43° CONGRESSO NAZIONALE SIMLA VERONA

SIMLA: PER UNA NUOVA COSCIENZA E CONOSCENZA NELLA MODERNA MEDICINA LEGALE E NELLA SCIENZA FORENSE
18 - 20 SETTEMBRE 2018
VERONA, PALAZZO DELLA GRAN GUARDIA

Divieto di riproduzione, utilizzo e diffusione anche parziale

Utilizzo di un approccio metabolomico basato sull'analisi ^{1}H NMR di umor acqueo animale per la stima dell'intervallo post-mortem.

Emanuela Locci, PhD, *elocci@unica.it*

Università of Cagliari
Dipartimento di Scienze Mediche e Sanità Pubblica
Unità di Medicina Legale
Direttore: Prof. Ernesto d'Aloja

C. Gonzalez-Riano et al. / Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis xxx (2016) xxx–xxx

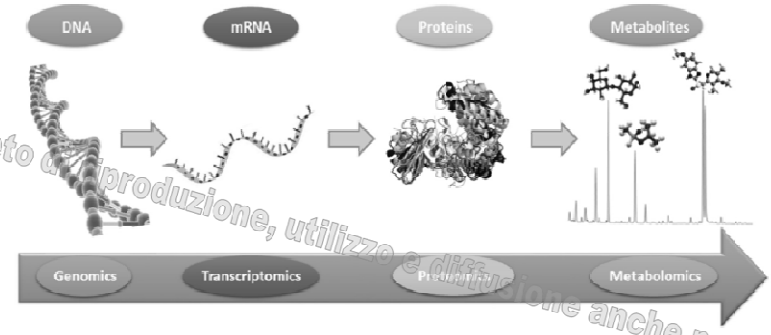


Fig. 2. The diagram of the interaction between *omics* sciences and the flow of biological information.

Divieto di riproduzione, utilizzo e diffusione anche parziale

METABOLOMICA

studio quali-quantitativo dei metaboliti a basso peso molecolare presenti nei fluidi biologici e nei tessuti e delle loro modificazioni in seguito a stimoli fisiopatologici

DISEGNO SPERIMENTALE

Campioni di UMOR ACQUEO ovino

Modello ovino → Ampia disponibilità di campioni
≈ 1ml di umor acqueo per occhio

Umor acqueo → Stabilità metabolica nel tempo
Facilità di prelievo nelle prime ore post-mortem

Divieto di riproduzione, utilizzo e diffusione anche parziale

- **Prelievo teste da animali omogenei**
- **Conservazione in ambiente controllato**
- **Occhio destro → asportazione palpebra → OCCHIO APERTO**
- **Occhio sinistro → sutura palpebra → OCCHIO CHIUSO**

1 prelievo umor acqueo ogni ora per 24 ore (PMI = 100-1500 min)

TRAINING SET	**TEST SET**
(modello)	**(validazione)**
n = 38 campioni	**n = 21 campioni**

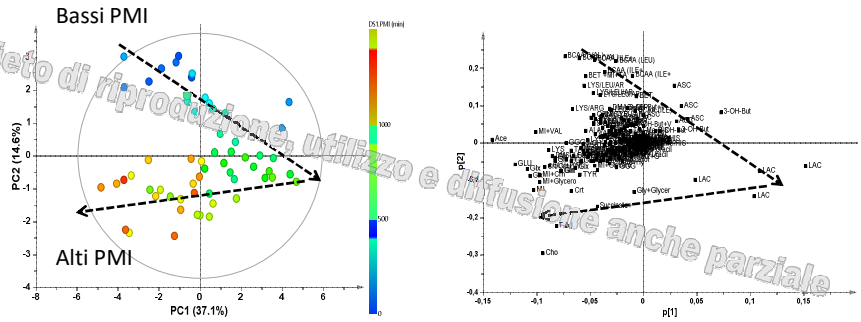
METODI

- **Prelievo attraverso il limbus corneale**
  aggiunta di NaN_3, conservazione a -80°C fino all'analisi
- **Preparazione campioni per analisi ^{1}H NMR**
  ultrafiltrazione su Amicon 10kDa
  tampone fosfato 1.5M pH=7.4 e riferimento interno (TSP)
- **Analisi ^{1}H NMR → profilo completo metaboliti a basso PM**
  Spettrometro NMR Agilent Unity INOVA 500MHz
- **Quantificazione metaboliti principali**
  ChenoMX 8.0 software
- **Analisi statistica univariata e multivariata**
  SIMCA 13 (Umetrics, Umea, Sweden)
  Piattaforma R 3.0.2 (R Foundation for Statistical Computing)

Divieto di riproduzione, utilizzo e diffusione anche parziale

RISULTATI

MODELLO PCA
(analisi non supervisionata)

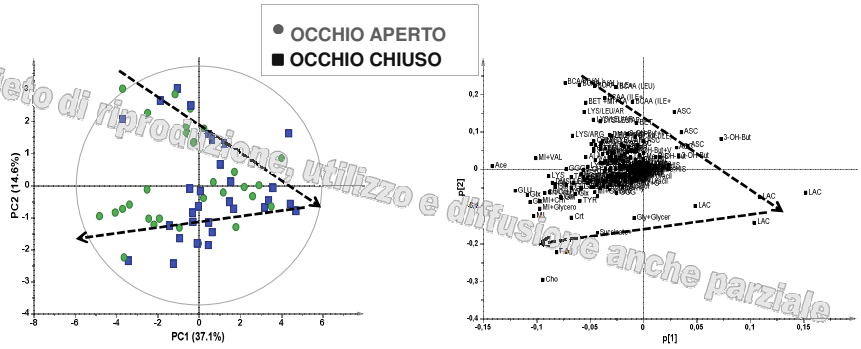


Divieto di riproduzione, utilizzo e diffusione anche parziale

Traiettoria tempo relata

RISULTATI

MODELLO PCA
(analisi non supervisionata)



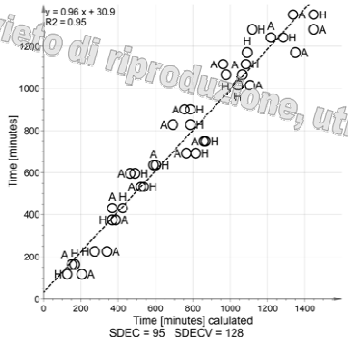
Divieto di riproduzione, utilizzo e diffusione anche parziale

Prelievi da occhi aperti o chiusi distribuiti in modo omogeneo

RISULTATI

MODELLO PREDITTIVO
ptPLS2: Time (k=43, A= 1+2, mean centering, y0.5)

TRAINING SET
N=38



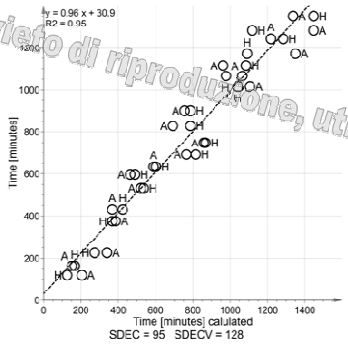
R^2Y_{time}=0.95 (<0.001)
$Q^2Y_{time\ CV\text{-}10\ fold}$=0.92 (<0.001)

Divieto di riproduzione, utilizzo e diffusione anche parziale

RISULTATI

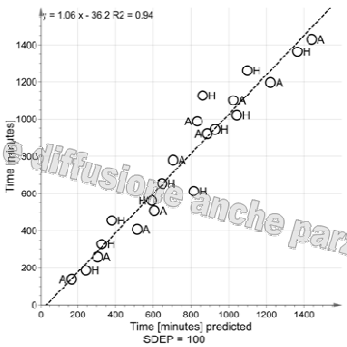
MODELLO PREDITTIVO
ptPLS2: Time (k=43, A= 1+2, mean centering, y0.5)

TRAINING SET
N=38



R^2Y_{time}=0.95 (<0.001)
$Q^2Y_{time\ CV\text{-}10\ fold}$=0.92 (<0.001)

TEST SET
N=21



ERRORE STIMA PMI = 100 minuti

Divieto di riproduzione, utilizzo e diffusione anche parziale

RISULTATI

Analisi univariata dei metaboliti principali

Model: y^C=Ax+B

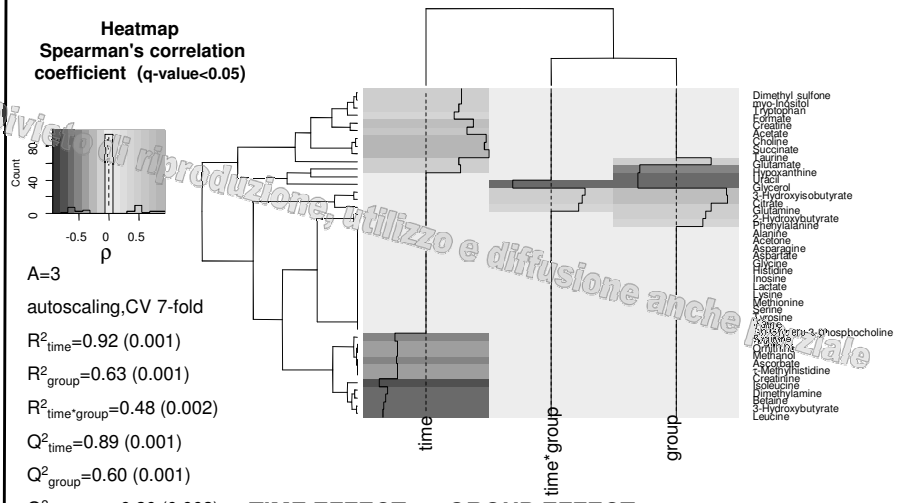
ID	R2	p-value A	C	SDEC	SDECV	SDEP
Taurine	0.84	4.2E-15	1.668	156	163	121
Choline	0.79	8.4E-14	1.182	174	181	276
Succinate	0.73	1.5E-11	1.128	197	203	219
Isoleucine	0.55	1.2E-07	1.000	256	264	357
Leucine	0.48	1.4E-06	1.000	274	278	323
Betaine	0.42	7.5E-06	0.804	290	297	324
Creatine	0.41	1.2E-05	1.590	297	301	379
Acetate	0.39	1.7E-05	1.260	298	307	265
X3.Hydroxybutyrate	0.37	4.6E-05	1.026	301	306	335
Arginine	0.33	1.6E-04	1.000	311	314	385
Dimethylamine	0.33	1.4E-04	0.804	312	326	387
Dimethyl_sulfone	0.31	1.7E-04	1.242	317	323	318
myo.Inositol	0.30	4.4E-04	0.966	319	329	442
Glutamate	0.25	1.3E-03	1.002	328	337	443

Divieto di riproduzione, utilizzo e diffusione anche parziale

RISULTATI

GROUP EFFECT → OCCHIO APERTO o CHIUSO

Heatmap
Spearman's correlation coefficient (q-value<0.05)



A=3

autoscaling,CV 7-fold

R^2_{time}=0.92 (0.001)

R^2_{group}=0.63 (0.001)

$R^2_{time*group}$=0.48 (0.002)

Q^2_{time}=0.89 (0.001)

Q^2_{group}=0.60 (0.001)

$Q^2_{time*group}$=0.20 (0.003)

TIME EFFECT >> GROUP EFFECT

Divieto di riproduzione, utilizzo e diffusione anche parziale

CONCLUSIONI

Costruzione di un modello predittivo

Validazione mediante esperimento indipendente

Potenziale strumento diagnostico

Divieto di riproduzione, utilizzo e diffusione anche parziale

PROSPETTIVE

Ampliare il range temporale analizzato

Utilizzare altri biofluidi e tessuti oculari

Traslare i risultati al modello umano

Università di Cagliari

Dipartimento di Scienze Mediche e Sanità Pubblica

Specializzandi Medicina Legale
Dott. Matteo Nioi

Prof. Ernesto d'Aloja

Università di Padova

Dipartimento di Salute della Donna e del bambino

Dott. Matteo Stocchero

Divieto di riproduzione, utilizzo e diffusione anche parziale

43° CONGRESSO NAZIONALE SIMLA
Verona, 18-20 Settembre 2018

43° CONGRESSO NAZIONALE SIMLA
Verona, 18-20 Settembre 2018