



METABOLOMICS COMPARISON OF CORD AND PERIPHERAL BLOOD-DERIVED SERUM EYE DROPS FOR THE TREATMENT OF DRY EYE DISEASE

KURU GÖZ HASTALIĞININ TEDAVİSİ İÇİN KORDON KANI VE PERİFERİK KAN KAYNAKLI SERUM GÖZ DAMLALARININ METABOLOMİKLERİNİN KARŞILAŞTIRMASI

ALINTI: doi: <https://doi.org/10.1016/j.transci.2021.103155>

YAZARLAR: Quartieri E, Marraccini C, Merolle L, Pulcini S, Buzzi M, Guardi M, Schioli D, Baricchi R, Pertinhez TA.

ÖZETLEYEN: Dr. Hülya Duran

GİRİŞ

Kuru göz hastalığı (DED; dry eye disease), oküler yüzeysel enflamasyon ve gözyaşı salgısının homeostazının bozulmasına bağlı hasarla seyreden çok faktörlü bir hastalıktır. DED, tedavi edilmediğinde veya şiddetli formlarda, görme kaybına, skara ve kornea ülserasyonuna yol açmaktadır. Yapay gözyaşları genellikle ilk basamak tedavi olarak kullanılır. İnsan kanından elde edilen göz damlaları da son yıllarda DED tedavisinde tercih edilmektedir. Kordon kanı serumu (CBS) ve periferik kan kaynaklı serum (PBS) bu amaçla kullanılmaktadır. Bugüne kadar, serum göz damlalarının içeriği ve optimal formülasyonuna yönelik standardizasyon yapılmamıştır ve non-protein içerik belirsizdir. Bu çalışmada, proton nükleer magnetik rezonans spektroskopisi (H-NMR) kullanılarak kordon kanı ve yetişkin periferik kan serumlarının içerdiği küçük moleküller ve metabolitlerin (<1500 Da molekül ağırlıklı) dağılımı, gözyaşı ile benzerlikleri ve farklılıklarının gösterilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ-YÖNTEM

Bu çalışma, İtalya'nın Bologna ve Reggio Emilia bölgesinde yapılan çok merkezli prospektif bir çalışmadır (Etik Kurul: protokol 2017/0006129). 24 kan bağışçısından (19 erkek, 5 kadın) PBS örneği, 31 yenidoğandan (18 erkek, 13 kız) doğumla beraber kord serum örneği alınmıştır. Her iki örnek tipinde beyaz küre (WBC) ve trombosit (PLT) sayısı otoanalizör (XN-1000 Sysmex Europe GmbH, Almanya) ile ölçülmüştür. Tüm serum örnekleri H-NMR ile analize kadar

-80°C'de bekletilmiştir. H-NMR analizi için 2 ml serum örneği, analizi etkileyecek protein ve/veya lipid komponentleri uzaklaştırmak için 3 kDa membran filtreler ile süzölmüştür. Metabolit tanımlama ve kantifikasyonu Chenomx NMR suite 8.3 yazılımı (Chenomx Inc., Kanada) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İki serum kaynağı arasındaki metabolit içeriği farklılıklarını kanıtlamak ve analitik yöntemin duyarlılığını en üst düzeye çıkarmak için seyreltilmemiş serum numuneleri ile çalışılmıştır.

İstatistiksel Analiz: PBS ve CBS arasındaki metabolit farklılıklarını görselleştirmek için Metabo Analyst 5.0 ile ısı haritası oluşturulmuştur. CBS ve PBS metabolit seviyeleri eşleştirilmemiş t-testi ile karşılaştırılmıştır. Metabolit içeriği, çok değişkenli istatistiksel analizde Değişken Önem puanları (VIP)>1.0 ve tek değişkenli analizde $p<0.05$ olduğunda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

SONUÇ-TARTIŞMA

WBC değerleri kordon kanında periferik kana göre anlamlı yüksek bulunmuş ($p<0.001$), PLT değerlerinde iki grup arasında fark saptanmamıştır. Seyreltilmemiş CBS ve PBS alkali imiş fakat CBS'nin, PBS'den önemli ölçüde daha alkali olduğu görölmüştür. Isı haritası analizinde PBS ve CBS'nin metabolik profili arasında heterojenite gözlenmiştir. Bununla birlikte ısı haritasında sitrat ve ornitin arasındaki metabolitlerin PBS'ye kıyasla CBS'de açıkça daha fazla olduğu saptanmış ve iki grup arasında bazı net farklılıklar olduğunu kanıtlanmıştır. Tüm numunelerin nicelleştirilmiş metabolit veri setlerine Temel Bileşen Analizi (PCA) uygulanmış, PBS kümesi için daha yüksek puan dağılımı görölmüştür. Biyokimyasal parametreler (WBC, PLT) ile PBS ve CBS'den elde edilen metabolitlerin konsantrasyonları Spearman's korelasyon analizi kullanılarak çapraz kontrol edilmiş, yine de bunlar arasında herhangi bir doğrudan anlamlı korelasyon ($p>0.05$) saptanmamıştır (veriler gösterilmemiştir).

Çalışmada karbonhidratlar, lipidler ve keton cisimlerinin metabolizmalarından türetilen 40'tan fazla metabolit tespit edilmiştir. Hem CBS hem de PBS'de bulunan metabolitlerin çoğunun, piruvat, taurin ve üre hariç, gözyaşındaki kadar çok daha yoğun olduğu saptanmıştır. Genel olarak CBS'de PBS'den daha yüksek metabolit konsantrasyonları bulunmuştur. Özellikle CBS'de bol miktarda saptanan bazı metabolitlerin DED tedavisi üzerinde olumlu etkileri

olabileceği düşünülmüştür. Glutamin, fenilalanin, alanin, betain, ornitin ve üre düzeylerinin iki numune türü arasında önemli ölçüde farklı olduğu görülmüştür. VIP puanları analizine göre, CBS ve PBS arasındaki büyük farklar miyo inositol, kolin, glutamin, kreatin ve β -hidroksibutirat seviyelerinde bulunmuştur. Kolin konsantrasyonu, CBS'de PBS'den üç kat daha yüksek saptanırken kolin metabolizmasının doğrudan bir ürünü olan betain CBS'de düşük seviyelerde saptanmıştır. Bu duruma CBS'de bulunan kolinin çoğunun betain'e metabolize edilmek yerine, membran fosfolipidlerinin sentezi için substrat olarak kullanılmasının ya da CBS'de PBS'den daha yüksek bir betain tüketiminin mevcudiyetinin neden olduğu varsayılmıştır. Ağızdan uygulanan kolinin gözyaşı filmini stabilize ettiği ve DED hastalarının semptomlarını hafiflettiği kanıtlanmıştır. CDP-kolin, lazer sonrası kornea hassasiyetinin iyileşmesine yardımcı olmaktadır. Kolinin rolü, lakrimal bezlerden gözyaşı salgısını uyaran, parasempatik sinirden salgılanan kolin metaboliti asetilkolinin aktivitesi ile açıklanabilir. Benzer şekilde kreatin seviyeleri CBS'de PBS'ye kıyasla iki katı olarak saptanırken, yıkım ürünü kreatinin CBS'de daha düşük bulunmuştur. Kreatin, ATP ve asit-baz dengesinin korunmasında, antioksidan fonksiyonların sağlanmasında ve plazma membranlarının stabilize edilmesinde rol oynar. Tüm bu özellikler DED hastaları için faydalı olabilir.

CBS'nin PBS'ye göre daha yüksek seviyelerde sitrat, gliserol ve keton cisimleri (asetoasetat ve β -hidroksibutirat) içerdiği tespit edilmiştir. β -hidroksibutirat DED'de faydalı bir role sahip olabilir, çünkü yapılan bir çalışmada sıçan kuru göz modelinde apoptoz ve gelişmiş kornea epitel erozyonu üzerinde baskılayıcı etki gösterdiği bulunmuştur. Ek olarak, 65 DED hastası üzerinde yapılan plasebo kontrollü bir çalışmada β -hidroksibutiratın gözyaşı eksikliğinin tedavisinde kullanılabileceği öne sürülmüştür.

Miyo-inositol, CBS'de önemli ölçüde yoğun olarak saptanmış başka bir metabolittir. İnositol 1,4,5-trifosfat reseptörlerinden (IP3R) yoksun bir fare modelinin göz kuruluğu fenotipi göstermesi, Sjögren sendromunda IP3R'nin düşük regüle olması inositol sinyalinin tükürük ve gözyaşı salgısının düzenlenmesinde önemli role sahip olduğunu göstermektedir. IP3R, fosforile edilmiş inositol formlarını bağlar ve göze inositol verilmesi, Sjögren sendromlu DED hastalarında IP3R'nin azalmasına karşı koyabilir.



H-NMR, numune manipülasyonu olmaksızın çok çeşitli biyoakışkanlarda majör metabolitlerin mutlak tespiti ve miktarının belirlenmesine izin verdiği için birçok avantaja sahiptir. Ancak, nM aralığındaki metabolitleri tespit edemez. Bu nedenle, DED tedavisine etkisi olabilecek bazı moleküller tespit edilememiş olabilir. Bununla birlikte, bu çalışma ile serum göz damlasının bileşim açısından gözyaşı ile pek çok benzerlik paylaştığına dair deneysel kanıtlar sağlanmış oldu. Ayrıca, DED tedavisi için kullanılan serum göz damlalarını standardize etmeyi amaçlayan gelecekteki çalışmalar için bir örnek temsil edebilir. Sonuç olarak, bu çalışmanın verileri kan bileşenlerinin DED'in klinik tedavisi için potansiyel olarak uygun olduğu hipotezini desteklemektedir. Standart bir serum ürünü geliştirmek ve terapötik potansiyeli optimize etmek için bu ürünlerde bulunan çözünebilir metabolitlerin iyi bir biyokimyasal analizi gereklidir.

