

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO Dipartimento di Farmacia

Dottorato di Ricerca in Scienze del Farmaco Ciclo XXIX

Anno accademico 2016/2017

Abstract

NMR-based metabolomic analysis of biological fluids to monitor relevant unsolved diseases

Dott. Angelica Palisi MAT. 8888200016

La metabolomica e la metabonomica comprendono il profilo completo di numerosi metaboliti con riferimento alle varie concentrazioni e fluttuazioni sia cellulari che sistemiche in risposta a farmaci, dieta, stile di vita, influenza dell'ambiente, stimoli e modulazioni genetiche, al fine di caratterizzare gli effetti benefici e negativi di tali interazioni. Nel contesto delle applicazioni biomediche, la metabolomica avrà in futuro un ruolo preferenziale rispetto alle altre scienze 'omiche' per la possibilità di rilevare in tempo reale la risposta degli organismi agli stress patologici. L'applicazione della tecnica NMR è stata utilizzata per l'analisi metabolomica di bio-fluidi derivanti da popolazioni di pazienti affetti rispettivamente da tumore delle ghiandole salivari; da sindrome da antifosfolipidi; pazienti con profilo lipidico alterato. Questo screening metabolomico NMR è mirato i) alla definizione di un profilo metabolomico che potrebbe essere patognomonicamente delle malattie monitorate e ii) l'identificazione di biomarcatori da utilizzare in ambito diagnostico e prognostico. In questo studio metabolomico basato su analisi NMR della saliva di pazienti affetti dai tumori delle ghiandole salivari i nostri dati mostrano caratteristiche anomalie nel profilo metabolomico connesse con il metabolismo di acetato, alanina, lattato, metanolo, fenilalanina, propionato, succinato. Abbiamo identificato per la prima volta l'impronta digitale metabolomica che caratterizza i pazienti con tumori della parotide con una potenziale applicazione per migliorare la diagnosi tempestiva ed un approccio terapeutico adeguato. I tumori alle ghiandole salivari, come molti altri tipi di cancro, sono patologie complesse, risultanti da una serie interdependente di alterazioni biochimiche, piuttosto che un singolo evento dirompente. In questo caso, con un approccio rivolto all'identificazione di un panel di metaboliti marcatori, piuttosto che ad un singolo biomarcatore, miglioreranno ed aumenteranno la

sensibilità e la specificità per il rilevamento, integrando i protocolli diagnostici classici e la classificazione istologica. Il nostro studio metabolomico NMR-based ha rivelato diversi profili nella saliva di pazienti affetti da tumori delle ghiandole salivari, confrontati in base all'età e al sesso, abbinati con i controlli. Il “finger print”, piuttosto che i singoli biomarkers, può riflettere in pieno la natura multifattoriale ed eterogenea della oncogenesi, fornendo preziosi elementi per integrare i test diagnostici clinici e di laboratorio. La sindrome antifosfolipidi (APS) è una malattia autoimmune, reumatica, infiammatoria cronica associata ad uno stato di ipercoagulabilità: inducendo trombosi vascolari ed aborti spontanei nelle donne. Ictus cerebrali e vascolari in questi pazienti sono responsabili della riduzione della aspettativa di vita: una diagnosi tempestiva ed un accurato monitoraggio della malattia è determinante per migliorare la precisione della terapia. Nel presente lavoro, vi presentiamo uno studio di metabolomica NMR su siero di pazienti affetti da APS. I nostri dati mostrano che gli individui che soffrono di APS hanno un profilo metabolomico caratteristico con anomalie del metabolismo associate ai donatori di gruppi metilici, di aminoacidi e corpi chetonici. Abbiamo identificato per la prima volta il “finger print” della sindrome da APS con la potenziale applicazione di migliorare la diagnosi tempestiva e favorire un approccio terapeutico adeguato. La prima stratificazione di pazienti APS in base al sesso offre indicazioni per la gestione della malattia secondo un approccio medico gender oriented. Il siero umano comprende un gran numero di componenti derivanti sia dal metabolismo endogeno sia dall'apporto nutrizionale i quali variano in risposta alla dieta. La composizione lipidica del siero è probabilmente il punto di riferimento più importante nella valutazione del rischio cardiovascolare e della progressione della malattia. Inoltre la composizione lipidica può influenzare il metabolismo e più in particolare, i percorsi molecolari che collegano l'apporto nutrizionale ed il rischio di malattia cronica. L'effetto esercitato dalla composizione lipidica modificata sul pattern genomico in risposta all'espressione su campioni di siero da soggetti maschi ipercolesterolemici, confrontati con normocholesterolemici è stato oggetto di un precedente studio. Nell'ultima parte di questa tesi di dottorato, utilizzando l'approccio metabolomico NMR ho studiato il profilo dei supramenzionati ipercolesterolemici e normocholesterolemici per correlare il profilo trascrittomico ottenuto dalle cellule epatiche umane con il profilo metabolomico del siero umano utilizzato per la cultura, mostrando una aumentata espressione di mRNA di HMGCS2, un enzima coinvolto nel percorso di corpi chetonici. Dall'analisi NMR sono emerse concentrazioni alterate di metaboliti coinvolti della via biosintetica dei corpi chetonici. Questo indica una correlazione tra il profilo trascrittomico di cellule epatiche trattate con sieri ipercolesterolemici, e il profilo metabolomico dei sieri stessi.