



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Μεταλλάξεις σε Μιτοχονδριακό DNA και Μεταβολικό σύνδρομο»**

**ΧΑΡΙΚΛΕΙΑ ΧΡΙΣΤΟΠΟΥΛΟΥ**  
**ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ, Επίκουρος Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας Τμήματος Ιατρικής Παν. Θεσσαλίας  
**(Επιβλέπουσα)**

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής Τμήματος Ιατρικής Παν. Θεσσαλίας **(Μέλος)**

ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας Τμήματος Ιατρικής Παν. Θεσσαλίας  
**(Μέλος)**

**ΛΑΡΙΣΑ, 2017**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**«Mitochondrial DNA dysfunction and metabolic syndrome»**

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών “Γενετική του Ανθρώπου” της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη της Επίκουρου Καθηγήτριας Κυτταρικής Βιολογίας κ. Βαρβάρας Τραχανά ,κατά το ακαδημαϊκό έτος 2016-2017 και αποτελεί βιβλιογραφική έρευνα που πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στην επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κ. Βαρβάρα Τραχανά που γνώρισα ως μεταπτυχιακή φοιτήτρια .Όλο αυτό το χρονικό διάστημα ήταν πάντα διαθέσιμη να ακούσει οποιοδήποτε πρόβλημα προέκυπτε και να βοηθήσει για την έγκαιρη επίλυσή του.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υπόλοιπους καθηγητές της επιτροπής και διδάσκοντές μου κατά τη διάρκεια του μεταπτυχιακού που βοήθησαν στη συγγραφή της παρούσας εργασίας με την πολύτιμη γνώση που μετέφεραν σε εμένα προσωπικά αλλά και στους υπόλοιπους συμφοιτητές μου. Ευχαριστώ την Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής κ. Ασπασία Τσέζου που ήταν και η υπεύθυνη του μεταπτυχιακού προγράμματος καθώς και τον Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακολογίας κ. Κων/νο Δήμα.

Με εκτίμηση

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μεταβολικό σύνδρομο αποτελεί ένα σύμπλεγμα διαταραχών όπως είναι η παχυσαρκία (κυρίως σπλαχνική), η ινσουλινοαντίσταση, η υπερλιπιδαιμία, η δυσλιποπρωτεϊναιμία και ο διαβήτης τύπου 2. Για την ανάπτυξή του ενέχονται γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες γι' αυτό τον λόγο είναι πολύπλευρη η προσέγγιση της μελέτης των μηχανισμών που ευθύνονται για την εμφάνισή του αλλά και η θεραπευτική προσέγγιση του συνδρόμου.

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν τα οργανίδια παραγωγής ενέργειας του κυττάρου μέσω μεταβολικών διαδικασιών που πραγματοποιούνται σε αυτά αλλά και το βιολογικό ρολόι του κυττάρου αφού εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως η απόπτωση και η γήρανση. Δυσλειτουργία στα μιτοχόνδρια σχετίζεται με παχυσαρκία, μεταβολικό σύνδρομο και διαβήτη τύπου 2. Αλλαγές στο δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης, μείωση των επιπέδων ATP, παρεμπόδιση της κατανάλωσης οξυγόνου και μειωμένη βιογένεση είναι μερικά από τα χαρακτηριστικά της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας. Βέβαια, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία είναι αρκετά πολύπλοκη γιατί εμπλέκονται γενετικοί παράγοντες και από το πυρηνικό αλλά και από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα καθώς και πολυάριθμοι περιβαλλοντικοί παράγοντες.

Ο κύριος μηχανισμός του μεταβολικού συνδρόμου είναι η ινσουλινοαντίσταση που συνήθως συμβαίνει σε μεγαλύτερα ηλικιακά άτομα και χαρακτηρίζεται από μειωμένη παραγωγή ATP στα μιτοχόνδρια, μειωμένη ενεργότητα των συμπλόκων της OXPHOS. Δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο εάν η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων είναι αποτέλεσμα της ινσουλινοαντίστασης ή την προκαλεί. Ένας από τους παράγοντες κλειδί της ινσουλινοαντίστασης είναι η απορύθμιση του μεταβολισμού σε ιστούς που είναι ευαίσθητοι στην ινσουλίνη όπως οι μύες, το ήπαρ και ο λιπώδης ιστός. Ειδικότερα στους σκελετικούς μυς μειωμένη παραγωγή ATP στα μιτοχόνδρια και αύξηση των ελευθέρων ριζών ROS οδηγούν σε μειωμένη οξειδωση των λιπαρών οξέων και αύξησή τους στο κυτταρόπλασμα ως ελεύθερα λιπαρά οξέα με αποτέλεσμα την ινσουλινοαντίσταση και τον διαβήτη τύπου 2.

Πρόσφατα ευρήματα δείχνουν ότι μειωμένη ενεργότητα της SIRT3 στο ήπαρ παχύσαρκων ατόμων οδηγεί σε υπερακετυλίωση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών που συμβάλλει στην μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Επιπλέον διατροφή πλούσια σε λίπη επάγει την καταστροφή του mtDNA και σχετίζεται με αύξηση του οξειδωτικού στρες σε

σκελετικούς μυς και ήπαρ και επάγει την αύξηση των δεικτών του ER στρες, της διαβάθμισης πρωτεϊνών και της απόπτωσης.

Στον λιπώδη ιστό τα μιτοχόνδρια είναι απαραίτητα για την σύνθεση τριγλυκεριδίων, την λιπογένεση αλλά και την λιπόλυση μέσω της οξειδωσης των λιπαρών οξέων ώστε να παραχθεί ATP. Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και η ινσουλινοαντίσταση προάγουν την χρόνια φλεγμονή, τον σχηματισμό αθηροσκληρωτικών πλακών και την ενεργοποίηση του φλεγμονώδους μονοπατιού Toll-like receptor 2/NF-kB στα μονοκύτταρα οδηγώντας σε έναν φαύλο κύκλο μεταξύ χρόνιας φλεγμονής και παραγωγής ROS. Ο TNF-α είναι προ-φλεγμονώδης πρωτεΐνη και παίζει ρόλο στην εμφάνιση χρόνιας φλεγμονής σε παχύσαρκα άτομα. Τέλος, ο TNF-α, επίσης, επάγει την μιτοχονδριακή δυσλειτουργία μειώνοντας την ενεργότητα του συμπλόκου III της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, αυξάνοντας την παραγωγή ROS και καταστρέφοντας το mtDNA σε καρδιακά μυοκύτταρα.

Σκοπός της εργασίας είναι η παρουσίαση των μιτοχονδριακών τροποποιήσεων που συμβαίνουν κατά την ινσουλινοαντίσταση, την παχυσαρκία, τον διαβήτη και την δυσλιποπρωτεϊναιμία, καθώς και της επίδραση των ROS σε αυτές τις παραμέτρους του μεταβολικού συνδρόμου αλλά και στην χρόνια φλεγμονή και γήρανση ώστε να υπάρξει μία πολύπλευρη προσέγγιση του μεταβολικού συνδρόμου που θα οδηγήσει στην καλύτερη μελέτη των μηχανισμών του αλλά και σε κατάλληλες θεραπευτικές μεθόδους.

## ABSTRACT

Metabolic syndrome is a cluster of metabolic disorders such as obesity (mainly visceral), insulin resistance, hyperlipidemia, dyslipoproteinaemia and type 2 diabetes mellitus. For metabolic syndrome involved both genetic and environmental factors so the study of mechanisms is very multifaceted both for the appearance and treatment of the syndrome.

Mitochondria are both the organelles which produce energy for the cell through metabolism and, also, cell's "biological clock" because they involved in apoptosis and aging. Mitochondrial dysfunction is closely associated with obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. Changes in the mitochondrial membrane potential, a reduction in the ATP level, the inhibition of mitochondrial oxygen consumption and reduced mitochondrial biogenesis are some of the characteristics of mitochondrial dysfunction. The mechanism of mitochondrial dysfunction is very complex, which includes genetic factors from both nuclear and mitochondrial genome and numerous environmental factors.

The centerpiece of mechanism of metabolic syndrome is insulin resistance which frequently occurs in elderly individuals, is characterized by a decrease in mitochondrial ATP production, a reduction in mitochondrial DNA, decreased activity of oxidative phosphorylation complexes. It is still unclear whether mitochondrial dysfunction results from or causes insulin resistance. One of the key factors for the formation of insulin resistance may be the dysregulation of energy metabolism in insulin sensitive tissues such as skeletal muscle, liver and adipose. Particularly, in skeletal muscle, reduced ATP production and increased ROS levels lead to reduced fatty acid oxidation and increased cytosolic free fatty acid levels, resulting in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus.

Recent findings suggest that reduced SIRT3 activity in fatty liver may result in hyperacetylation of mitochondrial proteins that contributes to mitochondrial dysfunction. Moreover, high-fat-diet-induced mtDNA damage correlates with increased oxidative stress in skeletal muscle and liver, which is associated with the induction of markers of endoplasmic reticulum stress, protein degradation and apoptosis.

In adipose tissue, mitochondria provide key intermediates for the synthesis of triglycerides and are critical for lipogenesis. Adipose mitochondria are also important

for lipolysis through the oxidation of fatty acids, which constitutes an important source of ATP to supply cells with energy. Mitochondrial dysfunction and insulin resistance promote chronic inflammation and the formation of atherosclerotic lesions, and the activation of the inflammatory Toll-like receptor 2/ nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway in monocytes is a central mechanism leading to a vicious cycle between chronic inflammation and mitochondrial ROS production. Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) is a key proinflammatory mediator that plays an important role in the chronic inflammation of adipose tissue in obese subjects. It has been concluded that TNF- $\alpha$  also induces mitochondrial dysfunction by reducing complex III activity, increasing ROS production and causing damage to mtDNA in cardiac myocytes.

The aim of this study is to present the mitochondrial modifications that occur during insulin resistance, obesity, diabetes and dysliproteinemia as well as the effect of ROS on these parameters of the metabolic syndrome as well as on chronic inflammation and aging in order to have a multifaceted approach Of the metabolic syndrome which will lead to a better study of its mechanisms but also to appropriate therapeutic methods.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|                                                                   |           |
|-------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>                                              | <b>7</b>  |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1</b>                                                 |           |
| 1.1 ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ.....                                      | 9         |
| 1.2 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ .....                        | 12        |
| 1.3 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ ΠΗΓΗ ROS ΚΑΙ ΓΗΡΑΝΣΗ .....              | 18        |
| 1.4 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA .....                          | 21        |
| 1.5 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ.....             | 26        |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2</b>                                                 |           |
| 2.1 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ....    | 38        |
| 2.2 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ-ΓΗΡΑΝΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ.....         | 51        |
| 2.3 MicroRNAs ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΣΤΡΕΣ ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ.... | 55        |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3</b>                                                 |           |
| 3.1 ΜΟΝΤΕΛΑ ΖΩΩΝ ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ.....                     | 59        |
| 3.2 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΣΤΟΧΕΥΟΝΤΑΣ ΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ.....        | 65        |
| <b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>                                          | <b>69</b> |
| <b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>                                          | <b>72</b> |



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία είναι μελέτη πληροφοριών και αποτελεσμάτων που υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία, έχουν δημοσιευτεί σε εγκεκριμένα επιστημονικά περιοδικά και άλλες επιστημονικές πηγές καθώς επίσης και τρέχουσες μελέτες και κλινικές δοκιμές που στοχεύουν στο αντικείμενο που είναι: «Μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακό DNA και μεταβολικό σύνδρομο» .

Ειδικότερος σκοπός της εργασίας είναι η παρουσίαση αυτών και η παράθεση επιστημονικών ερωτημάτων που αφορούν το θέμα αλλά και την συσχέτιση των μιτοχονδριακών μεταλλάξεων και του μεταβολικού συνδρόμου με άλλες ασθένειες όπως ο καρκίνος ,νευροεκφυλιστικές ασθένειες ,διαβήτης , καρδιαγγειακά νοσήματα , αθηρωμάτωση ,δυσλιποπρωτεϊναιμία .Επίσης καταστάσεις όπως το οξειδωτικό στρες ,η γήρανση , η απόπτωση , φλεγμονή σχετίζονται με μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA αφού τα μιτοχόνδρια αποτελούν την κύρια ενδογενή πηγή ελεύθερων δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS).

Η παρούσα εργασία στοχεύει επίσης στην καλύτερη δυνατή κατανόηση του μοριακού και γενετικού υπόβαθρου των μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό DNA και το μεταβολικό σύνδρομο και θεωρούμε ότι θα βοηθήσει να μελετήσουμε καλύτερα την σύνδεσή τους με άλλες ασθένειες. Επιπλέον ευελπιστούμε ότι μια τέτοια μελέτη μπορεί να συμβάλλει προς την κατεύθυνση της έγκαιρης διάγνωσης και πιθανά θεραπείας ασθενειών που σχετίζονται με τις μιτοχονδριακές μεταλλάξεις και με το μεταβολικό σύνδρομο. Εκμεταλλευόμενοι τις σύγχρονες μοριακές τεχνικές και τα εξατομικευμένα φάρμακα ειδικά για τον κάθε ασθενή με βάση το γενετικό του προφίλ.Η μελέτη του μιτοχονδριακού DNA και των μεταλλάξεων που εμφανίζονται σε αυτό έχει ήδη απασχολήσει την επιστημονική κοινότητα αλλά εξακολουθεί να αποτελεί πεδίο έρευνας αφού η υψηλή μεταλλακτικότητα του μιτοχονδριακού DNA και η ημιαυτονομία των μιτοχονδρίων αφήνει πλούσιο έδαφος για αρκετές μελέτες.

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν ένα από τα αρχαιότερα ενδομεμβρανικά συστήματα στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Κύρια λειτουργία τους είναι η παραγωγή ATP μέσω της αναπνοής (αερόβιος μεταβολισμός) και λόγω αυτού αποτελούν οδηγό για τη μελέτη της εξέλιξης των ευκαρυωτικών κυττάρων .Η εμφάνιση των μιτοχονδρίων έγινε περίπου πριν 2 δισ. έτη από την περικύκλωση ενός α-πρωτεοβακτηρίου από έναν πρόγονο του σύγχρονου ευκαρυωτικού κυττάρου και επακόλουθη συμβίωσή τους. [1]

Το ανθρώπινο μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) έχει πληροφορίες για 13 πρωτεΐνες που είναι συστατικά των αναπνευστικών συμπλόκων των μιτοχονδρίων I-IV και εδράζονται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου λειτουργώντας μαζί με τον κύκλο του Krebs στην μήτρα του μιτοχονδρίου. Η προέλευση του μιτοχονδριακού πρωτεώματος είναι μια μείξη των ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών πρωτεϊνών. Η αντιγραφή του mtDNA μοιάζει με την αντιγραφή του βακτηριακού DNA και γίνεται ανεξάρτητα από την αντιγραφή του πυρηνικού DNA. Δεν υπάρχει επιδιορθωτική ικανότητα και γι' αυτό συσσωρεύει πολλές μεταλλάξεις. Μέχρι σήμερα, έχουν γνωστοποιηθεί περίπου 50 ασθένειες οφειλόμενες στα μιτοχόνδρια (Μιτοχονδριοπάθειες) οι οποίες συμπεριλαμβάνονται στα μεταβολικά νοσήματα .

Με τον όρο μεταβολικό σύνδρομο (MetS) αναφερόμαστε σε ένα σύμπλεγμα καταστάσεων όπως είναι η αυξημένη πίεση αίματος, τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, η συσσώρευση λίπους γύρω από την περιφέρεια της μέσης, μη φυσιολογικά επίπεδα χοληστερόλης ή τριγλυκεριδίων καθώς και αντίσταση των περιφερικών ιστών (κυρίως του μυϊκού ιστού) στην ινσουλίνη . Ο συνδυασμός αυτών οδηγούν σε αύξηση του κινδύνου για εκδήλωση καρδιαγγειακών νοσημάτων , εγκεφαλικού επεισοδίου και σακχαρώδους διαβήτη.

Μελέτες έχουν δείξει ότι οι κυριότεροι παράγοντες που οδηγούν στην εμφάνιση του μεταβολικού συνδρόμου είναι η παχυσαρκία και η ινσουλινο-αντίσταση. Σήμερα υπάρχουν 1 δισ. υπέρβαρα άτομα παγκοσμίως (BMI>25) ενώ τα παχύσαρκα φτάνουν τα 300 εκατομμύρια (BMI>30). Η Ελλάδα είναι η πρώτη χώρα της Ε.Ε με τη μεγαλύτερη συχνότητα παχυσαρκίας ενηλίκων και δεύτερη μετά την Ιταλία σε συχνότητα εμφάνισης παιδικής παχυσαρκίας. Τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν την πρώτη αιτία θανάτου τόσο σε άνδρες όσο και σε γυναίκες στον δυτικό κόσμο και ακολουθεί ο καρκίνος.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

### 1.1 ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ

Το μεταβολικό σύνδρομο είναι ένα παζλ μεταβολικών διαταραχών που χαρακτηρίζεται από αυξημένη πίεση αίματος, υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, συσσώρευση λίπους γύρω από την μέση και μη φυσιολογικά επίπεδα τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης. Όλα αυτά αυξάνουν κατά πολύ τον κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα και εγκεφαλικά επεισόδια καθώς και για διαβήτη. Ο επιπολασμός είναι 25% σε άνδρες και 18% σε γυναίκες. [33]

Κύριος πυροδοτητής του μεταβολικού συνδρόμου (MetS) θεωρείται η κοιλιακή παχυσαρκία, καθώς εκκρίνονται κυτταροκίνες, όπως ο TNFα που επιδρά στον υποδοχέα της ινσουλίνης και συμβάλλει στην δημιουργία ινσουλινοαντίστασης. Επιπρόσθετα, η αυξημένη απελευθέρωση λιπαρών οξέων οδηγεί αφενός σε αυξημένη σύνθεση τριγλυκεριδίων και αφετέρου σε αυξημένη σύνθεση LDL (μικρής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη) που είναι αθηρωματογόνος και σε μείωση της HDL (υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη) που είναι προστατευτική. Ο διαβήτης με ή χωρίς MetS είναι δύο καταστάσεις που διευκολύνουν την αθηρωματική διαδικασία. Οι δύο αυτές καταστάσεις οξύνονται από διατροφή που επάγει την απελευθέρωση τοξικών ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) από τα μιτοχόνδρια. Στον πίνακα 1 φαίνονται τα κριτήρια πιστοποίησης του μεταβολικού συνδρόμου σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας.

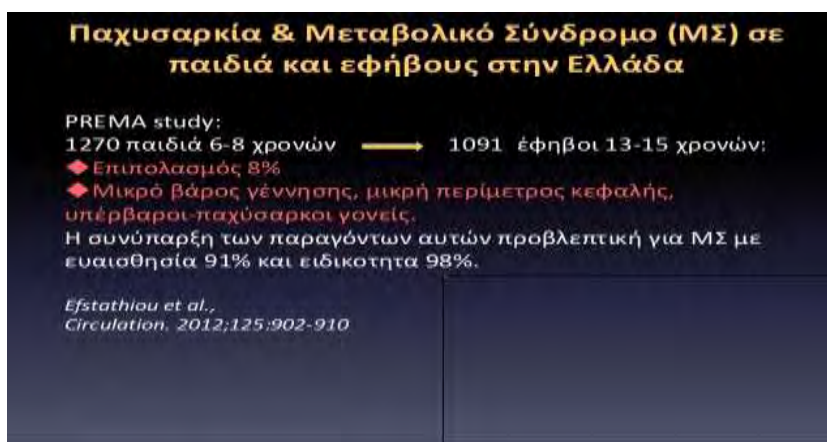
ΠΙΝΑΚΑΣ 1.Κριτήρια διάγνωσης MetS σύμφωνα με WHO

| Κριτήρια τεκμηρίωσης μεταβολικού συνδρόμου σύμφωνα με WHO & IDF(2005) |                                                    |
|-----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| 1 Σάκχαρο νηστείας                                                    | ≥100 mg% η διαγνωσμένος διαβήτης ιη<br>>110 παιδιά |
| 2 Τριγλυκερίδια                                                       | ≥150 mg% ή υπολιπιδαιμική θεραπεία<br>> 110 παιδιά |
| 3 HDL-χοληστερόλη                                                     | < 50 mg% Άνδρες, <60mg% Γυναίκες<br>< 40 παιδιά    |
| 4 Συστολική αρτηριακή πίεση/ Διαστολική αρτηριακή πίεση               | ≥130/85 mmHg<br>>90 παιδιά                         |
| 5 Ομφαλική περιμέτρος                                                 | >94 Άνδρες, >80 Γυναίκες, > 90 παιδιά              |
| Ορισμός συνδρόμου                                                     | Το 5 και άλλα 2                                    |

www.who.int

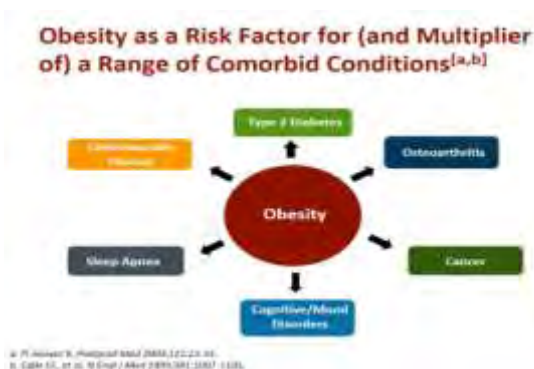
Σήμερα υπάρχουν 1 δισ. υπέρβαρα άτομα παγκοσμίως (BMI>25) ενώ τα παχύσαρκα φτάνουν τα 300 εκατομμύρια (BMI>30). Η Ελλάδα είναι η πρώτη χώρα της Ε.Ε με τη μεγαλύτερη συχνότητα παχυσαρκίας ενηλίκων και δεύτερη μετά την Ιταλία σε συχνότητα εμφάνισης παιδικής παχυσαρκίας. Τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν την πρώτη αιτία θανάτου τόσο σε άνδρες όσο και σε γυναίκες στον δυτικό κόσμο και ακολουθεί ο καρκίνος. Στην εικόνα 1 φαίνονται τα στοιχεία από έρευνα που διεξήχθη και αφορούν την παχυσαρκία και το μεταβολικό σύνδρομο σε παιδιά και εφήβους στην Ελλάδα ενώ στην εικόνα 2 παρουσιάζεται η παχυσαρκία ως παράγοντας κινδύνου για διάφορες ασθένειες. [33]

### ΕΙΚΟΝΑ 1. Παχυσαρκία και MetS



Efstathiou et al.(2012),Circulation:125:902-910

### ΕΙΚΟΝΑ 2. Παχυσαρκία ως παράγοντας κινδύνου σε διάφορες ασθένειες



Pi-Sunyer X. Postgrad Med 2009;121:21-33 Calle EE et al. N Engl J Med 1999;341:1097-1105

Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται τελευταία στη σύνδεση φλεγμονής και ινσουλινοαντίστασης καθώς και στη σημασία εκτίμησης ειδικών πρωτεϊνών φλεγμονής όπως η CRP. Μελετώντας το γενετικό υπόβαθρο του MetS σε έρευνα 2.058 δίδυμων ανδρών βρέθηκε γενετική προδιάθεση σε μονοζυγωτικά δίδυμα 31,6% έναντι 63% [10]

αυτών που εμφάνιζαν υπέρταση, διαβήτη και παχυσαρκία. Η έρευνα σε 236 δίδυμες γυναίκες έδειξε κληρονομησιμότητα και γενετική προδιάθεση 61% ενώ για αυτές με διαβήτη 87% και με δυσλιπιδαιμία 25%. Μελέτες σε οικογένειες της Β.Αμερικής για το μεταβολικό σύνδρομο (803 άτομα από 89 οικογένειες Λατίνων) έδειξαν κληρονομησιμότητα και γενετική προδιάθεση 24%, εμφάνιση διαβήτη-παχυσαρκίας-δυσλιπιδαιμίας 44% ενώ η εμφάνιση υπέρτασης 20%.

Από μελέτες ευρείας σάρωσης γονιδιώματος GWAS τα γονίδια που έχουν την μεγαλύτερη επίδραση για την εμφάνιση του MetS αλλά αντιπροσωπεύουν το 5-10% της ποικιλομορφίας των χαρακτηριστικών του συνδρόμου (το υπόλοιπο 40-45% οφείλεται σε γονίδια που ρυθμίζουν τα επίπεδα λιπιδίων και πίεσης) είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα της μελανοκορτίνης 4 σε πληθυσμούς της Ευρώπης και είναι ρυθμιστής της ισορροπίας ενέργειας (υπερφαγία και παχυσαρκία). [2],[3]

Από μελέτες σε παχύσαρκα ποντίκια Zucker βρέθηκε ότι το γονίδιο FTO που σχετίζεται με μάζα λίπους και παχυσαρκία ,το γονίδιο MLX1 που κωδικοποιεί μεταγραφικό παράγοντα που ρυθμίζει την παραγωγή ενζύμων που σχετίζονται με επίπεδα τριγλυκεριδίων στο πλάσμα καθώς και το γονίδιο TCF7L2 που η έκφρασή του επηρεάζει την λειτουργία των β παγκρετικών κυττάρων.[4],[5]

## 1.2 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ

Τα μιτοχόνδρια είναι κυτταροπλασματικά οργανίδια των ευκαρυωτικών κυττάρων που αποτελούνται από δύο μεμβράνες μία εξωτερική και μία εσωτερική ενώ στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων βρίσκεται η μήτρα. Η εξωτερική μεμβράνη έχει κυλινδρικό σχήμα και περιέχει τις πορίνες, πρωτεΐνες που επιτρέπουν τη διέλευση μεγάλων μορίων. Η εσωτερική μεμβράνη έχει αναδιπλώσεις και φέρει πολυενζυμικά συστήματα (σύμπλοκα I-V) τα οποία ευθύνονται για την οξειδωτική φωσφορυλίωση και την αναπνευστική αλυσίδα (OXPHOS). Η μήτρα είναι ο χώρος που περιβάλλεται από την εσωτερική μεμβράνη και φέρει DNA, ριβοσώματα και πολυάριθμα ένζυμα.

Οι κύριες λειτουργίες των μιτοχονδρίων είναι: ο μεταβολισμός βιολογικών μακρομορίων όπως υδατανθράκων και λιπαρών οξέων και η παραγωγή ενέργειας μέσω σύνθεσης ATP μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που επιτελείται στην εσωτερική μεμβράνη (σύμπλοκα I-V).

Τα μιτοχόνδρια είναι ημιαυτόνομα οργανίδια αφού από τις 100 περίπου πρωτεΐνες της OXPHOS οι 13 μόνο κωδικοποιούνται από μιτοχονδριακά γονίδια ενώ οι υπόλοιπες κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια. [6]

Τα περισσότερα σωματικά κύτταρα περιέχουν περισσότερα από 100 μιτοχόνδρια ανάλογα με τον ιστό και τις ενεργειακές τους απαιτήσεις. Κάθε μιτοχόνδριο περιέχει 2-10 μόρια δίκλωνου κυκλικού mtDNA μήκους 16.569 ζευγών βάσεων. Το mtDNA αποτελεί το 1% περίπου του συνολικού κυτταρικού DNA. Το δίκλωνο κυκλικό mtDNA αποτελείται από μία βαριά (H) αλυσίδα πλούσια σε G και μία ελαφριά (L) πλούσια σε C. Στο mtDNA που χαρτογραφήθηκε το 1981 έχει εντοπιστεί σε αυτό η αλληλουχία 37 γονιδίων. [7]

Όλα τα γονίδια rRNA και πρωτεϊνών βρίσκονται στην H αλυσίδα εκτός από το γονίδιο ND6 που βρίσκεται στην L. Τα ώριμα μετάγραφα παράγονται από πολυκυστρονικά μετάγραφα με διάσπαση των tRNAs και επακόλουθη πολυαδενυλίωση των mRNAs και rRNAs. [8]

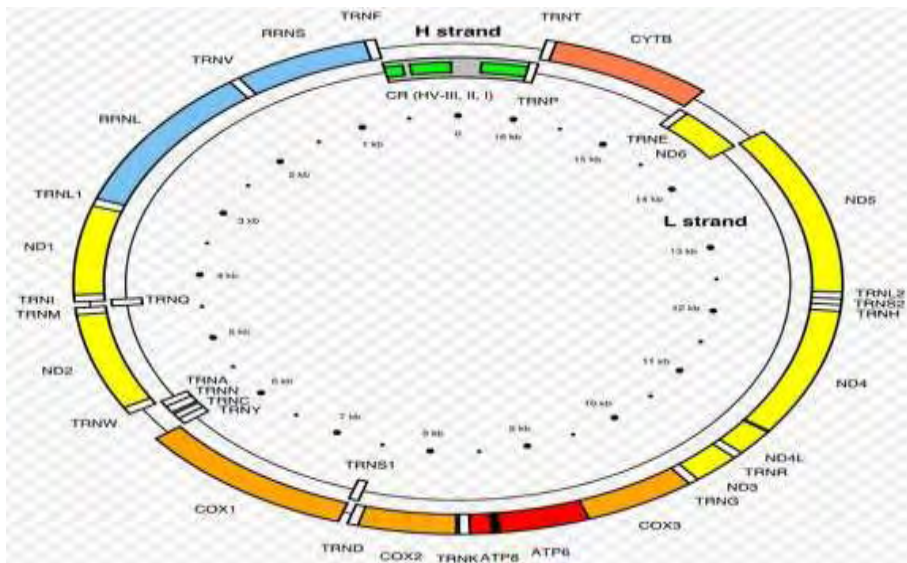
Από την ανάλυση της αλληλουχίας των 37 γονιδίων βρέθηκε ότι: τα 22 γονίδια μεταγράφονται σε tRNA, τα 2 σε rRNA (16S και 12S mt rRNAs) και τα υπόλοιπα 13 γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες που αποτελούν υπομονάδες του ενζυμικού συμπλέγματος της OXPHOS (σύμπλοκο I-V). Οι υπομονάδες αυτές είναι: 7 υπομονάδες της αφυδρογονάσης NADH (σύμπλοκο I), κυτόχρωμα b του συμπλόκου III, 3 υπομονάδες της κυτοχρωμικής οξειδάσης (σύμπλοκο IV) και 2 υπομονάδες της ATP συνθετάσης (σύμπλοκο

[12]

V). Το σύμπλοκο I της OXPHOS αποτελείται από 45 πολυπεπίδια από τα οποία τα 7 (υπομονάδες αφυδρογονάσης NADH) κωδικοποιούνται από το mtDNA Το σύμπλοκο II από 4 πολυπεπίδια που κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA (nDNA) ,το σύμπλοκο III από 11 πολυπεπίδια που 1 κωδικοποιείται από το mtDNA (cytb) , το σύμπλοκο IV από 13 εκ των οποίων τα 3 κωδικοποιούνται από το mtDNA(COI-III) και το σύμπλοκο V από 16 που 2 κωδικοποιούνται από το mtDNA (ATP συνθετάση 6 ,8). Από τα 5 αυτά σύμπλοκα μόνο το I και III-V μεταφέρουν πρωτόνια.Τα σύμπλοκα I και II χρησιμοποιούν φλαβίνες και Fe-S.Το σύμπλοκο III περιέχει κέντρο Fe-S,cyt b και c1. Το σύμπλοκο IV περιέχει 2 κέντρα Cu, cyt a και a3.

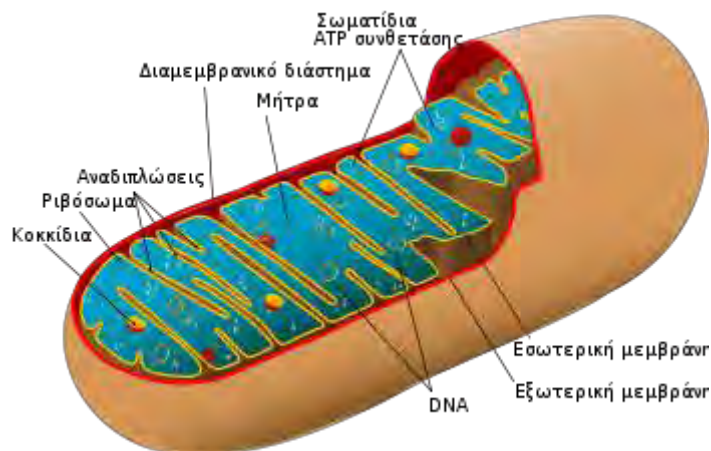
Το nDNA περιέχει τα γονίδια 0805X80, τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες για τα μεταβολικά μονοπάτια των μιτοχονδρίων καθώς και όλα τα ένζυμα που απαιτούνται για την βιογένεση των μιτοχονδρίων συμπεριλαμβανομένων της μιτοχονδριακής πολυμεράσης G (POLG), RNA πολυμεράσης, μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων, ριβοσωμικών πρωτεϊνών κ.τ.λ. Στην εικόνα 3 φαίνεται η δομή του mtDNA καθώς και η θέση των γονιδίων ενώ στην εικόνα 4 φαίνεται η χαρακτηριστική δομή που έχει το μιτοχόνδριο.

ΕΙΚΟΝΑ 3.Μιτοχονδριακό DNA



<https://el.wikipedia.org>

#### ΕΙΚΟΝΑ 4. Δομή μιτοχονδρίου



<https://el.wikipedia.org>

Τα μιτοχόνδρια επιτελούν 4 βασικές λειτουργίες στο κύτταρο: παρέχουν ενέργεια στο κύτταρο με μορφή ATP, παράγουν και ρυθμίζουν τα επίπεδα ROS, ρυθμίζουν το κυτταροπλασματικό  $Ca^{++}$  και ρυθμίζουν την απόπτωση μέσω των ποριών. Η ενεργειακή απόδοση βασίζεται στην κατανάλωση του υδρογόνου ως υδατάνθρακες και λιπαρά οξέα τα οποία αντιδρούν με το οξυγόνο για να παραχθεί νερό μέσω της OXPHOS. Η γλυκόζη διασπάται στο κυτταρόπλασμα σε πυροσταφυλικό οξύ μειώνοντας το κυτταροπλασματικό NAD σε NADH.

Το πυροσταφυλικό εισέρχεται στο μιτοχόνδριο και μέσω της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού μετατρέπεται σε μιτοχονδριακό ακετύλο-CoA, NADH και  $CO_2$ . Το ακετύλο-CoA εισέρχεται στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος (Krebs) που απομακρύνει τα υδρογόνα από τα οργανικά οξέα παράγοντας NADH +  $H^+$ . Τα λιπαρά οξέα οξειδώνονται πλήρως μέσα στο μιτοχόνδριο με β-οξείδωση παράγοντας ακετύλο-CoA, NADH και  $FADH_2$ .

Δύο  $e^-$  μεταφέρονται από από το NADH στην αφυδρογονάση του NADH (σύμπλοκο I). Ηλεκτρόνια από το σύμπλοκο I ή από τα ένζυμα που περιέχουν  $FADH$  όπως η ηλεκτρική αφυδρογονάση (SDH, σύμπλοκο II) μειώνουν την ουβικουινόνη (συνένζυμο  $Q_{10}$ ) τελικώς σε ουβικουινόλη ( $CoQH_2$ ). Τα  $e^-$  από το  $CoQH_2$  μεταφέρονται διαδοχικά στο σύμπλοκο III (bc1 σύμπλοκο), cyt c, σύμπλοκο IV (cytochrome c oxidase COX) και τελικά στο οξυγόνο για να δώσει νερό. Η ενέργεια που ελευθερώνεται καθώς τα  $e^-$  ρέουν προς τα κάτω στην αλυσίδα μεταφοράς  $e^-$  (ETC) χρησιμοποιείται για την άντληση πρωτονίων έξω από την εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου μέσω των

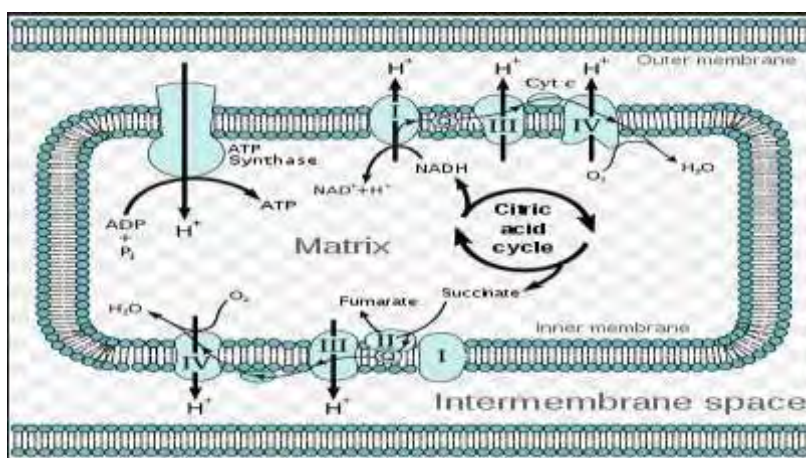


συμπλόκων I,III,IV.

Αυτό οδηγεί σε μία ηλεκτροχημική κλίση πρωτονίων που λειτουργεί σαν πυκνωτής ο οποίος είναι όξινος και θετικά φορτισμένος στον διαμεμβρανικό χώρο ενώ είναι βασικός και αρνητικά φορτισμένος στην πλευρά της μήτρας. Η ενέργεια που δεσμεύεται στην ηλεκτροχημική κλίση πρωτονίων συζευγνύεται με την μετατροπή του ADP σε ATP μέσω της ροής πρωτονίων μέσω της ATP συνθετάσης (σύμπλοκο V) πίσω στην μήτρα. Το ATP της μήτρας ανταλλάσσεται με το κυτταροπλασματικό ADP μέσω εσωμεμβρανικών μεταγωγέων νουκλεοτιδίων αδενίνης (ANT). Αυτή η ανταλλαγή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εισαγωγή πρωτεϊνών και Ca μέσα στο μιτοχόνδριο , παραγωγή θερμότητας και ρύθμιση του pH. Η αποτελεσματικότητα με την οποία τα μειωμένα διαιτητικά ισοδύναμα μετατρέπονται σε ATP μέσω της OXPHOS είναι γνωστή ως αποτελεσματικότητα σύζευξης. Αυτό καθορίζεται από την αποτελεσματικότητα με την οποία τα πρωτόνια αντλούνται έξω από την μήτρα από τα σύμπλοκα I,III και IV, την αποτελεσματικότητα της ροής πρωτονίων μέσω του συμπλόκου V που μετατρέπεται σε ATP και την αποτελεσματικότητα της ροής πρωτονίων διαμέσου της εσωτερικής μεμβράνης για άλλους λόγους. Αλλαγές σε μιτοχονδριακές πρωτεΐνες αλλάζουν την αποδοτικότητα της σύζευξης στην OXPHOS. Αυτό επηρεάζει έπειτα το ποσοστό των θερμίδων που καίγονται από τα μιτοχόνδρια και γίνεται παραγωγή ATP έναντι της παραγωγής θερμότητας με συνέπεια την παραγωγή ROS, πρόσληψη Ca11 και απόπτωση. Στην εικόνα 5 παρουσιάζονται οι βασικές λειτουργίες των μιτοχονδρίων με σκοπό την παραγωγή ενέργειας για τα κύτταρα.

[9]

EIKONA 5. Λειτουργίες μιτοχονδρίων



<https://el.wikipedia.org>

[15]

Τα μιτοχόνδρια είναι μητρικής προέλευσης αφού κατά την γονιμοποίηση τα σπερματοζώαρια δεν μεταβιβάζουν τα μιτοχόνδριά τους στο ωκύτταρο και παρατηρείται καταστροφή των πατρικών μιτοχονδρίων μετά την γονιμοποίηση. Έτσι το ζυγωτό περιέχει μόνο τα μητρικά μιτοχόνδρια. Κάθε άτομο κληρονομεί μόνο από την μητέρα του εκατοντάδες χιλιάδες αντίγραφα μιτοχονδριακών γονιδίων, οπότε μεταλλάξεις του mt DNA μεταβιβάζονται μόνο από την μητέρα σε όλους τους απογόνους.

Τα μιτοχονδριακά γονίδια περιέχουν πολύ λίγες αμετάφραστες περιοχές αφού περίπου το 93% του mtDNA κωδικοποιεί πρωτεΐνες. Επίσης στα μιτοχονδριακά γονίδια δεν περιέχονται ιντρόνια και το mtDNA δεν συσκευάζεται σε χρωματίνη οπότε δεν προστατεύεται από ιστόνες. Ο γενετικός κώδικας στα μιτοχόνδρια διαφέρει σε κάποιο βαθμό από τον γενετικό κώδικα του πυρήνα.

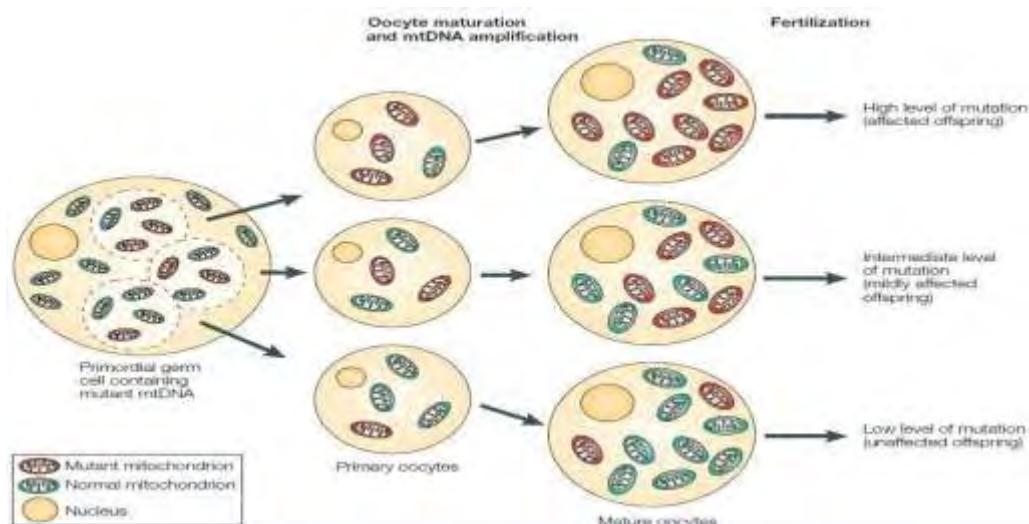
| <u>Πυρήνας</u> | <u>Μιτοχόνδρια</u> |
|----------------|--------------------|
| UGA -λήξης     | Trp                |
| AGA-Arg        | λήξης              |
| AGG-Arg        | λήξης              |
| AUA-Ile        | Met                |

Το mtDNA αντιγράφεται ανεξάρτητα από το πυρηνικό και δεν διαθέτει μηχανισμούς επιδιόρθωσης σε περίπτωση λάθους ενώ παρατηρείται επίσης συνεχής μεταγραφή πολλαπλών γονιδίων. Επίσης η απουσία ιστονών και η παραγωγή ελεύθερων δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) από την OXPHOS έχουν ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση μεταλλάξεων που πραγματοποιείται 10-17 φορές γρηγορότερα σε σχέση με το DNA του πυρήνα.

Στα φυσιολογικά άτομα το 99,9% των μορίων του mtDNA είναι πανομοιότυπα (ομοπλασμία). Εάν δημιουργηθεί όμως μία νέα μετάλλαξη κατά την αντιγραφή και κατ'επέκταση στην μίτωση του αρχικού κυττάρου τα μόρια mtDNA διαχωρίζονται με τυχαίο τρόπο στα δύο θυγατρικά κύτταρα οπότε παρατηρείται διαφορετικό ποσοστό μεταλλαγμένων μιτοχονδρίων μεταξύ των κυττάρων (ετεροπλασμία). Η αναλογία μεταλλαγμένου προς φυσιολογικό mtDNA που μεταβιβάζει η μητέρα σε κάθε απόγονο διαφέρει και καθορίζει και την σοβαρότητα της ασθένειας. Έτσι, μητέρα με ήπια συμπτώματα ενδέχεται να αποκτήσει απόγονο με σοβαρά ή καθόλου συμπτώματα. Καθώς το ποσοστό των μεταλλαγμένων mtDNAs αυξάνεται η ενεργειακή απόδοση των

μιτοχονδρίων μειώνεται. Όταν η παραγωγή ενέργειας είναι ανεπαρκής για την φυσιολογική λειτουργία του ιστού, υπάρχει ένα κατώτατο όριο (κατώφλι, ουδός) στο οποίο αρχίζουν να εμφανίζονται τα συμπτώματα και μπορεί να ξεκινήσει η απόπτωση ή η νέκρωση. Στην εικόνα 6 παρουσιάζεται το διαφορετικό ποσοστό των μεταλλαγμένων μιτοχονδρίων μεταξύ των κυττάρων (ετεροπλασμία). [10]

EIKONA 6.Ετεροπλασμία (Bottleneck effect)



Robert W. Taylor and Doug M. Turnbull, Nature Reviews, Genetics 2005

Ασθένειες που οφείλονται σε μεταλλάξεις του mtDNA έχουν συχνότητα εμφάνισης 1:8.500 γεννήσεις και συνήθως επηρεάζουν ιστούς που απαιτούν υψηλά ποσά ενέργειας όπως Κ.Ν.Σ, σκελετικούς μύες και καρδιακό μυ, νησίδια παγκρέατος, νεφρούς, ήπαρ. Πιθανόν υπάρχει ένας ελάχιστος κρίσιμος αριθμός (ουδός) μεταλλαγμένων mtDNAs στα κύτταρα πριν εμφανιστούν τα δυσλειτουργίες ιστών και κλινικά συμπτώματα. Έχει δημοσιευτεί μελέτη η οποία υποστηρίζει ότι η συσσώρευση ελλείψεων στο mtDNA σχετίζεται με την ηλικία, κάτι που θα αναφερθεί παρακάτω.

Έχουν αναγνωριστεί περισσότερες από 100 αναδιατάξεις και 50 αντικαταστάσεις. Υπάρχουν 3 βασικοί τύποι μεταλλάξεων: 1) οι μεταλλάξεις στις κωδικοποιούσες περιοχές γονιδίων που ρυθμίζουν την OXPHOS, 2) μεταλλάξεις αντικατάστασης σε γονίδια των tRNAs και rRNAs που ελαττώνουν την σύνθεση πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο και 3) αναδιατάξεις που δημιουργούν ελλείψεις ή διπλασιασμούς στο mtDNA. Οι σημαντικότερες παθήσεις που σχετίζονται με μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα της OXPHOS στο mtDNA είναι:

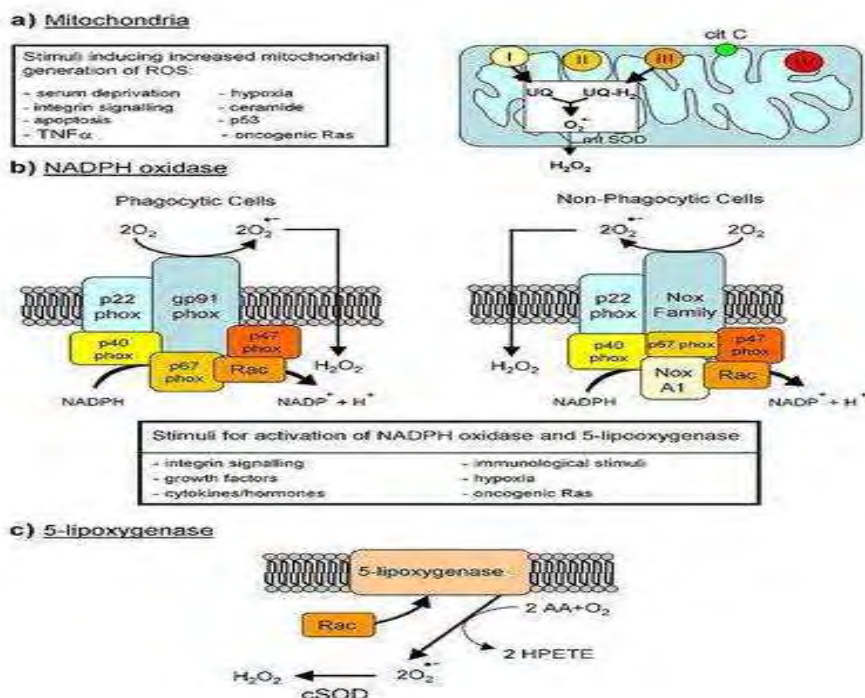
- 1) Leber's κληρονομική οπτική νευροπάθεια
- 2) Μυοκλωνική επιληψία (MERRF)
- 3) Μιτοχονδριακή εγκεφαλοπάθεια, οξέωση λακτικού και καρδιακά επεισόδια (MELAS)
- 4) Σύνδρομο Kearns-Sayre (KSS)
- 5) Σύνδρομο Leigh's
- 6) Ρευματικά αυτοάνοσα νοσήματα (αυτοάνοση ηπατίτιδα, οξεία αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα, προοδευτική συστηματική σκλήρυνση)

### 1.3 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ ΠΗΓΗ ROS ΚΑΙ ΓΗΡΑΝΣΗ

Οι ROS (ελεύθερες δραστικές ρίζες οξυγόνου) προέρχονται είτε από ενδογενείς παράγοντες είτε από εξωγενείς. Οι ενδογενείς πηγές ROS είναι κυρίως τα μιτοχόνδρια αλλά και τα υπεροξειδωμένα, μικροσώματα, οξειδωτικά ένζυμα, η φαγοκυττάρωση και οι πρωτεΐνες αίμης.

Οι κυριότερη πηγή ROS στον άνθρωπο είναι η διαρροή ενεργοποιημένου οξυγόνου από τα μιτοχόνδρια το οποίο φυσιολογικά σχηματίζεται ως ενδιάμεσο κατά την ΟΧΡΗΟΣ και η τελική του τύχη είναι ο σχηματισμός μορίων νερού. Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια καταναλώνει περίπου το 85% του οξυγόνου που χρειάζεται το κύτταρο. Περίπου το 1-5% του οξυγόνου που περνά μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων μετατρέπεται σε ROS ως παραπροϊόν. Στην εικόνα 7 παρουσιάζονται οι πηγές ROS στα κύτταρα.

## EIKONA 7.Μιτοχονδριακή πηγή ROS



<https://el.wikipedia.org>

Η αντιοξειδωτική άμυνα του ανθρώπου στηρίζεται στα αντιοξειδωτικά ένζυμα, στα προληπτικά αντιοξειδωτικά χήλωσης, στα προληπτικά αντιοξειδωτικά δέσμευσης ROS, στα αντιοξειδωτικά αδρανισμού ελεύθερων ριζών και στα επιδιορθωτικά και de novo ένζυμα.

1) Αντιοξειδωτικά ένζυμα: δρουν αποσυνθέτοντας το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και τα υδρουπεροξειδία. Εδώ ανήκουν η καταλάση, υπεροξειδάση γλουταθειόνης, υπεροξειδάση, S-τρανσφεράση.

2) Προληπτικά αντιοξειδωτικά χήλωσης: δρουν δεσμεύοντας και απομακρύνοντας μέταλλα. Εδώ ανήκουν η τρανσφερίνη, λακτοφερίνη που απομακρύνουν Fe, η απτοσφαιρίνη που απομακρύνει αιμοσφαιρίνη, η αιμοπηξίνη που απομακρύνει αίμη και η χαλκοπλασμίνη, αλβουμίνη που απομακρύνουν Cu.

3) Προληπτικά αντιοξειδωτικά δέσμευσης ROS: δρουν μετατρέποντας τις ROS. Εδώ ανήκουν η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) :  $2 O_2^{\cdot -} + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

Καροτενοειδή, βιταμίνη E που δεσμεύουν O<sub>2</sub>

4)Αντιοξειδωτικά αδρανοποίησης ελεύθερων ριζών: εδώ ανήκουν βιταμίνη C, ουρικό, χολερυθρίνη, αλβουμίνη που όλα αυτά έχουν υδρόφιλη δράση. Καθώς και βιταμίνη E, ουμπικινόλη, καροτενοειδή, φλαβονοειδή που έχουν λιποφιλική δράση.

5)Επιδιορθωτικά και de novo ένζυμα: επιδιορθώνουν βλάβες και ανασυγκροτούν τα μόρια στόχους.

Το οξειδωτικό στρες είναι η κατάσταση κατά την οποία η παραγωγή ROS δεν μπορεί να αντισταθμιστεί από τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς με αποτέλεσμα να αυξάνει το κυτταρικό οξειδωτικό φορτίο. Σχετίζεται με ασθένειες όπως: νευροεκφυλιστικές (Alzheimer's, Parkinson's), φλεγμονώδεις ασθένειες (ρευματοειδής αρθρίτιδα), καρδιαγγειακά νοσήματα, αλλεργίες, ανοσοανεπάρκειες, διαβήτης, γήρανση, καρκίνος. Επίσης, προκαλεί πρόωρη γήρανση (προγήρια). Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το σύνδρομο προγήριας Hutchinson Gilford που είναι σπάνιο (1:1.000.000 γεννήσεις) και εμφανίζεται προγήρια σε παιδιά που πεθαίνουν σε ηλικία περίπου 12 ετών. Τα αίτια ακόμα δεν έχουν απολύτως διαλευκανθεί. Τα παιδιά αυτά έχουν βραχύτερα τελομερή σε σχέση με τα φυσιολογικά που θεωρείται πιθανό αίτιο της ασθένειας. Το άλλο πιθανό αίτιο είναι μετάλλαξη σε γονίδιο με άγνωστη μέχρι τώρα λειτουργία το οποίο ενδέχεται να εμπλέκεται στην παρεμπόδιση της οξειδωτικής καταστροφής από τις ROS.

Το οξειδωτικό στρες είναι ένας από τους παράγοντες πρόωρης γήρανσης. Η συσσώρευση ROS προκαλεί γήρανση γεγονός που αποδεικνύεται και από το γεγονός ότι η οξειδωτική καταστροφή αυξάνεται γραμμικά ή εκθετικά με την αύξηση του προσδόκιμου της ηλικίας (lifespan). Επίσης το μεγαλύτερο προσδόκιμο ζωής σχετίζεται με χαμηλά επίπεδα οξειδωτικών παραγόντων ή υψηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών. [11]

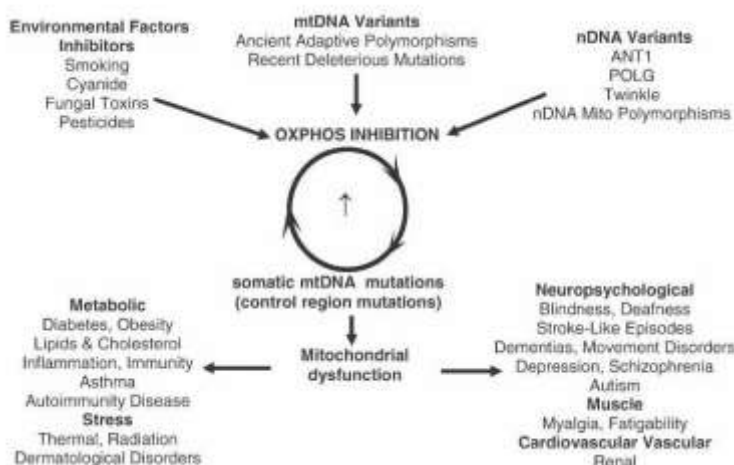
Σε μοντέλα ζώων συσχετίστηκαν τα επίπεδα της υπεροξειδάσης του ορού με το προσδόκιμο ζωής τους και βρέθηκε ότι τα υψηλότερα επίπεδα SOD και ουρικού οξέος συνδέονται με το αυξημένο προσδόκιμο ζωής. Επίσης, η αύξηση των αντιοξειδωτικών θα μπορούσε να επιβραδύνει τη γήρανση σε πειραματόζωα. Χορήγηση αντιοξειδωτικών οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα οξειδωτικής καταστροφής στον εγκέφαλο, ενώ αυτά τα πειραματόζωα παρουσίασαν επίσης αποτελεσματικότερη συμπεριφορά σε φαινόμενα σύγχυσης.

## 1.4 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA

Το mtDNA έχει υψηλό ρυθμό μεταξίγνεσης με τρεις κατηγορίες μεταλλάξεων που σχετίζονται με κλινικούς φαινοτύπους. Αυτές είναι 1) μεταλλάξεις των γεννητικών κυττάρων που έχουν ως αποτέλεσμα μιτοχονδριακές ασθένειες, 2) αρχαίες προσαρμοστικές μεταλλάξεις ένα υποσύνολο των οποίων επέτρεψε στο ανθρώπινο είδος να προσαρμοστεί, 3) σωματικές μεταλλάξεις που συσσωρεύονται με την ηλικία και ελαττώνουν την μιτοχονδριακή παραγωγή ενέργειας και σχετίζονται με γήρανση. Μεταλλάξεις σε γονίδια του πυρηνικού DNA (nuclear DNA-nDNA) που κωδικοποιούν ένζυμα της OXPHOS προκαλούν επίσης μιτοχονδριακές ασθένειες. Επιπλέον, αν συνδυαστούν μη παθογενείς μεταλλάξεις του nDNA και μεταλλάξεις γονιδίων του mtDNA ενδέχεται να είναι λειτουργικά μη συμβατές και να προκαλέσουν ασθένειες.

Μελέτες σε ποντίκια που έχουν επιβλαβείς μεταλλάξεις του mtDNA, έδειξαν ότι οι ωοθήκες των θηλαστικών εξαλείφουν επιλεκτικά τις πιο επιβλαβείς μεταλλάξεις του mtDNA. Ωστόσο, ηπιότερες μεταλλάξεις mtDNA μεταβιβάζονται από τα θηλυκά και εισάγονται στον γενικό πληθυσμό. Αυτό επιτρέπει στα είδη να προσαρμόζονται στις ενεργειακές μεταβολές του περιβάλλοντος. Στην εικόνα 8 παρουσιάζονται οι κατηγορίες μεταλλάξεων των γονιδίων του mtDNA και οι διαταραχές με τις οποίες σχετίζονται.

**ΕΙΚΟΝΑ 8.** Κατηγορίες μεταλλάξεων μιτοχονδριακών γονιδίων



Environmental and Molecular Mutagenesis 51:440-450(2010), www.interscience.wiley.com



Μεταλλάξεις σε γονίδια του mtDNA σχετίζονται με μεταβολικές και εκφυλιστικές ασθένειες, καρκίνο και γήρανση. Υπάρχουν περίπου 1500 γονίδια στο nDNA που κωδικοποιούν μόρια των μιτοχονδρίων και επιπλέον 37 γονίδια για παραγωγή ενέργειας μέσα στο mtDNA. Αναστολή της OXPHOS από μεταλλάξεις αυτών των μιτοχονδριακών γονιδίων ή από περιβαλλοντικούς ή/και φαρμακευτικούς παράγοντες οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή ROS που βαθμιαία οδηγούν σε μειωμένη ικανότητα παραγωγής ενέργειας από το μιτοχόνδριο και τελικά γήρανση ή/και καρκίνο. Δυσλειτουργία της OXPHOS πλήττει κυρίως όργανα με μεγάλες ενεργειακές απαιτήσεις όπως εγκέφαλος, καρδιά, σκελετικοί μύες, νεφροί και ενδοκρινικό σύστημα. Επίσης, διαταράσσεται η χρήση των θερμίδων που προσλαμβάνονται με αποτέλεσμα διαταραχές του μεταβολισμού όπως ο διαβήτης και η παχυσαρκία. Τέλος, η αυξημένη παραγωγή ROS προκαλεί κυτταρική τοξικότητα και εκδήλωση φλεγμονωδών ασθενειών. Μεταλλάξεις σε γονίδια του mtDNA :

1. *μεταλλάξεις των γεννητικών κυττάρων που έχουν ως αποτέλεσμα μιτοχονδριακές ασθένειες: παθογόνες μεταλλάξεις του mtDNA που περιλαμβάνουν μεταλλάξεις αναδιάταξης και υποκατάστασης βάσης.*

Μεταλλάξεις αναδιάταξης: μπορεί να είναι de novo μεταλλάξεις έλλειψης ή μητρικά κληρονομούμενες μεταλλάξεις ένθεσης σε μεταμιτωτικά κύτταρα. Οι περισσότερες ελλείψεις απομακρύνουν τουλάχιστον ένα tRNA και έτσι επηρεάζουν την πρωτεϊνοσύνθεση. Τα σύνδρομα που οφείλονται σε αναδιάταξη mtDNA είναι πάντα ετεροπλασμικά και οδηγούν σε εκδήλωση σειράς κλινικών συμπτωμάτων. Ο πιο ήπιος φαινότυπος αναδιάταξης mtDNA είναι ο μητρικά κληρονομικός διαβήτης τύπου II και η κώφωση. Πιο σοβαρή ομάδα ασθενειών αναδιάταξης mtDNA είναι η χρόνια προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία (CPEO) και το σύνδρομο Kearns-Sayre (KSS) που σχετίζεται με την οφθαλμοπληγία, και την μιτοχονδριακή μυοπάθεια με κόκκινες ίνες (RRFs). Η πιο σοβαρή ασθένεια αναδιάταξης είναι το σύνδρομο Pearson μυελού /παγκρέατος. Οι ασθενείς εμφανίζουν πανκυτοπενία νωρίς στη ζωή της και εξαρτώνται από μετάγγιση. Εάν επιβιώσουν εμφανίζουν τα συμπτώματα του KSS. Οι φαινοτυπικές διαφορές των μεταλλάξεων αναδιάταξης του mtDNA μπορεί να οφείλονται στην ποικιλία των ιστών που φέρουν την αναδιάταξη και το ποσοστό mtDNAs που φέρουν την αναδιάταξη σε κάθε ιστό.

Μεταλλάξεις υποκατάστασης βάσης στο mtDNA: αφορούν γονίδια πολυπεπτιδίων (πολυπεπτιδικές μεταλλάξεις), γονίδια rRNA και tRNA (μεταλλάξεις πρωτεϊνοσύνθεσης). Παθογόνες πολυπεπτιδικές μεταλλάξεις οφείλονται για ασθένειες



πολλών συστημάτων της LHON, σύνδρομο Leigh, και μιτοχονδριακή μυοπάθεια. Μεταλλάξεις πρωτεϊνοσύνθεσης οδηγούν σε MERRF, MELAS, εγκεφαλοπάθεια, μιτοχονδριακή μυοπάθεια, δυσανεξία στην άσκηση, CPEO και KSS, γαστρεντερικό σύνδρομο, δυστονία, διαβήτη, κώφωση, καρδιομυοπάθεια, νεφρική ανεπάρκεια, νόσο Alzheimer's, νόσο Parkinson's.

2. *αρχαίες προσαρμοστικές μεταλλάξεις*: λόγω της αυστηρής μητρικής κληρονόμησης το mtDNA εξελίσσεται μόνο μέσω της συσσώρευσης μεταλλάξεων. Εάν μία μετάλλαξη είναι ευεργετική για σε συγκεκριμένο περιβάλλον το mtDNA που την φέρει θα αυξηθεί με μεγάλη συχνότητα σε αυτό το περιβάλλον. Αυτό οδηγεί στην δημιουργία της ομάδας σχετικών απλοτύπων (haplogroup) που συγκεντρώνονται σε συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή (συσχέτιση με γεωγραφικό πλάτος και κλίμα). Τα 2/3 έως 3/4 όλων των αφρικανικών mtDNAs ανήκουν στο macrohaplogroup L, όλα τα ευρωπαϊκά στο N που περιέχει τα ευρωπαϊκά haplogroups H,I,J,UK,T,UV,W,X, τα ασιατικά στο M ή N που περιέχουν τα ασιατικά haplogroups A,C,D που είναι τα μόνα που εμπλουτίστηκαν στην Β.Α Σιβηρία και πέρασαν στην Αμερική. Αυτά τα αμερικανικά haplogroups ακολουθήθηκαν από haplogroups B και X. Η πρώτη απόδειξη ότι τα haplogroups του mtDNA μπορούν να τροποποιήσουν την γενετική προδιάθεση της νόσου ήταν η ανακάλυψη του ευρωπαϊκού haplogroup J που αυξάνει την διείσδυση των ηπιότερων μεταλλάξεων στη LHON. [12]

Αργότερα δείχθηκε ότι το haplogroup H σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο για ηλικιοεξαρτώμενο εκφυλισμό της ωχράς κηλίδας, ενώ τα haplogroups J και U σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για εκφυλισμό της ωχράς κηλίδας. Το haplogroup H σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για PD (Parkinson's disease) ενώ τα haplogroups J και K με μειωμένο κίνδυνο. Το haplogroup H σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για AD (Alzheimer's disease) ενώ τα U και Τα με μειωμένο. Το haplogroup J έχει σχετιστεί με μακροζωία σε Ευρωπαίους ενώ το D σε Ασιάτες. Το haplogroup J έχει σχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για διαβήτη σε ορισμένους Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς ενώ το N9a λειτουργεί προστατευτικά στον διαβήτη, μεταβολικό σύνδρομο, έμφραγμα του μυοκαρδίου σε Ασιάτες. Το haplogroup U έχει σχετιστεί με αυξημένα IgE αντισώματα στον ορό ενώ το H με προστασία στην σηψαιμία. Τα J και U5a σχετίζονται με ραγδαία εξέλιξη του AIDS ενώ τα H3, UK, I,W,X επιβραδύνουν την εξέλιξη του. Το H προστατεύει από λιποδυστροφία ενώ το Τα αυξάνει τον κίνδυνο για αυτήν. Τα haplogroups του mtDNA έχουν σχετιστεί με τις αθλητικές επιδόσεις λόγω της

[23]

διαφορετικής απόδοσης στην παραγωγή ATP. Συγκρίνοντας Φιλανδούς, Ισπανούς, Αιθίοπες και Κενυάτες δρομείς υπάρχει η ακόλουθη ιεραρχία στα haplogroups Lo>L1,L2,L3>I>H>U>J>UK. Τα macrohaplogroups N, ND3 np 10398 A115T και ATP6 np 8701 A59T επηρεάζουν την ενεργότητα του συμπλόκου I, το δυναμικό της μεμβράνης και την ρύθμιση του Ca<sup>++</sup>.

3. *σωματικές μεταλλάξεις που συσσωρεύονται με την ηλικία:* Αυξάνοντας τον ρυθμό μεταλλαξιγένεσης του mtDNA σε ποντίκια αυξάνεται ο ρυθμός γήρανσης ενώ μειώνοντας τον ρυθμό μεταλλαξιγένεσης εισάγοντας καταλάση μέσα στην μήτρα του μιτοχονδρίου αυξάνεται το προσδόκιμο ζωής (lifespan). Σωματικές μεταλλάξεις του mtDNA και μεταλλάξεις mtDNA σε γεννητικά κύτταρα έχουν αναφερθεί σε νεφρικό αδενοκαρκίνωμα, καρκίνο παχέος εντέρου, εγκεφάλου και λαιμού, αστροκυτταρικοί όγκοι, θυρεοειδούς, μαστού, προστάτη. Η αυξημένη παραγωγή ROS είναι εξάλλου παράγοντας καρκινογένεσης. Η εισαγωγή του μεταλλαγμένου γονιδίου ATP6T8993G σε κύτταρα προστάτη αυξάνει την παραγωγή ROS και την ανάπτυξη καρκίνου. Η παρουσία της μετάλλαξης ND6G13997A του mtDNA σε ποντίκια αυξάνει την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων καθώς και τη συσσώρευση ROS.

- Μεταλλάξεις σε γονίδια του πυρηνικού DNA (nDNA) που κωδικοποιούν ένζυμα της OXPHOS :

- Μεταλλάξεις των δομικών υπομονάδων των συμπλόκων I και II καθώς και στον παράγοντα συναρμολόγησης SURF1 του συμπλόκου IV μπορούν να προκαλέσουν σοβαρό ελάττωμα στην OXPHOS και να προκύψει το θανατηφόρο παιδικό σύνδρομο Leigh. Μεταλλάξεις στο γονίδιο polG (15q25) ή στο γονίδιο της ελικάσης (10q21) σχετίζονται με πολλαπλές ελλείψεις στο mtDNA και έχουν συνδεθεί με αυτοσωμική επικρατή ή αυτοσωμική υπολειπόμενη προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία (PEO). Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο της polG μπορούν να προκαλέσουν ευρύ φάσμα ασθενειών από ήπια μυοπάθεια σε θανατηφόρο σύνδρομο Alpers. Μεταλλάξεις στο ANT1 γονίδιο (14q34) μπορεί να αδρανοποιήσουν την πρωτεΐνη και να οδηγήσουν σε αυτοσωμική υπολειπόμενη μυοπάθεια και καρδιοπάθεια που σχετίζονται με πολλαπλές ελλείψεις στο mtDNA χωρίς PEO. Εντούτοις, άλλες μεταλλάξεις στο ANT1 ενεργούν ως επικρατείς και προκαλούν αυτοσωμική επικρατή PEO που σχετίζεται με συσσώρευση πολλαπλών ελλείψεων στο mtDNA. Μεταλλάξεις στο γονίδιο της κινάσης δεοξυγουανοσίνης (2q13) και στο γονίδιο της μιτοχονδριακής κινάσης της θυμιδίνης (16q21) προκαλούν αλλαγές στην υπομονάδα της ηλέκτρο-υλο-CoA συνθετάσης

(SUCLA2) και προκαλείται ήπια οξέωση, εγκεφαλομυοπάθεια τύπου Leigh, δυστονία και κώφωση σε συνδυασμό με ελλείψεις στο mtDNA. Μεταλλάξεις στο γονίδιο της φωσφορυλάση της θυμιδίνης (22q13) προκαλούν νευρογαστρεντερική εγκεφαλομυοπάθεια που σχετίζονται με ελλείψεις στο mtDNA. Μεταλλάξεις στο γονίδιο της μιτοχονδριακής πρωτεΐνης OPA1 (3q28-29) προκαλούν αυτοσωμική επικρατή οπτική ατροφία ενώ μεταλλάξεις του γονιδίου της mitofusin2 (1p36) οδηγούν σε περιφερική νευροπάθεια στο Charcot-Marie-Tooth2. Οι μιτοχονδριακές ασθένειες μπορούν, επίσης, να προκληθούν από μεταλλάξεις σε γονίδια των μεταβολικών πρωτεϊνών και του κύκλου Krebs καθώς και του συνενζύμου Q10.

- Μεταλλάξεις που οδηγούν σε ασθένειες αλληλεπίδρασης πυρήνα-κυτταροπλάσματος

- Ενώ έχει αποδειχθεί ότι μεταλλάξεις σε γονίδια του nDNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στην βιογένεση των μιτοχονδρίων οδηγούν σε μείωση του αριθμού των αντιγράφων του mtDNA, είναι πλέον σαφές ότι ασθένεια μπορεί να προκύψει και από αλληλεπίδραση γονιδίων του nDNA και γονιδίων του mtDNA που εντούτοις σχετίζονται με διαφορετικές λειτουργίες. Σε μία οικογένεια δύο σοβαρά προσβεβλημένα από εγκεφαλοπάθεια αρσενικά άτομα παρουσίασαν σχεδόν πλήρη απουσία του συμπλόκου I σε σκελετικούς μύες. Η γενετική ανάλυση παρουσίασε μία παραλλαγή στο nDNA στο X-συνδεδεμένο γονίδιο NDUFA1(G32R) του συμπλόκου I η οποία οδήγησε σε μείωση κατά 40% της ενεργότητας του συμπλόκου I. Επίσης εμφάνισαν δύο μεταλλάξεις που οδήγησαν σε απώλεια έκφρασης (missense) του mtDNA και η μία εντοπίστηκε στο γονίδιο ND1 (M21T) και η άλλη στο ND5 (M88T) οι οποίες σχετίστηκαν με μείωση κατά 30% της ενεργότητας του συμπλόκου I. Αφού το X χρωμόσωμα κληροδοτείται στα αρσενικά από την μητέρα και το mtDNA είναι μητρικής προέλευσης, παρατηρείται προδιάθεση για ασθένεια χωρίς να προκαλείται κλινικός φαινότυπος. Ωστόσο, όταν η μετάλλαξη στο mtDNA συνδυαστεί με την μετάλλαξη στο NDUFA1 καταλήγει σε πλήρη ανεπάρκεια του συμπλόκου I.

## 1.5 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Οι ασθένειες που οφείλονται σε μεταλλάξεις στο mtDNA επηρεάζουν πολλούς ιστούς και εμφανίζουν ποικιλία κλινικών συμπτωμάτων. Ομαδοποιώντας τα κλινικά χαρακτηριστικά υπάρχουν οι ακόλουθες ομάδες: Κλασικά σύνδρομα mtDNA, κλινικά σύνδρομα με υψηλό κίνδυνο μεταλλάξεων του mtDNA, συμμετοχή του mtDNA σε κοινές νόσους και ως προδιάθεση για κοινές ασθένειες αλλά και τη γήρανση. Σημαντική παράμετρος για μια πιθανή μιτοχονδριακή προέλευση των συμπτωμάτων σε πολλά άτομα περιλαμβάνει το ιστορικό στις μητέρες των οικογενειών, την ιστοχημική και βιοχημική ανάλυση για ακριβή προσδιορισμό του ελαττώματος στην αναπνευστική αλυσίδα, την ανάλυση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος για κοινές μεταλλάξεις και τέλος αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος για εύρεση σπάνιων ή νέων μεταλλάξεων. Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται τα κοινά χαρακτηριστικά των ασθενειών που σχετίζονται με το mtDNA.

### ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Κοινά χαρακτηριστικά ασθενειών σχετιζόμενων με mtDNA

| Box 1   Common features of mitochondrial DNA-associated diseases                                                                                               |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Adult</b>                                                                                                                                                   |
| • Neurological: migraine   strokes   epilepsy   dementia   myopathy   peripheral neuropathy   DIPLOPIA   ATAXIA   speech disturbances   sensorineural deafness |
| • Gastrointestinal: constipation   irritable bowel   DYSPHAGIA                                                                                                 |
| • Cardiac: heart failure   heart block   cardiomyopathy                                                                                                        |
| • Respiratory: respiratory failure   nocturnal hypoventilation   recurrent aspiration   pneumonia                                                              |
| • Endocrinal: diabetes   thyroid disease   parathyroid disease   ovarian failure                                                                               |
| • Ophthalmological: optic atrophy   cataract   ophthalmoplegia   PTOSIS                                                                                        |
| <b>Paediatric</b>                                                                                                                                              |
| • Neurological: epilepsy   myopathy   psychomotor retardation   ataxia   spasticity   DYSTONIA   sensorineural deafness                                        |
| • Gastrointestinal: vomiting   failure to thrive   dysphagia                                                                                                   |
| • Cardiac: biventricular hypertrophic cardiomyopathy   rhythm abnormalities                                                                                    |
| • Respiratory: central hypoventilation   apnoea                                                                                                                |
| • Haematological: anaemia   PANCYTOBAEMIA                                                                                                                      |
| • Renal: renal tubular defects                                                                                                                                 |
| • Liver: hepatic failure                                                                                                                                       |
| • Endocrinal: diabetes   adrenal failure                                                                                                                       |
| • Ophthalmological: optic atrophy                                                                                                                              |

Robert W. Taylor and Doug M. Turnbull, Nature Reviews Genetics 2005

Κλασικά σύνδρομα mtDNA : μεταλλάξεις στο mtDNA περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1988 για το σύνδρομο Kearns-Sayre (KSS) και LHON. Στο KSS σποραδικές ελλείψεις στο mtDNA εντοπίστηκαν σε βιοψία μυών και δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων σε αυτούς. Στην LHON (οπτική νευροπάθεια) αποδείχτηκε μητρική κληρονομικότητα και σημειακές μεταλλάξεις στα γονίδια της οικογένειας ND που

κωδικοποιούν υπομονάδες του συμπλόκου I.

Κλινικά σύνδρομα με υψηλό κίνδυνο μεταλλάξεων του mtDNA : την προηγούμενη δεκαετία αναγνωρίστηκαν κλινικά σύνδρομα που ίσως σχετίζονται με μεταλλάξεις στο mtDNA. Η προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία, το σύνδρομο Pearson, το σύνδρομο Leigh, μυικός πόνος επαγόμενος από άσκηση, κόπωση και ραβδομύλωση και αμινο-γλυκοσυλοεπαγόμενη απώλεια ακοής. Για μερικές από αυτές τις ασθένειες όπως την προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία διαταραχή στο mtDNA είναι η κύρια αιτία, ενώ για το σύνδρομο Leigh υπάρχουν πολλά γενετικά αίτια.

Συμμετοχή του mtDNA σε κοινές νόσους :το πιο κοινό μεταβολικό νόσημα ο διαβήτης σχετίζεται με διαταραχή στο mtDNA όπου εμπλέκονται πολλά είδη μεταλλάξεων. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ξεκάθαρη σχέση μεταξύ μελών οικογένειας που φέρουν ομοπλασμική μιτοχονδριακή μετάλλαξη στο tRNA και στο μεταβολικό σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από υπέρταση, υπομαγνησιαιμία και υπερχοληστερολαιμία. Η διάγνωση των σχετιζόμενων με μιτοχονδριακές μεταλλάξεις ασθενειών είναι δύσκολη γιατί εμπλέκονται πολλά κλινικά συμπτώματα, όπως στο διαβήτη που συχνά συνοδεύεται από κώφωση και τα εγκεφαλικά επεισόδια ενώ συνήθως σχετίζεται και με συμπτώματα ημικρανίας.

Παραλλαγές στο mtDNA που προδιαθέτουν για κοινές ασθένειες: η παραλλαγή 16189 που εμφανίζει πολλές C στην μη κωδική περιοχή ελέγχου (CR) του mtDNA έχει σχετιστεί με ευαισθησία στην καρδιομυοπάθεια και στον διαβήτη τύπου 2. Αυτή η παραλλαγή εμφανίζεται συχνά στους πληθυσμούς. Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται τα κριτήρια αναγνώρισης των ασθενειών που οφείλονται σε μεταλλάξεις στο mtDNA ενώ στον πίνακα 4 οι κλινικές διαταραχές.

### ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Κριτήρια αναγνώρισης mtDNA ασθενειών

| <b>Box 2   Guidelines for the recognition of patients with mitochondrial DNA disease</b>                                                                                                                                                                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A list of the clinical guidelines that have been generated from our experience of investigating and managing patients with mtDNA mutations.                                                                                                               |
| • Maternal inheritance                                                                                                                                                                                                                                    |
| • Recognition of classic syndromes; for example, mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) or chronic progressive external ophthalmoplegia (CPEO)                                                          |
| • Recognition of characteristic clinical features; for example, biventricular cardiac hypertrophy                                                                                                                                                         |
| • Involvement of many organ systems; for example, diabetes and deafness                                                                                                                                                                                   |
| • Specific combinations of symptoms; for example, strokes and migraine and seizures and ataxia                                                                                                                                                            |
| • Abnormal clinical or laboratory investigations; for example, lactic acidemia in children, characteristic magnetic-resonance-imaging findings, abnormal muscle biopsy that is associated with ragged red fibres or cytochrome c oxidase-deficient fibres |

Robert W. Taylor and Doug M. Turnbull, Nature Reviews Genetics 2005

## ΠΙΝΑΚΑΣ 4. Κλινικές διαταραχές που οφείλονται σε μεταλλάξεις του mtDNA

| Table 2   Clinical disorders that are caused by mutations in mitochondrial DNA |                                                                 |                                |                       |                        |                  |           |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------|------------------------|------------------|-----------|
| Mitochondrial DNA disorder                                                     | Clinical phenotype                                              | mtDNA genotype                 | Gene                  | Status                 | Inheritance      | Reference |
| Keams-Sayre syndrome                                                           | Progressive myopathy, ophthalmoplegia, cardiomyopathy           | A single, large-scale deletion | Several deleted genes | Heteroplasmic          | Usually sporadic | 61,158    |
| CPEO                                                                           | Ophthalmoplegia                                                 | A single, large-scale deletion | Several deleted genes | Heteroplasmic          | Usually sporadic | 61, 64    |
| Pearson syndrome                                                               | Pancytopenia, lactic acidosis                                   | A single, large-scale deletion | Several deleted genes | Heteroplasmic          | Usually sporadic | 65        |
| MELAS                                                                          | Myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes | 3243A>G;                       | <i>TRNL1</i>          | Heteroplasmic          | Maternal         | 169       |
|                                                                                |                                                                 | 3271T>C                        | <i>ND1 and ND5</i>    | Heteroplasmic          | Maternal         | 160, 161  |
| MERRF                                                                          | Myoclonic epilepsy, myopathy                                    | 8344A>G;                       | <i>TRNK</i>           | Heteroplasmic          | Maternal         | 162       |
| NARP                                                                           | Neuropathy, ataxia, retinitis pigmentosa                        | 8993T>G                        | <i>ATP6</i>           | Heteroplasmic          | Maternal         | 163       |
| MILS                                                                           | Progressive brain-stem disorder                                 | 8993T>C                        | <i>ATP6</i>           | Heteroplasmic          | Maternal         | 67        |
| MIDD                                                                           | Diabetes, deafness                                              | 3243A>G                        | <i>TRNL1</i>          | Heteroplasmic          | Maternal         | 164       |
| LHON                                                                           | Optic neuropathy                                                | 3460G>A                        | <i>ND1</i>            | Hetero- or homoplasmic | Maternal         | 165       |
|                                                                                |                                                                 | 11778G>A                       | <i>ND4</i>            | Hetero- or homoplasmic | Maternal         | 62        |
|                                                                                |                                                                 | 14484T>C                       | <i>ND6</i>            | Hetero- or homoplasmic | Maternal         | 166       |
| Myopathy and diabetes                                                          | Myopathy, weakness, diabetes                                    | 14709T>C                       | <i>TRNE</i>           | Hetero- or homoplasmic | Maternal         | 167, 168  |
| Sensorineural hearing loss                                                     | Deafness                                                        | 1555A>G                        | <i>RNR1</i>           | Homoplasmic            | Maternal         | 65        |
|                                                                                |                                                                 |                                | <i>TRNS1</i>          | Hetero- or homoplasmic | Maternal         | 169, 170  |
| Exercise intolerance                                                           | Fatigue, muscle weakness                                        | Individual mutations           | <i>CYB</i>            | Heteroplasmic          | Sporadic         | 68        |
| Fatal, infantile encephalopathy; Leigh/Leigh-like syndrome                     | Encephalopathy, lactic acidosis                                 | 10158T>C;                      | <i>ND3</i>            | Heteroplasmic          | Sporadic         | 66        |
|                                                                                |                                                                 | 10191T>C                       |                       |                        |                  |           |

Robert W. Taylor and Doug M. Turnbull, Nature Reviews Genetics 2005

Έλλειμμα 4.977 ζευγών βάσεων στο mtDNA που εντοπίζεται μεταξύ των νουκλεοτιδίων 8.469 και 13.447 έχει αναφερθεί σε ποικίλες ασθένειες και συσσωρεύεται με την ηλικία. Αυτό αφορά τα γονίδια που κωδικοποιούν την ATPase6, ATPase8, κυτοχρωμική οξειδάση III, υπομονάδα 3της αφυδρογονάσης του NADH (ND3), ND4, υπομονάδα L της ND4, και ND5. Κύτταρα που έχουν το συγκεκριμένο έλλειμμα χάνουν την λειτουργικότητα γονιδίων που εμπλέκονται στην OXPHOS και οδηγούνται σε μία γενική μείωση ενέργειας ειδικά στον εγκέφαλο και στους μυς. Ύστερα από ανάλυση του αριθμού των αντιγράφων του mtDNA σε λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος με PCR βρέθηκε συσσώρευση αριθμού αντιγράφων του ελλείμματος 4.977 του mtDNA με την ηλικία, η αυξημένη αναλογία αντιγράφων και ο αριθμός αντιγράφων του ελλείμματος 4.977 του mtDNA σχετίζονται με την σοβαρότητα της ασθένειας και τέλος το έλλειμμα 4.977 επηρεάζει περισσότερο ασθενείς με συμπτώματα στα οποία εμπλέκονται τρία ή περισσότερα όργανα. [13]

Στην συγκεκριμένη έρευνα βρέθηκε ότι σε φυσιολογικά άτομα ηλικίας 10-20 ετών υπήρχε μεγαλύτερος αριθμός αντιγράφων του ελλείμματος 4.977 του mtDNA ανά

[28]

κύτταρο σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα νεότερης ηλικίας 0-10 ετών. Σε ασθενείς με μιτοχονδριακές ασθένειες οι πιο ηλικιωμένοι ασθενείς είχαν ,επίσης, μεγαλύτερο αριθμό αντιγράφων του συγκεκριμένου ελλείμματος σε σχέση με τους νεότερους ασθενείς. Όμως, ο συνολικός αριθμός αντιγράφων mtDNA ανά κύτταρο δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ηλικιακά μεγαλύτερων και μικρότερων ασθενών. Στον πίνακα 5 παρουσιάζονται οι διαφορές στον συνολικό αριθμό αντιγράφων, στον αριθμό ελλειμμάτων και στον ρυθμό ελλειμμάτων του mtDNA σε ασθενείς με μιτοχονδριακή ασθένεια.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.** Διαφορές σε συνολικό αριθμό αντιγράφων mtDNA, αριθμό ελλειμμάτων 4.977 mtDNA και ρυθμό ελλειμμάτων 4.977 του mtDNA στο συνολικό DNA σε ασθενείς με μιτοχονδριακή ασθένεια (MCD) και σε υγιή δείγματα.

Table 5. Differences in total mtDNA copy number, ΔmtDNA<sup>4977</sup> copy number, and the ratio ΔmtDNA<sup>4977</sup> to total mtDNA in patients with mitochondrial disease (MCD) and healthy controls.

|                                                            | 0 < age (years) < 10 |             |       |        | 10 ≤ age (years) < 20 |             |       |        |
|------------------------------------------------------------|----------------------|-------------|-------|--------|-----------------------|-------------|-------|--------|
|                                                            | MCD                  | Controls    | t     | p      | MCD                   | Controls    | t     | p      |
| N                                                          | 135                  | 70          |       |        | 25                    | 31          |       |        |
| ΔmtDNA <sup>4977</sup> copy number /10 <sup>6</sup> cells* | 2.79 ± 0.50          | 1.70 ± 0.65 | -4.50 | <0.001 | 2.97 ± 0.48           | 2.60 ± 0.41 | -3.67 | <0.01  |
| total mtDNA copy number /cell*                             | 2.07 ± 0.39          | 1.76 ± 0.51 | 12.26 | <0.001 | 1.96 ± 0.50           | 2.21 ± 0.46 | 3.13  | <0.01  |
| proportion of ΔmtDNA <sup>4977</sup> (%)**                 | 0.12 ± 0.19          | 0.02 ± 0.03 | 5.85  | <0.001 | 0.37 ± 0.54           | 0.04 ± 0.05 | 2.98  | <0.001 |

\*Data are presented as (log) means ± SD.  
 \*\*Data are presented as means ± SD.

doi:10.1371/journal.pone.0128624.t005

2015 Zhang et al.,doi:10.1371/journal.pone.0128624

Η αυξημένη αναλογία ελλειμμάτων 4.977 του mtDNA σε ασθενείς με μιτοχονδριακή ασθένεια σε σχέση με τους υγιείς σχετίζεται με την σοβαρότητα της ασθένειας. Τα κυριότερα κλινικά χαρακτηριστικά σε νεαρούς ασθενείς με μιτοχονδριακές ασθένειες είναι : επιληψία (73,3%) ,μυοπάθεια (36,3%), οξείδωση γαλακτικού (29,6%), νανισμός (22,2%), παρεμπόδιση ανάπτυξης (21,5%) και πνευματικά ή ψυχολογικά συμπτώματα (10,4%). Στους μεγαλύτερους ηλικιακά ασθενείς τα κυριότερα συμπτώματα ήταν : επιληψία (68%), μυοπάθεια (52%), οξείδωση γαλακτικού (32%), απώλεια όρασης (28%), νανισμός (20%), καθυστέρηση ανάπτυξης (20%), πνευματικά ή ψυχολογικά συμπτώματα (12%) και έμετος/διάρροια/δυσκοιλιότητα (12%). Στους νεαρότερους ασθενείς η αναλογία του ελλείμματος 4.977 του mtDNA σχετίζεται θετικά με καθυστερημένη ανάπτυξη και οξείδωση του γαλακτικού, ενώ στους μεγαλύτερους ηλικιακά ασθενείς σχετίζεται

[29]



θετικά με πνευματικά/ψυχολογικά συμπτώματα και έμετο/διάρροια/δυσκοιλιότητα. Στον πίνακα 6 παρουσιάζονται οι συχνότητες των χαρακτηριστικών των μιτοχονδριακών ασθενειών σε ασθενείς μικρότερης και μεγαλύτερης ηλικίας.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 6.** Συχνότητες κλινικών χαρακτηριστικών σε νεότερους και μεγαλύτερους ηλικιακά ασθενείς μιτοχονδριακών ασθενειών.

Table Clinical manifestation frequencies in younger and older patients of mitochondrial diseases.

| Involved organ   | Clinical manifestation                        | Severity <sup>a</sup> |          |        | Total frequency (%) <sup>b</sup> |
|------------------|-----------------------------------------------|-----------------------|----------|--------|----------------------------------|
|                  |                                               | Mild                  | Moderate | Severe |                                  |
| Muscle           | Myopathy                                      | 13/5                  | 21/4     | 15/4   | 36.3/52.0                        |
| Renal            | Renal function tests                          | 4/1                   | 3/1      | 0/0    | 5.2/8.0                          |
| Gastrointestinal | Unexplained vomiting/ diarrheal/ constipation | 5/2                   | 4/1      | 1/0    | 7.4/12.0                         |
| Liver            | Liver function tests                          | 3/2                   | 1/0      | 0/0    | 3.0/6.0                          |
| Cardiovascular   | ECG changes/ Arrhythmia                       | 5/0                   | 3/2      | 0/0    | 5.9/8.0                          |
| Endocrine        | Blood glucose                                 | 6/0                   | 5/0      | 0/0    | 8.1/8.0                          |
| Respiratory      | Respiratory pattern                           | 4/1                   | 3/1      | 1/0    | 5.9/8.0                          |
| Eyes             | Vision                                        | 1/1                   | 2/3      | 4/3    | 5.2/25.0                         |
|                  | Pupils and eye movement                       | 3/1                   | 4/1      | 2/1    | 6.7/12.0                         |
| Ear              | Hearing                                       | 1/0                   | 0/0      | 1/2    | 1.5/8.0                          |
| Blood            | Anemia (Pancytopenia)                         | 3/2                   | 2/0      | 0/0    | 3.7/8.0                          |
| Brain            | Seizure                                       | 36/4                  | 32/8     | 41/5   | 73.3/88.0                        |
|                  | Development regression <sup>c</sup>           |                       |          |        | 21.5/20.0                        |
|                  | Globally development delay (including growth) | 5/0                   | 6/2      | 19/3   | 22.2/20.0                        |
|                  | Abscis <sup>d</sup>                           |                       |          |        | 5.9/8.0                          |
|                  | Mental or psychological problems <sup>e</sup> |                       |          |        | 10.4/12.0                        |
| Other            | Lactic acidosis <sup>f</sup>                  |                       |          |        | 29.4/32.0                        |

<sup>a</sup>. The results for the younger and older patient groups are indicated before and after the "/" symbol, respectively.  
<sup>b</sup>. The manifestations did not contribute to severity determination.  
<sup>c</sup>. In 15/17 (88%) patients.  
<sup>d</sup>. In 15/17 (88%) patients.  
<sup>e</sup>. In 15/17 (88%) patients.  
<sup>f</sup>. In 15/17 (88%) patients.

2015 Zhang et al.,doi:10.1371/journal.pone.0128624

Η αθηροσκλήρωση είναι μία ασθένεια που επηρεάζει τις αρτηρίες και χαρακτηρίζεται από σχηματισμό αθηρωσκληρωτικών πλακών όταν συσσωρεύονται λιπίδια στο ενδοθήλιο προκαλώντας καταστροφή και δυσλειτουργία. Τα λιπίδια είναι επιρρεπή σε οξειδωτική τροποποίηση από τις ROS και λειτουργούν ως φλεγμονώδες ερέθισμα προσελκύοντας λευκοκύτταρα στην περιοχή. Τα μακροφάγα που φτάνουν στην περιοχή εγκοιλώνουν τα οξειδωμένα λιπίδια και απελευθερώνουν φλεγμονώδεις παράγοντες οι οποίοι προκαλούν την μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων (VSMCS). Τα VSMCS είναι σημαντικά για την σταθερότητα της πλάκας γιατί εκκρίνουν εξωκυττάρια ουσία η οποία σχηματίζει ένα ινώδες κάλυμμα. Όμως η καταστροφή των VSMCS, η λέπτυνση του καλύμματος και η μεταγενέστερη ευαισθησία της πλάκας ίσως επάγονται από την φλεγμονή. Η φλεγμονή, ο κυτταρικός θάνατος και το οξειδωτικό στρες οδηγούν σε ευαισθησία της πλάκας.

Επειδή η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία μπορεί να προάγει την προ-αθηρωματική διαδικασία, η καταστροφή των μιτοχονδρίων έχει εμπλακεί στην αθηρογένεση και περιλαμβάνει και καταστροφή του mtDNA. Βλάβες στο mtDNA βρέθηκαν στα κύτταρα του κυκλοφορικού και σε καρδιακά κύτταρα ασθενών με

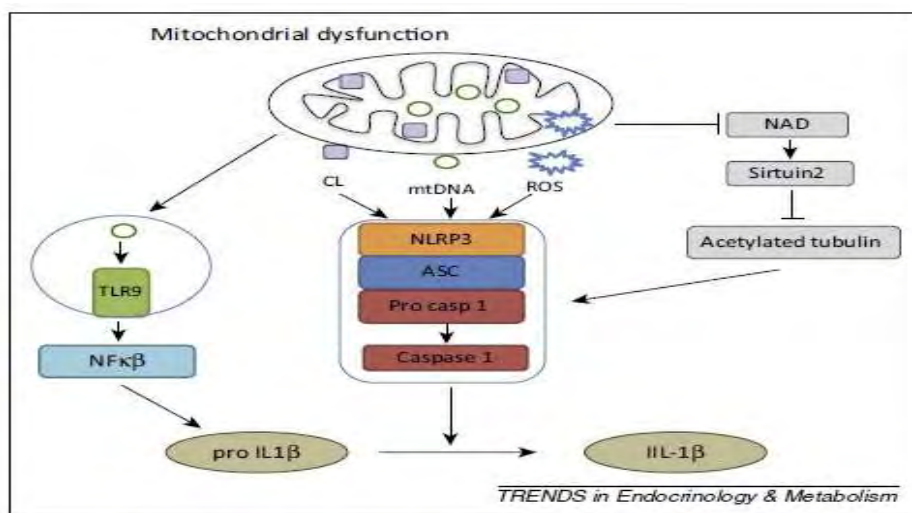
[30]



στεφανιαία νόσο γεγονός που συμβάλλει στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης. Η καταστροφή του mtDNA είναι πρώιμο γεγονός της αθηρογένεσης ενώ κατόπιν σε συνδυασμό με την μιτοχονδριακή δυσλειτουργία παρουσιάζουν ένα μοντέλο αθηροσκλήρωσης και μεταβολικού συνδρόμου.

Μελέτες σε ποντίκια που παρουσιάζουν βλάβες στο mt DNA κωδικοποιούν μία μεταλλαγμένη mtDNA πολυμεράση που παίζει ρόλο στην πρόκληση σημειακών μεταλλάξεων και ελλειμμάτων στο mtDNA. Τα ποντίκια εμφανίζουν ηλικιωμένο φαινότυπο, με κύφωση, αναιμία και απώλεια βάρους. Επίσης, έχουν απώλεια της απολιποπρωτεΐνης E που δείχνει ότι η βλάβη στο mtDNA προάγει αθηροσκλήρωση και ευαισθησία στην πλάκα και αυτό μπορεί να συμβεί και χωρίς καμία αύξηση των ROS. Σε αντίθεση, η απόπτωση των VSMC και των μονοκυττάρων εκθέτουν ένα προ-φλεγμονώδες προφίλ. Στην εικόνα 9 παρουσιάζεται ο μηχανισμός που συνδέει την δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων με την φλεγμονή, ενώ στην εικόνα 10 φαίνεται ο ρόλος των μιτοχονδρίων στον κυτταρικό θάνατο.

ΕΙΚΟΝΑ 9 .Μηχανισμός που συνδέει μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και φλεγμονή.

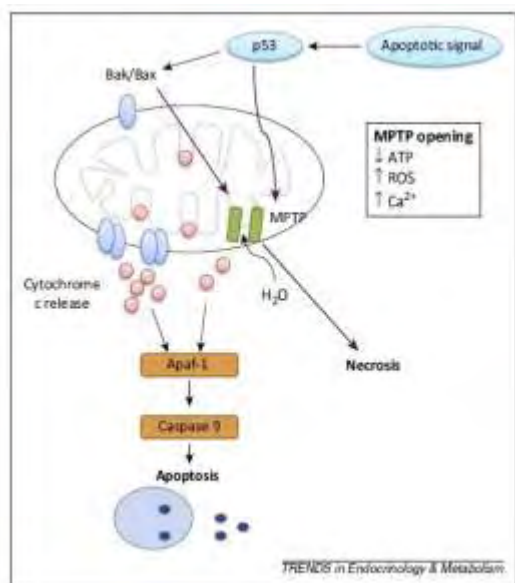


**Mechanisms linking mitochondrial dysfunction and inflammation.** The NLRP3 inflammasome is a multiprotein complex comprising NLRP3, the adapter protein ASC, and pro-caspase 1 (pro casp 1). Once activated, caspase 1 cleaves pro-interleukin 1 beta (IL-1β) into its mature form. Dysfunctional mitochondria generate reactive oxygen species (ROS), externalise cardiolipin (CL), and release mitochondrial DNA (mtDNA), all of which can activate NLRP3. NAD/NADH levels are also decreased, leading to decreased sirtuin 2 activity and the accumulation of α-acetylated tubulin, which promotes NLRP3 and ASC colocalisation. mtDNA also contains significant amounts of unmethylated DNA as CpG islands, which activate nuclear factor kappa B (NFκB) signalling and increased cytokine expression through Toll-like receptor 9 (TLR9).

Trends in Endocrinology and Metabolism September 2014, Vol.25, No.9

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2014.06.008>

## EIKONA 10. Μιτοχονδριακή ρύθμιση κυτταρικού θανάτου



Mitochondrial regulation of cell death. Apoptotic stimuli converge on Bax and Bak, which oligomerise to form pores that mediate mitochondrial outer membrane permeabilisation. Cytochrome c is released from the intermembrane space and binds with the adapter protein Apaf-1 to activate caspase 9. The ensuing caspase cascade leads to apoptosis. Apoptosis can be amplified by the opening of mitochondrial permeability transition pores (MPTPs), which allows entry of water and solutes (<1.5 kDa). Mitochondrial swelling leads to rupture of the outer mitochondrial membrane and cytochrome c release; however, prolonged MPTP opening results in collapse of oxidative phosphorylation and necrosis. MPTP opening is increased in conditions associated with mitochondrial dysfunction including increased reactive oxygen species and depletion of ATP. The proapoptotic signals Bax and p53 also promote MPTP opening.

Trends in Endocrinology and Metabolism September 2014, Vol.25, No.9 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2014.06.008>

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία διακόπτει τον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων μέσω του FGF21 (Fibroblaste Growth Factor 21) μιας ορμόνης που ρυθμίζει την λιπόλυση. Μυϊκές ίνες από ποντίκι και άνθρωπο που έχουν ελαττωματική απελευθέρωση FGF21 οδηγούν σε κινητοποίηση των λιπιδίων από τα αδιποκύτταρα. Αυτή η λιπόλυση σχετίζεται με μειωμένη μάζα λίπους αλλά αυξημένη γλυκερόλη ορού και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Παρομοίως, μεταλλαγμένα ποντίκια που είχαν έλλειψη της απολιποπρωτεΐνης E έδειξαν μειωμένη μάζα λίπους αλλά παρουσίασαν προαθηρωματική υπερχοληστερολαιμία.

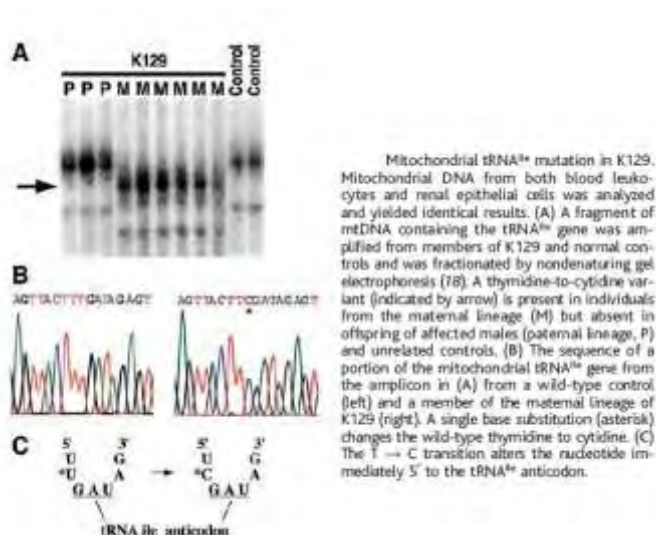
Συμπερασματικά, εάν τα επίπεδα καταστροφής ή δυσλειτουργίας του mtDNA κατακλύζουν τις προστατευτικές αντιοξειδωτικές διαδικασίες τότε γίνεται μιτοφαγία που λειτουργεί προστατευτικά για το μιτοχόνδριο. Τα δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια καθαρίζονται από το κύτταρο με διαβάθμιση από το λυσόσωμα και τα συστατικά τους ανακυκλώνονται για επόμενη χρήση. Για να αρχίσει η μιτοφαγία τα δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια συσσωρεύουν την PINK 1 (Induce Putative Kinase 1) που είναι ομόλοση φωσφατάσης και τενσίνης (PTEN) στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Η Parkin συστατικό του συμπλόκου της E3 λιγάσης ουβικουιτίνης, ακολούθως προσλαμβάνεται από την mitofusin 2 και ουβικουιτινώνει πολλές πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένου της VDAC ώστε να μαρκάρει τα μιτοχόνδρια για αυτοφαγική

[32]

διαβάθμιση. Όλο αυτό το μονοπάτι ίσως αποτελέσει χρήσιμο θεραπευτικό στόχο για την θεραπεία της αθηροσκλήρωσης. [14]

Η υπέρταση και δυσλιπιδαιμία αποτελούν παράγοντες κινδύνου για αθηροσκλήρωση, καρδιαγγειακά νοσήματα, έμφραγμα του μυοκαρδίου, καρδιακή ανεπάρκεια και συνήθως εμφανίζονται μαζί. Ανάλυση του μιτοχondριακού γονιδιώματος μητρικής σειράς έδειξε μία ομοπλασμική μετάλλαξη αντικατάστασης C σε U στο 5' άκρο του μιτοχondριακού αντικωδικονίου του tRNA που μεταφέρει την Ile, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 11. Η ύπαρξη U σε αυτή την θέση είναι από τις πιο συντηρημένες βάσεις ( 96% ανάμεσα σε 4.300 tRNAs σε όλα τα είδη). Η συντήρηση της U εξηγείται από την δομή του tRNA. Η θηλιά του αντικωδικονίου είναι αποτέλεσμα στροφής στον φωσφοδιεστερικό σκελετό επιτρέποντας την παρουσίαση του αντικωδικονίου στο κωδικόνιο του mRNA στο ριβόσωμα. Αυτή η στροφή σταθεροποιείται από δεσμό υδρογόνου μεταξύ της αμινομάδας της συντηρημένης U και της φωσφορικού σκελετού της τρίτης βάσης του αντικωδικονίου. Η C χάνει την αμινομάδα και δεν μπορεί να σχηματίσει αυτόν τον δεσμό υδρογόνου. Η αντικατάσταση της C σε U σε αυτή την θέση εμποδίζει την πρόσδεση του ριβοσώματος. Επίσης, η απώλεια της μιτοχondριακής λειτουργίας με την γήρανση σε συνδυασμό με το προηγούμενο προκαλούν επιπτώσεις για τις συνήθειες μεταβολικές διαταραχές.

EIKONA 11. Μετάλλαξη στο μιτοχondριακό tRNA της Ile στη μητρική σειρά K129.



12 November 2004, Vol 306, Science [www.sciencemag.org](http://www.sciencemag.org)

[33]

Ο διαβήτης είναι ένα από τα χαρακτηριστικά του MS. Συνήθως εμφανίζεται μέσω του τύπου 1 και 2 ανάλογα την σοβαρότητα της ινσουλινοπενίας. Εκτός από αυτούς μεταλλάξεις γονιδίων εμφανίζουν υψηλή πιθανότητα εμφάνισης διαβήτη στους φορείς τους κατά την διάρκεια της ζωής τους. Αυτοί οι μονογονιδιακοί τύποι διαβήτη περιλαμβάνουν τους τύπους διαβήτη «ώριμο διαβήτη των νέων» που είναι ο MODY (4) και ο μιτοχονδριακός που επίσης ονομάζονται «μητρικής κληρονομικότητας διαβήτη και κώφωση». Ο μιτοχονδριακός διακρίνεται από τον MODY λόγω της μητρικής κληρονομιάς σε συνδυασμό με την απώλεια ακοής στους περισσότερους φορείς (μέτρηση με ακοόμετρο μη αντίληψη ήχων πάνω από 5 Hz). Επίσης, στους φορείς της μετάλλαξης παρατηρούνται αλλαγές στον χρωματισμό του αμφιβληστροειδούς χιτώνα. Τα κύτταρα του βλεννογόνου του στόματος παρουσιάζουν 1,7 φορές μεγαλύτερη ετεροπλασμία σε σχέση με τα λευκοκύτταρα και γι' αυτό επιλέγονται για την μελέτη της μετάλλαξης. Κανονικά η μετάλλαξη ανιχνεύεται σε ασθενείς με μιτοχονδριακή μυοπάθεια, εγκεφαλοπάθεια, οξειδωτική του γαλακτικού και καρδιακά επεισόδια (σύνδρομο MELAS).

Ο μιτοχονδριακός διαβήτης σχετίζεται με μία μετάλλαξη την A3243G στο mtDNA. Η μετάλλαξη αυτή αφορά το γονίδιο που κωδικοποιεί το tRNA που μεταφέρει την Leu όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 12.

ΕΙΚΟΝΑ 12. Διαβητογενής μετάλλαξη A3243G στο γονίδιο του tRNA της Leu στο mtDNA.



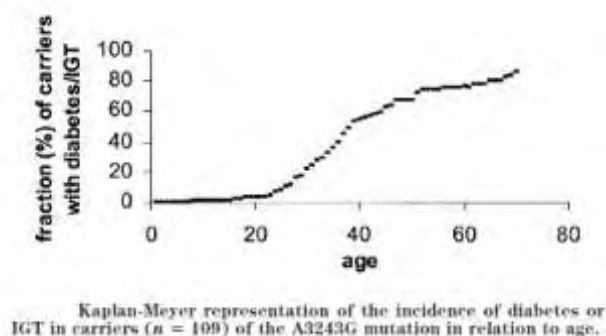
Diabetes 53(Suppl.1):S103-S109,2004

Ο μιτοχονδριακός διαβήτης που σχετίζεται με την παραπάνω μετάλλαξη εκδηλώνεται σε ηλικία 38 ετών. Στην Ολλανδία 1,3% των δειγμάτων ήταν θετικό για την μετάλλαξη A3243G. Στην Αγγλία εμφανίστηκε χαμηλή συχνότητα της μετάλλαξης

σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2. Στην Ιαπωνία η μετάλλαξη εμφανίζεται με μεγάλη συχνότητα όπως και στην Φιλανδία. Στην Τουρκία παρατηρήθηκε μία de novo περίπτωση της μετάλλαξης. Αυτό δείχνει ότι η μετάλλαξη A3243G συνεχώς αναγεννιέται μέσα στην ανθρώπινη «δεξαμενή» γονιδίων. [17]

Στην εικόνα 13 φαίνεται η καμπύλη Kaplan-Mayer που απεικονίζει την επίπτωση για διαβήτη/μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη (IGT) σε φορείς της μετάλλαξης A3243G στην Γερμανία. Σχεδόν όλοι οι φορείς εμφανίζουν διαβήτη ή IGT πριν την ηλικία των 70 ετών έτσι η διεισδυτικότητα της μετάλλαξης είναι σχεδόν 100%. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη είναι ετεροπλασμική που σημαίνει ότι εμφανίζεται μίξη φυσιολογικού mtDNA (wild type) και mtDNA που φέρει την A3243G στα κύτταρα των ασθενών.

**ΕΙΚΟΝΑ 13.** Καμπύλη Kaplan-Mayer για την επίπτωση του διαβήτη ή της IGT σε φορείς (n=109) της μετάλλαξης A3243G σε σχέση με την ηλικία.



Diabetes 53(Suppl.1):S103-S109,2004

Αν και η μετάλλαξη A3243G ανιχνεύεται σε όλους τους ιστούς των ασθενών, τα μεγαλύτερα επίπεδα ετεροπλασμίας είναι υψηλότερα σε ιστούς με χαμηλή μιτογόνο δράση όπως είναι οι μύες. Το κυριότερο ελάττωμα που οδηγεί σε διαβήτη είναι ο τροποποιημένος μεταβολισμός γλυκόζης στους μύς. Επιπλέον μελέτες δεν αναγνωρίζουν ινσουλινο αντίσταση ως κοινό παράγοντα στους φορείς της μετάλλαξης αν και η ινσουλινο αντίσταση έχει παρατηρηθεί σε μερικούς φορείς. Επίσης η ενέργεια που παράγεται από τους μύς που αντανακλάται στα επίπεδα ATP/ADP και φωσφοκρεατινίνης δεν απορρυθμίζεται.

Η παραγωγή γλυκόζης από τα ηπατοκύτταρα είναι ένας παράγοντας που απορρυθμίζεται από την μετάλλαξη A3243G. Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στους μύς

οδηγεί σε μεγαλύτερη ροή γαλακτικού στο ήπαρ τροφοδοτώντας την γλυκονεογένεση. Μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν στοιχεία για την ηπατική παραγωγή γλυκόζης και την καταστολή της από την ινσουλίνη σε φορείς της μετάλλαξης. Επίσης, παρατηρείται ελαττωματική έκκριση ινσουλίνης από το πάγκρεας ως απάντηση στο ερέθισμα της γλυκόζης στους φορείς της μετάλλαξης.

Μελέτη που έγινε σε 92 άτομα στην Ολλανδία με IGT (μειωμένη ανοχή στην γλυκόζη) ύστερα από χορήγηση 10 mmol/L γλυκόζης έδειξε ότι δύο άτομα ήταν φορείς της μετάλλαξης A3243G και εμφάνισαν σημαντικά μειωμένη έκκριση ινσουλίνης σε σχέση με τους μη-φορείς. Όταν η ευαισθησία στην ινσουλίνη μελετήθηκε από την αναλογία ανάμεσα στον ρυθμό διάθεσης της γλυκόζης (10 mmol/L) και τα επίπεδα ινσουλίνης παρατηρήθηκε μεγαλύτερη ευαισθησία στην ινσουλίνη και στους δύο φορείς της μετάλλαξης συγκρινόμενοι με τους μη-φορείς. Τέλος εξετάζοντας 25 μη διαβητικούς φορείς της μετάλλαξης και 25 μη φορείς ταιριαστούς ως προς την ηλικία, φύλο και BMI δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στην γλυκόζη, ινσουλίνη, πεπτιδιο-C και γλυκογόνο όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 14. Αυτό δείχνει ότι δεν υπάρχουν συνέπειες της μετάλλαξης A3243G πριν την απόκτηση ανοχής στη γλυκόζη.

**EIKONA 14.** Χαρακτηριστικά φορέων και μη φορέων της μετάλλαξης A3243G

Characteristics of the study cohort examined by a hyperglycemic clamp

|                 | n  | BMI<br>(kg/m <sup>2</sup> ) | Fasting glucose<br>(mmol/l) | HbA <sub>1c</sub><br>(%) | First-phase<br>insulin (pmol/l)* | Second-phase<br>insulin (pmol/l)† |
|-----------------|----|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Noncarriers     | 90 | 28.4                        | 6.56                        | 5.7                      | 694                              | 312                               |
| A3243G carriers | 2  | 24.7                        | 6.35                        | 5.9                      | 390                              | 141                               |

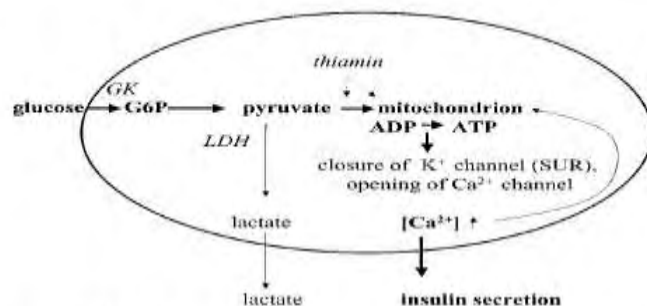
\*First-phase integrated insulin concentrations at 2.5, 5, 7, and 10 min after application of 10 mmol/l hyperglycemia. †Second-phase average insulin concentration in the 120- to 180-min range, minus basal.

Diabetes 53(Suppl.1):S103-S109,2004

Η παρουσία της μετάλλαξης σε υβριδικές κυτταρικές σειρές (wild type ή μεταλλαγμένα μιτοχόνδρια) πάνω από ένα όριο ετεροπλασμίας οδηγεί σε μειωμένη κατανάλωση οξυγόνου και οξειδωτική φωσφορύλιωση. Στα β παγκρεατικά κύτταρα η αναλογία ATP/ADP καθορίζει την ικανότητα ανοίγματος του καναλιού K<sup>+</sup> που εμπλέκεται στην έκκριση ινσουλίνης. Αλλαγές σε αυτή την αναλογία ως αποτέλεσμα μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας επηρεάζουν την ρύθμιση έκκρισης ινσουλίνης που επάγεται από την γλυκόζη. Σε κυτταρικές σειρές β παγκρεατικών κυττάρων όπου το

mtDNA είναι μειωμένο παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου παρουσιάζουν απώλεια στην έκκριση ινσουλίνης που επάγεται από γλυκόζη παρόλο που το κλείσιμο του καναλιού  $K^+$  από την επίδραση σουλφονυλουρίας διεγείρει ακόμα την έκκριση ινσουλίνης. Σε έρευνες που ο αριθμός αντιγράφων του mtDNA μειώνεται σε  $\beta$  παγκρεατικά κύτταρα με knockout πυρηνικών γονιδίων που κωδικοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα A δείχνουν ότι την μειωμένη μιτοχονδριακή λειτουργία στην έκκριση ινσουλίνης. Ο μηχανισμός δράσης παρουσιάζεται στην εικόνα 15. Ο μιτοχονδριακός διαβήτης αναπτύσσεται κατά την ενηλικίωση μεταξύ 35-40 ετών (η γήρανση συμβάλλει στην σταδιακή αλλοίωση της λειτουργίας των  $\beta$  παγκρεατικών κυττάρων) ενώ ο MODY2 η υπεργλυκαιμία είναι φανερή νωρίς μετά την γέννηση ως αποτέλεσμα της εξασθενημένης παραγωγής ATP ως απάντηση στην γλυκόζη. [17]

**ΕΙΚΟΝΑ 15.** Αλλαγές στην συγκέντρωση της γλυκόζης σε σχέση με την έκκριση ινσουλίνης σε περίπτωση μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας



Schematic overview of the steps linking variations in glucose concentration to variations in insulin secretion. The efficiency by which variations in glucose concentrations are coupled with the magnitude of the change in ADP/ATP ratio is a main determinant for insulin secretion. Steps that modulate the efficiency are as follows: the activity of glucokinase (GK); the activity of lactate dehydrogenase (LDH), which is low in functional  $\beta$ -cells (thin arrows); and the thiamin status of the cell. Thiamin is a cofactor for pyruvate dehydrogenase and  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase, enzymes that determine the flux of glucose through glycolysis and the Krebs cycle. The activity of the Krebs cycle is also upregulated by the uptake of  $Ca^{2+}$  by mitochondria after the ATP/ADP-induced closure of the K channel and subsequent opening of the voltage-gated Ca channel. G6P, glucose-6-phosphate.

Diabetes 53(Suppl.1):S103-S109,2004

Μελέτες σε κυτταρικές σειρές  $\beta$  παγκρεατικών κυττάρων που έχουν μειωμένο αριθμό αντιγράφων mtDNA και μετάλλαξη στο γονίδιο της γλυκοκινάσης (MODY2) και έλλειψη θειαμίνης όπως παρατηρείται στην μεγαλοβλαστική αναιμία με διαβήτη και κώφωση έδειξαν ότι είναι επίσης διαβητογενείς και δείχνουν τον κρίσιμο ρόλο της αναλογίας ATP/ADP στην διαδικασία έκκρισης ινσουλίνης. Πιο πρόσφατη μελέτη σε κυτταρική σειρά  $\beta$  παγκρεατικών κυττάρων βHC9 έδειξε ότι εξάντληση του mtDNA δεν επηρεάζει σημαντικά την κυτταροπλασματική συγκέντρωση ATP παρόλο που η έκκριση ινσουλίνης που επάγεται από γλυκόζη έχει μπλοκαριστεί.

[37]

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### 2.1 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ

Η υπέρταση συνοδεύεται από την παρουσία υπερχοληστερολαιμίας, υπερτριγλυκεριδαιμίας, υπομαγνησαιμίας, διαβήτη, ινσουλινοαντίσταση και παχυσαρκία. Αυτός ο συνδυασμός διαταραχών πλήττει πάνω από το ¼ των ενηλίκων στις Η.Π.Α και αναφέρεται ως μεταβολικό σύνδρομο, σύνδρομο X ή δυσλιπιδαιμική υπέρταση.

Μελέτη σε Καυκάσιους συγγενείς (K129) ατόμων με μεταβολικό σύνδρομο διαπίστωσε πρόγονο με υπομαγνησαιμία. Από τους 142 συγγενείς οι 38 εμφάνισαν υπέρταση (πίεση αίματος >140/90 mmHg ή έκαναν θεραπεία για υπέρταση), 33 εμφάνισαν υπερχοληστερολαιμία (χοληστερόλη>200 mg/dL ή έκαναν θεραπεία) και 32 εμφάνισαν υπομαγνησαιμία (0,8-1,7 mg/dL ενώ το φυσιολογικό είναι 1,8-2,5 mg/dL). Η υπομαγνησαιμία επηρέασε και τα δύο φύλα ενώ δεν εμφανίστηκε να επηρεάζει η ηλικία τα επίπεδα  $Mg^{2+}$ . Και τα 32 άτομα με υπομαγνησαιμία ήταν στην ίδια μητρική σειρά. Πατεράδες με υπομαγνησαιμία δεν την μετέφεραν στους απογόνους ενώ μητέρες με υπομαγνησαιμία την μετέφεραν σε μεγάλη συχνότητα στους απογόνους. Αυτό πιστοποιεί ότι υπάρχει μιτοχονδριακή κληρονομικότητα. Ανάλυση σύνδεσης εξάλλου δεν έδειξε συμμετοχή του πυρηνικού γονιδιώματος στην υπομαγνησαιμία.

Στα άτομα της μητρικής σειράς K129 τα επίπεδα  $Mg^{2+}$  του ορού ήταν χαμηλότερα σε σχέση με συγγενείς που δεν ανήκαν στην μητρική σειρά και είχαν και αυξημένη έκκριση  $Mg^{2+}$  στα ούρα που πιστοποιεί μειωμένη επαναπορρόφηση  $Mg^{2+}$  στους νεφρούς. Επίσης, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα  $Ca^{2+}$  στα ούρα, υποκαλιαιμία λόγω μειωμένης νεφρικής απώλειας ενώ δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην έκκριση  $Na^{+}$  στα ούρα 24ώρου. [15]

Η υπέρταση, επίσης, διαχωρίζεται με βάση την μητρική σειρά. Η επικράτηση της υπέρτασης στην μητρική σειρά K129 έδειξε εξάρτηση από την ηλικία, αυξάνοντας από 5% σε άτομα ηλικίας κάτω των 30 ετών σε 40 % σε άτομα ηλικίας 30-50 ετών και σε 95% σε άτομα άνω των 50 ετών. Η επικράτηση της υπέρτασης στην μητρική σειρά

[38]



είναι συγκρίσιμη σε μεγάλο βαθμό με τον γενικό πληθυσμό.

ΠΙΝΑΚΑΣ 7: Μέση τιμή ολικής χοληστερόλης, LDL, VLDL, HDL, τριγλυκεριδίων, γλυκόζης και ινσουλινουαισθησίας σε ενήλικες 18-60 ετών σε μητρικές και μη μητρικές σειρές του K129. (HOMA= εκτίμηση ομοιόστασης)

|                           | Nonmaternal | Maternal  | P       |
|---------------------------|-------------|-----------|---------|
| SBP (mm Hg)               | 122 ± 2     | 135 ± 3   | 0.00007 |
| DBP (mm Hg)               | 77 ± 1      | 82 ± 1    | 0.002   |
| Total cholesterol (mg/dl) | 173 ± 4     | 199 ± 7   | 0.002   |
| LDL + VLDL (mg/dl)        | 124 ± 5     | 150 ± 8   | 0.004   |
| HDL (mg/dl)               | 50 ± 2      | 49 ± 3    | 0.78    |
| Triglyceride (mg/dl)      | 129 ± 14    | 148 ± 22  | 0.46    |
| Glucose (mg/dl)           | 84 ± 1      | 95 ± 11   | 0.28    |
| HOMA                      | 3.5 ± 0.3   | 4.0 ± 0.3 | 0.22    |

12 November 2004, Vol 306, Science [www.sciencemag.org](http://www.sciencemag.org)

Σύμφωνα με τον πίνακα 7 σε ενήλικες 18-60 ετών της μητρικής σειράς K129 αυξήθηκε η συστολική πίεση κατά μέσο όρο 13 mm Hg και η διαστολική πίεση κατά 5 mm Hg. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν σε ανάλυση όλων των ενηλίκων. Τα επίπεδα ρενίνης και αλδοστερόνης του πλάσματος δεν είναι διαφορετικά ανάμεσα στα άτομα μητρικής σειράς και μη μητρικής σειράς. Επίσης, η υπερχοληστερολαιμία διαχωρίζεται με βάση την μητρική σειρά. Ποσοτική ανάλυση της ολικής χοληστερόλης σε ενήλικες 18-60 ετών μετά από ρύθμιση ηλικίας, φύλου, και BMI έδειξε αύξηση κατά μέσο όρο 26 mg/dL στη μητρική σειρά. Αυτή η αύξηση αποδίδεται σε αύξηση της LDL και της VLDL χωρίς όμως επίδραση στην HDL ή στα τριγλυκερίδια.

Συμπερασματικά, από τους 45 ενήλικες της μητρικής σειράς, 38 είχαν τουλάχιστον ένα από τα τρία υπέρταση, υπερχοληστερολαιμία, υπομαγνησταιμία, 26 είχαν δύο από αυτά τα χαρακτηριστικά ενώ 7 είχαν και τα τρία. Αυτά τα στοιχεία δείχνουν ως αίτιο μιτοχονδριακή μετάλλαξη για το σύνδρομο στην σειρά K129. Από ανάλυση αλληλούχησης και πολυμορφισμών, βρέθηκαν 14 παραλλαγές στην μητρική σειρά. Οι 13 από τους πολυμορφισμούς δεν έχουν γνωστή επίδραση. Ένας πολυμορφισμός που αναφέρθηκε προηγουμένως είναι αντικατάσταση T σε C στην θέση 4.291 νουκλεοτίδιο, που επηρεάζει το μιτοχονδριακό γονίδιο του tRNA της Ile. Αυτή η μετάλλαξη βρέθηκε μόνο στην μητρική σειρά K129 και δεν βρέθηκε σε χιλιάδες μιτοχονδριακά γονιδιώματα που αλληλουχήθηκαν προηγουμένως. Αυτή η μετάλλαξη είναι ομοπλάσμη σε λευκοκύτταρα όλων των μελών της μητρικής σειράς ανεξάρτητα από τον φαινότυπο, ενώ εμφανίζει 1% ετεροπλάσμία.

[39]

Τα άτομα της σειράς K129 εμφανίζουν και άλλα κλινικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με μιτοχονδριακή δυσλειτουργία όπως ημικρανία, απώλεια ακοής, υπερτροφική καρδιομυοπάθεια. Μετρήσεις μεταξύ της μητρικής σειράς K129 και της μη μητρικής σε HDL, τριγλυκερίδια, ινσουλινοαντίσταση, BMI και σακχαρώδη διαβήτη δεν έδειξαν σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο σειρών.

Τέλος, σε σκελετικούς μύες των ατόμων με μιτοχονδριακή δυσλειτουργία βρέθηκε ότι ο κύκλος του Krebs γίνεται φυσιολογικά αλλά παρατηρείται μειωμένη παραγωγή ATP. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν μία μία αιτιατή σχέση ανάμεσα στην μιτοχονδριακή μετάλλαξη και την υπέρταση, υπερχοληστερολαιμία και υπομαγνησαιμία. Αυτό το γεγονός αποτελεί ένδειξη για την εμπλοκή της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας στο διαβήτη τύπου 2 και την ινσουλινοαντίσταση που είναι επιπλέον χαρακτηριστικά του μεταβολικού συνδρόμου. Σπάνια μιτοχονδριακή μετάλλαξη προκαλεί διαβήτη με κώφωση. Χάσιμο μιτοχονδριακής λειτουργίας συνδέεται με ινσουλινοαντίσταση. Τέλος η έκφραση γονιδίων της OXPHOS μειώνεται σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 και ινσουλινοαντίσταση. Αν και στα άτομα της μητρικής σειράς K129 απουσιάζουν η ινσουλινοαντίσταση, η παχυσαρκία και η υπερτριγλυκεριδαίμια παρουσιάζουν απώλεια της μιτοχονδριακής τους λειτουργίας. Η απώλεια μιτοχονδριακής λειτουργίας με την γήρανση συχνά συμβάλλει σε όλα τα χαρακτηριστικά του μεταβολικού συνδρόμου.

Σύμφωνα με μελέτες του Διεθνούς Οργανισμού Υγείας και Διατροφής που έγιναν το 2009 η επικράτηση του μεταβολικού συνδρόμου (MS) στις Η.Π.Α είναι 34% σε πληθυσμό ηλικίας 20 ετών. Η επικράτηση του MS αυξάνεται στις διάφορες ηλικιακές ομάδες για τα δύο φύλα. Τα τελευταία χρόνια η επικράτηση του MS στις αναπτυγμένες χώρες και στην Ασία γίνεται με ραγδαίους ρυθμούς. Στην Κίνα η επικράτηση του MS το 2005 αυξήθηκε από 14-18% και συνεχίζει να αυξάνεται . Περίπου το 60-80% των διαβητικών ασθενών εμφανίζουν επίσης MS. Η πυροδότηση σχετίζεται με ανθυγιεινό τρόπο ζωής, έλλειψη άσκησης και σωστής διατροφής, ορμονικές αλλαγές και γήρανση. Οι δύο κυριότεροι παράγοντες κινδύνου είναι η παχυσαρκία και η ινσουλινο αντίσταση. Άτομα με αυξημένο κοιλιακό λίπος είναι πιθανότερο να εμφανίσουν υπέρταση, αυξημένη χοληστερόλη, τριγλυκερίδια και λιπαρά οξέα και αυτά επηρεάζουν την ινσουλίνη που ρυθμίζει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα οδηγώντας σε ινσουλινοαντίσταση. Το MS οφείλεται σε γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Πυρηνικά γονίδια, συμπεριλαμβανομένου του γονιδίου

του υποδοχέα γ των υπεροξειδοσωμάτων, των γονιδίων των λαμινών A/C και του γονιδίου της IL-6 θεωρούνται υπεύθυνα για εμφάνιση του MS. Στους γενετικούς παράγοντες περιλαμβάνονται και παραλλαγές του mtDNA που πυροδοτούν την εμφάνιση του MS.

Σε μελέτη που αφορά την πυροδότηση του MS κατά την νεανική ηλικία σε 18 ετών άντρα με ιστορικό μητρικής κληρονομικότητας διαβήτη βρέθηκε ότι στην οικογένειά του κάποια άτομα παρουσίαζαν διαβήτη τύπου 2 και χαρακτηριστικά του MS ενώ ο 18 ετών άντρας δεν παρουσίασε διαβήτη. Σημειωτέον, μία ετεροπλάσματική μετάλλαξη του mtDNA, η A8890G, παρατηρήθηκε στον 18 ετών άντρα αλλά όχι στην υπόλοιπη οικογένεια. Η μετάλλαξη A8890G εντοπίζεται στο γονίδιο της ATPάσης 6 που κωδικοποιεί μία υπομονάδα της ATP συνθετάσης (ATPάσης) στα μιτοχόνδρια. Το ένζυμο αυτό είναι συστατικό του καναλιού πρωτονίων και είναι αναγκαίο για την μεταφορά πρωτονίων και την παραγωγή ενέργειας (συχνές μεταλλάξεις του γονιδίου που κωδικοποιεί το ένζυμο είναι οι ετεροπλάσματικές μετατροπές T8993C και T8993G που σχετίζονται με σύνδρομο Leigh και NARP). Ίσως η μετάλλαξη αυτή σχετίζεται με δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και ίσως συμβάλλει στην πυροδότηση του MS κατά την νεανική ηλικία. [16]

**ΠΙΝΑΚΑΣ 8. Κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά όλων των μελών της οικογένειας**

Clinical and biochemical characteristics of all family members.

| Variables                  | Family members |                 |                 |                 |                 |                  |                  |                  |                  |
|----------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                            | I <sub>1</sub> | II <sub>1</sub> | II <sub>2</sub> | II <sub>3</sub> | II <sub>4</sub> | III <sub>1</sub> | III <sub>2</sub> | III <sub>3</sub> | III <sub>4</sub> |
| Gender                     | F              | M               | F               | M               | F               | F                | M                | M                | M                |
| Age, years                 | 23             | 61              | 54              | 45              | 43              | 38               | 33               | 18               | 18               |
| Weight (kg)                | 71             | 87              | 87              | 83              | 90              | 94               | 87               | 95               | 95               |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> )   | 30.02          | 28.08           | 24.30           | 21.45           | 26.55           | 27.34            | 21.71            | 27.47            | 27.47            |
| DBP (mmHg)                 | 62             | 80              | 78              | 75              | 80              | 80               | 70               | 70               | 70               |
| SBP (mmHg)                 | 120            | 130             | 126             | 130             | 120             | 130              | 110              | 110              | 110              |
| History of diabetes, years | 0              | 0               | 4               | 1               | 1               | 0                | 0                | 0                | 0                |
| Biochemical parameters     |                |                 |                 |                 |                 |                  |                  |                  |                  |
| FBG (mmol/l)               | 4.8            | 7.78            | 5.17            | 6.98            | 10.78           | 5.87             | 5.08             | 5.08             | 5.08             |
| HbA <sub>1c</sub> (%)      | 6.38           | 7.37            | 6.01            | 7.81            | 9.39            | 5.2              | 5.35             | 4.63             | 4.63             |
| BUN (mmol/l)               | 5.7            | 4.1             | 6.9             | 4.3             | 3.8             | 6.1              | 4.3              | 4                | 4                |
| Cr (mmol/l)                | 85             | 73              | 81              | 80              | 80              | 30               | 54               | 31               | 31               |
| UA (mmol/l)                | 447            | 346             | 450             | 307             | 214             | 280              | 230              | 342              | 342              |
| Cys C (mg/l)               | 1.41           | 1.32            | 1.57            | 1.28            | 0.86            | 1.20             | 1.00             | 1.29             | 1.29             |
| MB (mmol/l)                | 0.07           | 0.06            | 0.07            | 0.03            | 0.12            | 0.08             | 0.06             | 0.07             | 0.07             |
| Lipid parameters           |                |                 |                 |                 |                 |                  |                  |                  |                  |
| TC (mmol/l)                | 4.15           | 4.24            | 4.58            | 7.33            | 5.01            | 6.29             | 4.54             | 6.78             | 6.78             |
| TG (mmol/l)                | 0.54           | 1.18            | 1.1             | 2.43            | 2.25            | 1.56             | 1.53             | 1.8              | 1.8              |
| HDL-C (mmol/l)             | 1.4            | 1.3             | 1.36            | 1.34            | 0.89            | 1.08             | 1.04             | 0.97             | 0.97             |
| LDL-C (mmol/l)             | 2.27           | 2.64            | 2.62            | 4.79            | 2.57            | 3.96             | 2.74             | 4.86             | 4.86             |
| apoA-I (g/l)               | 2.2            | 1.38            | 1.41            | 1.07            | 1.24            | 1.53             | 0.84             | 1.12             | 1.12             |
| apoB-I00 (g/l)             | 0.98           | 1.15            | 1.13            | 1.62            | 1.11            | 1.28             | 0.83             | 2.14             | 2.14             |
| apoA-IIapoB-I00            | 1.22           | 1.2             | 1.25            | 0.66            | 1.12            | 1.18             | 1.01             | 0.53             | 0.53             |
| Hearing loss               | +              | +               | +               | +               | +               | +                | +                | +                | +                |
|                            |                |                 | (single ear)    |                 |                 |                  |                  |                  |                  |

DBP, diastolic arterial blood pressure; FBG, fasting blood glucose; BUN, blood urea nitrogen; Cr, creatinine; UA, uric acid; Cys C, cysteine C; MB, β-microglobulin; TC, total cholesterol; TG, triglycerid; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol.

Molecular Medicine Reports8:1060-1066,2013 doi:10.3892/mmr.2013.1616

Ο 18 ετών άντρας (III3) διαγνώστηκε με MS ενώ τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας εμφάνισαν χαρακτηριστικά MS. Τα άτομα I2,II1,II4,II5 και II6 εμφάνισαν

[41]

διαβήτη για περισσότερο από 1 χρόνο μαζί με απώλεια ακοής και ήπια νεφρική ανεπάρκεια. Τα άτομα II1,II6,III1 και III3 ήταν υπέρβαρα με BMI 25-29 Kg/cm<sup>2</sup>. Δεν παρατηρήθηκε καθόλου παχυσαρκία (BMI>30) και υπέρταση στην οικογένεια. Επιπλέον ο 18 ετών άντρας (III3) και ο πατέρας του (II5) εμφάνιζαν δυσλειτουργία στον μεταβολισμό των λιπιδίων με υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων και LDL-C, χαμηλότερα επίπεδα HDL-C και ρυθμό ApoA-1/ApoB100 μικρότερο του 1. Στον πίνακα 8 φαίνονται τα κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά όλων των μελών της οικογένειας.

Ανάλυση του mtDNA της οικογένειας έδειξε την ύπαρξη της παραλλαγής T16189C που σχετίζεται με το MS. Επίσης μία ετεροπλασμική αντικατάσταση A-G στην θέση 8890 του mtDNA εμφανίστηκε μόνο στον άντρα 18 ετών (III3). Η μετάλλαξη A8890G αλλάζει το βασικό αμινοξύ Lys σε Glu στην θέση 122 της υπομονάδας της ATPάσης $\beta$ . Αυτό το αμινοξύ βρίσκεται στον ενδομεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων και είναι υψηλά συντηρημένο σε 30 διαφορετικά είδη οργανισμών. Επιπλέον, καμία άλλη μετάλλαξη που σχετίζεται με MS ή διαβήτη δεν εντοπίστηκε στον 18 ετών άντρα ή την υπόλοιπη οικογένειά του.

Αν και η οικογένεια είναι μια τυπική διαβητική οικογένεια, παρουσιάζονται χαρακτηριστικά του MS με ήπια αύξηση των επιπέδων της κυστίνης C ενός δείκτη για νεφρική ανεπάρκεια. Ο ασθενής άντρας 18 ετών παρουσιάζει κεντρική παχυσαρκία (υπέρβαρος με 95 cm περιφέρεια μέσης), δυσλιπιδαιμία (υψηλά τριγλυκερίδια, χαμηλή HDL, χαμηλά επίπεδα απολιποπρωτείνης A-I/απολιποπρωτείνης B-100) και ήπια νεφρική ανεπάρκεια σύμφωνα με τα επίπεδα της κυστίνης C. Η παχυσαρκία είναι παράγοντας κινδύνου για την ινσουλινοαντίσταση και τα  $\beta$  παγκρεατικά κύτταρα εκκρίνουν περισσότερη ινσουλίνη αντισταθμίζοντας την ινσουλινοαντίσταση. Η δυσλειτουργία των  $\beta$  παγκρεατικών κυττάρων προκαλεί προ-διαβήτη που οδηγεί σε διαβήτη. Επίσης, ο απλός νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός T16189C εμφανίστηκε σε όλα τα μέλη της οικογένειας.

Αν και τα πυρηνικά γονίδια εμπλέκονται στην πυροδότηση του MS οι μεταλλάξεις του mtDNA είναι επίσης σημαντικές για την ανάπτυξη του MS. Η μετάλλαξη T4291C του μιτοχονδριακού tRNA της Ile παρατηρήθηκε πρώτα στους Καυκάσιους μαζί με MS. Επιπλέον, η T16189C της D θηλιάς του mtDNA ενέχεται για την ανάπτυξη ινσουλινοαντίστασης, MS και στεφανιαίας νόσου. Μελέτες έχουν δείξει ότι μεταλλάξεις στο mtDNA σχετίζονται με διαβήτη και ειδικότερα η ετεροπλασμική

μετάλλαξη A3243G του tRNA της Leu ενέχεται για τον μητρικής κληρονομικότητας διαβήτη και επάγει δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων. Στον πίνακα 9 παρουσιάζονται οι παραλλαγές στο mtDNA που εμφανίστηκαν στην οικογένεια.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 9.** Παραλλαγές mtDNA στην οικογένεια

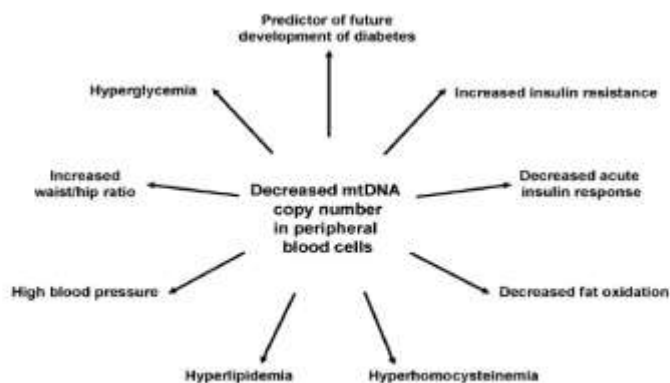
| mtDNA variants in this family <sup>a</sup> |          |                        |                        |                                     |                                  |
|--------------------------------------------|----------|------------------------|------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| Gene                                       | Position | Nucleotide replacement | Amino acid replacement | Conservation (H/B/M/X) <sup>b</sup> | Previously Reported <sup>c</sup> |
| D-Loop                                     | 73       | A-G                    |                        |                                     | Y                                |
|                                            | 263      | A-G                    |                        |                                     | Y                                |
|                                            | 313      | C-CC                   |                        |                                     | Y                                |
|                                            | 489      | T-C                    |                        |                                     | Y                                |
|                                            | 16184    | C-T                    |                        |                                     | Y                                |
|                                            | 16189    | T-C                    |                        |                                     | Y                                |
|                                            | 16223    | C-T                    |                        |                                     | Y                                |
|                                            | 16298    | T-C                    |                        |                                     | Y                                |
| 12S rRNA                                   | 16319    | G-A                    |                        |                                     | Y                                |
|                                            | 750      | A-G                    |                        | A/A/A/                              | Y                                |
| 16S rRNA                                   | 1438     | A-G                    |                        | A/A/A/G                             | Y                                |
|                                            | 2706     | A-G                    |                        | A/G/A/A                             | Y                                |
| ND2                                        | 2835     | C-T                    |                        | C/A/A/A                             | Y                                |
|                                            | 4713     | A-G                    |                        |                                     | Y                                |
| CO1                                        | 4769     | A-G                    |                        |                                     | Y                                |
|                                            | 6179     | C-A                    |                        |                                     | Y                                |
| CO2                                        | 7028     | C-T                    |                        |                                     | Y                                |
|                                            | 7196     | C-A                    |                        |                                     | Y                                |
|                                            | 8245     | A-G                    |                        |                                     | Y                                |
| ATP6                                       | 8860     | A-G                    | Thr-Ala                | T/A/A/T                             | Y                                |
|                                            | 8890     | A-G                    | Lys-Glu                | E/K/E/N                             | N                                |
|                                            | 9053     | G-A                    | Ser-Asn                | S/G/G/T                             | Y                                |
| CO3                                        | 9540     | T-C                    |                        |                                     | Y                                |
|                                            | 10398    | A-G                    | Thr-Ala                | T/T/T/A                             | Y                                |
| ND3                                        | 10400    | C-T                    |                        |                                     | Y                                |
|                                            | 10873    | T-C                    |                        |                                     | Y                                |
|                                            | 11176    | G-A                    |                        |                                     | Y                                |
| ND4                                        | 11719    | G-A                    |                        |                                     | Y                                |
|                                            | 12705    | C-T                    |                        |                                     | Y                                |
| ND5                                        | 14470    | T-C                    |                        |                                     | Y                                |
|                                            | 15043    | G-A                    |                        |                                     | Y                                |
| ND6                                        | 15301    | G-A                    |                        |                                     | Y                                |
|                                            | 15326    | A-C                    |                        |                                     | Y                                |
|                                            | 15487    | A-T                    | Thr-Ala                | T/M/LT<br>P/P/P/P                   | Y                                |

<sup>a</sup>Family members include III and all maternal relatives; <sup>b</sup>H: *Homo sapiens*; B: *Bos taurus*; M: *Mus musculus*; X: *Xenopus laevis*; <sup>c</sup>Y, yes; N, no.

Molecular Medicine Reports 8:1060-1066, 2013 doi:10.3892/mmr.2013.1616

Η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, όπως παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του διαβήτη τύπου 2, χαρακτηριστικό του MS, όπως η ινσουλινοαντίσταση και η ελαττωμένη παραγωγή ινσουλίνης. Στην εικόνα 16 συνοψίζεται η σχέση ανάμεσα στον μειωμένο αριθμό αντιγράφων mtDNA σε κύτταρα περιφερικού αίματος που είναι δείκτης του MS.

**ΕΙΚΟΝΑ 16.** Σχέση μειωμένου αριθμού αντιγράφων mtDNA σε κύτταρα περιφερικού αίματος και χαρακτηριστικά διαβήτη τύπου 2.



Association of decreased mtDNA copy number in peripheral blood cells with various pathophysiological abnormalities of type 2 diabetes.

Y.M Cho et al./Diabetes Research and Clinical Practice 77S(2007)S172-S177

Doi:10.1016/j.diabres.2007.01.052

Σημειακές μεταλλάξεις ή ελλείμματα στο mtDNA σχετίζονται με την μητρικά κληρονομούμενο διαβήτη και επίσης συμμετέχουν και στην παθογένεια άλλων χαρακτηριστικών του MS εκτός από την υπεργλυκαιμία. Οι περισσότερες σημειακές μεταλλάξεις έχουν βρεθεί σε γονίδια tRNA. Μεταξύ αυτών η A3243G στο tRNA της Leu είναι η πιο καλομελετημένη και έχει αναφερθεί προηγουμένως να σχετίζεται με μιτοχονδριακή μυοπάθεια, εγκεφαλοπάθεια, οξείδωση γαλακτικού, MELAS, μητρικά κληρονομούμενο διαβήτη και κώφωση (MIDD). Στην Κορέα μόνο το 5% των διαβητικών είχαν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη, αυτό δείχνει ότι η συχνότητά της είναι σπάνια και εξηγεί μικρό ποσοστό της παθογένειας του διαβήτη. Επίσης, η μετάλλαξη T4291C είναι κρίσιμη για την λειτουργία του tRNA.

Μιας και ο διαβήτης τύπου 2 είναι ο πιο κοινός, πρόσφατα βρέθηκε σε μελέτη που έγινε σε Ευρωπαίους ότι δεν υπάρχει απόδειξη σχέσης μεταξύ κοινών πολυμορφισμών στο mtDNA και διαβήτη 2 στους Ευρωπαίους. Σε αντίθεση με αυτό η παραλλαγή T16189C που είναι κοινός πολυμορφισμός του mtDNA βρέθηκε ότι σχετίζεται με ινσουλινοαντίσταση, παχυσαρκία και διαβήτη σε μερικούς πληθυσμούς.

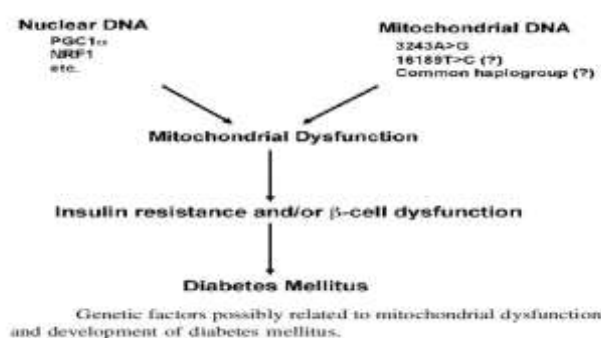
Στην Ασία ανάλυση που έγινε σε διάφορους πληθυσμούς έδειξε ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός σχετίζεται με ευαισθησία στον διαβήτη τύπου 2.

Πολυμορφισμοί σε πυρηνικά γονίδια που ρυθμίζουν την μιτοχονδριακή λειτουργία και τον διαβήτη τύπου 2 για τον PGC1a (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1) και για τον πυρηνικό παράγοντα NRF1 (Nuclear Respiratory Factor). Ο PGC1a εμπλέκεται στην βιογένεση των μιτοχονδρίων, θερμογένεση, οξείδωση λιπαρών οξέων, ηπατική γλυκονεογένεση και χρήση γλυκόζης από περιφερικούς ιστούς. Πολυμορφισμοί για αυτό το γονίδιο σχετίζονται με διαβήτη 2 σε μερικούς πληθυσμούς. Αν και δεν έχει βρεθεί σημαντική σχέση ανάμεσα σε πολυμορφισμούς του PGC1a και κίνδυνο για διαβήτη 2 στους Κορεάτες, βρέθηκαν δύο πολυμορφισμοί που σχετίζονται με πυροδότηση του διαβήτη σε ηλικία κάτω των 40ετών. [18]

Ο NRF1 είναι μεταγραφικός παράγοντας που δρα σε πυρηνικά γονίδια που κωδικοποιούν υπομονάδες των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας και συστατικά της αντιγραφής και μεταγραφής των μιτοχονδρίων. Ο NRF1 προσδένεται και ενεργοποιεί υποκινητές πολλών γονιδίων της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων όπως το cytc, υπομονάδα 8 της NADH αφυδρογονάσης, υπομονάδες οξειδασών στο

κυτόχρωμα, υπομονάδες ΑΤΡασών, μιτοχονδριακό μεταγραφικό παράγοντα Α (TFAM). Η αερόβια άσκηση αυξάνει την έκφραση του NRF1 στους σκελετικούς μυς ενώ υπερέκφραση του NRF1 σε ποντίκια αυξάνει την μεταφορά γλυκόζης στους σκελετικούς μυς . Έχουν βρεθεί 12 απλοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί και ένας προσθήκης/απαλοιφής στο γονίδιο NRF1 σε Κορεάτες. Από αυτούς οι g.141G.>T και g.54529A>G δείχνουν αυξημένο κίνδυνο για διαβήτη 2 και ίσως και ο απλότυπος Η4. Στην εικόνα 17 συνοψίζονται οι γενετικοί παράγοντες που σχετίζονται με την δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων.

**ΕΙΚΟΝΑ 17.** Γενετικοί παράγοντες που πιθανόν σχετίζονται με μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και ανάπτυξη διαβήτη 2.

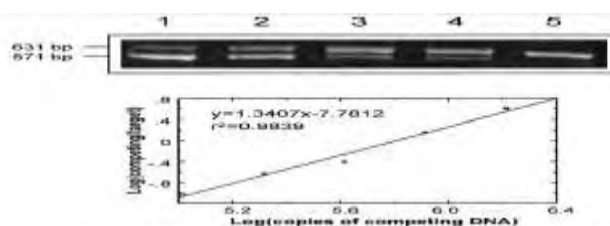


Y.M Cho et al./Diabetes Research and Clinical Practice 77S(2007)S172-S177

Doi:10.1016/j.diabres.2007.01.052

Σε μελέτη που έγινε βρέθηκε ότι το ποσό του mtDNA μειώνεται σε κύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με μη ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη (NIDDM) και επίσης τα χαμηλότερα επίπεδα mtDNA προηγούνται της ανάπτυξης διαβήτη και σχετίζονται με μερικές παραμέτρους της ινσουλινοαντίστασης. Μέτρηση της μέσης ποσότητας του mtDNA με ανάλυση υβριδισμού Southern blot σε ασθενείς με NIDDM και σε φυσιολογικούς έδειξε ότι είναι 35% χαμηλότερη στους ασθενείς και επίσης η ποσότητα mtDNA δεν σχετίζεται με την ηλικία, τον BMI, την διάρκεια του διαβήτη ή τα επίπεδα HbA όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 18, .

**EIKONA 18.** Ποσοτικοποίηση mtDNA σε λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος μεταξύ ασθενών με NIDDM και μη ασθενών.



Quantification of mtDNA in peripheral blood leukocytes by competitive PCR. Upper: known numbers of copies of internal standard DNA were added to total cellular DNA extracted from peripheral blood leukocytes and was amplified with primers mtF1 and mtR1. As indicated, two products were generated, one derived from mtDNA (631 bp) and the other from internal standard DNA (671 bp). Lane 1-5, competition of varying amounts of internal standard DNA ( $16.43 \times 10^5$ ,  $8.21 \times 10^5$ ,  $4.11 \times 10^5$ ,  $2.06 \times 10^5$ ,  $1.03 \times 10^5$  copies, respectively), with 5 ng of total cellular DNA. Lower: The ratio of each internal standard product/target product was plotted against the number of copies of internal standard added to yield the equivalence point between internal standard and target DNA.

H.K.Lee et al./Diabetes Research and Clinical Practice 42(1998)161-167

Υπολογίζοντας την ποσότητα mtDNA σε άτομα που εμφανίζουν σακχαρώδη διαβήτη μέσα σε 2 χρόνια έδειξε ότι δεν βρέθηκαν διαφορές στην πίεση αίματος και στο λιπιδικό προφίλ μεταξύ αυτών που εμφάνισαν διαβήτη και αυτών που δεν εμφάνισαν όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 10. Επίσης, η μέση ποσότητα mtDNA ήταν χαμηλότερη σε αυτούς που εμφάνισαν σακχαρώδη διαβήτη.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 10.** Κλινικά χαρακτηριστικά ατόμων που εμφάνισαν διαβήτη μετά από δύο χρόνια

Clinical characteristics of the subjects who became diabetic after two years

|                                 | Converters to diabetes (n = 23) | Non-converters (n = 22) | P-value |
|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------|---------|
| Age (years)                     | 61.0 ± 13.0                     | 58.0 ± 14.0             | NS      |
| Sex (M/F)                       | 13/10                           | 14/8                    | NS      |
| MtDNA (copies/pg template DNA)  | 102.8 ± 41.5                    | 137.8 ± 67.7            | <0.05   |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> )        | 24.7 ± 4.2                      | 23.4 ± 2.6              | NS      |
| WHR                             | 0.90 ± 0.05                     | 0.88 ± 0.05             | NS      |
| Fasting glucose (mmol/l)        | 5.91 ± 0.78                     | 5.57 ± 0.54             | NS      |
| Post-load glucose (mmol/l)      | 6.50 ± 1.56                     | 6.67 ± 1.76             | NS      |
| Systolic blood pressure (mmHg)  | 133.0 ± 18.0                    | 127.0 ± 21.0            | NS      |
| Diastolic blood pressure (mmHg) | 83.0 ± 12.0                     | 83.0 ± 16.0             | NS      |
| Fasting insulin (pmol/l)        | 52.4 ± 10.0                     | 53.1 ± 12.9             | NS      |
| Proinsulin (pmol/l)             | 13.3 ± 7.8                      | 8.4 ± 5.2               | NS      |
| Cholesterol (mmol/l)            | 4.19 ± 0.96                     | 4.03 ± 0.76             | NS      |
| Triglyceride (mmol/l)           | 1.63 ± 0.78                     | 1.37 ± 0.89             | NS      |
| HDL-cholesterol (mmol/l)        | 0.95 ± 0.23                     | 0.85 ± 0.23             | NS      |

Values are mean ± S.D.

H.K.Lee et al./Diabetes Research and Clinical Practice 42(1998)161-167

Ένας άλλος παράγοντας που αυξάνει τον κίνδυνο για εμφάνιση του MS κατά 60% είναι η εμμηνόπαυση. Η σχέση μεταξύ εμμηνόπαυσης και MS είναι ανεξάρτητη από παράγοντες όπως η ηλικία, BMI, σωματική άσκηση που δείχνει ότι τα οιστρογόνα ίσως έχουν έναν προστατευτικό ρόλο κατά της ανάπτυξης του MS. Πρόσφατες μελέτες



έχουν δείξει ότι τα οιστρογόνα παίζουν ωφέλιμο ρόλο στην βιογένεση των μιτοχονδρίων και την λειτουργία τους παίζοντας ρόλο στη ρύθμιση πυρηνικών και μιτοχονδριακών πρωτεϊνών και στην αντιοξειδωτική δράση. Δυσλειτουργία των ωοθηκών και πρόκληση μείωσης της μιτοχονδριακής λειτουργίας συμβάλλουν σε αύξηση της επικράτησης του MS.

Ποικίλοι μηχανισμοί όπως η ινσουλινοαντίσταση (IR), σπλαχνικό λίπος, φλεγμονώδεις ή αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες καθώς και η ενεργοποίηση του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης συμβάλλουν στο MS. Τέλος, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως οδηγεί σε παχυσαρκία και ινσουλινοαντίσταση ενώ η μείωση του αριθμού αντιγράφων του mtDNA σχετίζεται με εμφάνιση του διαβήτη τύπου 2.

Σε μελέτη που έγινε της σχέσης του MS και της μιτοχονδριακής λειτουργίας μετρήθηκε ο αριθμός του mtDNA σε λευκοκύτταρα γυναικών με εμμηνόπαυση και MS και σε γυναίκες με εμμηνόπαυση αλλά χωρίς MS. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 11 έδειξαν ότι δεν υπάρχει διαφορά την πίεση του αίματος, ολική χοληστερόλη, CRP, ομοκυστεΐνη, ουρικό οξύ, κάπνισμα, αλκοόλ, άσκηση και την χρήση αντιδιαβητικής αγωγής μεταξύ των δύο ομάδων γυναικών. Οι γυναίκες με MS είχαν σημαντικά μεγαλύτερες τιμές μέσης ηλικίας, BMI, περιφέρειας μέσης, γλυκόζης και ινσουλίνης μετά από νηστεία, τριγλυκεριδίων και έκαναν χρήση αντι-υπερτασικής αγωγής αντίθετα με τις γυναίκες χωρίς MS. Τα επίπεδα HDL χοληστερόλης και 25-υδροξυβιταμίνης D ήταν σημαντικά χαμηλότερα στις γυναίκες με MS.

### ΠΙΝΑΚΑΣ 11. Κλινικά χαρακτηριστικά γυναικών με MS και χωρίς MS

| <i>Clinical characteristics of participants with and without MS</i> |                      |                  |       |
|---------------------------------------------------------------------|----------------------|------------------|-------|
| Characteristics                                                     | Without MS (n = 113) | With MS (n = 31) | P     |
| Age, y                                                              | 56.63 ± 5.88         | 60.19 ± 6.01     | <0.01 |
| Body mass index, kg/m <sup>2</sup>                                  | 24.00 ± 2.26         | 26.30 ± 2.99     | <0.01 |
| Waist circumference, cm                                             | 80.89 ± 6.34         | 87.65 ± 6.32     | <0.01 |
| Blood pressure, mm Hg                                               |                      |                  |       |
| Systolic                                                            | 122.1 ± 14.52        | 127.1 ± 11.45    | 0.07  |
| Diastolic                                                           | 71.73 ± 9.24         | 74.68 ± 7.97     | 0.11  |
| Glucose tolerance index                                             |                      |                  |       |
| Fasting glucose, mg/dL                                              | 86.26 ± 16.07        | 97.77 ± 24.94    | 0.02  |
| Fasting insulin, μIU/mL                                             | 5.22 ± 2.83          | 8.99 ± 8.23      | 0.02  |
| HOMA-IR                                                             | 1.13 ± 0.72          | 2.42 ± 3.07      | <0.01 |
| Lipid profile                                                       |                      |                  |       |
| Total cholesterol, mg/dL                                            | 207.5 ± 35.46        | 209.8 ± 40.1     | 0.76  |
| Triglycerides, <sup>a</sup> mg/dL                                   | 106.3 ± 88.34        | 219.6 ± 103.2    | <0.01 |
| HDL-cholesterol, mg/dL                                              | 58.30 ± 10.80        | 47.38 ± 12.40    | <0.01 |
| LDL-cholesterol, mg/dL                                              | 128.0 ± 33.61        | 118.5 ± 32.22    | 0.16  |
| Inflammatory index                                                  |                      |                  |       |
| hs-CRP, mg/mL                                                       | 0.17 ± 0.44          | 0.15 ± 0.11      | 0.60  |
| Homocysteine, μmol/L                                                | 12.01 ± 10.19        | 11.96 ± 3.03     | 0.98  |
| Adiponectin, <sup>b</sup> μg/mL                                     | 6.90 ± 4.41          | 4.80 ± 3.34      | <0.01 |
| 25-Hydroxyvitamin D, <sup>c</sup> ng/mL                             | 16.91 ± 9.04         | 12.30 ± 4.95     | <0.01 |
| Uric acid, mg/dL                                                    | 3.88 ± 0.82          | 4.16 ± 0.96      | 0.11  |
| Current smoker <sup>d</sup>                                         | 0                    | 1 (3.23)         | 0.22  |
| Alcohol consumption <sup>e</sup>                                    | 5 (4.42)             | 3 (9.68)         | 0.37  |
| Regular exercise <sup>f</sup>                                       | 40 (35.40)           | 10 (32.26)       | 0.91  |
| Medication, n (%)                                                   |                      |                  |       |
| Hypertension                                                        | 18 (15.93)           | 8 (25.81)        | 0.32  |
| Diabetes                                                            | 6 (5.31)             | 5 (16.13)        | <0.05 |
| Other                                                               | 0                    | 1 (3.23)         | 0.22  |

Data are shown as mean ± SD.

P values were calculated using t test or Fisher's exact test.

MS, metabolic syndrome; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein.

<sup>a</sup>Values were analyzed after log transformation.

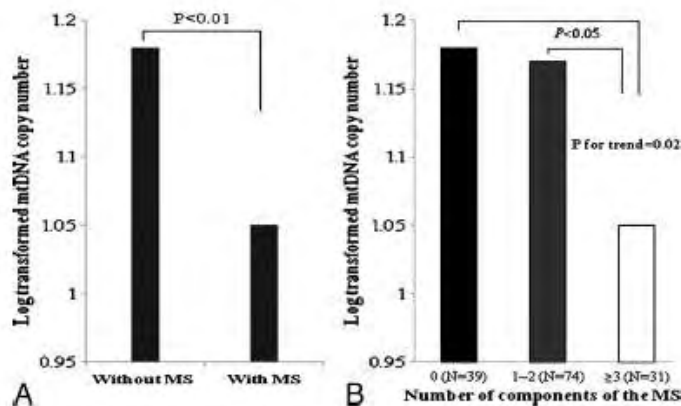
<sup>b</sup>A smoking habit was defined as being a current smoker.

<sup>c</sup>Alcohol consumption was defined as the consumption of 72 g or more of alcohol per week.

<sup>f</sup>Regular exercise was defined as physical exercise performed at least 30 minutes per session, more than twice a week, for more than 6 months.

Ο αριθμός αντιγράφων mtDNA στα λευκοκύτταρα των γυναικών με MS ήταν χαμηλότερος σε σχέση με αυτές χωρίς MS. Επιπλέον, καθώς ο αριθμός των χαρακτηριστικών του MS αυξάνεται η συγκέντρωση του αριθμού αντιγράφων του mtDNA στα λευκοκύτταρα μειώνεται όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 19. Συγκρίνοντας γυναίκες στην εμμηνόπαυση που είχαν λιγότερα από δύο χαρακτηριστικά του MS με γυναίκες με εμμηνόπαυση με περισσότερα από τρία χαρακτηριστικά του MS ο αριθμός των αντιγράφων του mtDNA στα λευκοκύτταρα των τελευταίων ήταν σημαντικά χαμηλότερος όπως φαίνεται στον πίνακα 12. Επίσης, στα λευκοκύτταρα γυναικών με εμμηνόπαυση και MS που είχαν κοιλιακή παχυσαρκία και υπερτριγλυκεριδαιμία ο αριθμός των mtDNA ήταν χαμηλότερος σε σχέση με αυτές που είχαν εμμηνόπαυση αλλά όχι MS. [20]

**ΕΙΚΟΝΑ 19.** Αριθμός mtDNA σε γυναίκες με εμμηνόπαυση με ή χωρίς MS



Mitochondrial DNA copy number in participants with or without MS and according to the number of components of metabolic syndrome that was present. Mitochondrial DNA copy number was analyzed after log-transformation. Mitochondrial DNA copy number was significantly lower in participants with metabolic syndrome. **A:** As the number of components of metabolic syndrome increased, mitochondrial DNA copy number rose. **B:** *P* values were calculated using *t* test, analysis of variance, and Tukey's comparison analysis. MS, metabolic syndrome.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 12.** Αριθμός mtDNA σε λευκοκύτταρα γυναικών με εμμηνόπαυση με ή χωρίς χαρακτηριστικά του MS

*Leukocyte mitochondrial DNA copy number with or without each component of metabolic syndrome*

| Variables                             | No                    | Yes                  | P     |
|---------------------------------------|-----------------------|----------------------|-------|
| Abdominal obesity <sup>a</sup>        | 1.17 ± 0.22 (n = 93)  | 1.10 ± 0.19 (n = 51) | 0.04  |
| Hypertriglyceridemia <sup>b</sup>     | 1.18 ± 0.22 (n = 109) | 1.06 ± 0.17 (n = 35) | <0.01 |
| Low HDL-cholesterol <sup>c</sup>      | 1.17 ± 0.20 (n = 97)  | 1.10 ± 0.23 (n = 47) | 0.07  |
| High blood pressure <sup>d</sup>      | 1.15 ± 0.21 (n = 95)  | 1.14 ± 0.22 (n = 49) | 0.82  |
| Impaired fasting glucose <sup>e</sup> | 1.16 ± 0.21 (n = 120) | 1.12 ± 0.24 (n = 24) | 0.45  |

Values are expressed as mean ± SD.  
 Values were analyzed after log-transformation.  
 P values were calculated using t test.  
 HDL, high-density lipoprotein.  
<sup>a</sup>Waist circumference, ≥85 cm.  
<sup>b</sup>Triglycerides, ≥150 mg/dL.  
<sup>c</sup>HDL-cholesterol, <50 mg/dL.  
<sup>d</sup>Systolic blood pressure, ≥130 mm Hg or diastolic blood pressure, ≥85 mm Hg or use of antihypertensive medication.  
<sup>e</sup>Fasting glucose, ≥100 mg/dL or use of insulin or hypoglycemic medication.

Menopause, Vol 19, No. 5, 2012 doi:10.1097/gme.0b013e31823a3e46

Σύμφωνα με τον πίνακα 13, ο αριθμός mtDNA στα λευκοκύτταρα γυναικών με εμμηνόπαυση είναι αρνητικά σχετιζόμενος με την περιφέρεια μέσης, ινσουλίνη μετά από νηστεία, ολική χοληστερόλη και τριγλυκερίδια ενώ εμφανίζει θετική συσχέτιση με τα επίπεδα 25-υδροξυβιταμίνης D του ορού. Τέλος, ο αριθμός mtDNA στα λευκοκύτταρα ήταν ανεξάρτητος με το MS ύστερα από προσαρμογή σε παραμέτρους όπως η ηλικία, BMI, HOMA-IR (Homeostasis model assessment of insulin resistance), 25-υδροξυβιταμίνη D, αδιπονεκτίνη, CRP.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 13.** Συσχέτιση μεταξύ αριθμού mtDNA λευκοκυττάρων και διαφόρων μεταβολικών παραμέτρων

*Stepwise multiple regression analysis for metabolic syndrome*

|                             | $\beta$ | SE    | P     | OR (95% CI)         |
|-----------------------------|---------|-------|-------|---------------------|
| Age                         | 0.102   | 0.047 | 0.02  | 1.107 (1.015-1.208) |
| BMI                         | 0.315   | 0.099 | <0.01 | 1.370 (1.127-1.664) |
| HOMA-IR                     | 0.605   | 0.294 | 0.04  | 1.831 (1.029-3.260) |
| Leukocyte mtDNA copy number | -3.500  | 1.363 | 0.01  | 0.030 (0.002-0.437) |

All variables left in the model are significant at the 0.15 level. No other variable met the 0.15 significant level for entry into the model. Variables included in the stepwise model are age, BMI, HOMA-IR, hs-CRP, log-transformed adiponectin, log-transformed 25-hydroxyvitamin D, and log-transformed leukocyte mtDNA copy number.  
 HOMA-IR, Homeostasis model assessment of insulin resistance; OR, odds ratio; BMI, body mass index; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; mtDNA, mitochondrial DNA.

Menopause, Vol 19, No. 5, 2012 doi:10.1097/gme.0b013e31823a3e46

Το Εθνικό Κέντρο Υγείας και Διατροφής της Κορέας δημοσίευσε ότι η επικράτηση του MS είναι περίπου 1/3 του συνολικού πληθυσμού της νότιας Κορέας. Επίσης, αναφέρθηκε ότι διαταραχές όπως ο καρκίνος, νευροεκφυλιστικές και καρδιαγγειακές ασθένειες, μεταβολικές διαταραχές σχετίζονται με δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων. Πράγματι, αλλαγές στον αριθμό αντιγράφων του mtDNA έχουν βρεθεί σε ασθενείς με νευρολογικές διαταραχές και πολλαπλή σκλήρωση ενώ μειωμένος

αριθμός mtDNA σχετίζεται με διαβήτη τύπου 2 και δυσλιπιδαιμία. Στη μελέτη που έγινε συμμετείχαν 5.178 ενήλικες 40-70 ετών της νότιας Κορέας και ξεκίνησε τον Νοέμβριο του 2005 ενώ ολοκληρώθηκε τον Γενάρη του 2008.

Μέσα σε 2,8 έτη το 36,6% των ατόμων ανέπτυξαν MS. Αρχικά, ο BMI, περιφέρεια μέσης, συστολική και διαστολική πίεση, τριγλυκερίδια, HOMA-IR (Homeostasis model assessment for insulin resistance) ήταν όλα σημαντικά υψηλότερα ενώ η HDL χοληστερόλη ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε εκείνους που είχε εμφανιστεί το MS σε σχέση με εκείνους που δεν είχε εμφανιστεί. Ο αριθμός αντιγράφων mtDNA ήταν σημαντικά χαμηλότερος σε αυτούς που εμφάνισαν MS σε σχέση με αυτούς που δεν εμφάνισαν. Αντίθετα, το έλλειμμα mtDNA ήταν μεγαλύτερο σε αυτούς που είχαν MS σε σχέση με αυτούς που δεν είχαν. Η αναλογία πιθανοτήτων (OD=odd ratio) για την ανάπτυξη MS στο μέγιστο αριθμό αντιγράφων mtDNA συγκρινόμενη με εκείνη στο ελάχιστο αριθμό ήταν 0,34. Οι αντίστοιχες ORs για μεγάλη περιφέρεια μέσης, χαμηλή HDL, υψηλά τριγλυκερίδια και υψηλή πίεση ήταν 0,33, 0,26, 0,40 , 0,70. Η OR για εμφάνιση MS και υψηλότερη αναλογία ελλείμματος mtDNA συγκρινόμενη με την χαμηλότερη αναλογία ήταν 3,12. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 14. Συμπερασματικά, αυξημένος αριθμός αντιγράφων mtDNA σχετίζεται με χαμηλότερο κίνδυνο για MS ενώ αυξημένος ρυθμός ελλείμματος mtDNA με μεγαλύτερο κίνδυνο για MS. [21]

**ΠΙΝΑΚΑΣ 14.** Αναλογία πιθανοτήτων (OD ratio) για εμφάνιση MS και χαρακτηριστικών του σύμφωνα με αριθμό mtDNA και αναλογία ελλείμματος mtDNA.

Odds ratios (ORs) for acute-onset metabolic syndrome and its components according to baseline mitochondrial DNA (mtDNA) copy numbers and deletion ratios.

|                                  | mtDNA copy numbers |                  |                  |                  | mtDNA deletion ratios |                  |                  |                  |
|----------------------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------------|------------------|------------------|------------------|
|                                  | Quartile 1         | Quartile 2       | Quartile 3       | Quartile 4       | Quartile 1            | Quartile 2       | Quartile 3       | Quartile 4       |
| mtDNA copies/cell                | <99.99             | 100.0-114.9      | 115.0-135.9      | >136             |                       |                  |                  |                  |
| Deletion ratio (%)               |                    |                  |                  |                  | ≤0.01                 | 0.02-4.99        | 5.00-10.99       | >11.00           |
| New-onset metabolic syndrome (%) | 41.5               | 47.2             | 35.7             | 25.4             | 33.3                  | 23.9             | 27.7             | 64.0             |
| Metabolic syndrome               |                    |                  |                  |                  |                       |                  |                  |                  |
| Model 1                          | 1.00               | 1.38 (0.60-3.15) | 0.58 (0.25-1.34) | 0.36 (0.15-0.87) | 1.00                  | 0.64 (0.27-1.52) | 0.72 (0.31-1.65) | 3.24 (1.47-7.14) |
| Model 2                          | 1.00               | 1.43 (0.59-3.46) | 0.70 (0.28-1.74) | 0.34 (0.13-0.91) | 1.00                  | 0.71 (0.29-1.74) | 0.73 (0.30-1.79) | 3.12 (1.35-7.16) |
| Large waist circumference        |                    |                  |                  |                  |                       |                  |                  |                  |
| Model 1                          | 1.00               | 0.75 (0.35-1.61) | 0.41 (0.19-0.91) | 0.33 (0.15-0.74) | 1.00                  | 0.44 (0.18-1.07) | 1.02 (0.46-2.25) | 1.67 (0.78-3.61) |
| Model 2                          | 1.00               | 0.86 (0.30-2.43) | 0.42 (0.14-1.25) | 0.33 (0.10-1.06) | 1.00                  | 0.41 (0.13-1.25) | 0.90 (0.29-2.71) | 1.47 (0.54-3.95) |
| Low HDL cholesterol              |                    |                  |                  |                  |                       |                  |                  |                  |
| Model 1                          | 1.00               | 1.20 (0.53-2.69) | 0.55 (0.23-1.26) | 0.31 (0.13-0.73) | 1.00                  | 1.75 (0.76-4.05) | 1.98 (0.87-4.54) | 3.27 (1.41-7.60) |
| Model 2                          | 1.00               | 1.12 (0.47-2.67) | 0.56 (0.22-1.39) | 0.26 (0.10-0.68) | 1.00                  | 1.85 (0.79-4.33) | 2.14 (0.90-5.11) | 3.13 (1.32-7.42) |
| High triglycerides               |                    |                  |                  |                  |                       |                  |                  |                  |
| Model 1                          | 1.00               | 1.31 (0.62-2.75) | 0.74 (0.34-1.58) | 0.46 (0.20-1.04) | 1.00                  | 0.68 (0.30-1.56) | 0.79 (0.35-1.78) | 1.31 (0.61-2.79) |
| Model 2                          | 1.00               | 1.33 (0.61-2.87) | 0.71 (0.32-1.56) | 0.40 (0.17-0.94) | 1.00                  | 0.67 (0.29-1.56) | 0.84 (0.37-1.90) | 1.32 (0.61-2.84) |
| High blood pressure              |                    |                  |                  |                  |                       |                  |                  |                  |
| Model 1                          | 1.00               | 1.20 (0.57-2.51) | 0.81 (0.38-1.71) | 0.55 (0.25-1.19) | 1.00                  | 0.52 (0.23-1.17) | 1.11 (0.51-2.39) | 1.77 (0.83-3.75) |
| Model 2                          | 1.00               | 1.30 (0.60-2.80) | 0.99 (0.45-2.17) | 0.70 (0.31-1.57) | 1.00                  | 0.44 (0.18-1.05) | 1.18 (0.54-2.58) | 1.66 (0.77-3.57) |
| High blood glucose               |                    |                  |                  |                  |                       |                  |                  |                  |
| Model 1                          | 1.00               | 0.86 (0.39-1.88) | 0.78 (0.35-1.73) | 0.79 (0.35-1.74) | 1.00                  | 1.18 (0.48-2.91) | 1.42 (0.59-3.39) | 1.88 (0.82-4.34) |
| Model 2                          | 1.00               | 0.86 (0.38-1.91) | 0.77 (0.34-1.74) | 0.70 (0.31-1.61) | 1.00                  | 1.21 (0.49-3.01) | 1.34 (0.54-3.27) | 1.83 (0.78-4.25) |

Data are expressed as OR (95% CI). Model 1: adjusted for age, gender; Model 2: Model 1 plus additional adjustments for baseline body mass index, low-density lipoprotein cholesterol, smoking, regular exercise. HDL: high-density lipoprotein.

Diabetes@Metabolism 2016, www.sciencedirect.com ,http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2016.09.007

## 2.2 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ-ΓΗΡΑΝΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ

Οι περισσότεροι ασθενείς που εμφανίζουν MS είναι παχύσαρκοι, μεγαλύτερης ηλικίας και με ινσουλινοαντίσταση. Οι παράγοντες που το προσδιορίζουν είναι το βάρος, γενετικοί παράγοντες, ηλικία, τρόπος ζωής και μεγάλη πρόσληψη θερμίδων. Όμως παρά την σημασία της παχυσαρκίας μερικές φορές ασθενείς που έχουν φυσιολογικό βάρος εμφανίζουν ινσουλινοαντίσταση και εκδηλώνουν το σύνδρομο. Το σύνδρομο εκδηλώνεται όταν τουλάχιστον τρεις από τις πέντε παραμέτρους εκδηλώνονται : σπλαχνική παχυσαρκία (περιφέρεια μέσης >102 cm για άντρες και >88cm για γυναίκες), αυξημένη αρτηριακή πίεση(>130/85 mm Hg, δυσγλυκαιμία (γλυκόζη πλάσματος μετά από νηστεία >100 mg/dL), υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων (>150 mg/dL), χαμηλή HDL (<40 mg/dL σε άντρες ή <50 mg/dL σε γυναίκες).

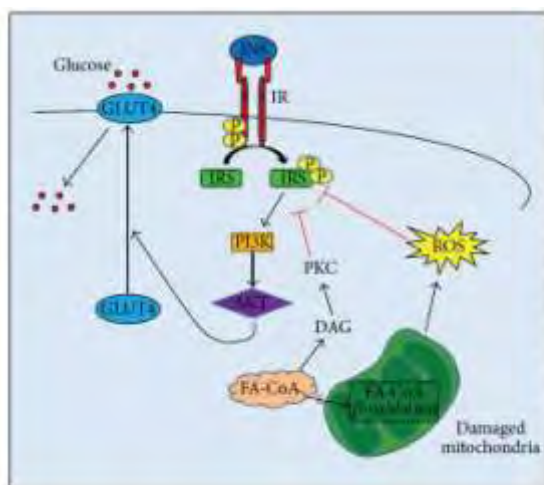
Οι ROS (ελεύθερες δραστικές ρίζες οξυγόνου) επάγουν την οξειδωτική καταστροφή μακρομορίων προκαλώντας κυτταρική δυσλειτουργία με την ηλικία και σταδιακά κυτταρικό θάνατο. Η σταδιακή οξειδωτική καταστροφή του mtDNA με την ηλικία προκαλεί σπάσιμο των αλυσίδων DNA και οδηγούν σε σωματικές μεταλλάξεις του mtDNA. Αυτό οδηγεί σε βλάβη των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας και έτσι υπάρχει ένας φαύλος κύκλος με αύξηση της παραγωγής των μιτοχονδριακών ROS. Η ηλικιο-εξαρτώμενη αύξηση της οξειδωτικής καταστροφής του DNA, λιπιδίων και πρωτεϊνών αποτελεί απόδειξη για την αύξηση ελλειμμάτων στο mtDNA και μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας με την ηλικία.

Ο κύριος μηχανισμός παθογένειας του MS είναι η ινσουλινοαντίσταση που εκδηλώνεται αρχικά ενώ σε δεύτερη φάση εκδηλώνονται οξειδωτικό στρες και χαμηλού επιπέδου φλεγμονή. Το οξειδωτικό στρες σχετίζεται με αγγειακές αλλαγές, παχυσαρκία, την ανάπτυξη διαβήτη.

Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> χρησιμοποιεί το ίδιο μονοπάτι με την ινσουλίνη και προκαλεί μειορρύθμιση του σήματος που παράγεται φυσιολογικά από την δράση της ινσουλίνης. Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> προκαλεί αύξηση της πρόσληψης γλυκόζης από τα αδιποκύτταρα και τους μύες και επίσης προκαλεί μετακίνηση του GLUT4 και σύνθεση λιπιδίων στα αδιποκύτταρα. Φυσιολογικά, η ινσουλίνη αλληλεπιδρά με τις α υπομονάδες του

υποδοχέα της IR της κυτταρικής μεμβράνης. Αυτό προκαλεί αυτοφωσφορυλίωση της Tyr και ο IR αποκτά δράση κινάσης τυροσίνης και μετά από αυτό ακολουθεί φωσφορυλίωση του IRS-1 (Insulin Receptor Substrate 1) και κατόπιν ενεργοποίηση του Akt και μετατόπιση του GLUT4 (Glucose Transporter Type 4) στην κυτταρική μεμβράνη όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 20. Η ένωση του GLUT4 στην μεμβράνη οδηγεί σε πρόσληψη γλυκόζης με διευκόλυνση της διάχυσής της. Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία απεικονίζεται με 2 τρόπους : παρεμβαίνει με την οξείδωση του ακυλ-CoA και την ακόλουθη συσσώρευση των ενδοκυτταρικών λιπιδίων και της διακυλογλυκερόλης και μετά την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C και μέσω της παραγωγής ROS. Και οι 2 τρόποι ενεργοποιούν την κινάση σερίνης που φωσφορυλιώνει την σερίνη του IRS-1 παρεμποδίζοντας έτσι την μεταγωγή του σήματος της ινσουλίνης. Η φωσφορυλιωμένη IRS-1 απελευθερώνεται από το εσωτερικό της μεμβράνης και προκαλούν διαβάθμιση των πρωτεϊνών και έτσι η ινσουλίνη αποτυγχάνει να ακολουθήσει το φυσιολογικό μεταβολικό μονοπάτι. [23]

ΕΙΚΟΝΑ 20. Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία ρυθμίζει το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης



Mitochondrial dysfunction regulates insulin signaling. Insulin interacts with  $\alpha$ -subunits of its receptor (IR) on cell membrane. In response to stimuli, tyrosine residues undergo autophosphorylation, and the IR phosphorylates the insulin-receptor substrate-1 (IRS-1) in serine residues, activating Akt, with phosphorylation of the type 4 glucose transporter (GLUT4) to the cell membrane and facilitation of glucose uptake. Mitochondrial dysfunction inhibits insulin signaling, leading to insulin resistance, by (1) interfering with oxidation of fatty acyl-CoA and consequent accumulation of diacylglycerol, with consequent activation of protein kinase C and phosphorylation of IRS-1 in tyrosine residues preventing its activation, and (2) through the generation of ROS, which inhibits IRS phosphorylation in serine residues.

The Scientific World Journal,2014,ID:604685,http://dx.doi.org/10.1155/2014/604685

Επιπλέον δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων παίζει κεντρικό ρόλο για μεταβολικές και καρδιαγγειακές διαταραχές (στεφανιαία νόσος, υπέρταση, καρδιακή δυσλειτουργία, εμβολή σχετίζονται με ινσουλινοαντίσταση και διαβήτη). Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFAs) συμβάλλουν στην ινσουλινοαντίσταση, μειωμένη καρδιακή ικανότητα και μειωμένη παραγωγή ATP ενώ αυξάνουν την μυοκαρδιακή κατανάλωση οξυγόνου σε παχύσαρκα και με ινσουλινοαντίσταση ποντίκια ob/ob.

[52]

Το οξειδωτικό στρες συνοδεύεται από αυξημένη συγκέντρωση στα ούρα της F2 ισοπροστάνης (8-επι-προσταγλανδίνη F2a) που είναι προϊόν οξείδωσης των λιπιδίων και αυτό συναντάται και στον διαβήτη τύπου 1 και 2 και στην παχυσαρκία. Επιπλέον, αυτός ο δείκτης σχετίζεται με τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Το οξειδωτικό στρες είναι η πρώτη φάση του διαβήτη 1 με μειωμένη ισορροπία σε NO, ουρικό οξύ ορού (ισχυρό αντιοξειδωτικό) και ασύμμετρη-διμεθυλ-L-αργινίνη (ADMA). [22]

Επίσης, οι ROS τροποποιούν την έκφραση της αδιπονεκτίνης που εκκρίνεται από τα αδιποκύτταρα και έτσι σχετίζεται με την παχυσαρκία και τον αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα. Οι δείκτες της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων στο πλάσμα και τα ούρα που είναι ενδεικτικοί του οξειδωτικού στρες σχετίζονται με χαμηλότερη συγκέντρωση αδιπονεκτίνης στην κυκλοφορία. Τα παχύσαρκα άτομα έχουν υψηλότερα επίπεδα δεικτών οξειδωτικού στρες και η απόκτηση βάρους αυξάνει αυτά τα επίπεδα. Το οξειδωτικό στρες και η φλεγμονή δευτερευόντως αυξάνουν την αναλογία λεπτίνης σε αδιπονεκτίνη και αυξάνουν τα επίπεδα άλλων αδιποκινών όπως είναι ο TNF (παράγοντας νέκρωσης όγκων) και ο αναστολέας ενεργοποίησης πλασμινογόνου 1. Η παχυσαρκία σχετίζεται με υπέρταση, ινσουλινοαντίσταση, διαβήτη, υπερλιπιδαιμία και καθένα από αυτά μπορεί να αυξήσει τον βαθμό του οξειδωτικού στρες. Συγκρίνοντας παχύσαρκα άτομα χωρίς MS με παχύσαρκα που έχουν MS, τα τελευταία εμφανίζουν μεγαλύτερο βαθμό οξειδωτικού στρες.

Τέλος, αύξηση των δεικτών του οξειδωτικού στρες στο πλάσμα ασθενών με MS που εμφανίζουν όλα τα χαρακτηριστικά του καθώς και νεφρική ανεπάρκεια δείχνει θετική συσχέτιση με αυξημένη συγκέντρωση τριγλυκεριδίων στο πλάσμα και χαμηλή HDL.

Σημαντικά γονίδια που αυξάνουν το προσδόκιμο ζωής (lifespan) είναι της κινάσης mTOR στόχος της ραπαμυκίνης, η πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από AMP (AMPK), sirtuins και ο αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης 1 (IGF-1). Αυτά τα γονίδια ενώνουν τα μονοπάτια μακροζωίας με αυτά του μεταβολισμού δείχνοντας έτσι ότι το προσδόκιμο ζωής εξαρτάται από την διαθεσιμότητα ενέργειας.

Η σηματοδότηση μέσω του IGF-1 προσδιορίζει την μακροζωία. Ανωμαλίες στο μονοπάτι σηματοδότησης της ινσουλίνης προκαλούν ηλικιο-εξαρτώμενες ασθένειες και αυξημένη θνησιμότητα, όπου ο άξονας αυξητικής ορμόνης GH/IGF-1 θα μπορούσε δυνητικά να συνεισφέρει στην μακροζωία. Σε μεγάλη ηλικία, χαμηλά επίπεδα IGF-1 σχετίζονται με αδυναμία, φτωγή διατροφή και μείωση γνωστικής ικανότητας και έτσι

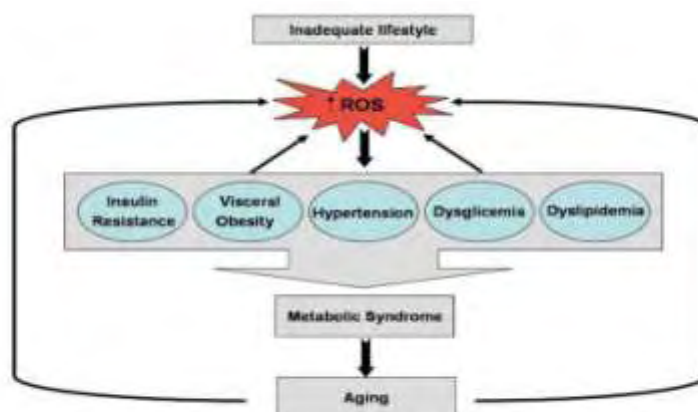
αύξηση κινδύνου για θάνατο.

Η γήρανση επιταχύνεται όταν παρουσιάζονται μεταβολικές ή καρδιαγγειακές ασθένειες και ο κίνδυνος ασθενειών αυξάνεται με την γήρανση. Παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης ασθενειών με την γήρανση είναι η παχυσαρκία, η ινσουλινοαντίσταση, η φλεγμονή, αλλαγές στην ενεργοποίηση του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης, στρες και υπέρταση, ενώ, όλα αυτά μαζί αυξάνουν την εμφάνιση του MS. Η γήρανση, η ινσουλινοαντίσταση και τα καρδιαγγειακά νοσήματα επιταχύνονται με την εκδήλωση του MS.

Πειράματα σε ποντίκια με υπερενεργοποίηση ή καταστολή γονιδίων που εμπλέκονται στην γήρανση όπως sirtuins, p66Shc, και mTOR οδηγούν σε ανάπτυξη χαρακτηριστικών του MS. Επίσης, αλλαγή στην έκφραση της FOXO, ενός μεταγραφικού παράγοντα, και στον IGF-1 επηρεάζει την διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών και συνεπώς την μακροζωία.

Τα μιτοχόνδρια είναι το «βιολογικό ρολόι» της κυτταρικής γήρανσης και σύμφωνα με αυτό το 2007 ο Passos δημοσίευσε μία μελέτη που έδειξε ότι τα γηρασμένα κύτταρα έχουν μεγαλύτερα επίπεδα ROS, δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια, περισσότερα σπασίματα της διπλής έλικας DNA και μικρότερα τελομερή και αυτό φανερώνει ότι οι ROS ενισχύουν την γήρανση που εξαρτάται από τα τελομερή. Στην εικόνα 21 συνοψίζεται η σύνδεση των ROS με τα χαρακτηριστικά του μεταβολικού συνδρόμου και τη γήρανση. [22]

ΕΙΚΟΝΑ 21. Σχέση μεταξύ ROS, επιτάχυνσης γήρανσης και μεταβολικού συνδρόμου.



Schematic relationship between ROS production, accelerated senescence and metabolic syndrome.

[www.aginganddisease.org](http://www.aginganddisease.org), <http://dx.doi.org/10.14336/AD.2014.0305>

[54]



### 2.3 MicroRNAs ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΣΤΡΕΣ ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ

Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία που προκαλείται από αλλαγές στην έκφραση των miRNAs έχει προταθεί ως ένας παράγοντας που συμβάλλει στην εμφάνιση μεταβολικών ασθενειών, ενώ ταυτόχρονα, η ανώμαλη έκφραση ορισμένων miRNAs σχετίζεται με επαγωγή στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (ER) που προκαλείται από το πλεόνασμα θρεπτικών ουσιών. Μελέτες δείχνουν ότι τα miRNAs είναι σύνδεσμος μεταξύ οξειδωτικού στρες και στρες του ER, δύο οδών στρες που απορρυθμίζονται στις μεταβολικές ασθένειες και σχετίζονται με υπερπαραγωγή πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (VLDL). Η δυσλιποπρωτεϊναιμία συχνά συνοδεύεται από μεταβολικό σύνδρομο, το οποίο αρχίζει με υπερπαραγωγή της VLDL και αλλοιωμένη βιογένεση της υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (HDL).

Τα miRNAs είναι μια κατηγορία μικρών μη κωδικών RNAs, με μήκος περίπου 22 νουκλεοτιδίων. Συμμετέχουν σε διαδικασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, διαφοροποίηση, απόπτωση και μεταβολισμός λιπιδίων. Τα γονίδια των miRNAs είναι περίπου το 1% του γονιδιώματος. Η ρύθμιση των miRNAs στηρίζεται στη συμπληρωματικότητα μεταξύ του miRNA και του mRNA του γονιδίου στόχου, με τις συμπληρωματικές θέσεις συνήθως να βρίσκονται μέσα στο 3'UTR άκρο του mRNA. Το γονίδιο περιέχει συχνά συμπληρωματικές θέσεις για αρκετά διαφορετικά miRNAs ενώ την ίδια στιγμή ένα miRNA μπορεί να ρυθμίζει ταυτόχρονα πολλά διαφορετικά γονίδια. Το 60% όλων των ανθρώπινων γονιδίων ελέγχονται από miRNAs. Περίπου το ένα τέταρτο των ανθρώπινων miRNAs βρίσκεται μέσα στα ιντρόνια άλλων γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, επιτρέποντας τη συντονισμένη μεταγραφή του miRNA και του mRNA στόχου. Πρώτα δημιουργούνται στον πυρήνα τα pri-miRNAs και μετά αυτά διασπώνται μέσα στον πυρήνα για να δώσουν τα pre-miRNAs μήκους περίπου 70 νουκλεοτιδίων. Το pre-miRNA εξάγεται στο κυτταρόπλασμα όπου αναγνωρίζεται και υποβάλλεται σε επεξεργασία από την

Dicer, μια ενδονουκλεάση RNAάση III. Το μικρό δίκλωνο miRNA ξετυλίγεται και η μία αλυσίδα επεξεργάζεται από την πρωτεΐνη RISC και έτσι προκύπτει το miRNA.

Η ανάπτυξη του μεταβολικού συνδρόμου συνήθως συνοδεύεται με την ενεργοποίηση της μεταφλεγμονής, μιας μορφής χρόνιας φλεγμονής που ελέγχεται από κύτταρα του μεταβολισμού. Προκαλείται από περίσσεια θρεπτικών ή άλλων μεταβολιτών και έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη έκκριση φλεγμονωδών κυτοκινών όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων TNFα και IL-6 και ενεργοποίηση φλεγμονωδών μονοπατιών όπως c-Jun, NH2-τερματικές κινάσες (JNK), IKB κινάση (IKK) και πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από RNA (PKR). Στο MS εμφανίζεται φλεγμονώδες στρες που απορρυθμίζει τον μεταβολισμό της VLDL. Η συγκέντρωση TNFα του πλάσματος συσχετίστηκε θετικά με τη συγκέντρωση VLDL πλάσματος καθώς και με έναν αριθμό παραγόντων κινδύνου για τη στεφανιαία νόσο. Η θετική συσχέτιση μεταξύ φλεγμονωδών παραγόντων και υπερπαραγωγής VLDL δηλώνει ότι η αναστολή της φλεγμονής μπορεί να προάγει την δυσλιπιδαιμία σε άτομα με μεταβολική νόσο.

Στοιχεία από μελέτες έδειξαν ότι οι φλεγμονώδεις αποκρίσεις ρυθμίζονται από ορισμένα miRNAs, όπως miR-223, miR-15a και miR-16. Στους λιπώδεις ιστούς ποντικών miR-223 KO (Knockout) ήταν αυξημένη η φλεγμονή σε σχέση με ποντίκια WT (Wild Type) και αυτό οφείλεται στην αυξημένη διείσδυση μακροφάγων του λιπώδους ιστού των KO ποντικών. Ποντίκια WT που έλαβαν κύτταρα μυελού των οστών από miR-223 KO ποντίκια και τροφοδοτήθηκαν με HFD για 8 εβδομάδες ανέπτυξαν σημαντική ανοχή στην ινσουλίνη σε σύγκριση με αυτά που έλαβαν κύτταρα μυελού των οστών από ποντικούς WT. Μελέτη αποκάλυψε ότι το miR-223 στοχεύει το mRNA του Pknox1, μιας πρωτεΐνης που εμπλέκεται στην ρύθμιση των μακροφάγων και μειώνει την έκφραση της Pknox1. Επιπλέον, το miR-223 βρέθηκε ότι αναστέλλει άμεσα τη φλεγμονώδη δραστηριότητα της NLRP3. Η αυξημένη έκφραση του miR-223 κατά την χορήγηση HFD μπορεί να είναι μια ανταπόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος ώστε να υπάρξει βελτίωση της φλεγμονής που προκαλείται από το HFD. Αυτά τα στοιχεία δείχνουν ότι η αφθονία ορισμένων miRNAs θα μπορούσε να αποτελέσει ενδεχόμενη στρατηγική για την καταπολέμηση του υπερβολικού θρεπτικού συστατικού που προκαλεί την φλεγμονή.

Η UPR είναι βασικό συστατικό της φλεγμονής και των δικτύων σηματοδότησης των στρες, και επίσης συνδέεται με την διαταραχή του μεταβολισμού των λιπιδίων και

των λιποπρωτεϊνών στο MS. Το ER στρες ενεργοποιεί 3 διαμεμβρανικούς αισθητήρες IRE1 α/β, PERK και ATF6 των οποίων οι λειτουργίες είναι να διευκολύνουν το κύτταρο να προσαρμοστεί στο στρες. Η βιοσύνθεση της apoB διαμορφώνεται τόσο από την ινσουλίνη όσο και από το ER στρες. Μειωμένο ER στρες που προκαλείται από τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (FAs) αυξάνει την έκκριση apoB ενώ η μεγαλύτερη φόρτωση σε λιπίδια προκαλεί στρες και μείωση της apoB. Η συνεχής έκκριση apoB από ηπατοκύτταρα προκαλεί ER στρες και ινσουλινοαντίσταση. Η ενεργοποίηση του PERK προκαλεί έκφραση του miR-211 που στοχεύει τον υποκινητή των chop/gadd 153 και εξασθενίζει την έκφρασή του. Αυτό παρέχει την δυνατότητα για το κύτταρο να αποκαταστήσει την ομοιόσταση πριν επέλθει απόπτωση. Πιο ενδιαφέρουσα, ενεργοποίηση της PERK κατά το ER στρες σε συνδυασμό με τον μεταγραφικό παράγοντα NF-kB επάγει την έκφραση του miR-30c-2\* και αυτό με την σειρά του αυξάνει την έκφραση του XBP1 και έτσι λόγω αυτού προάγεται η ηπατική έκφραση VLDL ενώ η μείωση της XBP1 μειώνει τα τριγλυκερίδια του πλάσματος, την χοληστερόλη και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα εξαιτίας της μειωμένης έκκρισης VLDL.

Η ενεργοποίηση της IRE, ενός άλλου αισθητήρα του ER στρες διασπά το pre-miR-17 οδηγώντας στην μειωμένη έκφραση του miR-17 το οποίο καταστέλλει κανονικά την έκφραση της πρωτεΐνης που αλληλεπιδρά με θειορεδοξίνη (TXNIP). Έτσι μετά ενεργοποιείται η NLRP3 της φλεγμονής και επάγεται απόπτωση σε παγκρεατικά κύτταρα οδηγώντας σε ινσουλινοαντίσταση. Αυτές οι μελέτες δείχνουν ότι τα miR-223 και miR-30c-2 μπλέκονται στη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων στα μιτοχόνδρια και στο ER και στην επακόλουθη αύξηση της υπερλιπιδαιμίας που είναι ένα από τα χαρακτηριστικά του MS. Στον πίνακα 15 παρουσιάζονται τα miRNAs που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των λιπιδίων και λιποπρωτεϊνών, ενώ στην εικόνα 22 παρουσιάζεται η ρύθμιση του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών από τα miRNAs. [24]

**ΠΙΝΑΚΑΣ 15.** Τα miRNAs που μπλέκονται σε μεταβολισμό λιπιδίων και λιποπρωτεϊνών

| miRNA        | Lipid-Related Gene                                                                                      | Function of Gene                                                                                                      | Effects on Lipids                                                          |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| miR-30c      | <i>MTP</i>                                                                                              | Lipidate apoB                                                                                                         | ↓ Plasma lipids                                                            |
| miR-155      | <i>LPGAT1</i><br><i>LXRα</i>                                                                            | Regulate lipid synthesis                                                                                              | ↓ Hepatic lipids                                                           |
| miR-122      | <i>PMVK</i><br><i>FASN</i><br><i>ACC2</i><br><i>SCD1</i><br><i>ACLY</i><br><i>AMPKα</i><br><i>HADHB</i> | Cholesterol synthesis<br>FA synthesis<br>FA synthesis<br>FA synthesis<br>FA synthesis<br>FA oxidation<br>FA oxidation | ↑ Plasma cholesterol<br>↑ Plasma TG<br>↑ Lipid synthesis<br>↓ FA oxidation |
| miR-33a/b    | <i>CPT1α</i><br><i>CROT</i><br><i>AMPKα</i><br><i>ABCA1</i>                                             | FA oxidation<br>FA oxidation<br>FA oxidation<br>Cholesterol efflux                                                    | ↑ Hepatic lipids<br>↑ Plasma cholesterol                                   |
| miR-144      | <i>ABCA1</i>                                                                                            | Cholesterol efflux                                                                                                    | ↓ Plasma cholesterol                                                       |
| miR-145      | <i>ABCA1</i>                                                                                            | Cholesterol efflux                                                                                                    | ↓ Plasma cholesterol                                                       |
| miR-758      | <i>ABCA1</i>                                                                                            | Cholesterol efflux                                                                                                    | ↓ Plasma cholesterol                                                       |
| miR-378/378* | <i>CRAT</i>                                                                                             | FA oxidation                                                                                                          | ↑ Hepatic lipids<br>↑ Plasma TG                                            |
| miR-185      | <i>SR-BI</i>                                                                                            | Cholesterol uptake                                                                                                    | ↓ Cholesterol uptake                                                       |
| miR-96       | <i>SR-BI</i>                                                                                            | Cholesterol uptake                                                                                                    | ↓ Cholesterol uptake                                                       |
| miR-223      | <i>SR-BI</i>                                                                                            | Cholesterol uptake                                                                                                    | ↓ Cholesterol uptake                                                       |
| miR-125a     | <i>SR-BI</i>                                                                                            | Cholesterol uptake                                                                                                    | ↓ Cholesterol uptake                                                       |

*AJP-Endocrinol Metab* • doi:10.1152/ajpendo.00194.2014 • www.ajpendo.org

**ΕΙΚΟΝΑ 22.** Ρύθμιση μεταβολισμού λιποπρωτεϊνών από miRNAs



**Fig. 1.** MicroRNA (miRNA) regulation of lipoprotein metabolism. Schematic overview of miRNAs involved in metabolism of VLDL and HDL. Select hepatic miRNAs that regulate genes involved in either lipid biosynthesis or mitochondrial fatty acid (FA) oxidation influence lipid availability within hepatocytes and increase or decrease VLDL secretion. miRNAs that down-regulate ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) expression decrease cholesterol efflux from both the liver and extrahepatic tissues, such as the heart, brain, and macrophages, and decrease HDL production. Hepatic miRNAs that downregulate hepatic scavenger receptor class B type I (SR-BI) expression decrease selective HDL-cholesterol uptake into the liver.

*AJP-Endocrinol Metab* • doi:10.1152/ajpendo.00194.2014 • www.ajpendo.org

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### 3.1 ΜΟΝΤΕΛΑ ΖΩΩΝ ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ

Η ανάπτυξη της παχυσαρκίας έχει αποδοθεί και σε γενετικούς και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Τα παχύσαρκα ποντίκια Zucker έχουν ερευνηθεί και χρησιμοποιηθεί ως μοντέλα για την παχυσαρκία και το MS. Αυτά τα ποντίκια έχουν μετάλλαξη στο γονίδιο *fa/fa* μόνο και χαρακτηρίζεται από έλλειμμα του υποδοχέα της λεπτίνης και μπορεί να διακριθεί από την 5<sup>η</sup> εβδομάδα ανάπτυξης με εναπόθεση υπερβολικού υποδόριου και σπλαχνικού λίπους. Χαρακτηρίζονται από υπερφαγία, ινσουλινοαντίσταση, δυσλιπιδαιμία και υπέρταση δηλαδή όλους τους παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση μεταβολικού συνδρόμου.

Αυτοί οι ποντικοί έχουν χρησιμοποιηθεί προηγουμένως για την αξιολόγηση των επιπτώσεων της θεραπείας ενάντια στην παχυσαρκία, θεραπεία όπως η αφυδροεπιανδροστερόνη, αγωνιστές του υποδοχέα peroxisome proliferator-activated  $\alpha$ ,  $\gamma$  στα λιπίδια του ορού, το σωματικό βάρος και ευαισθησία στην ινσουλίνη. Η συνηθισμένη άσκηση, επίσης, προκαλεί αύξηση του TNF- $\alpha$  στον λιπώδη ιστό παχύσαρκου ποντικού Zucker. Με βάση μελέτη που στηρίχθηκε στα αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα της ηλεκτροθεραπείας αυτή έχει προταθεί ως μέσο για τον έλεγχο του χαμηλού βαθμού φλεγμονής στον παχύσαρκο Zucker ποντικό που είναι το μοντέλο του μεταβολικού συνδρόμου.

Στην μελέτη έγινε έλεγχος εάν η επανειλημμένη εφαρμογή της ηλεκτροθεραπείας στα παχύσαρκα Zucker ποντίκια θα οδηγήσει σε αλλαγή της ανισορροπίας μεταξύ προ-φλεγμονοδών και αντιφλεγμονοδών κυτοκινών που παράγονται από τον λευκό λιπώδη ιστό. Μετρήθηκε η επίδραση της ηλεκτροθεραπείας στο σωματικό βάρος του ποντικού καθώς και τα

επίπεδα γλυκόζης, ινσουλίνης, λεπτίνης, αδιπονεκτίνης, TNF-a και IL-10. Μια αλλαγή στις σχετικές συγκεντρώσεις του TNF-a και IL-10 στο αίμα και στον λιπώδη ιστό θα έδειχνε αλλαγή στην ενεργοποίηση των μακροφάγων του λιπώδους ιστού ενώ μια αλλαγή των επιπέδων αδιπονεκτίνης και λεπτίνης θα έδειχνε μεταβολή στην αντίσταση στην ινσουλίνη. Θεραπείες κατά της παχυσαρκίας ή φάρμακα δεν πρέπει ιδανικά να αυξήσουν τη γλυκόζη του αίματος διαφορετικά θα υπήρχε μια τάση προς την κατεύθυνση ο διαβήτη συχνά να συνυπάρχει με την παχυσαρκία.

Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία μπορεί να προκληθεί από αλλαγές στην μορφολογία των μιτοχονδρίων. Ειδικότερα, σε σκελετικούς μυς ατόμων με διαβήτη τύπου 2 και παχυσαρκία τα μιτοχόνδρια έχουν μικρότερο μέγεθος και αριθμητικά είναι λιγότερα ενώ το μικρότερο μέγεθος που εμφανίζουν σχετίζεται με ευαισθησία στην ινσουλίνη. Η παχυσαρκία σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα mitofusin και πολυμορφισμούς στο γονίδιο της PARL (presenillin-associated rhomboid-like protein). [23]

Σε μελέτη που έγινε σε παχύσαρκα ποντίκια Zucker και δημοσιεύτηκε το 2016 χρησιμοποιήθηκαν 2 ομάδες ποντικών. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από 5 παχύσαρκα ποντίκια, μέσης ηλικίας 14,6 εβδομάδων, μέσου βάρους 528 g που τους εφαρμόστηκε ηλεκτροθεραπεία 6 φορές για πάνω από 2 εβδομάδες. Η δεύτερη ομάδα αποτελείται από 7 ποντίκια, μέσης ηλικίας 14,1 εβδομάδων, μέσου βάρους 540 g που δεν τους εφαρμόστηκε ηλεκτροθεραπεία και αποτελούν την ομάδα ελέγχου της μελέτης (control).

Τα αποτελέσματα της αναφερθείσας μελέτης για τις μέσες μετρήσεις σωματικού βάρους κατά την 1<sup>η</sup> και 12<sup>η</sup> ημέρα για την Ομάδα 1 και την Ομάδα 2 παρουσιάζονται στον Πίνακα 16. Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στο μέσο σωματικό βάρος την 12<sup>η</sup> μέρα σε σύγκριση με την 1η Ημέρα τόσο για την Ομάδα 1 όσο και για την Ομάδα 2 ποντικών. Επίσης, δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στο μέσο σωματικό βάρος μεταξύ Ομάδας 1 και Ομάδας 2 την ημέρα 1 ή την ημέρα 12 ( $p > 0,05$  και για τις δύο συγκρίσεις, unpaired t test). [25]

[60]

**ΠΙΝΑΚΑΣ 16.** Μέτρηση βάρους σε παχύσαρκα ποντίκια

| Body weight measurements (g). |            |            |
|-------------------------------|------------|------------|
| Obese Zucker fatty rats       |            |            |
|                               | Group 1    | Group 2    |
| Day 1                         | 528 (6.6)  | 540 (13.0) |
| Day 12                        | 512 (7.3)* | 518 (9.2)* |

Data presented as mean (standard error).  
\* Significantly different from Day 1 by paired t test ( $p < 0.05$ ).

[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).

Το βασικό επίπεδο γλυκόζης του αίματος λήφθηκε να είναι στα 20 λεπτά. Η μέτρηση της γλυκόζης αίματος μετρήθηκε για 30 λεπτά σε διάστημα 20 έως 50 λεπτά μετά την αναισθησία. Ο πίνακας 17 δείχνει τα μέσα επίπεδα της γλυκόζης αίματος σε 20 λεπτά και σε 50 λεπτά και την αλλαγή στα επίπεδα γλυκόζης αίματος στις διάφορες ημέρες της θεραπείας και για τις δύο ομάδες. Συνδυασμένες μετρήσεις γλυκόζης αίματος στα 20 λεπτά και αλλαγή της γλυκόζης αίματος για πάνω από τα 30 λεπτά για την 1<sup>η</sup> εβδομάδα και την 2<sup>η</sup> εβδομάδα και για τις δύο ομάδες παρουσιάζονται στον Πίνακα 18.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 17.** Μέτρηση γλυκόζης αίματος για τις 2 ομάδες για 12 ημέρες

| Blood glucose measurements (mmol/L) on days of treatment. |                            |                          |                          |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Day of study                                              | BG at 20 min               | BG at 50 min             | Change in BG             |
| Group 1 (obese Zucker fatty rats, EA treated)             |                            |                          |                          |
| Day 1                                                     | 7.92 (0.53) <sup>a</sup>   | 8.54 (0.62)              | 0.62 (0.60)              |
| Day 3                                                     | 5.42 (0.41) <sup>b</sup>   | 5.90 (0.86)              | 0.48 (0.76)              |
| Day 5                                                     | 4.94 (0.21) <sup>b</sup>   | 5.96 (0.69)              | 1.02 (0.49) <sup>*</sup> |
| Day 8                                                     | 6.08 (0.35) <sup>b,c</sup> | 6.30 (0.50)              | 0.22 (0.18)              |
| Day 10                                                    | 7.04 (0.52) <sup>a,c</sup> | 9.58 (2.21)              | 2.54 (1.79)              |
| Day 12                                                    | 5.54 (0.42) <sup>b</sup>   | 6.58 (0.54)              | 1.04 (0.16) <sup>*</sup> |
| Group 2 (obese Zucker fatty rats, control)                |                            |                          |                          |
| Day 1                                                     | 7.96 (0.64) <sup>d</sup>   | 7.64 (0.48) <sup>f</sup> | -0.32 (0.20)             |
| Day 3                                                     | 5.74 (0.61) <sup>e</sup>   | 5.14 (0.64) <sup>e</sup> | -0.60 (0.07)             |
| Day 5                                                     | 4.84 (0.55) <sup>e</sup>   | 4.66 (0.50) <sup>e</sup> | -0.18 (0.12)             |
| Day 8                                                     | 5.10 (0.38) <sup>e</sup>   | 5.06 (0.23) <sup>e</sup> | -0.04 (0.27)             |
| Day 10                                                    | 5.84 (0.37) <sup>e</sup>   | 6.06 (0.54) <sup>e</sup> | 0.22 (0.30)              |
| Day 12                                                    | 5.40 (0.19) <sup>e</sup>   | 5.36 (0.20) <sup>e</sup> | -0.04 (0.24)             |

Data presented as mean (standard error). Data tested for each group by analysis of variance (ANOVA) and Duncan's test with significance taken to be at the level  $p < 0.05$ . For each group, values with different superscript letters within individual columns are significantly different.  
\* Significantly different from Group 2 by unpaired t test ( $p < 0.05$ ).  
BG = blood glucose; EA = electroacupuncture.

[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).



**ΠΙΝΑΚΑΣ 18.** Μετρήσεις γλυκόζης στα 20 min και αλλαγή για πάνω από 30 min για 2 εβδομάδες και στις 2 ομάδες ποντικών Zucker.

|                         | Blood glucose measurements (mmol/L) over Week 1 and Week 2. |                          |                         |                          |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
|                         | Week 1                                                      |                          | Week 2                  |                          |
|                         | Baseline BG (at 20 min)                                     | Change in BG over 30 min | Baseline BG (at 20 min) | Change in BG over 30 min |
| Obese Zucker fatty rats |                                                             |                          |                         |                          |
| Group 1                 | 6.09 (0.41)                                                 | 0.71 (0.34)*             | 6.22 (0.29)*            | 1.27 (0.61)              |
| Group 2                 | 6.18 (0.47)                                                 | -0.37 (0.09)             | 5.45 (0.19)             | 0.05 (0.15) <sup>†</sup> |

Data presented as mean (standard error).  
\* Significantly different from Group 2 by unpaired t test ( $p < 0.05$ ).  
<sup>†</sup> Significantly different from Week 1 by unpaired t test ( $p < 0.05$ ).

[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).

Για την Ομάδα 1, η μέση γλυκόζη αίματος σε 20 λεπτά την 1<sup>η</sup> ημέρα ήταν σημαντικά υψηλότερη από την 3<sup>η</sup> ημέρα, 5<sup>η</sup> ημέρα, 8<sup>η</sup> ημέρα και την 12<sup>η</sup> ημέρα, αλλά όχι την 10<sup>η</sup> ημέρα ( $p < 0.0005$ ). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στη μέση τιμή γλυκόζης αίματος στα 50 λεπτά για την ομάδα 2, ενώ οι μέσες τιμές γλυκόζης αίματος στα 20 λεπτά και στα 50 λεπτά της Ημέρας 1 ήταν σημαντικά υψηλότερες από ό, τι για όλες τις άλλες ημέρες. Και για τις δύο ομάδες, δεν υπήρξαν σημαντικές αλλαγές στη μέση τιμή γλυκόζης αίματος όταν μετρήθηκε η αλλαγή της για πάνω από 30 λεπτά κατά τη διάρκεια της περιόδου μελέτης. Για την Ομάδα 1 εμφανίστηκε μια θετική αλλαγή στην γλυκόζη αίματος όταν μετρήθηκε η αλλαγή της για πάνω από 30 λεπτά, για όλες τις ημέρες που εφαρμόστηκε η θεραπεία ενώ για την Ομάδα 2 υπήρξε αρνητική αλλαγή για την γλυκόζη του αίματος όταν μετρήθηκε η αλλαγή της για πάνω από 30 λεπτά για όλες τις ημέρες θεραπείας εκτός από την 10<sup>η</sup> ημέρα. Υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων στην μέση μεταβολή της γλυκόζης αίματος την 5<sup>η</sup> ημέρα (τέλος 1<sup>ης</sup> εβδομάδας) και 12 ημέρα (τέλος 2<sup>ης</sup> εβδομάδας). Τέλος, για την Ομάδα 1 δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην βασική γλυκόζη αίματος ή στην αλλαγή που παρουσίασε η γλυκόζη αίματος κατά την εβδομάδα 1 και την εβδομάδα 2. Για την ομάδα 2, όμως, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην αλλαγή της γλυκόζης του αίματος κατά την 2<sup>η</sup> εβδομάδα. Για την Ομάδα 1, η βασική γλυκόζη του αίματος κατά την 2<sup>η</sup> εβδομάδα και η βασική αλλαγή που παρουσίασε η γλυκόζη αίματος κατά την 1<sup>η</sup> εβδομάδα ήταν στατιστικά υψηλότερες σε σχέση με της Ομάδας 2. [25]

Η μέση τιμή για αδιπονεκτίνη, λεπτίνη, IL-10, TNPa, ινσουλίνη και γλυκόζη στον ορό του αίματος που συλλέχθηκαν κατά την 12<sup>η</sup> μέρα στο τέλος της μελέτης

[62]



παρουσιάζονται στον πίνακα 19.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 19.** Μετρήσεις αδιπονεκτίνης, λεπτίνης, IL-10, TNF $\alpha$ , ινσουλίνης και γλυκόζης στον ορό του αίματος κατά την 12 μέρα

| Measurements of adiponectin, leptin, interleukin-10 (IL-10), tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), insulin, and glucose in blood sera. | Obese Zucker fatty rats |              |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|--------------|
|                                                                                                                                                    | Group 1                 | Group 2      |
| Adiponectin ( $\mu\text{g/mL}$ )                                                                                                                   | 15.28 (3.41)            | 21.72 (1.47) |
| Leptin (ng/mL)                                                                                                                                     | 66.16 (4.36)            | 63.22 (2.46) |
| Adiponectin:leptin ( $\times 10^3$ )                                                                                                               | 0.24 (0.07)             | 0.34 (0.02)  |
| IL-10 (pg/mL)                                                                                                                                      | 12.91 (2.55)            | 20.15 (3.78) |
| TNF- $\alpha$ (pg/mL)                                                                                                                              | 3.47 (0.89)*            | 18.89 (0.86) |
| IL-10:TNF- $\alpha$                                                                                                                                | 2.66 (0.54)*            | 1.00 (0.28)  |
| Insulin (ng/mL)                                                                                                                                    | 13.63 (0.95)            | 12.42 (1.62) |
| Glucose (mmol/L)                                                                                                                                   | 12.23 (1.25)            | 9.18 (0.84)  |

Data presented as mean (standard error). The adiponectin:leptin ratios were determined from levels expressed in ng/mL.  
\* Significantly different from Group 2 by unpaired t test ( $p < 0.05$ ).

[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην μέση τιμή των αδιπονεκτίνης, λεπτίνης, IL-10, TNF $\alpha$ , ινσουλίνης και γλυκόζης στον ορό του αίματος μεταξύ των 2 ομάδων κατά το τέλος της μελέτης (12<sup>η</sup> μέρα). Η μέση τιμή του TNF- $\alpha$  στον ορό ήταν σημαντικά χαμηλότερη στην ομάδα 1 σε σχέση με την ομάδα 2. Η αναλογία αδιπονεκτίνης-λεπτίνης μεταξύ των δύο ομάδων δεν ήταν σημαντικά διαφορετική ( $p > 0,05$ ) αλλά τα επίπεδα IL-10 και TNF- $\alpha$  ήταν σημαντικά υψηλότερα για την ομάδα 1 σε σχέση με την ομάδα 2.

Οι μέσες τιμές για αδιπονεκτίνη, λεπτίνη, IL-10, TNF- $\alpha$  στον λευκό λιπώδη ιστό των ποντικών που μετρήθηκαν κατά την 12<sup>η</sup> μέρα (τέλος μελέτης) φαίνονται στον πίνακα 20.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 20.** Μέση τιμή σε αδιπονεκτίνη, λεπτίνη, IL-10, TNF- $\alpha$  στον λευκό λιπώδη ιστό κατά την 12<sup>η</sup> μέρα (τέλος μελέτης)

| Measurements of adiponectin, leptin, interleukin-10 (IL-10) and tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) in white adipose tissue. | Obese Zucker fatty rats |               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|---------------|
|                                                                                                                                           | Group 1                 | Group 2       |
| Adiponectin ( $\mu\text{g/mL}$ )                                                                                                          | 13.35 (2.84)            | 7.35 (1.51)   |
| Leptin (ng/mL)                                                                                                                            | 48.16 (3.39)            | 43.06 (2.34)  |
| Adiponectin:leptin ( $\times 10^3$ )                                                                                                      | 0.27 (0.05)             | 0.17 (0.03)   |
| IL-10 (pg/mL)                                                                                                                             | 469.4 (16.39)           | 486.7 (28.26) |
| TNF- $\alpha$ (pg/mL)                                                                                                                     | 21.13 (1.63)            | 17.87 (1.70)  |
| IL-10:TNF- $\alpha$                                                                                                                       | 22.70 (1.83)            | 27.97 (2.56)  |

Data presented as mean (standard error). The adiponectin:leptin ratios were determined from levels expressed in ng/mL. White adipose tissue (0.2 g) was homogenized in 0.6 mL radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer with protease inhibitor, centrifuged, and the infranant assayed.

[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των 2 ομάδων στα επίπεδα αδιπονεκτίνης, λεπτίνης, IL-10, TNF- $\alpha$ . Η αναλογία αδιπονεκτίνης/λεπτίνης και TNF- $\alpha$ /IL-10 δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ( $p>0,05$ ). Τέλος, τέσσερις από τις πέντε τιμές για την αδιπονεκτίνη στην ομάδα 1 ήταν μεγαλύτερες από 9 mg/mL ενώ για την ομάδα 2 μόνο μία από τις πέντε τιμές ήταν μεγαλύτερη από 9 mg/mL.

Αξιοσημείωτο από μελέτες είναι ότι υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι η παχυσαρκία και η ινσουλινοαντίσταση σχετίζονται με την φλεγμονή λόγω της χρόνιας ενεργοποίησης του ανοσοβιολογικού συστήματος. Τα άτομα με μεταβολικό σύνδρομο παρουσιάζουν μία περίσσεια προ-φλεγμονωδών κυτοκινών όπως TNF- $\alpha$  και IL-6 που και τα δύο παράγονται στον λιπώδη ιστό οδηγώντας σε ανισορροπία μεταξύ προ-φλεγμονωδών και αντι-φλεγμονωδών κυτοκινών. Παρεμβάσεις σε παχύσαρκες γυναίκες με στόχο την απώλεια βάρους έχουν οδηγήσει σε μείωση των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών συμπεριλαμβανομένης της IL-6.

Τέλος, σε μοντέλο παχύσαρκων ποντικών παρατηρήθηκε ότι αυξημένα επίπεδα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> από τον λιπώδη ιστό εμφανίζονται σε αρχικά στάδια του διαβήτη. Αυτό το γεγονός ακολουθείται από μειωμένα επίπεδα mRNA των SOD, καταλάσης και υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης. Η παχυσαρκία και η ινσουλινοαντίσταση σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων στο ήπαρ. Σε μοντέλα ζώων με παχυσαρκία και διαβήτη έχει παρατηρηθεί στο ήπαρ τους αύξηση των δεικτών της υπεροξειδωσής των λιπιδίων. Σε ποντίκια το οξειδωτικό στρες επάγεται χρησιμοποιώντας αναστολείς της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης. Η μείωση των επιπέδων γλουταθειόνης σε ιστούς που αποτελεί σημαντικό αντιοξειδωτικό για τα κύτταρα προκαλεί αύξηση των δεικτών του οξειδωτικού στρες και μειωμένη ομοιόσταση της γλυκόζης.

### 3.2ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΣΤΟΧΕΥΟΝΤΑΣ ΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

Παρουσιάζοντας τον κύριο ρόλο της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας για την ανάπτυξη διαφόρων μεταβολικών διαταραχών, έχουν αναπτυχθεί νέες θεραπευτικές στρατηγικές τα τελευταία χρόνια με σκοπό να ρυθμίσουν την λειτουργία των μιτοχονδρίων και την βιογένεση. Αυτές οι θεραπευτικές προσεγγίσεις θα μπορούσαν να είναι χρήσιμες ώστε να μειώσουν την δράση της ινσουλίνης και την παραγωγή της από τα β παγκρεατικά κύτταρα, την συσσώρευση λιπιδίων στο ήπαρ, τις δυσλειτουργίες των σκελετικών μυών, την ενδοθηλιακή χαλάρωση των αγγείων και την συστολική και διαστολική λειτουργία του μυοκαρδίου. Η νέα φαρμακολογική προσέγγιση εστιάζει στους μηχανισμούς που ρυθμίζουν την βιογένεση των μιτοχονδρίων, στις ROS και στην αναπνευστική αλυσίδα ώστε να αποκατασταθεί η λειτουργία των μιτοχονδρίων.

Νέες φαρμακολογικές ανακαλύψεις με σκοπό την βελτίωση της λειτουργίας των μιτοχονδρίων έχουν προταθεί τα τελευταία χρόνια αλλά υπάρχει ταυτόχρονα και συνεχής αναζήτηση νέων. Η ρεσβερατρόλη, ένα συστατικό του κόκκινου κρασιού, ενεργοποιεί την SIRT1, προκαλεί θερμιδικό περιορισμό, έχει αντιγηραντική δράση, ελαττώνει τα σημάδια γήρανσης σε ποντίκια και αυξάνει την επιβίωση. Στα ποντίκια η ρεσβερατρόλη βελτιώνει την ινσουλινοαντίσταση, προστατεύει από την παχυσαρκία που προκαλείται λόγω διατροφής, επάγει γονίδια για την οξειδωτική φωσφορυλίωση και ενεργοποιεί τον PGC-1α. Άλλα μικρότερα μόρια που μοιάζουν με την ρεσβερατρόλη είναι καταλληλότερα για να ενισχύσουν την δράση της SIRT1 αποακετυλιώνοντάς της. Η SIRT1 είναι μία αποακετυλάση ιστονών που ρυθμίζει την PGC-1α που είναι ρυθμιστής της βιογένεσης των μιτοχονδρίων και συμπαράγοντας μεταγραφικών παραγόντων που δρουν στην ενεργειακή ομοιόσταση. Διαβητικά ποντίκια που ακολούθησαν θεραπεία με tadalafil έδειξαν βελτίωση στην λειτουργία του αριστερού καρδιακού κόλπου που σχετίζεται με αύξηση της ενεργότητας της SIRT στην καρδιά. [23]

Άλλος στόχος για φαρμακολογικούς χειρισμούς είναι η AMPK που ενισχύει και την γλυκόζη και την οξείδωση των λιπών, την αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού. Επιπλέον, όπως πρόσφατα δείχθηκε, στοχεύοντας τα αντι-οξειδωτικά στα μιτοχόνδρια ίσως επέλθει αλλαγή στην επιλογή κατάλληλου ενεργειακού καυσίμου από τα κύτταρα. Βιταμίνες και χημικά παράγωγα με αντι-οξειδωτικές ιδιότητες έχουν αναπτυχθεί όπως

[65]

το συνένζυμο Q, η βιταμίνη E, η N-ακετυλκυστεΐνη (NAC), η βιταμίνη C και επαγωγείς της οξυγενάσης της αίμης και έχουν την ικανότητα μείωσης της παραγωγής ROS. Επιτυχώς, αντι-οξειδωτικά παράγωγα που έχουν συντεθεί ώστε να στοχεύουν εξειδικευμένα τα μιτοχόνδρια ενσωματώνουν την ουβικουινόνη (mitoQ) ή βιταμίνη E (mitoVit E). Δια στόματος χορήγηση της mitoQ (500 mM σε πόσιμο νερό) σε φυσιολογικά αρσενικά ποντίκια προστατεύουν τους καρδιακούς μυς, εμποδίζουν τον μυοκαρδιακό κυτταρικό θάνατο και βελτιώνουν την αναπνευστική λειτουργία σε ποντίκια με ισχαιμία. Στοχεύοντας τα αντιοξειδωτικά των μιτοχονδρίων προστατεύονται οι ινοβλάστες από την αταξία Friedreich στην οποία μπλοκάρεται η σύνθεση της γλουταθειόνης από το οξειδωτικό στρες και την βράχυνση των τελομερών. Σε ενδοθηλιακά κύτταρα της αορτής η mitoQ μειώνει την οξειδωτική καταστροφή όταν αυτά εκτίθενται σε στρες με 25 mM γλυκόζης και οξειδάσης της γλυκόζης. Επιπλέον, η mitoQ μειώνει τις ROS και μειώνει, επίσης, και την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης που ενεργοποιείται με μίτωση, p42-ERK2, στα ενδοθηλιακά κύτταρα μετά από υποξικό στρες. [23]

Στοχεύοντας το οξειδωτικό στρες, συμπληρώματα με tetrahydrobiopterin (BH4) που είναι συμπαράγοντας του NOS ή με sepiapterin που είναι πρόδρομο μόριο του έχει δείξει ότι βελτιώνουν την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία σε καπνιστές, διαβητικούς, ασθενείς με υπέρταση, υπερχοληστερολαιμία ή στεφανιαία νόσο. Το φολικό οξύ που έχει ήπια αντι-οξειδωτική δράση μπορεί να αντιστρέψει το μη ζευγάρωμα του NOS πιθανόν μέσω της BH4. Συμπληρώματα με το συνένζυμο Q10 είναι χρήσιμα για την θεραπεία της παχυσαρκίας, του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής σε ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο γιατί το CoQ10 είναι απαραίτητο για την σωστή λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας. Επίσης, είναι γνωστή η αντι-φλεγμονώδης δράση και η συμμετοχή του CoQ10 στον μεταβολισμό των λιπιδίων. Η curcumin είναι, επίσης, ένα αντι-οξειδωτικό και αντι-φλεγμονώδες παράγωγο. Μελέτη σε παχύσαρκα ποντίκια έδειξε ότι αυξάνει την κατανάλωση οξυγόνου και μειώνει τα επίπεδα οξείδωσης των λιπιδίων και των πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια του ήπατος παχύσαρκων ποντικών (παχυσαρκία επαγόμενη από διατροφή πλούσια σε λίπος) σε σχέση με παχύσαρκα ποντίκια που δεν ακολουθούν θεραπεία με curcumin. Επιπλέον, η curcumin δεν προκαλεί απόκτηση βάρους ούτε επηρεάζει την μιτοχονδριακή σύνθεση NO. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι η παχυσαρκία επάγει το οξειδωτικό στρες και την δυσλειτουργία

[66]

των μιτοχονδρίων ενώ η curcumin προσφέρει προστασία από αυτά. [26]

Θεραπεία με ecdysterone διατηρεί φυσιολογικά τα επίπεδα του σταθερού NO και σε συνδυασμό με την δράση του υπεροξειδίου, iNOS, και nNOS στα μιτοχόνδρια των καρδιακών κυττάρων ποντικών με διαβήτη επαγόμενο από streptozotocin προστατεύει από το οξειδωτικό στρες. Μελέτη σε παχύσαρκα αρσενικά ποντίκια Zucker με ινσουλινο-αντίσταση έδειξε ότι οι αναστολείς της οξειδάσης του NADPH (apocynin και VAS2870) και η BH4 (tetrahydrobiopterin) απέτυχαν να τοποποιήσουν την αγγειοδιαστολή που είχε επαχθεί από την βραδυκινίνη. Επίσης, φάνηκε η αύξηση υπεροξειδίου στα αγγεία των ποντικών μείωσή του από την mito-TEMPO που είναι στόχος της υπεροξειδικής δισμουτάσης. Η αγγειοδιαστολή βελτιώνεται σε αρτηρίες με ποντικών με ινσουλινο-αντίσταση και παχυσαρκία ύστερα από δράση υπεροξειδικής δισμουτάσης και mito-TEMPO.

Το μπλοκάρισμα του TNF-a με infliximab αλλά όχι η καταστολή του iNOS ή της κυκλοοξυγενάσης βελτιώνει την χαλάρωση του ενδοθηλίου και μειώνει τον σχηματισμό υπεροξειδίου. Συμπληρώματα με L-arginine ή το πρόδρομό του L-citrulline είναι μία αποτελεσματική στρατηγική για την θεραπεία του μεταβολικού συνδρόμου, της παχυσαρκίας και του διαβήτη τύπου 2.

Το lipoamide είναι διεγέρτης της βιογένεσης των μιτοχονδρίων στα αδιποκύτταρα και έχει δυναμική θεραπευτική εφαρμογή για την παχυσαρκία και τον διαβήτη τύπου 2. Το lipoamide διεγείρει την έκφραση του eNOS και τον σχηματισμό cGMP. Επιπλέον, αποσιώπηση του eNOS χρησιμοποιώντας siRNA εμποδίζει την βιογένεση των μιτοχονδρίων που επάγεται από το lipoamide.

Ένα φάρμακο που προκαλεί ευαισθησία στην ινσουλίνη είναι το pioglitazone και είναι προσδέτης του PPAR $\gamma$ . Αυτό βελτιώνει το πρόβλημα της ινσουλινο αντίστασης και μειώνει τον κίνδυνο καρδιαγγειακών νοσημάτων σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2. Το pioglitazone μειώνει το μέγεθος του μυοκαρδίου μέσω της ενεργοποίησης του PPAR $\gamma$ , της κινάσης της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης 3, της Akt και eNOS μονοπατιών αλλά όχι μέσω ανοίγματος των μιτοχονδριακών καναλιών K<sup>+</sup>. Η χρήση αυτού του φαρμάκου αποτελεί μία νέα στρατηγική για την θεραπεία διαβήτη τύπου 2 με στεφανιαία νόσο. [26]

Αλλαγή στον τρόπο ζωής ώστε να περιέχεται σωματική άσκηση και σωστή διατροφή μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη τύπου 2 που είναι ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά του μεταβολικού συνδρόμου, ενώ η φυσική δραστηριότητα βελτιώνει

[67]

την αντοχή στην γλυκόζη. Η άσκηση βελτιώνει την μεταφορά ηλεκτρονίων στους μυς, διεγείρει την βιογένεση των μιτοχονδρίων μέσω του PGC-1α και βελτιώνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη. Επιπλέον, ενεργοποιεί την AMPK που βελτιώνει και την οξειδωση της γλυκόζης και των λιπαρών οξέων. Αντι-υπεργλυκαιμική θεραπεία χορηγείται δια στόματος για την αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου 2 ώστε να αυξηθεί η ευαισθησία των οργάνων, η έκκριση ινσουλίνης ή να μειωθεί η πρόσληψη γλυκόζης κατά την πέψη. Η ινσουλίνη και η metformin αποτελούν την πρώτη γραμμή θεραπείας του διαβήτη. Υπογλυκαιμικά παράγωγα και άσκηση μειώνουν το οξειδωτικό στρες σε διαβητικούς ασθενείς μειώνοντας τη δράση του NOX ή βελτιώνοντας την μιτοχονδριακή λειτουργία. Οι στατίνες, οι αναστολείς των ενζύμων μετατροπής της αγγειοτενσίνης και οι αναστολείς του υποδοχέα AT-1 έχουν έμμεση αντι-οξειδωτική δράση και διεγείρονται από την παραγωγή NO και από την ταυτόχρονη παρεμπόδιση της παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου. Έχει δείχτει ότι βελτιώνουν την καρδιαγγειακή λειτουργία σε προ-κλινικές και κλινικές δοκιμές και μειώνουν την επίπτωση καρδιακών επεισοδίων σε ασθενείς με καρδιαγγειακό νόσημα. Αυτά τα φάρμακα καθώς και ο παρεμποδιστής απελευθέρωσης NO, nebivolol έχουν συνδυαστικές αντιοξειδωτική δράση. [26]

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μεταλλάξεις σε γονίδια του mtDNA σχετίζονται με μεταβολικές και εκφυλιστικές ασθένειες, καρκίνο και γήρανση. Υπάρχουν περίπου 1500 γονίδια στο nDNA που κωδικοποιούν μόρια των μιτοχονδρίων και επιπλέον 37 γονίδια για παραγωγή ενέργειας μέσα στο mtDNA. Αναστολή της OXPHOS από μεταλλάξεις αυτών των μιτοχονδριακών γονιδίων ή από περιβαλλοντικούς ή/και φαρμακευτικούς παράγοντες οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή ROS που βαθμιαία οδηγούν σε μειωμένη ικανότητα παραγωγής ενέργειας από το μιτοχόνδριο και τελικά γήρανση ή/και καρκίνο. Δυσλειτουργία της OXPHOS πλήττει κυρίως όργανα με μεγάλες ενεργειακές απαιτήσεις όπως εγκέφαλος, καρδιά, σκελετικοί μύες, νεφροί και ενδοκρινικό σύστημα. Επίσης, διαταράσσεται η χρήση των θερμίδων που προσλαμβάνονται με αποτέλεσμα διαταραχές του μεταβολισμού όπως ο διαβήτης και η παχυσαρκία. Τέλος, η αυξημένη παραγωγή ROS προκαλεί κυτταρική τοξικότητα και εκδήλωση φλεγμονωδών ασθενειών. Μεταλλάξεις στο nDNA που αφορούν μιτοχονδριακά γονίδια είναι οι ακόλουθες: των υπομονάδων συμπλόκων I και II της OXPHOS, του παράγοντα SURF του συμπλόκου IV της OXPHOS, της polG, της ελικάσης, του ANT1, μιτοχονδριακής κινάσης θυμιδίνης, φωσφορυλάσης θυμιδίνης, μιτοχονδριακής πρωτεΐνης OPA1, της mitofusin2, των ενζύμων του κύκλου Krebs και του Q10.

Μεταλλάξεις σε γονίδια του nDNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στην βιογένεση των μιτοχονδρίων οδηγούν σε μείωση του αριθμού των αντιγράφων του mtDNA, είναι πλέον σαφές ότι ασθένεια μπορεί να προκύψει και από αλληλεπίδραση γονιδίων του nDNA και γονιδίων του mtDNA που εντούτοις σχετίζονται με διαφορετικές λειτουργίες.

Μεταλλάξεις σε γονίδια στο mtDNA σχετίζονται με: κλασικά σύνδρομα όπως Kearns-Sayre και Lyon, κλινικά σύνδρομα με υψηλό κίνδυνο μεταλλάξεων στο mtDNA όπως οφθαλμοπληγία, σύνδρομο Pearson και σύνδρομο Leigh, μεταβολικό σύνδρομο μέσω μετάλλαξης στο γονίδιο του tRNA της Leu, διαβήτης τύπου 2 και καρδιομυοπάθεια μέσω παραλλαγής 16189, έλλειμμα 4.977 ζευγών βάσεων στα γονίδια των ATPase6, ATPase8, κυτοχρωμικής οξειδάσης III, υπομονάδων 3,4,5 της αφυδρογονάσης του NADH. Σε ασθενείς με μιτοχονδριακές ασθένειες οι πιο ηλικιωμένοι ασθενείς είχαν περισσότερα αντίγραφα του ελλείμματος στο mtDNA σε σχέση με τους νεότερους ασθενείς.

Απώλεια της απολιποπρωτεΐνης E που δείχνει ότι η βλάβη στο mtDNA προάγει αθηροσκλήρωση και ευαισθησία στην πλάκα και αυτό μπορεί να συμβεί και χωρίς καμία αύξηση των ROS. Η καταστροφή του mtDNA είναι πρώιμο γεγονός της αθηρογένεσης ενώ κατόπιν σε συνδυασμό με την μιτοχονδριακή δυσλειτουργία παρουσιάζουν ένα μοντέλο αθηροσκλήρωσης και μεταβολικού συνδρόμου. Εάν τα επίπεδα καταστροφής ή δυσλειτουργίας του mtDNA κατακλύζουν τις προστατευτικές αντιοξειδωτικές διαδικασίες τότε γίνεται μιτοφαγία που λειτουργεί προστατευτικά για το μιτοχόνδριο. Τα δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια καθαρίζονται από το κύτταρο με διαβάθμιση από το λυσόσωμα και τα συστατικά τους ανακυκλώνονται για επόμενη χρήση.

Ο μιτοχονδριακός διαβήτης σχετίζεται με μία μετάλλαξη την A3243G στο mtDNA. Η μετάλλαξη αυτή αφορά το γονίδιο που κωδικοποιεί το tRNA που μεταφέρει την Leu. Μεγαλύτερα ποσοστά ετεροπλασμίας παρατηρούνται στους μυς. Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στους μυς οδηγεί σε μεγαλύτερη ροή γαλακτικού στο ήπαρ τροφοδοτώντας την γλυκονογένεση. Ο μιτοχονδριακός διαβήτης αναπτύσσεται κατά την ενηλικίωση μεταξύ 35-40 ετών (η γήρανση συμβάλλει στην σταδιακή αλλοίωση της λειτουργίας των β παγκρεατικών κυττάρων)

Πυρηνικά γονίδια, συμπεριλαμβανομένου του γονιδίου του υποδοχέα γ των υπεροξειδωσμάτων, των γονιδίων των λαμινών A/C και του γονιδίου της IL-6 θεωρούνται υπεύθυνα για εμφάνιση του MS. Στους γενετικούς παράγοντες περιλαμβάνονται και παραλλαγές του mtDNA που πυροδοτούν την εμφάνιση του MS.

Η μετάλλαξη A8890G εντοπίζεται στο γονίδιο της ATPase6, προκαλεί αλλαγή του αμινοξέος Lys σε Glu και σχετίζεται με δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και συμβάλλει στην πυροδότηση του μεταβολικού συνδρόμου σε νεανική ηλικία. Ο απλός νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός T16189C του mtDNA σχετίζεται με το μεταβολικό σύνδρομο και ενέχεται για ανάπτυξη ινσουλινοαντίστασης, διαβήτη, μεταβολικού συνδρόμου και στεφανιαίας νόσου. Άτομα με μεταβολικό σύνδρομο παρουσιάζουν κεντρική παχυσαρκία, υψηλά τριγλυκερίδια, χαμηλή HDL, χαμηλή apo-lipoA/apo-lipoB, ήπια νεφρική ανεπάρκεια με αύξηση του δείκτη κυστίνη C. Η μετάλλαξη T4291C του mtDNA του γονιδίου tRNA της Ile εντοπίζεται σε Καυκάσιους μαζί με μεταβολικό σύνδρομο. Η ετεροπλασμική μετάλλαξη A3243G του γονιδίου του tRNA της Leu ενέχεται για τον μητρικής κληρονομικότητας διαβήτη και επάγει την δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων.



Πολυμορφισμοί πυρηνικών γονιδίων που ρυθμίζουν την μιτοχονδριακή λειτουργία και πυροδοτούν τον διαβήτη τύπου αφορούν τον PGC1a και τον NRF1. Ο PGC1a εμπλέκεται στην βιογένεση των μιτοχονδρίων, την οξειδωση των λιπαρών οξέων, την ηπατική γλυκονεογένεση, την θερμογένεση και την χρήση γλυκόζης από περιφερικούς ιστούς.

Ποικίλοι μηχανισμοί όπως η ινσουλινοαντίσταση (IR), σπλαχνικό λίπος, φλεγμονώδεις ή αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες καθώς και η ενεργοποίηση του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης συμβάλλουν στο MS. Τέλος, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως οδηγεί σε παχυσαρκία και ινσουλινοαντίσταση ενώ η μείωση του αριθμού αντιγράφων του mtDNA σχετίζεται με εμφάνιση του διαβήτη τύπου 2.

Αλλαγές στον αριθμό αντιγράφων του mtDNA έχουν βρεθεί σε ασθενείς με νευρολογικές διαταραχές και πολλαπλή σκλήρωση ενώ μειωμένος αριθμός mtDNA σχετίζεται με διαβήτη τύπου 2 και δυσλιπιδαιμία.

Οι ROS τροποποιούν την έκφραση της αδιπονεκτίνης που εκκρίνεται από τα αδιποκύτταρα και έτσι σχετίζεται με την παχυσαρκία και τον αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα. Τα παχύσαρκα άτομα έχουν υψηλότερα επίπεδα δεικτών οξειδωτικού στρες και χαμηλή συγκέντρωση αδιπονεκτίνης στην κυκλοφορία. Το οξειδωτικό στρες και η φλεγμονή δευτερευόντως αυξάνουν την αναλογία λεπτίνης σε αδιπονεκτίνη και αυξάνουν τα επίπεδα άλλων αδιποκινών όπως είναι ο TNF (παράγοντας νέκρωσης όγκων) και ο αναστολέας ενεργοποίησης πλασμινογόνου 1.

Η παχυσαρκία και η ινσουλινοαντίσταση σχετίζονται με την φλεγμονή λόγω της χρόνιας ενεργοποίησης του ανοσοβιολογικού συστήματος. Τα άτομα με μεταβολικό σύνδρομο παρουσιάζουν μία περίσσεια προ-φλεγμονοδών κυτοκινών όπως TNF-α και IL-6. Η παχυσαρκία και η ινσουλινοαντίσταση σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων στο ήπαρ.

Θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση του μεταβολικού συνδρόμου λόγω του το ότι είναι ένα πολυπαραγοντικό νόσημα που επιδρούν γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι οι εξής: 1) αντιοξειδωτική προσέγγιση, 2) διέγερση βιογένεσης μιτοχονδρίων, 3)στόχος τα λιπίδια της μιτοχονδριακής μεμβράνης, το δυναμικό της μεμβράνης και η μιτοφαγία, 4) θεραπεία αντικατάστασης, 5)κυτταρική θεραπεία, 6) γονιδιακή θεραπεία για τα μεταλλαγμένα γονίδια του mtDNA και του nDNA που προκαλούν ελάττωμα στον μεταβολισμό των μιτοχονδρίων.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Jonathan R.Friedman and Jodi Nunnari (Jan.2004), Nature, 505(7483):335-343
- [2] Lede V et al. (Dec.2016), PLoSOne, 11(12)
- [3] Yang J. et al. (2016), AsiaPacJclinNutr, 25(1):213-219
- [4] Rotter I. et al. (Nov.2016), ClinIntervAging, 11:1723:1732
- [5] Khoroshinina L.P. et al. (2014), AdvGerontol, 27(4):704-709
- [6] Nat.Rev.Genet 2005
- [7] Nature, (1981), 290:457-465
- [8] Anderson et al. (1981);Montoya et.al(1981);Ojala et al.(1981);Wallacw et al.(1981)
- [9]Mishmar et al.(2003);Wallace et al.(2003);Ruiz-Pesini et al.(2004);Ruiz-Pesini and Wallace(2006)
- [10] Wallace et al.(2007);Wallace(2005)
- [11] Datta S. et al.(Apr.2014),Mol Biol Cell, 25(8):1202-1215
- [12] Brown et al.(1995,1997,2002);Torrioni et al(1997)
- [13] Yanchun Zhang et al.(May 2015),PLoSONE10(5):1371
- [14] Emma P.K and Martin R.Bennet (Sept.2014),Trends in Endocrinology and Metabolism, Vol.25(9):25
- [15] Frederick H.Wilson et al. (Nov.2004), Science306:1190
- [16] Wei Ye et al.(2013), Molecular Medicine Reports(8):1060-1066
- [17] J.Antonie Maasen et al.(Febr.2004), Diabetes,Vol.53(1):S102-S109
- [18] Young Min Cho et al.(2007),Diabetes Research and Clinical Practice (77):S172-S177
- [19] H.K.Lee et al.(1998),Diabetes Research and Clinical Practice (42):161-167
- [20] Jung-Ha Kim et al.(2012), The Journal of the North American Menopause Society, Vol15(5):582-587
- [21] Kim J-Y et al.(2016), Diabetes and Metabolism
- [22] Francesca Bonomini et al. (April 2015), Aging and Disease, Vol.6(2):109-120
- [23] Daniela Sorriento et al.(March 2014), The scientific World Journal,ID604685
- [24]PatriciaChristian and Qiaozhu Su (Sept.2014), AmJ Physiol.Endocrinol.Metabolism 307:E729-E737
- [25] Jacqueline J.T.Liaw and Philip V.Peplow(2016), Journal of Acupuncture and Medician Studies,9(2):73-79
- [26] Larisa Litvinova et al.,(Feb.2015), Frontiers in Physiology, Vol.6(20):1-10

[72]

- [27] <http://dx.doi.org/10.1016/j-diabet.2016.09.07>
- [28] <http://dx.doi.org/10.14336/AD.2014.0305>
- [29] <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0128624>
- [30] <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2013.1616>
- [31] <http://dx.doi.org/10.1016/j.diadres.2007.052>
- [32] <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2015.00020>
- [33] <http://el.wikipedia.org>

[73]