

ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ ΣΤΑ ΟΥΡΑ ΩΣ ΕΡΓΑΛΕΙΟ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΟΝΕΦΡΙΤΙΔΕΣ

Ελένη Τζάλη^{1,2}, Σοφία Καφόρου³, Νίκος Κουντουράκης³, Ελένη Δροσατάκη^{1,2}, Ελευθερία Κλειώ Δερμιτζάκη¹, Δήμητρα Λυγερού^{1,2},
Αριάδνη Ανδροβιτσανέα¹, Χρήστος Πλέρος¹, Ανδρέας Αντωνάκης^{1,2}, Αλέξανδρος Γεώργιος Καββαδίας¹, Νικόλαος Παπαδάκης^{1,2},
Κωνσταντίνα Κυδωνάκη¹, Μιχάλης Παπαπαναγιώτου^{1,2}, Μυρτώ Κονιδάκη^{1,2}, Χαρίκλεια Γακιοπούλου⁴, Γιώργος Γκουρίδης³,
Κωνσταντίνος Στυλιανού^{1,2}, Ιωάννης Πετράκης^{1,2}

1. Νεφρολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου
2. Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ιατρική Σχολή
3. Proteomics Unit, Institute of Molecular Biology and Biotechnology (IMBB-FORTH); Heraklion-Crete, 70013, Greece.
4. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Εργαστήριο Α΄ Παθολογικής Ανατομικής



Υπόβαθρο και σκοπός

Συστατικά του συμπληρώματος **στα ούρα** συσχετίζονται με **ενεργότητα** νεφρικής βλάβης σε διάφορες σπειραματοπάθειες (V. et al., 2024).

Ερευνητικό ερώτημα

Μπορεί η **πρωτεομική ανάλυση** πρωτεϊνών του **συμπληρώματος στα ούρα** να διακρίνει την ενεργότητα σε σπειραματοπάθειες;

Πληθυσμός μελέτης και συλλογή δειγμάτων

Περίοδος μελέτης: Μάιος-Αύγουστος 2025

Κριτήρια ένταξης: ενήλικες με ΧΝΝ σταδίου II–IV, τεκμηριωμένη ιστολογικά σπειραματοπάθεια (προοπτικά ή αναδρομικά)

Δείγμα: **δεύτερα πρωινά ούρα**

Κλινικά δεδομένα κατά τη δειγματοληψία :

- eGFR
- uPCR, uACR

Διαχρονικά δεδομένα:

Εκτός από **προοπτικά**, οι μετρήσεις eGFR, uPCR και uACR συλλέχθηκαν και αναδρομικά **πριν από τη νεφρική βιοψία ή την ένταξη στη μελέτη**

→ Αποτύπωση προϋπάρχουσας πορείας της νεφρικής λειτουργίας και της πρωτεϊνουρίας.

Κοορτή 2 ομάδων

20 ασθενείς με **ενεργό** νόσο

1029 επισκέψεις

~51 επισκέψεις /ασθενή

Ενεργός νόσος
IgA νεφροπάθεια (n= 4)
ANCA σχετιζόμενη αγγειίτιδα (n=4)
Μεμβρανώδη νεφροπάθεια (n=4)
Εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση (n=3)
Διάμεση νεφρίτιδα (n=1)
IC-MPGN / κρουσφαιριναιμική MPGN (n=1)
Νεφρίτιδα του Λύκου (n=1)
Θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια (n=1)
N. Λεπτών Μεμβρανών (n=1)

7 ασθενείς με **ανεργό** νόσο

387 επισκέψεις

~55 επισκέψεις/ ασθενή

Ανεργός νόσος
IgA νεφροπάθεια (n= 2)
ANCA σχετιζόμενη αγγειίτιδα (n=2)
Εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση (n=2)
Ατυπο Αιμολυτικό Ουραιμικό Σύνδρομο (n=1)

Στατιστική Ανάλυση

Ενεργότητα νεφρικής νόσου:

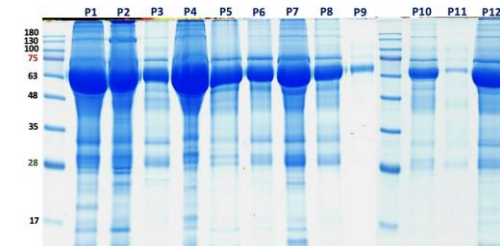
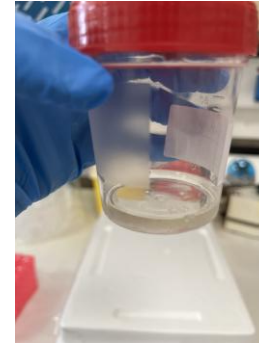
- **Δυαδικό κλινικό καταληκτικό σημείο** βάσει της κανονικοποιημένης διαχρονικής κλίσης του εκτιμώμενου ρυθμού σπειραματικής διήθησης
 - Φθίνουσα = ενεργότητα
 - Σταθεροποίηση ή αύξηση = μη ενεργότητα
- Κανονικοποίηση ως προς ηλικία, φύλο, αρχικό eGFR, στάδιο ΧΝΝ, πρωτεϊνουρία
- Σύγκριση μοντέλων **λογιστικής παλινδρόμησης** με ανεξάρτητες μεταβλητές:
 - Νεφρική λειτουργία** (όπως εκφράζεται από: πρωτεϊνουρία, eGFR, στάδιο ΧΝΝ, ηλικία, φύλο) – **προς απλοποίηση- eGFR**
 - Συνδυασμός πρωτεομικής πληροφορίας + eGFR**

Αξιολόγηση της απόδοσης στη διάκριση ενεργών/μη ενεργών:

- ROC - ΔAUC
- Ευαισθησία με δεδομένη ειδικότητα 80% και 90%

Πρωτεομική Ανάλυση

1. Συλλογή και φυγοκέντρηση ούρων
2. Κατακρήμνιση πρωτεϊνών με ακετόνη και αποθήκευση στους -80°C
3. Διαχωρισμός με 1D SDS-PAGE
4. Πέψη των πρωτεϊνών με θρυψίνη
5. Ανάλυση πεπτιδίων με νανο-υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με διαδοχική φασματομετρία μάζας (nLC-MS/MS)



nLC-MS/MS: Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών

Identified Proteins	Accession Number	Molecular Weight	Total Spectrum counts
1 Uncharacterized protein OS=Homo sapiens OX=9606 PE=4 SV=1	A0A8Q3SIZ7_HUM	5 kDa	1
2 Metallothionein-1A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MT1A PE=1 SV=2	MT1A_HUMAN	6 kDa	1
3 Small proline-rich protein 2F OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPRR2F PE=1 SV=1	SPR2F_HUMAN	8 kDa	1
4 Reactive oxygen species modulator 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ROMO1 PE=1 SV=1	ROMO1_HUMAN	8 kDa	3
5 Sperm protein associated with the nucleus on the X chromosome N1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPANXN1 PE=3 SV=1	SPXN1_HUMAN	8 kDa	1
6 Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GNB3 PE=1 SV=1	GBG3_HUMAN	8 kDa	2
7 Late cornified envelope protein 3A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LCE3A PE=1 SV=1	LCE3A_HUMAN	9 kDa	1
8 Down syndrome critical region protein 10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DSCR10 PE=5 SV=1	DSC10_HUMAN	9 kDa	1
9 Transcriptional regulator PINT87aa OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LINC-PINT PE=1 SV=1	PINT87_HUMAN	10 kDa	1
10 Cysteine-rich C-terminal protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CRCT1 PE=1 SV=1	CRCT1_HUMAN	10 kDa	1
11 Late cornified envelope protein 3B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LCE3B PE=1 SV=1	LCE3B_HUMAN	10 kDa	1
12 WAP four-disulfide core domain protein 13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=WFDC13 PE=1 SV=1	WFD13_HUMAN	10 kDa	1
13 Keratin-associated protein 3-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRTAP3-2 PE=1 SV=1	KRA32_HUMAN	10 kDa	1
14 Defensin alpha 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DEFA4 PE=1 SV=2	DEF4_HUMAN	11 kDa	1
15 Putative ribosomal protein eL43-like OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL37AP8 PE=5 SV=2	RL37L_HUMAN	11 kDa	1
16 Immunoglobulin heavy variable 3/OR16-9 (non-functional) (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGHV3OR16-9 PE=1 SV=1	A0A0B4J2B5_HUM	11 kDa	2
17 Ig-like domain-containing protein OS=Homo sapiens OX=9606 PE=1 SV=1	A0AAG2SXZ4_HUM	11 kDa	1
18 Plasminogen-like protein A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLGLA PE=1 SV=1	PLGA_HUMAN (+1)	11 kDa	1
19 Defensin-6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DEFA6 PE=1 SV=1	DEF6_HUMAN	11 kDa	1
20 Immunoglobulin lambda constant 7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGLC7 PE=1 SV=3	IGLC7_HUMAN	11 kDa	1
21 Dermcidin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DCD PE=1 SV=2	DCD_HUMAN	11 kDa	1
22 Prostate and testis expressed protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PATE4 PE=1 SV=2	PATE4_HUMAN	11 kDa	1
23 Uncharacterized protein ZNF561-AS1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZNF561-AS1 PE=4 SV=1	CS082_HUMAN	12 kDa	1
24 Prostate and testis expressed protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PATE3 PE=1 SV=1	PATE3_HUMAN	12 kDa	1

1. Βαση «UniProt»

2. ~2.000-3000 πρωτεΐνες ανά ασθενή (MW <60kDa)

3. Εστίαση στις πρωτεΐνες του συμπληρώματος

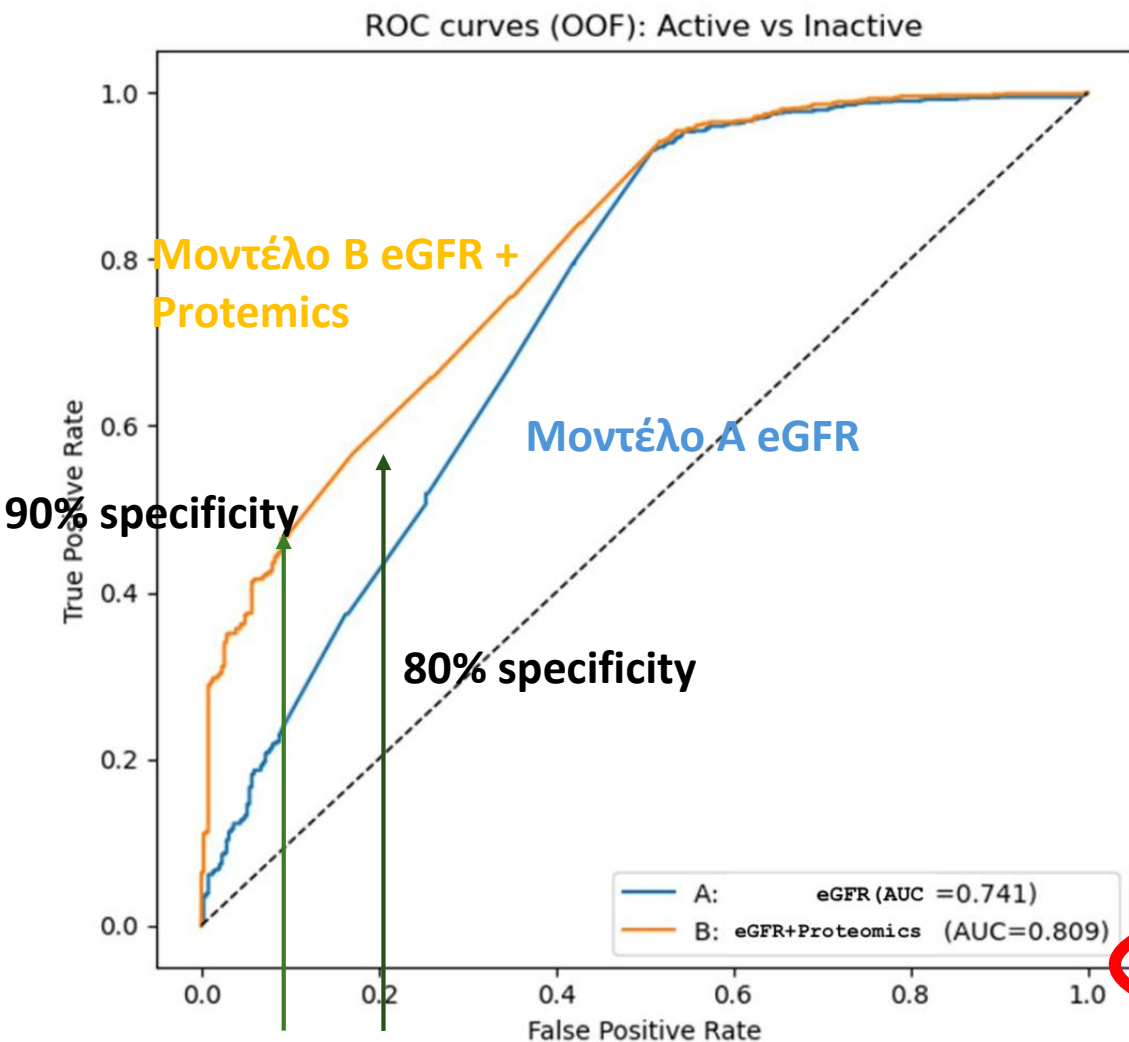
4. Ποσοτικοποίηση βάση αριθμού φασμάτων (Total Spectrum Counts)

5. Κανονικοποίηση ως την κρεατινίνη ούρων, ολική πρωτεΐνη κ.α. παραμέτρους

Ερευνητικό ερώτημα

Μπορεί η πρωτεωμική ανάλυση πρωτεϊνών του συμπληρώματος στα ούρα να διακρίνει την ενεργότητα στις σπειραματοπάθειες;

(i) Η πρωτεομική ανάλυση συστατικών του συμπληρώματος στα ούρα αναγνωρίζει **διπλάσιο αριθμό** ασθενών με **ενεργή νόσο** με **υψηλή ειδικότητα**.

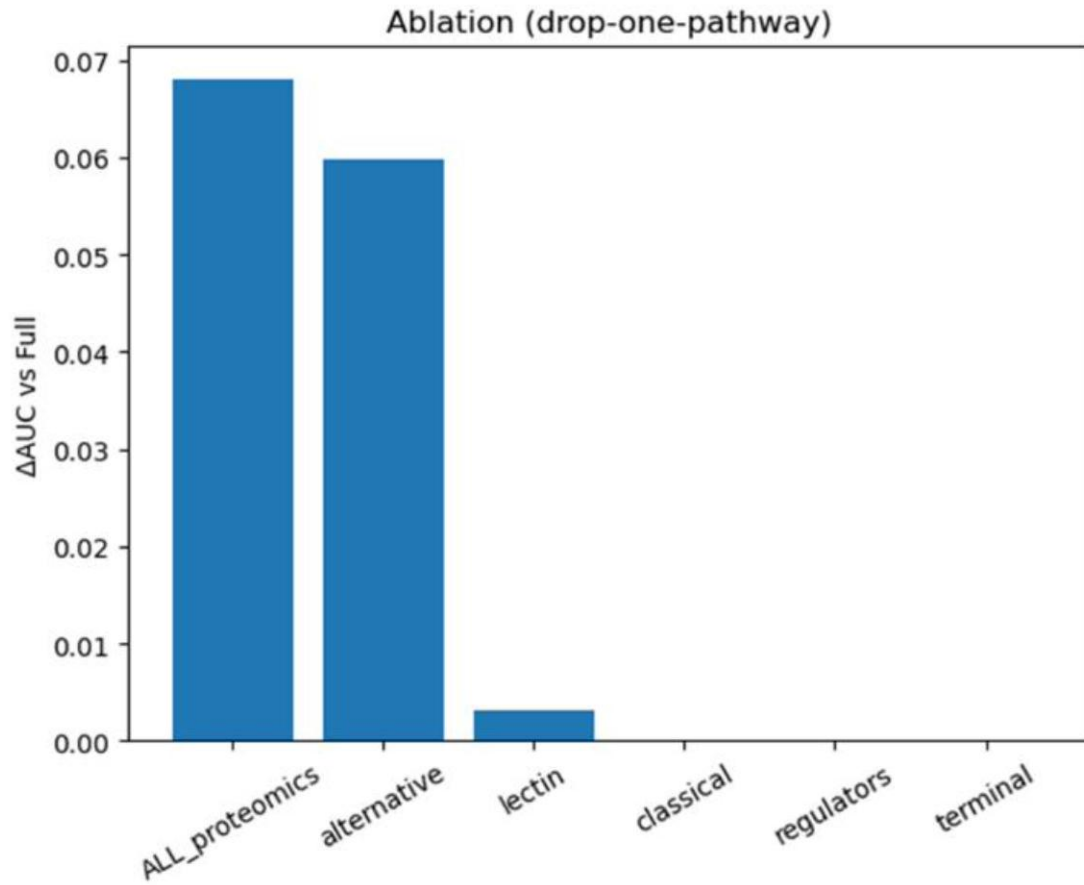


	Ευαισθησία μοντέλου A	Ευαισθησία μοντέλου B
80% Ειδικότητα	0.374	0.567
90% Ειδικότητα	0.230	0.467

Δ AUC=0.068 **95% CI Δ AUC = [0.054 - 0.079]**

(ii) Ποιο μονοπάτι συνεισφέρει σημαντικά στο μοντέλο ;

Αρχικό AUC μοντέλου eGFR+ Proteomics =0.809



Απαλοιφή	Τελικό AUC (μετά την απαλοιφή)	ΔAUC
Πρωτεωμικής πληροφορίας	0.741	- 0.068
Κλασσική Οδού	0.807	0.001
Λεκτίνης	0.804	-0.005
Εναλλακτική Οδού	0.748	-0.060
Ρυθμιστών	0.807	0.001
Τελική οδού	0.807	0.001

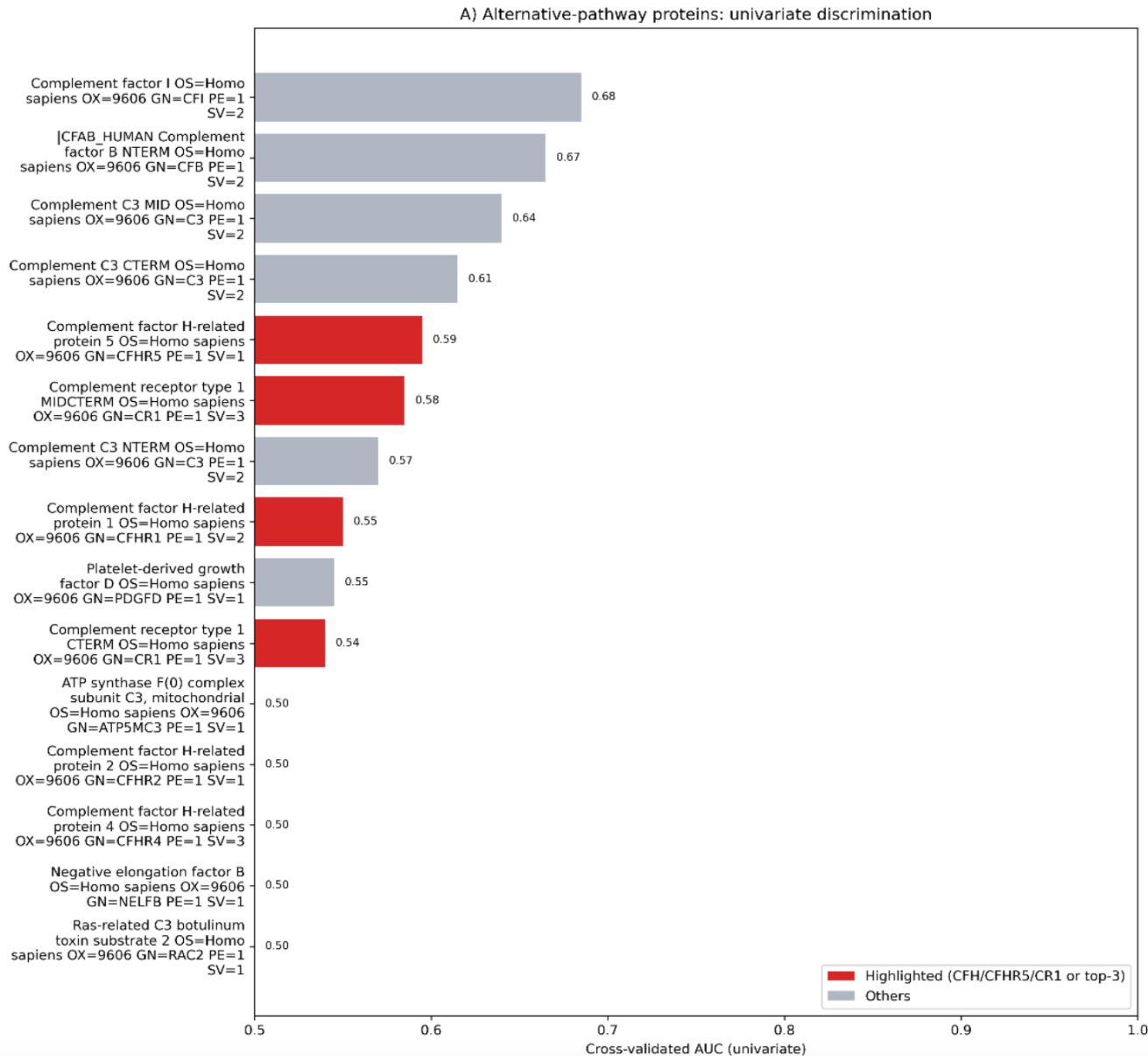
Η εναλλακτική οδός αποτελεί την κύρια οδό διάκρισης μεταξύ ενεργού και ανενεργού νόσου.

Δύο ερωτήσεις επιπλέον...

- Ποια πρωτεΐνη διακρίνει καλύτερα από μόνη της ασθενείς με ενεργή νόσο;
- Ποια πρωτεΐνη είναι απαραίτητη για το πλήρες μοντέλο στην διάκριση ασθενών με ενεργή νόσο;

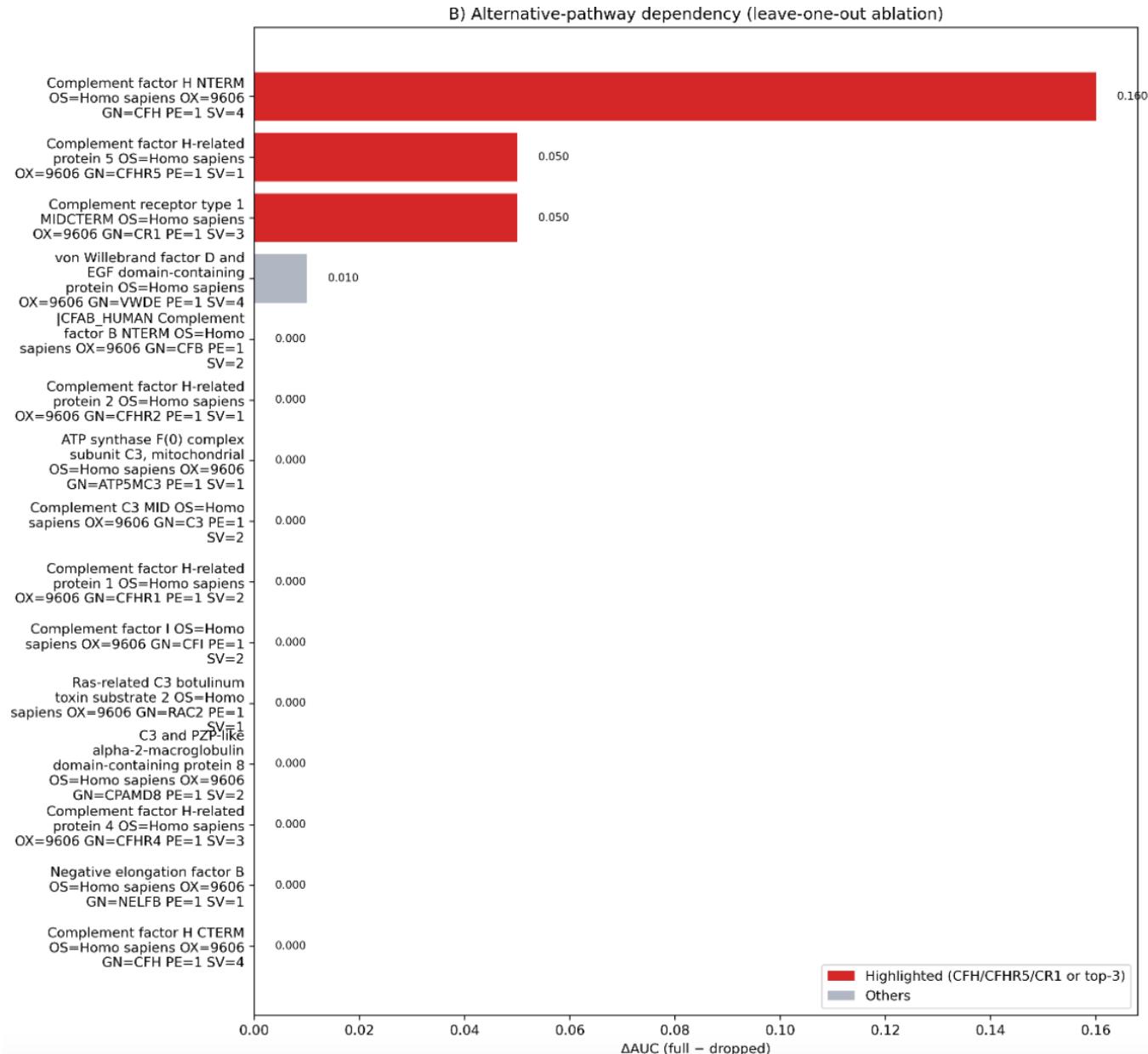
(iii) Μονοπαραγοντικές αναλύσεις:

Ποια πρωτεΐνη διακρίνει καλύτερα **από μόνη της** ασθενείς με ενεργή νόσο;



- **CFI** (Complement Factor I-ρυθμιστής του συμπληρώματος)
- **CFB** (Complement Factor B-συστατικό της C3 κονβερτάσης)
- **τα θραύσματα C3**
- ισχυρότερο μεμονωμένο σήμα.

(iv) Ποια πρωτεΐνη είναι **απαραίτητη** για το **πλήρες** μοντέλο στην διάκριση ασθενών με ενεργή νόσο;



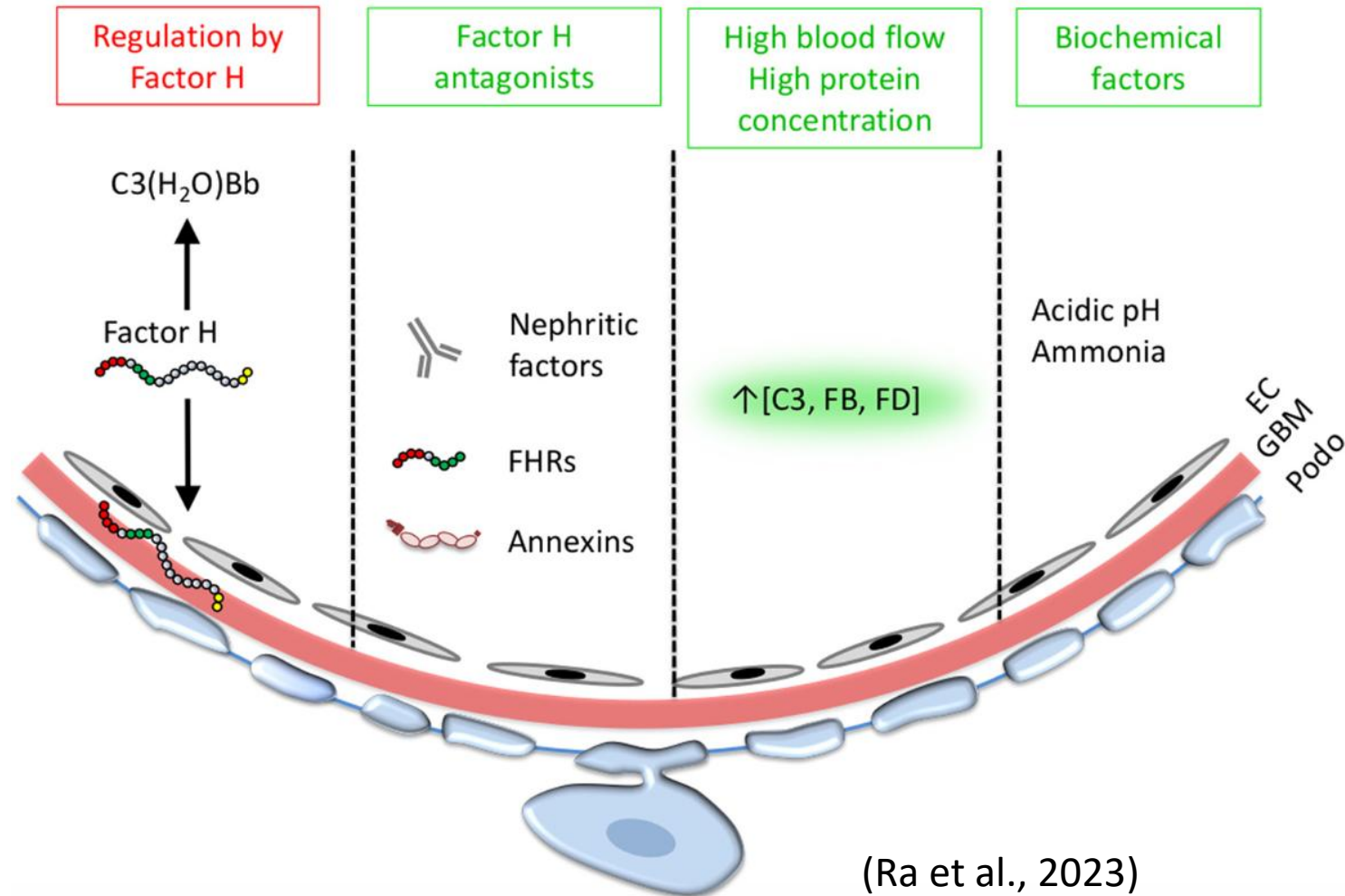
- **CFH (Complement Factor H**-κύριος διαλυτός αναστολέας της εναλλακτικής οδού)
 - **CFHR5 (CFH-related protein 5**- πρωτεΐνη συγγενής του Factor H, που τον ανταγωνίζεται)
 - **CR1 (Complement Receptor 1**- υποδοχέας/ρυθμιστής των C3b και C4b)
- επιδραστικότεροι στο πολυπαραγοντικό μοντέλο.

Γιατί το συμπλήρωμα των ούρων αντανακλά την ενεργότητα της νεφρικής νόσου;

- Ούρα → νεφρο-ειδικό βιολογικό υλικό
- Ιστική/Ορολογική ενεργότητα
 - Ενδονεφρική Παραγωγή (K. et al., 2020)
- «Τροπισμός» της εναλλακτικής οδού (Ra et al., 2023):
 - πρωτοπαθής απορρύθμιση (λ.χ. C3 σπειραματοπάθεια)
- Μηχανισμός ενίσχυσης εναλλακτικής οδού – 80% ενεργοποίησης (Te et al., 2004).

CFH/CFHR

- Factor H : κύριος διαλυτός αναστολέας της εναλλακτικής οδού
- η GBM στερείται μεμβρανικών ρυθμιστών του συμπληρώματος (αλληλεπίδραση CFH με θειϊκή ηπαράνη)
- CFHR5 ανήκει στην οικογένεια των Factor H–related proteins: ανταγωνίζεται τη δέσμευση του CFH στο C3b



Συμπεράσματα και περιορισμοί

- Τα ούρα παρέχουν αξιόλογη, μη επεμβατική, πληροφορία για την εκτίμηση της ενεργότητας της νόσου.
- Το συμπλήρωμα των ούρων αποτελεί υποσχόμενη πηγή βιοδεικτών.
- Η εναλλακτική οδός του συμπληρώματος προσδίδει το βασικό σήμα ενεργότητας, ενώ στο επίκεντρο βρίσκεται η ανεπαρκής ρύθμιση της.

Περιορισμοί

- Ετερογενής πληθυσμός ασθενών
- Περιορισμένος αριθμός ασθενών ανά διάγνωση ...

Σας
ευχαριστώ!



ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ ΣΤΑ ΟΥΡΑ ΩΣ ΕΡΓΑΛΕΙΟ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΟΝΕΦΡΙΤΙΔΕΣ

Ελένη Τζάλη^{1,2}, Σοφία Καφόρου³, Νίκος Κουντουράκης³, Ελένη Δροσατάκη^{1,2}, Ελευθερία Κλειώ Δερμιτζάκη¹, Δήμητρα Λυγερού^{1,2},
Αριάδνη Ανδροβιτσανέα¹, Χρήστος Πλέρος¹, Ανδρέας Αντωνάκης^{1,2}, Αλέξανδρος Γεώργιος Καββαδίας¹, Νικόλαος Παπαδάκης^{1,2},
Κωνσταντίνα Κυδωνάκη¹, Μιχάλης Παπαπαναγιώτου^{1,2}, Μυρτώ Κονιδάκη^{1,2}, Χαρίκλεια Γακιοπούλου⁴, Γιώργος Γκουρίδης³,
Κωνσταντίνος Στυλιανού^{1,2}, Ιωάννης Πετράκης^{1,2}

1. Νεφρολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου
2. Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ιατρική Σχολή
3. Proteomics Unit, Institute of Molecular Biology and Biotechnology (IMBB-FORTH); Heraklion-Crete, 70013, Greece.
4. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Εργαστήριο Α΄ Παθολογικής Ανατομικής



Αναφορές

- A., R., Madden, B., Charlesworth, M. C., Sharma, R., Sethi, A., Debiec, H., Cattran, D., Fervenza, F. C., Smith, R. J., Ronco, P., & Sethi. (2020). Proteomic Analysis of Complement Proteins in Membranous Nephropathy. *Kidney international reports*, 5(5). <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2020.01.018>
- Ad, Mayta, M. L., Duboff, A. G., Riley, N. M., Moritz, R. L., Meyer, J. G., Y., J., Rex, D. A. B., Schuster, D., Neely, B. A., Rosano, G. L., Volkmar, N., Momenzadeh, A., Peters-Clarke, T. M., Egbert, S. B., Kreimer, S., Doud, E. H., Crook, O. M., Yadav, A. K.,...Hegeman. (2024). Comprehensive Overview of Bottom-Up Proteomics Using Mass Spectrometry. *ACS measurement science au*, 4(4). <https://doi.org/10.1021/acsmesuresciau.3c00068>
- Ejm, Rjmge, B., Michels, M., van Rossum, M., de Nooijer, A. H., Nilsson, P. H., de Bruin, W. C. C., & Toonen. (2022). Pitfalls in complement analysis: A systematic literature review of assessing complement activation. *Frontiers in immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1007102>
- Fc, S., S., Palma, L. M. P., Theis, J. D., & Fervenza. (2023). Proteomic Analysis of Complement Proteins in Glomerular Diseases. *Kidney international reports*, 8(4). <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2023.01.030>
- Fc, S., S., Zand, L., De Vriese, A. S., Specks, U., Vrana, J. A., Kanwar, S., Kurtin, P., Theis, J. D., Angioi, A., Cornell, L., & Fervenza. (2017). Complement activation in pauci-immune necrotizing and crescentic glomerulonephritis: results of a proteomic analysis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 32(suppl_1). <https://doi.org/10.1093/ndt/gfw299>
- Jd, C., M. D., Hajishengallis, G., & Lambris. (2024). A guide to complement biology, pathology and therapeutic opportunity. *Nature reviews. Immunology*, 24(2). <https://doi.org/10.1038/s41577-023-00926-1>
- K., M. A., Keir, L. S., Abt, J. C., Heidelberg, H. S., Horton, R., Welsh, G. I., Meyer-Schwesinger, C., Licht, C., Coward, R. J., Fester, L., Saleem, M. A., & Oh. (2020). Podocytes Produce and Secrete Functional Complement C3 and Complement Factor H. *Frontiers in immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01833>
- Lt, S., M. N., Church, S. E., Fremeaux-Bacchi, V., & Roumenina. (2015). Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Frontiers in immunology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00262>
- Ra, M., T. J., & Harrison. (2023). The susceptibility of the kidney to alternative pathway activation-A hypothesis. *Immunological reviews*, 313(1). <https://doi.org/10.1111/imr.13168>
- Te, M., H., Ulvund, G., Vien, L., Fung, M., & Mollnes. (2004). The quantitative role of alternative pathway amplification in classical pathway induced terminal complement activation. *Clinical and experimental immunology*, 138(3). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02627.x>
- V., K., Bukhari, M. H., Kahlenberg, J. M., & Wang. (2024). Urinary complement biomarkers in immune-mediated kidney diseases. *Frontiers in immunology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1357869>
- Wc, Smith, R. J. H., M., V., Barratt, J., Beck, L. H., Fakhouri, F., Gale, D. P., Goicoechea de Jorge, E., Mosca, M., Noris, M., Pickering, M. C., Susztak, K., Thurman, J. M., Cheung, M., King, J. M., Jadoul, M., & Winkelmayr. (2024). The role of complement in kidney disease: conclusions from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney international*, 106(3). <https://doi.org/10.1016/j.kint.2024.05.015>