

ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΑΚΡΥΩΝ ΣΕ ΠΑΙΔΙΑ ΚΑΙ ΕΦΗΒΟΥΣ ΜΕ ΣΥΓΓΕΝΗ ΥΠΕΡΙΝΣΟΥΛΙΝΙΣΜΟ

Μιχαέλα Νικολάου^{1*}, Ελένη Αγγελοπούλου^{1*}, Ρόζα-Άννα Κιτάνη², Ιωάννης-Ανάργυρος Βασιλάκης¹, Ιερώνυμος Ζωιδάκης³,
Μαρτίνα Σαμιωτάκη⁴, Χριστίνα Κανακά-Gantenbein^{1,2*}, Νικόλαος Χρ. Νικολαΐδης^{1,2*}

¹Μονάδα Ενδοκρινολογίας, Μεταβολισμού και Διαβήτη και Κέντρο Εμπειρογνωμοσύνης Σπανίων Ενδοκρινικών Νοσημάτων Παίδων, Aghia Sophia Children's Hospital ENDO-ERN, A' Παιδιατρική Κλινική Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α., Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία». ²Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών «Η Επιστήμη του Στρες και Προαγωγή Υγείας».

³Εργαστήριο Πρωτεομικής, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών. ⁴Εργαστήριο Πρωτεομικής, Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Ερευνών «Αλέξανδρος Φλέμινγκ».



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο συγγενής υπερινσουλιτισμός (ΣΥΙ) είναι η πιο κοινή αιτία επίμονης και σοβαρής υπογλυκαιμίας στη νεογνική, βρεφική και παιδική ηλικία. Αποτελεί σπάνιο γενετικό νόσημα με την επίπτωσή του να εκτιμάται σε 1:28.000-1:50000. Η γενετική διαταραχή ανευρίσκεται συχνότερα στα γονίδια ABCC8 και KCNJ11. Διακρίνεται σε διάχυτη και εστιακή μορφή που αντιμετωπίζεται με συντηρητική / φαρμακευτική ή χειρουργική θεραπεία αντίστοιχα. Η καθυστερημένη διάγνωση και η μη σωστή διαχείριση των υπογλυκαιμιών μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή εγκεφαλική βλάβη και κατ' επέκταση σε μόνιμες νευροαναπτυξιακές διαταραχές. Ο ΣΥΙ παραμένει μία ασθένεια με υψηλή θνητότητα και σοβαρές κοινωνικοοικονομικές επιπτώσεις στις οικογένειες των προσβεβλημένων ατόμων. Ο σκοπός της παρούσας προοπτικής μελέτης είναι να ταυτοποιηθεί το πρωτεομικό προφίλ δακρύων σε παιδιά κι εφήβους με ΣΥΙ που παρακολουθούνται στη Μονάδα Ενδοκρινολογίας, Μεταβολισμού και Διαβήτη της Α' Παιδιατρικής Κλινικής Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Στη μελέτη συμμετείχαν 10 παιδιά και έφηβοι με ΣΥΙ, ηλικίας 4-17 ετών χωρίς συννοσηρότητες καθώς και 10 υγιείς μάρτυρες σταθμισμένοι κατά φύλο και ηλικία. Το ερευνητικό πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την Επιτροπή Βιοηθικής και Δεοντολογίας Νοσ. Παίδων «Η Αγία Σοφία» Αρ. Πρωτ: 13102/05.07.2021. Υπήρξε Ενυπόγραφη συγκατάθεση από γονείς μετά από ενδελεχή ενημέρωση αυτών. Στα παιδιά που συμμετείχαν στην μελέτη καταγράφησαν τα κλινικο-εργαστηριακά χαρακτηριστικά και πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία δακρύων.

ΜΕΘΟΔΟΙ

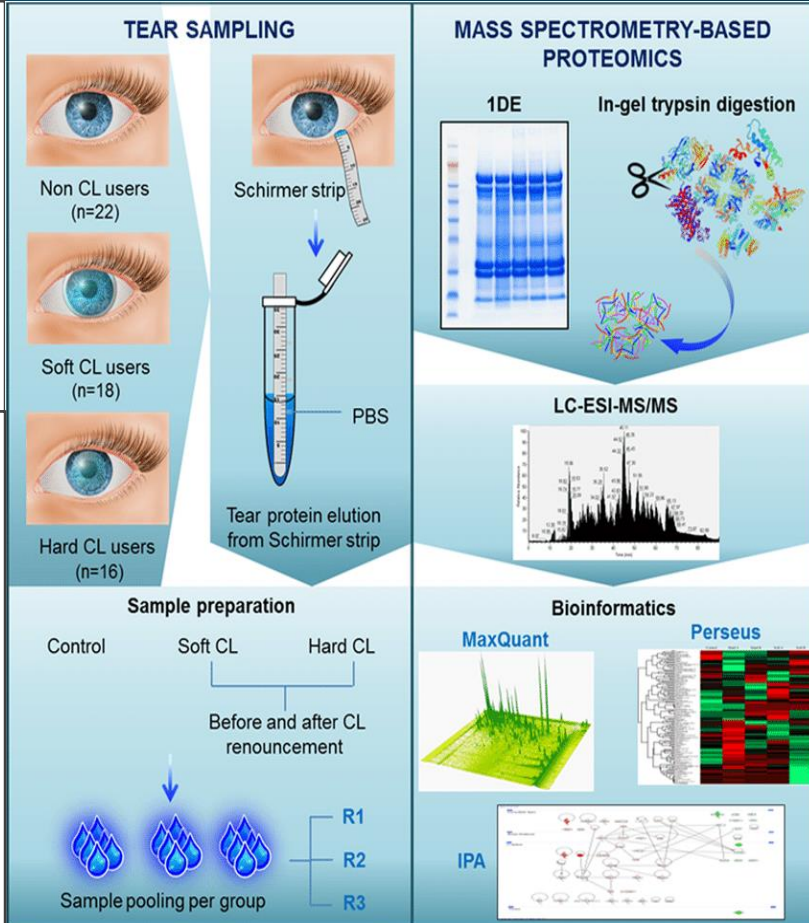
Το δάκρυ ως βιολογικό υλικό



- Μη παρεμβατική συλλογή κατά την δειγματοληψία
- Ο ρυθμός παραγωγής δακρύων είναι περίπου 2 μl/min
- Η μέση συγκέντρωση πρωτεΐνης είναι 5-7 μg/μl
- Περισσότερες από 1500 πρωτεΐνες στα δάκρυα
- Σύνδρομο ξηροφθαλμίας, διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια
- Νόσος Alzheimer, Σκλήρυνση κατά πλάκας
- Η μελέτη των δακρύων ως βιολογικό υλικό αποτελεί καινοτομία

Πρωτόκολλο Πρωτεομικής Ανάλυσης

- Οι πρωτεΐνες των δακρύων απομονώθηκαν συνολικά από 20 δείγματα δακρύων.
- Η πέψη τους πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο Sp3.
- Τα πεπτίδια διαχωρίστηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συζευγμένη με φασματόμετρο μάζας Q Exactive HF-X για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση τους με το λογισμικό DIA-NN.
- Η στατιστική και βιοπληροφορική ανάλυση έγινε με τα λογισμικά Perseus και Metascape



Banerjee I, et al. Therapies and outcomes of congenital hyperinsulinism-induced hypoglycaemia. *Diabet Med.* 2019;36(1):9-21. doi:10.1111/dme.13823
Csósz É. et al. *J Proteomics.* 2017; 153: 30-43

ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΑΚΡΥΩΝ ΣΕ ΠΑΙΔΙΑ ΚΑΙ ΕΦΗΒΟΥΣ ΜΕ ΣΥΓΓΕΝΗ ΥΠΕΡΙΝΣΟΥΛΙΝΙΣΜΟ

Μιχαέλα Νικολάου^{1*}, Ελένη Αγγελοπούλου^{1*}, Ρόζα-Άννα Κιτάνη², Ιωάννης-Ανάργυρος Βασιλάκης¹, Ιερώνυμος Ζωιδάκης³,
Μαρτίνα Σαμιωτάκη⁴, Χριστίνα Κανακά-Gantenbein^{1,2*}, Νικόλαος Χρ. Νικολαΐδης^{1,2*}

¹Μονάδα Ενδοκρινολογίας, Μεταβολισμού και Διαβήτη και Κέντρο Εμπειρογνωμοσύνης Σπανίων Ενδοκρινικών Νοσημάτων Παίδων, Aghia Sophia Children's Hospital ENDO-ERN, Α' Παιδιατρική Κλινική Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α., Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία». ²Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών «Η Επιστήμη του Στρες και Προαγωγή Υγείας».

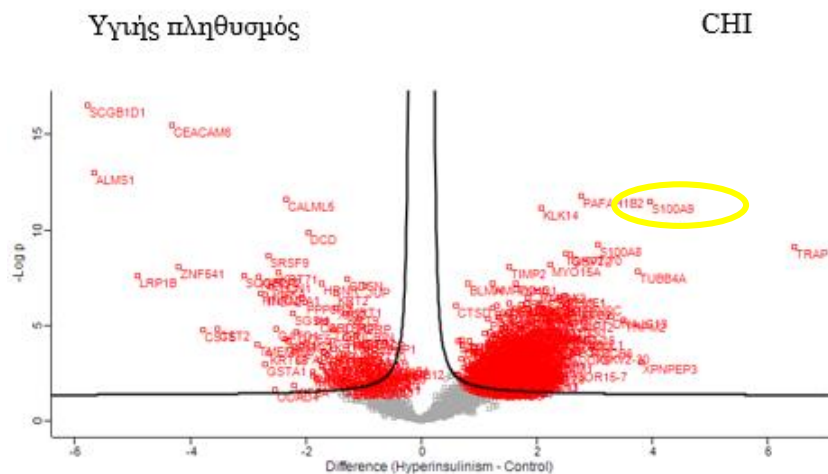
³Εργαστήριο Πρωτεομικής, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών. ⁴Εργαστήριο Πρωτεομικής, Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Ερευνών «Αλέξανδρος Φλέμινγκ».



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

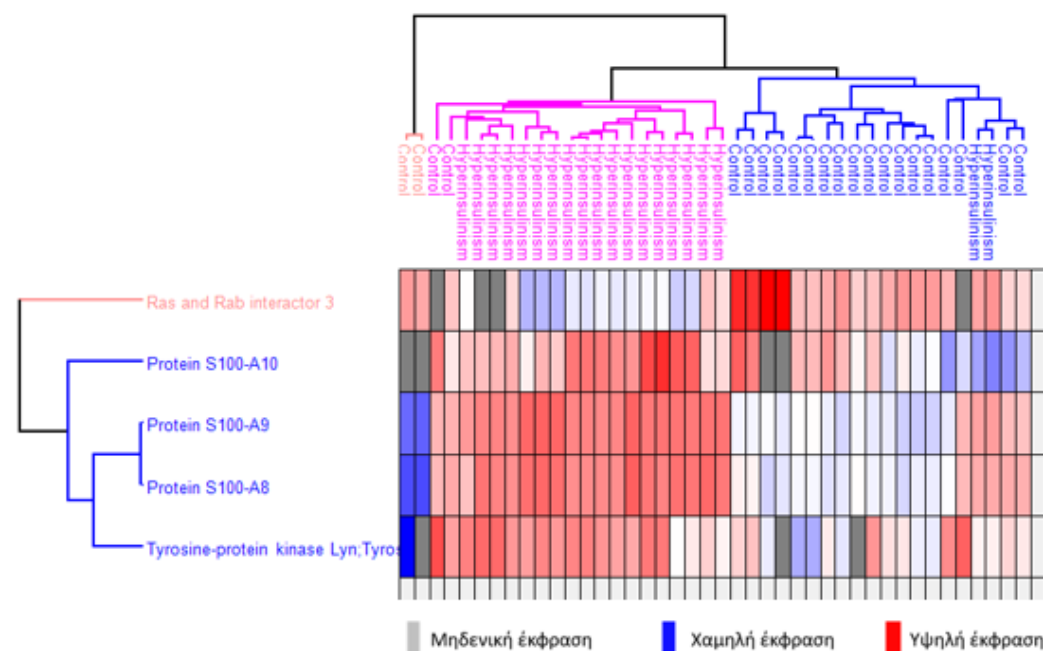
- Ταυτοποιήθηκαν συνολικά **3901** διαφορετικές πρωτεΐνες σε όλα τα δείγματα δακρύων
- Ανευρέθησαν **673** στατιστικώς σημαντικά διαφορικώς εκφραζόμενες (downregulated-upregulated) πρωτεΐνες στις δύο ομάδες εξετασθέντων

ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ



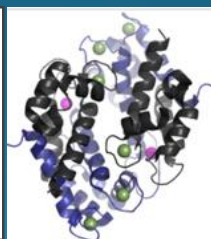
- Οι ασθενείς με ΣΥΙ εμφανίζουν υψηλότερες συγκεντρώσεις **καλπροτεκτίνης** (πρωτεΐνες **S100A8** και **S100A9**).

S100 A8/9 – Καλπροτεκτίνη



ΚΑΛΠΡΟΤΕΚΤΙΝΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΗΣ

- Ανευρίσκεται στα κοκκιοκύτταρα, μονοκύτταρα και στα πρώιμα στάδια διαφοροποίησης των μακροφάγων
- Καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση των φλεγμονωδών διεργασιών και της ανοσοαπόκρισης
- Αυξάνεται σε άτομα με μεταβολικό σύνδρομο, κατάσταση η οποία χαρακτηρίζεται από χρόνια φλεγμονή
- Βρίσκεται κυρίως ως καλπροτεκτίνη (S100A8/A9) η οποία έχει μια ευρεία πληθώρα ενδο- και εξωκυτταρικών λειτουργιών.



- Βιοδείκτης σε φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου IBD (faecal CP)
- Βιοδείκτης στην Ρευματοειδή αρθρίτιδα (serum CP)
- Βιοδείκτης σε βακτηριακές αναπνευστικές νόσους (serum CP)

ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΑΚΡΥΩΝ ΣΕ ΠΑΙΔΙΑ ΚΑΙ ΕΦΗΒΟΥΣ ΜΕ ΣΥΓΓΕΝΗ ΥΠΕΡΙΝΣΟΥΛΙΝΙΣΜΟ

Μιχαέλα Νικολάου^{1*}, Ελένη Αγγελοπούλου^{1*}, Ρόζα-Άννα Κιτάνι², Ιωάννης-Ανάργυρος Βασιλάκης¹, Ιερώνυμος Ζωιδάκης³,
Μαρτίνα Σαμιωτάκη⁴, Χριστίνα Κανακά-Gantenbein^{1, 2*}, Νικόλαος Χρ. Νικολαΐδης^{1, 2*}

¹Μονάδα Ενδοκρινολογίας, Μεταβολισμού και Διαβήτη και Κέντρο Εμπειρογνωμοσύνης Σπανίων Ενδοκρινικών Νοσημάτων Παιδών, Aghia Sophia Children's Hospital ENDO-ERN, Α' Παιδιατρική Κλινική Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α., Νοσοκομείο Παιδών «Η Αγία Σοφία». ²Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών «Η Επιστήμη του Στρες και Προαγωγή Υγείας».

³Εργαστήριο Πρωτεομικής, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών. ⁴Εργαστήριο Πρωτεομικής, Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Ερευνών «Αλέξανδρος Φλέμινγκ».

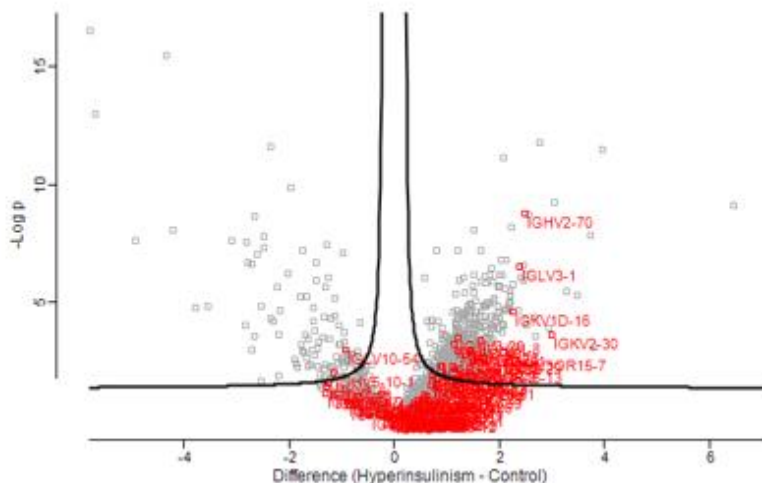


ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Οι ασθενείς με ΣΥΙ εμφανίζουν υψηλότερες συγκεντρώσεις **ανοσοσφαιρινών**.

Βιολογικά Μονοπάτια

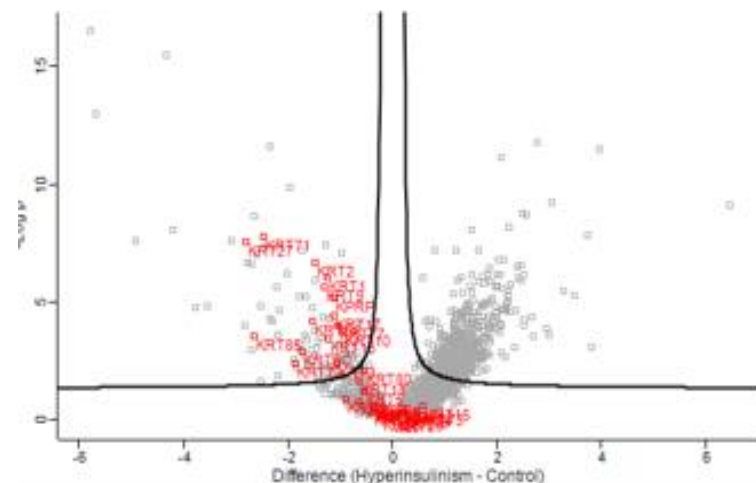
- Αποκοκκίωση Ουδετεροφίλων
- Ενεργοποίηση και προσαρμογή της άμυνας του οργανισμού



Οι ασθενείς με ΣΥΙ εμφανίζουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις διαφόρων **κερατινών**.

Βιολογικά Μονοπάτια

- Αποκοκκίωση Ουδετεροφίλων
- Ενεργοποίηση και προσαρμογή της άμυνας του οργανισμού



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Στατιστικώς **σημαντικές** διαφορές στο πρωτεομικό προφίλ των δακρύων ανάμεσα σε άτομα με ΣΥΙ και υγιείς μάρτυρες
2. Η **καλπροτεκτίνη** (S100A8/A9) εντοπίστηκε σε αυξημένη έκφραση στα δείγματα του ΣΥΙ σε σχέση με υγιείς μάρτυρες
3. Πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην **ανοσολογική απάντηση** υπερεκφράζονται σε άτομα με ΣΥΙ
4. Μειωμένη έκφραση σε άτομα με ΣΥΙ φαίνεται να έχουν οι πρωτεΐνες του **κερατίνου φραγμού**

Απαιτείται περαιτέρω ανάλυση δεδομένων και κατάλληλοι συσχετισμοί με κλινικοεργαστηριακά στοιχεία για τον εντοπισμό πρώιμων βιοδεικτών για πιθανές μακροχρόνιες επιπλοκές σε ασθενείς με ΣΥΙ