφορές στα επίπεδα κυτταροκινών μεταξύ ασθενών με GCA και PMR στα T1-T4!

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

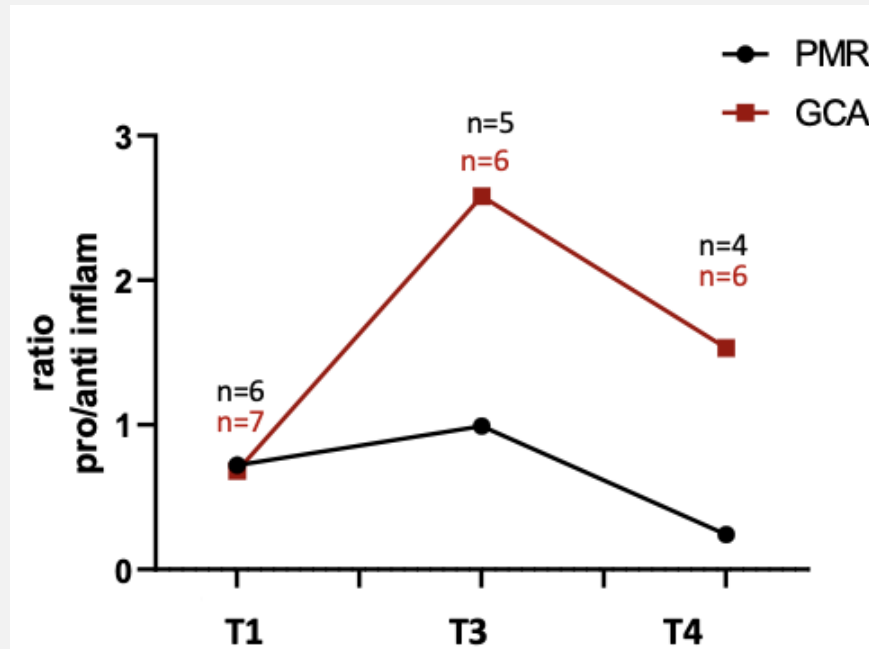
IL-21, IL-4 (T2) → **μειωμένα** επίπεδα

Αποτελέσματα

Σ. Λιπιδομική- Μικροί Λιπιδικοί Μεσολαβητές

Λόγος: $\frac{\text{average (pg/ml) of prostaglandins (PGE2, 6K-PGF1A), thromboxane (TXB2), leukotrienes (LTB4) (φλεγμονώδη)}}{\text{average (pg/ml) of lipoxins, maresins, protectins, resolvins D and E series (αντι-φλεγμονώδη: SPMs)}}$

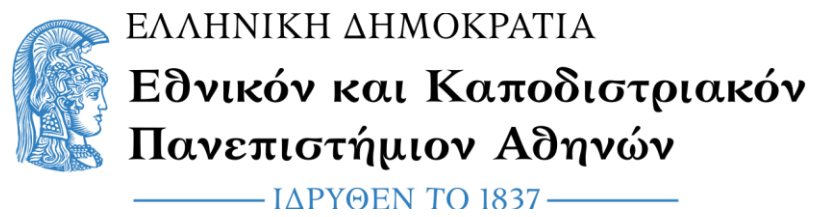
- Κατά την ενεργό νόσο (T1) → Οι PMR και GCA ασθενείς εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα του λόγου φλεγμονωδών/ αντι-φλεγμονωδών LMs
- Μετά από 96 ώρες θεραπείας με GCs (T3) Οι GCA ασθενείς εμφανίζουν (x2) επικράτηση των φλεγμονωδών LMs.
- Μετά από 6 μήνες θεραπείας με GCs (T4) Οι GCA ασθενείς εμφανίζουν ακόμη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

- ✓ Οι ασθενείς με PMR και GCA στην οξεία φάση έχουν διακριτές διαφορές υποπληθυσμών ανοσοκυττάρων σε σχέση με τους υγιείς δότες
- ✓ 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 τεχνολογιών ευρείας βάσεως (omics technologies) δύναται να προσφέρει νέα δεδομένα στην καλύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας 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.



eatris

European infrastructure
for translational medicine



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΡΕΥΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ
& ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΝΩΣΗ
ΡΕΥΜΑΤΟΛΟΓΩΝ ΕΛΛΑΔΟΣ

Πηγές Χρηματοδότησης:

Ευχαριστίες

Παπαδάκη Μαρία, Βιολόγος PhD

Πασχαλίδης Νίκος, Βιολόγος PhD

Παύλου Ελευθέριος, Βιοπληροφορικός

Χατζής Λουκάς, Παθολόγος PhD

Αργυροπούλου Ουρανία, Ρευματολόγος PhD

Πάλλα Παναγιώτα, Ειδικευόμενη Παθολογίας

Γαλάνη Ιωάννα, Ερευνήτρια Γ', ΙΙΒΕΑΑ

Γουλές Ανδρέας, Επίκ. Καθηγητής Ρευματολογίας, ΕΚΠΑ

Ανδρεάκος Ευάγγελος, Ερευνητής Α', ΙΙΒΕΑΑ

Τζιούφας Αθανάσιος, Καθηγητής Ρευματολογίας, ΕΚΠΑ

Σας ευχαριστώ πολύ!
