



Α' Παιδιατρική Κλινική
Ιπποκράτειο Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

20^ο Πανελλήνιο Συνέδριο
Νεφρολογίας

3-6
Μαΐου 2018
Μέγαρο Διεθνές Συνεδριακό
Κέντρο Αθηνών
Αθήνα



www.20psn.gr

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΒΑΡΥΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΣΤΕΝΩΣΗΣ ΤΗΣ ΠΥΕΛΟΟΥΡΗΤΗΡΙΚΗΣ ΣΥΜΒΟΛΗΣ ΣΤΑ ΒΡΕΦΗ

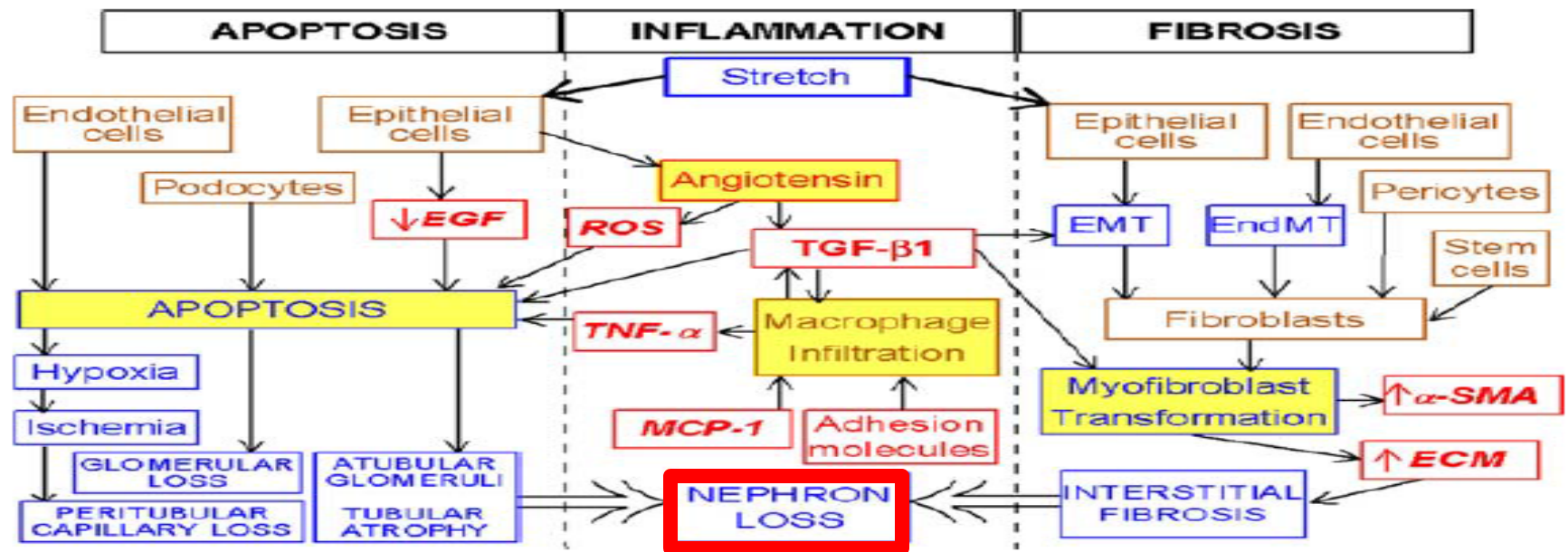
Ν. Πρίντζα¹, Α. Παυλάκη¹, Ο. Μπέγου², Ε. Φαρμάκη¹, Ι. Ντότης¹, Σ. Σταμπουλή¹, Ε. Γκίκα³, Α. Ταπάρκου¹, Χ. Γκόγκα¹, Ν. Ράικος³, Γ. Θεοδωρίδης², Φ. Παπαχρήστου¹

1. Νεφρολογική Μονάδα Παίδων, Α' Παιδιατρική Κλινική ΑΠΘ, Ιπποκράτειο Γενικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης
2. Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, ΑΠΘ
3. Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, Ιατρική Σχολή, ΑΠΘ

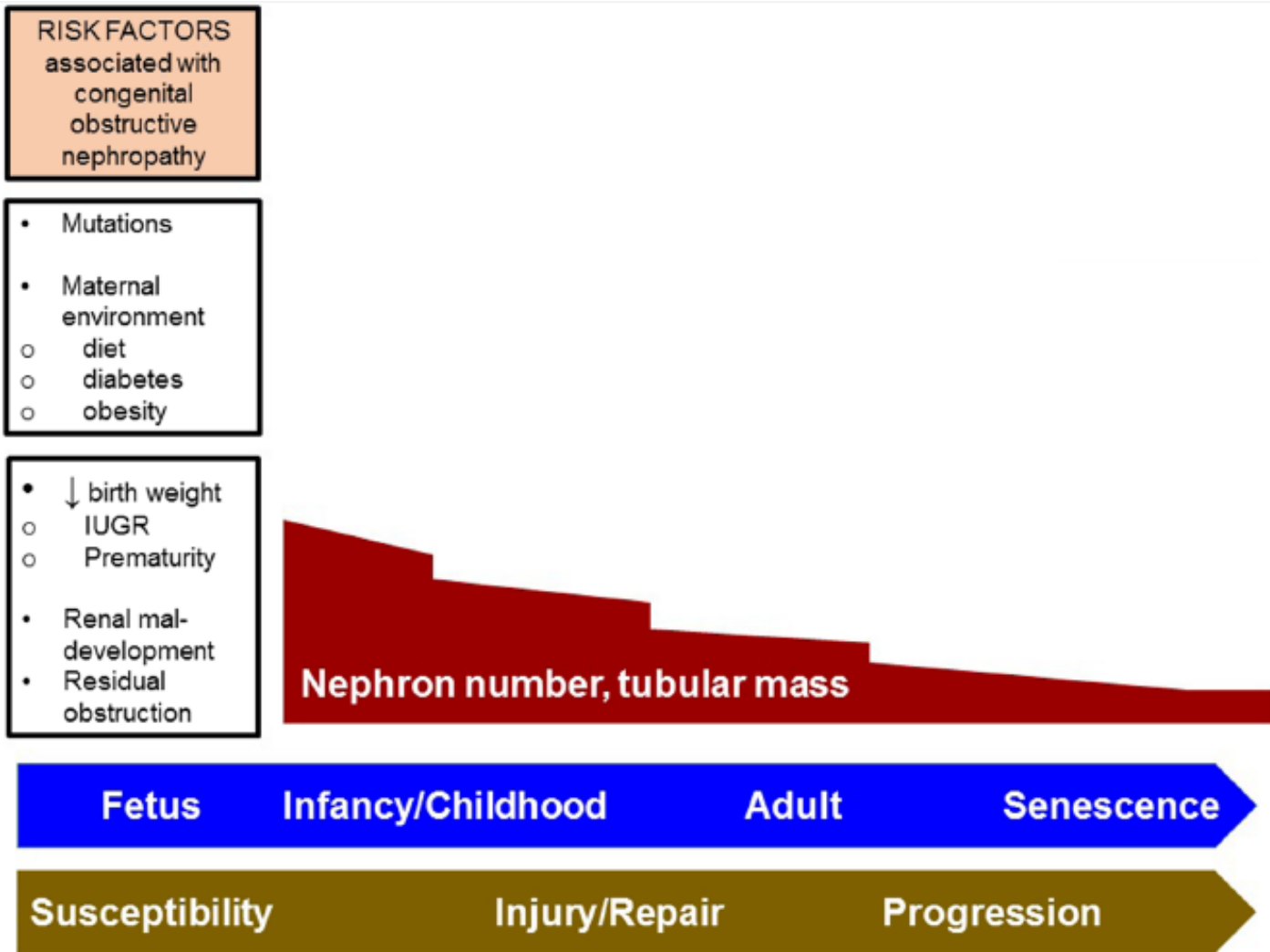
Στένωση πυελοουρητηρικής συμβολής (ΣΠΟΥΣ) και νεφρική βλάβη

Παθογένεση νεφρικής βλάβης

Διάταση νεφρικών σωληναρίων, φαινοτυπική κυτταρική μετάπτωση, **απόπτωση**, διάμεση **φλεγμονή**, σπειραματική βλάβη και προοδευτική **διάμεση ίνωση**



Factors contributing to congenital obstructive nephropathy and to subsequent progression of CKD over the life of the patient



ΣΠΟΥΣ-αντιμετώπιση



«what can be done for my patient with congenital UTO to optimize long-term outcome? »

- **Σκοπός:** βέλτιστη αύξηση του νεφρού και διατήρηση της νεφρικής λειτουργίας
- **Τρόπος:** έγκαιρη και ορθή επιλογή των βρεφών που θα ωφεληθούν από τη χειρουργική παρέμβαση

Παρούσα διαγνωστική
προσέγγιση στηρίζεται σε
επαναλαμβανόμενους
ελέγχους με:

Υπερηχογραφήματα ΟΥΡΠ
Διουρητικά νεφρογράμματα



Δεν μπορεί να καθορίσει με
αξιοπιστία αν οι ασθενείς έχουν
σημαντική απόφραξη και
βρίσκονται σε κίνδυνο για
ανάπτυξη μόνιμης νεφρικής
βλάβης

Αναζήτηση
αξιόπιστων
και **πρώιμων**
δεικτών
ανατομικών
και
λειτουργικών
αλλαγών του
νεφρού

Σκοπός

- Να διερευνήσει
 - αν το μεταβολικό προφίλ των παιδιών με ΣΠΟΥΣ διαφέρει σε σχέση με αυτό των υγιών παιδιών
 - αν στοιχεία του μεταβολικού προφίλ μπορούν να διαχωρίσουν τα χειρουργικά από τα μη χειρουργικά περιστατικά
 - αν τελικά μπορούν να συμβάλλουν στη μακροχρόνια παρακολούθηση αυτών των ασθενών

Ασθενείς και Μέθοδοι

- Προοπτική μελέτη ασθενών – μαρτύρων
- Ομάδα μελέτης : νεογνά και βρέφη, με διάγνωση ετερόπλευρης υδρονέφρωσης (προσθιοπίσθια διάμετρο νεφρικής πυέλου >10 mm)
- Κριτήρια αποκλεισμού:
 - Χρόνια νοσήματα
 - ΚΟΥΠ, ΣΚΟΥΣ, ΒΟΟΥ, διάταση ουρητήρα οποιασδήποτε αιτιολογίας
 - Αμφοτερόπλευρη ΣΠΟΥΣ
 - Χειρουργική επέμβαση ουροποιητικού

Ασθενείς και Μέθοδοι

- Για κάθε ασθενή καταγράφηκαν :
 - Υπερηχογραφικός έλεγχος
 - Διουρητικό νεφρόγραμμα (MAG-3)

Σύμφωνα με τα διεθνή κριτήρια επιλέχθηκαν τα βρέφη που αντιμετωπίστηκαν χειρουργικά

Heinlen JE et al. Operative versus nonoperative management of ureteropelvic junction obstruction in children. Urology. 2009

Η αρχική ομάδα των ασθενών μας χωρίστηκε σε:

- **ομάδα Α** : ασθενείς που έπασχαν από σοβαρή ΣΠΟΥΣ και αντιμετωπίστηκαν χειρουργικά
- **ομάδα Β** : ασθενείς με μη χειρουργική ΣΠΟΥΣ που τέθηκαν σε συστηματική παρακολούθηση (μάρτυρες νόσου).
- **ομάδα Γ** : υγιή νεογνά και βρέφη (μάρτυρες)

Ασθενείς και Μέθοδοι

Κρατήθηκαν ένα δείγμα ορού και ένα δείγμα ούρων

Ομάδα Α: προεγχειρητικά

Ομάδα Β: κατά την αρχική διάγνωση

Ομάδα Γ: ένα δείγμα ούρων και ορού

Φυγοκεντρήθηκαν άμεσα και αποθηκεύτηκαν σε βαθιά κατάψυξη (-20°C) μέχρι την ανάλυσή τους

Μεταβολομική Ανάλυση

- Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υπερ-υψηλής απόδοσης, υδρόφιλης αλληλεπίδρασης συζευγμένη με χρωματογραφία μάζας (HILIC-MS/MS)
- Στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση με δυνατότητα προσδιορισμού άνω των 100 ενδογενών ενώσεων
- Έχει αναπτυχθεί και επικυρωθεί στο εργαστήριο τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ.

Ανάλυση Δεδομένων

- Χρήση του λογισμικού MassLynx® (Waters, Milford, MA, USA)
- Τα δεδομένα από τους ανιχνευθέντες μεταβολίτες που προέκυψαν από το πρόγραμμα TargetLynx® αναλύθηκαν περαιτέρω:
 - 1) για την πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση με το λογισμικό SIMCA 3.0 (Umetrics, Malmö, Sweden) –
 - ανάλυση κυρίων συνιστωσών (Principle Component Analysis, PCA)
 - διακριτική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial-Least Squares-Discriminate Analysis, PLS-DA)
 - 2) για την μονοπαραμετρική στατιστική ανάλυση με το Microsoft excel (Microsoft corporation, USA)
- Η επικύρωση των μοντέλων που ελήφθησαν αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας τα διαγράμματα μεταθέσεων και την τιμή p της ANOVA

Αποτελέσματα

	Ομάδα Α	Ομάδα Β	Ομάδα Γ
Αριθμός	23	22	19
Φύλο (άρρεν/θήλυ)	21/2	16/6	11/8
Laterality (Δεξιός/Αριστερός)	10/13	1/21	-
Ηλικία κατά τη διάγνωση (προγεννητικά/μετά)	21/2	22/0	-
Ηλικία κατά την είσοδο στη μελέτη (μήνες) [median (min-max)]	2 (1 - 11)	2 (1 - 10)	2 (1 - 48)
Προσθιοπίσθια διάμετρος νεφρικής πυέλου (mm) [median(min-max)]	17 (15 - 50)	11,5 (10 - 20)	-

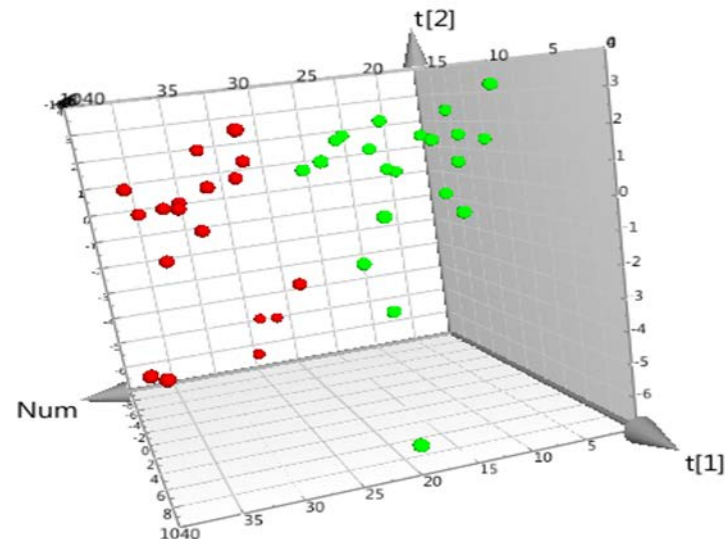
Προσδιορίστηκαν:

- 66 μεταβολίτες στα ούρα
- 52 μεταβολίτες στον ορό

Ομάδα Α vs Ομάδα Γ

-Δείγματα ορού-

Τα μεταβολικά δεδομένα που προέκυψαν από τα δείγματα ορού μπόρεσαν να διαχωρίσουν σαφώς την ομάδα Α από την ομάδα Γ, δηλαδή τους χειρουργικούς ασθενείς από τους μάρτυρες

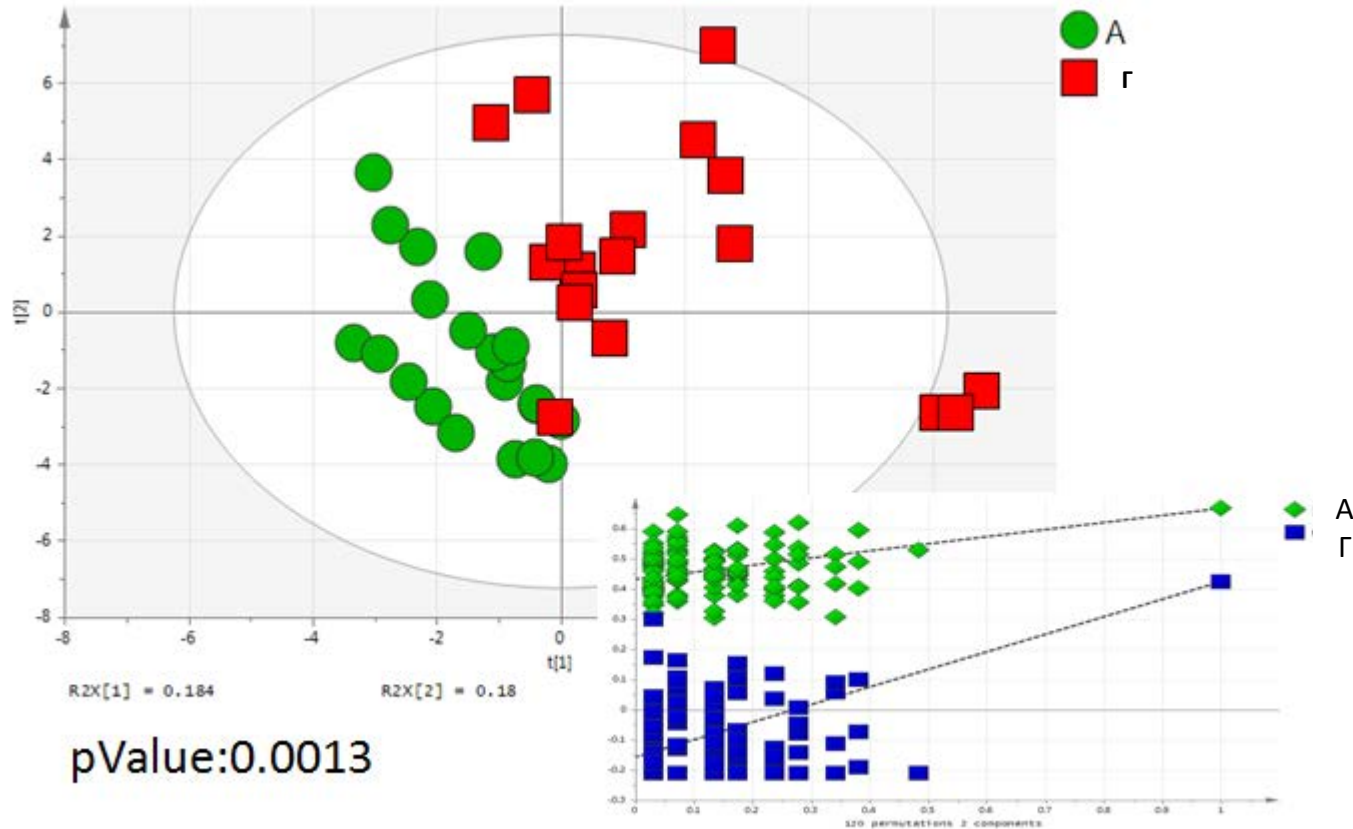


R2X[1] = 0.292 R2X[2] = 0.124

Ανάλυση κυρίων συνιστωσών (Principle Component Analysis, PCA)

Ομάδα Α vs Ομάδα Γ

-Δείγματα ορού-

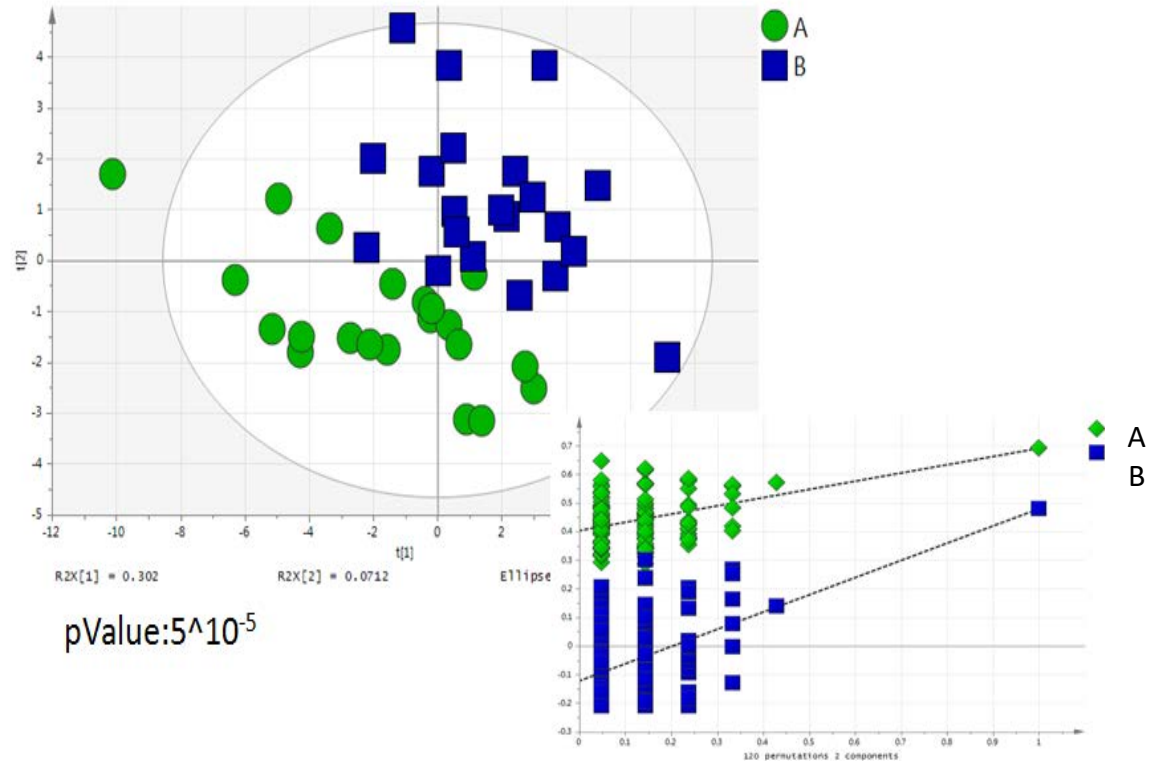


Διακριτική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων
(Partial-Least Squares-Discriminate Analysis, PLS-DA scatter plot)
Διάγραμμα μεταθέσεων (permutation plot)

Ομάδα A vs Ομάδα B

-Δείγματα ορού-

Στατιστικά σημαντική διαφορά παρουσιάζει και η σύγκριση του μεταβολικού προφίλ του ορού της ομάδας A από την ομάδα B ($p = 0.00005$)

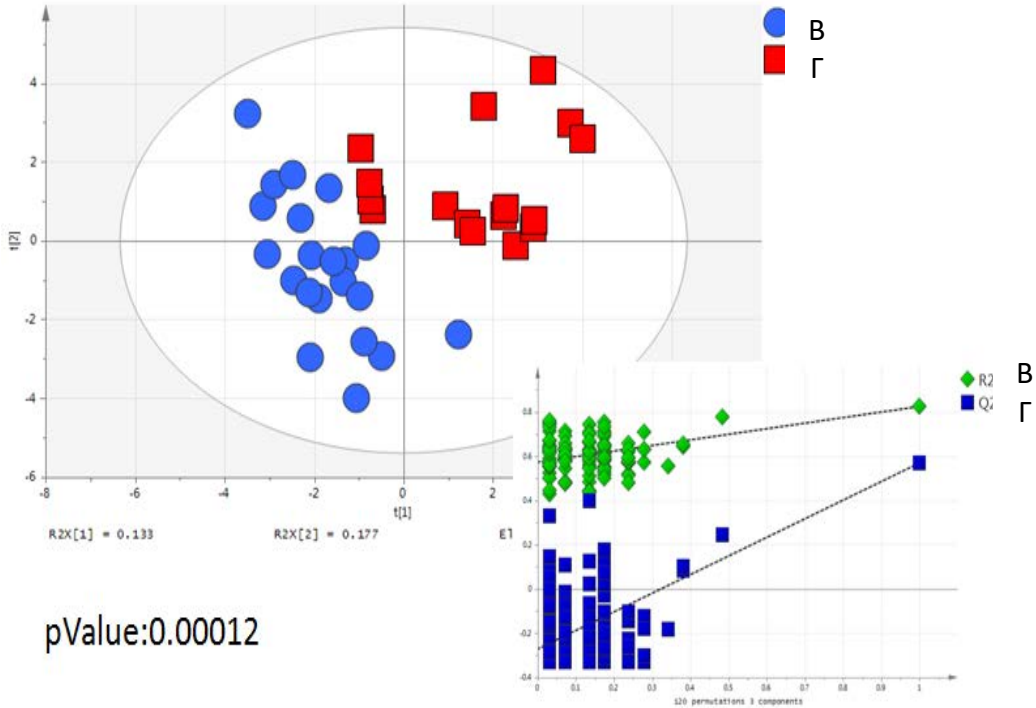


Διακριτική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων
(Partial-Least Squares-Discriminate Analysis, PLS-DA scatter plot)
Διάγραμμα μεταθέσεων (permutation plot)

Ομάδα Β vs Ομάδα Γ

-Δείγματα ορού-

Στατιστικά σημαντική διαφορά παρουσιάζει και η σύγκριση του μεταβολικού προφίλ του ορού της ομάδας Β από την ομάδα Γ ($p = 0.0001$)

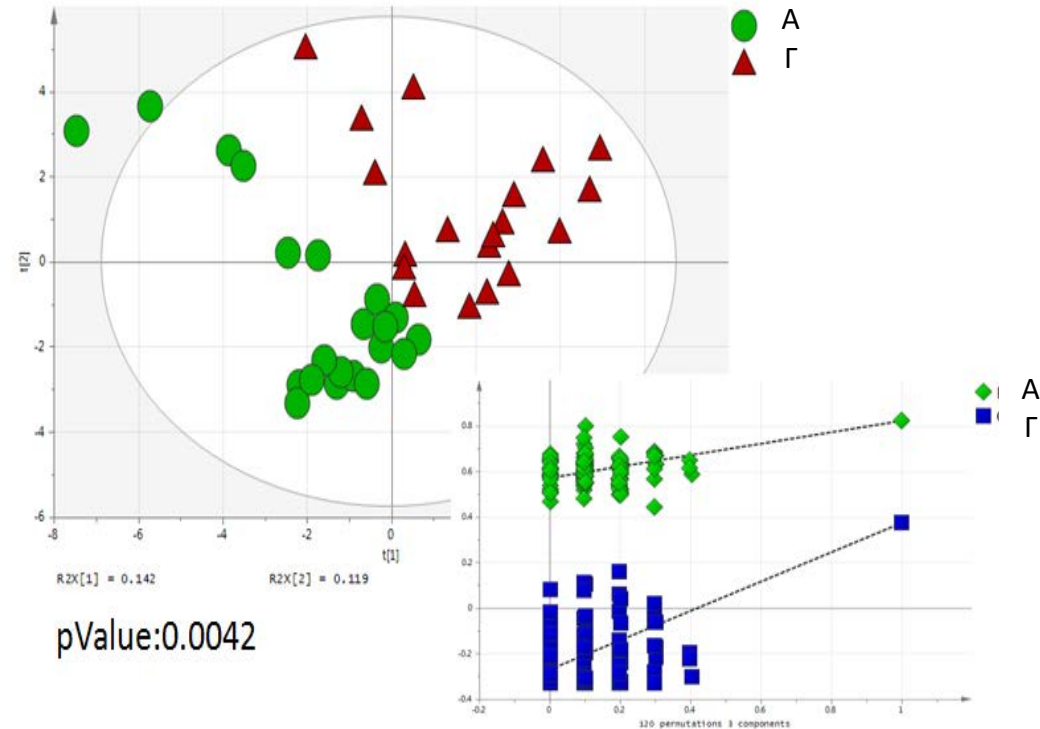


Διακριτική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων
(Partial-Least Squares-Discriminate Analysis, PLS-DA scatter plot)
Διάγραμμα μεταθέσεων (permutation plot)

Ομάδα Α vs Ομάδα Γ

-Δείγματα ούρων-

Στατιστικά σημαντική διαφορά αναδείχθηκε μόνο μεταξύ των μεταβολικών προφίλ ούρων της ομάδας Α και της ομάδας Γ ($p = 0.042$)



Διακριτική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων
(Partial-Least Squares-Discriminate Analysis, PLS-DA scatter plot)
Διάγραμμα μεταθέσεων (permutation plot)

Ομάδα Α vs Ομάδα Γ

-Δείγματα ορού-

Compounds	p-Value (tTest)	Fold Change
2-Hydroxyisovaleric	0,036	↓
Choline	0,045	↓
Creatinine	0,006	↓
Homocysteine	0,001	↑
Pantothenate	0,020	↓
Tryptophane	0,006	↑
Isoleycine	0,016	↑

Ομάδα A vs Ομάδα B

-Δείγματα ορού-

Compounds	p-Value (tTest)	Fold Change
Aspartic Acid	0,0002	↑
Choline	0,0016	↑
Dimethylamine	0,0180	↑
Glycine	0,0120	↑
Lysine	0,0300	↑
Phenylalanine	0,0200	↑
Serine	0,0350	↑
Leycine	0,0150	↑
Isoleycine	0,0500	↑

Ομάδα Β vs Ομάδα Γ

-Δείγματα ορού-

Compounds	p-Value (tTest)	Fold Change
2-Hydroxyisovaleric	0,0500	↓
Choline	0,0200	↓
Creatinine	0,0003	↓
Dimethylamine	0,0010	↓
Homocysteine	0,0330	↑
Pantothenate	0,0130	↓
Putrescine	0,0180	↓
Pyroglutamic	0,0030	↓
Ribose	0,0002	↓
Tryptophane	0,0040	↑
Xanthine	0,0200	↓

Ομάδα Α vs Ομάδα Γ

-Δείγματα ούρων-

Compounds	p-Value (tTest)	Fold Change
Cystine	0,005	↓
Glutamic Acid	0,000014	↑
Hypoxanthine	0,036	↑
Lysine	0,010	↓
Maltose	0,032	↓
Nicotinamide	0,040	↑

Συμπεράσματα

Το μεταβολικό προφίλ στον ορό μπόρεσε να διαχωρίσει σαφώς τους ασθενείς που οδηγήθηκαν στο χειρουργείο από αυτούς που τέθηκαν σε συστηματική παρακολούθηση καθώς και από τους μάρτυρες

Το μεταβολικό προφίλ των ούρων διαχώρισε σαφώς τα χειρουργικά περιστατικά από τους μάρτυρες

Η μεταβολομική ανάλυση μπορεί να συμβάλλει στη μακροχρόνια παρακολούθηση αυτών των ασθενών???

Η πρώτη κλινική μελέτη που προσδιορίζει το μεταβολικό προφίλ βρεφών με ΣΠΟΥΣ στον ορό και η δεύτερη μελέτη που προσδιορίζει το μεταβολικό προφίλ βρεφών με ΣΠΟΥΣ στα ούρα

www.nature.com/scientificreports
SCIENTIFIC REPORTS

OPEN A capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry pipeline for long term comparable assessment of the urinary metabolome

Received: 20 July 2016
Accepted: 14 September 2016
Published: 03 October 2016

Franck Boizard^{1,2}, Valérie Brunchaux^{1,2}, Panagiotis Moulos³, Benjamin Brouil^{1,2}, Julia Klein^{1,2}, Nadia Loumi⁴, Cécile Caubet^{1,2}, Stéphanie Yellier¹, Jean-Loup Bascand^{1,2}, Stéphane Decramer^{1,2}, Joost P. Scharstra^{1,2} & Bénédicte Buffin-Meyer^{1,2}

- 32 μεταβολίτες που σχετίζονται με την ΣΠΟΥΣ
- Μοντέλο πρόβλεψης που τους επέτρεψε να διαγνώσουν με 76% ευαισθησία και 86 % ειδικότητα

¹H NMR-based metabonomics study on serum of renal interstitial fibrosis rats induced by unilateral ureteral obstruction

Haiyan Zhang,^a Jianmin Jia,^a Jinguo Cheng,^{ab} Faqing Ye,^a Xiaokun Li^a and Hongchang Gao^a

Mol. BioSyst., 2012

Identification of key metabolic changes in renal interstitial fibrosis rats using metabonomics and pharmacology

SCIENTIFIC REPORTS

Liangcai Zhao¹, Minjian Dong¹, Shixian Liao^{3*}, Yao Du¹, Qi Zhou¹, Hong Zheng¹, Minjiang Chen^{1,2}, Jiansong Ji² & Hongchang Gao¹

Published: 03 June 2016

Kidney Tissue Targeted Metabolic Profiling of Unilateral Ureteral Obstruction Rats by NMR

Zhenyu Li^{1*}, Aiping Li^{1*}, Jining Gao², Hong Li² and Xuemei Qin^{1*}

frontiers
in Pharmacology

ORIGINAL RESEARCH
published: 15 September 2016

Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν αποτελούν τα πρόδρομα αποτελέσματα μίας έρευνας που βρίσκεται ακόμη σε εξέλιξη

Οι βιοτεχνολογικές πλατφόρμες και τα εξελιγμένα στατιστικά εργαλεία προσφέρουν τη δυνατότητα σύνδεσης των παρατηρούμενων συσχετισμών με τις υποκείμενες διαδικασίες σε κυτταρικό και βιοχημικό επίπεδο

Ο τελικός στόχος, δηλαδή η **ανακάλυψη μεταβολιτών**, που θα μπορούσαν να **χρησιμεύσουν ως βιοδείκτες** απαιτεί προσεκτικά σχεδιασμένες πολυκεντρικές μελέτες, με ανάλυση μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων χρησιμοποιώντας ενδεχομένως και πολλαπλές – omics αναλύσεις (multiomics)

¹H NMR-based metabonomics study on serum of renal interstitial fibrosis rats induced by unilateral ureteral obstruction

Haiyan Zhang,^a Jianmin Jia,^a Jinguo Cheng,^{ab} Faqing Ye,^a Xiaokun Li^a and Hongchang Gao^{*a}

Mol. BioSyst., 2012

Identification of key metabolic changes in renal interstitial fibrosis rats using metabonomics and pharmacology

Liangcai Zhao¹, Minjian Dong^{1*}, Shixian Liao^{3*}, Yao Du¹, Qi Zhou¹, Hong Zheng¹, Minjiang Chen^{1,2}, Jiansong Ji² & Hongchang Gao¹

SCIENTIFIC REPORTS

Published: 03 June 2016

Kidney Tissue Targeted Metabolic Profiling of Unilateral Ureteral Obstruction Rats by NMR

Zhenyu Li^{1†}, Aiping Li^{1†}, Jining Gao², Hong Li² and Xuemei Qin^{1*}

frontiers
in Pharmacology

ORIGINAL RESEARCH
published: 15 September 2016

Με στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση στο ίδιο μοντέλο απόφραξης σε ποντικούς εντόπισαν διαφορές τόσο στο μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης της ισολευκίνης όσο και σε αυτό της μεθειονίνης – ομοκυστεΐνης

Η πρώτη κλινική μελέτη που προσδιορίζει το μεταβολικό προφίλ βρεφών με ΣΠΟΥΣ στον ορό και η δεύτερη μελέτη που προσδιορίζει το μεταβολικό προφίλ βρεφών με ΣΠΟΥΣ στα ούρα

Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν αποτελούν τα πρόδρομα αποτελέσματα μίας έρευνας που βρίσκεται ακόμη σε εξέλιξη

Οι βιοτεχνολογικές πλατφόρμες και τα εξελιγμένα στατιστικά εργαλεία προσφέρουν τη δυνατότητα σύνδεσης των παρατηρούμενων συσχετισμών με τις υποκείμενες διαδικασίες σε κυτταρικό και βιοχημικό επίπεδο

Ο τελικός στόχος, δηλαδή η **ανακάλυψη μεταβολιτών**, που θα μπορούσαν να **χρησιμεύσουν ως βιοδείκτες** απαιτεί προσεκτικά σχεδιασμένες πολυκεντρικές μελέτες, με ανάλυση μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων χρησιμοποιώντας ενδεχομένως και πολλαπλές – omics αναλύσεις (multiomics)