



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΤΜΗΜΑ ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΑΣ

Διδακτορική Διατριβή

«Η επίδραση της ενεργοποίησης της κινάσης GCN2 σε ανθρώπινα σπειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα σε περιβάλλον φυσιολογικής και υψηλής γλυκόζης»

υπό

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑΣ ΤΣΟΓΚΑ

Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2022

Στην Μητέρα μου, που πάντα πίστευε σε εμένα.

Στον Πατέρα μου, που ακόμα και τώρα είναι δίπλα μου.

Στον σύζυγό μου, που πάντα με ωθούσε πιο μπροστά.

*Στον Περσέα μου, που είναι η απόλυτη κινητήριος δύναμη, με την ελπίδα ότι θα είναι υπερήφανος και θα
κυνηγήσει με πείσμα τα όνειρά του.*

© 2022 ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΤΣΟΓΚΑ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

**1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων)**

Θεόδωρος Ελευθεριάδης
Αναπληρωτής Καθηγητής Νεφρολογίας
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

2^{ος} Εξεταστής

Ιωάννης Στεφανίδης
Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

3^{ος} Εξεταστής

Δημήτριος Μπόγδανος
Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

4^{ος} Εξεταστής

Κωνσταντίνος Μακαρίτσης
Καθηγητής Παθολογίας
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

5^{ος} Εξεταστής

Ευτέρπη Ζαφειρίου
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δερματολογίας
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

6^{ος} Εξεταστής

Γρηγόριος Γιαμούζης
Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

7^{ος} Εξεταστής

Αλεξάνδρα Μπαργιώτα
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή με θέμα «Η επίδραση της ενεργοποίησης της κινάσης GCN2 σε ανθρώπινα πειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα σε περιβάλλον φυσιολογικής και υψηλής γλυκόζης» εκπονήθηκε εξ' ολοκλήρου στο Εργαστήριο της Νεφρολογικής Κλινικής του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αρχικά οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον επιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Θεόδωρο Ελευθεριάδη για την ανάθεση της διατριβής, για την ανοχή του, την υπομονή του, την καθοδήγησή του αλλά πάνω από όλα για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω αυτόν τον στόχο μου.

Επιπλέον ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στον μεταδιδακτορικό ερευνητή του εργαστηρίου και σύζυγό μου κ. Γεώργιο Πίσσα, που μου έδωσε κίνητρο, γνώσεις, πείσμα και που χωρίς αυτόν δεν θα είχα φτάσει ποτέ σε αυτό το σημείο.

Την μεγαλύτερη ευγνωμοσύνη οφείλω στους γονείς μου που δεν έπαψαν ποτέ να πιστεύουν σε εμένα, πάντα ήταν δίπλα μου και στήριζαν κάθε μου προσπάθεια. Εύχομαι να είμαι αντάξια των προσδοκιών τους.

Τέλος ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στον υιό μου Περσέα που του εύχομαι να ακολουθήσει την επιμονή των γονιών του και να πετύχει όλα όσα θα ονειρευτεί.

Κωνσταντίνα Τσόγκα-Πίσσα

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

Κωνσταντίνα Τσόγκα

Εκπαίδευση :

2016-2022 : Υποψήφια Διδάκτωρ Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας- Τμήμα Ιατρικής. Θέμα διατριβής : «Η επίδραση της ενεργοποίησης της κινάσης GCN2 σε ανθρώπινα σπειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα σε περιβάλλον φυσιολογικής και υψηλής γλυκόζης»

2013-2014 : MSc Γενετική του Ανθρώπου- Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας-Τμήμα Ιατρικής- Θέμα Πτυχιακής Εργασίας « Αναστολείς mTOR ως φαρμακευτικοί στόχοι»

2001-2006 : ΑΤΕΙ Λάρισας-Σ.Ε.Υ.Π-Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων- Θέμα Πτυχιακής Εργασίας «Σύγχρονες μέθοδοι ταξινόμησης ιών του ανθρώπου»

Ξένες Γλώσσες: TOEIC (advance)

TOEFL (110/120)

First Certificate of English, University of Cambridge

Εργασιακή εμπειρία :

6/2011 έως σήμερα : Senior Clinical Research Associate- BECRO pharmaceutical services. Συμμετοχή ως CRA σε : 5 κλινικές δοκιμές φάσης IV

7 κλινικές δοκιμές φάσης III

24 κλινικές δοκιμές βιοισοδυναμίας.

2009-2010 -Κυανός Σταυρός – Αθήνα-Τεχνολόγος Εργαστηρίου

2008-2009 -Αττικό Νοσοκομείο – Αθήνα-Τεχνολόγος Εργαστηρίου-

2006-2007 -ΙΕΚ Κορυδαλού- Αθήνα -Διδασκαλία Αιματολογίας-Βιοχημείας ΙΙ- Μικροβιολογίας ΙΙ

2005-2006 -Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ-Τεχνολόγος Εργαστηρίου-πρακτική άσκηση και επιπλέον εθελοντική παραμονή

Επιπλέον εκπαίδευση:

BECRO : ICH E6 guideline, EMA BE guideline, Protocol development, Conduct and Monitoring of Clinical Trials and eCRFs, Design and Analysis of Bioequivalence studies, Data Management and Statistical Analysis of Clinical Trials, SPSS (2-2017)

BECRO : ICH E6 guideline, EMA BE guideline, Protocol development, Conduct and Monitoring of Clinical Trials and eCRFs, Design and Analysis of Bioequivalence studies, Data Management and Statistical Analysis of Clinical Trials, SPSS (9-2016)

BECRO : ICH E6 guideline, EMA BE guideline, Protocol development, Conduct and Monitoring of Clinical Trials and eCRFs, Design and Analysis of Bioequivalence studies, Data Management and Statistical Analysis of Clinical Trials, SPSS (9-2015)

BECRO : ICH E6 guideline, EMA BE guideline, Protocol development, Conduct and Monitoring of Clinical Trials and eCRFs, Design and Analysis of Bioequivalence studies, Data Management and Statistical Analysis of Clinical Trials, SPSS (9-2014)

OBEKE : ICH E6 guideline, EMA BE guideline, Protocol development, Conduct and Monitoring of Clinical Trials and eCRFs, Design and Analysis of Bioequivalence studies, Data Management and Statistical Analysis of Clinical Trials, SPSS (9-2013)

OBEKE : ICH E6 guideline, EMA BE guideline, Protocol development, Conduct and Monitoring of Clinical Trials and eCRFs, Design and Analysis of Bioequivalence studies, Data Management and Statistical Analysis of Clinical Trials, SPSS (9-2012)

OBEKE : ICH E6 guideline, EMA BE guideline, Protocol development, Conduct and Monitoring of Clinical Trials and eCRFs, Design and Analysis of Bioequivalence studies, Data Management and Statistical Analysis of Clinical Trials, SPSS (6-2011)

- NIDA Clinical Trials Network-Good Clinical
- THE GLOBAL HEALTH NETWORK :
- ICH GOOD CLINICAL PRACTICE E6 (R2)
- INTRODUCTION TO CLINICAL RESEARCH
- INTRODUCTION TO INFORMED CONSENT
- THE RESEARCH QUESTION
- THE STUDY PROTOCOL: PART ONE
- THE STUDY PROTOCOL: PART TWO
- INTRODUCTION TO DATA MANAGEMENT FOR CLINICAL RESEARCH STUDIES
- INTRODUCTION TO COLLECTING AND REPORTING ADVERSE EVENTS IN CLINICAL RESEARCH
- INTRODUCTION TO GOOD CLINICAL LABORATORY PRACTICE

Δημοσιεύσεις :

- Indoleamine 2,3-dioxygenase, by degrading L-tryptophan, enhances carnitine palmitoyltransferase I activity and fatty acid oxidation, and exerts fatty acid-dependent effects in human alloreactive CD4⁺ T-cells.

Eleftheriadis T, Pissas G, Sounidaki M, Tsogka K, Antoniadis N, Antoniadis G, Liakopoulos V, Stefanidis I. (Int J Mol Med. 2016 Nov;38(5):1605-1613. doi: 10.3892/ijmm.2016.2750.)

- Activation of general control nonderepressible 2 kinase protects human glomerular endothelial cells from harmful high-glucose-induced molecular pathways.

Eleftheriadis T, Tsogka K, Pissas G, Antoniadis G, Liakopoulos V, Stefanidis I. (Int Urol Nephrol. 2016 Oct;48(10):1731-9. doi: 10.1007/s11255-016-1377-x.)

- Differential effects of the two amino acid sensing systems, the GCN2 kinase and the mTOR complex 1, on primary human alloreactive CD4⁺ T-cells.

Eleftheriadis T, Pissas G, Antoniadis G, Liakopoulos V, Tsogka K, Sounidaki M, Stefanidis I. (Int J Mol Med. 2016 May;37(5):1412-20. doi: 10.3892/ijmm.2016.2547.)

- Increased Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Monocytes of Patients on Hemodialysis.

Eleftheriadis T, Pissas G, Antoniadis G, Tsogka K, Makri P, Liakopoulos V, Stefanidis I. (Iran J Kidney Dis. 2016 Mar;10(2):91-3.)

- Indoleamine 2,3-dioxygenase downregulates T-cell receptor complex ζ-chain and c-Myc, and reduces proliferation, lactate dehydrogenase levels and mitochondrial glutaminase in human T-cells.

Eleftheriadis T, Pissas G, Antoniadis G, Tsogka K, Sounidaki M, Liakopoulos V, Stefanidis I. (Mol Med Rep. 2016 Jan;13(1):925-32. doi: 10.3892/mmr.2015.4595.)

«Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ GCN2 ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ
ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΑΙ ΥΨΗΛΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ»

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΤΣΟΓΚΑ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2022

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Θεόδωρος Ελευθεριάδης** Αναπληρωτής Καθηγητής Νεφρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (**Επιβλέπων**)
2. **Ιωάννης Στεφανίδης** Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Δημήτριος Μπόγδανος** Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περίληψη

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι η έβδομη αιτία θανάτου παγκοσμίως με τον ετήσιο αριθμό των διαβητικών ασθενών να έχει αύξουσα πορεία. Πρόκειται για πολυπαραγοντικό νόσημα με μικροαγγειακές και μακροαγγειακές επιπλοκές που οδηγούν σε ελαττωμένη ποιότητα ζωής καθώς και μειωμένο προσδόκιμο επιβίωσης.

Η νεφροπάθεια αποτελεί μια εκ των μικροαγγειακών επιπλοκών του διαβήτη που χαρακτηρίζεται από την προοδευτική μείωση της νεφρικής λειτουργίας και καταλήγει στην νεφρική νόσο τελικού σταδίου. Οι σημαντικότερες μικροαγγειακές σπειραματικές βλάβες είναι η οξώδης σπειραματοσκλήρυνση, η διάχυτη μεσαγγειακή σκλήρυνση και η πάχυνση της τριχοειδικής βασικής μεμβράνης.

Τα σπειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα δεν μπορούν να ελαττώσουν την έκφραση του μεταφορέα GLUT-1, με αποτέλεσμα την αυξημένη η εισροή γλυκόζης στο κυτταρόπλασμα, όταν η εξωκυττάρια συγκέντρωσή της είναι υψηλή. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών που προκαλεί θραύσεις του DNA. Συνέπεια αυτού, είναι η απενεργοποίηση της GAPDH και η αναστολή της φυσιολογικής οδού της γλυκόλυσης, με προώθηση του μεταβολισμού της γλυκόζης προς τα μονοπάτια των πολυολών, των εξοζαμινών, την ενεργοποίηση του PKC και της παραγωγής προϊόντων μη ενζυματικής γλυκοζυλίωσης, AGEs.

Τα παραπροϊόντα των προαναφερόμενων μονοπατιών, η αύξηση των ROS αλλά και η πρωτεϊνουρία, οδηγούν στο στρες του Ενδοπλασματικού Δικτύου και πολλές μελέτες συνδέουν το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ) με την ανάπτυξη και εξέλιξη της νεφρικής νόσου, ανεξαρτήτως εάν αποδίδεται σε πρωτοπαθή σπειραματονεφρίτιδα, σπειραματική νόσο λόγω γενετικών μεταλλάξεων, διαβητική νεφροπάθεια (ΔΝ), οξεία νεφρική βλάβη (ΟΝΒ), ΧΝΑ ή νεφρική ίνωση.

Λαμβάνοντας υπόψη τις ευεργετικές επιδράσεις του περιορισμού των πρωτεϊνών στη διαβητική νεφροπάθεια αλλά και το ρόλο του νεφρικού ενδοθηλίου στην παθογένεια του, αξιολογήθηκε η επίδραση της ενεργοποιημένης GCN2 κινάσης, που είναι αισθητήρας στέρησης αμινοξέων, σε γνωστές επιβλαβείς μοριακές οδούς στα ανθρώπινα πρωτογενή πειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα (GEnC).

Τα GEnC καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες κανονικής και υψηλής γλυκόζης, παρουσία ή όχι του ενεργοποιητή κινάσης GCN2, τρυπτοφάνη. Αξιολογήθηκε η έκφραση του μεταφορέα γλυκόζης 1 (GLUT1), η παραγωγή των ROS, η δραστηριότητα της GAPDH και τα προϊόντα των παράπλευρων μεταβολικών οδών της γλυκόλυσης. Διαπιστώθηκε ότι η υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης αυξάνοντας την έκφραση των GLUT1, οδηγεί σε υψηλή παραγωγή ROS και αναστολή της δραστηριότητα της GAPDH. Επιπλέον αύξησε τα προϊόντα του μονοπατιού των πολυολών, τη δραστηριότητα PKC, το επίπεδο των τροποποιημένων από το O-GlcNAc πρωτεϊνών που παράγονται από την οδό των εξοζαμινών και την παραγωγή μεθυλγλυοξάλης που είναι πρόδρομος των AGEs. Η προσθήκη τρυπτοφάνης στα GEnC αποκατέστησε τις παραπάνω μεταβολές που προκλήθηκαν από την υψηλή γλυκόζη.

Στην συνέχεια αξιολογήθηκε η δραστηριότητα των μεταφορέων SGLT2, σε πρωτογενή ανθρώπινα RPTECs που καλλιεργήθηκαν σε περιβάλλον φυσιολογικής ή υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης, παρουσία ή όχι του αναστολέα των SGLT2 δαπαγλιφλοζίνη. Σκοπός ήταν να αξιολογηθεί η κατανάλωση γλυκόζης, η παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS), η δραστηριότητα της GAPDH, η δραστηριότητα του μονοπατιού των πολυολών, των εξοζαμινών, της παραγωγής AGEs, η δραστηριότητα της PKC, ο TGF-β1, η ιντερλευκίνη-8 (IL-8), η νέκρωση των κυττάρων και η κυτταρική απόπτωση.

Διαπιστώθηκε ότι η υψηλή γλυκόζη αυξάνοντας την έκφραση των SGLT2 και την κατανάλωση γλυκόζης οδηγεί στην αυξημένη παραγωγή ROS και την αναστολή της GAPDH. Η αναστολή της GAPDH οδηγεί στην συσσώρευση παραπροϊόντων της γλυκόλυσης λόγω ενεργοποίησης επιβλαβών μεταβολικών οδών. Τελικά, αυτά τα μονοπάτια οδηγούν σε υπερπαραγωγή TGF-β1 και IL-8, καθώς και σε νέκρωση των κυττάρων και απόπτωση. Η προσθήκη δαπαγλιφλοζίνης αποκατέστησε τα ανωτέρω γεγονότα.

Κατά την έναρξη αλλά και την εξέλιξη πολλών ασθενειών, το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου συνδέεται άρρηκτα με την μειωμένη κατάσταση οξειδοαναγωγής.

Τα πρωτογενή ανθρώπινα νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα εγγύς εσπειραμένων RPTCEs καλλιεργήθηκαν σε εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό που περιείχε χαμηλής συγκέντρωσης γλυκόζη απουσία τρυπτοφάνης και παρουσία ή όχι του επαγωγέα του στρες του Ενδοπλασματικού Δικτύου μπρεφελδίνης-A. Αξιολογήθηκε ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η παραγωγή ROS, η έναρξη του στρες του ΕΔ, η ενεργότητα της GCN2 κινάσης, η απόπτωση και η αυτοφαγία. Διαπιστώθηκε η ότι η απουσία Τρυπτοφάνης ήταν ευεργετική για την κυτταρική επιβίωση κατά το στρες του Ενδοπλασματικού δικτύου καθώς μειώθηκε η παραγωγή των ROS, αυξήθηκε η αυτοφαγία και μειώθηκε η απόπτωση.

SUMMARY

Diabetes mellitus is the seventh leading cause of death worldwide, with the annual number of diabetic patients rising. It is a multifactorial disease with microvascular and macrovascular complications that reduce both quality of life and life expectancy.

Nephropathy is a microvascular complication of diabetes that causes a progressive decline in renal function and eventually leads to end-stage kidney disease. The most common microvascular glomerular lesions are nodular glomerulosclerosis, diffuse mesangial sclerosis, and capillary basal membrane thickening.

Glomerular endothelial cells cannot reduce the expression of GLUT-1 transporter, resulting in increased glucose influx into the cytoplasm when the extracellular glucose concentration is high. This causes an increase in the production of free radicals, which results in DNA damage. As a result, GAPDH is deactivated, and the normal glycolysis pathway is diverted towards the pathways of polyols, exosamin, PKC activation, and the production of Advanced glycation end products, AGEs.

The by-products of the above-mentioned pathways, the increased production of ROS and proteinuria, lead to the stress of the Endoplasmic Reticulum. Many studies link the ER stress with the development and progression of kidney disease, regardless of whether it is attributed to primary glomerulonephritis, glomerular disease due to genetic mutations, diabetic nephropathy (DN), acute kidney damage, CKD or renal fibrosis.

Taking into account the beneficial effects of protein restriction on diabetic nephropathy and the role of renal endothelium in its pathogenesis, the activated amino acid deprivation sensor, GCN2 kinase, was evaluated, on known harmful molecular pathways in human primary glomerular endothelial cells (GEnC)

The GEnC cells were cultured under normal and high glucose conditions, in the presence or not of the GCN2 kinase activator, tryptophanol. The expression of glucose transporter 1 (GLUT1), the production of ROS, the activity of GAPDH, and the by-products of the diverted metabolic pathways of glycolysis were evaluated. It was found that high glucose concentration leads to the increased expression of GLUT1, increased ROS production and inhibited GAPDH. In addition, it increased the products of the polyol pathway, the PKC activity, the level of O-GlcNAc-modified proteins produced by the hexosamine pathway and the production of methylglyoxal, which is a precursor of AGEs. The supplementation of tryptophanol to the GEnC cell cultures restored the above changes caused by high glucose.

Subsequently, the activity of SGLT2 transporters in primary human RPTECs cultivated in an environment of normal or high glucose concentration was evaluated, in the presence or not of the inhibitor of SGLT2 dapagliflozin. The aim was the evaluation of glucose consumption, free radical production (ROS), GAPDH activity, polyol pathway activity, hexosamine pathway activity, AGEs production, PKC activity, TGF- β 1, interleukin-8 (IL-8), cell necrosis, and cell apoptosis.

It was found that high glucose by increasing the expression of SGLT2 and glucose consumption leads to increased ROS production and inhibition of GAPDH. Inhibition of GAPDH leads to the accumulation of by-products of glycolysis due to the activation of harmful metabolic pathways. Eventually, these pathways lead to overproduction of TGF- β 1 and IL-8, as well as to cell necrosis and apoptosis. The addition of dapagliflozin ameliorated the above facts.

At the onset and progression of many diseases, the stress of the endoplasmic network is inextricably linked to the reduced state of redox.

ER stress is linked to the onset and progression of many diseases, due to the reduced state of redox.

The primary human renal epithelial cells (RPTCEs) were cultured in the absence of Tryptophan under low concentration of glucose, with or without the stress inducer of the ER stress Brefeldine-A . Cell proliferation, ROS production, onset of ER stress, activity of GCN2 kinase, apoptosis and autophagy were evaluated. It was found that the absence of Tryptophan was beneficial for cell survival during ER stress as the production of ROS decreased, autophagy increased and apoptosis decreased.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	16
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	20
Κεφάλαιο 1.	21
Εισαγωγή	22
1.1 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ	22
1.2 ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΟΥ ΝΕΦΡΟΥ.....	27
1.3 ΔΙΑΒΗΤΙΚΗ ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑ	33
1.3.1 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΛΑΒΕΣ ΕΠΙ ΔΙΑΒΗΤΙΚΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ	35
1.4 ΠΑΓΚΡΕΑΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ.....	37
1.4.1 ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ.....	38
1.5 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΜΕΤΑΦΟΡΕΙΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ.....	42
1.6 ΓΛΥΚΟΛΥΣΗ.....	46
1.7 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ : ΠΗΓΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ROS.....	49
1.8 ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑ	51
1.8.1 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΥΨΗΛΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ.....	51
1.8.2 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ ΚΑΙ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑ.....	52
1.8.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ ΣΕ PARP ΚΑΙ GARDH	53
1.8.3.1 ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΠΟΛΥΟΛΩΝ.....	55
1.8.3.2 ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΕΞΟΖΑΜΙΝΩΝ	60
1.8.3.3 ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΔΙΑΚΥΛΟΓΛΥΚΕΡΟΛΩΝ – PKC	68
1.8.3.4 AGEs- ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΜΗ ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗΣ ΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΣΗΣ.....	72
1.8.3.4.1 ΜΕΘΥΛΟΓΛΥΟΞΑΛΗ	77
1.8.3.4.2 Συνέπειες των AGEs συνοπτικά	81
1.9 ΣΤΡΕΣ ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΔΙΚΤΙΟΥ	84
1.9.1 ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ.....	93
1.10 ΣΤΕΡΗΣΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ.....	100
1.10.1 GCN2 κινάση.....	100
1.11 ΓΛΥΚΟΛΥΣΗ ΣΤΟΝ ΝΕΦΡΟ	102
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	103
Εισαγωγή-σκοπός	104
Κεφάλαιο 2.	106

2.1 Ενεργοποίηση GCN2 κινάσης σε περιβάλλον φυσιολογικής και υψηλής γλυκόζη	107
2.1.1 Υλικά και μέθοδοι	107
2.1.1.1 Αξιολόγηση κυτταροτοξικότητας τρυπτοφάνολης TRP.....	108
2.1.1.2 Αξιολόγηση κατανάλωσης D-γλυκόζης από τα GEnC πρωτογενή ενδοθηλιακά σπειραματικά κύτταρα	109
2.1.1.3 Αξιολόγηση επιπέδων p-eIF2α, GLUT1 και γλυκοζυλιωμένων O-GlcNAc πρωτεϊνών	109
2.1.1.4 Αξιολόγηση επιπέδων Ελεύθερων Ριζών Οξυγόνου	110
2.1.1.5 Αξιολόγηση επιπέδων 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (GAPDH) ...	110
2.1.1.6. Αξιολόγηση επιπέδων πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC)	111
2.1.1.7 Αξιολόγηση ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Σορβιτόλης και MGO....	111
2.2 Στατιστική ανάλυση	112
2.3 Αποτελέσματα.....	113
2.3.1 Η συγκέντρωση Τρυπτοφάνολης 0.25mM δεν είναι τοξική για τα GEnC και ενεργοποιεί την GCN2 κινάση.	113
2.3.2 Η υψηλή γλυκόζη αυξάνει την έκφραση των GLUT-1, ενώ η παρουσία TRP μειώνει την έκφραση του μεταφορέα και την κατανάλωση γλυκόζης...	116
2.3.3 Η υψηλή γλυκόζη αυξάνει την παραγωγή ROS και μειώνει την GAPDH, ενώ η TRP περιορίζει και τα δύο φαινόμενα.	118
2.3.4 Η αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης αυξάνει την δραστηριότητα του μονοπατιού των πολυολών, της PKC, των εξοζαμινών και της παραγωγής AGEs στα GEnC , ενώ η τρυπτοφάνολη τα προστατεύει.....	120
2.4 Συζήτηση.....	124
Κεφάλαιο 3.	129
3.1 Αναστολή SGLT-2 από Δαπαγλιφλοζίνη	130
3.1.1 Υλικά και μέθοδοι	131
3.1.1.2 Κατανάλωση Γλυκόζης από τα RPTECs.....	131
3.1.1.3 Ο SGLT2 ενεργοποίησε την ενεργή ματισμένη κασπάση 3 (activated cleaved caspase 3) και την O-Glc–NAC τροποποίηση πρωτεϊνών.....	132
3.1.1.4 Παραγωγή των ROS	133
3.1.1.5 Ενεργότητα GAPDH και PKC.....	133
3.1.1.6 Συγκέντρωση D-σορβιτόλης και μεθυλγλυοξάλης.....	134
3.1.1.7 Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας.....	134
3.1.1.8 Παραγωγή TGF-β1 και IL-8	134
3.2 Στατιστική ανάλυση	135

3.3 Αποτελέσματα.....	136
3.3.1 Υπο συνθήκες υψηλής γλυκόζης τα RPTECs αυξάνουν την κατανάλωση της γλυκόζης και την έκφραση των SGLT2, ενώ η παρουσία δαπαγλιφοζίνης μειώνει και τα δύο.....	136
3.3.2 Η υψηλή γλυκόζη αυξάνει την παραγωγή ROS και μειώνει την έκφραση της GAPDH, ενώ η παρουσία δαπαγλιφοζίνης βελτιώνει την εικόνα.....	138
3.3.3 Η υπεργλυκαιμία αυξάνει την συγκέντρωση D-σορβιτόλης, MGO, O-GlcNAc τροποποιημένων πρωτεϊνών, και την ενεργότητα του PKC όλα τα οποία βελτιώνονται από την δαπαγλιφοζίνη.....	140
3.3.4 Η δαπαγλιφοζίνη προστατεύει τα κύτταρα από την νέκρωση και απόπτωση λόγω υψηλής γλυκόζης.	145
3.3.5 Η υψηλή γλυκόζη προκαλεί την παραγωγή του TGF-β1 και IL-8, ενώ η δαπαγλιφοζίνη μειώνει το επίπεδό τους	147
3.4 Συζήτηση.....	149
Κεφάλαιο 4	153
4.1 ΣΤΡΕΣ ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ	154
4.1.1 Υλικά και μέθοδοι	154
4.1.1.1 Αξιολόγηση κυτταροτοξικότητας Brefeldin-A (BFA).....	155
4.1.1.2 Απεικόνιση κυττάρων.....	155
4.1.1.3 Αξιολόγηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού.....	155
4.1.1.4 Αξιολόγηση παραγωγής μιτοχονδριακών ROS.....	156
4.1.1.5 Αξιολόγηση έναρξης στρες ΕΔ, ενεργότητας GCN2 κινάσης, απόπτωση και αυτοφαγία.....	157
4.2 Στατιστική ανάλυση	158
4.3 Αποτελέσματα.....	159
4.3.1 Αξιολόγηση της BFA επί της κυτταροτοξικότητας στα RPTECs.....	159
4.3.2 Η έλλειψη Τρυπτοφάνης είναι ευεργετική για την κυτταρική επιβίωση κατά την βλάβη που προκύπτει από το στρες Ενδοπλασματικού δικτύου.	160
4.3.3 Η απουσία τρυπτοφάνης επιδρά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μειώνει την παραγωγή ROS κατά το στρες Ενδοπλασματικού Δικτύου.....	162
4.3.4 Ενεργοποίηση της PERK και έναρξη του UPR.....	164
4.3.5 Ενεργοποίηση GCN2 κινάσης	165
4.3.6 Φωσφορυλίωση eIF2α	166
4.3.7 Η απουσία Τρυπτοφάνης επηρεάζει τους κατωροϊκούς στόχους του UPR.	167
4.3.8 Η απουσία τρυπτοφάνης μειώνει την κυτταρική απόπτωση επάγοντας την αυτοφαγία.	169

4.4 Συζήτηση.....	172
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	178

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1.

Εισαγωγή

1.1 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι η έβδομη αιτία θανάτου παγκοσμίως. Για το έτος 2019 υπολογίστηκε ότι ο αριθμός των διαβητικών ασθενών έφτασε τα 463 εκατομμύρια, δηλαδή το 8% του ενήλικου πληθυσμού, με τον τύπου 2 να αφορά στο 90% των περιστατικών και να ευθύνεται επιπλέον για 4,2 εκατομμύρια θανάτους. Στην Ελλάδα καταγράφηκαν περίπου 600.000 ασθενείς με διαβήτη και περίπου 3000 θάνατοι εξαιτίας των επιπλοκών του. Ως προς τον αντίκτυπο του διαβήτη και των νοσημάτων που προκαλεί, στον οικονομικό τομέα, είναι άξιο να αναφερθεί πως το έτος 2017 στοίχησε στις ΗΠΑ 327 εκατομμύρια δολάρια, καθώς οι ιατρικές δαπάνες για τους διαβητικούς ασθενείς είναι κατά 2 φορές υψηλότερες [1]

Πρόκειται για πολυπαραγοντικό χρόνια μεταβολικό νόσημα, με χαρακτηριστική αύξηση της γλυκόζης του αίματος, είτε λόγω μειωμένης έκκρισης ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος, είτε λόγω μειωμένης ευαισθησίας των κυττάρων στην επίδρασή της, γνωστή ως ινσουλινοαντίσταση. Οδηγεί σε διαταραγμένο μεταβολισμό υδατανθράκων, λιπιδίων και πρωτεϊνών με συνέπεια τις χρόνιες επιπλοκές σε όλους τους ιστούς. Οι κυριότερες μορφές που εκδηλώνεται είναι ο διαβήτης τύπου 1, τύπου 2, κύησης και MODY [2] [3]

Καθώς ο σακχαρώδης διαβήτης προκαλεί μικροαγγειακές (αμφιβληστροειδοπάθεια, νεφροπάθεια και νευροπάθεια) και μακροαγγειακές επιπλοκές (στεφανιαία νόσο, αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και περιφερική αρτηριοπάθεια) σχετίζεται με μειωμένη ποιότητα ζωής και μειωμένο προσδόκιμο επιβίωσης [4].

Ο διαβήτης τύπου 1 προκύπτει από την ολική έλλειψη ή την ελάχιστη έκκριση ινσουλίνης, λόγω βλάβης των β-κυττάρων και συνήθως έχει αυτοάνοσο χαρακτήρα. Ο ασθενής εξαρτάται απόλυτα από εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης, ώστε τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα να παραμείνουν σε φυσιολογικά επίπεδα. Αυτή η μορφή διαβήτη είναι η συνηθέστερη στην παιδική ηλικία, που όμως λόγω του αυτοάνοσου χαρακτήρα της δεν αποκλείεται και από την ενήλικη ζωή [1].

Ο διαβήτης τύπου 2, προκύπτει από την προοδευτική μείωση της ευαισθησίας των κυττάρων στην δράση της ινσουλίνης, της οποίας τα επίπεδα ανευρίσκονται αυξημένα στην κυκλοφορία. Λόγω της αυξημένης ζήτησης και κατά συνέπεια παραγωγής ινσουλίνης, βαθμιαία προκαλείται βλάβη στα β-κύτταρα, με αποτέλεσμα την καταστροφή τους και τη συνεπαγόμενη προοδευτική μείωση της παραγωγής της. Σε αυτό το στάδιο οι διαβητικοί ενδέχεται να εξελιχθούν σε ινσουλινοεξαρτώμενους ασθενείς. Αποτελεί δε, την συχνότερη μορφή διαβήτη στους ενήλικες, με κυριότερο προδιαθεσικό παράγοντα την παχυσαρκία, καθώς ο λιπώδης ιστός υπερπαραγάγει μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα, γλυκερόλη, ορμόνες, προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και άλλους παράγοντες που συμβάλουν στην ινσουλινοαντίσταση. Επιπλέον προδιαθεσικοί παράγοντες είναι η ηλικία και το οικογενειακό ιστορικό [5]

Ο διαβήτης κύησης εμφανίζεται στο 3-5% των κυήσεων και αφορά γυναίκες που δεν είχαν διαγνωστεί με διαβήτη στο παρελθόν. Προκαλείται από την παράλληλη μείωση έκκρισης της ινσουλίνης και την ινσουλινοαντίσταση. Η παχυσαρκία και σε αυτήν την περίπτωση αποτελεί προδιαθεσικό παράγοντα και μελέτες έχουν δείξει ότι αν και είναι αναστρέψιμος με την λήξη της κύησης, το 30-40% αυτών των γυναικών θα αναπτύξουν διαβήτη τύπου 2 αργότερα στη ζωή τους.

Σε σπάνιες περιπτώσεις ο διαβήτης οφείλεται σε γενετικές διαταραχές των β-κυττάρων π.χ. MODY που ευθύνεται μετάλλαξη της γλυκοκινάσης και ο νεογνικός διαβήτης με χαρακτηριστική ανάπτυξη μη φυσιολογικών παγκρεατικών νησίδων,

μειωμένη μάζα β-κυττάρων ή δυσλειτουργία των β-κυττάρων. Γενετικά σύνδρομα που συνδέονται με τον διαβήτη είναι τα Prader Willi, Down, αταξία Friedreich's και άλλα. [2] [1]

Νοσήματα της παγκρεατικής εξωκρινούς μοίρας όπως κυστική ίνωση, φάρμακα, ιώσεις, η αιμοχρωμάτωση, λιποδυστροφίες, καθώς και ενδοκρινοπάθειες που προκαλούν την υπερέκφραση ορμονών ανταγωνιστών της ινσουλίνης, μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε διαβήτη. Επιπλέον, ο ΣΔ μπορεί να προκληθεί από την μερική ή ολική παγκρεατεκτομή, και τον τραυματισμό ή την φλεγμονή του παγκρέατος. [2] [1] [6]

Η διάγνωση του ΣΔ τίθεται όταν ανιχνεύεται γλυκόζη νηστείας ≥ 126 mg/dl ή συμπτώματα υπεργλυκαιμίας και τυχαία τιμή γλυκόζης πλάσματος ≥ 200 mg/dl, ανεξαρτήτως μεσοδιαστήματος από το τελευταίο γεύμα. Τα κλασικά συμπτώματα της υπεργλυκαιμίας περιλαμβάνουν πολουρία, πολυδιψία, ανεξήγητη απώλεια σωματικού βάρους ή μια τιμή γλυκόζης πλάσματος ≥ 200 mg/dl, 2 ώρες μετά από τη λήψη 75 g γλυκόζης κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας ανοχής στη γλυκόζη, σύμφωνα με τις συστάσεις της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας. [2]

Παράγοντες προδιάθεσης διαβήτη είναι ο δείκτης μάζας σώματος ≥ 30 kg/m², η καθιστική ζωή, οι συγγενείς πρώτου βαθμού με ΣΔ, οι γυναίκες με ιστορικό γέννησης τέκνου βάρους γέννησης >4 kg, το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, το ιστορικό διαταραγμένης γλυκόζης νηστείας ή/και διαταραγμένης (παθολογικής) ανοχής στη γλυκόζη, η υπέρταση, η HDL < 250 mg/dl, οι καταστάσεις που σχετίζονται με την αυξημένη αντίσταση στην ινσουλίνη (σοβαρού βαθμού παχυσαρκία, μελανίζουσα ακάνθωση) και το ιστορικό καρδιαγγειακού επεισοδίου. [2]

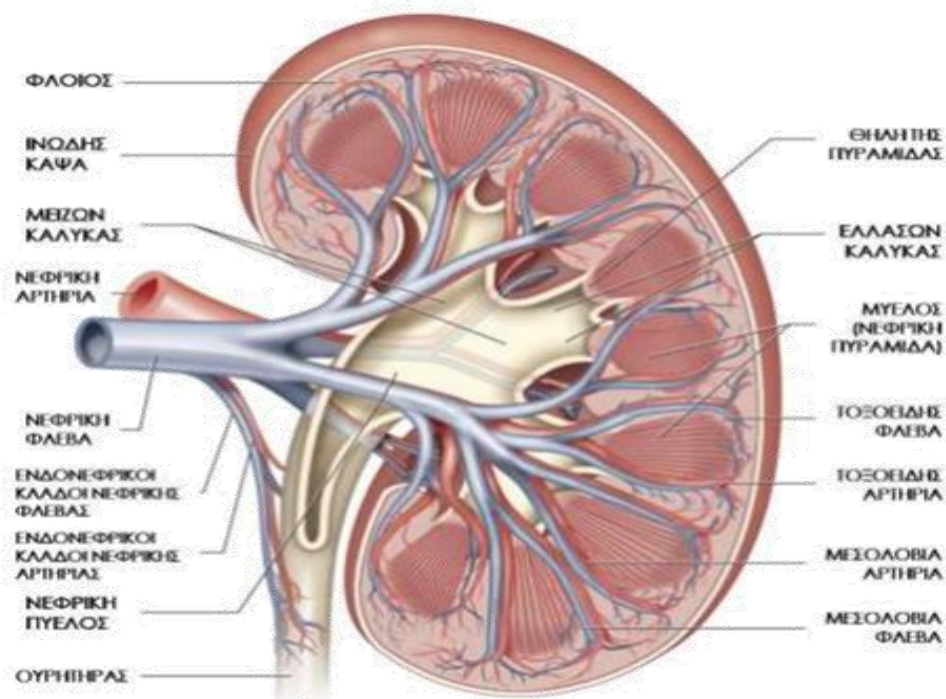
ΚΥΡΙΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΝΤΙΔΙΑΒΗΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ	ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ
ΔΙΓΟΥΑΝΙΔΙΑ ΜΕΤΦΟΡΜΙΝΗ	Όχι πρόκληση υπογλυκαιμίας Ουδέτερη επίδραση στο σωματικό βάρος Πιθανή μείωση καρδιαγγειακών συμβαμάτων	Γαστρεντερικές διαταραχές Σπανία γαλακτική οξέωση Ανεπάρκεια βιταμίνης Β12 Αντένδειξη σε διάφορες παθήσεις
ΣΟΥΛΦΟΥΝΥΛΟΥΡΙΕΣ 1.ΓΛΙΒΕΝΚΛΑΜΙΔΗ 2.ΓΚΙΑΚΑΖΙΔΗ 3.ΡΕΠΑΓΛΙΝΙΔΗ	Μείωση κινδύνου μικροαγγειοπάθειας	Υπογλυκαιμίες Αύξηση σωματικού βάρους Ισως μικρή διατηρησιμότητα Πιθανή μείωση ισχαιμικής προπόνησης μυοκαρδίου
ΜΕΤΑΓΛΙΤΙΝΙΔΕΣ 1.ΝΑΤΕΓΛΙΝΙΔΗ 2.ΡΕΠΑΓΛΙΝΙΔΗ	Ευελιξία δοσολογίας Βελτίωση μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας	Υπογλυκαιμίες Αύξηση σωματικού βάρους Συχνή δοσολογία Πιθανή μείωση ισχαιμικής προπόνησης μυοκαρδίου
ΓΛΙΤΑΖΟΝΕΣ ΠΙΟΓΛΙΤΑΖΟΝΗ	Δεν προκαλεί υπογλυκαιμία Βελτίωση λιπιδαιμικής εικόνας Πιθανή μείωση καρδιαγγειακών συμβαμάτων Διατηρησιμότητα	Αύξηση σωματικού βάρους Οίδημα, καρδιακή ανεπάρκεια Κατάγματα Πιθανή αύξηση κινδύνου εμφάνισης καρκίνου ουροδόχου κύστης
ΑΝΑΣΤΟΛΗ α-ΓΛΥΚΟΣΙΔΑΣΗΣ ΑΚΑΡΒΟΖΗ	Δεν προκαλεί υπογλυκαιμία Βελτίωση μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας Ουδέτερη επίδραση στο σωματικό βάρος	Γαστρεντερικές διαταραχές Συχνή δοσολογία
ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ DPP-4 1.ΣΙΝΤΑΓΛΙΠΤΙΝΗ 2.ΒΙΛΔΑΓΛΙΠΤΙΝΗ 3.ΣΑΞΑΓΛΙΠΤΙΝΗ 4.ΛΙΝΑΓΛΙΠΤΙΝΗ 5.ΑΛΟΓΛΙΠΤΙΝΗ	Δεν προκαλεί υπογλυκαιμία Ουδέτερη επίδραση στο σωματικό βάρος	Αντεδεικνύται σε ασθενείς με ιστορικό παγκρεατίτιδας
ΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ GLP-1 1.ΕΞΕΝΑΤΙΔΗ 2.ΛΙΡΑΓΛΟΥΤΙΔΗ 3.ΛΙΞΙΣΕΝΑΤΙΔΗ 4.ΕΞΕΝΑΤΙΔΗ LAR	Δεν προκαλεί υπογλυκαιμία Μείωση σωματικού βάρους Μείωση καρδιαγγειακής νοσηρότητας (λιραγλουτιδη, σεμαγλουτιδη) Μείωση καρδιαγγειακής θνησιμότητας (λιραγλουτιδη) Μείωση ολικής θνησιμότητας (λιραγλουτιδη)	Γαστρεντερικές διαταραχές ενεσιμα Απαιτείται εκπαίδευση Πιθανότητα παγκρεατίτιδας

5.ΝΤΟΥΛΑΓΛΟΥΤΙΔΗ		
ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ SGLP-2	Δεν προκαλεί υπογλυκαιμία	Λοιμώξεις ουρογεννητικού
1.ΔΑΠΑΓΛΙΦΛΟΖΙΝΗ	Μείωση σωματικού βάρους και αρτηριακής πίεσης	Προσοχή σε αφυδάτωση και σε λήψη διουρητικών της αγκύλης
2.ΕΜΠΑΓΛΙΦΛΟΖΙΝΗ	Σε άτομα με εγκατεστημένη καρδιαγγειακή νόσο διαπιστώθηκε μείωση καρδιαγγειακής νοσηρότητας (εμπαγλιφλοζίνη, καναγλιφλοζίνη), της καρδιοαγγειακής θνησιμότητας (εμπαγλιφλοζίνη) και νοσηλεία για καρδιακή ανεπάρκεια (εμπαγλιφλοζίνη, καναγλιφλοζίνη)	Ακροτηριασμοί, κατάγματα (καναγλιφλοζίνη)
3.ΚΑΝΑΓΛΙΦΛΟΖΙΝΗ	Μείωση λευκοματουρίας	
ΙΝΣΟΥΛΙΝΕΣ	Μεγάλη εμπειρία Μείωση κινδύνου εμφάνισης μικροαγγειοπάθειας	Υπογλυκαιμές Αύξηση σωματικού βάρους Ενέσιμα Απαιτείται εκπαίδευση

πίνακας 1 : πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα αντιδιαβητικών φαρμάκων [2]

1.2 ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΟΥ ΝΕΦΡΟΥ



Εικόνα 1. Ο ανθρώπινος νεφρός

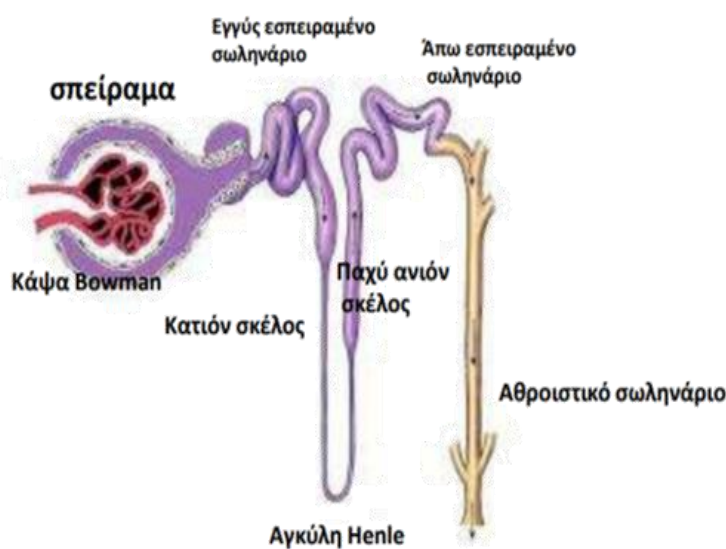
Ο ρόλος του νεφρού είναι η απέκκριση των προϊόντων του μεταβολισμού και των ξένων χημικών ουσιών, η ρύθμιση της ισορροπίας νερού-ηλεκτρολυτών, η επαναρρόφηση γλυκόζης, η ρύθμιση της ωσμωτικότητας των σωματικών υγρών και της οξεοβασικής ισορροπίας, η νεογλυκογένεση επί ασιτίας, η ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και η έκκριση, ο μεταβολισμός και η απέκκριση ορμονών, η παραγωγή ερυθροποιητίνης και προσταγλανδινών και η αποδόμηση της ινσουλίνης [7] [8] [9].

Ο ανθρώπινοι νεφροί βρίσκονται στον οπισθοπεριτοναϊκό χώρο και εκτείνονται από τον 12ο θωρακικό έως τον 3ο οσφυϊκό σπόνδυλο, ενώ συγκλίνουν προς τα επάνω και πίσω. Έχουν σχήμα κυανοειδές, μήκος 9-12εκ., πλάτος 5-6 εκ., πάχος 4εκ και βάρος 120-300γρ. Περικλείονται σε ινώδη χιτώνα που τους διαχωρίζει από το περινεφρικό λίπος και μαζί με την νεφρική περιτονία, συμβάλουν στην διατήρηση της

θέσης τους. Ανατομικά χωρίζονται στην πρόσθια και οπίσθια επιφάνεια, το έσω και έξω χείλος και τους δύο πόλους. Η πύλη του κάθε νεφρού βρίσκεται στο έσω χείλος, στο ύψος του 1ου οσφυϊκού σπονδύλου και από εκεί εισέρχονται οι κλάδοι της νεφρικής αρτηρίας και τα νεύρα, ενώ εξέρχονται οι κλάδοι της νεφρικής φλέβας με την νεφρική πύελο. Στο νεφρικό παρέγχυμα εδράζουν οι νεφρώνες, τα αθροιστικά σωληνάρια και δίκτυο τριχοειδών. Διαχωρίζεται εξωτερικά στην φλοιώδη μοίρα που είναι κοκκιώδους σύστασης και εσωτερικά στην μυελώδη που είναι γραμμωτή.

Η μυελώδης μοίρα διαχωρίζεται στην έξω και έσω μοίρα και η έξω μοίρα διαχωρίζεται με την σειρά της, στην έξω και έσω στοιβάδα. Στην έξω στοιβάδα της έξω μοίρας του μυελού, εδράζει το ευθύ τμήμα του εγγύς σωληναρίου ενώ στην έσω στοιβάδα συναντούμε το ανιόν παχύ σκέλος της αγκύλης Henle και το αθροιστικό σωληνάριο έξω μοίρας. Στην έσω μοίρα του μυελού, συναντώνται το κατιόν και το ανιόν λεπτό σκέλος της αγκύλης Henle καθώς και το αθροιστικό σωληνάριο έσω μοίρας μυελού. Ο νεφρικός μυελός αποτελείται από τις νεφρικές πυραμίδες που είναι 8-18 κωνοειδείς δομές, οι κορυφές των οποίων ονομάζονται νεφρικές θηλές, περιβάλλονται από τον ελάσσονα κάλυκα και προβάλλουν μέσα στη νεφρική κοιλία. Οι ελάσσονες κάλυκες των νεφρικών θηλών συνενώνονται σχηματίζοντας 2-3 μείζονες κάλυκες οι οποίοι αποτελούν την νεφρική πύελο και καταλήγουν στον ουρητήρα. Στην κορυφή της κάθε νεφρικής θηλής παρατηρούνται 12 έως 30 οπές όπου καταλήγουν τα ουροφόρα σωληνάρια. Οι βάσεις των πυραμίδων στρέφονται προς την φλοιώδη μοίρα του νεφρού και έχουν κάθετες προεκβολές που ονομάζονται μυελικές ακτίνες. Οι μυελικές ακτίνες διαπερνούν την έξω και έσω στοιβάδα του μυελού και περιέχουν τα ευθεία τμήματα των εγγύς σωληναρίων, τα ανιόντα σκέλη των αγκύλων Henle και τα αθροιστικά σωληνάρια. Αναλυτικά, στην έξω στοιβάδα της έξω μοίρας του μυελού, εδράζει το ευθύ τμήμα του εγγύς σωληναρίου ενώ στην έσω στοιβάδα συναντούμε το ανιόν παχύ σκέλος της αγκύλης Henle και το

αθροιστικό σωληνάριο έξω μοίρας. Στην έσω μοίρα του μυελού, συναντώνται το κατιόν και το ανιόν λεπτό σκέλος της αγκύλης Henle καθώς και το αθροιστικό σωληνάριο έσω μοίρας μυελού. Ο φλοιός του νεφρού περιβάλλει την μυελώδη ουσία και διεισδύει ανάμεσα από τις πυραμίδες σχηματίζοντας τις στήλες Bertin. Στον φλοιό συναντώνται το σπείραμα με την κάψα Bowman, το εγγύς και το άπω εσπειραμένο σωληνάριο, το συνεκτικό σωληνάριο, την αρχική μοίρα του αθροιστικού σωληναρίου, οι μεσολοβίδες αρτηρίες και φλέβες, τα αρτηριόλια, τα φλεβίδια, τα τριχοειδή και τα λεμφαγγεία. [7] [8] [9].



Εικόνα 2. Ο νεφρώνας αποτελούμενος από το σπείραμα και τα σωληνάρια

Σε κάθε νεφρό παρατηρούνται ένα εκατομμύριο νεφρώνες και από την στιγμή της γέννησης δεν ξανασχηματίζονται νέοι [7].

Οι νεφρώνες αποτελούνται από το σπείραμα ή νεφρικό σωματίο που εν συνεχεία συνδέεται με το εσπειραμένο σωληνάριο. Οι νεφρώνες διακρίνονται στους επιφανειακούς, τους μεσοφλοιώδεις και τους παρασπειραματικούς, ανάλογα με την θέση του νεφρικού σωματίου, και στους έχοντες μακριά ή βραχεία καμπύλη ανάλογα με το μήκος της αγκύλης Henle [7].

βασική μεμβράνη που αποτελείται από κολλαγόνο IV, λαμινίνη, φμπρονεκτίνη, εντακτίνη και πρωτεογλυκάνες. Έχει πάχος 300-350 nm, είναι ημιδιαπερατή και ηλεκτρικά φορτισμένη, ενώ είναι αναδιπλούμενη με άνοιγμα στις σπειραματικές πύλες. Η εξωτερική της επιφάνεια είναι καλυμμένη από ποδοκύτταρα και εσωτερικά έρχεται σε άμεση επαφή με το μεσάγγειο και τα τριχοειδή αγγεία. Η σπειραματική βασική μεμβράνη είναι προϊόν της σύντηξης δυο βασικών μεμβρανών, που παράγονται από τα ενδοθηλιακά και τα ποδοκύτταρα. Ο ρόλος της είναι η μηχανική στήριξη των δομικών στοιχείων του σπειράματος, η αλληλεπίδραση κυτταρικών υποδοχέων μέσω των πρωτεϊνικών συστατικών της και η συμμετοχή στο σπειραματικό ηθμό διήθησης όπου γίνεται η υπερδιήθηση του πλάσματος και η αρχική φάση παραγωγής των ούρων [7] [8] [9]. Σε ό,τι αφορά το κολλαγόνο τύπου IV, οι αλυσίδες α3,α4,α5 κυριαρχούν ενώ οι α1 και α2 υπάρχουν σε μικρές ποσότητες [193].

Το μεσάγγειο αποτελείται από μεσαγγειακά κύτταρα, ενδοθηλιακά και ποδοκύτταρα όπου όλα έρχονται σε στενή επαφή με την σπειραματική βασική μεμβράνη. Τα μεσαγγειακά κύτταρα μαζί με τον διάμεσο ιστό αποτελούν το σπειραματικό μεσάγγειο. Τα ποδοκύτταρα είναι πλήρως διαφοροποιημένα ήδη κατά την εμβρυική ζωή. Αποτελούνται από τρία τμήματα, το κυτταρικό σώμα, τις πρωτογενείς αποφυάδες και τις δευτερογενείς αποφυάδες. Το κυτταρικό σώμα έχει μεγάλο όγκο, επιπλέει εντός της ουροφόρου κοιλότητας και οι αποφυάδες καταλήγουν στα σπειραματικά τριχοειδή τα οποία καλύπτουν με τρόπο τέτοιο ώστε δυο γειτονικές αποφυάδες να προέρχονται από διαφορετικά ποδοκύτταρα. Οι αποφυάδες μεταξύ τους αφήνουν ενδιάμεσες σχισμές που γεφυρώνονται από πολυπεπτιδικά διαφράγματα όπου επιτελείται η διήθηση. Βλάβη στην λειτουργία των διαφραγμάτων οδηγεί σε πρωτεϊνουρία. Τα ποδοκύτταρα δεν παράγουν μόνο στοιχεία της εξωκυττάριας ουσίας αλλά και πρωτεΐνάσες που την αποδομούν [194]. Τα

μεσαγγειακά κύτταρα προέρχονται από πρόδρομα κύτταρα λείων μυϊκών κυττάρων και έχουν ρόλο δομικής στήριξης, σύνθεσης εξωκυττάριας ουσίας, φαγοκυττάρωσης, σύνθεσης και έκκρισης αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών [7] [8] [9].

Τα νεφρικά σωληνάρια επενδύονται από επιθήλιο μονής στιβάδας που επικάθεται στην βασική μεμβράνη. Τα επιθηλιακά αυτά κύτταρα είναι υπεύθυνα για την διακυτταρική (διαμέσου των κυττάρων) και παρακυτταρική (ανάμεσα από τα κύτταρα) μεταφορά ουσιών. Η διακυτταρική μεταφορά επιτελείται από κανάλια, μεταφορείς ή συμμεταφορείς, ενώ η παρακυτταρική εξαρτάται από τις στενές συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων. Το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο ξεκινά από το σπείραμα, έχει πάχος 40-60μm και επενδύεται από επιθηλιακά κύτταρα. Απορροφά τον μέγιστο όγκο του διηθούμενου νερού και ηλεκτρολυτών. Στην συνέχεια ευθείάζεται για να σχηματίσει το κατιόν σκέλος της αγκύλης Henle που φέρεται στην μυελώδη μοίρα. Ακολουθεί η λεπτή ανιούσα μοίρα, και στην συνέχεια η παχιά μοίρα της αγκύλης Henle, που εντοπίζεται στον φλοιό. Εν συνεχεία σχηματίζεται το άπω εσπειραμένο σωληνάριο. Τέλος το βραχύ εμβόλιμο σωληνάριο οδηγεί στα αθροιστικά σωληνάρια που μαζί με άλλα, συνενώνονται και καταλήγουν στους θηλαίους πόρους [7] [8] [9].

1.3 ΔΙΑΒΗΤΙΚΗ ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑ

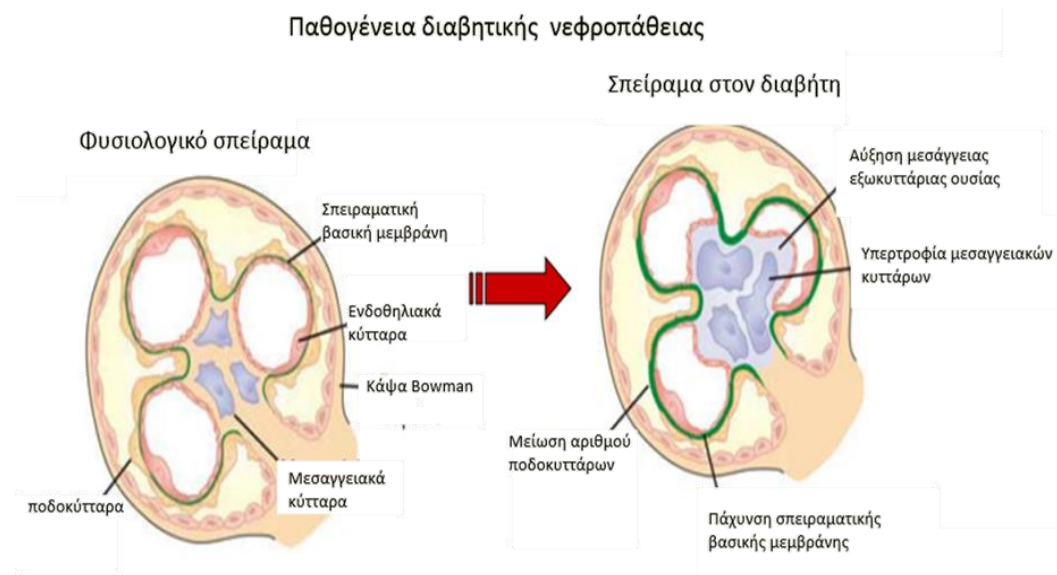
Η διαβητική νεφροπάθεια είναι μικροαγγειακή επιπλοκή του σακχαρώδους διαβήτη και χαρακτηρίζεται από την επίμονη παρουσία πρωτεϊνουρίας ($>0,5\text{g}/24$) και την προοδευτική μείωση της νεφρικής λειτουργίας καταλήγοντας στην νεφρική νόσο τελικού σταδίου. Η αύξηση της σπειραματικής τριχοειδικής ροής, συνεπάγεται με την παραγωγή εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και την πρόκληση ενδοθηλιακής βλάβης με αποτέλεσμα την αυξημένη διαπερατότητα των μακρομορίων από το σπείραμα. Στην συνέχεια προκαλείται η μεσαγγειακή επέκταση, η διάμεση σκλήρυνση και τελικά η σπειραματική σκλήρυνση.

Οι βλάβες που προκαλούνται στο νεφρό διαχωρίζονται στις σπειραματικές, στις αγγειακές (αρτηριοσκλήρυνση) και στην πυελονεφρίτιδα. Οι σημαντικότερες μικροαγγειακές σπειραματικές βλάβες περιλαμβάνουν την οζώδη σπειραματοσκλήρυνση, την διάχυτη μεσαγγειακή σκλήρυνση και την πάχυνση της τριχοειδικής βασικής μεμβράνης. Η οζώδης σπειραματοσκλήρυνση εμφανίζεται στο 15-30% των μακροχρόνια διαβητικών ασθενών και εκδηλώνεται με εμφάνιση όζων στην περιφέρεια του σπειράματος που προκύπτουν από την ανευρυσματική διάταση των σπειραματικών τριχοειδών και τη μεσαγγειόλυση. Αποτελεί βασική αιτία νοσηρότητας και θνητότητας. Η διάχυτη μεσαγγειακή σκλήρυνση παρουσιάζεται σε ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη περισσότερο από μία δεκαετία. Χαρακτηριστικό της είναι εκτεταμένη αύξηση της μεσαγγειακής ουσίας λόγω πάχυνσης της βασικής μεμβράνης και εκδηλώνεται με πρωτεϊνουρία, οίδημα και υποαλβουμιναιμία. Η πάχυνση των τριχοειδικών βασικών μεμβρανών παρατηρείται σε όλο το μήκος των μεμβρανών και εκδηλώνεται λίγα μόλις χρόνια από την εγκατάσταση του διαβήτη χωρίς όμως κλινικές εκδηλώσεις. Στις μακροαγγειακές βλάβες περιλαμβάνονται η αρτηριοσκλήρυνση και η νεφρική αθηροσκλήρυνση με τις αλλοιώσεις να ομοιάζουν

με αυτές που παρουσιάζονται και στο υπόλοιπο σώμα. Τέλος η πυελονεφρίτιδα είναι η οξεία ή χρόνια φλεγμονή των νεφρών με έναρξη τον διάμεσο ιστό και επέκταση στα σωληνάρια [10] [11].

Η διαβητική νεφροπάθεια χωρίζεται σε πέντε στάδια. Στο πρώτο στάδιο, κατά την διάγνωση της νόσου, παρατηρείται υπερδιήθηση, υπερλειτουργία και υπερτροφία. Χαρακτηρίζεται από αγγειοδιαστολή, διόγκωση νεφρών και σπειραμάτων και αυξημένο ρυθμό σπειραματικής διήθησης. Η αποβολή λευκώματος στα ούρα είναι φυσιολογική όπως φυσιολογική ή ελαφρά αυξημένη είναι η αρτηριακή πίεση. Πέντε χρόνια περίπου από την εμφάνιση του σακχαρώδη διαβήτη έρχεται το δεύτερο στάδιο ή αλλιώς σιωπηλό. Παρατηρείται χαρακτηριστική πάχυνση της βασικής σπειραματικής μεμβράνης και υπερπλασία του μεσάγγειου. Ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα, δεν αυξάνεται η αποβολή λευκώματος και η αρτηριακή πίεση μπορεί να είναι φυσιολογική ή αυξημένη. Στο τρίτο στάδιο έχουμε την υποκλινική διαβητική νεφροπάθεια που εκδηλώνεται πέντε έως δεκαπέντε χρόνια από την έναρξη του διαβήτη. Χαρακτηρίζεται από μετρίου βαθμού λευκωματινουρία (μικρολευκωματινουρία) με μείωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης και αρτηριακή υπέρταση. Μετά από δεκαπέντε με είκοσι πέντε χρόνια από την έναρξη της νόσου εκδηλώνεται το τέταρτο στάδιο με σοβαρό βαθμό λευκωματινουρίας (μακρολευκωματινουρία), μείωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης και αρτηριακή υπέρταση. Παρατηρούνται οζίδια Kimmelstiel-Wilson στο μεσάγγειο όπως και διαμεσοσωληναριακή ίνωση. Στο πέμπτο στάδιο ή ουραιμικό έχουμε την νεφρική νόσο τελικού σταδίου που εκδηλώνεται από είκοσι πέντε έως τριάντα χρόνια μετά την έναρξη του διαβήτη. Χαρακτηρίζεται από περαιτέρω έκπτωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης, μείωση της λευκωματινουρίας και αρτηριακή υπέρταση [200] [201][202]

1.3.1 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΛΑΒΕΣ ΕΠΙ ΔΙΑΒΗΤΙΚΟΥ ΕΛΔΑΦΟΥΣ



Εικόνα 4. Στην διαβητική νεφροπάθεια προκαλείται αύξηση της μεσάγγειας ουσίας, υπερτροφία των μεσαγγειακών κυττάρων, πάχυνση της σπειραματικής μεμβράνης και μείωση του αριθμού των ποδοκυττάρων.

Κατά την διαβητική νεφροπάθεια παρατηρούνται τα εξής είδη ιστολογικών βλαβών: η αύξηση της μεσάγγειας εξωκυττάριας ουσίας, η υπερτροφία των μεσαγγειακών κυττάρων, η πάχυνση της βασικής μεμβράνης των σπειραμάτων και τελικά η σκλήρυνση τους, και η μείωση του αριθμού των ποδοκυττάρων. Επειδή η μεσαγγειακή έκπτυξη και η νεφρική σκλήρυνση δεν αναπτύσσονται ταυτόχρονα, γίνεται σαφές ότι δεν έχουν κοινή παθογένεια. Η νεφροσκλήρυνση προκαλείται από την ενδοσπειραματική υπέρταση λόγω αγγειοδιαστολής των νεφρικών αρτηριών ή λόγω ισχαιμικών βλαβών επαγόμενων από την υαλίνωση των αγγείων. Η μεσαγγειακή υπερπλασία από την άλλη, οφείλεται στη χρόνια υπεργλυκαιμία λόγω υπερπαραγωγής θεμέλιας ουσίας, ή μη ενζυματικής γλυκοζυλίωσης των πρωτεϊνών της [12] [14].

Στο σπείραμα των φυσιολογικών νεφρών, τα τριχοειδή αγγεία έχουν ομοιόμορφη διάταξη γύρω από τον μεσαγγειακό άξονα, όμως στην διαβητική νεφροπάθεια τα σπειράματα παρατηρούνται αποδιοργανωμένα, με υπερτροφία του μεσαγγειακού άξονα και ελάττωση των κυττάρων του μεσάγγειου [13]. Καθώς η βλάβη αυτή γίνεται σε βάθος χρόνου, αρχικά όταν γίνει η διάγνωση του διαβήτη, τα σπειράματα είναι φυσιολογικά, το πάχος της βασικής μεμβράνης κυμαίνεται στα 0,3 μm , ο μεσαγγειακός άξονας καταλαμβάνει το 33% του σπειράματος και η μεσάγγεια ουσία είναι στο 50% του άξονα. Σε βάθος πενταετίας, η βασική μεμβράνη αυξάνει το πάχος της κατά 0,1 μm ενώ στην δεκαετία φτάνει τα 0,5 μm , παρατηρείται υπερτροφία του άξονα, που πλέον καταλαμβάνει το 40% του σπειράματος, ενώ η μεσάγγεια ουσία φτάνει στο 55-65% του άξονα. Κατά το τελικό στάδιο, το πάχος της βασικής μεμβράνης φτάνει τα 0,7 μm , ο άξονας καταλαμβάνει το 50% του σπειράματος και η μεσάγγεια ουσία καταλαμβάνει το 60-70% της επιφάνειας του σπειράματος [14].

Στην βασική μεμβράνη κατά την διαβητική νεφροπάθεια, υπάρχει αυξημένη έκφραση των αλυσίδων του κολλαγόνου $\alpha 3$ και $\alpha 4$ αλλά μειωμένη σύνθεση των $\alpha 1$ και $\alpha 2$ και επιπλέον υπάρχει μείωση της θειικής ηπαρίνης [193]. Η αλλαγή αυτή στην σύνθεση και η εναπόθεση κολλαγόνου IV είναι που οδηγούν σε αύξηση του πάχους της μεμβράνης [195].

Αύξηση έκτασης της μεσάγγειας ουσίας παρουσιάζεται τρία έως πέντε χρόνια μετά την έναρξη του διαβήτη, λόγω αυξημένης εναπόθεσης εξωκυττάριας ουσίας και υπερτροφίας των μεσαγγειακών κυττάρων [196].

Η μείωση της αντίστασης στο προσαγωγό και στο απαγωγό αρτηριόλιο προκαλεί αύξηση στην ροή του αίματος, στο σπείραμα και αυξημένη υδροστατική πίεση στα τριχοειδή του σπειράματος. Η αυξημένη αιμάτωση και η υπερδιήθηση οδηγούν σε αιμοδυναμικές αλλαγές του σπειράματος από τα πρώτα στάδια της διαβητικής νεφροπάθειας [197]. Η αύξηση της ενδοσπειραματικής πίεσης

προκαλείται, μεταξύ άλλων, και από την αύξηση εναπόθεσης μεσάγγειας ουσίας, την βλάβη των ποδοκυττάρων, την πάχυνση της βασικής μεμβράνης και την σπειραματοσκλήρυνση. Άλλοι παράγοντες που επιδρούν στην αιμοδυναμική ισορροπία του σπειράματος είναι οι VEGF και TGF- β που επάγονται από το διαβητικό μικροπεριβάλλον, καθώς ο VEGF προκαλεί αγγειοδιαστολή και ο TGF- β 1 αυξάνεται κατά την υπεργλυκαιμία [198]. Η διαταραχή της αιμοδυναμικής ισορροπίας του σπειράματος προκαλεί μηχανικό στρες, με συνέπεια την παραγωγή κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων, που οδηγούν στην αυξημένη παραγωγή μεσάγγειου ουσίας [199].

Τα νεφρικά κύτταρα προσλαμβάνουν γλυκόζη μέσω πρωτεϊνικών διαμεμβρανικών μεταφορέων, ανεξάρτητων από την ινσουλίνη. Η αυξημένη ενδοκυττάρια γλυκόζη, που παρατηρείται από την υπεργλυκαιμία, ενεργοποιεί πληθώρα μεταβολικών μονοπατιών των οποίων τα προϊόντα είναι ιδιαίτερα τοξικά για τον νεφρικό ιστό.

1.4 ΠΑΓΚΡΕΑΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ

Το πάγκρεας εντοπίζεται οπισθοπεριτοναϊκά στην άνω κοιλία, δεν καλύπτεται από περιτόναιο και η κεφαλή του περιβάλλεται από την αγκύλη του δωδεκαδάκτυλου. Έχει μήκος περίπου 15 cm και σχήμα πεπλατυσμένο κωνικό ενώ μέσω του παγκρεατικού πόρου συνδέεται με το λεπτό έντερο. Ανατομικά διακρίνονται 4 μοίρες, η κεφαλή, ο αυχέννας, το σώμα και τέλος η ουρά. Εντός του οργάνου βρίσκονται δύο πόροι, ο κύριος παγκρεατικός και ο εφεδρικός ή δευτερεύων ή πόρος του Santorini [15].

Είναι αδένας με ενδοκρινή και εξωκρινή μοίρα. Η εξωκρινής μοίρα είναι υπεύθυνη για την παραγωγή πεπτικών ενζύμων. Η ενδοκρινής μοίρα είναι ενσωματωμένη στην εξωκρινή με μεγαλύτερη πυκνότητα στην περιοχή της ουράς και αποτελείται από ομάδες κυττάρων που σχηματίζουν τις νησίδες Langerhans. Οι νησίδες είναι περίπου 1.000.000 και αποτελούνται από τέσσερεις τύπους κυττάρων. Τα α-κύτταρα αποτελούν το 20% των νησιδιακών κυττάρων, εκκρίνουν γλυκαγόνη και βρίσκονται κυρίως στην περιφέρεια των νησιδίων. Τα β-κύτταρα είναι το 70%, εκκρίνουν ινσουλίνη και βρίσκονται στην κεντρική περιοχή. Κάθε νησίδιο περιέχει περίπου 4000 β-κύτταρα και ο αριθμός τους δύναται να αυξηθεί κατά την εγκυμοσύνη ή την παχυσαρκία, αλλά και να μειωθεί όπως παρατηρείται στα τελικά στάδια του διαβήτη. Τα δ-κύτταρα είναι λιγότερα από το 10%, εκκρίνουν σωματοστατίνη και βρίσκονται ανάμεσα στους δύο άλλους τύπους κυττάρων. Τα Ε είναι λιγότερα από 1% και παράγουν γκρελίνη ενώ τέλος τα F ή PP κύτταρα εκκρίνουν το παγκρεατικό πολυπεπίδιο και βρίσκονται στα νησίδια του οπίσθιου λοβού της κεφαλής του παγκρέατος [15]

1.4.1 ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ

Στα β-κύτταρα του παγκρέατος, συντίθεται η ινσουλίνη, η οποία μαζί με αμυλίνη και c-πεπίδιο, οργανώνονται σε κυστίδια, αναμένοντας την απελευθέρωσή τους. Εντός του κυστιδίου, 6 μόρια ινσουλίνης είναι προσκολλημένα σε 1 μόριο ψευδαργύρου και στην επιφάνεια των κυστιδίων ανευρίσκονται οι πρωτεΐνες munc18 και rab3, μέσω των οποίων συνδέονται στην συνταξίνη (syntaxin) της μεμβράνης. Η απελευθέρωση της ινσουλίνης γίνεται σε δύο στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο, τα κυστίδια είναι ήδη αγκυροβολημένα στο εσωτερικό της μεμβράνης αναμένοντας την έξοδό τους και κατά το δεύτερο, τα κυστίδια βρίσκονται βαθύτερα στο

κυτταρόπλασμα και μετακινούνται προς την μεμβράνη για να αντικαταστήσουν αυτά που ήδη εξωκυττώθηκαν. Η μετακίνηση αυτή γίνεται με ρυθμό 5-40 κυστίδια ανά λεπτό, ανά κύτταρο και ξεκινάει κατά την διάρκεια της πρώτης φάσης [16] [17]

Η γλυκόζη μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, εισέρχεται στα β-κύτταρα του παγκρέατος, μέσω των μεταφορέων GLUT-2. Στην συνέχεια υπόκειται γλυκόλυση με απώτερο στόχο τον σχηματισμό πυρουβικού. Το πυρουβικό εισέρχεται στην αναπνευστική αλυσίδα του μιτοχονδρίου και οδηγεί στην παραγωγή ATP [16] [17]

Η κυτταρική μεμβράνη έχει φορτίο -70mV και στην επιφάνειά της υπάρχουν κανάλια K^+ και Ca^+ . Σε συνθήκες χαμηλής/φυσιολογικής συγκέντρωσης γλυκόζης το κανάλι K^+ παραμένει ανοιχτό λόγω μεγαλύτερης συγκέντρωσης ADP από ATP. Όταν συνέπεια της γλυκόλυσης, ο λόγος ATP/ ADP αυξηθεί, το ATP προσδένει σε προκαθορισμένη θέση στο κανάλι K^+ και το κλείνει, με αποτέλεσμα την άθροιση K^+ στο κυτταρόπλασμα και την αλλαγή της πολικότητας της μεμβράνης στα -50mV . Η αλλαγή αυτή στην πολικότητα προς το ηλεκτροθετικότερο (-50mV), οδηγεί στο άνοιγμα του καναλιού Ca^+ με αποτέλεσμα τη έξοδο Ca^{2+} από το κυτταρόπλασμα και την παράλληλη σύντηξη των μεμβρανών του κυστιδίου, που προαναφέρθηκε, με συνέπεια τη απελευθέρωση ινσουλίνης, c-πεπτιδίου και αμιλίνης στην κυκλοφορία [16] [17].

Οποιαδήποτε βλάβη στον ανώτερο μηχανισμό, που δεν επιτρέπει την έξοδο της ινσουλίνης, συνεπάγεται στην εκδήλωση διαβήτη. Για παράδειγμα, στην περίπτωση του MODY η βλάβη στην γλυκοκινάση δεν επιτρέπει την έναρξη της γλυκόλυσης, και εφόσον δεν θα παραχθεί αρκετό ATP, το κανάλι K^+ δεν θα κλείσει, η πολικότητα της μεμβράνης δεν θα αλλάξει, το κανάλι Ca^+ θα παραμείνει κλειστό και η ινσουλίνη δεν θα απελευθερωθεί στην κυκλοφορία [16] [17].

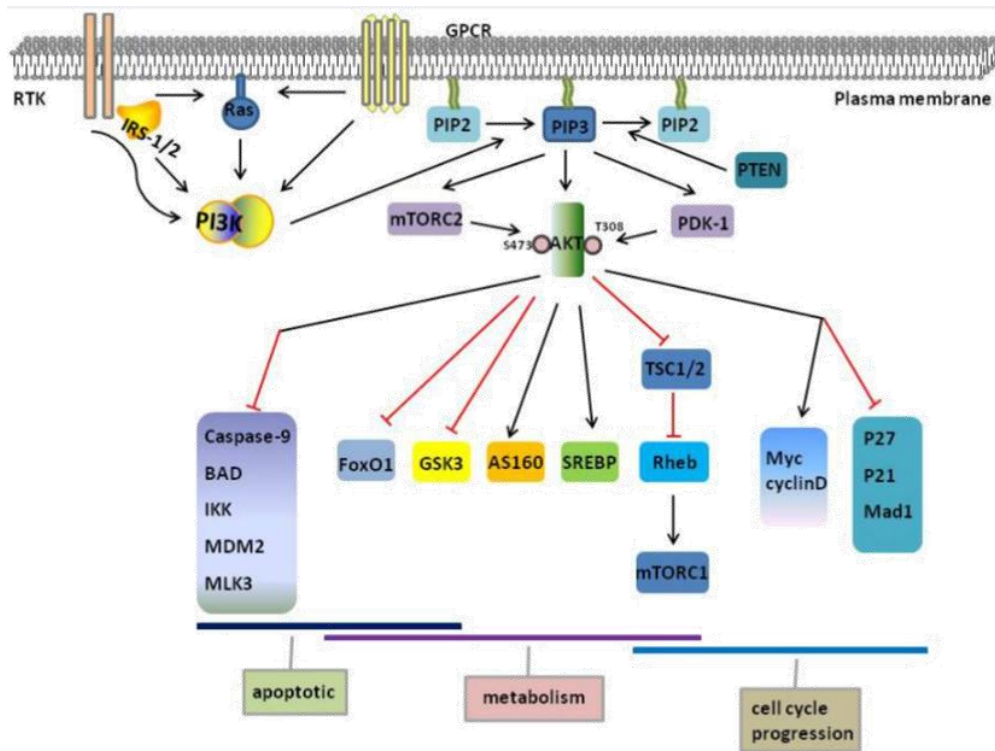
Η ινσουλίνη ούσα στην κυκλοφορία, προσδένει σε κατάλληλους υποδοχείς τυροσίνης κινάσης IR (insulin reseptor) των κυττάρων και οδηγεί στην έναρξη

μεταβολικών οδών που επηρεάζουν τις κυτταρικές λειτουργίες. Ο IR είναι υποδοχέας που αποτελείται από δύο υπομονάδες «α» στην εξωκυττάρια πλευρά της μεμβράνης και δύο υπομονάδες «β» που διαπερνούν την μεμβράνη και καταλήγουν εντός του κυτταροπλάσματος. Η ινσουλίνη προσδένει μεταξύ των δύο α-υπομονάδων και αυτό προκαλεί το γειτνίασμα των δύο υπομονάδων «β» που φωσφορυλιώνουν η μία την άλλη. Αυτή η αλληλοφωσφορυλίωση έλκει και φωσφορυλιώνει τον IRS, που με την σειρά του έλκει και φωσφορυλιώνει το PI3K. Το ενεργοποιημένο πλέον PI3K, θα ενεργοποιήσει το mTORC2 αλλά και αποσπώντας ένα φώσφορο από ATP μετατρέπει τη 4,5 διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (PIP2) σε PIP3, το οποίο εν συνεχεία προσδένει στο PDK1 [18]. Το PDK1 θα φωσφορυλιώσει την AKT της οποίας η ενεργοποίηση θα ολοκληρωθεί από την ταυτόχρονη φωσφορυλίωσή της από το mTORC2 [19].

Η ενεργοποιημένη πλέον ACT μεταξύ άλλων, θα ρυθμίσει τον κυτταρικό κύκλο, τον κυτταρικό μεταβολισμό, θα προκαλέσει τον μεταβολισμό της γλυκόζης προς γλυκογόνο, την ενεργοποίηση του mTORC1 και την μετακίνηση των GLUT-4 στην επιφάνεια των μυϊκών, λιποκυττάρων και καρδιακών κυττάρων [20] [21].

Η ενεργοποίηση του mTORC1 οδηγεί σε αναστολή απόπτωσης και αυτοφαγίας και επαγωγή των πρωτεϊνοσύνθεσης, σύνθεσης λιπιδίων και λιποκυττάρων, σύνθεση μιτοχονδρίων, σύνθεση γλυκογόνου, και την αναδραστική (backloop) αναστολή του PI3K [22].

Η AKT βρίσκεται σε τρεις ισομορφές, τις AKT-1,2 και 3. Ενδοκυττάρια, η AKT μέσω διέγερσης της εξοκινάσης, είναι ο «ηθικός αυτουργός» πίσω από τον μεταβολισμό της γλυκόζης σε 6-φωσφορική-γλυκόζη, μέσω της συνθάσης του γλυκογόνου κινάσης 3 (GSK3), την παραγωγή κυτταρικής ενέργειας διά της γλυκόλυσης και επιπλέον προάγει την παραγωγή γλυκογόνου μέσω αναστολής του FoxO1 [23].



Εικόνα 5. Σηματοδότηση μονοπατιού της AKT. [22]

1.5 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΜΕΤΑΦΟΡΕΙΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ

Η γλυκόζη λαμβάνεται από τις τροφές υπό την μορφή σύμπλοκων υδατανθράκων, οι οποίοι αποδομούνται και απορροφούνται πλήρως από το λεπτό έντερο. Η ποσότητα γλυκόζης που αποθηκεύεται και ανακυκλώνεται στο σώμα ημερησίως είναι 250 έως 450gr και ο εγκέφαλος από μόνος του καταναλώνει 125gr. Μια φυσιολογική και ισορροπημένη, δυτικού τύπου διατροφή, παρέχει στο σώμα περίπου 180gr ημερησίως και η υπόλοιπη ποσότητα παρέχεται από την αποθηκευμένη γλυκόζη και την γλυκονεογένεση, με την συμβολή του ήπατος και των νεφρών. Ο ομοιοστατικός μηχανισμός διαχείρισης της γλυκόζης διασφαλίζει ότι επαρκής ποσότητα θα φτάσει πρώτα στον εγκέφαλο και μετά στα υπόλοιπα όργανα [24].

Η φυσιολογική συγκέντρωση γλυκόζης στην κυκλοφορία είναι περίπου 5mM και αυτό διότι η γλυκόζη, υπό φυσιολογικές συνθήκες, μετακινείται, μεταφέρεται και μεταβολίζεται με σκοπό την παραγωγή ενέργειας. Η είσοδος της γλυκόζης στα κύτταρα επιτυγχάνεται μέσω εξειδικευμένων μεταφορέων που είναι οι GLUT της οικογένειας SLC2 και οι SGLT της οικογένειας SLC5 [25].

Οι GLUT είναι 14 στον αριθμό αλλά οι καλύτερα χαρακτηρισμένοι είναι οι 1-4 [26].

Ο GLUT-1 είναι αναμφίβολα ο πιο μελετημένος μεμβρανικός μεταφορέας και η δομή, ο μηχανισμός και η μεταφορά μέσω αυτής της πρωτεΐνης έχουν υπάρξει αντικείμενο εκατοντάδων μελετών τις τελευταίες δεκαετίες. Βρίσκεται σχεδόν σε όλα τα κύτταρα και έχει πολύ μεγάλη συνάφεια με την γλυκόζη ($K_m=1mM$) με αποτέλεσμα να εισέρχονται στο κύτταρο όλα τα μόρια που προσδένουν στον μεταφορέα, ανεξαρτήτως εξωκυττάριας συγκέντρωσης και επιπλέον δρα ανεξάρτητα από την ινσουλίνη. Αυξημένος αριθμός των συγκεκριμένων μεταφορέων απαντάται

στα ερυθροκύτταρα, τα εμβρυικά κύτταρα, τα καρδιακά, τα κύτταρα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και τους νεφρούς. Εκτός από μεταφορέας γλυκόζης, ο GLUT-1 δρα και ως μεταφορέας βιταμίνης C αλλά και ως υποδοχέας εισόδου του ιού HTLV [27].

Ο GLUT-2 είναι επίσης μεμβρανικός μεταφορέας, ανεξάρτητος της ινσουλίνης και εντοπίζεται κυρίως στη βασοπλευρική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων του νεφρού και λεπτού εντέρου, το ήπαρ και το πάγκρεας. Επειδή έχει $K_m=17\text{mM}$, η γλυκόζη εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα όταν η εξωκυττάρια συγκέντρωσή της είναι μεγάλη [28] [29]. Όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης είναι αυξημένη, στα επιθηλιακά κύτταρα του αυλού του λεπτού εντέρου, ο GLUT-2 μπορεί να ανιχνευτεί και στην πλευρική μεμβράνη, αυξάνοντας την απορρόφηση της γλυκόζης [30].

Στα β-παγκρεατικά κύτταρα, η αυξημένη γλυκόζη πυροδοτεί την έκκριση ινσουλίνης, ενώ η απουσία GLUT-2 αποτρέπει την επαγόμενη από την παρουσία γλυκόζης, έκκριση ινσουλίνης. Στα ηπατοκύτταρα, η παρουσία GLUT-2 επάγει την έκφραση γλυκολυτικών και λιπογονικών γονιδίων που ελέγχουν την έκκριση γλυκαγόνης, τη συμπεριφορά σίτισης, την έκκριση ινσουλίνης και την πρόσληψη γλυκόζης από τους περιφερειακούς ιστούς. Επιπλέον αυτός ο μεταφορέας είναι απαραίτητος για τη λειτουργία των αισθητήρων γλυκόζης της ηπατοπυλαίας φλέβας αλλά και του κεντρικού νευρικού συστήματος [30] [31].

Ο GLUT-3 είναι ακόμα ένας υποδοχέας που εντοπίζεται στην μεμβράνη και δρα ανεξάρτητα από την παρουσία ινσουλίνης. Συναντάται ως επί το πλείστον σε πλακούντα, νευρικά κύτταρα, σπερματοζώαρια, νεφρό και έχει $K_m=1.5\text{ mM}$. Στα νευρικά κύτταρα συναντάται τόσο στους δενδρίτες όσο και τους νευράξονες και ο βαθμός έκφρασής του ποικίλει σε διαφορετικά μέρη του εγκεφάλου [31]. Στα εμβρυικά κύτταρα εκφράζεται σε τροφοεκτήδερμα και βλαστοκύστη ενώ μετά την εμφύτευση, στους έξω εμβρυικούς υμένες. Στις διαβητικές μητέρες, προεμφυτευτικά,

η έκφρασή του GLUT-3 είναι μειωμένη με αποτέλεσμα την απόπτωση [26]. Ο μεταφορέας αυτός, επίσης εκφράζεται στα λεμφοκύτταρα, τα μονοκύτταρα και τα αιμοπετάλια, όπου βρίσκεται εντός του κυτταροπλάσματος και μεταναστεύει στην μεμβράνη κατά την κυτταρική ενεργοποίηση, ώστε να εξασφαλιστεί η είσοδος και ο μεταβολισμός της γλυκόζης [26].

Ο GLUT-4 με $K_m=15mM$ εντοπίζεται στα λιποκύτταρα, τα μυϊκά κύτταρα και την καρδιά. Διαφέρει από τους τρεις προηγούμενους μεταφορείς στο γεγονός ότι εντοπίζεται σε κυστίδια εντός του κυτταροπλάσματος. Ο μεταφορέας αυτός εξαρτάται από την παρουσία ινσουλίνης, η οποία αφού προσδέσει στον υποδοχέα της, οδηγεί στην ενεργοποίηση του AKT με συνέπεια οι GLUT-4 να μετακινηθούν στην μεμβράνη. Για αυτή του την μετακίνηση απαιτείται η ενεργοποιημένη συεισφορά περισσότερων από 60 μορίων [32].

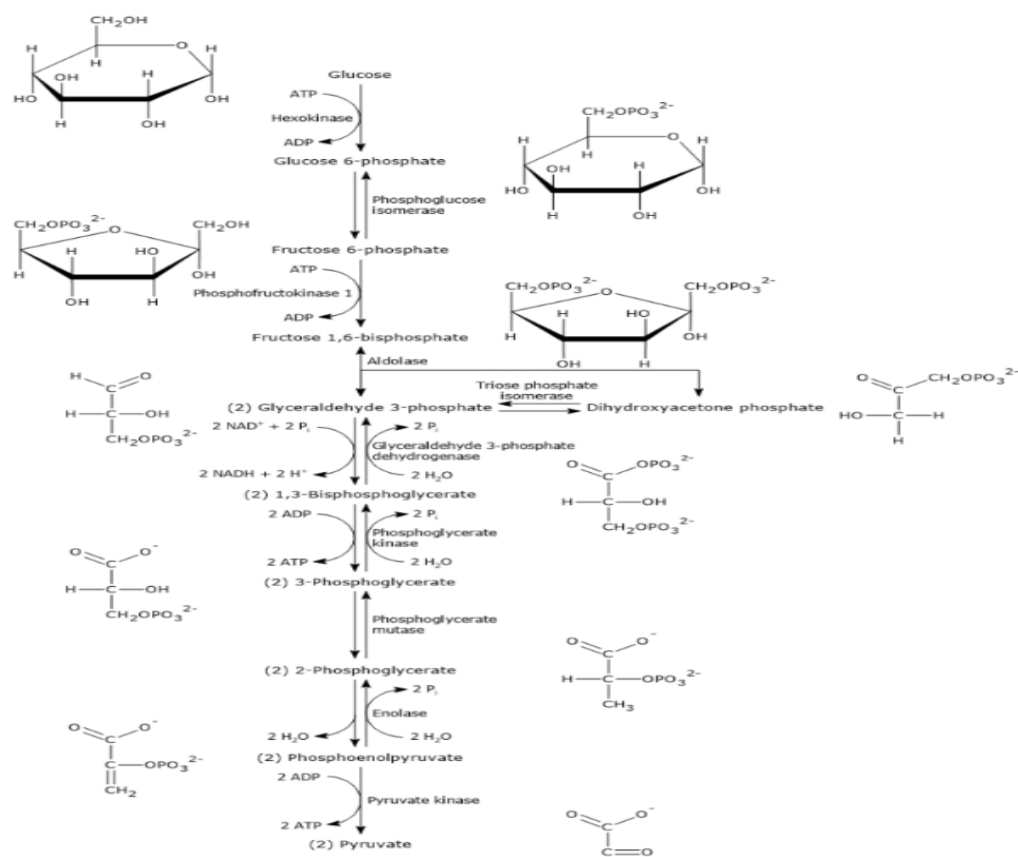
Οι 6 συμμεταφορείς νατρίου-γλυκόζης είναι οι SGLT-1, 2,3, 4, 5 και 6. Εντοπίζονται σε πληθώρα οργάνων και δρουν ανεξάρτητα από την παρουσία ινσουλίνης, αλλά καθώς κάνουν μεταφορά γλυκόζης από περιβάλλον χαμηλότερης συγκέντρωσης προς περιβάλλον υψηλότερης, εξαρτώνται από το Na^+ και το ATP. Το νάτριο ως ενεργοποιό κατιόν των SGLTs, αφού συνδεθεί σε καθορισμένη θέση στην εξωκυττάρια πλευρά του μεταφορέα, προκαλεί δομική αναδιαμόρφωσή του, σχηματίζοντας κοιλότητα υποδοχής, στην οποία δεσμεύεται η γλυκόζη. Ολόκληρο το μόριο περιστρέφεται, ώστε 2 ιόντα νατρίου και 1 μόριο γλυκόζης να προσανατολιστούν προς τον ενδοκυττάριο χώρο, στον οποίο και απελευθερώνονται, με τον μεταφορέα να ξαναπεριστρέφεται, με ρυθμό 1000 κύκλους ανά δευτερόλεπτο, ώστε η θέση δέσμευσης του νατρίου να βρίσκεται πάλι στον εξωκυττάριο χώρο [33]. Τα εισερχόμενα στο κύτταρο ιόντα, εξέρχονται στον διάμεσο χώρο μέσω της αντλίας K/Na και στην συνέχεια μέσω της πλαγιοβασικής μεμβράνης στην κυκλοφορία με την συμβολή των GLUT [24].

Ο SGLT-1 έχει $K_m=0.5\text{mM}$ και τα υποστρώματά του είναι η γλυκόζη και η γαλακτόζη. Συναντάται στο έντερο, την τραχεία, τους νεφρούς, την καρδιά, τον εγκέφαλο, τους όρχεις και τον προστάτη.

Ο SGLT-2 έχει $K_m=2\text{mM}$ και είναι μεταφορέας γλυκόζης στους νεφρούς, τον εγκέφαλο, το ήπαρ, τον θυρεοειδή αδένα τους μύες και την καρδιά. [24] Στον νεφρό οι SGLT2 εντοπίζονται στην κορυφαία (apical) μεμβράνη στα επιθηλιακά κύτταρα (RPTECs) του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου, στις περιοχές S1 και S2 και λόγω του χαμηλού K_m ευθύνονται για το 90%-97% της επαναπορρόφησης της γλυκόζης. Το υπόλοιπο 10% επαναρροφάται από τους SGLT-1 στο S3 τμήμα του σωληναρίου και κατά συνέπεια δεν ανιχνεύεται γλυκόζη στα ούρα, εκτός και αν η γλυκόζη στο αίμα υπερβεί τα 180 mg/mL [34]. Οι αναστολείς των SGLT-2, που ονομάζονται γλυφοζίνες, έχουν ποικίλες ιδιότητες χωρίς όμως μεγάλες διαφορές στον τρόπο δράσης τους. Οι αναστολείς αυτοί είναι η νταπαγλιφλοζίνη, η καναγλιφλοζίνη και η εμπαγλιφλοζίνη. Ρόλος τους είναι η αναστολή σε μεγάλο βαθμό της επαναρρόφησης της γλυκόζης και η αύξηση της απέκκρισής της στα ούρα. Με τον μηχανισμό αυτό δράσης, οι αναστολείς SGLT-2 μειώνουν δραστικά την υπεργλυκαιμία. Υπολογίζεται ότι καθημερινά με την χορήγηση αναστολέων SGLT-2 αποβάλλονται με τα ούρα 70-80gr γλυκόζης. Η αυξημένη αποβολή γλυκόζης συμβάλλει και στην απώλεια βάρους (περίπου 300 θερμίδες ημερησίως) όπως επίσης μερικώς και στην μείωση της αρτηριακής πίεσης.

Ο SGLT-3 εντοπίζεται κυρίως στο ήπαρ, το νεφρό, τους μύες και το λεπτό έντερο [35]. Ο SGLT-4 με $K_m=2,4\text{mM}$ μετακινεί γλυκόζη και μανόζη στο έντερο, τους νεφρούς, τον εγκέφαλο, τους πνεύμονες, την τραχεία την μήτρα και το πάγκρεας. Ο SGLT-5 έχει άγνωστη K_m , άγνωστο υπόστρωμα αλλά ανευρίσκεται στους νεφρούς. Τέλος ο SGLT-6 έχει $K_m=0,12\text{mM}$ για την μυο-ινοσιτόλη και 35mM για την γλυκόζη. Εντοπίζεται στον εγκέφαλο, τους νεφρούς και το έντερο [24] [36].

1.6 ΓΛΥΚΟΛΥΣΗ

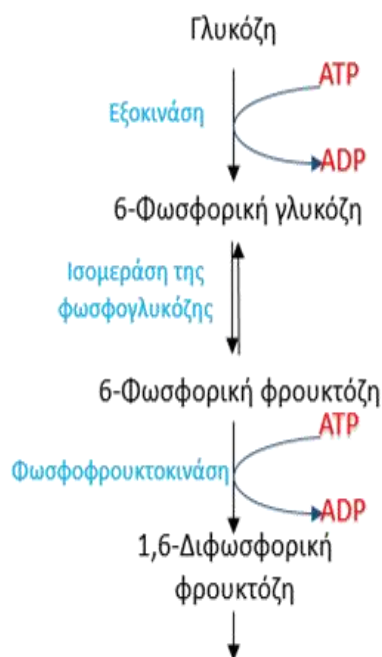


Εικόνα 6. Τα τρία στάδια στις γλυκόλυση προς σχηματισμό πυρουβικού .

Μετά την κατανάλωση υδατανθράκων, η γλυκόζη εισέρχεται στο λεπτό έντερο. Στην κορυφαία μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων του εντερικού αυλού βρίσκονται οι υποδοχείς SGLT-1 από όπου η γλυκόζη με 2 ιόντα Na⁺ εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα. Στην συνέχεια μέσω της βασικής μεμβράνης εξέρχεται στον ενδιάμεσο χώρο και στην συνέχεια θα περάσει στην κυκλοφορία από όπου θα απορροφηθεί από τα διάφορα κύτταρα των ιστών δια μέσω των μεταφορέων, και θα υποστεί γλυκόλυση.

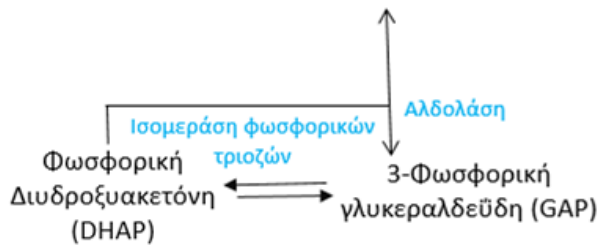
Η γλυκόλυση γίνεται σε τρία στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο, μέσω της εξοκίνησης, φωσφορυλιώνεται από το ATP για να σχηματιστεί η 6-φωσφορική

γλυκόζη (Glc-6P). Το 91% της Glc-6P, από την ισομεράση της φωσφογλυκόζης, ισομεριώνεται προς 6-φωσφορική φρουκτόζη (Frc-6p) και το 9% ανάγεται από το NADP⁺ σε 6-P-gluconate μέσω του ενζύμου G6PD [37]. Τέλος η 6-φωσφορική φρουκτόζη (Frc-6p) αφού φωσφορυλιωθεί από το ATP, θα μεταβληστεί σε 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη (Frc-1,6-bis-P).



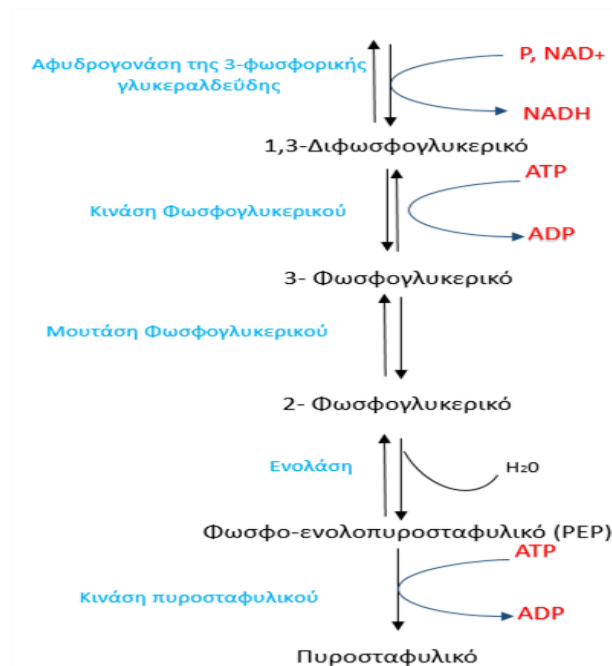
Εικόνα 7. Πρώτο στάδιο γλυκόλυσης. Η γλυκόζη μεταβολίζεται σε GA3P και DHAP.

Κατά το δεύτερο στάδιο, μέσω της αλδολάσης, η Frc-1,6-bis-P διασπάται σε φωσφορική διυδροξυακετόνη (DHAP) και σε 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη (GA3P) [38]. Η DHAP καταλυόμενη από την ισομεράση των φωσφορικών τριοζών μετατρέπεται επίσης σε 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη GA3P, οπότε συνολικά προκύπτουν 2 μόρια GA3P [39].



Εικόνα 8. Δεύτερο στάδιο γλυκόλυσης

Κατά το τρίτο και τελευταίο στάδιο, τα δύο μόρια GA3P, από την αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης θα μετατραπούν σε 1,3-διφωσφογλυκερικά (1,3-bis-P-glycerate), η κινάση του φωσφογλυκερικού καταλύει την μετατροπή του 1,3-διφωσφογλυκερικού σε 3-φωσφογλυκερικό. Εν συνεχεία το 3-φωσφογλυκερικό αναδιατάσσεται σε 2-φωσφογλυκερικό μέσω της μούτάσης του φωσφογλυκερικού και εν συνεχεία θα αφυδατωθεί σε φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικό μέσω της ενολάσης. Στο τέλος η κινάση του πυροσταφυλικού μετατρέπει το φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικό σε 2 μόρια πυροσταφυλικού. Το πυροσταφυλικό καταλήγει σε ακετυλο-συνένζυμο Α και εισέρχεται στο μιτοχόνδριο [39].



Εικόνα 9. Τρίτο στάδιο γλυκόλυσης.

1.7 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ : ΠΗΓΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ROS

Το NADH που παράγεται από την γλυκόλυση στο κυτταρόπλασμα, δεν μπορεί έτσι απλά να περάσει μέσα στο μιτοχόνδριο ώστε να αποδώσει τα ηλεκτρόνια του στην αναπνευστική αλυσίδα. Στο κυτταρόπλασμα, το πυροσταφυλικό με οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση, όπως προαναφέρθηκε, μετατρέπεται σε ακετυλο-συνένζυμο-A το οποίο εν συνεχεία μπαίνοντας στον κύκλο του Krebs μετατρέπεται σε οξαλοξικό. Η αφυδρογονάση του μηλικού καταλύει την μεταφορά 2H^+ από το NADH στο οξαλοξικό μετατρέποντάς το σε μηλικό, το οποίο είναι πλέον σε θέση να εισέλθει στο μιτοχόνδριο διαμέσου των μεταφορέων μηλικού-ασπαρτικού με την ταυτόχρονη έξοδο α-κετογλουταρικού. Εντός του μιτοχονδρίου πλέον, το μηλικό αποδίδει 2H^+ που είχε πάρει, στο NAD^+ προς σχηματισμό NADH και ξανά έχουμε τον σχηματισμό οξαλοξικού. Καθώς το οξαλοξικό αδυνατεί να μετακινηθεί εντός της μιτοχονδριακής μεμβράνης, μετατρέπεται από το γλουταμινικό σε α-κετογλουταρικό και ασπαρτικό. Το α-κετογλουταρικό θα ξαναβγεί από τον μεταφορέα μηλικού-ασπαρτικού για να μπει νέο μαλαϊκό και το ασπαρτικό θα βγει από το γλουταμινικό-ασπαρτικό αντιπρότερ με παράλληλη είσοδο γλουταμινικό [40].

Η αναπνευστική αλυσίδα του μιτοχονδρίου αποτελείται από τέσσερα πρωτεϊνικά σύμπλοκα, τα I, II, III και IV. Κατά τον μεταβολισμό της γλυκόζης στο κυτταρόπλασμα και τον κύκλο του κιτρικού οξέος, παράγονται λοιπόν δότες ηλεκτρονίων με κυριότερο τον NADH που αποδίδει τα ηλεκτρόνια του στο σύμπλοκο I και το FADH_2 που αποδίδει τα ηλεκτρόνια του στο σύμπλοκο II. Τα ηλεκτρόνια και των δύο αυτών σύμπλοκων μεταφέρονται στο συνένζυμο Q και από εκεί μετακινούνται προς το σύμπλοκο III. Στην συνέχεια μεταφέρονται προς το κυτόχρωμα-C, μετά στο σύμπλοκο IV. Η μεταφορά των ηλεκτρονίων κατά μήκος της

αναπνευστικής αλυσίδας, οδηγεί στην άντληση πρωτονίων (H^+) από τη μήτρα του μιτοχονδρίου προς την κυτταροπλασματική πλευρά της εσωτερικής μεμβράνης του. Αυτό γίνεται με χρήση της ενέργειας των ηλεκτρονίων στα σύμπλοκα I, II και IV. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται μία διαφορά δυναμικού εκατέρωθεν της μεμβράνης, η οποία αποτελεί την πρωτονιοκίνητη δύναμη που οδηγεί στην μεταφορά των πρωτονίων (H^+) στην ATP-συνθάση η οποία θα τα χρησιμοποιήσει για την παραγωγή ATP. Παράλληλα οι UCPs (uncoupling proteins) μπορούν να μειώσουν την διαβάθμιση της τάσης ώστε να παραχθεί θερμότητα και με αυτό τον τρόπο να διατηρείται σταθερή η παραγωγή ATP [41] [42].

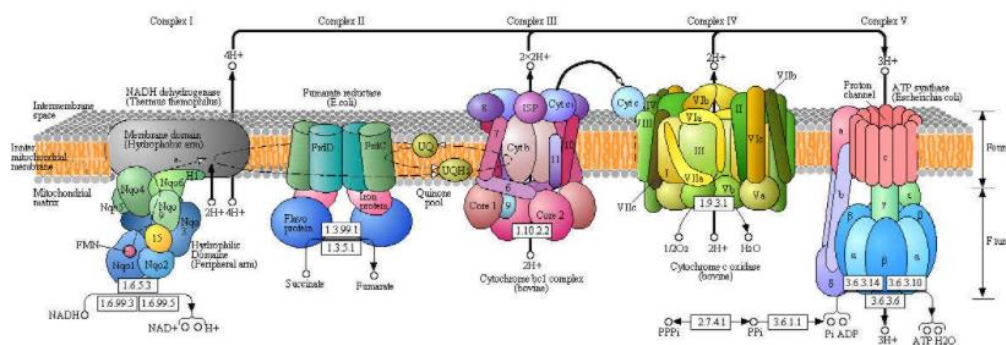
Στο σύμπλοκο IV (οξειδάση του κυτοχρώματος), τα e^- αποδίδονται στο O_2 με αποτέλεσμα τον σχηματισμό H_2O . Αναλυτικότερα, επειδή το O_2 εάν προσλάβει έστω ένα e^- δημιουργεί υπεροξειδίου (O_2^-), που είναι ιδιαίτερα δραστική ελεύθερη ρίζα, το σύμπλοκο IV συγκρατεί το O_2 και αφού παραλάβει $4e^-$ από το κυτόχρωμα C και αντλήσει 4 πρωτόνια από το εσωτερικό του μιτοχονδρίου, θα προκύψει η χημική αντίδραση $4H^+ + O_2 \rightarrow 2H_2O$ [43].

Το ένζυμο δισμουτάση του υπεροξειδίου (MnSOD) υποβαθμίζει το O_2^- σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) το οποίο με αντίδραση Fenton μετατρέπεται σε OH^- . Υπό την δράση γλουταθειόνης (GSH) το OH^- μετατρέπεται σε H_2O [44] [42]

Είναι γνωστές πέντε ισομορφές των UCP. Η UCP-1 εκφράζεται κυρίως στα νεογνά και είναι υπεύθυνη για την θερμογένεση. Η UCP-2 βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα και στα β -κύτταρα του παγκρέατος, υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες του μιτοχονδρίου, διακόπτοντας την λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας και κατά συνέπεια της παραγωγής ATP, εμποδίζουν την έξοδο της ινσουλίνης, ενισχύοντας έτσι την εκδήλωση του ΣΔ τύπου 2. Η UCP-3 παίζει ρόλο στον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων από τα μιτοχόνδρια και εντοπίζεται κυρίως στους σκελετικούς μύες

,τον καφέ λιπώδη ιστό και ελάχιστα στην καρδιά. Οι UCP-4 και 5 εντοπίζονται στο νευρικό σύστημα [45] [46] [47].

Βλέπουμε λοιπόν πως ενώ το μιτοχόνδριο υπό φυσιολογικές συνθήκες παράγει ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και υπεροξειδίου, μόνο το 0,1% του καταναλισκομένου O₂ θα οδηγήσει στον σχηματισμό ROS.



Εικόνα 10. Αναπνευστική αλυσίδα μιτοχονδρίου

1.8 ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑ

1.8.1 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΥΨΗΛΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ

Το 2000 η πειραματική μελέτη της ομάδας των Nishikawa και Takeshi, έδειξε ότι ο κύκλος του KREBS είναι η κύρια αιτία παραγωγής ελεύθερων ριζών (ROS) σε συνθήκες υψηλής γλυκόζης. Απέδειξαν ότι τα ROS που παρήχθησαν στην συνθήκη υπεργλυκαιμίας, προέρχονταν από το ηλεκτροχημικό δυναμικό της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας και ότι η υπερέκφραση των αποσυζευγμένων πρωτεϊνών (UCP1) και της δισμουτάσης του υπεροξειδίου του μαγγανίου (Mn-SOD) απέτρεψε

την επίδραση της υπεργλυκαιμίας, αποδεικνύοντας ότι αυτός ο μηχανισμός ευθύνεται για τα παραγόμενα ROS. [42].

Η ομάδα του Brownlee το 2004 πειραματικά απέδειξε ότι η υπεργλυκαιμία επηρεάζει τα κύτταρα εκ των έσω και για την ακρίβεια ότι όλες οι βλάβες προκύπτουν από την υπερπαραγωγή υπεροξειδίου από την αναπνευστική αλυσίδα. Μάλιστα εφελτήριο για την μελέτη τους ήταν το γεγονός ότι ενώ όλα τα κύτταρα ενός διαβητικού ασθενούς ευρίσκονται υπό συνθήκες υψηλής γλυκόζης, αυτά που δείχνουν να επηρεάζονται είναι τα ενδοθηλιακά των τριχοειδών, τα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, τα μεσεγγυματικά του νεφρικού σπειράματος, τα νευρικά και τα κύτταρα Schwann. Η προδιάθεση για βλάβη αυτών των συγκεκριμένων κυττάρων ώθησε την ομάδα να υποθέσει ότι το πρόβλημα έγκειται σε πιο πρόδρομα μόρια και να σχηματίσουν ένα ενοποιημένο μοντέλο μεταβολικών διεργασιών που ευθύνονται για τις βλάβες που προκαλεί η υπεργλυκαιμία [48].

1.8.2 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ ΚΑΙ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑ

Όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης είναι υψηλή, όπως στον διαβήτη, είναι αναμενόμενο η ποσότητα των παραγόμενων NADH και FADH₂ από την γλυκόλυση, να είναι αυξημένη και κατά συνέπεια και ο αριθμός των ηλεκτρονίων που διακινούνται στην αναπνευστική αλυσίδα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αυξηθεί η τάση στην μιτοχονδριακή μεμβράνη και για λόγους αυτοπροστασίας, οι πρωτεΐνες UCPs αποσυνδέουν την επικοινωνία της αναπνευστικής αλυσίδας με την ATP-συνθάση, με αποτέλεσμα την αναστολή παραγωγής ATP . Καθώς όμως η αλυσίδα εξακολουθεί να είναι ενεργή, η ενέργεια που συσσωρεύεται μετατρέπεται σε θερμική [49].

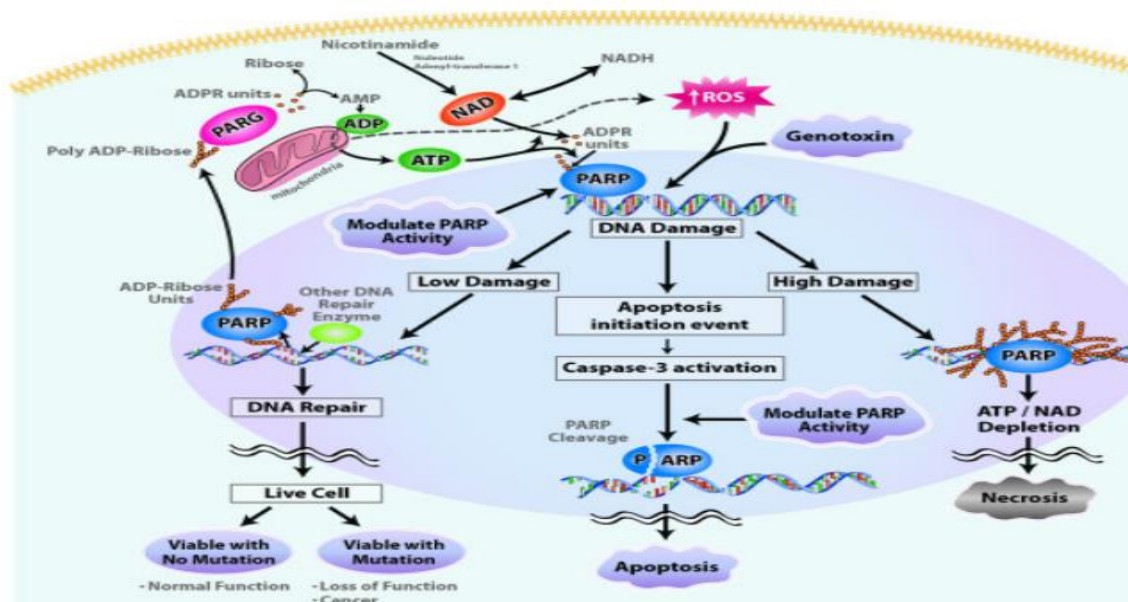
Υπό την δράση των ενεργών UCP, η μετακίνηση των ηλεκτρονίων σταματά στο σύμπλοκο III και αυτά επαναπροωθούνται στο συνένζυμο Q. Τα ηλεκτρόνια αυτά αποδίδονται στο O₂ κατά ένα την φορά, μετατρέποντάς το σε O₂⁻. Η υπερπαραγωγή υπεροξειδίου θα προκαλέσει την σύνθεση H₂O₂ που θα δώσει OH⁻ και που θα καταναλώσει γλουταθειόνη για να σχηματιστεί H₂O. Η υπερβολική αυτή συσσώρευση των ελευθέρων ριζών όταν υπερβαίνει την ικανότητα αποτοξίνωσης του κυττάρου, οδηγεί σε οξειδωτικό στρες, με αποτέλεσμα την οξείδωση πρωτεϊνών, την οξείδωση των λιπιδίων και τις θραύσεις στις έλικες τόσο του κυτταρικού όσο και του μιτοχονδριακού DNA. Όταν αυτές οι βλάβες είναι πέραν της ικανότητας των διορθωτικών μηχανισμών του κυττάρου, μπορούν αν προκαλέσουν απόπτωση, διακοπή του κυτταρικού κύκλου ή μονιμοποίηση βλαβών του DNA ικανών να αντιγραφούν στις επόμενες κυτταρικές γενιές [50].

1.8.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ ΣΕ PARP ΚΑΙ GAPDH

Υπό φυσιολογικές συνθήκες η πρωτεΐνη PARP (Poly (ADP-ribose) εντοπίζεται ανενεργή στον πυρήνα. Όταν προκύπτουν θραύσεις στην έλικα του DNA, όπως υπό την παρουσία ROS, η PARP ενεργοποιείται και προσδένοντας στο σημείο της βλάβης προσελκύει άλλα μόρια με σκοπό την αποκατάσταση [48]. Η ενεργή PARP, καταναλώνοντας ATP, διασπά το NAD⁺ στα δύο επί μέρους συστατικά του, το νικοτινικό οξύ και την ADP-ριβόζη και στην συνέχεια πολυμερίζει την ADP-ριβόζη. Η πολυ-ADP-ριβόζη (PAR) προσδένει στην GAPDH, η οποία μαινοβγαίνει στον πυρήνα, και την πολυ-ADP-ριβοσιλιώνει αδρανοποιώντας την [51].

Η υπέρ-ενεργοποίηση της PARP μπορεί να στερήσει τα κυτταρικά αποθέματα ATP διότι στην προσπάθειά του το κύτταρο να αντικαταστήσει τα NAD^+ , καταναλώνει ATP με αποτέλεσμα την μείωσή του και συνέπεια τον κυτταρικό θάνατο [52]. Εκτός αυτών, η παραγωγή PAR θα οδηγήσει στην απελευθέρωση AIF από τα μιτοχόνδρια επίσης με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο [53].

Όταν απενεργοποιηθεί η GAPDH, η 3-P-γλυκεριναλδεΐδη δεν μετατρέπεται σε 1,3-διφωσφογλουκερικό και κατά επέκταση δεν προχωράει η γλυκόλυση προς τον σχηματισμό πυρουβικού. Επί υπεργλυκαιμίας η είσοδος γλυκόζης εξακολουθεί να είναι αυξημένη, με αποτέλεσμα την εκτροπή της γλυκόλυσης προς παράπλευρα μεταβολικά μονοπάτια, ιδιαιτέρως βλαβερά για το κύτταρο. Τα μονοπάτια αυτά είναι το μονοπάτι των πολυολών, των εξοζαμινών, το μονοπάτι ενεργοποίησης του PKC και των προϊόντων τελικής μη ενζυματικής γλυκοζυλίωσης (Advanced Glycation End products, AGEs) [50] [48].



Εικόνα 11. Επίδραση υπεργλυκαιμίας στην παραγωγή ROS και την ενεργοποίηση της PARP.

Το μονοπάτι των πολυολών περιλαμβάνει δύο ενζυματικές αντιδράσεις. Την αναγωγή της γλυκόζης προς σορβιτόλη και την επακόλουθη οξείδωση της σορβιτόλης σε φρουκτόζη.

Υπό φυσιολογική συγκέντρωση γλυκόζης, μόνο το 3% μεταβολίζεται προς αυτή την οδό [57], ενώ όταν η συγκέντρωσή υπερβαίνει τα 20mM το 30% μεταβολίζεται από το εν λόγω μονοπάτι, καθότι η εξογενάση και η γλυκογενάση έχουν κορεστεί [56]. Η αντίδραση καταλύεται από την αλδόζη ρεντουκτάση (AR), που λόγω χαμηλής συγγένειας με την γλυκόζη ($K_m = 50-100 \text{ mM}$), ενεργοποιείται μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις της [58]. Η αλδόζη ρεντουκτάση (AR) καταλύει την αναγωγή της γλυκόζης σε σορβιτόλη από το NADPH, και στην συνέχεια η αφυδρογονάση της σορβιτόλης (SDH) καταλύει την οξείδωση της σορβιτόλης σε φρουκτόζη από το NAD^+ . Προϊόντα αυτών των αντιδράσεων είναι τα NADP^+ και τα NADH. Η φρουκτόζη, τέλος μεταβολίζεται σε 6-P-φρουκτόζη καταλυόμενη από την εξοκινάση με την κατανάλωση ATP προς ADP [59] [60].

Το 2001 ανακαλύφθηκε ότι στο σπείραμα υγείων ανθρώπων, δεν ανιχνεύεται AR ούτε SDH, σε αντίθεση με τον διαβήτη όπου εκφράζονται και τα δύο ένζυμα [61]. Τέλος, βάση των πειραματικών μελετών της ομάδας των Zopf και Steffen, πλέον γνωρίζουμε ότι η έκφραση της AR είναι υψηλότερη στις νεφρικές θηλές και μειώνεται όσο ανεβαίνουμε προς τον φλοιό, ενώ η έκφραση της SDH είναι υψηλότερη στον φλοιό και μειώνεται όσο πλησιάζουμε στις θηλές [62].

Συνοπτικά οι λόγοι που το συγκεκριμένο μεταβολικό μονοπάτι είναι τοξικό για το κύτταρο έγκειται στα εξής γεγονότα:

Η AR υπό φυσιολογικές συνθήκες μεταβολίζει τοξικές αλδεϋδες ($K_m = 10-30 \mu\text{M}$) σε αδρανείς αλκοόλες, αλλά επειδή καταναλώνεται από την αντίδραση προς σχηματισμό σορβιτόλης, οι τοξικές αλδεϋδες αθροίζονται στο κύτταρο [57].

Σε φυσιολογικές συνθήκες, το NADPH χρησιμοποιείται από την ρεντουκτάση της γλουταθειόνης για την μετατροπή του GSSG σε γλουταθειόνη (GSH). Επειδή στην υπεργλυκαιμία το NADPH καταναλώνεται από την AR, αυτό συνεπάγεται μείωση της παραγόμενης GSH [57]. Μελέτες έχουν δείξει ότι στους διαβητικούς ασθενείς, υπάρχει σημαντική μείωση στα επίπεδα των NADPH και κατά συνέπεια GSH [63].

Η κατανάλωση του NAD⁺ από την SDH για τον σχηματισμό της φρουκτόζης, επηρεάζει το μεταβολικό μονοπάτι των σιτρουλινών που ευθύνεται για την αποακετυλίωση των πρωτεϊνών [64].

Η κατανάλωση NADPH προς NADP⁺ από την AR και η παράλληλη κατανάλωση NAD⁺ προς NADH από την SDH, στους ιστούς όπου εκφράζεται η αφυδρογονάση της σορβιτόλης, μετατοπίζει την οξειδοαναγωγική κατάσταση των συνενζύμων πυριδίνης οδηγώντας στον μεταβολικό φαινότυπο της υποξίας ή αλλιώς ψευδοϋποξίας, με αποτέλεσμα αποκρίσεις παρόμοιες της υποξίας [56].

Οι νεφροί, ο αμφιβληστροειδής και τα κύτταρα Schwann έχουν χαμηλή έκφραση αφυδρογονάσης της σορβιτόλης και κατά συνέπεια αδυνατούν να μεταβολίσουν την σορβιτόλη προς φρουκτόζη με αποτέλεσμα την συσσώρευσή της [59]. Καθώς, η σορβιτόλη δεν μπορεί να διαπεράσει την κυτταροπλασματική μεμβράνη, προκαλεί την εισροή νερού στο κυτταρόπλασμα προκαλώντας έτσι οσμωτικό στρες [65]. Μελέτες έχουν δείξει ότι η άθροισή της στα κύτταρα οδηγεί σε ενζυματουρία και δυσλειτουργία των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων [66].

Τόσο η φρουκτόζη όσο και τα παράγωγα του μεταβολισμού της (3-φωσφορικής γλυκόζης) είναι δραστικότερα υποστρώματα για τον σχηματισμό AGEs.

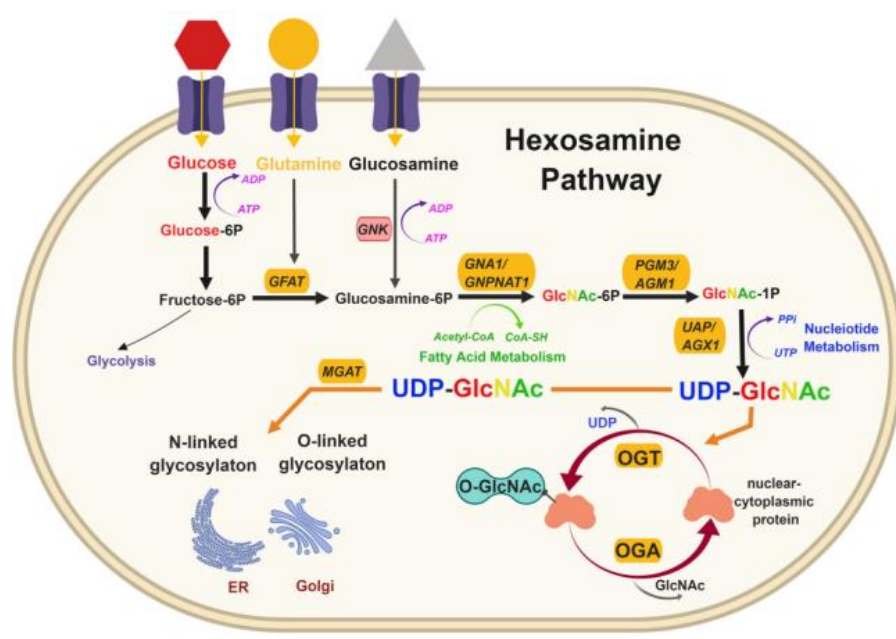
Το μονοπάτι των πολυολών, λόγω μετατροπών που προκαλεί σε πυριμιδίνες, προκαλεί την σύνθεση νιτρικού οξειδίου (NO) και ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών κινασών [42]. Για την ακρίβεια, η αύξηση των NADH προκαλεί την σύνθεση

δυσγλυκερόλης (DAG) από φωσφορική διυδροξυακετόνη (DHAP) με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του PKC [67].

Καθώς η γλυκόζη συνεχίζει να μεταβολίζεται από το μονοπάτι των πολυολών, προκαλείται μεγάλη αύξηση στην συγκέντρωση της φρουκτόζης. Ο επακόλουθος μεταβολισμός της από την εξοκινάση προκαλεί υπερπαραγωγή ακετυλο-συνένζυμου-Α και εξάντληση του ATP. Η εξοκινάση έχει πολύ χαμηλή συγγένεια με την φρουκτόζη και ως εκ τούτου την μεταβολίζει μόνο όταν η συγκέντρωση της φρουκτόζης είναι πολύ υψηλή [68]. Επιπλέον ο καταβολισμός της φρουκτόζης από την κετοεξοκινάση (KHK) παράγει 1-Ρ φρουκτόζη (Frc-1P) που μέσω της αλδολάσης θα διασπαστεί σε γλυκερυναλδεϋδη (GA) και DHAP. Η GA μέσω του TKFC μεταβολίζεται σε GA3P. Ο καταβολισμός λοιπόν της φρουκτόζης συμβάλει σημαντικά στην αύξηση της δεξαμενής DHAP και GA3P αλλά και οδηγεί σε μεγάλη μείωση του ATP [69]. Στον νεφρό, η KHK εκφράζεται στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο ενώ δεν εκφράζεται στο σπείραμα. Σε πειραματικό μοντέλο ποντικών KHK knockout (KHK^{-/-}) βρέθηκε σημαντική μείωση της απέκκρισης λευκοματινης στα ούρα σε σύγκριση με διαβητικά ποντίκια άγριου τύπου. Αυτό υποδεικνύει μειωμένη διαπερατότητα του σπειράματος στην πρωτεΐνη ή βελτιωμένη λειτουργία των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων με καλύτερη σωληναριακή επαναρρόφιση πρωτεϊνών. Τέλος στο ήπαρ ο μεταβολισμός της φρουκτόζης από την φρουκτοκινάση μεσολαβεί στην λιπώδη διήθησή του, μέσω διαδικασίας που οδηγείται από το οξειδωτικό στρες και την παραγωγή ουρικού οξέος. Ενώ οι περισσότερες από τις επιδράσεις του ηπατικού μεταβολισμού της φρουκτόζης αναμένεται να δράσουν εντός του ήπατος, ο μεταβολισμός της ηπατικής φρουκτόζης, επειδή αυξάνει τα επίπεδα του ουρικού οξέος και των λιπιδίων στον ορό, ευθύνεται για ορισμένες από τις νεφρικές βλάβες [70]. Όταν υπάρχει αυξημένη συγκέντρωση φρουκτόζης είτε εξωγενώς από την διατροφή, είτε ενδογενώς μέσω της σορβιτόλης, η συνεπαγόμενη

μείωση του ATP επάγει την παραγωγή ουρικού οξέος, τη φλεγμονή και την ίνωση στο νεφρό [69].

1.8.3.2 ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΕΞΟΖΑΜΙΝΩΝ



Εικόνα 14. Μεταβολικό μονοπάτι εξοζαμινών [203]

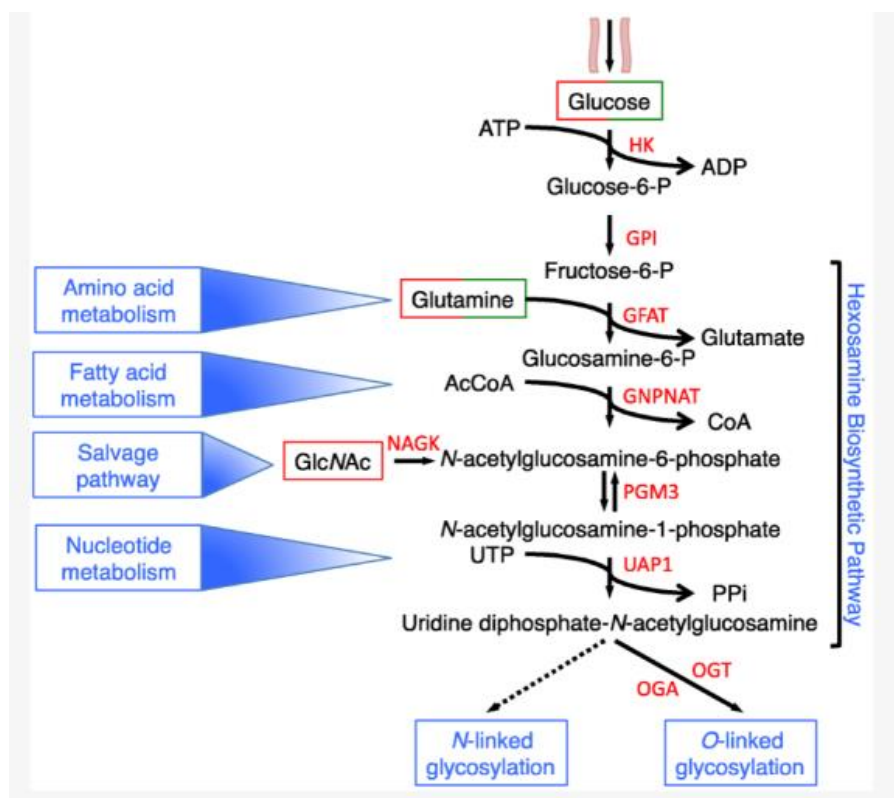
Κατά την γλυκόλυση, όπως προαναφέρθηκε, η γλυκόζη μεταβολίζεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη (Glc-6P) η οποία στην συνέχεια μεταβολίζεται σε 6-φωσφορική φρουκτόζη (Frc-6P). Φυσιολογικά λιγότερο από το 5% της γλυκόζης που εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα θα μεταβληθεί από το μονοπάτι της εξοζαμίνης, με τελικό προϊόν την UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνη (UDP-GlcNAc) [72].

Κύριος αισθητήρας του μεταβολικού αυτού μονοπατιού, είναι το ένζυμο αμινο-τρανσφεράση της γλουταμίνης 6-φωσφορικής γλυκόζης (Glutamine Fructose -6 phosphate aminotransferase - GFAT) που καταλύει την προσφορά μιας αμινομάδας από την γλουταμίνη στην 6-φωσφορική-φρουκτόζη (Frc-6P) προς σύνθεση 6-φωσφορικής γλυκοζαμίνης (GlcN-6P) και γλουταμινικού οξέος [73]. Εκ του παραλλήλου, εξωγενής γλυκοζαμίνη εισερχόμενη από τους μεταφορείς γλυκόζης, καταλύεται από την κινάση της γλυκοζαμίνης και με κατανάλωση ATP, δίνει επίσης

GlcN-6P, αυξάνοντας την ροή του μονοπατιού, παρακάμπτοντας το ένζυμο GFAT [74].

Στην συνέχεια το ακετυλοσυνένζυμο Α (Acetyl-CoA) μέσω του ενζύμου GNAT δίνει την ακετυλομάδα του και προκύπτουν συνένζυμο Α (CoA) και GlcNAc-6P. Παράλληλα η Ν-ακετυλογλυκοζαμίνη (GlcNAc) καταλυόμενη από την Ν-ακετυλογλυκοζαμίνη κινάση, με κατανάλωση ATP, δίνει επίσης GlcNAc-6P. Η τελευταία μέσω της Ν-ακετυλογλυκοζαμίνης φωσφογλουκομουτάσης (AGM) μεταβολίζεται σε GlcNAc-1P που τέλος μέσω της Ν-ακετυλογλυκοζαμίνης-1-φωσφατιδο-φωσφορύλασης (AGX) μετατρέπεται σε UDP-GlcNAc [73].

Το UDP-GlcNAc μέσω της Ο-ακετυλογλυκοζαμινο-τρανφεράσης (O-GlcNAc transferase - OGT) μεταφέρει ένα μόριο Ν-ακετυλογλυκοζαμίνης σε υποστρώματα, για την παραγωγή γλυκοσαμινογλυκανών, πρωτεογλυκανών και γλυκολιπιδίων. Κατά την αντίστροφη αντίδραση, το ένζυμο OGA (O-GlcNAcase) απομακρύνει την GlcNAc-ομάδα από τα τροποποιημένα μακρομόρια [75].



Εικόνα 15: Μονοπάτι εξοζαμινών.

Εκτός από την γλυκόζη, το μονοπάτι τροφοδοτείται από τον μεταβολισμό αμινοξέων, λιπαρών οξέων και νουκλεοτιδίων [71].

Έχει βρεθεί ότι περισσότερες από 4000 πρωτεΐνες γλυκοζυλιώνονται μέσω του GlcNAc [76] αλλά αυτός ο τύπος γλυκοζυλίωσης διαφέρει, καθώς συμβαίνει στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα και όχι στο ενδοπλασματικό δίκτυο ή στο σύστημα Golgi. Συντονίζεται μόνο από τα δύο ένζυμα OGT και OGA τα οποία δρουν ως αισθητήρες μεταβολικών σημάτων και θρεπτικών συστατικών κυρίως πρωτεϊνών, λιπιδίων και νουκλεϊκών οξέων. Τα προϊόντα αυτής της μετα-μεταφραστικής γλυκοζυλίωσης τροποποιούν ποικίλες κυτταρικές διεργασίες, με συνέπεια η διαταραγμένη λειτουργία τους να εμπλέκεται σε αρκετά σημαντικά νοσήματα, όπως ο διαβήτης, ο καρκίνος και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Επιπλέον, καθώς υπάρχει μόνο ένα γονίδιο (στο X χρωμόσωμα) που κωδικοποιεί αυτά τα ένζυμα, τόσο

στον άνθρωπο όσο και στα υπόλοιπα θηλαστικά, η απουσία τους είναι εμβρυονικά θνησιγόνα [77].

Πρωτεΐνες συνδεδεμένες με GlcNAc κατατάσσονται στους μεταγραφικούς παράγοντες, πρωτεΐνες των πυρηνικών πόρων, πρωτεΐνες συνδεδεμένες με RNA, πολυμεράσες, ένζυμα, κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες και πρωτεΐνες του θερμικού σοκ. Έτσι με την γλυκοζυλίωση και την απογλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών με το σάκχαρο GlcNAc, επηρεάζεται η αντιγραφή του DNA, η αποδόμηση πρωτεϊνών, η απόπτωση, η καρκινογένεση, η αντιμετώπιση καταστάσεων stress, η γλυκονεογένεση, η σηματοδότηση ασβεστίου, η σηματοδότηση ινσουλίνης η μιτοχονδριακή ομοιόσταση, η συνεχής καταγραφή των ενεργειακών αναγκών του κυττάρου και η διατήρηση του σακχάρου του αίματος.

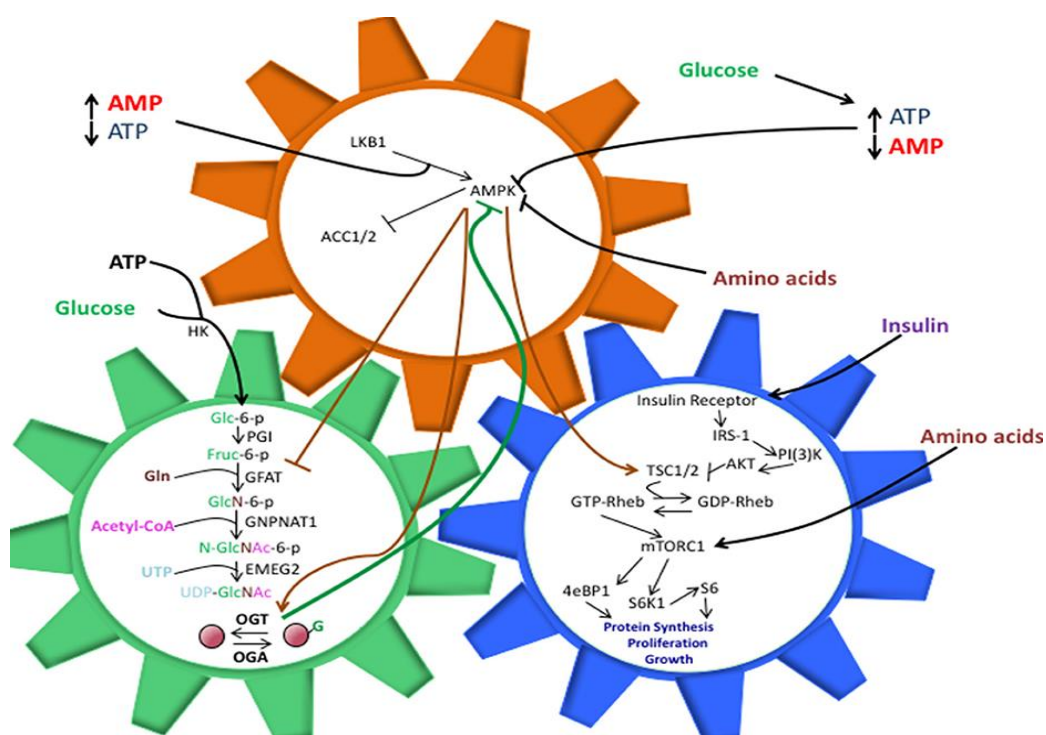
Πολυάριθμες μορφές κυτταρικής βλάβης οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα O-GlcNAc τόσο σε *in vivo* όσο και σε *in vitro* μοντέλα. Η αύξηση της συγκέντρωσης των O-GlcNAc πριν ή αμέσως μετά την βλάβη, δρα προστατευτικά σε μοντέλα θερμικού ή οξειδωτικού στρες, στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (ER), υποξίας, τραυματισμού, βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης και αιμορραγίας τραύματος [78].

Αυτό συμβαίνει λόγω της αλληλεπίδρασης του UDP-GlcNAc με το μονοπάτι AMPK και εμμέσως με το mTORC. Το μονοπάτι του AMPK φωσφορυλιώνει τους αναστολείς του mTORC1, TSC1/2, διατηρώντας ανενεργό το mTORC1. Υπό συνθήκες αυξημένων αμινοξέων, γλυκόζης ή UDP-GlcNAc, το AMPK αναστέλλεται με συνέπεια την συνεχή δραστηριότητα του mTORC1, οδηγώντας σε παθολογικές καταστάσεις όπως ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός κ.α. [79]. Αντιστρόφως, το AMPK φωσφορυλιώνει το GFAT και το απενεργοποιεί ώστε να μειωθεί η δεξαμενή των UDP-GlcNAc [80].

Επιπροσθέτως το μονοπάτι των εξοζαμινών αλληλοεπιδρά με την απόκριση στο μονοπάτι των μη ορθώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, (Unfolded Protein Response,

UPR). Η χαμηλή συγκέντρωση θρεπτικών στοιχείων, για παράδειγμα η απουσία γλυκόζης, μειώνει την δράση του μονοπατιού και οδηγεί στο στρες του ενδοπλασματικού δικτυού επαγόμενου από τις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, λόγω χαμηλής N-γλυκοζυλίωσης [81]. Σε απάντηση της μείωσης λοιπόν των N-γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνών, το ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) ενεργοποιεί τον μεταφραστικό παράγοντα ATF4 με συνέπεια την αύξηση της ρύθμισης του GFAT και την αύξηση της ροής του μονοπατιού των εξοζαμινών. Επιπροσθέτως, λόγω ενεργοποίησης του UPR προκαλείται η υπερέκφραση του XBP1 (X-box binding protein -1) που ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και τα προστατεύει από το οξειδωτικό στρες μέσω του HDC3 [82].

Η μείωση του OGT ή της γλυκοζυλίωσης μέσω O-GlcNAc επάγει το UPR, συνεπώς ενεργοποιείται η PERK που αυξάνει την φωσφορυλίωση του eIF2α και οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση [83].

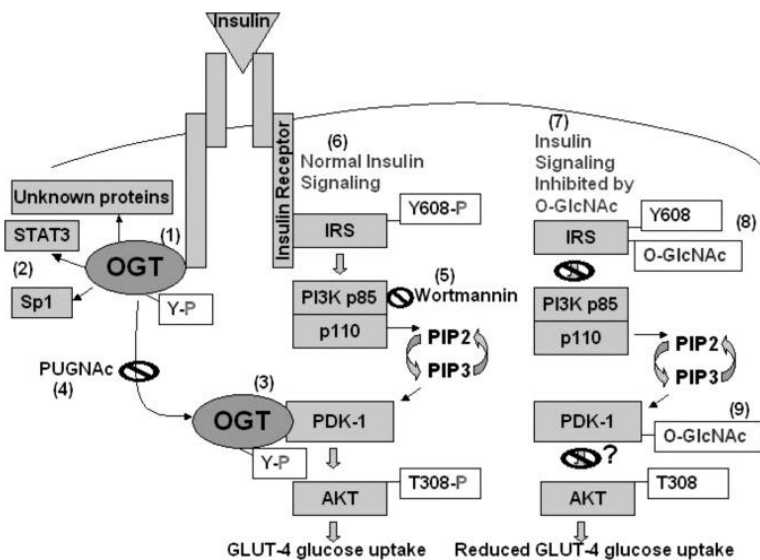


Εικόνα 16: Το μονοπάτι των εξοζαμινών αλληλεπιδρά με τα μονοπάτια AMPK και mTORC1 [79]

Κατά την υπεργλυκαιμία το CaMKII υπόκειται σε O-GlcNAc τροποποίηση και ενεργοποιείται ακόμα και όταν τα επίπεδα ασβεστίου είναι χαμηλά [84].

Το OGT είναι γνωστό ότι εμπλέκεται σε μεταβολικά μονοπάτια επαγόμενα από την ινσουλίνη. Ο υποδοχέας της ινσουλίνης φωσφορυλιώνει το OGT, που με την σειρά του προσδένει στο PIP3. Η υψηλή συγκέντρωση O-GlcNAc στον IRS μειώνει την αλληλεπίδραση του IRS-1 με το PI3K με συνέπεια την αναστολή του PI3K [85]. Επιπλέον, επειδή η ενεργοποίηση του mTOR αυξάνει τα επίπεδα του OGT και κατά επέκταση των O-GlcNAc τροποποιημένων πρωτεϊνών, η φαρμακευτική αναστολή του έχει δείξει να μειώνει την παρουσία αυτών των πρωτεϊνών [86] [87].

Η αύξηση της δραστηριότητας του OGT από την ινσουλίνη, αυξάνει την τροποποίηση από O-GlcNAc, και δύναται ότι η υπερινσουλιναιμία σε συνδυασμό με την υπεργλυκαιμία να ενεργοποιεί συνεργατικά το OGT, οδηγώντας σε ασυνήθιστα αυξημένα επίπεδα O-GlcNAc και ινσουλινοαντίσταση. Σύμφωνα με το μοντέλο των Whelan, Stephen A. et al, τα IRS-1, IRS-2 και PDK1 είναι όλα υποστρώματα OGT και σε συνδυασμό με την αύξηση της O-GlcNAc αναστέλλει την φωσφορυλίωση της IRS-1 στο PI3K, οδηγώντας σε αδρανοποίηση του AKT και μειωμένη πρόσληψη γλυκόζης μέσω των GLUT-4. Επιπλέον, η διέγερση της ινσουλίνης από το OGT και/ή η αναστολή του O-GlcNAcase μπορεί επίσης να ρυθμίζει τη ρύθμιση της δραστηριότητας του AKT κατά την αυξημένη μετατροπή του O-GlcNAc σε PDK1 [85].



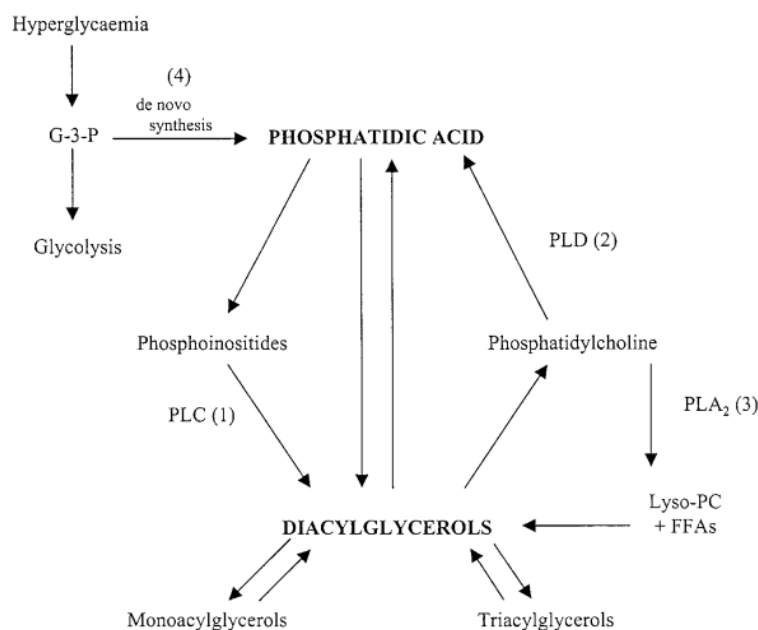
Εικόνα 17: επίδραση OGT στην σηματοδότηση της AKT [85]

Η ομάδα των Kolm-Litty απέδειξε η ενεργοποίηση του μονοπατιού των εξοζαμινών είτε από την υπεργλυκαιμία είτε από την αύξηση της γλυκοζαμίνης, οδηγεί σε υπερέκφραση του μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα TGF- β καθώς και ότι η υπερέκφραση του GFAT είναι αυτή που σε οδηγεί αύξηση των επιπέδων του mRNA τόσο για τον TGF- β όσο και των υποδοχέων του, TGF- β type I και type II. Συνέπεια αυτού, είναι η αύξηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας που τελικά οδηγεί σε νεφρική βλάβη και αναστολή του πολλαπλασιασμού των μεσαγγειακών κυττάρων [88].

Το GFAT λόγω χαμηλής συγγένειας με την Frc-6P ενεργοποιείται όταν η ποσότητα του υποστρώματός του είναι υψηλή. Επιπλέον, το GFAT ρυθμίζεται από την ήδη υπάρχουσα συγκέντρωσή του στο κυτταρόπλασμα, αυξάνεται από την φωσφορυλίωση από το cAMP και αναστέλλεται αναδραστικά από το τελικό προϊόν του μονοπατιού, που είναι το UDP-GlcNAc [73]. Ο βαθμός έκφρασης του GFAT είναι ιστοειδικός. Με την μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας και του in-situ υβριδισμού έχει βρεθεί ότι το GFAT εκφράζεται περισσότερο στους σκελετικούς μύες, τον λιπώδη ιστό, και τα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων. Λιγότερη έκφραση υπάρχει στο

επιθήλιο των νεφρικών σωληναρίων και δεν ανιχνεύεται έκφραση στα πειραματικά. Από την κατανομή του στους ιστούς και τον βαθμό έκφρασής του, φαίνεται ξεκάθαρα η σύνδεση του μονοπατιού των εξοζαμινών με την ινσουλινοαντίσταση [73]. Βεβαίως όλα τα παραπάνω παρατηρούνται σε συνθήκες ευγλυκαιμίας. Αντιθέτως σε συνθήκες υπεργλυκαιμίας, παρατηρείται ιδιαίτερα υψηλή έκφραση του GFAT στα πειραματικά κύτταρα ασθενών με διαβητική νεφροπάθεια. [73]. Το 2009 η ομάδα των Degrell ανίχνευσε αυξημένη συγκέντρωση O-GlcNAc τροποποιημένων πρωτεϊνών τόσο στο σπείραμα όσο και στα επιθηλιακά κύτταρα των σωληναρίων σε βιοψίες διαβητικών νεφροπαθών. Συγκεκριμένα στο σπείραμα η μεγαλύτερη συγκέντρωση εντοπίστηκε στον πυρήνα, αιτιολογώντας την υπερτροφία του σπειράματος που παρατηρείται τους διαβητικούς νεφροπαθείς [89].

1.8.3.3 ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΔΙΑΚΥΛΟΓΛΥΚΕΡΟΛΩΝ – ΡΚΚ



Εικόνα 18 : μονοπάτι των διακυλογλυκερολών [90]

Κατά την γλυκοζυλίωση, η 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη (Frc-1,6-bis-P) διασπάται σε GA3P και DHAP. Η DHAP στην συνέχεια μέσω μιας σειράς αντιδράσεων και με την συμβολή του ακετυλοσυνένζυμου A, οδηγεί σε de novo σύνθεση δυακυλογλυκερόλης (DAG). Άλλες πηγές παραγωγής DAG είναι η απελευθέρωση μη εστεροποιημένων ελευθέρων λιπαρών οξέων από πρόδρομα λιπίδια μέσω της φωσφολιπάσης A₂ (PLA₂), η υδρόλυση της φωσφατιδυλοχολίνης από την φωσφολιπάση D (PLD) και η υδρόλυση φωσφολιπιδίων της ινοσιτόλης από την φωσφολιπάση C (PLC) [90].

Κατά την τελευταία περίπτωση, στην εσωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, η PLC διασπά την 4,5 διφωσφορική φωσφατιδο-ινοσιτόλη (PIP₂) σε 1,4,5-τριφωσφορική-ινοσιτόλη (IP₃) και DAG. Η DAG παραμένει στην μεμβράνη και η IP₃ μετακινείται στο ενδοπλασματικό δίκτυο όπου προσδένει στα κανάλια Ca²⁺, προκαλεί την απελευθέρωση ιόντων Ca²⁺ από τις

«αποθήκες» του ΕΔ με συνέπεια την απότομη αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Ca^{2+} . Το Ca^{2+} που απελευθερώνεται, συνδέεται στην πρωτεϊνική κινάση C (PKC) η οποία μεταναστεύει προς την κυτταροπλασματική μεμβράνη και ενεργοποιείται από την DAG. Η μεγάλη έξοδος Ca^{2+} από το ενδοπλασματικό δίκτυο οδηγεί στο στρες του ΕΔ και την ενεργοποίηση του UPR [90] [91].

Η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) είναι κινάση σερίνης/θρεονίνης και έχουν περιγραφεί 12 ισομορφές που είναι χωρισμένες σε τρεις ομάδες. Η ομάδα Α ή τυπικές, αποτελείται από τις ισομορφές α , βI , βII και γ και για την ενεργοποίησή τους είναι απαραίτητη η παρουσία DAG, ασβεστίου και φωσφατιδυλοσερίνης. Η ομάδα Β ή καινούριες, αποτελείται από τις ισομορφές δ , ϵ , η , θ , μ που ενεργοποιούνται παρουσία DAG και φωσφατιδυλοσερίνης. Τέλος, η ομάδα C ή άτυπες αποτελείται από τις ισομορφές ζ και ι/λ που ενεργοποιούνται παρουσία μόνο φωσφατιδυλοσερίνης [90]. Οι διαφορετικές ισομορφές PKC ανταποκρίνονται διαφορετικά σε συνθήκες υπεργλυκαιμίας, καθώς διαφορετικής προέλευσης DAG επιλεκτικά ενεργοποιούν μία ή περισσότερες ισομορφές σε διαφορετικούς ιστούς. Για παράδειγμα η επαγόμενη από την υπεργλυκαιμία DAG ενεργοποιεί τις ισομορφές βI και βII στους νεφρούς και τον αμφιβληστροειδή [92].

Κατά την υπεργλυκαιμία, λόγω απενεργοποίησης της GAPDH και εκτροπής της γλυκόλυσης, η de novo σύνθεση DAG αυξάνεται πολύ στο κυτταρόπλασμα με συνέπεια την υπερ-ενεργοποίηση της PKC [93]

Η ενεργή PKC οδηγεί σε αναστολή έκφρασης mRNA για την ενδοθηλιακή συνθάση του NO, αυξημένη δραστηριότητα της ενδοκυττάριας MAP-κινάσης με συνέπεια την αύξηση της ενδοθηλίνης-1 (αύξηση αγγειοσύσπασης), αύξηση έκφρασης VEGF (αύξηση αγγειακής διαπερατότητας), αύξηση TGF- β (πάχυνση βασικής μεμβράνης τριχοειδών), και αύξηση ενεργοποιητή του αναστολέα ινωδόλυσης PAI-1, του NF- κB και οξειδάσης NAD(P)H. Τα αποτελέσματα των

ανωτέρω είναι να επηρεάζεται η ρύθμιση της ενδοθηλιακής διαπερατότητας, η αγγειοσύσπαση, η αγγειογένεση, η ενεργοποίηση των κυτταροκινών, η προσκόλληση των λευκοκυττάρων και η σύνθεση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, οδηγώντας σε αγγειακές επιπλοκές του διαβήτη στον αμφιβληστροειδή, στην αορτή, στην καρδιά και στο νεφρικό σπείραμα.

Τα βασικά χαρακτηριστικά της διαβητικής νεφροπάθειας είναι ο αυξημένος ρυθμός σπειραματικής διήθησης, η προοδευτική αύξηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας στο σπειραματικό μεσάγγειο και η προοδευτική έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας. Όλα μαζί προκαλούνται από την ενεργοποίηση του PKC, που όπως προαναφέρθηκε, ενεργοποιεί παράγοντες αιμοδυναμικούς, μεταβολικούς και φλεγμονώδεις [94]. Παρατηρείται υπερτροφία του νεφρικού σωματίου και επέρχεται ρήξη των τριχοειδών του αγγειώδους σπειράματος και τέλος νεφροσκλήρυνση [95].

Ο αυξημένος ρυθμός σπειραματικής διήθησης (GFR) οφείλεται στην μείωση της αντίστασης των αρτηριολίων, με αποτέλεσμα την αύξηση της πίεσης της σπειραματικής διήθησης. Αιτία είναι η αυξημένη παραγωγή αγγειοτενσίνης II και προσταγλανδινών που προκαλούν αγγειοδιαστολή. Η αυξημένη παραγωγή προσταγλανδινών E2 προκαλείται από την ενεργοποίηση του PKC και της κυτταροπλασματικής φωσφολιπάσης A2 που είναι βασικός ρυθμιστής της σύνθεσης αραχιδονικού οξέος [96] [97]. Η σπειραματική διήθηση αυξάνεται και από την δράση του νιτρικού οξέος (NO). Η απέκκριση των μεταβολιτών του NO, NO² και NO³ είναι αυξημένη στον διαβήτη, λόγω υπερέκφρασης του γονιδίου της NO-συνθάσης, με συνέπεια την αύξηση του NO στα μεσαγγειακά κύτταρα [98]. Την ίδια στιγμή στο σπείραμα, το NO και η μονοφωσφορική κυκλική αδενοσίνη (cAMP) έχουν μειωμένα επίπεδα [99]. Τα γεγονότα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι, η επαγόμενη από την υπεργλυκαιμία, ενεργοποίηση του PKC, ρυθμίζει την αιμοδυναμική ικανότητα του νεφρού, αυξάνοντας ή μειώνοντας την παραγωγή NO, με διαφορετικό τρόπο στους

διαφορετικούς τύπους νεφρικών κυττάρων. Επιπλέον, στα πειραματικά κύτταρα παράγοντας της αύξησης του GFR είναι η αυξημένη έκφραση του VEGF (vascular endothelial growth factor) [93]. Ο VEGF παράγεται από τα ποδοκύτταρα και τα μεσαγγειακά κύτταρα και προκαλεί υπερτροφία του νεφρικού σωματίου και αύξηση της διαπερατότητας των τριχοειδών του αγγειώδους σπειράματος, συνδράμοντας στην ανώμαλη νεφρική αιμοδυναμική [100].

Στην υπεργλυκαιμία, η αύξηση της εξοκυττάριας θεμέλιας ουσίας στο πειραματικό μεσάγγειο και η πάχυνση της βασικής πειραματικής μεμβράνης, συνοδεύονται από τα αυξημένα επίπεδα κολλαγόνου IV και φιμπρονεκτίνης, λόγω ενεργοποίησης του PKC. Η ενεργοποίηση του PKC ρυθμίζει πολλές ισομορφές της NADPH-οξειδάσης με αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή οξειδωτικών παραγόντων. Η παρουσία των οξειδωτικών παραγόντων, σε συνδυασμό με την επαγόμενη από την PKC ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK, επάγει την υπερέκφραση αυξητικών παραγόντων ίνωσης [93]. Σημαντικό ρόλο σε αυτό διαδραματίζει ο TGF-β1 που διεγείρει την παραγωγή πρωτεογλυκανών, ινωδονεκτίνης και λαμινίνης και πλέον είναι γνωστό ότι τόσο η υπεργλυκαιμία όσο και τα AGEs αυξάνουν την παραγωγή του μεταγραφικού παράγοντα [100].

Μια ακόμα καλά χαρακτηρισμένη βλάβη, είναι η αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας. Η ενεργοποιημένη PKC, φωσφορυλιώνοντας τις κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες των εξωτερικών κυτταρικών συνδέσμων, αυξάνει την διαπερατότητα των φραγμών που σχηματίζονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, στην αλβουμίνη και άλλα μακρομορία. Το αποτέλεσμα είναι η πρωτεϊνουρία [93].

1.8.3.4 AGEs- ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΜΗ ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗΣ ΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΣΗΣ

Ένας ακόμα βλαπτικός μηχανισμός της υπεργλυκαιμίας είναι ο σχηματισμός προϊόντων μη ενζυματικής γλυκοζυλίωσης (AGEs), που καθώς είναι μια αυθόρμητη αντίδραση, εξαρτάται από τον βαθμό και την διάρκεια της υπεργλυκαιμίας.

Μόρια γλυκόζης ή λιπιδίων που έχουν αναχθεί, αντιδρούν μη ενζυματικά με αμινομάδες πρωτεϊνών, φωσφολιπιδίων ή νουκλεϊκών οξέων, σε διάστημα λίγων ωρών, σχηματίζοντας βάσεις Schiff. Οι βάσεις Schiff είναι αναστρέψιμα, ασταθή μόρια που σε διάστημα ημερών υπόκεινται σε μοριακές ανακατατάξεις δημιουργώντας τα επίσης αναστρέψιμα πρόδρομα προϊόντα Amadori. Στο τέλος, τα πρόδρομα αυτά προϊόντα, με σταδιακή μοριακή επαναδιευθέτηση, αφυδάτωση, συμπύκνωση και οξειδωση συνθέτουν τα τελικά προϊόντα υψηλής μη ενζυματικής γλυκοζυλίωσης AGEs. Το σύνολο αυτών των αντιδράσεων ονομάζεται αντίδραση Maillard. Η ολοκλήρωση των AGEs είναι μια διαδικασία που μπορεί να διαρκέσει έως και χρόνια και καθώς τα προϊόντα αυτά είναι θερμοδυναμικώς σταθερά, είναι και μη αναστρέψιμα [101].

Η ενδογενής παραγωγή των AGEs ενισχύεται από την παρουσία μετάλλων αλλά αναστέλλεται από την παρουσία ασκορβικού οξέος. Ο ρυθμός παραγωγής τους σχετίζεται με την βαρύτητα της κλινικής εικόνας του διαβήτη στην αμφιβληστροειδοπάθεια, στον καταρράκτη, την νευροπάθεια και την νεφροπάθεια. Εκτός από την ενδογενή παραγωγή AGEs, στην κυτταρική δεξαμενή προστίθενται και τα εξωγενή, που προέρχονται από την διατροφή (μαγείρεμα σε υψηλές θερμοκρασίες) και το κάπνισμα [102]. Από το 10% των διατροφικών AGEs που απορροφούνται από το έντερο, το 1/3 αποβάλλεται από τα ούρα εντός 48 ωρών. Ο νεφρός είναι το κυρίως υπεύθυνο όργανο για την απομάκρυνση των AGEs, όπου τα

φιλτραρισμένα AGEs καταβολίζονται μερικώς στα εγγύς σωληνάρια, ενώ τα υπόλοιπα απεκκρίνονται στα ούρα [103]. Εκτός από τους νεφρικούς ιστούς, το ήπαρ είναι επίσης ένα σημείο μεταβολισμού και αποικοδόμησης των AGEs, όπου εκτός από τον κεντρικό ρόλο του στην αποικοδόμηση τους. Έχει τη δυνατότητα να παράγει χαμηλά επίπεδα φλεγμονωδών μορίων, προκαλώντας οξειδωτικό στρες και στην περίπτωση των AGEs, θεωρείται ότι συμβάλλει σε φλεγμονώδεις διεργασίες μέσω της ενεργοποίησης του RAGE, μετά από αλληλεπίδραση με τους προσδέτες του τους νεφρούς [103].

Καθώς τα AGEs είναι μη αναστρέψιμα, οι πρωτεΐνες που βλάπτονται περισσότερο είναι αυτές με μεγάλη διάρκεια ζωής, για αυτό και οι πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας είναι πολύ επιρρεπείς, καθώς ο χρόνος ημίσειας ζωής τους είναι οι 100 ημέρες [104].

Ο βλαπτικός τους ρόλος έγκειται στο ότι σχηματίζουν ισχυρούς ενδοπρωτεϊνικούς ή διαπρωτεϊνικούς ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ πρωτεϊνών, ίδιων ή διαφορετικών, και έτσι επηρεάζουν τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Οι μη ενζυματικώς γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες AGEs, σχηματίζονται όταν μια πρωτεΐνη αντιδρά με μία α-οξοαλδεΐδη όπως η γλυοξάλη (προϊόν αυτοοξειδωσης της γλυκόζης), η μεθυλγλυοξάλη (προϊόν αποφωσφορυλίωσης φωσφορικών τριοζών) ή η 3-δεοξυγλυκοσόνη (3-DG). Οι αρχικές βάσεις Schiff, που σχηματίζονται από κατάλοιπα γλυκόζης, λυσίνης και N-τελικού-αμινοξέος και αφού αναδιαταχθούν, σχηματίζουν φρουκτοζαμίνη. Τόσο η αποικοδόμηση της φρουκτοζαμίνης, όσο και η άμεση αντίδραση της α-οξοαλδεΐδης με πρωτεΐνες, μπορεί να σχηματίσει πολλά AGEs [105].

Τα AGEs μπορεί να οδηγήσουν σε διασταυρούμενη σύνδεση δομικών και βασικών μεμβρανών, τροποποιώντας έτσι βασικές κυτταρικές δομές που επηρεάζουν τη διαπερατότητα και την κυτταρική κινητικότητα. Εκτός από την αλληλεπίδρασή

τους με πρωτεΐνες, τα AGEs προσδένουν και σε υποδοχείς. Οι υποδοχείς MSR1 (macrophage scavenger receptor-1), AGE-R1, AGE-R2, και AGE-R3 είναι υπεύθυνοι για την κάθαρση από τον ορό και την αποικοδόμησή τους. Η σύνδεση ωστόσο με τον υποδοχέα RAGE, οδηγεί σε αθηρογένεση, φλεγμονή και ανοσολογικές αποκρίσεις, μέσω ενεργοποίησης του NF-κB. Αυτό συνεπάγεται στην υπερέκφραση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-6, IL-1α και TNF-α αλλά και την περαιτέρω επαγωγή του οξειδωτικού στρες, μέσω επαγωγής της φλεγμονής, αγγειοσύσπασης και πήξης [103].

Επιπλέον, τα AGEs μπορούν να επάγουν σήματα, μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τον υποδοχέα τους RAGE. Ο RAGE εντοπίζεται στα μυϊκά κύτταρα, τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα ενδοθηλιακά, τα ποδοκύτταρα, τα αστροκύτταρα και τα μικρονευρογλοιακά κύτταρα. Μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης, τα AGEs αυξάνουν την παραγωγή μιας σειράς φλεγμονωδών μορίων και μορίων που προκαλούν βλάβη των ιστών, η οποία συμβάλλει στην ανάπτυξη της επιταχυνόμενης αθηροσκλήρωσης και των μικροαγγειακών επιπλοκών στον διαβήτη όπως η νεφροπάθεια. Η αλληλεπίδραση AGE-RAGE επιπλέον ρυθμίζει την έκφραση των μορίων πρόσφυσης, επηρεάζει την παραγωγή κολλαγόνου, τον πολλαπλασιασμό και την έκφραση μορίων τροποποίησης, τη χημειοταξία, την έκφραση προφλεγμονωδών/προθρομβωτικών μορίων, διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και την παραγωγή ιντερλευκίνης-2 (IL-2), ενεργοποιεί την οξειδάση NADPH και επάγει την παραγωγή ROS. Επιπλέον προάγουν το οξειδωτικό στρες μέσω ενεργοποίησης της NADPH-οξειδάσης και των μιτοχονδριακών μονοπατιών αλλά ενεργοποιεί και τον πυρηνικό παράγοντα NF-κB [105] [106].

Ο NF-κB, ως κείριος μεταγραφικός παράγοντας επάγει ποικιλία φλεγμονωδών και προ-ή αντί-αποπτωτικών σημάτων στο κύτταρο, ανάλογα με την πορεία, την τοποθεσία και τη διάρκεια του ερεθίσματος. Επακόλουθο της επαγόμενης από τον

RAGE ενεργοποίησης του NF-κB, είναι η αύξηση της ρύθμισης του ίδιου του RAGE. Ένας μοριακός μηχανισμός στον οποίο βασίζεται μια τέτοια επίδραση έχει διευκρινιστεί από την παρατήρηση ότι η κωδικοποίηση γονιδίων RAGE περιέχει λειτουργικά σημεία πρόσδεσης για NF-κB [107].

Στον διαβήτη, στα μακροφάγα, τα AGEs κατόπιν σύνδεσης με τον RAGE, ενεργοποιούν τον μηχανισμό της φλεγμονής, με συνέπεια την συγκέντρωση λιποπρωτεϊνών και την δημιουργία αθηρωματικής πλάκας.

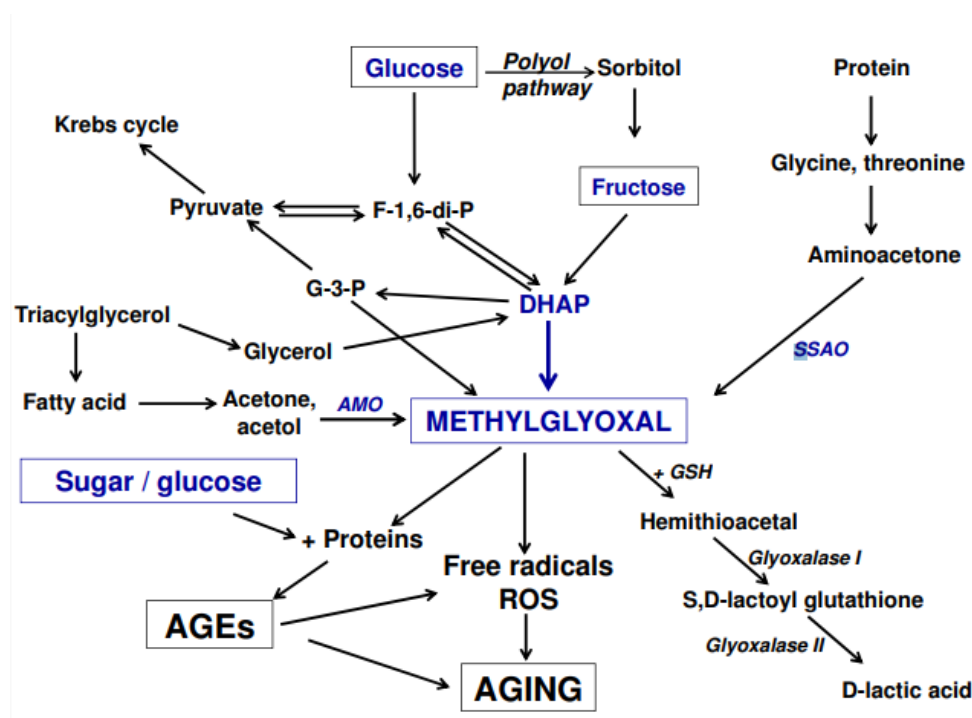
Συνοψίζοντας, τα AGEs, σε κυτταρικό επίπεδο, λόγω υπεροξειδωσής των λιπιδίων και δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου, προκαλούν πτώση των επιπέδων NO, αύξηση της ενδοθηλίνης 1 και του αγγειακού τόνου, υπερέκφραση του αγγειακού μορίου προσκόλλησης VCAM-1, αύξηση των κυτταροκινών IL-1, TGF-β και IGF-1A, αύξηση του πολλαπλασιασμού και διέγερση των T-λεμφοκυττάρων προς παραγωγή ιντερφερόνης-γ.

Η νεφρική δυσλειτουργία οδηγεί σε μειωμένη κάθαρση των AGEs και συσώρευσή τους στους ιστούς, ενώ τα επίπεδά τους στο πλάσμα αυξάνεται σταδιακά. Ο συνδυασμός διαβήτη και νεφρικής δυσλειτουργίας οδηγεί σε ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα, με αποτέλεσμα τα AGEs να αθροίζονται στις αρτηρίες και τον ορό και με τον ρυθμό αύξησής τους να είναι σε συνάρτηση με τη βαρύτητα της νεφρικής βλάβης. Έχει αποδειχθεί ότι οι AGEs στους νεφρούς προέρχονται είτε από την κυκλοφορία, είτε παράγονται από γλυκοζυλίωση νεφρικών πρωτεϊνών ή οφείλονται σε εξασθενημένους μηχανισμούς απομάκρυνσής τους [103].

Η επαγόμενη από τα AGEs βλάβη των νεφρών προέρχεται από την σηματοδότηση λόγω AGE-RAGE που ενεργοποιεί την PKC, το μονοπάτι των MAP κινασών και τον NF-κB, την ενεργοποίηση του TGF-β, την ενεργοποίηση του μονοπατιού RAGE-ERK/p38- MAPK-Smad3'. Τέλος τροποποιεί την δομή του νεφρικού ιστού μέσω διασταυρωμένων αντιδράσεων με το κολλαγόνο [103].

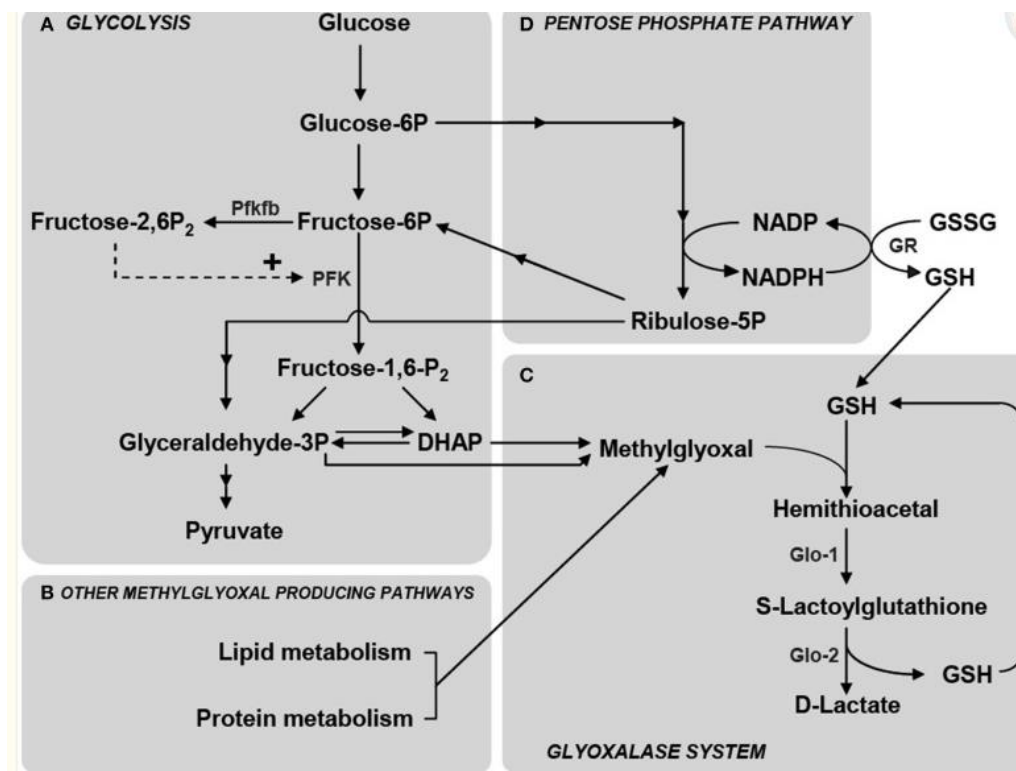
Η χρόνια νεφρική νόσος και τα AGEs περιπλέκονται μεταξύ τους. Αυξημένα AGEs συμβάλλουν στη μείωση της νεφρικής λειτουργίας και της σπειραματικής διήθησης [108]. Δυστυχώς, η αιμοκάθαρση δεν τα απομακρύνει σε ικανοποιητικό βαθμό. Μάλιστα στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς, η AGE-τροποποιημένη β2 σφαιρίνη είναι το βασικό παθογενωμικό εύρημα της επαγόμενης από την αιμοκάθαρση, αμυλοείδωσης. Σε αυτούς τους ασθενείς, η συγκέντρωσή των AGEs επιστρέφει στα φυσιολογικά επίπεδα μόνο κατόπιν μεταμόσχευσης νεφρού [102].

1.8.3.4.1 ΜΕΘΥΛΟΓΛΥΟΞΑΛΗ



Εικόνα 19: Μεταβολικό μονοπάτι μεθυλογλυοξάλης [109]

Στην συνέχεια της πορείας καταβολισμού της γλυκόζης, είδαμε ότι η Frc-6P μέσω του GFAT μεταβολίζεται σε 6-φωσφορική-γλουκοζαμίνη (glucosamine-6P) και μέσω της φωσφοφρουκτοκινάσης (PFK) σε 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης (Frc-1,6-bis-P). Η Frc-1,6-bis-P από την αλδολάση διασπάται σε DHAP και 3-φωσφορική γλυκεριναλδεΐδη (GA3P). Από τα ενδιάμεσα των φωσφορικών τριοζών DHAP και GA3P, μέσω αποφωσφορυλίωσης, σχηματίζεται η μεθυλγλυοξάλη (MGO) που είναι μια ιδιαίτερα αντιδραστική α-οξοαλδεΐδη. Προσκολλάται κυρίως στα κατάλοιπα λυσίνης και αργινίνης και καθώς τα τελευταία είναι σε πληθώρα στα ενεργά κέντρα των πρωτεϊνών, γίνεται αντιληπτό ότι η τροποποίησή των πρωτεϊνών μέσω της μη ενζυματικής γλυκοζυλίωσης οδηγεί σε παθολογικές καταστάσεις [111] [106].



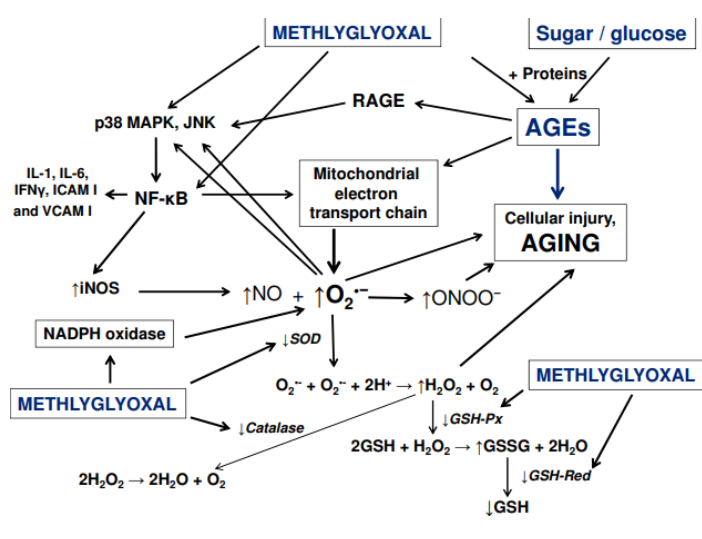
Εικόνα 20 : η παραγωγή μεθυλογλυοξάλης εξαρτάται από την γλυκόζη, τον μεταβολισμό λιπιδίων και πρωτεϊνών και το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών [110]

Η αποικοδόμηση των MGO γίνεται από το σύστημα των γλυοξαλών. Αρχικά η MGO μέσω γλουταθειόνης μεταβολίζεται σε S-d-λακτογλουταθειόνη από την γλυοξάλη I και στην συνέχεια από την γλυοξάλη II υδρολύεται σε D-lactate και γλουταθειόνη. Η νέοπαραχθείσα γλουταθειόνη θα ξαναχρησιμοποιηθεί από την γλυοξάλη I για τον καταβολισμό των υπολοίπων MGO ενώ το D-γαλακτικό θα μεταβολιστεί προς πυροουβικό [112].

Η αυξημένη παραγωγή MGO, οδηγεί στην ταχεία τροποποίηση πρωτεϊνών και άλλων υποστρωμάτων προς την παραγωγή AGEs. Η τροποποίηση υποστρωμάτων από την MGO συμβάλλει στην αύξηση της ρύθμισης των φλεγμονωδών μορίων που προκαλούν οξειδωτικό στρες και βλάβη στους ιστούς λόγω αλληλεπίδρασης των AGEs με τους RAGE, τη μεταγραφή γονιδίων, τη διασταυρούμενη σύνδεση πρωτεϊνών και την απόπτωση [106]. Από την τροποποίηση του DNA από την MGO,

προκύπτουν θραύσεις της αλυσίδας, αύξηση των μεταλλάξεων και κυτταροτοξικότητα [113].

Οι MGO-γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες υπόκεινται σε κυτταρική πρωτεόλυση και απελευθερώνουν MG-H1 που είναι συχνά το κύριο προϊόν μη ενζυματικής γλυκοζυλίωσης. Το MG-H1 βρίσκεται αυξημένο στον διαβήτη και έχει συσχετιστεί με αγγειακές επιπλοκές, νεφρική ανεπάρκεια, κίρρωση, νόσο του Αλτσχάιμερ, αρθρίτιδα, νόσο του Πάρκινσον και γήρανση [111] [106].



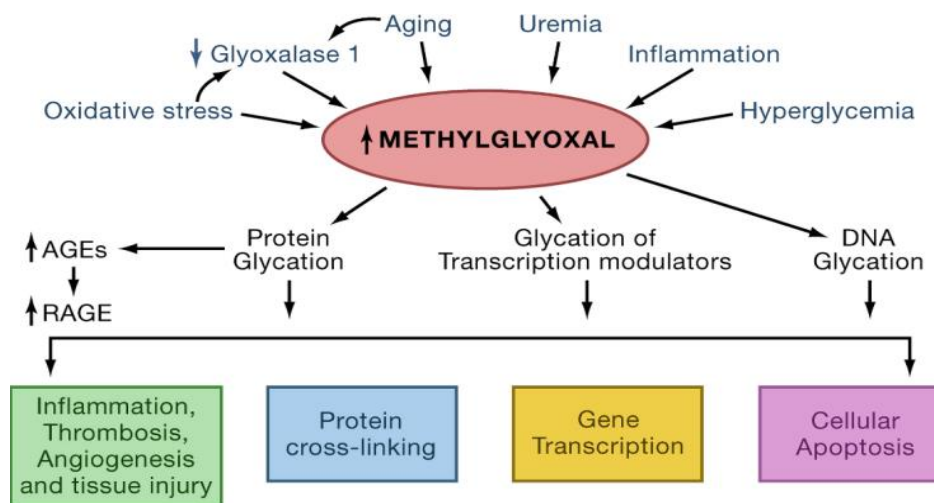
Εικόνα 21 : οξειδωτικό στρες επαγόμενο από την μεθυλγλυοξάλη και τα AGEs [109]

Πέραν του ότι η MGO προκαλεί την παραγωγή AGEs, επάγει και το οξειδωτικό στρες. Αυξάνει τον σχηματισμό μιτοχονδριακού υπεροξειδίου, υπεροξειδίου του υδρογόνου και περοξυνιτίτη (ONOO⁻). Αυξημένη ποσότητα παραγόμενου υπεροξειδίου μπορεί να αντιδράσει με μονοξείδιο του αζώτου για να σχηματίσει υπεροξυνιτίτη (ONOO⁻) που είναι ισχυρός οξειδωτικός και νιτρώδης παράγοντας. Επιπλέον επάγει την έκφραση προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως η ιντερλευκίνη 1β (IL-1), η ιντερλευκίνη-6 (IL-6), η ιντερλευκίνη-8 (IL-8) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων β (TNF-β). Επιπροσθέτως, αυξάνει τη δραστηριότητα πολλών προ-οξειδωτικών

ενζύμων όπως η οξειδάση NADPH, το p38 MAPK και την έκφραση των JNK και PPAR- α . Ένας επιπλέον μηχανισμός, όπου η MGO ευνοεί και προκαλεί οξειδωτικό στρες, είναι η μείωση των αντιοξειδωτικών παραγόντων όπως η γλουταθειόνη (GSH), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η αναγωγή γλουταθειόνης και η απομυτάση υπεροξειδίου του μαγγανίου (MnSOD). Τα μειωμένα αντιοξειδωτικά με τη σειρά τους, μειώνουν την αποτοξίνωση της MGO, αυξάνοντας τον χρόνο ημίσειας ζωής της και έτσι προκαλώντας ένα φαύλο κύκλο που οδηγεί σε ακόμα περισσότερες κυτταρικές βλάβες [109].

Στην υπεργλυκαιμία παρατηρείται ότι η αδρανοποίηση της GAPDH λόγω οξειδωτικού στρες, η συνεπαγόμενη αυξημένη συσσώρευση των φωσφορικών τριοζών (GA3P και DHAP) και η παράλληλη δραστηριότητα του μονοπατιού των πολυολών με υπερενεργοποίηση της AR, που καταναλώνει NADPH, προκαλούν την μεγάλη συσσώρευση των MGO και την αδυναμία αποτοξίνωσής τους, λόγω ανεπαρκούς ποσότητας γλουταθειόνης. Άλλοι παράγοντες που συμβάλλουν στη συσσώρευση MGO, είναι η ουραιμία, η γήρανση και η φλεγμονή.

Η MGO είναι υπεύθυνη για την ινσουλινοαντίσταση επαγόμενη από την υπεργλυκαιμία στον διαβήτη τύπου 2 [114]. Ως προς την διαβητική νεφροπάθεια, έχει αποδειχτεί σε πειραματικά μοντέλα, μη διαβητικών ποντικών νοκ-άουτ για την γλυοξάλη 1, ότι προσομοιάζουν την διαβητική νεφροπάθεια αλλά και ότι η υπερέκφραση της γλυοξάλης 1 μειώνει την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και μειώνει τη νεφρική δυσλειτουργία σε διαβητικούς αρουραίους [115] [116]



Εικόνα 22 : παράγοντες που συμβάλουν στην παραγωγή μεθυλγλυοξάλης και συνέπειες υπερπαραγωγής της. [106]

1.8.3.4.2 Συνέπειες των AGEs συνοπτικά

Αρτηριοσκλήρωση:

Θρόμβωση → αύξηση διαπερατότητας ενδοθηλιακών κυττάρων και προθρομβωτική δράση

Στένωση αγγειακών αυλών → κυτταροκίνες και αυξητικοί παράγοντες ενεργοποιούν τα μονοκύτταρα και παχαίνει η βασική μεμβράνη των αγγείων

Πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών ινών → δράση IL-1α, TNF-β, IGF-1, PDGF

Αθηρωμάτωση → τροποποίηση LDL και μακροφάγα

Υπέρταση → μείωση NO

Ανόμαλος κυτταρικός πολλαπλασιασμός → τροποποίηση γονιδίων κυτταροκινών και πρωτεϊνών από ROS

Διαβητική σπειραματοσκλήρυνση:

Διεύρυνση μεσάγγειου → α) αύξηση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και σύνθεση κολλαγόνου IV υπό την δράση των IGF-1, IGF-2, TGF-β και PDGF. β) Παγίδευση πρωτεϊνών και λιπιδίων.

Πρωτεϊνουρία → πάχυνση βασικής μεμβράνης και αύξηση διαπερατότητας λόγω γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνών.

Βλάβες επαγόμενες από το ανοσοποιητικό σύστημα → χημειοτακτική προσέλκυση μακροφάγων και ενεργοποίηση συμπληρώματος

Αθηροσκλήρωση και μικροαγγειακή βλάβη σπειράματος → AGEs και υπερλιπιδαιμία

Ουραιμία :

Αμυλοείδωση → μη ενζυματική γλυκοζυλίωση μικροσφαιρίνης-β₂ λόγω χημειοταξίας IL-1β, TNF-α, και IL-6

Δυσλιπιδαιμία → ατελής κάθαρση λόγω μη ενζυματικώς γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνών και λιπιδίων

Αθηροσκλήρωση → AGEs- οξειδωτικός στρες- δυσλιπιδαιμία

Αποτυχία υπερδιήθησης → σχηματισμός AGEs στο περιτόναιο

ΚΥΤΤΑΡΑ	ΕΠΙΔΡΑΣΗ
Μονοκύτταρα/μακροφάγα	↑ δέσμευση συνδετών, ενδοκυττάρωσης και αποδόμησης ↑ χημειοταξίας ↑ παραγωγής κυτοκινών (TNF-α, IL-1α) ↑ παραγωγής αυξητικών παραγόντων (PDGF, IGF-1)
T λεμφοκύτταρα	↑ δέσμευση συνδετών, παραγωγής ιντερφερόνης
Ενδοθηλιακά κύτταρα	↑ δέσμευση συνδετών, αποδόμησης ↑ Διαπερατότητα μεμβράνης ↑ έκφρασης VCAM και ICAM ↑ Tissue factor, thrombomodulin
αιμοπετάλια	↑ δέσμευση συνδετών ↑ Πρόσδεση φιβρονεκτίνης ↑ Συσσωμάτωση
Ινοβλάστες	↑ δέσμευση συνδετών, EGF ↑ πολλαπλασιασμού
Λεία μυϊκά κύτταρα	↑ δέσμευση συνδετών, πολλαπλασιασμού
νευρογλοιακά κύτταρα , αστροκύτταρα	↑ δέσμευση συνδετών, αποδόμησης ↑ GM-CSF, ελευθέρων ριζών
Μεσαγγειακά κύτταρα	↑ δέσμευση συνδετών g, ενδοκυττάρωσης και αποδόμησης ↑ φιβρονεκτίνη, κολλαγόνου IV, λαμινικής, αυξητικών παραγόντων (PDGF, TGF-β1)

Πίνακας 2 : επίδραση των AGEs σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους

1.9 ΣΤΡΕΣ ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΔΙΚΤΙΟΥ

Το Ενδοπλασματικό Δίκτυο (Ε.Δ) είναι ένα δυναμικό οργανίδιο με ικανότητα επέκτασης ανάλογα με τις κυτταρικές απαιτήσεις. Είναι υπεύθυνο για την σύνθεση, την τροποποίηση και τον ποιοτικό έλεγχο των πρωτεϊνών. Η πρωτεόσταση, δηλαδή η ομοιόσταση των πρωτεϊνών, βασίζεται στην σωστή λειτουργία του ΕΔ. Η απορρύθμιση της λειτουργίας του, που αναφέρεται ως στρες, οδηγεί σε σοβαρές επιπλοκές οι οποίες εκδηλώνονται όχι μόνο σε κυτταρικό επίπεδο, αλλά σε και μακροσκοπικό, με κατάρρευση ολόκληρων συστημάτων, όπως παρατηρείται στο κεντρικό νευρικό σύστημα [117].

Στα β-κύτταρα του παγκρέατος, το στρες Ε.Δ. μπορεί να προκληθεί από την ανικανότητά τους να αναδιπλώσουν τα αυξημένα επίπεδα των προ-ινσουλικών ενδιάμεσων μορίων. Επιπλέον πολλές μελέτες εμπλέκουν το στρες του ΕΔ ως βασικό παράγοντα για ανάπτυξη και εξέλιξη της νεφρικής νόσου, ανεξαρτήτως εάν οφείλεται σε πρωτοπαθή σπειραματονεφρίτιδα, σπειραματική νόσο λόγω γενετικών μεταλλάξεων, διαβητική νεφροπάθεια (ΔΝ), οξεία νεφρική βλάβη (ΟΝΒ), ΧΝΝ ή νεφρική ίνωση [118].

Το ΕΔ σε συνεργασία με το σύστημα Ουβικιτίνης-Πρωτεασώματος (UPS) αποτελούν τα κύρια μέρη της πρωτεόστασης. Μετά την ολοκλήρωση της μετάφρασης, οι πρωτεΐνες μεταβαίνουν στον αυλό του ΕΔ, όπου μέσω ενζύμων και μορίων-συνοδών αποκτούν την τελική αναδιπλωμένη δομή τους. Εν συνεχεία, μεταφέρονται μέσω των εκκριτικών μονοπατιών στο σύστημα Golgi για την περαιτέρω επεξεργασία τους. Το UPS είναι το καταληκτικό σημείο όπου θα κατακερματιστούν σε ολιγοπεπτίδια μέσω πρωτεολυτικών μηχανισμών, είτε για διατήρηση ενέργειας είτε για αντιγονοπαρουσίαση [119] [120].

Διαταραχή στην ομοιόσταση του ΕΔ οδηγεί σε άθροιση μη αναδιπλωμένων ή μη ορθώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, παρεμπόδιση μετακίνησης πρωτεϊνών στο σύστημα Golgi ή τον κυτταροσκελετό-ακτίνης, προκαλώντας τελικά δυσπροσαρμοστικό στρες του ΕΔ και πυροδοτώντας την απόκριση των μη ορθώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών UPR (unfolded protein response). Αιτίες για τις μη ορθώς αναδιπλωμένες πρωτεΐνες είναι το οξειδωτικό στρες, η φλεγμονή, τοξικές χημικές ουσίες, η υποξία, η ανεπάρκεια θρεπτικών συστατικών, η απώλεια της ομοιόστασης των ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}), οι σημειακές μεταλλάξεις σε εκκρινόμενες πρωτεΐνες που σταθεροποιούν ενδιάμεσους τύπους αναδίπλωσης ή προκαλούν την συσσωμάτωση πρωτεϊνών, ή που επηρεάζουν την λειτουργία των ασβέστιο-εξαρτώμενων μορίων-συνοδών του Ε.Δ. [121].

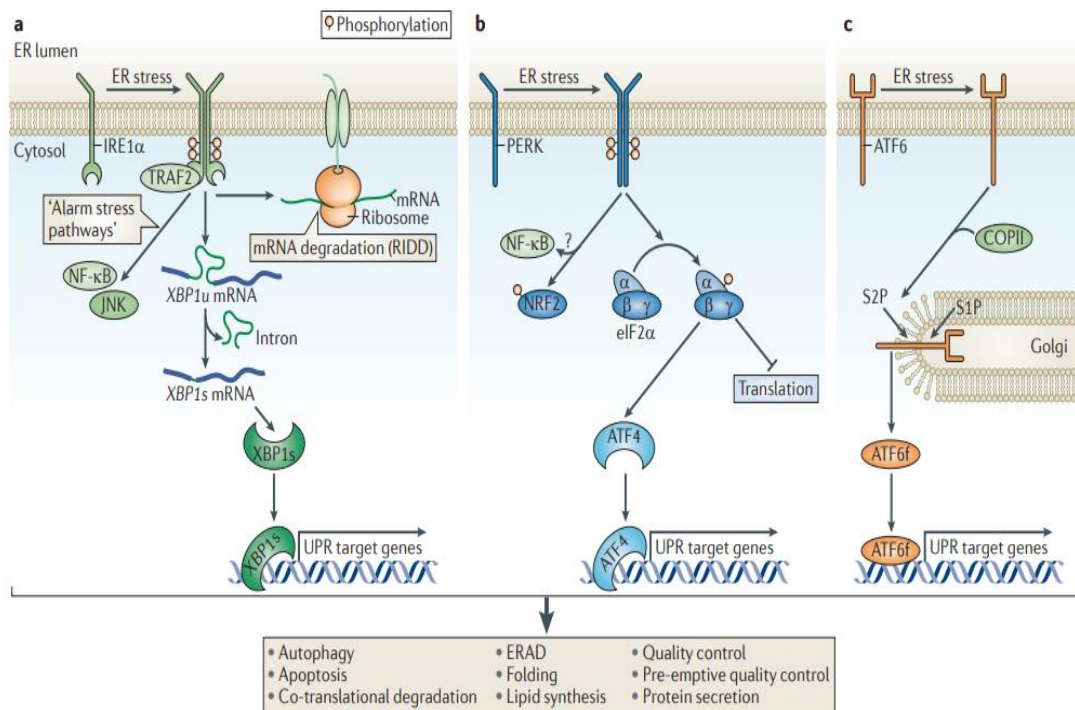
Ο ρόλος του UPR είναι να μειώνει τον όγκο των μη αναδιπλωμένων ή μη ορθώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών αναστέλλοντας την πρωτεϊνσύνθεση, αυξάνοντας την παραγωγή μορίων-συνοδών και ενεργοποιώντας το σύστημα στο σύστημα ER - associated degradation (ERAD) για να ανοικοδομηθούν οι λάθος πρωτεΐνες.

Οι ελαττωματικές πρωτεΐνες υπό την συνοδεία ειδικών μορίων-συνοδών που μετέχουν, μεταφέρονται μέσω τρανσλοκονίων, στο κυτταρόπλασμα όπου μέσω της ουβικιτινιλίωσης αφού σημανθούν, οδηγούνται στο πρωτεάσωμα προς αποδόμηση [122].

Το στρες του ΕΔ ενεργοποιείται από τρεις πρωτεΐνες, τις kinase R-like ER kinase (PERK), inositol requiring 1α (IRE1α), activating transcription factor 6 (ATF6), και συντονιστής είναι η συνοδός πρωτεΐνη BiP (GRP78).

Οι PERK, IRE1α και ATF6 είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες στην μεμβράνη του ΕΔ. Υπό συνθήκες ηρεμίας η συνοδός BiP είναι προσδεμένη στην επιφάνεια αυτών των πρωτεϊνών, προς την πλευρά του αυλού του ΕΔ και έτσι οι PERK, IRE1α και ATF6 παραμένουν αδρανείς. Η συνάθροιση μη-ορθώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών

στο ΕΔ, προκαλεί την απομάκρυνση της BiP από τις προαναφερόμενες και την πρόσδεσή της στις μη-ορθώς αναδιπλωμένες πρωτεΐνες.



Εικόνα 23: το στρες ΕΔ οδηγεί στην ενεργοποίηση των PARP, IRE1 και ATF6 [120]

Με την απομάκρυνση της BiP από την PERK, ενοσιείται ο διμερισμός της PERK και η μετατροπή της σε ενεργή κινάση που φωσφορυλιώνει τον eIF-2α. Ο ενεργός φωσφορυλιωμένος eIF-2α, σταματά την μετάφραση αλλά επιτρέπει στο ριβόσωμα την μετάφραση των εναλλακτικών πλαισίων ανάγνωσης, με αποτέλεσμα την σύνθεση της ATF4. Η ATF4 μεταναστεύει στον πυρήνα και τροποποιεί την αυτοφαγία, την απόπτωση, αυξάνει την έκφραση των πρωτεϊνών συνοδών όπως η BiP, ένζυμα βιοσύνθεσης και μετακίνησης αμινοξέων και αντιοξειδωτικών παραγόντων, την GADD34 καθώς επίσης και τον CHOP [123]. Η ATF4 εκτός από τη ενεργοποίηση μέσω PERK κατά το UPR, ενεργοποιείται και από την GCN2 κατά τη στέρση

αμινοξέων, αλλά και από το μιτοχονδριακό στρες εξαιτίας αναστολής της αναπνευστικής αλυσίδας λόγω μεταφορμίνης, και επάγει την αυτοφαγία [124] [125] [126]. Στην περίπτωση που δεν μπορεί να επέλθει πρωτεόσταση, η παρατεταμένη ενεργοποίηση της PERK και η αυξημένη έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα CHOP/GADD153, μειώνει την ρύθμιση της αντί-αποπτωτικής πρωτεΐνης BCL-2 (B-cell lymphoma 2), ενισχύει την έκφραση των προ-αποπτωτικών παραγόντων όπως η BH3-protein BIM και αναστέλλει γονίδια που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των αμινοξέων όπως την asparagine synthetase (ASNS), με αποτέλεσμα να επάγει την απόπτωση [127] [123].

Η GADD34, ως φωσφατάση, αποφωσφορυλιώνοντας το eIF-2α εκτρέπει την μετάφραση από τα εναλλακτικά πλαίσια και την επιστρέφει στα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης, προστατεύοντας από την απόπτωση [127].

Η ενεργοποίηση της ATF6 λόγω απομάκρυνσης της BiP επιτρέπει την μετακίνηση της ATF6 στο Golgi όπου τέμνεται από τις S1P και S2P. Η υπομονάδα ATF6f (50 KDa), αφού εισέλθει στον πυρήνα, αυξάνει και αυτή με την σειρά της την μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν το ERAD, πρωτεΐνες συνοδούς όπως HSPA5, GRP94, HYOU1, και καρλετικιουλίνη (CALR), το XBP1 αλλά και την CHOP [120] [128]

Για την πλήρη δράση του UPR, τα μονοπάτια ATF6 και IRE1 συνεργάζονται σε ότι αφορά την XBP1. Η ενεργοποίηση του ATF6 αυξάνει την μεταγραφή του XBP1-mRNA και στην συνέχεια η ενεργοποίηση του IRE1 με την φωσφορυλίωση του eIF2α οδηγεί στην μετάφραση της πρωτεΐνης XBP1 [129].

Η IRE1α αποτελείται από μια υπομονάδα κινάσης θρεονίνης/σερίνης και μια υπομονάδα ενδοριβονουκλεάσης προς την κυτταροπλασματική πλευρά. Μετά την απομάκρυνση της BiP, η IRE1α διμερίζεται και αυτοφωσφορυλιώνεται. Η ενεργός πλέον IRE1α, έχει δράση m-RNA ενδονουκλεάσης και με μάτισμα τροποποιεί το

XBP1-mRNA (unspliced X-box binding protein 1-XBP1u) ώστε να μπορεί να μεταφραστεί ο μεταγραφικός παράγοντας XBP-1. Εν συνεχεία ο XBP1 εισέρχεται στον πυρήνα και αυξάνει την γονιδιακή έκφραση ρυθμιστών της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης, των συνοδών πρωτεϊνών αποδόμησης ERAD, της βιοσύνθεσης και επέκτασης του ΕΔ και της σύνθεσης φωσφατιδυλοχολίνης, βασικού φωσφολιπιδίου της μεμβράνης του ενδοπλασματικού [128] [130]

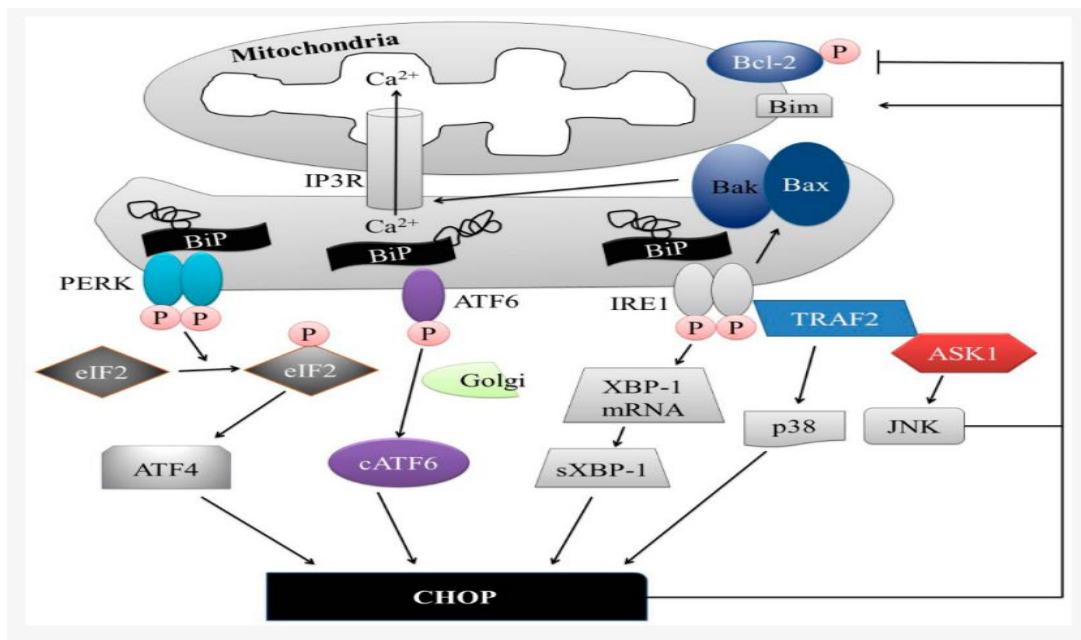
Μια ακόμα δράση της υπομονάδας της ενεργής IRE1α, είναι ότι εμποδίζει την μεταφορά οποιουδήποτε πολυπεπτιδίου που προσπαθεί να εισέλθει στο ΕΔ από τα τρανσλοκόνια, ενεργοποιώντας τον μηχανισμό της «ρυθμιζόμενης και εξαρτώμενης από την IRE1 αποικοδόμησης» ή αλλιώς RIDD. Το RIDD αυξάνει την έκφραση της κασπάσης-2 οδηγώντας στην απόπτωση. Ο θάνατος των παγκρεατικών β-κυττάρων οφείλεται στην ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3 (NLR Family Pyrin Domain Containing 3) λόγω στρες ΕΔ όπου προκαλείται από την στοχευμένη αποικοδόμηση του μεταγράφου της ινσουλίνης μέσω της RIDD [131] [133] Με τον μηχανισμό της RIDD και σε συνδυασμό με την φωσφορυλίωση του eIF2α από την PERK, σταματά η εισροή πρωτεϊνών στο ΕΔ δίνοντας έτσι την ευκαιρία να αποκατασταθεί η πρωτεόσταση [120].

Τέλος ο διμερισμός του IRE1α δημιουργεί θέση πρόσδεσης της TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2) η οποία ενεργοποιεί τον NF-κB και φωσφορυλιώνει την AKS1 (apoptosis signal-regulating kinase 1). Η ενεργή ASK1 ενεργοποιεί την JUN N-terminal kinase (JNK) και την p-38-mitogen activation protein kinase (MAPK). Τα ενεργοποιημένα JNK αφού μεταναστεύσουν στην μιτοχονδριακή μεμβράνη ενεργοποιούν την Bim και απενεργοποιούν την Bcl-2. Η φωσφορυλίωση του p38 MARK ενεργοποιεί την CHOP που οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του Bim και του death receptor 5 (DR5) ενώ παράλληλα μειώνει την έκφραση του Bcl-2, οδηγώντας το κύτταρο στην απόπτωση [184]. Η Bax (Bcl-2 associated X protein) έχει την

ικανότητα να προσδένει και να ενεργοποιεί το IRE1 αλλά και το IP3R (inositol 1,4,5-triphosphate receptors) με αποτέλεσμα την διαφυγή Ca^{2+} από το ΕΔ και την επακόλουθη αύξηση των μιτοχονδριακών επιπέδων Ca^{2+} . Συνέπεια αυτού είναι η απελευθέρωση κυτοχρώματος C και η επαγωγή της απόπτωσης από την οδό των κασπασών [185].

Έτσι, μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού ASK1-MAPK-JNK ενεργοποιούνται η φλεγμονή, η ίνωση με ενεργοποίηση του TGFβ, και η απόπτωση από το μιτοχονδριακό μονοπάτι των κασπασών. Εκτός από το στρες του ΕΔ, παράγοντες που οδηγούν στην ενεργοποίηση της ASK1 είναι ο TNFα, λοιμώξεις, τα ROS, το οσμωτικό στρες, η αύξηση των ιόντων Ca^{2+} . Ειδικότερα, τα τρία τελευταία απαντώνται σε αρκετά υψηλά επίπεδα στον διαβήτη [186].

Το ενδοκυττάριο Ca^{2+} αποθηκεύεται κυρίως στον αυλό του ΕΔ, όπου εξασφαλίζει τη σωστή πρωτεϊνική αναδίπλωση, αλληλοεπιδρώντας με της πρωτεΐνες-συνοδούς. Το ΕΔ ελέγχει πολλές κυτταρικές διεργασίες και σηματοδοτεί μεταβολικές οδούς ως απάντηση στο στρες, μέσω της μεταφοράς Ca^{2+} μέσα και έξω από τον αυλό του. Το Ca^{2+} που απελευθερώνεται από το ΕΔ, μπορεί να οδηγήσει στην απόπτωση κυρίως μέσω του θανάτου επαγόμενου από τα μιτοχόνδρια [185]



Εικόνα 24 : Μηχανισμός UPR. Κατά τη διάρκεια του στρες ΕΔ και οι τρεις οδοί UPR οδηγούν στην έναρξη της μεταγραφής του CHOP. Η συγκέντρωση μη ορθώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών προκαλεί διαχωρισμό της BiP από το IRE1, την PERK και τον ATF6, οδηγώντας στην ενεργοποίησή τους. Το ενεργοποιημένο IRE1 κάνει μάτισμα του XBP-1 mRNA, παράγοντας τον μεταγραφικό παράγοντα XBP-1 που μετατοπίζεται στον πυρήνα και ρυθμίζει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα CHOP. Το IRE1 στρατολογεί τον υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNFR) που σχετίζεται με τον παράγοντα-2 (TRAF2) και την προ αποπτωτική κινάση ASK1, με αποτέλεσμα την κατάντη ενεργοποίηση της κινάσης JNK και της πρωτεϊνικής κινάσης ενεργοποίησης μιτογόνου p38 (MAPK). Το ενεργό p38 MAPK φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον CHOP, ενώ JNK μετατοπίζεται στη μιτοχονδριακή μεμβράνη, αναστέλλοντας την αντι-αποπτωτική Bcl-2 και ενεργοποιώντας την προαποπτωτική Bim. Το IRE1 μπορεί να ενεργοποιήσει τις προαποπτωτικές Bax και Bak που προκαλούν τους υποδοχείς IP3Rs να απελευθερώσουν το Ca^{2+} από το ΕΔ. Η ενεργή PERK 2 φωσφορυλιώνει τον eIF2, που οδηγεί στην μετάφραση του ATF4 οποίος μετατοπίζεται στον πυρήνα και διεγείρει τη μεταγραφή πρωτεϊνών που απαιτούνται για την ανάκτηση της ομοιόστασης ΕΔ. Το ATF6 τέμνεται από ένζυμα του Golgi και ενεργοποιείται οδηγώντας στην έκφραση του CHOP. [185]

Η συνεργασία των PERK και IRE1 είναι προαπαιτούμενο για την ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης του NF-κB. Σε φυσιολογικές συνθήκες ο NF-κB παραμένει αδρανής υπό την επίδραση της IκBa. Η φωσφορυλίωση του eIF2α από την PERK οδηγεί σε αναστολή της νέας σύνθεσης IκBa ενώ η παράλληλη ενεργοποίηση του

IRE1 διατηρεί υψηλά τα επίπεδα του IKK. Ο ρόλος του IKK είναι να φωσφορυλιώνει τον IκBα και να οδηγεί στην αποικοδόμησή του στο πρωτεάσωμα με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του NF-κB. Το PERK αναστέλλει την σύνθεση του αναστολέα, με συνέπεια όλο και περισσότερα NF-κB παραμένουν ελεύθερα και ο IRE1 προκαλεί την αποδόμηση όσων έχουν απομείνει με αποτέλεσμα αυτά τα δύο μονοπάτια να οδηγούν σε πολύ μεγαλύτερη έκφραση του NF-κB συγκριτικά με μόνο την ενεργοποίηση του IRE1 [187].

Κύριοι επαγωγείς του στρες του ΕΔ που εμπλέκονται ενεργά στην εξέλιξη νεφρικής ανεπάρκειας και κυρίως της διαβητικής νεφροπάθειας, είναι η υπεργλυκαιμία, η πρωτεϊνουρία [128] , [188], η ανεξέλεγκτη παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) [189] , [190], η συσσώρευση AGEs [191], και η απορρύθμιση της οξειδωσης των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA) [192].

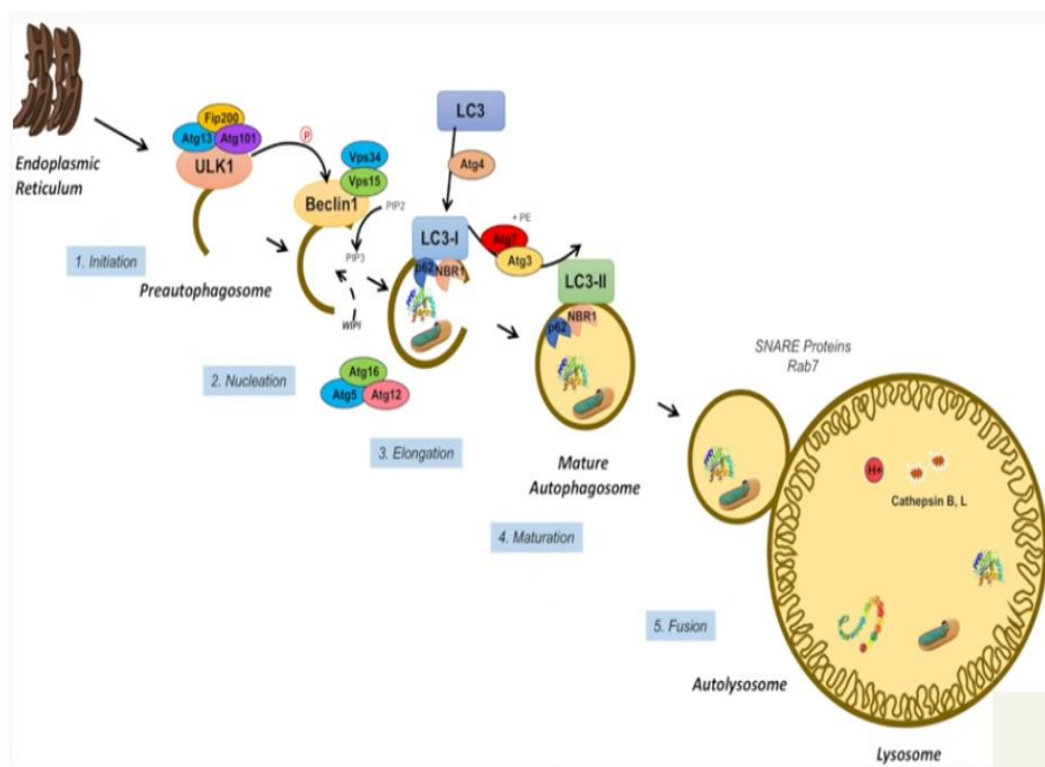
Η πρωτεϊνουρία και η υπεργλυκαιμία στον διαβήτη μπορεί να προκαλέσουν στρες ΕΔ στα σωληναριακά κύτταρα του νεφρού, εξαιτίας της συσσώρευσης μη ενζυματικώς γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνών (AGEs), της συνύπαρξης οξειδωτικού στρες, καθώς και της αυξημένης μαζικής επαναρρόφησης πρωτεϊνών και λιπιδίων που παρατηρούνται στην πρωτεϊνουρία [128].

Πειραματικά έχει πραγματοποιηθεί επαγωγή του στρες ΕΔ σε ποδοκύτταρα μέσω άθροισης πρωτεϊνών, στα πειραματικά επιθηλιακά μέσω επαγόμενης βλάβης από το συμπλήρωμα ή μέσω έκθεσης εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων σε υψηλές συγκεντρώσεις αλβουμίνης [128].

Probeset ID	Gene Symbol	Alias	Category	Gene Title	Mild DN	Established DN
200779_at	ATF4		III	Activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67)	↔	ND
217550_at	ATF6		I	Activating transcription factor 6	↔	ND
211833_s_at	BAX		III	BCL2-associated X protein	↔	ND
203684_s_at	BCL2		III	B-cell CLL/lymphoma 2	↔	ND
207004_at	BCL2		III	B-cell CLL/lymphoma 2	↔	ND
200068_s_at	CANX		I	Calnexin	↔	↑
208852_s_at	CANX		I	Calnexin	↔	↑
207181_s_at	CASP7		III	Caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase	↔	ND
209383_at	DDIT3	CHOP/GADD153	III	DNA damage-inducible transcript 3	↔	↓
203279_at	EDEM1		I	Eukaryotic translation initiation factor 2- α kinase 3	↔	ND
207061_at	ERN1	IRE1	I	ERO1-like (S. cerevisiae)	↔	ND
211936_at	HSPA5	GRP78/BiP	I; II; III	Hypoxia upregulated 1	↔	↑
200825_s_at	HYOU1	ORP150	I	Mitogen-activated protein kinase 8	↔	↑
201620_at	MBTPS1	S1P	I	Membrane-bound transcription factor peptidase, site 1	↔	↑
202014_at	PPP1R15A	GADD34	III	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A	↔	ND
37028_at	PPP1R15A	GADD34	III	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A	↔	ND
204413_at	TRAF2		III	TNF receptor-associated factor 2	↔	ND
200670_at	XBP1		I	X-box binding protein 1	↔	↑

Εικόνα 25 : Σύγκριση 28 γονιδίων γνωστής εμπλοκής στο στρες-ΕΔ από βιοψίες του διάμεσου σωληναριακού χώρου από ασθενείς μέτριας Διαβητικής Νεφροπάθειας (DN) (κρεατινίνη ορού < 1,4mg/dl) και εγκατεστημένης Διαβητικής Νεφροπάθειας (κρεατινίνη ορού \geq 1,4mg/dl). Γονίδια με σημαντικά αυξορύθμιση ($P < 0,05$) έχουν σημανθεί με βέλος προς τα επάνω και με μειωμένη ρύθμιση έχουν σημανθεί με βέλος προς τα κάτω. Γονίδια των οποίων η ρύθμιση δεν άλλαξε έχουν σημανθεί με το σύμβολο ↔. Γονίδια που η ρύθμισή τους ήταν υπό του ορίου ανίχνευσης έχουν σημανθεί με ND (not detectable) [128].

1.9.1 ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ



Εικόνα 26: σχηματισμός αυτοφαγοσώματος και σύντηξη με λυσοσωματική μεμβράνη.

Η αυτοφαγία είναι το ενδοκυτταρικό σύστημα ανακύκλωσης και αποικοδόμησης μέσω του λυσοσώματος. Είναι διεργασία με σημαντικό ρόλο σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις και αποτελείται από διαδοχικά βήματα που είναι η απομόνωση, η μεταφορά στο λυσόσωμα, η αποικοδόμηση και τέλος η χρήση των προϊόντων αποδόμησης. Κάθε βήμα μπορεί να κατέχει διαφορετική λειτουργία. Έχουν περιγραφεί τρεις τύποι αυτοφαγίας, η μακροαυτοφαγία, η μικροαυτοφαγία και η διαμεσολαβόμενη από πρωτεΐνες συνοδούς. Για την διεργασία αυτή απαιτείται η μεσολάβηση ενός μοναδικού κυτταρικού οργανιδίου, του αυτοφαγοσώματος που περικλείει τμήμα του κυτταροπλάσματος και αποδομεί όλο το περιεχόμενο, με αυτή

είναι και από τις βασικές διαφορές σε σχέση με την αποδόμηση μέσω του πρωτεασώματος που αποδομεί στοχευμένα [132].

Η αυτοφαγία συμμετέχει στην προσαρμογή κατά τη στέρηση θρεπτικών συστατικών, την ενδοκυττάρια κάθαρση πρωτεϊνών και οργανιδίων, την ανάπτυξη, την αντιγήρανση, την εξάλειψη των μικροοργανισμών, την καταστολή όγκων, την αντιγονοπαρουσίαση αλλά και τον κυτταρικό θάνατο [132].

Αποτελεί επιστημονικό ερώτημα το πώς μπορεί ένα σύστημα μαζικής αποδόμησης να ευθύνεται και να ρυθμίζει τόσες πολλές λειτουργίες. Ένας πιθανός καθοριστικός παράγοντας είναι η έκταση της αποδόμησης καθώς η υπερβολική καταστροφή χωρίς ανάλογη βιοσύνθεση, είναι επιβλαβής για τα κύτταρα. Αυτό μπορεί να εξηγήσει πολλά από τα αμφιλεγόμενα ζητήματα που σχετίζονται με την τοξικότητα της αυτοφαγίας, ιδιαίτερα στις κυτταροκαλλιέργειες. Ωστόσο, η έκταση της αυτοφαγίας *in vivo*, φαίνεται να ελέγχεται αυστηρά, καθώς η αυτοφαγία ή η ολική πρωτεόλυση δεν διατηρείται, ενώ αντιθέτως μειώνεται κατά τη διάρκεια παρατεταμένης αποστέρησης θρεπτικών στοιχείων [134]. Από τον Mizushima και την ομάδα του προτάθηκε ο διαχωρισμός της αυτοφαγίας σε «επαγόμενη» και «βασική», όπου στην πρώτη κατηγορία έχουμε παραγωγή αμινοξέων μετά από ασιτία ενώ στη δεύτερη έχουμε ανακύκλωση των κυτταροπλασματικών συστατικών [132].

Στους πολυκύτταρους οργανισμούς η απουσία θρεπτικών δεν γίνεται αντιληπτή από το κάθε κύτταρο και καθώς η ασιτία αποτελεί πρόβλημα για το σύνολο του οργανισμού είναι αναμενόμενο η αυτοφαγία να ρυθμίζεται από ένα εξαιρετικά οργανωμένο σύστημα που δεν είναι άλλο από το ενδοκρινολογικό μέσω της ινσουλίνης. Για παράδειγμα, η αυτοφαγία στο ήπαρ αναστέλλεται από την ινσουλίνη και επάγεται από το γλυκογόνο [135]. Όμως και άλλες ορμόνες ή αυξητικοί παράγοντες συμβάλουν στην ρύθμιση της αυτοφαγίας, όπως ο αιμοποιητικός αυξητικός παράγοντας interleukin-3 (IL-3) που προκαλεί εν μέρη αναστολή της

αυτοφαγίας [132]. Η σηματοδότηση από τα αμινοξέα ή την ινσουλίνη και τους αυξητικούς παράγοντες συγκλίνει στο mTOR καθώς και έχει βρεθεί ότι η ραπαμυκίνη επάγει την αυτοφαγία τόσο στις ζύμες όσο και στα θηλαστικά [136]. Επιπλέον ρυθμιστικοί παράγοντες της αυτοφαγίας είναι η Bcl-2, τα ROSκ, το Ca²⁺, το AMPK, το p19ARF, το DRAM, το TRAIL, το FADD και το IP3 [132].

Κατά την μικροαυτοφαγία, το κυτταροπλασματικό περιεχόμενο που προορίζεται να αποδομηθεί, εγκοιλώνεται από την λυσοσωμιακή μεμβράνη σχηματίζοντας κυστίδια μονής στοιβάδας [137].

Στην διαμεσολαβούμενη αυτοφαγία από πρωτεΐνες συνοδούς δεν παρατηρείται σχηματισμός κυστιδίων, αλλά αντιθέτως έχουμε άμεση στόχευση των προς αποδόμηση πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες αναγνωρίζονται στο κυτταρόπλασμα από την Heat Shock Protein 70 (HSP70), στην συνέχεια προσδέονται στο λυσόσωμα, ξετυλίγονται, μεταφέρονται στον αυλό του λυσοσώματος και τέλος αποικοδομούνται [138].

Η μακροαυτοφαγία είναι η πιο μελετημένη μορφή και για αυτό έχει επικρατήσει με τον όρο αυτοφαγία να εννοούμε την μακροαυτοφαγία. Ξεκινά από το ενδοπλασματικό δίκτυο, το σύστημα Golgi ή και τα ενδοσώματα, με τον σχηματισμό των μεμβρανών απομόνωσης διπλής στιβάδας, που ονομάζονται φαγοφόροι. Οι φαγοφόροι επεκτείνονται και εγκοιλώνουν τα ενδοκυτταρικά συστατικά, περικλείοντάς τα και σχηματίζοντας το αυτοφαγόσωμα. Σε αυτή την διαδικασία συμμετέχουν πολλά πρωτεϊνικά σύμπλοκα όπως το Ulk/2-Atg13-1FIP200, Beclin 1, πληθώρα Atg, η μετατροπή του LC3I σε LC3II που μαρτυρά τον σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος, καθώς και άλλες [139]. Οι μεμβράνες των αυτοφαγοσωμάτων και των λυσοσωμάτων συντήκονται, σχηματίζοντας τα αυτοφαγολυσοσώματα. Μετά την σύντηξη αυτή, το περιεχόμενο των αυτοφαγοσωμάτων αποδομείται από τα λυσοσωμιακά ένζυμα και παράλληλα περμεάσες και μεταφορείς εξάγουν τα

αμινοξέα και τα άλλα παράγωγα της αποδόμησης στο κυτταρόπλασμα, όπου θα επαναχρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία νέων μακρομορίων, οργανιδίων κ.τ.λ. [140].

Ως προς τον νεφρό και την παρουσία διαβήτη, πειραματικά μοντέλα ποντικών με ΣΔ τύπου I και II έχουν δείξει ότι η αυτοφαγία είναι μειωμένη, αλλά και στον άνθρωπο βιοψιακό υλικό από τους νεφρούς έχει δείξει συσσώρευση της πρωτεΐνης p62/SQSTM1 (υπόστρωμα του λυσοσωμικού αποικοδομητικού μονοπατιού) στα εγγύς σωληναριακά κύτταρα [141].

Η στέρηση θρεπτικών συστατικών απενεργοποιεί το mTOR και ενεργοποιεί τα AMPK και SIRT-1. Υπο φυσιολογικές συνθήκες θρεπτικών στοιχείων, το mTORC1 φωσφορυλιώνοντας την ULK1 την αδρανοποιεί, όταν όμως το mTORC1 απενεργοποιηθεί λόγω απουσίας θρεπτικών, υποξίας, στρες του ΕΔ, στέρησης αυξητικών παραγόντων ή λόγω παρουσίας αναστολέων (πχ ραπαμυκίνη) τότε η ULK1 ενεργοποιείται, φωσφορυλιώνει την Beclin1 και επάγεται η αυτοφαγία. Πειραματικά έχει αποδειχτεί ότι κατά την διαβητική νεφροπάθεια υπάρχει αυξημένη δραστηριότητα του mTORC1 στα ποδοκύτταρα, γεγονός που προκαλεί την αύξηση του μεσάγγειου, την πάχυνση της βασικής σπειραματικής μεμβράνης, την απώλεια ποδοκυττάρων και την πρωτεϊνουρία. Η αναστολή του mTORC1 οδηγεί σε μειωμένη έκφραση της ακτίνης των σπειραματικών λείων μυϊκών κυττάρων, μειώνει την συσσώρευση στο μεσαγγειακό παρέγχυμα, την νεφρική υπερτροφία, και την έκφραση του mRNA των TGF1 και VEGF [139].

Ένα ακόμα σημαντικό μονοπάτι που εμπλέκεται στην αυτοφαγία, είναι αυτό του AMPK καθώς έχει διαπιστωθεί ότι στην ενεργή του μορφή επάγει την αυτοφαγία, όμως κατά την διαβητική νεφροπάθεια, στα ποδοκύτταρα παραμένει αδρανές. Όπως το mTORC1, έτσι και το AMPK, είναι ανιχνευτής θρεπτικών συστατικών, με την διαφορά ότι στην ενεργή του μορφή επάγει την αυτοφαγία. Σε συνθήκες θρεπτικής

στέρησης, το AMPK φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται από τις κινάσες liver kinase B1 (LKB1), calcium/calmodulin-dependent kinase kinase β (CaMKK β), και TGF- β -activated kinase 1 (TAK1). Ειδικότερα, οι κινάσες CaMKK β και TAK1 εμπλέκονται στην επαγόμενη από το AMPK αυτοφαγία κατά την αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} . Το ενεργό AMPK επάγει την αυτοφαγία καθώς φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την ULK1. Επίσης, αλληλοεπιδρά και με το mTORC1, ενεργοποιώντας τους αναστολείς του TSC1/TSC2 και απενεργοποιώντας την RAPTOR μέσω φωσφορυλίωσης, με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση του συμπλόκου. Η ενεργή ULK1 φωσφορυλιώνει και αναστέλλει και τους δύο ρυθμιστές της (AMPK και mTORC1) ώστε να προσαρμόσει με ακρίβεια την αυτοφαγία. Στην διαβητική νεφροπάθεια η έκφραση του AMPK είναι μειωμένη στα σωληνάρια και το σπείραμα, όμως σε πειραματικά μοντέλα διαβήτη η χορήγηση ενεργοποιητών του AMPK, όπως η μετοφορμίνη και η ρεσβεατρόλη, έχουν δείξει ότι η αύξηση στην φωσφορυλίωσή του αλλά και η μείωση του mTORC1 οδηγούν σε αναστολή της υπεργλυκαιμίας, μείωση της αλβουμινουρίας και της υπερτροφίας αλλά και επιπλέον βελτίωση της νεφρικής λειτουργίας [139].

Επιπλέον ανιχνευτής θρεπτικών συστατικών που ρυθμίζει θετικά την αυτοφαγία είναι το Silent information regulator T1 (SIRT1) που λειτουργεί ως ενδοκυττάριος αισθητήρας ενέργειας, παρακολουθώντας τη συγκέντρωση των NAD^+ και ρυθμίζει τις μεταβολικές αλλαγές *in vivo* κατά το οξειδωτικό στρες. Το SIRT1 σχηματίζει μοριακό σύμπλοκο με βασικά συστατικά των μηχανημάτων της αυτοφαγίας, όπως Atg 5, Atg7, και LC3, τα οποία αποακετυλιώνει με την συμβολή του NAD^+ [142]. Επιπλέον, το SIRT1 αλληλοεπιδρά και αποακετυλιώνει τον transcription factor forkhead box O3 (FoxO3), με αποτέλεσμα την ενισχυμένη έκφραση του BCL2/adenovirus E1B 19-kDa interacting protein 3 (Bnip3) και την προώθηση της αυτοφαγίας [143]. Το SIRT1 έχει υψηλή έκφραση στα νεφρικά κύτταρα του ποντικού

και μείωσή της οδηγεί σε μειωμένη κυτταρική αντίσταση στο οξειδωτικό στρες, ενώ η φαρμακολογική ενεργοποίηση του SIRT1 βελτιώνει την επιβίωση των κυττάρων ως απάντηση στο οξειδωτικό στρες [144]. Πειραματικά μοντέλα διαβητικών ποντικών αλλά και ασθενών με διαβητική νεφροπάθεια έχει δείξει ότι η έκφραση SIRT1 είναι χαμηλή στο σπείραμα όμως ενεργοποιητές του όπως η ρεσβεατρόλη, και σε αυτή την περίπτωση βελτιώνει την νεφρική λειτουργία, μειώνει την φλεγμονή, την αλβουμινουρία, την απόπτωση, αλλά και το επαγόμενο από την υπεργλυκαιμία οξειδωτικό στρες. Έτσι, όπως και το AMPK, το SIRT1 έχει κυτταροπροστατευτική δράση στα νεφρά. Η αναστολή του συμβάλλει στη νεφρική βλάβη που σχετίζεται με την διαβητική νεφροπάθεια μέσω αρνητικής ρύθμισης της αυτοφαγίας ωστόσο έχει θετική επίδραση στην ινσουλίνη προκαλώντας έκκρισή της και καταστέλλοντας τους αρνητικούς ρυθμιστές της σηματοδότησής της [139].

Τα ποδοκύτταρα, ως πλήρως διαφοροποιημένα, έχουν πολύ μικρή ικανότητα πολλαπλασιασμού και συνεπώς διαθέτουν πολύ υψηλά επίπεδα αυτοφαγίας για την διατήρηση της ομοιόστασής τους. Διαγραφή του Atg5, σε πειραματικά μοντέλα, προκάλεσε σπειραματοπάθεια, σπειραματοσκλήρυνση, αύξηση των οξειδωμένων πρωτεϊνών, στρες του ΕΔ, αύξηση της πρωτεϊνουρίας και απώλεια ποδοκυττάρων. Στον αντίποδα, διαγραφή της Raptor και κατ' επέκταση μειορρύθμιση του mTORC1, οδήγησε σε μείωση της πρωτεϊνουρίας, μείωση της αύξησης του μεσεγχυματικού διάμεσου ιστού και της σπειραματοσκλήρυνσης και μείωσε την εξέλιξη της διαβητικής νεφροπάθειας, επιβεβαιώνοντας ότι το ενεργό mTORC1 καταστέλλει την αυτοφαγίας στα ποδοκύτταρα κατά τον διαβήτη [139].

Ορόσημο της διαβητικής νεφροπάθειας, είναι η αύξηση του μεσάγγειου με υπερτροφία των μεσαγγειακών κυττάρων και αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους. Σε συνδυασμό με την αύξηση των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας παρατηρείται σπειραματοσκλήρυνση. Η αυτοφαγία μείωσε την παρουσία πρωτεϊνών

της εξωκυττάριας ουσίας προωθώντας την αποικοδόμηση του ενδοκυττάριου κολλαγόνου I [145]. Μελέτες έχουν δείξει ότι στην διαβητική νεφροπάθεια υπάρχει δυσλειτουργία του αυτοφαγοκυτταρικού μηχανισμού πιστεύεται ότι η αυτοφαγία αναστέλλεται λόγω αναστολής του tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP3) καθώς ανευρίσκεται μειωμένος τόσο πειραματικά μοντέλα διαβητικών ποντικών όσο και σε ασθενείς με διαβητική νεφροπάθεια. Αυτό συμβαίνει γιατί η μείωση του TIMP3 οδηγεί σε μείωση της έκφρασης του FoxO1 το οποίο με τη σειρά του προκαλεί την αναστολή γονιδίων που επάγουν την αυτοφαγία [139].

1.10 ΣΤΕΡΗΣΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ

1.10.1 GCN2 κινάση

Η κινάση Gcn2 είναι περισσότερο γνωστή σαν ρυθμιστής της έναρξης μετάφρασης ως απάντηση στην στέρηση αμινοξέων. Η Gcn2 κινάση διατηρείται ανενεργή μέσω διαφόρων αυτό-ανασταλτικών μοριακών αλληλεπιδράσεων, εξασφαλίζοντας ότι παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση μέχρι να προκύψει σήμα ενεργοποίησής της [146]. Ο μοριακός μηχανισμός ενεργοποίησής της περιλαμβάνει τη δέσμευση των αφόρτιστων tRNAs, γεγονός που οδηγεί σε δομική μετατροπή και ενεργοποίηση της GCN2. Αυτό το μονοπάτι απαιτεί την GCN1, που εξασφαλίζει την παράδοση του αφόρτιστου tRNA στην GCN2 η οποία αυτοφωσφορυλιώνεται. Ωστόσο, η GCN2 εκτός από την αποστέρηση αμινοξέων ενεργοποιείται και μετά από στέρηση πουρινών, υπερϊώδη ακτινοβολία, υποξία, οξειδωτικό στρες (H₂O₂), παρουσία μεθυλγλυοξάλης ή ραπαμυκίνης, οσμωτικό στρες και στρες του ΕΔ [147] [148] [146].

Η GCN2 φωσφορυλιώνει τον eIF2α στην σερίνη 51 και μετατρέπει το eIF2 στον ανταγωνιστικό αναστολέα του, το eIF2B. Με αυτό τον τρόπο προσκαλείται μειωμένη καθολική πρωτεϊνσύνθεση και, ως εκ τούτου, μειωμένη συνολική χρήση αμινοξέων. Η φωσφορυλίωση του eIF2α, όπως είδαμε και στο στρες του ΕΔ, οδηγεί στην μετάφραση των εναλλακτικών πλαισίων ανάγνωσης και επιτρέπει την μετάφραση του ATF4 [146].

Η δραστηριότητα της Gcn2 έχει συσχετιστεί με μια σειρά φυσιολογικών μεταβολικών αποκρίσεων καθώς και με ασθένειες ή διαταραχές. Για παράδειγμα, τα ένζυμα καταβολισμού αμινοξέων χρησιμοποιούνται για σηματοδότηση, όπως η ειδική για την Trp Ινδολαμίνη-2,3-διοξυγενάση (IDO). Τα κύτταρα που εκφράζουν

την IDO προκαλούν εξάντληση Trp στο άμεσο κυτταρικό περιβάλλον ώστε να προκαλέσουν αντιδράσεις από γειτονικά κύτταρα, όπως για παράδειγμα την καταστολή του πολλαπλασιασμού των T-κυττάρων με τρόπο εξαρτώμενο από τη λειτουργία Gcn2. Τα καρκινικά κύτταρα εξαρτώνται από το Gcn2 για επιβίωση και πολλαπλασιασμό [146].

Η κινάση Gcn2 ρυθμίζει τον μεταβολισμό των λιπιδίων και την γλυκονεογένεση στο ήπαρ, και αυξάνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη υπό συνθήκες διατροφικών περιορισμών. Στο ανοσοποιητικό σύστημα επάγει την εγγενή ανοσία, ρυθμίζει την διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων, προστατεύει από την αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα και είναι απαραίτητη για την εγκαθίδρυση της μνήμης. Επιπλέον ρυθμίζει την διατροφική συμπεριφορά προς πηγές αμινοξέων, προστατεύει τον εγκέφαλο από την θανατηφόρα λευκοδυστροφία κατά την αποστέρηση αμινοξέων αλλά έχει και συμβολή στην δυσλειτουργία των νευρώνων στο Alzheimer [146].

1.11 ΓΛΥΚΟΛΥΣΗ ΣΤΟΝ ΝΕΦΡΟ

Πλέον είναι γνωστό ότι η γλυκόλυση έχει μικρότερη δυναμική στα εγγύς σωληνάκια σε σύγκριση με άλλα μέρη του νεφρού. Βασικά γλυκολυτικά ένζυμα όπως η εξοκινάση, η φωσφοφρουκτοκινάση και η πυρουβική κινάση εκφράζονται ελάχιστα στα επιθηλιακά κύτταρα των εγγύς σωληναρίων σε σχέση με τον υπόλοιπο νεφρικό ιστό. Στο άπω εσπειραμένο σωληνάριο η δραστηριότητα της εξοκινάσης είναι 15 φορές υψηλότερη στο διευρυμένο ανοδικό τμήμα της αγκύλης του Henle από ότι στο εγγύς σωληνάριο. Ομοίως, η πυρουβική κινάση, ενεργοποιείται περισσότερο στα αθροιστικά σωληνάκια αλλά όχι στα εγγύς. Στα κύτταρα των εγγύς σωληναρίων, η γλυκόλυση συμβάλλει μόνο στο 4% της νεφρικής παραγωγής ATP υπό αερόβιες συνθήκες καθώς ο ρυθμός επαναρρόφησης της είναι 35 pmol/min ανά mm, ενώ η δραστηριότητα της εξοκινάσης είναι περίπου 2 pmol/min ανά mm. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι μόνο το 5% της γλυκόζης που εισέρχεται στο κύτταρο φωσφορυλιώνεται στα εγγύς σωληνάκια. Το μεγαλύτερο μέρος της γλυκόζης δεν χρησιμοποιείται φυσιολογικά ως πηγή ενέργειας, αλλά απελευθερώνεται στα περιπνευματικά τριχοειδή μέσω του μεταφορέα γλυκόζης GLUT-2 στη βασοπλευρική μεμβράνη των κυττάρων των εγγύς σωληναρίων [149].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή-σκοπός

Τα πειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα αδυνατούν να ελαττώσουν την έκφραση του μεταφορέα GLUT-1 και σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης, η εισροή γλυκόζης στο κυτταρόπλασμα είναι αυξημένη. Όπως αναφέρθηκε στο γενικό μέρος, η υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης, οδηγεί στην αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών με αποτέλεσμα την θραύση των αλυσίδων του DNA και την ενεργοποίηση της PARP. Συνέπεια της ενεργοποιημένης PARP, είναι η απενεργοποίηση της GAPDH και η αναστολή της φυσιολογικής οδού της γλυκόλυσης, με προώθηση του μεταβολισμού της γλυκόζης προς το μονοπάτι των πολυολών, των εξοζαμινών, την ενεργοποίηση του PKC και της παραγωγής AGEs.

Η αυξημένη παραγωγή AGEs καθώς και η συσσώρευση των O-Glc-Nac τροποποιημένων πρωτεϊνών, η αύξηση των ROS αλλά και η πρωτεϊνουρία οδηγούν στο στρες του Ενδοπλασματικού Δικτύου. Σε μοριακό επίπεδο, πολλές μελέτες έχουν συνδέσει το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ) ως τον βασικό παράγοντα στην ανάπτυξη και εξέλιξη της νεφρικής νόσου, ανεξαρτήτως εάν αποδίδεται σε πρωτοπαθή πειραματονεφρίτιδα, πειραματική νόσο λόγω γενετικών μεταλλάξεων, διαβητική νεφροπάθεια (ΔΝ), οξεία νεφρική βλάβη (ΟΝΒ), ΧΝΑ ή νεφρική ίνωση [118].

Στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα έχει αποδειχτεί ότι η στέρηση αμινοξέων οδηγεί στην ενεργοποίηση της Gcn2 κινάσης και σε μείωση της έκφρασης του μεταφορέα GLUT-1 [150]. Την υπόθεση ότι το ίδιο φαινόμενο μπορεί να συμβαίνει και στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στηρίζουν αποτελέσματα *in vivo* μελέτης, με τον ενεργοποιητή της Gcn2 κινάσης, αλοφουτζινόνη, που έδειξαν προστατευτική δράση έναντι της διαβητικής νεφροπάθειας [152].

Η γλυκοτοξικότητα των ενδοθηλιακών κύτταρων των νεφρικών τριχοειδών έχει μελετηθεί εκτενώς στην διαβητική νεφροπάθεια, καθώς είναι μικροαγγειακή επιπλοκή του σακχαρώδη διαβήτη. Σε συνθήκες υπεργλυκαιμίας η εισροή γλυκόζης από τα RPTECs είναι αυξημένη και οι γλυφοζίνες, ως αναστολείς των SGLT2, έχουν δείξει προστατευτική δράση στους νεφρούς. Συνεπώς έπρεπε να διερευνηθεί η δράση του μεταφορέα σε περιβάλλον υψηλής και φυσιολογικής γλυκόζης υπό την επίδραση του αναστολέα δαπαγλιφλοζίνη. Αξιολογήσαμε λοιπόν, αν το καθιερωμένο μοντέλο της γλυκοτοξικότητας στα τριχοειδικά ενδοθηλιακά κύτταρα, λαμβάνει χώρα και στα RPTECs όπου όμως κύριος μεταφορέας γλυκόζης είναι ο SGLT2.

Στόχος της παρούσας διατριβής είναι να διερευνηθεί σε ανθρώπινα πειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα σε περιβάλλον υψηλής γλυκόζης, κατά πόσον η ενεργοποίηση της κινάσης GCN2 ελαττώνει την έκφραση του μεταφορέα γλυκόζης GLUT1 και καταστέλλει τα μεταβολικά μονοπάτια που είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση διαβητικής νεφροπάθειας. Επιπλέον αξιολογήθηκε το καθιερωμένο μοντέλο της γλυκοτοξικότητας των τριχοειδικών ενδοθηλιακών κυττάρων να λαμβάνει χώρα και στα RPTECs όπου κύριος μεταφορέας είναι ο SGLT2. Τέλος μελετήθηκε η προστατευτική δράση της απουσίας τρυπτοφάνης στην επαγόμενη από το στρες-ΕΔ απόπτωση των πρωτογενών ανθρώπινων RPTEC.

Κεφάλαιο 2.

2.1 Ενεργοποίηση GCN2 κινάσης σε περιβάλλον φυσιολογικής και υψηλής γλυκόζης

2.1.1 Υλικά και μέθοδοι

Πρωτογενή ενδοθηλιακά σπειραματικά κύτταρα (GEnC) προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Sciencell Research Laboratories, San Diego, CA. Επώαστηκαν στους 37°C σε 5% CO₂ σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό ενδοθηλιακών κυττάρων (# 2001, Sciencell Research Laboratories) στο οποίο έγινε προσθήκη 5% fetal bovine serum (FBS) (#0025, Sciencell Research Laboratories), 1% endothelial cell growth supplement (#1052, Sciencell Research Laboratories) και 1% διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης (#0503, Sciencell Research Laboratories). Όλες οι φλάσκες και οι κυτταρικές πλάκες βοθρίων είχαν επικάλυψη 2μg/cm φιμπρονεκτίνης (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν έως 80% πληρότητας τρυβλίου και για την συγκομιδή τους έγιναν δύο πλύσεις με 1x Dulbecco's PBS (Sigma-Aldrich). Στην συνέχεια τα κύτταρα συλλέχθηκαν με χρήση θρυψίνης-EDTA (Sigma-Aldrich) και τοποθετήθηκαν σε κυτταρικές πλάκες βοθρίων διαφορετικών συνθηκών ανάλογων με τις απαιτήσεις/συνθήκες του κάθε πειράματος. Όλες οι πλάκες και φλάσκες που χρησιμοποιήθηκαν είχαν προετοιμαστεί με επικάλυψη 2μg/cm² φιμπρονεκτίνης (Sigma-Aldrich)

Στις κυτταρικές πλάκες 6-βοθρίων τοποθετήθηκαν 3x10⁵ κύτταρα, στις 24-βοθρίων τοποθετήθηκαν 5x10⁴ κύτταρα και στις 96-βοθρίων τοποθετήθηκαν 1x10⁴ κύτταρα. Για τις ανάγκες των πειραμάτων οι κυτταροκαλλιέργειες στις πλάκες βοθρίων επώαστηκαν με το κύριο θρεπτικό υλικό για 24 ώρες και στην συνέχεια ακολούθησε 48ωρη επώαση με τις εξής συνθήκες:

α) συνθήκη (C) : φυσιολογική συγκέντρωση γλυκόζης 5,55 mM D-γλυκόζης με ταυτόχρονη προσθήκη 14,45 mM L-γλυκόζης (Sigma-Aldrich) ώστε να επιτευχθεί ίδια ωσμωτικότητα μεταξύ των δύο διαλυμάτων.

β) συνθήκη (HG) : υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης με προσθήκη 20 mM D-γλυκόζης (Sigma Aldrich).

γ) συνθήκη φυσιολογικής γλυκόζης και τρυπτοφανόλης (CT): προσθήκη 0,25mM τρυπτοφανόλης (Sigma Aldrich) σε φυσιολογικής συγκέντρωσης γλυκόζη (C) 5,55 mM D-γλυκόζης, ομοίως με την συνθήκη α.

δ) συνθήκη υψηλής γλυκόζης και τρυπτοφανόλης (HGT) : προσθήκη 0,25mM τρυπτοφανόλης(TRP) σε υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης (HG) 20 mM D-γλυκόζης, ομοίως με την συνθήκη β.

Όλα τα πειράματα επαναλήφθηκαν 10 φορές.

2.1.1.1 Αξιολόγηση κυτταροτοξικότητας τρυπτοφανόλης TRP

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 96 βοθρίων σε συνθήκες C, HG,CT,HGT όπου οι συγκέντρωση της τρυπτοφανόλης αυξήθηκε κλιμακωτά στα 0,125, 0,25 και 0,5 mM. Η κυτταροτοξικότητα μελετήθηκε με την μέτρηση απελευθέρωσης LDH με την χρήση Cytotox Non-Radioactive Cytotoxic Assay kit (Promega Corporation, Madison, WI) βάση του πρωτοκόλλου του κατασκευαστή. Η κυτταροτοξικότητα υπολογίστηκε από την εξίσωση $\text{Κυτταροτοξικότητα \%} = (\text{LDH υπερκείμενου} / \text{Συνολική LDH}) * 100$.

2.1.1.2 Αξιολόγηση κατανάλωσης D-γλυκόζης από τα GEnC πρωτογενή ενδοθηλιακά σπειραματικά κύτταρα

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλάκες των 6 βοθρίων. Η κατανάλωση της γλυκόζης υπολογίστηκε με μέτρηση της μείωσης της D-γλυκόζης του υπερκείμενου των καλλιεργειών υψηλής γλυκόζης (HG) και υψηλής γλυκόζης με τρυπτοφανόλη (HGT). Ο υπολογισμός έγινε αφαιρώντας από την συγκέντρωση της D-γλυκόζης του αρχικού θρεπτικού υλικού, την D-γλυκόζη στο τέλος των πειραμάτων, με την χρήση της συσκευής Element Blood και τις αντίστοιχες ταινίες (Element, Infopria, Titusville, USA).

2.1.1.3 Αξιολόγηση επιπέδων p-eIF2α, GLUT1 και γλυκοζυλιωμένων O-GlcNAc πρωτεϊνών

Ίδιος αριθμός GEnC και για τις τέσσερις συνθήκες, καλλιεργήθηκε σε πλάκες 6 βοθρίων. Στην συνέχεια τα κύτταρα λύθηκαν με T-PER tissue protein extraction reagent (Thermo, FisherScientific, Rockford, IL) εμπλουτισμένο με αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών (Sigma-Aldrich). Η πρωτεϊνική συγκέντρωση ποσοτικοποιήθηκε με μέθοδο Bradford (Sigma-Aldrich) και 10μg χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοστύπωση κατά Western, η οποία κανονικοποιήθηκε με β-ακτίνη (Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Τα κύρια αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το ειδικό για την φωσφορυλίωση του eIF2α στη σερίνη 51 (p-eIF2α) (Cell Signaling Technology), το ειδικό για τον GLUT1 (Santa Cruz Biotechnonogy, Dallas, TX) και το ειδικό έναντι των γλυκοσιλιωμένων O-GlcNAc πρωτεϊνών (Santa Cruz Biotechnonogy, Dallas, TX). Το δεύτερο αντίσωμα που φέρει την χρωστική του μαύρου ραπανακίου, ήταν το IgG μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού (Cell Signaling Technology).

2.1.1.4 Αξιολόγηση επιπέδων Ελεύθερων Ριζών Οξυγόνου

Για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες ίσος αριθμός κυττάρων καλλιεργήθηκε σε πλάκες 96-βοθρίων υπό και των 4 συνθηκών (C, CT, HG και HGT). Μετά το πέρας της επώασης τα κύτταρα βιάφτηκαν με 5μM CellROX® Deep Red Reagent (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) προσθέτοντας τον ιχνηθέτη στο θρεπτικό υλικό και επωάζοντας για 30 λεπτά στους 37 °C. Στην συνέχεια τα κύτταρα πλύθηκαν με 1xD-PBS και η ένταση του φθοριοχρώματος μετρήθηκε στον ειδικό αναλυτή EnSpire® Multimode Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA) με το excitation του φθορισμού και το emission spectra στα 640 και 665nm, αντίστοιχα.

2.1.1.5 Αξιολόγηση επιπέδων 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH)

Η αξιολόγηση της ενεργότητας της GAPDH χρησιμοποιήθηκε το Colometric GAPDH Assay (Sciencell Research Laboratories, #8148). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 24-βοθρίων υπό και των 4 συνθηκών (C, CT, HG και HGT) και εναιωρήθηκαν για 20 λεπτά στους 4°C στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης του προμηθευτή. Κατόπιν, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή του κιτ τα κυτταρικά εκλούσματα τοποθετήθηκαν σε πλάκα 96-βοθρίων και η ενεργότητα της GAPDH μετρήθηκε με χρωματομετρία στα 340nm στον ειδικό αναλυτή EnSpire® Multimode Plate Reader σε χρονικό διάστημα 12 λεπτών. Τα κυτταρικά εκλούσματα στην διαδικασία μέτρησης της GAPDH, ποσοτικοποιήθηκαν με την μέθοδο Bradford.

2.1.1.6. Αξιολόγηση επιπέδων πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC)

Η ποσοτικοποίηση της ενεργότητας της PKC πραγματοποιήθηκε με την χρήση του κιτ χρωματομετρίας PKC Kinase Activity Assay Kit (Abcam, Cambridge, UK). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 6-βοθρίων υπό και των 4 συνθηκών (C, CT, HG και HGT). Μετά το πέρας της επώασης, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με παγωμένο PBS και λύθηκαν με 1ml κατά τις οδηγίες του προμηθευτή. Κατόπιν, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή του κιτ, τα κυτταρικά εκλούσματα τοποθετήθηκαν σε πλάκα 96-βοθρίων και η ενεργότητα της PKC μετρήθηκε με χρωματομετρία στα 450nm στον ειδικό αναλυτή EnSpire® Multimode Plate Reader.

Τα κυτταρικά εκλούσματα στην διαδικασία μέτρησης της PKC, ποσοτικοποιήθηκαν με την μέθοδο Bradford.

2.1.1.7 Αξιολόγηση ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Σορβιτόλης και MGO

Για να αξιολογηθεί η ενδοκυττάρια συγκέντρωση Σορβιτόλης και MGO τα κύτταρα λύθηκαν, χρησιμοποιήθηκε δοκιμασία Bradford (Sigma-Aldrich) και το έκλουσμα τροποποιήθηκε ώστε να περιέχει 2μg πρωτεΐνης ανά μl. Στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν 50 μl του παραπάνω εκλούσματος.

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλάκες των 6 βοθρίων και λύθηκαν με αντιδραστήριο T-PER tissue protein extraction (Thermo Fisher Scientific Inc., Rochford, IL). Η σορβιτόλη μετρήθηκε χρωματογραφικά κάνοντας χρήση του D-Sorbitol Assay Kit (Abcam, Cambridge, UK) ενώ τα MGO ποσοτικοποιήθηκαν με την χρήση του κιτ Human Methylglyoxal ELISA (MyBiosource, San Diego, CA) .

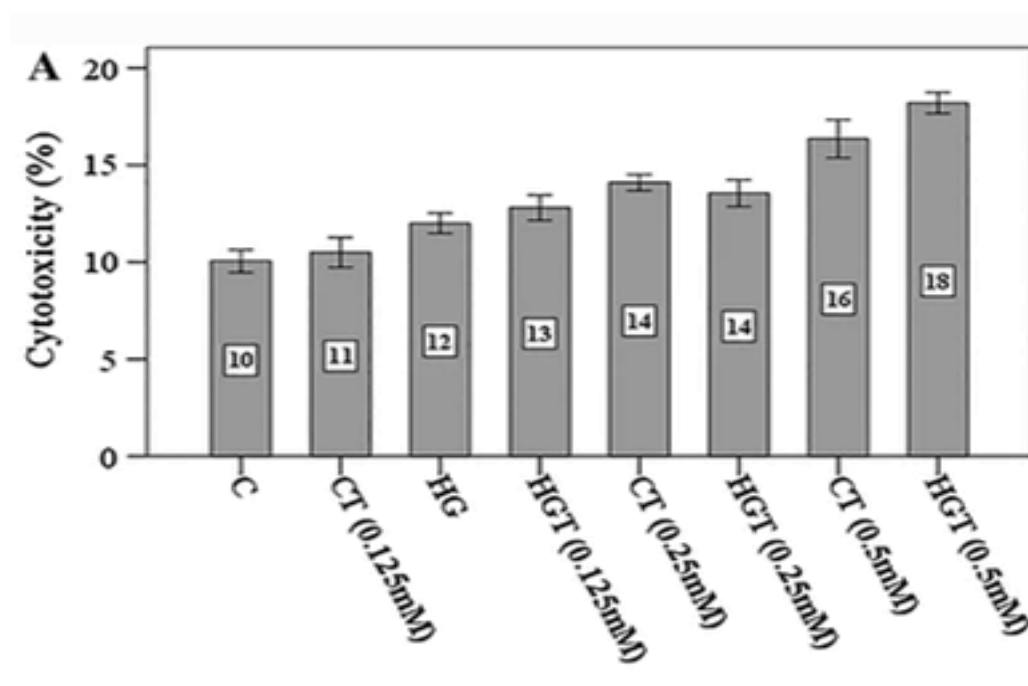
2.2 Στατιστική ανάλυση

Η κανονικότητα των παραμέτρων που αξιολογήθηκαν επιβεβαιώθηκε με δοκιμή one sample Kolmogorov-smirnov. Για την σύγκριση των μέσων όρων χρησιμοποιήθηκε ANOVA με διόρθωση κατά Bonferoni και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσοι όροι \pm τυπική απόκλιση (SD) με το $p < 0.05$ να θεωρείται στατιστικά σημαντικό.

Τα αποτελέσματα της Western Blot εκφράστηκαν ως οπτικές πυκνότητες (OD) και το p value υπολογίστηκε από τους μέσους όρους των οπτικών πυκνοτήτων. Η στατιστική ανάλυση των OD των control αποφεύχθηκε ώστε να μην παραβιαστούν οι παράμετροι της κανονικής κατανομής των συγκρινόμενων μεταβλητών όταν έγινε χρήση παραμετρικού στατιστικού τεστ. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως OD και οι μπάρες σφάλματος αντιστοιχούν σε 2SD.

2.3 Αποτελέσματα

2.3.1 Η συγκέντρωση Τρυπτοφάνης 0.25mM δεν είναι τοξική για τα GEnC και ενεργοποιεί την GCN2 κινάση.

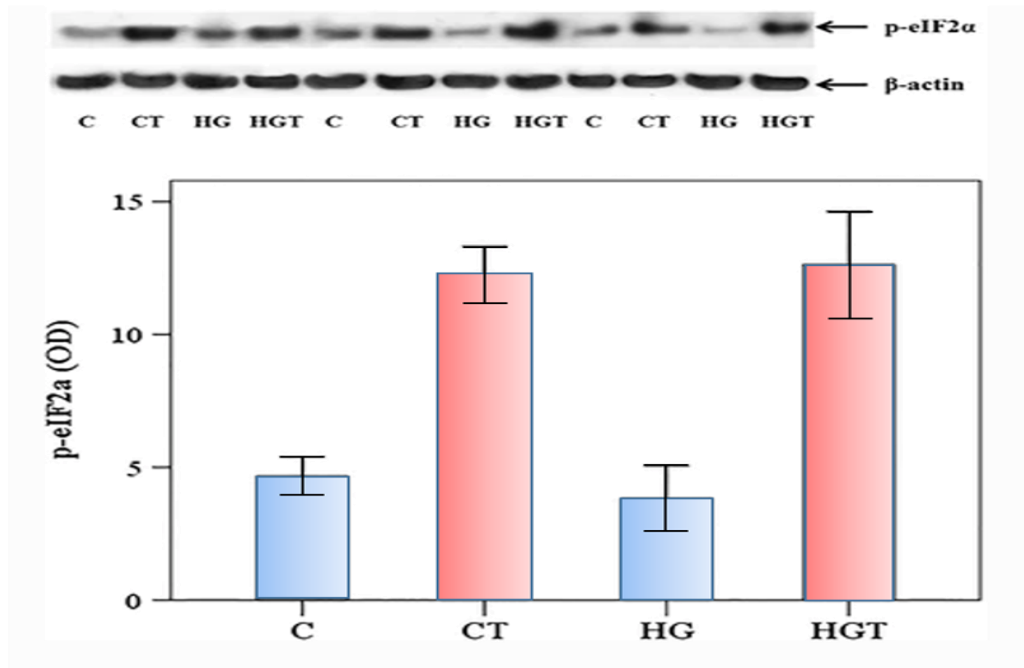


Στις κυτταροκαλλιέργειες των GEnC υπό φυσιολογική και υψηλή γλυκόζη, με ή χωρίς αυξανόμενη συγκέντρωση τρυπτοφάνης (0,125mM, 0,25mM και 0,5mM), η κυτταροτοξικότητα για 0,5mM τρυπτοφάνης, κυμάνθηκε στο $10,05 \pm 0,93\%$ για την συνθήκη φυσιολογικής γλυκόζης, ενώ για την υψηλής κυμάνθηκε στο $18,20 \pm 0,86\%$. Η παρουσία υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης αύξησε την κυτταροτοξικότητα από $10,05 \pm 0,93\%$ σε $12,00 \pm 0,82\%$.

Στην συνθήκη φυσιολογικής γλυκόζης, υπό παρουσία 0,25mM τρυπτοφάνης η κυτταροτοξικότητα κυμάνθηκε στο $14,10 \pm 0,66\%$ και δεν ήταν υψηλότερη από αυτή

που παρατηρήθηκε στην συνθήκη υψηλής γλυκόζης με τρυπτοφάνη που κυμάνθηκε στο $13,55 \pm 1,09\%$.

Βάση αυτών των παρατηρήσεων η συγκέντρωση τρυπτοφάνης που επιλέχθηκε για την διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν τα $0,25\text{mM}$.

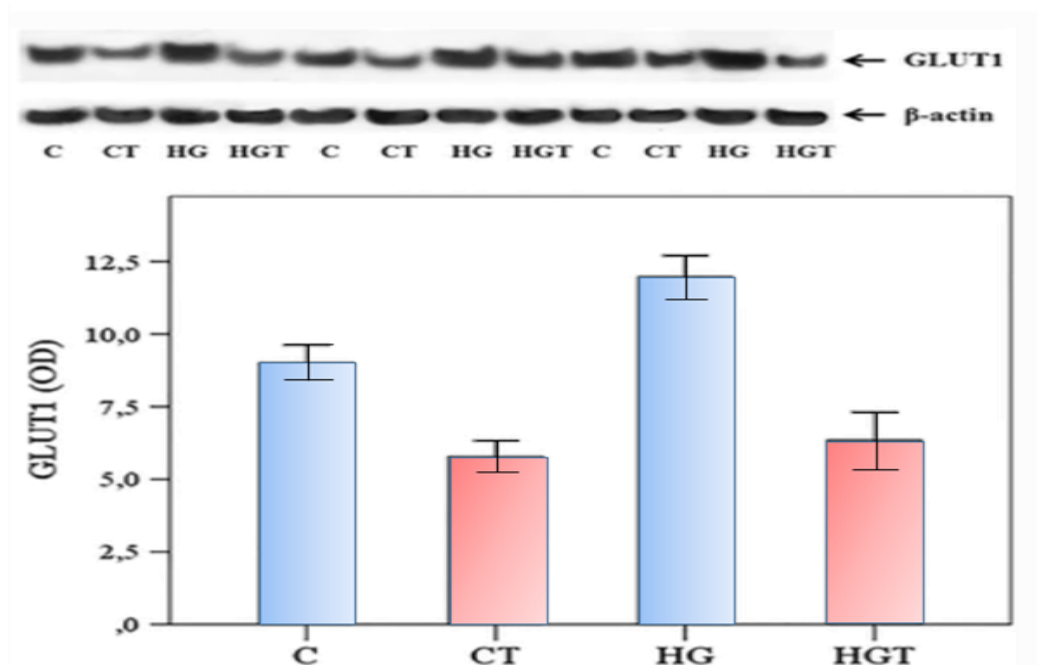


Κατά την σύγκριση των καλλιεργειών φυσιολογικής και υψηλής γλυκόζης δεν προέκυψε διαφορά στα επίπεδα φωσφορυλίωσης του eIF2α ($p=1,000$). Καθώς είναι γνωστό ότι ο eIF2α φωσφορυλιώνεται από την ενεργή κινάση GCN2, συμπεραίνουμε ότι η συγκέντρωση της γλυκόζης δεν επηρεάζει την ενεργότητα της GCN2 και κατά επέκταση την φωσφορυλίωση του eIF2α.

Η προσθήκη τρυπτοφάνης προκαλεί την ενεργοποίηση της GCN2. Όταν στην συνθήκη φυσιολογικής γλυκόζης, έγινε προσθήκη 0,25mM τρυπτοφάνης, η φωσφορυλίωση του eIF2α αυξήθηκε κατά $2,84\pm 1,07\%$ ($p<0,001$) και στην υψηλής γλυκόζης κατά $2,72\pm 0,31\%$ ($p<0,001$).

Προκύπτει λοιπόν ότι η παρουσία τρυπτοφάνης δεν επηρεάζει την φωσφορυλίωση του eIF2α με διαφορετικό τρόπο, ως προς την συγκέντρωση της γλυκόζης ($p=1,00$) καθώς η φωσφορυλίωσή του εξαρτάται αποκλειστικά από την ενεργοποίηση της GCN2 λόγω παρουσίας αφόρτιστων tRNA.

2.3.2 Η υψηλή γλυκόζη αυξάνει την έκφραση των GLUT-1, ενώ η παρουσία TRP μειώνει την έκφραση του μεταφορέα και την κατανάλωση γλυκόζης.

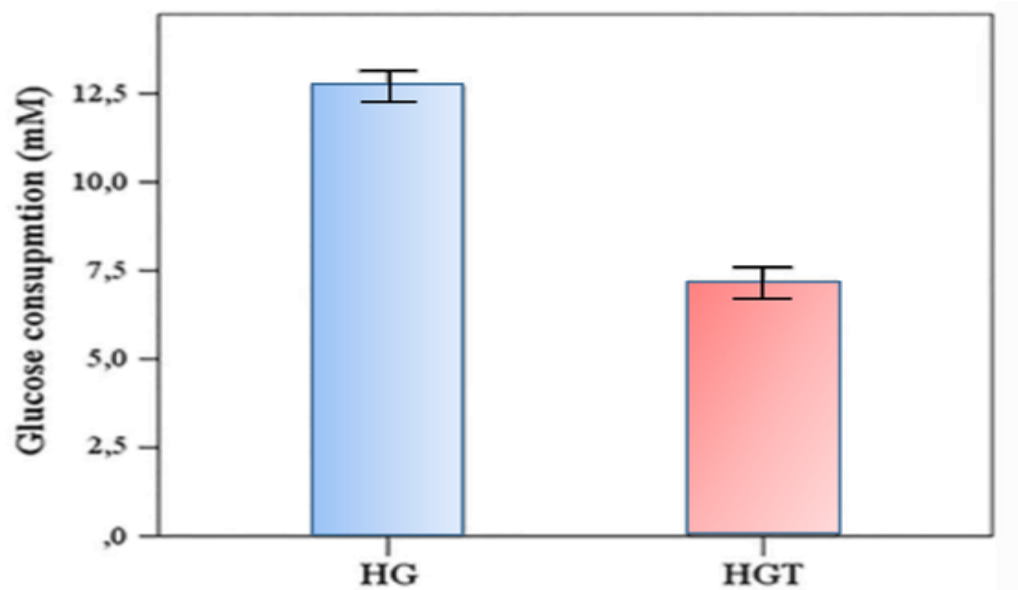


Η παρουσία υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης, οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης του GLUT-1 κατά $1,33 \pm 0,03$ ($p < 0,001$) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασής του στην συνθήκη φυσιολογικής γλυκόζης.

Η προσθήκη TRP, με την συνεπαγόμενη ενεργοποίηση της GCN2 και την φωσφορυλίωση του eIF2 α , μείωσε την έκφραση του GLUT-1 τόσο στην συνθήκη φυσιολογικής γλυκόζης όσο και υψηλής.

Στην συνθήκη φυσιολογικής γλυκόζης οδήγησε σε μείωση της έκφρασης του GLUT-1 στο $0,64 \pm 0,04$ ($p < 0,001$) και στην συνθήκη υψηλής γλυκόζης στο $0,73 \pm 0,23$ ($p < 0,001$).

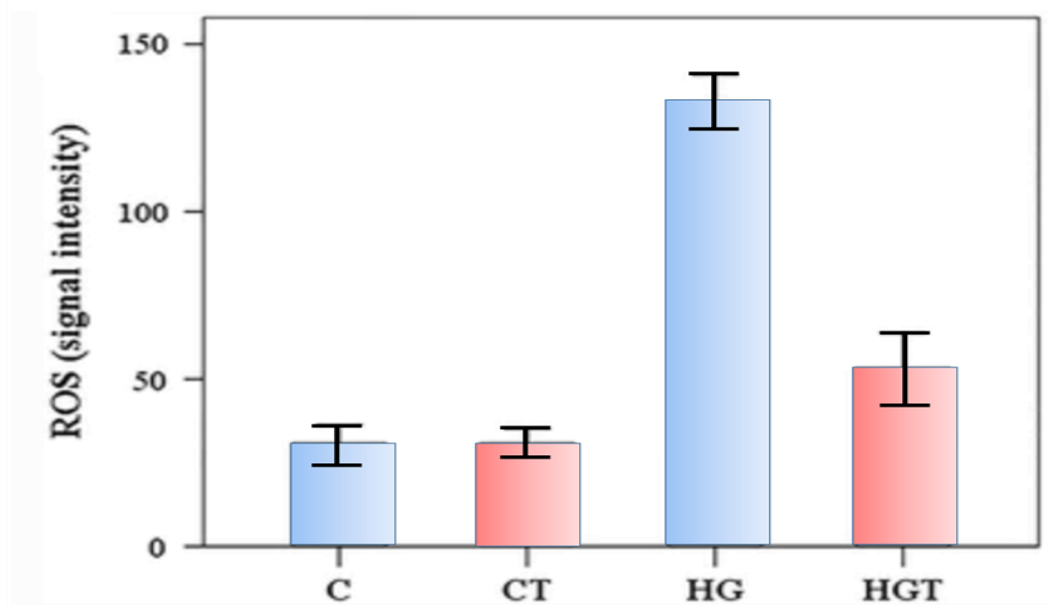
Από αυτή την παρατήρηση, συμπεραίνουμε ότι η ενεργοποίηση της GCN2 προκαλεί μείωση του μεταφορέα, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης γλυκόζης καθώς η ίδια μείωση παρατηρείται και κατά την παρουσία τρυπτοφάνης ($p = 1,000$).



Η επίδραση της παρουσίας τρυπτοφάνης και κατά συνέπεια της ενεργής GCN2, στην έκφραση των GLUT-1, επιβεβαιώνεται και από τον ρυθμό κατανάλωσης D-γλυκόζης ο οποίος μειώνεται από την παρουσία της τρυπτοφάνης.

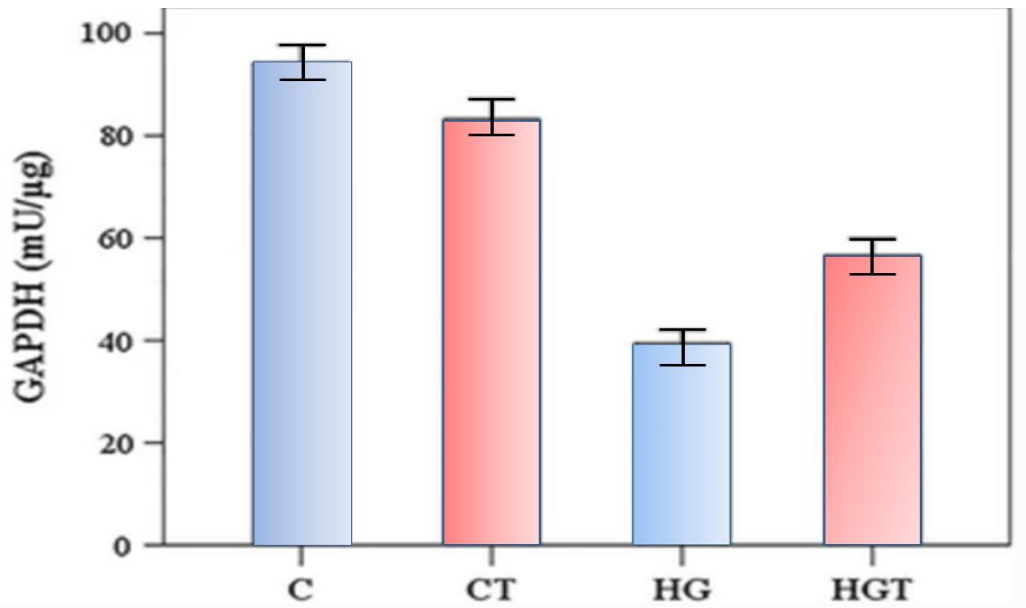
Κατά την συνθήκη υψηλής γλυκόζης, η κατανάλωση μετρήθηκε στα $10,17 \pm 0,53$ mmol/L ενώ η ενεργοποίηση της κινάσης οδήγησε σε μείωση της κατανάλωσης γλυκόζης στα $7,17 \pm 0,66$ mmol/L ($p < 0,001$), υποδεικνύοντας έτσι την παρουσία λιγότερων μεταφορέων στην κυτταρική επιφάνεια.

2.3.3 Η υψηλή γλυκόζη αυξάνει την παραγωγή ROS και μειώνει την GAPDH, ενώ η TRP περιορίζει και τα δύο φαινόμενα.



Κατά την φυσιολογική συγκέντρωση γλυκόζης, τα επίπεδα των ROS, όπως ανιχνεύτηκαν από τον φθορογόνο ιχνηθέτη, κυμάνθηκαν στα $30,83 \pm 9,43$. Η προσθήκη τρυπτοφάνης στη συνθήκη φυσιολογικής γλυκόζης, δεν επηρέασε τα επίπεδα παραγωγής των ROS ($30,83 \pm 7,64$, $p = 1,000$).

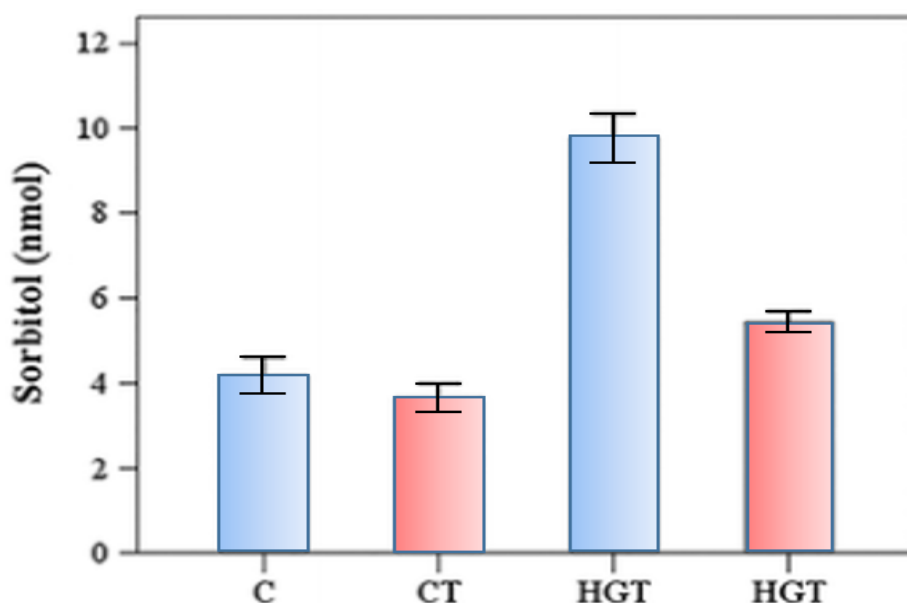
Η παρουσία υψηλής γλυκόζης προκάλεσε ιδιαίτερος υψηλά επίπεδα των ROS, που ανιχνεύτηκαν στα $132,67 \pm 14,09$, $p < 0,001$. Η προσθήκη τρυπτοφάνης στην κυτταροκαλλιέργεια υψηλής γλυκόζης, προκαλώντας την ενεργοποίηση της GCN2, οδήγησε σε μείωση του φθορισμού ανίχνευσης των ROS στα $53,33 \pm 18,13$ ($p < 0,001$). Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με προηγούμενα πειράματα που δείχνουν ότι η προσθήκη τρυπτοφάνης μειώνει την έκφραση των GLUT-1 και την κατανάλωση γλυκόζης.



Υπό συνθήκες φυσιολογικής γλυκόζης, η συγκέντρωση της GAPDH είναι υψηλή ($94,30 \pm 5,31$ mU/μg). Η προσθήκη τρυπτοφάνης, σε αυτή την συνθήκη, δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση της GAPDH ($83,30 \pm 6,13$ mU/μg $p < 0,001$).

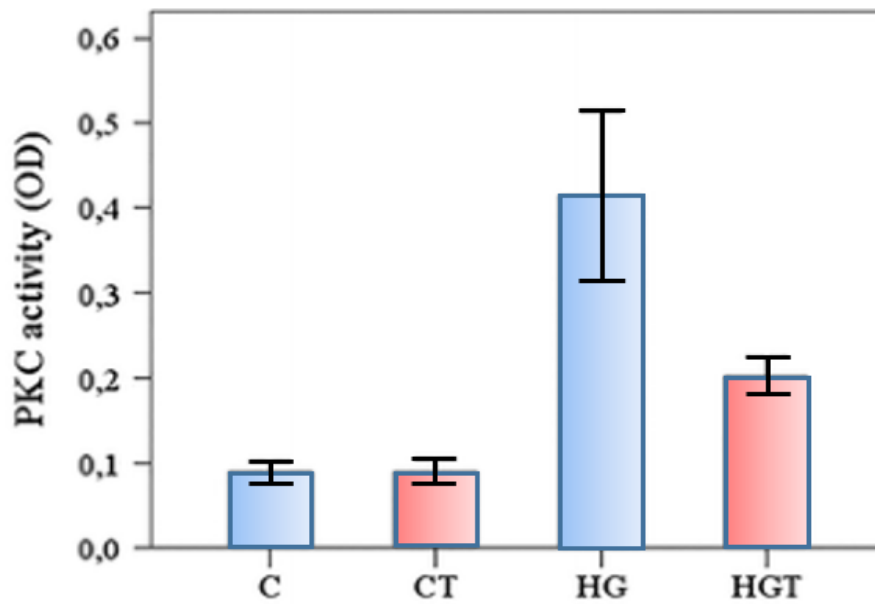
Η αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης, μείωσε δραστικά τα επίπεδα της GAPDH, όπου μετρήθηκε στα $39,50 \pm 4,06$ mU/μg ($p < 0,001$). Στην ίδια συνθήκη, η ενεργοποίηση της GCN2 κινάσης, από την προσθήκη τρυπτοφάνης, οδήγησε σε μέτρηση της GAPDH σε υψηλότερα επίπεδα ($56,70 \pm 5,06$ mU/μg $p < 0,001$).

2.3.4 Η αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης αυξάνει την δραστηριότητα του μονοπατιού των πολυολών, της PKC, των εξοζαμινών και της παραγωγής AGEs στα GEnC , ενώ η τρυπτοφάνη τα προστατεύει.



Η τρυπτοφάνη δεν επηρέασε την περιεκτικότητα των κύτταρων σε σορβιτόλη όταν τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν υπό φυσιολογική συγκέντρωση γλυκόζης ($4,17 \pm 0,68$ έναντι $3,65 \pm 0,55$ nmol, $p=0,523$).

Η υψηλή γλυκόζη αύξησε την περιεκτικότητα των GEnC κύτταρων σε σορβιτόλη, βασικού προϊόντος του μονοπατιού των πολυολών, από $4,17 \pm 0,68$ σε $9,77 \pm 0,92$ nmol ($p<0,001$), ενώ η προσθήκη TRP μείωσε τη σορβιτόλη σε $5,76 \pm 2,52$ nmol ($p<0,001$), δηλαδή, σε υψηλότερο επίπεδο μεν ($p=0,001$) αλλά παρόμοια σε αυτό που παρατηρήθηκε στη φυσιολογική γλυκόζη.

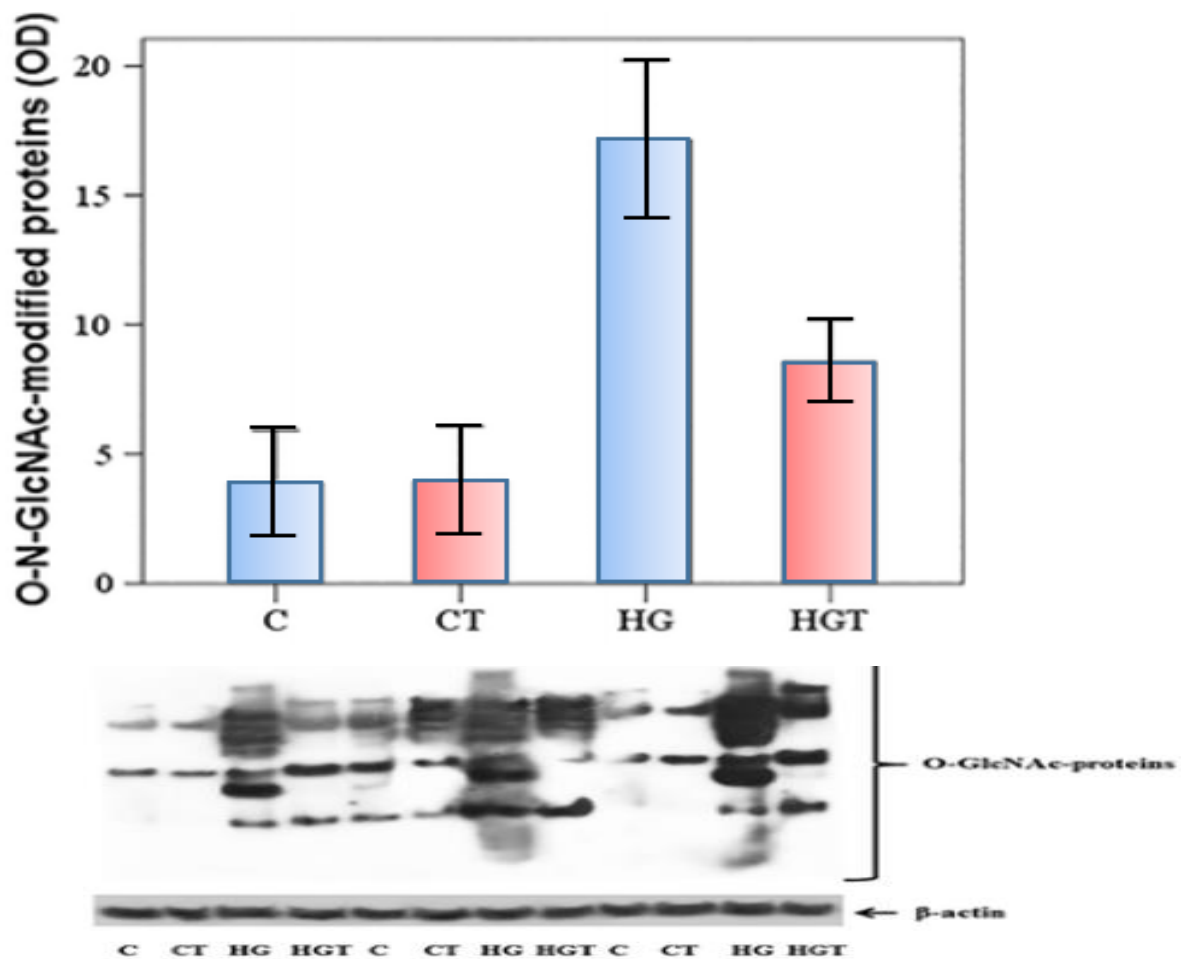


Η φυσιολογική συγκέντρωση γλυκόζης δεν σηματοδοτεί την ενεργοποίηση της PKC κινάσης, με την οπτική της πυκνότητα να μετράται μόλις στο $0,09 \pm 0,02$ ($p < 0,001$). Το ίδιο παρατηρείται εάν στην συνθήκη αυτή προστεθεί τρυπτοφάνη με σκοπό την ενεργοποίηση της GCN2 όπου μετρήθηκε η ίδια οπτική $0,09 \pm 0,03$, ($p = 1,000$)

Η υψηλή γλυκόζη οδήγησε σε σημαντική ενεργοποίηση της PKC, με την οπτική πυκνότητα της δοκιμασίας δραστηριότητάς της να μετράται στο $0,41 \pm 0,16$.

Η τρυπτοφάνη μείωσε τη δραστηριότητα του PKC κατά το ήμισυ όταν προστέθηκε στο περιβάλλον υψηλής γλυκόζης ($0,20 \pm 0,16$, $p < 0,001$), αλλά και πάλι το επίπεδό του PKC παρέμεινε υψηλότερο από αυτό που παρατηρήθηκε στα GENC που καλλιεργήθηκαν σε κανονική γλυκόζη ($p = 0,027$).

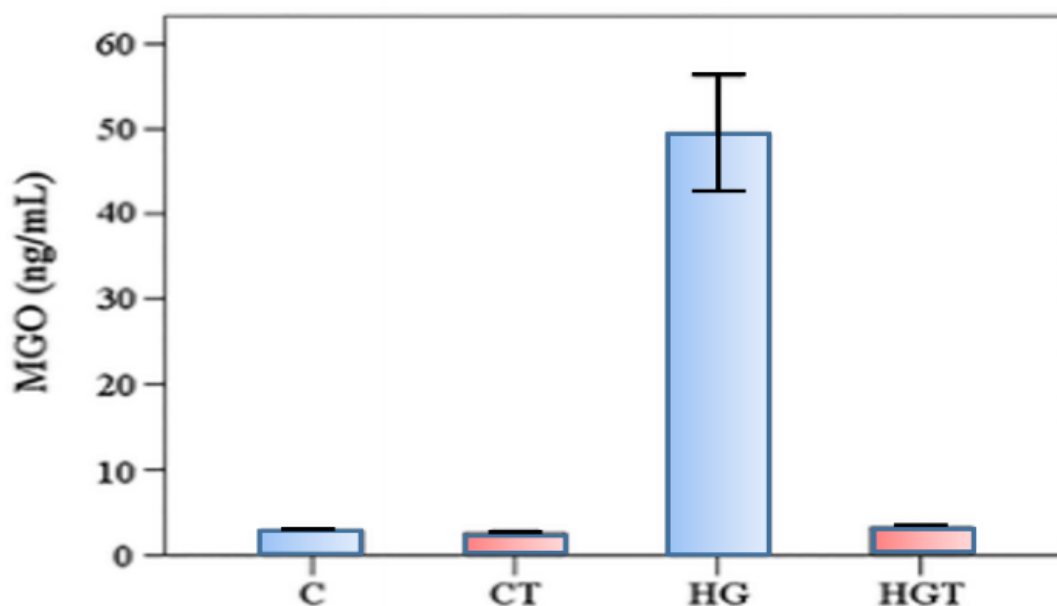
Γίνεται σαφές ότι ο παράγοντας ενεργοποίησης της PKC είναι η γλυκόζη και όχι η τρυπτοφάνη ή η ενεργοποίηση της GCN2. Η ενεργοποίηση της GCN2 σε περιβάλλον υψηλής γλυκόζης δείχνει να έχει ανασταλτική δράση στην ενεργοποίηση του PKC.



Το μονοπάτι των εξοζαμινών μελετήθηκε με τη μέτρηση των τροποποιημένων πρωτεϊνών με GlcNAc.

Υπό κανονική συγκέντρωση γλυκόζης, η TRP δεν επηρέασε το επίπεδο των τροποποιημένων από το O-GlcNAc πρωτεϊνών, καθώς τα επίπεδά παρέμειναν σταθερά ($1,02 \pm 0,44$, $p = 0,231$).

Στη συνθήκη υψηλής γλυκόζης, τα επίπεδα των GlcNAc-πρωτεϊνών, βρέθηκαν αυξημένα κατά $5,18 \pm 1,65$ ($p < 0,001$), όμως προσθήκη τρυπτοφάνης μείωσε σημαντικά τις τροποποιημένες πρωτεΐνες σε $2,62 \pm 0,88$ ($p < 0,001$), παραμένοντας, ωστόσο, σε υψηλότερα επίπεδα από αυτά που παρατηρήθηκαν στην φυσιολογική γλυκόζη ($p < 0,001$).



Στα GEnC, όταν η γλυκόζη είναι φυσιολογική, η συγκέντρωση της MGO, πρόδρομου μορίου των AGEs, ανιχνεύεται στα $2,83 \pm 0,06$ ng/mL. Η προσθήκη τρυπτοφάνης σε αυτή την συνθήκη δεν επηρέασε την παραγωγή μεθυλγλυοξάλης, με τη συγκέντρωσή της να ανιχνεύεται στα $2,52 \pm 0,42$ ng/ml ($p=1,000$).

Η υψηλή γλυκόζη προκάλεσε σημαντική αύξηση της ενδοκυττάριας περιεκτικότητας MGO σε $49,42 \pm 10,68$ ng/mL ($p<0,001$). Η προσθήκη τρυπτοφάνης, στη συνθήκη υψηλής γλυκόζης, μείωσε σημαντικά την περιεκτικότητα των GEnC κυττάρων σε MGO ($3,18 \pm 0,13$ ng/ mL, $p< 0,001$), τιμή που δεν διέφερε από εκείνη που διαπιστώθηκε στην συνθήκη φυσιολογικής γλυκόζης ($p = 1,000$).

Η ενεργοποίηση της GCN2 κινάσης, λόγω παρουσίας της τρυπτοφάνης, αποτρέπει το σχηματισμό MGO σε περιβάλλον υπεργλυκαιμίας προστατεύοντας τα κύτταρα από την τοξική δράση των AGEs.

2.4 Συζήτηση

Με εφελτήριο τις ευεργετικές συνέπειες δίαιτας με στέρηση πρωτεϊνών στην εξέλιξη της διαβητικής νεφροπάθειας [155][154], εξετάστηκε εάν η ενεργοποίηση της κινάσης GCN2, που ανιχνεύει την στέρηση αμινοξέων [48], δρα προστατευτικά στα πρωτογενή ανθρώπινα GEnC, έναντι των επιβλαβών μοριακών μονοπατιών που πυροδοτούνται από την υψηλή γλυκόζη.

Η ενεργοποίηση της κινάσης GCN2 επιτεύχθηκε με τη χρήση τρυπτοφάνης στην σχετικά μη τοξική συγκέντρωση των 0,25mM. Η τρυπτοφάνη ως ανταγωνιστικός αναστολέας της tryptophanyl-tRNA συνθάσης, προκαλώντας αύξηση της δεξαμενής των μη φορτισμένων tRNA, δρα ως φαρμακολογικός ενεργοποιητής της GCN2 κινάσης, με συνεπακόλουθη φωσφορυλίωση του eIF2 α , τροποποιώντας έτσι το κυτταρικό μεταφραστικό δυναμικό. Ο eIF2 α , παρουσία τρυπτοφάνης φωσφορυλιώθηκε από την GCN2 και στις δύο συνθήκες γλυκόζης.

Η αυξημένη εισροή γλυκόζης στα GEnC κύτταρα οδήγησε σε αυξημένη παραγωγή μιτοχondριακών ROS, προκαλώντας θραύσεις των DNA αλυσίδων και ενεργοποίηση του ενζύμου PARP, το οποίο πέραν της επιδιόρθωσης του DNA, προκάλεσε την αναστολή της δράσης της GAPDH. Η ενεργοποίηση της GCN2 κινάσης, μέσω προσθήκης τρυπτοφάνης, ελάττωσε την παραγωγή ROS και τις θραύσεις στο DNA, καθώς τα επίπεδα της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης αποκαταστάθηκαν σχεδόν σε φυσιολογικά επίπεδα όμοια με εκείνα που παρατηρήθηκαν σε κατάσταση φυσιολογικής συγκέντρωσης γλυκόζης.

Όπως έχει επιβεβαιωθεί σε διάφορες μελέτες [48], έτσι και στην διαβητική νεφροπάθεια, η αρχική αιτία της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, φαίνεται να είναι η αυξημένη εισροή γλυκόζης. Η αδυναμία των κυττάρων να μειώσουν τη ρύθμιση των GLUTs, σε συνδυασμό με το περιβάλλον υψηλής γλυκόζης, συμβάλλει στην

αυξημένη εισροή της στο κυτταρόπλασμα και αυτό έχει επιβεβαιωθεί στα μεσαγγειακά κύτταρα, τα οποία αυξάνουν την ρύθμιση των GLUT-1, όταν καλλιεργούνται σε συνθήκες υψηλής γλυκόζης [151]. Στην παρούσα μελέτη, η ενεργοποίηση της GCN2 κινάσης μείωσε, την επαγόμενη από την υπεργλυκαιμία, έκφραση του GLUT- 1, τόσο στην καλλιέργεια υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης όσο και στην φυσιολογικής συγκέντρωσης. Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί και στα ανθρώπινα T-λεμφοκύτταρα [150].

Στα κύτταρα GEnC που καλλιεργήθηκαν σε περιβάλλον υψηλής γλυκόζης χωρίς TRP, η κατανάλωση γλυκόζης ήταν υψηλότερη από εκείνη που παρατηρήθηκε παρουσία TRP και, κατά συνέπεια, παραλληλίστηκε με τις αλλαγές στην έκφραση των GLUT-1. Αυτό επιβεβαιώνει ότι στα ανθρώπινα πειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα, η έκφραση των μεταφορέων GLUT-1 ρυθμίζει την εισροή γλυκόζης στο κύτταρο.

Η αυξημένη εισροή γλυκόζης στα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι γνωστό ότι προκαλεί την παραγωγή μιτοχονδριακών ROS που οδηγούν σε θραύσεις της αλυσίδας DNA. Αυτό επάγει την ενεργοποίηση του επιδιορθωτικού ενζύμου PARP, το οποίο επιπλέον τροποποιεί και αδρανοποιεί την GAPDH [156]. Στην παρούσα μελέτη, η καλλιέργεια GEnC σε συνθήκες υψηλής γλυκόζης, οδήγησε σε μεγάλη παραγωγή μιτοχονδριακών ROS, φαινόμενο που όμως δεν παρατηρήθηκε όταν στην ίδια συνθήκη έγινε προσθήκη τρυπτοφάνης. Οι μεταβολές αυτές στην παραγωγή ROS, ήταν σε συνάφεια με αντίστοιχες αλλαγές στη δραστηριότητα της GAPDH. Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι μειώνοντας την έκφραση GLUT-1 και κατ' επέκταση την εισροή γλυκόζης στο κυτταρόπλασμα των GEnC, η ενεργοποίηση της κινάσης GCN2 αποτρέπει τα αρχικά επιβλαβή μοριακά συμβάντα που προκαλούνται από υψηλή γλυκόζη.

Αξιολογήσαμε την επίδραση της ενεργοποίησης της GCN2 κινάσης, στα τέσσερα γνωστά επιβλαβή μεταβολικά μονοπάτια, που παρατηρούνται στην κυτταρική βλάβη από την υπεργλυκαιμία. Κατά την αυξημένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση γλυκόζης και την επαγόμενη αναστολή της GAPDH, δημιουργείται μεγάλη συσσώρευση των εκατέρωθεν προϊόντων της γλυκόλυσης. Το μονοπάτι των πολυολών είναι το πρώτο που ανακαλύφθηκε να εμπλέκεται στις χρόνιες επιπλοκές του σακχαρώδη διαβήτη [157]. Σε αυτόν τον κύκλο πειραμάτων, η καλλιέργεια των GEnC σε περιβάλλον υψηλής γλυκόζης, οδήγησε σε σημαντικά αυξημένη συγκέντρωση σορβιτόλης, που όμως μειώθηκε σημαντικά από την προσθήκη τρυπτοφάνης. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η ενεργοποίηση της GCN2 κινάσης και η συνεπαγόμενη διατήρηση της ενεργότητας της GAPDH λόγω μείωσης εισροής γλυκόζης, εξουδετερώνει την υπερδραστηριότητα του μονοπατιού των πολυολών, που προκαλείται από την υψηλή γλυκόζη.

Η αυξημένη συγκέντρωση Frc-6P, λόγω αναστολής της GAPDH, είδαμε αναλυτικότερα σε προηγούμενο κεφάλαιο, ότι οδηγεί στην συνάθροιση UDP-GlcNAc και κατά συνέπεια προκαλεί την συσσώρευση πρωτεϊνών με τροποποίηση O-GlcNAc. Ως προς τον ΣΔ, την διαβητική νεφροπάθεια και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, διαπιστώθηκε ότι η υψηλή γλυκόζη προκαλεί αυτή την τροποποίηση σε σημαντικές πρωτεΐνες όπως ο παράγοντας μεταγραφής Sp1, με αποτελέσματα την παραγωγή του προ-ινωτικού TGF-β1 και του αναστολέα του ενεργοποιητή πλασμινογόνου 1 (PAI-1) αλλά και με αναστολή του eNOS, συμβάλλοντας στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που χαρακτηρίζει την ΔΝ [158] [159]. Σε αυτή τη μελέτη, δείξαμε ότι στα πειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα, η υψηλή γλυκόζη αύξησε εντυπωσιακά το επίπεδο των τροποποιημένων από το O-GlcNAc πρωτεϊνών, όμως η ενεργοποίηση της κινάσης GCN2 μείωσε σημαντικά αυτό το φαινόμενο.

Το επόμενο μονοπάτι που μελετήθηκε κα σχετίζεται με τις χρόνιες επιπλοκές του Σ.Δ. είναι αυτό των διαγλυκερολών, που οδηγεί στην ενεργοποίηση του PKC. Η αυξημένη εισροή γλυκόζης και η αναστολή της GAPDH, οδηγούν σε συνάθροιση της Frc-1,6-bis-P που μεταβολίζεται σε DAG και οδηγεί στην ενεργοποίηση του PKC. Το ενεργοποιημένο PKC επιδεινώνει τη νεφρική λειτουργία με ποικίλους τρόπους, που προαναφέρθηκαν αναλυτικά, μεταξύ των οποίων και με την αύξηση του προϊνωτικών παράγοντα TGF-β1 [160] αλλά και με την τροποποίηση της έκφρασης της συνθάσης ενδοθηλιακού μονοξειδίου του αζώτου (eNOS) [161]. Στην παρούσα μελέτη αποδείχτηκε ότι στα ανθρώπινα πειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα, η υπεργλυκαιμία οδήγησε σε μεγάλη δραστηριότητα της PKC κινάσης. Η προσθήκη τρυπτοφανόλης ενεργοποιώντας την GCN2 κινάση, μείωσε την εισροή γλυκόζης και διατήρησε μειωμένη την ενεργότητα του PKC.

Το τελευταίο αλλά εξίσου σημαντικό μεταβολικό μονοπάτι που εμπλέκεται στην παθογένεια των χρόνιων επιπλοκών της ΔΝ, είναι ο σχηματισμός των AGEs. Στα ενδοθηλιακά κύτταρα και σε περιβάλλον υψηλής γλυκόζης, η συσσωρευμένη 3-φωσφορική γλυκεριναλδεΰδη (GA3P) μεταβολίζεται σε μεθυλγλυοξάλη (MGO), πρόδρομο μόριο των AGEs. Η MGO μπορεί να τροποποιήσει πολλές ενδοκυττάρια πρωτεΐνες, όπως το πρωτεάσωμα, ή μπορεί να διαχυθεί έξω από το κύτταρο παράγοντας εξωκυττάρια AGEs, τα οποία ασκούν την επίδρασή τους μέσω των υποδοχέων RAGE. Στην παρούσα μελέτη, στα GEnC, η υψηλή γλυκόζη αύξησε σημαντικά την συγκέντρωση των MGO, ενώ η ενεργοποίηση της κινάσης GCN2 μείωσε την παρουσία τους.

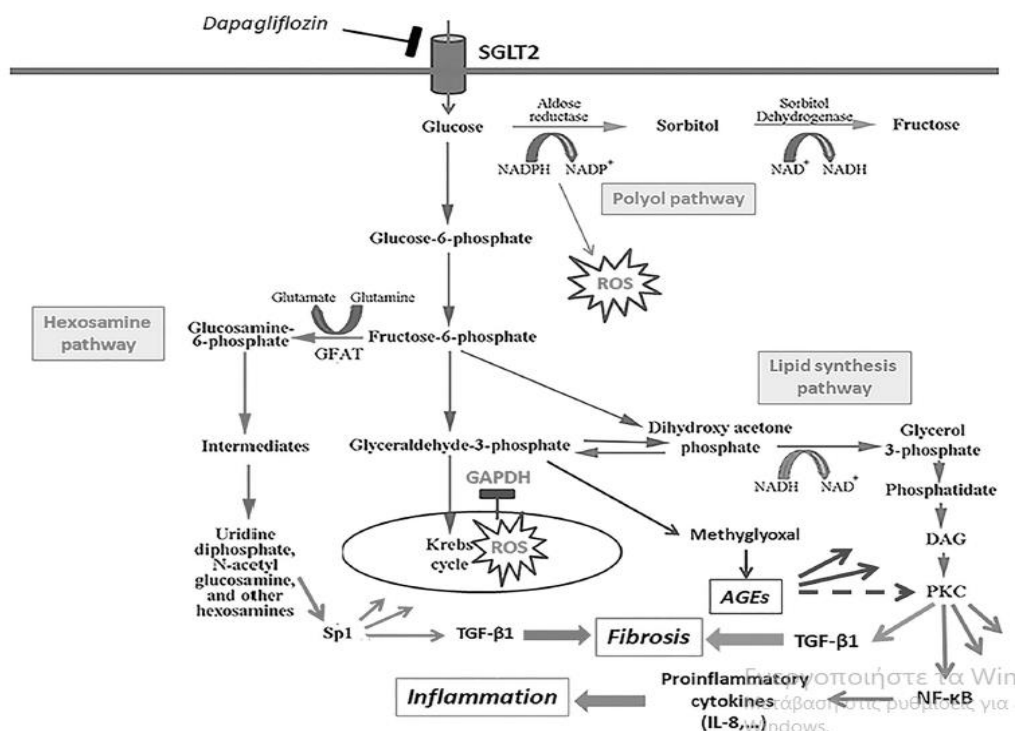
Η μελέτη των Sato et.al, έδειξε ότι η αλοφουτζινόνη, που είναι εγκεκριμένο ορφανό φάρμακο για τη θεραπεία του σκληροδέρματος, στη διαβητική νεφροπάθεια, αποτρέπει την εναπόθεση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, λόγω παρεμβολής στην μεταγωγή του σήματος του TGF-β1 [152]. Η αλοφουτζινόνη όμως, αναστέλλοντας τη

συνθάση-propryl-tRNA, δρα ως ενεργοποιητής της GCN2 κινάσης, φαινόμενο που όμως δεν αξιολογήσαν [153].

Η παρούσα μελέτη επιβεβαίωσε ότι στα πρωτεύοντα πειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα, η ενεργοποίηση της GCN2 κινάσης, αποτρέπει επιβλαβή μεταβολικά γεγονότα που επάγονται από την υψηλή γλυκόζη, αξιώνοντας την ευεργετική επίδραση του περιορισμού των πρωτεϊνών στην εξέλιξη της διαβητικής νεφροπάθειας [154] [155]. Επιπλέον, η παρούσα μελέτη απέδειξε ότι η GCN2 κινάση θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως φαρμακευτικός στόχος για την πρόληψη ή τη θεραπεία της ΔΝ και ενδεχομένως και άλλων αγγειακών επιπλοκών της. Το πλεονέκτημα μιας τέτοιας προσέγγισης έγκειται στο γεγονός ότι η ενεργοποίηση της GCN2 κινάσης, μειώνοντας την εισροή γλυκόζης, αποτρέπει τη παραγωγή των ROS και μειώνει την δράση των επιβλαβών μεταβολικών μονοπατιών που προκύπτουν από την έκθεση των ενδοθηλιακών κυττάρων στην υψηλή γλυκόζη. Αντίθετα, οι κλινικές μελέτες αναφερόμενες σε θεραπεία των αγγειακών επιπλοκών της DM αναστέλλοντας μόνο μία από τις τέσσερις οδούς κάθε φορά, όπως με αναστολείς της αλδόζης [162] ή με αναστολείς PKC-β [163], δεν παρουσίασαν σημαντικά ευρήματα.

Κεφάλαιο 3.

3.1 Αναστολή SGLT-2 από Δαπαγλιφλοζίνη



Εικόνα 28: αναστολή SGLT2 από την δαπαγλιφλοζίνη [164]

Η δαπαγλιφλοζίνη μεταβολίζεται από την τρανσφεράση UGT1A σε αδρανή μεταβολίτη και αποβάλλεται κατά 75% από τους νεφρούς. Ο μεταβολισμός της δεν εμπλέκεται με το ηπατικό κυτόχρωμα P 450 ενώ επί χρόνιας νεφρικής νόσου αυξάνεται η έκθεση στο φάρμακο από 30 έως 80% , γι' αυτό δεν χορηγείται σε GFR<60ml/min. Οι μελέτες φάσης 3 και οι μεταanalύσεις δείχνουν ότι η νταπαγλιφλοζίνη ως μονοθεραπεία μειώνει την HbA1c 0,54% (όταν baseline A1c <8%) ενώ είναι μεγαλύτερη η μείωση όταν αρχική A1c >8%. Πρόσφατα δεδομένα 4ετίας σύγκρισης νταπαγλιφλοζίνης vs γλιμεπιρίδη ως προσθήκη στη μετφορμίνη έδειξε μείωση 3,65kg (στο τέλος της 4ετίας) με νταπαγλιφλοζίνη vs αύξηση 0,73kg με γλιμεπιρίδη.

3.1.1 Υλικά και μέθοδοι

Πρωτογενή ανθρώπινα νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα εγγύς εσπειραμένων RPTCEs (ScienCell, Carlsbad, CA) καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε περιβάλλον χαμηλής συγκέντρωσης γλυκόζη DMEM (5,5 mM d-γλυκόζη) (Thermo Fisher Scientific Inc., Rochford, IL), και σε περιβάλλον σε υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης DMEM (25 mM d-γλυκόζη) (Thermo Fisher Scientific Inc.), παρουσία ή όχι 15 ng/mL δαπαγλιφλοζίνης (Χημικά Selleck, Μόναχο, Γερμανία). Η χαμηλής συγκέντρωσης γλυκόζη DMEM (5,5 mM D-γλυκόζη) αντιπροσωπεύει την φυσιολογική συγκέντρωση της D-γλυκόζης. Στο θρεπτικό υλικό των κυτταροκαλλιέργειών φυσιολογικής γλυκόζης (5,5 mM D-γλυκόζη) έγινε προσθήκη 19,5 mM L-γλυκόζης (Sigma-Aldrich) ώστε να επιτευχθεί ίδια ωσμωτικότητα διαλύματος με την καλλιέργεια υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης, που ήταν στα 25 mM D-γλυκόζης. Επιπλέον οι κυτταροκαλλιέργειες εμπλουτίστηκαν με 10% εμβρυϊκό ορό βοοειδών (Sigma-Aldrich) αντιβιοτικά 100 U/mL πενικιλίνη και 100 µg/mL στρεπτομυκίνη (Sigma-Aldrich). Για τις ανάγκες των πειραμάτων, τα RPTEC καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 6 βοθρίων (3 x 10⁵ κύτταρα), 24 βοθρίων (5 x 10⁴ κύτταρα) ή πλάκες 96 βοθρίων (1 x 10⁴ κύτταρα), σε συνθήκες υγρασίας με 5% CO₂ και στους 37 °C. Καθένα ένα από τα πειράματα επαναλήφθηκε εννέα φορές.

3.1.1.2 Κατανάλωση Γλυκόζης από τα RPTECs

Για την αξιολόγηση της κατανάλωσης γλυκόζης από τα RPTECs, οι καλλιέργειες επώαστηκαν σε πλάκες των 6 βοθρίων. Μετά το πέρας της επώασης, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση D-γλυκόζης στο υπερκείμενο, κάνοντας χρήση του Element Blood

glucose monitor (Element) και η ευρεθείσα τιμή αφαιρέθηκε από την αρχική συγκέντρωση που είχαν οι καλλιέργειες.

3.1.1.3 Ο SGLT2 ενεργοποίησε την ενεργή ματισμένη κασπάση 3 (activated cleaved caspase 3) και την O-Glc-NAc τροποποίηση πρωτεϊνών

Τα RPTECs καλλιεργήθηκαν σε πλάκες των 6 βοθρίων και μετά το πέρας της πειραματικής διεργασίας, η πρωτεΐνη εκχυλίστηκε με την βοήθεια του αντιδραστηρίου T-PER tissue protein extraction reagent (Thermo Fisher Scientific Inc.) κατόπιν εμπλουτισμού με αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών (Sigma-Aldrich). Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης έγινε με την μέθοδο Bradford (Sigma-Aldrich) και για την ανοσοσύτρωση κατά Western χρησιμοποιήθηκαν 10μg από το κάθε δείγμα.

Τα κύρια αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν έναντι SGLT2 rabbit anti-SGLT2 (Cat. no. AGT-032; Alomone Labs, Jerusalem, Israel), έναντι ματισμένης κασπάσης 3 rabbit anti-cleaved caspase 3 (Cat. no. ab13847; Abcam, Cambridge, UK), έναντι O-Glc-NAc mouse anti-O-Glc-NAc (Cat. no. sc59623; Santa Cruz Biotechnology), και έναντι β-ακτίνης rabbit anti-β-actin (Cat. no. 4967; Cell Signaling Technology).

Μετά την ολονύκτια επώαση των μεμβρανών στους 4 °C με το πρωτεύον αντίσωμα, προστέθηκε το δευτερεύον αντίσωμα anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (Cat. no. 7074; Cell Signaling Technology), ή το anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (Cat. no. 7076; Cell Signaling Technology) και έγινε επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Fisher Scientific Inc.) χρησιμοποιήθηκε για την αποβριδοποίηση των PVDF bolts

για ακόλουθη υβριδοποίηση με άλλο αντίσωμα. Για τη διαδικασία της ECL χρησιμοποιήθηκε το LumiSensor Plus Chemiluminescent HRP substrate kit (GenScript Corporation, Piscataway, NJ) και η πυκνομετρική ανάλυση έγινε με το λογισμικό Image J (National Institute of Health, Bethesda, MD).

3.1.1.4 Παραγωγή των ROS

Τα RPTEC καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 96 βοθρίων και μετά το πέρας της επώασης προστέθηκαν 5 μ M φθορογόνου ιχνηθέτη CellROX Deep Red Reagent (Invitrogen, Life Technologies). Κατόπιν επώασης στους 37⁰C για 30 λεπτά, τα κύτταρα πλύθηκαν με phosphate buffer saline (PBS) (Sigma- Aldrich) και η ένταση του σήματος φθορισμού μετρήθηκε από το EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin Elmer).

3.1.1.5 Ενεργότητα GAPDH και PKC

Ενεργότητα GAPDH και PKC μετρήθηκε αφού πρώτα το προϊόν λύσης τροποποιήθηκε ώστε να περιέχει την ίδια συγκέντρωση πρωτεΐνης κατά Bradford. Για τη δράση της GAPDH, τα RPTEC καλλιεργήθηκαν σε κυτταροκαλλιέργειες 24 βοθρίων και η δραστηριότητα του ενζύμου αξιολογήθηκε με την χρωματομετρική ανάλυση για την GAPDH της Sciencell, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για τη ενεργότητα του PKC, τα RPTEC καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 6 βοθρίων, ξεπλύθηκαν δύο φορές με παγωμένο διάλυμα PBS και λύθηκαν με 1 mL ρυθμιστικό διάλυμα λύσης.

Στη συνέχεια μετρήθηκε χρωματομετρικά η ενεργότητα PKC, με PKC Kinase Activity (Abcam) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

3.1.1.6 Συγκέντρωση D-σορβιτόλης και μεθυλγλυοξάλης.

Στο τέλος των πειραμάτων, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 6 βοθρίων, λύθηκαν με αντιδραστήριο εκχύλισης πρωτεΐνης ιστού T-PER. Ακολούθησε Bradford ώστε κάθε όγκος των προϊόντων λύσης (lysate) να περιέχει 100μg πρωτεΐνης/mL. Η D-σορβιτόλη και η MGO μετρήθηκαν χρωματομετρικά χρησιμοποιώντας το kit D-Sorbitol Assay Kit (Abcam) και το kit ELISA Human Methylglyoxal (MyBiosource, San Diego, CA), αντίστοιχα.

3.1.1.7 Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας

Για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικότητας, τα RPTEC καλλιεργήθηκαν σε πλάκες των 96 βοθρίων. Η κυτταρική νέκρωση προσδιορίστηκε από την απελευθέρωση της γαλακτικής δεϋδρογονάσης (LDH) με την χρήση του kit Cytotox Non-Radioactive Cytotoxic Assay (Promega Corporation) βάση των οδηγιών του κατασκευαστή. Η κυτταροτοξικότητα υπολογίστηκε από την εξίσωση $\text{Κυτταροτοξικότητα \%} = (\text{LDH υπερκείμενου} / \text{Συνολική LDH}) * 100$.

3.1.1.8 Παραγωγή TGF-β1 και IL-8

Τα RPTEC καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 6 βοθρίων. Σε συνέχεια, τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν και οι συγκεντρώσεις TGF-β1 και IL-8 αξιολογήθηκαν χρωματομετρικά με χρήση ενζυμικής σύνδεσης ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού

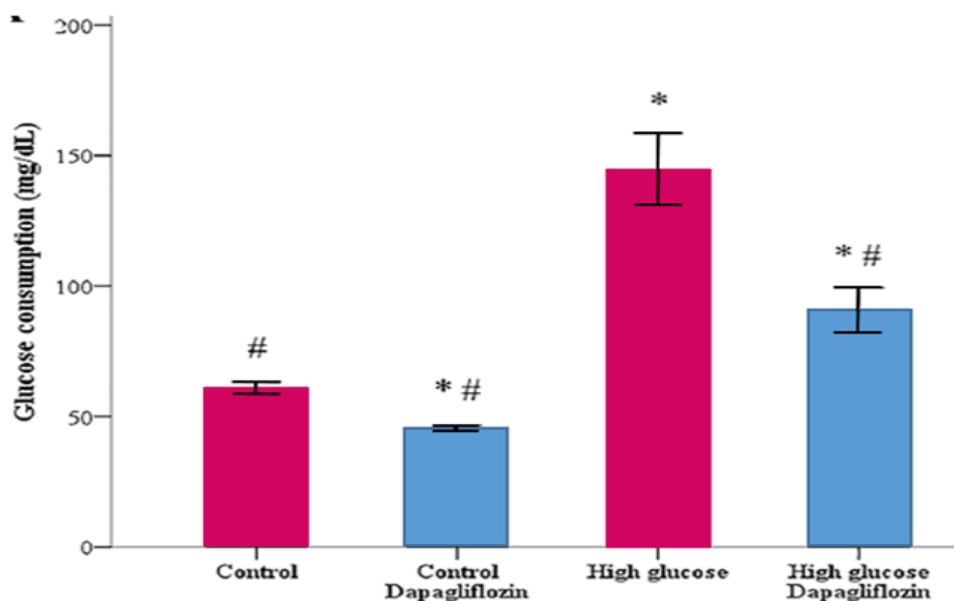
(ELISA). Χρησιμοποιήθηκαν το κιτ ELISA ανθρώπινου TGF-beta-1 (AssayPro, St. Charles, MO) με εύρος ανίχνευσης 31–2000 pg/mL και το κιτ ELISA ανθρώπινης IL-8/NAP-1 (Bender MedSystems GmbH, Βιέννη, Αυστρία) με ανίχνευση εύρους 15,6–1000 pg/mL.

3.2 Στατιστική ανάλυση

Η κανονική κατανομή των μεταβλητών αξιολογήθηκε και επιβεβαιώθηκε με δοκιμή Kolmogorov-Smirnov. Για την σύγκριση των μέσων έγινε Μονόδρομη ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) ακολουθούμενη από τη διόρθωση κατά Bonferroni. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν και απεικονίστηκαν ως μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση (SD) και $p < 0,05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό. Στατιστική ανάλυση έγινε με χρήση του IBM SPSS Statistics for Windows, Έκδοση 20 (IBM Corp., Armonk, NY).

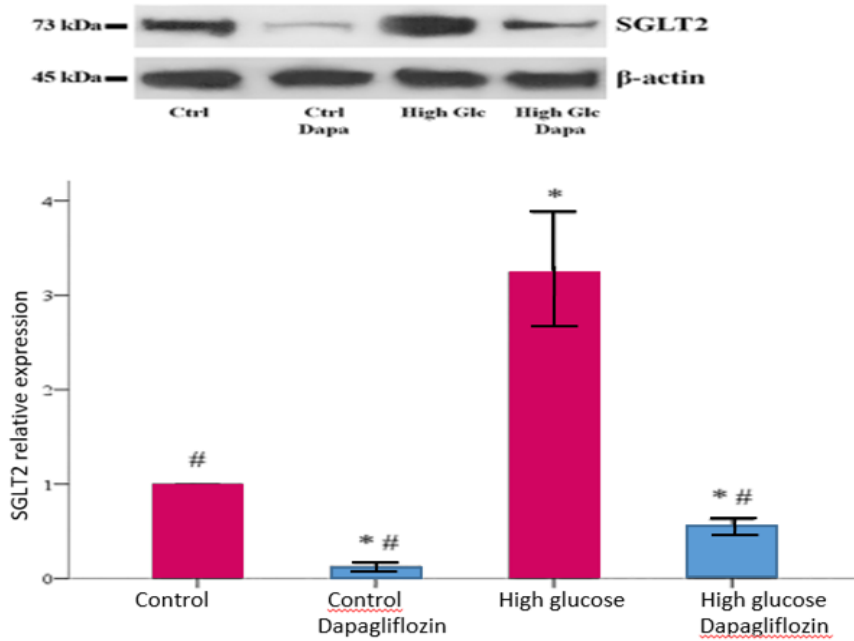
3.3 Αποτελέσματα

3.3.1 Υπο συνθήκες υψηλής γλυκόζης τα RPTECs αυξάνουν την κατανάλωση της γλυκόζης και την έκφραση των SGLT2, ενώ η παρουσία δαπαγλιφοζίνης μειώνει και τα δύο.



Αρχικά αξιολογήσαμε το κατά πόσον η αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης στο καλλιεργητικό υλικό, προκαλεί αύξηση της απορρόφησής της από τα RPTEC και ποια η επίδραση του αναστολέα SGLT2, δαπαγλιφοζίνης.

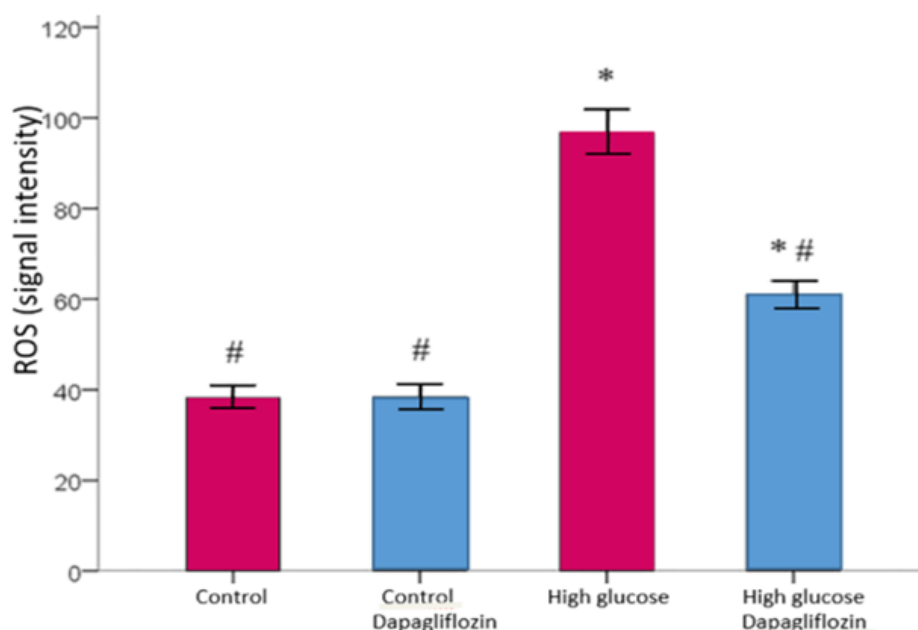
Η πρόσληψη γλυκόζης από τα RPTEC αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσής της, σε σχέση με την συνθήκη φυσιολογικής συγκέντρωσης γλυκόζης. Ωστόσο στην δεύτερη περίπτωση η κατανάλωση δεν φτάνει στο επίπεδο που ανιχνεύθηκε όταν τα RPTEC καλλιεργήθηκαν παρουσία φυσιολογικής συγκέντρωσης γλυκόζης.



Στην συνέχεια εξετάσαμε το κατά πόσον η αύξηση της κατανάλωση γλυκόζης, στην συνθήκη υπεργλυκαιμίας, οφείλεται στην αύξηση έκφρασης των SGLT2 καθώς επίσης και την επίδραση της δαπαγλιφλοζίνης.

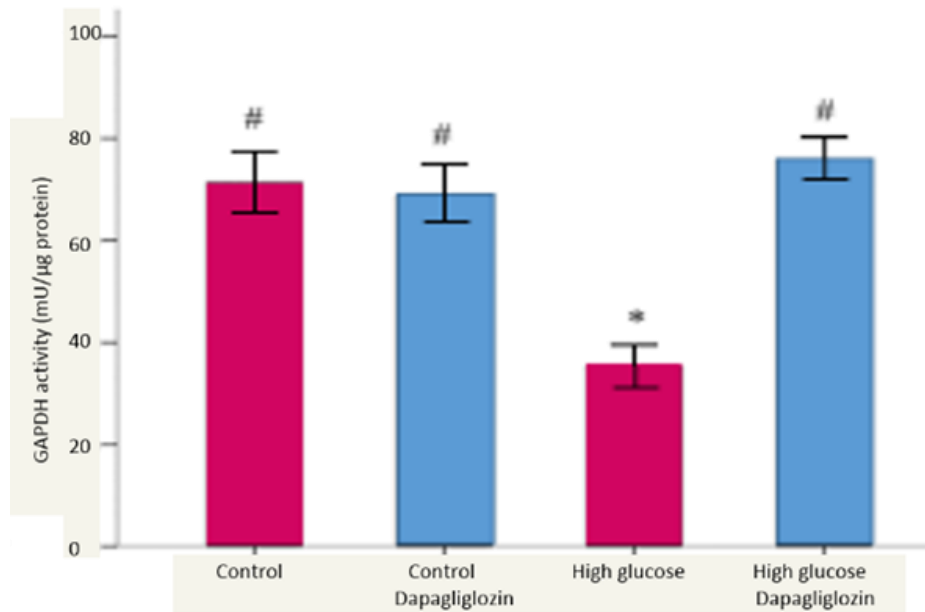
Πειραματικά αποδείχτηκε ότι η έκφραση των μεταφορέων SGLT2, είναι σε αναλογία με την συγκέντρωση της γλυκόζης στο υπόστρωμα. Η προσθήκη δαπαγλιφλοζίνης οδήγησε σε σημαντική μείωση της έκφρασης του μεταφορέα και στις δύο συνθήκες.

3.3.2 Η υψηλή γλυκόζη αυξάνει την παραγωγή ROS και μειώνει την έκφραση της GAPDH, ενώ η παρουσία δαπαγλιφλοζίνης βελτιώνει την εικόνα.



Η παρουσία οξειδωτικού στρες προσδιορίστηκε από την μέτρηση των ROS. Στις συνθήκες φυσιολογικής γλυκόζης η παραγωγή των ROS μετρήθηκε σε χαμηλά επίπεδα, τα οποία διατηρήθηκαν και μετά την προσθήκη του αναστολέα.

Κατά τα πειράματα στα GEnC, είδαμε ότι η αυξημένη εισροή γλυκόζης οδηγεί σε σημαντική αύξηση του σχηματισμού ROS, φαινόμενο που παρατηρήθηκε και στα RPTECs. Η αναστολή του μεταφορέα από την δαπαγλιφλοζίνη προστάτευσε τα κύτταρα από την αυξημένη σύνθεση ελευθέρων ριζών, καθώς περιορίσε την έκφραση του μεταφορέα.



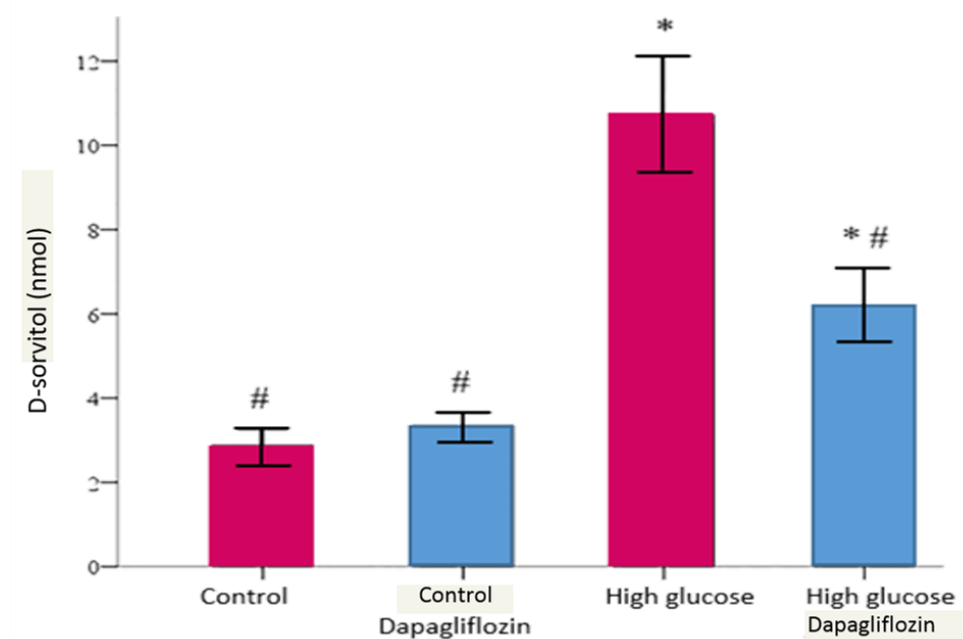
Στην συνέχεια αξιολογήθηκε η επίδραση του οξειδωτικού στρες στην αναστολή της δράση της GAPDH, καθώς και στην επίδραση της δαπαγλιφλοζίνης.

Όταν τα RPTEC καλλιεργήθηκαν σε περιβάλλον φυσιολογικής γλυκόζης, όπως και στην περίπτωση των GENC, η GAPDH παρέμεινε ενεργή και η δραστηριότητά της μειώθηκε κατά την παρουσία υψηλής γλυκόζης.

Η αναστολή των SGLT-2 από την δαπαγλιφλοζίνη δεν είχε καμία επίδραση ως προς την ενεργότητα της GAPDH σε συνθήκες φυσιολογικής συγκέντρωσης γλυκόζης. Στην συνθήκη υψηλής γλυκόζης, η αναστολή των μεταφορέων επέτρεψε την έκφραση της GAPDH και μάλιστα στον ίδιο βαθμό με αυτόν που παρατηρήθηκε στην συνθήκη φυσιολογικής γλυκόζης.

Η ενεργή GAPDH στα GENC, επιτρέπει την ορθή πορεία της γλυκόλυσης, χωρίς τις επιπτώσεις της εκτροπής της προς τα μονοπάτια των πολυολών, εξοζαμινών, ενεργοποίησης PKC και παραγωγής AGEs. Στον επόμενο κύκλο πειραμάτων μελετήθηκε το φαινόμενο αυτό και στα RPTEC.

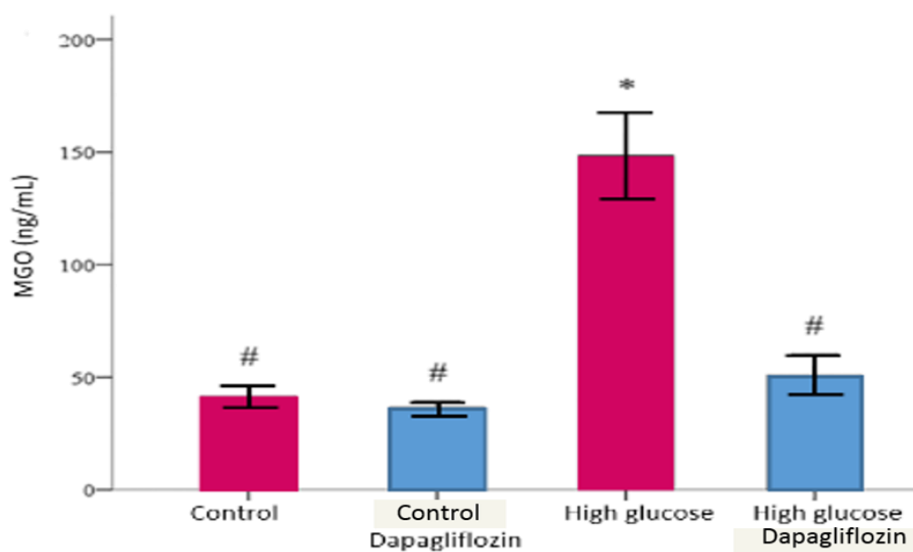
3.3.3 Η υπεργλυκαιμία αυξάνει την συγκέντρωση D-σορβιτόλης, MGO, O-GlcNAc τροποποιημένων πρωτεϊνών, και την ενεργότητα του PKC όλα τα οποία βελτιώνονται από την δαπαγλιφλοζίνη.



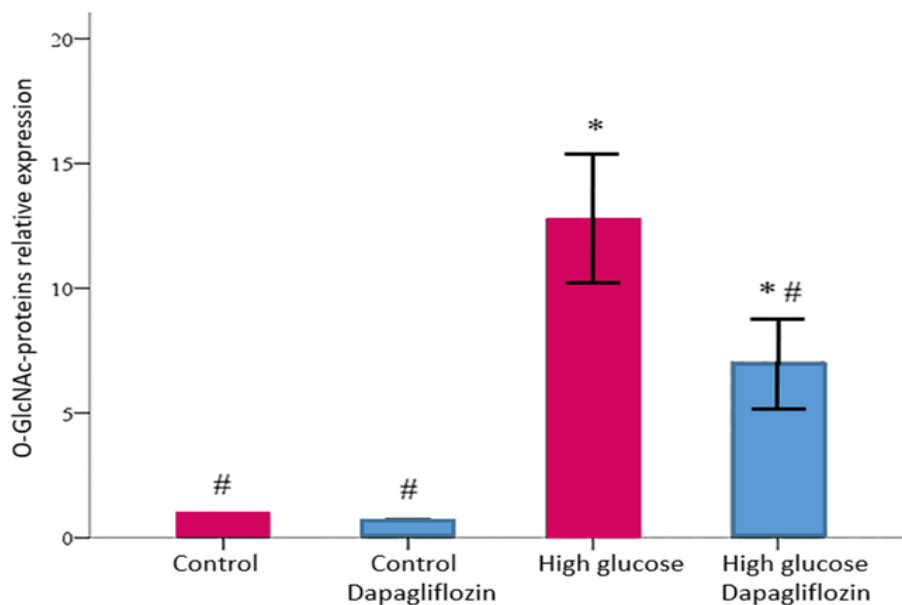
Η ενεργοποίηση του μονοπατιού των πολυολών έγινε με την μέτρηση της παραγωγής D-σορβιτόλης, στο περιβάλλον φυσιολογικής και υψηλής γλυκόζης παρουσία ή όχι δαπαγλιφλοζίνης.

Στα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών, όπως είδαμε και στα GEnC, η συγκέντρωση της σορβιτόλης παραμένει χαμηλά, αλλά αυξάνεται σημαντικά στην υπεργλυκαιμία.

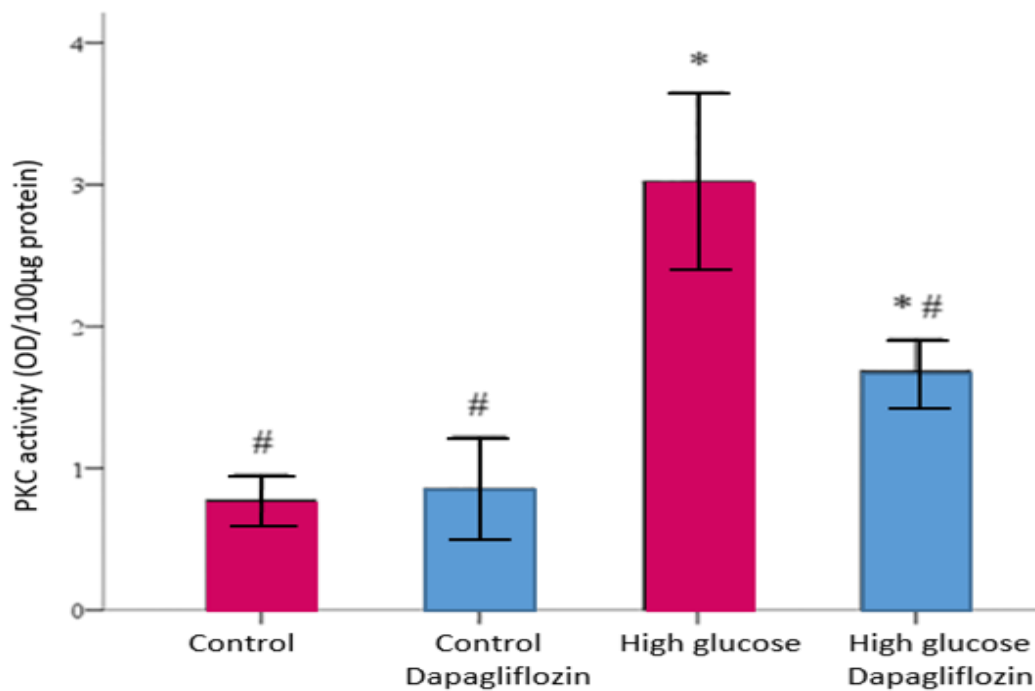
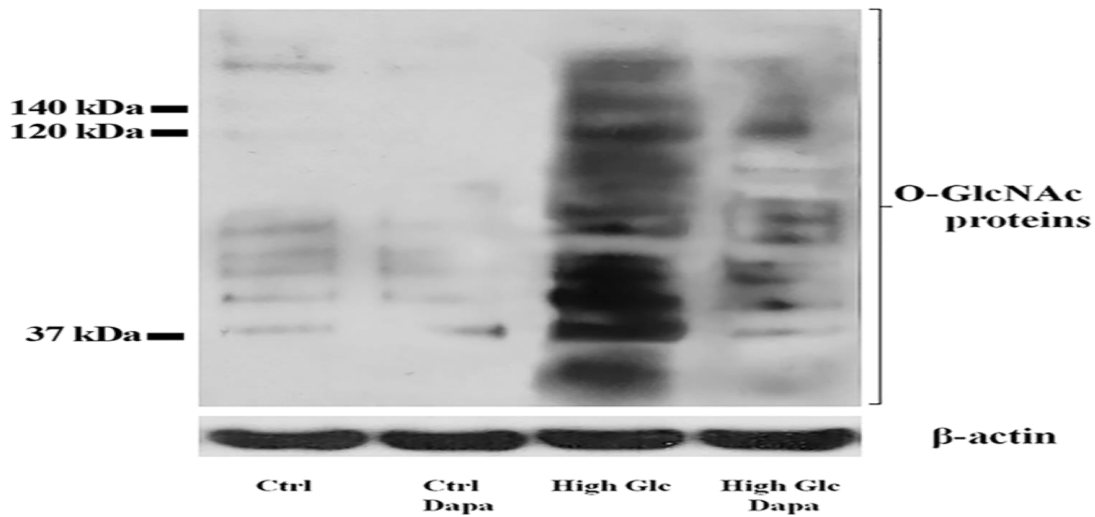
Υπό φυσιολογική γλυκόζη, η αναστολή του μεταφορέα δεν έχει κάποια επίδραση, γεγονός που ανατρέπεται στην περίπτωση της υπεργλυκαιμίας. Στην συνθήκη υπεργλυκαιμίας η αναστολή των SGLT-2 ελαττώνει σημαντικά την παραγωγή σορβιτόλης καθώς μειώνεται η εισροή γλυκόζης και περιορίζεται η ενεργότητα του μονοπατιού των πολυολών.



Για να αξιολογηθεί ο σχηματισμός των AGEs παρουσία ή όχι δαπαγλιφλοζίνης στις δύο συνθήκες διαφορετικής συγκέντρωσης γλυκόζης, έγινε προσδιορισμός των MGO. Παρατηρήθηκε ότι η παρουσία υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης ευνόησε τον σχηματισμό MGO, ωστόσο κατά την προσθήκη δαπαγλιφλοζίνης τα επίπεδα MGO μειώθηκαν δραματικά σε βαθμό παρόμοιο με τη συνθήκη φυσιολογικής γλυκόζης.



Ως προς το μονοπάτι των εξοζαμινών, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των τροποποιημένων πρωτεϊνών από O-GlcNAc στις δύο συνθήκες, παρουσία ή όχι δαπαγλιφλοζίνης. Το επίπεδο των τροποποιημένων πρωτεϊνών από O-GlcNAc αυξήθηκε σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης, ενώ η παρουσία δαπαγλιφλοζίνης μείωσε σημαντικά τα επίπεδα των O-GlcNAc τροποποιημένων πρωτεϊνών.

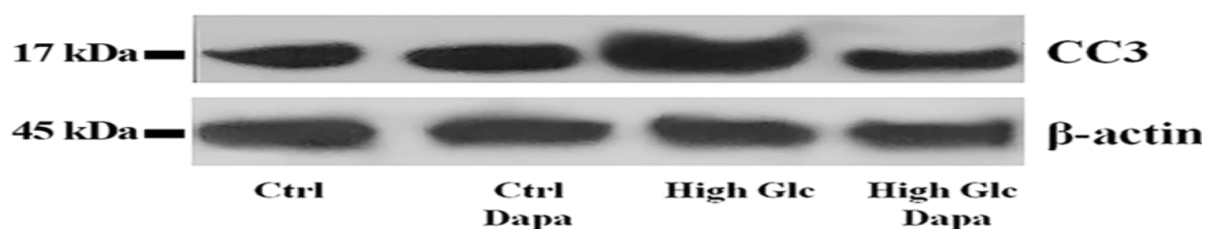
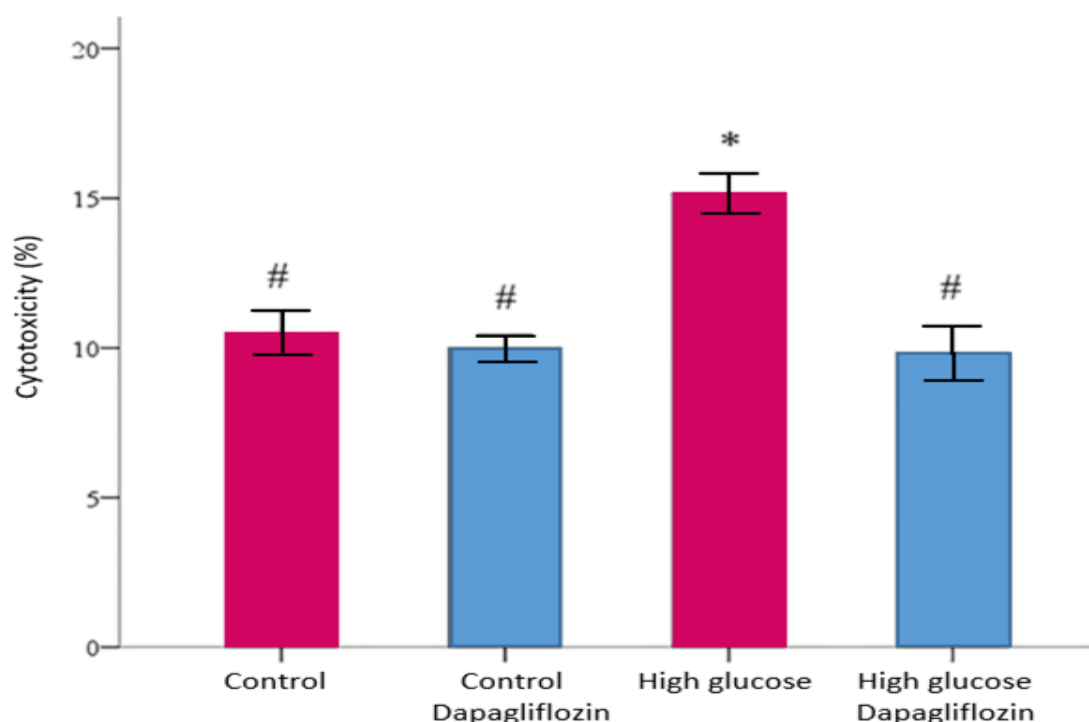


Εν συνεχεία, αξιολογήθηκε η επίδραση των δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων γλυκόζης σε συνδυασμό με την παρουσία ή όχι δαπαγλιφλοζίνης στην ενεργότητα του PKC.

Όπως και στα GEnC, έτσι και στα RPTEC, στην συνθήκη φυσιολογικής γλυκόζης η ενεργότητα του PKC κυμάνθηκε σε χαμηλά επίπεδα, ενώ σχεδόν η ενεργότητα του PKC τριπλασιάστηκε σε υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης.

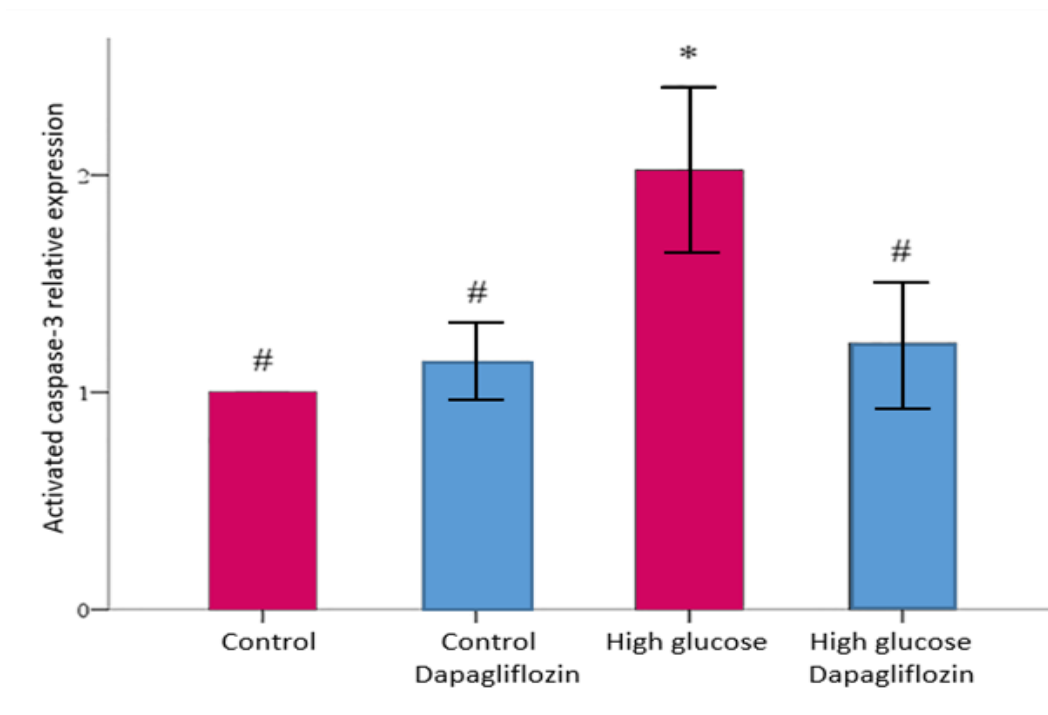
Η αναστολή του μεταφορέα μέσω δαπαγλιφλοζίνης δεν επέφερε καμία επίδραση ως προς την ενεργότητα του PKC, όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης είναι σε φυσιολογικά επίπεδα. Αντιθέτως, σε υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης η δαπαγλιφλοζίνη προκάλεσε μείωση της ενεργότητας του PKC.

3.3.4 Η δαπαγλιφλοζίνη προστατεύει τα κύτταρα από την νέκρωση και απόπτωση λόγω υψηλής γλυκόζης.



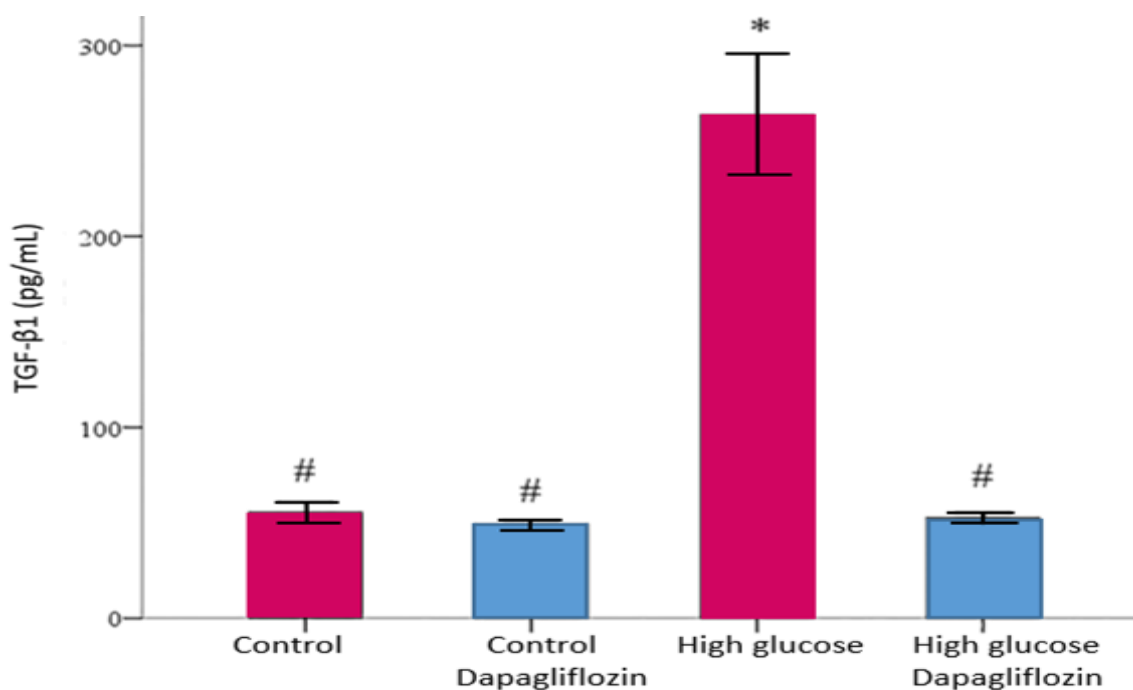
Για να ελεγχθεί η επίδραση της υψηλής γλυκόζης και της δαπαγλιφλοζίνης στα RPTEC αξιολογήθηκε η κυτταρική νέκρωση με την μέθοδο απελευθέρωσης LDH και η απόπτωση με αξιολόγηση του επιπέδου της ενεργοποιημένης ματισμένης-κασπάσης 3, στην οποία συγκλίνουν όλες οι αποπτωτικές οδοί.

Βρέθηκε ότι η υψηλή γλυκόζη προκαλεί νέκρωση των RPTECs, αλλά η δαπαγλιφλοζίνη αναστρέφει την κυτταροτοξική επίδραση της υψηλής γλυκόζης.



Σε συνθήκες υψηλής γλυκόζης πυροδοτείται η απόπτωση στα RPTEC, ωστόσο, η δαπαγλιφλοζίνη την αποτρέπει.

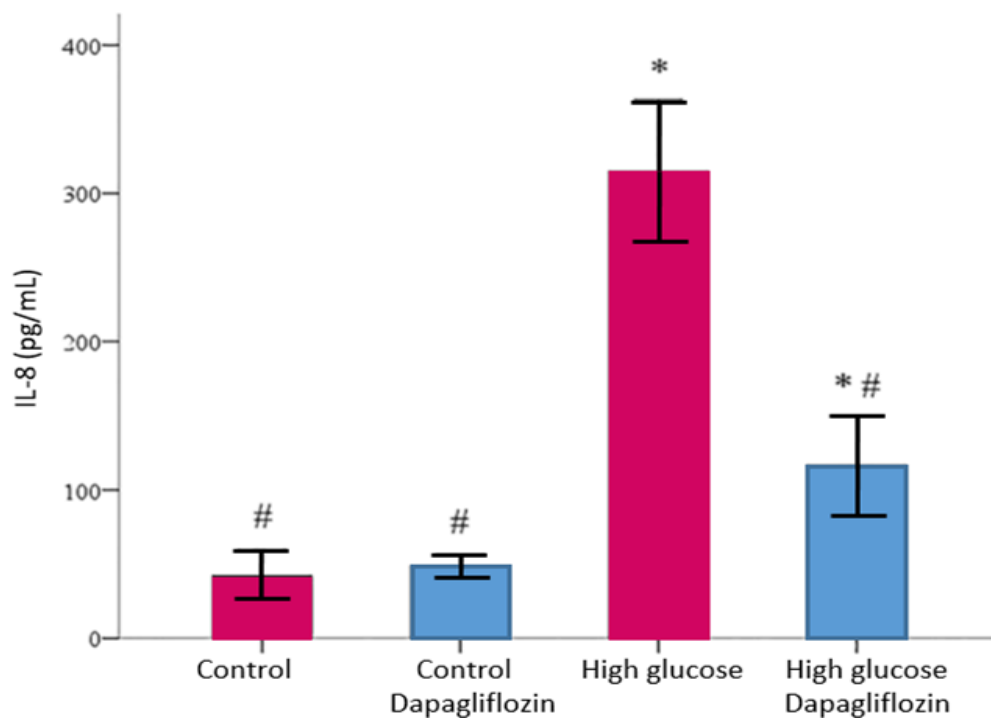
3.3.5 Η υψηλή γλυκόζη προκαλεί την παραγωγή του TGF-β1 και IL-8, ενώ η δαπαγλιφλοζίνη μειώνει το επίπεδό τους



Τόσο η ίνωση όσο και η φλεγμονή συμβάλλουν στην παθογένεση της διαβητικής νεφροπάθειας. Αξιολογήθηκε λοιπόν το αποτέλεσμα της παρουσίας υψηλής γλυκόζης και δαπαγλιφλοζίνης, στην παραγωγή της προ-ινωτικής κυτοκίνης TGF-β1, καθώς και της προφλεγμονώδους κυτοκίνης IL-8.

Συγκριτικά με τα RPTEC που καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογική συγκέντρωση γλυκόζης, αυτά που καλλιεργήθηκαν σε υψηλή, παράγαγαν περισσότερο TGF-β1.

Η δαπαγλιφλοζίνη επαναφέρει την παραγωγή του TGF-β1 στο επίπεδο που παρατηρείται σε όταν RPTEC καλλιεργήθηκαν υπό φυσιολογικές συνθήκες γλυκόζης



Η υψηλή γλυκόζη προκαλεί παραγωγή IL-8 από τα RPTEC όμως η δαπαγλιφλοζίνη βελτιώνει την υπερπαραγωγή τους.

3.4 Συζήτηση

Καθώς η διαβητική νεφροπάθεια που είναι η κύρια αιτία της νεφρικής νόσου τελικού σταδίου, θεωρείται μικροαγγειακή επιπλοκή του σακχαρώδη διαβήτη, η γλυκοτοξικότητα των ενδοθηλιακών κύτταρων των νεφρικών τριχοειδών έχει μελετηθεί εκτενώς. Ωστόσο, η πρόσφατη εισαγωγή αναστολέων SGLT2 σε θεραπευτικά σκευάσματα σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 και η ανακάλυψη ότι οι γλυφοζίνες δρουν προστατευτικά για τους νεφρούς, αυξάνουν την πιθανότητα σημαντικής συμβολής της γλυκοτοξικότητας των RPTEC στην παθογένεση της διαβητικής νεφροπάθειας.

Στη παρούσα μελέτη αξιολογήσαμε αν το καθιερωμένο μοντέλο της γλυκοτοξικότητας στα τριχοειδικά ενδοθηλιακά κύτταρα λαμβάνει χώρα επίσης στα RPTECs με τη διαφορά ότι ο κύριος μεταφορέας είναι ο SGLT2.

Υπό συνθήκες υψηλής γλυκόζης, η πρόσληψή της από τα RPTEC αυξάνεται, ενώ η θεραπευτική συγκέντρωση της δαπαγλιφλοζίνης μειώνει την αυξημένη εισροή της στα RPTEC. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, εκτός από την υψηλή εξωκυττάρια συγκέντρωση γλυκόζης, η αυξημένη έκφραση των SGLT2, υπό συνθήκες υψηλής γλυκόζης, επιπλέον συμβάλλει στην αυξημένη εισροή της.

Έτσι, παρόμοια όπως συμβαίνει και με την αύξηση έκφρασης των GLUT1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα των νεφρικών τριχοειδών, στα RPTEC η παρουσία υψηλής γλυκόζης προκαλεί αύξηση στην έκφραση των SGLT2. Προκαλεί ενδιαφέρον ότι η δαπαγλιφλοζίνη, εκτός από της λειτουργίας SGLT2, μειώνει και την έκφρασή τους.

Αν και ο μοριακός μηχανισμός για το τελευταίο δεν διερευνήθηκε στη μελέτη μας, από τελεολογική άποψη, η ενδοκυττάρια γλυκόζη μπορεί να καθορίζει το

επίπεδο SGLT2 με τρόπο που υπό υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης η έκφραση του SGLT2 να αυξάνεται ώστε να μην γίνει σπατάλη γλυκόζης με αποβολή της από τα ούρα, καθώς η γλυκόζη του πλάσματος φιλτράρεται από το σπείραμα και στη συνέχεια εισέρχεται στα RPTEC, ανάλογα με τη συγκέντρωσή της.

Όπως και με την περίπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, επιβεβαιώσαμε ότι η αυξημένη εισροή γλυκόζης προκαλεί υπερπαραγωγή ROS και αναστολή της δραστηριότητας της GAPDH όταν τα RPTEC καλλιεργούνται σε περιβάλλον υψηλή γλυκόζη. Ξανά, όπως και στα ενδοθηλιακά κύτταρα, έτσι και στα RPTEC η υψηλή γλυκόζη οδήγησε στην ενεργοποίηση των τεσσάρων επιβλαβών μεταβολικών μονοπατιών δηλαδή αυτό των πολυολών, των εξοζαμινών, την παραγωγή MGO και την ενεργοποίηση του PKC, με αποτέλεσμα να επηρεάζονται δυσμενώς πολλές κυτταρικές λειτουργίες. Είδαμε ότι η δαπαγλιφλοζίνη βελτιώνει το αποτέλεσμα από τα παραπάνω μονοπάτια.

Η ίνωση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της διαβητικής νεφροπάθειας. Μαζί με τη σπειραματική ίνωση, η περισοληναριακή ίνωση είναι επίσης χαρακτηριστικό τη διαβητικής νεφροπάθειας, και για την ακρίβεια, το τελευταίο ίσως σχετίζεται καλύτερα με τον φθίνοντα ρυθμό της σπειραματικής διήθησης (GFR). Όλα τα προηγούμενα επιβλαβή μονοπάτια που περιγράφηκαν μπορούν να αυξήσουν την παραγωγή TGF-β1 και πράγματι, στη μελέτη μας, η υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη είδαμε να επάγει την παραγωγή TGF-β1 από τα RPTEC, ενώ η δαπαγλιφλοζίνη επαναφέρει το επίπεδό τους σε αυτό που παρατηρήθηκε υπό κανονικές συνθήκες γλυκόζης.

Στην παθογένεση της διαβητικής νεφροπάθειας, συμβάλλει επίσης η φλεγμονή και είναι σημαντικός ο ρόλος του NF-κB στην παραγωγή πολλών προφλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών όπως η IL-8, που παράγεται από διάφορους κυτταρικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένων των επιθηλιακών κυττάρων, όπου προσελκύει και

ενεργοποιεί τα ουδετερόφιλα. Η περιωληναριακή διήθηση με ουδετερόφιλα και μακροφάγα έχει ενοχοποιηθεί για την εξέλιξη της διαβητικής νεφροπάθειας. Σε υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης, τα RPTEC παράγουν IL-8, όπου και πάλι η δαπαγλιφλοζίνη φαίνεται να έχει ευεργετική επίδραση.

Σε ότι αφορά την επίδραση της υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης στην ακεραιότητα των RPTEC, οι προηγούμενες μελέτες αποκάλυψαν τη σχέση μεταξύ οξειδωτικού στρες που προκαλείται από τη γλυκόζη και του κυτταρικού θανάτου. Στην μελέτη μας επιβεβαιώσαμε την τοξικότητα της αυξημένης γλυκόζης στα RPTEC, καθώς πυροδότησε τόσο την κυτταρική νέκρωση όσο και την κυτταρική απόπτωση, ενώ η δαπαγλιφλοζίνη άσκησε κυτταροπροστατευτική δράση, έναντι και των δύο τύπων κυτταρικού θανάτου.

Είναι πιθανό ότι η αναστολή του SGLT2 προστατεύει τους νεφρούς, αφενός λόγω της μείωσης που προκαλεί στην ενδοσπειραματική πίεση και αφετέρου λόγω της προστασίας που παρέχει στα RPTEC όταν από το σπείραμα περνά πλάσμα με υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης.

Μια πιλοτική κλινική μελέτη σε ανθρώπους με εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνσης και σε αρουραίους που είχαν υποστεί νεφρεκτομή, απέτυχε να αποδείξει όφελος από τη χορήγηση δαπαγλιφλοζίνης στο GFR ή την πρωτεϊνουρία, παρόλο που η δαπαγλιφλοζίνη αύξησε την απέκκριση της γλυκόζης σημαντικά [34]. Με τα αποτελέσματα αυτά, τονίζεται έμμεσα ότι οι αναστολείς SGLT2 μπορεί να είναι προστατευτικοί μόνο υπό την παρουσία υπεργλυκαιμίας όπου μπορεί να αποτρέπεται ή να βελτιώνεται η εξέλιξη της διαβητικής νεφροπάθειας μέσω προστασίας των RPTEC από την γλυκοτοξικότητα.

Είναι ενδιαφέρον ότι στη μελέτη μας, ως προς στην παραγωγή ROS, την δραστηριότητα GAPDH, τα τέσσερα επιβλαβή μεταβολικά μονοπάτια που προκαλούνται από υψηλή γλυκόζη, την παραγωγή TGF-β1, IL-8 και την κυτταρική

επιβίωση, η ευεργετική επίδραση της δαπαγλιφλοζίνης ήταν εμφανής μόνο σε RPTEC που καλλιεργήθηκαν υπό υψηλή γλυκόζη συνθήκες.

Πρόσφατη τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, με eGFR της τάξης των 30–90 mL/min/1,73 m² (διάμεσος eGFR 55 ml/min/1,73 m²), και λευκωματουρία (διάμεση αναλογία λευκωματίνης ούρων προς κρεατινίνη 930 mg/g) σταμάτησε πρόωρα, λόγω προφανούς προστατευτικής δράσης στους νεφρούς, ανεξαρτήτως από την γλυκόζη του αίματος, στην ομάδα υπό τον αναστολέα SGLT2 καναγλιφλοζίνη [36]. Ως εκ τούτου, όσον αφορά τη διατήρηση της νεφρικής λειτουργίας, οι αναστολείς SGLT2 είναι ωφέλιμοι ακόμη και μετά την ανάπτυξη διαβητικής νεφροπάθειας.

Επειδή, στη μελέτη μας, η δαπαγλιφλοζίνη προστατεύει τα RPTEC σε συνθήκες υψηλής γλυκόζης, μπορεί να υποτεθεί ότι μια τέτοια επίδραση μπορεί να παρατηρηθεί ακόμη και σε διαβητικούς με χαμηλό γλυκαιμικό έλεγχο και αυτό σημαντικό αν ληφθεί υπόψη το υψηλό ποσοστό ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη και κακό γλυκαιμικό έλεγχο, που φτάνει το 40% σε ασθενών με διαβητική νεφροπάθεια [37].

Κεφάλαιο 4

4.1 ΣΤΡΕΣ ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ

4.1.1 Υλικά και μέθοδοι

Τα πρωτογενή ανθρώπινα νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα εγγύς εσπειραμένων RPTCEs προμηθεύτηκαν από την ScienCell (cat. no. 4100, ScienCell, Carlsbad, CA, USA) και καλλιεργήθηκαν σε εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό που περιείχε χαμηλής συγκέντρωσης γλυκόζη (cat. no. 12320032, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL), 5 % FBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 100 U/ml πενικιλίνη και 100 µg/ml στρεπτομυκίνη (Sigma-Aldrich).

Για την συνθήκη απουσίας τρυπτοφάνης χρησιμοποιήθηκε ειδικά τροποποιημένο DMEM χαμηλής γλυκόζης άνευ L-tryptophan (Thermo Fisher Scientific Inc.). Τα κύτταρα επώαστηκαν για 16 ώρες με ή άνευ τρυπτοφάνης, σε πλάκες των 6 βοθρίων έως να αναπτυχθούν σε πληθυσμό 300.000/βοθρίο, σε πλάκες 12 βοθρίων έως πληθυσμό των 100.000/βοθρίο και πλάκες 96 βοθρίων έως πληθυσμό 100.000/βοθρίο. Μετά το πέρας της περιόδου επώασης, τα κύτταρα πλυθήκαν δύο φορές με 1x Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (1x D-PBS) και συμπληρώθηκαν τα θρεπτικά υλικά της κάθε συνθήκης. Στην συνέχεια σε κάθε καλλιέργεια προστέθηκε Brefeldin-A (cat.no. 9972; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) που επάγει το στρες του ΕΔ. Τέλος, για να μετρήσουμε την συνάθροιση LC3II, που αποτρέπουν την λυσοσωμιακή όξυνση acidification και αποικοδόμηση του περιεχομένου τους κατά τα τελικά στάδια της αυτοφαγίας, προστέθηκε η μη τοξική συγκέντρωση των 50 µM chloroquine (Sigma-Aldrich). Οι πειραματικές διαδικασίες επαναλήφθηκαν 9 φορές.

4.1.1.1 Αξιολόγηση κυτταροτοξικότητας Brefeldin-A (BFA)

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 96 βοθρίων παρουσία συγκεντρώσεων μπρεφελδίνης-A (Brefeldin-A, BFA) των 1, 5 και 10μg/ml και για 6, 12 και 24 ώρες αντίστοιχα. Η κυτταροτοξικότητα αξιολογήθηκε με δοκιμασία απελευθέρωσης γαλακτικής αφυδρογενάσης (Lactate Dehydrogenase, LDH) με χρήση του Cytotox Non-Radioactive Cytotoxic Assay kit (Promega Corporation, Madison, WI) βάση πρωτοκόλλου του κατασκευστή και πραγματοποιήθηκε σε τρεις ανεξάρτητες μετρήσεις τα αποτελέσματα των οποίων αναφέρονται ως μέσος όρος των τριών μετρήσεων.

4.1.1.2 Απεικόνιση κυττάρων

Η κυτταρική βιωσιμότητα και η μορφολογία των RPTECs παρατηρήθηκε με οπτικό μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Axiovert 40C, Carl Zeiss Light Microscopy, Göttingen, Germany) στο οποίο τοποθετήθηκε ψηφιακή κάμερα (3MP USB2.0 Microscope Digital Camera, AmScope, Irvine, CA, USA). Οι φωτογραφικές λήψεις πραγματοποιήθηκαν κατά την έναρξη χρήσης BFA και εν συνεχεία σε μεσοδιαστήματα των 2, 4, 6, 8, 12 και 24ωρών.

4.1.1.3 Αξιολόγηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Μετά το πέρας 12ωρης επώασης με BFA (5μg/ml), ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός αξιολογήθηκε με Cell Proliferation ELISA (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) στις κυτταροκαλλιέργειες των 96 βοθρίων πυκνότητας 1×10^5 κυττάρων ανά βοθρίο. Η ενσωμάτωση της βρόμο-δεόξυ-ουριδίνης (Bromodeoxyuridine, BrdU) και της ανοσοενζυματικής ανίχνευσης έγινε βάση των

οδηγιών του κιτ. Για τον υπολογισμό του δείκτη πολλαπλασιασμού, η οπτική πυκνότητα της συνθήκης άνευ κυττάρων αφαιρέθηκε από το κάθε δείγμα και η προκύπτουσα οπτική πυκνότητα των επεξεργασμένων δειγμάτων αφαιρέθηκε από την οπτική πυκνότητα των μη επεξεργασμένων κυττάρων. Τα πειράματα αυτά έγιναν σε τρεις ανεξάρτητες επαναλήψεις και τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος των τριών μετρήσεων.

4.1.1.4 Αξιολόγηση παραγωγής μιτοχονδριακών ROS

Το κυτταρικό οξειδωτικό στρες αξιολογήθηκε στις κυτταροκαλλιέργειες των 96 βοθρίων με BFA (5μg/ml) μετά το πέρας επώασης 12ωρών , μέσω χρωστικής fluorogenic probe CellROX® Deep Red Reagent (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) σε συγκέντρωση των 5μM. Ο ιχνηθέτης προστέθηκε στο θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα επώαστηκαν για 30 λεπτά στους 37 °C. Στην συνέχεια ξεπλύθηκαν με 1x D-PBS και η ένταση του φθορισμού μετρήθηκε και αναλύθηκε με EnSpire® Multimode Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA). Τα πειράματα έγιναν σε τρεις ανεξάρτητες τριπλέτες και τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος των τριών μετρήσεων.

4.1.1.5 Αξιολόγηση έναρξης στρες ΕΔ, ενεργότητας GCN2 κινάσης, απόπτωση και αυτοφαγία

Η έναρξη του στρες ΕΔ, η ενεργότητα της κινάσης GCN2 η απόπτωση και η αυτοφαγία αξιολογήθηκαν με ανοσοσύτρωση κατά Western. Μετά το πέρας της 16ωρης επώασης με ή άνευ τρυπτοφάνης, ακολούθησε 12ωρη επώαση με 5μg/ml BFA και τα RPTECs κύτταρα λύθηκαν με T-PER tissue protein extraction reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA). Στο διάλυμα λύσης προστέθηκαν αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών των Sigma-Aldrich και Roche Diagnostics αντίστοιχα. Η πρωτεϊνική συγκέντρωση κάθε δείγματος μετρήθηκε με την μέθοδο Bradford της Sigma-Aldrich. Από κάθε συνθήκη, 10μg ηλεκτοφορήθηκαν σε SDS-PAGE τζέλ (Invitrogen, Life Technologies), έγινε μεταφοράς σε μεμβράνες polyvinylidene difluoride (PVDF) (Invitrogen, Life Technologies). Ακολούθησε 16ωρη επώαση με το κύριο αντίσωμα στους 4°C και 30λεπτη με το δευτερεύον αντίσωμα σε θερμοκρασία δωματίου (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody, cat. no. 7074; Cell Signaling Technology). Η ανίχνευση των μπαντών διεξήχθη με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια κάνοντας χρήση του LumiSensor Plus Chemiluminescent HRP (Κιτ Υποστρώματος GenScript, Piscataway, NJ) και η απεικόνιση με X-ray Fujifilm Super RX (Fujifilm, Japan). Στην περίπτωση επαναϊβρυδοποίησης των PVDF blots με διαφορετικά αντισώματα, το προηγούμενα πρωταρχικά και δευτερεύοντα αντισώματα απομακρύνθηκαν με Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Fisher Scientific Inc.). Για να ποσοτικοποιηθούν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις Western ως οπτικές πυκνότητες, χρησιμοποιήθηκε το Java-based Image J software (version 1.49; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Τα ονόματα των πρωτογενών αντισωμάτων έναντι των συγκεκριμένων πρωτεϊνών της μελέτης ήταν τα εξής: αντίσωμα έναντι φωσφορυλιωμένης PERK

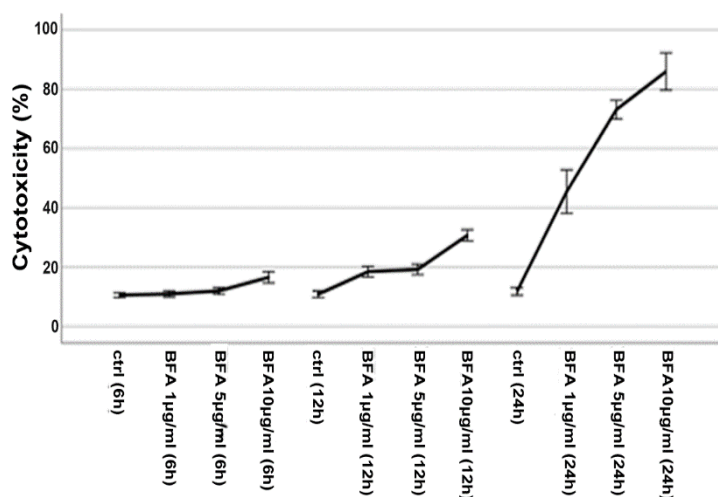
στην θρεονίνη 981 (p-PERK, cat.no. E-AB-21296; Elabscience, Houston, TX), αντίσωμα έναντι GCN2K φωσφορυλιωμένης στην θρεονίνη 899 (p-GCN2K, cat.no. ab75836; Abcam, Cambridge, UK), αντίσωμα έναντι φωσφορυλιωμένου eIF2α phosphorylated στην σερίνη 51 (p-EIF2α, cat. no. 9721; Cell Signaling), αντίσωμα έναντι C/EBP-ομόλογης πρωτεΐνης (CHOP, cat.no. 5554, Cell Signaling), αντίσωμα έναντι πρωτεΐνης heat shock 70 (HSP70, cat.no. 4872; Cell Signaling), αντίσωμα έναντι ενεργής κασπάσης ματισμένης στο ασπάρτικο 175 (cleaved caspase-3, cat. no. 9664; Cell Signaling), αντίσωμα έναντι phosphatidylethanolamine-conjugated microtubule-associated protein 1-light chain 3 B II (LC3 II, cat. no. ab48394; Abcam) και τέλος για την κανονικοποίηση αντίσωμα έναντι της β-ακτίνης (β-actin, cat. no. 4967, Cell Signaling Technology).

4.2 Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα λογισμικού IBM SPSS Statistics για Windows, Έκδοση 20 (IBM Corp., Armonk, Νέα Υόρκη, ΗΠΑ). Η κανονικότητα των μεταβλητών αξιολογήθηκε και επιβεβαιώθηκε από την δομική Kolmogorov-Smirnov. Για τη σύγκριση των μέσων όρων μεταξύ δύο μεταβλητών, εφαρμόστηκε t-test μη-εξαρτημένων μεταβλητών. Για συγκρίσεις μέσων όρων μεταξύ περισσότερων από δύο μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε μονόδρομη ανάλυση διακύμανσης. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα και τιμή με $p < 0,05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική. Η αξιολόγηση των στυλωμάτων των Western blot εκφράστηκε ως οπτική πυκνότητα (OD) με τιμές p που υπολογίστηκαν κατόπιν σύγκρισης των μέσων όρων των ODs.

4.3 Αποτελέσματα

4.3.1 Αξιολόγηση της BFA επί της κυτταροτοξικότητας στα RPTECs



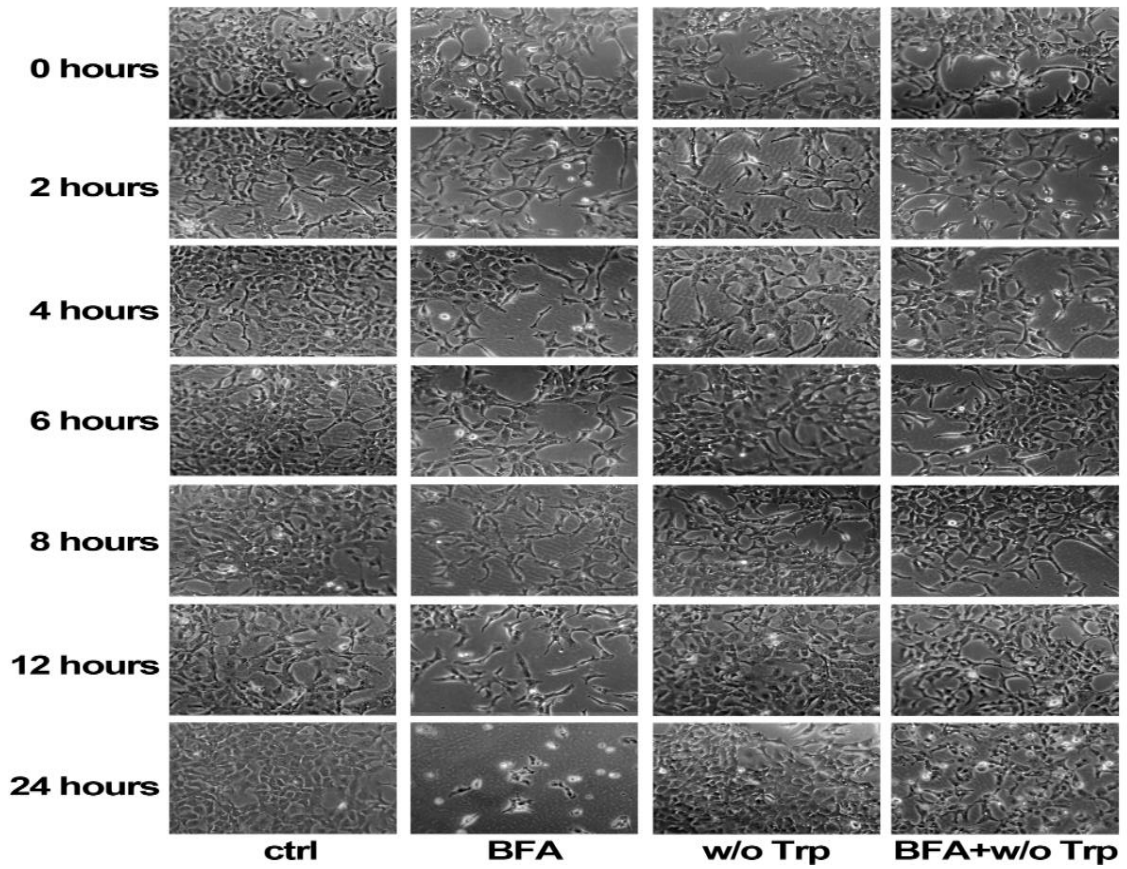
Η δοκιμασία της κυτταροτοξικότητας υπολογίστηκε από την μέσω απελευθέρωση LDH και απέδειξε ότι η BFA δεν είναι τοξική σε συγκεντρώσεις 1,5 ή 10µg/ml και για επώαση 6

ωρών, όπου οι τιμές κυμάνθηκαν στα $10,55 \pm 0,32\%$ για τα RPTECs απλού θρεπτικού υλικού. Στις αυξανόμενες συγκεντρώσεις BFA, οι τιμές κυμάνθηκαν στα $10,88 \pm 0,21\%$, $11,45 \pm 0,46\%$ και $16,82 \pm 1,89\%$.

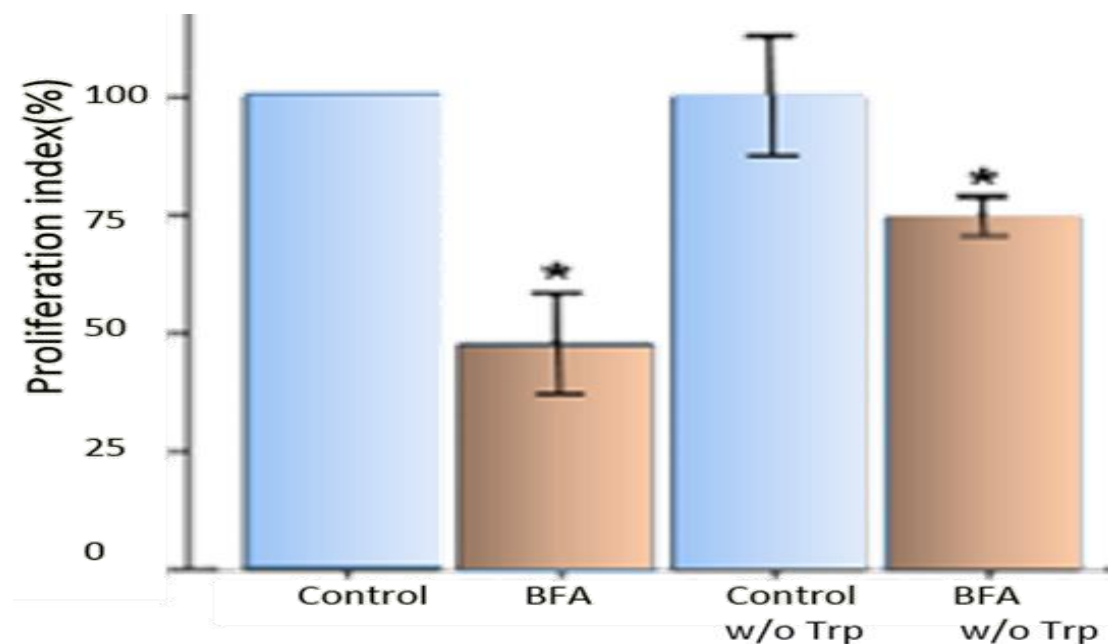
Η κυτταροτοξικότητα αυξήθηκε σημαντικά ($31,14 \pm 1,55\%$) κατά την 12ωρη επώαση όταν η συγκέντρωση BFA ήταν στα 10µg/ml, ενώ για τις συγκεντρώσεις 1 και 5 µg/ml κυμάνθηκε στα $18,32 \pm 1,46\%$ και $18,89 \pm 0,73\%$, αντιστοίχως. Βάση αυτών των αποτελεσμάτων, επιλέξαμε την συγκέντρωση των 5 µg/ml στην 12ωρη επώαση καθώς η συγκέντρωση BFA απέδωσε αμελητέο βαθμό τοξικότητας σε σχέση με το δείγμα ελέγχου και επιπλέον αυτό το χρονικό διάστημα ήταν αρκετό ώστε η BFA να επάγει το στρες του Ενδοπλασματικού δικτύου.

4.3.2 Η έλλειψη Τρυπτοφάνης είναι ευεργετική για την κυτταρική επιβίωση κατά την βλάβη που προκύπτει από το στρες Ενδοπλασματικού δικτύου.

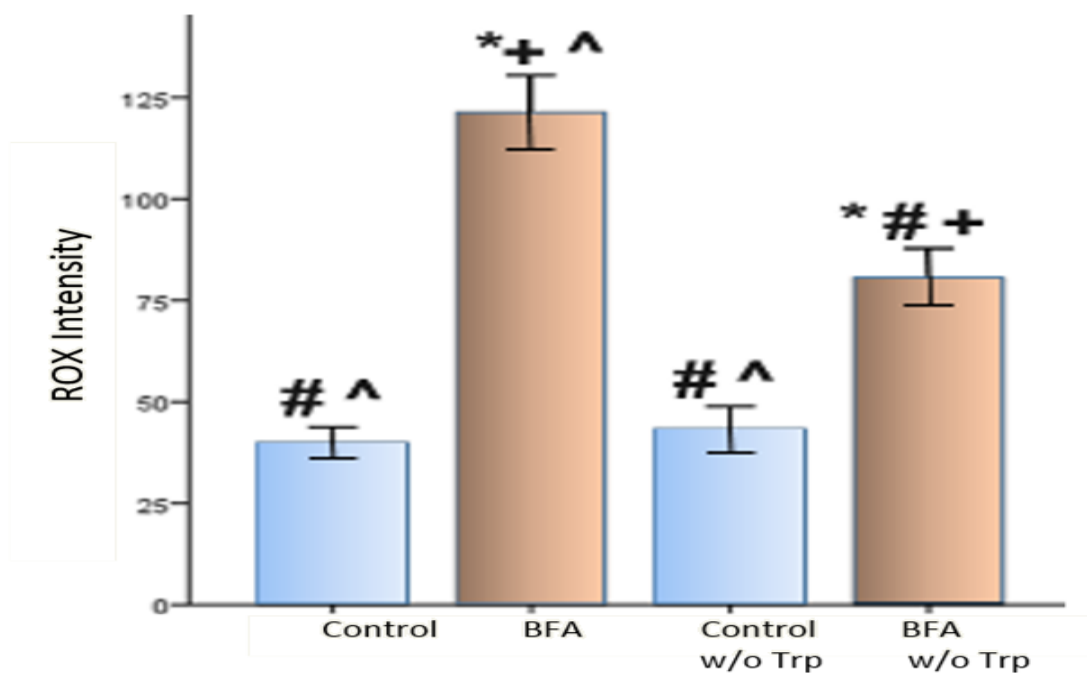
Τα πρωτογενή ανθρώπινα κύτταρα RPTECs καλλιεργήθηκαν σε υλικό με (ctrl) ή χωρίς τρυπτοφάνη (w/o Trp) επί 16 ώρες. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης προστέθηκαν 5μg/ml BFA με σκοπό να προκληθεί στρες του Ενδοπλασματικού δικτύου. Είδαμε ότι τα κύτταρα που εκτέθηκαν στην BFA όχι μόνο δεν πολλαπλασιάστηκαν αλλά στις 12 ώρες παρουσίασαν σημάδια επιδείνωσης. Στις 24 ώρες η παρουσία της BFA ήταν καταστροφική για την επιβίωση των κυττάρων. Στον αντίποδα αυτού, τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν απουσία τρυπτοφάνης παρέμειναν βιώσιμα και επέδειξαν ικανότητα πολλαπλασιασμού σχεδόν παράλληλη με αυτά του control. Επιπλέον η απουσία τρυπτοφάνης από το καλλιεργητικό υλικό παράτεινε την κυτταρική επιβίωση κατά την χρήση BFA (BFA+w/o Trp) ενώ εμφανίστηκε μικρού βαθμού εκφυλισμός στις 24 ώρες. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι στα ανθρώπινα πρωτογενή νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα, η απουσία Τρυπτοφάνης από το θρεπτικό υλικό, παρατείνει σημαντικά την κυτταρική επιβίωση υπο συνθήκες στρες του Ενδοπλασματικού δικτύου. Για τους ανωτέρω λόγους, για τα πειράματά μας επιλέχτηκε η 12ωρη επώαση με BFA .



4.3.3 Η απουσία τρυπτοφάνης επιδρά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μειώνει την παραγωγή ROS κατά το στρες Ενδοπλασματικού Δικτύου.

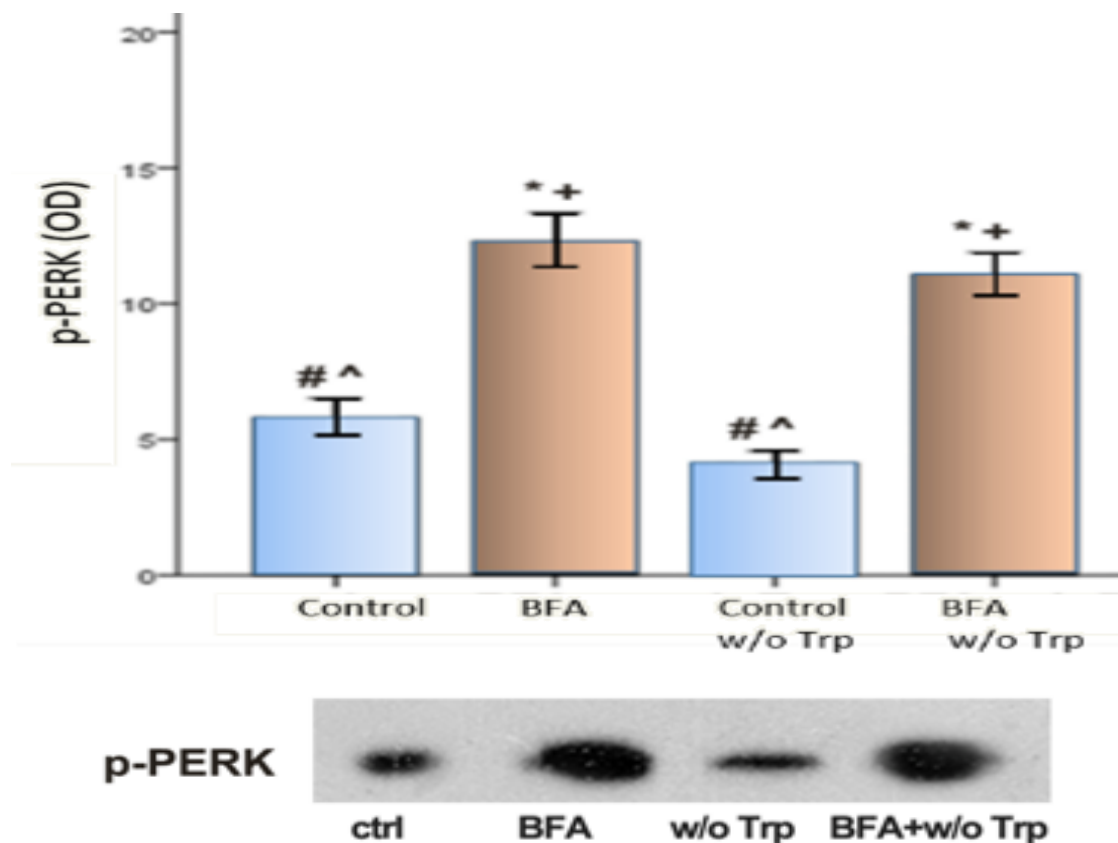


Όπως είδαμε από τα πειράματά μας, στις 12 ώρες επώασης με BFA ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός μειώθηκε σημαντικά ($47,35 \pm 11,25\%$, $p < 0,001$). Στη συνθήκη απουσίας Τρυπτοφάνης όχι μόνο δεν επηρεάστηκε ο πολλαπλασιασμός σε σχέση με το control ($98,67 \pm 13,78\%$, $p = 1,0$) αλλά επιπλέον βελτιώθηκε ο μειωμένος ρυθμός πολλαπλασιασμού εξαιτίας της παρουσίας BFA ($74,77 \pm 4,16\%$, $p < 0,05$).



Ως προς την παραγωγή ROS, τα RPTECs που καλλιεργήθηκαν παρουσίας BFA σε σχέση με τα RPTECs που καλλιεργήθηκαν σε απλό θρεπτικό υλικό έδωσαν πολύ ισχυρότερο σήμα φθορισμού ($121,33 \pm 8,71$ vs $39,83 \pm 1,57$, $p < 0,001$). Τα RPTECs που καλλιεργήθηκαν σε απλό θρεπτικό υλικό και αυτά που καλλιεργήθηκαν απουσίας τρυπτοφάνης, δεν παρουσίασαν διαφορές ως προς την παραγωγή ROS ($80,5 \pm 2,76$, $p < 0,001$) αν και τα επίπεδα ROS παρέμεναν ελαφρώς υψηλότερα σε σχέση με αυτά του απλού θρεπτικού υλικού ($p < 0,001$).

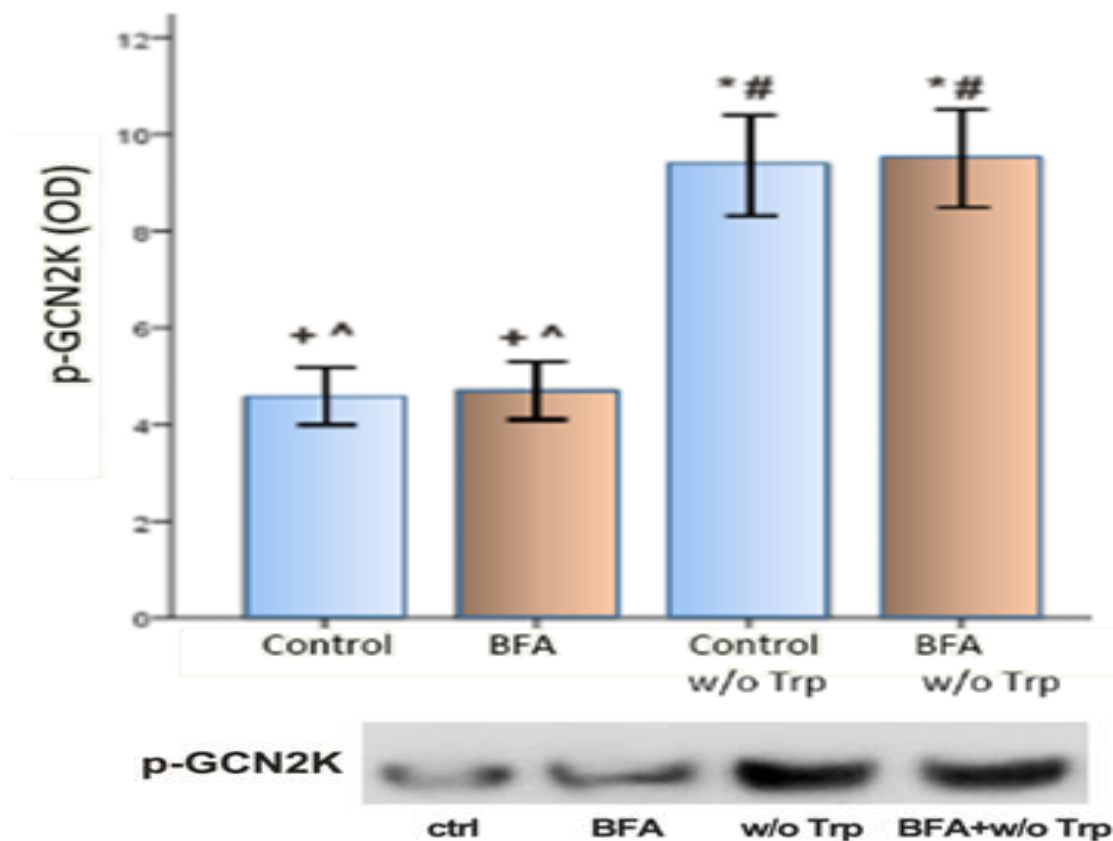
4.3.4 Ενεργοποίηση της PERK και έναρξη του UPR



Κατά την έναρξη του UPR, η πρωτεΐνη PERK διμερίζεται και φωσφορυλιώνεται. Στην καλλιέργεια ελέγχου (control) μετά από 12ωρη επώαση, είδαμε ότι έχουμε χαμηλά επίπεδα φωσφορυλίωσης της PERK που όμως αυξήθηκαν όταν στην ίδια συνθήκη έγινε προσθήκη 5μg/ml BFA ($5,80 \pm 0,98$ vs $12,30 \pm 1,21$, $p < 0,001$). Εξίσου χαμηλή φωσφορυλίωση με αυτήν που είδαμε στο Control, παρατηρήσαμε και την συνθήκη άνευ τρυπτοφάνης ($4,13 \pm 0,49$, $p = 0,001$).

Όταν στην συνθήκη άνευ Τρυπτοφάνης έγινε προσθήκη BFA, η φωσφορυλίωση της PERK αυξήθηκε ($11,06 \pm 0,87$, $p < 0,001$) και δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά με την αύξηση που είδαμε όταν η BFA προστέθηκε στην καλλιέργεια με τρυπτοφάνη ($p = 0,21$).

4.3.5 Ενεργοποίηση GCN2 κινάσης

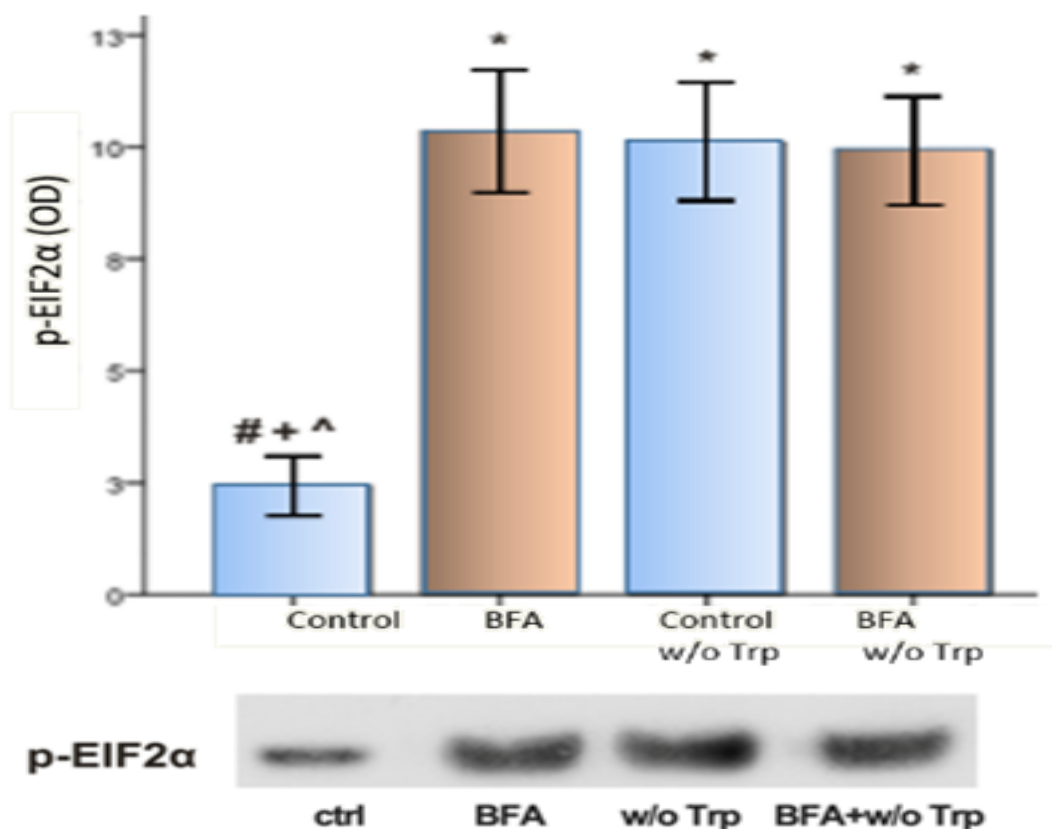


Στην καλλιέργεια ελέγχου δεν παρατηρήθηκε αξιόλογη φωσφορυλίωση της GCN2 κινάσης, που επιπλέον έδειξε να μην επηρεάζεται από την παρουσία BFA ($4,68 \pm 0,42$, $p=0,79$). Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι το UPR επαγόμενο από την BFA δεν οδηγεί σε ενεργοποίηση της GCN2K.

Όπως ήταν αναμενόμενο, η απουσία τρυπτοφάνης στις συνθήκες με ή χωρίς BFA, αύξησε σημαντικά τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της GCN2 κινάσης ($9,38 \pm 0,88$ και $9,50 \pm 0,89$ vs. $4,56 \pm 0,57$, $p < 0,001$).

Από αυτά τα αποτελέσματα καθίσταται σαφές ότι η απουσία Τρυπτοφάνης είναι ο καθοριστικός παράγοντας ενεργοποίησης της κινάσης GCN2.

4.3.6 Φωσφορυλίωση eIF2α

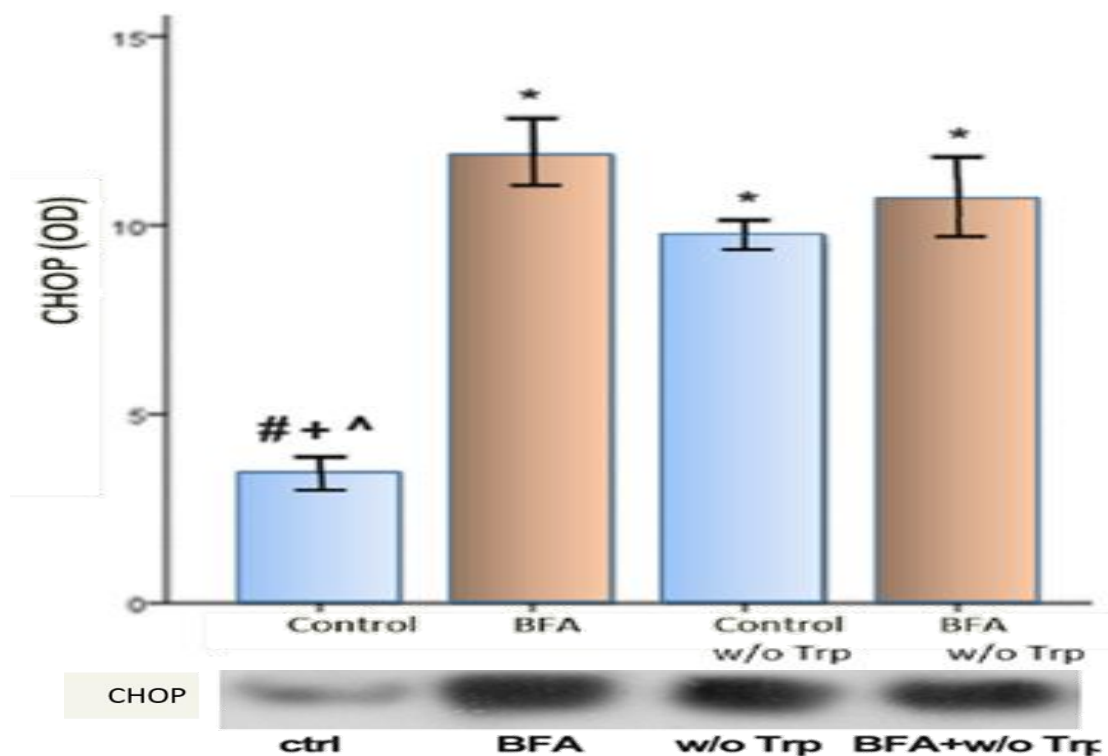


Στην συνθήκη του control, όπως ήταν αναμενόμενο, τα επίπεδα της φωσφορυλίωσης του eIF2α κυμάνθηκαν στα $2,94 \pm 0,45$. Η παρουσία BFA στην ίδια συνθήκη, επάγοντας την φωσφορυλίωση του PERK, προκάλεσε αύξηση στην φωσφορυλίωση του eIF2α στο $10,35 \pm 1,96$ ($2,94 \pm 0,45$ vs $10,35 \pm 1,96$, $p < 0,001$).

Η απουσία τρυπτοφάνης, προκαλώντας την φωσφορυλίωση της GCN2 κινάσης, οδήγησε και αυτή στην αύξηση της φωσφορυλίωσης του eIF2α στα $10,10 \pm 1,85$, $p < 0,001$. Απουσία τρυπτοφάνης και ταυτόχρονης παρουσίας BFA οδήγησε επίσης σε αύξηση της φωσφορυλίωσης στο $9,93 \pm 1,77$, $p = 0,001$.

Από αυτά τα αποτελέσματα παρατηρήσαμε ότι δεν υπήρξε σημαντική διαφορά στα επίπεδα φωσφορυλίωσης του EIF2α μεταξύ των καλλιιεργειών που είχαν BFA

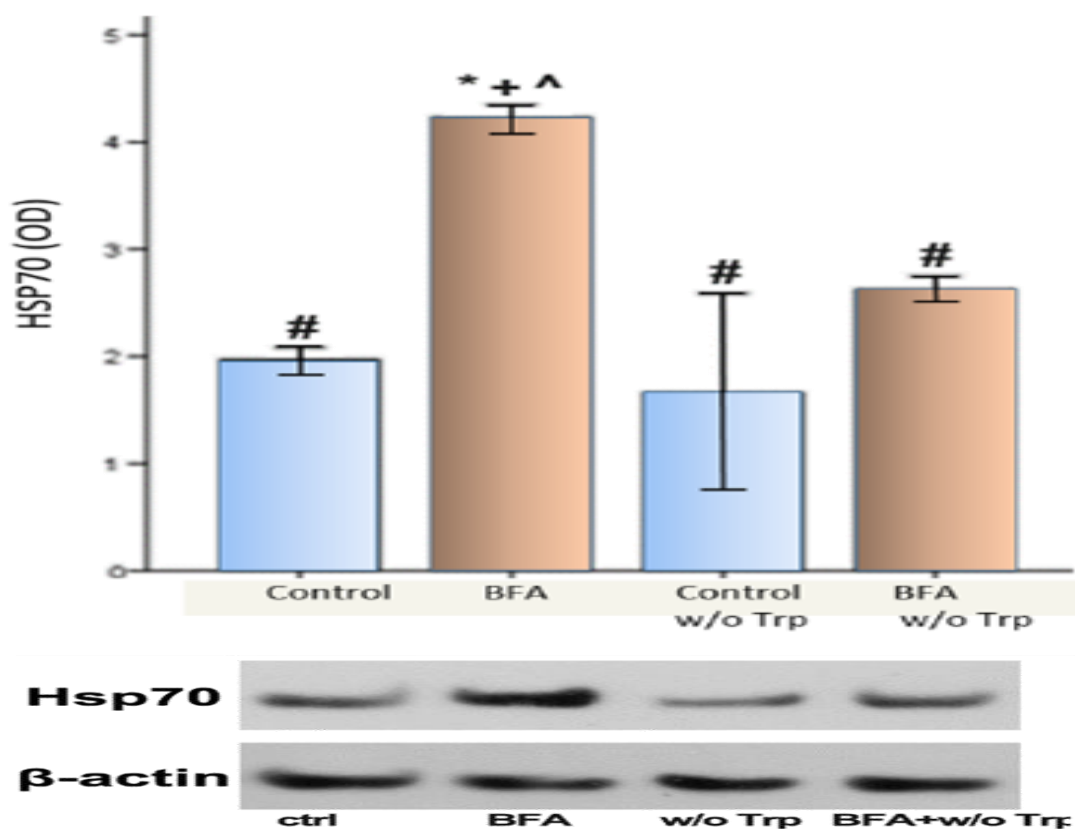
4.3.7 Η απουσία Τρυπτοφάνης επηρεάζει τους κατωροϊκούς στόχους του UPR.



Στην καλλιέργεια ελέγχου δεν παρατηρήσαμε αξιοσημείωτη αύξηση της προαποπτωτικής CHOP ($3,43 \pm 0,5$ $p < 0.001$).

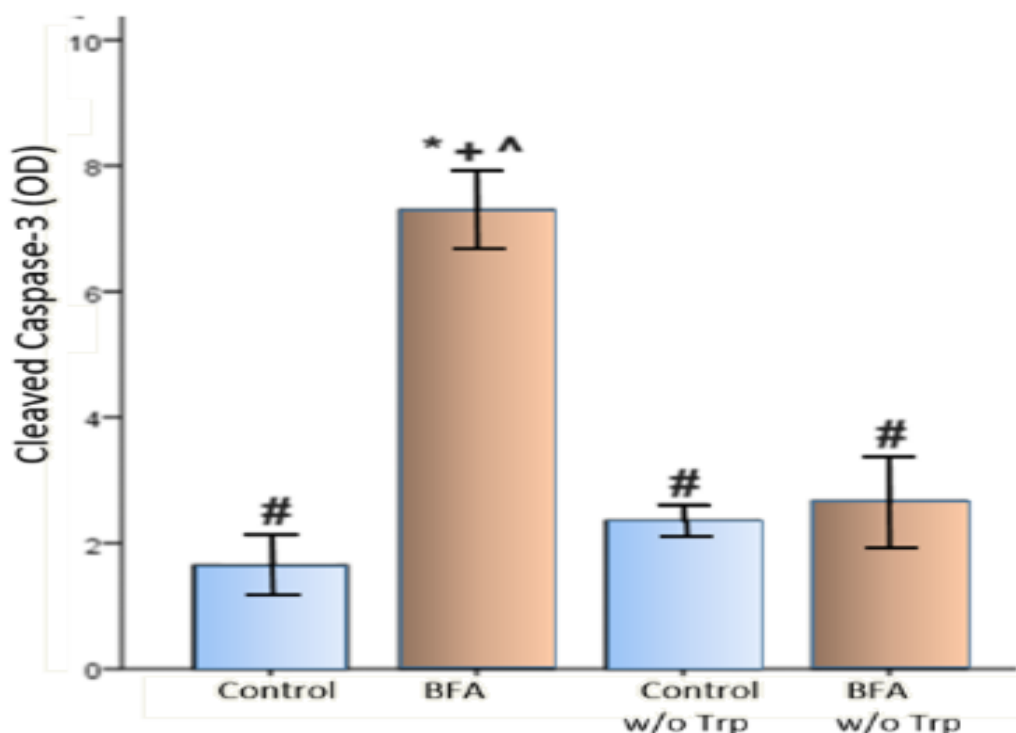
Τόσο η παρουσία BFA όσο και η απουσία τρυπτοφάνης αλλά και ο συνδυασμός αυτών των δύο συνθηκών, οδήγησαν σε αξιοσημείωτη αύξηση έκφρασης της CHOP ($11,83 \pm 1,12$, (BFA) $9,73 \pm 0,46$ (w/o TRP) και $10,66 \pm 1,37$ (BFA+w/o TRP) αντιστοίχως).

Η προσθήκη BFA, η απουσία τρυπτοφάνης αλλά και ο συνδυασμός αυτών προκάλεσε αξιοσημείωτη αύξηση των επιπέδων έκφρασης των προ-αποπτωτικών CHOP σε σχέση με την RPTECs καλλιέργεια ελέγχου ($11,83 \pm 1,12$, (BFA) $9,73 \pm 0,46$ (w/o TRP) και $10,66 \pm 1,37$ (BFA+w/o TRP) vs. $3,43 \pm 0,5$ (ctrl), $p = 0,001$, $p < 0.001$ και $p = 0,003$, αντιστοίχως).

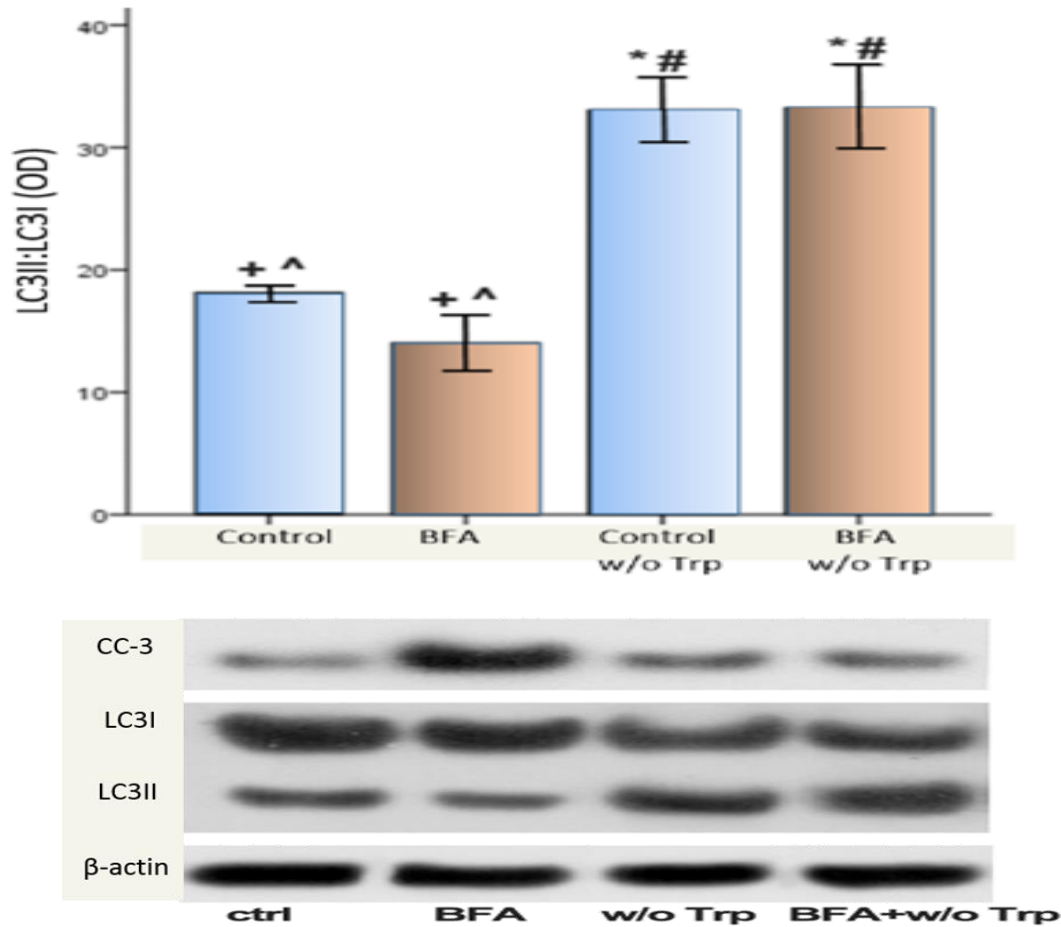


Στις καλλιέργειες RPTECs με BFA τα επίπεδα HSP70 βρέθηκαν αυξημένα σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου ($4,23 \pm 0,12$ vs. $2,01 \pm 0,08$, $p < 0,01$). Η απουσία τρυπτοφάνης δεν προκάλεσε κάποια σημαντική διαφορά στην έκφραση των επιπέδων των heat shock πρωτεϊνών ($1,66 \pm 0,93$, $p = 0,14$). Η απουσία τρυπτοφάνης στις καλλιέργειες με BFA οδήγησε σε σημαντική μείωση των επιπέδων των HSP70 συγκριτικά με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο BFA ($2,62 \pm 0,13$, $p < 0,01$).

4.3.8 Η απουσία τρυπτοφάνης μειώνει την κυτταρική απόπτωση επάγοντας την αυτοφαγία.



Στις κυτταροκαλλιέργειες των RPTECs, τα επίπεδα της ματισμένης caspase-3 παρέμειναν ίδια στην συνθήκη άνευ τρυπτοφάνης συγκριτικά με την συνθήκη control ($2,35 \pm 0,35$ vs $1,65 \pm 0,21$, $p=0,1$). Παρόλα αυτά στις καλλιέργειες με BFA τα επίπεδα ενεργής ματισμένης κασπάσης ανιχνεύτηκαν σημαντικά αυξημένα ($7,30 \pm 0,40$, $p<0,001$). Η απουσία τρυπτοφάνης παρουσία BFA προστάτευσε από την επαγόμενη από το BFA απόπτωση ($2,67 \pm 0,51$, $p=0,1$).



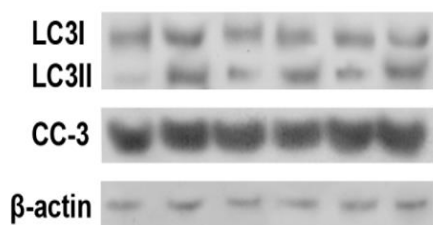
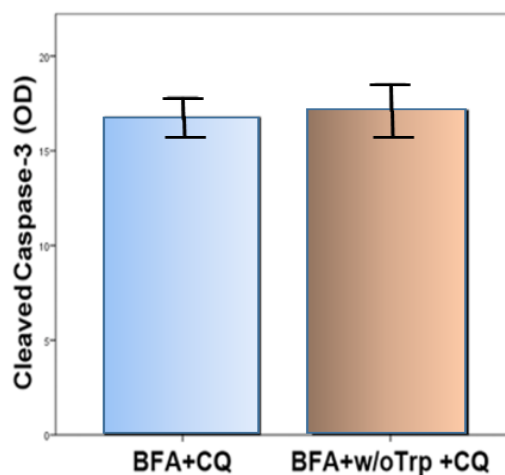
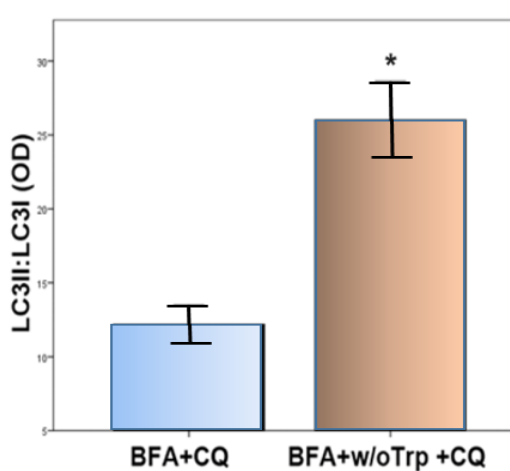
Σχετικά με την αυτοφαγία, η απουσία τρυπτοφάνης στα RPTECs έδειξε ότι η αυτοφαγία, όπως εκτιμήθηκε από τον λόγο LC3II-με-LC3I, αυξήθηκε σημαντικά ($32,6 \pm 3,5$ vs. $18,1 \pm 0,41$, $p < 0,001$).

Στον αντίποδα, δεν παρατηρήθηκε επαγωγή της αυτοφαγίας λόγω ER stress εξαιτίας της BFA ($14,3 \pm 2,6$, $p = 0,45$). Αύξηση της αυτοφαγικής ροής ($33,1 \pm 4,2$, $p < 0,001$) επίσης παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες RPTECs με BFA άνευ τρυπτοφάνης υποδεικνύοντας για ακόμα μια φορά πως η απουσία τρυπτοφάνης οδηγεί το κύτταρο στην αυτοφαγία.

Η προσθήκη χλωροκίνης (CQ) στα RPTECs σε καλλιεργητικό υλικό άνευ τρυπτοφάνης και η ταυτόχρονη παρουσία BFA αύξησε σημαντικά την αναλογία

LC3II : LC3I συγκριτικά με τις καλλιέργειες που είχαν BFA αλλά όχι CQ ($25,22 \pm 2,98$ vs $8,64 \pm 1,47$. $p < 0,001$).

Για να καθοριστεί εάν η αυτοφαγία είναι ωφέλιμη για την κυτταρική επιβίωση κατά το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, αξιολογήθηκαν τα επίπεδα της ματισμένης caspase-3 υπό τις ίδιες συνθήκες και η CQ προστέθηκε ως αναστολέας της αυτοφαγίας. Και στις δύο συνθήκες BFA+CQ και BFA+w/oTrp+CQ ανιχνεύθηκαν σχεδόν τα ίδια υψηλά επίπεδα έκφρασης ματισμένης caspase-3 ($16,75 \pm 1,02$ vs $17,13 \pm 1,31$). Τα άνω ευρήματα ενισχύουν την υπόθεση ότι η απουσία τρυπτοφάνης αυξάνει την αυτοφαγία, τον κυτταρικό αυτόν μηχανισμό που προστατεύει το κύτταρο από την βλαπτική επίδραση του επαγόμενου από την BFA στρες του ΕΔ.



BFA	+	+	+	+	+	+
w/o Trp	-	+	-	+	-	+
CQ	+	+	+	+	+	+

4.4 Συζήτηση

Η απουσία τρυπτοφάνης μπορεί να θεωρηθεί προληπτική προσέγγιση ως προς την νεφρική βλάβη υπό συνθήκες στρες του ενδοπλασματικού δικτύου [165.] [166]]. Η προευσαιθητοποίηση των κυττάρων κατά την ένδοια θρεπτικών συστατικών, έχει θεωρείται σε αρκετές μελέτες ως μέσο προφύλαξης έναντι μιας επιβλαβούς επαγόμενης επίδρασης [167] [168] [169] [170] . Εδώ, τεκμηριώνουμε την προστατευτική δράση της απουσίας τρυπτοφάνης στην επαγόμενη από στρες-ΕΔ απόπτωση των πρωτογενών ανθρώπινων RPTEC. Το στρες-ΕΔ προκλήθηκε από τη χορήγηση BFA, ενός μακροκυκλικού αντιβιοτικού λακτόνης που μειώνει τη συγκέντρωση πρωτεΐνης στον αυλό του ER και τη διακοπή της φυσαλιδώδους μεταφοράς της στο Golgi, οδηγώντας σε συσσώρευση πρωτεϊνών με λανθασμένη αναδίπλωση και τελικά στην απόπτωση [171].

Τα RPTEC μετά από 12 ώρες χορήγησης 5 µg/ml BFA, παρουσίασαν ευαισθησία στην αποπτωτική δράση της BFA παρουσιάζοντας σημάδια έντονης επιδείνωσης, συμπύκνωσης και απώλειας προσκόλλησης, ενώ στις 24 ώρες υπήρξε εκτεταμένος κυτταρικός θάνατος. Από την άλλη, η προετοιμασία των RPTEC σε περιβάλλον με BFA για 16 ώρες αλλά σε ένα μέσο χωρίς τρυπτοφάνη, δεν σταμάτησε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και προστατεύτηκαν από την επαγόμενη από στρες-ΕΔ κυτταρική απόπτωση.

Ομοίως, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός μειώθηκε σημαντικά κατά τη χορήγηση BFA, ενώ στην περίπτωση των προετοιμασμένων χωρίς τρυπτοφάνη RPTECs ο πολλαπλασιασμός ήταν στα ίδια επίπεδα με τα κύτταρα ελέγχου. Επιπλέον, σε περίπτωση ταυτόχρονης απουσίας τρυπτοφάνης και παρουσίας BFA, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός αν και δεν έφτασε τα επίπεδα της κατάστασης ctrl ή w/o Trp, ήταν σημαντικά αυξημένος σε σύγκριση με μόνο BFA.

Η προετοιμασία των νεφρικών κυττάρων σε συνθήκες απουσίας τρυπτοφάνης απέδειξε ότι είναι ευεργετική για την μείωση των ελευθέρων ριζών. Κατά την έναρξη αλλά και την εξέλιξη πολλών ασθενειών, το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με μια μειωμένη κατάσταση οξειδοαναγωγής, που χαρακτηρίζεται μεταξύ άλλων από την μειωμένη διαθεσιμότητα των νιτρικών οξειδίων και τον υπεροξειδωμένο αυλό του ΕΔ, κατά την διάρκεια της παρατεταμένης απόκρισης UPR [204]. Στην παρούσα μελέτη, τα ROS αυξήθηκαν σημαντικά παρουσία BFA, όμως η ταυτόχρονη απουσία Τρυπτοφάνης οδήγησε σε μείωσή τους κατά το ΕΔ-στρες σε παραπάνω από το μισό. Τα παραπάνω ευρήματα σχετικά με τη στέρηση αμινοξέων στη μείωση της παραγωγής ROS κατά τη διάρκεια του στρες ER έχουν επίσης επιβεβαιωθεί από άλλους [172].

Η στέρηση τρυπτοφάνης γίνεται αντιληπτή από την GCN2K και όχι από τον άλλο αισθητήρα έλλειψης αμινοξέων, τον mTORC1[19,36,37]. Κατά την απουσία τρυπτοφάνης, η GCN2K προσδένει στα αφόρτιστα mRNA, αυτόφωσφορυλιώνεται και διμερίζεται. Η φωσφορυλιωμένη πλέον GCN2K (p-GCN2K), φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον eIF2α τροποποιώντας τον μεταφραστικό μηχανισμό του κυττάρου. Τούτο οδηγεί στην μετάφραση μια ειδικής ομάδας mRNAs που περιέχει μια ανάντη περιοχή ORF στην 5'αμετάφραστη περιοχή όπως αυτή του ATF4. Αύξηση στην έκφραση της ATF4 προκαλείται επίσης από την φωσφορυλίωση της PERK κατά το στρες του ΕΔ, ενεργοποιώντας τα μονοπάτια του UPR και τους κατωροικούς τους στόχους που περιλαμβάνουν τις heat shock proteins και τον προαποπτωτικό μεταγραφικό παράγοντα CHOP[173].

Όπως ήταν αναμενόμενο, η απουσία τρυπτοφάνης ενεργοποίησε την κινάση GCN2, ενώ το BFA δεν επηρέασε τα επίπεδα της κινάσης. Στην περίπτωση του PERK, η φωσφορυλίωσή του ήταν αυξημένη στα κυττάρων που είχε προστεθεί BFA

και BFA+w/o με τρυπτοφάνη, ενώ τα επίπεδα έκφρασης p-PERK παρέμειναν αμετάβλητα στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία τρυπτοφάνης.

Η CHOP, που είναι κατωροικός στόχος του UPR, αυξήθηκε σε όλες τις καλλιέργειες που είχαν υποστεί επεξεργασία (BFA-w/oTrp- BFA+w/oTrp) οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι εκτός από την BFA, η απουσία τρυπτοφάνης ενεργοποιεί τα μονοπάτια του UPR με τρόπο ανεξάρτητο της PERK. Το γεγονός αυτό αποδεικνύεται και από άλλες μελέτες που έχουν καταγράψει επαγωγή του ΕΔ-στρες σε περιβάλλοντα στέρησης αμινοξέων λόγω ενεργοποίησης της GCN2K που με την σειρά της οδηγεί στην UPR μέσω του μονοπατιού GCN2K-ATF-4 [174] [175].

Η επαγωγή του στρες τόσο από την απουσία τρυπτοφάνης όσο και από την παρουσία BFA οδήγησαν σε αύξηση της προαποπτωτικής CHOP ωστόσο όμως αυτό δεν φάνηκε στην HSP70. Ενώ η παρουσία BFA οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων HSP70, η απουσία τρυπτοφάνης στα κύτταρα με BFA ανιχνεύτηκε σε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα.

Το εν λόγω εύρημα, καταδεικνύει ένα διαφορετικό συσχετισμό του στόχου ATF-4-HSP70 UPR μεταξύ των κινασών eIF2α, της GCN2 και του PERK γεγονός που έχει καταγραφεί και από άλλες μελέτες.

Ο Heat shock factor αυξάνει την μεταγραφική δραστηριότητα πολλών heat shock proteins συμπεριλαμβανομένης και της HSP70. Κατά την απουσία γλυκόζης ή αμινοξέων μειώνει την μεταγραφική δραστηριότητα των καταρροϊκών HSPs [170] [169]. Σε απάντηση της ενεργοποίησης της HSP70 από τις Ire1 και PERK κατά την διάρκεια του UPR, οι GCN2 και PERK παρά το ότι έχουν κοινό κατωροϊκό στόχο ρυθμίζουν με διαφορετικό τρόπο την μεταγραφή και μετάφραση των κατωροϊκών γονιδίων του UPR και στην περίπτωση της HSP70 αυτό γίνεται με ανταγωνιστικό τρόπο.

Στην παρούσα μελέτη, παρατηρήσαμε ότι ενώ η έκφραση της CHOP αυξήθηκε σημαντικά στην καλλιέργεια άνευ τρυπτοφάνης, όπως και σε αυτήν με προσθήκη BFA αλλά και τον συνδυασμό αυτών των δύο συνθηκών, η απουσία τρυπτοφάνης προστατεύει από την απόπτωση.

Η CHOP είναι ένας πολυλειτουργικός προ-αποπτωτικός μεταγραφικός παράγοντας κατά την απόκριση στο ΕΔ-στρες, γνωστός ότι ρυθμίζει κατωροϊκά την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 και μεταβάλλει την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου, ευαισθητοποιώντας το κύτταρο στην απόπτωση που προκαλείται από το ΕΔ-στρες [176]. Ωστόσο, αντιφατικά αποτελέσματα παρατηρήθηκαν όταν η απόπτωση των RPTEC αξιολογήθηκε με την εξέταση των επιπέδων της ενεργοποιημένης διασπασμένης κασπάσης-3 (cleaved caspase-3), στην οποία συγκλίνουν όλες οι αποπτωτικές οδοί [177]. Τα επίπεδα ματισμένης κασπάσης-3 ανιχνεύθηκαν υψηλά κατά το επαγόμενο από BFA στρες του ΕΔ, αλλά στην περίπτωση απουσίας τρυπτοφάνης με ή χωρίς BFA, η κυτταρική απόπτωση δεν επηρεάστηκε δείχνοντας ότι η απουσία τρυπτοφάνης έδρασε προστατευτικά.

Στην προσπάθεια να προσδιοριστούν οι παράγοντες που προστατεύουν τα κύτταρα κατά την απουσία τρυπτοφάνης υπό συνθήκες ER-stress επαγόμενου από BFA, εξετάστηκε το ενδεχόμενο ο υποκείμενος μηχανισμός να είναι η αυτοφαγία. Η αυτοφαγία δρα ως μηχανισμός τροφοδοσίας υπο συνθήκες διατροφικού στρες ή οξειδωτικής βλάβης και έχει προστατευτικό ρόλο στην οξεία και χρόνια νεφρική βλάβη AKI και CKD [178]. Κατά την απουσία αμινοξέων η αυτοφαγία αυξάνεται και μια δίαιτα φτωχή σε αμινοξέα βελτιώνει την ισχαιμική οξεία νεφρική βλάβη.

Στην μελέτη μας η αυτοφαγία αυξήθηκε σημαντικά και στις δύο περιπτώσεις προετοιμασίας απουσίας τρυπτοφάνης (w/o συνθήκες Trp και BFA+w/o Trp, αντίστοιχα). Από την άλλη, η παρουσία BFA από μόνη της δεν έδειξε αύξηση στην αυτοφαγία καθώς αξιολογήθηκε από την αναλογία LC3II-προς-LC3I και δεν

επίδρασε στα προετοιμασμένα RPTEC. Αυτή η παρατήρηση διαφέρει από τη μελέτη που έγινε σε νεφρικά κύτταρα από τους Kawakami et al. 179] όμως τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν σε εκείνη την μελέτη ήταν αθανατοποιημένα.

Η ευεργετική επίδραση της αυτοφαγίας, σε RPTEC που καλλιεργήθηκαν απουσία τρυπτοφάνης κατά τη διάρκεια του επαγόμενου από BFA ΕΔ-στρες, στην παράταση της κυτταρικής επιβίωσης, επιβεβαιώθηκε επίσης με τη χρήση χλωροκίνης που αναστέλλει την αυτοφαγία [181]. Σε σύγκριση με τα προετοιμασμένα RPTEC υπό θεραπεία με BFA και χλωροκίνη, η ταυτόχρονη προετοιμασία των κυττάρων σε ένα μέσο χωρίς τρυπτοφάνη αύξησε την αυτοφαγική ροή περισσότερο από δύο φορές. Επιπλέον, τα επίπεδα ματισμένης κασπάσης-3 στις ίδιες συνθήκες ήταν σημαντικά αυξημένα και παρέμειναν σχετικά ίδια.

Η αναστολή της αυτοφαγικής διαδικασίας από τη χλωροκίνη οδήγησε σε αυξημένη κυτταρική απόπτωση, σε αντίθεση με τον προστατευτικό μηχανισμό προετοιμασίας για την κυτταρική επιβίωση έναντι στρες ΕΔ. Αποδεικτά στοιχεία αυξημένης επιβίωσης λόγω αύξησης της αυτοφαγίας λόγω στέρησης αμινοξέων κατά τη διάρκεια ΕΔ-στρες έχει επίσης επιβεβαιωθεί από άλλες μελέτες, στις οποίες εμπλέκονται άλλα αμινοξέα, εκτός από την τρυπτοφάνη [180] [182] [183].

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης υποδηλώνουν ότι η απουσία τρυπτοφάνης στα πρωτογενή ανθρώπινα RPTEC έχει προστατευτικό ρόλο έναντι των επιβλαβών επιπτώσεων του στρες ER. Η επακόλουθη ενεργοποίηση της αυτοφαγίας μέσω της προετοιμασίας κατά τη ένδονα τρυπτοφάνης είναι ένας από τους υποκείμενους μηχανισμούς που διασώζουν τα κύτταρα από την απόπτωση που προκαλείται από το στρες ER. Τα δεδομένα της συγκεκριμένης μελέτης αποτελούν εφαλτήριο για τη βελτίωση ή την πρόληψη της νεφρικής βλάβης που

προκαλείται από το στρες του ER, μέσω επιλεκτικής διατροφής ή φαρμακευτικών παραγόντων που επάγουν την αυτοφαγία.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. IDF DIABETES ATLAS Ninth Edition 2019
2. ΓΕΝΙΚΗ ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ ΥΠΟΥΡΓΕΙΟΥ ΥΓΕΙΑΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΔΑΠΑΝΗΣ, ΤΗΝ ΟΛΟΚΛΗΡΩΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΩΝ/ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΩΝ ΚΑΙ ΤΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΜΗΤΡΩΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ-ΑΠΡΙΛΙΟΣ 2019
3. Largay J. Case Study: New-onset diabetes: How to tell the difference between Type 1 and Type 2 Diabetes. *Clinical Diabetes*. 2012 Jan 1;30(1):25–6; DOI:10.2337/diaclin.30.1.25.
4. WHO. Diabetes. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>. Access date: January 17, 2015
5. Kahn, S., Hull, R. & Utzschneider, K. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444, 840–846 (2006). <https://doi.org/10.1038/nature05482>.]
6. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes – 2018. *Diabetes Care*. 2018;41(Suppl 1):S13–27; DOI:10.2337/dc18-S00
7. Wallace MA. Anatomy and physiology of the kidney. *AORN journal*. 1998 Nov 1;68(5):799-820.
8. Rayner H, Thomas M, Milford D. Kidney anatomy and physiology. In *Understanding Kidney Diseases 2016* (pp. 1-10). Springer, Cham.
9. Marieb EN, Hoehn K. *Human anatomy & physiology*. Pearson education; 2007.
10. Fioretto, Paola, et al. "Sequential renal biopsies in insulin-dependent diabetic patients: structural factors associated with clinical progression." *Kidney international* 48.6 (1995): 1929-1935.]
11. SM, Mauer, et al. "Structural-functional relationships in diabetic nephropathy." *J Clin Invest* 74 (1984): 1143-1.
12. Heilig CW, Concepcion LA, Riser BL, Freytag SO, Zhu M, Cortes P. Overexpression of glucose transporters in rat mesangial cells cultured in a normal glucose milieu mimics the diabetic phenotype. *The Journal of clinical investigation*. 1995 Oct 1;96(4):1802-14.
13. Misra PS, Szeto SG, Krizova A, Gilbert RE, Yuen DA. Renal histology in diabetic nephropathy predicts progression to end-stage kidney disease but not the rate of renal function decline. *BMC nephrology*. 2020 Dec;21(1):1-2.
14. Fioretto P, Mauer M. Histopathology of diabetic nephropathy. In *Seminars in nephrology* 2007 Mar 1 (Vol. 27, No. 2, pp. 195-207). WB Saunders.
15. Bockman DE. Anatomy of the pancreas. *The exocrine pancreas: biology, pathobiology and disease*. Raven Press, New York. 1993:1-8.
16. Baeshen NA, Baeshen MN, Sheikh A, Bora RS, Ahmed MM, Ramadan HA, Saini KS, Redwan EM. Cell factories for insulin production. *Microbial cell factories*. 2014 Dec;13(1):1-9.

17. Steiner DF, Park SY, Støy J, Philipson LH, Bell GI. A brief perspective on insulin production. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2009 Nov;11:189-96.
18. Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochemical Journal*. 2000 Mar 15;346(3):561-76.
19. Liu P, Gan W, Chin YR, Ogura K, Guo J, Zhang J, Wang B, Blenis J, Cantley LC, Toker A, Su B. PtdIns (3, 4, 5) P₃-dependent activation of the mTORC2 kinase complex. *Cancer discovery*. 2015 Nov 1;5(11):1194-209.
20. Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. *Annual review of biochemistry*. 1998 Jul;67(1):481-507.
21. Govers R. Cellular regulation of glucose uptake by glucose transporter GLUT4. *Advances in clinical chemistry*. 2014 Jan 1;66:173-240.
22. Huang X, Liu G, Guo J, Su Z. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. *International journal of biological sciences*. 2018;14(11):1483.
23. Kousteni S. FoxO1, the transcriptional chief of staff of energy metabolism. *Bone*. 2012 Feb 1;50(2):437-43.
24. Wright EM, Hirayama BA, Loo DF. Active sugar transport in health and disease. *Journal of internal medicine*. 2007 Jan;261(1):32-43.
25. Uldry M, Thorens B. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflügers Archiv*. 2004 Feb;447(5):480-9.
26. Thorens B, Mueckler M. Glucose transporters in the 21st Century. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2010 Feb;298(2):E141-5.
27. Mueckler M, Makepeace C. Model of the exofacial substrate-binding site and helical folding of the human Glut1 glucose transporter based on scanning mutagenesis. *Biochemistry*. 2009 Jun 30;48(25):5934-42.
28. Thorens, Bernard. "Molecular and Cellular Physiology of GLUT-2, a High-Km Facilitated Diffusion Glucose Transporter." *International review of cytology* 137 (1992): 209-238.
29. Thorens B, Weir GC, Leahy JL, Lodish HF, Bonner-Weir S. Reduced expression of the liver/beta-cell glucose transporter isoform in glucose-insensitive pancreatic beta cells of diabetic rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990 Sep 1;87(17):6492-6.
30. Kellett GL, Brot-Laroche E, Mace OJ, Leturque A. Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2. *Annu. Rev. Nutr.* 2008 Aug 21;28:35-54.
31. Marty N, Dallaporta M, Thorens B. Brain glucose sensing, counterregulation, and energy homeostasis. *Physiology*. 2007 Aug;22(4):241-51
32. Larance M, Ramm G, James DE. The GLUT4 code. *Molecular endocrinology*. 2008 Feb 1;22(2):226-33.
33. Wright EM. Glucose transport families SLC5 and SLC50. *Molecular aspects of medicine*. 2013 Apr 1;34(2-3):183-96.
34. DeFronzo RA, Norton L, Abdul-Ghani M. Renal, metabolic and cardiovascular considerations of SGLT2 inhibition. *Nature Reviews Nephrology*. 2017 Jan;13(1):11-26.
35. Wright EM. Renal Na⁺-glucose cotransporters. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2001 Jan 1;280(1):F10-8.

36. Wright EM, Loo DD, Hirayama BA, Turk E. Surprising versatility of Na⁺-glucose cotransporters: SLC5. *Physiology*. 2004 Dec;19(6):370-6.
37. Ronquist G, Theodorsson E. Inherited, non-spherocytic haemolysis due to deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2007 Jan 1;67(1):105-11.
38. Bolaños JP, Almeida A, Moncada S. Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway?. *Trends in biochemical sciences*. 2010 Mar 1;35(3):145-9.
39. Chandel NS. Glycolysis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2021 May 1;13(5):a040535.
40. Alabduladhem TO, Bordoni B. Physiology, Krebs Cycle. InStatPearls [Internet] 2021 Feb 7. StatPearls Publishing.
41. Trumpower BL, Gennis RB. Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: the enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation. *Annual review of biochemistry*. 1994 Jul;63(1):675-716.
42. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi SI, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 2000 Apr;404(6779):787-90.
43. Kadenbach B. Complex IV-The regulatory center of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Mitochondrion*. 2021 May 1;58:296-302.
44. Wallace DC. Diseases of the mitochondrial DNA. *Annual review of biochemistry*. 1992 Jul;61(1):1175-212.
45. Carroll AM, Haines LR, Pearson TW, Fallon PG, Walsh CM, Brennan CM, Breen EP, Porter RK. Identification of a functioning mitochondrial uncoupling protein 1 in thymus. *Journal of Biological Chemistry*. 2005 Apr 22;280(16):15534-43.
46. Krauss S, Zhang CY, Scorrano L, Dalgaard LT, St-Pierre J, Grey ST, Lowell BB. Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic β cell dysfunction. *The Journal of clinical investigation*. 2003 Dec 15;112(12):1831-42.
47. Li Y, Maedler K, Shu L, Haataja L. UCP-2 and UCP-3 proteins are differentially regulated in pancreatic beta-cells. *PLoS One*. 2008 Jan 2;3(1):e1397.
48. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *diabetes*. 2005 Jun 1;54(6):1615-25.
49. Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS letters*. 1997 Oct 13;416(1):15-8.
50. Moreli JB, Santos JH, Rocha CR, Damasceno DC, Morceli G, Rudge MV, Bevilacqua E, Calderon IM. DNA damage and its cellular response in mother and fetus exposed to hyperglycemic environment. *BioMed research international*. 2014 Jan 1;2014.
51. Murata MM, Kong X, Moncada E, Chen Y, Imamura H, Wang P, Berns MW, Yokomori K, Digmán MA. NAD⁺ consumption by PARP1 in response to DNA damage triggers metabolic shift critical for damaged cell survival. *Molecular biology of the cell*. 2019 Sep 15;30(20):2584-97.

52. Virág L, Salzman AL, Szabó C. Poly (ADP-ribose) synthetase activation mediates mitochondrial injury during oxidant-induced cell death. *The Journal of Immunology*. 1998 Oct 1;161(7):3753-9.
53. Yu SW, Andrabi SA, Wang H, Kim NS, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL. Apoptosis-inducing factor mediates poly (ADP-ribose)(PAR) polymer-induced cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006 Nov 28;103(48):18314-9.
54. Mara L, Oates PJ. The polyol pathway and diabetic retinopathy. In *Diabetic Retinopathy 2008* (pp. 159-186). Humana Press.
55. Jeffery J, Jörnvall H. Enzyme relationships in a sorbitol pathway that bypasses glycolysis and pentose phosphates in glucose metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1983 Feb 1;80(4):901-5.
56. Srivastava SK, Ramana KV, Bhatnagar A. Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocrine reviews*. 2005 May 1;26(3):380-92.
57. Singh M, Kapoor A, Bhatnagar A. Physiological and Pathological Roles of Aldose Reductase. *Metabolites*. 2021 Oct;11(10):655.
58. Srivastava SK, Hair GA, Das B. Activated and unactivated forms of human erythrocyte aldose reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1985 Nov 1;82(21):7222-6.
59. Srikanth KK, Orrick JA. Biochemistry, Polyol Or Sorbitol Pathways. In *StatPearls [Internet]* 2021 Nov 22. StatPearls Publishing.
60. Dunlop M. Aldose reductase and the role of the polyol pathway in diabetic nephropathy. *Kidney international*. 2000 Sep 1;58:S3-12.
61. Kasajima H, Yamagishi SI, Sugai S, Yagihashi N, Yagihashi S. Enhanced in situ expression of aldose reductase in peripheral nerve and renal glomeruli in diabetic patients. *Virchows Archiv*. 2001 Jul;439(1):46-54.
62. Zopf S, Flämig J, Schmid H, Miosge N, Blaschke S, Hahn EG, Müller GA, Grunewald RW. Localization of the polyol pathway in the human kidney. *Histology and histopathology*. 2009.
63. Bravi MC, Pietrangeli P, Laurenti O, Basili S, Cassone-Faldetta M, Ferri C, De Mattia G. Polyol pathway activation and glutathione redox status in non—insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism*. 1997 Oct 1;46(10):1194-8.
64. Morris BJ. Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013 Mar 1;56:133-71.
65. Spector A. Some aspects of Dr Kinoshita's contributions to lens protein chemistry. *Experimental eye research*. 1990 Jun 1;50(6):689-94.
66. Ishii N, Ikenaga H, Ogawa Z, Aoki Y, Saruta T, Suga T. Effects of renal sorbitol accumulation on urinary excretion of enzymes in hyperglycaemic rats. *Annals of clinical biochemistry*. 2001 Jul 1;38(4):391-8.
67. Thomas TP, Porcellati F, Kato K, Stevens MJ, Sherman WR, Greene DA. Effects of glucose on sorbitol pathway activation, cellular redox, and metabolism of myo-inositol, phosphoinositide, and diacylglycerol in cultured human retinal pigment epithelial cells. *The Journal of clinical investigation*. 1994 Jun 1;93(6):2718-24.

68. Diggle CP, Shires M, Leitch D, Brooke D, Carr IM, Markham AF, Hayward BE, Asipu A, Bonthron DT. Ketoheokinase: expression and localization of the principal fructose-metabolizing enzyme. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2009 Aug;57(8):763-74.
69. Hannou SA, Haslam DE, McKeown NM, Herman MA. Fructose metabolism and metabolic disease. *The Journal of clinical investigation*. 2018 Feb 1;128(2):545-55.
70. Lanaspá MA, Ishimoto T, Cicerchi C, Tamura Y, Roncal-Jimenez CA, Chen W, Tanabe K, Andres-Hernando A, Orlicky DJ, Finol E, Inaba S. Endogenous fructose production and fructokinase activation mediate renal injury in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2014 Nov 1;25(11):2526-38.
71. Chiaradonna F, Ricciardiello F, Palorini R. The nutrient-sensing hexosamine biosynthetic pathway as the hub of cancer metabolic rewiring. *Cells*. 2018 Jun;7(6):53.
72. Park J, Lai MK, Arumugam TV, Jo DG. O-GlcNAcylation as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Neuromolecular medicine*. 2020 Jun;22(2):171-93.
73. Schleicher ED, Weigert C. Role of the hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy. *Kidney international*. 2000 Sep 1;58:S13-8.
74. Fülöp N, Marchase RB, Chatham JC. Role of protein O-linked N-acetylglucosamine in mediating cell function and survival in the cardiovascular system. *Cardiovascular research*. 2007 Jan 15;73(2):288-97.
75. Ong Q, Han W, Yang X. O-GlcNAc as an integrator of signaling pathways. *Frontiers in endocrinology*. 2018 Oct 16;9:599.
76. Ma J, Hart GW. O-GlcNAc profiling: from proteins to proteomes. *Clinical proteomics*. 2014 Dec;11(1):1-6.
77. Shafi R, Iyer SP, Ellies LG, O'Donnell N, Marek KW, Chui D, Hart GW, Marth JD. The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000 May 23;97(11):5735-9.
78. Zachara NE, Molina H, Wong KY, Pandey A, Hart GW. The dynamic stress-induced "O-GlcNAc-ome" highlights functions for O-GlcNAc in regulating DNA damage/repair and other cellular pathways. *Amino acids*. 2011 Mar;40(3):793-808.
79. Cork GK, Thompson J, Slawson C. Real talk: the inter-play between the mTOR, AMPK, and hexosamine biosynthetic pathways in cell signaling. *Frontiers in endocrinology*. 2018:522.
80. Akella NM, Ciraku L, Reginato MJ. Fueling the fire: emerging role of the hexosamine biosynthetic pathway in cancer. *BMC biology*. 2019 Dec;17(1):1-4.
81. Braakman I, Bulleid NJ. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annual review of biochemistry*. 2011 Jul 7;80:71-99.
82. Wang ZV, Deng Y, Gao N, Pedrozo Z, Li DL, Morales CR, Criollo A, Luo X, Tan W, Jiang N, Lehrman MA. Spliced X-box binding protein 1 couples the

- unfolded protein response to hexosamine biosynthetic pathway. *Cell*. 2014 Mar 13;156(6):1179-92.
83. Ferrer CM, Lynch TP, Sodi VL, Falcone JN, Schwab LP, Peacock DL, Vocadlo DJ, Seagroves TN, Reginato MJ. O-GlcNAcylation regulates cancer metabolism and survival stress signaling via regulation of the HIF-1 pathway. *Molecular cell*. 2014 Jun 5;54(5):820-31.
84. Erickson JR, Pereira L, Wang L, Han G, Ferguson A, Dao K, Copeland RJ, Despa F, Hart GW, Ripplinger CM, Bers DM. Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. *Nature*. 2013 Oct;502(7471):372-6.
85. Whelan SA, Dias WB, Thiruneelakantapillai L, Lane MD, Hart GW. Regulation of insulin receptor substrate 1 (IRS-1)/AKT kinase-mediated insulin signaling by O-linked β -N-acetylglucosamine in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of biological chemistry*. 2010 Feb 19;285(8):5204-11.
86. Park S, Pak J, Jang I, Cho JW. Inhibition of mTOR affects protein stability of OGT. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014 Oct 17;453(2):208-12.
87. Kaasik K, Kivimäe S, Allen JJ, Chalkley RJ, Huang Y, Baer K, Kissel H, Burlingame AL, Shokat KM, Ptáček LJ, Fu YH. Glucose sensor O-GlcNAcylation coordinates with phosphorylation to regulate circadian clock. *Cell metabolism*. 2013 Feb 5;17(2):291-302.
88. Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann R, Schleicher ED. High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *The Journal of clinical investigation*. 1998 Jan 1;101(1):160-9.
89. Degrell P, Cseh J, Mohás M, Molnár GA, Pajor L, Chatham JC, Fülöp N, Wittmann I. Evidence of O-linked N-acetylglucosamine in diabetic nephropathy. *Life sciences*. 2009 Mar 27;84(13-14):389-93.
90. Idris I, Gray S, Donnelly R. Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia*. 2001 May;44(6):659-73.
91. Lee TS, Saltsman KA, Ohashi H, King GL. Activation of protein kinase C by elevation of glucose concentration: proposal for a mechanism in the development of diabetic vascular complications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989 Jul 1;86(13):5141-5.
92. Idris I, Donnelly R. Protein kinase C β inhibition: a novel therapeutic strategy for diabetic microangiopathy. *Diabetes and Vascular Disease Research*. 2006 Dec;3(3):172-8.
93. Noh H, King GL. The role of protein kinase C activation in diabetic nephropathy. *Kidney International*. 2007 Aug 1;72:S49-53.
94. Cooper ME. Interaction of metabolic and haemodynamic factors in mediating experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia*. 2001 Nov;44(11):1957-72.

95. Chappey O, Dosquet C, Wautier MP, Wautier JL. Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. *European journal of clinical investigation*. 1997 Feb;27(2):97-108.
96. Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ. cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell*. 1993 Jan 29;72(2):269-78.
97. Haneda M, Araki SI, Togawa M, Sugimoto T, Motohide I, Kikkawa R. Mitogen-activated protein kinase cascade is activated in glomeruli of diabetic rats and glomerular mesangial cells cultured under high glucose conditions. *Diabetes*. 1997 May 1;46(5):847-53.
98. Sharma K, Danoff TM, DePiero A, Ziyadeh FN. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages and glomerular mesangial cells by elevated glucose levels: possible mediation via protein kinase C. *Biochemical and biophysical research communications*. 1995 Feb 6;207(1):80-8.
99. Craven PA, Studer RK, Derubertis FR. Impaired nitric oxide-dependent cyclic guanosine monophosphate generation in glomeruli from diabetic rats. Evidence for protein kinase C-mediated suppression of the cholinergic response. *The Journal of clinical investigation*. 1994 Jan 1;93(1):311-20.
100. Tsuchida K, Makita Z, Yamagishi S, Atsumi T, Miyoshi H, Obara S, Ishida M, Ishikawa S, Yasumura K, Koike T. Suppression of transforming growth factor beta and vascular endothelial growth factor in diabetic nephropathy in rats by a novel advanced glycation end product inhibitor, OPB-9195. *Diabetologia*. 1999 Apr;42(5):579-88.
101. Chetyrkin S, Mathis M, Pedchenko V, Sanchez OA, McDonald WH, Hachey DL, Madu H, Stec D, Hudson B, Voziyan P. Glucose autoxidation induces functional damage to proteins via modification of critical arginine residues. *Biochemistry*. 2011 Jul 12;50(27):6102-12.
102. Makita Z, Radoff S, Rayfield EJ, Yang Z, Skolnik E, Delaney V, Friedman EA, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *New England Journal of Medicine*. 1991 Sep 19;325(12):836-42.
103. Palimeri S, Palioura E, Diamanti-Kandarakis E. Current perspectives on the health risks associated with the consumption of advanced glycation end products: recommendations for dietary management. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*. 2015;8:415.
104. Price RG, Spiro RG. Studies on the metabolism of the renal glomerular basement membrane. Turnover measurements in the rat with the use of radiolabeled amino acids. *Journal of Biological Chemistry*. 1977 Dec 10;252(23):8597-602.
105. Ramasamy R, Vannucci SJ, Yan SS, Herold K, Yan SF, Schmidt AM. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. *Glycobiology*. 2005 Jul 1;15(7):16R-28R.
106. Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. Methylglyoxal comes of AGE. *Cell*. 2006 Jan 27;124(2):258-60.

107. Li J, Schmidt AM. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *Journal of Biological Chemistry*. 1997 Jun 27;272(26):16498-506.
108. Raj DS, Choudhury D, Welbourne TC, Levi M. Advanced glycation end products: a Nephrologist's perspective. *American journal of kidney diseases*. 2000 Mar 1;35(3):365-8.
109. Dhar I, Desai K. Aging: Drugs to eliminate methylglyoxal, a reactive glucose metabolite, and advanced glycation endproducts. *In Pharmacology* 2012 Mar 14. IntechOpen.
110. Allaman I, Bélanger M, Magistretti PJ. Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. *Frontiers in neuroscience*. 2015 Feb 9;9:23.
111. Rabbani N, Thornalley PJ. Methylglyoxal, glyoxalase 1 and the dicarbonyl proteome. *Amino acids*. 2012 Apr;42(4):1133-42.
112. Vander Jagt DL, Hunsaker LA. Methylglyoxal metabolism and diabetic complications: roles of aldose reductase, glyoxalase-I, betaine aldehyde dehydrogenase and 2-oxoaldehyde dehydrogenase. *Chemico-biological interactions*. 2003 Feb 1;143:341-51.
113. Thornalley PJ. Protecting the genome: defence against nucleotide glycation and emerging role of glyoxalase I overexpression in multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Biochemical Society Transactions*. 2003 Dec 1;31(6):1372-7.
114. Dhar A, Dhar I, Jiang B, Desai KM, Wu L. Chronic methylglyoxal infusion by minipump causes pancreatic β -cell dysfunction and induces type 2 diabetes in Sprague-Dawley rats. *Diabetes*. 2011 Mar 1;60(3):899-908.
115. Giacco F, Du X, D'Agati VD, Milne R, Sui G, Geffrion M, Brownlee M. Knockdown of glyoxalase 1 mimics diabetic nephropathy in nondiabetic mice. *Diabetes*. 2014 Jan 1;63(1):291-9.
116. Brouwers O, Niessen PM, Miyata T, Østergaard JA, Flyvbjerg A, Peutz-Kootstra CJ, Sieber J, Mundel PH, Brownlee M, Janssen BJ, De Mey JG. Glyoxalase-1 overexpression reduces endothelial dysfunction and attenuates early renal impairment in a rat model of diabetes. *Diabetologia*. 2014 Jan;57(1):224-35.
117. LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 2007 Jul;8(7):499-509. [Salminen A, Kauppinen A, Suuronen T, Kaarniranta K, Ojala J. ER stress in Alzheimer's disease: a novel neuronal trigger for inflammation and Alzheimer's pathology. *Journal of neuroinflammation*. 2009 Dec;6(1):1-3.
118. Cybulsky AV. Endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response and autophagy in kidney diseases. *Nature Reviews Nephrology*. 2017 Nov;13(11):681-96.
119. Brodsky JL, Skach WR. Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum: Recent lessons from yeast and mammalian cell systems. *Current opinion in cell biology*. 2011 Aug 1;23(4):464-75.
120. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012 Feb;13(2):89-102.

121. Lindholm D, Korhonen L, Eriksson O, Köks S. Recent insights into the role of unfolded protein response in ER stress in health and disease. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2017 May 10;5:48.
122. Bernasconi R, Molinari M. ERAD and ERAD tuning: disposal of cargo and of ERAD regulators from the mammalian ER. *Current opinion in cell biology*. 2011 Apr 1;23(2):176-83.
123. Peng X, Yang T, He L, Chen X, Jiang Y, Zhang H, Liu H, Peng Y. Impact of GADD34 on Apoptosis of Tonsillar Mononuclear Cells from IgA Nephropathy Patients by Regulating Eif2 α Phosphorylation. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018;50(6):2203-15.
124. Kim KH, Jeong YT, Kim SH, Jung HS, Park KS, Lee HY, Lee MS. Metformin-induced inhibition of the mitochondrial respiratory chain increases FGF21 expression via ATF4 activation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013 Oct 11;440(1):76-81.
125. Lozy F, Karantza V. Autophagy and cancer cell metabolism. In *Seminars in cell & developmental biology* 2012 Jun 1 (Vol. 23, No. 4, pp. 395-401). Academic Press.
126. Montrose D, Galluzzi L. *Cellular Nutrient Utilization and Cancer*. Academic Press; 2019 Aug 24.
127. Ohoka N, Yoshii S, Hattori T, Onozaki K, Hayashi H. TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *The EMBO journal*. 2005 Mar 23;24(6):1243-55.
128. Lindenmeyer MT, Rastaldi MP, Ikehata M, Neusser MA, Kretzler M, Cohen CD, Schlöndorff D. Proteinuria and hyperglycemia induce endoplasmic reticulum stress. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2008 Nov 1;19(11):2225-36.
129. Lee K, Tirasophon W, Shen X, Michalak M, Prywes R, Okada T, Yoshida H, Mori K, Kaufman RJ. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes & development*. 2002 Feb 15;16(4):452-66.
130. Sriburi R, Jackowski S, Mori K, Brewer JW. XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology*. 2004 Oct 11;167(1):35-41.
131. Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, Harada A, Mori K. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6 α and XBP1. *Developmental cell*. 2007 Sep 4;13(3):365-76.
132. Mizushima N. The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell death & differentiation*. 2005 Nov;12(2):1535-41.
133. Maurel M, Chevet E, Tavernier J, Gerlo S. Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends in biochemical sciences*. 2014 May 1;39(5):245-54.
134. Maurel M, Chevet E, Tavernier J, Gerlo S. Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends in biochemical sciences*. 2014 May 1;39(5):245-54.

135. Mortimore GE, Pösö AR. Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply. *Annual review of nutrition*. 1987 Jul;7(1):539-68.
136. Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, Scaravilli F, Easton DF, Duden R, O'Kane CJ, Rubinsztein DC. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nature genetics*. 2004 Jun;36(6):585-95.
137. Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ. Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*. 2011 Jul 1;7(7):673-82.
138. Arias E, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. *Current opinion in cell biology*. 2011 Apr 1;23(2):184-9.
139. Ding Y, Choi ME. Autophagy in diabetic nephropathy. *The Journal of endocrinology*. 2015 Jan;224(1):R15.
140. Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, Oomori H, Noda T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Amano A. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*. 2013 Mar;495(7441):389-93.
141. Yamahara K, Kume S, Koya D, Tanaka Y, Morita Y, Chin-Kanasaki M, Araki H, Isshiki K, Araki SI, Haneda M, Matsusaka T. Obesity-mediated autophagy insufficiency exacerbates proteinuria-induced tubulointerstitial lesions. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2013 Nov 1;24(11):1769-81.
142. Lee IH, Cao L, Mostoslavsky R, Lombard DB, Liu J, Bruns NE, Tsokos M, Alt FW, Finkel T. A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008 Mar 4;105(9):3374-9.
143. Kume S, Uzu T, Horiike K, Chin-Kanasaki M, Isshiki K, Araki SI, Sugimoto T, Haneda M, Kashiwagi A, Koya D. Calorie restriction enhances cell adaptation to hypoxia through Sirt1-dependent mitochondrial autophagy in mouse aged kidney. *The Journal of clinical investigation*. 2010 Apr 1;120(4):1043-55.
144. He W, Wang Y, Zhang MZ, You L, Davis LS, Fan H, Yang HC, Fogo AB, Zent R, Harris RC, Breyer MD. Sirt1 activation protects the mouse renal medulla from oxidative injury. *The Journal of clinical investigation*. 2010 Apr 1;120(4):1056-68.
145. Kim SI, Na HJ, Ding Y, Wang Z, Lee SJ, Choi ME. Autophagy promotes intracellular degradation of type I collagen induced by transforming growth factor (TGF)- β 1. *Journal of Biological Chemistry*. 2012 Apr 6;287(15):11677-88.
146. Castilho BA, Shanmugam R, Silva RC, Ramesh R, Himme BM, Sattlegger E. Keeping the eIF2 alpha kinase Gcn2 in check. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2014 Sep 1;1843(9):1948-68.
147. Anda S, Zach R, Grallert B. Activation of Gcn2 in response to different stresses. *PloS one*. 2017 Aug 3;12(8):e0182143.
148. Grallert B, Boye E. GCN2, an old dog with new tricks. *Biochemical Society Transactions*. 2013 Dec 1;41(6):1687-91.
149. Nakagawa T, Johnson RJ, Andres-Hernando A, Roncal-Jimenez C, Sanchez-Lozada LG, Tolan DR, Lanaspa MA. Fructose production and metabolism in the

- kidney. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2020 May 1;31(5):898-906.
150. Eleftheriadis T, Pissas G, Yiannaki E, Markala D, Arampatzis S, Antoniadis G, Liakopoulos V, Stefanidis I. Inhibition of indoleamine 2, 3-dioxygenase in mixed lymphocyte reaction affects glucose influx and enzymes involved in aerobic glycolysis and glutaminolysis in alloreactive T-cells. *Human immunology*. 2013 Dec 1;74(12):1501-9.
151. Brosius FC, Heilig CW. Glucose transporters in diabetic nephropathy. *Pediatric Nephrology*. 2005 Apr;20(4):447-51.
152. Sato S, Kawamura H, Takemoto M, Maezawa Y, Fujimoto M, Shimoyama T, Koshizaka M, Tsurutani Y, Watanabe A, Ueda S, Halevi K. Halofuginone prevents extracellular matrix deposition in diabetic nephropathy. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009 Feb 6;379(2):411-6.
153. Pines M, Spector I. Halofuginone-the multifaceted molecule. *Molecules*. 2015 Jan;20(1):573-94.
154. Walker JD, Dodds RA, Murrells TJ, Bending JJ, Mattock MB, Keen H, Viberti GC. Restriction of dietary protein and progression of renal failure in diabetic nephropathy. *The Lancet*. 1989 Dec 16;334(8677):1411-5.
155. Zeller K, Whittaker E, Sullivan L, Raskin P, Jacobson HR. Effect of restricting dietary protein on the progression of renal failure in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*. 1991 Jan 10;324(2):78-84.
156. Du X, Matsumura T, Edelstein D, Rossetti L, Zsengellér Z, Szabó C, Brownlee M. Inhibition of GAPDH activity by poly (ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *The Journal of clinical investigation*. 2003 Oct 1;112(7):1049-57.
157. Gabbay KH, Merola LO, Field RA. Sorbitol pathway: presence in nerve and cord with substrate accumulation in diabetes. *Science*. 1966 Jan 14;151(3707):209-10.
158. Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J, Brownlee M. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000 Oct 24;97(22):12222-6.
159. Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *The Journal of clinical investigation*. 2001 Nov 1;108(9):1341-8.
160. Koya D, Jirousek MR, Lin YW, Ishii H, Kuboki K, King GL. Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *The Journal of clinical investigation*. 1997 Jul 1;100(1):115-26.
161. Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, Ha SW, Igarashi M, Yamauchi T, Feener EP, Herbert TP, Rhodes CJ, King GL. Regulation of endothelial constitutive nitric

- oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo: a specific vascular action of insulin. *Circulation*. 2000 Feb 15;101(6):676-81.
162. Passariello N, Sepe J, Marrazzo G, De Cicco A, Peluso A, Plsano MC, Sgambato S, Tesauro P, D'Onofrio F. Effect of aldose reductase inhibitor (tolrestat) on urinary albumin excretion rate and glomerular filtration rate in IDDM subjects with nephropathy. *Diabetes care*. 1993 May 1;16(5):789-95.
163. Cherney DZ, Konvalinka A, Zinman B, Diamandis EP, Soosaipillai A, Reich H, Lorraine J, Lai V, Scholey JW, Miller JA. Effect of protein kinase C β inhibition on renal hemodynamic function and urinary biomarkers in humans with type 1 diabetes: a pilot study. *Diabetes care*. 2009 Jan 1;32(1):91-3.
164. Eleftheriadis T, Pissas G, Tsogka K, Nikolaou E, Liakopoulos V, Stefanidis I. A unifying model of glucotoxicity in human renal proximal tubular epithelial cells and the effect of the SGLT2 inhibitor dapagliflozin. *International urology and nephrology*. 2020 Jun;52(6):1179-89.
165. Inagi R, Kumagai T, Nishi H, Kawakami T, Miyata T, Fujita T, Nangaku M. Preconditioning with endoplasmic reticulum stress ameliorates mesangioproliferative glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2008 May 1;19(5):915-22
166. Park KM, Chen A, Bonventre JV. Prevention of kidney ischemia/reperfusion-induced functional injury and JNK, p38, and MAPK kinase activation by remote ischemic pretreatment. *Journal of Biological Chemistry*. 2001 Apr 13;276(15):11870-6.
167. Eleftheriadis T, Pissas G, Sounidaki M, Antoniadis N, Antoniadis G, Liakopoulos V, Stefanidis I. Preconditioning of primary human renal proximal tubular epithelial cells without tryptophan increases survival under hypoxia by inducing autophagy. *International urology and nephrology*. 2017 Jul;49(7):1297-307.
168. Eleftheriadis T, Tsogka K, Pissas G, Antoniadis G, Liakopoulos V, Stefanidis I. Activation of general control nonderepressible 2 kinase protects human glomerular endothelial cells from harmful high-glucose-induced molecular pathways. *International urology and nephrology*. 2016 Oct;48(10):1731-9.
169. Eliassen MM, Brabec M, Gerner C, Pollheimer J, Auer H, Zellner M, Weingartmann G, Garo F, Roth E, Oehler R. Reduced stress tolerance of glutamine-deprived human monocytic cells is associated with selective down-regulation of Hsp70 by decreased mRNA stability. *Journal of molecular medicine*. 2006 Feb;84(2):147-58.
170. Hensen SM, Heldens L, van Enkevort CM, van Genesen ST, Pruijn GJ, Lubsen NH. Heat shock factor 1 is inactivated by amino acid deprivation. *Cell Stress and Chaperones*. 2012 Nov;17(6):743-55.
171. Moon JL, Kim SY, Shin SW, Park JW. Regulation of brefeldin A-induced ER stress and apoptosis by mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012 Jan 13;417(2):760-4.
172. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF. An integrated stress response regulates amino acid

- metabolism and resistance to oxidative stress. *Molecular cell*. 2003 Mar 1;11(3):619-33.
173. Lee YY, Cevallos RC, Jan E. An upstream open reading frame regulates translation of GADD34 during cellular stresses that induce eIF2 α phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*. 2009 Mar 13;284(11):6661-73.
174. Munder M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *British journal of pharmacology*. 2009 Oct;158(3):638-51.
175. Dang Do AN, Kimball SR, Cavener DR, Jefferson LS. eIF2 α kinases GCN2 and PERK modulate transcription and translation of distinct sets of mRNAs in mouse liver. *Physiological genomics*. 2009 Aug;38(3):328-41.
176. Hu H, Tian M, Ding C, Yu S. The C/EBP homologous protein (CHOP) transcription factor functions in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and microbial infection. *Frontiers in immunology*. 2019:3083.
177. Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *Journal of internal medicine*. 2005 Dec;258(6):479-517.
178. Duann P, Lianos EA, Ma J, Lin PH. Autophagy, innate immunity and tissue repair in acute kidney injury. *International journal of molecular sciences*. 2016 May;17(5):662.
179. Kawakami T, Inagi R, Takano H, Sato S, Ingelfinger JR, Fujita T, Nangaku M. Endoplasmic reticulum stress induces autophagy in renal proximal tubular cells. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2009 Sep 1;24(9):2665-72.
180. Tallóczy Z, Jiang W, Virgin HW, Leib DA, Scheuner D, Kaufman RJ, Eskelinen EL, Levine B. Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2 α kinase signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002 Jan 8;99(1):190-5.
181. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*. 2010 Feb 5;140(3):313-26.
182. Ogata M, Hino SI, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, Murakami T, Taniguchi M, Tanii I, Yoshinaga K, Shiosaka S. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic Reticulum Stress. *Molecular and cellular biology*. 2006 Dec 15;26(24):9220-31.
183. García-Navas R, Munder M, Mollinedo F. Depletion of L-arginine induces autophagy as a cytoprotective response to endoplasmic reticulum stress in human T lymphocytes. *Autophagy*. 2012 Nov 9;8(11):1557-76.
184. Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2013 Dec 1;1833(12):3460-70.
185. Bahar E, Kim H, Yoon H. ER stress-mediated signaling: Action potential and Ca²⁺ as key players. *International journal of molecular sciences*. 2016 Sep;17(9):1558.
186. Brys R, Gibson K, Poljak T, Van Der Plas S, Amantini D. Discovery and development of ASK1 inhibitors. *Progress in Medicinal Chemistry*. 2020 Jan 1;59:101-79.

187. Tam AB, Mercado EL, Hoffmann A, Niwa M. ER stress activates NF- κ B by integrating functions of basal IKK activity, IRE1 and PERK. *PloS one*. 2012 Oct 26;7(10):e45078.
188. El Karoui K, Viau A, Dellis O, Bagattin A, Nguyen C, Baron W, Burtin M, Broueilh M, Heidet L, Mollet G, Druilhe A. Endoplasmic reticulum stress drives proteinuria-induced kidney lesions via Lipocalin 2. *Nature communications*. 2016 Jan 20;7(1):1-3.
189. Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*. 2008 Jul;454(7203):455-62.
190. Lee ES, Kim HM, Kang JS, Lee EY, Yadav D, Kwon MH, Kim YM, Kim HS, Chung CH. Oleanolic acid and N-acetylcysteine ameliorate diabetic nephropathy through reduction of oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in a type 2 diabetic rat model. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2016 Mar 1;31(3):391-400
191. Zhuang A, Forbes JM. Stress in the kidney is the road to pERdition: is endoplasmic reticulum stress a pathogenic mediator of diabetic nephropathy. *J Endocrinol*. 2014 Sep 1;222(3):R97-111.
192. Cunard R. Endoplasmic reticulum stress in the diabetic kidney, the good, the bad and the ugly. *Journal of clinical medicine*. 2015 Apr;4(4):715-40.
193. Mason RM, Wahab NA. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2003 May 1;14(5):1358-73.
194. Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiological reviews*. 2003 Jan 1;83(1):253-307.
195. Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN. From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2005 Jun 1;54(6):1626-34.
196. Adler S. Structure-function relationships associated with extracellular matrix alterations in diabetic glomerulopathy. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1994 Nov 1;5(5):1165-72.
197. Hostetter TH. Hyperfiltration and glomerulosclerosis. In *Seminars in nephrology* 2003 Mar 1 (Vol. 23, No. 2, pp. 194-199). WB Saunders.
198. Van der Zee R, Murohara T, Luo Z, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation* 1997;95(4):1030-7.
199. Crowley SD, Coffman TM. Recent advances involving the renin-angiotensin system. *Experimental cell research*. 2012 May 15;318(9):1049-56.
200. Lindholm E, Agardh E, Tuomi T, Groop L, Agardh CD. Classifying diabetes according to the new WHO clinical stages. *European journal of epidemiology*. 2001 Nov;17(11):983-9.
201. Weir GC, Bonner-Weir S. Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes*. 2004 Dec 1;53(suppl_3):S16-21.

202. Bakris GL. Recognition, pathogenesis, and treatment of different stages of nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. In Mayo Clinic Proceedings 2011 May 1 (Vol. 86, No. 5, pp. 444-456). Elsevier.
203. AKELLA, Neha M.; CIRAKU, Lorela; REGINATO, Mauricio J. Fueling the fire: emerging role of the hexosamine biosynthetic pathway in cancer. BMC biology, 2019, 17.1: 1-14.
204. MAAMOUN, Hatem, et al. Crosstalk between oxidative stress and endoplasmic reticulum (ER) stress in endothelial dysfunction and aberrant angiogenesis associated with diabetes: a focus on the protective roles of heme oxygenase (HO)-1. Frontiers in Physiology, 2019, 70.