



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ –ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ,
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη Μεταλλάξεων Μιτοχονδριακών Γονιδίων σε ασθενείς με
Διαβήτη**

ΣΑΡΙΔΑΚΗ ΑΡΤΕΜΙΣ

ΛΑΡΙΣΑ (ΙΟΥΝΙΟΣ 2012)

**Μελέτη Μεταλλάξεων Μιτοχονδριακών Γονιδίων σε
ασθενείς με Διαβήτη**

**Identification of mitochondrial mutations in patients with
Diabetes**

Τριμελής Επιτροπή

Ζίφα Αιμιλία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας (Νευροβιολογίας),
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

Λεωνίδας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Ζίφα Αιμιλία για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα θέμα ιδιαίτερα ενδιαφέρον και για την άψογη συνεργασία και κατανόηση εκ μέρους της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον κ. Μαμούρη Ζήση και τον κ. Λεωνίδα Δημήτριο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Θέμη Γιαννούλη και τον κ. Σταμάτη Κώστα για τη σημαντική καθοδήγησή τους στην εκμάθηση όλων των καινούργιων τεχνικών που έπρεπε να εφαρμόσω στο εργαστήριο ώστε να πραγματοποιηθεί το πειραματικό μέρος της εργασίας.

Ευχαριστώ τη Βάσω Θεωδοροπούλου η οποία με βοήθησε στην εφαρμογή των νέων τεχνικών που έπρεπε να πραγματοποιηθούν στο εργαστήριο και για την ηθική της υποστήριξη.

Ευχαριστώ την Κική Καρακασίδου για την καθοδήγησή της ώστε να ολοκληρωθεί η διπλωματική μου καθώς και για την ηθική της υποστήριξη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια μου για την ηθική, οικονομική και ψυχολογική υποστήριξη τους ώστε να μπορέσω να ολοκληρώσω το μεταπτυχιακό μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κατάλογος εικόνων.....	σελ 6
Κατάλογος πινάκων.....	σελ 7
Περίληψη.....	σελ8
Abstract.....	σελ9
1.Εισαγωγή	
1.1 Δομή των μιτοχονδρίων.....	σελ10
1.2 Γενετική των μιτοχονδρίων.....	σελ 11
1.3 Χαρακτηριστικά γνωρίσματα του μιτοχονδριακού DNA.....	σελ 13
1.4.Μιτοχονδριακα tRNAs.....	σελ 15
1.5. Μεταλλάξεις Μιτοχονδριακού Γονιδιώματος.....	σελ 17
1.5.1_Ελλείψεις mtDNA.....	σελ18
1.5.2_Σημειακές Μεταλλάξεις του mtDNA.....	σελ 18
1.5.3.Μεταλλάξεις Πυρηνικών Γονιδίων.....	σελ 20
1.6.ΔΙΑΒΗΤΗΣ: Μια συχνή ασθένεια ή επιδημία;.....	σελ 21
1.7.Διαβήτης.....	σελ 23
1.8.Ινσουλίνη.....	σελ 23
1.9.Γαξινόμηση του διαβήτη.....	σελ 25
1.10.Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1.....	σελ 25
1.11.Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2.....	σελ 27
1.12.Επιπλοκές.....	σελ 29
1.13.Διαβήτης της κύησης.....	σελ 30
1.14.Διάγνωση.....	σελ 31
1.15.Δοκιμασία ανοχής γλυκόζης.....	σελ 31
1.16.Θεραπεία.....	σελ 32
1.17.Διαβήτης και μιτοχονδριακή λειτουργία.....	σελ 32
1.18.Ελεύθερες ρίζες (ROS) και διαβήτης.....	σελ 35
1.19.Μιτοχονδριακος διαβήτης.....	σελ 36
1.20.Σκοπός της εργασίας.....	σελ 37
2.Υλικά και Μέθοδοι	
2.1Απομόνωση ολικού DNA.....	σελ 38
2.2.PCR.....	σελ 39

2.3.Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%.....σελ	41
2.3.1.Παρασκευή πηκτής αγαρόζης.....σελ	42
2.3.2.Ηλεκτροφόρηση.....σελ	42
2.4.SSCP-Μέθοδος Ανάλυσης Πολυμορφισμού μονοκλωνικής διαμόρφωσης..σελ	42
2.4.1Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδίου.....σελ	42
2.4.2.Αποδιάταξη και φόρτωμα των δειγμάτων.....σελ	43
2.4.3.Χρώση των gel.....σελ	44
2.5.Καθαρισμός των προϊόντων PCR.....σελ	45
2.6.Αλληλούχηση και ανάλυση των αλληλουχιών με προγράμματα βιοπληροφορικής.....σελ	45
3.Αποτελέσματα	
3.1 Ενίσχυση με PCR του τμήματος IGM του mtDNA.....σελ	46
3.2 Ανάλυση δειγμάτων με SSCP.....σελ	47
3.3 Ταυτοποίηση μεταλλάξεων.....σελ	50
3.4 Μετάλλαξη T4480A.....σελ	51
3.5 Μετάλλαξη 4249insC.....σελ	52
3.6 Μετάλλαξη 4249delC.....σελ	52
3.7 Μετάλλαξη C4250T.....σελ	53
3.8 Μετάλλαξη T4336C.....σελ	54
4. Συζήτηση.....σελ	55
Βιβλιογραφία.....σελ	58

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Η δομή του μιτοχονδρίου

Εικόνα 2: Χάρτης ανθρώπινου μιτοχονδριακού γονιδιώματος.

Εικόνα 3: Η διάταξη σε σχήμα τριφυλλιού του tRNA

Εικόνα 5: Παγκόσμιες προβλέψεις για την επιδημία του διαβήτη στα έτη 2003-1025

Εικόνα 6: Η επίδραση της υπεργλυκαιμίας στη λειτουργία των μιτοχονδρίων

Εικόνα 7: Μηχανισμός παραγωγής οξειδωτικής φωσφορυλίωσης

Εικόνα 8: Το τμήμα του mtDNA που ενισχύεται από το ζεύγος εκκινητών FwIGM και RevIGM

Εικόνα 9 : Πήκτωμα όπου απεικονίζεται στο 1^ο πηγάδι το Negative control, είναι καθαρό και επιβεβαιώνει πως δεν υπήρξε επιμόλυνση. Στα πηγάδια 2 ως 6 απεικονίζονται τα ενισχυμένα μιτοχονδριακά τμήματα DNA των δειγμάτων 6, 9, 51, 60, 101 τα οποία προέρχονται από ασθενείς με διαβήτη.

Εικόνα 10α-στ: Στα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου απεικονίζονται με άσπρο βελάκια τα πρότυπα των δειγμάτων τα οποία μελετήθηκαν περαιτέρω και αλληλουχήθηκαν και σημειώνονται οι μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν

Εικόνα 11: Απεικονίζει τη θέση 4480 όπου εμφανίζεται η μετάλλαξη T4480A στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα

Εικόνα 12: Απεικονίζει τη θέση 4249 όπου εμφανίζεται η μετάλλαξη 4249insC στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα.

Εικόνα 13: Απεικονίζει τη θέση 4249 όπου εμφανίζεται η μετάλλαξη 4249delC στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα

Εικόνα 14: Απεικονίζει τη θέση 4250 όπου εμφανίζεται η μετάλλαξη C4250T στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα

Εικόνα 15: Απεικόνιση θέσης μεταλλάξεων στο γονίδιο ND1.

Εικόνα 16: Απεικονίζει τη θέση 4336 όπου εμφανίζεται η μετάλλαξη T4336C στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα

Εικόνα 17: Η μετάλλαξη T4336C στο βραχίονα-υποδοχέα του tRNA^{Gln}

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Ο μιτοχονδριακός γενετικός κώδικας του ανθρώπου

Πίνακας 2: Η συσχέτιση των κυριότερων μιτοχονδριακών μεταλλάξεων και ασθενειών

Πίνακας 3: Ταξινόμηση των τύπων του διαβήτη

Πίνακας 4: Κίνδυνος εμφάνισης διάφορων παθολογικών καταστάσεων στους διαβητικούς σε σχέση με το γενικό πληθυσμό

Πίνακας 5: Τα χαρακτηριστικά των εκκινήτων

Πίνακας 6: Τα συστατικά της αντίδρασης PCR.

Πίνακας 7: Τα στάδια της PCR

Πίνακας 8: Ποσότητες των αντιδραστηρίων για την παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδίου 10%.

Πίνακας 9: Συγκεντρωτικός πίνακας με τις μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στους 102 ασθενείς με διαβήτη που μελετήθηκαν.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια νόσος με μεγάλο επιπολασμό στον πληθυσμό, η οποία έχει μελετηθεί τόσο σε μοριακό όσο και σε γενετικό επίπεδο. Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία ευθύνεται για την εμφάνιση ασθενειών, γι' αυτό το ερευνητικό ενδιαφέρον επικεντρώνεται στη μελέτη του μιτοχονδριακού γονιδιώματος με σκοπό την πρόγνωση, διάγνωση και θεραπεία αυτών των ασθενειών.

Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε ανίχνευση των μεταλλάξεων σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη. Για την πραγματοποίηση της έρευνας χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος από 102 ασθενείς με διαβήτη από τα οποία απομονώθηκε μιτοχονδριακό DNA, ενώ έγινε και σύγκριση με 20 δείγματα αίματος υγιών ατόμων. Η ταυτοποίηση των μεταλλάξεων πραγματοποιήθηκε με μοριακές τεχνικές. Με κατάλληλους εκκινητές ενισχύθηκε το τμήμα που κωδικοποιεί τα γονίδια tRNA^{Ile}, tRNA^{Gln} και tRNA^{Met} καθώς και τμήματα των παρακείμενων γονιδίων των ND1 και ND2 υπομονάδων του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας. Στη συνέχεια, τα δείγματα αναλύθηκαν με SSCP για την κατάταξη τους σε πρότυπα ανάλογα με την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα. Τα δείγματα που παρουσίασαν διαφορετικό πρότυπο στην ανάλυση SSCP αλληλουχήθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 5 μεταλλάξεις. Οι ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη εμφάνισαν τις εξής μεταλλάξεις: T4480A στο γονίδιο ND2 (σε συχνότητα 1/102), C4250T στο γονίδιο ND1 (1/102), 4249insC στο γονίδιο ND1 (2/102), και 4249delC στο γονίδιο ND1 (1/102). Επίσης, ανιχνεύθηκε και η μετάλλαξη T4336C σε υγιή άτομα, στο γονίδιο tRNA^{Gln} (σε συχνότητα 1/20).

Οι προαναφερθείσες μεταλλάξεις δεν έχουν αναφερθεί ξανά στη βιβλιογραφία και δεν εμφανίστηκαν σε κανένα από τα υγιή άτομα. Για να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα για το ρόλο των γονιδίων του mtDNA στην εμφάνιση και κληρονομικότητα της νόσου του διαβήτη πρέπει να ολοκληρωθεί η έρευνα σε όλα τα tRNA γονίδια στους ασθενείς και να γίνει σύγκριση με μεγάλη ομάδα του φυσιολογικού πληθυσμού. Τέλος, είναι απαραίτητο να προσδιοριστεί η ακριβής επίδραση των μεταλλάξεων που έχουν βρεθεί, στη λειτουργία των μιτοχονδρίων.

ABSTRACT

Diabetes is a disease with high prevalence in population, which has been studied in molecular and genetic level. The mitochondrial dysfunction causes diseases so the researchers focus their interest on the study of mitochondrial genome in order to predict, diagnose and treat these diseases.

In this study, we tried to detect mutations in patients with diabetes mellitus. We used blood samples from 102 patients and 20 healthy individuals. The identification of mutations was carried out using molecular methods. MtDNA was isolated from blood samples. We used suitable primers that target the tRNA^{Ile}, tRNA^{Gln} and tRNA^{Met} genes and part of ND1 and ND2 genes. Then, the samples analyzed by SSCP. The samples that showed a different mobility's pattern on SSCP analysis were sequenced and 5 mutations were identified. Patients with diabetes showed the following mutations: T4480A in ND2 gene (frequency: 1/102), C4250T in ND1 gene (1/102), 4249insC in ND1 gene (2/102), και 4249delC in ND1 gene (1/102). The mutation T4336C in tRNA^{Gln} gene was detected in healthy individuals (frequency: 1/20).

The above mutations have not been mentioned in literature and healthy individuals don't appear these mutations. In order to safely conclude about the role of mtDNA genes in the onset and inheritance of diabetes, we have to complete the research on all tRNA genes in the patients and compare the results with a big sample of controls. Finally, it is necessary to determine the exact effect of the mutations that have been found on the function of mitochondria.

1. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

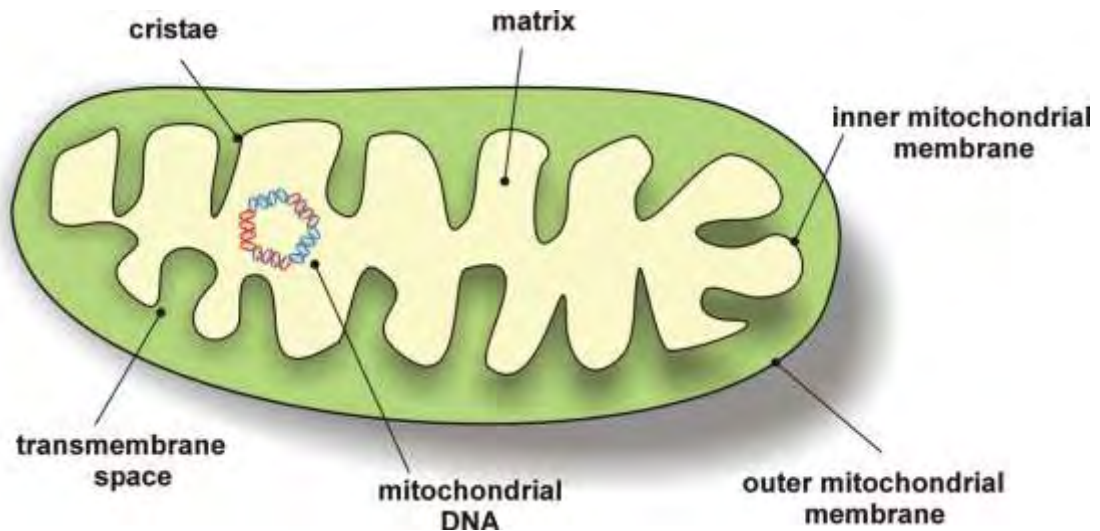
Τα μιτοχόνδρια είναι κυτταρικά οργανίδια, τα οποία συμβάλλουν στην καλή λειτουργία των κυττάρων και στη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου (Kuznetsov & Margreiter, 2009). Ο κύριος ρόλος τους είναι η παραγωγή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), μέσω μεταβολικών διαδικασιών στις οποίες συμπεριλαμβάνονται ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού ή κιτρικού οξέος (TCA) και η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) παράγεται, κυρίως, μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) (van der Giezen and Tovar, 2005).

Τα μιτοχόνδρια συμμετέχουν στη ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης και της ομοιόστασης του ασβεστίου στο κύτταρο. Συμμετέχουν, επίσης, στη βιοσύνθεση αμινοξέων, λιπαρών οξέων, συμπαραγόντων βιταμινών και νευροδιαβιβαστών (Waldbaum & Patel, 2009). Η σύνθεση της ομάδας αίμης, μερικά στάδια της σύνθεσης στεροειδών και του κύκλου της ουρίας σχετίζονται με τη λειτουργία αυτών των δομών (Pinti *et al.*, 2010). Αποτελούν, επίσης, σημαντικούς ρυθμιστές της απόπτωσης (Newmeyer and Ferguson-Miller, 2003; Pozzan *et al.*, 2000).

Η παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια (Duchen, 2004). Οι ROS συμμετέχουν σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια. Οι περισσότερες λειτουργούν ως δευτερογενείς αγγελιοφόροι που προκαλούν διαφορετικά κυτταρικά γεγονότα, όπως έκκριση κυτταροκινών ή ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων αλλά στον αντίποδα προκαλούν βλάβες στα μιτοχόνδρια και κατ' επέκταση σε όλο το κύτταρο (Edeas *et al.*, 2010a). Η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων ευθύνεται για πολλές μεταβολικές και εκφυλιστικές ασθένειες, για τη γήρανση και ενοχοποιείται για την εμφάνιση καρκίνου.

1.1 ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ

Τα μιτοχόνδρια διαθέτουν δύο συστήματα μεμβρανών, μία εξωτερική και μία μεγάλων διαστάσεων πτυχωτή εσωτερική μεμβράνη. Δημιουργούνται δύο διαμερίσματα στο μιτοχόνδριο: ο διαμεμβρανικός χώρος μεταξύ της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης και η μήτρα, η οποία περιβάλλεται από την εσωτερική μεμβράνη (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Η δομή του μιτοχονδρίου (Labieniec-Watala *et al.*, 2012).

Η εξωτερική μεμβράνη περιέχει πορίνες, οι οποίες την καθιστούν διαπερατή σε μόρια μεγέθους μικρότερο από 5-6 kDa (Waldbaum & Patel, 2009). Ενώσεις, όπως το νερό, O₂, CO₂, και NH₃ εύκολα διαπερνούν τη μεμβράνη. Ωστόσο, απαιτείται η συμμετοχή ειδικών καναλιών και πρωτεϊνών-μεταφορέων, ώστε υδρόφιλοι μεταβολίτες και όλα τα ανόργανα ιόντα να διαπεράσουν τη μεμβράνη (Szewczyk & Wojtczak, 2002).

Η εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων περιέχει ένζυμα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Αυτό το σύμπλεγμα ενζύμων περιέχει τέσσερις οξειδοαναγωγάσες που εμπλέκονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Complexes I - IV) και στο σύμπλεγμα σύνθεσης της ATP (Complex V). Οι περισσότερες αντιδράσεις του κύκλου του κιτρικού οξέος και της οξείδωσης των λιπαρών οξέων λαμβάνουν χώρα στη μήτρα (Berg *et al.*, 2001).

1.2 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ

Κάθε ανθρώπινο κύτταρο περιέχει εκατοντάδες μιτοχόνδρια, το κάθε ένα από τα οποία περιέχει 2 - 10 μόρια μιτοχονδριακού DNA. Κάθε τέτοιο μόριο έχει μήκος 16.569 ζεύγη βάσεων, αποτελείται από δύο αλυσίδες, είναι δηλαδή δίκλωνο και μεταγράφονται και οι δύο του αλυσίδες. Η μία από αυτές είναι πλούσια σε γουανίνη και ονομάζεται βαριά (heavy, H), ενώ η άλλη είναι πλούσια σε κυτοσίνη και ονομάζεται ελαφριά (light, L) (Wallace, 1999).

Το μιτοχονδριακό DNA του ανθρώπου περιέχει 37 γονίδια τα οποία κωδικοποιούν 2 ριβοσωμικά RNAs (rRNAs), 22 tRNAs και 13 πολυπεπίδια. Τα πολυπεπίδια είναι συστατικά της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης: Οι πρωτεΐνες αυτές είναι το κυτόχρωμα b, επτά υπομονάδες της αφυδρογονάσης του NADH (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5 και 6), τρεις υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (CO I, II και III) και δύο υπομονάδες (6η και 8η) της μιτοχονδριακής συνθετάσης του ATP. (Wallace, 1999).

Το mtDNA αντιγράφεται με ημισυντηρητικό τρόπο και δεν περιορίζεται μόνο στη φάση S της μεσόφασης. Αντιγράφεται συνεχώς και ανεξάρτητα από το πυρηνικό, τόσο σε διαιρούμενα όσο και σε μη διαιρούμενα κύτταρα (Taanman *et al.*, 2003). Η πολυμεράση γ, η κινάση 2 της θυμιδίνης και η κινάση της δεοξυγουανοσίνης είναι ένζυμα υπεύθυνα για την αντιγραφή του mtDNA και κωδικοποιούνται από γονίδια του πυρήνα. Μεταγράφεται και μεταφράζεται μέσα στα μιτοχόνδρια. Το πυρηνικό γονιδίωμα κωδικοποιεί την πλειοψηφία των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, οι οποίες συντίθενται στο κυτταρόπλασμα και στη συνέχεια μεταφέρονται στα μιτοχόνδρια. Ο πυρήνας, επίσης, ελέγχει τη μεταγραφική ικανότητα του mtDNA μέσω ρυθμιστικών πρωτεϊνών, όπως ο μιτοχονδριακός μεταγραφικός παράγοντας A (TFAM-mitochondrial transcription factor A) που κωδικοποιείται από γονίδιο του πυρήνα (Larsson *et al.*, 1998). Οι 13 μιτοχονδριακές πρωτεΐνες μαζί με τις πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA σχηματίζουν τα 5 ενζυμικά συμπλέγματα που είναι απαραίτητα για την οξειδωτική φωσφορυλίωση και την παραγωγή ενέργειας με τη μορφή ATP.

Τα μιτοχόνδρια έχουν εξελίξει ένα περίπλοκο σύστημα για την εισαγωγή των πρωτεϊνών οι οποίες κωδικοποιούνται από τα γονίδια του πυρήνα. Οι πρωτεΐνες μπορεί να διαθέτουν μία N-τελική αλληλουχία αμινοξέων η οποία στοχεύει στους υποδοχείς της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων. Ακολουθεί αναδίπλωση και εισαγωγή των πρωτεϊνών στο κατάλληλο διαμέρισμα του μιτοχονδρίου, πριν την αποκοπή της αλληλουχίας. Η ταυτοποίηση της συγκεκριμένης αλληλουχίας είναι σημαντικός δείκτης του μιτοχονδριακού εντοπισμού και χρήσιμη στον καθορισμό της συνεισφοράς και λειτουργίας των πρωτεϊνών (Ezquerua *et al.*, 2005).

Η δομή του mtDNA είναι πολύ συμπαγής καθώς περιοχές, όπως ιντρόνια, ψευδογονίδια καθώς και επαναλαμβανόμενο DNA συνήθως απουσιάζουν. Ωστόσο, υπάρχει μια μη κωδικοποιούσα περιοχή, ο βρόχος D (D-loop), που περιέχει ακολουθίες απαραίτητες για την έναρξη της αντιγραφής και της μεταγραφής. Η

περιοχή του βρόχου D είναι μία περιοχή 1.1 kb, η οποία σχηματίζεται με εκτόπιση των δύο αλυσίδων από μία τρίτη αλυσίδα DNA (Shadel and Clayton, 1997).

1.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΓΝΩΡΙΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA

Το μιτοχονδριακό DNA έχει μοναδικά χαρακτηριστικά που το διακρίνουν από το πυρηνικό γονιδίωμα:

- Μεταβιβάζεται μόνο μέσω της μητρικής γενεαλογικής σειράς. Οι περισσότεροι ερευνητές θεωρούν ότι το πατρικό mtDNA δεν εισέρχεται με το σπέρμα στο γονιμοποιημένο ωάριο κατά τη σύλληψη, γι' αυτό το έμβρυο αποκτά μόνο μητρικό. Ωστόσο, μια έρευνα πατρικής κληρονομής που μελετούσε μια μετάλλαξη ενός μιτοχονδριακού γονιδίου η οποία οφείλεται σε έλλειψη, έδειξε ότι υπάρχουν σπάνιες εξαιρέσεις (Schwartz *et al.*, 2002). Πιθανόν, η αντιγραφή του πατρικού mtDNA να καταστέλλεται. Υπάρχουν ενδείξεις για επιλεκτική στόχευση των μιτοχονδρίων του σπέρματος με σκοπό την αποικοδόμηση από τα ωάρια (Sutovsky *et al.*, 1999; 2004). Η αποτυχία ενός ωαρίου να εξαλείψει το πατρικό mtDNA θα μπορούσε να οδηγήσει στην απώλεια του εμβρύου στο στάδιο της βλαστοκύστης (St John *et al.*, 2000). Οι ερευνητές, επίσης, δεν κατάφεραν να ανιχνεύσουν πατρικό mtDNA σε ασθενείς με σποραδικές μιτοχονδριακές μυοπάθειες (Filosta *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2003). Συνεπώς, εάν συμβαίνει η μεταβίβαση μέσω του πατέρα είναι σπάνια και, πιθανόν, εξαρτάται από την παρουσία ειδικών μεταλλάξεων που επιτρέπουν στο μιτοχονδριακό DNA του σπέρματος να αποφεύγει την αποικοδόμηση και να αντιγράφεται. Σε κάθε περίπτωση, το δόγμα ότι το ανθρώπινο mtDNA κληρονομείται αποκλειστικά από τη μητέρα παραμένει μία λογική βάση για γενετική συμβουλευτική.
- Ενώ τουλάχιστον 32 διαφορετικά μόρια tRNA μεταφέρουν αμινοξέα στα ριβοσώματα ο αριθμός των μορίων tRNA έχει περιοριστεί στο ελάχιστο και μόνον 22 μόρια απαιτούνται για την πρωτεϊνσύνθεση των μιτοχονδρίων (Taylor and Turnbull, 2005).
- Κάθε άτομο περιλαμβάνει στα κύτταρά του εκατοντάδες ή και χιλιάδες αντίγραφα του ίδιου μορίου μιτοχονδριακού DNA. Ο αριθμός των αντιγράφων ποικίλλει μεταξύ των κυττάρων, ανάλογα με τις ανάγκες για ενέργεια των ιστών. Η πολυπλοειδική φύση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος δημιουργεί ένα μοναδικό

γενετικό χαρακτηριστικό στα μιτοχόνδρια, την ομοπλασμία και ετεροπλασμία. Ομοπλασμία είναι η κατάσταση κατά την οποία όλα τα αντίγραφα του μιτοχονδριακού γονιδιώματος είναι πανομοιότυπα. Στην περίπτωση της ετεροπλασμίας κύτταρα, ιστοί, ακόμα και ολόκληροι οργανισμοί, μπορεί να έχουν δύο πληθυσμούς mtDNA: φυσιολογικά (αγρίου τύπου) και μεταλλαγμένα. Η αξία αυτών των όρων είναι εμφανής όταν λάβουμε υπόψη τις μιτοχονδριακές μεταλλάξεις που οδηγούν σε ασθένειες. Μεταλλάξεις του mtDNA χωρίς βλαβερή επίδραση συνήθως είναι ομοπλασμικές, ενώ παθογόνες μεταλλάξεις συνήθως, αλλά όχι πάντα, είναι ετεροπλασμικές. Σε περίπτωση ετεροπλασμίας, είναι λογικό ότι πρέπει να υπάρχει ένας κρίσιμος ελάχιστος αριθμός μεταλλαγμένων mtDNA πριν η δυσλειτουργία στον ιστό και τα κλινικά συμπτώματα γίνουν εμφανή (Sciacco *et al.*, 1994).

- Ο γενετικός κώδικας του mtDNA του ανθρώπου διαφέρει από τον παγκόσμιο κώδικα σε αρκετά σημεία (πίνακας 1). Τα σπουδαιότερα από αυτά είναι:

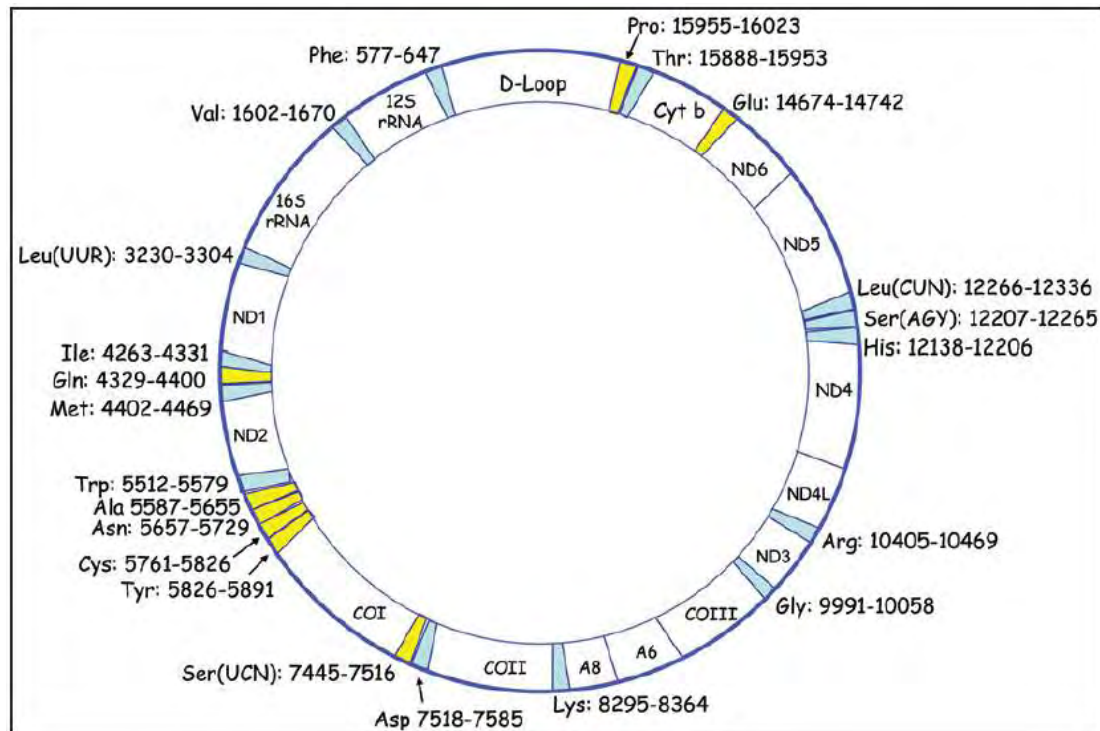
Τα κωδικόνια AUA και AUU καθώς και το κωδικόνιο AUG χρησιμοποιούνται και ως κωδικόνια έναρξης. Το AUA κωδικοποιεί τη μεθειονίνη αντί της ισολευκίνης, το AUG τη μεθειονίνη, ενώ το AUU την ισολευκίνη όπως στον παγκόσμιο γενετικό κώδικα. Το κωδικόνιο UGA κωδικοποιεί το αμινοξύ τρυπτοφάνη και δεν αποτελεί κωδικόνιο τερματισμού. Τα κωδικόνια AGA και AGG, θεωρούνταν τα τελευταία τριάντα χρόνια, κωδικόνια τερματισμού, ωστόσο αποδείχτηκε ότι στο ανθρώπινο μιτοχόνδριο τα κωδικόνια τερματισμού είναι τα UAA και UAG (Temperley *et al.*, 2010).

Πίνακας 1: Ο μιτοχονδριακός γενετικός κώδικας του ανθρώπου (Πηγή: MITOMAP WEB)

Phe F	UUU UUC	Thr T	ACU ACC ACA ACG	Asp D	GAU GAC
Leu (1) L (UUA/G)	UUA UUG	Ala A	GCU GCC GCA GCG	Glu E	GAA GAG
Leu (2) L (CUN)	CUU CUC CUA CUG	Tyr Y	UAU UAC	Cys C	UGU UGC
Ile I	AUU AUC	Ter	UAA UAG	Trp W	UGA UGG
Met M	AUA AUG	His H	CAU CAG	Arg R	CGU CGC CGA CGG
Val V	GUU GUC GUA GUG	Gln Q	CAA CAG	Ser (2) S (AGU/C)	AGU AGC
Ser (1) S (UCN)	UCU UCC UCA UCG	Asn N	AAU AAC	See note below ⁺	AGA AGG
Pro P	CCU CCC CCA CCG	Lys K	AAA AAG	Gly G	GGU GGC GGA GGG

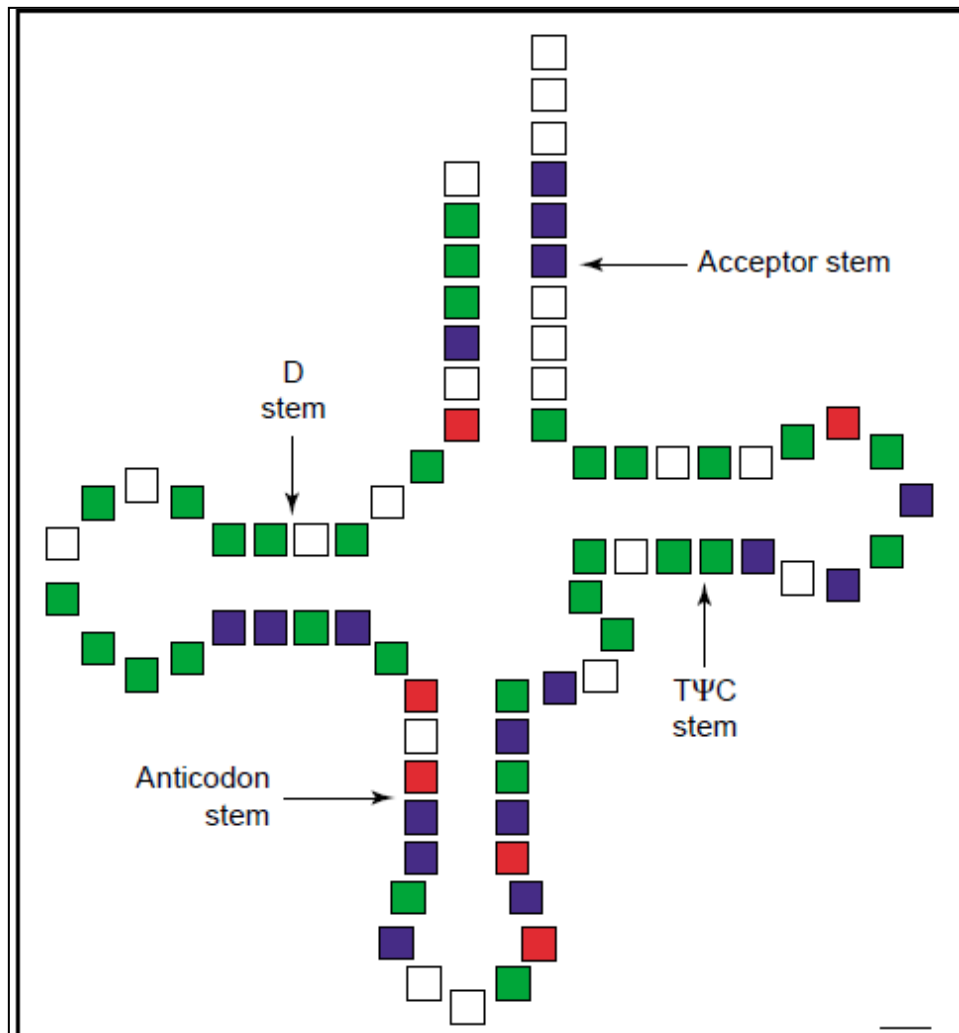
1.4 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ tRNAs

Τα tRNAs αποτελούν βασικά συστατικά της πρωτεϊνοσύνθεσης καθώς μεταφέρουν τα αμινοξέα στο ριβόσωμα, βοηθούν την πρόσδεσή τους στα κωδικόνια των mRNAs και διευκολύνουν την ενσωμάτωσή τους στα πολυπεπτίδια με υψηλή πιστότητα. Το ανθρώπινο μιτοχονδριακό γονιδίωμα περιέχει μία μικρή ομάδα tRNAs. Τα tRNAs που κωδικοποιούνται στα μιτοχόνδρια είναι τα μόνα που χρησιμοποιούνται για τη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια. Ενώ η είσοδος των tRNAs συμβαίνει σε μερικά ευκαρυωτικά μιτοχόνδρια, δεν έχει παρατηρηθεί σε ανθρώπινα κύτταρα *in vivo*. Γι αυτό το λόγο τα διαθέσιμα tRNAs στα ανθρώπινα μιτοχόνδρια υποδεικνύουν ότι τα αμινοξέα μεταφέρονται από ένα μόνο tRNA. Εξαιρέση αποτελούν η σερίνη (tRNA^{Ser(AGY)} και tRNA^{Ser(UCN)}) και η λευκίνη (tRNA^{Leu(UUR)} και tRNA^{Leu(CUN)}) που διαθέτουν δύο ισοϋποδοχείς. Για να εκτελεστεί η πρωτεϊνοσύνθεση στα μιτοχόνδρια χρειάζονται, δηλαδή, 22 tRNAs (Εικόνα 2) (Martin, 1995; Zifa *et al.*, 2007).



Εικόνα 2: Χάρτης ανθρώπινου μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Με μπλε και κίτρινο συμβολίζονται τα 22 tRNAs (Zifa *et al.*, 2007).

Η γενική δομή των tRNAs είναι καλά συντηρημένη στους περισσότερους οργανισμούς. Ωστόσο, οι δομές των tRNAs των μιτοχονδρίων των ανώτερων ευκαρυωτών αποκλίνει σημαντικά από αυτές των υπόλοιπων οργανισμών. Η δευτεροταγής δομή τους έχει σχήμα τριφυλλιού με 4 επικράτειες: το βραχίονα-υποδοχέα, το βραχίονα D, το βραχίονα TψC και το βραχίονα αντικωδικονίου (Εικόνα 3). Η δευτεροταγής δομή αναδιπλώνεται σε μία συμπαγή τριτοταγή δομή σχήματος L, όπως συμβαίνει σε όλες τις κλάσεις tRNAs (Dirheimer *et al.*, 1995). Ωστόσο, τα μιτοχονδριακά tRNAs έχουν μικρούς βραχίονες ή έλλειψη και ολόκληρων επικρατειών (Helm *et al.*, 2000).



Εικόνα 3: Η διάταξη σε σχήμα τριφυλλίου του tRNA (Wittenhagen & Kelly, 2003).

1.5 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ

Το mtDNA παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία στις μεταλλάξεις, σε αντίθεση με το πυρηνικό γονιδίωμα, καθώς αποτελείται μόνο από κωδικές αλληλουχίες και οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης είναι περιορισμένοι. Οι περισσότερες μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA είναι σημειακές. Παρατηρούνται, επίσης, μικρές ή μεγάλες ελλείψεις. Οι μεταλλάξεις είναι είτε κληρονομούμενες, είτε επίκτητες. Είναι αξιοσημείωτο ότι οι κληρονομούμενες μεταλλάξεις είναι σχεδόν πάντα σημειακές και όχι μεγάλες ανακατατάξεις όπως ελλείψεις ή διπλασιασμοί. Είναι πιθανό πως η γενεαλογική γραμμή δεν επιτρέπει μεγάλες ανακατατάξεις του μιτοχονδριακού DNA, γι' αυτό οι ελλείψεις είναι πάντα επίκτητες και ετεροπλασμικές. Οι σημειακές

μεταλλάξεις μπορεί να είναι κληρονομούμενες ή επίκτητες και να παρουσιάζουν ομοπλασμία ή ετεροπλασμία (Gellerich *et al.*, 2002).

1.5.1.ΕΛΛΕΙΨΕΙΣ mtDNA

Οι ελλείψεις του mtDNA ήταν οι πρώτες μεταλλάξεις οι οποίες περιγράφηκαν και σχετίστηκαν με ανθρώπινη ασθένεια (Holt *et al.*, 1988). Το μέγεθος της έλλειψης μπορεί να ποικίλλει από μία μόνο βάση έως αρκετές Kb και εντοπίζονται σε οποιοδήποτε τμήμα του μορίου. Η πιο κοινή έλλειψη έχει μήκος 5 Kb και εκτείνεται μεταξύ των γονιδίων που κωδικοποιούν για το κυτόχρωμα b και για την υπομονάδα II της κυτοχρωμικής οξειδάσης, δηλαδή σε περιοχή όπου απαντώνται tRNAs και γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Μεγάλης κλίμακας ελλείψεις, όπως η προαναφερθείσα, έχουν συσχετιστεί με ειδικούς φαινότυπους που αντιστοιχούν σε σύνδρομα όπως το Kearns-Sayre, το Pearson και η χρόνια προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία (CPEO). Ωστόσο, η παθολογική έκφραση των ελλείψεων δεν περιορίζεται σε αυτούς τους φαινότυπους αλλά έχει συνδεθεί με όλες σχεδόν τις μιτοχονδριακές εγκεφαλοπάθειες.

Ελλείψεις εντοπίζονται σε καταστάσεις ετεροπλασμίας, το ποσοστό των μορίων με έλλειμμα ποικίλλει ανάμεσα στους ιστούς και ο βαθμός ετεροπλασμίας μπορεί να αλλάξει με την πάροδο του χρόνου. Οι ελλείψεις προκύπτουν ως mtDNA προμετάλλαξη, πιθανόν, μέσα στο ωοκύτταρο και μεταφέρονται στο νεογνό το οποίο μπορεί να εμφανίσει κλινικά χαρακτηριστικά. Είναι εξαιρετικά ασυνήθιστο να προσβληθούν περισσότερα από ένα νεογνά και ο κίνδυνος της μετέπειτα μετάδοσης από μία προσβεβλημένη γυναίκα έχει εκτιμηθεί στο 4% (Chinnery *et al.*, 2004). Ορισμένοι ασθενείς έχουν διπλασιασμούς στο mtDNA, οι οποίοι θα μπορούσαν να αποτελέσουν ενδιάμεσο βήμα στο σχηματισμό ελλείψεων. Μικρές ελλείψεις έχουν περιγραφεί σε γονίδια όπως αυτά που κωδικοποιούν ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας (Schapira, 2006).

1.5.2.ΣΗΜΕΙΑΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΤΟΥ mtDNA

Περισσότερες από 100 μεταλλάξεις που έχουν συνδεθεί με ανθρώπινες ασθένειες έχουν περιγραφεί σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, tRNAs, rRNAs (Servidei, 2004). Από τις μεταλλάξεις που έχουν εντοπιστεί και συσχετιστεί με ασθένειες, περισσότερες από τις μισές εντοπίζονται στα γονίδια των tRNAs, γεγονός αξιοσημείωτο δεδομένου ότι οι αλληλουχίες των tRNAs αποτελούν μόνο το 10% του

μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί λόγω του ουσιαστικού ρόλου των tRNAs στη σύνθεση πρωτεϊνών οι οποίες συμμετέχουν στην παραγωγή ενέργειας. Από τα 22 tRNAs τα 21 σχετίζονται με μεταλλάξεις που προκαλούν ασθένειες. Η μόνη γνωστή εξαίρεση είναι το γονίδιο για το tRNA της αργινίνης (tRNA^{Arg}). Αξίζει να σημειωθεί ότι το 50% των παθολογικών μεταλλάξεων παρατηρείται σε 3 μόνο tRNAs : tRNA^{Leu(UUR)}, tRNA^{Lys} και tRNA^{Ile}.

Η κλινική τους έκφραση ποικίλλει και περιλαμβάνει ποικίλους φαινότυπους (Πίνακας 2) όπως τα σύνδρομα: MELAS (μιτοχονδριακή εγκεφαλομυοπάθεια, γαλακτική οξέωση και αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια), MERRF (μυοκλονική επιληψία με ερυθρές ρακώδεις ίνες), NARP (νευροπάθεια, αταξία, μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια), LHON (κληρονομική οπτική νευροπάθεια του Leber). Επίσης, ολιγοσυμπτωματικά σύνδρομα που προκύπτουν από σημειακές μεταλλάξεις του mtDNA περιλαμβάνουν το σακχαρώδη διαβήτη, καρδιομυοπάθειες, νευροαισθητήρια κώφωση. Ωστόσο, ασθενείς με ολιγοσυμπτωματικές μορφές μπορούν διαδοχικά να αναπτύξουν επιπλέον κλινικά χαρακτηριστικά, π.χ η μητρική κληρονομικότητα υπέρτασης, υπερχοληστερολαιμίας και υπερμαγνησιαμίας που προκαλείται από μετάλλαξη στο μιτοχονδριακό tRNA της ισολευκίνης (Wilson *et al.*, 2004).

Πίνακας 2: Στον πίνακα παρουσιάζεται η συσχέτιση των κυριότερων μιτοχονδριακών μεταλλάξεων και ασθενειών (Scharira, 2006).

	mtDNA mutation
CPEO	3243 tRNA ^{Leu} (UUR)
Cardiomyopathy with or without encephalopathy	4269 tRNA ^{Ile} 4317 tRNA ^{Leu} 3260 tRNA ^{Leu} (UUR) 3243 tRNA ^{Leu} (UUR)
KSS	Deletion/duplication, 3243 tRNA ^{Leu} (UUR) 8344 tRNA ^{Lys}
MELAS	3243 tRNA ^{Leu} (UUR) 11084 ND4 3271 tRNA ^{Leu} (UUR)
MERRF	8344 tRNA ^{Lys} 8356 tRNA ^{Lys}
NARP	8993 ATPase 6
Pearson's syndrome	
LHON	ND4 (11778) ND1 (3460) ND6 (14484)
Leigh's syndrome	8344 tRNA ^{Lys} 8993 ATPase 6
Diabetes mellitus and deafness	3243 tRNA ^{Leu} (UUR)

1.5.3.ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Επίσης, διάφορες ασθένειες έχει αποδειχτεί ότι οφείλονται σε μεταλλάξεις πυρηνικών γονιδίων που κωδικοποιούν μιτοχονδριακές πρωτεΐνες. Αυτές περιλαμβάνουν διαταραχές που προκαλούνται από μεταλλάξεις πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον κύκλο του κιτρικού οξέος, στη β-οξειδωση και στον κύκλο της ουρίας. Μεταλλάξεις πυρηνικών γονιδίων τα οποία συμμετέχουν στην αντιγραφή του μιτοχονδριακού DNA ή κωδικοποιούν πρωτεΐνες της αναπνευστικής αλυσίδας μπορούν να οδηγήσουν σε φαινότυπους όμοιους με τις προαναφερθείσες μεταλλάξεις του mtDNA. Άλλες προκαλούν διακριτά κλινικά συμπτώματα που πιθανόν συμπεριλαμβάνουν προοδευτικές νευροεκφυλιστικές ασθένειες. (Scharira, 2006)

Οι ασθένειες που προκαλούνται από βλάβες στο μιτοχονδριακό σύστημα μεταφοράς είναι σπάνιες, αλλά μεταλλάξεις ενός γονιδίου που συμμετέχει στη μιτοχονδριακή μεταφορά πρωτεϊνών έχει αποδειχτεί ως αιτία του συνδρόμου Mohr-Tranebjaerg με συμπτώματα νευροαισθητήριας κώφωσης, δυστονίας, δυσφαγίας, τύφλωσης και παράνοιας (Tranebjaerg *et al.*, 1995; Ezquerua *et al.*, 2005).

1.6 ΔΙΑΒΗΤΗΣ: Μια συχνή ασθένεια ή επιδημία;

Το 1993 ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) δημοσίευσε εκτιμήσεις για την επικράτηση του διαβήτη και την μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη σε ενήλικες, με βάση τα στοιχεία από 75 κοινότητες σε 32 χώρες. Οι εκτιμήσεις αυτές παρέχονται ως συγκρίσιμες πληροφορίες όσον αφορά τον επιπολασμό της παθολογικής ανοχής στη γλυκόζη από πολλούς πληθυσμούς σε όλον τον κόσμο. (King and Rewers, 1993).

Μια περαιτέρω μελέτη έχει πραγματοποιηθεί που συνδέει τα δεδομένα από την παγκόσμια βάση δεδομένων που συλλέγονται από τον Π.Ο.Υ. με τις δημογραφικές εκτιμήσεις και τις προβλέψεις που εκδίδονται από τα Ηνωμένα Έθνη για την εκτίμηση του αριθμού των ατόμων με διαβήτη σε όλες τις χώρες του κόσμου σε τρία χρονικά σημεία, δηλαδή, τα έτη 1995, 2000 και 2025. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν ότι για τον κόσμο ως σύνολο, μεταξύ των ετών 1995 και 2025, ο ενήλικος πληθυσμός θα αυξηθεί κατά 72%, ο επιπολασμός του ΣΔ σε ενήλικες θα αυξηθεί κατά 35% και ο αριθμός των ατόμων με διαβήτη θα αυξηθεί κατά 122%. Για τις αναπτυσσόμενες χώρες, θα υπάρξει 11% αύξηση στον ενήλικο πληθυσμό, 27% αύξηση του επιπολασμού του διαβήτη των ενηλίκων και 42% αύξηση του αριθμού των ατόμων με διαβήτη. Για τις αναπτυσσόμενες χώρες, θα υπάρχει μια αύξηση 82% στον ενήλικο πληθυσμό, 48% αύξηση στον επιπολασμό του διαβήτη των ενηλίκων και 170% αύξηση του αριθμού των ατόμων με διαβήτη (Εικόνα 5) (King *et al.*, 1998).

Είναι γνωστό ότι ο διαβήτης αποτελεί μία από τις πλέον δαπανηρές και με χρόνιες επιπτώσεις ασθένειες της εποχής μας και είναι μια κατάσταση που αυξάνει σε αναλογίες επιδημίας σε όλο τον κόσμο. Η επικράτηση της φυσιολογικής ανοχής γλυκόζης σε οποιοδήποτε πληθυσμό αφορά την δημόσια υγεία, δεδομένου ότι ο διαβήτης μπορεί να αυξήσει την επιβάρυνση της υγείας και της αναπηρίας. Η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης της γλυκόζης του αίματος στο διαβήτη και η συχνότητα των επιπλοκών της νόσου αποδείχθηκε σε μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες. Ακριβής μεταβολικός έλεγχος του διαβήτη δεν είναι πάντα εφικτός και ως εκ τούτου το

ζήτημα του μοριακού μηχανισμού που διέπει τις επιβλαβείς συνέπειες της υπεργλυκαιμίας στα κύτταρα και ιστούς του σώματος καθώς και οι δυνατότητες της φαρμακολογικής αναστολή τους, είναι ύψιστης σημασίας στην Διαβητολογική πράξη και αντι-θεραπεία του διαβήτη. Σήμερα, ο διαβήτης αντιμετωπίζεται όχι μόνο ως ασθένεια αλλά ως επιδημία. Ωστόσο, η επιδημιολογία του διαβήτη είναι σχετικά μικρή. Η πρώτη έρευνα για την επιδημιολογία του διαβήτη έγινε το 1978. Στη συνέχεια, στο σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα από δύο δεκαετίες, επιδημιολογικές μελέτες είχαν σημαντικό αντίκτυπο στην έρευνα, την περίθαλψη και την πρόληψη του διαβήτη. Αυτή η έκρηξη του ενδιαφέροντος και της δραστηριότητας στην επιδημιολογία του διαβήτη θα συμβάλλει στην αποτελεσματική μείωση του αριθμού των ασθενών με αυτή την νόσο (Labieniec-Watala *et al.*, 2012).



Εικόνα 5: Παγκόσμιες προβλέψεις για την επιδημία του διαβήτη στα έτη 2003-1025 (Labieniec-Watala *et al.*, 2012).

1.7 ΔΙΑΒΗΤΗΣ

Ο όρος *σακχαρώδης διαβήτης* αποδίδεται σε διάφορα μεταβολικά σύνδρομα, τα οποία χαρακτηρίζονται από αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα (υπεργλυκαιμία), που προκύπτουν από ανωμαλίες στην έκκριση ινσουλίνης, στη δράση της ινσουλίνης ή στο συνδυασμό αυτών. Τα συνήθη συμπτώματα του διαβήτη είναι υπεργλυκαιμία, γλυκοζουρία, πολυουρία, πολυδιψία, πολυφαγία, απώλεια βάρους, θολή όραση και ευαισθησία σε ορισμένες λοιμώξεις (Mealey and Ocampo, 2007).

Ο σακχαρώδης διαβήτης περιλαμβάνει, κυρίως, δύο κλινικά ξεχωριστές ασθένειες: το διαβήτη τύπου 1 και τύπου 2. Ο διαβήτης τύπου 1 αποτελεί αυτοάνοσο νόσημα και καταστρέφει τα β-κύτταρα των παγκρεατικών νησιδίων, ενώ ο διαβήτης τύπου 2 είναι μη αυτοάνοσο (Brooks-Worrell *et al.*, 2009).

Ο φαινότυπος της νόσου είναι ετερογενής και μπορεί να διαχωριστεί σε διαφορετικούς υπότυπους ανάλογα με την υποκείμενη γενετική αιτία και την παθοφυσιολογία. Τύποι διαβήτη που οφείλονται σε μονογονιδιακές μεταλλάξεις είναι σπάνιοι, έχουν μικρή διεισδυτικότητα και μικρή επιρροή από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Αντιθέτως, οι κοινοί τύποι διαβήτη- τύποι 1 και 2 έχουν σημαντικό γενετικό υπόβαθρο, αν και το πρότυπο κληρονομικότητάς τους δεν είναι σαφές. Ο φαινότυπος είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης πολλαπλών παραλλαγών γονιδίων και του περιβάλλοντος (Horenstein and Shuldiner, 2004).

1.8 ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ

Η ινσουλίνη ανακαλύφθηκε από τους Banting και Best γεγονός το οποίο αποτέλεσε ορόσημο για τη θεραπεία ασθενών με διαβήτη (Bliss, 1982).

Η ινσουλίνη παράγεται από τα β-κύτταρα των νησιδίων του Langerhans στο πάγκρεας. Το πρόδρομο μόριο της ινσουλίνης (προ-προινσουλίνη) φέρει ένα σηματοδοτικό πεπτιδίο, το οποίο κατευθύνει την πεπτιδική αλυσίδα στο εσωτερικό του ενδοπλασματικού δικτύου. Η ινσουλίνη αποτελείται από δύο αλυσίδες πεπτιδίων οι οποίες συνδέονται με δύο δισουλφιδικούς δεσμούς. Διατηρείται για σχετικά μικρό διάστημα στην κυκλοφορία και διασπάται μετά από περίπου 10 λεπτά, κυρίως, στο ήπαρ και στους νεφρούς. Αυτή η γρήγορη αλλαγή σηματοδοτεί τη γρήγορη μείωση

των επιπέδων της ινσουλίνης όταν σταματήσει η έκκρισή της από τα β-κύτταρα (Koolman and Rohm, 2003).

Ο κύριος ρόλος της ινσουλίνης είναι η ρύθμιση της κυτταρικής απορρόφησης και της χρήσης γλυκόζης και αποτελεί καθοριστικό παράγοντα της συγκέντρωσης της γλυκόζης του πλάσματος. Τα φυσιολογικά επίπεδα της γλυκόζης διατηρούνται περίπου στα 5 mmol/L σε συνθήκες μειωμένης διατροφής και είναι δυνατόν παροδικά να αυξηθούν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε 8 mmol/L μετά από ένα γεύμα.

Πολλοί παράγοντες συμμετέχουν στη ρύθμιση της έκκρισης ινσουλίνης αλλά ο κυριότερος είναι η συγκέντρωση της γλυκόζης στο πλάσμα. Η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο πλάσμα, προκαλεί άμεσα, ταχεία αύξηση στην έκκριση ινσουλίνης. Η αυξημένη συγκέντρωση αμινοξέων, επίσης, προκαλεί έκκριση ινσουλίνης και, έτσι, ενισχύεται η κυτταρική πρόσληψη και η χρήση για τη σύνθεση των πρωτεϊνών. Η σωματοστατίνη, η οποία εκκρίνεται από τα κύτταρα δ (κύτταρα των νησίδων Langerhans του παγκρέατος), αναστέλλει την απελευθέρωση ινσουλίνης. Οι ορμόνες ACTH, η θυροξίνη, τα γλυκοκορτικοειδή, η αυξητική ορμόνη, η αδρεναλίνη κ.ά. επηρεάζουν την απελευθέρωση ινσουλίνης.

Η ινσουλίνη συνδέεται με τους υποδοχείς της μεμβράνης στην επιφάνεια των κυττάρων και προκαλεί σημαντικές μεταβολές στη δραστηριότητα των μεμβρανικών πρωτεϊνών-φορέων και στα ενδοκυττάρια ένζυμα. Επίσης, η ινσουλίνη είναι κύρια αναβολική ορμόνη, η οποία επηρεάζει το μεταβολισμό των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων σε μεγάλο εύρος ιστών του σώματος (McGeown, 2002).

1.9 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΔΙΑΒΗΤΗ

Πίνακας 3: Ταξινόμηση των τύπων του διαβήτη

Πρωτοπαθής σακχαρώδης διαβήτης	A) Τύπος I ή ινσουλινο-εξαρτώμενος
	B) Τύπος II ή μη ινσουλινο-εξαρτώμενος
	Γ) Διαβήτης κύησης
Δευτεροπαθής σακχαρώδης διαβήτης ο οποίος προκαλείται από άλλα νοσήματα ή γνωστές επιδράσεις	A) Παγκρεατική νόσο όπως χρόνια παγκρεατίτιδα, αιμοχρωμάτωση, ολική παγκρεατεκτομή, όγκοι παγκρέατος, βαρεία οξεία παγκρεατίτιδα
	B) Παθήσεις ενδοκρινικών αδένων (όπως σύνδρομο Cushing, μεγαλακρία, φαιοχρωμοκύτωμα, γλουκαγόνομα, πρωτοπαθής αλδοστερονισμός)
	Γ) Φαρμακευτικός – ιατρογενής ΣΔ (όπως κορτικοστεροειδή, θειαζιδικά διουρητικά, αντισυλληπτικά, β-αναστολείς συμπαθητικού, ανοσοκατασταλτικά, ιντερφερόνη, κ.ά)
Διαβήτης ως συνέπεια κακής θρέψης (τροπικών χωρών)	
Διαταραγμένη ανοχή γλυκόζης	
Σπάνιες μορφές	A) Σύνδρομο με ανωμαλία στους υποδοχείς της ινσουλίνης
	B) Συγκεκριμένα σπάνια γενετικά σύνδρομα

1.10 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ 1

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 εκδηλώνεται ως αποτέλεσμα της καταστροφής των παγκρεατικών β-κυττάρων και χαρακτηρίζεται από απόλυτη ανεπάρκεια ινσουλίνης, μια απότομη εμφάνιση συμπτωμάτων, τάση προς κέτωση και απαίτηση εξωγενούς χορήγησης ινσουλίνης για την επιβίωση του ατόμου. Η τάση προς κέτωση προκαλείται από τη συσσώρευση στο αίμα και στους ιστούς του ασθενούς του ακετοξικού οξέος, του β-οξυβουτυρικού οξέος και της ακετόνης και συνοδεύεται από απόπνοια ακετόνης (χαρακτηριστική οσμή στην αναπνοή του ασθενούς).

Στον τύπου 1 διαβήτη υπάγονται όσοι ασθενείς είναι ινσουλινοεξαρτώμενοι από την αρχή της διάγνωσης του διαβήτη ή χρειάστηκαν μόνιμη θεραπεία με ινσουλίνη ένα χρόνο αργότερα από τη διάγνωση. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η διάγνωση γίνεται σε παιδική, εφηβική ή, γενικώς, νεαρή ηλικία. Η νεαρή, όμως, ηλικία διαγνώσεως δεν είναι αποκλειστικό χαρακτηριστικό του διαβήτη τύπου 1, εφόσον εξ αρχής ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης μπορεί να εμφανισθεί σε οποιαδήποτε ηλικία, ακόμη και γεροντική. Αν τα άτομα με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 δεν ακολουθήσουν άμεσα θεραπεία εμφανίζουν κετοξέωση. Η διαβητική κετοξέωση είναι

μία μεταβολική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία, κέτωση και μεταβολική οξέωση. Κατά τη μεταβολική οξέωση η συσσώρευση του ακετοξικού οξέος και του β-οξυβουτυρικού οξέος τρέπουν το pH του αίματος προς την όξινη πλευρά, διαταράσσεται η αναπνευστική λειτουργία και εμφανίζεται η χαρακτηριστική αναπνοή.

Στοιχεία που συνηγορούν στη διάγνωση του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 στην καθημερινή πράξη είναι τα ακόλουθα:

1. Μεγάλη ένταση και μικρή σχετικά διάρκεια συμπτωμάτων
2. Γρήγορη απώλεια βάρους
3. Τάση προς κέτωση
4. Ηλικία εμφάνισης μικρότερη των 35 ετών
5. Αποτυχία δοκιμαστικής αγωγής με δίαιτα

Στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 φαίνεται ότι υφίσταται κληρονομική προδιάθεση για ανάπτυξη της νόσου, ενώ συμβάλλουν και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Οι γενετικοί παράγοντες που επηρεάζουν τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου του διαβήτη έχουν μελετηθεί εκτενώς και έχουν αναφερθεί πάνω από 20 χρωμοσωμικές περιοχές με γονίδια ύποπτα για σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1. Από αυτά τα πιο καλά χαρακτηρισμένα είναι: τα HLA γονίδια (ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο) και το γονίδιο της ινσουλίνης. Τα HLA γονίδια εντοπίζονται στα βραχέα σκέλη του χρωμοσώματος 6. Εκτενείς μελέτες έχουν δείξει ότι η ειδικότητα των HLA γονιδίων που συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο για τη νόσο διαφέρει μεταξύ λαών διαφορετικών εθνικοτήτων. Τα HLA αντιγόνα είναι πολύπλοκες γλυκοπρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης που παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία λόγω πολυμορφίας των HLA γονιδίων που τα κωδικοποιούν. Μελέτες απέδειξαν τη σύνδεση του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 1 με τα αλληλόμορφα γονίδια HLA τάξης I και II (Friday *et al.*, 1999; Stephens & Eisenbarth, 2000; Pugliese, 2004).

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 εκδηλώνεται, συνήθως, απότομα με έντονα συμπτώματα και απώλεια βάρους. Αυτό το γεγονός όμως δεν αποκλείει την περίπτωση ύπαρξης ενός λανθάνοντος σταδίου κατά τη διάρκεια του οποίου δεν εκδηλώνονται συμπτώματα. Στην προκλινική αυτή περίοδο βρίσκονται στον ορό αντιησιδιακά αντισώματα (ICA). Πρόκειται για IgG αντισώματα τα οποία συγκεντρώνονται σε αρκετά αντιγόνα των νησιδιακών κυττάρων (κύτταρα α, β, δ και PP των νησιδίων Langerhans). Σε παιδιά και εφήβους με πρωτοεμφανιζόμενο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1, ανιχνεύονται στο 80% των περιπτώσεων και σε

ενήλικες στο 70-80% των περιπτώσεων. Μετά την εμφάνιση των κλινικών εκδηλώσεων ελαττώνεται η συχνότητα τους έτσι ώστε μετά από 10 χρόνια ποσοστό μικρότερο από 10% των ασθενών να εμφανίζει τα αντιησιδιακά αντισώματα τα οποία ανιχνεύονται και σε λανθάνοντα ινσουλινοεξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη ενηλίκων.

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 εκδηλώνεται με τη γνωστή συμπτωματολογία του, όταν η δυνατότητα για έκκριση ινσουλίνης έχει μειωθεί πολύ ή παρεμβάλλεται κάποια λοίμωξη που αυξάνει λόγω έκκρισης των ορμονών του stress, τις ανάγκες σε ινσουλίνη. Μετά την αρχική θεραπεία με ινσουλίνη αρκετοί διαβητικοί, ιδίως παιδιά, εμφανίζουν το φαινόμενο της «ύφεσης του σακχαρώδους διαβήτη» που διαρκεί 3-6 μήνες.

1.11 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ 2

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 είναι η πιο κοινή μεταβολική νόσος παγκοσμίως και ο επιπολασμός του υπερβαίνει πολύ αυτόν του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 1. Ανάμεσα στις διαφορετικές αιτίες που οδηγούν στο διαβήτη, ο ρόλος των μιτοχονδρίων θεωρείται σημαντικός. Δυσλειτουργίες της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, υπερπαραγωγή των ROS και λιποϋπεροξειδωσών ή βλάβες σε αντιοξειδωτικά συστήματα άμυνας χαρακτηρίζουν το σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Τα αυξημένα επίπεδα των ROS οδηγούν σε γενικευμένη οξειδωτική βλάβη των μιτοχονδρίων. Επιπλέον, είναι αποδεδειγμένο ότι η μιτοχονδριακή λειτουργία είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική έκκριση, παρουσία γλυκόζης, της ινσουλίνης από τα παγκρεατικά β κύτταρα. (Luft,1994)

Η κληρονομικότητα και η παχυσαρκία είναι δύο καθοριστικοί παράγοντες στην ανάπτυξη σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2. Επειδή ο διαβήτης μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία, δεν είναι εύκολο να καθοριστεί ο τύπος της κληρονομικότητας. Στις περισσότερες περιπτώσεις, φαίνεται ότι κληρονομείται μία μειωμένη ικανότητα έκκρισης ινσουλίνης, η οποία γίνεται με τα χρόνια μεγαλύτερη και ο διαβήτης εκδηλώνεται όταν η αντίσταση των ιστών στην ινσουλίνη δεν μπορεί να υπερνικηθεί από την εκκρινόμενη ινσουλίνη. Η ανοχή στην ινσουλίνη αυξάνεται όσο αυξάνεται η παχυσαρκία, αλλά μπορεί να υπάρχει και χωρίς τη συμβολή της. Η παχυσαρκία προδιαθέτει στην ανάπτυξη ινσουλινοαντοχής, πιθανόν, λόγω της παραγωγής από το λιπώδη ιστό ουσιών που ελαττώνουν την ευαισθησία των κυττάρων στην ινσουλίνη.

Πολλές προσπάθειες έχουν γίνει για την ολοκλήρωση της σάρωσης του γονιδιώματος για το σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Πειραματικά αποτελέσματα προτείνουν τη συμβολή των χρωμοσωμάτων 2q37, 12q, 3q και 20 στην εμφάνιση της νόσου (Hanis *et al.*, 1996; Pratley *et al.*, 1998). Το γονίδιο της καλπαΐνης 10 συνδέθηκε με την ανάπτυξη του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 και θα μπορούσε να είναι ένας νέος δείκτης, και πιθανόν ένας νέος θεραπευτικός παράγοντας. Η καλπαΐνη 10, αποδείχτηκε ότι έχει τρεις μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs), οι οποίοι σχετίζονται με το σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και, πιθανόν, λειτουργεί ως ρυθμιστική πρωτεΐνη που ρυθμίζει την αντίδραση γλυκόζης, την έκκριση ινσουλίνης ή την αλληλεπίδραση υποδοχέων. Η καλπαΐνη 10 κωδικοποιείται από το γονίδιο CAPN10, το οποίο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 2q37.3. Ανήκει σε μία συντηρημένη οικογένεια πρωτεασών που εξαρτώνται από το ασβέστιο. Οι καλπαΐνες διασπών διάφορες πρωτεΐνες: υποδοχείς, κανάλια ιόντων, συστατικά του κυτταροσκελετού, σηματοδοτικά μόρια, ογκοπρωτεΐνες. Συμμετέχουν στη νέκρωση διαφόρων τύπων κυττάρων και στη ρύθμιση της απόπτωσης αλληλεπιδρώντας με άλλες πρωτεΐνες, όπως η p53 (Arrington *et al.*, 2006). Ο προσδιορισμός τέτοιων «εγγύς φαινοτύπων» θα μπορούσε να προσφέρει θεραπείες των υποκείμενων μοριακών δυσλειτουργιών και όχι απλώς των συμπτωμάτων (Sridhar, 2000).

Η διάγνωση του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 γίνεται, συνήθως, σε ηλικία μεγαλύτερη των 40 ετών, αλλά σπανιότερα υπάρχουν και περιπτώσεις διάγνωσης σε μικρότερες ηλικίες, οι οποίες συνήθως είναι ειδικές μορφές κληρονομικού διαβήτη. Έτσι σε μικρό αριθμό ασθενών παρατηρείται επικρατής τύπος κληρονομικότητας και έναρξη σε μικρή ηλικία (Μορφές MODY). Μελέτες σε μονοζυγωτικούς διδύμους έχουν αποσαφηνίσει ότι η κληρονομικότητα στο διαβήτη τύπου 2 είναι πιο ισχυρή από ότι στον τύπο 1.

1.12 ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ

Οι επιπλοκές που προκύπτουν από την ασθένεια του σακχαρώδους διαβήτη είναι σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας και έχουν συσχετισθεί με την καταστροφή ή δυσλειτουργία διαφόρων οργάνων, όπως τα μάτια, οι νεφροί και τα νεύρα. (Turner *et al.*,1999). Η πιθανότητα ανάπτυξης επιπλοκών λόγω του σακχαρώδους διαβήτη μειώνεται όσο καλύτερα ρυθμίζονται οι τιμές του σακχάρου στο αίμα. Μια σειρά παραγόντων, όπως το κάπνισμα, τα αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης, η παχυσαρκία, η αρτηριακή υπέρταση και η καθιστική ζωή, επιταχύνουν την ανάπτυξη επιπλοκών. Οι επιπλοκές του σακχαρώδους διαβήτη διακρίνονται σε οξείες και χρόνιες.

Στις οξείες επιπλοκές υπάγονται:

Διαβητική κετοξέωση και διαβητικό κώμα: είναι μια επικίνδυνη επιπλοκή, θεωρείται επείγον περιστατικό και είναι πιο συχνή σε σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1. Στην περίπτωση που η αρχική μεταβολική οξέωση δεν αντιμετωπισθεί έγκαιρα και κατάλληλα εμφανίζεται το διαβητικό κώμα. Το επίπεδο συνείδησης δεν επηρεάζεται αρχικά, στη συνέχεια όμως μπορεί να εμφανιστούν σταδιακά πτώση του επιπέδου συνείδησης, υπνηλία, λήθαργος και τελικά κώμα. Σε σοβαρότερες περιπτώσεις παρατηρούνται υπόταση και κυκλοφορική καταπληξία (shock).

- Υπερωσμωτικό μη κετονικό κώμα: χαρακτηρίζεται από αύξηση της οσμωτικότητας του πλάσματος (>350 mOsm/L), πολύ υψηλά επίπεδα σακχάρου αίματος (>600 mg/dl) και απουσία κετοξέωσης. Εμφανίζεται συχνότερα σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2.
- Υπογλυκαιμία: αποτελεί ουσιαστικά επιπλοκή της θεραπείας του σακχαρώδους διαβήτη.

Στις χρόνιες επιπλοκές υπάγονται:

- Διαβητική μικροαγγειοπάθεια στην οποία προκαλείται προσβολή των τριχοειδών αγγείων που με τη σειρά της προκαλεί:
 - ✓ Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια: υπερπλασία των τριχοειδών στην επιφάνεια του αμφιβληστροειδή και προσβολή της ωχράς κηλίδας, που οδηγούν σε απώλεια όρασης.
 - ✓ Διαβητική νεφροπάθεια: προσβολή των νεφρών με βλάβες του σπειράματος, των αγγείων και του διάμεσου ιστού που μπορεί να οδηγήσουν σε νεφρική ανεπάρκεια.

✓ Διαβητική νευροπάθεια: νευροπάθεια του αυτόνομου νευρικού συστήματος.

Συχνά εμφανίζεται απώλεια της αισθητικότητας και στυτική δυσλειτουργία.

- Διαβητική μακροαγγειοπάθεια κατά την οποία προκύπτει εμφάνιση αρτηριοσκλήρυνσης, νωρίτερα και σοβαρότερης μορφής. Προσβολή αρτηριών μεσαίου και μεγάλου μεγέθους.
- Στεφανιαία νόσος, που μπορεί να οδηγήσει σε στηθάγχη ή οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου.
- Αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, κυρίως ισχαιμικού τύπου.
- Περιφερική αγγειακή νόσος.

Άλλες επιπλοκές είναι οι ακόλουθες:

- Ευπάθεια σε λοιμώξεις.
- Υπερλιπιδαιμίες, λιπώδης διήθηση του ήπατος
- Περιοδοντίτιδα.

Στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 τα συμπτώματα της πολουρίας και πολυδιψίας μπορεί να είναι ήπια και η διάγνωση ενδέχεται να καθυστερήσει για μήνες ή χρόνια. Έτσι εξηγείται γιατί σε μερικούς ασθενείς υπάρχουν ήδη κατά την διάγνωση χρόνιες διαβητικές επιπλοκές. Αλλά και με συμπτώματα που διαρκούν επί μήνες παρατηρείται καθυστέρηση στη διάγνωση. Οι διαβητικοί τύπου 2 δεν παθαίνουν εύκολα κετοξέωση, μπορεί να πάθουν όμως υπερωσμωτικό μη κετονικό υπεργλυκαιμικό κώμα. Ο κίνδυνος εμφάνισης ορισμένων παθολογικών προβλημάτων είναι μεγαλύτερος στους διαβητικούς σε σχέση με το γενικό πληθυσμό.

Πίνακας 4: Κίνδυνος εμφάνισης διάφορων παθολογικών καταστάσεων στους διαβητικούς σε σχέση με το γενικό πληθυσμό:

Τύφλωση	20 πλάσιος
Νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου	25 πλάσιος
Ακρωτηριασμοί κάτω άκρων	40 πλάσιος
Έμφραγμα μυοκαρδίου	3 πλάσιος
Αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο	2 πλάσιος

1.13 ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΗΣ ΚΥΗΣΕΩΣ

Πρόκειται για διαβήτη που εμφανίζεται στη διάρκεια της κύησης και είναι συνέπεια των διαβητογόνων επιδράσεων ορμονών της κύησης (αντίσταση ιστών στην

ινσουλίνη) σε άτομα που μειονεκτούν στην αντιμετώπιση διαβητογόνων επιδράσεων. Οι γυναίκες αυτές ενδεχομένως θα εμφάνιζαν σακχαρώδη διαβήτη με την αύξηση του βάρους τους ή την πρόοδο της ηλικίας. Ο διαβήτης της κύησης άλλοτε εξαφανίζεται μετά τον τοκετό, για να επανεμφανισθεί στο απώτερο μέλλον και άλλοτε παραμένει. Έχει χαρακτηριστικά διαβήτη τύπου 2. Οι γυναίκες αυτές, αν μείνουν χωρίς κατάλληλη αντιμετώπιση γεννούν υπέρβαρα νεογνά τα οποία σε μεγάλο ποσοστό αναπτύσσουν σακχαρώδη διαβήτη στην ενήλικη ζωή τους.

1.14 ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η διάγνωση του διαβήτη επιβεβαιώνεται με εξέταση του σακχάρου στο αίμα. Η εξέταση της γλυκόζης στο αίμα μπορεί να γίνει πρωί πριν από το πρόγευμα ή σε τυχαίο δείγμα ή 2 ώρες μετά από γεύμα πλούσιο σε υδατάνθρακες. Στο πλάσμα οι τιμές είναι 10-20% ψηλότερες από ότι στο ολικό φλεβικό αίμα. Όταν υπάρχουν συμπτώματα διαβήτη, η μέτρηση μιας τιμής γλυκόζης πλάσματος είναι αρκετή για να επιβεβαιώσει τη διάγνωση. Σε υπόνοια σακχαρώδους διαβήτη χωρίς συμπτωματολογία πρέπει το αποτέλεσμα να είναι σαφώς παθολογικό (>126 mg/dl) και να επιβεβαιωθεί με δεύτερη εξέταση. Αν οι τιμές της γλυκόζης είναι οριακές και υπάρχει υπόνοια σακχαρώδη διαβήτη πρέπει να προχωρήσουμε σε διενέργεια δοκιμασίας ανοχής γλυκόζης.

1.15 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΟΧΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ

Η Δοκιμασία Ανοχής Γλυκόζης (ΔΑΓ) γίνεται με χορήγηση 75 gr γλυκόζης per os και αιμοληψίες για γλυκόζη πλάσματος ανά 30 λεπτά επί δύο ώρες. Θεωρούμε ότι η ΔΑΓ είναι φυσιολογική όταν στο δείγμα πριν από τη λήψη γλυκόζης η τιμή στο πλάσμα είναι κάτω από τα 126 mg/dl, καμιά τιμή από τις αιμοληψίες 30', 60', 90' λεπτά δεν υπερβαίνει τα 200 mg/dl και το δείγμα 2 ωρών είναι κάτω από τα 140 mg/dl. Θεωρούμε την ΔΑΓ παθολογική, όταν το δείγμα των 2 ωρών είναι πάνω από τα 200 mg/dl, ενώ ένα τουλάχιστον από τα ενδιάμεσα δείγματα αίματος είναι πάνω από τα 200 mg/dl. Αν βρεθούν τιμές γλυκόζης ψηλότερες από τις ανώτερες φυσιολογικές τιμές των 2 ωρών, αλλά που δεν φθάνουν τα διαγνωστικά κριτήρια της παθολογικής καμπύλης, θεωρούμε ότι η καμπύλη δεν είναι διαγνωστική, αλλά δείχνει

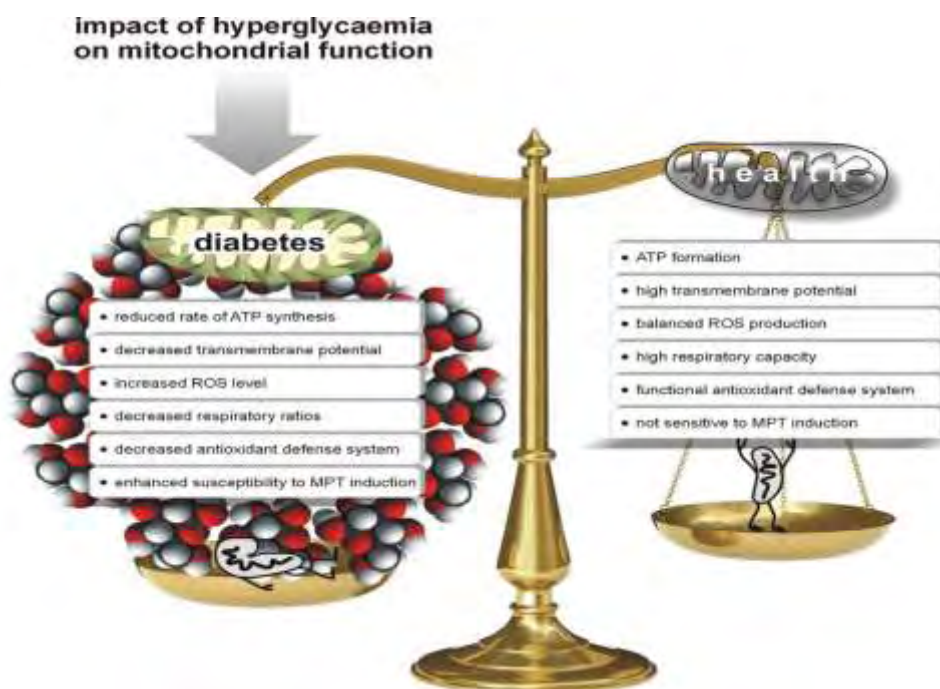
μειωμένη ανοχή γλυκόζης (Impaired glucose tolerance). Στις περιπτώσεις που η ΔΑΓ δείχνει μειωμένη ανοχή γλυκόζης και δεν είναι σαφώς παθολογική συστήνεται επανάληψη της σε έξι μήνες ή σε ένα χρόνο.

1.16 ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Πολύ σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση του διαβήτη παίζει η εκπαίδευση του διαβητικού ασθενούς όσον αφορά στη διατροφή που πρέπει να ακολουθεί, στον έλεγχο του σακχάρου από τον ίδιο και στη χορήγηση ινσουλίνης. Η στρατηγική αντιμετώπισης έχει ως στόχο αφενός το μακροχρόνιο γλυκαιμικό έλεγχο του ασθενούς κι αφετέρου την εξάλειψη των παραγόντων που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης των χρόνιων επιπλοκών του διαβήτη, δηλαδή τη διακοπή του καπνίσματος, τον έλεγχο της αρτηριακής πίεσης και των επιπέδων χοληστερόλης, την αύξηση της σωματικής άσκησης και την υιοθέτηση από τον ασθενή του υγιεινού τρόπου ζωής. Σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 1, η χορήγηση ινσουλίνης είναι απαραίτητη για την εξασφάλιση των επιθυμητών επιπέδων γλυκόζης. Αντίθετα, σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2, ο γλυκαιμικός έλεγχος είναι δυνατόν να επιτευχθεί, αρχικά, με έλεγχο του σωματικού βάρους και διαίτα ή με χορήγηση αντιδιαβητικών φαρμάκων από το στόμα. Ινσουλίνη θα χρειαστούν οι ασθενείς αυτοί σε περίπτωση αποτυχίας γλυκαιμικού ελέγχου με τα παραπάνω μέτρα.

1.17 ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Τα μιτοχόνδρια εκτελούν μια ποικιλία βιοενεργειακών λειτουργιών οι οποίες είναι υποχρεωτικές για τη ρύθμιση της ενδοκυττάριας παραγωγής ενέργειας. Η αλλοίωση των βιοενεργειακών δραστηριοτήτων ενδέχεται να έχει δραματικές συνέπειες για την κυτταρική λειτουργία, μέσω της διαταραχής του ενεργειακού φορτίου και της ισορροπίας του κυττάρου (Εικόνα 6).

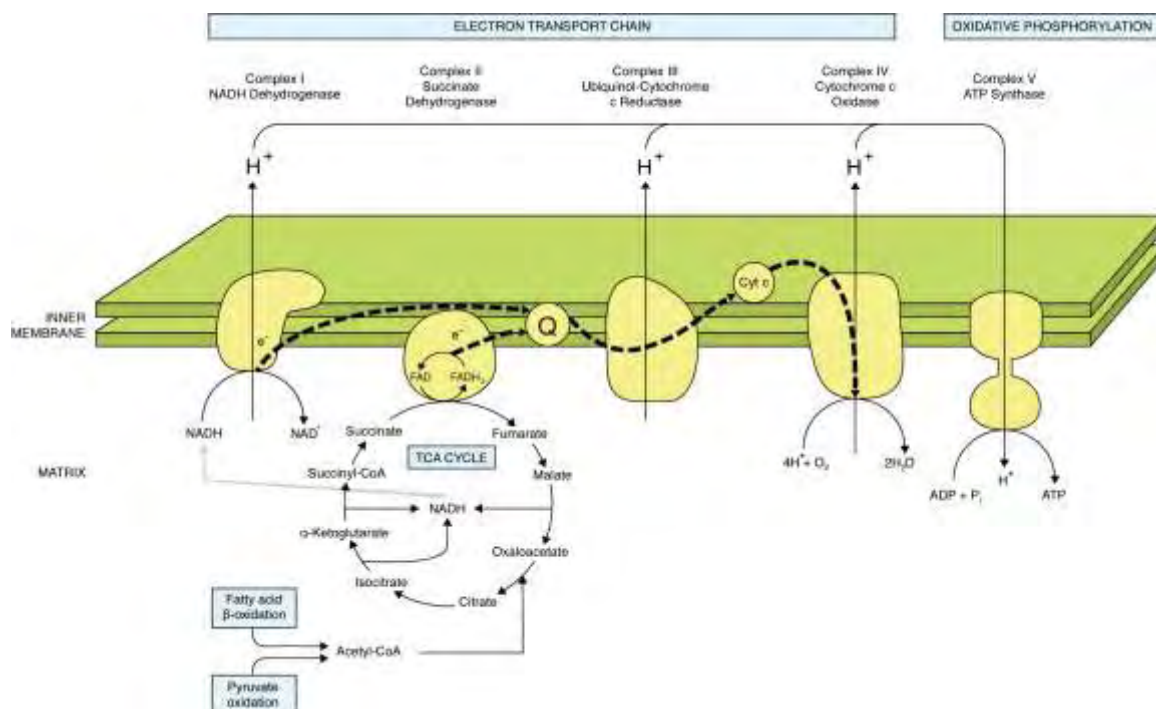


Εικόνα 6: Η επίδραση της υπεργλυκαιμίας στη λειτουργία των μιτοχονδρίων. (Labieniec-Watala *et al.*, 2012)

Αν και η δομή του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) περιγράφηκε πριν από 45 χρόνια (Clayton & Vinograd, 1967) και οι ασθένειες που οφείλονται σε βλάβες στο μονοπάτι της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης πολύ νωρίτερα (Luft *et al.*, 1962), οι παθολογικές μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού γονιδιώματος δεν είχαν περιγραφεί μέχρι το 1988 (Holt *et al.*, 1988). Το σύνδρομο MELAS, για παράδειγμα, περιγράφηκε για πρώτη φορά 28 χρόνια πριν (Paulakis *et al.*, 1984), ενώ πολλές αναφορές διασαφηνίζουν και τη σχέση μεταξύ της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας και του διαβήτη. Τα τελευταία χρόνια, έχει καταστεί σαφές ότι ανάμεσα στις μιτοχονδριακές ασθένειες περιλαμβάνεται και ο σακχαρώδης διαβήτης. Ωστόσο, ορισμένοι μηχανισμοί του ρόλου του μιτοχονδρίου σε αυτήν την παθολογία εξακολουθούν να χρειάζονται περαιτέρω διευκρίνιση.

Η πιο σημαντική λειτουργία του μιτοχονδρίου, όπως προαναφέρθηκε, είναι η παραγωγή ενέργειας στην μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), μέσω της λειτουργίας της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC) και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Ο κύριος μηχανισμός που οδηγεί στην οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι ο εξής (Εικόνα 7) : ηλεκτρόνια υψηλού δυναμικού (e^-) που προέρχονται από το NADH και $FADH_2$ (Duchen, 2004), κινούνται κατά μήκος της αναπνευστικής αλυσίδας η οποία αποτελείται από τέσσερα πρωτεϊνικά σύμπλοκα (Complex I - IV) και δύο επιπλέον μεταφορείς ηλεκτρονίων, το συνένζυμο Q (ουβικινόνη), ένα μικρό

μόριο που κινείται ελεύθερα στο εσωτερικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης και το κυτόχρωμα c (Cyt c), που βρίσκεται στο διαμεμβρανικό χώρο και συνδέεται με την εσωτερική μεμβράνη. Μέρος της ενέργειας που απελευθερώνεται κατά τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται από την αντλία πρωτονίων η οποία μεταφέρει πρωτόνια (H^+) από τη μήτρα στο διαμεμβρανικό χώρο. Στην εσωτερική μεμβράνη σχηματίζεται ηλεκτροχημική βαθμίδωση ηλεκτρονίων. Τα πρωτόνια τείνουν να επιστρέφουν στη μήτρα του μιτοχονδρίου ώστε να αποκατασταθεί η ισορροπία στη συγκέντρωση των ηλεκτρονίων και στις πλευρές της μεμβράνης. Η επιστροφή επιτυγχάνεται μέσω διαμεμβρανικού πρωτεϊνικού συμπλόκου - ATP συνθεάση - και η ενέργεια που παράγεται χρησιμοποιείται για την σύνθεση ATP από ADP και ανόργανου φωσφόρου (P_i).



Εικόνα 7: Μηχανισμός παραγωγής οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Labiencic-Watala *et al.*, 2012).

Στην περίπτωση του διαβήτη παρατηρείται αύξηση των δοτών ηλεκτρονίων ($NADH$ και $FADH_2$), που επάγεται από την υπεργλυκαιμία, με αποτέλεσμα την αύξηση της ροής ηλεκτρονίων μέσα από τη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η αναλογία ATP/ADP αυξάνεται και παρατηρείται υπερπόλωση της μεμβράνης των μιτοχονδρίων (διαφορά ηλεκτροχημικού δυναμικού). Αυτή η υψηλή διαφορά ηλεκτροχημικού δυναμικού που δημιουργείται από τη βαθμίδωση πρωτονίων οδηγεί σε μερική αναστολή της μεταφοράς των ηλεκτρονίων στο

σύμπλοκο III (Complex III), με αποτέλεσμα την αυξημένη ροή ηλεκτρονίων προς το συνένζυμο Q. Αυτό με τη σειρά του, οδηγεί σε μερική αναγωγή του Οξυγόνου (O₂) για την παραγωγή ελεύθερων ριζών ανιόντος υπεροξειδίου. Επιταχύνεται η αναγωγή του συνενζύμου Q και η παραγωγή των ROS, τα οποία πιστεύεται ότι αποτελούν τη βασική πηγή για τη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων η οποία συμβάλλει καθοριστικά στην εμφάνιση μεταβολικών συνδρόμων που σχετίζονται με το διαβήτη (Labieniec-Watala *et al.*, 2012).

1.18 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ (ROS) ΚΑΙ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

Το οξειδωτικό στρες, κατάσταση η οποία χαρακτηρίζεται από συνεχή παραγωγή ελεύθερων ριζών, έχει ενοχοποιηθεί ως ένας σημαντικός παράγοντας για την έναρξη και την εξέλιξη του διαβήτη και συναφών επιπλοκών του. Μερικές από τις συνέπειες ενός οξειδωτικού περιβάλλοντος μπορεί να είναι η ανάπτυξη της αντίστασης στην ινσουλίνη, η δυσλειτουργία των β-κυττάρων, η διαταραγμένη αντοχή στη γλυκόζη και η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία η οποία μπορεί τελικά να οδηγήσει στο διαβήτη.

Τα μιτοχόνδρια είναι οι βασικοί παραγωγοί δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) στο εσωτερικό των κυττάρων. Το ποσό των ROS συμβάλλει στην απόπτωση και, ίσως, στη διαφοροποίηση των παγκρεατικών κυττάρων. Τα παγκρεατικά κύτταρα έχουν μια φτωχή ικανότητα αναγέννησης, όταν καταστρέφονται. Έτσι, σε συνθήκες αυξημένης απώλειας των κυττάρων, είτε λόγω απόπτωσης είτε λόγω αποδιαφοροποίησης θα προκύψει μια κατάσταση στην οποία παρατηρείται ανεπαρκής αντικατάσταση των χαμένων κυττάρων. Στο τέλος, αυτό θα οδηγήσει σε ανεπαρκή έκκριση ινσουλίνης για να διατηρηθεί η σωστή ομοιόσταση της γλυκόζης. Η ενισχυμένη παραγωγή των ROS μπορεί να διευκολύνει αυτή τη διαδικασία. Θεωρητικά, το ποσοστό των ROS που παράγουν τα μιτοχόνδρια εξαρτάται από διάφορους παράγοντες (Vidal-Puig *et al.*, 1994).

Η απενεργοποίηση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (ελεύθερη ρίζα) από την καταλάση (αντιοξειδωτικό ένζυμο, το οποίο μετατρέπει το υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο) θα μπορούσε να αποτελέσει ένα κρίσιμο βήμα για την απομάκρυνση των ενδοκυττάρων ROS από κύτταρα που παράγουν την ινσουλίνη. Από την άλλη πλευρά, η αναστολή της καταλάσης σε συνθήκες αντοχής στην ινσουλίνη θα μπορούσε να αποτελέσει, επίσης, μια προσαρμοστική αντίδραση για τη διατήρηση της ομοιόστασης του ενδοκυττάρου υπεροξειδίου του υδρογόνου ως ενδιάμεσο των φυσιολογικών διαδικασιών που ενεργοποιούνται από την

ινσουλίνη. Γενικά, οι σχέσεις μεταξύ των ROS και του διαβήτη φαίνεται εξαιρετικά πολύπλοκη (Bonnefont-Rousselot, 2002).

1.19 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

Στην κλινική πράξη, ο μιτοχονδριακός διαβήτης παρουσιάζεται σε μια συνήθους μορφή διαβήτη. Η φύση του διαβήτη μπορεί να είναι τύπου 1 ή τύπου 2 ανάλογα με τη σοβαρότητα της παθολογικής ανοχής στη γλυκόζη. Ο μιτοχονδριακός διαβήτης μπορεί να διακριθεί από το διαβήτη όψιμης έναρξεως των νέων (MODY-maturity onset diabetes of the young), με βάση τη μετάδοση από τη μητέρα, σε συνδυασμό με αμφίπλευρα προβλήματα ακοής στους περισσότερους φορείς (Maassen *et al.*, 2004). Τελική απόδειξη για την παρουσία του μιτοχονδριακού διαβήτη αποτελεί η γενετική ανάλυση. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, ο μιτοχονδριακός διαβήτης συνδέεται με την μετάλλαξη A3243G στο mtDNA, αν και μια σειρά άλλων μεταλλάξεων στο mtDNA έχει, επίσης, εμπλακεί. Η συσχέτιση του μιτοχονδριακού διαβήτη με την μετάλλαξη A3243G αποδεικνύεται κλινικά κατά τη μέση ηλικία των 38 χρόνων, ωστόσο, το εύρος της ηλικίας έναρξης της νόσου είναι αρκετό μεγάλο (Maassen 2002).

Ο διαβήτης, συχνά, σχετίζεται με βαρηκοΐα και αναφέρεται ως σύνδρομο μητρικής κληρονομικότητας βαρηκοΐας και διαβήτη (MIDD σύνδρομο). Όλες οι μεταλλάξεις που οδηγούν σε MIDD, έχουν βρεθεί σε περιπτώσεις ετεροπλασμίας. Ένα μεγάλο έλλειμμα/διπλασιασμός (Ballinger *et al.*, 1992) καθώς, επίσης, και ένας άλλος διπλασιασμός, έχουν βρεθεί ότι προκαλούν MIDD (Martin-Negrier *et al.*, 1998). Αυτές οι μεγάλες ανακατατάξεις είναι μοναδικές: πρώτον, κληρονομούνται από τη μητέρα, σε αντίθεση με τις περισσότερες άλλες μεγάλες ανακατατάξεις και δεύτερον, δε σχετίζονται με άλλα κλασικά σύνδρομα που προκαλούνται από ελλείμματα. Ορισμένοι ασθενείς με MIDD εμφανίζουν τη μετάλλαξη A3243G στο γονίδιο MTTL1 που κωδικοποιεί το tRNA^{Leu (UUR)}, μία μετάλλαξη που συχνά σχετίζεται με το σύνδρομο μιτοχονδριακής εγκεφαλοπάθειας (MELAS) (Reardon *et al.*, 1992; van den Ouweland *et al.*, 1992). Η μετάλλαξη A3243G μειώνει τη σταθερότητα των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα και εμποδίζει την πρόσδεση της λευκίνης στο tRNA, με αποτέλεσμα τη μειωμένη σύνθεση βασικών μιτοχονδριακών πρωτεϊνών (Maassen *et al.*, 2001).

Η μετάλλαξη A3243G συχνά προκαλεί βαρηκοΐα ή/και διαβήτη. Σχεδόν όλοι οι ασθενείς παρουσιάζουν νευροαισθητήρια βαρηκοΐα. Ο διαβήτης κατά την εμφάνισή

του είναι μη εξαρτώμενος από την ινσουλίνη αλλά με το χρόνο εξελίσσεται σε εξαρτώμενος. Πολλοί ασθενείς εμφανίζουν ρετινοπάθεια, μυοπάθεια, καρδιομυοπάθεια, εγκεφαλοπάθεια και νεφροπάθεια, παρέχοντας φαινοτυπική συνέχεια μεταξύ MIDD και MELAS (Guillausseau *et al.*, 2001).

Σε άλλες οικογένειες με MIDD, έχουν περιγραφεί η μετάλλαξη T14709G στο γονίδιο MTTE που κωδικοποιεί το tRNA^{Glu} και η μετάλλαξη A8296G στο γονίδιο MTTK που κωδικοποιεί το tRNA^{Lys} (Kameoka *et al.*, 1998).

Οι βλαβερές συνέπειες των μεταλλάξεων του μιτοχονδριακού DNA δεν περιορίζονται μόνο στη μειωμένη παραγωγή ATP. Επηρεάζουν και τις κυτταρικές λειτουργίες στις οποίες συμμετέχουν τα μιτοχόνδρια. Στα παγκρεατικά κύτταρα, η αναλογία ATP/ADP, πιθανώς, προσδιορίζει την πιθανότητα ανοίγματος του καναλιού K⁺ που εξαρτάται από το ATP και εμπλέκεται στην έκκριση ινσουλίνης. Κατά συνέπεια αλλαγές στην αναλογία ATP/ADP, ως αποτέλεσμα της δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων, επηρεάζουν την έκκριση ινσουλίνης που ελέγχεται από το κανάλι K⁺ (Maasen *et al.*, 2004). Η παραπάνω άποψη επιβεβαιώνεται μέσω πειραματικών παρατηρήσεων κατά τις οποίες: Παγκρεατικές κυτταρικές σειρές, στις οποίες το περιεχόμενο του μιτοχονδριακού DNA μειώνεται έντονα παρουσία του βρωμιούχου αιθιδίου, παρουσιάζουν μειωμένη έκκριση ινσουλίνης επαγόμενη από τη γλυκόζη, μολονότι το κλείσιμο του καναλιού K⁺ με φαρμακευτικές ουσίες εξακολουθεί να διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης (Hayakawa *et al.*, 1998 ; Tsuruzoe *et al.*, 1998).

1.20 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η ταυτοποίηση μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια σε ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη, με σκοπό να μελετήσουμε το ρόλο μεταλλάξεων mtDNA στη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων. Η ταυτοποίηση των μεταλλάξεων πραγματοποιήθηκε με μοριακές τεχνικές. Το τμήμα του μιτοχονδριακού DNA που κωδικοποιεί τα γονίδια tRNA^{Ile}, tRNA^{Gln} και tRNA^{Met} ενισχύθηκε με PCR και, κατόπιν, τα δείγματα αναλύθηκαν με SSCP για την κατάταξη τους σε πρότυπα ανάλογα με την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα. Η SSCP επιτρέπει την ταχεία και ταυτόχρονη ανίχνευση διάφορων νουκλεοτιδικών παραλλαγών.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 102 δείγματα αίματος από ασθενείς με διαβήτη. Τα δείγματα αίματος συλλέχθηκαν από το Περιφερειακό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας και αποθηκεύτηκαν στους -20°C .

2.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA

Για την απομόνωση ολικού DNA από αίμα ακολουθήθηκε το εξής πρωτόκολλο:

- Σε σωλήνες eppendorfs των 2ml, προστίθεται 0,5ml αίμα και 1ml SSC (Standard Saline Citrate) 1X. Ακολουθεί έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση στα 13000 rpm για 3 λεπτά.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται, προστίθεται 1 ml SSC 1X, ακολουθεί έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση στα 13000 rpm για 1 λεπτό
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο, προστίθεται 0,5 ml NaOAc 0,2 M, ακολουθεί έντονη ανάδευση, προστίθενται 50 μl SDS (θειικό δωδεκυλικό νάτριο) 5% και 5 μl proteinase K (20 ng/ μl). Το SDS 5% είναι ανιοντικό απορρυπαντικό που καταστρέφει όλες σχεδόν τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, προκαλεί ρήξη των πυρηνικών και των κυτταρικών μεμβρανών και διαλυματοποιεί τις πρωτεΐνες. Η πρωτεΐνάση K είναι πρωτεολυτικό ένζυμο το οποίο καταστρέφει τις DNAάσες, βοηθώντας έτσι στην απελευθέρωση του DNA. Τα δείγματα τοποθετούνται για επώαση στο φούρνο, στους 55°C , για 1 ώρα.
- Προστίθενται 0,5 ml φαινόλη και 0,5 ml χλωροφόρμιο. Η φαινόλη και το χλωροφόρμιο αποτελούν οργανικούς διαλύτες κατάλληλοι για την εκχύλιση του μείγματος και την απομάκρυνση των πρωτεϊνών και του RNA. Συγκεκριμένα, η φαινόλη καθαρίζει το DNA από τις πρωτεΐνες. Το χλωροφόρμιο απομακρύνει υπολείμματα φαινόλης. Ακολουθεί έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση στα 13000 rpm για 7 λεπτά.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα eppendorfs των 2 ml, προστίθεται 1 ml χλωροφόρμιο και ακολουθεί ήπια ανακίνηση και φυγοκέντρηση στα 13000 rpm για 10 λεπτά.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα eppendorfs των 2 ml και προστίθεται 1 ml ισοπροπανόλη. Η ισοπροπανόλη συμβάλλει στην κατακρήμνιση του DNA. Τα δείγματα τοποθετούνται στους -20°C για 15 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 13000 rpm για 10 λεπτά.

- Το υπερκείμενο απομακρύνεται, προστίθεται 1 ml παγωμένη αιθανόλη 70% για έκπλυση του ιζήματος. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 13000 rpm για 10 λεπτά.
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και τοποθετούνται τα δείγματα στο φούρνο, στους 37 °C , για ξήρανση.
- Προστίθενται 100 μl ddH₂O, ώστε να επαναδιαλυθεί το DNA που βρίσκεται υπό τη μορφή ιζήματος.
- Τα δείγματα διατηρούνται στους 4 °C για 1-2 ημέρες, έως ότου ολοκληρωθεί η επαναδιάλυση του DNA και έπειτα φυλάσσονται στους – 20 ° C.

Μετά την ολοκλήρωση της απομόνωσης του DNA, 5 μl διαλύματος DNA από κάθε δείγμα ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 2% στα 100 Volts. Εφόσον η ποσότητα και η ποιότητα του DNA είναι ικανοποιητικές, ακολουθεί ενίσχυση με τη μέθοδο της PCR (αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης).

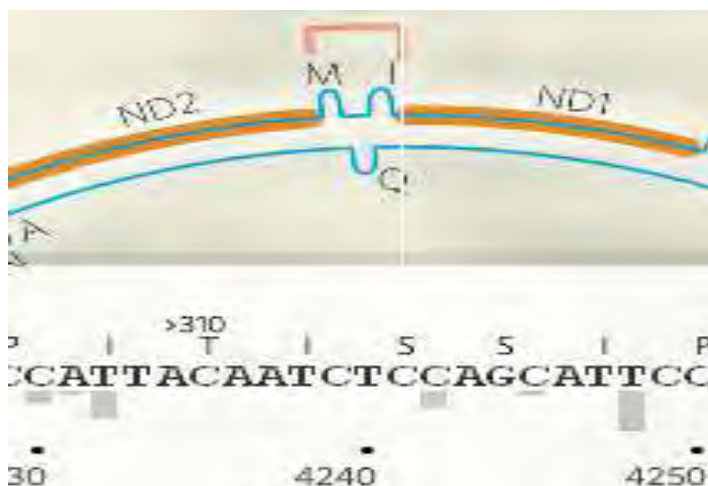
2.2.PCR

Για την ενίσχυση του DNA και συγκεκριμένα του γονιδίου IGM, που απομονώνεται από τα δείγματα αίματος ατόμων με διαβήτη, πραγματοποιείται PCR. Το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε είναι το FwIGM και RevIGM. Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 1) αναφέρονται τα χαρακτηριστικά του ζεύγους εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε:

Πίνακας 5: Τα χαρακτηριστικά των εκκινητών

	Όνομα Primer	Αλληλουχία	Μήκος (bp)
Forward primer	FwIGM	CCAGCATTCCCCCTCAAACC	20
Reverse primer	RevIGM	TGGGCCAGGGGATTAATTA	19

Το ζεύγος εκκινητών FwIGM και RevIGM ενισχύει το τμήμα των 245 bp που κωδικοποιεί τα γονίδια tRNA^{Ile}, tRNA^{Gln} και tRNA^{Met} καθώς και τμήματα των παρακείμενων γονιδίων των ND1 και ND2 υπομονάδων του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας (εικόνα 8). Ο εκκινητής FwIGM προσδένεται στη θέση 4241-4260 του mtDNA και ο RevIGM στη θέση 4486-4468.



Εικόνα 8: Στην εικόνα απεικονίζεται με την κόκκινη αγκύλη το τμήμα του mtDNA που ενισχύεται από το ζεύγος εκκινητών FwIGM και RevIGM (www.mitowheel.org).

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 50 μ l. Τα συστατικά της αντίδρασης είναι τα ακόλουθα (πίνακας 6):

Πίνακας 6: Τα συστατικά της αντίδρασης PCR.

Αντιδραστήρια	Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις	Σε τελικό όγκο V=50 μ L.
DNA			1,5
Ρυθμιστικό διάλυμα	10x	1x	5
MgCl ₂	50mM	1mM	1
dNTPs	40mM	0.8 mM	1
Fw primer	50 μ M	1 μ M	1
Rv primer	50 μ M	1 μ M	1
KAPA Taq pol	5units/ μ l	1 unit	0,2
ddH ₂ O			39

Σε όλες τις διαδικασίες ενίσχυσης περιοχής με PCR χρησιμοποιείται “Negative control” δηλαδή χωρίς το DNA-μήτρα για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη ή όχι επιμολύνσεων.

Τα στάδια της PCR που ακολουθήθηκαν είναι τα ακόλουθα (πίνακας 7):

Πίνακας 7: Τα στάδια της PCR.

Στάδια	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Αριθμός κύκλων
Initial Denaturation	95°C	4 min	
Denaturation	95°C	40 sec	35 κύκλοι
Annealing	50°C	40 sec	
Extension	72°C	40sec	
Final Extension	72°C	10min	

2.3.ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 2%

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης βασίζεται στο διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθος τους. Πραγματοποιήθηκε για να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα της απομόνωσης του DNA και της ενίσχυσης με PCR του IGM γονιδίου. Το μέγεθος των τμημάτων εκτιμάται με βάση το μάρτυρα μοριακών μεγεθών τμημάτων DNA.

2.3.1.Παρασκευή πηκτής αγαρόζης:

- Σε κωνική φιάλη προστίθενται 0.6 gr αγαρόζης και 40mL TAE 1X (για τη μικρή πηκτή) και 1.2 gr αγαρόζης και 80mL TAE 1X (για τη μεγάλη πηκτή)
- Το διάλυμα αναδεύεται και κατόπιν θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων για 2 λεπτά μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη
- Προστίθενται στο διάλυμα 4 μl και 8 μl βρωμιούχο αιθίδιο για τη μικρή και μεγάλη πηκτή αντίστοιχα, για να είναι εμφανείς οι ζώνες του DNA κατά την παρατήρηση της πηκτής σε λάμπα UV και αναδεύεται.

- Σε plate με χτενάκι για το σχηματισμό πηγαδιών μεταφέρεται το διάλυμα της αгарόζης για να πήξει. Η μεταφορά γίνεται προσεχτικά για να μη δημιουργηθούν φουσκάλες.
- Ο χρόνος πήξης είναι περίπου 20 min.
- Μόλις η πηκτή πήξει απομακρύνεται προσεχτικά το χτενάκι και μεταφέρεται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης η οποία περιέχει buffer ηλεκτροφόρησης TBE 1X. Η ποσότητα του buffer ηλεκτροφόρησης πρέπει να είναι τόση ώστε να καλύπτεται και η πηκτή.

ΠΡΟΣΟΧΗ!!! Η διαδικασία παρασκευής της πηκτής αгарόζης λαμβάνει χώρα σε απαγωγό λόγω της επικίνδυνης φύσης του βρωμιούχου αιθιδίου.

2.3.2. Ηλεκτροφόρηση:

Σε parafilm προστίθενται για κάθε δείγμα 3 μl χρωστικής (loading buffer) και 5 μl από κάθε δείγμα (είτε γενωματικό DNA είτε προϊόν PCR). Αναμιγνύονται με πιπετάρισμα και φορτώνονται στα πηγάδια. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 150 με 200 volts. Μόλις ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, η πηκτή παρατηρείται και φωτογραφίζεται σε λάμπα UV.

2.4. SSCP-Μέθοδος Ανάλυσης Πολυμορφισμού μονοκλωνικής διαμόρφωσης

Η SSCP επιτρέπει την ταχεία και ταυτόχρονη ανίχνευση διάφορων νουκλεοτιδικών παραλλαγών. Τα προϊόντα PCR που ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης και εμφάνισαν θετικό αποτέλεσμα, προετοιμάζονται κατάλληλα για ανάλυση με τη μέθοδο SSCP ως εξής:

2.4.1. Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδίου

- Για δύο gel πολυακρυλαμιδίου διαστάσεων 20 x 18 cm, πάχους 2mm, τελικού όγκου 125ml και πυκνότητας 10%, οι ποσότητες των αντιδραστηρίων αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 8):

Πίνακας 8: Ποσότητες των αντιδραστηρίων για την παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδίου 10%.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ
Ακρυλαμίδη	12,375 gr
Bis-Ακρυλαμίδη	0,33 gr
TBE 10X	10 ml
Γλυκερόλη 50%	12,5 ml
TEMED	125 μ l
APS 20%	650 μ l

- Προστίθεται ddH₂O μέχρι ο τελικός όγκος να γίνει 125 ml.
- Οι πηκτές πήζουν σε 30 min περίπου
- Στην συσκευή ηλεκτροφόρησης τοποθετούνται οι πηκτές και TBE 0,5X.

2.4.2.Αποδιάταξη και φόρτωμα των δειγμάτων

- Σε eppendorfs των 0,5 ml προστίθενται 5 μ l προϊόντος PCR και 10 μ l ρυθμιστικό διάλυμα αποδιάταξης (Denaturation Buffer)
- Σε Θερμικό Κυκλοποιητή με εφαρμογή ειδικού προγράμματος αποδιάταξης, αποδιατάσσονται πλήρως τα δίκλινα μόρια DNA. Πριν ολοκληρωθεί το τελευταίο στάδιο τα δείγματα εξέρχονται από τη συσκευή και τοποθετούνται αμέσως σε πάγο, για την αποφυγή της επαναδιάταξης των μονόκλωνων μορίων DNA.
- Έπειτα τα δείγματα φορτώνονται στις πηκτές, οι οποίες βρίσκονται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης τοποθετείται στο ψυγείο. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται για 16 – 22 h στα 220Volts.

2.4.3.Χρώση των gel

Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης, ακολουθεί η χρώση των πηκτών, η οποία περιλαμβάνει πλύσεις με τρία διαφορετικά διαλύματα (οι ποσότητες αναλογούν σε δύο πηκτές):

1^ο διάλυμα:

- Σε ογκομετρικό κύλινδρο προστίθενται 780 ml ddH₂O, 20 ml αιθανόλη 100% και 1ml οξικό οξύ.
- Ακολουθεί ανακίνηση και γίνεται η πρώτη πλύση προσθέτοντας 200 ml του διαλύματος σε κάθε gel για 3 min.
- Τα gel τοποθετούνται στον αναδευτήρα
- Μετά τα 3 min το διάλυμα απομακρύνεται.
- Προστίθενται ξανά 200 ml διαλύματος σε κάθε gel για 3 min για να γίνει μια δεύτερη πλύση και έπειτα το διάλυμα απομακρύνεται.
- Γίνονται 2 φορές πλύσεις με ddH₂O για 1 min.

2^ο διάλυμα:

- Σε ογκομετρικό κύλινδρο προστίθενται 400 ml διαλύματος νιτρικού αργύρου.
- Τα gel τοποθετούνται στον αναδευτήρα
- Σε κάθε gel προστίθενται από 200 ml διαλύματος για 20 min.
- Τα gel ξεπλένονται έπειτα 2 φορές με ddH₂O.

3^ο διάλυμα:

- Σε ποτήρι ζέσεως προστίθενται 6 gr NaOH, 0,02 gr NaBH₄, 2 ml φορμαλδεύδη και συμπληρώνεται ddH₂O μέχρι ο τελικός όγκος του διαλύματος να γίνει 400ml.
- Προστίθενται 200 ml διαλύματος σε κάθε gel.
- Τα gel τοποθετούνται στον αναδευτήρα
- Τα gel παραμένουν στο διάλυμα μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες.
- Στη συνέχεια, το διάλυμα απομακρύνεται και ακολουθεί μια πλύση με ddH₂O.

Στο τέλος της διαδικασίας τα gel πολυακρυλαμιδίου συσκευάζονται σε διαφανείς μεμβράνες και συγκρίνονται τα αποτελέσματα. Επιλέγονται τα δείγματα που εμφάνισαν διαφορετικά πρότυπα ηλεκτροφόρησης σε σχέση με τα φυσιολογικά υπό εξέταση άτομα και ακολουθεί η διαδικασία του καθαρισμού των PCR προϊόντων των επιλεγμένων δειγμάτων, ώστε να σταλούν για αλληλούχιση.

2.5.Καθαρισμός των προϊόντων PCR

Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR επιτυγχάνεται με το Purelink[™] PCR Purification Kit της Invitrogen.

2.6.Αλληλούχιση και ανάλυση των αλληλουχιών με προγράμματα βιοπληροφορικής

Τα καθαρισμένα προϊόντα της PCR αλληλουχήθηκαν από το τμήμα Ιστολογίας – Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η ανάλυση των αλληλουχιών έγινε με το εργαλείο βιοπληροφορικής BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Πρόκειται για ευρετικό αλγόριθμο για ανίχνευση ομόλογων ακολουθιών.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία, όπως προαναφέρθηκε και στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι» χρησιμοποιήθηκαν 102 δείγματα αίματος από ασθενείς με διαβήτη, τα οποία συλλέχθηκαν από το Περιφερειακό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Σκοπός της εργασίας ήταν η ταυτοποίηση μεταλλάξεων στα μιτοχondριακά tRNA γονίδια: tRNA^{Ile}, tRNA^{Gln} και tRNA^{Met} σε ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη, ενώ έγινε και σύγκριση με δείγματα αίματος υγιών ατόμων. Για την ταυτοποίηση των μεταλλάξεων απομονώθηκε mtDNA από δείγματα αίματος ασθενών και υγιών ατόμων, ενισχύθηκε με PCR με κατάλληλους εκκινητές και, κατόπιν, τα δείγματα αναλύθηκαν με SSCP για την κατάταξη τους σε πρότυπα ανάλογα με την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα. Τα δείγματα που παρουσίασαν διαφορετικό πρότυπο στην ανάλυση SSCP αλληλουχίστηκαν.

3.1 Ενίσχυση με PCR του τμήματος IGM του mtDNA

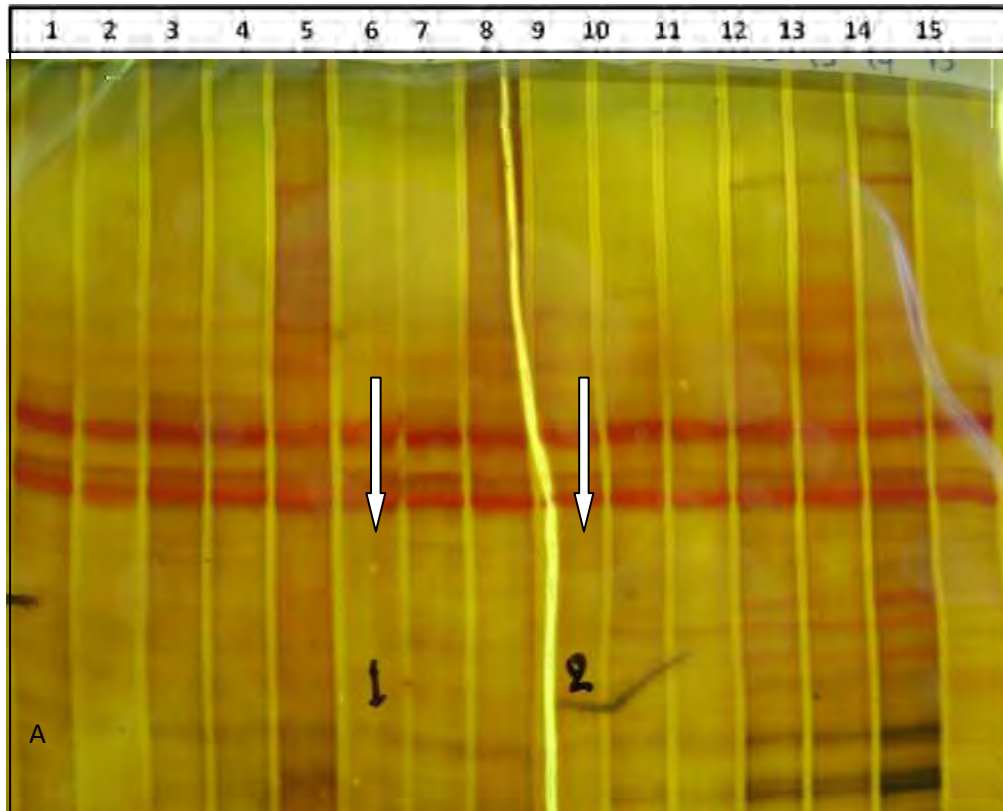
Το ζεύγος εκκινητών FwIGM και RevIGM χρησιμοποιήθηκε για να ενισχυθεί το τμήμα των 245 bp που κωδικοποιεί τα γονίδια tRNA^{Ile}, tRNA^{Gln} και tRNA^{Met} καθώς και τμήματα των παρακείμενων γονιδίων των ND1 και ND2 υπομονάδων του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας. Τα αποτελέσματα της PCR ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v (εικόνα 9), ώστε να επιβεβαιωθεί ότι το τμήμα που ενισχύθηκε είναι το επιθυμητό (245 bp).

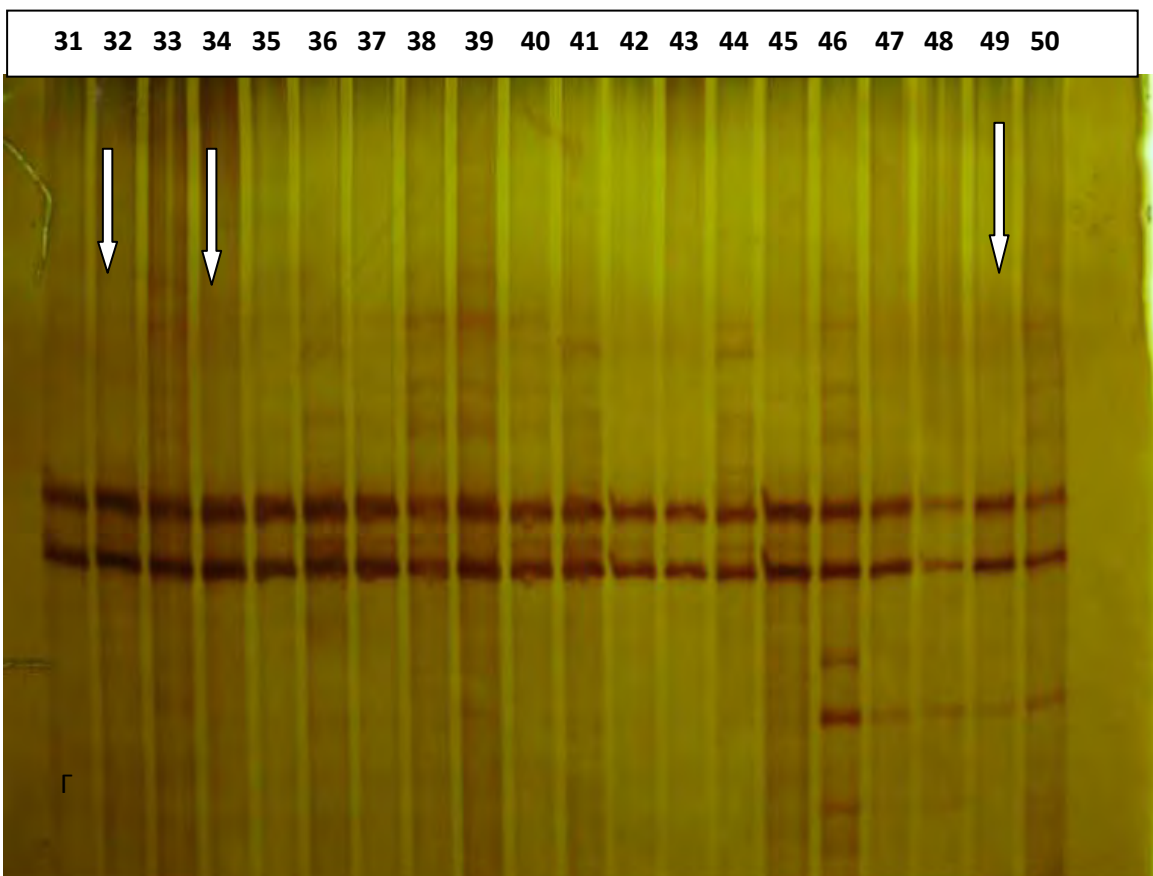
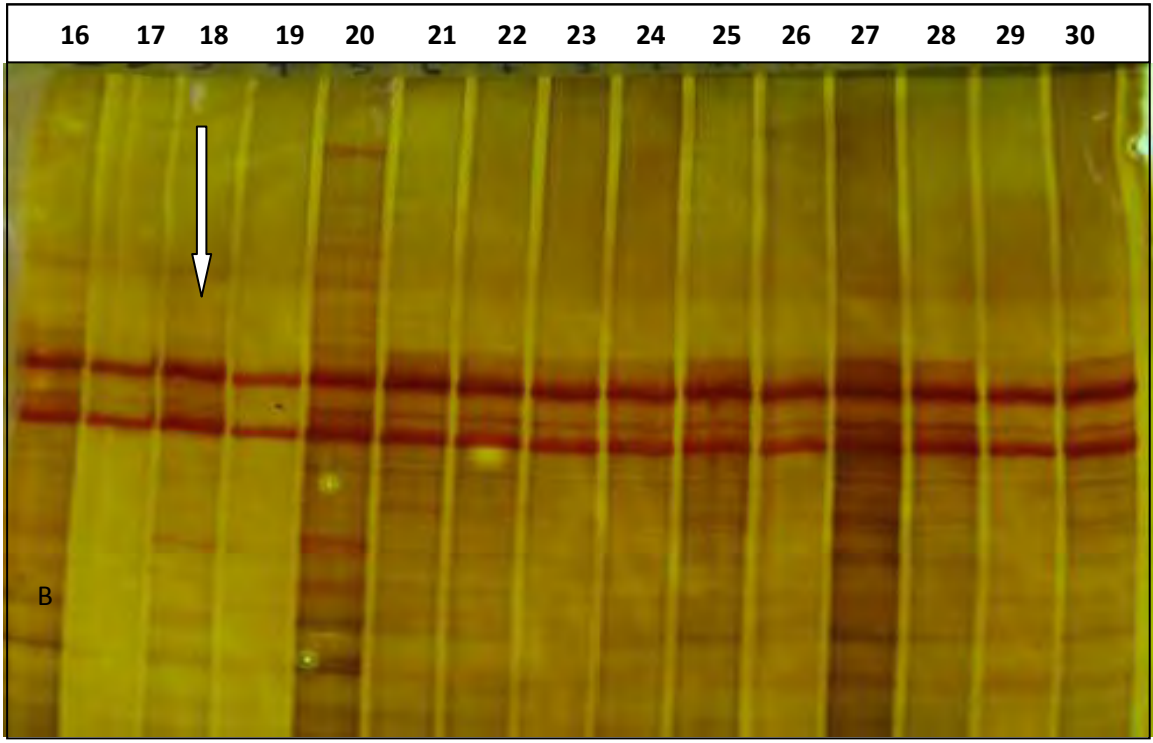


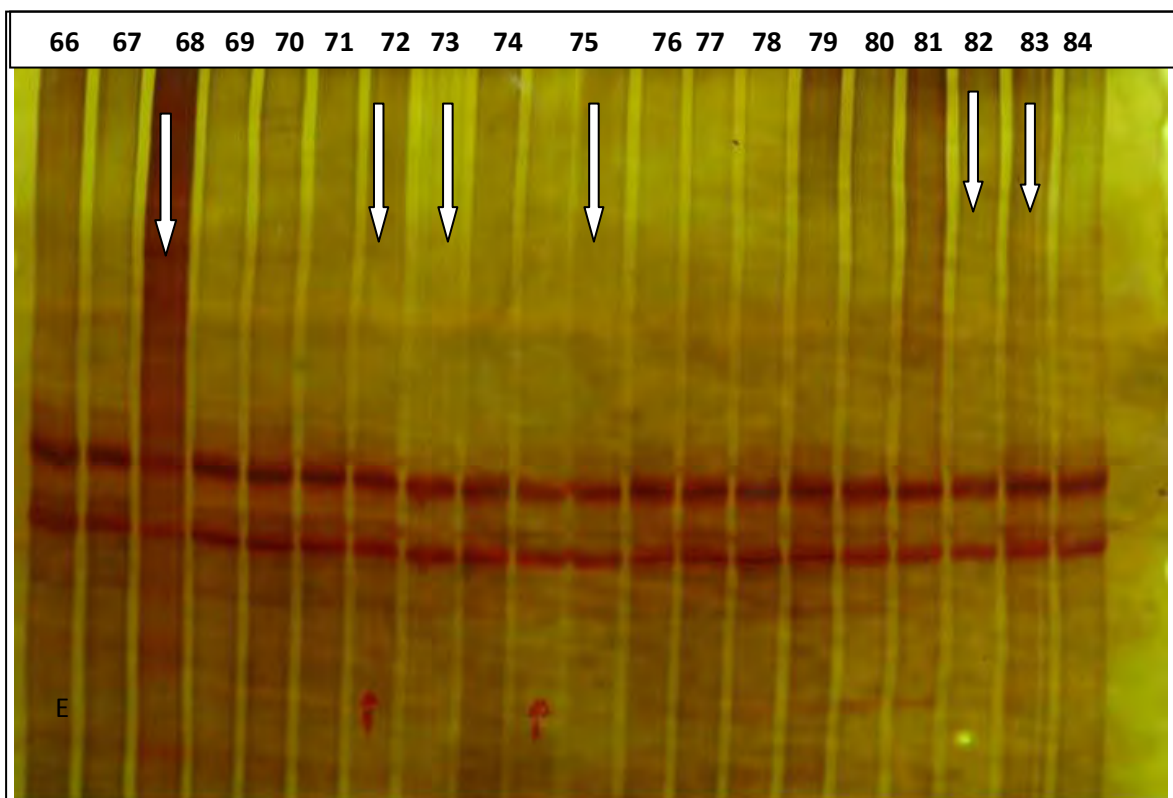
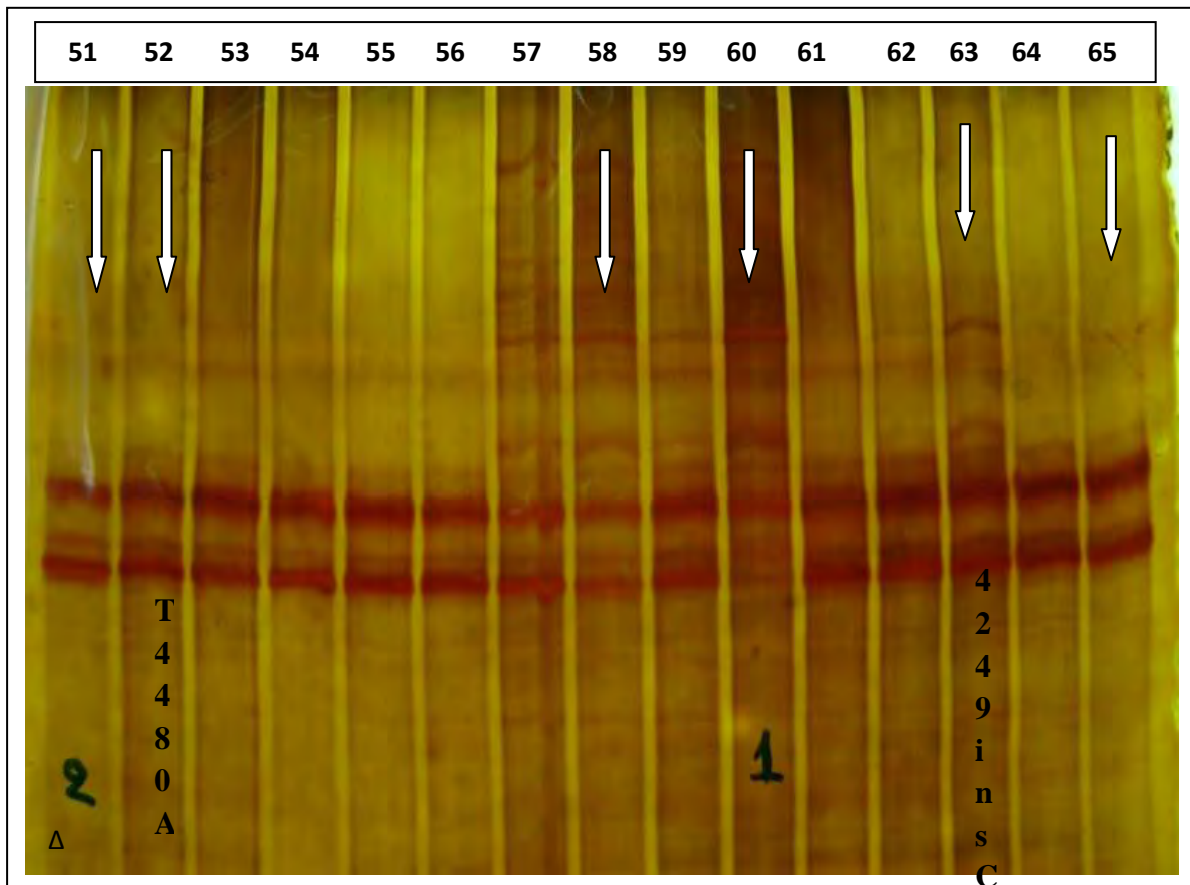
Εικόνα 9 : Στο πήκτωμα απεικονίζεται στο 1^ο πηγάδι το Negative control, είναι καθαρό και επιβεβαιώνει πως δεν υπήρξε επιμόλυνση. Στα πηγάδια 2 ως 6 απεικονίζονται τα ενισχυμένα μιτοχondριακά τμήματα DNA των δειγμάτων 6, 9, 51, 60, 101 τα οποία προέρχονται από ασθενείς με διαβήτη. Για την ενίσχυση των 5 τμημάτων χρησιμοποιήθηκαν 1,5μl DNA-template. Το μέγεθος των τμημάτων DNA είναι 245 bp.

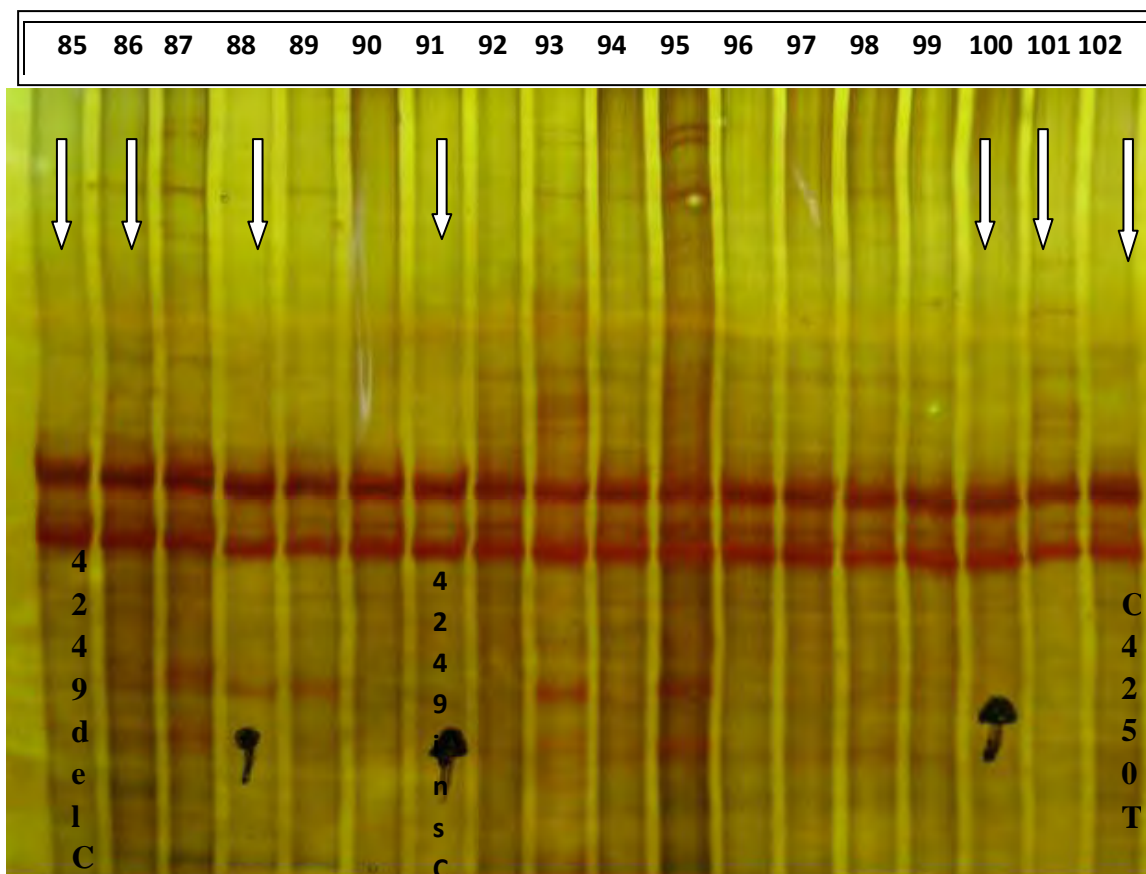
3.2 Ανάλυση δειγμάτων με SSCP

Τα δείγματα αναλύθηκαν με SSCP ώστε να διαχωριστούν σε πρότυπα ανάλογα με την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα. Στη συνέχεια, παρατίθενται τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης της ανάλυσης SSCP (Εικόνα 10α-10στ).









Εικόνα 10α-στ: Στα παραπάνω ηηκτώματα πολυακρυλαμίδιου απεικονίζονται με άσπρο βελάκι τα πρότυπα των δειγμάτων τα οποία μελετήθηκαν περαιτέρω και αλληλουχήθηκαν και σημειώνονται οι μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν.

3.3 Ταυτοποίηση μεταλλάξεων

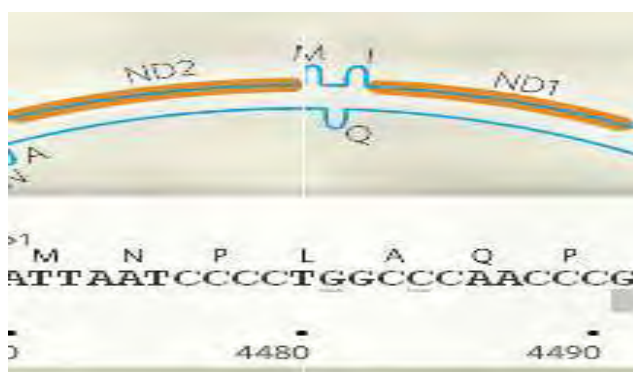
Τα δείγματα που παρουσίασαν διαφορετικό πρότυπο στην ανάλυση SSCP αλληλουχήθηκαν. Με τη βοήθεια των χρωματογραφημάτων που προέκυψαν από την αλληλούχιση των προϊόντων της PCR ταυτοποιήθηκαν μεταλλάξεις στα δείγματα 52, 63, 85, 91 και 102 τα οποία προέρχονται από ασθενείς με διαβήτη. Μετάλλαξη ανιχνεύτηκε και σε ένα από τα δείγματα των υγιών ατόμων όπως παρουσιάζεται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 9: Συγκεντρωτικός πίνακας με τις μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στους 102 ασθενείς με διαβήτη που μελετήθηκαν.

Αριθμός δείγματος	Γονίδιο	Νουκλεοτιδική αλλαγή	Αριθμός ατόμων	Θέση στο tRNA
52	MT-ND2	T4480A	1/102	–
63, 91	MT-ND1	4249insC	2/102	–
85	MT-ND1	4249delC	1/102	–
102	MT-ND1	C4250T	1/102	–
C2 (υγιές άτομο)	tRNA ^{Gln}	T4336C	1	Βραχίονας υποδοχής

3.4 Μετάλλαξη T4480A

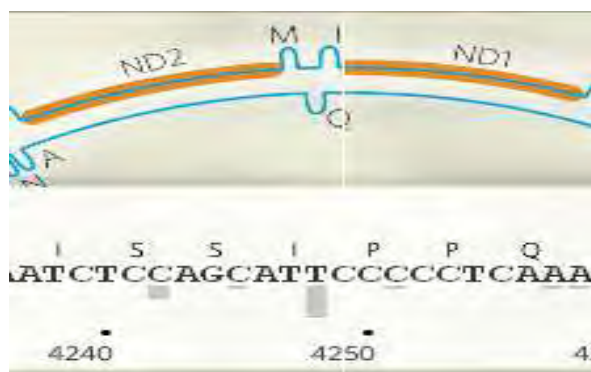
Στο δείγμα 52 παρατηρείται αντικατάσταση της T (θυμίνη) από A (αδερίνη), στην υπομονάδα της αφυδρογονάσης του NADH που κωδικοποιείται από το γονίδιο MT-ND2. Η T (θυμίνη) αποτελεί το 2^ο νουκλεοτίδιο του κωδικονίου CTG που αντιστοιχεί στο αμινοξύ λευκίνη (L) (Εικόνα 11). Η αντικατάσταση της T από A οδηγεί σε παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη όπου το κωδικόνιο CTG αντικαθίσταται από το CAG, το οποίο αντιστοιχεί στη γλουταμίνη (Q).



Εικόνα 11: Η λευκή γραμμή απεικονίζει τη θέση 4480 όπου εμφανίζεται η μετάλλαξη T4480A στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα (www.mitowheel.org).

3.5 Μετάλλαξη 4249insC

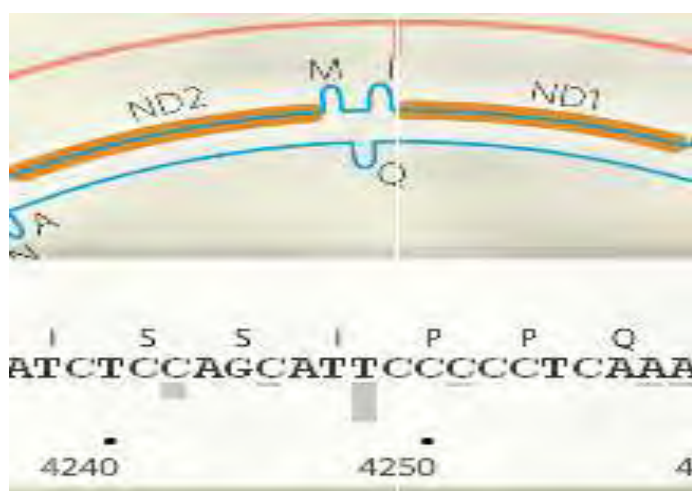
Στα δείγματα 63 και 91 παρατηρείται προσθήκη της βάσης C (κυτοσίνη) στη θέση 4249, στην υπομονάδα της αφυδρογονάσης του NADH που κωδικοποιείται από το γονίδιο MT-ND1. Στη θέση 4249 εισάγεται μία κυτοσίνη, η οποία αποτελεί το 1^ο νουκλεοτίδιο του κωδικονίου CCC που αντιστοιχεί στο αμινοξύ προλίνη (P) (Εικόνα 12, 15).



Εικόνα 12: Η λευκή γραμμή απεικονίζει τη θέση 4249 όπου εμφανίζεται η μετάλλαξη 4249insC στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα (www.mitowheel.org).

3.6 Μετάλλαξη 4249delC

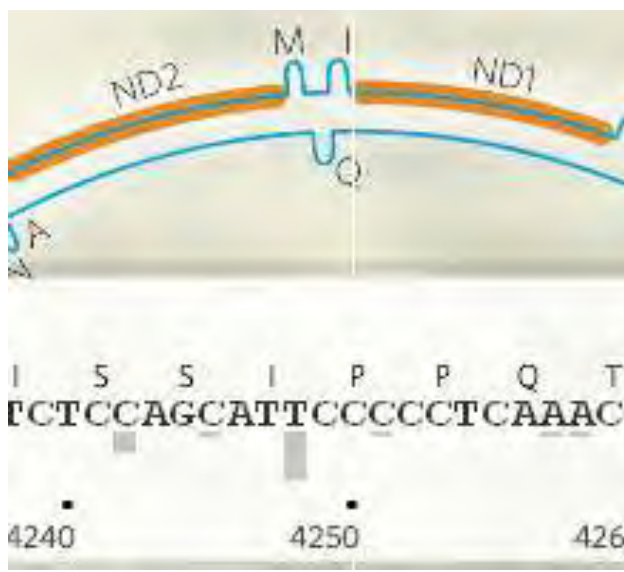
Στο δείγμα 85 παρατηρείται έλλειψη της βάσης C (κυτοσίνη) στη θέση 4249, στην υπομονάδα της αφυδρογονάσης του NADH που κωδικοποιείται από το γονίδιο MT-ND1. Η κυτοσίνη αποτελεί το 1^ο νουκλεοτίδιο του κωδικονίου CCC που αντιστοιχεί στο αμινοξύ προλίνη (P) (Εικόνα 13, 15).



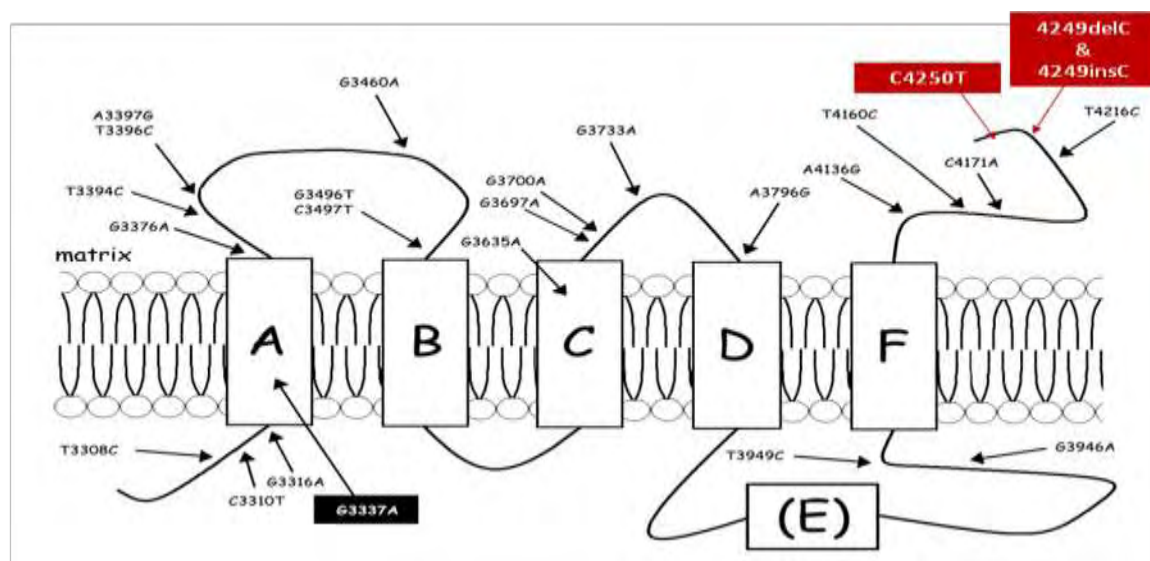
Εικόνα 13: Η λευκή γραμμή απεικονίζει τη θέση 4249 όπου εμφανίζεται η μετάλλαξη 4249delC στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα (www.mitowheel.org).

3.7 Μετάλλαξη C4250T

Στο δείγμα 102 παρατηρείται αντικατάσταση της C (κυτοσίνη) από T (θυμίνη), στην υπομονάδα της αφυδρογονάσης του NADH που κωδικοποιείται από το γονίδιο MT-ND1. Η C (κυτοσίνη) αποτελεί το 2^ο νουκλεοτίδιο του κωδικονίου CCC που αντιστοιχεί στο αμινοξύ προλίνη (P) (Εικόνα 14, 15). Η αντικατάσταση της C από T οδηγεί σε παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη όπου το κωδικόνιο CCC αντικαθίσταται από το CTC, το οποίο αντιστοιχεί στη λευκίνη (L).



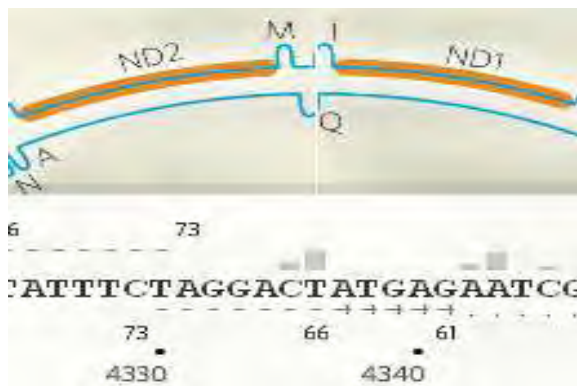
Εικόνα 14: Η λευκή γραμμή απεικονίζει τη θέση 4250 όπου εμφανίζεται η μετάλλαξη C4250T στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα (www.mitowheel.org).



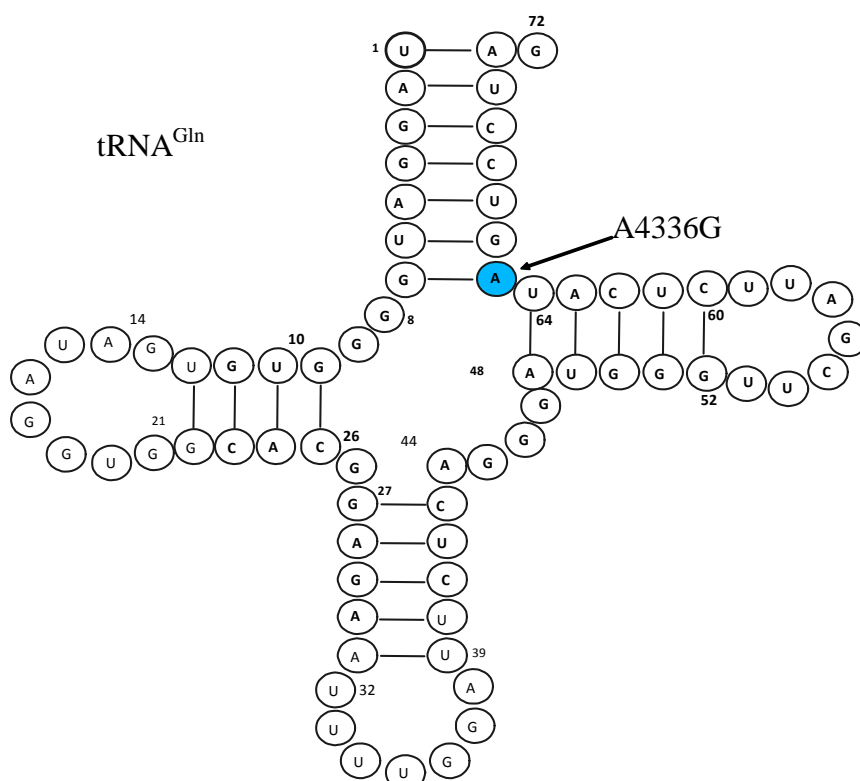
Εικόνα 15: Απεικόνιση θέσης μεταλλάξεων στο γονίδιο ND1.

3.8 Μετάλλαξη T4336C

Στο δείγμα C2 υγιούς ατόμου παρατηρείται αντικατάσταση της T (θυμίνη) από C (κυτοσίνη), στο γονίδιο tRNA^{Gln}. Το νουκλεοτίδιο T εντοπίζεται στη θέση 66 (Εικόνα 16,17) του βραχίονα-υποδοχέα του tRNA. Η μετάλλαξη έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή του mismatch ζεύγους βάσεων 66A:7G σε mismatch 66G:7G.



Εικόνα 16: Η λευκή γραμμή απεικονίζει τη θέση 4336 όπου εμφανίζεται η μετάλλαξη T4336C στο μιτοχondριακό γονιδίωμα (www.mitowheel.org).



Εικόνα 17: Η μετάλλαξη T4336C στο βραχίονα-υποδοχέα του tRNA^{Gln}.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματεύεται την ταυτοποίηση μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά tRNA γονίδια σε ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη, με σκοπό να μελετήσουμε το ρόλο των μεταλλάξεων του mtDNA στη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και κατ' επέκταση στην εμφάνιση της νόσου του σακχαρώδους διαβήτη.

Οι μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA μπορούν να διαχωριστούν σε μεγάλες ανακατατάξεις και σε μεταλλάξεις που περιορίζονται σε μικρό αριθμό ζευγών βάσεων. Όσον αφορά στις τελευταίες, η πλειοψηφία μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA αναφέρεται σε σημειακές μεταλλάξεις. Οι περισσότερες ελλείψεις, διπλασιασμοί, εισαγωγές, αναστροφές ή άλλες σύνθετες ανακατατάξεις, περιλαμβάνουν αρκετά γονίδια, αφού τα μιτοχονδριακά γονίδια βρίσκονται πολύ κοντά το ένα με το άλλο (37 γονίδια σε 16,5 kb). Οι σημειακές μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA μπορούν να εμφανίζονται σε όλα τα γονίδια και οι συνέπειές τους μπορεί να εξαρτώνται από τις αλλαγές που επιφέρουν στα προϊόντα των γονιδίων αυτών, από το εύρος των ιστών που φέρουν τις μεταλλάξεις, τη μεταβολή της παραγωγής ATP στους ιστούς αυτούς, άλλους πολυμορφισμούς του μιτοχονδριακού DNA, παράγοντες που κωδικοποιούνται από τον πυρήνα και αλληλεπιδρούν με τα προϊόντα των γονιδίων του μιτοχονδριακού DNA.

Οι μεταλλάξεις του mtDNA θεωρούνται «ύποπτες» για την εμφάνιση της νόσου του σακχαρώδους διαβήτη. Η πιο συχνή μετάλλαξη mtDNA είναι η A3234G, η οποία κωδικοποιεί για το tRNA^{Leu} γονίδιο (Maassen *et al.*, 2004). Η A3234G μορφή μιτοχονδριακού διαβήτη χαρακτηρίζεται από μειωμένη απελευθέρωση ινσουλίνης επαγόμενη από τη γλυκόζη αλλά, όχι από ανοχή στην ινσουλίνη, προτείνοντας ότι η κύρια παθογένεια λαμβάνει χώρα στα β παγκρεατικά κύτταρα. Πρόσφατες μελέτες παρουσιάζουν στοιχεία για ηπατική δυσλειτουργία (Takahashi *et al.*, 2008) και μειωμένη πρόσληψη γλυκόζης από σκελετικούς μύες που σχετίζονται με τη μετάλλαξη A3234G (Lindroos *et al.*, 2008).

Για την πραγματοποίηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος από 102 ασθενείς με διαβήτη από τα οποία απομονώθηκε μιτοχονδριακό DNA, ενώ έγινε και σύγκριση με δείγματα αίματος υγιών ατόμων. Η ταυτοποίηση των μεταλλάξεων πραγματοποιήθηκε με μοριακές τεχνικές. Το ζεύγος εκκινητών FwIGM και RevIGM χρησιμοποιήθηκε για να ενισχυθεί το τμήμα των

245 bp που κωδικοποιεί τα γονίδια tRNA^{His}, tRNA^{Gln} και tRNA^{Met} καθώς και τμήματα των παρακείμενων γονιδίων των ND1 και ND2 υπομονάδων του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας. Στη συνέχεια, τα δείγματα αναλύθηκαν με SSCP για την κατάταξη τους σε πρότυπα ανάλογα με την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα. Η SSCP επιτρέπει την ταχεία και ταυτόχρονη ανίχνευση διάφορων νουκλεοτιδικών παραλλαγών. Τα δείγματα που παρουσίασαν διαφορετικό πρότυπο στην ανάλυση SSCP αλληλουχήθηκαν.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της αλληλούχισης στους 102 ασθενείς με διαβήτη που μελετήθηκαν εντοπίστηκαν 4 μεταλλάξεις από τις οποίες 3 εντοπίζονται στο γονίδιο ND1 και 1 στο γονίδιο ND2. Οι μεταλλάξεις οι οποίες εντοπίζονται στο γονίδιο ND1 είναι οι : **4249insC**, **C4250T**, **4249delC** και στο ND2 η **T4480A** (Πίνακας 9). Και οι 4 μεταλλάξεις δεν έχουν μέχρι αυτή τη στιγμή αναφερθεί στη δικτυακή βάση δεδομένων για το μιτοχόνδριο www.mitomap.org. Οι μεταλλάξεις C4250T, 4249delC και T4480A εμφανίζονται με συχνότητα 1/102 ασθενείς με διαβήτη. Αντίθετα, η μετάλλαξη 4249insC εμφανίζεται 2 φορές στο σύνολο των 102 ασθενών με διαβήτη (2/102). Τα δείγματα των υπόλοιπων ασθενών που μελετήθηκαν παρουσιάζουν κοινό πρότυπο.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο εντοπισμός και η ταυτοποίηση της μετάλλαξης T4336C στο μιτοχονδριακό γονίδιο tRNA^{Gln} δείγματος αίματος υγιούς ατόμου. Η μετάλλαξη T4336C εντοπίζεται στο βραχίονα-υποδοχέα του tRNA. Αναφέρεται και ως παθογόνος μετάλλαξη με πιθανή συσχέτιση με τις νόσους Alzheimer και Parkinson (Wallace *et al.*, 1992). Σε κάθε περίπτωση είναι δύσκολο να εκτιμηθεί ο ρόλος των μιτοχονδριακών μεταλλάξεων στις ασθένειες αυτές για τις οποίες η παθοφυσιολογία δεν είναι πλήρως γνωστή. Η ίδια μετάλλαξη έχει ανιχνευθεί σε άτομα που παρουσίασαν ημικρανίες αλλά και απώλεια ακοής (Finnila *et al.*, 2001).

Η εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων για το ρόλο των προαναφερθέντων μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά tRNA γονίδια και γενικότερα για το ρόλο του mtDNA στην εμφάνιση της νόσου του σακχαρώδους διαβήτη απαιτεί να επεκταθεί η έρευνα σε όλα τα tRNA γονίδια στους ασθενείς και να γίνει σύγκριση με μεγάλη ομάδα του «φυσιολογικού» πληθυσμού. Επιπλέον, είναι απαραίτητο να προσδιοριστεί η ακριβής επίδραση των μεταλλάξεων που έχουν βρεθεί στη λειτουργία των μιτοχονδρίων. Με αυτό τον τρόπο, θα μπορέσει να προσδιοριστεί η ακριβής επίδραση των μεταλλάξεων στην εμφάνιση και εξέλιξη των συμπτωμάτων του σακχαρώδους διαβήτη στους ασθενείς που μελετήθηκαν.

Σχεδόν 32 χρόνια έχουν περάσει από τη στιγμή που οι Sanger *et al.*, αλληλούχησαν το μιτοχονδριακό γονιδίωμα και ακόμη εξακολουθεί να σημειώνεται σημαντική πρόοδος στον τομέα της μελέτης των μιτοχονδρίων. Η πλήρης κατανόηση της παθογένειας των μιτοχονδριακών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου και του διαβήτη, θα επιτευχθεί μελετώντας τις βασικές διαδικασίες της αντιγραφής, μεταγραφής και μετάφρασης του mtDNA. Οι μεταλλάξεις του mtDNA αποτελούν μια σημαντική αιτία εμφάνισης γενετικής ασθένειας. Η κλινική ποικιλία των συμπτωμάτων αυτών των διαταραχών καθιστά ως πρόκληση την αναγνώριση ασθενών με mtDNA ασθένεια.

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μία νόσος που παρουσιάζεται σε ολοένα και περισσότερα άτομα του ανθρώπινου πληθυσμού. Η μελέτη των μιτοχονδριακών μεταλλάξεων που σχετίζονται με την εμφάνισή του θα βοηθήσει στη βελτίωση της ποιότητας ζωής των ανθρώπων που έχουν την προδιάθεση να ασθενήσουν από την νόσο αυτή, θα συμβάλλει στην σωστή πρόληψη αλλά και την έγκαιρη διάγνωση της νόσου. Η ραγδαία εξέλιξη της μοριακής γενετικής υπόσχεται πολλά σχετικά με τη διερεύνηση της παθογένειας του σακχαρώδους διαβήτη και την περαιτέρω αντιμετώπιση αυτού με μοριακές μεθόδους όπως η γονιδιακή θεραπεία.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bliss M. (1982). Banting's, Best's, and Collip's accounts of the discovery of insulin. *Bull Hist Med*, pp. 554-568
- Chinnery PF DiMauro S, Shanske S, et al. (2004). Risk of developing a Mitochondrial DNA deletion disorder. *Lancet* 364, pp 592–96.
- Dirheimer, G. et al, (1995). Primary, secondary, and tertiary structures of tRNAs. In *tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function* , American Society for Microbiology Press, pp. 93–126
- Duchen, M.R. (2004). Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med*, pp. 365-451
- Edeas, M.Attaf, D.Mailfert, A.S Nasu, M. & Joubet.R. (2010a). Maillard Reaction, mitochondria and oxidative stress: Potential role of antioxidants. *Pathologie Biologie*, pp. 220–225
- Ezquerra M, Campdelacreu J, Munoz E, Tolosa E, Marti MJ (2005). A novel intronic mutation in the DDP1 gene in a family with X-linked dystonia-deafness syndrome. *Arch Neurol*, 62, pp 306–08.
- Finnila S, Autere J, Lehtovirta M, Hartikainen P, Mannermaa A, Soininen H, Majamaa K (2001). “Increased risk of sensorineural hearing loss and migraine in patients with a rare mitochondrial DNA variant 4336A>G in tRNAGln” *Journal of Medical Genetics*, 38, pp.400-405
- Filosto M, Mancuso M, Vives-Bauza C, et al. (2003). Lack of paternal inheritance of muscle mitochondrial DNA in sporadic mitochondrial myopathies. *Ann Neurol*, 54, pp 524–26.
- Gellerich FN, Deschauer M, Chen Y, Muller T, Neudecker S, Zierz S. Functional impairment of mitochondria in skinned fibers of CPEO patients with single and multiple deletions of mt-DNA correlate with heteroplasmy. *Biochim Biophys Acta* 2002, 1556, pp. 41–52.
- Helm.M, et al. (2000). Search for characteristic structural features of mammalian mitochondrial tRNAs. *RNA* 6, pp 1356–1379
- Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. (1988). Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331 , pp 717–19.

- King. H & Rewers M. (1993). Global estimates for prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in adults. WHO Ad Hoc Diabetes Reporting Group. *Diabetes Care*, pp.157-177
- King, H, Aubert, R.E & Herman, W.H.O (1998). Global burden of diabetes, 1995-2025:prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care*, pp. 1414-1431
- Kuznetsov, A. V. & Margreiter, R. (2009). Heterogeneity of mitochondria and mitochondrial function within cells as another level of mitochondrial complexity. *Int J Mol Sci*, pp. 1911-1929
- Labieniec M. & Watala C. (2010). Use of poly (amido).amine dendrimers in prevention of early non-enzymatic modifications of biomacromolecules. *Biochimie*, pp. 1296-1305
- Larsson NG et a (1998). Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nature Genet* 18, pp. 231–236.
- Lindroos MM, Majamaa K, Tura A, Mari A, Kalliokoski KK, Taittonen MT, Iozzo P, and Nuutila P, (2008). The m.3243A>G mutation in mitochondrial DNA leads to decreased insulin sensitivity in skeletal muscle and to progressive {beta}-cell dysfunction. *Diabetes* 58, pp.543–549
- Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L, Afzelius B (1962). A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *J Clin Invest* 41, pp. 1776–1804
- Luft, R. (1994). The development of mitochondrial medicine. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, pp. 8731-8738
- Martin-Hernandez E, Garcia-Silva MT, Vara J, Campos Y, Cabello A, Muley R, Del Hoyo P, Martin MA, Arenas J (2005). Renal pathology in children with mitochondrial diseases. *Pediatr Nephrol* 20, pp.1299-305
- Newmeyer D.D and Ferguson-Miller, S (2003). Mitochondria: Releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 112, pp. 481-490.
- Pavlakis SG, Phillips PC, DiMauro S, De Vivo DC,Rowland LP (1984). Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: a distinctive clinical syndrome. *Ann Neurol* 16, pp.4818.

- Pinti M, Nasi M, Gibellini L, Roat E, De Biasi, S, Bertoncelli, L. & Cossarizza A. (2010). The role of mitochondria in HIV infection and its treatment. *J Exp Clin Med*, pp. 145–155
- Pozzan, T, P. Magalhaes and R. Rizzuto. (2000). The comeback of mitochondria to calcium signaling. *Cell Calcium*. 28, pp.279–283
- Schapira AH (2006). Mitochondrial disease. *Lancet* 368, pp.70-82.
- Schwartz M, Vissing J (2002). Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 347, pp 576–80
- Sciacco M, Bonilla E, Schon EA, DiMauro S, Moraes CT (1994). Distribution of wild-type and common deletion forms of mtDNA in normal and respiration-deficient muscle fibers from patients with mitochondrial myopathy. *Hum Mol Genet* 3, pp.13–19.
- Servidei S (2004). Mitochondrial encephalomyopathies: gene mutation. *Neuromuscul Disord* 14, pp.107–16.
- Shadel GS, Clayton DA (1997). Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Ann Rev Biochem* 66, pp.409-435
- St John J, Sakkas D, Dimitriadi K, et al (2000). Failure of elimination of paternal mitochondrial DNA in abnormal embryos. *Lancet* 355, pp. 200.
- Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. (1999). Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* 402, pp.371–72.
- Sutovsky P, Van Leyen K, McCauley T, Day BN, Sutovsky M. (2004). Degradation of paternal mitochondria after fertilization: implications for heteroplasmy, assisted reproductive technologies and mtDNA inheritance. *Reprod Biomed Online* 8, pp. 24–33.
- Szewczyk, A & Wojtczak L. (2002). Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev*, pp. 101–127
- Taanman JW, Muddle JR, Muntau AC (2003). Mitochondrial DNA depletion can be prevented by dGMP and dAMP supplementation in a resting culture of deoxyguanosine kinase-deficient fibroblasts. *Hum Mol Genet* 12, pp.1839–45
- Takahashi Y, Iida K, Takeno R, Kitazawa R, Kitazawa S, Kitamura H, Fujioka Y, Yamada H, Kanda F, Ohta S, Nishimaki K, Fujimoto M, Kondo T, Iguchi G, Takahashi K, Kaji H, Okimura Y, and Chihara K, (2008). Hepatic failure and enhanced oxidative stress in mitochondrial diabetes. *Endocrinol J* 55, pp. 509–514
- Taylor, R. W and Turnbull, D. M. (2005). Mitochondrial DNA

mutations in human disease. *Nat. Rev. Genet* 6, pp. 389 – 402.

- Taylor RW, McDonnell MT, Blakely EL, et al (2003). Genotypes from patients indicate no paternal mitochondrial DNA contribution. *Ann Neurol* 54, pp.521–24.
- Temperley R., Richter, R, Dennerlein, S, Lightowlers, R. N. and Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. (2010). "Hungry codons promote frameshifting in human mitochondrial ribosomes." *Science* 327, pp.301.
- Tranebjaerg L, Schwartz C, Eriksen H, et al. (1995). A new X linked recessive deafness syndrome with blindness, dystonia, fractures, and mental deficiency is linked to Xq22. *J Med Genet* 32, pp. 257–63.
- Turner, R.C, Cull, C.A, Frighi, V. & Holman. R.R. (1999). Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49).. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS). Group. *JAMA*, pp.2005-2012
- van der Giezen, M and T. M. Lenton (2012). The rise of oxygen and complex life. *J. Euk. Microbiol* 59, pp.111-113.
- Waldbaum, S. & Patel, M. (2009). Mitochondria, oxidative stress, and temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*, pp. 23-45
- Wallace DC, Shoffner, JM, Brown MD, Torroni A, Lott MT, Cabell M (1992). "Mitochondrial DNA mutations associated with Alzheimer's and Parkinson's disease" *American Journal of Human Genetics*, 51: A30.
- Wallace DC, Brown MD, Lott MT. (1999). Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene* 238, pp. 211–30.
- Wittenhagen LM, Roy MD, Kelley SO (2003). The pathogenic U3271C human mitochondrial tRNA Leu(UUR). mutation disrupts a fragile anticodon stem. *Nucleic Acids Res* 31, pp.596-601.
- Wilson FH, Hariri A, Farhi A, et al (2004). A cluster of metabolic defects caused by mutation in a mitochondrial tRNA. *Science* 306, pp.1190–94.
- Zifa E, Giannouli S, Theotokis P, Stamatis C, Mamuris Z, Stathopoulos C (2007). Mitochondrial tRNA Mutations: clinical and functional perturbations. , *RNA Biology* 4, pp.1,38-66. Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Τούντας,1995,Σακχαρώδης Διαβήτης. Αθήνα: Εκδ.Επτάλοφος, σελ 1039-1073
- Jan Koolman,Klaus- Heinrich Roehm,2007, Εγχειρίδιο Βιοχημείας, 2^η έκδοση, σελ 160
- J.G.McGeown,2009,Συνοπτική Φυσιολογία του Ανθρώπου, 2^η έκδοση, σελ 290-291