

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΔΟΜΗΣ-
ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΝΕΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΦΑΡΜΑΚΩΝ
ΒΑΝΑΔΙΟΥ ΚΑΙ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΜΕ ΒΑΣΗ
ΜΟΡΙΑΚΟΥΣ ΔΕΙΚΤΕΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΟΜΙΜΗΣΗΣ
ΣΤΟ ΔΙΑΒΗΤΗ ΤΥΠΟΥ ΙΙ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

της

ΟΛΓΑΣ Κ. ΤΣΑΒΕ

Πτυχιούχου Βιολόγου

Μ.Δ.Ε. Εφαρμοσμένη Γενετική και Βιοτεχνολογία ΑΠΘ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2016

ΟΛΓΑ Κ. ΤΣΑΒΕ

ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΔΟΜΗΣ-ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΝΕΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΒΑΝΑΔΙΟΥ ΚΑΙ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΜΕ ΒΑΣΗ ΜΟΡΙΑΚΟΥΣ ΔΕΙΚΤΕΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΟΜΙΜΗΣΗΣ ΣΤΟ ΔΙΑΒΗΤΗ ΤΥΠΟΥ ΙΙ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Υποβλήθηκε στο Τμήμα Χημικών Μηχανικών
Τομέας Χημείας
Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας και Προηγμένων Υλικών
Ημερομηνία Προφορικής Εξέτασης: 13-7-2016

Εξεταστική Επιτροπή

Καθηγητής Α. Σαλίφογλου, Επιβλέπων Καθηγητής (Α.Π.Θ.)

Καθηγήτρια Μ. Κυριακίδου-Λιακοπούλου, Μέλος Τριμελούς Επιτροπής (Α.Π.Θ.)

Επίκ. Καθ. Σπ. Χατζησπύρου, Μέλος Τριμελούς Επιτροπής (Α.Π.Θ.)

Καθηγητής Γ. Θεοφιλίδης, Εξεταστής (Τμήμα Βιολογίας, Α.Π.Θ.)

Αν. Καθ. Γ. Κυριάκου, Εξεταστής (Α.Π.Θ.)

Ομότ. Καθ. Ι.Γ. Γιώβος, Εξεταστής (Τμήμα Ιατρικής, Α.Π.Θ.)

Καθηγητής Ι. Πλακατούρας, Εξεταστής (Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων)

© ΟΛΓΑ Κ. ΤΣΑΒΕ

© Α.Π.Θ.

«Μελέτη ανάπτυξης μοντέλων αξιολόγησης δομής-δραστηκότητας νέων μεταλλοφαρμάκων βαναδίου και ψευδαργύρου με βάση μοριακούς βιοδείκτες ινσουλινομίμησης στο διαβήτη τύπου ΙΙ»

©ISDN

«Η έγκριση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Χημικών Μηχανικών του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων της συγγραφέως» (Ν. 5343/1932, άρθρο 202, παρ. 2)

Αφιέρωση

Στην οικογένειά μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Αθανάσιο Σαλίφογλου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση του θέματος, τη συνεχή του υποστήριξη και παρουσία καθ' όλη τη διάρκεια του διαστήματος αυτού.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής κ. Σπ. Χατζησπύρου Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος και την κ. Μαρία Κυριακίδου-Λιακοπούλου Καθηγήτρια του Τμήματος, για τη βοήθεια που παρείχαν κατά τη διεξαγωγή της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, κ. Ι. Πλακατούρα Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίων, τον κ. Ι. Γιώβο Ομότιμο Καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, τον κ. Γ. Κυριάκου Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Χημικών Μηχανικών καθώς και τον κ. Γεώργιο Θεοφιλίδη Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Ευχαριστώ επίσης όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζώων του Τμήματος Βιολογίας, του Εργαστηρίου Ανόργανης Χημείας του Τμήματος Χημικών Μηχανικών και του Εργαστηρίου Μοριακής Ενδοκρινολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ για την υποδειγματική συνεργασία αλλά και το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε καθημερινά στο Εργαστήριο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κ. Μ. Γιαβροπούλου Ενδοκρινολόγο, Επιμελήτρια Α' (Ε.Σ.Υ.) για την αμέριστη βοήθεια, υποστήριξη και συνεργασία σε κάθε επίπεδο.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες αξίζουν στο γραμματέα του Εργαστηρίου Ανόργανης Χημείας κ. Σέργιο Γιαννούλλου για την πολύτιμη βοήθειά του.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα εκείνα τα άτομα που βοήθησαν στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας, γονείς και φίλους για την ψυχολογική ενίσχυση αλλά και κατανόηση.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) encompasses a group of metabolic syndromes, with a common characteristic being high blood glucose levels. Hyperglycemia emerges as the ultimate phenotypic symptom, following a series of pathological processes related directly or indirectly to the inability or failure to produce insulin. Based on the known pathogenicity of the disease, DM can be either insulin-dependent (DM 1) or insulin-independent (DM 2). DM2 covers approximately 90% of the diagnosed cases worldwide. The currently administered therapeutic protocols, dealing with the disease symptoms, have several disadvantages pertaining to a) elevated oxidative stress in patients exogenously receiving insulin, with a concomitant diminution of their standard of living, and b) a plethora of side-effects from insulin substitutes. The rapid rise of the disease worldwide, the extent and severity of complications emerging in all human physiological systems-organs-tissues, in combination with the lack of effectiveness of contemporary therapeutic drugs, raise an immediate need for new insulin mimetic pharmaceuticals. Especially intimate is the relationship between DM and obesity, both closely associated with adipose tissue, which stores energy in the form of triglycerides and releases free fatty acids, while concurrently acting as an endocrine organ. Furthermore, adipose tissue accumulation, against obesity, is linked to tolerance observed toward insulin. In this respect, the goal of the present study was to evaluate the action of known insulin mimetic metal ions in the insulin metabolic pathway, with emphasis in lipogenesis (adipogenesis), which reflects the main insulin form of activity. The development of potential such pharmaceuticals, capable of inducing pre-adipocyte adipogenesis toward mature adipocytes, rides on the design of metal-organic forms of metal ions Zn(II), V(IV,V) and Cr(III), with appropriate structurally configured organic substrates, capable of inducing differentiation of their physicochemical properties at the biological level. Zinc is an endogenous trace element, participating in numerous intracellular processes, such as the synthesis and excretion of insulin, the induction of intracellular glucose uptake, while it has been shown that it acts at various points along the signaling pathway activated by insulin. It is not, however, yet fully delineated a) what the role is for zinc mimicking or replacing insulin activity, and b) what the correlation is between the nature of zinc form(s) in relation to the bioactivity it exhibits. Chromium has been shown to play a central role in the metabolism of hydrocarbons, enhancing insulin activity and thus sensitivity toward that hormone, ultimately serving long term therapeutic approaches for DM 2. Vanadium has been described

as a non-essential nutritional supplement and an agent necessary in minute amounts, with no however known physiological role of that trace element in humans. Its mechanism of action toward glycemic control is primarily linked to that of insulin, but through re-adjustment of insulin receptors. To that end, plenty of work has been carried out to pursue understanding of the relationship between vanadium and DM, in view of the fact that vanadium mimicks the majority of the immediate effects of insulin, such as glucose uptake and activation of its catabolic pathways.

For that reason, a) especially configured organic ligand binders, and b) a family of well-defined complex compounds of Zn(II), V(IV,V) and Cr(III) have been designed, synthesized and characterized physicochemically (X-ray crystallography, analytical techniques, NMR spectroscopy, FT-IR, TGA-DTG, ESI-MS, etc.). For the structure-dependent and metal-dependent biological investigation of the newly synthesized complex forms of Zn(II), V(IV,V) and Cr(III) the adipose tissue cell line 3T3-L1 was used, through which careful evaluation took place of a) the (a)toxicity behavior of the title materials, b) the adipogenic potential, and c) the extent of influence in the expression of genes directly or indirectly related to the cellular differentiation (PPAR- γ) and the intracellular glucose uptake (GLUT 1, 4), and d) the expression of glucokinase and adiponectin genes. The results a) show a clear structure-biological activity relationship (cellular survival, migration, adipogenesis) of the discrete forms of Zn(II), V(IV,V) and Cr(III), and b) set the grounds for the development of molecular technology fighting hyperglycemia through atoxic, bioavailable active forms of Zn(II), V(IV,V) and Cr(III).

Further research into the broader field of peripheral neuropathy and neurotoxicity led to the central nervous system (CNS) and the peripheral nervous system (PNS). They are two especially sensitive tissues, in view of their vulnerability to a plethora of stress factors. In this case, specific metal ions were examined, endogenous or exogenous, potentially toxic to the nervous system as a function of their concentration or the extent of disruption of their homeostasis. For the evaluation of the activity of such metal ionic forms (cobalt, cerium, aluminum, chromium, copper as well as anticancer drugs based on platinum) a model system was employed, encompassing isolated rat sciatic nerves (*ex vivo*). The model is based on the correlation between viability and action potential generation from stimulated nerve fibers. Nerve viability evaluation can be run through generation of Compound Action Potentials (CAP). *In vitro* evaluation of metal ionic action was carried out in primary hippocampal cells. Initial evaluation of the potential toxicity action on behalf of the studied metal ionic compounds took place at high concentrations (500 μ M). The results show that Fe(III) and

Al(III) are not toxic, given that CAP is not affected throughout the duration of the experiments. In addition, Co(III) and Ce(III) do not seem to influence significantly the viability of the nerve fibers. On the other hand, Cu(II) and Cr(VI) lower significantly the viability of nerve fibers in a dose-dependent fashion. This observation is tentatively attributed to the production of ROS, in view of the fact that both metal ions are redox active. Moreover, the potential neuroprotective action of n-acetyl cysteine (NAC) and the chelator EDTA was also examined. The results show clearly the neuroprotective role of EDTA, whereas NAC has no influence on the copper-induced toxicity. Finally, the anticancer drugs oxaliplatin and cis-platin seem to influence the potassium voltage-gated channels, in view of the fact that secondary repolarization phases emerge prominently.

Collectively, the structure- and metal-dependent behavior of the newly-arisen metal ionic compounds in clinically demanding pathologies reflect on the existence of specific physicochemical characteristics of the organic substrates which, when present, influence profusely the biological activity of the metal ions (DM and peripheral neuropathy). The discoveries in this field of research, through the present doctoral thesis, shed light onto key aspects of clinically important conditions and proffer merit toward further research and employment of safe metallodrugs against aberrational cellular processes in human physiology.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης (ΣΔ) αντιπροσωπεύει ομάδα μεταβολικών νοσημάτων με κοινό χαρακτηριστικό τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Η υπεργλυκαιμία εμφανίζεται ως το καταληκτικό χαρακτηριστικό μετά από μια σειρά παθολογικών καταστάσεων που σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με την αδυναμία ή/και ανεπάρκεια παραγωγής της ινσουλίνης. Με βάση την αιτιοπαθογένεια της νόσου, ο ΣΔ διακρίνεται κυρίως σε ινσουλινο-εξαρτώμενο (Διαβήτης τύπου 1) και μη (Διαβήτης τύπου 2). Ο διαβήτης τύπου 2 αντιστοιχεί περίπου στο 90% των διαγνωσμένων περιπτώσεων παγκοσμίως. Τα θεραπευτικά πρωτόκολλα που ακολουθούνται για τη θεραπεία των συμπτωμάτων της νόσου παρουσιάζουν αρκετά μειονεκτήματα, τα οποία αφορούν α) στο αυξημένο stress ασθενών που λαμβάνουν εξωγενώς ινσουλίνη, με αποτέλεσμα την υποβάθμιση της ποιότητας ζωής τους, και β) σε πληθώρα παρενεργειών από τα υποκατάστατα ινσουλίνης. Η ραγδαία αύξηση της νόσου, η έκταση και η σοβαρότητα των επιπλοκών που εμφανίζονται σχεδόν σε όλα τα συστήματα του οργανισμού, σε συνδυασμό με την έλλειψη αποτελεσματικότητας των σημερινών θεραπευτικών παραγόντων, εγείρουν την ανάγκη για εύρεση νέων ινσουλινομιμητικών φαρμάκων. Ιδιαίτερα πιθανή σύνδεση μεταξύ του ΣΔ και της παχυσαρκίας αποτελεί ο λιπώδης ιστός, ο οποίος αποθηκεύει ενέργεια με τη μορφή τριγλυκεριδίων και απελευθερώνει ελεύθερα λιπαρά οξέα, ενώ παράλληλα δρα ως ενδοκρινές όργανο. Επιπλέον, η συσσώρευση του λιπώδους ιστού, κατά την παχυσαρκία, σχετίζεται με την ανοχή που παρατηρείται στην ινσουλίνη. Στο πλαίσιο αυτό, στόχος της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η αξιολόγηση της δράσης γνωστών ινσουλινομιμητικών μεταλλοϊόντων στο μεταβολικό μονοπάτι της ινσουλίνης με έμφαση στη λιπογένεση (αδιπογένεση), η οποία αποτελεί κύρια δράση της ινσουλίνης. Η ανάπτυξη εν δυνάμει μεταλλοφαρμάκων ικανών να προκαλέσουν αδιπογένεση προ-λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα στηρίζεται στο σχεδιασμό μεταλλο-οργανικών μορφών των μεταλλοϊόντων Zn(II), V(IV,V) και Cr(III) με κατάλληλα δομικά διαμορφωμένα οργανικά υποστρώματα που επάγουν διαφοροποίηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους σε βιολογικό επίπεδο.

Ο ψευδάργυρος αποτελεί ενδογενές ιχνοστοιχείο, το οποίο συμμετέχει σε πολυάριθμες ενδοκυττάρια διεργασίες, όπως η σύνθεση και έκκριση ινσουλίνης, στην επαγωγή ενδοκυττάρια πρόσληψη της γλυκόζης, ενώ έχει δειχθεί ότι δρα σε διάφορα σημεία του σηματοδοτικού μονοπατιού που ενεργοποιείται από την ινσουλίνη. Ωστόσο, δεν είναι ακόμα πλήρως αποσαφηνισμένος ο α) τρόπος με τον οποίο ο ψευδάργυρος μιμείται ή αντικαθιστά

τη δράση της ινσουλίνης καθώς, και β) βαθμός συσχέτισης της μορφής του ψευδαργύρου σε σχέση με τη βιοδραστικότητα που επιδεικνύει. Το χρώμιο έχειδειχθεί ότι επιτελεί κεντρικό ρόλο στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, ενισχύοντας τη δράση της ινσουλίνης και άρα την ευαισθησία σε αυτή, με αποτέλεσμα τη μακροχρόνια θεραπεία του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Το βανάδιο έχει περιγραφεί τόσο ως μη απαραίτητο θρεπτικό συστατικό όσο και ως συστατικό το οποίο απαιτείται σε πάρα πολύ μικρές ποσότητες και δεν έχει βρεθεί ακόμη κάποιος φυσιολογικός ρόλος του ως ιχνοστοιχείου στον άνθρωπο. Ο μηχανισμός δράσης του βαναδίου στον γλυκαιμικό έλεγχο σχετίζεται αρχικά με αυτόν της ινσουλίνης, αλλά και με την επαναρρύθμιση των υποδοχέων της ινσουλίνης. Πολυάριθμες έρευνες έχουν διεξαχθεί με σκοπό την κατανόηση της σχέσης μεταξύ βαναδίου και ΣΔ, καθώς έχειδειχθεί ότι το βανάδιο μιμείται την πλειοψηφία των άμεσων επιδράσεων της ινσουλίνης, όπως είναι η πρόσληψη της γλυκόζης και η ενεργοποίηση μονοπατιών καταβολισμού της.

Για το σκοπό αυτό, σχεδιάστηκαν, συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν φυσικοχημικά (κρυσταλλογραφία ακτίνων X, αναλυτικές τεχνικές, φασματοσκοπίες NMR, FT-IR, TGA-DTG, ESI-MS, κ.ά.) α) ειδικά δομημένοι οργανικοί υποκαταστάτες, και β) μια οικογένεια από καλώς καθορισμένες σύμπλοκες ενώσεις [Zn(II), V(IV,V) και Cr(III)]. Για τη διερεύνηση της δομο-εξαρτώμενης και μεταλλο-εξαρτώμενης βιολογικής δραστηριότητας των νεοσυντιθέμενων μορφών (Zn(II), V(IV,V) και Cr(III)) χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά λιπώδους ιστού, 3T3-L1, όπου πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση του α) (α)τοξικού χαρακτήρα των υπό μελέτη υλικών, β) αδιπογενετικού δυναμικού, γ) βαθμού επιρροής στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με την κυτταρική διαφοροποίηση (PPAR-γ) και την ενδοκυττάρια πρόσληψη γλυκόζης (GLUT 1, 4), και 4) την έκφραση των γονιδίων της γλυκοκινάσης και αδιπονεκτίνης. Τα αποτελέσματα α) υποδεικνύουν σαφή σχέση δομής-βιολογικής δραστηριότητας (κυτταρική επιβίωση, μεταναστευτικότητα, αδιπογένεση) των διακριτών μορφών Zn(II), V(IV,V) και Cr(III), και β) θέτουν τα θεμέλια για την ανάπτυξη μοριακής τεχνολογίας αντιμετώπισης της υπεργλυκαιμίας μέσω ατοξικών, βιοδιαθέσιμων δραστικών μορφών Zn(II), V(IV,V) και Cr(III).

Περαιτέρω έρευνα στο ευρύτερο πεδίο περιφερικής νευροπάθειας και νευροτοξικότητας οδήγησε στο κεντρικό νευρικό (ΚΝΣ) και περιφερικό νευρικό (ΠΝΣ) σύστημα. Πρόκειται ιδιαίτερα ευάλωτους ιστούς, καθώς είναι εύκολα προσβάσιμοι σε πληθώρα καταπονητικών παραγόντων. Στην περίπτωση αυτή εξετάστηκαν συγκεκριμένα μεταλλοϊόντα, ενδογενή ή μη, εν δυνάμει τοξικά για το νευρικό σύστημα ως συνάρτηση της συγκέντρωσής τους ή κατά τη διατάραξη της ομοιόστασής τους. Για την αξιολόγηση της επίδρασης των μεταλλοϊόντων

αυτών (κοβάλτιο, δημήτριο, αργίλιο, χρώμιο, χαλκός καθώς και αντικαρκινικά φάρμακα με βάση το λευκόχρυσο) χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο του απομονωμένου ισχιακού νεύρου των θηλαστικών (επίμυες ex vivo). Το μοντέλο βασίζεται στο συσχετισμό της βιωσιμότητας με τη γένεση δυναμικών δράσης από διεγερμένες νευρικές ίνες. Η αξιολόγηση της βιωσιμότητας πραγματοποιείται μέσω της παραγωγής Σύνθετου Δυναμικού Ενέργειας (ΣΔΕ). Η *in vitro* αξιολόγηση της δράσης των μεταλλοϊόντων πραγματοποιήθηκε σε πρωτογενείς καλλιέργειες ιπποκαμπιαίου ιστού. Η αρχική αξιολόγηση της ενδεχόμενης τοξικής δράσης των υπό μελέτη μεταλλοϊοντικών ενώσεων έγινε σε υψηλές συγκεντρώσεις (500 μM). Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι ο Fe(III) και το Al(III) δεν είναι τοξικά, καθόσον το ΣΔΕ ενέργειας δεν επηρεάζεται καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Επιπλέον, το Co(II) και το Ce(III) φαίνεται να μην επηρεάζουν ιδιαίτερα τη βιωσιμότητα των νευρικών ινών. Αντίθετα, ο Cu(II) και το Cr(VI) μειώνουν σημαντικά τη βιωσιμότητα των νευρικών ινών με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Η παρατήρηση αυτή αποδίδεται στην παραγωγή ROS, δεδομένου ότι αμφότερα μεταλλοϊόντα είναι οξειδοαναγωγικά ενεργά. Επιπρόσθετα, αξιολογήθηκε η ενδεχόμενη νευροπροστατευτική δράση των ενώσεων N-ακετυλ-κυστεΐνη (NAC) και του χηλικοποιητικού μορίου EDTA. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν σαφή νευροπροστατευτική δράση του EDTA, ενώ η NAC δεν έχει καμία επίδραση στην προκαλούμενη από το χαλκό τοξικότητα. Τα ίδια αποτελέσματα προκύπτουν και από την *in vitro* αξιολόγηση. Τέλος, τα αντικαρκινικά οξαλιπλατίνη και *cis*-πλατίνη φαίνεται να επηρεάζουν τα τασεοελεγχόμενα κανάλια καλίου καθώς εμφανίζονται δευτερογενείς επαναπολωτικές φάσεις.

Συνολικά, η δομο- και μεταλλο-εξαρτώμενη συμπεριφορά των νεοσυντιθέμενων ενώσεων σε κλινικά απαιτητικές παθολογίες αντικατοπτρίζουν την ύπαρξη συγκεκριμένων φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των οργανικών υποστρωμάτων που όταν είναι παρόντα επηρεάζουν ουσιαστικά τη βιολογική δραστηριότητα των μεταλλοϊόντων (ΣΔ και περιφερική νευροπάθεια). Οι ανακαλύψεις στο πεδίο αυτό μέσω της παρούσας διδακτορική διατριβής φέρουν στο φως ουσιαστικές γνώσεις που προσφέρουν προοπτική για περαιτέρω έρευνα και χρήση ασφαλών μεταλλοφαρμάκων για την αντιμετώπιση αποκλινουσών κυτταρικών διεργασιών στην ανθρώπινη φυσιολογία.

ΕΚΘΕΣΗ ΠΡΩΤΟΤΥΠΙΑΣ

Για πρώτη φορά, στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής, γίνεται προσπάθεια να αντιμετωπισθεί μια παθολογική κατάσταση στον άνθρωπο, ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ), με την α) επίκληση, χρήση και υλοποίηση της χημείας υβριδικών υλικών μεταλλο-οργανικής φύσεως (βανάδιο, ψευδάργυρος, χρώμιο), με τον οργανικό υποκαταστάτη να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο από τη σχεδίαση και σύνθεση μέχρι τη βιολογική δράση του συμπλοκοποιημένου μεταλλοϊόντος, β) διερεύνηση της (α)τοξικής δράσης των διαφόρων μεταλλοϊοντικών συμπλόκων μορφών και δομο-εξαρτώμενη επιλογή αυτών προς περαιτέρω διερεύνηση του βιολογικού ρόλου σε κυτταρικό επίπεδο, και γ) έρευνα της μοριακής βιολογίας των καλά καθορισμένων και επιλεγμένων μεταλλοσυμπλόκων ως προς το αδιπογενετικό τους δυναμικό και τους σηματοδοτικούς σταθμούς που αντικατοπτρίζουν προοπτική στην ανάπτυξη μεταλλοφαρμάκων για την αντιμετώπιση του σακχαρώδη διαβήτη. Ο ΣΔ αντιπροσωπεύει ένα σύνολο μεταβολικών νοσημάτων που χαρακτηρίζεται από μη φυσιολογική ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης. Έχειδειχθεί ότι υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ συγκεκριμένων μεταλλοϊόντων (βαναδίου, ψευδαργύρου) και του ΣΔ και οι βασικοί μηχανισμοί που διέπουν τη σχέση αυτή δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί.

Συγκεκριμένα, μεταξύ των διαφόρων ρόλων των μεταλλοϊόντων βαναδίου (V(IV,V)) και ψευδαργύρου (Zn(II)) που έχουν προταθεί μέχρι σήμερα, η εξωγενής τους δράση ως ινσουλινομιμητικών παραγόντων αποτελεί σύγχρονη πρόκληση προς διερεύνηση με στόχο την εφαρμογή τους ως μεταλλοφάρμακα ενάντια στον Διαβήτη τύπου 2.

Προκειμένου να διερευνηθεί το αδιπογενετικό δυναμικό τους έγινε προσπάθεια εκλογίκευσης μιας δομο-εξαρτώμενης σχεδίασης δυαδικών και τριαδικών συμπλόκων μορφών των προαναφερθέντων μεταλλοϊόντων με οργανικά υποστρώματα. Έτσι, σχεδιάστηκε αρχικά η οργανική φύση μεταλλοδεσμευτικών υποκαταστατών-ligands ικανών να διαμορφώσουν το περιβάλλον συναρμογής των μεταλλοϊόντων με επαρκή δομική ευελιξία, που δίνει τη δυνατότητα ανάπτυξης διαφορικής βιοχημικής δραστηριότητας σε κυτταρικό επίπεδο. Συνεπώς, για να διαμορφωθεί κατάλληλα η σφαίρα συντονισμού του μεταλλοϊόντος σε σαφώς καθορισμένες αντι-διαβητικές μορφές, α) μια σειρά από καλά καθορισμένα δυαδικά και τριαδικά V(IV,V)-, και Zn(II)-L (L=Schiff Base) υλικά με διακριτό αριθμό αλκοολικών ομάδων και μεταβαλλόμενο κορμό βανιλίνης, σχεδιάστηκαν, συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν φυσικοχημικά. Όλα τα υλικά προέκυψαν από την ερευνητική δραστηριότητα του εργαστηρίου και χαρακτηρίστηκαν με πληθώρα τεχνικών, όπως, στοιχειακή ανάλυση, FT-IR, ESI-MS, NMR, TGA, και κρυσταλλογραφία ακτίνων X,

β) αξιολογήθηκε η ενδεχόμενη κυτταροτοξική τους δράση, γ) ελέγχθηκε η επίδρασή τους στην ενδογενή, φυσιολογική μεταναστευτικότητα των κυττάρων, δ) αξιολογήθηκε η ικανότητά τους να επάγουν την κυτταρική διαφοροποίηση (από πρόωμα λιποκύτταρα σε ώριμα λιποκύτταρα), και ε) αξιολογήθηκε η επίδρασή ή/και η συμμετοχή τους σε στενά συνδεδεμένους μοριακούς δείκτες που αφορούν στην επαγόμενη αδιπογένεση. Τα συνολικά αποτελέσματα υποδεικνύουν τη α) σημασία των βασικών δομικών χαρακτηριστικών των υποκαταστατών Schiff που συναρμολογούνται στο μεταλλοϊοντικό κέντρο, επηρεάζοντας την (α)τοξική και ινσουλινομιμητική συμπεριφορά των μεταλλοϊόντων αυτών, και β) διακριτή δομο-εξαρτώμενη αδιπογενετική δράση των συγκεκριμένων μεταλλοϊόντων, θέτοντας τη βάση για το σχεδιασμό νέων, αποτελεσματικών αντιδιαβητικών παραγόντων. Έτσι, επιτεύχθηκε η δημιουργία ενός ολοκληρωμένου προφίλ βιοδραστικότητας σε σχέση με τη μεταλλοδομή που επάγει βιολογική δράση και τους μοριακούς στόχους σε κυτταρικό επίπεδο που επηρεάζονται κατά την μεταλλο-επαγόμενη αδιπογένεση και χαρακτηρίζουν τα προκύπτοντα λιποκύτταρα.

Σε μια περαιτέρω προσπάθεια συγκριτικής αποτίμησης του αδιπογενετικού δυναμικού μεταλλοϊόντων που σχετίζονται με την ινσουλινομίμηση στο σακχαρώδη διαβήτη, τρία μεταλλοϊόντα, δηλ. βανάδιο (V(IV)), ψευδάργυρος (Zn(II)) και χρώμιο (Cr(III)) μελετήθηκαν επισταμένα. Προς το σκοπό αυτό, η δομική φύση των μεταλλοϊόντων αυτών επιλέχθηκε έτσι ώστε να α) διατηρούν τη συγκεκριμένη οξειδωτική βαθμίδα, β) διαθέτουν συναρμοσμένο τον ίδιο οργανικό μεταλλοδεσμευτικό υποκαταστάτη (το κιτρικό ανιόν), γ) έχουν τον ίδιο αριθμό συναρμογής 6 (οκταεδρική γεωμετρία), και δ) είναι υδατοδιαλυτά και βιοδιαθέσιμα στο φυσιολογικό εύρος pH. Η επιλογή αυτή ανεδύθη από τη συνθετική δραστηριότητα του εργαστηρίου στο πεδίο των συγκεκριμένων μεταλλοϊόντων και τη διαλεύκανση της δομικής τους ειδογένεσης σε υδατικά διαλύματα βιολογικής σημασίας.

Σε όλες τις προαναφερθείσες περιπτώσεις μελετών, εξετάστηκαν ενδελεχώς οι μοριακοί βιολογικοί στόχοι που επηρεάζονται από τη δράση των συγκεκριμένων μορφών μεταλλοϊόντων κατά τη διεργασία της αδιπογένεσης και της ανάδειξης ώριμων λιποκυττάρων, ικανών προς πρόσληψη και καταβολισμό της γλυκόζης. Οι μοριακοί αυτοί στόχοι περιλαμβάνουν μόρια, όπως ο μεταγραφικός παράγοντας PPAR-γ, που εκφράζει πρόωμο γεγονός κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαφοροποίησης και ο παράγοντας ιστοειδικού γλυκοζομεταφορέα GLUT4, με την έκφραση των επιπέδων του GLUT 4 να εξαρτώνται από αυτά του PPAR-γ. Περαιτέρω, η γλυκοκινάση GCK και αδιπονεκτίνη είναι από τα μόρια εκείνα που αντικατοπτρίζουν την προϊούσα κατάσταση της αδιπογένεσης ως αποτέλεσμα της επίδρασης των διαφόρων μορφών των συγκεκριμένων μεταλλοϊόντων. Σε

διακριτές περιπτώσεις, εξετάστηκε και η πιθανή ανάπτυξη οξειδωτικού stress, με τα ανάλογα πειράματα να αντικατοπτρίζουν την ουσιαστική συμβολή των εμπλεκόμενων μεταλλοϊοντικών συμπλόκων μορφών στην αδιπογένεση. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν δοσο-εξαρτώμενο τρόπο δράσης για το εύρος συγκεντρώσεων που εξετάστηκαν, με τα σύμπλοκα να επιφέρουν επίπεδα πρόσληψης της γλυκόζης ανάλογα ή/ και μεγαλύτερα από αυτά της ινσουλίνης.

Ως περαιτέρω επέκταση του πεδίου της μεταλλοεπαγόμενης διεργασίας της αδιπογένεσης, εξετάστηκε η επίδραση της φύσης συγκεκριμένων μεταλλοϊόντων σε ex vivo μοντέλα (επίμυες διαβητικοί και μη) περιφερικής νευροπάθειας. Συγκεκριμένα, έγινε προσπάθεια διερεύνησης της επίδρασης διαφόρων ενδογενών και μη μεταλλοϊόντων στο περιφερικό και κεντρικό νευρικό σύστημα. Επιπλέον, έγινε προσπάθεια αποσαφήνισης του μηχανισμού δράσης των μεταλλοϊόντων αυτών καθώς και αξιολόγηση του νευροπροστατευτικού δυναμικού γνωστών αντιοξειδωτικών και χηλικοποιητικών παραγόντων. Η διάφοροι χημικοί παράγοντες καταπόνησης έχουν ως στόχο δράσης τη συνολική δομή των νευρώνων καθώς και τα τασεοελεγχόμενα κανάλια, τα οποία εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη. Ο τρόπος δράσης των παραγόντων αυτών μπορεί να είναι άμεσος ή έμμεσος μέσω ενεργοποίησης μηχανισμών που δεν αποτελούν τον πρωταρχικό στόχο. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι:

- Ο σίδηρος και το αργίλιο δεν επηρεάζουν τη βιωσιμότητα του ισχιακού νεύρου, ενώ το κοβάλτιο και το δημήτριο εμφανίζουν ήπια τοξικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις.
- Ο χαλκός και το χρώμιο μειώνουν τη βιωσιμότητα του ισχιακού νεύρου με τρόπο που εξαρτάται από τη συγκέντρωση. Η τοξικότητα αυτή οφείλεται σε πρόκληση οξειδωτικού stress και γίνεται έκδηλη μέσω μείωσης του Σύνθετου Δυναμικού Ενέργειας (ΣΔΕ).
- Ο χαλκός εκτός από τις περιφερικές νευρικές ίνες, επιδρά και στα κύτταρα του υποκάμπου του εγκεφάλου και η τοξικότητα αυτή είναι δοσο-εξαρτώμενη.
- Τα αντικαρκινικά φάρμακα, οξαλιπλατίνα και cis-πλατίνη, τα οποία ανήκουν στις αντινεοπλασματικές ενώσεις με βάση το λευκόχρυσο επηρεάζουν το ΣΔΕ μειώνοντάς το. Ωστόσο, επιδρούν άμεσα στα τασεοελεγχόμενα κανάλια Na^+ και K^+ , με διακριτή δράση μεταξύ διαβητικών και μη διαβητικών ζώων. Η δράση αυτή γίνεται έκδηλη με παρατεταμένη εκπολωτική και επαναπολωτική περίοδο.

- Η Ν-ακετυλο-κυστεΐνη, αν και είναι αναγωγικό μόριο, δρα επικουρικά με το χαλκό ενισχύοντας σε πολλές περιπτώσεις τη νευροτοξική του δράση, καθώς αντιδρά με το Cu(II) προς παραγωγή H₂O₂.
- Το κινικό οξύ δεν έχει καμία επίδραση στην προκαλούμενη από το χαλκό τοξικότητα, ενώ το EDTA χηλικοποιεί αποτελεσματικά το χαλκό, προστατεύοντας το νευρικό ιστό στο σύνολό του.
- Η προστατευτική δράση των διαφόρων χημικών παραγόντων εξαρτάται από θερμοδυναμικά δεδομένα καθώς και από τη φύση των μορίων που συμπλοκοποιούν τα εκάστοτε μεταλλοϊόντα.
- Η νευροτοξική και καταπονητική δράση των μεταλλοϊόντων διακρίνεται ανάλογα με το στόχο και το τελικό αποτέλεσμα που επιφέρουν σε: άμεση ή έμμεση, δομική ή λειτουργική.

Όλες οι προαναφερθείσες μελέτες στοιχειοθετούν την πρωτοτυπία της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας και σκιαγραφούν τόσο το συγκεκριμένο πεδίο της υβριδικής βιοανόργανης τεχνολογίας όσο και το ευρύτερο πεδίο που καλύπτει μεταλλοεξαρτώμενες-μεταλλοεπαγόμενες φυσιολογικές και αποκλίνουσες κυτταρικές διεργασίες παθολογικής φύσεως (ΣΔ). Η έρευνα αυτή έχει α) παρουσιαστεί σε εθνικά και διεθνή συνέδρια, β) δημοσιεύεται σταδιακά σε διεθνή περιοδικά υψηλού κύρους, και γ) διαθέτει έντονη προοπτική περαιτέρω εντρύφησης στο μέλλον.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	1
ΜΕΡΟΣ Ι	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 Η ΑΣΘΕΝΕΙΑ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ.....	12
1.2 ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΣΔ	12
1.3 ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ – ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΣΔ.....	13
1.4 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΣΔ.....	16
1.5 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΣΔ.....	16
1.5.1 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ 1	17
1.5.2 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ 2	20
1.5.3 ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΣΤΗΝ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ.....	42
1.5.4 ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΣΤΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΟ ΣΔ ΤΥΠΟΥ 2	43
1.5.5 ΣΥΝΔΡΟΜΑ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ ΣΤΗΝ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ ΚΑΙ ΛΙΠΟΔΥΣΤΡΟΦΙΕΣ	44
1.6 ΑΛΛΟΙ ΕΙΔΙΚΟΙ ΤΥΠΟΙ ΣΔ.....	46
1.6.1 ΜΟΝΟΓΟΝΙΔΙΑΚΟΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ	46
1.6.2 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ	46
1.6.3 ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΩΝ ΝΕΟΓΝΩΝ	46
1.6.4 ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΩΡΙΜΟΤΗΤΑΣ ΠΟΥ ΕΝΦΑΝΙΖΕΤΑΙ ΣΤΟΥΣ ΝΕΟΥΣ (MODY)	47
1.7 ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΚΑΙ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ	49
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΛΙΠΩΔΗΣ ΙΣΤΟΣ ΚΑΙ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ	54
2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΙΣΤΟΥ.....	54
2.1.1 ΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΟ - ΛΙΠΟΣΤΑΓΟΝΑ	57
2.1.2 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΟΥ ΛΙΠΩΔΟΥΣ ΙΣΤΟΥ	58
2.1.3 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ	59
2.1.4 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ	60
2.1.5 ΕΝΔΟΚΡΙΝΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ.....	62
2.2 ΛΙΠΟΓΕΝΕΣΗ	66
2.2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΛΙΠΟΓΕΝΕΣΗΣ.....	66
2.3 ΛΙΠΩΔΗΣ ΙΣΤΟΣ ΚΑΙ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ 2.....	83
2.4 Η ΘΕΩΡΙΑ ΤΟΥ ΑΣΘΕΝΟΥΣ ΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΟΥ	87

2.4.1 PPAR-γ, λιπογένεση και λιποτοξικότητα.....	88
2.5 ΧΡΟΝΙΑ ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΤΟΥ ΛΙΠΩΔΟΥΣ ΙΣΤΟΥ ΚΑΙ ΙΝΟΥΛΙΝΟΑΝΤΙΣΤΑΣΗ.....	89
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	92
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΜΕΤΑΛΛΟ-ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΙΝΣΟΥΛΙΝΟ-ΜΙΜΗΣΗ ΚΑΙ ΣΔ	96
3.1 ΣΗΜΕΡΙΝΑ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΤΟΥ ΣΔ	96
3.1.1 ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΩΔΟΥΣ ΔΙΑΒΗΤΗ ΤΥΠΟΥ 1	96
3.1.2 ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΩΔΟΥΣ ΔΙΑΒΗΤΗ ΤΥΠΟΥ 2.....	99
3.2 Ο ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΣ	103
3.2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	103
3.2.2 ΣΔ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ	107
3.2.3 ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΣΤΗΝ ΑΣΘΕΝΕΙΑ ΤΟΥ ΣΔ	109
3.2.4 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΣΤΟΝ ΣΔ ...	112
3.2.5 ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΣ ΚΑΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ.....	112
3.3 ΤΟ ΒΑΝΑΔΙΟ	121
3.3.1 Το βανάδιο στους έμβιους οργανισμούς	123
3.3.2 ΧΗΜΙΚΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΒΑΝΑΔΙΟΥ	125
3.3.3 ΒΑΝΑΔΙΟ ΚΑΙ ΣΔ.....	126
3.3.4 ΒΑΝΑΔΙΟ ΚΑΙ ΣΔ ΤΥΠΟΥ 1.....	127
3.3.5 ΠΙΘΑΝΟΙ ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΒΑΝΑΔΙΟΥ	130
3.3.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΒΑΝΑΔΙΟΥ ΣΕ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΔΙΑΘΕΣΗΣ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ	130
3.3.7 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΒΑΝΑΔΙΟΥ ΣΕ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ.....	135
3.4 ΤΟ ΧΡΩΜΙΟ	138
3.4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	138
3.4.2 ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΧΡΩΜΙΟΥ ΣΤΟΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ.....	139
3.4.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΧΡΩΜΙΟΥ ΣΤΗΝ ΙΝΣΟΥΛΙΝΟ-ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΤΟΝ ΣΔ ΤΥΠΟΥ 2	141
3.4.4 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ.....	142
3.4.5 ΤΟ ΧΡΩΜΙΟ ΣΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ	143
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	152
ΜΕΡΟΣ ΙΙ.....	157

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	158
ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΛΙΠΟΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΤΩΝ Zn(II), V(IV) ΚΑΙ Cr(III). ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΛΛΟ-ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΛΙΠΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΟΝ ΣΔ ΤΥΠΟΥ 2.	158
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	158
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	161
2.1 Σχεδιασμός, σύνθεση και φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των ενώσεων Zn(II)-citrate, V(IV)-citrate και Cr(III)-citrate.....	161
2.2 Ανάπτυξη κυτταρικών καλλιέργειών πρώιμων και ώριμων 3T3-L1 λιποκυττάρων.	164
2.2.1 Κυτταρική καλλιέργεια 3T3-L1 λιποκυττάρων.....	164
2.2.2 Επαγωγή της διαφοροποίησης των πρώιμων ινοβλαστών 3T3-L1 σε ώριμα λιποκύτταρα.....	164
2.3 Έλεγχος της (α)τοξικής δράσης των Zn(II)-cit, V(IV)-cit και Cr(III)-cit.	165
2.3.1 Μέτρηση των επιπέδων κυτταρικής επιβίωσης πρώιμων και ώριμων λιποκυττάρων με χρήση της φωταύγειας.....	165
2.3.2 Εκτίμηση της ενδεχόμενης αναστολής του μεταναστευτικού δυναμικού των 3T3-L1 μετά από επίδραση με τα Zn(II)-cit, V(IV)-cit και Cr(III)-cit.....	165
2.4 Επαγωγή της κυτταρικής διαφοροποίησης των 3T3-L1 με χρήση των Zn(II)-cit, V(IV)-cit και Cr(III)-cit.	166
2.4.1 Χρώση των παραγόμενων λιπιδίων (oil red O staining)	166
2.4.2 Ποσοτική εκτίμηση της σχετικής έκφρασης του mRNA στενά συνδεδεμένων μοριακών στόχων.....	166
2.5 Εκτίμηση της πρόκλησης οξειδωτικού stress μετά από έκθεση των πρώιμων λιποκυττάρων στην ένωση Cr(III)-cit.....	167
2.6. Στατιστική ανάλυση και επεξεργασία δεδομένων.	168
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	169
3.1 Αποτελέσματα ελέγχου (α)τοξικής δράσης των Zn(II)-cit, V(IV)-cit και Cr(III)-cit.....	169
3.1.1 Μέτρηση της βιωσιμότητας των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με τις ενώσεις Zn(II)-cit, V(IV)-cit και Cr(III)-cit.	169
3.1.2 Μέτρηση της βιωσιμότητας των προ-λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με τις ενώσεις Zn(II)-cit, V(IV)-cit και Cr(III)-cit.	171
3.1.3 Μέτρηση της βιωσιμότητας των ώριμων λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με τις ενώσεις Zn(II)-cit, V(IV)-cit και Cr(III)-cit.....	174

3.2 Αποτελέσματα εκτίμησης της επίδρασης των Zn(II)-cit, V(IV)-cit και Cr(III)-cit στην φυσιολογική, ενδογενή μεταναστευτικότητα των 3T3-L1 προ-λιποκυττάρων.....	176
3.3 Αποτελέσματα επαγωγής της κυτταρικής διαφοροποίησης των 3T3-L1 με χρήση των Zn(II)-cit, V(IV)-cit και Cr(III)-cit.....	179
3.3.1 Χρώση των παραγόμενων λιπιδίων μετά από επίδραση με τις ενώσεις Zn(II) και V(IV) (oil red O staining)	179
3.3.2 Χρώση των παραγόμενων λιπιδίων μετά από επίδραση με την ένωση Cr(III) (oil red O staining)	179
3.3.3. Ποσοτική εκτίμηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του mRNA στενά συνδεδεμένων μοριακών στόχων μετά από διαφοροποίηση με τις ενώσεις Zn(II)-cit και V(IV)-cit (RT-PCR).....	184
3.3.4. Ποσοτική εκτίμηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του mRNA στενά συνδεδεμένων μοριακών στόχων μετά από διαφοροποίηση με την ένωση Cr(III)-cit (RT-PCR).....	193
3.4 Εκτίμηση της πρόκλησης οξειδωτικού stress από έκθεση των πρώιμων λιποκυττάρων στην ένωση Cr(III)-cit	197
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	200
4.1 Δομο-ειδική δράση των Zn(II)-cit και V(IV)-cit	201
4.2 Βιολογικό προφίλ των Zn(II)-cit και V(IV)-cit στην λιπογένεση – συσχέτιση με στενά συνδεδεμένους μοριακούς στόχους	203
4.3 Δομο-ειδική δράση του Cr(III)-cit	205
4.4 Βιολογικό προφίλ του Cr(III)-cit στην λιπογένεση – συσχέτιση με στενά συνδεδεμένους μοριακούς στόχους.....	207
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	210
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	213
ΣΧΕΣΗ ΔΟΜΗΣ-ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΝΕΟ-ΣΥΝΤΙΘΕΜΕΝΩΝ ΚΑΛΑ ΚΑΘΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΤΡΙΑΔΙΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟ-ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ Zn(II)-Schiff ΥΛΙΚΩΝ. ΒΙΟΜΟΡΙΑΚΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟ ΤΟ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ 3T3-L1 ΠΡΟ-ΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΩΡΙΜΑ ΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΑ. .213	
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	213
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	215
2.1 Σχεδιασμός, σύνθεση και φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των οργανικών υποστρωμάτων και των νεο-συντιθέμενων ενώσεων Zn(II).....	215
2.2 Κυτταρική καλλιέργεια και βιολογικές δοκιμασίες	221

2.2.1. Ανάπτυξη κυτταρικής καλλιέργειας.....	221
2.2.2. Επαγωγή της λιπογένεσης	221
2.2.3. Αξιολόγηση της κυτταρικής επιβίωσης.....	222
2.2.4. Επαγωγή της λιπογένεσης με τα Zn(II)-σύμπλοκα	222
2.2.5. RT-PCR.....	223
2.2.6. Έλεγχος της επίδρασης των Zn(II)-συμπλόκων στην μεταναστευτικότητα των 3T3-L1 προ-λιποκυττάρων	223
2.2.7. Εκτίμηση της πρόσληψης της γλυκόζης από ώριμα λιποκύτταρα με τις ενώσεις 1 και 2.....	223
2.2.8. Στατιστική ανάλυση	224
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	224
3.1. Αποτελέσματα ελέγχου τοξικής δράσης	224
3.1.1. Μέτρηση της βιωσιμότητας των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με απλές, ανόργανες μορφές ψευδαργύρου.	224
3.1.2 Μέτρηση της βιωσιμότητας των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με τους νεοσυντιθέμενους υποκαταστάτες (LH1, LH2 και LH3).....	226
3.1.3. Μέτρηση της βιωσιμότητας των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με τους νεοσυντιθέμενους υποκαταστάτες (LH4, LH5 και LH6).....	228
3.1.4. Μέτρηση της βιωσιμότητας των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με τα νεοσυντιθέμενα μεταλλο-σύμπλοκα ψευδαργύρου (1-3).....	231
3.1.5. Μέτρηση της βιωσιμότητας των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με τα νεοσυντιθέμενα μεταλλο-σύμπλοκα ψευδαργύρου (4-7).....	233
3.1.6. Μέτρηση της βιωσιμότητας των προ-λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με τα νεοσυντιθέμενα μεταλλο-σύμπλοκα ψευδαργύρου (1-2).....	236
3.1.7. Μέτρηση της βιωσιμότητας των προ-λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με τα νεοσυντιθέμενα μεταλλο-σύμπλοκα ψευδαργύρου (4-7).....	237
3.1.8. Μέτρηση της βιωσιμότητας των ώριμων λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με τα νεοσυντιθέμενα μεταλλο-σύμπλοκα ψευδαργύρου (1-2).....	241
3.1.9. Μέτρηση της βιωσιμότητας των ώριμων λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με τα νεοσυντιθέμενα μεταλλο-σύμπλοκα ψευδαργύρου (4-7).....	242
3.2. Αποτελέσματα κυτταρικής διαφοροποίησης	248
3.2.1. Διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα με τις ενώσεις 1 και 2 (oil red O staining)	248

3.2.2. Διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα με τις ενώσεις 4-7 (oil red O staining)	252
3.2.3. Διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα με τις ενώσεις 1 και 2 (RT-PCR)	254
3.2.4. Διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα με τις ενώσεις 4-7 (RT-PCR)	256
3.3.1. Εκτίμηση της πρόσληψης της γλυκόζης από ώριμα λιποκύτταρα με τις ενώσεις 1 και 2.....	262
4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ	263
4.1 Η έννοια και σπουδαιότητα των Zn(II)-Schiff υλικών	264
4.2 Δομο-εξαρτώμενη βιολογική δραστηριότητα του Zn(II).....	265
4.3 Δομο-εξαρτώμενη επίδραση του Zn(II) στην κυτταρική επιβίωση των πρώιμων και ώριμων λιποκυττάρων.....	267
4.4 Επαγωγή της λιπογένεσης από τον ψευδάργυρο και ινσουλινομιμητική δράση.....	269
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	271
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	273
ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΔΟΜΟ-ΕΙΔΙΚΟΥ ΛΙΠΟΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΝΕΟ-ΣΥΝΤΙΘΕΜΕΝΩΝ ΣΑΦΩΣ ΚΑΘΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΔΥΑΔΙΚΩΝ V(V)-Schiff ΥΛΙΚΩΝ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗΝ ΕΠΑΓΩΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΟ ΒΑΝΑΔΙΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ 3T3-L1 ΠΡΟ-ΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΩΡΙΜΑ ΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΑ. ΣΧΕΣΗ ΔΟΜΗΣ-ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΜΟΡΙΑΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ.	
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	273
2.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	275
2.1.Σχεδιασμός, σύνθεση και φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των υλικών.....	275
2.1.1 Schiff-Base οργανικά υποστρώματα.....	275
2.1.2 V(V)-Schiff Base υλικά.....	275
2.2. Ανάπτυξη κυτταρικής καλλιέργειας και βιολογικές δοκιμασίες	277
2.2.1. Ανάπτυξη κυτταρικής καλλιέργειας.....	277
2.2.2. Επαγωγή της λιπογένεσης	277
2.2.3. Αξιολόγηση της κυτταρικής επιβίωσης.....	278
2.2.4. Επαγωγή της λιπογένεσης με τα V(V)-σύμπλοκα	278
2.2.5. Ποσοτική εκτίμηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του mRNA στενά συνδεδεμένων μοριακών στόχων μετά από διαφοροποίηση με τις νεοσυντιθέμενες ενώσεις V(V) (RT-PCR)	279

2.2.6. Έλεγχος της επίδρασης των V(V)-συμπλόκων στην μεταναστευτικότητα των 3T3-L1 προ-λιποκυττάρων	279
2.2.7. Στατιστική ανάλυση	279
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	280
3.1. Αποτελέσματα κυτταρικής επιβίωσης	280
3.1.1. Μέτρηση της βιωσιμότητας των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με απλές, ανόργανες μορφές βαναδίου.	280
3.1.2 Μέτρηση της βιωσιμότητας των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με τους νεοσυντιθέμενους υποκαταστάτες (LH1-LH3).	281
3.1.3 Μέτρηση της βιωσιμότητας των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με τα νεοσυντιθέμενα μεταλλο-σύμπλοκα βαναδίου (1-3).	282
3.1.4. Μέτρηση της βιωσιμότητας των προ-λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με τα νεοσυντιθέμενα μεταλλο-σύμπλοκα βαναδίου (1-3).....	284
3.1.5. Μέτρηση της βιωσιμότητας των ώριμων λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με τα νεοσυντιθέμενα μεταλλο-σύμπλοκα βαναδίου (1-3).....	286
3.1.6. Έλεγχος της επίδρασης των V(V)-συμπλόκων στην μεταναστευτικότητα των 3T3-L1 προ-λιποκυττάρων (1-3).....	288
3.2 Αποτελέσματα κυτταρικής διαφοροποίησης	290
3.2.1. Διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα με τις ενώσεις 1-3 (oil red O staining)	290
3.2.3. Διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα με τις ενώσεις 1-3 (RT-PCR)	293
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	295
4.1 Σχεδιασμός και σύνθεση των V(V)-Schiff υλικών	295
4.2 Σχέση δομής-βιολογικής δράσης	297
4.3 Σχέση βαναδίου βιολογικής δραστηριότητας	298
4.4 Επαγωγή της διαφοροποίησης με V(V)	299
4. Συμπεράσματα	300
4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	301
ΜΕΡΟΣ ΙΙΙ.....	303
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι.....	304
ΔΙΑΒΗΤΗΤΙΚΗ ΝΕΥΡΟΠΑΘΕΙΑ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΛΛΟΪΟΝΤΩΝ ΣΤΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ. <i>IN VITRO</i> ΚΑΙ <i>EX VIVO</i> ΜΕΛΕΤΗ	304

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	304
1.1.1 ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΚΑΙ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	305
Δομή Περιφερικού Νευρικού Συστήματος	305
Δομή των περιφερικών νεύρων	307
1.1.2 Φυσιολογία της Αγωγής του Νευρικού Ερεθίσματος.....	307
Δυναμικό Ηρεμίας	307
1.1.3 Δομή του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος.....	311
1.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΚΑΤΑΠΙΟΝΗΣΗΣ.....	313
1.2.1 ΜΕΤΑΛΛΟΪΟΝΤΑ - ΜΕΤΑΛΛΟΤΟΞΙΝΕΣ.....	313
1.2.2 ΜΕΤΑΛΛΟΦΑΡΜΑΚΑ - ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ.....	345
1.3 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ STRESS.....	350
1.3.1 ΜΕΤΑΛΛΟ-ΕΠΑΓΟΜΕΝΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ STRESS.....	352
1.3.2 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΣΗ	355
1.3.3 ΧΗΛΙΚΟΠΟΙΗΣΗ.....	355
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	359
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	359
2.1. ΑΝΑΤΟΜΙΑ.....	359
2.1.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΙΣΧΙΑΚΟΥ ΝΕΥΡΟΥ	359
2.1.2 ΛΗΨΗ ΙΠΠΟΚΑΜΠΙΑΙΟΥ ΙΣΤΟΥ	360
2.2. ΗΛΕΚΤΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΓΡΑΦΕΣ (<i>exvivo</i>).....	361
2.3. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΥΡΩΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΓΛΟΙΑΔΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ (<i>in vitro</i>).....	365
2.3.1 ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΙΑΙΟΥ ΙΣΤΟΥ.....	365
2.3.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	367
2.4. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ.....	367
• Συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με ακτίνες Laser. (Confocal Laser Scanning Microscope)	368
2.5. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ.....	370
2.5.1 ΜΕΤΑΛΛΟΤΟΞΙΝΕΣ	370
2.5.2 ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ.....	372
2.5.3 ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΠΙΝΕΥΡΙΟΥ	372

2.5.4 ΣΗΜΑΝΣΗ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΦΘΟΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΣ ΔΙΧΛΩΡΟΦΛΟΥΡΟΣΚΕΪΝΗ (DCFDA).....	373
2.5.5 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ – ΕΦΑΡΜΟΓΗ 2 ^{0Y} ΗΛΕΚΤΡΙΚΟΥ ΠΑΛΜΟΥ ΣΤΗΝ ΣΧΕΤΙΚΗ ΑΝΕΡΕΘΙΣΤΗ ΠΕΡΙΟΔΟ.....	373
2.5.6 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΧΗΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΟΥΣΙΩΝ <i>invitro</i>	375
2.6. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ – ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ.....	378
2.7. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥΛΙΚΟ	380
2.8. ΧΗΜΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.....	380
2.8.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΜΟΝΟΎΔΡΙΚΟΣ <i>cis</i> ΔΙΣ(ΓΛΥΚΙΝΙΚΟΣ)ΧΑΛΚΟΣ(II) <i>cis</i> -Cu(gly) ₂ ·H ₂ O.....	380
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	386
3.1 Βιωσιμότητα του ισχιακού νεύρου υπό μακροχρόνιες κανονικές συνθήκες (<i>ex vivo</i>)	386
3.2 Βιωσιμότητα των περιφερικών ινών του ισχιακού νεύρου του επίμυος υπό την επίδραση μεταλλοτοξινών	391
3.2.1 Σίδηρος	391
3.2.2 Κοβάλτιο.....	392
3.2.3 Δημήτριο.....	394
3.2.4 Αργίλιο	395
3.2.5 Χρώμιο	396
3.2.6 Χαλκός.....	399
3.3 Ιστολογική διερεύνηση της σχέσης της δράσης του Cu(II) με τον σχηματισμό ενεργών μορφών οξυγόνου.	408
3.4 Βιωσιμότητα πρωτογενούς καλλιέργειας ιπποκαμπιαίου ιστού υπό βραχυπρόθεσμες συνθήκες (<i>in vitro</i>)	410
3.4.1 Εκτίμηση της νευροτοξικής δράσης του <i>cis</i> -[Cu(II)-glycinate]	410
3.4.2 Εκτίμηση της νευροπροστατευτικής δράσης του EDTA και QA.	413
3.5 Ανάπτυξη μοντέλου εκτίμησης περιφερικής νευροπάθειας	420
3.5.1 Συχνότητα διέγερσης-εφαρμογή 2 ⁰⁰ ηλεκτρικού παλμού στην σχετική ανερέθιστη περίοδο.	420
3.5.2 Βιωσιμότητα του ισχιακού νεύρου υπό μακροχρόνιες συνθήκες σε συχνότητα διέγερσης 100 Hz (<i>ex vivo</i>).....	426
3.6 Αντικαρκινικά φάρμακα.....	428
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	438

4.1 Νευροτοξική δράση μεταλλοϊόντων και νευροπροστατευτική δράση χημικών παραγόντων (<i>ex vivo</i>)	438
4.2 Νευροτοξική δράση του cis-[Cu(II)-glycinate] (<i>invitro</i>)	446
4.3 Αξιολόγηση της δράσης αντικαρκινικών μεταλλοφαρμάκων	448
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	450
ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	452
ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ.....	457
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	459
1. Η κυτταρική σειρά 3T3-L1.....	459
2. Μέθοδος καλλιέργειας	460
3. Αναπτυξη υπό-καλλιεργειών	460
4. Κρυοαποθήκευση 3T3-L1 προ-λιποκυττάρων σε υγρό άζωτο	461
5. Μέτρηση βιωσιμότητας και αριθμού προ-λιποκυττάρων με την μέθοδο του TrypanBlue.....	461
6. Απόψυξη προ-λιποκυττάρων και ώριμων λιποκυττάρων από το υγρό άζωτο	462
7. Διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα.....	462
8. Έλεγχος της διαφοροποίησης με οπτική μικροσκοπία	463
9. Έλεγχος της διαφοροποίησης με χρώση oil redO staining.....	463
10. Έλεγχος με Real – Time PCR	464
10.1 Εκχύλιση – απομόνωση RNA.....	464
10.2 Σύνθεση cDNA – ανάστροφη μεταγραφή	466
10.3 Ποσοτικοποίηση με real-time PCR.....	467
11. Μέτρηση της βιωσιμότητας των προ- και ώριμων λιποκυττάρων με χρήση της φωταύγειας (luminescence assay).....	471
12. Ποιοτική εκτίμηση της αναστολής του μεταναστευτικού δυναμικού των προ-λιποκυττάρων (<i>in vitro</i> scratch assay).....	473
13. Εκτίμηση της πρόσληψης της γλυκόζης από ώριμα λιποκύτταρα.....	475

ΜΕΡΟΣ Ι

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 Η ΑΣΘΕΝΕΙΑ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο σύγχρονος τρόπος ζωής με κύρια χαρακτηριστικά αυτά του δυτικού τρόπου ζωής (διαιτητικές επιλογές, καθιστική ζωή) σε συνδυασμό με τη επίδραση της γενετικής προδιάθεσης καθώς και άλλων παραγόντων που ξεκινούν νωρίς από την ενδομήτρια ζωή του ανθρώπου, έχουν οδηγήσει στην εμφάνιση νοσημάτων και παθολογικών καταστάσεων που σχετίζονται με τον μεταβολισμό. Ο Σακχαρώδης Διαβήτης (ΣΔ), που για καιρό θεωρήθηκε ασθένεια ήσσονος σημασίας για την παγκόσμια υγεία, παίρνει τώρα την θέση του ως μια από τις κύριες απειλές για την υγεία του ανθρώπου στον 21ο αιώνα. Τις προηγούμενες δύο δεκαετίες παρατηρήθηκε μια εκρηκτική αύξηση στον αριθμό των ατόμων που διαγνώστηκαν με σακχαρώδη διαβήτη παγκοσμίως [1,2]. Σημαντικές αλλαγές στο περιβάλλον του ανθρώπου, στην ανθρώπινη συμπεριφορά αλλά και στον τρόπο ζωής έχουν οδηγήσει σε κλιμακωτή αύξηση της παχυσαρκίας και του διαβήτη, εξ' ου και όρος *diabesity* ο οποίος προτάθηκε αρχικά από τον Shafiq αρκετές δεκαετίες πριν [3,4].

Πολυάριθμοι παθογενετικοί μηχανισμοί συμμετέχουν στην ανάπτυξη του ΣΔ. Οι μηχανισμοί αυτοί εκτείνονται από αυτοάνοση καταστροφή των β- παγκρεατικών κυττάρων με αποτέλεσμα την πλήρη έλλειψη έκκρισης της ινσουλίνης έως και ισχυρή ινσουλινο-ανοχή. Ήδη από την παιδική ηλικία, φαίνεται πως υπάρχει μια ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα στην ινσουλινο-αντίσταση και την εκδήλωση σακχαρώδους διαβήτη. Είναι επίσης γνωστό πως η αντίσταση στην ινσουλίνη σχετίζεται και με άλλους παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα, όπως η υπέρταση, τα υψηλά επίπεδα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων καθώς και παχυσαρκία - όλες παθολογικές καταστάσεις που συνθέτουν την εικόνα του μεταβολικού συνδρόμου.

1.2 ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΣΔ

Η ασθένεια του ΣΔ αποτελεί ομάδα μεταβολικών διαταραχών η οποία χαρακτηρίζεται από επίμονη υπεργλυκαιμία (αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα - υψηλότερα από τα φυσιολογικά) και μπορεί να προκύψει από προβληματική έκκριση της ινσουλίνης, μειονεκτική δράση της ή/και τα δύο[1].

Οι δύο κύριοι τύποι του διαβήτη είναι ο τύπος 1 (γνωστός ως ινσουλινο-εξαρτώμενος διαβήτης) και ο τύπος 2 (γνωστός ως μη ινσουλινο-εξαρτώμενος διαβήτης). Ο διαβήτης τύπου 1 προκαλείται κατά κύριο λόγο από την αυτοάνοση καταστροφή των ινσουλινο-παραγωγών β-κυττάρων των νησιδίων του παγκρέατος (Langerhans islets) και διακρίνεται περαιτέρω σε ιδιοπαθή και ανοσολογικό ενώ ο διαβήτης τύπου 2 προκύπτει τόσο από διαταραγμένη έκκριση ινσουλίνης όσο και από αντίσταση στην δράση της. Ο διαβήτης είναι μείζον παγκόσμιο πρόβλημα υγείας και το 2010 είχε υπολογιστεί να προσβάλει 285 εκατομμυρίων άτομα παγκοσμίως και ο αριθμός αυτός προβλέπεται να αυξηθεί σε περισσότερα από 400 εκατομμύρια κατά τις επόμενες δύο δεκαετίες λόγω πληθυσμιακών δημογραφικών μεταβολών, όπως η γήρανση και αστικοποίηση και από μεταβολές στον τρόπο διαβίωσης, όπως το διαιτητικό προφίλ και η άσκηση, και η σχετική με αυτά αύξηση της παχυσαρκίας. Η αύξηση σε μεγάλο βαθμό αντιπροσωπεύει αύξηση στον επιπολασμό του διαβήτη τύπου 2 η οποία αντιπροσωπεύει ~90% όλων των περιπτώσεων διαβήτη, ωστόσο ο επιπολασμός του διαβήτη τύπου 1 αυξάνεται ραγδαία επίσης. Άλλοι τύποι ΣΔ περιλαμβάνουν ενδοκρινολογικές, γενετικές διαταραχές των β-παγκρεατικών κυττάρων, παθήσεις του παγκρέατος κ.α.. Ιδιαίτερα συχνός είναι και ο διαβήτης της κύησης οποίος πρόκειται για μεταβολική διαταραχή που εμφανίζεται κατά την διάρκεια της κύησης και είναι συνέπεια των διαβητογόνων επιδράσεων των ορμονών της κύησης σε γυναίκες που μειονεκτούν στην αντιμετώπιση των διαβητογόνων αυτών επιδράσεων. Ο ΣΔ της κύησης έχει χαρακτηριστικά ΣΔ τύπου 2 και θεωρείται αρκετά συχνός ξεπερνώντας το 18% των κύσεων σύμφωνα με τα πρόσφατα καθιερωμένα κριτήρια.

1.3 ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ – ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΣΔ

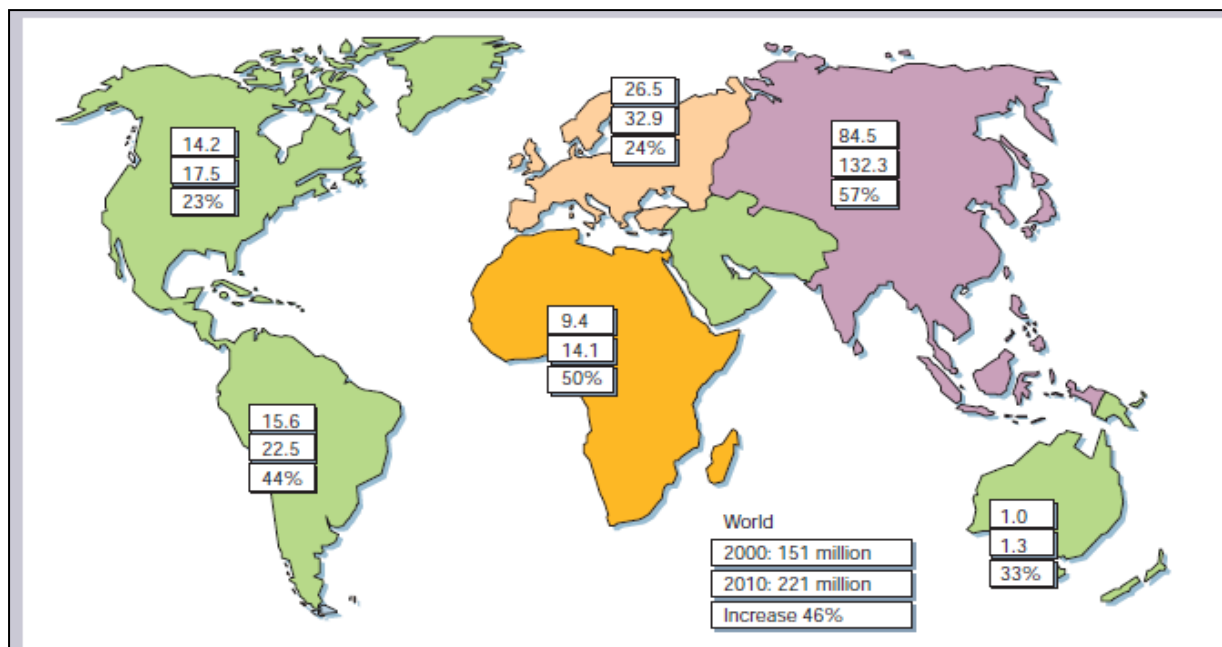
Ο ΣΔ αποτελεί την πέμπτη κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως, ευθυνόμενος για 4 εκατομμύρια θανάτους ετησίως ξεπερνώντας τον αριθμό των παγκόσμιων θανάτων από τον ιό της ανθρώπινης ανοσολογικής ανεπάρκειας (HIV). Η πρόωρη θνησιμότητα προκαλείται κατά κύριο λόγο από την αύξηση των καρδιαγγειακών παθήσεων, αλλά ο διαβήτης προκαλεί επίσης σημαντικές νοσηρότητες μέσω των μικροαγγειακών επιπλοκών, που επηρεάζουν τους οφθαλμούς, τα νεύρα, τους νεφρούς και άλλα όργανα.

Ο επιπολασμός εκφράζει την συχνότητα ενός νοσήματος σε ένα συγκεκριμένο πληθυσμό, μια ορισμένη στιγμή. Στην Ελλάδα υπολογίζεται ότι ο πληθυσμός των ενηλίκων 20-79 ετών, που πάσχει από ΣΔ είναι 585 χιλιάδες, δηλαδή το 7% του πληθυσμού ηλικίας 20-79 ετών.

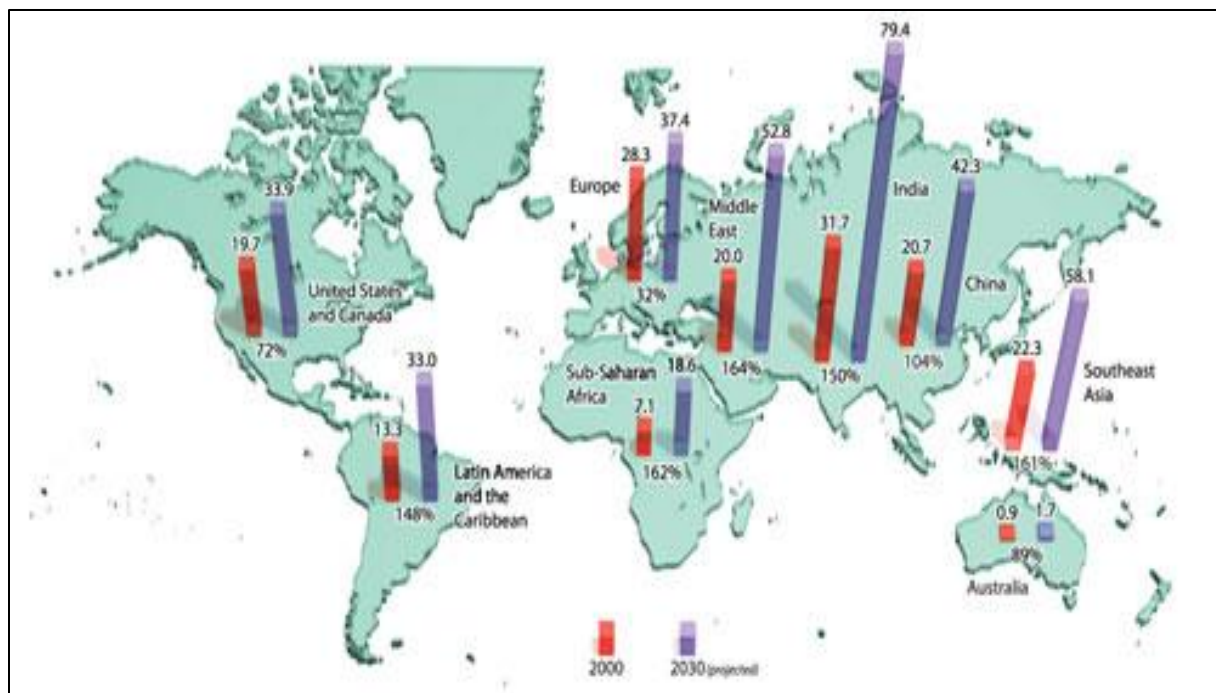
Ο επιπολασμός του διαβήτη στις ΗΠΑ το 2010 ήταν σχεδόν 27 εκατομμύρια (12.3%), ενώ 3,6 εκατομμύρια άνθρωποι πάσχουν από διαβήτη στο Ηνωμένο Βασίλειο (7.4%) (Εικόνες 1. Α&Β). Ο επιπολασμός του διαβήτη στο Ηνωμένο Βασίλειο διπλασιάζεται κάθε 20 έτη μετά το τέλος του Δευτέρου Παγκοσμίου Πολέμου. Αναγνωρίζεται πλέον ότι οι χαμηλών και μεσαίων εισοδημάτων χώρες αντιμετωπίζουν την μεγαλύτερη επιβάρυνση του διαβήτη, με περίπου τα δύο τρίτα των ατόμων που εμφανίζουν διαβήτη να ζουν σε αυτές τις περιοχές του κόσμου. Οκτώ από τις 10 πρώτες χώρες με υψηλότερους απόλυτους αριθμούς ατόμων με διαβήτη έχουν αναπτυσσόμενες ή μεταβατικές οικονομίες.

Οι διαφορές οι οποίες παρουσιάζονται στον επιπολασμό του ΣΔ ανά χώρα, έθνος, φυλή ή ακόμα και φύλο αποδίδονται σε διαφορετική γενετική καταβολή και προδιάθεση καθώς και στην επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως είναι η παχυσαρκία, η έλλειψη σωματικής άσκησης και άλλων παραγόντων που ως γνωστό προάγουν την ανάπτυξη ΣΔ.

Ο επιπολασμός του ΣΔ τύπου 2 στην Ευρώπη κυμαίνεται μεταξύ 2-8% ενώ στην Αμερική υπολογίζεται ότι είναι 7.8%. Ο επιπολασμός του ΣΔ τύπου 1 εμφανίζει μεγαλύτερες διαφορές μεταξύ των κρατών και των φυλών. Υψηλότερο επιπολασμό εμφανίζει η Φινλανδία (2.6%) σε σύγκριση με την Αμερική (1.7%) [5,6].



Εικόνα 1.3.Α Αριθμός ατόμων με Σακχαρώδη Διαβήτη (σε εκατομμύρια) για το 2000 και το 2010 και η εκατοστιαία αύξηση των κρουσμάτων.



Εικόνα 1.3.Β Αριθμός ατόμων με Σακχαρώδη Διαβήτη (σε εκατομμύρια) για το 2000 και το 2030 και η εκατοστιαία αύξηση των κρουσμάτων.

1.4 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΣΔ

Η διάγνωση του ΣΔ πραγματοποιείται με μέτρηση της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος κατά την διάρκεια νηστείας και τα επίπεδα της δεν θα πρέπει να ξεπερνούν τα 7.0 mmol/L (126 mg/dL) ή μεγαλύτερη των 11,1 mmol/L (200 mg/dL) αν η μέτρηση είναι τυχαία ή μετά από δίωρη δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη. Τα διαγνωστικά κριτήρια περιλαμβάνουν επίσης δύο ακόμη κατηγορίες μη φυσιολογικών συγκεντρώσεων γλυκόζης οι οποίες αφορούν στην διαταραγμένη γλυκαιμία νηστείας (IGF) και στην διαταραγμένη ανοχή γλυκόζης (IGT). Η τελευταία τιμή μπορεί να διαγνωσθεί μόνο μετά από δοκιμασία ανοχής στην γλυκόζη (OGTT) με 75g per os. Για την διάγνωση ατόμων με κλασική συμπτωματολογία απαιτείται μόνο μία παθολογική (μη φυσιολογική) τιμή γλυκόζης ενώ παράλληλα παρατηρείται πολυουρία και πολυδιψία. Στα ασυμπτωματικά άτομα απαιτείται η χρήση καμπύλης γλυκόζης. Οι συγκεντρώσεις γλυκόζης πλάσματος παρουσιάζουν μια ασύμμετρη κανονική κατανομή στο γενικό πληθυσμό και, ως εκ τούτου, η οριοθέτηση της από την κανονική-φυσιολογική γίνεται πολλές φορές αυθαίρετα. Εναλλακτικός τρόπος διάγνωσης του ΣΔ αποτελεί η μέτρηση της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c) (>6.5% (48 mmol/mol). Βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ο βαθμός επαναληψιμότητας των τιμών σε σχέση με τις τιμές γλυκόζης μη νηστείας. Η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη (HbA1c) αποτελεί μια καταγραφή του ολοκληρωμένου γλυκαιμικού ελέγχου για την περίοδο των προηγούμενων 2-3μηνών, και αντανακλά την μέση διάρκεια ζωής των ερυθροκυττάρων (ερυθρών αιμοσφαιρίων). Η γλυκόζη προσκολλάται στην ώριμη αιμοσφαιρίνη με μη ενζυματικό τρόπο και εξαρτάται από την μέση συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως αντίδραση Amadori [7,8].

1.5 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΣΔ

Η ταξινόμηση του ΣΔ σε κάθε περίπτωση εξαρτάται από τις συνθήκες που λαμβάνουν χώρα την χρονική στιγμή της διάγνωσης ενώ πολλές φορές δεν είναι εφικτή η κατάταξη της κάθε περίπτωσης σε μία μόνο κατηγορία. Ενδεικτικά, μία ασθενής με ΣΔ κύησης μπορεί να παραμείνει υπεργλυκαιμική και μετά τον τοκετό, αναπτύσσοντας τελικά ΣΔ τύπου 2. Όμοια, ένας ασθενής που αποκτά ΣΔ εξαιτίας εξωγενούς λήψης υψηλών δόσεων στεροειδών μπορεί να παραμείνει με φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης μετά την διακοπή της χορήγησης των γλυκοκορτικοειδών αλλά ενδέχεται τελικά να αναπτύξει ΣΔ αρκετά χρόνια αργότερα λόγω υποτροπιάζουσας παγκρεατίτιδας. Στα ίδια πλαίσια, άτομα τα οποία λαμβάνουν θειαζίνες

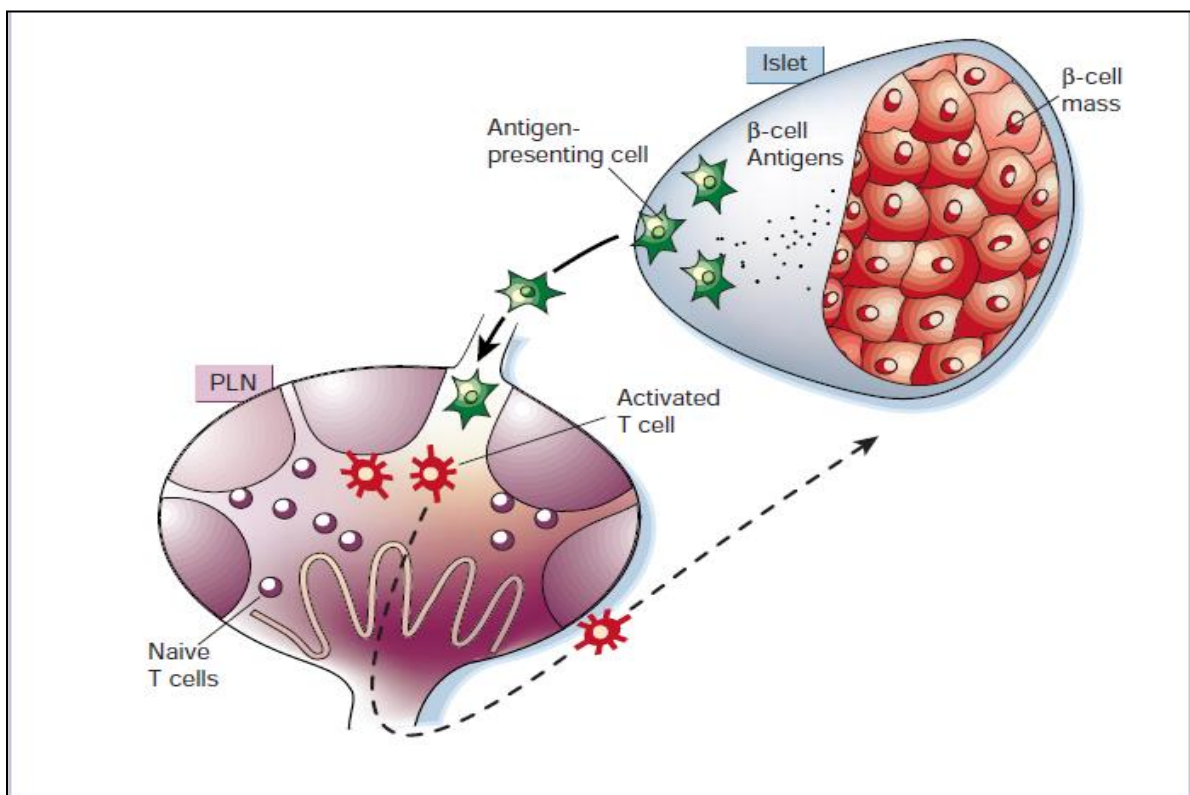
παρουσιάζουν ΣΔ μετά την πάροδο πολλών ετών. Επομένως, ιδιαίτερη σημασία αποκτά η κατανόηση της παθογένεσης της υπεργλυκαιμίας καθώς και να αντιμετωπισθεί αποτελεσματικά παρά η τυπική ταξινόμηση του τύπου του ΣΔ σε κάθε περίπτωση.

1.5.1 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ 1

Ο ΣΔ τύπου 1 είναι μια αυτοάνοση ασθένεια η οποία προκύπτει από την καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος των νησιδίων του Langerhans τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της ινσουλίνης. Ο διαβήτης τύπου 1 έχει δύο διακριτές φάσεις: την ινσουλίτιδα, όταν ένας μεικτός αριθμός λευκοκυττάρων εισβάλλει στα νησίδια και τον διαβήτη, όπου τα περισσότερα β-κύτταρα έχουν πεθάνει και άρα δεν παράγεται ινσουλίνη για την ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης, γεγονός που οδηγεί σε υπεργλυκαιμία. Τα άτομα μπορεί να έχουν για μεγάλο διάστημα συγκαλυμμένη ινσουλίτιδα πριν εξελιχθεί σε διαβήτη ενώ πολλές φορές η ασθένεια δεν εμφανίζεται ποτέ. Ο διαβήτης τύπου 1 αποτελεί παλιά διαταραχή καθώς έχει καταγραφεί σε ελληνικά και αιγυπτιακά συγγράμματα. Επιπλέον αποτελεί κοινή ασθένεια που σήμερα επηρεάζει το 0.5% του πληθυσμού στις ανεπτυγμένες χώρες ενώ η συχνότητα του φαίνεται να αυξάνεται. Ανοσοϊστολογικές αναλύσεις δείχνουν ότι τα περισσότερα λευκοκύτταρα που εισέρχονται στα νησίδια είναι T κύτταρα. Η νόσος δεν αναπτύσσεται σε ποντίκια τα οποία είναι γενετικά αθυμικά ή έχουν T λεμφοπενία ή υπέστησαν θυμεκτομή κατά την γέννηση. Αν και τα περισσότερα από αυτά τα δεδομένα προέρχονται από μοντέλα διαβήτη σε τρωκτικά, υπάρχουν άφθονες ενδείξεις ότι και στους ανθρώπους η ασθένεια αυτή διαμεσολαβείται από τα T λεμφοκύτταρα και έχει παρόμοια ιστολογία ενώ υπάρχει θετική απόκριση σε θεραπεία με αναστολείς των T λεμφοκυττάρων. Τα T λεμφοκύτταρα με διαβητογόνες ιδιότητες εμπίπτουν στις κλάσεις CD4+ και CD8+. Τα κύτταρα αυτά αποκρίνονται σε αντιγόνα τα οποία είναι ειδικά αλλά όχι μοναδικά και συντίθενται στα β-κύτταρα συμπεριλαμβανομένων πεπτιδίων που προέρχονται από την ινσουλίνη, την αποκαρβοξυλάση του γλουταμινικού οξέος και τις φωσφατάσες της τυροσίνης 1A-2 και 1A-2b (Εικόνες 1.5.1 A & B).

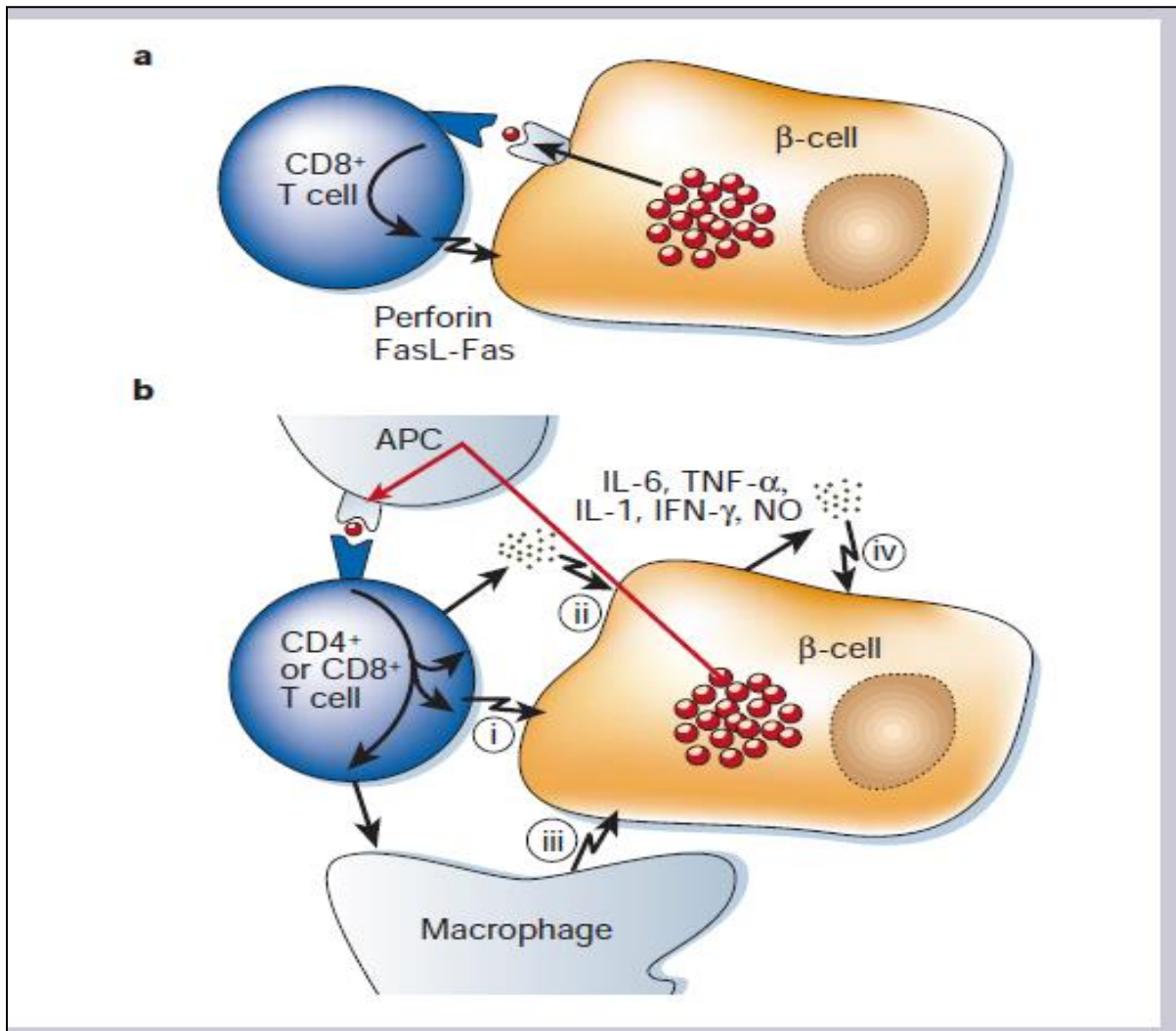
Ο διαβήτης τύπου 1 είναι μια διακριτή, πολυπαραγοντική διαταραχή και η παθογένεια της ασθένειας συνεπάγεται και περιβαλλοντικούς παράγοντες (ακόμα και ιογενείς λοιμώξεις) που μπορεί να ενεργοποιήσουν τους μηχανισμούς αυτοανοσίας σε γενετικά ευαίσθητα άτομα οδηγώντας σε προοδευτική απώλεια των νησίδων των β-κυττάρων [9]. Από πολλές απόψεις, οι

προσπάθειες για την επίλυση του πάζλ της αιτιολογίας του διαβήτη τύπου 1 ήταν απογοητευτικές παρά τις δεκαετίες της έρευνας [9,10]. Η προδιάθεση για ανάπτυξη της ασθένειας μεσολαβείται από έναν αριθμό γονιδίων που αλληλεπιδρούν με πολύπλοκο τρόπο μεταξύ τους αλλά και με το περιβάλλον. Ιδιαίτερα χαμηλά ποσοστά διαβήτη έχουν βρεθεί στους ασιατικούς πληθυσμούς [11] ενώ αντίθετα τα υψηλότερα ποσοστά εμφανίζονται στην Φινλανδία με 35 περιστατικά ανά 100.000 άτομα [12]. Η κατάσταση αυτή είναι αρκετά διαφορετική από άλλες βαλτικές περιοχές [13] και κυρίως την Εσθονία [14], της οποίας ο πληθυσμός ομοιάζει ως προς την κουλτούρα, αλλά παρουσιάζει μόνο το 1/3 της συχνότητας εμφάνισης. Η παρατήρηση αυτή δίνει έμφαση στην σημαντική επιρροή των περιβαλλοντικών παραγόντων στην εμφάνιση του διαβήτη τύπου 1.



Εικόνα 1.5.1.A Προτεινόμενο σχήμα για την έναρξη του διαβήτη τύπου 1. Ανώριμα T λεμφοκύτταρα κυκλοφορούν μέσω του αίματος και των λεμφικών οργάνων περιλαμβάνοντας τους λεμφαδένες του παγκρέατος (PLNs). Στους λεμφαδένες του παγκρέατος έρχονται αντιμέτωπα με τα αντιγονοπαρουσιαστικά (APCs) κύτταρα, τα οποία φέρουν στην επιφάνειά τους MHC μόρια τα οποία φέρουν αντιγόνα υπό την μορφή

πεπτιδικών θραυσμάτων. Στην περίπτωση αυτή τα αντιγόνα προέρχονται από πρωτεΐνες που συντίθενται στα παγκρεατικά νησίδια των β-κυττάρων. Κλάσμα των ανώριμων T λεμφοκυττάρων μπορεί να αναγνωρίσει τα MHC μόρια, να ενεργοποιηθεί και να εισέλθει στον παγκρεατικό ιστό όπου συναντούν εκ νέου συγγενή αντιγόνα, επανενεργοποιούνται και διατηρούνται.



Εικόνα 1.5.1.B Προτεινόμενο σχήμα των μηχανισμών θανάτου των β-κυττάρων. Α) σύμφωνα με τους μηχανισμούς αναγνώρισης-σύνδεσης, τα T-κύτταρα (σε αυτή την περίπτωση CD8+) ενεργοποιούνται από την απευθείας αναγνώριση αντιγόνων που παρουσιάζονται από τα MHC μόρια (στην περίπτωση αυτή μόρια κλάσης I) στα β-κύτταρα. Η ενεργοποίηση αυτή προκαλεί την θανάτωση των β-κυττάρων μέσω της κυττάρου/κυττάρου επαφής χρησιμοποιώντας τα μονοπάτια Fas/FasL ή το μονοπάτι της περιφορίνης. Β) Σύμφωνα με τους μηχανισμούς ενεργοποίησης-σύνδεσης, τα T-κύτταρα

(CD4+ ή CD8+) αναγνωρίζουν έμμεσα αντιγόνα των β-κυττάρων που παρουσιάζονται από τα APCs στην περιοχή. Η ενεργοποίηση αυτή προκαλεί τον θάνατο των β-κυττάρων που διαμεσολαβείται από επιφανειακούς υποδοχείς όπως είναι οι: FasL/Fas, TNF-α/TNF-R (i), κυτοκίνες και άλλα διαλυτά μόρια απόπτωσης που παράγονται από τα T-κύτταρα (ii), ενεργοποίηση μακροφάγων (iii), ενεργοποίηση των β-κυττάρων και διέγερση της παραγωγής μεσολαβητών απόπτωσης.

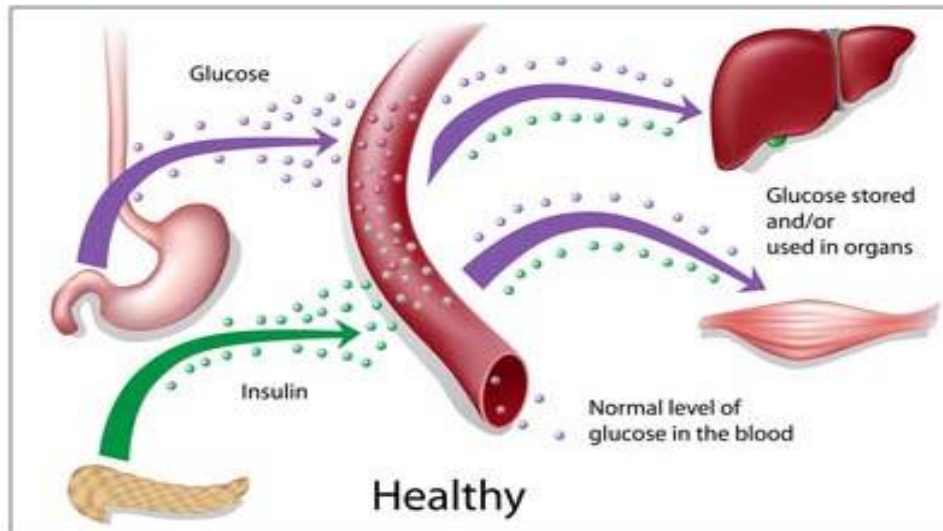
1.5.2 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ 2

Ο διαβήτης τύπου 2 χαρακτηρίζεται από έλλειψη ευαισθησίας στην ινσουλίνη καθώς και διαταραχή στην έκκριση της. Ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 δεν εξαρτώνται από εξωγενή ινσουλίνη παρά μόνο σε περιπτώσεις όπου τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα δεν μπορούν να ρυθμιστούν μέσω ειδικής διατροφής ή υπογλυκαιμικών παραγόντων. Έχει υπολογισθεί ότι ο παγκόσμιος αριθμός ατόμων με διαβήτη πρόκειται να αυξηθεί στα 300 εκατομμύρια μέχρι και το 2025 [1,15] εκ των οποίων η πλειοψηφία θα χαρακτηρίζεται από διαβήτη τύπου 2 κυρίως λόγω του τρόπου ζωής και των διατροφικών προτύπων [16]. Τα αίτια ή οι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση του ΣΔ τύπου 2 μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες οι οποίες περιλαμβάνουν τους τροποποιήσιμους και τους μη τροποποιήσιμους. Στην πρώτη κατηγορία σημαντική θέση κατέχουν η παχυσαρκία, ιδίως του κεντρικού τύπου ή σπλαχνική παχυσαρκία και η καθιστική ζωή ή η έλλειψη σωματικής άσκησης. Άτομα τα οποία έχουν εμφανίσει διαταραγμένη γλυκόζη νηστείας (IGF) ή διαταραγμένη ανοχή γλυκόζης (IGT) ή έχουν χαρακτηριστικά μεταβολικού συνδρόμου (ορίζεται παρακάτω) ή καταναλώνουν υπερθερμιδικές δίαιτες, πλούσιες σε κορεσμένα λίπη και απλά σάκχαρα έχουν αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση ΣΔ τύπου 2. Στους μη τροποποιήσιμους παράγοντες κινδύνου συμπεριλαμβάνονται γενετικά αίτια, δηλαδή γονιδίων τα οποία προδιαθέτουν για την εμφάνιση παχυσαρκίας, αντίστασης στην ινσουλίνη και για έκπτωση της λειτουργίας των β παγκρεατικών κυττάρων σε συνθήκες αυξημένων αναγκών, τα οποία καθορίζονται από τη φυλετική ομάδα που μπορεί κάποιος να ανήκει ή από το οικογενειακό περιβάλλον. Άλλοι μη τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου είναι η ηλικία (αύξηση της συχνότητας με την γήρανση), το γένος, το ιστορικό ΣΔ κατά την κύηση και το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών.

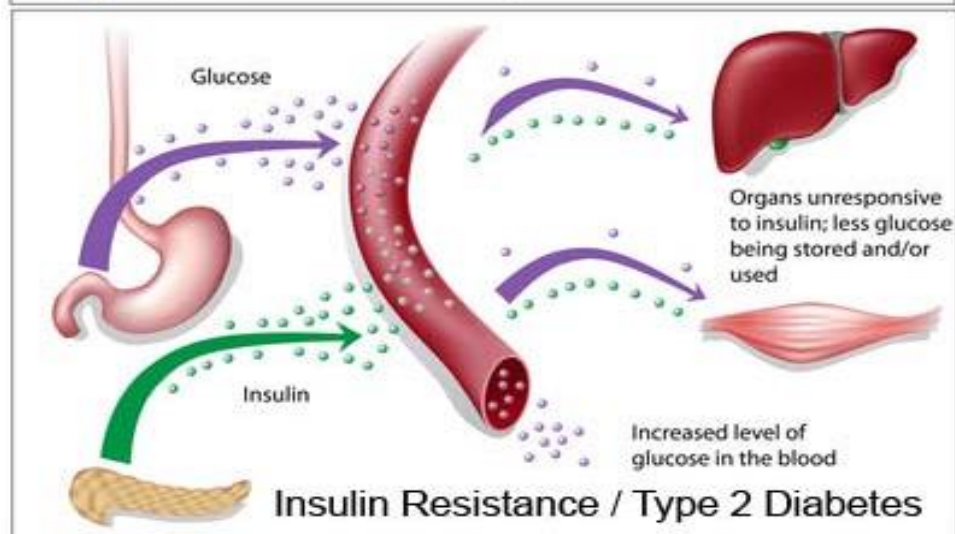
Ο ΣΔ τύπου 2 χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη ινσουλινο-αντίστασης των ιστών στη δράση της ινσουλίνης και από δυσλειτουργία των β-κυττάρων του παγκρέατος που αδυνατούν να ανταποκριθούν στις αυξημένες, εξαιτίας της ινσουλινο-αντίστασης, ανάγκες για ινσουλίνη με

αποτέλεσμα την αύξηση των τιμών του σακχάρου στο αίμα σε περίοδο νηστείας αλλά και μεταγευματική περίοδο. Ως αντίσταση στην ινσουλίνη χαρακτηρίζεται η κατάσταση κατά την οποία η ινσουλίνη αδυνατεί να προκαλέσει τις συνήθεις βιολογικές δράσεις της σε συγκεντρώσεις που σε φυσιολογικά άτομα είναι αποτελεσματικές [1](Εικόνα 1.5.2).

A



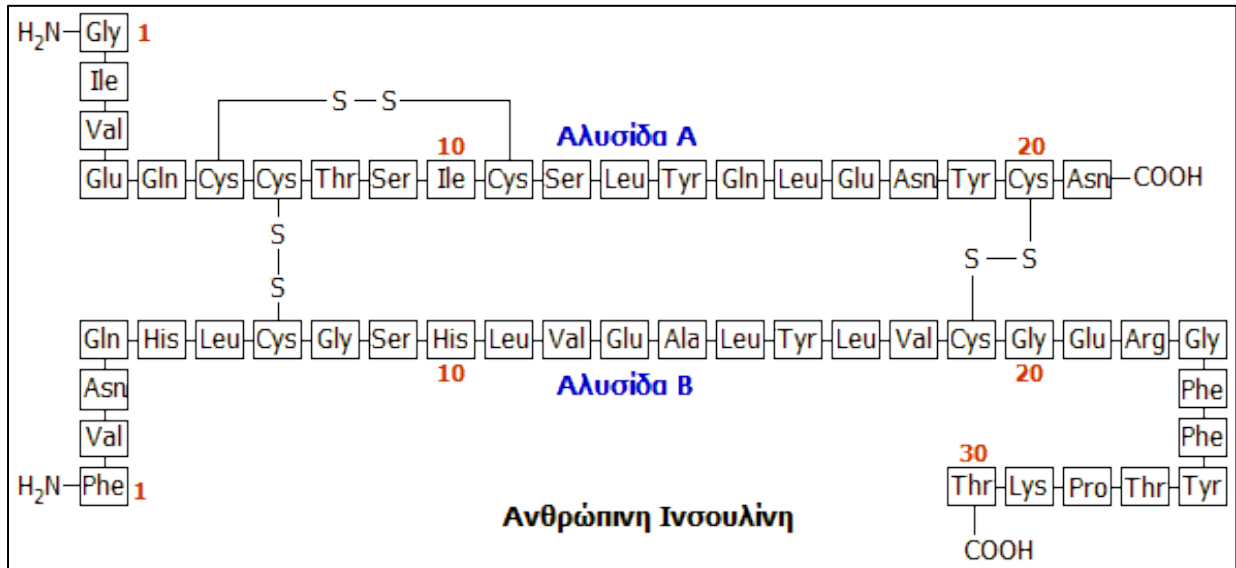
B



Εικόνα 1.5.2 Σχηματική απεικόνιση της ινσουλινο-ανοχής και των συνεπειών της κατά τον ΣΔ τύπου 2 (B) σε σχέση με την φυσιολογική κατάσταση (A).

1.5.2.1 Η ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ

Η ινσουλίνη είναι μια πεπτιδική ορμόνη με 51-αμινοξέα που αποτελείται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες, τις Α και Β οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικές γέφυρες (Εικόνα 1.5.2.1Α).

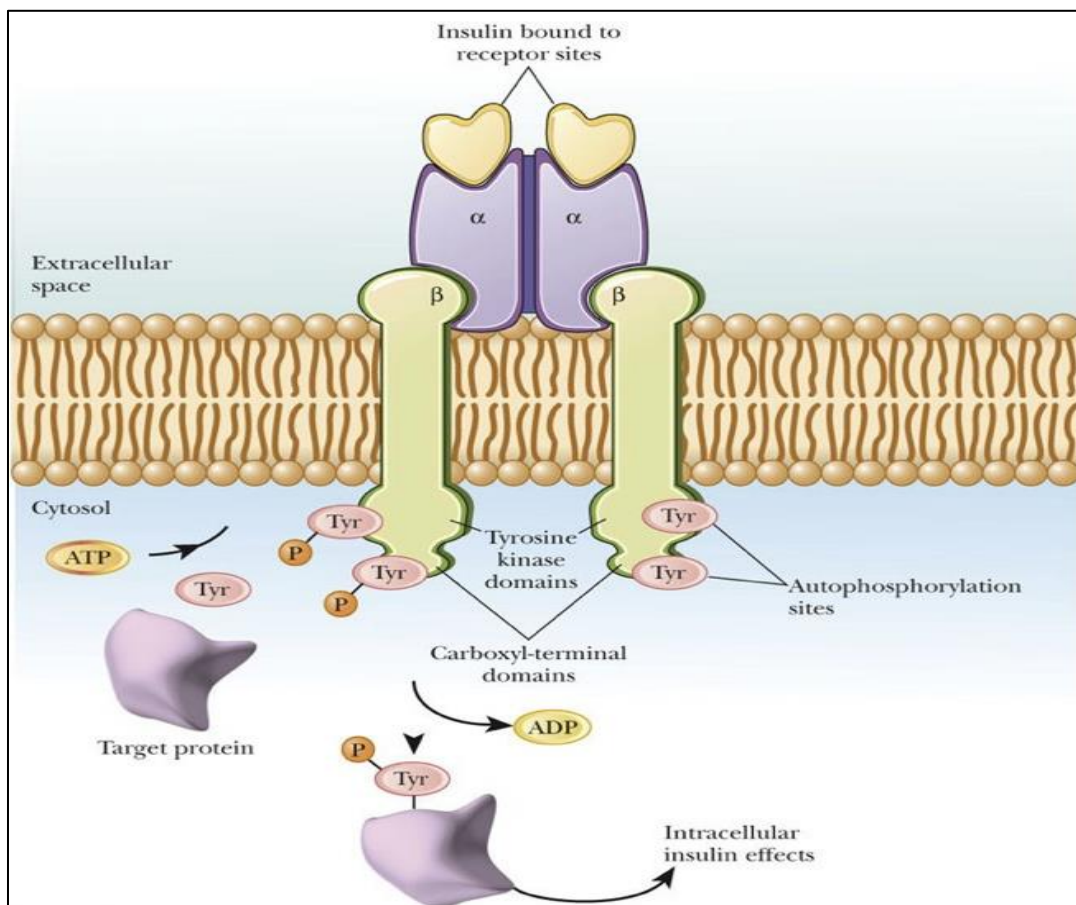


Εικόνα 1.5.2.1.Α Η αμινοξική ακολουθία των πεπτιδικών αλυσίδων της ορμόνης της ινσουλίνης. Στο σχήμα φαίνεται η σύνδεση των αλυσίδων Α και Β με δισουλφιδικούς δεσμούς.

Η ινσουλίνη συντίθεται στα β κύτταρα των νησιδίων του Langerhans στο πάγκρεας. Στα νησίδια αυτά υπάρχουν επίσης τα α κύτταρα που παράγουν γλυκαγόνη, τα δ κύτταρα που παράγουν σωματοστατίνη, τα F κύτταρα που παράγουν γκρελίνη και τα PP κύτταρα τα οποία παράγουν το παγκρεατικό πολυπεπίδιο. Τα β κύτταρα βρίσκονται σε πλειοψηφία στις νησιαδιακές δομές και κατέχουν τις κεντρικές περιοχές ενώ περιβάλλονται από άλλους τύπους κυττάρων. Η σύνθεση της ινσουλίνης πραγματοποιείται στα ριβοσώματα του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου (RER) ως μια πρόδρομη αλυσίδα αμινοξέων που ονομάζεται πρεπρο-ινσουλίνη. Μετά την απομάκρυνση του σηματοδοτικού πεπτιδίου, η προ-ινσουλίνη μεταφέρεται από το RER στο σύστημα Golgi όπου και σχηματίζονται διαλυτά εξαμερή προ-ινσουλίνης τα οποία περιέχουν ψευδάργυρο. Στη συνέχεια, το ένζυμο κονβερτάση (PC1/3) της προ-ορμόνης

το οποίο βρίσκεται εκτός του συστήματος Golgi καταλύει την παραγωγή της ώριμης ινσουλίνης και του συνδετικού πεπτιδίου (C-peptide). Ως εκ τούτου, αδρανοποιητικές μεταλλάξεις της PC1/3 προκαλούν τόσο δευτεροπαθή υπο-αδρεναλισμό όσο και διαβήτη. Στα παγκρεατικά νησίδια, η ινσουλίνη και το C- πεπτίδιο ελευθερώνονται ταυτόχρονα σε ισομοριακές ποσότητες με εξωκύτωση ως απάντηση σε μια σειρά από ερεθίσματα, συμπεριλαμβανομένης της γλυκόζης και των αμινοξέων. Η έκκριση της ινσουλίνης πραγματοποιείται με συντονισμένο παλμικό τρόπο από τα β κύτταρα με χαρακτηριστικό διφασικό πρότυπο ως ερέθισμα στην λήψη τροφής. Αρχικά, υπάρχει μια οξεία και ταχεία «πρώτη φάση» ελευθέρωσης ινσουλίνης, διάρκειας λίγων λεπτών, ακολουθούμενη από μία λιγότερο έντονη «δεύτερη φάση», που είναι μεγαλύτερης διάρκειας. Τα β-κύτταρα του παγκρέατος εκκρίνουν 0,25-1,5 μονάδες ινσουλίνης/ώρα σε κατάσταση νηστείας. Αν και σε πολύ χαμηλό επίπεδο, αυτή η βασική έκκριση καλύπτει πάνω από το 50% της συνολικής ημερήσιας παραγωγής ινσουλίνης. Η γλυκόζη είναι το κύριο ερέθισμα για την έκκριση της ινσουλίνης, αν και άλλα μακρο-θρεπτικά συστατικά, καθώς και ορμονικοί και νευρικοί παράγοντες μπορούν να διεγείρουν και να μεταβάλουν την απόκριση αυτή. Όταν η γλυκόζη εισέρχεται στα β-κύτταρα διαμέσου μιας οικογένειας υψηλής χωρητικότητας μεταφορέων γλυκόζης (GLUT 1-3, κυρίως GLUT2), φωσφορυλιώνεται από το ένζυμο γλυκοκινάση και πραγματοποιείται γλυκόλυση προς σχηματισμό ATP. Η αύξηση των επιπέδων του ATP έχει ως αποτέλεσμα το κλείσιμο ενός τύπου διαύλου καλίου, τον δίαυλο ενδοκυττάριας αποκατάστασης καλίου 6.2 (KJR6.2) στην επιφάνεια των κυττάρων οδηγώντας σε εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης. Το γεγονός αυτό ακολουθείται από άμεση εισροή ιόντων ασβεστίου στο εσωτερικό του κυττάρου ενεργοποιώντας έτσι την μετατόπιση κοκκίων ινσουλίνης στην επιφάνεια των κυττάρων και την απελευθέρωση της ορμόνης με εξωκυττάρωση. Αξίζει να αναφερθεί ότι στο μηχανισμό αυτό βασίζεται η δράση των σουλφονουλουριών (κατηγορία υπογλυκαιμικών παραγόντων) καθώς έχουν την ιδιότητα να δεσμεύονται στην στον υποδοχέα SUR1 που γειτνιάζει με τον υποδοχέα KJR6.2 προκαλώντας το κλείσιμο του δεύτερου. Η όλη διαδικασία που περιγράφηκε υποδιαιρείται σε δύο βασικά μέρη που αντιστοιχούν στην αντίχνευση των επιπέδων της γλυκόζης και την μετέπειτα έκκριση της ινσουλίνης. Η φυσιολογική λειτουργία των β κυττάρων εξαρτάται από την υψηλή ευαισθησία στην σύνδεση της γλυκόζης αλλά και την έκκριση της ινσουλίνης[17,18,19,20].

Η ινσουλίνη ασκεί τις βιολογικές της δράσεις με δέσμευση στον υποδοχέα της ινσουλίνης στην επιφάνεια των κυττάρων-στόχων. Ο υποδοχέας της ινσουλίνης είναι ένα ετεροτετραμερές το οποίο αποτελείται από δύο α - και δύο β - υπομονάδες γλυκοπρωτεϊνών που συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς (Εικόνα 1.5.2.1 B).



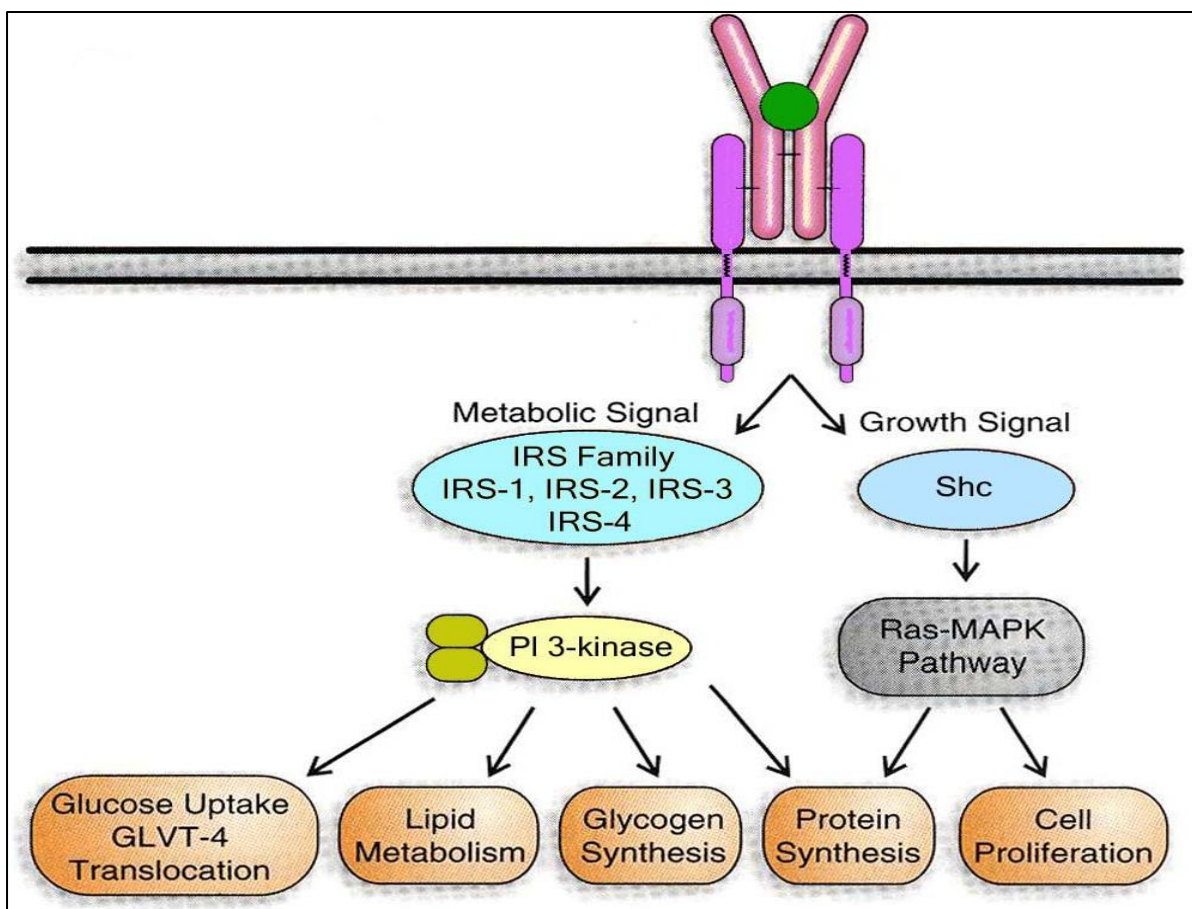
Εικόνα 1.5.2.1.B Σχηματική απεικόνιση του ετεροτετραμερούς του υποδοχέα της ινσουλίνης το οποίο αποτελείται από δύο α - και δύο β - υπομονάδες γλυκοπρωτεϊνών που συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς. Η σύνδεση της ινσουλίνης στον υποδοχέα έχει ως αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση της β - υπομονάδας προσδίδοντας δράση κινάσης τυροσίνης ενεργοποιώντας έτσι στη συνέχεια το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης.

Η ινσουλίνη συνδέεται στις εξωκυττάρια α - υπομονάδες με αποτέλεσμα την δομική μεταβολή της διαμόρφωσης επιτρέποντας στο ATP να συνδεθεί στην ενδοκυττάρια β - υπομονάδα. Η σύνδεση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση της β - υπομονάδας προσδίδοντας δράση κινάσης τυροσίνης. Στη συνέχεια λαμβάνει χώρα η φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης σε ενδοκυττάρια υποστρώματα του υποδοχέα της ινσουλίνης (IRS) τα οποία με την σειρά τους

συνδέονται σε άλλα μόρια σηματοδότησης ενεργοποιώντας έτσι το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης. Γενικά η ινσουλίνη μπορεί να θεωρηθεί ως μια ορμόνη που σηματοδοτεί την «μετά το γεύμα» διατροφική κατάσταση. Κατά την περίοδο αυτή, η ινσουλίνη είναι ζωτικής σημασίας στη ρύθμιση του κυτταρικού ενεργειακού εφοδιασμού, της ισορροπίας σε μακρο-θρεπτικά συστατικά και τη διευθέτηση των αναβολικών διαδικασιών. Η ινσουλίνη παρουσιάζει σημαντικές αναβολικές δράσεις στον ενδιάμεσο μεταβολισμό, επηρεάζοντας τον μεταβολισμό της γλυκόζης, των λιπιδίων και των πρωτεϊνών. Οι σημαντικότεροι ινσουλινο-ευαίσθητοι ιστοί είναι το ήπαρ, οι σκελετικού μύες και ο λιπώδης ιστός. Μετά την έκκριση της ινσουλίνης, το 60% αυτής απομακρύνεται στη συνέχεια από το ήπαρ με αποτέλεσμα η συγκέντρωση της ινσουλίνης στην πυλαία φλέβα που φθάνει στο ήπαρ να είναι τριπλάσια σε σχέση με αυτή που αντιστοιχεί στην περιφερική κυκλοφορία. Η ινσουλίνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ηπατικής παραγωγής της γλυκόζης αναστέλλοντας τη γλυκονεογένεση και προάγοντας την αποθήκευση γλυκογόνου. Όμοια, στα μυϊκά κύτταρα η από την ινσουλίνη μεσολαβούμενη πρόσληψη γλυκόζης ενεργοποιεί την σύνθεση και την αποθήκευση γλυκογόνου και την χρήση υδατανθράκων ως άμεση πηγή ενέργειας για την σύσπαση των μυών αντί των λιπαρών οξέων και των αμινοξέων[21].

1.5.2.2 Η ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ

Οι κύριες δράσεις της ινσουλίνης διακρίνονται γενικά σε δύο κατηγορίες : (1) στον μεταβολισμό των υδατανθράκων, λιπών και πρωτεϊνών και (2) στην ροή ιόντων και την κυτταρική ανάπτυξη, διαφοροποίηση και απόπτωση [22] (Εικόνα 1.5.2.2Α). Το κυριότερο ερέθισμα για την απελευθέρωση της ινσουλίνης είναι η γλυκόζη. Η ινσουλίνη ρυθμίζει την συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα σε συνεργασία με την γλυκαγόνη. Αυτές οι δύο ορμόνες παράγονται ενδοκρινικά στο πάγκρεας με τη διαφορά ότι η γλυκαγόνη παράγεται στα α-κύτταρα. Ο μηχανισμός δράσης τους είναι ακριβώς αντίστροφος, για αυτό μπορεί να θεωρηθεί ότι αλληλορυθμίζονται μεταξύ τους. Η ινσουλίνη έχει αναβολική δράση και η γλυκαγόνη καταβολική. Συνεπώς, είναι απαραίτητη η ισορροπία ανάμεσα στις δύο ορμόνες ώστε να εξασφαλίζεται η καλή λειτουργία του οργανισμού.



Εικόνα 1.5.2.2.A Οι κύριες δράσεις της ινσουλίνης είναι α) ο μεταβολισμός των υδατανθράκων, λιπών και πρωτεϊνών, β) η κυτταρική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμός, και γ)η διαφοροποίηση και απόπτωση των κυττάρων στόχων.

Μεταβολισμός της γλυκόζης

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η συγκέντρωση της γλυκόζης του πλάσματος διατηρείται μέσα σε ένα στενό εύρος τιμών παρά τις μεγάλες διακυμάνσεις στην παροχή και την ζήτηση θρεπτικών συστατικών. Σε μη παθοφυσιολογικές καταστάσεις, η ινσουλίνη μαζί με την κύρια αντι-ρυθμιστική της ορμόνη, την γλυκαγόνη, είναι ο κύριος ρυθμιστής του μεταβολισμού της γλυκόζης. Η ινσουλίνη εμπλέκεται σε πολυάριθμα βήματα της ρύθμισης του μεταβολισμού των υδατανθράκων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ινσουλίνη αυξάνει την πρόσληψη της γλυκόζης στους κύριους ινσουλινο-ευαίσθητους ιστούς. Η μεταφορά της γλυκόζης μέσα στο κύτταρο διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης μεσολαβείται από την οικογένεια των γλυκοζο-μεταφορέων GLUT. Ο GLUT 1 συμμετέχει στη βασική και μη ινσουλινο-εξαρτώμενη

πρόσληψη της γλυκόζης από τα κύτταρα ενώ ο GLUT 2 θεωρείται σημαντικός για την αντίχνευση της γλυκόζης από τα β κύτταρα. Ο GLUT 3 εμπλέκεται στην μη ινσουλινο-εξαρτώμενη πρόσληψη γλυκόζης στον εγκέφαλο και ο GLUT 4 είναι υπεύθυνος για την ινσουλινο-εξαρτώμενη πρόσληψη γλυκόζης τόσο στους μύες όσο και στον λιπώδη ιστό. Ο GLUT4 βρίσκεται κανονικά μέσα σε κυτταροπλασματικά κυστίδια, ωστόσο μετά τη δέσμευση της ινσουλίνης στους υποδοχείς της, μετατοπίζεται στην επιφάνεια των κυττάρων όπου και σχηματίζει διάυλο για την είσοδο της γλυκόζης. Η ινσουλίνη αυξάνει τη σύνθεση του γλυκογόνου και αναστέλλει την διάσπαση του. Ο έλεγχος του μεταβολισμού του γλυκογόνου εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση των ενζύμων που ελέγχουν την γλυκογονόλυση και σύνθεση του γλυκογόνου. Τα κύρια ένζυμα είναι το καταβολικό ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου και το αναβολικό ένζυμο συνθάση του γλυκογόνου. Η ινσουλίνη μπορεί να αυξάνει τη σύνθεση του γλυκογόνου, με την ενεργοποίηση της συνθάσης του γλυκογόνου, ενώ αναστέλλει την γλυκογονόλυση αποφωσφορυλιώνοντας την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η γλυκόλυση διεγείρεται ενώ η γλυκονεογένεση εμποδίζεται με αποφωσφορυλίωση της κινάσης του πυροσταφυλικού (PK) και της 2,6-διφωσφορικής κινάσης. Επιπλέον, η ινσουλίνη αυξάνει τη μη αναστρέψιμη μετατροπή του πυροσταφυλικού σε ακετυλ-CoA με την ενεργοποίηση του μιτοχondριακού ενζυμικού συμπλέγματος της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης. Το ακετυλ-CoA μπορεί τότε να οξειδώνεται άμεσα μέσω του τρικαρβοξυλικού κύκλου (Krebs), ή να χρησιμοποιείται για τη σύνθεση λιπαρών οξέων[21].

Μεταβολισμός λιπιδίων

Η ινσουλίνη αυξάνει το ρυθμό της λιπογένεση με αρκετούς τρόπους στο λιπώδη ιστό και το ήπαρ, ενώ παράλληλα ελέγχει το σχηματισμό και την αποθήκευση των τριγλυκεριδίων. Το κρίσιμο βήμα για την λιπογένεση είναι η ενεργοποίηση της ινσουλινο-ευαίσθητης λιποπρωτεϊνικής λιπάσης στα τριχοειδή αγγεία. Τα λιπαρά οξέα στη συνέχεια ελευθερώνονται από τα κυκλοφορούντα χυλομικρά ή από τις πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες και ενσωματώνονται στο λιπώδη ιστό. Η σύνθεση λιπαρών οξέων αυξάνεται με την ενεργοποίηση και την αυξημένη φωσφορυλίωση της καρβοξυλάσης του ακετυλο-CoA, ενώ η οξείδωση καταστέλλεται με την αναστολή της ακυλ-τρανσφεράσης της καρνιτίνης. Η λιπογένεση διευκολύνεται επίσης από την πρόσληψη της γλυκόζης, καθώς ο μεταβολισμός της από το μονοπάτι φωσφορικών πεντοζών οδηγεί στο σχηματισμό φωσφορικού νικοτιναμιδο-αδενινο

δινουκλεοτιδίου (NADPH), το οποίο είναι απαραίτητο για τη σύνθεση λιπαρών οξέων. Η σύνθεση τριγλυκεριδίων διεγείρεται από την εστεροποίηση της φωσφορικής γλυκερόλης, ενώ η διάσπαση των τριγλυκεριδίων καταστέλλεται με αποφωσφορυλίωση της ορμονο-ευαίσθητης λιπάσης. Η σύνθεση της χοληστερόλης αυξάνεται με την ενεργοποίηση και την αποφωσφορυλίωση της αναγωγάσης του υδροξυμεθυλ-γλουταρικού συνένζυμου A (HMG-CoA), ενώ η διάσπαση των εστέρων της χοληστερόλης φαίνεται να αναστέλλεται από την αποφωσφορυλίωση της εστεράσης της χοληστερόλης. Αξίζει να αναφερθεί ότι ο μεταβολισμός των φωσφολιπιδίων επηρεάζεται επίσης από την ινσουλίνη[21].

Μεταβολισμός πρωτεϊνών

Η ινσουλίνη διεγείρει την πρόσληψη των αμινοξέων από τα κύτταρα και προωθεί την πρωτεϊνοσύνθεση σε μια σειρά από ιστούς. Υπάρχουν επιδράσεις στη μεταγραφή συγκεκριμένων mRNA, καθώς και της μετάφρασής τους σε πρωτεΐνες στα ριβοσώματα. Παραδείγματα ενισχυμένης μεταγραφής mRNA περιλαμβάνουν την γλυκοκινάση και τη συνθάση των λιπαρών οξέων. Αντίθετα, η ινσουλίνη μειώνει τα mRNA που κωδικοποιούν ένζυμα του ήπατος, όπως της συνθετάσης του φωσφορικού καρβαμυλίου, η οποία είναι ένζυμο κλειδί στον κύκλο της ουρίας. Ωστόσο, η κύρια δράση της ινσουλίνης στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών είναι να αναστέλλει τη διάσπαση των πρωτεϊνών. Με τον τρόπο αυτό δρα συνεργικά με την πρωτεΐνη GH και τον ινσουλινόμορφο αυξητικό παράγοντα (IGF-I) αυξάνοντας έτσι τον πρωτεϊνικό αναβολισμό [21].

Γλυκαγόνη

Η γλυκαγόνη είναι πολυπεπτίδιο με μοριακό βάρος ~3.5 kD. Συντίθεται ως ένα μεγάλο πρόδρομο μόριο, την προ-προγλυκαγόνη, και διασπάται μέσα στα κύτταρα στη δραστική ορμόνη. Η έκκριση της διεγείρεται από την πτώση της γλυκόζης στο αίμα και από διάφορα αμινοξέα. Η έκκριση της γλυκαγόνης είναι επίσης υπό τον έλεγχο νευρικών μηχανισμών-σημάτων. Η ενεργοποίηση των αδρενεργικών ινών του συμπαθητικού αυξάνει την απελευθέρωση της γλυκαγόνης. Η γλυκαγόνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρόληψη της υπογλυκαιμίας κατά τη διάρκεια της νηστείας ανταγωνιζόμενη τις δράσεις της ινσουλίνης. Κύρια περιοχή δράσης της είναι το ήπαρ όπου συνδέεται με G-πρωτεΐνες υποδοχείς γλυκαγόνης ενεργοποιώντας την αδενυλική κυκλάση. Η σύνδεση αυτή οδηγεί στην κινητοποίηση του

γλυκογόνου και την παραγωγή γλυκόζης από μη-υδατανθρακικούς προδρόμους μέσω της γλυκονεογένεσης [23].

1.5.2.3 ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ

Τα βασικά σημεία που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης περιλαμβάνουν τον υποδοχέα της ινσουλίνης, τα πρωτεϊνικά υποστρώματα (IRS), την φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη 3 κινάση (PI3K), την Akt/πρωτεϊνική κινάση B (AKT/PKB) και την ενεργοποιούμενη από μιτογόνα πρωτεϊνική κινάση (MAPK). Τα σημεία αυτά είναι λειτουργικά σε πολλούς τύπους κυττάρων. Οι πρωτεΐνες που αναφέρθηκαν αποτελούν κύριους κόμβους σε ένα διευρυμένο δίκτυο σηματοδοτικών μονοπατιών το οποίο είναι καλά ρυθμισμένο τόσο θετικά όσο και αρνητικά.

Η σύνδεση της ινσουλίνης στην εξωκυττάρια πλευρά του υποδοχέα κινάσης τυροσίνης (IR) έχει ως αποτέλεσμα της αυτοφωσφορυλίωση του IR ο οποίος με την σειρά του φωσφορυλιώνει και στρατολογεί διάφορα υποστρώματα και πιο συγκεκριμένα, πρωτεΐνες προσαρμογείς όπως είναι οι πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια IRS. Η φωσφορυλίωση του υποδοχέα λαμβάνει χώρα σε κατάλοιπα τυροσίνης που βρίσκονται στο ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα. Ο υποδοχέας της ινσουλίνης διαθέτει παρόμοια δομή με αυτή του υποδοχέα του ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα 1 (IGF-1) και πολλών άλλων αυξητικών παραγόντων και υποδοχέων κυτταροκινών οι οποίοι φέρουν ένα κοινό εξωκυττάριο συνδέτη που ενεργοποιεί μια ενδοκυττάρια περιοχή τυροσινικής κινάσης. Τουλάχιστον εννέα υποστρώματα έχουν αναγνωριστεί για τους υποδοχείς IGF-I εκ των οποίων τέσσερα περιλαμβάνονται στην οικογένεια των IRS πρωτεϊνών (insulin-receptor substrate proteins) [24]. Οι φωσφορυλιωμένες τυροσίνες αυτών των υποστρωμάτων λειτουργούν ως θέσεις σύνδεσης για πρωτεΐνες οι οποίες φέρουν SH2 (Src-homology-2) περιοχές. Πολλές από τις SH2 πρωτεΐνες δρουν ως μόρια προσαρμογής όπως είναι και η ρυθμιστική υπομονάδα p85 της PI3K.

Η φωσφορυλίωση των IRS στη συνέχεια προκαλεί την έκθεση περιοχών στις πρωτεΐνες αυτές που μπορούν να συνδεθούν με άλλα μόρια. Ανάμεσα σε αυτά τα μόρια ανήκει και η PI3K η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης κυρίως μέσω ενεργοποίησης των καταρακτών Akt/PKB και PKCζ. Οι πρωτεΐνες IRS είναι εξαιρετικά ομόλογες. Πρόσφατες μελέτες σε κυτταρικές σειρές και knockout ποντίκια έδειξαν ότι δρουν

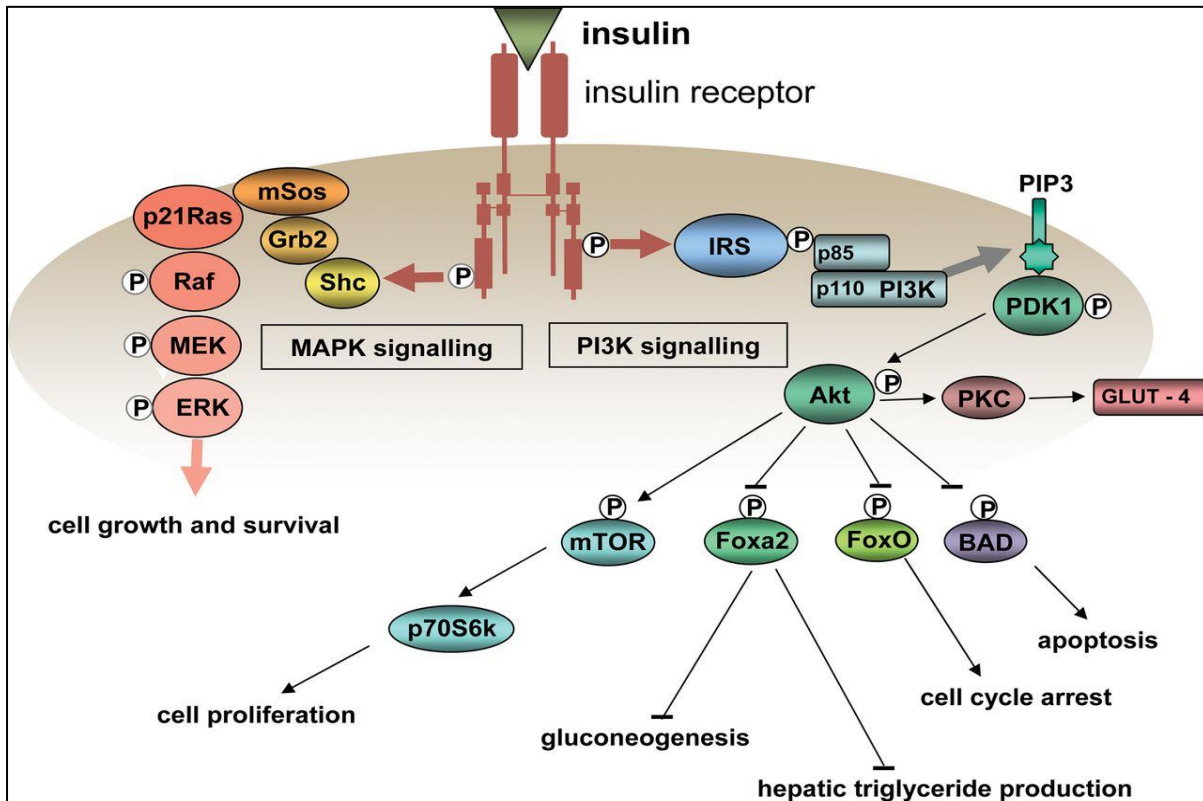
συμπληρωματικά στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης. Knockout ποντίκια για την IRS-1 παρουσιάζουν γενικευμένη προ- και μετά- γεννητική αναπτυξιακή καθυστέρηση, έλλειψη ευαισθησίας στην ινσουλίνη και μειωμένη ανεκτικότητα στην γλυκόζη [25]. Έλλειψη της IRS-2 σχετίζεται με προβληματική πρόσληψη της γλυκόζης η οποία διεγείρεται από την ινσουλίνη ενώ δεδομένα υποστηρίζουν ότι οι IRS-3 και IRS-4 δρουν ως αρνητικοί ρυθμιστές της IRS-1 [26].

Η PI3K αποτελείται από την p85 και τις καταλυτικές υπομονάδες της p110. Η στρατολόγηση της PI3K στην πλασματική μεμβράνη έχει ως αποτέλεσμα την σύνδεση της με φυσιολογικά για την πρωτεΐνη υποστρώματα όπως είναι η PtdIns(3.4.5)P2 την οποία και φωσφορυλιώνει προς σχηματισμό της PtdIns(3.4.5)P3. Τα γεγονότα αυτά διαδραματίζονται άμεσα από την στιγμή που θα συνδεθεί η ινσουλίνη στον υποδοχέα της και μέσα σε ένα λεπτό αυξάνεται σημαντικά η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της PtdIns(3.4.5)P3. Βασικός τελεστής της PtdIns(3.4.5)P3 στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης είναι η πρωτεΐνη Akt/PKB η οποία φέρει μια περιοχή ομόλογη της πλεκστρίνης στο αμινοτελικό της άκρο και μέσω αυτού συνδέεται στην PtdIns(3.4.5)P3. Η αλληλεπίδραση της PtdIns(3.4.5)P3 με την Akt/PKB δεν οδηγεί σε άμεση ενεργοποίηση της δεύτερης αλλά αντίθετα την φέρνει σε γειννίαση με άλλες κινάσες οι οποίες την φωσφορυλιώνουν στην θρεονίνη στη θέση 308 και την σερίνη στη θέση 473. Η φωσφορυλίωση αυτή οδηγεί και στην ενεργοποίηση της Akt/PKB. Η θρεονίνη 308 βρίσκεται στον πυρήνα της καταλυτικής περιοχής της πρωτεΐνης, γνωστό ως T-loop ενώ η σερίνη 473 στην καρβοξυτελική μη καταλυτική περιοχή, γνωστή ως υδρόφοβο μοτίβο. Η φωσφορυλίωση της θρεονίνης 308 πραγματοποιείται από την πρωτεΐνη PDK1 η οποία όπως και η PtdIns(3.4.5)P3 φέρει περιοχή ομόλογη της πλεκστρίνης. Η ενεργοποιημένη Akt/PKB προάγει την σύνθεση του γλυκογόνου μέσω αναστολής της GSK3, την πρωτεϊνική σύνθεση μέσω του μονοπατιού mTOR καθώς και την κυτταρική επιβίωση μέσω αναστολής διαφόρων αποπτωτικών παραγόντων όπως είναι η πρωτεΐνη Bad, οι μεταγραφικοί παράγοντες που ανήκουν στην οικογένεια Forkhead και η GSK3. Η ινσουλίνη διεγείρει την πρόσληψη της γλυκόζης στα κύτταρα του λιπώδους ιστού και στα μυϊκά κύτταρα καθώς δίνει το έναυσμα για την μετακίνηση των κυστιδίων που περιέχουν τον μεταφορέα της γλυκόζης την κυτταρική επιφάνεια. Η μετατόπιση του μεταφορέα GLUT4 στην πλασματική μεμβράνη προϋποθέτει την ενεργοποίηση του μονοπατιού Akt/PKB και την φωσφορυλίωση της CAP που μεσολαβείται από την πρωτεΐνη IR με στόχο τον σχηματισμό του συμπλόκου CAP:Cbl:CrkII. Το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης επίσης σχετίζεται με την ανάπτυξη και την μίτωση, γεγονότα τα οποία ως επί το πλείστον προκαλούνται από τον Akt

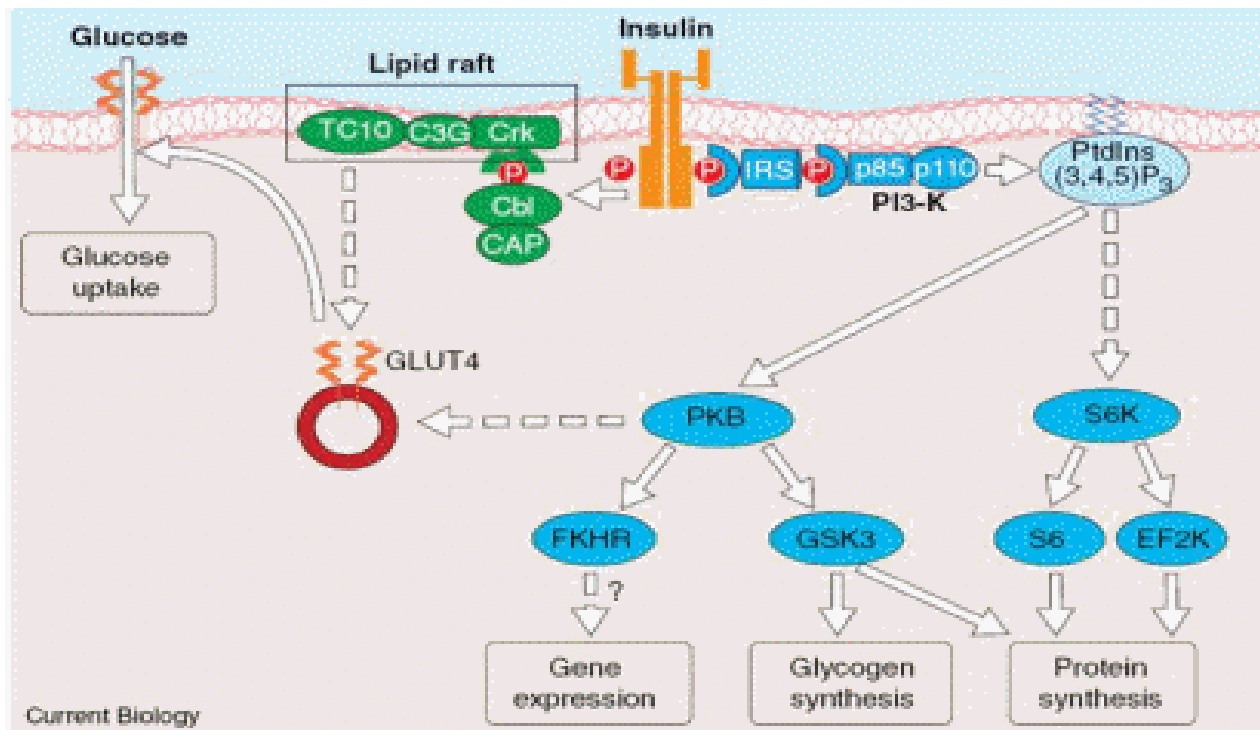
καταρράκτη και την ενεργοποίηση του μονοπατιού Ras/MAPK. Ωστόσο μπορεί να υπάρξει και αρνητικό σήμα ανάδρασης από τους καταρράκτες Akt/PKB, PKCZ, p70 S6K και MAPK με αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση της σερίνης και την απενεργοποίηση της IRS σηματοδότησης (Εικόνα 1.5.2.3 Α) [27,28,29,30,31].

Η ινσουλίνη αυξάνει την μεταφορά της γλυκόζης κυρίως στα κύτταρα του λιπώδη ιστού και τα μυϊκά κύτταρα μέσω διέγερσης της μετατόπισης του μεταφορέα της γλυκόζης από το κυτοσόλιο στην πλασματική μεμβράνη. Ο μεταφορέας GLUT4 ανιχνεύεται σε κυστίδια τα οποία ανακυκλώνονται συνεχώς μεταξύ ενδοκυττάρων περιοχών και της πλασματικής μεμβράνης. Η ινσουλίνη αυξάνει την είσοδο της γλυκόζης στους κυτταρικούς τύπους που αναφέρθηκαν κυρίως μέσω αύξησης των επιπέδων της εξωκύτωσης των κυστιδίων που μεταφέρουν την πρωτεΐνη GLUT4 ενώ παράλληλα μειώνει την εσωτερίκευσή τους [27]. Αν και οι μηχανισμοί που ελέγχουν αυτή την λειτουργία δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένοι, είναι πιθανό ότι τα κυστίδια αυτά τα οποία είναι ευαίσθητα στην ινσουλίνη να είναι παγιδευμένα σε κάποιο σημείο ενδοκυτταρικά και αυτό να σχετίζεται με το δίκτυο των μικροσωληνίσκων [28]. Φωσφορυλίωσεις οι οποίες καταλύονται από κινάσες που εξαρτώνται από τις πρωτεΐνες PtdIns(3.4.5)P₃ απελευθερώνουν τα κυστίδια από τα σημεία δέσμευσης τους επιτρέποντας έτσι την μεταφορά στην πλασματική μεμβράνη. Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι τα κυστίδια αυτά κινούνται κατά μήκος των μικροσωληνίσκων καθοδόν προς την κυτταρική επιφάνεια πιθανόν μέσω των μοριακών μηχανών κίνησης της κινεσίνης ενώ στην συνέχεια αγκυροβολούν και συντήκονται με την πλασματική μεμβράνη επιτρέποντας την εξωκυτάρια έκθεση του μεταφορέα GLUT4. Επιπλέον είναι πιθανό και ο κυτοσκελετός της ακτίνης να διαδραματίζει κάποιο σημαντικό ρόλο στην μετακίνηση του GLUT4. Η ινσουλίνη προκαλεί αναδιαμόρφωση των φλοιωδών νηματίων της ακτίνης σε σημεία ακριβώς κάτω από την πλασματική μεμβράνη προκαλώντας ρυτίδωση της μεμβράνης. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανόν να αντανακλά τον πολυμερισμό και τον αποπολυμερισμό της ακτίνης με συμμετοχή των λαμελιποδίων και/ή τον σχηματισμό φιλοποδίων. Η κυτοχλασίνη D η οποία αποπολυμερίζει την ακτίνη καθώς και οι τοξίνες λατρουνκουλίνη A και B (latrunculin A and B) που συνδέονται μονομερώς στην ακτίνη αναστέλλουν την δράση της ινσουλίνης επί της ακτίνης και άρα την μετακίνηση του GLUT4. Εκτός από την μεταφορά των κυστιδίων, η ινσουλίνη μπορεί να επηρεάζει ακόμα την αγκυροβόληση και την σύντηξη των κυστιδίων στην πλασματική μεμβράνη. Κατά την αγκυροβόληση και σύντηξη των κυστιδίων υπό φυσιολογικές συνθήκες η πρωτεΐνη VAMP2 (v-

SNARE) αλληλεπιδρά με την συνταξίνη 4 της μεμβράνης του κυστιδίου [27]. Αν και οι αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών SNARE θεωρούνται απαραίτητες για την λειτουργία αυτή καμία από τις SNARE πρωτεΐνες δεν φαίνεται να είναι ο άμεσος στόχος της ινσουλίνης. Ωστόσο οι βοηθητικές των SNARE πρωτεΐνες, Synip και Munc18c ενδέχεται να σχετίζονται με την αγκυροβόληση και σύντηξη των GLUT4 κυστιδίων με τρόπο που εξαρτάται από την ινσουλίνη αλλά όχι από την PI3K.



Εικόνα 1.5.2.3.Α Σηματοδοτικοί καταρράκτες που εκκινούν από την ενεργοποίηση του υποδοχέα της ινσουλίνης.



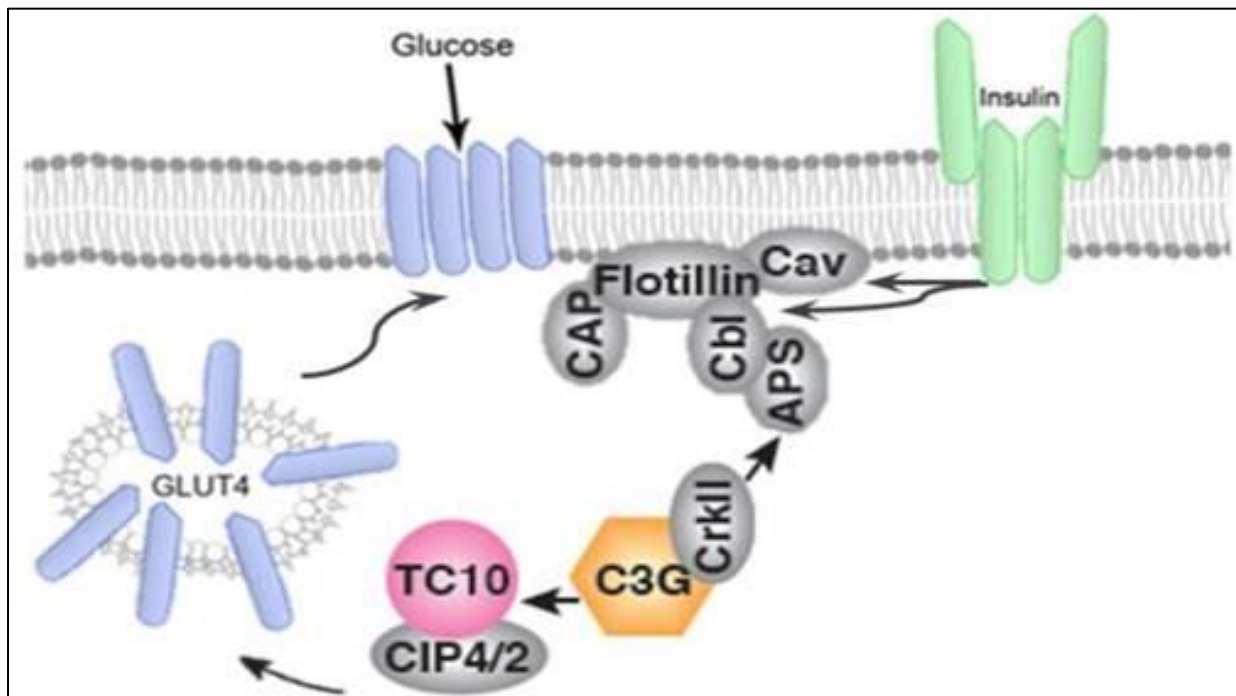
Εικόνα 1.5.2.3.B Σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης.

1.5.2.4 ΑΛΛΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ

Το μονοπάτι CAP/Cbl/TC10

Στη διαδικασία μεταφοράς της γλυκόζης συμμετέχουν και άλλες σηματοδοτικές οδοί που δρουν παράλληλα με αυτή της PI3K. Ένα τέτοιο μονοπάτι είναι το CAP/Cbl/TC10. Το μονοπάτι αυτό αποκλίνει στο επίπεδο της κινάσης του υποδοχέα της ινσουλίνης το οποίο μεσολαβεί την φωσφορυλίωση τυροσίνης του πρωτο-ογκογονιδίου Cbl μέσω μιας αλληλουχίας γεγονότων που δεν περιλαμβάνουν τις IRS. Στο σημείο αυτό απαιτείται η στρατολόγηση της πρωτεΐνης APS η οποία περιέχει περιοχές SH2 και PH στη β-υπομονάδα του υποδοχέα της ινσουλίνης. Η APS αλληλεπιδρά μέσω των περιοχών αυτών με φωσφοτυροσίνες στον βρόχο ενεργοποίησης του υποδοχέα της ινσουλίνης. Η πρωτεΐνη που συνδέεται με την Cbl στρατολογείται παράλληλα με την Cbl προς το σύμπλεγμα του υποδοχέα της ινσουλίνης-APS. Μετά την απεμπλοκή της CAP/Cbl από τον υποδοχέα της ινσουλίνης, η περιοχή CAP-S6H συνδέεται με την φλοτιλίνη σε λιπιδιακές σχεδίες της κυτταρικής μεμβράνης που περιέχουν καβεολίνη. Αμέσως μετά την σύνδεση του συμπλόκου CAP/Cbl με την φλοτιλίνη η φωσφορυλιωμένη στην Cbl τυροσίνη παρουσιάζει μια θέση αναγνώρισης η οποία προσελκύει το σύμπλοκο CrkII-C3G στη λιπιδιακή

σχεδία. Η CrkII σε συγκεκριμένες θέσεις φωσφορυλίωσης της Cbl. Η C3G αποτελεί παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανυλίου για την πρωτεΐνη TC10 η οποία είναι μέλος των RhoGTPασών. Η TC10 ρυθμίζει τον κυτταρικό σκελετό της ακτίνης και διάφοροι τελεστές της έχουν προταθεί ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην μετακίνηση του γλυκοζομεταφορέα GLUT 4[32].

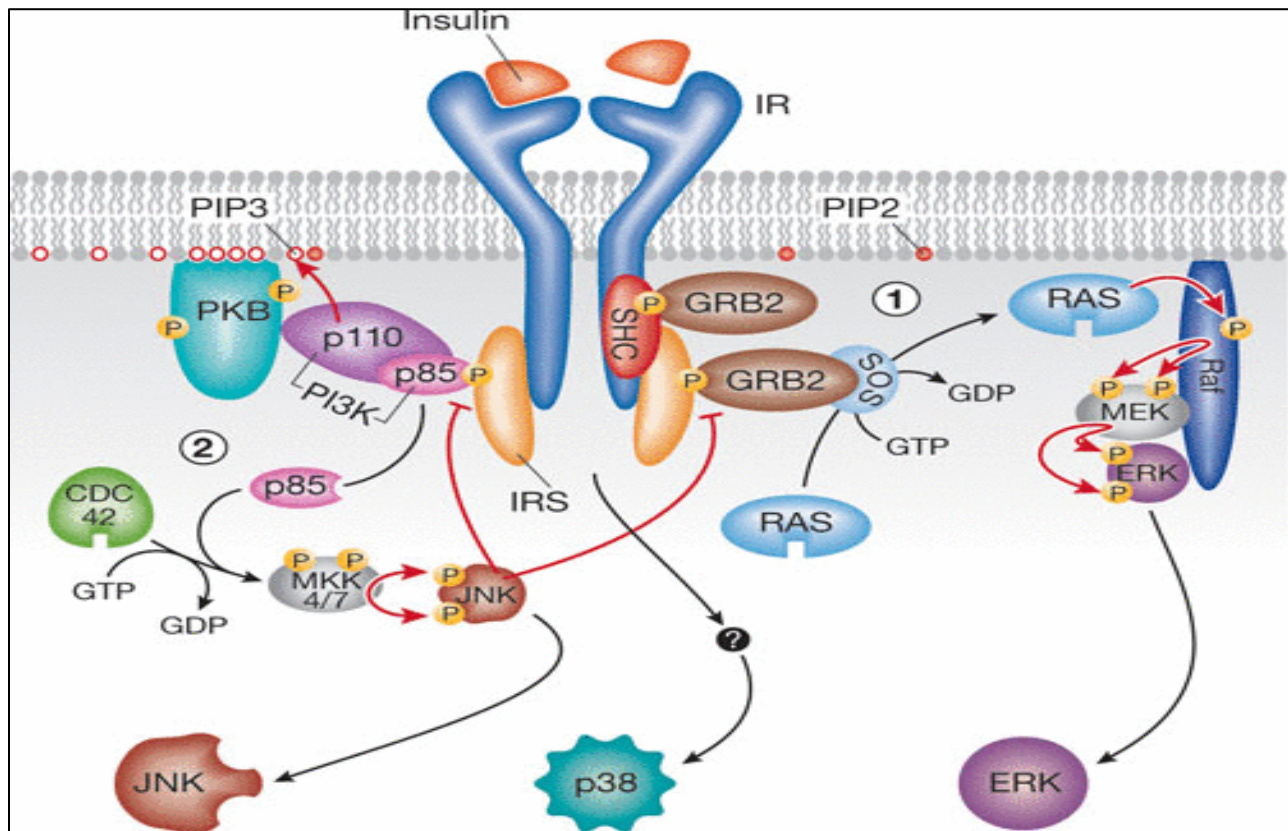


Εικόνα 1.5.2.4.A Το σηματοδοτικό μονοπάτι CAP/Cbl/TC10 το οποίο δρα παράλληλα με αυτό της PI3K για την στρατολόγηση του GLUT 4.

Το μονοπάτι Ras-p38/MAPK

Ένα άλλο σηματοδοτικό μονοπάτι το οποίο εκκινεί από τα υποστρώματα IRS το μονοπάτι Ras/MAPK. Το μονοπάτι αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερη σημασία στην κυτταρική ανάπτυξη και την μιτογένεση. Η Grb-2 περιέχει και αυτή περιοχές SH3 πρόσδεσης. Η πρωτεΐνη αυτή συνδέει μεταξύ τους πρωτεΐνες και μια από αυτές τις πρωτεΐνες είναι η SOS η οποία αποτελεί παράγοντα ανταλλαγής GDP/GTP. Η αλληλεπίδραση αυτή καθιστά την SOS ικανή για ενεργοποίηση του μονοπατιού Ras/MAPK. Η ενεργοποίηση της SOS έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της Raf-1 η οποία με την σειρά της εκκινεί έναν καταρράκτη που οδηγεί σε διαδοχική φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της MEK η οποία με την σειρά της φωσφορυλιώνει τις

εξωκυτταρικά ρυθμιζόμενες κινάσες ERK1 και ERK2. Οι ενεργοποιημένες ERK φωσφορυλιώνουν πολλαπλούς στόχους που μεσολαβούν τις μιτογόνες δράσεις του μονοπατιού Ras/MAPK και τις αυξητικές δράσεις της ινσουλίνης. Το μονοπάτι Ras/MAPK μπορεί επίσης να μεσολαβείται από τους υποδοχείς της ινσουλίνης μέσω του υποστρώματος SHC. Αξίζει να αναφερθεί ότι το μονοπάτι MAPK αποτελεί μια οδό διέγερσης της συνθάσης του γλυκογόνου. Με τον τρόπο αυτό, το μονοπάτι MAPK έχει την δυνατότητα να αλληλεπιδρά με τις μεταβολικές οδούς σηματοδότησης ωστόσο το μονοπάτι αυτό δεν είναι απαραίτητο για την διέγερση της μεταφοράς γλυκόζης δεν θεωρείται σχετιζόμενο με τις μεταβολικές δράσεις της ινσουλίνης[33].



Εικόνα 1.5.2.4.B Το σηματοδοτικό μονοπάτι Ras-p38/MAPK και η εκκίνηση του από την ενεργοποίηση των υποστρωμάτων IRS.

1.5.2.5 ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ

Η ενεργοποίηση ή αναστολή του σηματοδοτικού καταρράκτη της ινσουλίνης υπόκειται σε μια δυναμική ισορροπία μεταξύ διεγερτικών και ανασταλτικών μηχανισμών. Οι ανασταλτικοί παράγοντες αντιπροσωπεύουν την φυσιολογική λειτουργία της δράσης της ινσουλίνης κατά την προσαρμογή των οργανισμών και την διατήρηση της ομοιοστασίας τους ενώ όταν δεν είναι ισορροπημένοι μπορεί να οδηγήσει σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις και ανάπτυξη ινσουλινο-αντίστασης.

Αρχικά, η αναστολή της σηματοδότησης της ινσουλίνης μπορεί να λάβει χώρα στον υποδοχέα της καθώς ο υποδοχέας αποτελεί το πρώτο κρίσιμο στοιχείο του δικτύου αυτού. Η αναστολή του υποδοχέα μπορεί να συμβεί εξαιτίας πολλών παραγόντων και ένας από αυτούς είναι η συνεχής διέγερση των υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας με αποτέλεσμα την εξασθένιση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη. Επιπλέον, ως αναστολείς μπορεί να δράσουν διάφορες πρωτεΐνες αλλά και μοριακοί μηχανισμοί. Χρόνια έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις ινσουλίνης έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του αριθμού των υποδοχέων της ινσουλίνης λόγω εσωτερίκευσής τους και άρα την μετατόπιση της καμπύλης δράσης-απόκρισης στην ινσουλίνη. Ανασταλτική δράση σε επίπεδο υποδοχέα έχει επίσης ο παράγοντας διαφοροποίησης του πλάσματος 1 (PC-1). Η πρωτεΐνη αυτή είναι μια μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη η οποία έχει δράση πυροφωσφατάσης και δρα ως εγγενής αναστολέας της κινάσης τυροσίνης του υποδοχέα της ινσουλίνης. Η αλληλεπίδραση με τον PC-1 έχει ως αποτέλεσμα την αποτροπή της γεινίασης των β-υπομονάδων που απαιτείται για την τρανσφοσφορυλίωση. Μελέτη των πολυμορφισμών του γονιδίου του PC-1 δείχνουν ότι σχετίζονται με την ανάπτυξη παιδικής παχυσαρκίας αλλά και ΣΔ τύπου 2. Ανασταλτική δράση μπορεί να έχουν ακόμη και οι πρωτεΐνες Grb οι οποίες μπορούν να συνδέονται με μόρια φωσφοτυροσίνης πάνω στον υποδοχέα της ινσουλίνης και να μεταβάλλουν την δράση της κινάσης τυροσίνης του υποδοχέα. Ο φυσιολογικός ρόλος των πρωτεϊνών ατών δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένος και οι δράσεις τους μπορεί να είναι ιστοειδικές με δράση είτε διεγερτική είτε ανασταλτική σε ότι αφορά την σηματοδότηση της ινσουλίνης[34].

Αναστολή του μονοπατιού της ινσουλίνης μπορεί επίσης να συμβεί και σε επίπεδο υποστρωμάτων του υποδοχέα. Οι ενδογενείς φωσφατάσες των πρωτεϊνών φωσφοτυροσίνης (PTPάσες) έχουν την ικανότητα να φωσφορυλιώνουν μόρια τυροσίνης των β-υπομονάδων του

υποδοχέα της ινσουλίνης καθώς και μόρια πρόσδεσης των υποστρωμάτων του υποδοχέα με αποτέλεσμα τη μείωση της μεταγωγής σήματος της ινσουλίνης. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι οι PTP-1B και η φωσφατάση LAR. Υπερέκφραση της PTP-1B σε μύες ποντικών έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση αντίστασης στην ινσουλίνη με μειωμένη ικανότητα αυτοφωσφορυλίωσης των υποδοχέων της. Άλλος αρνητικός μηχανισμός της ρύθμισης του σήματος της ινσουλίνης αποτελεί η φωσφορυλίωση της σερίνης-θρεονίνης. Η φωσφορυλίωση της σερίνης ελαττώνει τη δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης του υποδοχέα της ινσουλίνης και μειώνει την σύζευξη του υποδοχέα με τα υποστρώματα IRS. Οι πρωτεϊνική κινάση C(PKC) είναι κινάσες σερίνης-θρεονίνης με πολλαπλά υποστρώματα. Η φωσφορυλίωση σερίνης-θρεονίνης των IRS παρεμποδίζει την ικανότητα τους να συνδέονται στον υποδοχέα της ινσουλίνης αλλά και με την PI3K με συνέπεια την μείωση της ευαισθησίας του μονοπατιού της PI3K. Επιπλέον, οι η ινσουλίνη ενεργοποιεί άτυπες PKC κινάσες όπως οι PKCζ μέσω του μονοπατιού PI3K το οποίο είναι σε θέση να φωσφορυλιώνει και να απευαισθητοποιεί τις IRS. Στο ίδιο πλαίσιο ανήκει και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων α (TNF-α) ο οποίος είναι κυτοκίνη που παράγεται στα κύτταρα του ανοσοποιητικού, του λιπώδους ιστού αλλά και τον μυϊκό ιστό. Ο TNF-αεπάγει την φωσφορυλίωση της σερίνης της IRS1 μειώνοντας έτσι την ικανότητά της να φωσφορυλιώνεται από την κινάση τυροσίνης του υποδοχέα της ινσουλίνης ρυθμίζοντας κατά συνέπεια αρνητικά την σηματοδότηση της ινσουλίνης. Εκτός από τον TNF-α η ινσουλίνη ενεργοποιεί ακόμη τις πρωτεΐνες JNK. Οι πρωτεΐνες αυτές επάγουν αυξημένη δραστηριότητα κινάσων σερίνης έναντι πολλών ενδοκυττάρων υποστρωμάτων. Η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών αυτών από την ινσουλίνη υποδεικνύει αρνητική ανατροφοδότηση του μονοπατιού της ινσουλίνης από την ίδια την ορμόνη. Έχει δειχθεί ότι οι JNK επάγονται σε καταστάσεις απόκρισης σε στρες ενοχοποιώντας τις σε καταστάσεις αντίστασης στην ινσουλίνη, στο μεταβολικό σύνδρομο καθώς και στον ΣΔ τύπου 2. Άλλοι παράγοντες με ανασταλτική δράση στη σηματοδότηση της ινσουλίνης είναι ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ ο οποίος ενισχύει την φωσφορυλίωση της σερίνης των IRS1 και η IκΒ κινάση[34].

1.5.2.6 ΙΣΤΟ-ΕΙΔΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ

Ο μυϊκός ιστός, ο λιπώδης ιστός και το ήπαρ αποτελούν τους κατεξοχήν ινσουλινο-ευαίσθητους ιστούς τον οργανισμό. Η ινσουλίνη ρυθμίζει την συνολική ομοιοστασία των καυσίμων του σώματος μέσω εξειδικευμένων δράσεων σε διάφορους ιστούς στόχους. Το είδος και η φύση των βιολογικών αυτών δράσεων διαφοροποιείται σημαντικά ανάλογα με το είδος του ιστού και οι

διαφοροποιήσεις αυτές δεν οφείλονται τόσο στον τρόπο της σηματοδότησης της ινσουλίνης αλλά στα διαφορετικά συστήματα τέλεσης των διαφοροποιημένων κυττάρων στόχων. Τόσο ο μυϊκός και ο λιπώδης ιστός όσο και το ήπαρ είναι όργανα που μεταξύ άλλων είναι υπεύθυνα για την αποθήκευση και οξείδωση των ενεργειακών καυσίμων του οργανισμού και διαδραματίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην γενικότερη ρύθμιση του μεταβολισμού.

Σκελετικοί μύες

Το μεγαλύτερο ποσοστό πρόσληψης γλυκόζης η οποία διεγείρεται από την ινσουλίνη παραλαμβάνεται από τους σκελετικούς μύες. Η μεταφορά της γλυκόζης διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης διεκπεραιώνεται μέσω των γλυκοζομεταφορέων GLUT. Συνολικά έχουν ταυτοποιηθεί 13 μέλη της οικογένειας GLUT/SLC2. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι ιδιαίτερα συντηρημένες και οι διαμεμβρανική τους διάταξη εξυπηρετεί τον σχηματισμό ενός διαύλου με στόχο την διευκολυνόμενη διάχυση των μονοσακχαριτών στο εσωτερικό του κυττάρου. Κάθε ισομορφή γλυκοζομεταφορέα ο οποίος διαθέτει ειδικό ρόλο στο μεταβολισμό της γλυκόζης εξαρτάται από την μορφή της έκφρασης στον ιστό, την εξειδίκευση και την συγγένεια προς το υπόστρωμα, την κινητική της μεταφοράς αλλά και την ρύθμιση της έκφρασης του ανάλογα με τις φυσιολογικές συνθήκες που επικρατούν. Οι κύριες ισομορφές που μεσολαβούν την μεταφορά της γλυκόζης μετά από διέγερση από την ινσουλίνη είναι οι GLUT1 και 4. Σε κύτταρα τα οποία δεν έχουν διεγερθεί από την ινσουλίνη επικρατεί κυρίως ο γλυκοζομεταφορέας GLUT 1 ο οποίος μεσολαβεί την ενδοκυττάρια πρόσληψη της γλυκόζης μετά από ταχύτατη φωσφορυλίωση της εξωκινάσης. Στα μη διεγερμένα κύτταρα, ο GLUT 4 συμμετέχει ελάχιστα στη μεταφορά της γλυκόζης. Περισσότερο από το 90% του μεταφορέα αυτού βρίσκεται στην ενδοκυττάρια περιοχή της μεμβράνης. Η μεταφορά της γλυκόζης στο εσωτερικό του κυττάρου μετά από διέγερση με ινσουλίνη απαιτεί την στρατολόγηση του GLUT 4. Η διαδικασία αυτή είναι καθοριστική στην από την ινσουλίνη ρυθμιζόμενη ενδοκυττάρια πρόσληψη της γλυκόζης σε όλους τους περιφερικούς ιστούς-στόχους. Ο GLUT 4 θεωρείται ο σημαντικότερος γλυκοζομεταφορέας ο οποίος κατευθύνεται και εξαρτάται από την σηματοδότηση της ινσουλίνης σε ιστούς όπως ο σκελετικός, ο λιπώδης και ο καρδιακός. Ωστόσο πρέπει να αναφερθεί ότι ο GLUT 4 βρίσκεται σε μη διεγερμένους ιστούς σε βασικά επίπεδα (basic GLUT 4). Η βασική αυτή εντόπιση σχετίζεται με την ισορροπία ταχείας ενδοκύτωσης και της αργής ανακύκλωσης του γλυκοζομεταφορέα. Η μεταφορά και διακίνηση

των κυστιδίων του GLUT 4 περιλαμβάνει την ακτίνη και τους μικροσωληνίσκους του κυτταρικού σκελετού. Η ινσουλίνη διεγείρει την κυτταροσκελετική αναδιαμόρφωση με αποτέλεσμα την εμφάνιση των φλοιωδών προεκτάσεων της β-ακτίνης οι οποίες αγκυρώνονται στη μεμβράνη του κυττάρου. Η αναδιαμόρφωση αυτή βρίσκεται υπό τον έλεγχο των μικρών G-πρωτεϊνών της οικογένειας Rho, Rac και Rab. Πρωτεΐνες των μικροσωληνίσκων όπως είναι η δυνείνη και η κινεσίνη έχουν απομονωθεί μαζί με τον GLUT 4. Αναδιαμόρφωση της ακτίνης ή/και διάσπαση των μικροσωληνίσκων έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της μετατόπισης του GLUT 4 και άρα την μεταφορά της γλυκόζης στο εσωτερικό του κυττάρου[35].

Το μονοπάτι το οποίο συνδέει την μεταγωγή σήματος της ινσουλίνης και την ενδοκυττάρια πρόσληψη της γλυκόζης δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ακόμα. Σε ένα μεγάλο βαθμό η ενεργοποίηση αυτή εξαρτάται από την αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα της ινσουλίνης καθώς και την φωσφορυλίωση του υποστρώματος IRS1 και της PI3K. Η ενεργοποίηση της PI3K έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή των PI(3,4,5)P3 που με την σειρά τους ενεργοποιούν την PDK1. Η PDK1 ενεργοποιεί δύο διακριτά μονοπάτια τα οποία συμβάλλουν στην μετατόπιση του GLUT 4. Παράλληλα, ο ενεργοποιημένος υποδοχέας της ινσουλίνης δίνει το έναυσμα για την ενεργοποίηση του μονοπατιού CAP/Cbl/TC10 που αναφέρθηκε προηγουμένως και ρυθμίζει τον κυτταρικό σκελετό.

Ωστόσο, στον σκελετικό μυ κατά την μυϊκή συστολή μπορεί να παρατηρηθεί μεταφορά γλυκόζης ανεξάρτητα από την διέγερση της ινσουλίνης. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να εμφανιστεί χωρίς καμία μεταβολή στην συγκέντρωση της ινσουλίνης του ορού και φαίνεται να σχετίζεται με την ενδοκυττάρια αύξηση του 5'AMP.

Λιπώδης ιστός

Όπως είναι γνωστό, ο λιπώδης ιστός αποτελεί τον κυριότερο χώρο αποθήκευσης ενέργειας για τον οργανισμό με την μορφή τριγλυκεριδίων. Η συσσώρευση λίπους στα λιποκύτταρα (λιποκύτταρα) του λιπώδους ιστού εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ λιπογένεσης και λιπόλυσης. Η λιπογένεση αναφέρεται στην πρόσληψη λιπαρών οξέων ενώ η λιπόλυση στην οξείδωση αυτών. Στον λιπώδη ιστό, η ινσουλίνη αυξάνει την διαθεσιμότητα της γλυκερόλης αλλά και την σύνθεση τριγλυκεριδίων αυξάνοντας έτσι την πρόσληψη της γλυκόζης. Η διαδικασία αυτή επιτελείται μέσω ενεργοποίησης γλυκολυτικών και λιπογενετικών ενζύμων. Η ινσουλίνη ενεργοποιεί την Akt/PKB μέσω φωσφορυλίωσης. Υψηλά επίπεδα της Akt

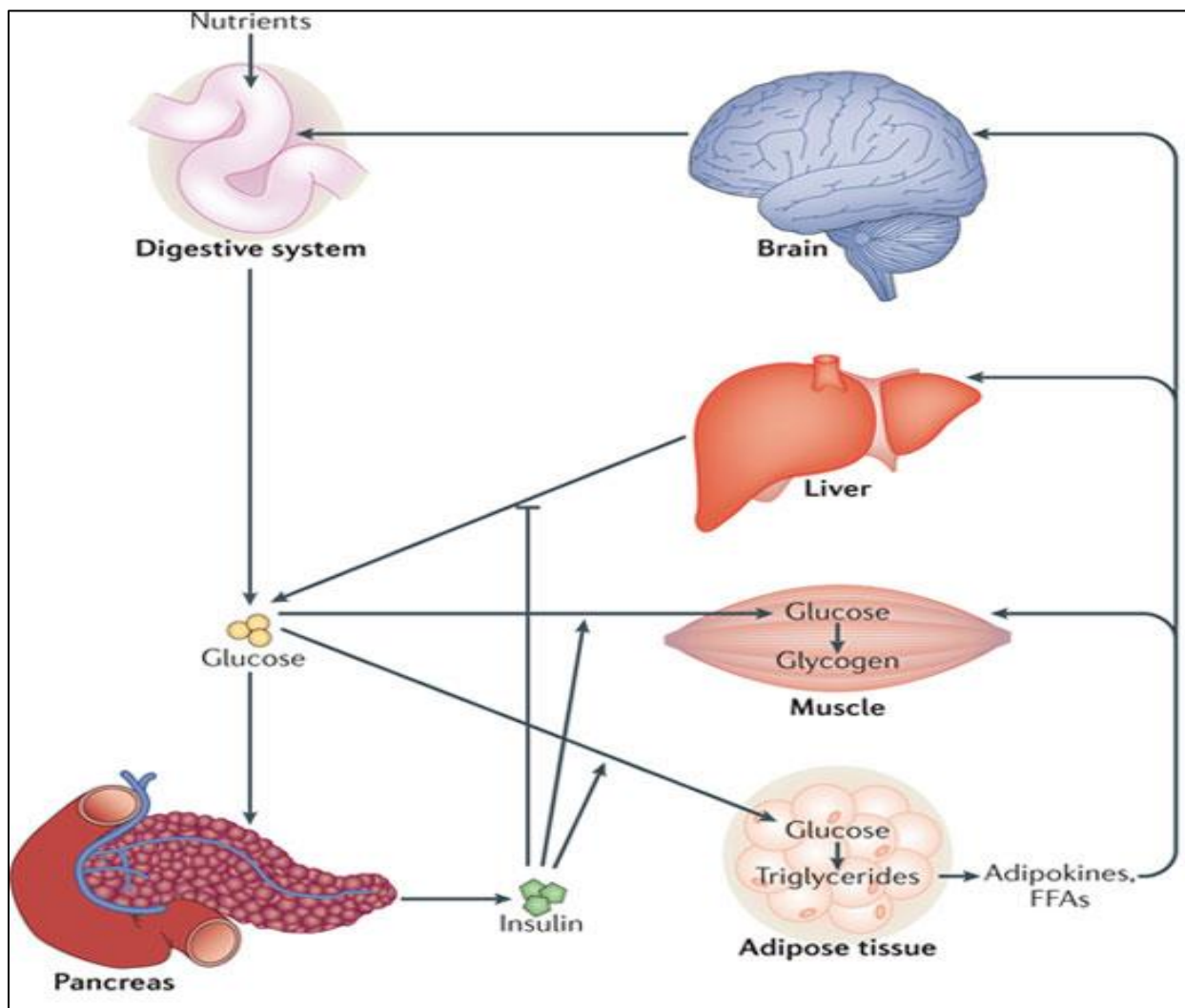
σχετίζονται με υψηλά επίπεδα λιπογένεσης *in vitro* σε καλλιέργειες 3T3-L1. Επιπλέον, η ινσουλίνη επάγει την έκφραση των γονιδίων δύο κεντρικών λιπογόνων πρωτεϊνών, της συνθάσης λιπαρών οξέων (FAS) και της SREBP-1. Η λιπόλυση, αντίστοιχα, είναι στενά ρυθμισμένη ώστε να συμβαδίζει η προσαρμογή των μεταβολικών καυσίμων με τις ενεργειακές ανάγκες. Σε κατάσταση νηστείας, παρατηρείται ενίσχυση της λιπόλυσης προς παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA). Μετά την λήψη τροφής η λιπόλυση μειώνεται και τα λιποκύτταρα δρουν ως αποθήκες τριγλυκεριδίων. Η λιπόλυση υπόκειται σε ορμονικό έλεγχο από λιπολυτικές και αντιλιπολυτικές ορμόνες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι κατεχολαμίνες οι οποίες έχουν λιπολυτικό ρόλο με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν οι περιλιπίνες οι οποίες εντοπίζονται στα λιποσταγονίδια των λιποκυττάρων και είναι απαραίτητες για την εναπόθεση και κινητοποίηση των τριγλυκεριδίων [36].

Ήπαρ

Ο ηπατικός μεταβολισμός σχετίζεται με την διέγερση του σχηματισμού του γλυκογόνου καθώς και την ρύθμιση της γλυκονεογένεσης. Οι διαδικασίες αυτές μεσολαβούνται από την ινσουλίνη και θεωρούνται βασικοί παράγοντες στην από το ήπαρ παραγωγή της γλυκόζης. Σε μεγάλο βαθμό η δράση της ινσουλίνης στο ήπαρ σχετίζεται με την μεταγραφή γονιδίων. Μετά από διέγερση από την ινσουλίνη, το μεγαλύτερο ποσοστό της προσλαμβανόμενης γλυκόζης στον άνθρωπο αποθηκεύεται με την μορφή γλυκογόνου. Η ινσουλίνη προωθεί την ενεργοποίηση της συνθάσης του γλυκογόνου η οποία προσθέτει γλυκοσυλ-ομάδες στις αυξανόμενες αλυσίδες των πολυσακχαριτών και έτσι το γλυκογόνο αποθηκεύεται στους μύες, τα λιποκύτταρα και το ήπαρ. Η ικανότητα της ινσουλίνης να διεγείρει την συνθάση του γλυκογόνου εξαρτάται από την σηματοδότηση μέσω της ενεργοποιημένης Akt/PKB. Ένας από τους μηχανισμούς που εμπλέκεται είναι η αδρανοποίηση της GSK3.

Η παραγωγή γλυκόζης στο ήπαρ εξαρτάται από της αντιρυθμιστικές ως προς την ινσουλίνη ορμόνες γλυκαγόνη, κατεχολαμίνες και γλυκοκορτικοειδή σε συνθήκες νηστείας. Μετά την λήψη τροφής ή μετά από εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης, η ηπατική παραγωγή γλυκόζης καταστέλλεται ισχυρά από την ινσουλίνη ως συνέπεια της αναστολής της γλυκογονόλυσης και της γλυκονεογένεσης. Η γλυκονεογένεση ρυθμίζεται από τα γονίδια του ενζύμου φωσφοενολ-πυροσταφυλική καρβοξυκινάση (PEPCK) και του ενζύμου γλυκόζο-6-φωσφατάση (G-6-Ραση).

Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην ηπατική παραγωγή γλυκόζης διαδραματίζουν ακόμη οι υπατικοί υποδοχείς X που εμπλέκονται στο μεταβολισμό λιπιδίων και υδατανθρακών καθώς και οι πρωτεΐνες PGC-1 οποίες ρυθμίζουν τις PEPCK και G-6-Pασες ως πρωτεΐνες-συνενεργοποιητές. Κύριος γλυκοζομεταφορέας στην ηπατική παραγωγή γλυκόζης είναι ο GLUT 2 ο οποίος διαθέτει υψηλή ικανότητα μεταφοράς γλυκόζης. Η αυξημένη παραγωγή γλυκόζης στο ήπαρ αποτελεί μια σημαντική παράμετρο της υπεργλυκαιμίας στο ΣΔ και για το λόγο αυτό αποτελεί στόχο φαρμακευτικής παρέμβασης.



Εικόνα 1.5.2.6.A Σχηματική απεικόνιση της δράσης της ινσουλίνης στους κύριους ινσουλινο-ευαίσθητους ιστούς μετά την διέγερση της έκκρισής της από το πάγκρεας.

1.5.3 ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΣΤΗΝ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ινσουλίνη αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της ομοιοστασίας της γλυκόζης στον οργανισμό με βασικότερους ιστούς στόχους τον ηπατικό, τον λιπώδη και τον μυϊκό. Το ήπαρ είναι το όργανο παραγωγής της γλυκόζης ενώ ο λιπώδης και πολύ περισσότερο ο μυϊκός καταναλώνουν την γλυκόζη. Για την διατήρηση της ομοιοστασίας αυτής είναι απαραίτητη η διατήρηση μια λεπτής ισορροπίας μεταξύ των οργάνων αυτών. Οι δράσεις της ινσουλίνης αφορούν στον μεταβολισμό των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων. Ο μεταβολισμός των υδατανθράκων περιλαμβάνει την α) αύξηση της μεταφοράς της γλυκόζης διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης στο μυϊκό λιπώδη ιστό και αύξηση της γλυκόλυσης, β) αύξηση της σύνθεσης του γλυκογόνου στο μυϊκό και λιπώδη ιστό και στο ήπαρ, και γ) μείωση της διάσπασης του γλυκογόνου και της γλυκονεογένεσης στο ήπαρ. Ο μεταβολισμός των λιπιδίων περιλαμβάνει την μείωση της λιπόλυσης στον λιπώδη ιστό με αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων των ελεύθερων λιπαρών οξέων στο αίμα καθώς και την αύξηση της δραστηριότητας της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης. Αντίστοιχα, ο μεταβολισμός των πρωτεϊνών αφορά στην αύξηση της μεταφοράς των αμινοξέων και της σύνθεσης πρωτεϊνών στο μυϊκό, λιπώδη ιστό και ήπαρ και στη μείωση της αποδόμησης των πρωτεϊνών. Επιπλέον, η ινσουλίνη προκαλεί αγγειοδιαστολή και αύξηση της ροής του αίματος στους ιστούς ώστε να διευκολύνεται απορρόφηση των συστατικών της λαμβανόμενης τροφής μέσω αύξησης του NO (μονοξειδίου του αζώτου).

Ο όρος ινσουλινο-ευαισθησία χαρακτηρίζει την ικανότητα της ινσουλίνης να επιτελέσει τον ορμονικό της ρόλο. Η βιολογική δράση της ινσουλίνης δεν περιορίζεται αποκλειστικά και μόνο στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, αλλά επηρεάζει ταυτόχρονα το μεταβολισμό των λιπιδίων και των πρωτεϊνών. Η μείωση στην αποτελεσματικότητα της δράσης της ινσουλίνης οδηγεί στη λεγόμενη ινσουλινο-αντίσταση. Με τη πάροδο του χρόνου και εφόσον η ελαττωματική της λειτουργία, συνδυαστεί με ταυτόχρονη βλάβη στην έκκριση της, τότε δίνεται η δυνατότητα εγκατάστασης του ΣΔ τύπου 2. Ο οργανισμός για να καλύψει την ανικανότητα δράσης της ινσουλίνης και με σκοπό να διατηρήσει την ομοιόσταση της γλυκόζης αντιδρά με υπερινσουλιναμία.

Ο όρος ινσουλινο-αντίσταση χρησιμοποιήθηκε αρχικά, προκειμένου να περιγράψει μεμονωμένα περιστατικά διαβητικών ασθενών που απαιτούσαν δόσεις εξωγενούς ινσουλίνης για την επίτευξη ευγλυκαιμίας. Μιας και η ινσουλίνη που χορηγούνταν τότε προερχόταν από βοοειδή, η

παρατηρούμενη ινσουλινο-αντίσταση στην πλειοψηφία των ασθενών αυτών ήταν δευτερογενούς αιτιολογίας, προκαλούνταν, δηλαδή, από αντισώματα. Στις μέρες μας, ωστόσο, η ινσουλινο-αντίσταση από μία σπάνια επιπλοκή της θεραπείας του Σακχαρώδους Διαβήτη, αναγνωρίζεται πλέον ως ένα συστατικό διαφόρων διαταραχών στις οποίες συγκαταλέγονται

- Η πλειοψηφία των περιπτώσεων Σακχαρώδους Διαβήτη Τύπου II,
- Καταστάσεις που προκαλούν δευτερογενώς ινσουλινο-αντίσταση όπως παχυσαρκία, στρες, λοιμώξεις, ουραιμία, μεγαλακρία, υπερέκκριση γλυκοκορτικοειδών και εγκυμοσύνη,
- Διαταραχές που, ως ένα βαθμό, προκαλούνται από την ινσουλινο-αντίσταση (Στεφανιαία Νόσος, Μεταβολικό Σύνδρομο, υπέρταση, Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών), Σύνδρομα αντίστασης στην ινσουλίνη (σύνδρομο τύπου B), σπάνιες κληρονομούμενες διαταραχές (σύνδρομο Donohue) και διάφορες μορφές λιποδυστροφίας.

1.5.4 ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΣΤΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΟ ΣΔ ΤΥΠΟΥ 2

Καθόλα τα στάδια του ΣΔ τύπου 2 παρατηρούνται διαταραχές στις μεταβολικές οδούς της δράσης της ινσουλίνης που ήδη αναφέρθηκαν.

Η σύνδεση της ινσουλίνης με τον υποδοχέα της τόσο στα μυϊκά όσο και στα ηπατικά κύτταρα ασθενών με ΣΔ τύπου 2 είναι φυσιολογική ή ελάχιστα μειωμένη. Στο γονίδιο του υποδοχέα της ινσουλίνης δεν έχουν βρεθεί δομικές μεταβολές ενώ η μελέτη της κινάσης τυροσίνης αποκάλυψε ότι η μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου οφείλεται σε επίκτητες αλλαγές και όχι γενετικές. Ο μοριακός μηχανισμός περιλαμβάνει ενεργοποίηση από τα ελεύθερα λιπαρά οξέα της πρωτεϊνικής κινάσης C η οποία με την σειρά της ενεργοποιεί μια κινάση σερίνης. Η κινάση σερίνης επάγει την φωσφορυλίωση της PI3K παρεμποδίζοντας έτσι την μεταγωγή του σήματος της ινσουλίνης.

Σε ότι αφορά τον μεταβολισμό των υδατανθρακών, η ινσουλινοστίσταση έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της μεταφοράς γλυκόζης διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης στο μυϊκό και λιπώδη ιστό. Αξίζει να αναφερθεί ότι σε λιποκύτταρα ασθενών με ΣΔ τύπου 2 παρουσιάζεται έως και 80% μείωση της έκφρασης των γλυκοζομεταφορέων GLUT 4. Ακόμη παρατηρείται μείωση στην γλυκόλυση και την οξειδωση της γλυκόζης, μείωση της σύνθεσης γλυκογόνου και ανεπαρκής καταστολή της ενδογενούς παραγωγής γλυκόζης στο ήπαρ η οποία μπορεί να αποδοθεί σε αντίσταση του ήπατος στην ινσουλίνη, διαταραχή της έκκρισης της ινσουλίνης, αύξηση της έκκρισης της γλυκαγόνης, αύξηση των κυκλοφορούντων ελεύθερων λιπαρών οξέων

και των υποστρωμάτων της γλυκονεογένεσης. Στον λιπώδη ιστό παρατηρείται μείωση της καταστολής της λιπόλυσης, αύξηση της οξειδωσης των ελεύθερων λιπαρών οξέων, ανεπαρκής κάθαρση των τριγλυκεριδίων από την κυκλοφορία και μειωμένη σύνθεση λιπαρών οξέων και τριγλυκεριδίων.

Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην ινσουλινο-αντίσταση διαδραματίζει η αύξηση των παραγόμενων κυτοκινών και άλλων φλεγμονωδών παραγόντων. Σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις αντίστασης στην ινσουλίνη όπως είναι η παχυσαρκία και ΣΔ τύπου 2 η αύξηση του λιπώδους ιστού έχει ως αποτέλεσμα την τοπική συσσώρευση ενεργοποιημένων μακροφάγων τα οποία εκφράζουν προφλεγμονώδη γονίδια, εκκρίνουν κυτοκίνες όπως τον TNF- α και επηρεάζουν την ενδοκυττάρια σηματοδότηση της ινσουλίνης. Οι παραγόμενες κυτοκίνες έχουν την ικανότητα να περνούν στην κυκλοφορία του αίματος και δρουν σε απομακρυσμένα σημεία-στόχους συμβάλλοντας στην ενίσχυση της ινσουλινο-αντίστασης. Η παρατεταμένη φλεγμονή έχει συνδεθεί με την ινσουλινο-αντίσταση και ενέχεται άμεσα στην μη φυσιολογική λειτουργία των β -κυττάρων του παγκρέατος[37].

1.5.5 ΣΥΝΔΡΟΜΑ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ ΣΤΗΝ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ ΚΑΙ ΛΙΠΟΔΥΣΤΡΟΦΙΕΣ

Γνώση για την γενετική βάση του διαβήτη έχει επίσης αποκτηθεί από την μελέτη σπάνιων συνδρόμων που σχετίζονται με αντίσταση στην ινσουλίνη. Τα σύνδρομα αυτά χαρακτηρίζονται βιοχημικά από υπερινσουλιναμία και αντίσταση στην ινσουλίνη στον λιπώδη ιστό, τους μύες και το ήπαρ. Το γονίδιο του υποδοχέα της ινσουλίνης θεωρήθηκε ένας λογικός υποψήφιος παράγοντας για την εξήγηση της σοβαρής υπερινσουλιναμίας που περιγράφεται σε τέτοιους ασθενείς. Η πιο σοβαρή μορφή αντίστασης στην ινσουλίνη είναι ο λεπρεχανισμός (leprechaunism) (Donahue syndrome) που ονομάστηκε έτσι από την δυσμορφία που εμφανίζεται στα βρέφη με αυτή την ασθένεια. Οι ασθενείς επίσης μπορεί να παρουσιάσουν ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης. Το σύνδρομο αυτό προκύπτει από μεταλλάξεις του γονιδίου του υποδοχέα της ινσουλίνης. Τα άτομα με το σύνδρομο αυτό σπάνια επιβιώνουν μετά το πέρας του δεύτερου έτους της ζωής τους [38]. Το σύνδρομο Rabson-Mendenall χαρακτηρίζεται από υπερπλασία της επίφυσης (pineal hyperplasia), μελανίζουσα ακάνθωση (acanthosisnigricans), επιτάχυνση της ανάπτυξης και οδοντική δυσπλασία. Μεταλλάξεις στον υποδοχέα της ινσουλίνης οδηγούν σε ελλειπή ενεργοποίηση του υποδοχέα [39].

Οι λιποδυστροφίες χαρακτηρίζονται από μη κανονική ρύθμιση της αποθήκευσης του λίπους. Στην περίπτωση αυτή ο λιπώδης ιστός εναποτίθεται εσφαλμένα στο μυϊκό ιστό και το ήπαρ και όχι στις συνήθεις υποδόριες περιοχές. Η γενικευμένη συγγενής λιποδυστροφία (Berardinelli-Seip syndrome) καταλήγει σε απώλεια υποδόριου λίπους και ηπατομεγαλία και δευτερογενώς σε μη κανονική εναπόθεση του λίπους και του γλυκογόνου. Μέχρι τώρα έχουν ενοχοποιηθεί δύο γονίδια: το γονίδιο *BSCL2* το οποίο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11 και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη σειρίνη (seipin), αναπόσπαστο κομμάτι του ενδοπλασματικού δικτύου, και το γονίδιο *AGPAT2* το οποίο κωδικοποιεί ένα ενζυμο που συμμετέχει στην σύνθεση των γλυκεροφωσfolιπιδίων [40].

Άλλες μορφές της λιποδυστροφίας προκύπτουν από μεταλλάξεις στα γονίδια *LMNA* και *PPARG*. Το γονίδιο *LMNA* αρχικά αναγνωρίστηκε μέσω αναλύσεων σύνδεσης, και ματίζεται για να παραχθούν δύο πρωτεΐνες, οι λαμινίνη Α και λαμινίνη C οι οποίες αποτελούν μέρος του πυρηνικού φακέλου, υπεύθυνος για την κίνηση από και προς τον πυρήνα [41]. Ίσως η πιο γνωστή από τις λαμινοπάθειες (laminopathies) είναι η οικογενής μερική λιποδυστροφία (Dunnigan syndrome). Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον το γεγονός ότι ο λιπώδης ιστός χάνεται στα άκρα όπως και σε άλλες μορφές λιποδυστροφιών αλλά διατηρείται στο λαιμό και το πρόσωπο. Σχετιζόμενες παθήσεις του ενδοκρινικού συστήματος περιλαμβάνουν πολυκυστικές ωθήκες, υπερανδρογοναιμία (hyperandrogenism) και υπερλιπιδαιμία. Ο υποδοχέας PPAR-γ (peroxisome proliferator activated receptor γ) είναι ένας πυρηνικός ορμονικός υποδοχέας ο οποίος εκφράζεται κυρίως στον λιπώδη ιστό και δρα ως αισθητήρας του λίπους ενώ επάγει την ενεργοποίηση καταρρακτών μεταγραφικών γεγονότων που οδηγούν σε αυξημένη ευαισθησία στην ινσουλίνη και την διαφοροποίηση των λιποκυττάρων. Μεταλλάξεις στο γονίδιο του υποδοχέα PPARγ καταλήγουν στην παραγωγή μιας κατατετμημένης πρωτεΐνης η οποία είναι ανίκανη να συνδεθεί κατάλληλα με μόρια (ligands) σηματοδότησης. Ομόζυγες μεταλλάξεις οδηγούν σε σοβαρή αντίσταση έναντι της ινσουλίνης ενώ ετερόζυγες μεταλλάξεις παρουσιάζουν ένα πιο ήπιο φαινότυπο.

1.6 ΑΛΛΟΙ ΕΙΔΙΚΟΙ ΤΥΠΟΙ ΣΔ

1.6.1 ΜΟΝΟΓΟΝΙΔΙΑΚΟΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

Μερικές από τις πιο πειστικές αποδείξεις ότι η κληρονομική διακύμανση μπορεί να προκαλέσει απορρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης του αίματος προέρχονται από κλινικές και γενετικές περιγραφές περιπτώσεων μονογονιδιακού διαβήτη περιλαμβάνοντας τον διαβήτη ωριμότητας (maturity-onset diabetes, MODY), σύνδρομα ανθεκτικότητας στην ινσουλίνη, μιτοχονδριακό διαβήτη και τον νεογνικό διαβήτη. Αν και εμφανίζονται σπάνια τα σύνδρομα αυτά παρέχουν ένα πλαίσιο για την κατανόηση και την διερεύνηση του πολύπλοκου γενετικού υποβάθρου του διαβήτη τύπου 2.

1.6.2 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

Ο μιτοχονδριακός διαβήτης είναι μια άλλη σπάνια παραλλαγή μονογονιδιακού διαβήτη. Η μητρική κληρονόμηση του διαβήτη και της κώφωσης προκαλείται από μετάλλαξη που οδηγεί σε αλλαγή της αλανίνης σε γουανίνη στο γονίδιο που κωδικοποιεί για το tRNA της λευκίνης. Το ελάττωμα αυτό οδηγεί σε αναποτελεσματική οξειδωτική φωσφορυλίωση.

1.6.3 ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΩΝ ΝΕΟΓΝΩΝ

Ο νεογνικός διαβήτης ο οποίος συνήθως εκδηλώνεται στις πρώτες μέρες ή μήνες της ζωής, μπορεί να είναι παροδικός (επίλυση σε διάστημα 12 εβδομάδων) ή μόνιμος. Οι περισσότερες περιπτώσεις παροδικού νεογνικού σακχαρώδη διαβήτη (transient neonatal diabetes mellitus, TNDM) προκύπτουν από μεταλλάξεις εντυπώματος (imprinting mutations) των γονιδίων ZAC και HYNAI του χρωμοσώματος 6q [42]. Το είδος αυτού του νεογνικού διαβήτη συνήθως υποχωρεί στην παιδική ηλικία αλλά συνδέεται με αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης διαβήτη τύπου 2 στην ενήλικη ζωή. Ο μόνιμος νεογνικός διαβήτης (Permanent neonatal diabetes mellitus, PNDM) παραδοσιακά αντιμετωπίζεται με ινσουλίνη και έχει πρόσφατα συσχετισθεί με μεταλλάξεις ενεργοποίησης στο γονίδιο KCNJ11 το οποίο κωδικοποιεί τα ευαίσθητα στο ATP κανάλια καλίου των νησίδων, Kir6 [43].

1.6.4 ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΩΡΙΜΟΤΗΤΑΣ ΠΟΥ ΕΝΦΑΝΙΖΕΤΑΙ ΣΤΟΥΣ ΝΕΟΥΣ (MODY)

Ο συγκεκριμένος τύπος διαβήτη περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1960 ως το μοναδικό είδος μη ινσουλινο-εξαρτώμενου, αυτοσωμικού διαβήτη σε λεπτούς, νεαρούς ενήλικες (συνήθως <25 ετών), οι οποίοι δεν ήταν επιρρεπείς σε κετοξέωση [44]. Επομένως είναι διακριτός από τον διαβήτη τύπου 2 όταν υπάρχει οικογενειακό ιστορικό, την εκδήλωση διαβήτη σε μικρές ηλικίες και την απουσία παχυσαρκίας. Το σύνδρομο αυτό αντιπροσωπεύει το 1-2% των περιπτώσεων διαβήτη, αν και ο διαβήτης ωριμότητας σε νέους αφορά στο 5% των περιπτώσεων διαβήτη στην Ευρώπη [45]. Με την χρήση προσεγγίσεων σύνδεσης και υποψηφίων γονιδίων, οι ερευνητές έχουν εντοπίσει 6 διαφορετικά γονίδια που σχετίζονται με τον MODY, αν και περίπου το 10% των ασθενών με τον συγκεκριμένο τύπο διαβήτη δεν έφεραν καμία ταυτοποιήσιμη γενετική μετάλλαξη (μια κατάσταση που καλείται MODY X). Παρά τις διαφορές που παρατηρούνται στην κλινική εικόνα και την απόκριση στη θεραπεία, τα έξι σύνδρομα MODY μοιράζονται τρία χαρακτηριστικά: α) έρχονται ως αποτέλεσμα μεταλλαγμένων γονιδίων τα οποία εκφράζονται στα β-κύτταρα του παγκρέατος, β) τα γονίδια αυτά εκφράζουν πυρηνικούς παράγοντες μεταγραφής (με σημαντική εξαίρεση αυτό του γονιδίου της γλυκοκινάσης), γ) οι μεταλλάξεις αυτές έχουν ως αποτέλεσμα σημαντική απώλεια της λειτουργίας των β παγκρεατικών κυττάρων με επακόλουθη επιρροή της παραγωγής της ινσουλίνης. Το σύνδρομο MODY1 αναγνωρίστηκε μέσω μελέτης σύνδεσης μιας αμερικανικής οικογένειας (linkage study) [46]. Το σύνδρομο αυτό οδηγεί σε σοβαρή, προοδευτική δυσλειτουργία των β-κυττάρων και άρα την εξάρτηση από την ινσουλίνη. Το σύνδρομο MODY1 είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων του γονιδίου HNF4A του χρωμοσώματος 20 το οποίο επηρεάζει την ανάπτυξη και την λειτουργία των ανθρώπινων β παγκρεατικών κυττάρων. Το σύνδρομο αυτό αποτελεί την τρίτη πιο συχνή υποπερίπτωση του συνδρόμου MODY και αριθμεί 31 μεταλλάξεις σε 40 οικογένειες μέχρι και σήμερα.

Το σύνδρομο MODY2 αντιπροσωπεύει το 20% των συνολικών περιπτώσεων συνδρόμου MODY. Ενώ τα υπόλοιπα σύνδρομα τύπου MODY οφείλονται σε μεταλλάξεις που αφορούν σε πυρηνικούς μεταγραφικούς παράγοντες, το σύνδρομο MODY2 οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου της γλυκοκινάσης (GCK) που εδράζεται στο χρωμόσωμα 7p. Η γλυκοκινάση είναι υπεύθυνη για την φωσφορυλίωση της γλυκόζης και τον έλεγχο των τιμών περιορισμού κατά το πρώτο στάδιο της γλυκόλυσης. Το ένζυμο αυτό λειτουργεί ως αισθητήρας της γλυκόζης για τα β παγκρεατικά κύτταρα και ρυθμίζει την παραγωγή της ινσουλίνης. Μεταλλάξεις απενεργοποίησης του συγκεκριμένου γονιδίου έχουν ως αποτέλεσμα ήπια, σταθερή και δια βίου

υπεργλυκαιμία νηστείας (fasting hyperglycemia) καθώς τα άτομα αυτά στερούνται έναν αποτελεσματικό αισθητήρα της γλυκόζης. Τα επίπεδα έκκρισης της ινσουλίνης σε ασθενείς με σύνδρομο τύπου MODY2 είναι παρόμοια με αυτά ατόμων που δεν φέρουν την μετάλλαξη, αν και τα επίπεδα αυτά παρατηρούνται σε περιπτώσεις όπου ανιχνεύονται υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης [47]. Στην περίπτωση αυτή σπάνια απαιτείται θεραπεία ενώ η εμφάνιση μικροαγγειακής νόσου είναι ασυνήθιστη. Όπως προβλέπεται με βάση την παθοφυσιολογία, οι ασθενείς με GCK μεταλλάξεις δεν αποκρίνονται στην ινσουλίνη ή σε υπογλυκαιμικούς παράγοντες που χορηγούνται από το στόμα επειδή μειώνεται η ενδογενής παραγωγή ινσουλίνης ως απόκριση σε εξωγενή θεραπεία. Θετική εμφανίζεται η χρήση GCK ενεργοποιητών σε προκαταρκτικές μελέτες σε ζώα.

Το σύνδρομο MODY 3 είναι η πιο κοινή υποπερίπτωση του συνδρόμου MODY, αριθμώντας 193 μεταλλάξεις που καταγράφηκαν σε 373 οικογένειες. Ο διαβήτης συνήθως αναπτύσσεται στην πρώιμη ενήλικη ζωή, ωστόσο μπορεί να εμφανιστεί και αργότερα κατά την διάρκεια της ζωής. Οι ασθενείς χάνουν προοδευτικά την φυσιολογική λειτουργία των β-κυττάρων και οι απαιτήσεις σε χορήγηση ινσουλίνης είναι χαμηλές, τελικά όμως η εξάρτηση από την ινσουλίνη είναι αναπόφευκτη. Το σύνδρομο αυτό έρχεται ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων του γονιδίου HNF1A (TCF1), το οποίο επηρεάζει βασικά βήματα της μεταφοράς, του μεταβολισμού της γλυκόζης αλλά και του μιτοχondριακού μεταβολισμού. Παθήσεις του αμφιβληστροειδούς και νεφροπάθεια εμφανίζονται συχνά σε περιπτώσεις συνδρόμου MODY 3 σε αντίθεση με την μακροαγγειακή νόσο που δεν εμφανίζεται.

Το σύνδρομο MODY 4 προκύπτει από ετερόζυγες μεταλλάξεις του γονιδίου που κωδικοποιεί των προαγωγέα της ινσουλίνης (insulin promoter factor 1 (IPF1 ή PDX1)), ένα μεταγραφικό παράγοντα που ρυθμίζει την μεταγραφή του γονιδίου της ινσουλίνης καθώς και την ανάπτυξη του παγκρέατος και των νησίδων. Ομόζυγες μεταλλάξεις του εξονίου 1 του IPF1 συντελούν στη απλασία του παγκρέατος [48].

Η υποπερίπτωση MODY 5 του συνδρόμου MODY είναι πιο συχνή από ότι είχε αρχικά υπολογιστεί και αποτελεί την μοναδική περίπτωση που συνδέεται με ανωμαλίες της νεφρικής λειτουργίας. Το σύνδρομο αυτό αναγνωρίστηκε μετά από γενετικό έλεγχο από μια ιαπωνική ομάδα η οποία εντόπισε μια μη νοηματική μετάλλαξη (nonosense) στο γονίδιο HNF1B (TCF2). Το γονίδιο HNF1B εκφράζεται κυρίως στο πάγκρεας, το ήπαρ και τα νεφρά. Ο διαβήτης, όπως ήδη αναφέρθηκε προκύπτει τόσο από την αντίσταση του ήπατος στην ινσουλίνη όσο και από

την απώλεια β-κυττάρων. Η δυσλειτουργία των β-κυττάρων είναι πιο σοβαρή στην περίπτωση του MODY 5 από ότι σε αυτή του MODY 3 ενώ έχει παρατηρηθεί και κετοξέωση [49]. Οι ασθενείς αυτοί συνήθως απαιτούν θεραπεία με ινσουλίνη και δεν ανταποκρίνονται σε σουλφονουλουρίες. Οι μεταλλάξεις HNF1B έχουν συσχετισθεί με νεφρική δυσλειτουργία, προβλήματα του ουρογεννητικού συστήματος, μη φυσιολογική ηπατική λειτουργία και υπερουριχαιμία (hyperuricemia) [50].

Τέλος, το σύνδρομο MODY 6 προκύπτει από μεταλλάξεις του γονιδίου NEUROD1 (BETA2) το οποίο είναι απαραίτητο για την παγκρεατική ανάπτυξη και τη μεταγραφή του γονιδίου της ινσουλίνης. Οι ασθενείς αυτοί αναπτύσσουν μετριώς σοβαρή και προοδευτική απώλεια της λειτουργίας των β-κυττάρων. Το σύνδρομο MODY 6 θεωρείται εξαιρετικά σπάνιο και είναι λίγες οι βιβλιογραφικές αναφορές σε αυτό.

1.7 ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΚΑΙ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

Το μεταβολικό σύνδρομο αποτελεί έναν όρο «ομπρέλα» για το σύνολο των μεταβολικών διαταραχών που αναπόφευκτα σχετίζονται με την αθηρωμάτωση και την καρδιαγγειακή νόσο. Βασικοί παράμετροι του συνδρόμου αυτού αποτελούν η παχυσαρκία, κυρίως η κεντρική ή σπλαχνική, η δυσλιπιδαιμία, η υπέρταση και ο σακχαρώδης διαβήτης. Κοινός παρονομαστής των μεταβολικών αυτών διαταραχών είναι αδιαμφισβήτητη η ανοχή των περιφερικών ιστών (κυρίων του μυϊκού και του λιπώδους) στην φυσιολογική δράση της ινσουλίνης. Η ινσουλينو-αντίσταση δεν αποτελεί αυτή καθαυτή νόσο ωστόσο θεωρείται η κύρια μεταβολική διαταραχή που αυξάνει δραματικά τον κίνδυνο εμφάνισης των παθοφυσιολογικών συνεπειών που απαρτίζουν το μεταβολικό σύνδρομο και συνδέεται αιτιολογικά με αυτές. Πρέπει να αναφερθεί ότι εκτός των κύριων συνιστωσών του μεταβολικού συνδρόμου υπάρχει επιπλέον μια σειρά άλλων διαταραχών οι οποίες συνδέονται με το σύνδρομο αυτό και είναι: η υπερουριχαιμία, το λιπώδες ήπαρ, η υπνική άπνοια, το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, η αυξημένη πηκτικότητα του αίματος κ.α.. Οι διαταραχές αυτές δεν ορίζουν το μεταβολικό σύνδρομο ωστόσο συνδέονται με αυτό με κοινό σημείο αναφοράς την ινσουλينو-αντίσταση. Η εμφάνιση του μεταβολικού συνδρόμου λαμβάνει χώρα κυρίως όταν γενετικώς επιρρεπή άτομα είναι υπέρβαρα. Παράγοντες όπως η ανθυγιεινή διατροφή και η έλλειψη σωματικής άσκησης αυξάνουν την συχνότητα εμφάνισης μεταβολικού συνδρόμου. Ήδη το 25% του αμερικανικού πληθυσμού εκτιμάται ότι

παρουσιάζει μεταβολικό σύνδρομο. Σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 ο επιπολασμός του μεταβολικού συνδρόμου αγγίζει το 92% [51].

Το μεταβολικό σύνδρομο δεν παρουσιάζει διακριτά διαγνωστικά συμπτώματα. Η κλινική ταξινόμηση του μεταβολικού συνδρόμου προτάθηκε από την Αμερικανική επιτροπή ειδικών (NCEP) και έχει ως στόχο την διευκόλυνση του προσδιορισμού του συνδρόμου στην κλινική πράξη. Η προσέγγιση του NCEP λαμβάνει υπόψη την κεντρική παχυσαρκία πρωταρχική αιτία του μεταβολικού συνδρόμου, καθώς έτσι εκκρίνονται κυτοκίνες και κυρίως η πρωτεΐνη TNFα που επιδρά στον υποδοχέα της ινσουλίνης και συμβάλλει στην δημιουργία ινσουλινοαντίστασης. Επιπρόσθετα, η αυξημένη απελευθέρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA) επί κοιλιακής παχυσαρκίας οδηγεί αφενός μεν σε αυξημένη σύνθεση VLDL από το ήπαρ με αποτέλεσμα αύξηση παραγωγής των αθηρωγόνων μικρών πυκνών LDL και μείωση της HDL και αφ' ετέρου σε λιπώδη διήθηση των μυών με αποτέλεσμα ανταγωνισμό στην σταφυδική δράση της ινσουλίνης και δευτερογενώς ανάπτυξη ινσουλινο-αντίστασης. Η θεραπεία του μεταβολικού συνδρόμου περιλαμβάνει την βελτίωση της βασικής υποκείμενης μεταβολικής διαταραχής, δηλαδή της αντίστασης των περιφερικών ιστών στην δράση της ινσουλίνης. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την αλλαγή του τρόπου ζωής (ελάττωση του σωματικού βάρους και μέτρια καθημερινή σωματική άσκηση) και ενδεχομένως με φάρμακα (π.χ. γλιταζόνες) καθώς και με την αντιμετώπιση των παραγόντων κινδύνου που συνυπάρχουν (υπέρταση, δυσλιπιδαιμία, κυρίως μείωση της LDL, διαβήτης)[51].

Συνοπτικά λοιπόν, ο ΣΔ διαβήτης αποτελεί μια σύνθετη, πολυπαραγοντική ασθένεια η οποία επηρεάζει ένα όλο και αυξανόμενο αριθμό ατόμων κατατάσσοντας την σε έναν από τους σημαντικότερους κινδύνους για την ανθρώπινη ζωή. Τις τελευταίες δεκαετίες πολυάριθμες μελέτες έριξαν φως στους μηχανισμούς που ευθύνονται για την εμφάνιση της παθοφυσιολογικής αυτής κατάστασης, ενώ μεγάλη προσπάθεια καταβάλλεται στην εύρεση νέων, αποτελεσματικών και καινοτόμων θεραπειών. Ωστόσο, δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως οι μηχανισμοί (γενετικοί, μοριακοί, περιβαλλοντικοί κ.α.) που ευθύνονται για την εμφάνιση της ασθένειας ενώ απαιτείται βελτίωση των ήδη υπάρχοντων θεραπευτικών πρωτοκόλλων στοχεύοντας στην βελτίωση της ποιότητας των ασθενών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] American Diabetes Association, *Diab. Care* 29(Suppl. 1) (2006) S43–S48.
- [2] A. Amos, D. McCarty, P. Zimmet, *Diabetic Med.* 14 (1997)S1–S85.
- [3] H. King, R. Aubert, W. Herman, *Diab. Care* 21(9) (1998)1414–1431.
- [4] World Health Organization, Department of Noncommunicable Disease Surveillance Geneva (1999) 1-59.
- [5] K.M. Bullard, S.H. Saydah, G. Imperatore, C.C. Cowie, E.W. Gregg, L.S. Geiss, Y.J. Cheng, D.B. Rolka, D.E. Williams, C.J. Caspersen, *Diab. Care* 36(8) (2013) 2286-93.
- [6] E.W. Gregg, Y. Li, J. Wang, N.R. Burrows, M.K. Ali, D. Rolka, D.E. Williams, L. Geiss, *N. Engl. J. Med.* 370(16) (2014) 1514-1523.
- [7] M.W. Carpenter, D.R. Coustan, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 144(7) (1982) 768-773.
- [8] J.B. O’Sullivan, C.M. Mahan, *Diabetes* 13 (1964) 278-285.
- [9] L. Harrison, T. Kay, P. Colman, M. Honeyman, *The Endocrinology and Diabetes Research Foundation of the University of Sydney* (1999) 85-100.
- [10] M. Atkinson, N. Maclaren, *N. Engl. J. Med.* 331(21) (1994)1428-1436.
- [11] M. Karvonen, J. Tuomilehto, I. Libman, R. LaPorte, *Diabetologia* 36(10) (1993)883-892.
- [12] J. Tuomilehto, R. Lounamaa, E. Tuomilehto-Wolf, A. Reunanen, E. Virtala, E.A. Kaprio, H.K. Akerblom, *Diabetologia* 35(1) (1992) 70-6.
- [13] J. Tuomilehto, T. Podar, G. Brigis, B. Urbonaite, M. Rewers, B. Adojaan, Z. Cepaitis, I. Kalits, H. King, R. LaPorte, R. Lounamaa, Z. Padaiga, A. Reunanen, E. Tuomilehto-Wolf, M. Walczak, *Int. J. Epidemiol.* 21(3) (1992) 518-527.
- [14] J. Tuomilehto, T. Podar, A. Reunanen, I. Kalits, R. Lounamaa, E. Tuomilehto-Wolf, B. Adojaan, B. Neff, R.E. LaPorte, *Diab. Care* 14(11) (1991) 982-988.
- [15] H. King, R. Aubert, W. Herman, *Diab. Care* 21(9) (1998) 1414-1431.
- [16] P. Zimmet, *Diabetologia* 42(5) (1999) 499-518.
- [17] J.C. Henquin, *Diabetes* 53(Suppl 3) (2004) S48-58.
- [18] T.J. Nelson, D.L. Alkon, *Biochem. Soc. Trans.* 33(Pt 5) (2005) 1033-1036.
- [19] B. Desvergne, L. Michalik, W. Wahli, *Physiol. Rev.* 86(2) (2006) 465-514.
- [20] J.C. Henquin, N. Ishiyama, M. Nenquin, M.A. Ravier, J.C. Jonas, *Diabetes* 51(Suppl 1) (2002) S60-S7.
- [21] G. Dimitriadis, P. Mitrou, V. Lambadiari, E. Maratou, S.A. Raptis, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 93(Suppl 1) (2011) S52-59.
- [22] B. Draznin, *Insulin Resistance: Childhood Precursors and Adult Disease* (2008) 95-108.
- [23] R. Dobbs, H. Sakurai, H. Sasaki, G. Faloona, I. Valverde, D. Baetens, L. Orci, R. Unger, *Science* 187(4176) (1975) 544-547.
- [24] S. McPhee, *Παθολογική Φυσιολογία* (2000) 644-649.
- [25] A.J. Vander, J. Sherman, D. Luciano, *Φυσιολογία του Ανθρώπου: Μηχανισμοί της Λειτουργίας του Οργανισμού Τόμοι I & II* (2001) 221-223, 790-796.
- [26] S.S. Gropper, J.L. Smith, J.L. Groff, *Διατροφή και Μεταβολισμός* (2007) 92-94, 166, 290-291.

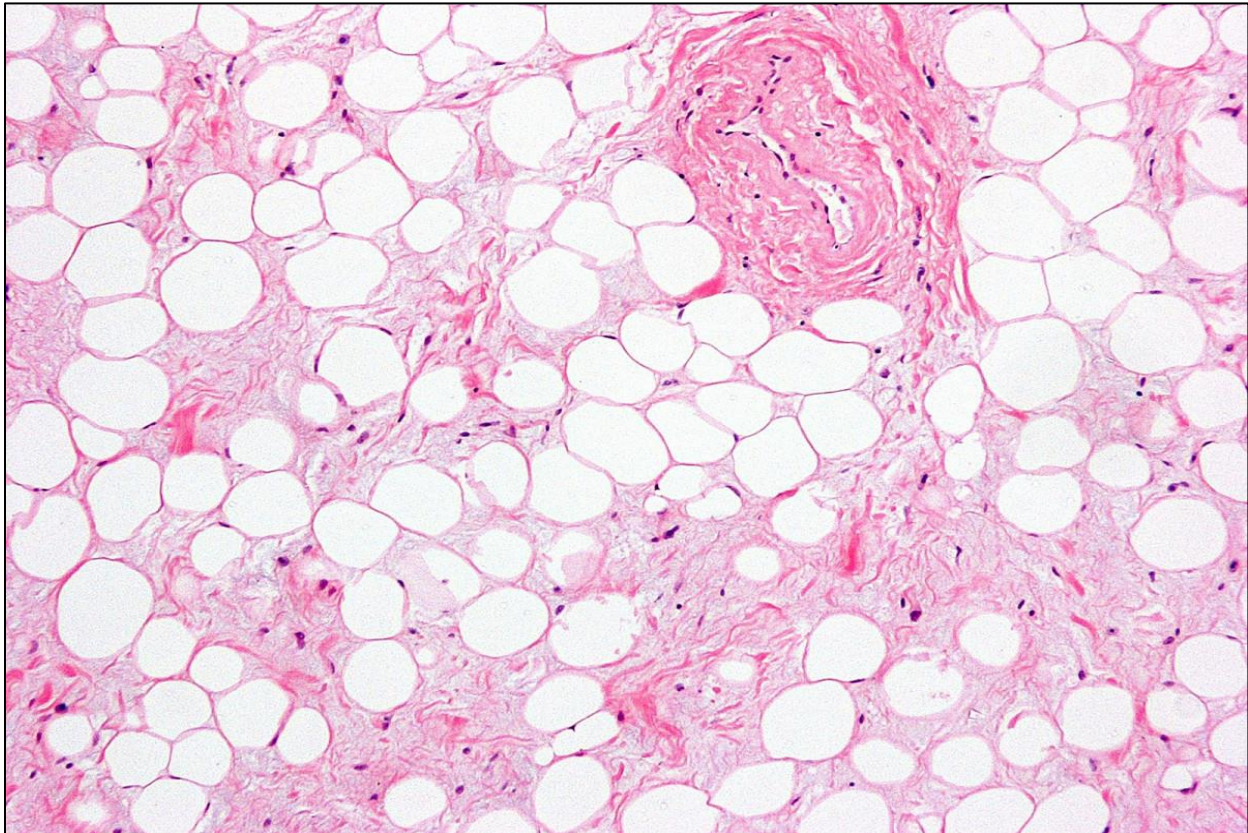
- [27] D.R. Alessi, *Biochem. Soc. Trans.* 29(Pt 2) (2001) 1-14.
- [28] D.P. Brazil, B.A. Hemmings, *Trends Biochem. Sci.* 26(11) (2001) 657-664.
- [29] S. Frame, P. Cohen, *Biochem. J.* 359(Pt 1) (2001), 1-16.
- [30] A.R. Saltiel, C.R. Kahn, *Nature* 414(6865) (2001) 799-806.
- [31] B. Vanhaesebroeck, S.J. Leever, K. Ahmadi, J. Timms, R. Katso, P.C. Driscoll, R. Woscholski, P.J. Parker, M.D. Waterfield, *Annu. Rev. Biochem.* 70 (2001) 535-602.
- [32] S.H. Chiang, C.A. Baumann, M. Kanzaki, D.C. Thurmond, R.T. Watson, C.L. Neudauer, I.G. Macara, J.E. Pessin, A.R. Saltiel, *Nature* 410(6831) (2001) 944-948.
- [33] H. Gehart, S. Kumpf, A. Ittner, R. Riccia, *EMBO Rep.* 11(11) (2010) 834-840.
- [34] J. Boucher, A. Kleinriders, C.R. Kahn, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6(1) (2014).
- [35] J.M. Santos, S.B. Ribeiro, A.R. Gaya, H.J. Appell, J.A. Duarte, *Int. J. Sports Med.* 29(10) (2008) 785-794.
- [36] J.T. Tansey, C. Sztalryd, J. Gruia-Gray, D.L. Roush, J.V. Zee, O. Gavrilova, M.L. Reitman, C.X. Deng, C. Li, A.R. Kimmel, C. Londos, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(11) (2001) 6494-6499.
- [37] S. Lillioja, D.M. Mott, M. Spraul, R. Ferraro, J.E. Foley, E. Ravussin, W.C. Knowler, P.H. Bennett, C. Bogardus, *N. Engl. J. Med.* 329(27) (1993) 1988-1992
- [38] A. Krook, L. Brueton, S. O'Rahilly, *Lancet.* 342(8866) (1993) 277-278.
- [39] D.E. Moller, J.S. Flier, *N. Engl. J. Med.* 319(23) (1988) 1526-1529.
- [40] C. Windpassinger, M. Auer-Grumbach, J. Irobi, H. Patel, E. Petek, G. Hörl, R. Malli, J.A. Reed, I. Dierick, N. Verpoorten, T.T. Warner, C. Proukakis, P. Van den Bergh, C. Verellen, L. Van Maldergem, L. Merlini, P. De Jonghe, V. Timmerman, A.H. Crosby, K. Wagner, *Nat. Genet.* 36(3) (2004) 271-276
- [41] S. Shackleton, D.J. Lloyd, S.N. Jackson, R. Evans, M.F. Niermeijer, B.M. Singh, H. Schmidt, G. Brabant, S. Kumar, P.N. Durrington, S. Gregory, S. O'Rahilly, R.C. Trembath, *Nat. Genet.* 24(2) (2000) 153-156.
- [42] I.K. Temple, R.J. Gardner, D.J. Mackay, J.C. Barber, D.O. Robinson, J.P. Shield, *Diabetes* 49(8) (2000) 1359-1366.
- [43] A.L. Gloyn, E.R. Pearson, J.F. Antcliff, P. Proks, G.J. Bruining, A.S. Slingerland, N. Howard, S. Srinivasan, J.M. Silva, J. Molnes, E.L. Edghill, T.M. Frayling, I.K. Temple, D. Mackay, J.P. Shield, Z. Sumnik, A. van Rhijn, J.K. Wales, P. Clark, S. Gorman, J. Aisenberg, S. Ellard, P.R. Njølstad, F.M. Ashcroft, A.T. Hattersley, *N. Engl. J. Med.* 350(18) (2004) 1838-1849.
- [44] S.S. Fajans, J.W. Conn, *Diabetes* 9 (1960) 83-88.
- [45] H.M. Ledermann, *Diabetologia* 38(12) (1995) 1482.
- [46] G.I. Bell, K.S. Xiang, M.V. Newman, S.H. Wu, L.G. Wright, S.S. Fajans, R.S. Spielman, N.J. Cox, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88(4) (1991) 1484-1488.
- [47] G. Velho, H. Blanché, M. Vaxillaire, C. Bellanné-Chantelot, V.C. Pardini, J. Timsit, P. Passa, I. Deschamps, J.J. Robert, I.T. Weber, D. Marotta, S.J. Pilkis, G.M. Lipkind, G.I. Bell, P. Froguel, *Diabetologia* 40(2) (1997) 217-224.

- [48] D.A. Stoffers, N.T. Zinkin, V. Stanojevic, W.L. Clarke, J.F. Habener, *Nat. Genet.* 15(1) (1997) 106-110.
- [49] C. Bingham, S. Ellard, T.R. Cole, K.E. Jones, L.I. Allen, J.A. Goodship, T.H. Goodship, D. Bakalinova-Pugh, G.I. Russell, A.S. Woolf, A.J. Nicholls, A.T. Hattersley, *Kidney Int.* 61(14) (2002) 1243-1251.
- [50] E.R. Pearson, M.K. Badman, C.R. Lockwood, P.M. Clark, S. Ellard, C. Bingham, A.T. Hattersley, *Diab. Care* 27(5) (2004) 1102-1107.
- [51] K.G. Alberti, P. Zimmet, J. Shaw, *Diabet Med.* 23(5) (2006) 469-480.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΛΙΠΩΔΗΣ ΙΣΤΟΣ ΚΑΙ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΙΣΤΟΥ

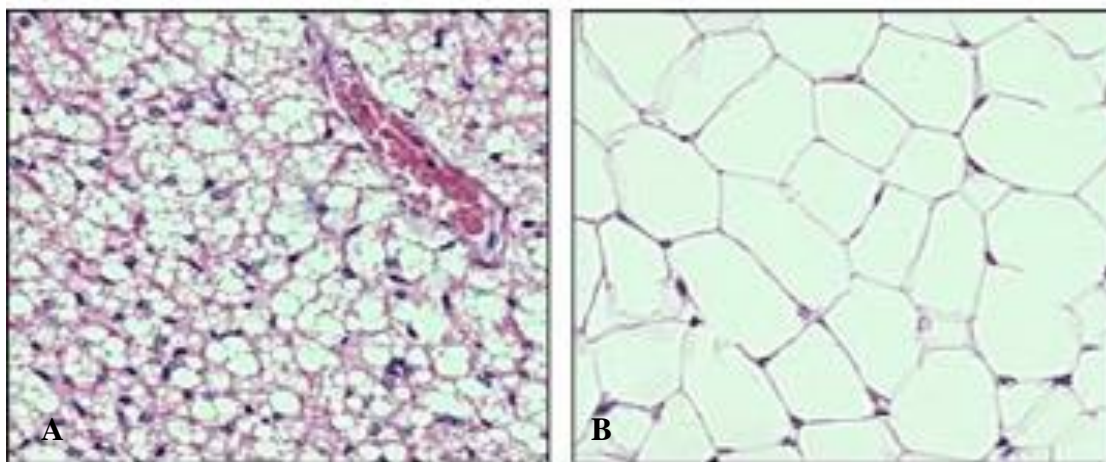
Ο λιπώδης ιστός αποτελεί ειδικό τύπο χαλαρού συνδετικού ιστού όπου επικρατούν τα λιπώδη κύτταρα (λιποκύτταρα) (Εικόνα 1.1). Τα λιπώδη κύτταρα μπορεί να βρίσκονται μεμονωμένα ή σε μικρές ομάδες συγκροτώντας έτσι ένα όργανο με βασική ιδιότητα την αποθήκευση ενέργειας με τη μορφή λίπους. Ο λιπώδης ιστός αποτελείται μόνο κατά το 1/3 από ώριμα λιποκύτταρα ενώ τα υπόλοιπα 2/3 είναι πρόιμα λιποκύτταρα, κύτταρα του στρώματος (stromal vascular fraction – SVF) του λιπώδους ιστού, όπως είναι τα ενδοθηλιακά κύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα των μικρών αγγείων, ινοβλάστες, μακροφάγα καθώς και κύτταρα του νευρικού ιστού. Οι δύο βασικοί κυτταρικοί τύποι του λιπώδους ιστού διακρίνονται με βάση το χρώμα τους (μορφολογική διάκριση) αλλά και την λειτουργία τους. Ο λευκός λιπώδης ιστός έχει υποκίτρινη χροιά και περιέχει κυρίως λευκά λιποκύτταρα σε αντίθεση με τον φαιό ο οποίος εμφανίζεται καστανόχρους και αποτελείται από φαιά λιποκύτταρα [1,2].



Εικόνα 2.1 Ιστολογική απεικόνιση του λιπώδους ιστού.

Ιδιαίτερα σημαντική διάκριση του λιπώδους ιστού είναι αυτή που βασίζεται στον εντοπισμό του καθώς έτσι διακρίνεται σε σπλαχνικό και υποδόριο. Και οι δύο τύποι λιπώδους ιστού αποτελούνται από μικρότερες αποθήκες λίπους με συγκεκριμένες φυσιολογικές λειτουργίες. Ο υποδόριος λιπώδης ιστός διακρίνεται σε επιπολής και εν τω βάθει στιβάδα. Ο σπλαχνικός λιπώδης ιστός υποδιαιρείται σε οπισθοπεριτοναϊκό και ενδοπεριτοναϊκό. Στον άνθρωπο, το οπισθοπεριτοναϊκό λίπος αντιπροσωπεύει περίπου το 25% του συνολικού λιπώδους ιστού του σπλαχνικού διαμερίσματος [2]. Το σπλαχνικό και υποδόριο λίπος αποτελούνται κυρίως από λευκό λιπώδη ιστό, ο οποίος επιπρόσθετα απαντά και σε μικρότερα διαμερίσματα, που περιβάλλουν άλλα όργανα, όπως η καρδιά, οι γεννητικοί αδένες και οι νεφροί. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο λευκός και ο φαιός λιπώδης ιστός παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές οι οποίες μακροσκοπικά σχετίζονται με το χρώμα. Ο λευκός λιπώδης ιστός εμφανίζει λευκό έως υποκίτρινο χρώμα ενώ ο φαιός έχει καστανό χρώμα λόγω του αυξημένου αριθμού τριχοειδών αλλά και των πολυάριθμων χρωματισμένων μιτοχονδρίων εξαιτίας του κυτοχρώματος. Τα λευκά λιποκύτταρα είναι περισσότερο σφαιρικά με την διάμετρό τους να κυμαίνεται μεταξύ 30-70 μm. Τα κύτταρα αυτά περιέχουν μία μεγάλη μονόχωρη λιποσταγόνα το μέγεθος της οποίας μπορεί να υπερβαίνει και τα 50 μm. Η σταγόνα αυτή λίπους καταλαμβάνει την πλειονότητα του κυτταροπλάσματος συμπιέζοντας πολλές φορές τον πυρήνα. Ως αποτέλεσμα αυτού του γεγονότος ο πυρήνας εμφανίζεται έκκεντρος και αποπλατυσμένος. Στο παχύτερο τμήμα του κυτταροπλάσματος περιέχονται το σύμπλεγμα Golgi, μιτοχόνδρια, δεξαμενές του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου και ελεύθερα ριβοσώματα. Τα φαιά λιποκύτταρα είναι μικρότερα με την διάμετρό τους να κυμαίνεται από 20-40 μm και το σχήμα τους είναι πολυγωνικό. Ο πυρήνας εδώ είναι κεντρικός και το κυτταρόπλασμα περιέχει σταγονίδια λίπους διαφορετικού μεγέθους. Χαρακτηριστικό γνώρισμα των κυττάρων αυτών είναι η ύπαρξη πολυάριθμων μιτοχονδρίων [3,4]. Αξίζει να αναφερθεί ότι τα λευκά λιποκύτταρα όταν το λιπιδιακό τους περιεχόμενο ελαττωθεί χάνουν το σφαιρικό σχήμα και μπορεί να εμφανίζονται ως πολύχωρα κύτταρα. Τόσο ο λευκός όσο και ο φαιός λιπώδης ιστός διαθέτει πλούσια αγγειακή αιμάτωση. Λευκά λιποκύτταρα συγκροτούν θέσεις άρδευσης από ένα αρτηρίδιο. Κάθε λιποκύτταρο αιματώνεται από ένα παρακείμενο τριχοειδές ενώ μπορεί να βρίσκεται σε επαφή με ένα γλυκοπρωτεϊνικό στρώμα ινοβλάστες μακροφάγα ή και μαστοκύτταρα. Ο φαιός λιπώδης ιστός διαθέτει πλουσιότερο αγγειακό σύστημα σε σχέση με τον λευκό. Η αυξημένη αγγείωση του ιστού αυτού καθώς και η ύπαρξη πολυάριθμων

μιτοχονδρίων προσδίδουν το καστανό χρώμα του φαιού λιπώδους ιστού [4,5]. Τόσο ο λευκός όσο και ο φαιός λιπώδης ιστός νευρώνονται κυρίως από νοραδρενεργικές ίνες του συμπαθητικού νευρικού συστήματος, ενώ υπάρχουν αναφορές και για παρασυμπαθητική νεύρωση του λιπώδους ιστού. Οι νοραδρενεργικές ίνες του λευκού λιπώδους ιστού περιορίζονται στο τοίχωμα των τριχοειδών, ενώ στο φαιό λιπώδη ιστό, όπου η νεύρωση είναι πυκνότερη, οι νευρικές ίνες αλληλεπιδρούν επιπλέον και με την κυτταρική μεμβράνη των φαιών λιποκυττάρων μέσω «τυχαίων» συνάψεων. Παρόλο που ο κύριος νευροδιαβιβαστής στις νευρικές απολήξεις του λιπώδους ιστού είναι η νορεπινεφρίνη, στο φαιό λιπώδη ιστό έχουν εντοπισθεί νευρικές ίνες που περιέχουν ως νευροδιαβιβαστή το νευροπεπτίδιο Υ και την ουσία Ρ. Πρέπει επίσης να σημειωθεί η παρουσία αισθητικής νεύρωσης στο φαιό και πιθανότατα και στο λευκό λιπώδη ιστό, με πιθανό ρόλο στη ρύθμιση της ενεργειακής ισορροπίας του σώματος[3,6] (Εικόνα 2.2).



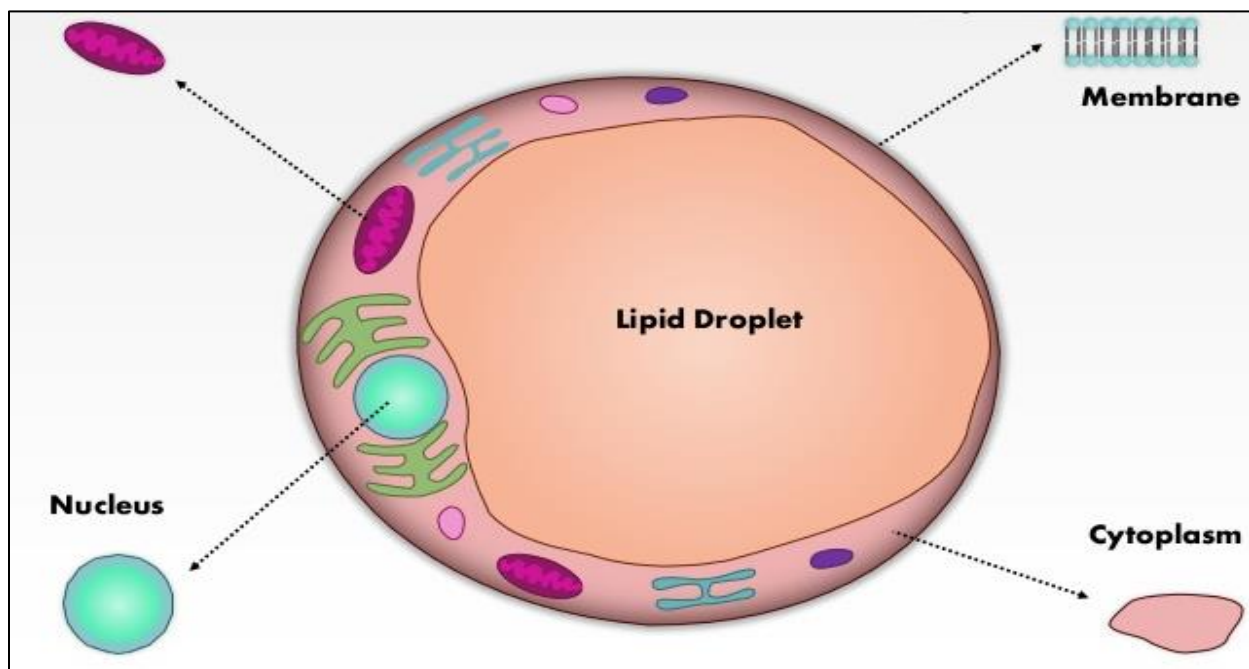
Εικόνα 2.2 (Α) φαιός λιπώδης ιστός, (Β) λευκός λιπώδης ιστός. Ο φαιός λιπώδης ιστός περιέχει πολυάριθμα σταγονίδια λίπους μικρού μεγέθους σε σχέση με τον λευκό ο οποίος περιέχει μια μεγάλη μονόχωρη λιποσταγόνα. Ο φαιός λιπώδης ιστός επίσης περιέχει περισσότερα μιτοχόνδρια σε σχέση με το λευκό.

Τα λευκά λιποκύτταρα συμμετέχουν ενεργά στο μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπιδίων, με τη λιποσταγόνα να εξυπηρετεί τη μακροχρόνια αποθήκευση πλούσιων σε ενέργεια ουδέτερων λιπιδίων, κυρίως τριακυλογλυκερολών (τριγλυκεριδίων) και εστέρων χοληστερόλης. Τα λευκά λιποκύτταρα εμφανίζουν επίσης ενδοκρινή λειτουργία, συνθέτοντας και εκκρίνοντας ποικιλία βιοδραστικών μορίων.

Κύρια λειτουργία των φαιών λιποκυττάρων αποτελεί η θερμογένεση. Είναι δεδομένη η παρουσία στο φαιό και λευκό λιπώδη ιστό παρόμοιων βιοχημικών μηχανισμών που ευθύνονται για τη σύνθεση και υδρόλυση λιπιδίων, καθώς και για τη σύνθεση πρωτεϊνών.

2.1.1 ΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΟ - ΛΙΠΟΣΤΑΓΟΝΑ

Η σημαντικότερη δομή του λευκού λιποκυττάρου είναι η λιποσταγόνα η οποία καταλαμβάνει έως και το 95% του συνολικού όγκου του κυττάρου (Εικόνα 2.3). Ο πυρήνας της λιποσταγόνας αυτής αποτελείται από ουδέτερα λιπίδια η σύνθεση των οποίων πραγματοποιείται στο ενδοπλασματικό δίκτυο των λιποκυττάρων και περιβάλλονται από μονή στιβάδα φωσφολιπιδίων των οποίων το υδρόφοβο τμήμα τους είναι προσανατολισμένο προς το λιπιδικό πυρήνα και το υδρόφιλο προς την επιφάνεια του σταγονιδίου.



Εικόνα 2.3 Σχηματική απεικόνιση του λιποκυττάρου. Στην εικόνα παρουσιάζονται τα οργανίδια του κυττάρου και η υπερμεγέθης λιποσταγόνα η οποία απαρτίζει έως και το 95% του συνολικού όγκου του κυττάρου.

Έχει δειχθεί μετά από εκτεταμένη έρευνα ότι η οικογένεια των πρωτεϊνών PAT (perilipin-adipophilin-TIP47) είναι υπεύθυνη για την μεταφορά των λιπιδίων στην λιποσταγόνα. Η οικογένεια των PAT πρωτεϊνών χαρακτηρίζεται από δομική ομοιότητα των μελών της και έχουν την ικανότητα σύνδεσης με τα λιπίδια των λιποσταγονιδίων. Οι πρωτεΐνες περιλιπίνη (perilipin) και αδιποφιλίνη (adipophilin) εκφράζονται ιδιοστατικά και καλύπτουν την εξωτερική στιβάδα

της επιφάνειας της λιποσταγόνας όπου βρίσκονται σε επαφή με το κυτταρόπλασμα. Η περιλιπίνη κατέχει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του λιποκυττάρου, καθώς προστατεύει τα περιεχόμενα στη λιποσταγόνα λιπίδια από την υδρολυτική δράση των κυτταροπλασματικών λιπασών, σε περιόδους που υπάρχει επάρκεια ενέργειας ενώ επιπρόσθετα έχει δείχθει ότι μετά από φωσφορυλίωσή της από την PKA συμμετέχει στην ρύθμιση της λιπόλυσης η οποία επάγεται από ορμόνες ή αδρενεργική διέγερση.

2.1.2 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΟΥ ΛΙΠΩΔΟΥΣ ΙΣΤΟΥ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί ο λιπώδης ιστός αποτελεί όργανο με βασική ιδιότητα την αποθήκευση ενέργειας. Η ενέργεια αυτή αποθηκεύεται κυρίως με την μορφή τριγλυκεριδίων. Ωστόσο, πέρα από αποθήκη ενέργειας, ο λιπώδης ιστός αποτελεί σημαντική δομή μόνωσης και μηχανικής στήριξης των υπολοίπων οργάνων του σώματος. Πιο συγκεκριμένα, ο λιπώδης ιστός προσφέρει προστασία έναντι σε μεταβολές της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος αλλά και σε άλλες μηχανικές και μη καταπονήσεις. Επιπλέον, η παρουσία του λιπώδους ιστού εξυπηρετεί και μεταβολικούς σκοπούς και η παρατήρηση αυτή ενισχύεται από την ικανότητα του ιστού αυτού να ανταποκρίνεται σε ορμονική αλλά και συμπαθητική νευρική διέγερση.

Ειδικότερα, ο λιπώδης ιστός έχει την ικανότητα αποθήκευσης ενέργειας με την μορφή τριγλυκεριδίων μέσα σε μεγάλες λιποσταγόνες και η ενέργεια αυτή μπορεί να απελευθερώνεται με την μορφή ελεύθερων λιπαρών οξέων. Η διαδικασία αυτή δεν εξαρτάται από τον χώρο και τον χρόνο καθώς όταν υπάρχει περίσσεια ενέργειας αυτή μπορεί να αποθηκεύεται συνεχώς υπό την επίδραση της ινσουλίνης. Σε καταστάσεις όπου ο αριθμός των κυττάρων δεν επαρκεί για την περαιτέρω αποθήκευση ενέργειας τότε λαμβάνει χώρα η διαδικασία της λιπογένεσης με στόχο την αύξηση του αριθμού των λιποκυττάρων. Αντίστοιχα, σε καταστάσεις όπου οι ενεργειακές ανάγκες είναι αυξημένες, τα ήδη αποθηκευμένα λιπίδια απελευθερώνονται για την απαιτούμενη παραγωγή ενέργειας. Η διαδικασία αυτή απαιτεί την ορμονική μεσολάβηση από κατεχολαμίνες και άλλες λιπολυτικές ορμόνες [7,8,9].

Σε αντίθεση με τον λευκό λιπώδη ιστό, ο φαιός λιπώδης ιστός αποθηκεύει τριγλυκερίδια τα οποία αποτελούν άμεση πηγή για την παραγωγή θερμότητας. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την αποσύνδεση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης των ελεύθερων λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια. Ο φαιός λιπώδης ιστός λοιπόν, φαίνεται να έχει περισσότερο θερμορυθμιστικό ρόλο. Αξίζει να αναφερθεί ότι η ρύθμιση της θερμογένεσης στο φαιό λιπώδη ιστό γίνεται

κυρίως με τη μεσολάβηση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος, μέσω β3-αδρενεργικών υποδοχέων.



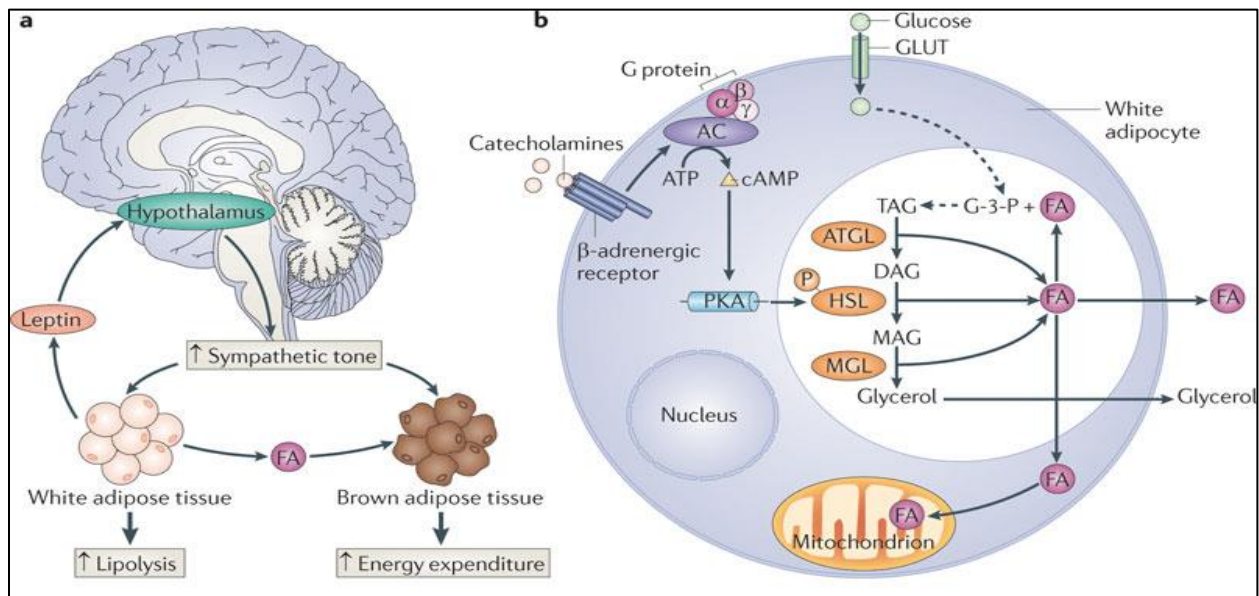
Εικόνα 2.4 Βασικές λειτουργίες του λιπώδους ιστού.

Οι τρεις βασικότερες λειτουργίες των λευκών λιποκυττάρων αφορούν στο μεταβολισμό των λιπιδίων, στο μεταβολισμό της γλυκόζης και στην παραγωγή και έκκριση πεπτιδίων με ποικίλες βιολογικές δράσεις.

2.1.3 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

Μετά από τη πρόσληψη τροφής από ένα οργανισμό, τα λιποκύτταρα αποθηκεύουν προσωρινά τα προϊόντα της πέψης με την μορφή τρίακυλογλυκεριδίων. Η φύση των υδρόφοβων λιπαρών οξέων και η υψηλή θερμιδική τους αξία καθιστά τα μόρια κατάλληλα για αποθήκευση σε μεγάλη πυκνότητα στα λιποκύτταρα. Αντίθετα, σε περίοδο νηστείας, το λιποκύτταρο διαθέτει κατάλληλους βιοχημικούς μηχανισμούς υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και γλυκερόλη αποδίδοντας στη συνέχεια τα προϊόντα της υδρόλυσης στην κυκλοφορία. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα χρησιμοποιούνται από τους ιστούς, κυρίως μέσω β-οξειδωσης, για την παραγωγή ενέργειας (ATP), ενώ η γλυκερόλη μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί από το ήπαρ για τη σύνθεση τριακυλογλυκερολών. Τα τριγλυκερίδια διαθέτουν τη μοναδική ικανότητα αποθήκευσης αυξημένων ποσών ενέργειας από το γλυκογόνο, γεγονός που καθιστά πολύτιμη τη σύνθεση, αλλά και τον ελεγχόμενο καταβολισμό τους για τη συνεχή παροχή ενέργειας στον

οργανισμό, ακόμα και σε περιόδους παρατεταμένης νηστείας. Η ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων ελέγχεται από τρεις κύριες μεταβολικές διαδικασίες και πιο συγκεκριμένα από την πρόσληψη λιπαρών οξέων, την λιπογένεση και την λιπόλυση. Η μεταβολικές αυτές διαδικασίες μεταβάλλονται από εξωκυττάρια ερεθίσματα όπως είναι η ινσουλίνη, η κορτιζόλη, οι κατεχολαμίνες, η αυξητική ορμόνη, η τεστοστερόνη, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και οι κυτταροκίνες. Τα λιπαρά οξέα που χρησιμοποιούνται από τα λιποκύτταρα προέρχονται κυρίως από τα ελεύθερα λιπαρά οξέα του πλάσματος και λιγότερο από τη *de novo* σύνθεση στο κυτταρόπλασμα. Το σύνολο των κυκλοφορούντων λιπαρών οξέων συμπεριλαμβάνει αυτά που προσλαμβάνονται με την τροφή και αυτά που απελευθερώνονται από τα λιποκύτταρα με τη λιπόλυση.

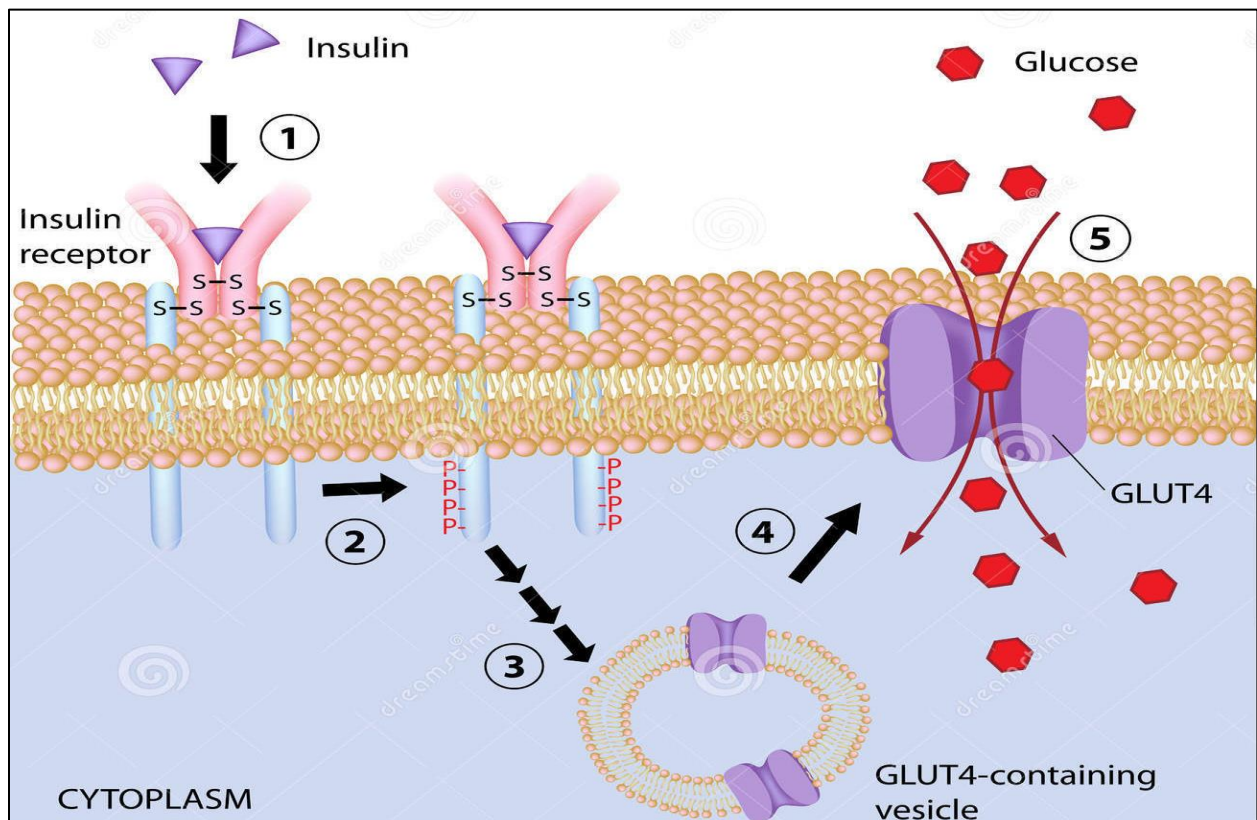


Εικόνα 2.1.3 Σηματοδοτικό μονοπάτι μεταβολισμού των λιπιδίων.

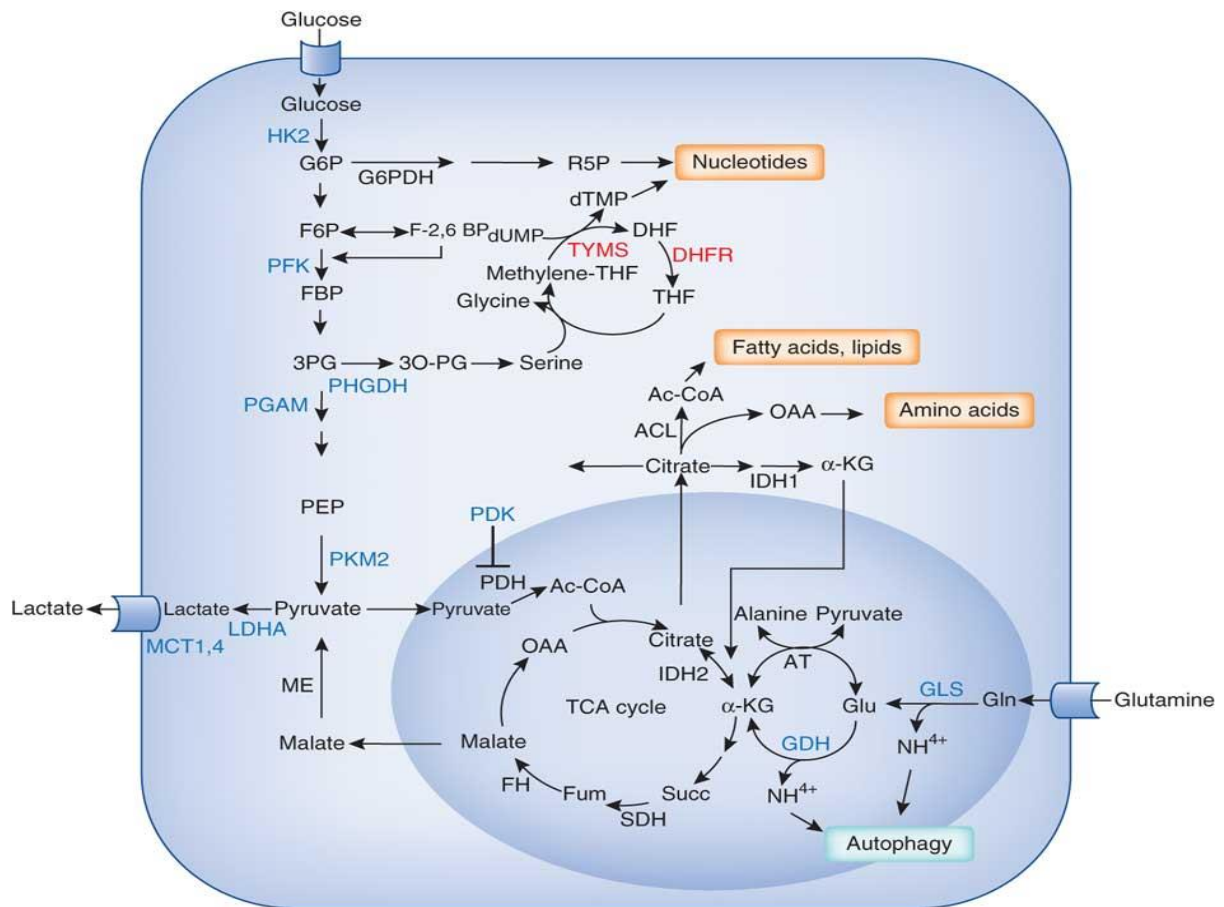
2.1.4 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ

Ιδιαίτερα σημαντική μεταβολική λειτουργία των λιποκυττάρων αποτελεί η συμμετοχή τους στον μεταβολισμό της γλυκόζης. Τα λιποκύτταρα, τα σκελετικά και τα καρδιακά μυϊκά κύτταρα εκφράζουν τον ινσουλινοεξαρτώμενο γλυκοζομεταφορέα GLUT 4 ο οποίος είναι υπεύθυνος για την μεταγευματική μεταφορά της γλυκόζης από την κυκλοφορία του αίματος στο εσωτερικό των κυττάρων προς χρήση ή /και αποθήκευση. Έχει δειχθεί ότι στα λιποκύτταρα, η γλυκόζη μέσω της διαδικασίας της γλυκόλυσης παρέχει το κατάλληλο υπόστρωμα για την *de novo* σύνθεση λιπαρών οξέων και γλυκερόλης. Ο μεταβολικός ρόλος των λιποκυττάρων μπορεί να επηρεάσει

το μεταβολισμό της γλυκόζης και σε άλλους ιστούς καθώς η αυξημένη λιπόλυση των τριγλυκεριδίων στα λιποκύτταρα αυξάνει τα επίπεδα των κυκλοφορούντων λιπαρών οξέων. Η αύξηση αυτή με την σειρά της επιδρά αρνητικά στην ηπατική κάθαρση της ινσουλίνης, και στην επαγόμενη από την ινσουλίνη καταστολή της ηπατικής παραγωγής γλυκόζης. Αντίθετα, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα αυξάνουν το ρυθμό ηπατικής γλυκονεογένεσης. Συνολικά, η ύπαρξη υψηλών επιπέδων ελεύθερων λιπαρών οξέων οδηγεί σε υπεργλυκαιμία. Παράλληλα, τα λιπαρά οξέα αυξάνουν την αντίσταση των σκελετικών μυών στην ινσουλίνη και σε συνδυασμό με την αντισταθμιστική αύξηση της επαγόμενης από τη γλυκόζη έκκριση ινσουλίνης και την ελαττωμένη απομάκρυνση της τελευταίας από το ήπαρ ενισχύουν την περιφερική υπερινσουλιναιμία[10,11].



Εικόνα 2.1.4 Α Σχηματική απεικόνιση της ενδοκυττάριας πρόσληψης της γλυκόζης.



Εικόνα 2.1.4 Β Σηματοδοτικό μονοπάτι του μεταβολισμού της γλυκόζης.

2.1.5 ΕΝΔΟΚΡΙΝΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Έπειτα από την ανακάλυψη της λεπτίνης και των πολυάριθμων δράσεων της, κατατρίφθηκε η άποψη ότι ο λιπώδης ιστός αποτελεί μια απλή δομή με παθητική λειτουργία. Ο λιπώδης ιστός, εκτός από το βιολογικό υπόβαθρο για την αποθήκευση και απελευθέρωση ενέργειας, διαθέτει τον απαραίτητο μηχανισμό για να επικοινωνεί με απομακρυσμένα όργανα και το ΚΝΣ και συντονίζει ποικιλία λειτουργιών, όπως η ενεργειακή ομοιοστασία, ο μεταβολισμός και η ανοσία. Το λιποκύτταρο αποτελεί σημαντική βιοσυνθετική μηχανή καθώς είναι πηγή πληθώρας βιοδραστικών πεπτιδίων ρυθμίζοντας την λειτουργία πολλών οργάνων και ιστών συμπεριλαμβανομένου και του ίδιου. Ο τρόπος με τον οποίο ο λιπώδης ιστός ελέγχει την λειτουργία των ιστών-στόχων μπορεί να είναι αυτοκρινής, παρακρινής ή ενδοκρινής. Αν και οι περισσότεροι παράγοντες που εκκρίνονται από τα λιποκύτταρα ρυθμίζουν το μεταβολισμό αυτών με αυτοκρινή ή παρακρινή τρόπο, σημαντικός αριθμός προϊόντων των λιποκυττάρων

εισέρχονται στην κυκλοφορία και έχουν ενδοκρινή δράση[4,7,9]. Παρακάτω θα αναφερθούν ορισμένα στοιχεία για τα κυριότερα παράγωγα του λιπώδους ιστού.

Η λεπτίνη, προϊόν του γονιδίου *ob* (*obesity gene*), είναι μια ορμόνη, που παράγεται στα λιποκύτταρα του υποδόριου λίπους και λιγότερο στα κοιλιακά λιποκύτταρα και η παραγωγή της είναι ανάλογη (υπάρχει δηλαδή θετική συσχέτιση) με τη λιπώδη μάζα και όχι τόσο με την κατανομή. Η παραγωγή της λεπτίνης εξαρτάται και από τη διατροφική κατάσταση καθώς έχειδειχθεί ότι σε περιόδους ελαττωμένης πρόσληψης τροφής η παραγωγή λεπτίνης ελαττώνεται. Στον άνθρωπο η λεπτίνη εκκρίνεται κατά ώσεις με μεγαλύτερο ρυθμό έκκρισης το βράδυ. Τα επίπεδα στον ορό είναι υψηλότερα στις προ-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες από τους άνδρες ενώ η παραγωγή της λεπτίνης επηρεάζεται και από πολλούς άλλους παράγοντες. Η ινσουλίνη, τα γλυκοκορτικοειδή, ο παράγοντας TNF- α και τα οιστρογόνα αυξάνουν την έκκρισή της[12,13].

Ο TNF- α αποτελεί έναν ανορεξιογόνο παράγοντα που δρα μέσω της λεπτίνης αφού διεγείρει *in vitro* την έκκριση της ορμόνης αυτής. Στο λιπώδη ιστό με τοπική παρακρινική δράση καταστέλλει γονίδια που ενέχονται στην πρόσληψη και αποθήκευση ελεύθερων λιπαρών οξέων (ΕΛΟ) και της γλυκόζης. Επιπλέον, καταστέλλει τη δραστηριότητα της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (ΛΛ) (καταστολή της λιπογένεσης), αυξάνει τη δραστηριότητα της ορμονο-ευαίσθητης λιπάσης (ΟΕΛ), ε αποτέλεσμα την αύξηση της λιπόλυσης ενώ ακόμη μειώνει την έκφραση των μεταφορέων γλυκόζης GLUT 4. Επίσης, έχειδειχθεί ότι τροποποιεί την έκφραση της αδιπονεκτίνης καθώς και της ιντερλευκίνης-6. Αυτές οι δράσεις προσδίδουν στον TNF- α τον ρόλο του τοπικού «λιποστάτη», που εμποδίζει την αύξηση του μεγέθους των λιποκυττάρων. Εξάλλου η παραγωγή του TNF- α από τον λιπώδη ιστό, με βάση πειραματικά και κλινικά δεδομένα, έχει σχετισθεί αιτιολογικά με την παχυσαρκία και την αντίσταση στην ινσουλίνη. Ακόμη, ο TNF- α επηρεάζει αρνητικά τη μετάδοση του σήματος της ινσουλίνης στα κύτταρα-στόχους μέσω ενεργοποίησης των κινασών της σερίνης.

Όπως και ο TNF- α , η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) παράγεται στα λιποκύτταρα του ανθρώπου και τα επίπεδα στο αίμα αυξάνονται με την παχυσαρκία. Η ιντερλευκίνη-6 αναστέλλει τη δραστηριότητα της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης και διεγείρει την οξειδωση γλυκόζης και λιπαρών οξέων και προάγει την απελευθέρωση γλυκαγόνης και κορτιζόλης με μάλλον τοπική παρά συστηματική δράση. Οι δράσεις αυτές σχετίζονται με αντίσταση στην ινσουλίνη, υπερλιπιδαιμία και υπεργλυκαιμία στα τρωκτικά και στον άνθρωπο. Παράλληλα η

ιντερλευκίνη-6 ελαττώνει την παραγωγή αδιπονεκτίνης. Από πειραματικά δεδομένα φαίνεται ότι η δράση της στο ΚΝΣ είναι αντίθετη: κεντρική χορήγηση της ιντερλευκίνης-6 αυξάνει την κατανάλωση ενέργειας και τη λιπώδη μάζα στα τρωκτικά [14,15,16].

Ο PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1, αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου-1) είναι η κυριότερη πρωτεΐνη της αιμόστασης/ινωδύλωσης που παράγει ο λιπώδης ιστός και ίσως είναι ο συνδετικός κρίκος μεταξύ παχυσαρκίας και καρδιαγγειακής νόσου. Τα επίπεδα στο πλάσμα σχετίζονται θετικά με την κεντρική κατανομή του λίπους κι επομένως βρίσκονται αυξημένα σε παχυσαρκία και αντίσταση στην ινσουλίνη. Στις καταστάσεις αυτές ο TNF-α συμβάλλει στην αυξημένη παραγωγή του PAI-1. Σε ποντίκια μετάλλαξη του γονιδίου του PAI-1 έχει ως αποτέλεσμα ελαττωμένη αύξηση βάρους παρά την αυξημένη πρόσληψη τροφής, αυξημένη κατανάλωση ενέργειας, βελτίωση της ομοιόστασης της γλυκόζης και της ευαισθησίας στην ινσουλίνη[17,18].

Η αδιπονεκτίνη σε φυσιολογικού βάρους ενήλικες παράγεται σε μεγάλα ποσά από τα διαφοροποιημένα λιποκύτταρα, κυρίως του υποδόριου λίπους συγκριτικά με το σπλαχνικό. Υπάρχουν 2 τύποι του υποδοχέα της αδιπονεκτίνης: ο τύπος 1 εκφράζεται κυρίως στους μύς και ο τύπος 2 στο ήπαρ. Έχει διαπιστωθεί ότι σε κεντρικού τύπου παχυσαρκία τα επίπεδα της στο πλάσμα είναι σημαντικά ελαττωμένα και εμφανίζουν αρνητική συσχέτιση με την αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης. Μελέτες σε πειραματόζωα και στον άνθρωπο έδειξαν συσχέτιση μεταξύ αδιπονεκτίνης και λειτουργίας του ενδοθηλίου. Ενδεικτικά αναφέρονται: αύξηση αγγειοδιαστολής, ελάττωση της σύνθεσης προσκολλητικών μορίων, καταστολή της δράσης του TNF-α στη λειτουργία του ενδοθηλίου, αυξημένη παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO). Επιπλέον, η αδιπονεκτίνη αυξάνει την ευαισθησία των ιστών στην ινσουλίνη. Χορήγηση αδιπονεκτίνης στα τρωκτικά προκαλεί αύξηση της πρόσληψης γλυκόζης και της οξείδωσης των λιπών στους μύς, ελάττωση της παραγωγής γλυκόζης στο ήπαρ και βελτιώνει σημαντικά τη δράση της ινσουλίνης. Φαίνεται, λοιπόν, ότι πρόκειται για μια μοναδική ορμόνη του λιπώδους ιστού με αντιδιαβητική και αντιαθερογόνο δράση [19,20,21].

Η αδιψίνη (adipsin) ή παράγων D του συμπληρώματος είναι ένας από αρκετούς παράγοντες του συμπληρώματος που παράγονται στο λιπώδη ιστό που χρησιμεύουν στην παραγωγή της πρωτεΐνης AS (acylation stimulating protein). Συμμετέχει στη ρύθμιση της αποθήκευσης ενέργειας μέσω αύξησης της σύνθεσης τριακυλο-γλυκερόλης και πρόσληψης γλυκόζης.

Μελέτες στον άνθρωπο έδειξαν ότι η αδιψίνη και η πρωτεΐνη AS σχετίζονται θετικά με παχυσαρκία, αντίσταση στην ινσουλίνη, δυσλιπιδαιμία και καρδιαγγειακή νόσο.

Η ρεζιστίνη (resistin, αντίσταση στην ινσουλίνη) είναι κυτταροκίνη που παράγεται στο λίπος, 15 φορές περισσότερο στο σπλαχνικό συγκριτικά με το υποδόριο. Φαίνεται ότι είναι ένας σημαντικός σύνδεσμος μεταξύ της παχυσαρκίας, της αντίστασης στην ινσουλίνη και της διαταραχής του μεταβολισμού των υδατανθράκων στα ποντίκια. Αν και δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί ο ρόλος της, η χορήγησή της σε φυσιολογικά ποντίκια ρυθμίζει τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων και προκαλεί διαταραχή της ανοχής γλυκόζης και της ευαισθησίας στην ινσουλίνη. Χορήγηση αντισωμάτων έναντι της ρεζιστίνης σε παχύσαρκα ποντίκια βελτιώνει το σάκχαρο και μειώνει την αντίσταση στην ινσουλίνη ενώ στον άνθρωπο δεν υπάρχουν ακόμα επαρκή δεδομένα για την δράση της [22].

Η βισφατίνη (visfatin) πρόκειται για μια νέα κυτταροκίνη που απομονώθηκε από σπλαχνικό λίπος ποντικού και ανθρώπου και τα επίπεδά της στο πλάσμα αυξάνονται παράλληλα με την αύξηση του σπλαχνικού λιπώδους ιστού και την εμφάνιση της παχυσαρκίας. Χορήγηση βισφατίνης σε ποντικούς είχε ως αποτέλεσμα την ελάττωση της γλυκόζης του αίματος (ινσουλινομιμητική δράση). Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι μπορεί να συνδέεται συνδέεται και να ενεργοποιεί τον υποδοχέα της ινσουλίνης [23].

Από τον λιπώδη ιστό εκκρίνονται ακόμη πρωτεΐνες του συστήματος ρενίνη-αγγειοτενσίνη. Το αγγειοτενσινογόνο παράγεται κυρίως από το ήπαρ, αλλά σημαντικές ποσότητες παράγονται και στον λιπώδη ιστό με τη ρυθμιστική επίδραση των γλυκοκορτικοειδών. Τοπικά, μετατρέπεται σε αγγειοτενσίνη II, η οποία αφενός δρα τοπικά προάγοντας τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων και αφετέρου διοχετεύεται στην κυκλοφορία. Ρενίνη και υποδοχείς της αγγειοτενσίνης παράγονται κυρίως στο σπλαχνικό λιπώδη ιστό.

2.2 ΛΙΠΟΓΕΝΕΣΗ

2.2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΛΙΠΟΓΕΝΕΣΗΣ

Ως λιπογένεση ορίζεται η βιοσύνθεση λιπιδίων. Η *de novo* λιπογένεση αφορά στη σύνθεση λιπαρών οξέων από διάφορα, μη λιπιδικές πρόδρομες ενώσεις όπως είναι η γλυκόζη, τα αμινοξέα και η αιθανόλη. Ως πρώτη ύλη χρησιμοποιούνται υποστρώματα τα οποία κατά τον καταβολισμό τους παράγουν ακετυλο-συνένζυμο Α (acetyl-CoA) και άρα είναι εφικτή η μετατροπή τους σε λιπαρά οξέα κατά τον μεταβολισμό [24].

Ο όρος λιπογένεση αφορά στη διαδικασία διαφοροποίησης των λιποκυττάρων κατά την ανάπτυξη του λιπώδους ιστού με τελικό σημείο τον φαινότυπο του ώριμου λιποκυττάρου. Η λιπογένεση θεωρείται μια δυναμική διαδικασία και είναι αποτέλεσμα της στρατολόγησης νέων λιποκυττάρων και αναφέρεται τόσο στον πολλαπλασιασμό όσο και στην διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων [25,26].

Ο σχηματισμός των λιποκυττάρων αρχίζει κατά την εμβρυογένεση, στα μέσα της κύησης, από το μέσο βλαστικό δέρμα (μεσόδερμα). Η ανάπτυξη του λευκού λιπώδους ιστού ολοκληρώνεται μετά την γέννηση [25,26]. Ο λιπώδης ιστός τελικά απαρτίζεται από ώριμα λιποκύτταρα, κύτταρα του ενδοθηλίου, ινοβλάστες καθώς και προ-λιποκύτταρα σε διάφορα στάδια διαφοροποίησης [27]. Οι διαδικασίες που σχετίζονται με την λιπογένεση διακρίνονται στην στρατολόγηση και τον πολλαπλασιασμό των βλαστικών κυττάρων και στην μετέπειτα διαφοροποίησή τους είτε προς λιποκύτταρα είτε προς αγγειακά κύτταρα. Ο πολλαπλασιασμός των προ-λιποκυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των κυττάρων του λιπώδους ιστού, ενώ κατά τη διαφοροποίηση αδιαφοροποίητα, πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα με μορφολογικά χαρακτηριστικά παρόμοια με τους ινοβλάστες εξέρχονται από τον κυτταρικό κύκλο και διαφοροποιούνται σε λειτουργικά ώριμα λιποκύτταρα [3,25,26].

Η ανάπτυξη του λιπώδους ιστού λαμβάνει χώρα καθόλη την διάρκεια ζωής ενός οργανισμού ως απόκριση στην φυσιολογική κυτταρική αντικατάσταση αλλά και στην ανάγκη για περαιτέρω δημιουργία αποθεμάτων λίπους, όταν η πρόσληψη θερμίδων υπερβαίνει τις φυσιολογικές διατροφικές απαιτήσεις [28,29,30].

Η διερεύνηση και αποσαφήνιση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην λιπογένεση κατέστησαν εφικτές μετά από μελέτες τόσο *in vitro* (σε πρωτογενείς καλλιέργειες όσο και σε

διάφορες κυτταρικές σειρές προ-λιποκυττάρων) αλλά και *in vivo* σε διαγονιδιακά ζώα. Οι πιο κοινά χρησιμοποιούμενες κυτταρικές σειρές είναι οι 3T3-L1, NIH3T3, Swiss 3T3 και 3T3-F442A, λευκών προ-λιποκυττάρων, και οι H1B-1B και HB2, φαιών λιποκυττάρων, οι οποίες προέρχονται από αθανатоποιημένα προλιποκύτταρα ποντικού [25,31]. Πρέπει να αναφερθεί ότι αν και τα κύτταρα των διαφόρων κυτταρικών σειρών *in vitro* εμφανίζουν σημαντικές διαφορές στο γονιδιακό προφίλ έκφρασης σε σχέση με τα λευκά λιποκύτταρα *in vivo*, σήμερα αποτελούν το καλύτερα μελετημένο μοντέλο λιπογένεσης και την κύρια πηγή συλλογής δεδομένων σχετικά με την φυσιολογία της.

2.2.1.1 Κυτταρικός πολλαπλασιασμός

Η αύξηση του αριθμού των λιποκυττάρων επιτυγχάνεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των πρόδρομων κυττάρων και πιο συγκεκριμένα των προ-λιποκυττάρων. Τα προ-λιποκύτταρα διατηρούν τον φαινότυπό τους αλλά και την ικανότητα τους να διαιρούνται καθόλη την διάρκεια ζωής ενός οργανισμού. Η ικανότητα διαίρεσης διατηρείται έως ένα βαθμό και στα μερικώς διαφοροποιημένα προ-λιποκύτταρα ενώ ακόμη δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως κατά πόσο αυτό συμβαίνει και στα ώριμα λιποκύτταρα [26]. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός κατά την λιπογένεση διακρίνεται σε δύο φάσεις. Η πρώτη λαμβάνει χώρα πριν από τον καθορισμό των μεσεγχυματικών κυττάρων ενώ η δεύτερη μετά τον καθορισμό και πριν από την διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων [32].

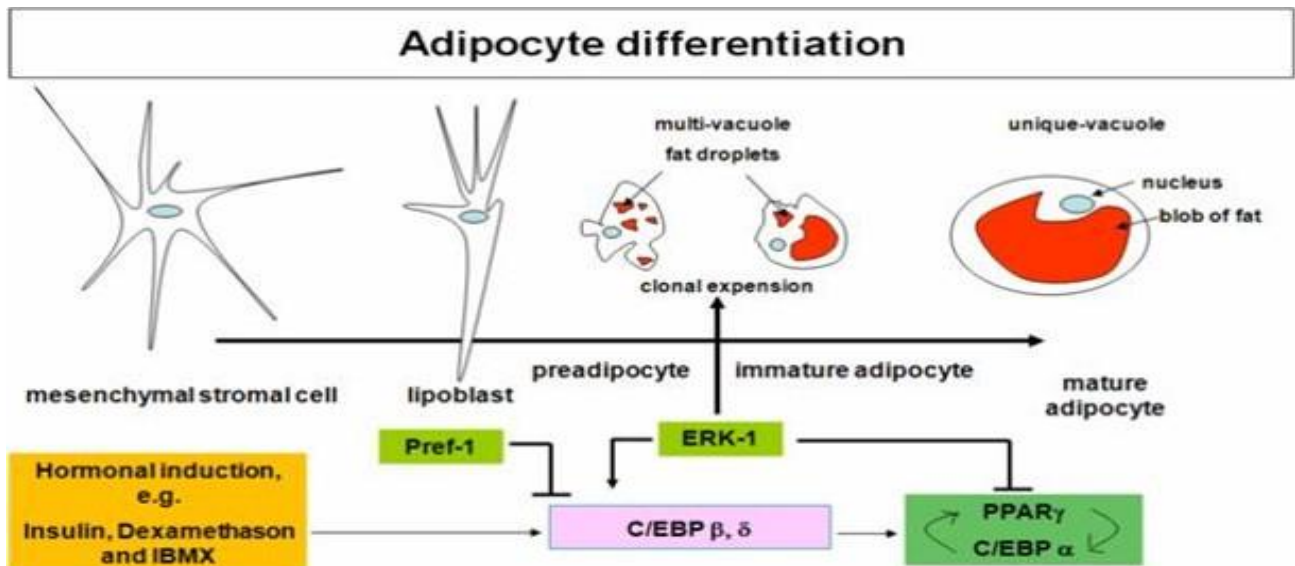
2.2.1.2 Καθορισμός – διαφοροποίηση

Ο λιπώδης ιστός αποτελεί πηγή πολυδύναμων μεσεγχυματικών κυττάρων. Κατά την διάρκεια ανάπτυξης του λιπώδους ιστού, την φάση του πολλαπλασιασμού των πολυδύναμων μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων διαδέχεται ο καθορισμός και στρατολόγηση ορισμένων εξ αυτών προς κύτταρα του λιπώδους ιστού. Ο καθορισμός αυτός σηματοδοτεί την μετατροπή του βλαστικού κυττάρου σε προ-λιποκύτταρο το οποίο παρουσιάζει ελάχιστες μορφολογικές διαφορές σε σχέση με το πρόδρομο κύτταρο ωστόσο έχει χάσει την ικανότητα διαφοροποίησης προς άλλους κυτταρικούς τύπους [33,34]. Κομβικό σημείο κατά την λιπογένεση θεωρείται η παύση της κυτταρικής διαίρεσης των προ-λιποκυττάρων. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας της διαφοροποίησης, το προ-λιποκύτταρο αποκτά πλέον όλα τα χαρακτηριστικά του ώριμου λιποκυττάρου. Η εξέλιξη των προ-λιποκυττάρων από την διαδικασία του κυτταρικού πολλαπλασιασμού έως και την μετατροπή τους σε ώριμα λιποκύτταρα είναι μια σύνθετη διεργασία η οποία εξαρτάται από πολυάριθμα ρυθμιστικά στοιχεία-μόρια ενώ

παράλληλα προϋποθέτει την επικοινωνία σηματοδοτικών μονοπατιών τόσο του κυτταρικού κύκλου όσο και παραγόντων κυτταρικής διαφοροποίησης [35].

2.2.1.3 Από τα πρόδρομα κύτταρα στα ώριμα λιποκύτταρα

Η μετάβαση από πολυδύναμο μεσεγχυματικό βλαστικό κύτταρο (multipotent mesenchymal stem cell) σε προ-λιποκύτταρο δεν εμπεριέχει ιδιαίτερες μορφολογικές μεταβολές. Η διαφοροποίηση ωστόσο καθώς και η διαδικασία της ωρίμανσης των λιποκυττάρων περιλαμβάνει σημαντικές μεταβολές τόσο στην μορφολογία όσο και στο βιοσυνθετικό δυναμικό των λιποκυττάρων. Τα προ-λιποκύτταρα έχουν περισσότερο αστεροειδές σχήμα ενώ όσο προχωρά η διαδικασία της διαφοροποίησης, το σχήμα τείνει να γίνει πιο σφαιρικό έχοντας την τάση αποθήκευσης λιπιδίων. Ακόμη, κατά την διαδικασία αυτή, τα κύτταρα αναπτύσσουν απαραίτητους μηχανισμούς οι οποίοι σχετίζονται με την ευαισθησία στην ινσουλίνη, την μεταφορά και σύνθεση λιπιδίων καθώς και την έκκριση πρωτεϊνών-μορίων χαρακτηριστικά των λιποκυττάρων. Στο αρχικό στάδιο, τα λιπίδια αποθηκεύονται σχηματίζοντας μικρά σταγονίδια λίπους ενώ καθώς προχωρά η διαφοροποίηση, τα σταγονίδια αυτά συντήκονται σχηματίζοντας μια μεγάλη λιπιδική σταγόνα η οποία συμπιέζει τον πυρήνα του λιποκυττάρου προς την περιφέρεια. Όταν η διαφοροποίηση ολοκληρωθεί τα λιποκύτταρα μπορούν να αυξάνουν σε μέγεθος και η συνεχής άθροιση λιπιδίων έχει ως αποτέλεσμα την υπερτροφία των λιποκυττάρων [32,36].



Εικόνα 2.2.1.3 Σχηματική αναπαράσταση της πορείας της λιπογένεσης από πρώιμα μεσεγχυματικά κύτταρα έως τα ώριμα λιποκύτταρα.

2.2.1.4 Εναρκτήρια σήματα στην διαφοροποίηση

Το ερέθισμα-σήμα το οποίο καθορίζει τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα προς προ-λιποκύτταρα δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί, ωστόσο έχει δειχθεί ότι ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αυτή διαδραματίζει η πρωτεΐνη BMP4 (Bone Morphogenetic Protein – 4), η οποία οδηγεί σε φωσφορυλίωση της Smad1 *in vitro*. Αξίζει να αναφερθεί ότι σε επίπεδο κυτταρικών σειρών, καθοριστικός παράγοντας για τον καθορισμό των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων προς συγκεκριμένους τύπους κυττάρων αποτελεί η πυκνότητα των κυττάρων [37]. Συνεπώς, τα μεσεγχυματικά κύτταρα έχουν την τάση να μετατραπούν σε λιποκύτταρα όταν η πυκνότητα είναι αυξημένη ενώ αντίθετα, σε μικρή πυκνότητα αποκτούν χαρακτηριστικά οστεοβλαστών.

Η μιτωτική κλωνική επέκταση και η αναστολή της αύξησης εξ επαφής έχει ως αποτέλεσμα την έξοδο των προ-λιποκυττάρων από τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G0/G1. Το γεγονός αυτό είναι προαπαιτούμενο για την τελική διαφοροποίηση των προλιποκυττάρων [38]. Μετά την ολοκλήρωση της κλωνικής επέκτασης, τα κύτταρα εισέρχονται σε μία φάση του κυτταρικού κύκλου, τη GD, στην οποία έχει ανασταλεί η ανάπτυξη, αλλά προάγεται η διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων. Στα 3T3-L1 προ-λιποκύτταρα η φάση αυτή χαρακτηρίζεται από μεταβολές στην έκφραση των αναστολέων των εξαρτώμενων από τις κυκλίνες -κινάσες (Cdk inhibitors) p18, p21 και p27 [39]. Η είσοδος στη φάση GD σηματοδοτεί τον καθορισμό των προ-λιποκυττάρων προς την τελική διαφοροποίηση. Η τελική διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων χαρακτηρίζεται από σημαντική αύξηση της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων PPAR γ και C/EBP α , οι οποίοι ενεργοποιούν την μεταγραφή πολυάριθμων γονιδίων που ευθύνονται για το φαινότυπο και τη φυσιολογία των ώριμων λιποκυττάρων [36]. Για την επαγωγή της έκφρασης αυτών των παραγόντων, απαραίτητη κρίνεται η πρότερη αύξηση του cAMP καθώς και η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα CREB (cAMP response element binding protein), ο οποίος με τη σειρά του αυξάνει την έκφραση του C/EBP β [40,41]. Ο C/EBP β και ο C/EBP δ αποτελούν μέλη της οικογένειας των CCAAT/Enhancer Binding Proteins, δηλαδή πρωτεϊνών που συνδέονται σε περιοχές που ενισχύουν την έκφραση γονιδίων. Τόσο ο C/EBP β όσο και ο C/EBP δ εκφράζονται πρώιμα κατά την τελική διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων και φαίνεται πως αποτελούν καθοριστικά εναρκτήρια σήματα της διαδικασίας [40,41].

2.2.1.5 Ενδοκυττάρια σηματοδότηση

Η διαδικασία της λιπογένεσης προϋποθέτει τον συντονισμό ενός πολύπλοκου γενετικού επαναπρογραμματισμού των κυττάρων, ο οποίος υπόκειται σε αυστηρό έλεγχο από παράγοντες όπως: ορμόνες, κυτταροκίνες, θρεπτικά συστατικά και διάφορα σηματοδοτικά μόρια. Τα σηματοδοτικά μόρια μεταβάλλουν την έκφραση ή την ενεργότητα μιας ποικιλίας μεταγραφικών παραγόντων, που ρυθμίζουν με την σειρά τους διεργασίες ανάπτυξης του λιπώδους ιστού. Έχει αναγνωριστεί μια σειρά μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι προάγουν ή αναστέλλουν την τον μηχανισμό της λιπογένεσης. Πληθώρα μελετών αποδεικνύουν πως οι παράγοντες αυτοί δρουν σε συνδυασμό ή/και διαδοχικά προκειμένου να ασκήσουν έλεγχο στα διάφορα στάδια της διαδικασίας [28,31,36].

Ομάδες μεταγραφικών παραγόντων, με διακριτές λειτουργίες, φαίνεται πως είναι σημαντικοί ρυθμιστές της διαδικασίας της λιπογένεσης. Σε αυτές περιλαμβάνονται οι CCAAT-enhancer binding proteins (C/EBP- α , - β και - δ), οι peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR- γ και - β / $-\delta$) και οι helix-loop-helix (SREBP-1c).

Οι C/EBPs αποτελούν οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων που προσδέονται σε CCAAT ενισχυτές και ανήκουν στην κατηγορία μεταγραφικών παραγόντων που σχηματίζουν μοτίβο φερμουάρ λευκίνης (leucine zipper), καθώς περιέχουν μια βασική καρβοξυτελική περιοχή (bZIP) πλούσια σε λευκίνη. Στη διαδικασία της λιπογένεσης φαίνεται πως εμπλέκονται τέσσερις ισομορφές αυτών οι οποίοι είναι οι C/EBP- α , - β , - δ και η CHOP-10 [25,33].

Έχει δειχθεί ότι οι C/EBP- β και C/EBP- δ διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως πρώιμοι ρυθμιστές της διαφοροποίησης των προ-λιποκυττάρων και της ανάπτυξης του λιπώδους ιστού, καθώς επάγονται πολύ νωρίς μετά την έναρξη της διαφοροποίησης. Τα μόρια αυτά προάγουν την λιπογένεση ενώ επιπλέον επηρεάζουν τον αριθμό των λιποκυττάρων του λιπώδους ιστού [42].

Ο C/EBP- α αποτελεί πλειοτροπικό μεταγραφικό παράγοντα, που ενεργοποιεί πολλά γονίδια ιστοειδικά των λιποκυττάρων [36]. Ο C/EBP- α προάγει την λιπογένεση σε μεταγενέστερο στάδιο από τους - β και - δ , από τους οποίους επάγεται και ο ίδιος. Το γεγονός αυτό πιθανόν συμβαίνει προκειμένου να προστατευθούν τα πολλαπλασιαζόμενα, κατά την κλωνική επέκταση, προ-λιποκύτταρα από την αντι-μιτωτική δράση του C/EBP- α [42]. Επιπλέον, ο C/EBP- α έχει

την ικανότητα να καθορίζει και άλλες μεσεγγυματικές κυτταρικές σειρές, όπως η ινοβλαστική NIH-3T3, προς ώριμα λιποκύτταρα [25].

Τέλος, η CHOP-10 (C/EBP Homologous Protein-10) περιλαμβάνει υπολείμματα προλίνης και γλυκίνης στην περιοχή σύνδεσης με το DNA, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η ικανότητα σύνδεσής της σε αυτό. Έτσι, σχηματίζοντας ετεροδιμερή με τον C/EBP-β δεν επιτρέπει την πρόσδεση του τελευταίου στο DNA και την εκδήλωση της δράσης του. Αποτελεί, λοιπόν, έναν αρνητικό ρυθμιστικό παράγοντα στη διαδικασία της λιπογένεσης [36].

Οι PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) ανήκουν σε μια οικογένεια πυρηνικών υποδοχέων ορμονών που περιλαμβάνει τους υποδοχείς ρετινοϊκού οξέος, τους υποδοχείς θυρεοειδικών ορμονών και τους υποδοχείς της βιταμίνης D3[43]. Ως πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών, ενεργοποιούνται από τα συνδεδεμένα σε αυτούς μόρια με στόχο τον έλεγχο της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων. Ο PPAR-α, έχει δειχθεί ότι επάγει τον πολλαπλασιασμό των υπεροξεισωμάτων, ενώ αντίθετα οι PPAR-γ και PPAR-δ (ή PPARβ) δεν εμφανίζουν τέτοια δράση [44]. Οι τρεις ισότυποι αποτελούνται α) από μια ελάχιστα συντηρημένη αμινοτελική περιοχή που επιτελεί μια ανεξάρτητη από το πρόσδεμα λειτουργία trans-ενεργοποίησης, β) από μια κεντρική, υψηλά συντηρημένη, περιοχή με ικανότητα σύνδεσης στο DNA και γ) από μια καρβοξυτελική περιοχή με λειτουργία trans-ενεργοποίησης εξαρτώμενη από το πρόσδεμα. Οι PPARs σχηματίζουν ετεροδιμερή με τους RXRs (cis-retinoid X receptors) και όλο το μεταγραφικό σύμπλεγμα προσδένεται στην PPRE (PPAR-response element) αλληλουχία του DNA. Το αποτέλεσμα της σύνδεσης αυτής είναι η επαγωγή της μεταγραφής γονιδίων-στόχων, που περιλαμβάνουν και γονίδια του μεταβολισμού των λιπιδίων μεταξύ άλλων, όπως του μεταφορέα των λιπαρών οξέων, της Acyl-CoA συνθετάσης και οξειδάσης [45].

Οι PPAR-γ και PPAR-δ εκφράζονται τόσο στο λευκό όσο και το φαιό λιπώδη ιστό και μάλιστα η έκφρασή τους αυξάνει με διαφορετική χρονικά έναρξη. Ο PPAR-δ εκφράζεται κατά την κλωνική επέκταση των προ-λιποκυττάρων και εμφανίζει τη μέγιστη έκφραση μετά την αναστολή εξ επαφής (κυτταρική επαφή), ενώ ο PPAR-γ επάγεται προς το τέλος της κλωνικής επέκτασης και εμφανίζει το μέγιστο της έκφρασής του στα τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα (terminal differentiation) [27].

Ο PPAR- γ αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της ανάπτυξης του λιπώδους ιστού τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, και θεωρείται ικανός και αναγκαίος μεταγραφικός παράγοντας προαγωγής της λιπογένεσης [28]. Η ικανότητα αυτή δεν περιορίζεται μόνο στην προαγωγή της διαφοροποίησης των προ-λιποκυττάρων του λιπώδους ιστού, αλλά και στην κινητοποίηση κυκλοφορούντων πρόδρομων κυττάρων μυελικής προέλευσης στο λιπώδη ιστό και διαφοροποίηση αυτών προς ώριμα λιποκύτταρα [46]. Ο PPAR- γ εμφανίζεται σε δύο ισομορφές, τις PPAR- γ 1 και PPAR- γ 2, οι οποίες προκύπτουν από χρήση διαφορετικού προαγωγέα και εναλλακτική συρραφή μετα-φραστικά. Για την εξέλιξη και διεκπεραίωση της λιπογένεσης, σημαντικότερος θεωρείται ο ρόλος του PPAR- γ 2, ο οποίος εκφράζεται ειδικότερα στο λιπώδη ιστό σε σχέση με τον PPAR- γ 1 [47,48].

Ο PPAR- γ αποτελεί κεντρικό ρυθμιστικό μόριο πολλών σηματοδοτικών μονοπατιών τα οποία εμπλέκονται στην λιπογένεση υποδεικνύοντας έτσι τον κομβικό ρόλο του μορίου αυτού στην συγκεκριμένη διαδικασία. Οι C/EBPs και συγκεκριμένα οι - β και - δ που αυξάνουν κατά την έναρξη της λιπογένεσης επάγουν την έκφραση τόσο του C/EBP α όσο και του PPAR- γ , ενώ και οι δύο οδηγούν στην ολοκλήρωση της διαδικασίας (terminal differentiation). Πολυάριθμα ρυθμιστικά σήματα της λιπογένεσης, όπως τα γλυκοκορτικοειδή και η GH φαίνεται πως ασκούν τη δράση τους μέσω επαγωγής των C/EBPs και επακόλουθης αύξησης της έκφρασης του PPAR- γ [49]. Ο PPAR- δ , ο οποίος επάγεται από λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας (Long Chain Fatty Acids), διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της τελικής διαφοροποίησης των προ-λιποκυττάρων, μέσω της επαγωγής της έκφρασης του γονιδίου του PPAR- γ . Το γεγονός αυτό εξηγεί της επίδραση της υψηλής σε λιπαρά οξέα δίαιτας στην υπερτροφική ανάπτυξη του λιπώδους ιστού [50]. Επιπρόσθετα, ο PPAR- γ , όπως και ο C/EBP α , εμφανίζει σημαντική αντιμιτωτική δράση, ενώ αντίθετα ο PPAR- δ επιδρά θετικά στον πολλαπλασιασμό των προ-λιποκυττάρων. Συνεπώς, η συνδυαστική και διαδοχική δράση των PPAR- δ και - γ , όπως και των C/EBPs ενέχεται αρχικά στην κλωνική επέκταση των προ-λιποκυττάρων και στη συνέχεια στην αναστολή του πολλαπλασιασμού και την τελική διαφοροποίηση [27]. Επιπλέον, παρατηρείται θετική και αμφίδρομη αλληλεπίδραση στην έκφραση μεταξύ των PPAR- γ και C/EBP α [36]. Αξίζει να αναφερθεί ότι η έκφραση και ενεργοποίηση του PPAR- γ επηρεάζεται θετικά από τον μεταγραφικό παράγοντα ιδιαίτερα όταν πρόκειται για εξωκυττάρια ερεθίσματα όπως η ινσουλίνη. Ο ADD-1 ή αλλιώς SREBP-1c ανήκει στην οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων Sterol Regulatory Elements Binding Proteins (SREBPs), η οποία περιλαμβάνει βασικούς

μεταγραφικούς παράγοντες με μοτίβο έλικας-βρόχου-έλικας-φερμουάρ λευκίνης. Οι SREBPs σχετίζονται με τη ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων σημαντικών για το μεταβολισμό της χοληστερόλης και των λιπαρών οξέων [51]. Ο ADD-1 (adipocyte determination and differentiation-dependent factor 1) εμπλέκεται στη μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων της λιπογένεσης τα οποία κωδικοποιούν για ένζυμα της σύνθεσης, αναγωγής και οξειδωσης των λιπαρών οξέων, καθώς και της σύνθεσης των τριακυλογλυκερολών. Έχει δείχθει ότι η αύξηση των επιπέδων του mRNA του ADD-1 παρατηρείται κυρίως στα πρώιμα στάδια της διαφοροποίησης, καταδεικνύοντας το σημαντικό του ρόλο στην λιπογένεση. Επιπλέον, ο ADD-1 προάγει την έκφραση γονιδίων που επάγονται από τον PPAR-γ, καθώς αυξάνει τόσο την έκφραση του συγκεκριμένου μορίου, όσο και την ενεργότητά του [35]. Η ρύθμιση της έκφρασης του ADD-1 φαίνεται να σχετίζεται και με την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου. Η ινσουλίνη και το θετικό ενεργειακό ισοζύγιο επάγουν την έκφρασή του, ενώ το χαμηλό ενεργειακό ισοζύγιο την ελαττώνει [52].

Οι Krüppel-like παράγοντες (KLFs) αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων, δακτυλίου ψευδαργύρου. Η παρουσία τους σχετίζεται με την ρύθμιση της απόπτωσης, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού αλλά και της διαφοροποίησης. Το προφίλ της έκφρασης των γονιδίων των KLFs κατά τη διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων, αλλά και η επίδρασή τους στην ανάπτυξη και τη γονιδιακή έκφραση των λιποκυττάρων υποδεικνύουν την ύπαρξη ενός καταρράκτη γεγονότων κατά την λιπογένεση όπου δρουν οι KLFs. Κατά συνέπεια, ο KLF15 επάγει την έκφραση του γλυκοζομεταφορέα GLUT4 ενώ συμμετέχει στην προαγωγή της λιπογένεσης [53]. Ο KLF5 επάγεται νωρίς κατά τη διαδικασία από τους C/EBP-β και -δ και με τη σειρά του ενεργοποιεί τον προαγωγέα του PPAR- γ2 [54]. Επιπρόσθετα, ο παράγοντας KLF6 δρα θετικά στη διαδικασία της λιπογένεσης, ενώ οι KLF2 και KLF7 έχουν αντίθετη δράση, πιθανότατα μέσω καταστολής του προαγωγέα του PPAR-γ2. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το γεγονός ότι οι KLF παράγοντες αντικαθιστούν ο ένας τον άλλο κατά την διάρκεια της λιπογένεσης. Παράλληλα, η στρατολόγηση διαφορετικών συν-ενεργοποιητών και συν-καταστολέων του προαγωγέα του γονιδίου του PPAR-γ2 από τους διαφορετικούς παράγοντες ενδέχεται να συμβάλει στην τροποποίηση της ενεργότητάς του [54]. Οι X ηπατικοί υποδοχείς LXRs (Liver X Receptors) αποτελούν ρυθμιστές της ομοιοστασίας της χοληστερόλης, των λιπιδίων αλλά και της γλυκόζης. Ο LXRβ εκφράζεται σταθερά τόσο σε προ-λιποκύτταρα

όσο και σε λιποκύτταρα, ενώ η έκφραση του LXRα επάγεται κατά τη διαφοροποίηση των προλιποκυττάρων. Ωστόσο δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί ο ακριβής ρόλος των παραγόντων αυτών στην λιπογένεση[33].

Τουλάχιστον 100 ακόμη μεταγραφικοί παράγοντες φαίνεται πως δρουν ρυθμιστικά κατά την διάρκεια της λιπογένεσης. Ιδιαίτερο ρόλο κατέχει ο Krox20 (ή early growth response protein-2) ο οποίος φαίνεται να προάγει την λιπογένεση στα πρώιμα στάδια μέσω αύξησης της έκφρασης του C/EBPβ. Επιπλέον, ο EBF1 (early B-cell factor), μπορεί να καθορίζει την λιπογένεση σε κυτταρικές σειρές ινοβλαστών *in vitro*[55]. Στους μεταγραφικούς αυτούς παράγοντες ανήκουν και οι EPAS1, STAT5a, CREB και BMAL1 [33]. Για την ολοκλήρωση της λιπογένεσης στον λευκό λιπώδη ιστό απαιτείται η δράση των S6K1 και 4E-BP1, οι οποίοι ενδέχεται να αποτελούν αναστολείς της λιπογένεσης στον φαιό λιπώδη ιστό. Η S6K1 είναι κινάση που σχετίζεται με την ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που ενεργοποιείται από τον mTOR, ενώ η 4E-BP1 είναι πρωτεΐνη που συνδέεται στον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης της μεταγραφής 4E (4E-Binding Protein 1). Έχει δειχθεί ότι knock-out για αυτή πειραματόζωα έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη ανάπτυξη λευκού λιπώδους ιστού και αυξημένη έκφραση, από τα πολύχρωρα λιποκύτταρα που αναπτύσσονται, των UCP1 και PGC-1α, και που είναι χαρακτηριστικά του φαιού λιπώδους ιστού. Μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος, όπως οι pRB και p107 φαίνεται πως ενισχύουν την λιπογένεση στο λευκό λιπώδη ιστό έναντι του φαιού [56]. Μεγάλος αριθμός μεταγραφικών παραγόντων αναστέλλουν την λιπογένεση, όπως είναι οι CHOP, KLF2 και KLF7, οι οποίοι προαναφέρθηκαν, αλλά και μέλη των οικογενειών μεταγραφικών παραγόντων GATA-binding και forkhead. Πρέπει ωστόσο να αναφερθεί ότι η έκφραση πολλών εξ αυτών, οι οποίοι θα οδηγούσαν τα κύτταρα προς άλλη κατεύθυνση, καταστέλλεται από θετικούς ρυθμιστές της λιπογένεσης, προκειμένου να ολοκληρωθεί η διαδικασία. Ακόμη, μια πληθώρα παραγόντων οι οποίοι επιδρούν αρνητικά στην ανάπτυξη του λιπώδους ιστού δε συνδέονται απευθείας στο DNA, αλλά καταστέλλουν τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Πιο συγκεκριμένα, οι GATA παράγοντες, πρωτεΐνες με μοτίβο δακτυλίου ψευδαργύρου οι οποίες εμπλέκονται στην αιμοποίηση και την ανάπτυξη του ουρογεννητικού συστήματος, καταστέλλονται κατά την λιπογένεση και ειδικότερα η υπερέκφραση του GATA2 ελαττώνει τα επίπεδα της λιπογένεσης. Παρόλο που η δράση των GATA μπορεί να εκδηλωθεί με απευθείας σύνδεση και αναστολή του προαγωγέα του γονιδίου του PPAR-γ2, μια μεταλλαγμένη μορφή του GATA2 που δε συνδέεται με το DNA ασκεί τη

δράση της μέσω σύνδεσης με τους C/EBPs, αναστέλλοντας την ικανότητά τους να ενεργοποιήσουν τον προαγωγέα του PPAR- γ 2 γονιδίου. Ακόμη, ο Foxc2 είναι μεταγραφικός παράγοντας που κατέχει σημαντικό ρόλο στην λιπογένεση, πιθανότατα δρώντας ανασταλτικά κατά την λιπογένεση του λευκού λιπώδη ιστού [57]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι πυρηνικοί συμπαράγοντες που συμβάλλουν στη φυσιολογική και αναπτυξιακή ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Οι συμπαράγοντες αυτοί δε συνδέονται απευθείας στο DNA, αλλά συμμετέχουν στο σχηματισμό μεγάλων συμπλόκων είτε μεταγραφικά ενεργών (συν-ενεργοποιητές) είτε μεταγραφικά ανενεργών (συν-καταστολείς), τα οποία μεσολαβούν την σύνδεση των μεταγραφικών παραγόντων στη βασική μεταγραφική μηχανή. Ορισμένοι συμπαράγοντες οδηγούν σε άμεση τροποποίηση της χρωματίνης. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν οι ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών HAT (CBP, p300) και οι ATP-εξαρτώμενες πρωτεΐνες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης της οικογένειας SWI/SNF (BRG1, BRM). Οι συμπαράγοντες που δεν εμφανίζουν ενζυμική δράση, λειτουργούν ως σημεία στρατολόγησης τροποποιητών της χρωματίνης. Πολλοί συν-ενεργοποιητές, μεταξύ των οποίων και μέλη της οικογένειας p160, δρουν με παρόμοιο τρόπο, ενώ παράλληλα διατηρούν μερική ενεργότητα HAT. Γενικότερα, οι συμπαράγοντες που σχετίζονται με μεταγραφικούς παράγοντες που ευνοούν την λιπογένεση έχουν θετική δράση στη διαδικασία. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται οι CBP (CREB-binding protein), p300, BRG1 και BRM, των οποίων η έκφραση διαδραματίζει κομβικό ρόλο στην διεκπεραίωση της λιπογένεσης [58]. Συμπαράγοντες όπως οι TRAP220/PBP (PPAR-binding protein) και PRIP (PPAR interacting protein) έχουν επίσης δράση συν-ενεργοποιητή και είναι απαραίτητοι για την εξέλιξη της λιπογένεσης, ενώ οι συν-καταστολείς NCoR (nuclear receptor co-repressor) και SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors) εμφανίζουν ανασταλτική δράση και απαιτείται ελάττωση της έκφρασής τους προκειμένου να ολοκληρωθεί η διαφοροποίηση [59]. Επιπρόσθετα, κάποιοι συμπαράγοντες εμφανίζουν συγκεκριμένο πρότυπο έκφρασης κατά την λιπογένεση. Ειδικότερα, οι ETO και HDACs, που δρουν ως συν-καταστολείς και αναστέλλουν τη διαφοροποίηση, τα επίπεδά τους ελαττώνονται κατά την λιπογένεση. Αντίθετα, η SIRT1, μέλος των σιρτουϊνών (sirtuins) που εμφανίζουν HDAC ενεργότητα, φαίνεται να αναστέλλει την λιπογένεση και εμφανίζει αυξημένη έκφραση κατά τη διαφοροποίηση. Τέλος, ο TAF-8 (TATA-binding protein-associated factor 8) που ανήκει στο TFIID σύμπλεγμα βασικών παραγόντων που συνδέονται στον προαγωγέα, εμφανίζει ιστο-ειδική έκφραση και επάγεται κατά

την λιπογένεση, χωρίς ωστόσο να έχει αποσαφηνιστεί με ποιους μεταγραφικούς παράγοντες αλληλεπιδρά [60]. Έχει δειχθεί επίσης ότι πρωτεΐνες των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου μπορούν να δράσουν ως συμπαραγόντες στην λιπογένεση. Πιο συγκεκριμένα, η CDK6 (cyclin dependent kinase-6) όταν συνδέεται με την κυκλίνη D3 φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον PPAR- γ προάγοντας τη διαδικασία, ενώ η CDK4 εμφανίζει παρόμοια δράση, χωρίς ωστόσο να φωσφορυλιώνει τον PPAR- γ . Στα πλαίσια αυτά, η κυκλίνη D1 καταστέλλει την ενεργότητα του PPAR- γ και αναστέλλει τη διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων [61].

Οι συμπαραγόντες, ωστόσο, μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο και στον καθορισμό της τύχης των κυττάρων. Σημαντική είναι η αναφορά των συμπαραγόντων HIC5, TAZ (transcriptional co-activator with PDZ-binding motif), TIP1 (tension-induced/inhibited protein-1) και TIP3 που εμπλέκονται στη διαδικασία της αδιπογένεσης. Πιο ειδικά, ο HIC5 συνδέεται στον PPAR- γ στο επιθήλιο του παχέος εντέρου όπου εκφράζεται κυρίως ο PPAR- γ 1, αλλά όχι άλλοι λιποκυτταρικοί δείκτες. Ωστόσο, τα επίπεδα του HIC5 ελαττώνονται κατά την λιπογένεση, σε σχέση με εκείνα των συμπαραγόντων που την ευνοούν, όπως ο TRAP220. Επιπλέον, η υπερέκφρασή του HIC5 αναστέλλει την λιπογένεση και επάγει την έκφραση επιθηλιακών δεικτών στα 3T3-L1 κύτταρα. Κατά συνέπεια, η παρουσία κάποιων συμπαραγόντων μπορεί να είναι καθοριστική για την κατεύθυνση που θα προσδώσει ο ίδιος μεταγραφικός παράγοντας στα διαφοροποιούμενα κύτταρα. Έχει επίσης παρατηρηθεί η ικανότητα στροφής των κυττάρων προς συγκεκριμένη κατεύθυνση από τον ίδιο συμπαραγόντα, ανάλογα με το μεταγραφικό παράγοντα στον οποίο συνδέεται. Ο TAZ δρα ως συν-καταστολέας του προαγωγέα του PPAR γ , αναστέλλοντας την λιπογένεση, ενώ δρα ως συν-ενεργοποιητής του RUNX2, προάγοντας τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών [61]. Επιπλέον, η περιβαλλοντική επίδραση, μέσω επιλεκτικής επαγωγής πυρηνικών συμπαραγόντων, μπορεί να επηρεάσει τον καθορισμό των κυττάρων. Η διάταση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων επάγει την έκφραση της TIP1 και καταστέλλει την έκφραση της TIP3. Η TIP1 αποτελεί σήμα για διαφοροποίηση σε λεία μυϊκά κύτταρα, αφού ευνοεί τη δράση HAT σε προαγωγείς γονιδίων που συμβάλλουν στη μυογένεση, ενώ η TIP3 συμβάλλει στην ακετυλίωση του προαγωγέα του PPAR- γ και άρα προάγει την λιπογένεση. Τέλος, μέλη της οικογένειας συμπαραγόντων p160 και ειδικότερα ο steroid-receptor co-activator-2 (SRC2/TIF2) και ο SRC-1 διαδραματίζουν ενδεχομένως ρόλο στην ανάπτυξη τόσο του λευκού, όσο και του φαιού λιπώδους ιστού.

2.2.1.6 Έλεγχος της λιπογένεσης

Για την ολοκλήρωση της λιπογένεσης, απαιτείται η συντονισμένη και διαδοχική ενεργοποίηση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων. Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες ενεργοποιούνται και δρουν ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης σηματοδοτικών μονοπατιών. Η ενεργοποίηση των μονοπατιών έρχεται ως αποτέλεσμα ποικίλων ερεθισμάτων, συνθηκών και παραγόντων τόσο εξωκυττάρων όσο και ενδοκυττάρων με στόχο την επαγωγή της κυτταρικής διαφοροποίησης. Πολυάριθμοι σηματοδοτικοί καταρράκτες επηρεάζουν τη διαδικασία της λιπογένεσης, ενώ παράλληλα η ενεργοποίηση των ίδιων των μονοπατιών εξαρτάται από πληθώρα εξωκυττάρων σημάτων.

Σημαντικό ρόλο σε ότι αφορά στην μοίρα των κυττάρων με μεσεγχυματική προέλευση διαδραματίζει το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt. Οι πρωτεΐνες Wnt ανήκουν στην οικογένεια των εκκρινόμενων γλυκοπρωτεϊνών και η δράση τους σχετίζεται με την κυτταρική ανάπτυξη. Ο τρόπος που δρουν είναι είτε αυτοκρινής είτε παρακρινής. Έχειδειχθεί ότι το μονοπάτι Wnt μπορεί να αναστέλλει την *in vitro* επαγωγή της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων μέσω καταστολής της έκφρασης τόσο του PPAR- γ όσο και του C/EBP α . Αντίστοιχα, η αναστολή της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού αυτού μονοπατιού έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της διαφοροποίησης των προ-λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα. Η πρωτεΐνη WNT10b ενισχύει την οστεοβλαστογένεση σε βάρος της λιπογένεσης και η έκφρασή της είναι ιδιοστατική στα προ-λιποκύτταρα και δεν εκφράζεται καθόλου στα ώριμα λιποκύτταρα. Αξίζει να αναφερθεί ότι *in vivo* σε διαγονιδιακά ζώα η έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης έχει ως αποτέλεσμα της μείωσης της μάζας του λευκού λιπώδους ιστού κατά 50% και πλήρη απουσία του φαιού λιπώδους ιστού. Η πρωτεΐνη WNT5b εκφράζεται κατά διαστήματα κατά την διάρκεια της λιπογένεσης και έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της διαφοροποίησης των προ-λιποκυττάρων. Επιπλέον, οι WNT10a και WNT6 διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη του φαιού λιπώδους ιστού. Η β -κατενίνη, αποτελεί μόριο τελεστή των πρωτεϊνών Wnt και η αλληλεπίδρασή της με τους μεταγραφικούς παράγοντες TCF/LEF έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της λιπογένεσης. Η χαμηλή έκφραση της β -κατενίνης κατά την αναγέννηση των μυϊκών ινών μπορεί να προσδώσει χαρακτηριστικά ώριμων λιποκυττάρων [62].

Ένα ακόμη μονοπάτι το οποίο λειτουργεί ρυθμιστικά στην επαγωγή της κυτταρικής διαφοροποίησης των λιποκυττάρων είναι το σηματοδοτικό μονοπάτι hedgehog. Οι πρωτεΐνες

hedgehog στα θηλαστικά δρουν μέσω των PTC (patched) υποδοχέων απελευθερώνοντας τη πρωτεΐνη SMO (smoothened). Η πρωτεΐνη αυτή ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση μέσω ενεργοποίησης πρωτεϊνών μελών της οικογένειας GLI .

Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο κατά την λιπογένεση διαδραματίζει η ινσουλίνη. Έχει δειχθεί ότι κατά τα τελικά στάδια της κυτταρικής διαφοροποίησης των λιποκυττάρων λαμβάνει χώρα η έκφραση των υποδοχέων της ινσουλίνης. Πριν από τα τελικά αυτά στάδια, η ινσουλίνη δρα κυρίως ενεργοποιώντας τους υποδοχείς του IGF-1 (insulin-like growth factor-1). Τα προλιποκύτταρα εκφράζουν περισσότερους IGF-1 υποδοχείς σε σχέση με αυτούς για την ινσουλίνη. Κατά την διάρκεια της λιπογένεσης παρατηρείται αλλαγή στον λόγο των υποδοχέων αυτών με τους υποδοχείς της ινσουλίνης να αυξάνονται καθώς οι υποδοχείς IGF-1 αυξάνονται. Η παρουσία της ινσουλίνης όχι μόνο επάγει την διαδικασία της λιπογένεσης αλλά θεωρείται απαραίτητη για την ωρίμανση των προ-λιποκυττάρων σε ώριμα και λειτουργικά λιποκύτταρα. Η ινσουλίνη λοιπόν αυξάνει το ποσοστό των κυττάρων τα οποία διαφοροποιούνται και ρυθμίζει το ποσοστό των παραγόμενων λιπιδίων στα διάφορα στάδια της λιπογένεσης. Οι παράγοντες PPAR γ και C/EBP α ενεργοποιούνται επίσης μέσω ενεργοποίησης του υποδοχέα IGF1-R. Επίσης, συστατικά του σηματοδοτικού καταρράκτη ινσουλίνης/IGF1 είναι σημαντικά για τη διαδικασία της λιπογένεσης. Απομάκρυνση των υποστρωμάτων του υποδοχέα της ινσουλίνης IRS-1, IRS-3, IRS-2 ή IRS-4 έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της διαφοροποίησης ενώ το ίδιο ισχύει σε περίπτωση αναστολής των πρωτεϊνών PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase) και AKT1/PKB και AKT2/PKB (protein kinase B).

Στην λιπογένεση, ακόμη, εμπλέκεται και ο mTOR ο οποίος δρα ως μόριο τελεστής του μονοπατιού IGF/ινσουλίνης [63]. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα σήματα που ξεκινούν από την ινσουλίνη ή τον IGF1 επηρεάζουν τη διαδικασία της λιπογένεσης με πολλαπλούς τρόπους.

Η επίδραση των ορμονών κατά την διάρκεια της λιπογένεσης περιλαμβάνει κυρίως την παρουσία των γλυκοκορτικοειδών. Η δεξαμεθαζόνη (dexamethazone) αποτελεί ένα συνθετικό γλυκοκορτικοειδές και θεωρείται το συχνότερα χρησιμοποιούμενο μόριο κατά την ωρίμανση των προ-λιποκυττάρων σε λιποκύτταρα παρουσία της ινσουλίνης *in vitro*. Η δράση της δεξαμεθαζόνης σχετίζεται με την επαγωγή της έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι είναι κομβικοί για την διεκπεραίωση της αδιπογένεσης όπως ο PPAR- γ και οι C/EBPs. Η δράση της γίνεται έκδηλη μετά τη σύνδεσή της στους κυτταροπλασματικούς υποδοχείς των

γλυκοκορτικοειδών. Οι υποδοχείς αυτοί εισέρχονται στον πυρήνα, όπου είτε αλληλεπιδρούν απευθείας με ρυθμιστικά στοιχεία (glucocorticoid response elements) των γονιδίων-στόχων, είτε μεταβάλλουν άμεσα την έκφραση άλλων μεταγραφικών παραγόντων, όπως οι c-myc και c-jun, και έμμεσα των γονιδίων-στόχων. Αρχικά, η δεξαμεθαζόνη επάγει την έκφραση του C/EBPδ, το οποίο με την σειρά του επάγει την έκφραση του C/EBPα οδηγώντας στην ωρίμανση των προ-λιποκυττάρων. Ο ρόλος των γλυκοκορτικοειδών στην επαγωγή της κυτταρικής ωρίμανσης μάλλον είναι βέβαιος και μάλιστα το σηματοδοτικό μονοπάτι που μεσολαβεί την διαδικασία καταλήγει σε επαγωγή της έκφρασης του C/EBPδ [64].

Άλλη ορμόνη η οποία ενδέχεται να έχει επίδραση στην λιπογένεση είναι η αυξητική ορμόνη GH ωστόσο η δράση της κατά την διαδικασία αυτή δεν είναι ακόμα αποσαφηνισμένη. Έχει παρατηρηθεί ότι η ορμόνη αυτή δρα μέσω κοινών μονοπατιών με την ινσουλίνη αλλά και άλλες ορμόνες και το γεγονός αυτό δυσχεραίνει την αποσαφήνιση της δράσης της στην ωρίμανση των προ-λιποκυττάρων. Έχει δειχθεί ότι, η GH προάγει τη λιπόλυση *in vivo* και τη λιπογένεση *in vitro* ωστόσο ο ρόλος της στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως.

Η ορμόνη θυροξίνη (T4) αποτελεί έναν ακόμα πιθανό παράγοντα ρύθμισης της λιπογένεσης. Δεδομένα υποστηρίζουν ότι ο μηχανισμός δράσης της σχετίζεται με την τροποποίηση της παραγωγής IGF αλλά και πρωτεϊνών που συνδέουν τον IGF σε διάφορα υποστρώματα. Επιπρόσθετα, η θυροξίνη πιθανόν να επάγει την έκφραση του γονιδίου της UCP1, ρυθμίζοντας έτσι θετικά την λιπογένεση του φαιού λιπώδους ιστού[31,32].

Μέλη της υπερικογένειας πρωτεϊνών του transforming growth factor-β, TGFβ, BMPs (bone morphogenetic proteins) και η μυοστατίνη ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση πολλών κυτταρικών τύπων, συμπεριλαμβανομένων των λιποκυττάρων. Η δράση τους μετά τη σύνδεση με τους υποδοχείς τους επιτελείται μέσω κοινών μονοπατιών (εξαρτώμενων ή μη από SMADs), αλλά τα διάφορα μέλη της οικογένειας μπορούν να καθορίσουν διαφορετικά την τύχη των κυττάρων. Υπερέκφραση του TGFβ αναστέλλει την λιπογένεση ενώ αναστολή της έκφρασής του ρυθμίζει θετικά την διαδικασία. Το μόριο τελεστής του TGFβ SMAD3 συνδέεται στους C/EBPs και αναστέλλει τον μεταγραφικό τους ρόλο, συνεπώς και την έκφραση του PPAR-γ2. Ο ρόλος της μυοστατίνης φαίνεται πως είναι περισσότερο πολύπλοκος και μη αποσαφηνισμένος, καθώς άλλοτε ενισχύει και άλλοτε αναστέλλει την λιπογένεση *in vitro*. Τα αντικρουόμενα αυτά

αποτελέσματα οφείλονται κυρίως στις συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων αλλά και στον κυτταρικό τύπο που χρησιμοποιείται.

Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την λιπογένεση είναι πρωτεΐνες BMPs οι οποίες έχουν ποικίλη δράση σε κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης. Η δράση τους εξαρτάται από την ίδια την πρωτεΐνη, την συγκέντρωσή της τον κυτταρικό τύπο καθώς και τη παρουσία άλλων ρυθμιστικών παραγόντων. Πιο ειδικά, η BMP4 έχει την ικανότητα να κατευθύνει πολυδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα προς λιποκύτταρα, ενώ η δράση της BMP2 είναι πιο πολύπλοκη και εξαρτάται σημαντικά από την παρουσία και άλλων σηματοδοτικών μορίων. Η BMP2 διεγείρει την λιπογένεση σε εμβρυικά βλαστικά κύτταρα παρουσία ινσουλίνης και TGFβ. Ακόμη, η BMP2 παρουσία ρετινοϊκού οξέος οδηγεί οστεοβλαστογένεση των προλιποκυττάρων 3T3-F442A παρατήρηση η οποία πιθανόν οφείλεται στην επαγωγή του συμπαραγόντα TAZ. Επίσης, το μόριο του σηματοδοτικού μονοπατιού των BMPs, Schnurri-2 (SHN2) φαίνεται πως είναι απαραίτητο στη διαδικασία της λιπογένεσης, καθώς η BMP2 προκαλεί μετακίνησή του στον πυρήνα, όπου προσελκύει τις SMAD1, SMAD4 και C/EBP-α στον προαγωγέα του PPAR-γ με αποτέλεσμα την έκφραση του γονιδίου του [38].

Σημαντικό ρόλο επίσης στην λιπογένεση φαίνεται πως διαδραματίζουν οι αυξητικοί παράγοντες των ινοβλαστών (FGFs). Έχειδειχθεί ότι ο FGF2 επάγει την ανάπτυξη του λιπώδους ιστού. Παρόμοια δράση εμφανίζει και ο FGF1, ο οποίος παράγεται από ενδοθηλιακά κύτταρα της μικροκυκλοφορίας και από προ-λιποκύτταρα *in vitro*. Ακόμη, ο FGF10 που ανήκει και αυτός στην οικογένεια των FGFs, παράγεται από κύτταρα του στρώματος του λευκού λιπώδους ιστού και επάγεται κατά την λιπογένεση *in vitro*[65].

Διαμεμβρανικοί υποδοχείς, όπως ο Notch, επίσης επιδρούν στη διαδικασία της λιπογένεσης. Η σύνδεση του Notch με τα υποστρώματά του, τα οποία είναι μέλη των οικογενειών Delta και Serrate/Jagged, έχει ως αποτέλεσμα την πρωτεολυτική του διάσπαση και την επακόλουθη μετατόπιση της ενδοκυττάριας περιοχής του στον πυρήνα, όπου εκεί ενεργοποιεί μια σειρά μεταγραφικών παραγόντων. Η δράση αρκετών από αυτούς τους παράγοντες, όπως είναι ο HES1 με μοτίβο έλικας-βρόχου-έλικας θεωρείται απαραίτητη για την κυτταρική διαφοροποίηση. Ωστόσο, η σταθερή ενεργοποίηση του μονοπατιού από τον υποδοχέα Notch πιθανόν να δρα ανασταλτικά στην διαδικασία της λιπογένεσης μέσω καταστολής της έκφρασης του PPAR-γ [66].

Ο Notch πιθανότατα αλληλεπιδρά με το εξωκυττάριο τμήμα του PREF1 μετά από πρωτεολυτική διάσπαση του και άρα η σηματοδότηση μέσω του διαμεμβρανικού υποδοχέα DLK1/PREF1 (preadipocyte factor-1) ενδέχεται να αναστέλλει την λιπογένεση. Η έκφραση του DLK1/PREF1 είναι υψηλή στα προ-λιποκύτταρα, αλλά ελαττώνεται με το πέρας της διαφοροποίησης. Ο υποδοχέας αυτός έχει δείχθει ότι δρα ανασταλτικά στην λιπογένεση και μάλιστα η δράση του πιθανόν επιτελείται μέσω των μεταγραφικών παραγόντων FOXA2, KLF2 και KLF6 [67].

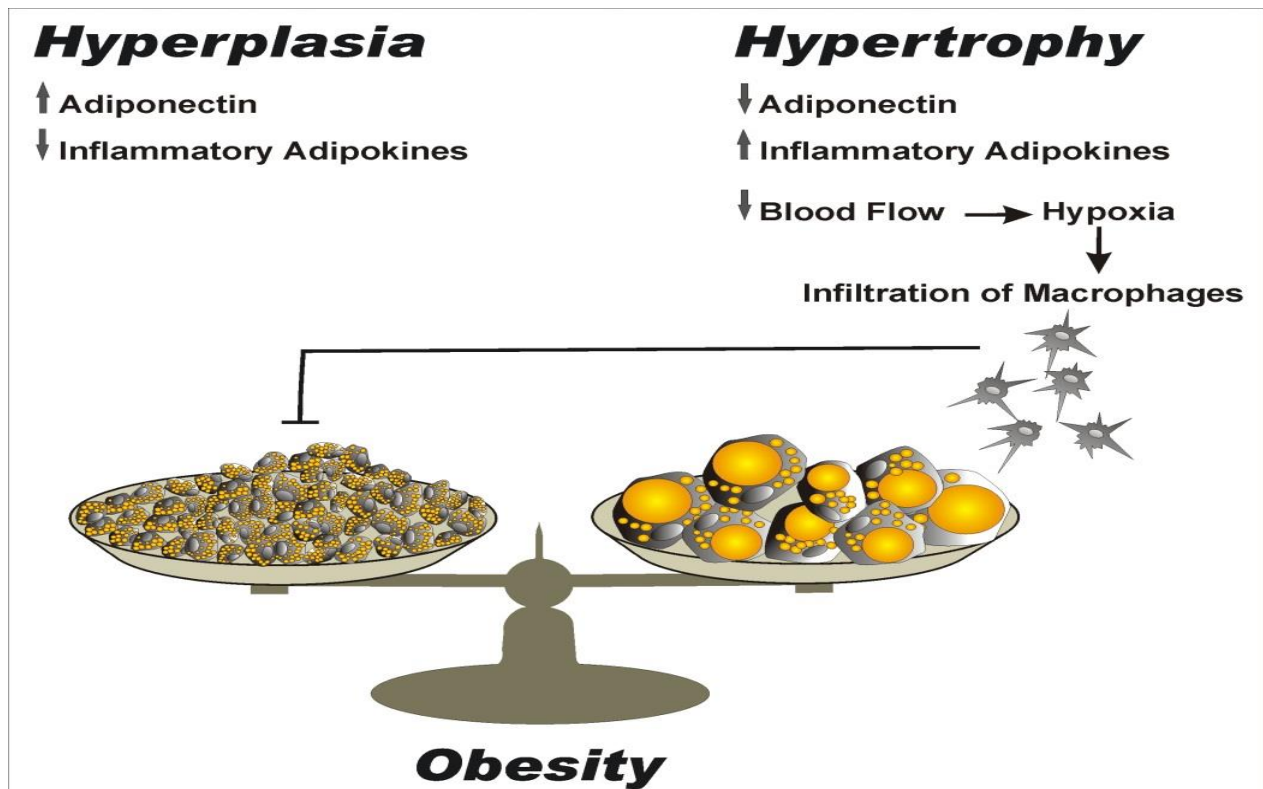
Αν και υπάρχει μεγάλος αριθμός μελετών, η δράση των MAPKs (mitogen-activated protein kinases) στην λιπογένεση δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, λόγω των πολυάριθμων αλλά και αντικρουόμενων αποτελεσμάτων. Πρέπει ωστόσο να αναφερθεί ότι η ERK1 (p44 MAPK) και η p38 MAPK επηρεάζουν σημαντικά τη διαδικασία της ωρίμανσης των προ-λιποκυττάρων. Η πρώτη είναι απαραίτητη στη φάση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, προάγοντας την λιπογένεση, αλλά αναστέλλει τη φάση της διαφοροποίησης, καθώς φωσφορυλιώνει τον κρίσιμο για το στάδιο αυτό PPAR- γ . Η δράση της πιθανότατα ρυθμίζεται από τη φωσφατάση-1 των MAPKs [MPK1 (MAPK phosphatase-1)], που ελαττώνει την ενεργότητα της ERK1 μετά τη φάση του πολλαπλασιασμού. Η p38 φαίνεται να προάγει την λιπογένεση στα 3T3-L1 προ-λιποκύτταρα, ενώ την αναστέλλει σε πρωτογενείς κυτταρικές σειρές προ-λιποκυττάρων και άλλων βλαστικών σειρών [65].

Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την λιπογένεση περιλαμβάνουν τον TNF- α , ο οποίος αναστέλλει τη διαφοροποίηση, αλλά ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του στρώματος του λιπώδους ιστού. Κατά αντιστοιχία, οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες IL-1 και IL-6 δρουν ανασταλτικά σε ότι αφορά τη διαφοροποίηση και την όλη πορεία της λιπογένεσης, καταστέλλοντας την δράση του PPAR- γ μέσω του καταρράκτη TAK1/TAB1/NIK. Τέλος, ο αυξητικός παράγοντας των μακροφάγων MCSF και η αγγειοτενσίνη-II φαίνεται να επηρεάζουν θετικά κυρίως τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του λιπώδους ιστού.

2.3 ΛΙΠΩΔΗΣ ΙΣΤΟΣ ΚΑΙ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ 2

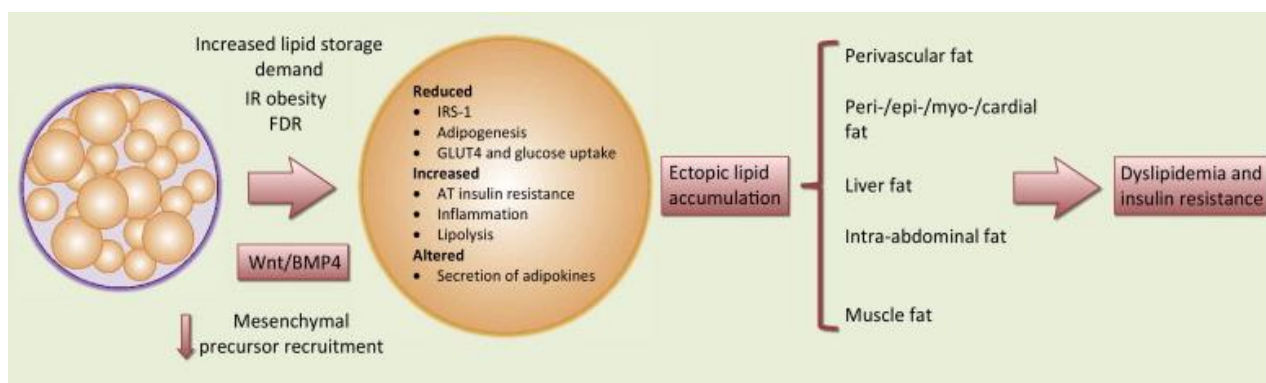
Πολυάριθμες μελέτες υποστηρίζουν πλέον την σύνδεση μεταξύ της παχυσαρκίας, της εμφάνισης ινσουλινο-αντίστασης και τελικά την εμφάνιση ΣΔ τύπου 2. Κατά την παχυσαρκία, λαμβάνουν χώρα σημαντικές μεταβολές στον λιπώδη ιστό οι οποίες είναι δομικές και λειτουργικές. Επιπλέον, σημαντικές αλλαγές παρατηρούνται και σε ιστούς εκτός του λιπώδους ιστού οι οποίες σχετίζονται με την αυξημένη συχνότητα λιπώδους διήθησης του ήπατος, αυξημένη περιεκτικότητα σε λίπος στους σκελετικούς μύες αλλά και σε άλλα όργανα [68].

Στην παχυσαρκία παρατηρείται αύξηση του αριθμού των λιποκυττάρων δηλαδή υπερπλασία καθώς και αύξηση του μεγέθους τους δηλαδή υπερτροφία. Παράλληλα, παρατηρείται σημαντική διήθηση των αποθηκών του λίπους από μονοκύτταρα αλλά και μείωση των αιμοφόρων αγγείων και της νεύρωσης του λιπώδους ιστού.



Εικόνα 5 Η υπερπλασία και η υπερτροφία των λιποκυττάρων σχετίζονται με την αύξηση της μάζας του λιπώδους ιστού δηλαδή την παχυσαρκία. Η κατάσταση αυτή συνοδεύεται από διήθησή του ιστού από μακροφάγα και τελικά τη παραγωγή σημαντικών επιπέδων φλεγμονωδών κυτταροκινών.

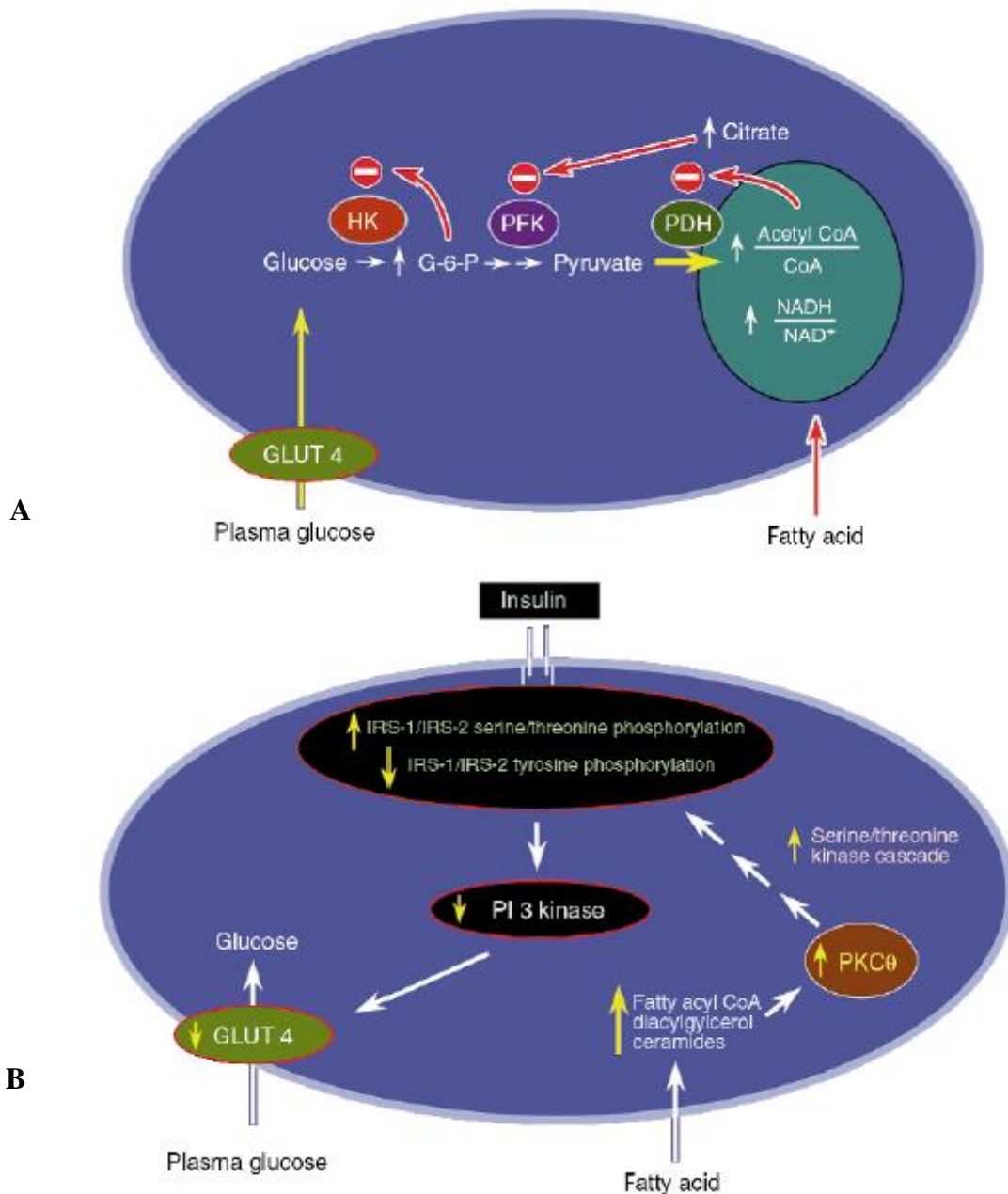
Αν και ακόμα δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί η αιτιολογική σχέση μεταξύ του ΣΔ και της παχυσαρκίας, η υπέρμετρη αύξηση του σωματικού βάρους αποτελεί ξεκάθαρα έναν ισχυρό παράγοντα στην ανάπτυξη ΣΔ [69]. Πιθανός συνδετικός κρίκος που συνδέει τον ΣΔ με την παχυσαρκία είναι ο λιπώδης ιστός ο οποίος όπως έχει ήδη αναφερθεί αποθηκεύει ενέργεια στη μορφή τριγλυκεριδίων και απελευθερώνει FFA ως απόκριση στις εκάστοτε ενεργειακές ανάγκες του οργανισμού. Σε υγιή άτομα η περίσσια του λίπους αποθηκεύεται στα κύτταρα του λιπώδους ιστού και πολύ μικρά ποσοστά τριγλυκεριδίων αποθηκεύονται σε μη λιποκύτταρα. Αντίθετα, στα παχύσαρκα άτομα το δυναμικό των λιποκυττάρων να αποθηκεύουν λίπος υπερβαίνει το φυσιολογικό με αποτέλεσμα την μη φυσιολογική συσσώρευση λίπους και σε άλλους ιστούς. Η αυξημένη συσσώρευση τριγλυκεριδίων στο μυϊκό ιστό, το ήπαρ και το πάγκρεας σχετίζεται φυσιολογική δυσλειτουργία των ιστών αυτών οδηγώντας έτσι σε «λιποτοξικότητα». Η λιποτοξικότητα αυτή μπορεί να θεωρηθεί θεμελιώδης παράγοντας για την ανάπτυξη της παχυσαρκίας αλλά και του ΣΔ τύπου 2 [70].



Εικόνα 2.3B Υπερτροφία του λιπώδους ιστού και σχετιζόμενα χαρακτηριστικά.

Η αντίσταση στην ινσουλίνη θεωρείται η κύρια παθοφυσιολογική μεταβολή κατά τον ΣΔ τύπου 2. Όπως έχει ήδη αναφερθεί η ασθένεια αυτή χαρακτηρίζεται από έλλειψη έκκρισης της ινσουλίνης και υπεργλυκαιμία. Έχει δειχθεί ότι υπάρχει ισχυρή συσχέτιση της μη φυσιολογικής λειτουργίας του λιπώδους ιστού και της εμφάνισης ΣΔ τύπου 2. Αν και δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως η σχέση αυτή, διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί για την διερεύνηση του ρόλου της λιποτοξικότητας στην εμφάνιση ινσουλινοανοχής και τελικά ΣΔ τύπου 2. Στη διαδικασία αυτή φαίνεται να συμβάλλει η αναστολή της πρόσληψης της γλυκόζης εξαιτίας των FFA με αποτέλεσμα την αποσιώπηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της ινσουλίνης. Έχει δειχθεί επίσης τα FFA ενδέχεται να επηρεάζουν την μετατόπιση του γλυκοζομεταφορέα GLUT 4 και/ή

την σύνθεσή του στο μυϊκό και τον λιπώδη ιστό [71]. Επιπρόσθετα, τα FFA μπορεί να επηρεάζουν αρνητικά διάφορα στάδια της μετάδοσης του σήματος από την ινσουλίνη με αποτέλεσμα την μειωμένη ενεργοποίηση της PI3K, της οποίας η ενεργοποίηση θεωρείται απαραίτητο βήμα για την ενδοκυττάρια μετακίνηση του GLUT 4 στην κυτταρική επιφάνεια [72]. Άλλο μόριο το οποίο μπορεί να επηρεαστεί κατά την διαδικασία αυτή είναι η πρωτεϊνική κινάση C θ ενώ ακόμη έχειδειχθεί ότι τα FFA δρουν κατασταλτικά στην μετατροπή της γλυκόζης σε γλυκογόνο προς περαιτέρω αποθήκευση [73]. Η συσσώρευση των FFA έχει επίσης ως αποτέλεσμα την αυξημένη σύνθεση κεραμιδίου το οποίο επηρεάζει την από ινσουλίνη εξαρτημένη πρόσληψη της γλυκόζης ενώ ακόμη σχετίζεται με την απόπτωση μέσω ενεργοποίησης της συνθάσης του NO (nitricoxide) [74]. Οι διαδικασίες αυτές που περιγράφησαν λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα σε ένα μυϊκό κύτταρο. Τα FFA συμμετέχουν στην εμφάνιση υπεργλυκαιμίας επιδρώντας στο ήπαρ όπου η γλυκόλυση οδηγεί σε αυξημένη ηπατική απελευθέρωση γλυκόζης εξαιτίας της γλυκονεογένεσης και της γλυκογονόλυσης. Η μεταβολισμός των FFA έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ATP και την μείωση του NAD με αποτέλεσμα την υπεργλυκαιμία [75]. Η λιποτοξικότητα στα β -παγκρεατικά κύτταρα έχει επίσης προταθεί ως πιθανός στόχος για την εκδήλωση της παθολογίας του ΣΔ τύπου 2 [76]. Η συσσώρευση των FFA στα β κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την έκκριση ινσουλίνης ωστόσο η έκκριση αυτή αναστέλλεται μετά από έκθεση σε μεγάλες συγκεντρώσεις FFA ή για μεγάλο χρονικό διάστημα.

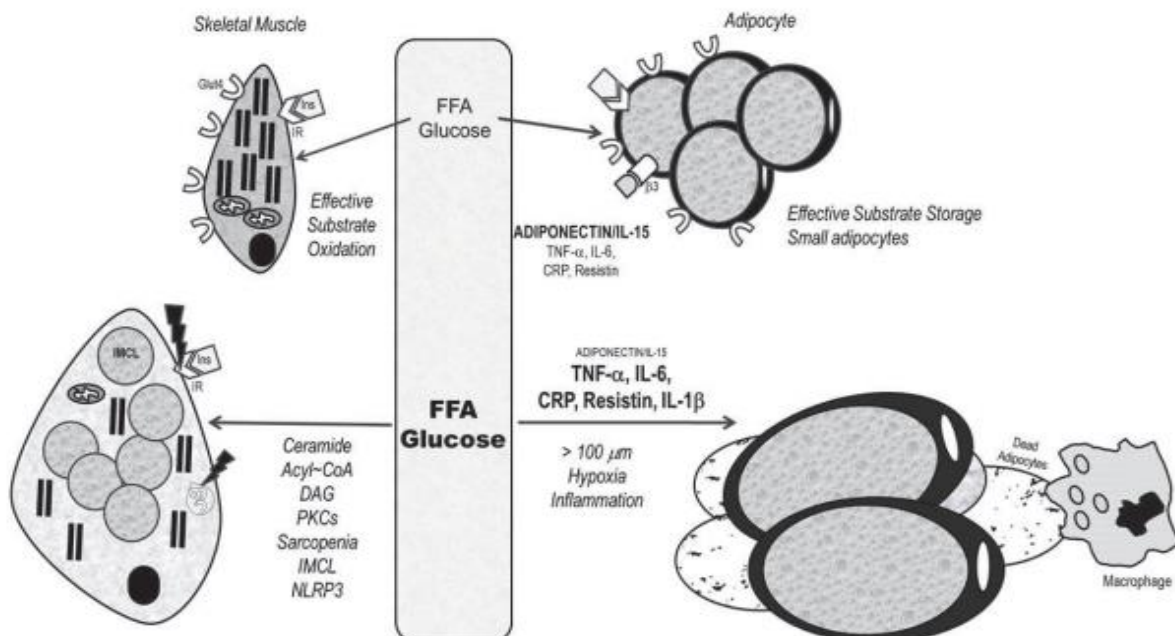


Εικόνα 6 (Α) Προτεινόμενος μηχανισμός πρόκλησης ινσουλινοαντίστασης στον μυϊκό ιστό όπως περιγράφηκε από τους Randle et al. Αύξηση της συγκέντρωσης των FFA έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των ενδομιτοχονδριακών επιπέδων των ακετυλ.CoA/CoA και των NADH/NAD⁺ και άρα την απενεργοποίηση της δεϋδρογονάσης του πυρουβικού (pyruvatedehydrogenase). Ως απόκριση σε αυτό έρχεται η αύξηση της συγκέντρωσης του κιτρικού που οδηγεί με την σειρά του στην αναστολή της φωσφοφρουκτοκινάσης. Η επακόλουθη αύξηση της ενδοκυττάριας 6-φωσφορικής γλυκόζης έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης εξωκινάσης II, η οποία οδηγεί σε αύξηση της ενδοκυττάριας

συγκέντρωσης της γλυκόζης και άρα μείωση της πρόσληψης γλυκόζης από τον μυϊκό ιστό. (B) προτεινόμενος εναλλακτικός μηχανισμός για την πρόκληση ινσουλινοαντίστασης υπό την επίδραση των FFA στον μυϊκό ιστό. Αύξηση στην μεταφορά των FFA στον μυϊκό ιστό ή μείωση στον ενδοκυττάριο μεταβολισμό τους έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των ενδοκυττάρων μεταβολιτών τους όπως είναι η διακυλογλυκερόλη, το ακετυλοσυνένζυμο Α και το κεραμίδιο. Οι μεταβολίτες αυτοί ενεργοποιούν τον καταρράκτη σερίνης/θρεονίνης (πιθανόν μέσω ενεργοποίησης της CΘ) με αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση των καταλοίπων σερίνης/θρεονίνης στα υποστρώματα IRS1 και IRS2 του υποδοχέα της ινσουλίνης. Ως απόκριση σε αυτό έρχεται η ελάττωση της ικανότητας των IRS υποστρωμάτων να ενεργοποιούν την κινάση PI3K. Συνεπώς, η μεταφορά της γλυκόζης αλλά και άλλων γεγονότων καθοδικά της σηματοδότησης του υποδοχέα της ινσουλίνης φαίνεται να αναστέλλονται[77].

2.4 Η ΘΕΩΡΙΑ ΤΟΥ ΑΣΘΕΝΟΥΣ ΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΟΥ

Αξίζει να αναφερθεί ότι στην παχυσαρκία τα μυϊκά κύτταρα είναι αυτά που «νοσούν» σε αντίθεση με τα λιποκύτταρα τα οποία πεθαίνουν αργά λόγω ασφυξίας. Η αλληλεπίδραση των δύο αυτών ιστών δημιουργεί ένα άξονα ο οποίος θεωρείται σημαντικός στην ανάπτυξη της παχυσαρκίας αλλά και άλλων συναφών μεταβολικών δυσλειτουργιών όπως είναι ο ΣΔ τύπου 2 (Εικόνα 2.4A).



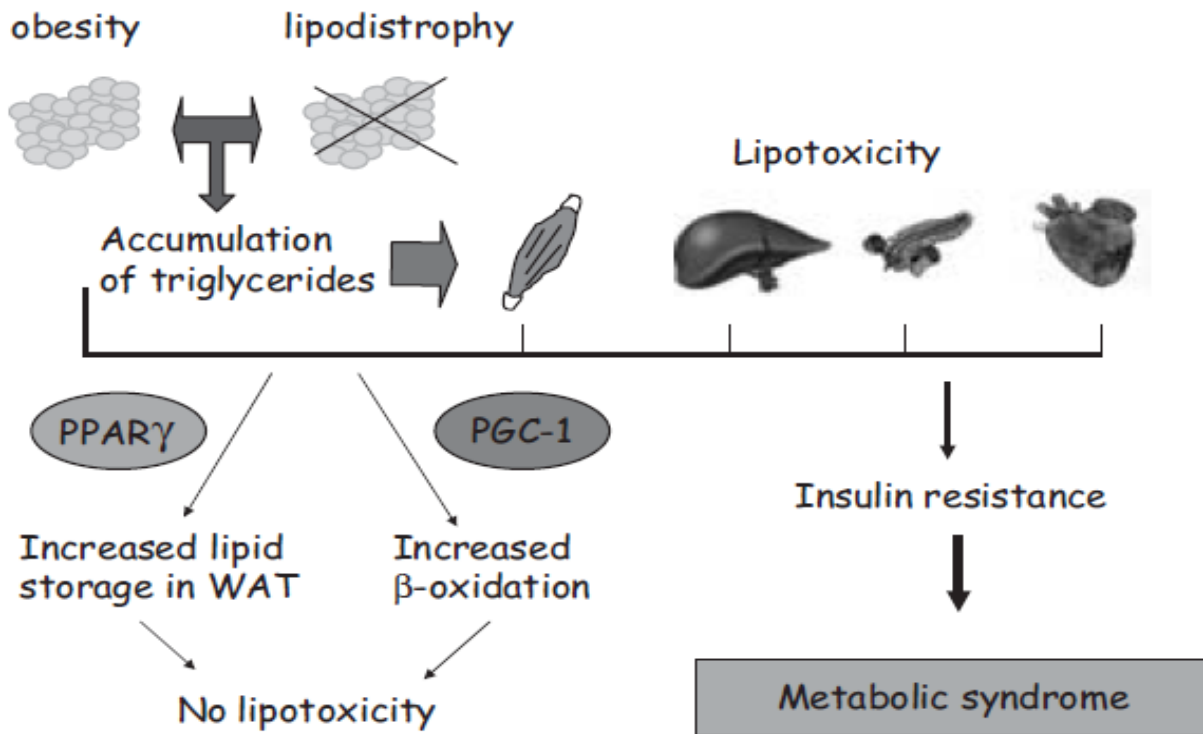
Εικόνα 2.4A Διαγραμματική απεικόνιση της επίδρασης των αυξημένων επιπέδων των FFA και της υπεργλυκαιμίας στα κύτταρα του λιπώδους ιστού και των μυϊκών κυττάρων σε

παχύσαρκα άτομα. Το «ασθενές» μυοκύτταρο χάνει σαρκομερή σε βάρος ενδομυοκυτταρικών λιπιδικών σταγόνων που αποτελούν πηγή του ακετυλοσυνενζύμου A, της διαγλυκερόλης και του κεραμιδίου. Παράλληλα, το αυξανόμενο σε μέγεθος λιποκύτταρο μεταπίπτει σε υποξικό απελευθερώνοντας κυτοκίνες, οι οποίες με την σειρά τους επιδρούν στο μυϊκό ιστό. Η απόπτωση των λιποκυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την στρατολόγηση μακροφάγων.

2.4.1 PPAR-γ, λιπογένεση και λιποτοξικότητα

Κατά την διάρκεια της λιπογένεσης ιδιαίτερα σημαντικός θεωρείται ο ρόλος του πυρηνικού υποδοχέα PPAR-γ [78]. Εκτός από την επίδρασή του στην κυτταρική διαφοροποίηση των προλιποκυττάρων και τον αριθμό τους, η ενεργοποίηση του PPAR-γ διεγείρει την αποθήκευση των FFA στα ώριμα λιποκύτταρα. Η ανακάλυψη ότι συνθετικά υποστρώματα του PPAR-γ (thiazolidinediones, TZDs) δρουν ως αντιδιαβητική παράγοντες έδωσε έναυσμα για περαιτέρω έρευνα γύρω από τον κομβικό ρόλο του μορίου αυτού στην αντιμετώπιση της ινσουλινοαντίστασης [79]. Αν και ο μηχανισμός δράσης των TZDs δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί δεδομένα υποστηρίζουν ότι η δράση τους σχετίζεται με την διέγερση της λιπογένεσης και άρα την αύξηση των κυττάρων που εκφράζουν των GLUT 4 με αποτέλεσμα τον μεταβολισμό της γλυκόζης τόσο στον μυϊκό όσο και στον λιπώδη ιστό [80,81].

Υπερμεγέθη λιποκύτταρα φαίνεται πως παρουσιάζουν υψηλότερο βαθμό ινσουλινοαντίστασης ενώ παράγουν υψηλά επίπεδα κυτοκινών του λιπώδους ιστού (adipokines) η έκκριση των οποίων εντείνει περισσότερο την ινσουλινοανοχή [82]. Επιπλέον, τα λιποκύτταρα αυτά αδυνατούν να αποθηκεύσουν FFA με αποτέλεσμα την κυκλοφορία αυτών και την πρόσβασή τους σε περιφερικούς ιστούς. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση του μεταβολικού συνδρόμου. Ωστόσο, η αύξηση του λιπώδους ιστού που σχετίζεται με την παχυσαρκία φαίνεται να οφείλεται περισσότερο στην υπερπλασία του ιστού παρά στην υπερτροφία. Η υπερτροφία έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των λιποκυττάρων τα οποία διαθέτουν μικρότερες λιποσταγόνες. Τα μικρότερα σε μέγεθος λιποκύτταρα διατηρούν την ευαισθησία στην ινσουλίνη καθώς και τη δυνατότητα έκκρισης κυτοκινών. Η παρατήρηση αυτή ενισχύεται από δεδομένα όπου ποντίκια ετερόζυγα για τον PPAR-γ εμφανίζουν βελτιωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη παρά τα αυξημένα επίπεδα λίπους [78].

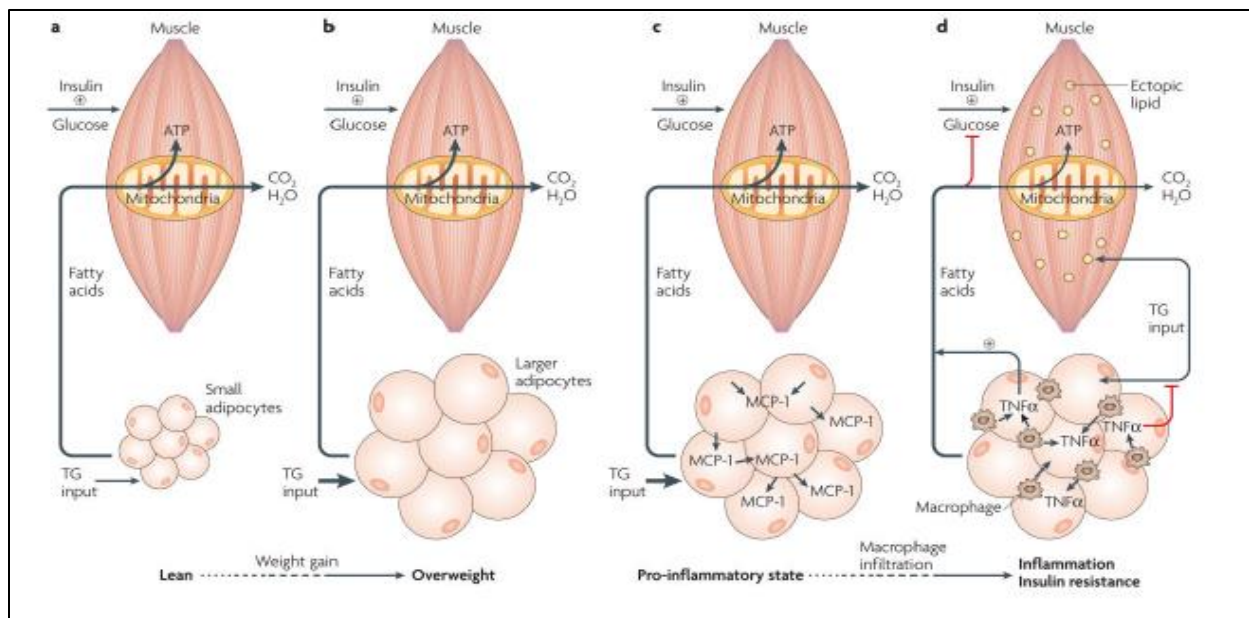


Εικόνα 2.4.1^A Λιπογένεση και λιποτοξικότητα: ο ρόλος του PPAR-γ και του (PPAR-γ)συνενεργοποιητή-1 (PGC1). Κατά την παχυσαρκία παρατηρείται αύξηση της συσσώρευσης του λίπους, ενώ παράλληλα επηρεάζεται η ανάπτυξη του λιπώδους ιστού προς λιποδυστροφία. Και στις δύο κλινικές αυτές καταστάσεις φαίνεται πως διαταράσσεται η ικανότητα του λιπώδους ιστού να διατηρεί τα λιπαρά οξέα μέσα στα λιποκύτταρα με αποτέλεσμα την μη φυσιολογική συσσώρευση των τριγλυκεριδίων και άλλων λιπιδιακών μορίων σε ιστούς εκτός του λιπώδη (λιποτοξικότητα). Το γεγονός αυτό οδηγεί στην ανάπτυξη α) περιφερικής αντίστασης στην ινσουλίνη και β) μεταβολικού συνδρόμου. Η αύξηση του δυναμικού για αποθήκευση του λίπους μέσω αύξησης των επιπέδων του PPAR-γ καθώς και της ικανότητας των κυττάρων να οξειδώνουν τα FFA μέσω αύξησης των επιπέδων του PGC1 αποτελούν βασικές παραμέτρους στην εύρεση κατάλληλων στρατηγικών για την αντιμετώπιση της λιποτοξικότητας.

2.5 ΧΡΟΝΙΑ ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΤΟΥ ΛΙΠΩΔΟΥΣ ΙΣΤΟΥ ΚΑΙ ΙΝΟΥΛΙΝΟΑΝΤΙΣΤΑΣΗ

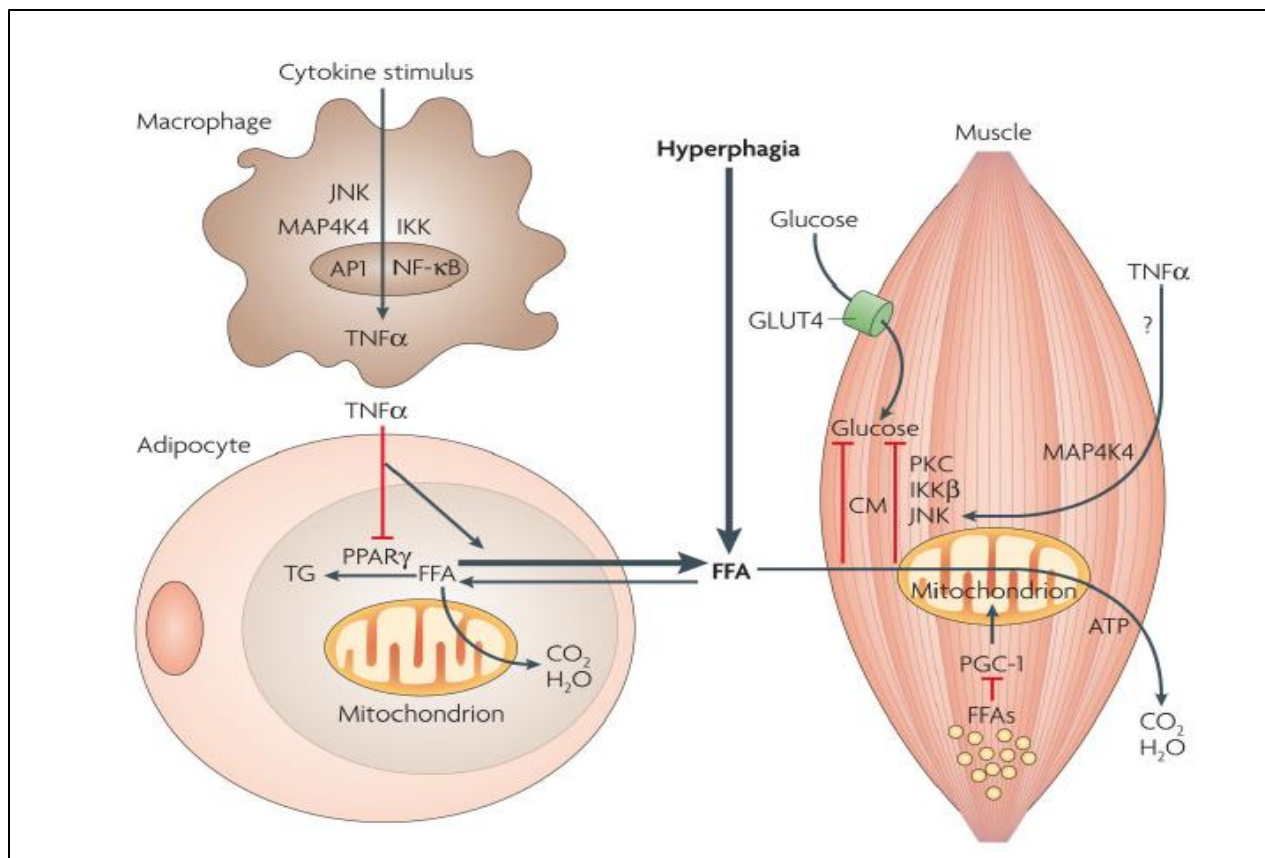
Καθώς η παθοφυσιολογική δυσλειτουργία του λιπώδους ιστού εξελίσσεται παράλληλα μειώνεται η δράση του ως ενδοκρινές όργανο. Ο λιπώδης ιστός ως ενδοκρινές όργανο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή κυτοκινών με σαφή ρόλο στον έλεγχο της όρεξης, την παχυσαρκία και την ευαισθησία στην ινσουλίνη [83]. Τέτοιες κυτοκίνες είναι ο TNF-α και η MCP-1/CCL2

(monocyte chemoattractant protein-1/chemokine (C-C motif) ligand-2) οι οποίες ρυθμίζουν την ανοσολογική απόκριση στον λιπώδη ιστό. Η από κυτοκίνες μεσολαβούμενη ανοσολογική απόκριση στον λιπώδη ιστό σχετίζεται με την ρύθμιση του μεταβολισμού στον λιπώδη ιστό και την ικανότητα των λιποκυττάρων να αποθηκεύουν τριγλυκερίδια. Ειδικότερα, υπερτροφικά λιποκύτταρα έχει δειχθεί ότι εκκρίνουν υψηλά επίπεδα της η MCP-1/CCL2 δρώντας ως χημειοτακτικός παράγοντας για την προσέλκυση μακροφάγων. Σε φυσιολογικά άτομα τα ποσοστά των μακροφάγων στον λιπώδη ιστό υπολογίζονται σε 5-10% σε αντίθεση με παχύσαρκα άτομα όπου τα ποσοστά αγγίζουν το 50%. Συνεπώς, η αυξημένη παραγωγή της MCP-1/CCL2 συνδέεται με την εγκαθίδρυση του προ-φλεγμονώδους σταδίου [84]. Η ανάπτυξη του σταδίου της φλεγμονής στον λιπώδη ιστό συνδέεται με την εμφάνιση ινσουλινοαντίστασης στον μυϊκό ιστό. Τα λιποκύτταρα και τα μακροφάγα εκκρίνουν MCP-1/CCL2 καθώς και άλλους παράγοντες προσέλκυσης κυττάρων φλεγμονής αλλά και υψηλά επίπεδα του TNF-α. Η δράση των κυτοκινών αυτών έχει δύο δραματικά αποτελέσματα: α) την αύξηση της λιπόλυσης και β) την μείωση της σύνθεσης τριγλυκεριδίων. Τα γεγονότα αυτά έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη κυκλοφορία των FFA αλλά και την πρόσληψη τριγλυκεριδίων απευθείας από τον μυϊκό ιστό μέσω της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης. Κατά συνέπεια, η αυξημένη και χρονικά παρατεταμένη πρόσληψη θερμίδων έχει ως αποτέλεσμα την δυσλειτουργία του λιπώδους ιστού μέσω κυτοκινών (Εικόνα 2.5 A&B).



Εικόνα 2.5A Η χρόνια φλεγμονή στον λιπώδη ιστό ευθύνεται για την ινσουλινο-αντίσταση στον μυϊκό ιστό.

Η φλεγμονή ωστόσο μπορεί να οδηγήσει σε ινσουλινο-αντίσταση μετά από απευθείας επίδραση του TNF-α στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης. Όπως και στην περίπτωση των FFA, εξωγενής χορήγηση TNF-α στον άνθρωπο οδηγεί στην εξασθένηση του σήματος της ινσουλίνης και της πρόσληψης της γλυκόζης από τον μυϊκό ιστό. Η δράση του TNF-α προϋποθέτει την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών JNK1 και MAP4K4 για την ανάπτυξη ινσουλινο-ανοχής [85].



Εικόνα 2.5B Η χρόνια φλεγμονή επιδρά στην εναπόθεση τριγλυκεριδίων στον λιπώδη ιστό.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] S. Cinti, J. Endocrinol. Invest. 25(10) (2002) 823-35.
- [2] S.I. Anghel, W. Wahli, Cell Res. 17(6) (2007) 486-511.
- [3] A.S. Avram, M.M. Avram, W.D. James, J. Am. Acad. Dermatol. 53(4) (2005) 671-683.
- [4] S. Cinti, Prost. Leuk. Essen. Fatty Acids 73(1) (2005) 9-15.
- [5] A.B. Rossi, A.L. Vergnanini, J. Eur. Acad. Derm. Venereol. 14(4) (2000) 251-262.
- [6] J.A. Romijn, E. Fliers, Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 8(4) (2005) 440-444.
- [7] H. Hauner, Physiol. Behav. 83(4) (2004) 653-658.
- [8] J.B. Prins, Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 16(4) (2002) 639-651.
- [9] J.K. Sethi, A.J. Vidal-Puig, J. Lipid. Res. 48(6) (2007) 1253-1262.
- [10] P.H. Ducluzeau, L.M. Fletcher, H. Vidal, M. Laville, J.M. Tavaré, Diabetes Metab. 28(2) (2002) 85-92.
- [11] B.L. Wajchenberg, Endocrine Rev. 21(6) (2000) 697-738.
- [12] A. Koerner, J. Kratzsch, W. Kiess, Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 19(4) (2005) 525-546.
- [13] P.G. Cammisotto, M. Bendayan, Histol. Histopathol. 22(2) (2007) 199-210.

- [14] M.H. Porter, A. Cutchins, J.B. Fine, Y. Bai, M. DiGirolamo, J. Lab. Clin. Med. 139(3) (2002) 140-146.
- [15] G.S. Hotamisligil, Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. 27(Suppl 3) (2003) 53-55.
- [16] G.E. Sonnenberg, G.R. Krakower, A.H. Kissebah, Obes. Res. 12(2) (2004) 180-186.
- [17] B. De Taeye, L.H. Smith, D.E. Vaughan, Curr. Opin. Pharmacol. 5(2) (2005) 149- 154.
- [18] T. Hoekstra, J.M. Geleijnse, E.G. Schouten, C. Kluft, Thromb. Haemost. 91(5) (2004) 861-872.
- [19] P.E. Scherer, S. Williams, M. Fogliano, G. Baldini, H.F. Lodish, J. Biol. Chem. 270(45) (1995) 26746-26749.
- [20] R. Piñero, M.J. Iglesias, R. Gallego, K. Raghay, S. Eiras, J. Rubio, C. Diéguez, O. Gualillo, J.R. González-Juanatey, F. Lago, FEBS Lett. 579(23) (2005) 5163-5169.
- [21] H. Waki, T. Yamauchi, J. Kamon, S. Kita, Y. Ito, Y. Hada, S. Uchida, A. Tsuchida, S. Takekawa, T. Kadowaki, Endocrinology 146(2) (2005) 790-796.
- [22] M. Bokarewa, I. Nagaev, L. Dahlberg, U. Smith, A. Tarkowski, J. Immunol. 174(9) (2005) 5789-5795.
- [23] A. Fukuhara, M. Matsuda, M. Nishizawa, K. Segawa, M. Tanaka, K. Kishimoto, Y. Matsuki, M. Murakami, T. Ichisaka, H. Murakami, E. Watanabe, T. Takagi, M. Akiyoshi, T. Ohtsubo, S. Kihara, S. Yamashita, M. Makishima, T. Funahashi, S. Yamanaka, R. Hiramatsu, Y. Matsuzawa, I. Shimomura, Science 307(5708) (2005) 426-430.
- [24] Y. Schutz, Physiol. Behav. 83(4) (2004) 557-564.
- [25] B. Feve, Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 19(4) (2005) 483-499.
- [26] D.B. Hausman, M. DiGirolamo, T.J. Bartness, G.J. Hausman, R.J. Martin, Obes. Rev. 2(4) (2001) 239-254.
- [27] P.A. Grimaldi, Prog. Lipid Res. 40(4) (2001) 269-281.
- [28] E.D. Rosen, Ann. N. Y. Acad. Sci. 979 (2002) 143-158, 188-196.
- [29] J.B. Prins, S. O’Rahilly, Clin. Sci. (Lond) 92(1) (1997) 3-11.
- [30] G. Entenmann, H. Hauner, Am. J. Physiol. 270(4 Pt 1) (1996) C1011-C1016.
- [31] J.B. Hansen, K. Kristiansen, Biochem. J. 398(2) (2006) 153-168.
- [32] M.M. Avram, A.S. Avram, W.D. James, J. Am. Acad. Dermatol. 56(3) (2007) 472-492.
- [33] E.D. Rosen, O.A. McDougald, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 7(12) (2006) 885-896.
- [34] C.T. Gomillion, K.J.L. Burg, Biomaterials 27(36) (2006) 6052-6063.
- [35] L. Fajas, Ann. Med. 35(2) (2003) 79-85.
- [36] T.C. Otto, M.D. Lane, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 40(4) (2005) 229-242.
- [37] R. McBeath, D.M. Pirone, C.M. Nelson, K. Bhadriraju, C.S. Chen, Dev. Cell 6(4) (2004) 483-495.
- [38] Q.Q. Tang, T.C. Otto, M.D. Lane, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 100(1) (2003) 44-49.
- [39] R.F. Morrison, S.R. Farmer, J. Biol. Chem. 274(24) (1999) 17088-17097.
- [40] J.W. Zhang, D.J. Klemm, C. Vinson, M.D. Lane, J. Biol. Chem. 279(6) (2004) 4471-4478.
- [41] W.C. Yeh, Z. Cao, M. Classon, S.L. McKnight, Genes Dev. 9(2) (1995) 168-181.

- [42] Q.Q. Tang, M.D. Lane, *Genes Dev.* 13(17) (1999) 2231-2241.
- [43] A. Aranda, A. Pasqual, *Physiol. Rev.* 81(3) (2001) 1269-1304.
- [44] G.A. Francis, E. Fayard, F. Picard, J. Auwerx, *Annu. Rev. Physiol.* 65 (2003) 261-311.
- [45] L. Michalik, W. Wahli, *Curr. Opin. Biotechnol.* 10(6) (1999) 564-570.
- [46] J.T. Crossno Jr., S.M. Majka, T. Grazia, R.G. Gill, D.J. Klemm, *J. Clin. Invest.* 116(12) (2006) 3220-3228.
- [47] P. Escher, O. Braissant, S. Basu-Modak, L. Michalik, W. Wahli, B. Desvergne, *Endocrinology* 142(10) (2001) 4195-4202.
- [48] D. Ren, T.N. Collingwood, E.J. Rebar, A.P. Wolffe, H.S. Camp, *Genes Dev.* 16(1) (2002) 27-32.
- [49] X.M. Shi, H.C. Blair, X. Yang, J.M. McDonald, X. Cao, *J. Cell Biochem.* 76(3) (2000) 518-527.
- [50] C. Bastie, S. Luquet, D. Holst, C. Jehl-Pietri, P.A. Grimaldi, *J. Biol. Chem.* 275(49) (2000) 38768-38773.
- [51] J.D. Horton, J.L. Goldstein, M.S. Brown, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 67 (2002) 491-498.
- [52] J.B. Kim, H.M. Wright, M. Wright, B.M. Spiegelman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(8) (1998) 4333-4337.
- [53] T. Mori, H. Sakaue, H. Iguchi, H. Gomi, Y. Okada, Y. Takashima, K. Nakamura, T. Nakamura, T. Yamauchi, N. Kubota, T. Kadowaki, Y. Matsuki, W. Ogawa, R. Hiramatsu, M. Kasuga, *J. Biol. Chem.* 280(13) (2005) 12867-12875.
- [54] Y. Oishi, I. Manabe, K. Tobe, K. Tsushima, T. Shindo, K. Fujiu, G. Nishimura, K. Maemura, T. Yamauchi, N. Kubota, R. Suzuki, T. Kitamura, S. Akira, T. Kadowaki, R. Nagai, *Cell Metab.* 1(1) (2005) 27-39.
- [55] Z. Chen, J.I. Torrens, A. Anand, B.M. Spiegelman, J.M. Friedman, *Cell Metab.* 1(2) (2005) 93-106.
- [56] S.H. Um, F. Frigerio F, M. Watanabe, F. Picard, M. Joaquin, M. Sticker, S. Fumagalli, P.R. Allegrini, S.C. Kozma, J. Auwerx, G. Thomas, *Nature* 431(7005) (2004) 200-205.
- [57] Q. Tong, J. Tsai, G. Tan, G. Dalgin, G.S. Hotamisligil, *Mol. Cell Biol.* 25(2) (2005) 706-715.
- [58] N. Takahashi, T. Kawada, T. Yamamoto, T. Goto, A. Taimatsu, N. Aoki, H. Kawasaki, K. Taira, K.K. Yokoyama, Y. Kamei, T. Fushiki, *J. Biol. Chem.* 277(19) (2002) 16906-16912.
- [59] K. Ge, M. Guermah, C.X. Yuan, M. Ito, A.E. Wallberg, B.M. Spiegelman, R.G. Roeder, *Nature* 417(6888) (2002) 563-567.
- [60] E.J. Yoo, J.J. Chung, S.S. Choe, K.H. Kim, J.B. Kim, *J. Biol. Chem.* 281(10) (2006) 6608-6615.
- [61] A. Abella, P. Dubus, M. Malumbres, S.G. Rane, H. Kiyokawa, A. Sicard, F. Vignon, D. Langin, M. Barbacid, L. Fajas, *Cell Metab.* 2(4) (2005) 239-249.

- [62] A.M. Vertino, J.M. Taylor-Jones, K.A. Longo, E.D. Bearden, T.F. Lane, R.E. McGehee Jr., O.A. MacDougald, C.A. Peterson, *Mol. Biol. Cell* 16(4) (2005) 2039-2048.
- [63] R.S. Garofalo, S.J. Orena, K. Rafidi, A.J. Torchia, J.L. Stock, A.L. Hildebrandt, T. Coskran, S.C. Black, D.J. Brees, J.R. Wicks, J.D. McNeish, K.G. Coleman, *J. Clin. Invest.* 112(2) (2003) 197-208.
- [64] S.M. Shin, K. Kim, J.K. Kim, S.R. Yoon, I. Choi, Y. Yang, *FEBS Lett.* 543(1-3) (2003) 25-30.
- [65] H. Sakaue, M. Konishi, W. Ogawa, T. Asaki, T. Mori, M. Yamasaki, M. Takata, H. Ueno, S. Kato, M. Kasuga, N. Itoh, *Genes Dev.* 16(8) (2002) 908-912.
- [66] D.A. Ross, P.K. Rao, T. Kadesch, *Mol. Cell Biol.* 24(8) (2004) 3505-3513.
- [67] J. Wu, S.V. Srinivasan, J.C. Neumann, J.B. Lingrel, *Biochemistry* 44(33) (2005) 11098-11105.
- [68] A.J. Scheen, F.H. Luyckx, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 16(4) (2002) 703-716.
- [69] A. Pascot, J.P. Després, I. Lemieux, N. Alméras, J. Bergeron, A. Nadeau, D. Prud'homme, A. Tremblay, S. Lemieux, *Diab. Care* 24(5) (2001) 902-908.
- [70] R.H. Unger, *Annu. Rev. Med.* 53 (2002) 319-336.
- [71] G.I. Shulman, *J. Clin. Invest.* 106(2) (2000) 171-176.
- [72] A.P. Russell, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 28(Suppl. 4) (2004) S66-71.
- [73] M. Manco, M. Calvani, G. Mingrone, *Diabetes Obes. Metab.* 6(6) (2004) 402-413.
- [74] R.H. Unger, *Biochimie* 87(1) (2005) 57-64.
- [75] R.H. Unger, *Diabetes* 44(8) (1995) 863-870.
- [76] M. Shimabukuro, M.Y. Wang, Y.T. Zhou, C.B. Newgard, R.H. Unger, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(16) (1998) 9558-9561.
- [77] G.I. Shulman, *J. Clin. Invest.* 106(2) (2000) 171-176.
- [78] Y. Barak, M.C. Nelson, E.S. Ong, Y.Z. Jones, P. Ruiz-Lozano, K.R. Chien, A. Koder, R.M. Evans, *Mol. Cell.* 4(4) (1999) 585-595.
- [79] P.D. Miles, Y. Barak, R.M. Evans, J.M. Olefsky, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284(3) (2003) E618-626.
- [80] J. Tonelli, W. Li, P. Kishore, U.B. Pajvani, E. Kwon, C. Weaver, P.E. Scherer, M. Hawkins, *Diabetes* 53(6) (2004) 1621-1629.
- [81] Y. Sugiyama, K. Murase, H. Ikeda, *Nippon Rinsho* 58(2) (2000) 370-375.
- [82] J.M. Molina, T.P. Ciaraldi, D. Brady, J.M. Olefsky, *Diabetes* 38(8) (1989) 991-995.
- [83] M. Qatanani, M.A. Lazar, *Genes Dev.* 21(12) (2007) 1443-1455.
- [84] K.E. Inouye, H. Shi, J.K. Howard, C.H. Daly, G.M. Lord, B.J. Rollins, J.S., *Diabetes* 56(9) (2007) 2242-2250.
- [85] K. Bouzakri, J.R. Zierath, *J. Biol. Chem.* 282(11) (2007) 7783-7789.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΜΕΤΑΛΛΟ-ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΙΝΣΟΥΛΙΝΟ-ΜΙΜΗΣΗ ΚΑΙ ΣΔ

3.1 ΣΗΜΕΡΙΝΑ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΤΟΥ ΣΔ

3.1.1 ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΩΔΟΥΣ ΔΙΑΒΗΤΗ ΤΥΠΟΥ 1

Η χορήγηση ινσουλίνης αποσκοπεί στην αναπλήρωση της πρακτικά παντελούς έλλειψης ενδογενούς ινσουλίνης. Κατά την εξωγενή χορήγησή της ινσουλίνης, οι διακυμάνσεις των επιπέδων της στο αίμα, πρέπει να προσομοιάζουν κατά το δυνατόν με εκείνες της ενδογενούς σε φυσιολογικές καταστάσεις. Βασικός στόχος της θεραπείας αποτελεί η διατήρηση σταθερών επιπέδων ινσουλιναιμίας καθ' όλο το 24ωρο για τη διατήρηση φυσιολογικών επιπέδων γλυκόζης κατά τη φάση της νηστείας.

Για την επίτευξη της βασικής ινσουλιναιμίας (βασική-basal) στα σχήματα πολλαπλών ενέσεων πλέον κατάλληλα είναι τα σκευάσματα ινσουλίνης μακράς διάρκειας δράσης (glargine, detemir).

Θεραπευτικά σχήματα με μείγματα ινσουλινών δεν έχουν θέση στην αντιμετώπιση του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 1, παρά μόνο σε ειδικές περιπτώσεις, όπως π.χ. έλλειψη ή αδυναμία συνεργασιμότητας του ασθενούς, όταν για ειδικούς λόγους δεν θεωρείται απαραίτητη η άριστη ρύθμιση.

Η χορήγηση ινσουλίνης πέραν της μεθόδου των πολλαπλών ενέσεων ημερησίως, μπορεί να γίνεται με συνεχή υποδόρια έγχυση με φορητή αντλία.

Με την αντλία συνεχούς έγχυσης ινσουλίνης χορηγείται ινσουλίνη ταχείας δράσης σε συνεχή προγραμματιζόμενο σε 24ωρη βάση ρυθμό.

Ανασυνδυσασμένη ή Ανθρώπινη ινσουλίνη

Η ευρύτητα πλέον χορηγούμενη ανθρώπινη ινσουλίνη (human insulin) δεν λαμβάνεται από τα β-κύτταρα του ανθρώπινου παγκρέατος, αλλά παράγεται σε βιομηχανική κλίμακα από γενετικά τροποποιημένα βακτήρια *E. coli* ή κύτταρα ζύμης με ανθρώπινα γονίδια συνδεδεμένα στο γονιδίωμά τους. Πιο συγκεκριμένα, παράγονται και απομονώνονται οι δύο αλυσίδες (Α και Β) της ινσουλίνης από δύο διαφορετικά κλωνοποιημένα *E. coli* ή κύτταρα ζύμης και στη συνέχεια ακολουθεί συνένωσή τους στο εργαστήριο μέσω των δεσμών S-S.

Η πρώτη ανθρώπινη ινσουλίνη από κλωνοποιημένα *E. coli* παρασκευάστηκε το 1982 από την εταιρεία Lilly στις ΗΠΑ. Την ίδια χρονιά, μια "ημισυνθετική ανθρώπινη" ινσουλίνη παρασκευάστηκε επίσης από ινσουλίνη χοίρου με αντικατάσταση της αλανίνης της θέσης B30 με θρεονίνη από την εταιρεία NovoIndustrieAS, Hoechst.

Η ανθρώπινη ινσουλίνη αναμένεται θεωρητικά να προκαλεί ηπιότερες ανοσογονικές αντιδράσεις στον άνθρωπο, ωστόσο οι κλινικές μελέτες δεν απέδειξαν κάτι τέτοιο. Σε σύγκριση όμως με τη βόειο ή άλλες ινσουλίνες ζωικής προέλευσης, η ανθρώπινη είναι ταχύτερη ως προς τη φυσιολογική δράση.

Οι τροποποιημένες ινσουλίνες αποτελούν νεότερους τύπους ινσουλινών. Η σύνθεσή τους ξεκινάει από την ανασυνδεμένη ανθρώπινη ινσουλίνη με αλλαγές στην αλληλουχία αμινοξέων σε περιοχές που δεν έχουν φυσιολογική σημασία και επομένως η δομή τους διαφέρει από τη φυσική ανθρώπινη ινσουλίνη. Τυπικό παράδειγμα αποτελεί η ινσουλίνη Humalog (ινσουλίνη lispro), όπου έχει πραγματοποιηθεί αντιστροφή της αλληλουχίας των B28-B29 αμινοξέων από Pro-Lys σε Lys-Pro. Αυτή η φαινομενικά μικρή τροποποίηση αποσταθεροποιεί το διμερές της φυσικής ινσουλίνης, με αποτέλεσμα την άμεση διαθεσιμότητα του φυσιολογικά δραστικού μονομερούς και επομένως διευκολύνει την ταχύτερη απορρόφησή του μέσω των τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων. Έτσι δρα ταχύτερα, οπότε και η δράση της διαρκεί λιγότερο [1].

Τροποποιημένες ινσουλίνες έχουν παρασκευασθεί κατά καιρούς για ερευνητικούς σκοπούς, όπως π.χ. για τη διαπίστωση της χρησιμότητας κάθε αμινοξέος των πεπτιδικών αλυσίδων. Ακόμη, η τροποποίηση μπορεί να έγκειται στην προσκόλληση στο μόριο λιπόφιλων ομάδων (π.χ. με ακυλίωση των ελεύθερων αμινοομάδων). Μια λιπόφιλη ινσουλίνη θα μπορούσε να απορροφηθεί από το έντερο, ανοίγοντας έτσι τον δρόμο στην από το στόμα χορήγηση σε κατάλληλη φαρμακευτική μορφή. Η φυσική ινσουλίνη είναι αδύνατον να ληφθεί από το στόμα, αφού θα καταστραφεί στο στομάχι υπό την επίδραση του υδροχλωρικού οξέος και των πρωτεολυτικών ενζύμων.

Οι διάφορες μορφές ινσουλίνης που διατίθενται στους ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη διαφέρουν μεταξύ ως προς την ταχύτητα απορρόφησης και τη βιοδιαθεσιμότητα. Η ποσότητα και η συχνότητα χορήγησης της ινσουλίνης είναι αποτέλεσμα προσεκτικής εξέτασης από

ειδικευμένους ιατρούς της κατάστασης του ασθενή, του τρόπου διατροφής του, της εργασίας του και της σωματικής άσκησης του.

Η διαφοροποίηση της ταχύτητας απορρόφησης εξαρτάται από τη μορφή της ινσουλίνης (καθαρή ινσουλίνη, σύμπλοκο ινσουλίνης-Zn(II), συμπλέγματα ινσουλίνης-πρωταμίνης, ινσουλίνης-πρωταμίνης-Zn(II), ινσουλίνη lispro κ.α.), όπως επίσης και από τον τρόπο χορήγησης. Για να επιτευχθεί ο επιθυμητός ρυθμός απορρόφησης, συχνά χορηγούνται μίγματα διαφόρων μορφών ινσουλίνης. Στον επόμενο πίνακα παρουσιάζονται ορισμένοι από τους πλέον συνηθισμένους τύπους ινσουλίνης.

Τρόποι χορήγησης ινσουλίνης στους διαβητικούς ασθενείς

Δυστυχώς η ινσουλίνη δεν μπορεί να χορηγηθεί από το στόμα, αφού θα καταστραφεί ταχύτατα στο στομάχι υπό την επίδραση του HCl και των πρωτεολυτικών ενζύμων τόσο του στομάχου, όσο και των εντέρων. Ο συνηθέστερος τρόπος χορήγησης είναι με υποδόρια ένεση (συνήθως στην κοιλιακή χώρα) και σπανιότερα με ενδοφλέβια ένεση, σε περίπτωση που απαιτείται ταχεία μεταφορά της στην κυκλοφορία του αίματος.

Η ένεση μπορεί να πραγματοποιηθεί με τις σύριγγες ινσουλίνης μίας χρήσης ή με τα στυλό ινσουλίνης (insulinpens). Τα τελευταία είναι ιδιαίτερα εύχρηστα αφού δέχονται φύσιγγες ινσουλίνης και επιτρέπουν τη ρύθμιση της χορηγούμενης δόσης. Οι λεπτές βελόνες ορισμένου μήκους καθιστούν τη διαδικασία χορήγησης σχετικά ανώδυνη. Ανάλογος τρόπος χορήγησης μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς βελόνες με τις ονομαζόμενες «ενέσεις πίδακα» (jetinjectors), με τους οποίους το διάλυμα ινσουλίνης χορηγείται με τη μορφή λεπτού πίδακα υπό συνθήκες αυξημένης πίεσης. Ο τρόπος αυτός πλεονεκτεί ως προς το ότι αποφεύγεται η πιθανότητα μόλυνσης από τη βελόνα.

Οι αντλίες ινσουλίνης αποτελούν ένα σχετικά νεότερο τρόπο εισαγωγής ινσουλίνης στο οργανισμό. Οι αντλίες χορηγούν ινσουλίνη με σταθερή ροή σε όλο το 24ωρο. Ορισμένες αντλίες μπορούν να προγραμματισθούν έτσι ώστε να χορηγούν ινσουλίνη σε ορισμένες δόσεις (bolus dose), ανάλογα με τις ανάγκες και το πρόγραμμα διατροφής του ασθενούς. Τελείως πρόσφατα μια Ελβετική εταιρεία αναφέρει την κατασκευή και δοκιμή νανοαντλίας που βασίζεται στις αρχές της μικρορευστονικής (microfluidics), που εφαρμόζονται απ' ευθείας στο δέρμα του ασθενούς σαν επίθεμα μιας χρήσης [2].

Ένας τρόπος χορήγησης της ινσουλίνης με τον οποίο ο ασθενής απαλλάσσεται τελείως από τις ενέσεις, είναι ο εισπνευστήρας ινσουλίνης (insulin inhaler). Με τον εισπνευστήρα η ινσουλίνη χορηγείται σε μορφή εισπνεόμενης λεπτής σκόνης. Αν και θεωρήθηκε ως ιδιαίτερα αποδεκτός και ασφαλής τρόπος χορήγησης ινσουλίνης, δυστυχώς για εμπορικούς λόγους (μεγάλο κόστος παραγωγής) διακόπηκε η παραγωγή εισπνεόμενης ινσουλίνης από το 2007 [2,3,4,5].

Μέθοδοι χορήγησης ινσουλίνης υπό εξέλιξη: Είναι συνεχής η έρευνα για αποτελεσματικότερη, ασφαλέστερη και ευκολότερη χορήγηση της ινσουλίνης. Μερικοί από τους υπό έρευνα τρόπους είναι οι εξής:

(α) Χειρουργικά **εμφυτευόμενες αντλίες** στην κοιλιακή χώρα. Ελέγχονται με τηλεχειριστήριο και θα "ξαναγεμίζουν" με ινσουλίνη κάθε 2 έως 3 μήνες. (β) **Επιθέματα** (έμπλαστρα) ινσουλίνης. Θα χορηγούν κατά συνεχή τρόπο μικρές δόσεις ινσουλίνης. Η διέλευση της ινσουλίνης μέσω του δερματικού φραγμού θα διευκολύνεται με υπερηχητικά κύματα ή ηλεκτρικό ρεύμα. (γ) Καταπινόμενα **δισκία** ινσουλίνης. Εξετάζεται ο τρόπος με τον οποίο θα αποφευχθεί η καταστροφή της ινσουλίνης κατά τη φυσιολογική διεργασία της πέψης. (δ) Στοματικά και ρινικά **σπρέυ**. (ε) **Τεχνητό πάγκρεας**. Αισθητήρας γλυκόζης θα παρακολουθεί τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα και ανάλογα θα ενεργοποιεί μια αντλία χορήγησης ινσουλίνης [5].

3.1.2 ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΩΔΟΥΣ ΔΙΑΒΗΤΗ ΤΥΠΟΥ 2

Σε κάθε περίπτωση, πριν την έναρξη οποιασδήποτε φαρμακευτικής θεραπείας, τα άτομα με ΣΔ τύπου 2 πρέπει να μεταβάλλουν τον τρόπο ζωής τους καθώς και το διαιτητικό τους προφίλ. Παράλληλα θα πρέπει να πραγματοποιείται τακτικός έλεγχος του γλυκαιμικού δείκτη και η θεραπεία που ακολουθείται να τροποποιείται σε περίπτωση μη απόδοσής της. Στην επιλογή του φαρμάκου λαμβάνονται υπόψη τα ειδικά χαρακτηριστικά των φαρμάκων, τα οφέλη αλλά και οι κίνδυνοι που μπορεί να προκύψουν από την χορήγησή τους. Στον πίνακα που ακολουθεί συνοψίζονται τα σημερινά θεραπευτικά πρωτόκολλα που ακολουθούνται σε συνδυασμό με τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα που παρουσιάζουν.

ΚΥΡΙΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΝΤΙΔΙΑΒΗΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ			
ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑ	ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑ	ΚΟΣΤΟΣ
<u>Διγουανίδια</u> Μετοφομίνη	<ul style="list-style-type: none"> • Μεγάλη εμπειρία • Δεν προκαλεί υπογλυκαιμίες • Ουδέτερη επίδραση στο σωματικό βάρος • Πιθανώς μείωση 	<ul style="list-style-type: none"> • Γαστρεντερικές διαταραχές • Σπάνια γαλακτική οξέωση • Ανεπάρκεια βιταμίνης Β12 • Αντενδείκνυται σε διάφορες παθήσεις 	Χαμηλό
<u>Σουλφονουλουρίες</u> 1.Γλιβενκλαμίδη 2.Γλικλαζίδη MR 3. Γλιμεπιρίδη	<ul style="list-style-type: none"> • Μεγάλη εμπειρία • Μείωση κινδύνου εμφάνισης μικροαγγειοπάθειας 	<ul style="list-style-type: none"> • Υπογλυκαιμίες • Αύξηση του σωματικού βάρους • Μικρή διατηρησιμότητα • Πιθανώς μείωση της ισχαιμικής προπόνησης στο μυοκάρδιο 	Χαμηλό
<u>Μεγλιτινίδες</u> 1.Νατεγλινίδη 2.Ρεπαγλινίδη	<ul style="list-style-type: none"> • Ευελιξία στη δοσολογία • Βελτίωση της μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας 	<ul style="list-style-type: none"> • Υπογλυκαιμίες • Αύξηση του σωματικού βάρους • Συχνή δοσολογία • Πιθανώς μείωση της ισχαιμικής προπόνησης στο μυοκάρδιο 	Υψηλό
<u>Γλιταζόνες</u> Πιογλιταζόνη	<ul style="list-style-type: none"> • Δεν προκαλεί υπογλυκαιμίες • Βελτιώνει τη λιπιδαιμική εικόνα • Πιθανώς μείωση καρδιαγγειακών συμβάντων • Διατηρησιμότητα 	<ul style="list-style-type: none"> • Αύξηση του σωματικού βάρους • Οίδημα, καρδιακή ανεπάρκεια • Κατάγματα • Πιθανώς αύξηση του κινδύνου για εμφάνιση καρκίνου ουροδόχου κύστης 	Υψηλό

<u>Αναστολείς α-γλυκοσιδάσης</u> Ακαρβόζη	<ul style="list-style-type: none"> • Δεν προκαλεί υπογλυκαιμίες • Βελτίωση της μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας • Ουδέτερη επίδραση στο σωματικό βάρος 	<ul style="list-style-type: none"> • Γαστρεντερικές διαταραχές • Συχνή δοσολογία 	Χαμηλό
<u>Αναστολείς DPP-4</u> 1.Βιλνταγλιπτίνη 2.Σαξαγλιπτίνη 3.Σιταγλιπτίνη	<ul style="list-style-type: none"> • Δεν προκαλούν υπογλυκαιμίες • Ουδέτερη επίδραση στο σωματικό βάρος 	<ul style="list-style-type: none"> • Παγκρεατίτιδα 	Υψηλό
<u>Μιμητικά GLP-1</u> 1.Εξενατίδη 2.Λιραγλουτίδη	<ul style="list-style-type: none"> • Δεν προκαλούν υπογλυκαιμίες • Μείωση του σωματικού βάρους 	<ul style="list-style-type: none"> • Γαστρεντερικές διαταραχές • Ενέσιμα • Απαιτείται εκπαίδευση • Παγκρεατίτιδα 	Υψηλό
Ινσουλίνες	<ul style="list-style-type: none"> • Μεγάλη εμπειρία • Μείωση κινδύνου εμφάνισης μικροαγγειοπάθειας 	<ul style="list-style-type: none"> • Υπογλυκαιμίες • Αύξηση του σωματικού βάρους • Ενέσιμα • Απαιτείται εκπαίδευση 	Ποικίλλει

Η πληθώρα των παρενεργειών, το κόστος, η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα, η έλλειψη βέλτιστου αποτελέσματος καθώς και το αυξημένο stress των ασθενών ειδικά στην περίπτωση ενέσιμης θεραπείας, αποτελούν ορισμένα από τα μειονεκτήματα των σημερινών θεραπευτικών πρωτοκόλλων στην θεραπεία του ΣΔ. Πιο ειδικά, τα μειονεκτήματα αυτά έδωσαν το έναυσμα για την σχεδίαση και σύνθεση νέων φαρμάκων με στόχο την ανάπτυξη βέλτιστων αντιδιαβητικών παραγόντων. Στο πλαίσιο αυτό, η χρήση μεταλλοϊόντων ως βιομιμητικά αποτελεί επιλογή στην θεραπεία αρκετών σύγχρονων ασθενειών μεταξύ αυτών και του ΣΔ. Η

δράση των μεταλλοϊόντων αυτών στην ασθένεια του ΣΔ καθώς και ο ρόλος του σε στενά συνδεδεμένα σηματοδοτικά μονοπάτια περιγράφεται στην συνέχεια του κεφαλαίου.

3.2 Ο ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΣ

3.2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο ψευδάργυρος ανήκει στα μέταλλα και το ιχνοστοιχείο του ψευδαργύρου είναι απαραίτητο σε κάθε οργανισμό για τη διατήρηση της ζωής. Ο ψευδάργυρος συμμετέχει στη φυσιολογική δραστηριότητα 300 και πλέον ενζύμων και περισσότερων από 2000 πρωτεϊνικών μεταγραφικών παραγόντων του κυττάρου. Ανεύρεται σε όλα τα κύτταρα του σώματος και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στον προστάτη, το σπερματικό υγρό, το έσω ους, το μάτι, το δέρμα, τις τρίχες, τα νύχια, τα οστά και το ήπαρ. Γενικά, ο ψευδάργυρος είναι ένα διατροφικό απαραίτητο ιχνοστοιχείο, το οποίο δρα ως καταλύτης βιοχημικών αντιδράσεων του σώματος και συμμετέχει σε δομικές και ρυθμιστικές λειτουργίες του ανθρωπίνου σώματος. Ο ψευδάργυρος υπάρχει σε ορισμένα τρόφιμα, από τα οποία προσλαμβάνεται, μέσω του λεπτού εντέρου και χρησιμοποιείται για την πρόληψη της εκδήλωσης πολλών παθολογικών καταστάσεων καθώς και για τη θεραπεία καταστάσεων, που προκαλούνται, εξ αιτίας της έλλειψής του, όπως είναι η καθυστέρηση της σωματικής ανάπτυξης, η οξεία διάρροια στα παιδιά και η επούλωση των τραυμάτων και των καταγμάτων. Ο ψευδάργυρος διαθέτει ισχυρές αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και χρησιμοποιείται ως ουσία που ενισχύει τη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος. Για τον λόγο αυτό χορηγείται στη θεραπεία του κοινού κρυολογήματος, τις καθ' υποτροπή μέσες ωτίτιδες, ρινοκολπίτιδες και αμυγδαλίτιδες, ενώ προλαβαίνει και τις λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος. Χρησιμοποιείται επίσης κατά του άσθματος, του σακχαρώδους διαβήτη, της υπέρτασης, το AIDS και δερματοπάθειες, όπως η ψωρίαση, το έκζεμα και η ακμή. Ο ψευδάργυρος χορηγείται επίσης στη διαταραχή ελλειμματικής προσοχής-υπερδραστηριότητας [attention deficit-hyperactivity disorder (ADHD)] τις διαταραχές της γεύσης, τις εμβοές των αυτιών, τις σοβαρές κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις, , τη νόσο του Crohn, τη νόσο του Alzheimer , το σύνδρομο Down, τη νόσο του Hansen, την ελκώδη κολίτιδα, το πεπτικό έλκος και τη νευρική ανορεξία. Ακόμη μπορεί να χορηγηθεί στην καλοήγη υπερπλασία του προστάτη, την ανδρική στειρότητα, τη στυτική δυσλειτουργία, την οστεοπενία και οστεοπόρωση, τη ρευματοειδή αρθρίτιδα τις μυϊκές κράμπες που σχετίζονται με ηπατοπάθεια. Χρησιμοποιείται επίσης στη δρεπανοκυτταρική αναιμία και σε κληρονομικές παθήσεις, όπως η εντεροπαθητική ακροδερματίτιδα και η νόσος του Wilson. Από τις μορφές ψευδαργύρου η πλέον ευαπορρόφητη από το έντερο είναι ο

πικολινικός ψευδάργυρος, η βιοδιαθεσιμότητα του οποίου επαυξάνεται από τη βιταμίνη C. Το συμπλήρωμα διατροφής **Zincobell** περιέχει στην κάψουλά του 10mg πικολινικού ψευδαργύρου και 150mg L-ασκορβικού οξέος (βιταμίνη C).

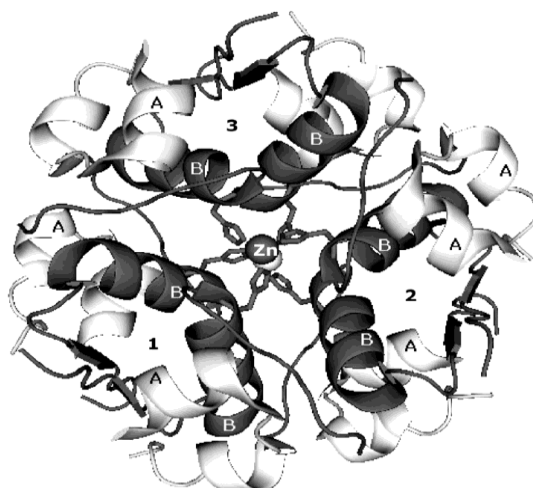
ΟΝΟΜΑ – ΣΥΜΒΟΛΟ	Ψευδάργυρος (Zn)
ΑΤΟΜΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ	30
ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	Στοιχείο μετάπτωσης
ΟΜΑΔΑ – ΠΕΡΙΟΔΟΣ – ΤΟΜΕΑΣ	12 ,4, d
ΣΧΕΤΙΚΗ ΑΤΟΜΙΚΗ ΜΑΖΑ	65,38(2) g•mol ⁻¹
ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΑΚΗ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ	[Ar] 3d ¹⁰ 4s ²

Ατομικές ιδιότητες	
Ατομική ακτίνα	134 pm
Ακτίνα van der Waals	139 pm
Ηλεκτραρνητικότητα	1,65
Ενέργειες ιονισμού	1st: 906,4 kJ•mol ⁻¹

Φυσικά χαρακτηριστικά	
Σημείο τήξης	692,68 K, 419,53°C
Σημείο βρασμού	1180 K, 907°C
Πυκνότητα	7.14 g•cm ⁻³
Ενθαλπία τήξης	7,32 kJ•mol ⁻¹
Μαγνητική συμπεριφορά	διαμαγνητικό

Σκληρότητα Mohs	2,5
Σκληρότητα Brinell	412 MPa

Το 1934 προτάθηκε για πρώτη φορά ότι ο ψευδάργυρος συμμετέχει στην κρυσταλλική δομή της ινσουλίνης και έτσι το μέταλλο αυτό συνδέθηκε με τον ΣΔ[6]. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε σε πολυάριθμες μελέτες οι οποίες έχουν ως στόχο την αποσαφήνιση της σχέσης του ψευδαργύρου με την ασθένεια του ΣΔ, την συμμετοχή του σε βιολογικούς μοριακούς μηχανισμούς καθώς και τον σχεδιασμό νέων θεραπευτικών στρατηγικών. Η σύνδεση του ψευδαργύρου με τον ΣΔ δεν προκαλεί έκπληξη καθώς όπως ήδη αναφέρθηκε το συγκεκριμένο μέταλλο αποτελεί αναπόσπαστο και απαραίτητο μέρος τουλάχιστον 300 ενζύμων όλων των κλάσεων [7,8]. Συνεπώς, ο ψευδάργυρος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε βασικές κυτταρικές διεργασίες όπως είναι η σύνθεση μακρομορίων (DNA/RNA), η μίτωση και η απόπτωση [9-12]. Στο ανθρώπινο σώμα έχει υπολογιστεί πως υπάρχουν 2-4 g ψευδαργύρου ενώ η συγκέντρωση στο πλάσμα του αίματος αντιστοιχεί σε 12-16 μM [12-15]. Ενώ το μισό περίπου της ποσότητας του ψευδαργύρου στο ανθρώπινο σώμα υπάρχει στα οστά, το δέρμα περιέχει το 6% του συνολικού βάρους του ψευδαργύρου του σώματος. Με δεδομένο τα χαμηλά επίπεδα ψευδαργύρου αλλά και στην ιδιαίτερη σημασία του είναι αναμενόμενο να υπάρχει ένας ιδιαίτερα λεπτός μηχανισμός ρύθμισης των επιπέδων του μετάλλου αυτού στον οργανισμό. Στους μηχανισμούς αυτούς ανήκουν ειδικοί μεταφορείς αλλά και μεταλοπρωτεΐνες όπως η μεταλλοθειονίνη (MT) η οποία συμμετέχει στην δέσμευση του μετάλλου αλλά και στην επιλεκτική αποδέσμευσή του η οποία εξαρτάται από το οξειδωτικό του προφίλ. [16-18].



Εικόνα 3.2.1 Δομή της ινσουλίνης όπου φαίνεται το μεταλλοϊόν του ψευδαργύρου.

Η διαταραχή της ομοιοστασίας του ψευδαργύρου φαίνεται πως σχετίζεται και με άλλες ασθένειες πέραν του ΣΔ όπως είναι η κίρρωση του ήπατος, η ανάπτυξη όγκων, εντερικές ασθένειες καθώς και ανοσολογικές διαταραχές[19-29]. Η σημασία του ψευδαργύρου στην φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος σχετίζεται με το γεγονός ότι ο ψευδάργυρος είναι απαραίτητος στην κυτταρική διαίρεση[29]. Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι ο ψευδάργυρος είναι απαραίτητος στην ανάπτυξη των T κυττάρων αλλά και στις λειτουργίες που αυτά επιτελούν μετά την ωρίμανσή τους. Ωστόσο, υψηλές συγκεντρώσεις ψευδαργύρου έχουν ως αποτέλεσμα την καταστολή των λειτουργιών αυτών, υπογραμμίζοντας έτσι την ανάγκη για λεπτή ρύθμιση των επιπέδων του ψευδαργύρου στον οργανισμό [29]. Ο ψευδάργυρος επίσης, έχειδειχθεί ότι εμπλέκεται στην απόπτωση των B κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς και στην απόκριση σε αντιγόνο υποδεικνύοντας έτσι την συμμετοχή του μετάλλου αυτού στην έκκριση κυτοκινών [30].

Όπως έχει ήδη αναφερθεί οι δύο κύριοι τύποι ΣΔ διαφέρουν ως προς την αιτιοπαθογένειά τους με τον τύπου 1 να αποτελεί αυτοάνοσο νόσημα ενώ τον τύπου 2 να οφείλεται στον τρόπο ζωής αλλά και άλλα ποικίλα και ετερογενή αίτια. Και στις δύο περιπτώσεις οι ασθενείς παρουσιάζουν υπεργλυκαιμία, προβληματική ή καθόλου έκκριση της ινσουλίνης.

Τα σημερινά θεραπευτικά πρωτόκολλα του ΣΔ χαρακτηρίζονται από μια σειρά παρενεργειών τα οποία περιλαμβάνουν: υπεργλυκαιμία, αύξηση του σωματικού βάρους, καρδιακή ανεπάρκεια, αύξηση διαφόρων ενζύμων του ήπατος και άλλα. Η ανάγκη για τον σχεδιασμό και την εύρεση

νέων ιδανικότερων αντιδιαβητικών παραγόντων αποτελεί βασικό στόχο στην έρευνα γύρω από τον ΣΔ [31].

Έχειδειχθεί ότι ο μεταβολισμός του ψευδαργύρου μπορεί να μεταβάλλεται τόσο σε ασθενείς όσο και σε πειραματόζωα με ΣΔ. Παράλληλα, η χορήγηση ψευδαργύρου έχει συσχετιστεί με την βελτίωση των συμπτωμάτων της ασθένειας γεγονός το οποίο κατατάσσει το μέταλλο αυτό ως κατάλληλο υποψήφιο για την ανάπτυξη μεταλλοφαρμακευτικών θεραπευτικών πρωτοκόλλων βασισμένα στον ψευδάργυρο [32]. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται επιπλέον από το γεγονός ότι ο μεταφορέας ψευδαργύρου (ZnT)-8 ενέχεται στους μηχανισμούς που συμμετέχουν στην εμφάνιση του ΣΔ τύπου 1 και 2 [33].

3.2.2 ΣΔ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, ο ψευδάργυρος συμμετέχει στην δομή της ινσουλίνης και για το λόγο αυτό πολυάριθμες μελέτες στρέφουν το ενδιαφέρον τους στην αποσαφήνιση των μηχανισμών που εμπλέκονται στον μεταβολισμό του ψευδαργύρου τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις.

Ιδιαίτερα συστηματική παρατήρηση αποτελεί η υψηλή αποβολή ψευδαργύρου στα ούρα τόσο σε διαβητικά μοντέλα ζώων (επίμυες και ποντίκια) όσο και σε διαβητικούς ασθενείς [34,35]. Ιδιαίτερα στους ανθρώπους η συγκέντρωση του ψευδαργύρου φαίνεται να είναι υψηλότερη στις διαβητικές γυναίκες σε σχέση με τους άντρες. Ακόμα δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως γιατί τα επίπεδα του ψευδαργύρου είναι σημαντικά υψηλά στα ούρα των διαβητικών ατόμων, ωστόσο μια εξήγηση είναι ο αυξημένος όγκος των ούρων σε σχέση με το φυσιολογικό καθώς και η πολυουρία που εμφανίζουν τα διαβητικά άτομα. Τα διαβητικά άτομα εκτός από υψηλά επίπεδα ψευδαργύρου στα ούρα εμφανίζουν παράλληλα υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης και γλυκόζης [34]. Έχειδειχθεί ότι η πολυουρία μπορεί να σχετίζεται με την υψηλή αποβολή ψευδαργύρου από τα ούρα καθώς ή υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα οδηγεί σε οσμωτική διούρηση. Παράλληλα η μείωση των επιπέδων γλυκόζης μετά από χορήγηση ινσουλίνης οδήγησε στην μείωση των επιπέδων ψευδαργύρου στα ούρα. Εναλλακτική οδός αποβολής του ψευδαργύρου αποτελεί ο εντερικός σωλήνας σε καταστάσεις διαταραχής του ανοσοποιητικού όπου σύμπλοκα πρωτεϊνών – ψευδαργύρου απελευθερώνονται στον εντερικό σωλήνα. Ιόντα όπως το ασβέστιο, το μαγνήσιο ή άλλα δισθενή κατιόντα, διάφορες ίνες, φωσφορικά ή άλλοι χηλικοποιητικοί

παράγοντες επηρεάζουν την απορρόφηση του ψευδαργύρου με αποτέλεσμα την έκκριση του μετάλλου [35]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο ψευδάργυρος αποβάλλεται και κατά την εφίδρωση [35]. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το εύρημα ότι σε ποντίκια τα οποία δεν είχαν τα γονίδια MT-I και MT-II παρατηρήθηκε υψηλή έκκριση ψευδαργύρου από το πάγκρεας ενισχύοντας την άποψη ότι οι πρωτεΐνες MT συμμετέχουν στην ρύθμιση του μεταβολισμού του ψευδαργύρου.

Η συχνή παρατήρηση ότι τα διαβητικά άτομα παρουσιάζουν υψηλή αποβολή ψευδαργύρου από τα ούρα υποδεικνύει ότι τα άτομα αυτά εμφανίζουν έλλειψη ψευδαργύρου σε περίπτωση που ο αποβαλλόμενος ψευδάργυρος δεν αναπληρώνεται. Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν την παρατήρηση αυτή μετά από μέτρηση της συγκέντρωσης του ψευδαργύρου στο πλάσμα του αίματος [35]. Πιο συγκεκριμένα τα επίπεδα του ψευδαργύρου στον ορό του αίματος είναι δυνατό να συνδεθούν με το τύπο του ΣΔ. Στην περίπτωση του ΣΔ τύπου 2 η συγκέντρωση του ψευδαργύρου είναι ιδιαίτερα χαμηλή τόσο στον ορό όσο και στο πλάσμα του αίματος ενώ στην περίπτωση του ΣΔ τύπου 1 τα επίπεδα είναι μάλλον υψηλά [35]. Σε διαβητικά πειραματόζωα ΣΔ τύπου 1 η υψηλή συγκέντρωση ψευδαργύρου εξηγείται εύκολα καθώς η ξαφνική καταστροφή του παγκρέατος από παράγοντες όπως η αλοξάνη ή η στρεπτοζωτοκίνη έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του μετάλλου αυτού από τα β παγκρεατικά κύτταρα [36]. Στην περίπτωση του ανθρώπου ωστόσο η εξήγηση δεν είναι τόσο απλή. Τα υψηλά επίπεδα ψευδαργύρου σχετίζονται κυρίως με το αρχικό στάδιο της ασθένειας όπου λαμβάνει χώρα η καταστροφή των β παγκρεατικών κυττάρων ενώ στη συνέχεια η αυξημένη αποβολή του ψευδαργύρου υπερτερεί σε σχέση με την απελευθέρωση από το πάγκρεας. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από την παρατήρηση ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του χρονικού σταδίου της ασθένειας και των επιπέδων του ψευδαργύρου στο πλάσμα και τον ορό του αίματος των ασθενών. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι τα επίπεδα του ψευδαργύρου στο πλάσμα ή τον ορό δεν αποτελούν αξιόπιστο βιοδείκτη της πραγματικής συγκέντρωσης του ψευδαργύρου στον οργανισμό καθώς χαμηλά επίπεδα του μετάλλου υποδεικνύουν έλλειψη του όμως μικρές αλλαγές των επιπέδων του οι οποίες μπορούν μόλις να επηρεάσουν το ανοσοποιητικό σύστημα δεν είναι μετρήσιμες [12]. Η διαφορά που παρατηρούνται στα επίπεδα του ψευδαργύρου μεταξύ των δύο τύπων (1 και 2) αποτυπώνονται επίσης και σε επίπεδο ιστών. Σε διαβητικούς επίμυες και ποντικούς στους οποίους χορηγήθηκε στρεπτοζωτοκίνη (τύπος 1) η συγκέντρωση

του ψευδαργύρου στη σπλήνα και το ήπαρ ήταν αυξημένη και η αύξηση αυτή πιθανόν να οφείλεται σε αύξηση της πρωτεΐνης MT η οποία παρατηρείται σε διαβητικά άτομα τύπου 1. Παρόμοια αύξηση παρατηρήθηκε και στον οστικό ιστό τόσο σε επίμυες όσο και σε ποντίκια μετά από χορήγηση στρεπτοζωτοκίνης σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες [37]. Κατά αντιστοιχία, σε πειραματόζωα με ΣΔ τύπου 2 τα οποία έφεραν μετάλλαξη για τον υποδοχέα της λεπτίνης παρατηρήθηκε μείωση του ψευδαργύρου στα οστά [35]. Σε διαβητικά πειραματόζωα Goto-Kakizaki (GK) (ΣΔ τύπου 2) (επίμυες) παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης του ψευδαργύρου στα νεφρά, τους όρχεις και τον λιπώδη ιστό ενώ υψηλότερα επίπεδα παρατηρήθηκαν στην σπλήνα, τον προστάτη και το πάγκρεας υποδεικνύοντας σαφή ανακατανομή του ψευδαργύρου στους διάφορους ιστούς κατά την διάρκεια της ασθένειας. Όπως και στην περίπτωση της αποβολής του ψευδαργύρου από τα ούρα, η ρύθμιση των επιπέδων του στον ορό του αίματος μπορεί να ομαλοποιηθεί μετά από θεραπεία της ασθένειας και μείωση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Η αυξημένη συγκέντρωση ψευδαργύρου σε διάφορους ιστούς μπορεί να μειωθεί μετά από χορήγηση ινσουλίνης υποδεικνύοντας ότι η αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα δεν είναι υπεύθυνη μόνο για την υψηλή έκκριση ψευδαργύρου στα ούρα αλλά και για τις μεταβολές των επιπέδων του μετάλλου στους διάφορους ιστούς ενώ για το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να εμπλέκονται και άλλες ορμονικές διαταραχές[36]. Η εμπλοκή της γλυκόζης στα επίπεδα του ψευδαργύρου υποστηρίζεται από μελέτες κατά τις οποίες η χορήγηση γλυκόζης σε φυσιολογικά αλλά και διαβητικά άτομα οδήγησε σε μείωση του ψευδαργύρου στο πλάσμα του αίματος [38]. Οι παρατηρήσεις αυτές υποστηρίζουν το γεγονός ότι μεταβολισμός του ψευδαργύρου μεταβάλλεται δυσμενώς στην ασθένεια του ΣΔ με αποτέλεσμα η ρύθμιση της ομοιοστασίας του ψευδαργύρου να αποτελεί βασική θεραπευτική επιλογή για την ασθένεια αυτή.

3.2.3 ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΣΤΗΝ ΑΣΘΕΝΕΙΑ ΤΟΥ ΣΔ

Η χορήγηση ψευδαργύρου σε διαβητικούς ασθενείς μπορεί να έχει ευεργετική επίδραση ιδιαίτερα σε αυτούς με ΣΔ τύπου 2 οι οποίοι παρουσιάζουν έλλειψη του μετάλλου αυτού. Η δράση της ινσουλίνης καθώς και η απελευθέρωση της ινσουλίνης από το πάγκρεας μειώθηκε σε επίμυες οι οποίοι παρουσίαζαν έλλειψη ψευδαργύρου σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες ενώ η σύνθεση της ινσουλίνης ήταν φυσιολογική υποδεικνύοντας έτσι το ρόλο του ψευδαργύρου στην διατήρηση της δράσης αλλά και της έκκρισης της ινσουλίνης[39]. Η ινσουλινομιμητική

δράση του ψευδαργύρου γίνεται εμφανής μετά την χρήση διαφόρων μεταλλοσυμπλόκων του ψευδαργύρου τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα την αναστολή της απελευθέρωσης λιπαρών οξέων μετά από διέγερση λιποκυττάρων με επινεφρίνη *in vitro* αλλά και *in vivo* σε ΚΚΑγ διαβητικά ποντίκια όπου παρατηρήθηκε μείωση της γλυκόζης του αίματος μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν *in vivo* και με από του στόματος χορήγηση των συμπλόκων αυτών [38,39]. Σε GK επίμυες, τα επίπεδα της γλυκόζης στον ορό του αίματος μειώνονται μετά από χορήγηση από του στόματος συμπλόκων δισθενούς ψευδαργύρου (Zn(II)). Η ινσουλινομιμητική δράση των συμπλόκων αυτών βασίζεται σε μεγάλο βαθμό την λιποφιλικότητα των υποστρωμάτων που συμπλοκοποιούν τον ψευδάργυρο καθώς είναι απαραίτητο να έρθει σε άμεση επαφή το σύμπλοκο με την ενδοκυττάρια περιοχή [40]. Οι παρατηρήσεις αυτές υποστηρίζουν το γεγονός ότι ο ψευδάργυρος διαθέτει ενδοκυττάρια δράση η οποία μιμείται την δράση της ινσουλίνης. Η χορήγηση ψευδαργύρου σε διάφορα διαβητικά μοντέλα πειραματόζωων έχει ως αποτέλεσμα τον καλύτερο γλυκαιμικό έλεγχο ο οποίος αξιολογείται με βάση τον δείκτη HbA_{1c}. Επιπλέον, η χορήγηση ψευδαργύρου πριν από την χορήγηση παραγόντων που επάγουν την εμφάνιση του ΣΔ όπως είναι η αλοξάνη (alloxan) ή διθιζόνη (dithizone) έχει δειχθεί ότι προλαμβάνει την υπεργλυκαιμία και την καταστροφή των παγκρεατικών νησιδίων. Διαβητικά ποντίκια τα οποία έλαβαν πόσιμο νερό εμπλουτισμένο με ψευδάργυρο μία εβδομάδα πριν την επαγωγή του διαβήτη με στρεπτοζωτοκίνη εμφάνισαν προστασία έναντι της χορηγούμενης στρεπτοζωτοκίνης πιθανότατα λόγω αυξημένης MT πρωτεΐνης στα παγκρεατικά νησίδια[41]. Η αντιδιαβητική και κυτταρο-προστατευτική δράση της πρωτεΐνης MT επιβεβαιώνεται περαιτέρω *in vitro* και *in vivo* μετά από διαγονιδιακή υπερέκφραση της πρωτεΐνης αυτής στα β παγκρεατικά κύτταρα που είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της καταστροφής των β παγκρεατικών κυττάρων, την παράταση της εμφάνισης της ασθένειας αλλά και την μείωση του επιπέδου της γλυκόζης στο αίμα. Αντίστοιχα, μείωση της γλυκόζης του αίματος παρατηρήθηκε μετά από επαγωγή του διαβήτη με στρεπτοζωτοκίνη όταν στους επίμυες χορηγήθηκε ψευδάργυρος προηγουμένως υποδόρια ενώ και στην περίπτωση αυτή η πρωτεΐνη MT ήταν υψηλή τόσο στο πλάσμα όσο και στο πάγκρεας. Ωστόσο υπάρχουν μελέτες όπου τα αποτελέσματα δεν συμφωνούν με τα προαναφερθέντα και αυτό μπορεί να οφείλεται στην διαφορετικότητα των πρωτοκόλλων που εφαρμόζονται καθώς και στα διαφορετικά είδη των πειραματόζωων [42].

Έχειδειχθείότιοψευδάργυροςμπορείναμειώνειτηνέκκρισητηςινσουλίνηςαπόταβκύτταρατουπαγκρέατοςγεγονόςπουκαθιστάτακύτταρααυτάλιγότεροευάλωτασετοξικούςπαράγοντες παρατήρηση η οποία βασίζεται στο γεγονός ότι υπερδιέγερση των κυττάρων αυτών τα καθιστά περισσότερο ευάλωτα σε διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει εναλλακτικό μηχανισμό στην προστασία ή την παράταση της εμφάνισης το ΣΔ τύπου 1 σε διαβητικά πειραματόζωα. Επιπλέον, ακόμη και μετά την εμφάνιση του ΣΔ τύπου 1, η χορήγηση ψευδαργύρου μείωσε την υπεργλυκαιμία καθώς και τα επίπεδα της λεπτίνης στον ορό σε διαβητικά πειραματόζωα υποδεικνύοντας έτσι ότι ο ψευδάργυρος μπορεί να αποτελέσει θεραπευτικό παράγοντα ακόμα και μετά την εμφάνιση της ασθένειας [32].

Σε ότι αφορά τον ΣΔ τύπου 2, οι μελέτες είναι λιγότερες, ωστόσο η κλινική κατάσταση διαβητικών ζώων (db/db) βελτιώθηκε με την γλυκόζη νηστείας να είναι μειωμένη και τα επίπεδα της ινσουλίνης του ορού επίσης ενώ παράλληλα αυξήθηκε η συγκέντρωση του ψευδαργύρου στο πάγκρεας.

Η χορήγηση ψευδαργύρου σε διαβητικούς ανθρώπους με διαβήτη τύπου 1 αποδείχθηκε λιγότερο αποτελεσματική σε σχέση με άτομα με διαβήτη τύπου 2 όπου η χορήγηση ψευδαργύρου είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της ινσουλινο-αντίστασης αλλά και την καταγραφή καλύτερου γλυκαιμικού ελέγχου.

Ο ψευδάργυρος έχει σαφή επίδραση όχι μόνο στον έλεγχο του γλυκαιμικού δείκτη αλλά και στη γενικότερη συμπτωματολογία του ΣΔ. ΈχειδειχθείότιψευδάργυροςεπηρεάζειτιςοξειδωτικέςμεταβολέςστοναμφιβληστροειδήχιτώνατουματιούκατάταρώταστάδιατουΣΔτύπου1σεδιαβητικάζώαενώακόμημειώνειτοοξειδωτικόstressσεδιαβητικάάτομαμεαμφιβληστροειδοπάθεια [43]. Επιπλέον, πολυάριθμες μελέτες υποστηρίζουν το γεγονός ότι ο ψευδάργυρος έχει προστατευτική δράση στην καρδιομυοπάθεια πιθανόν λόγω αύξηση των επιπέδων της MT όπως προκύπτει από μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία υπερεκφράζουν την MT στον καρδιακό ιστό [43]. Σε ότι αφορά την διαβητική νευροπάθεια, η χορήγηση ψευδαργύρου έχει συνδεθεί με την βελτίωση της ταχύτητας αγωγής των νευρώνων [44].

Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί στην αντιοξειδωτική δράση του ψευδαργύρου κατά την διάρκεια της ασθένειας του ΣΔ καθώς η προ-αντιοξειδωτική δράση του ψευδαργύρου είναι γνωστή ενώ παράλληλα το αντιοξειδωτικό ένζυμο υπεροξειδάση της δισμουτάσης (SOD) εξαρτάται από τον ψευδάργυρο. Η χορήγηση ψευδαργύρου σε διαβητικούς ασθενείς είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων και στα δύο είδη του ΣΔ. Υπερέκφραση της SOD σε διαβητικά ζώα είχε ως αποτέλεσμα την καλύτερη αντοχή των β κυττάρων στο επαγόμενο από τον ΣΔ οξειδωτικό stress κατά την εμφάνιση του ΣΔ τύπου 1 [45]. Αντίθετα, στον άνθρωπο υψηλά επίπεδα (CuZn)-SOD δεν έδρασαν προστατευτικά έναντι σε ενεργές μορφές οξυγόνου. Τα επίπεδα της SOD στον άνθρωπο φαίνεται πως δεν αυξάνουν μετά την χορήγηση ψευδαργύρου αν και η υπεροξειδωση των λιπιδίων στο πλάσμα ήταν σαφώς μειωμένη. Συνεπώς, ο ψευδάργυρος φαίνεται πως επηρεάζει θετικά την υπεροξειδωση των λιπιδίων και το οξειδωτικό stress αλλά το κατά πόσο το φαινόμενο αυτό μεσολαβεί από το ένζυμο της SOD παραμένει αδιευκρίνιστο.

3.2.4 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΣΤΟΝ ΣΔ

Η χορήγηση ψευδαργύρου, όπως έχει ήδη αναφερθεί, έχει ως αποτέλεσμα την βελτίωση του γλυκαιμικού δείκτη τόσο σε διαβητικά μοντέλα πειραματόζωων όσο και στον άνθρωπο χαρακτηριστικό που υποδεικνύει την ινσουλινομιμητική του ιδιότητα [32,39]. Ωστόσο οι μηχανισμοί οι οποίοι εμπλέκονται στην δράση αυτή δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένοι. Ο ινσουλινομιμητικός χαρακτήρας του ιόντος του ψευδαργύρου είχε ήδη περιγραφεί το 1982 σε απομονωμένα λιποκύτταρα επίμυος [46]. Στην μελέτη αυτή δείχθηκε ότι ο ψευδάργυρος σε συγκέντρωση 25-1000 μM διέγειρε την μεταφορά της 3-Ο-μεθυλγλυκόζης, τον μεταβολισμό της γλυκόζης σε διοξείδιο του άνθρακα (CO_2), γλυκερίδιο του λιπαρού οξέος και γλυκεριδική γλυκερόλη καθώς και τον κύκλο της φωσφορικής πεντόζης [46].

3.2.5 ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΣ ΚΑΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ

Μέρος της ινσουλινομιμητικής δράσης του ψευδαργύρου μπορεί να εξηγηθεί από την επίδραση που έχει στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης. Η πρωτεΐνη IRAP (insulin-responsive aminopeptidase) εξαρτάται από τον ψευδάργυρο και εκφράζεται κυρίως σε ινσουλινοευαίσθητους ιστούς όπως είναι ο λιπώδης και ο μυϊκός ιστός. Το μόριο αυτό είναι υπεύθυνο για την διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων του γλυκοζομεταφορέα GLUT 4 ο

οποίος με την σειρά του είναι υπεύθυνος για την ενδοκυττάρια πρόσληψη της γλυκόζης. Ως απόκριση στην ινσουλίνη το μόριο IRAP το οποίο βρίσκεται στην ενδοκυττάρια πλευρά της πλασματικής μεμβράνης μετατοπίζεται στην κυτταρική επιφάνεια με τον ίδιο τρόπο που μετατοπίζεται και ο γλυκοζομεταφορέας GLUT 4. Έχει δειχθεί ότι η μετατόπιση του μορίου αυτού μπορεί να επηρεάζεται στην περίπτωση του ΣΔ [47]. Έχει επίσης δειχθεί ότι ο ψευδάργυρος μπορεί να διεγείρει την μετατόπιση του γλυκοζομεταφορέα GLUT 4 στην επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης με αποτέλεσμα την ενδοκυττάρια πρόσληψη της γλυκόζης και άρα την μείωση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα [48]. Αξίζει να αναφερθεί ότι για την διαδικασία αυτή δεν απαιτείται πρόσδεση στον υποδοχέα της ινσουλίνης οπότε η σύνδεση του ψευδαργύρου λαμβάνει χώρα σε σημείο το μονοπατιού της ινσουλίνης το οποίο έπεται του υποδοχέα (βρίσκεται καθοδικά) [48]. Επιπλέον, ο ψευδάργυρος δεν έχει καμία επίδραση στην δράση κινάσης της τυροσίνης του υποδοχέα της ινσουλίνης. Ο μηχανισμός αυτός υποστηρίχθηκε στην συνέχεια και από τον Tang και συνεργάτες οι οποίοι έδειξαν ότι ο ψευδάργυρος ενεργοποιεί την πρόσληψη της γλυκόζης μέσω του μονοπατιού της ινσουλίνης.

Συνοπτικά, η πρόσδεση της ινσουλίνης στην α υπομονάδα του υποδοχέα της ινσουλίνης ο οποίος αποτελείται από δύο α και δύο β υπομονάδες οδηγεί στην διέγερση της κινάσης της τυροσίνης της β υπομονάδας, στην φωσφορυλίωση της β υπομονάδας και στην μεταβολή της στερεοδομής της η οποία ενεργοποιεί περαιτέρω την κινάση της τυροσίνης. Ως συνέπεια, κυτταρικές πρωτεΐνες οι οποίες είναι μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών του υποστρώματος IRS του υποδοχέα της ινσουλίνης φωσφορυλιώνονται και με την σειρά τους αλληλεπιδρούν με σηματοδοτικά μόρια τα οποία διαθέτουν Src-2 ομόλογα πεδία όπως είναι η ρυθμιστική υπομονάδα p85 της πρωτεΐνης PI3K. Η πρωτεΐνη PI3K αποτελεί βασικό σημείο του σηματοδοτικού μονοπατιού της ινσουλίνης για την κατανόηση και αποσαφήνιση της δράσης του ψευδαργύρου στη σηματοδότηση της ινσουλίνης.

Η ενεργοποίηση της PI3K προάγει την φωσφορυλίωση της PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1) η οποία διαθέτει δράση κινάσης σερίνης και με την σειρά της ενεργοποιεί την πρωτεΐνη Akt η οποία έχει δράση σερίνης/θρεονίνης και που επίσης ονομάζεται PKB. Η Akt στη συνέχεια είναι σε θέση να ενεργοποιήσει την μετατόπιση του GLUT 4 στα λιποκύτταρα και άρα την ενδοκυττάρια πρόσληψη της γλυκόζης ενώ παράλληλα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην μεταγωγή του σήματος της ινσουλίνης φωσφορυλιώνοντας κατάλοιπα σερίνης και

αναστέλλει την δράση της GSK-3 (glycogensynthasekinase-3) [49]. Η GSK-3 αποτελεί ένα ιδιοστατικά ενεργό ένζυμο το οποίο αποτελείται από δύο ισομορφές, την GSK-α και GSK-β. Και οι δύο αυτές ισομορφές απενεργοποιούνται σε απόκριση στην ινσουλίνη μέσω φωσφορυλίωσης της σερίνης. Η αναστολή αυτή οδηγεί σε αποφωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της συνθάσης του γλυκογόνου GS στα λιποκύτταρα. Πιο ειδικά, η ισομορφή GSK-α φαίνεται πως είναι απαραίτητη για τον ηπατικό μεταβολισμό της γλυκόζης ενώ η ισομορφή GSK-β είναι πιθανόν υπεύθυνη για την ρύθμιση της συνθάσης του γλυκογόνου στον μυϊκό ιστό [50].

Αναστολή της GSK-3 φαίνεται πως ενισχύει περαιτέρω την βασική δράση της συνθάσης της του γλυκογόνου καθώς και την ινσουλινο-εξαρτώμενη ενδοκυττάρια μεταφορά της γλυκόζης σε ινσουλινο-ανθεκτικούς ιστούς όπως ο μυϊκός σε επίμυες, πιθανόν μέσω αύξησης του γλυκοζομεταφορέα GLUT 4 μετά από διέγερση με ινσουλίνη. Δεν θεωρείται ωστόσο ιδιαίτερα πιθανό η άμεση αναστολή της GSK-3 να συμμετέχει στην ταχεία διέγερση της ενδοκυττάριας μεταφοράς της γλυκόζης από την ινσουλίνη στο μυϊκό και λιπώδη ιστό.

Έχει δειχθεί ότι συγκεκριμένοι αναστολείς της GSK-3 αυξάνουν τον βαθμό της αντιγραφής σε απομονωμένα β κύτταρα επίμυων (πρωτογενείς καλλιέργειες) αλλά και σε κυτταρικές σειρές ινσουλινόματος (INS cell lines) [51]. Οι αναστολείς αυτοί δρουν προστατευτικά ως προς τα β κύτταρα όταν συγκέντρωση της γλυκόζης είναι υψηλή.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ύπαρξη δύο οδών αρνητικής ανατροφοδότησης στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης. Εκτός από την φωσφορυλίωση της τυροσίνης, τόσο ο υποδοχέας της ινσουλίνης όσο και οι πρωτεΐνες IRS μπορεί να φωσφορυλιώνονται σε κατάλοιπα σερίνης γεγονός το οποίο ενδέχεται να οδηγήσει σε εξασθένηση του σήματος που προέρχεται από την ινσουλίνη και μεσολαβείται από την φωσφορυλίωση της τυροσίνης. Η φωσφορυλίωση της σερίνης μεσολαβείται από την PI3K, την Akt, την GSK-3 και την ραπαμυκίνη. Η GSK-3 μπορεί να φωσφορυλιώνει την IRS-1 μετατρέποντας το μόριο αυτό σε αναστολέα της δράσης κινάσης της τυροσίνης του υποδοχέα της ινσουλίνης *in vitro*. Ο δεύτερος μηχανισμός αρνητικής ανατροφοδότησης σχετίζεται με την ταχεία αποφωσφορυλίωση του υποδοχέα της ινσουλίνης αλλά και των IRS υποστρωμάτων του από την PTP1B.

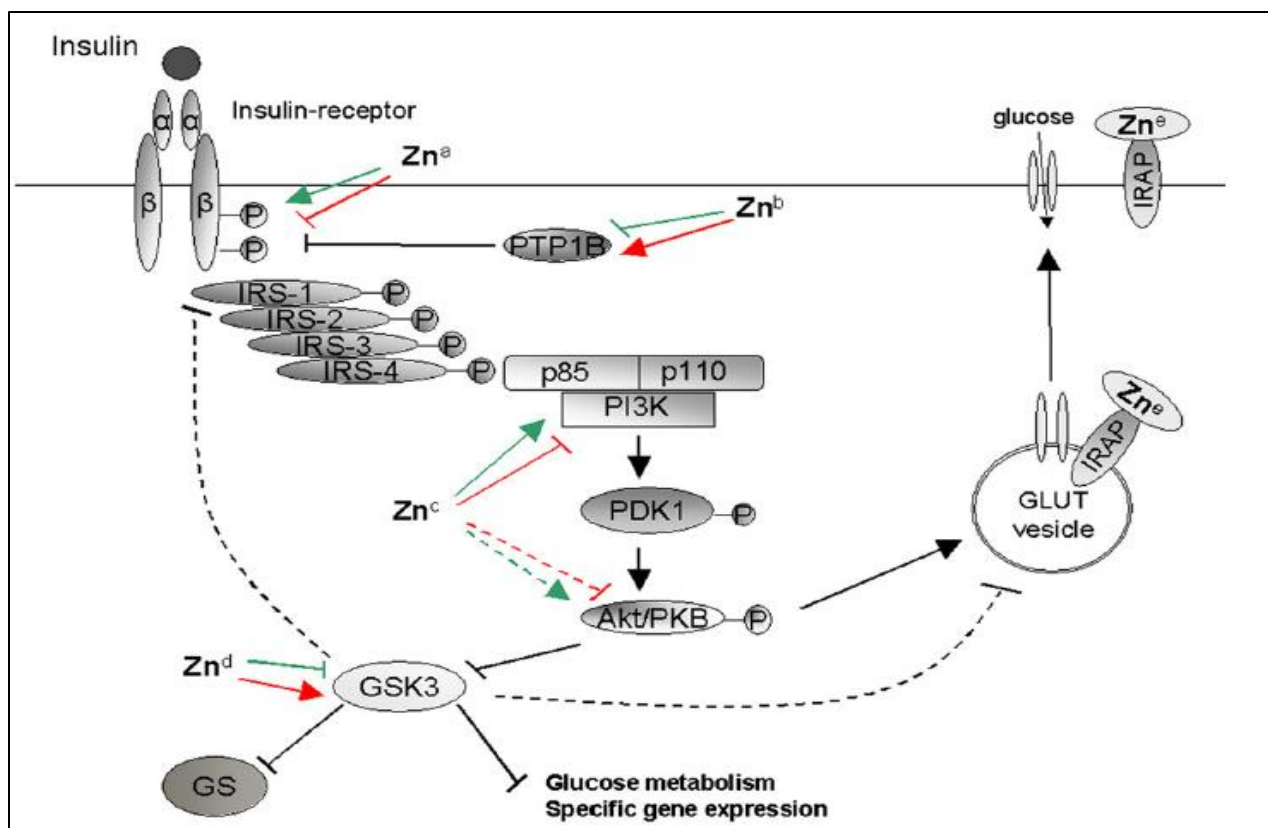
Η μετατόπιση του γλυκοζομεταφορέα GLUT η οποία εξαρτάται από την ινσουλίνη ρυθμίζεται από μόρια όπως τα IRS, η PI3K, ισομορφές της πρωτεϊνικής κινάσης C καθώς και την Akt ή PKB [51]. Όπως και η ινσουλίνη, ο ψευδάργυρος ενισχύει την ενδοκυττάρια πρόσληψη της γλυκόζης τόσο σε ινοβλάστες όσο και σε ώριμα λιποκύτταρα υποδεικνύοντας έτσι την δράση του ψευδαργύρου στο σηματοδοτικό μονοπάτι. Διερευνώντας την δράση του ψευδαργύρου στην μοριακή σηματοδότηση, παρατηρήθηκε ότι ο ψευδάργυρος φωσφορυλιώνει την κινάση της τυροσίνης της β υπομονάδας του υποδοχέα της ινσουλίνης. Αξίζει να σημειωθεί ότι το υπόστρωμα του υποδοχέα, IRS, φαίνεται να μην συμμετέχει στην ενδοκυττάρια πρόσληψη της γλυκόζης ως απόκριση στην διέγερση από τον ψευδάργυρο. Με βάση το μοντέλο, αυτό το οποίο προτείνει την ενεργοποίηση της PI3K χωρίς την μεσολάβηση των IRS, ο ψευδάργυρος διεγείρει την παραγωγή H₂O₂ από κύτταρα της επιδιδυμίδας με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κινάσης FAK (focal adhesion kinase) και η FAK τελικά ενεργοποιεί το μονοπάτι Akt-PI3K [47,48]. Πρόσθετα δεδομένα για την εμπλοκή του ψευδαργύρου στην φωσφορυλίωση του υποδοχέα της ινσουλίνης προέρχονται από την παρατήρηση ότι η PTP1B αποτελεί ευαίσθητο στόχο των ιόντων ψευδαργύρου. Αναστολή της PTP1B από τον ψευδάργυρο ο οποίος αποδεσμεύεται από την MT οδηγεί σε αυξημένη φωσφορυλίωση και άρα ενεργοποίηση του υποδοχέα της ινσουλίνης. Λαμβάνοντας υπόψη ότι το οξειδωτικό stress οδηγεί σε αποδέσμευση του ψευδαργύρου από την MT και άρα σε έλλειψη ψευδαργύρου σε κυτταρικό επίπεδο, η έλλειψη ψευδαργύρου εξαιτίας χαμηλής απορρόφησης ή λόγω αυξημένων απαιτήσεων για αυτόν μπορεί να οδηγήσει σε εμφάνιση ΣΔ [52].

Επιπλέον, η φωσφορυλίωση των καταλοίπων σερίνης από τον ψευδάργυρο και άρα ενεργοποίηση της Akt σε πρώιμα και ώριμα λιποκύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την μετατόπιση του GLUT 4 [52]. Η διαδικασία αυτή μπορεί να ανασταλεί από την βορτμανίνη (wortmannin) η οποία αποτελεί φυσιολογικό αναστολέα της PI3K υποδεικνύοντας έτσι την αναγκαιότητα της PI3K για την ενεργοποίηση της Akt από τον ψευδάργυρο [52].

Ένας ακόμη στόχος του ψευδαργύρου στο μονοπάτι της ινσουλίνης, αποτελεί η πρωτεΐνη GSK-3β η οποία έχει δείχθει ότι τα επίπεδά της αυξάνονται στον μυϊκό ιστό σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 με αποτέλεσμα την διαταραχή της δράσης της συνθάσης του γλυκογόνου καθώς και την ύπαρξη ινσουλινο-αντίστασης σε σκελετικό μυϊκό ιστό επίσης σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 2. Με δεδομένο την φωσφορυλίωση της σερίνης αλλά και την αναστολή της IRS-1 από την GSK-3 η

επίδραση της πρωτεΐνης αυτής μπορεί να είναι ακόμη μεγαλύτερη όταν τα επίπεδά της αυξάνουν επηρεάζοντας έτσι ανοδικά σημεία του σηματοδοτικού μονοπατιού της ινσουλίνης [53]. Η GSK3 αναστέλλεται μη ανταγωνιστικά από τον ψευδάργυρο οδηγώντας έτσι σε αύξηση της ενδοκυττάριας πρόσληψης της γλυκόζης. Η παρατήρηση αυτή είναι σε συμφωνία με το γεγονός ότι ο ψευδάργυρος φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την Akt η οποία με την σειρά της αναστέλλει την GSK-3β. Συνεπώς, όλες οι λειτουργίες της GSK-3 οι οποίες συνοψίζονται παραπάνω, μπορεί να επηρεάζονται από την παρουσία του ψευδαργύρου με αποτέλεσμα όχι μόνο την ενίσχυση της πρόσληψης της γλυκόζης αλλά και αύξησης της σύνθεσης του γλυκογόνου μέσω ενεργοποίησης της συνθάσης του γλυκογόνου καθώς και την μείωση της καταστροφής των β κυττάρων σε συνδυασμό με την αύξηση της αντιγραφής των β κυττάρων.

Συνοπτικά λοιπόν, ο ψευδάργυρος επηρεάζει το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης σε πολλαπλά επίπεδα τα οποία περιλαμβάνουν την φωσφορυλίωση της β υπομονάδας του υποδοχέα της ινσουλίνης αλλά και την Akt με αποτέλεσμα την αναστολή της GSK-3β. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν το ινσουλινομιμητικό προφίλ του συγκεκριμένου μετάλλου κάνοντας το θεραπευτική εναλλακτική στην αντιμετώπιση του ΣΔ και την ινσουλινοαντίσταση. Η περαιτέρω αντιδιαβητική δράση του ψευδαργύρου ως αναστολέα της GSK3 υποστηρίζεται σε μελέτες *in vivo* σε διαβητικά μοντέλα πειραματόζωων όπου η χορήγηση αναστολέων της GSK3 από το στόμα, υποδόρια ή ενδοπεριτοναϊκά είχα ως αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων της γλυκόζης και την βελτίωση στην απόκριση στην ινσουλίνη.



Εικόνα 3.2.5 Α Σύνοψη των πιθανών σημείων δράσης του ψευδαργύρου (κόκκινο: απουσία/πράσινο: παρουσία)στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης.

Ο ψευδάργυρος διαθέτει ινσουλινομιμητική δράση όχι μόνο γιατί επιδρά σε συγκεκριμένα σημεία του σηματοδοτικού μονοπατιού της ινσουλίνης αλλά γιατί ακόμη παρουσιάζει προστατευτική δράση ως προς τα ινσουλινοπαραγωγικά β κύτταρα αποτρέποντας την καταστροφή τους. Τόσο στον ΣΔ τύπου 1 όσο και στον τύπου 2 έχει παρατηρηθεί καταστροφή των β κυττάρων η οποία συχνά οφείλεται σε ανοσολογικά αίτια και η καταστροφή αυτή μεσολαβείται από προφλεγμονώδεις κυτοκίνες [25].

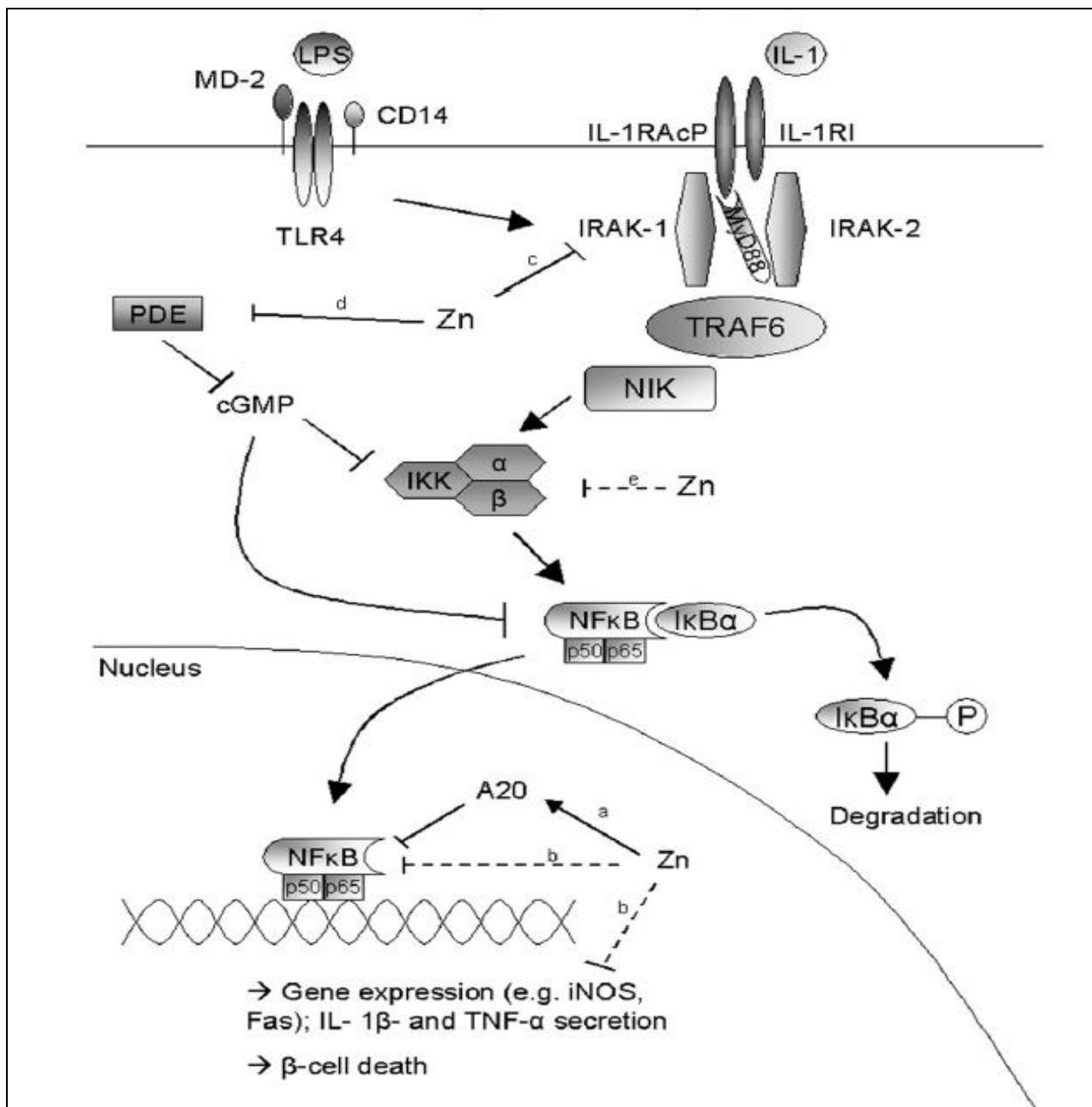
Η ιντερλευκίνη-1β (IL-1β) η οποία αποτελεί κύρια κυτοκίνη των μακροφάγων έχει δειχθεί ότι εμπλέκεται στην αναστολή της έκκρισης της ινσουλίνης η οποία διεγείρεται από την γλυκόζη αλλά και στην ωρίμανση της ινσουλίνης από προ-ινσουλίνη [54]. Ακόμη έχει δειχθεί ότι η ιντερλευκίνη-1β ενέχεται στην καταστροφή των νησιδίων του παγκρέατος τόσο στον ΣΔ τύπου 1 όσο και στον τύπου 2 [54]. Οι διεργασίες αυτές φαίνεται πως μεσολαμβάνονται από την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFκB (nuclear factor kappa B) και της

συνεκδοχικής παραγωγής νιτρικού οξέος (NO) από την επαγόμενη συνθάση του νιτρικού οξέος (iNOS) αλλά και από την έκφραση της Fas στα β κύτταρα [54]. Στον άνθρωπο φαίνεται πως η παραγωγή NO είναι λιγότερο σημαντική ως μεσολαβητής της καταστροφής των β κυττάρων από κυτοκίνες σε σχέση με τα ζώα [54]. Ο NFκB έχει προ-αποπτωτικές και αντι-αποπτωτικές ιδιότητες ανάλογα με τις κυτοκίνες που περιβάλλουν τα β κύτταρα ενώ δρα αποπτωτικά μετά από ενεργοποίηση του από την ιντερλευκίνη-1 [55]. Στα ανθρώπινα παγκρεατικά νησίδια η ιντερλευκίνη-1β δεν οδηγεί συνήθως σε απόπτωση καθώς απαιτούνται επιπλέον κυτοκίνες όπως είναι η ιντερφερόνη γ (IFN-γ) και ο TNF-α. Τα μόρια αυτά ενισχύουν την δράση της ιντερλευκίνης-1β μέσω ενεργοποίησης του σηματοδοτικού της μονοπατιού. Η ιντερλευκίνη-1β συντίθεται στα β παγκρεατικά κύτταρα και διεγείρεται από υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης σε καλλιέργεια ανθρώπινων παγκρεατικών νησιδίων [56]. Η ιντερλευκίνη-1β έχει δειχθεί ότι δρα αντιδιαβητικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενώ μπορεί να δρα προ-διαβητικά μετά από μακροχρόνια έκθεση σε αυτή [54,55]. Με δεδομένο ότι οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες αυξάνονται σε μεγαλύτερους σε ηλικία ανθρώπους, η αύξηση του κινδύνου για ΣΔ τύπου 2 με την ηλικία μπορεί εν μέρει να εξηγηθεί [57]. Η καταστροφική και διαβητο-γενετική δράση της ιντερλευκίνης-1β ενισχύεται από την παρατήρηση ότι η αναστολή του σηματοδοτικού της μονοπατιού από αγωνιστές του υποδοχέα της είχε ως αποτέλεσμα την βελτίωση της εκκριτικής λειτουργίας των β κυττάρων σε ασθενείς αλλά και πειραματόζωα με ΣΔ τύπου 2.

Τόσο η ιντερλευκίνη-1β όσο και ο μεταγραφικός παράγοντας NFκB αποτελούν στόχους του ψευδαργύρου εμπλέκοντας έτσι το μέταλλο αυτό στην ανάπτυξη της ασθένειας. Έχει δειχθεί ότι ο ψευδάργυρος διεγείρει την έκκριση ιντερλευκίνης-1, της ιντερλευκίνης-6, του TNF-α και του INF-γ από μονοκύτταρα της περιφερικής κυκλοφορίας με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο [30]. Τα αντικρουόμενα αποτελέσματα διαφόρων μελετών σχετικά με τον ψευδάργυρο και την επίδραση του στα μόρια αυτά υποδεικνύουν ότι ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν ο χρόνος αλλά και η δόση της έκθεσης στο συγκεκριμένο μέταλλο. *In vivo* χορήγηση ψευδαργύρου σε συγκεντρώσεις μέχρι και 500 μM φαίνεται πως διεγείρει την παραγωγή κυτοκινών ενώ συνδυασμός του μετάλλου με πυριθιόνη (ionophore pyrithione) φαίνεται πως μειώνει την παραγωγή κυτοκινών υποδεικνύοντας ότι υψηλές συγκεντρώσεις ενδοκυττάρου ψευδαργύρου αναστέλλουν την παραγωγή κυτοκινών σε αντίθεση με χαμηλές συγκεντρώσεις οι οποίες φαίνεται να την προάγουν.

Σε ανθρώπους μεγαλύτερης ηλικίας με μειωμένη συγκέντρωση ψευδαργύρου στο πλάσμα του αίματος, κύτταρα τα οποία παράγουν ιντερλευκίνη-1β και TNF-α φαίνεται να αυξήθηκαν σε σχέση με νεότερα άτομα όπως αύξηση παρουσίασαν και τα επίπεδα των παραγόμενων κυτοκινών [58]. Ο NFκB επηρεάζεται περαιτέρω από την παρουσία του ψευδαργύρου καθώς χορήγηση ψευδαργύρου είχε ως αποτέλεσμα α) μειωμένη δράση του NFκB που εξαρτάται από τον TNF-α, β) αναστολή της δράσης του NFκB και γ) μειωμένη έκφραση του iNOS σε παγκρεατικά κύτταρα CD1 ποντικών που έγιναν διαβητικά μέσω αλοξάνη ή στρεπτοζωτοκίνης.

Συμπερασματικά λοιπόν, λαμβάνοντας υπόψη α) τα ωφέλιμα αποτελέσματα της χορήγησης ψευδαργύρου στον γλυκαιμικό έλεγχο τόσο του ΣΔ τύπου 1 όσο και του τύπου 2 σε διαβητικά άτομα και πειραματόζωα και β) την ινσουλινομιμητική του δράση και την προστασία των β παγκρεατικών κυττάρων έναντι σε κυτοκίνες ο ψευδάργυρος μπορεί να θεωρηθεί ένας καλός υποψήφιος για την αντιμετώπιση του ΣΔ και κύριος του τύπου 2. Ωστόσο, ιδιαίτερα σημασία πρέπει να δοθεί στην δοσολογία του χορηγούμενου ψευδαργύρου προκειμένου να αποφευχθούν οι αρνητικές συνέπειες από την διαταραχή του ισοζυγίου του στον οργανισμό. Ο ΣΔ μπορεί να θεωρηθεί μια πολυπαραγοντική ασθένεια με πληθώρα αιτιοπαθογενετικών παραγόντων. Αδιαμφισβήτητα ο ψευδάργυρος και ο λεπτός έλεγχος των επιπέδων αποτελεί μέρος της παθοφυσιολογικής αυτής κατάστασης ανεξάρτητα από τα σημεία στα οποία συμμετέχει. Η συμμετοχή του ψευδαργύρου σε πολυάριθμες κυτταρικές διαδικασίες που μετέχουν στην ανάπτυξη και εμφάνιση της ασθένειας δίνει έμφαση στην διαβητογόνο δράση του όταν παρουσιαστεί διαταραχή της ομοιοστασίας του προσδίδοντας έτσι στο μέταλλο αυτό ξεχωριστή θέση στην διάγνωση, πρόληψη και θεραπεία του ΣΔ.



Εικόνα 3.2.5 Β Επίδραση του ψευδαργύρου στη καταστροφή των β κυττάρων που μεσολαβείται από κυτοκίνες.

3.3 ΤΟ ΒΑΝΑΔΙΟ

Το βανάδιο αποτελεί το 0.015% του φλοιού της γης επίπεδο που κυμαίνεται σε αυτό του ψευδαργύρου. Το βανάδιο παρουσιάζει υψηλή διαθεσιμότητα ενώ συσσωρευμένο σε διάφορα μεταλλεύματα είναι σπάνιο. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το βανάδιο μπορεί να βρεθεί στο θαλασσινό νερό ως vanadate (V) με την μορφή $\text{Na}_2\text{H}_2\text{VO}_4^-$ σε συγκεντρώσεις που αντιστοιχούν σε 30 nM [59]. Το βανάδιο θεωρείται το δεύτερο πιο διαδεδομένο μεταβατικό μέταλλο στο θαλασσινό νερό μετά τον μόλυβδο (100 nM) και σαφώς πιο διαδεδομένο από τον σίδηρο (0.02-1 nM). Έχει δειχθεί ότι οξειδία του σιδήρου συμμετέχουν στην συγκέντρωση και ανακύκλωση του βαναδίου στους ωκεανούς [60]. Το βανάδιο σχετικά εύκολα μεταπίπτει μεταξύ των οξειδωτικών βαθμίδων IV και V. Οι οξειδωτικές βαθμίδες που συναντάται φυσιολογικά το βανάδιο είναι οι III, IV και V. Το οξειδωτικό δυναμικό σε pH 7 για $\text{H}_2\text{VO}_4^- + 4\text{H}^+ + \text{e}^- \leftrightarrow \text{VO}^{2+} + 3\text{H}_2\text{O}$ αντιστοιχεί σε -0.341 V και έτσι είναι το εύρος όπου το VO^{2+} (βαναδύλιο) οξειδώνεται σε vanadate κάτω από αερόβιες συνθήκες. Το βαναδικό ιόν μεταπίπτει σε VO^{2+} ενδοκυττάρια από διάφορους παράγοντες όπως είναι πεπτίδια και πρωτεΐνες πλούσιες σε κυστεΐνη (γλουταθειόνη), το ασκορβικό, το NADH και φαινολικές ενώσεις. Τα κύρια είδη βαναδίου κάτω από αερόβιες συνθήκες είναι τα $\text{H}_2\text{VO}_4^- \leftrightarrow \text{H}_2\text{VO}_4^{2-} + \text{H}^+$ ($\text{pK}_a=8.1$) [61]. Κατιονικά είδη V^v όπως VO^{3+} ή VO_2^+ είναι σταθερά μόνο σε pH 7 και μόνο όταν συναρμολογούνται σε ισχυρά υποστρώματα που τα προφυλάσσουν από καθίζηση λόγω υδροξειδίων. Το ίδιο ισχύει και για το VO_2^+ σε αναερόβιες συνθήκες όπου υπάρχει φυσιολογικά σε μορφή $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+} \leftrightarrow [\text{VO}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_4]^+ + \text{H}^+$ στο χαμηλότερο εύρος pH. Τα κατιόντα οξοβαναδίου είναι ισχυρά οξέα κατά Lewis. Συνεπώς το βανάδιο πληροί δύο προϋποθέσεις για να θεωρηθεί «βιο-μέταλλο»: α) οξειδωαναγωγική συμπεριφορά σε ηλεκτροχημικό εύρος σχετικό με βιολογικές διεργασίες και β) ευαισθησία σε πυρηνόφιλα υποστρώματα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε ότι αφορά τη σημασία του βαναδίου ως απαραίτητο ιχνοστοιχείο παρουσιάζει η σχέση του βαναδικού ιόντος με το φωσφορικό ιόν σε pH 4 και φυσιολογικές συγκεντρώσεις (0.2 μM και 30 mM αντίστοιχα) στο πλάσμα ου αίματος. Το βαναδικό ιόν θεωρείται εδραιωμένος αναστολέας φωσφοενζύμων όπως είναι οι φωσφατάσες, οι κινάσες και οι ριβονουκλεάσες ενώ ακόμα μπορεί να διεγείρει συγκεκριμένα ένζυμα όπως οι φωσφομουτάσες και οι φωσφοϊσομεράσες. Ο ρόλος του βαναδίου ως ρυθμιστής φωσφοενζύμων είναι αναμενόμενος έως ένα σημείο. Η αναστολή της φωσφατάσης της τυροσίνης θεωρείται κύριο πιθανό βήμα στην ινσουλινμιμητική δράση του βαναδίου που αναλύεται παρακάτω. Η φυσιολογική δράση του

βαναδικού δεν περιορίζεται μόνο στο μονοβαναδικό αλλά επεκτείνεται και σε άλλα είδη όπως είναι το διβαναδικό (divanadate), το τετραβαναδικό (tetravanadate), το πενταβαναδικό (pentavanadate), και το δεκαβαναδικό (decavanadate). Το βαναδικό έχει δειχθεί ότι μπορεί να σχηματίσει ανυδρίτες με φωσφορικά και ATP.

ΟΝΟΜΑ – ΣΥΜΒΟΛΟ	Βανάδιο (V)
ΑΤΟΜΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ	23
ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	Στοιχείο μετάπτωσης
ΟΜΑΔΑ – ΠΕΡΙΟΔΟΣ – ΤΟΜΕΑΣ	5,4,d
ΣΧΕΤΙΚΗ ΑΤΟΜΙΚΗ ΜΑΖΑ	50,9414 g/mol
ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΑΚΗ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ	[Ar]4s ² 3d ³

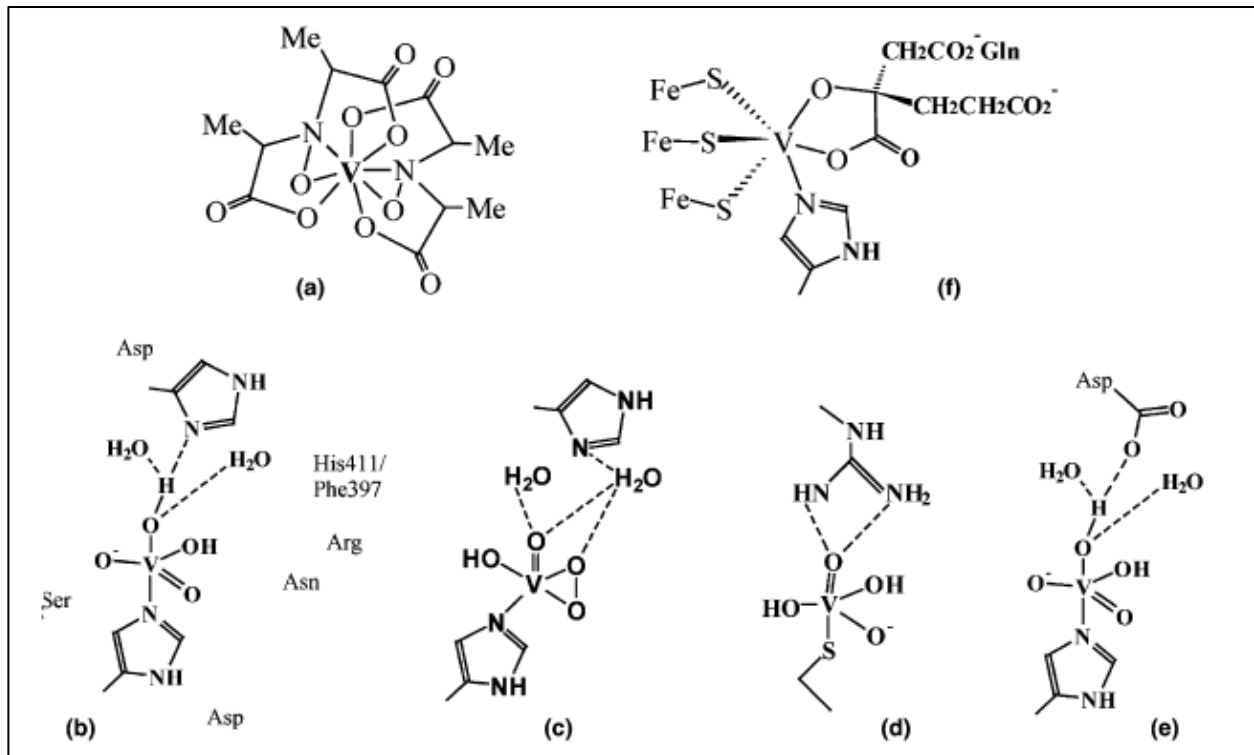
Ατομικές ιδιότητες	
Ατομική ακτίνα	132,1 pm
Ακτίνα van der Waals	205 pm
Ηλεκτραρνητικότητα	1,63
Ενέργειες ιονισμού	1st: 650,9 kJ·mol ⁻¹

Φυσικά χαρακτηριστικά	
Σημείο τήξης	2183 K, 1910°C
Σημείο βρασμού	3680 K, 3407°C
Πυκνότητα	6 g·cm ⁻³
Ενθαλπία τήξης	21,0 kJ·mol ⁻¹
Μαγνητική συμπεριφορά	παραμαγνητικό
Σκληρότητα Mohs	7
Σκληρότητα Brinell	628 MPa

3.3.1 Το βανάδιο στους έμβιους οργανισμούς

Διάφορα γένη των θαλάσσιων πολυχαιτών που ανήκουν στα Ascidiaceae συσσωρεύουν βανάδιο από το θαλασσινό νερό. Το βαναδικό ιόν εισέρχεται στον οργανισμό μέσω καναλιών των φωσφορικών ή των θειϊκών και ανάγεται από πρωτεΐνες σε VO^{2+} και V^{3+} και στη συνέχεια αποθηκεύεται σε ειδικά κύτταρα, τα βαναδοκύτταρα, σε συγκεντρώσεις έως και 0.3 M. Δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο γιατί αυτοί οι οργανισμοί δεσμεύουν βανάδιο ωστόσο η εμφάνιση βαναδίου στους οργανισμούς αυτούς αποτελεί μια από τις κύριες πηγές του σε μορφή πορφυρινών βαναδυλίου σε ποσοστό έως και 4%. Βανάδιο επίσης συσσωρεύεται αλλά σε μικρότερο βαθμό και σε είδη του γένους *Amanita*. Τα μανιτάρια αυτά περιέχουν μία ένωση βαναδίου (μη οξο-βαναδίου) που ονομάζεται amavanadin ο ρόλος της οποίας δεν είναι γνωστός. Έχει προταθεί ότι η ένωση αυτή αποτελεί εξελικτικό απομεινάρι ενός συμπαραγόνα ενζύμου που καταλύει την μεταφορά οξο-υποστρωμάτων.

Μια καλά μελετημένη ομάδα ενζύμων που περιέχουν βανάδιο είναι οι αλοπεροξειδάσες (haloperoxidases) οι οποίες καταλύουν την οξείδωση των θειοεθαίρων σε σουλφοξειδία [62,63]. Βακτήρια τα οποία παράγουν νιτρικά (όπως του γένους *Azotobacter*) κωδικοποιούν εκτός από την νιτρογενάση μολύβδου και την νιτρογενάση βαναδίου η οποία εκφράζεται απουσία μολύβδου σε χαμηλές θερμοκρασίες.



Εικόνα 3.3.1 Σύμπλοκα βαναδίου που συμμετέχουν σε βιολογικές διεργασίες. (α) Amanitin των μανιταριών *Amanita*, (β) το ενεργό κέντρο ενζύμων υπεροξειδασών (*A. nodosum* (His⁴¹¹) και *C. inaequalis* (Phe³⁹⁷), (γ) το ένζυμο του *C. inaequalis*, (δ) vanadate-phosphatase σύμπλοκο του bovinephosphotyrosylphosphatase, (ε) vanadate-phosphatase, (φ) περιβάλλον βαναδίου στη νιτρογενάση του Αζωτοβακτηρίου.

3.3.2 ΧΗΜΙΚΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΒΑΝΑΔΙΟΥ

Το βανάδιο ως μέταλλο ανήκει στην ομάδα 5 του Περιοδικού Πίνακα και είναι μεταβατικό μέταλλο. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το βανάδιο εμφανίζεται σε ανιονική μορφή (vanadate) ή κατιονική (vanadyl) [64,65]. Η συχνότερη μορφή βαναδίου στο πλάσμα του αίματος είναι αυτή του βαναδικού ιόντος το οποίο απαντάται ενωμένο με την τρανσφερίνη και σε μικρότερο βαθμό με τον αλβουμίνη [65]. Τα ιόντα του βαναδίου εισέρχονται στο εσωτερικό των κυττάρων μέσω συστημάτων μεταφοράς ανιόντων, όπως γίνεται και η μεταφορά των φωσφορικών [65]. Στο κυττόςολιο, το βαναδικό ιόν μεταπίπτει σε βαναδύλιο μέσω μη ενζυματικών αντιδράσεων. Στο πλαίσιο αυτό, θεωρείται πιθανό *in vivo* το βαναδύλιο που είναι η κύρια μορφή του βαναδίου να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση των μεταβολικών ιδιοτήτων του. Το μεγαλύτερο ποσοστό του βαναδίου βρίσκεται ενωμένο με πρωτεΐνες και ιδιαίτερα την γλουταθειόνη η οποία το προστατεύει από οξειδωση και μόνο το 1% βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή [66]. Η φυσιολογική συγκέντρωση του βαναδίου στο πλάσμα είναι περίπου ίδια με αυτή ενδοκυττάρια (20 nM) και η συνολική ποσότητα στον οργανισμό αντιστοιχεί σε 100-200 μg.

Μεγάλος αριθμός συμπλόκων βαναδίου έχουν σχεδιαστεί και συντεθεί με στόχο την διερεύνηση της αντιδιαβητικής τους δράσης. Τα σύμπλοκα και οι ενώσεις του βαναδίου διαχωρίζονται σε τρεις κύριες κατηγορίες οι οποίες περιλαμβάνουν τα ανόργανα άλατα (vanadate και vanadyl), τα σύμπλοκα υπεροξειδίου (peroxovanadium complexes) και τα οργανικά σύμπλοκα βαναδίου [65]. Αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί κάνοντας χρήση των ανόργανων μορφών του βαναδίου τόσο σε μοντέλα πειραματόζωων όσο και σε ανθρώπινες κλινικές μελέτες. Αν και στις μελέτες αυτές αποδεικνύεται η δράση των ενώσεων αυτών ως παράγοντες μείωσης των επιπέδων της γλυκόζης, οι παρενέργειες που παρουσιάζουν κυρίως λόγω τοξικότητας περιορίζει την χρήση τους ως θεραπευτικούς παράγοντες. Έχει δειχθεί ότι η δραστική συγκέντρωση τέτοιων ενώσεων για την μείωση των επιπέδων της γλυκόζης συνοδεύεται από διάρροια και αφυδάτωση [67]. Επιπλέον, ανόργανες ενώσεις του βαναδίου φαίνεται πως έχουν χαμηλή απορρόφηση. Συνεπώς, μια σειρά από οργανικά σύμπλοκα βαναδίου αναπτύχθηκαν με σκοπό την βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας και την μείωση των παρενεργειών που εμφανίζονται στην περίπτωση των ανόργανων ενώσεων. Μεταξύ αυτών των ενώσεων ξεχωρίζουν τα: bis(maltolato)oxovanadium(IV) (BMOV) και bis(ethylmaltolato) oxovanadium(IV) (BEOV). Τα σύμπλοκα αυτά εμφανίζουν σημαντικότερη δράση, χαμηλότερη τοξικότητα και βελτιωμένη

ανοχή. Τα σύμπλοκα υπεροξειδίου παρουσιάζουν λιγότερο ενδιαφέρον καθώς σχετίζονται με υψηλότερη τοξικότητα και πρόκληση οξειδωτικού stress στα κύτταρα [68].

3.3.3 ΒΑΝΑΔΙΟ ΚΑΙ ΣΔ

Έχει δειχθεί ότι διάφορα σύμπλοκα βαναδίου διαθέτουν ινσουλινο- μιμητικές και ενισχυτικές ιδιότητες τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Αν και η αντιδιαβητική ιδιότητα του βαναδίου καταγράφηκε πριν περισσότερο από 100 χρόνια, η πιθανή χρήση του ως αντιδιαβητικός παράγοντας έλαβε χώρα αρκετά χρόνια μετά (1985) [69]. Η μελέτη αυτή καθώς και μια σειρά άλλων υποστηρίζει ότι η θεραπεία με βανάδιο επιφέρει μείωση των επιπέδων της γλυκόζης σε διαβητικά μοντέλα πειραματόζων με ΣΔ τύπου 1 [69]. Στον ΣΔ τύπου 2 και άλλα μοντέλα ινσουλινοαντίστασης το βανάδιο βελτιώνει τα επίπεδα ινσουλίνης στο πλάσμα του αίματος καθώς και την ευαισθησία στην ινσουλίνη [70]. Συνεπώς, οι ενώσεις αυτές αποτελούν πιθανούς φαρμακευτικούς παράγοντες για την από του στόματος αντιμετώπιση του ΣΔ τύπου 1 και 2. Αν και υπάρχουν πολυάριθμες μελέτες που υποστηρίζουν στην αντιδιαβητική ικανότητα του βαναδίου δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα κατά πόσο το βανάδιο μιμείται ή/και ενισχύει την δράση της ινσουλίνης καθώς και τον μηχανισμό μέσω του οποίου δρα αντιδιαβητικά. Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν την ινσουλινομιμητική δράση του βαναδίου *in vitro* σε υψηλές συγκεντρώσεις (milimolar), ωστόσο *in vivo* δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν συγκεντρώσεις σε αυτό το εύρος. Επιπλέον, αρκετός όγκος δεδομένων υποστηρίζει ότι η ενίσχυση της διάθεσης της γλυκόζης στους περιφερικούς ιστούς *in vivo*, δεν αποτελεί επαρκή εξήγηση για την ικανότητα του βαναδίου να μειώνει α επίπεδα της γλυκόζης. Όμοια, διάφορες μελέτες υποστηρίζουν ότι η καταστολή της ηπατικής παραγωγής της γλυκόζης μέσω αναστολής της δράσης βασικών ενζύμων της γλυκονεογένεσης μπορεί να διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης από το βανάδιο. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία συμμετέχουν στην μεταβολική δράση του βαναδίου δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένα ωστόσο, αρκετά ένζυμα τα οποία σχετίζονται με την σηματοδότηση της ινσουλίνης έχουν προταθεί ως πιθανοί στόχοι του βαναδίου.

3.3.4 ΒΑΝΑΔΙΟ ΚΑΙ ΣΔ ΤΥΠΟΥ 1

Ο ΣΔ τύπου 1 χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία η οποία σχετίζεται με προοδευτικό θάνατο των β παγκρεατικών κυττάρων και υπερινσουλιναιμία. Κατά συνέπεια οι ασθενείς αυτοί χρειάζονται την συνεχή χορήγηση ινσουλίνης για να επιβιώσουν. Καθώς τα προβλήματα που συνδέονται με την συνεχή χορήγηση ινσουλίνης είναι αρκετά, παράγοντες που θα μπορούσαν ενδεχομένως να χρησιμοποιηθούν για την αντιμετώπιση της κατάστασης αυτής βρίσκονται στο κέντρο πολλών μελετών. Το βανάδιο ως ινσουλινο- μιμητικός ή/και ενισχυτικός παράγοντας, αποτελεί καλό υποψήφιο παράγοντα για την από του στόματος θεραπεία του ΣΔ τύπου 1. Μελέτες υποστηρίζουν ότι η χρόνια χορήγηση ανόργανων μορφών βαναδίου έχει ως αποτέλεσμα την εξομάλυνση των επιπέδων της γλυκόζης του πλάσματος ενώ παράλληλα επαναφέρει τα επίπεδα των λιπιδίων σε διάφορα διαβητικά μοντέλα πειραματόζωων ΣΔ τύπου 1 χωρίς σημαντική διαφοροποίηση των επιπέδων της ινσουλίνης στο πλάσμα του αίματος [69]. Παράλληλα, το βανάδιο δεν έχει καμία επίδραση στα επίπεδα της γλυκόζης και της ινσουλίνης στο πλάσμα του αίματος φυσιολογικών πειραματόζωων [69]. Άλλες μελέτες υποστηρίζουν η βελτίωση του μεταβολικού προφίλ των διαβητικών πειραματόζωων μετά από θεραπεία με βανάδιο συνοδεύεται με σημαντική αύξηση της πρόσληψης της γλυκόζης από περιφερικούς ιστούς καθώς και εξομάλυνση της ηπατικής παραγωγής γλυκόζης. Η βελτίωση αυτή στους περιφερικούς ιστούς σχετίζεται με την επαναφορά των χαμηλών επιπέδων του mRNA και της πρωτεΐνης του γλυκοζομεταφορέα GLUT 4 τόσο στον μυϊκό όσο και στον καρδιακό ιστό [71]. Όπως έχει ήδη αναφερθεί ο GLUT 4 αποτελεί τον κύριο γλυκοζομεταφορέα στους ιστούς αυτούς και η έκφρασή του εξαρτάται από την ινσουλίνη. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η θεραπεία διαβητικών πειραματόζωων (STZ diabetic rats) με την ένωση BMOV η οποία είναι οργανική ένωση βαναδίου που χορηγήθηκε με το νερό των πειραματόζωων είχε ως αποτέλεσμα του GLUT 4 στην πλασματική μεμβράνη του καρδιακού ιστού [72]. Σε ανθρώπινες κλινικές μελέτες του ΣΔ τύπου 1, έχει δειχθεί ότι χρόνια θεραπεία με βανάδιο μειώνει σημαντικά την ανάγκη για ινσουλίνη. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι δεν επηρεάστηκαν τα επίπεδα του πεπτιδίου C στο πλάσμα του αίματος. Το πεπτίδιο αυτό συντίθεται μαζί με την ινσουλίνη σε ίδια συγκέντρωση από τα β - παγκρεατικά κύτταρα και άρα η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει ότι μια αύξηση της παραγωγής ινσουλίνης από το πάγκρεας δεν εξηγεί την μειωμένη απαίτηση των ασθενών για ινσουλίνη. Όμοια, μειωμένες απαιτήσεις σε ινσουλίνη παρουσίασαν διαβητικά ζώα (STZ diabetic rats και BB rats) μετά από χορήγηση βαναδίου [73].

3.3.4.1 ΒΑΝΑΔΙΟ ΚΑΙ ΣΔ ΤΥΠΟΥ 2

Σε αντίθεση με τον ΣΔ τύπου 1, ο ΣΔ τύπου 2 σχετίζεται με την προοδευτική ανάπτυξη ινσουλινοαντίστασης στους περιφερικούς ιστούς και παρά τα αυξημένα επίπεδα ινσουλίνης στο αίμα οι ασθενείς αυτοί παρουσιάζουν υπεργλυκαιμία. Οποιαδήποτε λοιπόν προσέγγιση στην βελτίωση της ευαισθησίας της ινσουλίνης και την ενίσχυση της απόκρισης σε αυτή μπορεί να αποτελέσει σημαντικό κλινικό παράγοντα στην αντιμετώπιση του ΣΔ τύπου 2. Κατά συνέπεια, τις προηγούμενες δεκαετίες τα σύμπλοκα βαναδίου συγκέντρωσαν αρκετό ενδιαφέρον καθώς διαθέτουν ινσουλινο- μιμητικές ή/και ενισχυτικές ιδιότητες. Έχει δειχθεί σε αρκετές μελέτες ότι η χρήση τόσο ανόργανων όσο και οργανικών ενώσεων βαναδίου είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική μείωση της ινσουλίνης στο αίμα όσο και την βελτίωση της ευαισθησίας σε αυτή σε διαβητικά μοντέλα πειραματόζωων ΣΔ τύπου 2 [70]. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται και σε διαβητικά πειραματόζωα Zucker τα οποία εμφανίζουν ιδιαίτερα κοινό διαβήτη τύπου 2 με τον άνθρωπο [74]. Καθώς η ρυθμιστική δράση της ινσουλίνης σε ότι αφορά την γλυκόζη μεσολαβείται κυρίως από την πρόσληψη της γλυκόζης από περιφερικούς ιστούς και από μείωση της ηπατικής παραγωγής της, είναι πιθανό το βανάδιο να μιμείται την μεταβολική δράση της ορμόνης αυτής στους περιφερικούς ιστούς. Σε άλλες μελέτες μοντέλων πειραματόζωων προ- διαβήτη υποστηρίζεται ότι η βελτίωση της ομοιοστασίας της γλυκόζης δεν οφείλεται σε αναστολή της ηπατικής παραγωγής της αλλά σε αύξηση της ευαισθησίας της ινσουλίνης στους περιφερικούς ιστούς και κυρίως στον μυϊκό [75]. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από κλινικές μελέτες στον άνθρωπο όπου χρησιμοποιήθηκε βανάδιο σε μορφή θεικού βαναδυλίου. Ωστόσο, επειδή η αύξηση της πρόσληψης της γλυκόζης που παρατηρήθηκε στους ιστούς αυτούς δεν συνοδεύεται από αύξηση των επιπέδων του mRNA ή της πρωτεΐνης του GLUT 4 συνεπάγεται ότι το φαινόμενο αυτό οφείλεται σε διέγερση της μετατόπισης του ενδογενούς γλυκοζομεταφορέα ή σε ενίσχυση της μετατόπισής του στην πλασματική μεμβράνη. Παράλληλα, το βανάδιο, εκτός από την επίδρασή του στην ενδοκυττάρια πρόσληψη της γλυκόζης, φαίνεται να αποκαθιστά την δράση ενζύμων-κλειδιά στο μεταβολισμό της γλυκόζης καθώς και ένζυμα του λιπιδιακού μεταβολισμού σε ορισμένα μοντέλα πειραματόζωων με ινσουλινο-αντίσταση. Ακόμη, το βανάδιο έχει δειχθεί ότι ενισχύει την δράση της ινσουλίνης σε διαβητικά πειραματόζωα (Zucker) ενώ παράλληλα προστατεύει την λειτουργία των β παγκρεατικών κυττάρων [74]. Στα πλαίσια αυτά το βανάδιο μπορεί να έχει ευεργετική επίδραση

σε κλινικό επίπεδο στην πρόληψη ή/και παράταση της απώλειας των β παγκρεατικών κυττάρων σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 2.

Η ινσουλίνη επιπλέον, ρυθμίζει το αίσθημα για πρόσληψη τροφής μέσω αναστολής του υποθαλαμικού νευροπετιδίου Y (NPY) οδηγώντας στην αύξηση της παραγωγής της λεπτίνης η οποία εκκρίνεται από τον λιπώδη ιστό. Επειδή διάφορες μελέτες υποστηρίζουν ότι θεραπεία με BMOV έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του σωματικού βάρους σε διαβητικά πειραματόζωα, ένας προτεινόμενος μηχανισμός δράσης του βαναδίου ενδέχεται να είναι μίμηση ή/και η ενίσχυση της δράσης της ινσουλίνης στον υποθάλαμο και τα αποτελέσματα που παρατηρείται στο σωματικό βάρος να οφείλονται σε μεταβολή των επιπέδων του νευροπετιδίου στον υποθάλαμο. Πιο συγκεκριμένα, οι Wang και συνεργάτες έδειξαν ότι χορήγηση βαναδίου (BMOV) μείωσε σημαντικά τα επίπεδα του mRNA και της πρωτεΐνης του NPY και ενίσχυσε τα επίπεδα της λεπτίνης στο πλάσμα του αίματος και τον λιπώδη ιστό υποδεικνύοντας ότι η ένωση BMOV μπορεί να αυξάνει την ευαισθησία της ινσουλίνης στο λιπώδη ιστό και να μειώνει την αίσθηση για πρόσληψη τροφής μέσω μείωση των επιπέδων του νευροπετιδίου Y στον υποθάλαμο.

Επιπλέον, χρόνια θεραπεία διαβητικών επίμυων με την οργανική ένωση bis(ethylmaltolato)oxovanadium(IV) είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική αύξηση των επιπέδων της λεπτίνης σε συνδυασμό με τα επίπεδα της ινσουλίνης στο πλάσμα του αίματος [76] υποδεικνύοντας έτσι ότι η επίδραση του βαναδίου στα επίπεδα της λεπτίνης μεσολαβείται έμμεσα από την βελτίωση της λειτουργίας των β παγκρεατικών κυττάρων και άρα των επιπέδων της ινσουλίνης στο πλάσμα του αίματος.

Αντίστοιχα, σε ανθρώπινες κλινικές μελέτες η από του στόματος χορήγηση βαναδίου οδηγεί στην μείωση των επιπέδων γλυκόζης νηστείας, καταστολή της ηπατικής της παραγωγής και βελτίωση της ευαισθησίας της ινσουλίνης στον μυϊκό ιστό σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 2. Η παρατήρηση αυτή φαίνεται να σχετίζεται με την αύξηση της μη οξειδωτικής διάθεσης της γλυκόζης [77]. Οι Cusi και συνεργάτες υποστήριξαν ότι η χορήγηση στην μέγιστη ανεκτή συγκέντρωση για χρονικό διάστημα έξι εβδομάδων είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενδογενούς παραγωγής γλυκόζης η οποία συνδέεται με την μείωση των επιπέδων γλυκόζης νηστείας. Ωστόσο, λίγες μελέτες αναφέρουν βελτίωση της ευαισθησίας της ινσουλίνης χωρίς μετρήσιμες μεταβολές στην καταστολή της ηπατικής παραγωγής γλυκόζης. Οι Jentjens και συνεργάτες έδειξαν ότι χορήγηση θειϊκού βαναδυλίου είχε μηδενική επίδραση στην ευαισθησία

της ινσουλίνης, τα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης νηστείας σε υγιή άτομα. Η σημαντική αυτή παρατήρηση λαμβάνει χώρα και σε διαβητικά πειραματόζωα υποδεικνύοντας ότι το βανάδιο έχει επιλεκτική δράση στα ενεργοποιημένα μεταβολικά μονοπάτια και δεν τα επηρεάζει υπό φυσιολογικές συνθήκες.

3.3.5 ΠΙΘΑΝΟΙ ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΒΑΝΑΔΙΟΥ

Αν και οι αντιδιαβητικές ιδιότητες του βαναδίου είναι γνωστές, οι μηχανισμοί μέσω των οποίων μεσολαβείται η αντιδιαβητική δράση του μετάλλου δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί. Το ενδιαφέρον εύρημα ότι το βανάδιο μειώνει τα επίπεδα της γλυκόζης σε διαβητικά ζώα και εξομαλύνει μεταβολικές δυσλειτουργίες χωρίς ωστόσο να έχει καμία επίδραση υπό φυσιολογικές καταστάσεις, υποδεικνύει ότι τα βανάδιο επιδρά στα μεταβολικά μονοπάτια ότι υπάρχει παθογένεια. Επιπλέον, η ικανότητα του βαναδίου να μειώνει τα επίπεδα της γλυκόζης γίνεται έκδηλη παρουσία ενδογενούς ινσουλίνης [66,73]. Η παρατήρηση αυτή ενισχύει την άποψη ότι το βανάδιο δρα περισσότερο ινσουλινο-ενισχυτικά παρά ινσουλινο-μιμητικά *in vivo*. Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι ορισμένες και όχι όλες οι μεταβολικές δράσεις της ινσουλίνης μπορούν να ενισχυθούν ή/και να αντικατασταθούν από το βανάδιο *in vivo*. Μια τέτοια σημαντική εξαίρεση αποτελεί το πρότυπο της ανάπτυξης σε διαβητικά ζώα το οποίο σχετίζεται με την αδυναμία του βαναδίου να διεγείρει την πρόσληψη αμινοξέων, την πρωτεϊνική σύνθεση και την μιτογένεση. Συνεπώς, η δράση του βαναδίου είναι μάλλον μεταβολική παρά μιτογενετική σε σχέση με την ινσουλίνη. Η ομοιοστασία της γλυκόζης εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ της ηπατικής παραγωγή της και την πρόσληψή της από τους περιφερικούς ιστούς. Στα πλαίσια αυτά το βανάδιο επιδρά στα δύο αυτά σημεία μέσω ινσουλινοεξαρτώμενων ή μη σηματοδοτικών μονοπατιών.

3.3.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΒΑΝΑΔΙΟΥ ΣΕ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΔΙΑΘΕΣΗΣ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ

Μια από τις σημαντικότερες δράσεις της ινσουλίνης κατά την διάρκεια της απορρόφησης μεταγευματικά, είναι η διέγερση της διάθεσης της γλυκόζης στους περιφερικούς ιστούς. Η διαδικασία αυτή μεσολαβείται τόσο από την ενίσχυση της πρόσληψης της γλυκόζης όσο και από την παραγωγή του γλυκογόνου [78]. Ο μυϊκός ιστός εξαιτίας της μάζας του αποτελεί τον κυριότερο ινσουλινοεξαρτώμενο ιστό για την διάθεση της γλυκόζης. Η μεταβολική δράση της ινσουλίνης εκκινά μετά από ενεργοποίηση του υποδοχέα της στην κυτταρική επιφάνεια με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση δύο σηματοδοτικών μονοπατιών: της PI3K και της MAPK.

Αξίζει να αναφερθεί ότι το μονοπάτι της PI3K μεσολαβεί την πλειοψηφία των μεταβολικών δράσεων της ινσουλίνης ενώ αντίστοιχα το μονοπάτι της MAPK σχετίζεται με την μιτογόνο δράση της [78]. Καθώς το βανάδιο μιμείται ή/και ενισχύει περισσότερο τις μεταβολικές δράσεις της ινσουλίνης, η έρευνα *in vivo* στρέφεται περισσότερο στο μονοπάτι της PI3K. Έχειδειχθεί ότι το βανάδιο διεγείρει τόσο την πρόσληψη της γλυκόζης όσο και την παραγωγή του γλυκογόνου. Για τον λόγο αυτό αρκετά σημεία του μεταβολικού μονοπατιού της ινσουλίνης καθώς και ο υποδοχέας της έχουν διερευνηθεί ως πιθανοί στόχοι του συγκεκριμένου μετάλλου.

Το βανάδιο αποτελεί μη ειδικό αναστολέα της φωσφατάσης της τυροσίνης (PTPase) [68]. Στα πλαίσια αυτά, ένας πιθανός μηχανισμός δράσης του μετάλλου είναι η ενεργοποίηση του υποδοχέα της ινσουλίνης ή /και υποστρωμάτων αυτού έμμεσα μέσω αναστολής της αποφωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών αυτών [68]. Πιο συγκεκριμένα, έχειδειχθεί ότι αυξημένη δράση της PTP-1B (του ενζύμου που αποφωσφορυλιώνει τα κατάλοιπα τυροσίνης στον υποδοχέα της ινσουλίνης) αποκαθίσταται στον μυϊκό ιστό διαβητικών ζώων μετά από χρόνια χορήγηση BMOV (0.18 mmol/kg/3 ημέρες) [79]. Αν και η αναστολή των PTPασών θεωρείται απαραίτητη για την μεσολάβηση των μεταβολικών ιδιοτήτων του βαναδίου, νεότερα δεδομένα υποστηρίζουν το γεγονός ότι η αναστολή των PTPασών αυτών δεν εξηγεί την μεταβολική δράση του μετάλλου. Αρχικά, η ενδοκυττάρια μορφή του βαναδίου (βαναδύλιο) δεν αποτελεί πιθανό αναστολέα της πρωτεϊνικής φωσφατάσης. Επιπλέον, *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι η επίδραση του βαναδίου στην πρόσληψη της γλυκόζης και την σύνθεση του γλυκογόνου είναι ανεξάρτητα από την κινάση της τυροσίνης του υποδοχέα [80]. Έτσι, δύο πρωτεΐνες που δεν σχετίζονται με τον υποδοχέα (η κυτοσολική και η μεμβρανική πρωτεϊνική κινάση της τυροσίνης) έχουν προταθεί ότι μεσολαβούν την μεταβολική δράση του βαναδίου.

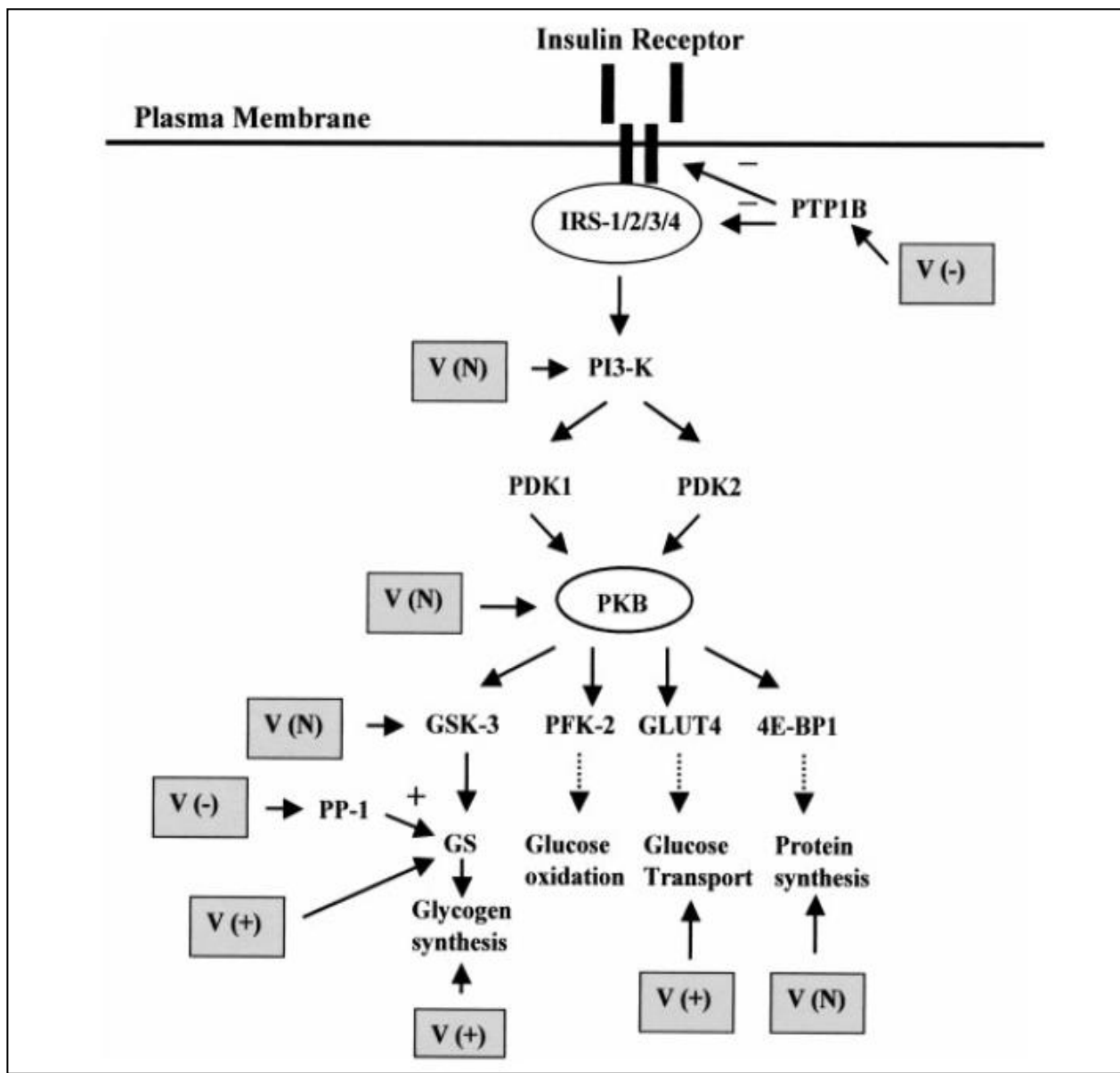
Έχειδειχθεί ότι η διέγερση της σύνθεσης του γλυκογόνου από την ινσουλίνη μεσολαβείται από την διέγερση της PI3K και του καθοδικού ενζύμου PKB (protein kinase B) [81]. Συνεπώς, ένας δεύτερος πιθανός μηχανισμός δράσης του βαναδίου θα ήταν η ρύθμιση της δράσης ή/και έκφρασης των ενζύμων αυτών. Πιο ειδικά, υπάρχουν δεδομένα από *in vitro* μελέτες που υποστηρίζουν ότι το βανάδιο σε εύρος συγκεντρώσεων millimolar ενεργοποιεί την PI3K και την PKB. Για την διερεύνηση των της επαναληψιμότητας των ιδιοτήτων αυτών του βαναδίου σε ανεκτές θεραπευτικές δόσεις *in vivo* χορηγήθηκε η ένωση BMOV σε πόσιμο νερό (0.75-1 mg/mL) για τρεις εβδομάδες σε διαβητικά ζώα. Η χορήγηση BMOV είχε ως αποτέλεσμα την

εξομάλυνση της γλυκόζης νηστείας χωρίς ιδιαίτερη επίδραση στα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης IRS-1 ή της δράσης της στον μυϊκό ιστό [82]. Επιπλέον, το βανάδιο δεν είχε καμία επίδραση στην έκφραση ή δράση της PKB τόσο στο μυϊκό ιστό όσο και στο ήπαρ των διαβητικών ζώων. Όμοια, περαιτέρω πειράματα σε διαβητικά πειραματόζωα προ-διαβήτη η χορήγηση BMOV (075 mg/mL για 3 ημέρες) είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική μείωση των επιπέδων ινσουλίνης στο πλάσμα και την βελτίωση της ευαισθησίας της ινσουλίνης ωστόσο δεν παρατηρήθηκε επαναφορά της δράσης της PI3K και της PKB τόσο στον μυϊκό ιστό όσο και στο ήπαρ [68]. Οι μελέτες αυτές υποδεικνύουν ξεκάθαρα ότι σε αντίθεση με την ινσουλίνη, το βανάδιο μεσολαβεί την μεταβολική ιδιότητά του ανεξάρτητα από την PI3K/PKB *in vivo*.

Η δράση της συνθάσης του γλυκογόνου, του ενζύμου που είναι υπεύθυνο για την σύνθεση του γλυκογόνου, ρυθμίζεται τόσο από την GSK-3 (glycogen synthase kinase-3) όσο και από την PP-1 η οποία ενεργοποιεί μέσω αποφωσφορυλίωσης το ένζυμο [83]. Στο πλαίσιο αυτό η GSK-3 ή/και η PP-1 αποτελούν πιθανούς στόχους του βαναδίου. Ωστόσο, το βανάδιο δεν ανέστειλε την δράση της GSK-3 διαβητικά μοντέλα πειραματόζωων (STZ-diabetic rats και Zucker). Ακόμη, περαιτέρω μελέτες με διαβητικά ζώα (Zucker) έδειξαν ότι το βανάδιο διεγείρει την συνθάση του γλυκογόνου μέσω ενεργοποίησης της PP-1. Συνολικά, οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα ότι *in vivo* η ένωση BMOV ρυθμίζει την φωσφορυλίωση του υποδοχέα της ινσουλίνης και των υποστρωμάτων IPΣ καθώς και την δράση της συνθάσης του γλυκογόνου μέσω φωσφατασών-κλειδιά. Επιπλέον, το βανάδιο, έχει δείχθει ότι, ρυθμίζει την γλυκογονόλυση μέσω εξομάλυνσης της δράσης της φωσφορυλάσης *a in vivo*. Σε αντίθεση με την ινσουλίνη, το βανάδιο δεν έχει καμία επίδραση στην PI3K, τη PKB και την GSK-3 σε θεραπευτικές δόσεις.

Η ινσουλίνη ρυθμίζει την πρόσληψη της γλυκόζης μέσω του ινσουλινο-εξαρτώμενου γλυκοζομεταφορέα GLUT 4 ο οποίος είναι ο κύριος γλυκοζομεταφορέας στον μυϊκό και λιπώδη ιστό [68]. Στο πλαίσιο αυτό, το βανάδιο ενδέχεται να μεσολαβεί την μείωση των επιπέδων της γλυκόζης μέσω ενεργοποίησης του μηχανισμού ενδοκυττάρωσης της γλυκόζης στους ιστούς αυτούς. Πράγματι, σε *in vivo* μελέτες έχει δείχθει ότι το βανάδιο αποκαθιστά τα επίπεδα του mRNA και της πρωτεΐνης του GLUT 4 και ενισχύει την μετατόπισή του από το εσωτερικό του κυττάρου στην πλασματική μεμβράνη στον μυϊκό ιστό διαβητικών ζώων [71,72]. Ωστόσο, το βανάδιο φαίνεται να μην έχει καμία επίδραση στην έκφραση του GLUT 4 ή στην μετατόπισή

του σε φυσιολογικά ζώα. Όπως και στην περίπτωση της συνθάσης του γλυκογόνου, έτσι και στην περίπτωση του GLUT 4 οι μηχανισμοί που σχετίζονται με την από το βανάδιο διέγερση δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί. Αν και *in vitro*, έχει δειχθεί ότι το βανάδιο διεγείρει την μεταφορά της γλυκόζης μέσω μετατόπισης του GLUT 4 (ανεξάρτητα και μη από την PI3K) σε λιποκύτταρα και μυοκύτταρα [84], η παρατήρηση ότι το βανάδιο σε θεραπευτικές δόσεις δεν έχει επίδραση στην έκφραση της PI3K ή τη PKB στο μυϊκό ιστό και το ήπαρ υποδεικνύει ότι το μέταλλο αυτό δεν επιδρά στην μετατόπιση του GLUT 4 μέσω της PI3K ή της PKB *in vivo*. Στην εικόνα που ακολουθεί συνοψίζονται τα σημεία όπου το βανάδιο επιδρά στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης.



Εικόνα 3.3.7 Πιθανά σημεία δράσης του βαναδίου στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης.

IRS: insulinreceptorsubstrate; PI3-K, phosphatidylinositol-3 kinase; PDK, 3-phosphoinositide-dependentkinase; PKB, proteinkinaseB; GSK-3, glycogensynthasekinase-3; PFK-2, phosphofructokinase-2; GLUT 4, glucosetransportertype 4; 4E-BP1, 4Ebindingprotein; PTP1B, proteintyrosinephosphatase 1B; PP-1, proteinphosphatase-1.

3.3.7 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΒΑΝΑΔΙΟΥ ΣΕ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ

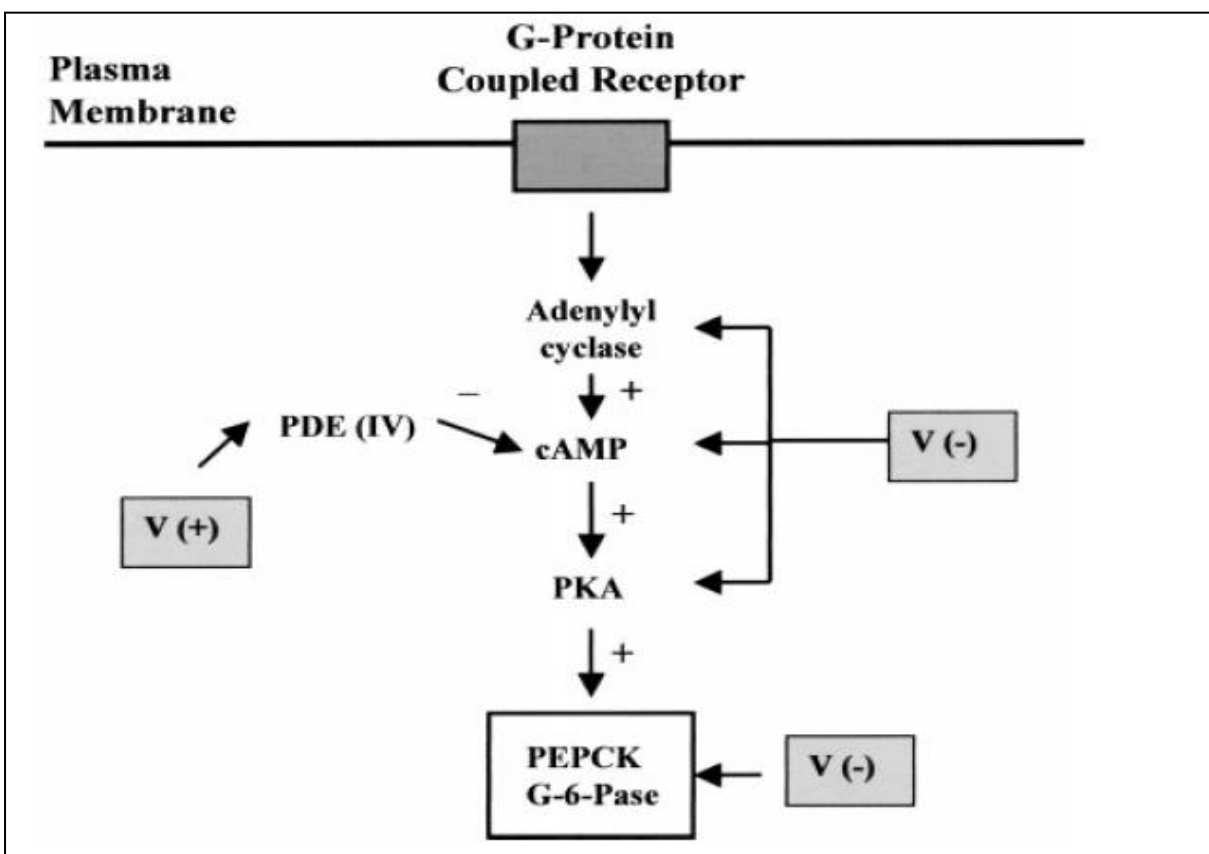
Η αυξημένη παραγωγή της γλυκόζης στο ήπαρ (HGP, hepatic glucose production) αποτελεί κύριο παράγοντα στην ανάπτυξη υπεργλυκαιμίας νηστείας τόσο στον ΣΔ τύπου 1 όσο και στον ΣΔ τύπου 2 [85]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η έκκριση της ινσουλίνης από τα β παγκρεατικά κύτταρα αναστέλλει την γλυκονεογένεση στο ήπαρ. Επομένως, απόλυτη (τύπος 1) ή σχετική (τύπος 2) απώλεια της ινσουλίνης οδηγεί στην αύξηση της ενδογενούς παραγωγής γλυκόζης στο ήπαρ σε κατάσταση διαβήτη. Η αυξημένη αυτή παραγωγή σχετίζεται με την αυξημένη έκφραση και δράση της PEPCK (phosphoenol pyruvate carboxyl kinase) και της G-6-Pase (glucose-6-phosphatase) που διαδραματίζουν κύριο ρόλο στην γλυκονεογένεση.

Το ιδιαίτερα σημαντικό εύρημα ότι το βανάδιο έχει περισσότερο προφανές αποτέλεσμα στα επίπεδα της γλυκόζης στο πλάσμα σε συνθήκες νηστείας σε σχέση με μεταγευματική περίοδο οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το βανάδιο ενδέχεται να μεσολαβεί την μείωση των επιπέδων της γλυκόζης μέσω αναστολής της ηπατικής παραγωγής της γλυκόζης. Πιο ειδικά, έχει δειχθεί ότι το βανάδιο εξομαλύνει την από το γλυκογόνο αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης στο πλάσμα σε φυσιολογικά ζώα *in vivo* [86]. Επιπρόσθετα, το γεγονός ότι το βανάδιο εν επιδρά στα ένζυμα που μεσολαβούν την μεταβολική δράση της ινσουλίνης σε ότι αφορά την πρόσληψη της γλυκόζης και της σύνθεση του γλυκογόνου, υποδεικνύει ότι το βανάδιο η επίδραση του βαναδίου στην διάθεση της γλυκόζης δεν αποτελεί το κύριο χαρακτηριστικό της αντιδιαβητικής του ιδιότητας *in vivo* [82]. Ακόμη, σε *in vivo* μελέτες έχει δειχθεί ότι ενώσεις το βαναδίου σε αντίστοιχες συγκεντρώσεις μπορούν να αυξήσουν τα επίπεδα της PEPCK και G-6-Pase σε επίπεδο mRNA στο ήπαρ διαφόρων μοντέλων πειραματόζωων.

Οι μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν την ανασταλτική δράση του βαναδίου στην έκφραση των πρωτεϊνών PEPCK και G-6-Pase στο ήπαρ διαβητικών ζώων είναι ιδιαίτερα πολύπλοκοι. Καθώς υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης έχει δειχθεί ότι αυξάνουν την έκφραση της G-6-Pase, μπορεί να θεωρηθεί ότι η ανασταλτική επίδραση του βαναδίου στην ηπατική παραγωγή γλυκόζης είναι δευτερεύον σε σχέση με την βελτίωση της υπεργλυκαιμίας.

Το βανάδιο επιπλέον βελτιώνει τα αυξημένα επίπεδα γλυκογόνου σε διαβητικά ζώα. Καθώς το γλυκογόνο διεγείρει την γλυκονεογένεση στο ήπαρ, ένας άλλος πιθανός μηχανισμός δράσης μπορεί να είναι η αναστολή της ηπατικής παραγωγής γλυκόζης. Το γλυκογόνο μεσολαβεί την

διέγερση των PEPCK και G-6Pase μέσω ενεργοποίησης του υποδοχέα G στην κυτταρική επιφάνεια με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης (cAMP). Η ινσουλίνη μπορεί να αντιστρέφει την επίδραση αυτή στο γλυκογόνο μέσω μείωσης των cAMP. Κατά συνέπεια μπορεί να θεωρηθεί ότι το βανάδιο μπορεί να αλληλεπιδρά με τα επίπεδα ή την δράση του cAMP[87] (Εικόνα 3.3.7)



Εικόνα 3.3.8 Προτεινόμενοι μηχανισμοί αναστολής της ηπατικής γλυκονεογένεσης από το βανάδιο.

PEPCK:phosphoenol pyruvate carboxy kinase; **G-6-Pase**, glucose-6-phosphatase; **PKA**, proteinkinaseA; **PDE**, phosphodiesterase.

Συνοπτικά λοιπόν, το βανάδιο μπορεί να βελτιώνει διάφορες μεταβολικές δυσλειτουργίες τόσο στον ΣΔ τύπου 1 όσο και στον ΣΔ τύπου 2. Στην περίπτωση του ΣΔ τύπου 1 έχει δειχθεί ότι χορήγηση βαναδίου εξομαλύνει την υπεργλυκαιμία ενώ στον ΣΔ τύπου 2 παρατηρείται μείωση των επιπέδων ινσουλίνης στο πλάσμα του αίματος και αύξηση της ευαισθησίας της ινσουλίνης.

Κατά συνέπεια, οι ενώσεις αυτές αποτελούν πιθανούς υποψήφιους για την ανάπτυξη αντιδιαβητικών παραγόντων που χορηγούνται από το στόμα.

3.4 ΤΟ ΧΡΩΜΙΟ

3.4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το χρώμιο αποτελεί ένα απαραίτητο για τον οργανισμό μεταλλοϊόν το οποίο απαιτείται για τον φυσιολογικό μεταβολισμό των υδατανθρακών και των λιπιδίων. Το χρώμιο στην τρισθενή του μορφή απαντάται σε διάφορες τροφές καθώς και διατροφικά συμπληρώματα. Το χρώμιο σε αυτή την οξειδωτική βαθμίδα βρίσκεται στην πιο σταθερή κατάσταση ενώ παράλληλα αποτελεί την λιγότερο τοξική μορφή. Τα φυσιολογικά επίπεδα του χρωμίου στο αίμα αντιστοιχούν σε 0,12 έως 0,67 mcg/L ενώ οι υψηλότερες συγκεντρώσεις του υπάρχουν στο ήπαρ, τον σπλήνα, τα νεφρά και τα οστά [88-92].

Το χρώμιο θεωρείται απαραίτητο για τον οργανισμό καθώς δεν είναι ενδογενές ωστόσο απαιτείται σε ορισμένες ποσότητες για την διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας του οργανισμού.

Το εξασθενές χρώμιο αποτελεί βιομηχανικό παραπροϊόν της παραγωγής διαφόρων μετάλλων και χημικών ενώσεων και είναι ιδιαίτερα τοξικό καθώς έχει συσχετισθεί με καρκινογένεση και μεταλλαξιγένεση. Αξίζει να αναφερθεί ότι το τρισθενές χρώμιο δεν μπορεί να μετατραπεί σε εξασθενές όταν βρίσκεται στην τροφή ή τον οργανισμό.

ΟΝΟΜΑ – ΣΥΜΒΟΛΟ	Χρώμιο (Cr)
ΑΤΟΜΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ	24
ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	Στοιχείο μετάπτωσης
ΟΜΑΔΑ – ΠΕΡΙΟΔΟΣ – ΤΟΜΕΑΣ	6, 4, d
ΣΧΕΤΙΚΗ ΑΤΟΜΙΚΗ ΜΑΖΑ	51,9961 g•mol ⁻¹
ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΑΚΗ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ	[Ar] 3d ⁵ 4s ¹

Ατομικές ιδιότητες	
Ατομική ακτίνα	128 pm
Ακτίνα van der Waals	139 ±5pm
Ηλεκτραρνητικότητα	1,66
Ενέργειες ιονισμού	1st: 652,9 kJ•mol ⁻¹

Φυσικά χαρακτηριστικά	
Σημείο τήξης	2180 K, 1907°C
Σημείο βρασμού	2944 K, 2671°C
Πυκνότητα	7.190 g·cm ⁻³
Ενθαλπία τήξης	21,0 kJ·mol ⁻¹
Μαγνητική συμπεριφορά	αντιφερρομαγνητικό
Σκληρότητα Mohs	8,5
Σκληρότητα Brinell	1120 MPa

3.4.2 ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΧΡΩΜΙΟΥ ΣΤΟΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ

Έχειδειχθείότι το χρώμιο μπορεί να ενισχύει την δράση της ινσουλίνης η οποία όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι ο κύριος ρυθμιστής του μεταβολισμού των υδατανθρακών, των λιπιδίων και των πρωτεϊνών [93]. Η βιολογική δραστηριότητα του χρωμίου περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1957 όταν συστατικό που απομονώθηκε από την ζύμη αποτέλεσε παράγοντα ρύθμισης της ομοιοστασίας της γλυκόζης σε επίμυες. Το βιολογικά δραστικό του παράγοντα αυτού αποδείχθηκε πως ήταν το χρώμιο [93]. Το χρώμιο καθιερώθηκε ως απαραίτητο θρεπτικό συστατικό το 1977 έπειτα από καταγραφή ιδιαίτερα υψηλών επιπέδων γλυκόζης στο αίμα ασθενούς ο οποίος λάμβανε παρεντερική διατροφή με πλήρη έλλειψη χρωμίου. Τα επίπεδα της γλυκόζης επανήλθαν σε πλήρως φυσιολογικές τιμές μετά από προσθήκη χρωμίου στην δίαιτα του ασθενούς. Πιο πρόσφατες μελέτες αποκαλύπτουν τον μηχανισμό δράσης του χρωμίου. Έχειδειχθείότι το χρώμιο μετά την απορρόφηση του στον οργανισμό ως μεταλλοϊόν συνδέεται σε ένα ολιγοπεπτίδιο προκειμένου να γίνει βιολογικά δραστικό [94]. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο χρωμίου-ολιγοπεπτίδιο συνδέεται στον υποδοχέα της ινσουλίνης με αποτέλεσμα την ενίσχυση της δράσης τυροσίνης στον υποδοχέα και άρα την ενίσχυση του σήματος. Επιπλέον, έχειδειχθείότι το χρώμιο μπορεί δράσει ενδοκυττάρια διεγείροντας την πρόσληψη της γλυκόζης από τα κύτταρα στον μυϊκό ιστό ως συμπαραγοντας της ινσουλίνης. Αξίζει να αναφερθεί ότι η δράση του χρωμίου είναι στενά και άρρηκτα συνδεδεμένη με την αύξηση και ενίσχυση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη [94].

Η διαταραχή της φυσιολογικής δράσης της ινσουλίνης ή η ινσουλίνη-αντίσταση αποτελούν κύριο παράγοντα αρκετών παθοφυσιολογικών καταστάσεων. Αδιαμφισβήτητα η ινσουλινο-αντίσταση αποτελεί πρόδρομο παράγοντα αυξημένων παθολογικών καταστάσεων όπως είναι η αύξηση των τριγλυκεριδίων στο αίμα, χαμηλή HDL, εμφάνιση υπέρτασης, το μεταβολικό σύνδρομο και ο ΣΔ τύπου 2 οι οποίες σχετίζονται αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου. Πολυάριθμοι παράγοντες ενέχονται στην ανάπτυξη ινσουλινο-αντίστασης και σε αυτούς περιλαμβάνονται η παχυσαρκία, διάφοροι γενετικοί παράγοντες, διατροφικές συνήθειες, η ηλικία, η επίδραση ορμονών, αλλά και ο τρόπος ζωής.

Η ινσουλινο-αντίσταση θεωρείται ο κοινός παρονομαστής σε μια πληθώρα μεταβολικών δεικτών οι οποίοι ορίζουν το μεταβολικό σύνδρομο. Το μεταβολικό σύνδρομο αποτελεί ομάδα μεταβολικών διαταραχών οι οποίες περιλαμβάνουν την σπλαχνική παχυσαρκία, αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, αυξημένες τιμές τριγλυκεριδίων, χαμηλή HDL καθώς και αυξημένη αρτηριακή πίεση. Η ύπαρξη τουλάχιστον τριών από αυτούς τους παράγοντες αρκούν προκειμένου να διαγνωσθεί το μεταβολικό σύνδρομο με την πιθανότητα διάγνωσης να αυξάνει με το πέρασ της ηλικίας [95].

Δεδομένα υποστηρίζουν το γεγονός ότι άτομα με μεταβολικό σύνδρομο παρουσιάζουν δύο με τρεις φορές περισσότερες πιθανότητες για ανάπτυξη καρδιαγγειακών νοσημάτων τα οποία περιλαμβάνουν στεφανιαία νόσο και έμφραγμα του μυοκαρδίου. Η παρουσία μόνο της ινσουλινο-αντίστασης, χωρίς την ύπαρξη άλλων δεικτών του μεταβολικού συνδρόμου, αρκεί για την αύξηση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακού νοσήματος από 1.5 έως 2 φορές σε σχέση με τα φυσιολογικά ως προς την ινσουλινο-αντίσταση άτομα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί η ινσουλινο-αντίσταση θεωρείται πρόδρομη κατάσταση για την εμφάνιση ΣΔ τύπου 2 ο οποίος θεωρείται αποτέλεσμα είτε ανεπαρκούς έκκρισης της ινσουλίνης είτε προβληματικής απόκρισης σε αυτή ή ακόμα και σε συνδυασμό των δύο αυτών χαρακτηριστικών [96]. Αξίζει να αναφερθεί ότι ο κίνδυνος για την εμφάνιση ΣΔ τύπου 2 αυξάνει καθώς αυξάνει ο βαθμός της ινσουλινο-αντίστασης.

Επιπρόσθετα, πέρα από τον ΣΔ και το μεταβολικό σύνδρομο, μια σειρά άλλων παθοφυσιολογικών καταστάσεων έχει συνδεθεί με την ινσουλινο-αντίσταση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS, polycysticovariansyndrome) το οποίο θεωρείται ένα αρκετά περίπλοκο σύνδρομο και έχει

συσχετισθεί με μη φυσιολογική ωορρηξία και μειωμένη γονιμότητα. Η ινσουλινο-αντίσταση επηρεάζει περίπου το 50-70% των γυναικών με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών ενώ τα άτομα με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση ΣΔ τύπου 2. Έχειδειχθεί ότι η χρήση παραγόντων με στόχο την αύξηση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη είχε ωφέλιμα αποτελέσματα στην διαχείριση και θεραπεία του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών [97].

3.4.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΧΡΩΜΙΟΥ ΣΤΗΝ ΙΝΣΟΥΛΙΝΟ-ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΤΟΝ ΣΔ ΤΥΠΟΥ 2

Αρκετά είναι εκείνα τα δεδομένα τα οποία υποστηρίζουν την συσχέτιση μεταξύ χαμηλών, βιοδιαθέσιμων επιπέδων χρωμίου στον οργανισμό και την ύπαρξη ΣΔ τύπου 2 [98]. Επιπλέον, η αυξημένη απώλεια χρωμίου σε βάθος χρόνου μπορεί να οξύνει το ήδη διαταραγμένο προφίλ των ασθενών με μη ινσουλινο-εξαρτώμενο διαβήτη σε ότι αφορά τα επίπεδα χρωμίου ενώ ακόμη μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ινσουλινο-αντίστασης σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 [98].

Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν το γεγονός συμπληρωματική χορήγηση χρωμίου μπορεί να βελτιώσει την ευαισθησία στην ινσουλίνη καθώς και τον γλυκαιμικό έλεγχο τόσο σε ζώα όσο και στον άνθρωπο που εμφανίζουν ινσουλινο-αντίσταση, αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, διαταραγμένη ανοχή στην γλυκόζη αλλά και ΣΔ. Σε μία μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε σε μοντέλο διαβητικού επίμυ γενετικά τροποποιημένου για παχυσαρκία και ινσουλινο-αντίσταση, η χορήγηση πικολινικού χρωμίου (chromium picolinate) είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική μείωση των επιπέδων της ινσουλίνης και της γλυκόζης νηστείας στο αίμα [92]. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από μελέτες σε άτομα με ινσουλινο-αντίσταση και ΣΔ.

Πολυάριθμες μελέτες έχουν ως στόχο την αποσαφήνιση του ρόλου του χρωμίου στον ΣΔ ωστόσο τα αποτελέσματα δεν συμφωνούν πάντα [99]. Μελέτη όπου πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση δεδομένων με μετα-ανάλυση οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το χρώμιο δεν έχει καμία επίδραση στα φυσιολογικά επίπεδα του σακχάρου στον άνθρωπο ενώ σε άτομα με ΣΔ τα αποτελέσματα ήταν στατιστικά μη σημαντικά [99]. Θα πρέπει ωστόσο να αναφερθεί ότι στην συγκεκριμένη ανάλυση δεν χρησιμοποιήθηκαν αρκετές μελέτες όπου είχε χρησιμοποιηθεί το πικολινικό χρώμιο καθώς η πλειοψηφία των μελετών που συμπεριλήφθηκαν αφορούσαν σε ενώσεις χρωμίου με χαμηλή απορροφησιμότητα. Η ασυνέπεια που παρατηρείται στις διάφορες μελέτες που λαμβάνουν χώρα πιθανότατα να οφείλεται στην μορφή του χρωμίου που

χρησιμοποιείται. Πιο συγκεκριμένα, στην πλειοψηφία των μελετών όπου χρησιμοποιήθηκε κάποια μη βιοδιαθέσιμη μορφή χρωμίου τα αποτελέσματα υποδεικνύουν χαμηλή επίδραση του χρωμίου στην ινσουλινο-αντίσταση σε αντίθεση με τις μελέτες εκείνες όπου χρησιμοποιήθηκε το πικολινικό χρώμιο το οποίο θεωρείται περισσότερο βιοδιαθέσιμο.

Σε 9 από τις συνολικά 15 ελεγχόμενες δοκιμές με στόχο την αξιολόγηση της επίδρασης του χρωμίου σε άτομα με ΣΔ ή διαταραγμένη ανοχή στην γλυκόζη προέκυψαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα στην αύξηση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη και την βελτίωση του γλυκαιμικού ελέγχου. Μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκε του πικολινικό χρώμιο παρατηρήθηκαν σημαντικότερα ποσοστά επιτυχίας. Κατά συνέπεια, η χορήγηση 200-1.000 mcg πικολινικού χρωμίου αυξάνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη, όπως προκύπτει από τα επίπεδα ινσουλίνης νηστείας στο αίμα, και βελτιώνει την ανοχή στην γλυκόζη καθώς παρατηρούνται μειωμένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα [100].

Ο πιθανός ρόλος του χρωμίου στην ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το 1950 από τους Mertz και Schwarz [95]. Το πόσο ουσιαστικό και απαραίτητο είναι το χρώμιο στην ανθρώπινη διατροφή προτάθηκε όταν χορήγηση χρωμίου σε νοσηλεύομενους ασθενείς είχε ως αποτέλεσμα την αναστροφή της ανοχής στην γλυκόζη [96]. Ωστόσο, το κατά πόσο το χρώμιο αποτελεί απαραίτητο μέταλλο για τον οργανισμό αποτελεί ακόμα θέμα αντιπαράθεσης καθώς τα απαιτούμενα ποσοστά θεωρούνται ιδιαίτερα χαμηλά. Σε κάθε περίπτωση, αρκετές κλινικές μελέτες υποστηρίζουν την ωφέλιμη επίδραση του χρωμίου στην αντιμετώπιση της ινσουλινοαντίστασης και του ΣΔ τύπου 2.

3.4.4 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Η χρήση του χρωμίου σε διάφορες κλινικές μελέτες οδήγησε σε αντικρουόμενα αποτελέσματα τα οποία πυροδότησαν την έρευνα γύρω από την ενδεχόμενη θεραπευτική του δράση σε ασθενείς με ΣΔ. Έχει δειχθεί ότι το χρώμιο βελτιώνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη σε αρκετές από αυτές τις μελέτες, όχι όμως σε όλες. Η ετερογένεια αυτών των αποτελεσμάτων μπορεί να αποδοθεί στους διαφορετικούς φυλετικούς και γενετικούς παράγοντες ωστόσο ακόμα και η υιοθέτηση του διαφορετικού φαινοτύπου ως παράγοντα για τα αντικρουόμενα αυτά αποτελέσματα αποτελεί αιτία διαφωνιών. Επιπλέον, για την διεξαγωγή ασφαλών αποτελεσμάτων απαραίτητο θεωρείται να λαμβάνεται υπόψη ο βαθμός και το στάδιο του ΣΔ καθώς και η παράλληλη ή πρότερη λήψη άλλων αντιδιαβητικών παραγόντων.

3.4.5 ΤΟ ΧΡΩΜΙΟ ΣΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ

Παρά τα αμφιλεγόμενα αποτελέσματα που προκύπτουν από διάφορες κλινικές μελέτες στον άνθρωπο, σε ότι αφορά μελέτες *in vitro* ή μοντέλα πειραματόζωων του ΣΔ το χρώμιο έχειδειχθεί ότι βελτιώνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη και την καρδιαγγειακή λειτουργία. Οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες επικεντρώνονται στον ρόλο και την επίδραση του χρωμίου στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης. Όπως ήδη έχει αναφερθεί η πλεοτροπική βιολογική δράση της ινσουλίνης γίνεται έκδηλη μετά από σύνδεση του μορίου της ινσουλίνης στην α υπομονάδα του υποδοχέα της ινσουλίνης και την αυτοφωσφορυλίωση της β υπομονάδας ενεργοποιώντας έτσι την μοριακή σηματοδότηση τη ινσουλίνης. Αρκετές μελέτες επικεντρώνονται στους μοριακούς μηχανισμούς εκείνους με τους οποίους το χρώμιο μπορεί να επιδράσει ή να μεταβάλλει το μοριακό σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης. Οι μελέτες αυτές χρησιμοποιούν *in vitro* μοντέλα ή μη και τα συστήματα αυτά είτε διεγείρονται από την ινσουλίνη είτε όχι. Για την διερεύνηση της επίδρασης του χρωμίου στις μελέτες αυτές γίνεται χρήση του χρωμίου σε απλές ανόργανες μορφές (άλας) ή σύμπλοκα του χρωμίου που ο σχεδιασμός τους στοχεύει στην αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας (potassium chromate, chromium picolinate, triphenylalaninate chromium). Η αξιολόγηση της δράσης του χρωμίου λοιπόν εξαρτάται όχι μόνο από την φύση και το είδος του υποκαταστάτη αλλά και από την δοσολογία και την μέθοδο της αξιολόγησης.

3.4.5.1 Επίδραση του χρωμίου στο υπόστρωμα IR και την δράση τυροσίνης.

Η πρώτη ένδειξη ότι το χρώμιο μπορεί να επηρεάσει την σηματοδότηση της ινσουλίνης ήρθε από τον Yoshimoto et al., οι οποίοι διερεύνησαν τον ρόλο του χρωμίου στον μεταβολισμό της γλυκόζης. Το χαμηλής μοριακής μάζας ολιγοπεπτίδιο χρωμίου (LMCr) ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά στο ήπαρ ποντικών που ενέθηκαν με χρωμικό κάλιο (potassium chromate) καθώς και σε λιποκύτταρα της επιδιδυμίδας αρουραίου όπου υπήρχε επαυξημένος μεταβολισμός της γλυκόζης σε CO₂ που μεσολαβείται από την ινσουλίνη [101]. Οι Davis και Vincent έδειξαν ότι το LMCr προκαλεί τρεις με οκτώ φορές παραπάνω την διέγερση την δράση κινάσης τυροσίνης στην μεμβράνη λιποκυττάρων αρουραίου χωρίς ωστόσο να μεταβάλλει τα βασικά επίπεδα (όταν δηλαδή δεν υπάρχει διέγερση από την ινσουλίνη) και ότι η δράση αυτή ήταν αναλογική του ποσοστού του LMCr [102]. Επιπρόσθετα, άλλα μεταλλοϊόντα όπως το Mn, ο Fe και το Co δεν είχαν το ίδιο αποτέλεσμα υπογραμμίζοντας έτσι την αναγκαιότητα του χρωμίου στην διαδικασία αυτή [102]. Το LMCr (μοριακό βάρος ~ 1500 kDa) συντίθεται από τα αμινοξέα γλυκίνη,

κυστεΐνη, γλουταμικό και ασπαρτικό. Τα αμινοξέα αυτά μετά την σύνδεση του χρωμίου απαρτίζουν την χρωμοδουλίνη. Σε άλλες μελέτες σε CHO-IR κύτταρα, τα οποία υπερεκφράζουν τον υποδοχέα της ινσουλίνης, το πικολινικό χρώμιο προκαλεί την φωσφορυλίωση της τυροσίνης στο υπόστρωμα IR αντί να ενισχύει την δράση τυροσίνης [103]. Ωστόσο, σε μη κυτταρικό σύστημα βασισμένο σε ανασυνδιασμένο τμήμα του IR το χρώμιο δεν προκαλεί την αυτοφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης. Το αποτέλεσμα αυτό ενδέχεται να οφείλεται στην απουσία διέγερσης από την ινσουλίνη.

3.4.5.2 Επίδραση του χρωμίου στις πρωτεΐνες IRS, Akt και PI3K.

Έχει δειχθεί ότι το χρώμιο μπορεί α) να ρυθμίζει ανοδικά το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης επιδρώντας σε μόρια καθοδικά του υποστρώματος IR μέσω ενίσχυσης της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης στην πρωτεΐνη IRS-1, β) να αυξάνει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της Thr³⁰⁸ και Ser⁴⁷³ της Akt και γ) να αυξάνει την δράση της PI3K σε μια σειρά από μοντέλα πειραματόζωων με αντίσταση στην ινσουλίνη. Σε παχύσαρκους αρουραίους (JCR:LA-cp) η χορήγηση πικολινικού χρωμίου ενισχύει την σηματοδότηση της ινσουλίνης στον σκελετικό μυ η οποία γίνεται έκδηλη μέσω αύξησης της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης στην IRS-1 και PI3K χωρίς να μεταβάλλει τα συνολικά επίπεδα των πρωτεϊνών αυτών. Το σύμπλοκο [Cr(phe)₃] (triphenylalaninate chromium) είχε σαφή αύξηση των επιπέδων πρόσληψης της γλυκόζης σε καλλιέργεια λιποκυττάρων μέσω ενίσχυσης της φωσφορυλίωσης της Akt με χρόνο- και δοσο-εξαρτώμενο τρόπο [104]. Επιπλέον, σε ποντίκια που δεν εκφράζουν την λεπτίνη (ob/ob) η χορήγηση του ίδιου συμπλόκου είχε ως αποτέλεσμα την βελτίωση στην ανοχή της γλυκόζης, εξομάλυνση των λιπιδιακών διαταραχών και την αύξηση της φωσφορυλίωσης της IR που διεγείρεται από την ινσουλίνη στο ήπαρ και το μυϊκό ιστό [104]. Επίσης το χρώμιο έχει χρησιμοποιηθεί σε μια σειρά *in vivo* και *in vitro* διατροφικών μοντέλων του διαβήτη με χαρακτηριστικά την υπεργλυκαιμία, την υπερινσουλιναιμία και/ή την υπερλιπιδαιμία. Σε ποντίκια που ακολούθησαν δίαιτα υψηλή σε σουκρόζη ή λιπαρά η χορήγηση χρωμίου είχε ως αποτέλεσμα την εξομάλυνση της αμβλυμμένης φωσφορυλίωσης της Akt και της εξασθενημένης δράσης της PI3K [105].

3.4.5.3 Επίδραση του χρωμίου στους γλυκοζομεταφορείς της οικογένειας GLUT.

Η επίδραση του χρωμίου ανοδικά στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης έχει ως αποτέλεσμα την επιρροή γεγονότων που θεωρούνται απομακρυσμένα όπως είναι η μετατόπιση των κυστιδίων του γλυκοζομεταφορέα GLUT 4 στην κυτταρική μεμβράνη. Σε ποντίκια που

ακολούθησαν δίαιτα υψηλή σε σουκρόζη η μετατόπιση του Glut 4, που διεγείρεται από την ινσουλίνη, ήταν σαφώς εξασθενημένη σε σχέση με φυσιολογικά ποντίκια [105]. Χορήγηση του συμπλόκου Cr(phe)₃ είχε ως αποτέλεσμα την επαναφορά των επιπέδων του GLUT 4. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από την χορήγηση πικολινικού χρωμίου σε άλλη μελέτη. Αξίζει να αναφερθεί ότι τα επίπεδα του GLUT 4 αυξάνονται εκτός από τον σκελετικό μυ και στο μυοκάρδιο ενώ επίσης παρατηρείται αύξηση των επιπέδων του GLUT 2 στο ήπαρ [106]. Για την διερεύνηση της του μηχανισμού που μεσολαβεί την ενίσχυση των επιπέδων του γλυκοζομεταφορέα GLUT 4 από το χρώμιο οι Chen et al., χρησιμοποίησαν καλλιέργεια λιποκυττάρων τα οποία διεγέρθηκαν με χλωρίδιο του χρωμίου και πικολινικό χρώμιο [107]. Στη μελέτη αυτή διαπιστώθηκε ότι η διέγερση των λιποκυττάρων με χρώμιο είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του GLUT 4 στην πλασματική μεμβράνη παράλληλα με τη αύξηση της ενδοκυττάριας πρόσληψης της γλυκόζης. Επιπλέον, διαπιστώθηκε, σε αντίθεση με άλλες *in vivo* και *in vitro* μελέτες, ότι η μετατόπιση του GLUT 4 από το χρώμιο είναι ανεξάρτητη από κύριες ινσουλινοεξαρτώμενες πρωτεΐνες του μονοπατιού της ινσουλίνης όπως είναι οι: IR, IRS-1, PI3K ή η Akt. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι το χρώμιο αυξάνει την ρευστότητα της πλασματικής μεμβράνης μέσω μείωσης της χοληστερόλης στην μεμβράνη καθώς επιδρά θετικά στην πρωτεΐνη που δρα ως μεταγραφικός παράγοντας υπεύθυνος για την ρύθμιση της ισορροπίας της χοληστερόλης στο κύτταρο [107]. Ακόμη έχει δειχθεί ότι το χρώμιο μειώνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης ABCA1 υποδεικνύοντας έτσι την σχέση μεταξύ χρωμίου και ομοιοστασίας της χοληστερόλης. Συνεπώς, αν και οι μηχανισμοί δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως, το χρώμιο τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, ενισχύει την μετατόπιση του γλυκοζομεταφορέα GLUT 4 υπό συνθήκες ανοχής στην γλυκόζη.

3.4.5.4 Επίδραση του χρωμίου σε μόρια που ρυθμίζουν αρνητικά το μονοπάτι της ινσουλίνης (PTP-1B, JNK, IRS-1 φωσφορυλίωση της σερίνης)

Ενώ το χρώμιο φαίνεται πως ενισχύει την σηματοδότηση της ινσουλίνης σε συνθήκες ανοχής στην ινσουλίνη, *in vitro* και *in vivo*, υπό φυσιολογικές συνθήκες έχει δειχθεί ότι δεν επηρεάζει την σηματοδοτικό μονοπάτι [104]. Όμοια, σε συμφωνία με δεδομένα που προέρχονται από μοντέλα πειραματόζωων, μελέτες στον άνθρωπο έδειξαν ότι η απόκριση στην ινσουλίνη μετά από χορήγηση χρωμίου ήταν πιθανότερη σε άτομα με ινσουλινοαντίσταση και αυξημένα επίπεδα γλυκόζης νηστείας και αιμογλοβίνης A1C. Καθώς η αντίσταση στην ινσουλίνη «δρομολογεί» την δράση του χρωμίου σε τέτοιες συνθήκες, στη συνέχεια περιγράφεται η

επίδραση του συγκεκριμένου μεταλλιόντος στους αρνητικούς εκείνους ρυθμιστές του σηματοδοτικού καταρράκτη της ινσουλίνης που συμμετέχουν στην ανάπτυξη και εμφάνιση ανοχής στην γλυκόζη. Η φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης σε διάφορες πρωτεΐνες ως απόκριση σε διέγερση από αυξητικούς παράγοντες διέπεται από την αμοιβαία δραστηριότητα φωσφατασών τυροσίνης (PTPs), κινασών τυροσίνης αλλά και των IR [108]. Η πρωτεΐνη PTP-1B είναι μια φωσφατάση η οποία έχει χαρακτηριστεί ως αρνητικός ρυθμιστής της σηματοδότησης της ινσουλίνης εξαιτίας της δράσης στην φωσφορυλίωση περιοχών τυροσίνης στις πρωτεΐνες IR και IR-1. Η δέσμευση της ινσουλίνης στην IR έχει ως αποτέλεσμα την παροδική απελευθέρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) που οδηγεί στην αναστρέψιμη οξείδωση ενός κρίσιμου καταλοίπου κυστεΐνης στο καταλυτικό σημείο της PTP-1B με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση της PTP-1P και άρα την κανονική σηματοδότηση της ινσουλίνης καθοδικά [109]. Κατά συνέπεια, συγκεκριμένοι αναστολείς της PTP-1B έχουν προταθεί ως πιθανοί αντιδιαβητικοί παράγοντες. Μέταλλα όπως το βανάδιο, έχει δείχθει ότι μεσολαβούν την ενίσχυση της δράσης της ινσουλίνης μέσω αναστρέψιμης οξείδωσης των καταλοίπων κυστεΐνης στην περιοχή της PTP-1β που αναφέρθηκε. Ως εκ τούτου είναι λογικό να υποτεθεί ότι το χρώμιο δρα με παρόμοιο τρόπο. Πρώιμες μελέτες υποστηρίζουν ότι το σύμπλοκο LMWCr ενισχύει την δράση της PTP και όχι της PTP-1B σε μεμβράνες λιποκυττάρων [110]. Αντίθετα, σε κύτταρα ηπατώματος επίμυ βρέθηκε ότι το χρώμιο οδηγεί σε 21-33% μείωση της δράσης της PTP-1B. Σε άλλες μελέτες ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση του $Cr(ρhe)_3$ του πικολινικού χρωμίου στα επίπεδα ή την ειδική δράση της PTP-1B τόσο *in vitro* όσο και σε πειραματόζωα με ινσουλινοαντίσταση. Οι Wang και συνεργάτες υποστήριξαν ότι το χρώμιο δεν αναστέλλει αποτελεσματικά την ανασυνδιασμένη ανθρώπινη PTP-1B καθώς και την αναστρέψιμη οξειδωτική ρύθμισή της [103]. Ωστόσο, η ομάδα του Cefalu υποστήριξε ότι το χρώμιο (πικολινικό) εξασθενεί τόσο τα επίπεδα της πρωτεΐνης όσο και την ειδική δράση της στον μυϊκό ιστό παχύσαρκων επίμυων. Ενώ η φωσφορυλίωση της τυροσίνης της IR ενισχύει την σηματοδότηση της ινσουλίνης, η φωσφορυλίωση των καταλοίπων σερίνης στη θέση 307 στην IRS-1 εξασθενεί σημαντικά την σηματοδότηση της ινσουλίνης. Φωσφορυλίωση της σερίνης της IRS-1 αποτρέπει την σύνδεση με την IR-β υπομονάδα και κατά συνέπεια αποτρέπει την σύνδεση της IRS-1 στον υποδοχέα με αποτέλεσμα την αποφυγή της μη ινσουλινο-εξαρτώμενης ενεργοποίησης της PI3K [111]. Επιπλέον, φωσφορυλίωση της IRS-1 στην σερίνη³⁰⁷ επιταχύνει την αποδόμηση της IRS-1 μέσω πρωτεασώματος ουβικουιτίνης

μειώνοντας έτσι τα επίπεδα της πρωτεΐνης και την περαιτέρω άμβλυνση του σηματοδοτικού μονοπατιού της ινσουλίνης. Η σερίνη³⁰⁷ της IRS-1 θεωρείται κύριος στόχος της JNK μεσολαβούμενης φωσφορυλίωσης [112]. Μελέτες όπου χρησιμοποιείται το χρώμιο έδειξαν ότι παχύσαρκα ποντίκια με ινσουλινοαντίσταση είχαν αυξημένα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης c-Jun (phospho-c-Jun) και της φωσφορυλιωμένης στην θέση σερίνη³⁰⁷ (IRS-1-phospho-Ser307) σε σχέση με τα φυσιολογικά. Η χορήγηση χρωμίου είχε ως αποτέλεσμα την καταστολή της φωσφορυλίωσης της c-Jun και της IRS-1 στο ήπαρ ob/ob ποντικών. Οι Chen και συνεργάτες οδηγήθηκαν σε παρόμοια αποτελέσματα μελετώντας τις πρωτεΐνες αυτές στον μυϊκό ιστό KK/HIH ποντικών με ινσουλινοαντίσταση. Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώνονται περαιτέρω σε *in vitro* καλλιέργειες μυοκυττάρων τα οποία κατάστησαν ανθεκτικά στην ινσουλίνη μετά από επίδραση με παλμιτικό οξύ ή με υπερινουλιναϊμικούς ή/και υπεργλυκαιμικούς παράγοντες οι οποίοι προκάλεσαν αύξηση της φωσφορυλίωσης της JNK και αμοιβαία αναστολή της ινσουλινο-εξαρτώμενης φωσφορυλίωσης της Akt και την ενδοκυττάρια πρόσληψη της γλυκόζης. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το χρώμιο μετριάζει το αποτέλεσμα που επιφέρει η επίδραση του παλμιτικού οξέος υποδεικνύοντας έτσι ότι όντως ρυθμίζει αρνητικά πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην ανάπτυξη ινσουλινοαντίσταση [113].

3.4.5.5 Χρώμιο και stress του ενδοπλασματικού δικτύου (ER)

Αρκετά δεδομένα υποστηρίζουν ότι συνθήκες stress που σχετίζονται με το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη αντιπροσωπεύοντας έτσι ένα ολόκληρο μηχανισμό η αποσαφήνιση του οποίου συμβάλλει στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας του ΣΔ τύπου 2. Αυξημένα επίπεδα ER stress έχουν παρατηρηθεί σε λιποκύτταρα και κύτταρα του ήπατος γενετικά τροποποιημένων παχύσαρκων επίμυων [114]. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η ύπαρξη ER stress ενεργοποιεί την κινάση JNK και επάγει την φωσφορυλίωση της σερίνης της IRS καταστέλλοντας έτσι την σηματοδότηση της ινσουλίνης [114]. Κατά συνέπεια, φαρμακευτικοί παράγοντες οι οποίοι εξασθενούν το ER stress (όπως μοριακές νταντάδες του ER) φαίνεται να έχουν ευεργετικές ιδιότητες σε ότι αφορά την συμπτωματολογία του ΣΔ. Πρόσφατη μελέτη υποστηρίζει ότι σε ob/ob ποντίκια βρέθηκαν αυξημένοι βιοδείκτες που σχετίζονται με το ER stress. Τέτοιοι βιοδείκτες είναι φωσφορυλιωμένη ER παγκρεατική κινάση, η α- υπομονάδα του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 2 καθώς και το ενζυμο 1 (inositol-requiringenzyme-1). Χορήγηση χρωμίου είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική μείωση των επιπέδων των δεικτών αυτών. Επιπρόσθετα, σε *in vitro*

καλλιέργειας μυοβλαστών όπου πραγματοποιήθηκε επαγωγή του ER stress με τον παράγοντα θαψιγαργίνη (thapsigargin), προκατεργασία των κυττάρων με χρώμιο είχε ως αποτέλεσμα την δόσο-εξαρτώμενη αναστολή της επαγωγής του ER stress. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν ότι το χρώμιο εξασθενεί το ER stress ωστόσο ο μηχανισμός μέσω του οποίου συμβαίνει κάτι τέτοιο δεν έχει αποσαφηνιστεί. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η διερεύνηση του κατά πόσο το χρώμιο δρα ως συμπαράγοντας μοριακών νταντάδων σε κύτταρα με αντίσταση στην ινσουλίνη.

3.4.5.6 Χρώμιο, οξειδωτικό stress και φλεγμονή

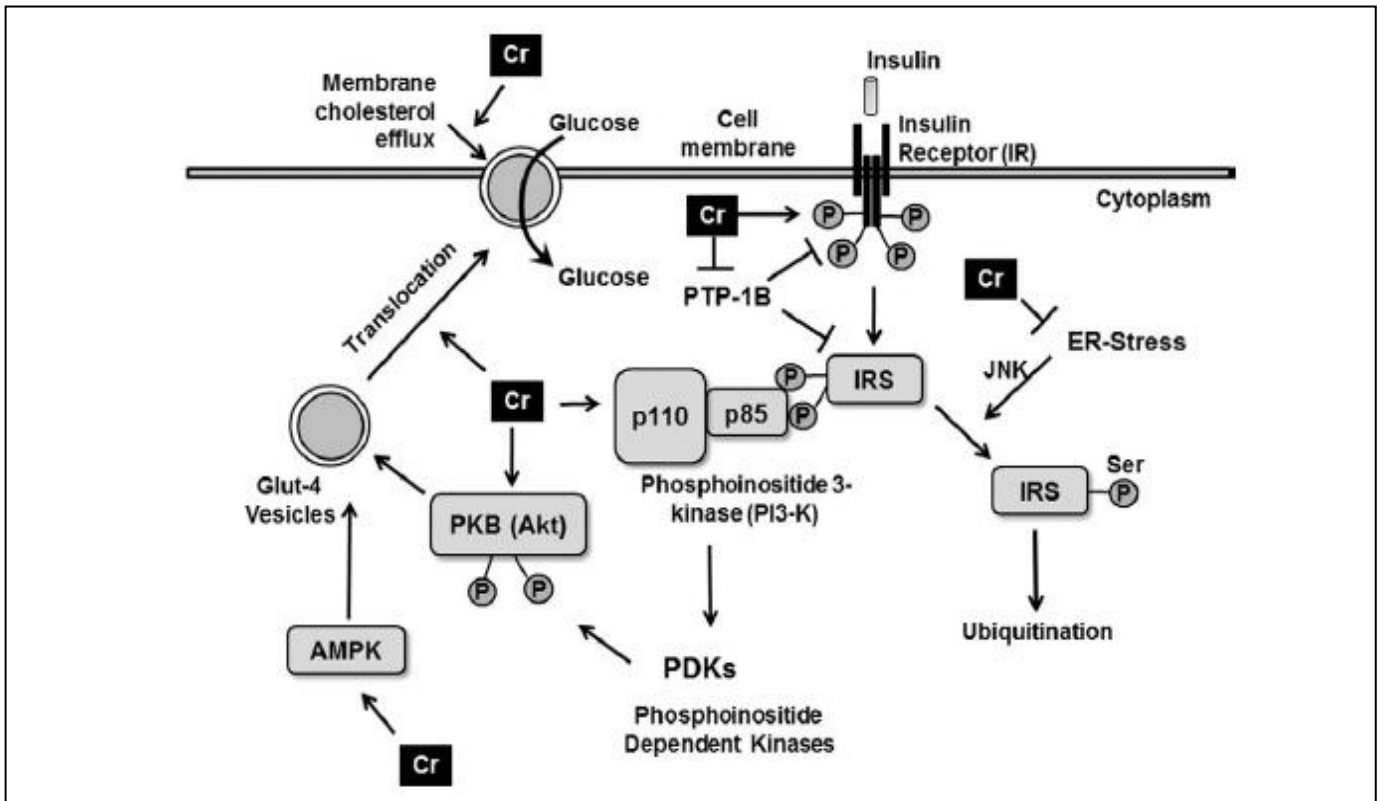
Ο ρόλος του οξειδωτικού stress και της φλεγμονής στον ΣΔ είναι γνωστός. Επιπλέον, έχει υποστηριχθεί ο ρόλος του χρωμίου στην ρύθμιση του οξειδωτικού stress αλλά και της φλεγμονής. Πιο συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι το χρώμιο μειώνει το οξειδωτικό stress σε μονοκύτταρα καθώς και απομονωμένα ανθρώπινα μονοκύτταρα τα οποία καλλιεργήθηκαν σε υπεργλυκαιμικές συνθήκες. Παράλληλα με την μείωση του οξειδωτικού stress, το χρώμιο αναστέλλει την παραγωγή προ-φλεγμονοδών κυτοκινών από μονοκύτταρα τα οποία εκτίθενται σε υπεργλυκαιμικές συνθήκες. Έχει βρεθεί ότι το χρώμιο αναστέλλει την γλυκοσυλίωση των πρωτεϊνών και την υπεροξειδωση των λιπιδίων όταν υπάρχει έκθεση σε υψηλά επίπεδα γλυκόζης [115]. Εκτός από τις *in vitro* αυτές μελέτες, έχει επίσης δειχθεί ότι η χορήγηση χρωμίου επιφέρει μείωση της παραγωγής προ-φλεγμονοδών κυτοκινών (TNF- α , ιντερλευκίνη-6, C-πρωτεΐνη), του οξειδωτικού stress αλλά και των επιπέδων των λιπιδίων σε διαβητικούς επίμυες. Οι Hazane-Puch και συνεργάτες χρησιμοποίησαν cDNA συστοιχές (arrays) για την διερεύνηση της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης ανθρώπινων κερατινοκυττάρων μετά από επίδραση με σύμπλοκα χρωμίου [116]. Οι συστοιχίες αυτές αποτελούνταν κυρίως από αλληλουχίες που αντιπροσωπεύουν γονίδια που συμμετέχουν στην αντιοξειδωση και την επιδιόρθωση του DNA. Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν ανοδική ρύθμιση της μεταγραφής της συνθάσης της γλουταθειόνης, της αιμο-οξειγενάσης 2 και της υπεροξειρεδοξίνης σε κύτταρα τα οποία είχαν εκτεθεί στα σύμπλοκα του χρωμίου. Επιπρόσθετα, το χρώμιο ανέστειλε την μεσολαβούμενη από το H₂O₂ οξειδωση των θειολών και την υπεροξειδωση των λιπιδίων [116]. Χορήγηση χρωμίου σε παχύσαρκα ποντίκια είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική μείωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης σε ανηγμένη και τον σχηματισμό πρωτεϊνικού καρβονυλίου. Παρόμοια αποτελέσματα υπήρξαν μετά από επίδραση με χρώμιο στα επίπεδα του οξειδωτικού stress σε διάφορες κλινικές μελέτες [117].

3.4.5.7 Επίδραση του χρωμίου στην AMPK (adenosine-monophosphate-activated protein kinase)

Η πρωτεΐνη AMPK είναι μια κινάση σερίνης-θρεονίνης η οποία συγκεντρώνει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω του ρυθμιστικού της ρόλου στην ενεργειακή ομοιοστασία του κυττάρου. Η AMPK η οποία ενεργοποιείται από την αύξηση των επιπέδων του AMP:ATP, ανακαλύφθηκε αρχικά ως διακόπτης της ρύθμισης της οξειδωσης των λιπαρών οξέων στον καρδιακό και μυϊκό ιστό. Η πρωτεΐνη αυτή έχει αναδειχθεί σε σημαντικό ρυθμιστή του μεταβολισμού της γλυκόζης [118]. Έχει δειχθεί ότι σε μυοβλάστες H9c2 αλλά και απομονωμένα καρδιομυοκύτταρα η ένωση Cr(rhe)3 διεγείρει την φωσφορυλίωση της α - καταλυτικής υπομονάδας της AMPK στη θέση Thr¹⁷² όπως επίσης και καθοδικούς στόχους της AMPK συμπεριλαμβανομένης της καρβοξυλάσης του ακετυλοσυνενζύμου A στην θέση Ser²¹² αλλά και την eNOS στη θέση Ser¹¹⁷⁷. Παράλληλα το χρώμιο διέγειρε την ενδοκυττάρια πρόσληψη της γλυκόζης στα ίδια κύτταρα. Τόσο η φωσφορυλίωση της AMPK όσο και η πρόσληψη της γλυκόζης που μεσολαβείται από το χρώμιο μπορεί να ανασταλεί από τον αναστολέα του συμπλόκου C. Πέρα από τις *in vitro* μελέτες, οξεία έγχυση χρωμίου σε ποντίκια είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων του AMP και την ουσιαστική μείωση του δυναμικού της μεμβράνης των μιτοχονδρίων στον καρδιακό ιστό. Συνεπώς, η αύξηση της συγκέντρωσης του καρδιακού AMP και του δυναμικού της μεμβράνης του μιτοχονδρίου μπορεί να συνεισφέρουν στην ενεργοποίηση της AMPK από τα σύμπλοκα του χρωμίου. Αν και τόσο η βορμανίνη η οποία είναι αναστολέας της PI3K όσο και το σύμπλοκο C μειώνουν την πρόσληψη της γλυκόζης στα καρδιομυοκύτταρα που επάγεται από το χρώμιο, κανένα από τα σύμπλοκα αυτά δεν μπλοκάρει τελείως την πρόσληψη της γλυκόζης στις υψηλότερες από τις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν. Ωστόσο, όταν χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός αναστολέων, η από το χρώμιο επαγόμενη πρόσληψη της γλυκόζης ανεστάλη τελείως υποδεικνύοντας ότι τόσο το μονοπάτι της ινσουλίνης όσο και της AMPK επηρεάζονται από το χρώμιο. Οι Penumathsa και συνεργάτες διερεύνησαν την επίδραση του συμπλόκου χρωμίου-νιασίνης σε μοντέλο ισχαιμίας/επαναιμάτωσης σε διαβητικά πειραματόζωα. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το χρώμιο εξασθενεί την δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας της καρδιάς, το μέγεθος του εμφράγματος και την απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων. Το χρώμιο επίσης βελτίωσε την καρδιακή συστολή καθώς και την διαχείριση των ιόντων ασβεστίου σε παχύσαρκα ποντίκια. Επιπλέον, η επίδραση του χρωμίου είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της μετατόπισης του GLUT 4 στις λιπιδιακές σχεδίες, την μειωμένη έκφραση της Cav-1 και την αύξηση της έκφρασης της Cav-3 ενώ παράλληλα

αυξήθηκε η φωσφορυλίωση της Akt, eNOS και AMPK. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν την υπόθεση ότι τόσο το μονοπάτι της ινσουλίνης όσο και της AMPK αποτελούν πιθανούς στόχους του χρωμίου.

Συμπερασματικά λοιπόν, το τρισθενές χρώμιο ως διατροφικό συμπλήρωμα έχειδειχθεί ότι βελτιώνει την αντίσταση στην ινσουλίνη και το λιπιδιακό προφίλ ωστόσο, δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα που να υποστηρίζουν την ευεργετική δράση του στον άνθρωπο. Αντίθετα, το χρώμιο βελτίωσε την ευαισθησία στην ινσουλίνη καθώς και την πρόσληψη της γλυκόζης σε διάφορα διαβητικά μοντέλα πειραματόζων με ΣΔ τύπου 2. Ωστόσο, παρά τα αντικρουόμενα δεδομένα, το χρώμιο χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα σε διάφορα σκευάσματα πολυβιταμινών και ενεργειακά ποτά. Παρόλα αυτά οι μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων το χρώμιο επιτελεί τις ευεργετικές του δράσεις δεν έχουν ακόμα αποσαφηνιστεί. Η χορήγηση χρωμίου σε πειραματόζωα με αντίσταση στην ινσουλίνη υποδεικνύει ότι το χρώμιο ενισχύει την σηματοδότηση της ινσουλίνης, αμβλύνει του αρνητικούς ρυθμιστές του μονοπατιού αυτού, ενισχύει την δράση της AMPK, ρυθμίζει ανοδικά την ενδοκυττάρια πρόσληψη της γλυκόζης και μειώνει το οξειδωτικό stress. Στην εικόνα 3.4.5.7 συνοψίζονται τα σηματοδοτικά μονοπάτια που περιγράφησαν υπογραμμίζοντας τα μόρια εκείνα τα οποία φαίνεται πως επηρεάζονται από το χρώμιο τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Η ευεργετική επίδραση του χρωμίου σε συνδυασμό με το χαμηλά τοξικό του προφίλ μπορούν να υποστηρίξουν την χρήση του ως συμπληρωματικό παράγοντα στην αντιμετώπιση του ΣΔ τύπου 2 και την αντίσταση στην ινσουλίνη.



Εικόνα 3.4.5.7 Πιθανοί μηχανισμοί μέσω των οποίων το χρώμιο ενισχύει την ενδοκυττάρια πρόσληψη της γλυκόζης. Το χρώμιο, έχει δείξει ότι ενισχύει την δράση κινάσης της IR-β και άρα την αύξηση της δράσης καθοδικών τελεστών της μονοπατιού της ινσουλίνης (PI3K και Akt) με αποτέλεσμα την ενίσχυση της μετατόπισης του GLUT 4 στην επιφάνεια του κυττάρου. Το χρώμιο επίσης ρυθμίζει καθοδικά την PTP-1B η οποία είναι αρνητικός ρυθμιστής του μονοπατιού της ινσουλίνης και μειώνει του ERstress. Παροδική αοδική ρύθμιση της AMPK από το χρώμιο έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της πρόσληψης της γλυκόζης. Επιπλέον, το χρώμιο μεσολαβεί την εκροή χοληστερόλης από την μεμβράνη, προάγοντας έτσι την μετατόπιση του GLUT 4 και άρα την ενδοκυττάρια πρόσληψη της γλυκόζης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] S.L. Noble, E. Johnston, B. Walton, *Am. Fam. Physician.* 57(2) (1998) 279–286, 289-292.
- [2] Kolatkar N (YouTotalHealth.com): "Insulin Administration: Types and differences".
- [3] NovoNordisk: "Administration of Insulin".
- [4] Walsh J (DiabetesNet.com): "Will Inhaled Insulin Really Take Your Breath Away?". (ε)
Κανακά - Gantenbein X: "Εισπνεόμενη ινσουλίνη στο Διαβήτη" Παιδιατρική Θεραπευτική
Ενημέρωση, 193-196, 2006.
- [5] National Diabetes Information Clearinghouse (του NIH): "Alternative Devices for Taking
Insulin".
- [6] D.A. Scott, *Biochem. J.* 28(4) (1934) 1592-1602.
- [7] B.L. Vallee, K.H. Falchuk, *Physiol. Rev.* 73(1) (1993) 79-118.
- [8] N. Wellinghausen, H. Kirchner, L. Rink, *Immunol. Today* 18(11) (1997) 519-521.
- [9] A.S. Prasad, *Nutrition* 11(1 Suppl) (1995) 93-99.
- [10] A.Q. Truong-Tran, L.H. Ho, F. Chai, P.D. Zalewski, *J Nutr.* 130(5S Suppl) (2000) 1459S-
1466S.
- [11] A.Q. Truong-Tran, J. Carter, R.E. Ruffin, P.D. Zalewski, *Biometals* 14(3-4) (2001) 315-
330.
- [12] H. Haase, E. Mocchegiani, L. Rink, *Biogerontology* 7(5-6) (2006) 421-428.
- [13] C.F. Mills, *Zinc in Human Biology* (1989).
- [14] A. Favier, M. Favier, *Rev. Fr. Gynecol. Obstet.* 85(1) (1990) 13-27.
- [15] K.H. Ibs, L. Rink, *J. Nutr.* 133(5 Suppl 1) (2003) 1452S-1456S.
- [16] S. Overbeck, P. Uciechowski, M.L. Ackland, D. Ford, L. Rink, *J. Leukoc. Biol.* 83(2)
(2008) 368-380.
- [17] W. Maret, A. Krezel, *Mol. Med.* 13(7-8) (2007) 371-375.
- [18] L. Rink, H. Haase, *Trends Immunol.* 28(1) (2007) 1-4.
- [19] A.F. Bartholomay, E.D. Robin, B.L. Vallee, *N. Engl. J. Med.* 255(9) (1956) 403-408.
- [20] S. Küllerich, O. Dietrichson, F.B. Loud, J. Naestoft, P. Christoffersen, E. Juhl, G. Kjems, C.
Christiansen, *Scand. J. Gastroenterol.* 15(3) (1980) 363-367.
- [21] J. Schölmerich, E. Löhle, E. Kötting, W. Gerok, *Hepatogastroenterology* 30(4) (1983) 119-
125.
- [22] J.C. Bode, P. Hanisch, H. Henning, W. Koenig, F.W. Richter, C. Bode, *Hepatology* 8(6)
(1988) 1605-1609.
- [23] T.D. Doerr, A.S. Prasad, S.C. Marks, F.W. Beck, F.H. Shamsa, H.S. Penny, R.H. Mathog, J.
Am. Coll. Nutr. 16(5) (1997) 418-422.
- [24] L.C. Costello, P. Feng, B. Milon, M. Tan, R.B. Franklin, *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 7(2)
(2004) 111-117.
- [25] C. McClain, C. Soutor, L. Zieve, *Gastroenterology* 78(2) (1980) 272-279.
- [26] G.C. Sturniolo, M.M. Molokhia, R. Shields, L.A. Turnberg, *Gut.* 21(5) (1980) 387-391.
- [27] J.F. Bach, M. Dardenne, *Med. Oncol. Tumor. Pharmacother.* 6(1) (1989) 25-29.
- [28] A.S. Prasad, *Mol. Cell Biochem.* 188(1-2) (1998) 63-69.

- [29] L. Rink, H. Kirchner, *J. Nutr.* 130(5S Suppl) (2000) 1407S-1411S.
- [30] L. Rink, P. Gabriel, *Biometals* 14(3-4) (2001) 367-383.
- [31] H.E., Lebovitz, *Clin. Chem.* 45(8 Pt 2) (1999) 1339-1345.
- [32] M.D. Chen, Y.M. Song, P.Y. Lin, *Horm. Metab. Res.* 32(3) (2000) 107-109.
- [33] F. Chimienti, S. Devergnas, A. Favier, M. Seve, *Diabetes* 53(9) (2004) 2330-2337.
- [34] W. Dettwyler, *Diabetologia.* 2(2) (1966) 75-81.
- [35] A.S. Levine, C.J. McClain, B.S. Handwerger, D.M. Brown, J.E. Morley, *Am. J. Clin. Nutr.* 37(3) (1983) 382-386.
- [36] D. Halim, K. Khalifa, R. Awadallah, E.A. El-Dessoukey, T. Hafez, Z. El-Hawary, *Z. Ernährungswiss. Suppl.* 16(1) (1977) 39-43.
- [37] W. Feng, Q. Qian, W. Ding, Z. Chai, *Metabolism* 50(10) (2001) 1168-1174.
- [38] I.J. Davies, M. Musa, T.L. Dormandy, *J. Clin. Pathol.* 21(3) (1968) 359-363.
- [39] A.M. Huber, S.N. Gershoff, *J. Nutr.* 103(12) (1973) 1739-1744.
- [40] H. Sakurai, Y. Adachi, *Biometals* 18(4) (2005) 319-323.
- [41] P. Ohly, C. Dohle, J. Abel, J. Seissler, H. Gleichmann, *Diabetologia.* 43(8) (2000) 1020-1030.
- [42] T. Minami, M. Shimizu, H. Tanaka, Y. Okazaki, M.G. Cherian, *Toxicology.* 132(1) (1999) 33-41.
- [43] S.A. Moustafa, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 201(2) (2004) 149-155.
- [44] R. Gupta, V.K. Garg, D.K. Mathur, R.K. Goyal, *J. Assoc. Physicians India* 46(11) (1998) 939-942.
- [45] H.M. Kubisch, J. Wang, R. Luche, E. Carlson, T.M. Bray, C.J. Epstein, J.P. Phillips, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91(21) (1994) 9956-9959.
- [46] J.M. May, C.S. Contoreggi, *J. Biol. Chem.* 257(8) (1982) 4362-4368.
- [47] W.T. Garvey, L. Maianu, J.H. Zhu, G. Brechtel-Hook, P. Wallace, A.D. Baron, *J. Clin. Invest.* 101(11) (1998) 2377-2386.
- [48] O. Ezaki, *J. Biol. Chem.* 264(27) (1989) 16118-16122.
- [49] D.A. Cross, D.R. Alessi, J.R. Vandenheede, H.E. McDowell, H.S., Hundai, P. Cohen, *Biochem. J.* 303(Pt 1) (1994) 21-26.
- [50] K. MacAulay, B.W. Doble, S. Patel, T. Hansotia, E.M. Sinclair, D.J. Drucker, A. Nagy, J.R. Woodgett, *Cell Metab.* 6(4) (2007) 329-337.
- [51] K.H. Ibs, *The importance of zinc ions for mononuclear leucocytes (Dissertation)* (2006) 1-111.
- [52] X.H. Tang, N.F. Shay, *J. Nutr.* 131(5) (2001) 1414-1420.
- [53] S.E. Nikoulina, T.P. Ciaraldi, S. Mudaliar, P. Mohideen, L. Carter, R.R. Henry, *Diabetes.* 49(2) (2000) 263-271.
- [54] T. Mandrup-Poulsen, *Diabetologia* 39(9) (1996) 1005-1029.
- [55] M. Cnop, N. Welsh, J.C. Jonas, A. Jörns, S. Lenzen, D.L. Eizirik, *Diabetes* 54(Suppl 2) (2005) S97-S107.
- [56] K. Maedler, P. Sergeev, F. Ris, J. Oberholzer, H.I. Joller-Jemelka, G.A. Spinas, N. Kaiser,

- P.A. Halban, M.Y. Donath, *J. Clin. Invest.* 110(6) (2002) 851-860.
- [57] L. Rink, M. Seyfarth, *Z. Gerontol. Geriatr.* 30(3) (1997) 220-225.
- [58] A.S. Prasad, F.W. Beck, B. Bao, J.T. Fitzgerald, D.C. Snell, J.D. Steinberg, L.J. Cardozo, *Am. J. Clin. Nutr.* 85(3) (2007) 837-844.
- [59] A. Butler, *Science* 281(5374) (1998) 207-210.
- [60] J.H. Trefry, S. Metz, *Nature* 342(6249) (1989) 531-533.
- [61] K. Elvingson, A. González Baró, L. Pettersson, *Inorg. Chem.* 35(11) (1996) 3388-3393.
- [62] A. Butler, A.H. Baldwin, *Struct. Bond.* 89 (1997) 109-131.
- [63] (a) H.B. ten Brink, A. Tuynman, H.L. Dekker, W. Hemrika, Y. Izumi, T. Oshiro, H.E. Schoemaker, R. Wever, *Inorg. Chem.* 37(26) (1998) 6780-6784.
- (b) H.B. ten Brink, H.L. Holland, H.E. Schoemaker, H. van Lingen, R. Wever, *Tetrahedron: Asymmetry* 10 (1999) 4563-4572.
- [64] S.J. Kopp, J. Daar, D.J. Paulson, F.D. Romano, R. Laddaga, *J. Mol. Cell Cardiol.* 29(9) (1997) 2355-2362.
- [65] S.H. Li, J.H. McNeill, *Mol. Cell Biochem.* 217(1-2) (2001) 121-129.
- [66] S. Pugazhenth, J.F. Angel, R.L. Khandelwal, *Metabolism* 40(9) (1991) 941-946.
- [67] S. Bhanot, A. Michoulas, J.H. McNeill, *Mol. Cell Biochem.* 153(1-2) (1995) 205-209.
- [68] S. Pugazhenth, J.F. Angel, R.L. Khandelwal, *Mol. Cell Biochem.* 122(1) (1993) 77-84.
- [69] J. Wang, V.G. Yuen, J.H. McNeill, *Metabolism* 50(6) (2001) 667-673.
- [70] K. Cusi, S. Cukier, R.A. DeFronzo, M. Torres, F.M. Puchulu, J.C. Redondo, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86(3) (2001) 1410-1417.
- [71] A.S. Clark, J.M. Fagan, W.E. Mitch, *Biochem. J.* 232(1) (1985) 273-276.
- [72] T.K. Jackson, A.I. Salhanick, J.D. Sparks, C.E. Sparks, M. Bolognino, J.M. Amatruda, *Diabetes* 37(9) (1988) 1234-1240.
- [73] H.V. Strout, P.P. Vicario, R. Saperstein R, E.E. Slater, *Endocrinology* 124(4) (1989) 1918-1924.
- [74] A. Shisheva, Y. Shechter, *J. Biol. Chem.* 268(9) (1993) 6463-6469.
- [75] P.R. Shepherd, D.J. Withers, K. Siddle, *Biochem. J.* 333(Pt 3) (1998) 471-490.
- [76] J. Wijkander, L.S. Holst, T. Rahn, S. Resjo, I. Castan, V. Manganiello, P. Belfrage, E. Degerman, *J. Biol. Chem.* 272(34) (1997) 21520-21526.
- [77] J.C. Molero, C. Martinez, A. Andres, J. Satrustegui, J.M. Carrascosa, *FEBS Lett.* 425(2) (1998) 298-304.
- [78] J.D. Foster, B.A. Pederson, R.C. Nordlie, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 251(4) (1997) 314-332.
- [79] N. Westergaard, C.L. Brand, R.H. Lewinsky, H.S. Andersen, R.D. Carr, A. Burchell, K. Lundgren, *Arch. Biochem. Biophys.* 366(1) (1999) 55-60.
- [80] D. Massillon, *J. Biol. Chem.* 276(6) (2000) 4055-4061.
- [81] R.W. Brownsey, G.W. Dong, *Mol. Cell Biochem.* 153(1-2) (1995) 131-137.
- [88] B.E. Wilson, A. Gondy, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 28(3) (1995) 179-184.

- [89] I. Kato, J.H. Vogelman, V. Dilman, J. Karkoszka, K. Frenkel, N.P. Durr, N. Orentreich, P. Toniolo, *Eur. J. Epidemiol.* 14(6) (1998) 621-626.
- [90] R. Anderson, *J. Am. Coll. Nutr.* 17(6) (1998) 548-555.
- [91] National Research Council, *Recommended Dietary Allowances* (1989) 241-246.
- [92] W.T. Cefalu, Z.Q. Wang, X.H. Zhang, L.C. Baldor, J.C. Russell, *J. Nutr.* 132(6) (2002) 1107-1114.
- [93] W. Mertz, *Nutr. Rev.* 56(6) (1998) 174-177.
- [94] J. Vincent, *J. Nutr.* 130(4) (2000) 715-718.
- [95] H.E. Resnick, *Diabetes Care* 25(7) (2002) 1246-1247.
- [96] B.J. Stoecker, *Modern Nutrition in Health and Disease* (1999) 277-282.
- [97] E. Seli, A.J. Duleba, *Hum. Reprod.* 17(9) (2002) 2230-2236.
- [98] B.W. Morris, S. MacNeil, C.A. Hardisty, S. Heller, C. Burgin, T.A. Gray, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 13(1-2) (1999) 57-61.
- [99] M.K. Hellerstein, *Nutr. Rev.* 56(10) (1998) 302-306.
- [100] R.A. Anderson, M.M. Polansky, N.A. Bryden, J.J. Canary, *Am. J. Clin. Nutr.* 54(5) (1991) 909-916.
- [101] S.J. Kopp, J. Daar, D.J. Paulson, F.D. Romano, R. Laddaga, *J. Mol. Cell Cardiol.* 29(9) (1997) 2355-2362.
- [102] S.H. Li, J.H. McNeill, *Mol. Cell Biochem.* 217(1-2) (2001) 121-129.
- [103] S. Pugazhenth, J.F. Angel, R.L. Khandelwal, *Metabolism* 40(9) (1991) 941-946.
- [104] S. Bhanot, A. Michoulas, J.H. McNeill, *Mol. Cell Biochem.* 153(1-2) (1995) 205-209.
- [105] S. Pugazhenth, J.F. Angel, R.L. Khandelwal, *Mol. Cell Biochem.* 122(1) (1993) 77-84.
- [106] J. Wang, V.G. Yuen, J.H. McNeill, *Metabolism* 50(6) (2001) 667-673.
- [107] K. Cusi, S. Cukier, R.A. DeFronzo, M. Torres, F.M. Puchulu, J.C. Redondo, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86(3) (2001) 1410-1417.
- [108] A.S. Clark, J.M. Fagan, W.E. Mitch, *Biochem. J.* 232(1) (1985) 273-276.
- [109] T.K. Jackson, A.I. Salhanick, J.D. Sparks, C.E. Sparks, M. Bolognino, J.M. Amatruda, *Diabetes* 37(9) (1988) 1234-1240.
- [110] H.V. Strout, P.P. Vicario, R. Saperstein R, E.E. Slater, *Endocrinology* 124(4) (1989) 1918-1924.
- [111] A. Shisheva, Y. Shechter, *J. Biol. Chem.* 268(9) (1993) 6463-6469.
- [112] P.R. Shepherd, D.J. Withers, K. Siddle, *Biochem. J.* 333(Pt 3) (1998) 471-490.
- [113] J. Wijkander, L.S. Holst, T. Rahn, S. Resjo, I. Castan, V. Manganiello, P. Belfrage, E. Degerman, *J. Biol. Chem.* 272(34) (1997) 21520-21526.
- [114] J.C. Molero, C. Martinez, A. Andres, J. Satrustegui, J.M. Carrascosa, *FEBS Lett.* 425(2) (1998) 298-304.
- [115] J.D. Foster, B.A. Pederson, R.C. Nordlie, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 251(4) (1997) 314-332.
- [116] N. Westergaard, C.L. Brand, R.H. Lewinsky, H.S. Andersen, R.D. Carr, A. Burchell, K. Lundgren, *Arch. Biochem. Biophys.* 366(1) (1999) 55-60.

[117] D. Massillon, J. Biol. Chem. 276(6) (2000) 4055-4061.

[118] R.W. Brownsey, G.W. Dong, Mol. CellBiochem. 153(1-2) (1995) 131-137.

ΜΕΡΟΣ II

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΛΙΠΟΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΤΩΝ $Zn(II)$, $V(IV)$ ΚΑΙ $Cr(III)$. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΛΛΟ-ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΛΙΠΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΟΝ ΣΔ ΤΥΠΟΥ 2.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μη φυσιολογική απόκριση των ινσουλινο-ευαίσθητων ιστών στην ινσουλίνη θεωρείται παράγοντας υψηλής σημασίας στην παθογένεια των μεταβολικών συνδρόμων και άρα του ΣΔ τύπου 2 [1-4]. Ωστόσο, οι μηχανισμοί που διέπουν την παθογένεια αυτή δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί. Διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως οι διαιτητικές συνήθειες και η απουσία φυσικής άσκησης σε συνδυασμό με διάφορους γενετικούς παράγοντες συνθέτουν το υπόβαθρο για την ανάπτυξη του μεταβολικού συνδρόμου. Επιπρόσθετα, ο επιπολασμός της παχυσαρκίας και του ΣΔ έχει αυξηθεί δραματικά τα τελευταία χρόνια. Έχει δειχθεί ότι υπάρχει ισχυρή, αιτιογενής σχέση μεταξύ της αντίστασης στην ινσουλίνη και του ΣΔ καθώς η ύπαρξη ανοχής στην ινσουλίνη μπορεί να είναι παρούσα έως και 10-20 χρόνια πριν την εμφάνιση του ΣΔ τύπου 2 [5-8]. Ιδιαίτερα πιθανή σύνδεση μεταξύ της παχυσαρκίας και του ΣΔ αποτελεί ο λιπώδης ιστός ο οποίος αποθηκεύει ενέργεια στην μορφή τριγλυκεριδίων και απελευθερώνει ελεύθερα λιπαρά οξέα. Έχει δειχθεί ότι η συσσώρευση του λιπώδους ιστού, κατά την παχυσαρκία, σχετίζεται με την ανοχή που παρατηρείται στην ινσουλίνη. Ανεπάρκεια του λιπώδους ιστού όπως στην επίκτητη ή κληρονομική λιποδυστροφία έχει επίσης συνδεθεί με την αντίσταση στην ινσουλίνη [9, 10]. Ο λιπώδης ιστός αποτελεί τον κύριο ιστό αποθήκευσης λίπους στα θηλαστικά και αποτελείται κυρίως από λιποκύτταρα αλλά και άλλους τύπους κυττάρων περιλαμβανομένων των μακροφάγων και των μαστικών κυττάρων. Επιπλέον, ο λιπώδης ιστός λειτουργεί ως ενδοκρινές όργανο που συνθέτει ορμόνες, κυτοκίνες και συμμετέχει στην ρύθμιση της μεταβολικής ομοιόστασης άλλων ιστών. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, περίσσεια λίπους αποθηκεύεται στον λιπώδη ιστό και μόνο μικρά ποσοστά τριγλυκεριδίων απαντώνται σε μη λιποκύτταρα [11]. Κατά την παχυσαρκία, η ικανότητα των λιποκυττάρων να αποθηκεύουν λίπος μπορεί να υπερβεί το φυσιολογικό με αποτέλεσμα τη μη ισορροπημένη συσσώρευση λίπους σε άλλους ιστούς. Η μη φυσιολογική (υπέρμετρη) συσσώρευση λίπους σε άλλους ιστούς όπως ο μυϊκός, το ήπαρ, και τα παγκρεατικά νησίδια σχετίζεται με πολυάριθμες

δυσλειτουργίες στους ιστούς αυτούς και μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη παχυσαρκίας και ΣΔ τύπου 2 [11]. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η παχύσκια χαρακτηρίζεται κυρίως από αυξημένα επίπεδα μάζας του λιπώδους ιστού οδηγώντας σε υπερπλασία και υπερτροφία των λιποκυττάρων. Εκτιμάται ότι ο αριθμός των λιποκυττάρων στον οργανισμό προσδιορίζεται σε μεγάλο βαθμό από την λιπογένεση. Κατά την διάρκεια της διαδικασίας αυτής, λαμβάνει χώρα η ωρίμανση των πρώιμων ινοβλαστών του λιπώδους ιστού σε ώριμα λιποκύτταρα. Συγκεκριμένα στάδια της λιπογένεσης μπορούν να περιγραφούν μέσω σηματοδοτικών καταρρακτών που οδηγούν στην έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων που ρυθμίζεται από μια μικρή ομάδα μεταγραφικών παραγόντων [11]. Οι μεταγραφικοί παράγοντες αυτοί διακρίνονται σε δύο κύριες οικογένειες οι οποίες είναι οι: α) CCAAT\enhancer-binding proteins C\EBPα, -β και -δ, και β) ο peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR-γ) [12,13]. Το σηματοδοτικό μονοπάτι της λιπογένεσης μπορεί να ρυθμιστεί από διάφορους, ετερογενείς παράγοντες που περιλαμβάνουν τον αυξητικό παράγοντα (transforming growth factor, TGF-β), τον IGF-1 (insulin growth factor 1), την ιντερλευκίνη 17, τον παράγοντα FGF-1 (fibroblast growth factor 1) καθώς και άλλους [14-16]. Τόσο ο PPAR-γ όσο και ο C\EBPα επάγουν την έκφραση γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στην ευαισθησία στην ινσουλίνη. Τα γονίδια-στόχοι περιλαμβάνουν τον ιστοειδικό για τον λιπώδη ιστό γλυκοζομεταφορέα GLUT 4, την πρωτεΐνη FABP4 (fatty acid binding protein), τη λιποπρωτεϊνική λιπάση LPL (lipoprotein lipase), τη πρωτεΐνη AGPAT 2 (sn-1-acyl glycerol-3-phosphate acyl transferase 2), τη περιλιπίνη καθώς και τους εκκρινόμενους προάγοντες αδιπονεκτίνη και λεπτίνη [17,18]. Αρκετά δεδομένα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι ο φυσιολογικός μεταβολισμός τόσο του λίπους όσο και της γλυκόζης καθώς και η επίτευξη φυσιολογικών επιπέδων ευαισθησίας στην ινσουλίνη απαιτούν στην ύπαρξη πλήρως λειτουργικού λιπώδους ιστού [19, 20]. Με δεδομένο τον κομβικό ρόλο του λιπώδους ιστού στη ρύθμιση και διατήρηση των ενεργειακών επιπέδων του οργανισμού, η κατανόηση της φυσιολογίας του θεωρείται απαραίτητη για την αποσαφήνιση της αιτιοπαθογένειας του ΣΔ τύπου 2 αλλά και την ανάπτυξης βέλτιστων θεραπειών για την αντιμετώπισή του. Επιπλέον, η αντιμετώπιση των σοβαρών προβλημάτων που σχετίζονται με την φύση και τη χορήγηση των σημερινών φαρμακευτικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται στην αγωγή και για τους δύο τύπους ΣΔ αποτελεί πρόκληση για την έρευνα αλλά και την φαρμακευτική βιομηχανία. Με βάση το γεγονός ότι α) τόσο ενδογενή όσο και εξωγενή μεταλλοϊόντα έχει αποδειχθεί ότι ενισχύουν φυσιολογικές διεργασίες που σχετίζονται με την παρατηρούμενη παρέκκλιση των

βιολογικών συστημάτων στην παθοφυσιολογία πολυάριθμων ασθενειών, β) φαρμακευτικοί παράγοντες που περιέχουν μέταλλα έχουν καθιερωθεί στην αντιμετώπιση ασθενειών τις τελευταίες δεκαετίες και γ) σαφώς καθορισμένα μεταλλοφάρμακα τα οποία είναι ατοξικά, χημικά και βιολογικά χαρακτηρισμένα για την αντιμετώπιση συγκεκριμένων προβλημάτων που σχετίζονται με τον ινσουλινο-εξαρτώμενο μεταβολισμό της γλυκόζης, έγινε προσπάθεια ανάπτυξης κατάλληλης βιοτεχνολογίας σε φαρμακευτικό επίπεδο. Για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκαν μεταλλοϊόντα με γνωστή ινσουλινομιμητική δράση ή/και επιρροή στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης. Τέτοια μεταλλοϊόντα είναι τα Zn(II), V(IV) και Cr(III). Στα πλαίσια αυτά για την διερεύνηση του λιπογενετικού δυναμικού των Zn(II), V(IV) και Cr(III) και την εφαρμογή της σφαίρας συναρμογής τους σε σαφώς καθορισμένους αντιδιαβητικούς παράγοντες, α) χρησιμοποιήθηκαν καλά καθορισμένες μορφές Zn(II)-citrate, V(IV)-citrate και Cr(III)-citrate δίνοντας έμφαση στον ρόλο του κιτρικού ως φυσιολογικού υποκαταστάτη (κύκλος του Krebs), β) αξιολογήθηκε η (α)τοξική συμπεριφορά τους (επίπεδα κυτταρικής βιωσιμότητας, μεταναστευτικό δυναμικό), γ) εκτιμήθηκε η ικανότητά τους για λιπογένεση και δ) αξιολογήθηκε η επίδρασή τους στενά συνδεδεμένους μοριακούς στόχους (PPAR-γ, GLUT 1, 4, GCK, adiponectin).

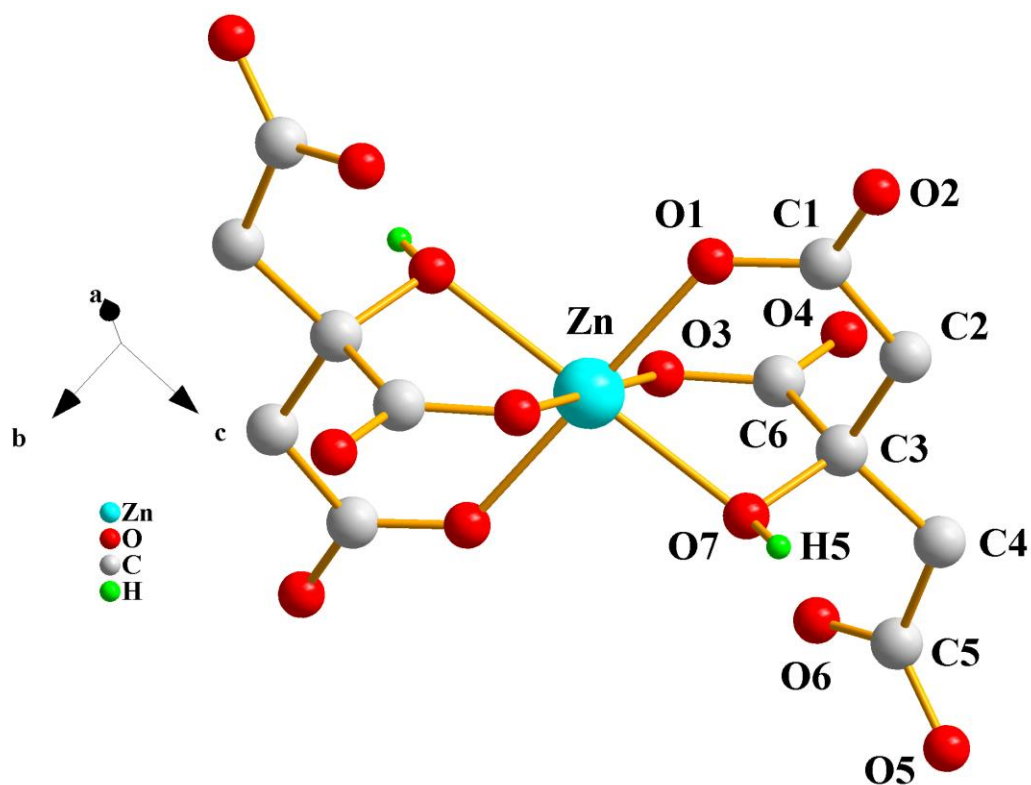
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

2.1 Σχεδιασμός, σύνθεση και φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των ενώσεων Zn(II)-citrate, V(IV)-citrate και Cr(III)-citrate.

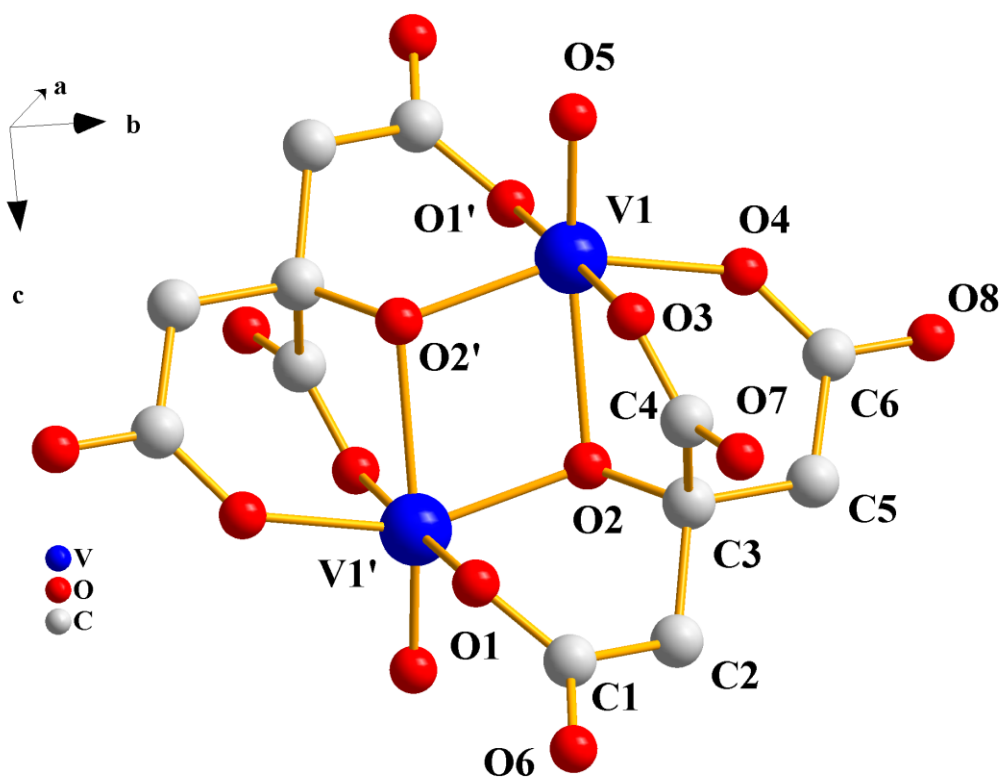
Οι ενώσεις συντέθηκαν και απομονώθηκαν σε μονοκρυσταλλική μορφή. Χαρακτηρίστηκαν φυσικοχημικά με πληθώρα μεθόδων και τεχνικών (στοιχειακή ανάλυση, FT-IR, κρυσταλλογραφία ακτίνων X, NMR (solid, solution), TGA-DTG) σύμφωνα με την βιβλιογραφία [21,22,18].

Οι ενώσεις που προέκυψαν μαζί με τις τρισδιάστατες κρυσταλλικές δομές δίνονται παρακάτω:

- $(\text{NH}_4)_4[\text{Zn}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)]_2$ [**Zn(II)-cit**] με $M_r = 418.63$

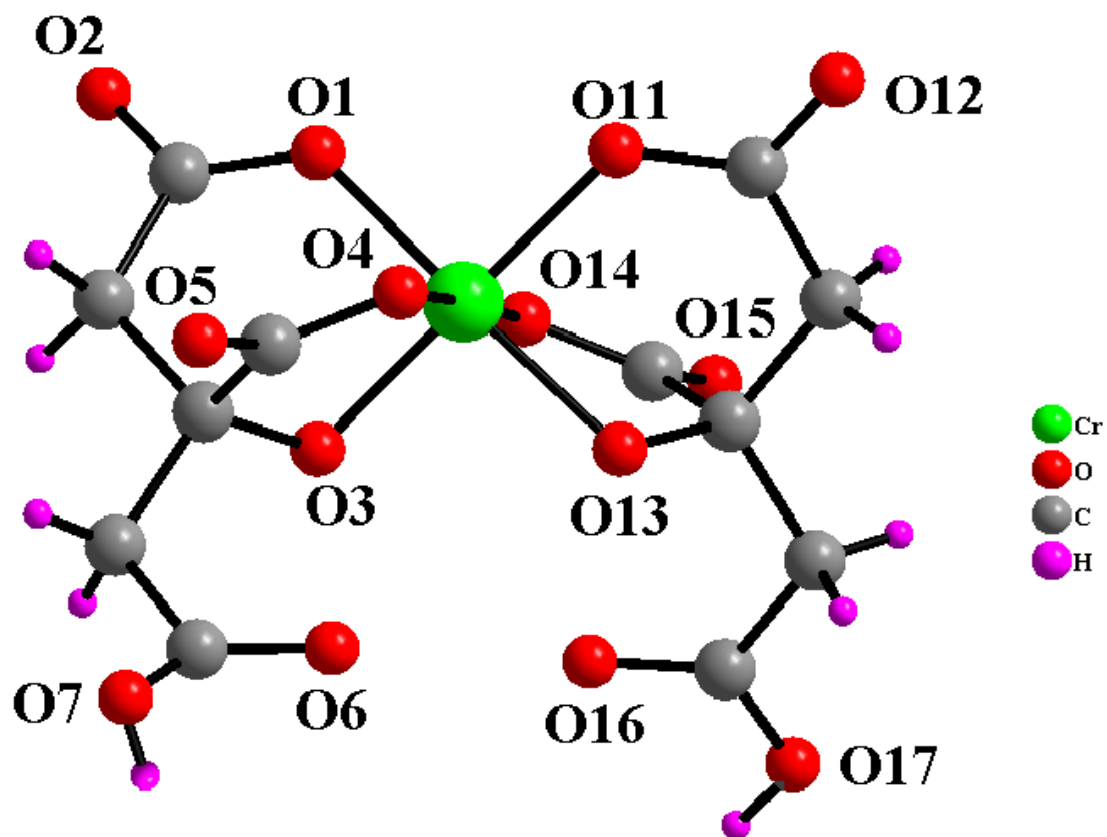


- $\text{Na}_4[\text{V}_2\text{O}_2(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7)_2] \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ [V(IV)-cit] $\mu\epsilon$ $M_r = 818.22$



κ01

- $\text{Na}_3[\text{Cr}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2] \cdot 8.5\text{H}_2\text{O}$ [Cr(III)-cit] $\mu\epsilon$ $M_r = 652.31$



2.2 Ανάπτυξη κυτταρικών καλλιέργειών πρώιμων και ώριμων 3T3-L1 λιποκυττάρων.

2.2.1 Κυτταρική καλλιέργεια 3T3-L1 λιποκυττάρων.

Η επίστροφή και η ανάπτυξη της κυτταρικής καλλιέργειας τόσο των ινοβλαστών όσο και των ώριμων λιποκυττάρων έγινε σε ειδικές φλάσκες καλλιέργειας 75 cm². Η διατήρηση των καλλιεργειών πραγματοποιείται κάτω από ειδικές συνθήκες σταθερής υγρασίας, θερμοκρασίας 37°C και 5% CO₂. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma D6429) το οποίο εμπλουτίζεται με 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Biochrom) και 1% μείγματος αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης (penicillin-streptomycin, Biochrom).

2.2.2 Επαγωγή της διαφοροποίησης των πρώιμων ινοβλαστών 3T3-L1 σε ώριμα λιποκύτταρα.

Η διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα που παράγουν και περιέχουν λιπίδια πραγματοποιήθηκε με κύριο διαφοροποιητικό παράγοντα την ινσουλίνη και την επικουρική δράση της δεξαμεθαζόνης (dexamethasone, Sigma) και της ισοβουτυλ-μεθυλξανθίνης (isobutyl-methyl-xanthine, Sigma). Η διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων έγινε ακολουθώντας συγκεκριμένο, γνωστό πρωτόκολλο διαφοροποίησης [23]. Συνοπτικά, δύο μέρες αφού η καλλιέργεια των πρώιμων ινοβλαστών φτάσει σε πυκνότητα 70% (ημέρα 0), τα κύτταρα διεγείρονται με 10ng/mL ινσουλίνης, 1 μM δεξαμεθαζόνης και 0.5 mM ισοβουτυλ-μεθυλξανθίνης τα οποία διαλύονται στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων. Δύο μέρες μετά (ημέρα 2), το θρεπτικό υλικό της διαφοροποίησης αντικαθίσταται με διάλυμα διατήρησης το οποίο αποτελείται από DMEM και 10ng/mL ινσουλίνης. Το διάλυμα της καλλιέργειας αντικαθίσταται με απλό θρεπτικό υλικό κάθε δύο μέρες. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν την 8^η μέρα της διαφοροποίησης. Στην περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκε αναστολέας του σηματοδοτικού μονοπατιού της ινσουλίνης (όπως της πρωτεΐνης MAPK), πραγματοποιήθηκε προ-επώαση των κυττάρων για 2 ώρες με τον αναστολέα και στη συνέχεια τα κύτταρα διεγέρθηκαν με το διάλυμα της διαφοροποίησης ή της διατήρησης αντίστοιχα.

2.3 Έλεγχος της (α)τοξικής δράσης των Zn(II)-cit, V(IV)-cit και Cr(III)-cit.

2.3.1 Μέτρηση των επιπέδων κυτταρικής επιβίωσης πρώιμων και ώριμων λιποκυττάρων με χρήση της φωταύγειας.

Για την αξιολόγηση των επιπέδων κυτταρικής επιβίωσης των πρώιμων και ώριμων λιποκυττάρων μετά από διέγερση με τις υπό μελέτη ενώσεις, χρησιμοποιήθηκε το kit της εταιρείας Promega, Cell Titer Glo το οποίο κάνει χρήση του φαινομένου της φωταύγειας. Για τον σκοπό αυτό κύτταρα επιστρώνονται σε ειδική λευκή πλάκα 96-οπών (2500 κύτταρα/οπή). Τα κύτταρα επωάζονται σε θρεπτικό υλικό παρουσία των ενώσεων στις επιθυμητές τελικές συγκεντρώσεις της κάθε ένωσης και για κατάλληλο χρονικό διάστημα (σύντομη και μακρά διέγερση 24 και 48 ωρών, αντίστοιχα). Η δοκιμασία βασίζεται στην ποσοτικοποίηση του ATP το οποίο σχετίζεται γραμμικά με τα μεταβολικώς ενεργά (ζωντανά) κύτταρα. Το αντιδραστήριο προστίθεται σε αναλογία 1:1 σε σχέση με το υπερκείμενο των κυττάρων χωρίς την απομάκρυνσή του. Ως αρνητικός μάρτυρα της δοκιμασίας χρησιμοποιήθηκε ο γνωστός κυτταροτοξικός παράγοντας δεοξυχολικό νάτριο (sodiumdeoxycholate, Sigma) σε αναλογία 1mg/mL. Κύτταρα τα οποία επώαστηκαν παρουσία μόνο θρεπτικού υλικού αποτέλεσαν τον φυσιολογικό μάρτυρα των κυττάρων.

2.3.2 Εκτίμηση της ενδεχόμενης αναστολής του μεταναστευτικού δυναμικού των 3T3-L1 μετά από επίδραση με τα Zn(II)-cit, V(IV)-cit και Cr(III)-cit.

Ο έλεγχος της επίδρασης των υπό μελέτη ενώσεων στην ενδογενή μεταναστευτικότητα των πρώιμων λιποκυττάρων πραγματοποιήθηκε μέσω της δοκιμασίας *in vitro* scratch assay. Για τον σκοπό αυτό, κύτταρα επιστρώθηκαν σε ειδικά πιάτα καλλιέργειας 35 mm και επώαστηκαν σε παρουσία θρεπτικού υλικού. Όταν οι μικροκαλλιέργειας απέκτησαν πυκνότητα 70-80% ακολούθησε μηχανική διακοπή της συνέχειας της καλλιέργειας με χρήση αποστειρωμένου ρύγχους μικροπιπέτας 100 μ Lt. Στη συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία των **Zn(II)-cit**, **V(IV)-cit** και **Cr(III)-cit** για 24 ώρες σε τελική συγκέντρωση 20 μ M της κάθε ένωσης. Η παρατήρηση των μικροκαλλιεργειών έγινε με χρήση του οπτικού μικροσκοπίου σε μεγέθυνση 10xAxioObserverZ1 (CarlZeiss, GmbH, Germany). Μικροφωτογραφίες των καλλιεργειών λήφθηκαν με την κάμερα AxioCamHccamera 24 ώρες μετά την διακοπή της συνέχειας της καλλιέργειας. Κύτταρα τα οποία επώαστηκαν μόνο παρουσία θρεπτικού υλικού αποτέλεσαν τον φυσιολογικό μάρτυρα του πειράματος.

2.4 Επαγωγή της κυτταρικής διαφοροποίησης των 3T3-L1 με χρήση των Zn(II)-cit, V(IV)-cit και Cr(III)-cit.

Τα πρώιμα λιποκύτταρα 3T3-L1 διαφοροποιήθηκαν σε ώριμα λιποκύτταρα ακολουθώντας το πρωτόκολλο διαφοροποίησης που περιγράφεται και παραπάνω. Τα κύτταρα διεγέρθηκαν με 10ng/mL ινσουλίνης ή/και τις υπό μελέτη ενώσεις σε διάφορες συγκεντρώσεις (0.5-20 μ M). Τα σύμπλοκα διαλύθηκαν αρχικά σε DMEM (10% FBS, 1% penicillin/streptomycin) σε αρχική συγκέντρωση 500 μ M και ακολούθησε φιλτράρισμα όλων των διαλυμάτων. Σε όλα τα πειράματα η ινσουλίνη αποτέλεσε τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Επιπλέον, κύτταρα τα οποία δε διαφοροποιήθηκαν αποτέλεσαν τον απλό μάρτυρα της δοκιμασίας. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης ενώ ειδικά για το **Cr(III)-cit** οι χρόνοι διέγερσης επεκτάθηκαν και στις 72 ώρες λόγω κινητικής αδράνειας του συγκεκριμένου μεταλλοϊόντος (εξηγείται παρακάτω).

2.4.1 Χρώση των παραγόμενων λιπιδίων (oil red O staining)

Κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης [και 9^η στην περίπτωση του Cr(III)] πραγματοποιήθηκε χρώση των παραγόμενων λιπιδίων των ώριμων λιποκυττάρων. Η παρουσία έντονου λιπιδιακού φορτίου σε μορφή λιποσταγόνας αποτελεί μορφολογικό δείκτη της επιτυχούς ωρίμανσης των πρώιμων ινοβλαστών του λιπώδους ιστού σε ώριμα λιποκύτταρα. Συνοπτικά, απομακρύνεται το υπερκείμενο των κυττάρων και ακολουθεί πλύση με dH₂O για την απομάκρυνση των λιπιδίων που βρίσκονται στον εξωκυττάριο χώρο. Στη συνέχεια, τα κύτταρα μονιμοποιούνται με 4% PFA(paraformaldehyde) και ακολουθεί επώαση με την χρωστική oil red για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν δύο πλύσεις με PBS (phosphate buffer saline) (1x) και στη συνέχεια γίνεται παρατήρηση και λήψη φωτογραφιών στο μικροσκόπιο.

2.4.2 Ποσοτική εκτίμηση της σχετικής έκφρασης του mRNA στενά συνδεδεμένων μοριακών στόχων.

Για την μέτρηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων μετά από επίδραση των υπό μελέτη ενώσεων πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του ολικού mRNA των κυττάρων κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Trizol. Ακολούθησε μετατροπή του σε cDNA με χρήση του the iScript cDNA synthesis kit (BioRad). Η RT-PCR έγινε με χρήση του Rotor GeneQ (Qiagen) χρησιμοποιώντας το kit QuantiTect SYBR Green

PCR kit. Οι γονιδιακοί στόχοι που εξετάστηκαν ήταν οι: ο μεταγραφικός παράγοντας PPAR- γ , οι γλυκοζομεταφορείς GLUT 1 και GLUT 4, η γλυκοκινάση (GCK) και η κυτοκίνη αδιπονεκτίνη (adiponectin, ADIPOQ). Στη συνέχεια παρατίθενται οι ακολουθίες των εκκινήτων του κάθε γονιδίου.

- **mPPAR- γ** forward 5'-GTCAGCGACTGGGACTTTTC-3' και reverse 5'-CGAGGACATCCAAGACAACC-3',
- **mGLUT 4** forward 5'-AACCAGCATCTTCGAGTCGG-3' και reverse 5'-TAAGAGCACCGAGACCAACG-3',
- **mGLUT 1** forward 5'-CTCACCACGCTTTGGTCTCT-3' και reverse 5'-CGCCTGCCAAAGCGATTAAC-3'
- **mGCK** forward 5' -CACGTATGGAACAGGGTGCT-3' και reverse 5'-TAGCCACGGAACCTTCCAAC-3'
- **mADIPOQ** forward: 5'-AAGGAGATCCAGGTCTTATTGG-3', και reverse: 5'-ACCTTCAGCCCCGGGTAC-3'.

2.5 Εκτίμηση της πρόκλησης οξειδωτικού stress μετά από έκθεση των πρώιμων λιποκυττάρων στην ένωση Cr(III)-cit.

Για την διερεύνηση της ενδεχόμενης παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) μετά από έκθεση των κυττάρων στην ένωση **Cr(III)-cit**, πρώιμα λιποκύτταρα επιστρώθηκαν σε αποστειρωμένες καλυπτρίδες σε πυκνότητα 70%. Τα κύτταρα επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό για 72 ώρες και τελική συγκέντρωση **Cr(III)-cit** 50 μ M. Ως θετικός μάρτυρας της δοκιμασίας χρησιμοποιήθηκε του H₂O₂ σε τελική συγκέντρωση 250 μ M και 45 λεπτά επώαση. Συνοπτικά, για την χρώση, πραγματοποιήθηκε 1x μια πλύση με Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) και ακολούθησε επώαση με την χρωστική 2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetate (H₂DCFDA) (Sigma, Steinheim, Germany) σε τελική συγκέντρωση 20 μ M. Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι παρουσία ROS η ένωση H₂DCFDA απο-εστεροποιείται στο εσωτερικό των κυττάρων μέσω οξείδωσης και μετατρέπεται σε 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) η οποία φθορίζει έντονα. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης με την χρωστική ακολουθεί πλύση με PBS και στη συνέχεια τα κύτταρα επώάζονται για 15 λεπτά με την χρωστική Hoechst (stock συγκέντρωση 1 mg/mL) για την χρώση και διάκριση των πυρήνων.

Η μονιμοποίηση των κυττάρων έγινε με 4% PFA για 20 λεπτά. Το διέγερση της H₂DCFDA αντιστοιχεί σε 488 nm και η απορρόφηση σε 530±20 nm. Η παρατήρηση των μικροκαλλιιεργειών έγινε με χρήση του μικροσκοπίου φθορισμού σε μεγέθυνση 10xAxioObserverZ1 (CarlZeiss, GmbH, Germany). Μικροφωτογραφίες των καλλιιεργειών λήφθηκαν με την κάμερα AxioCamHccamera.

2.6. Στατιστική ανάλυση και επεξεργασία δεδομένων.

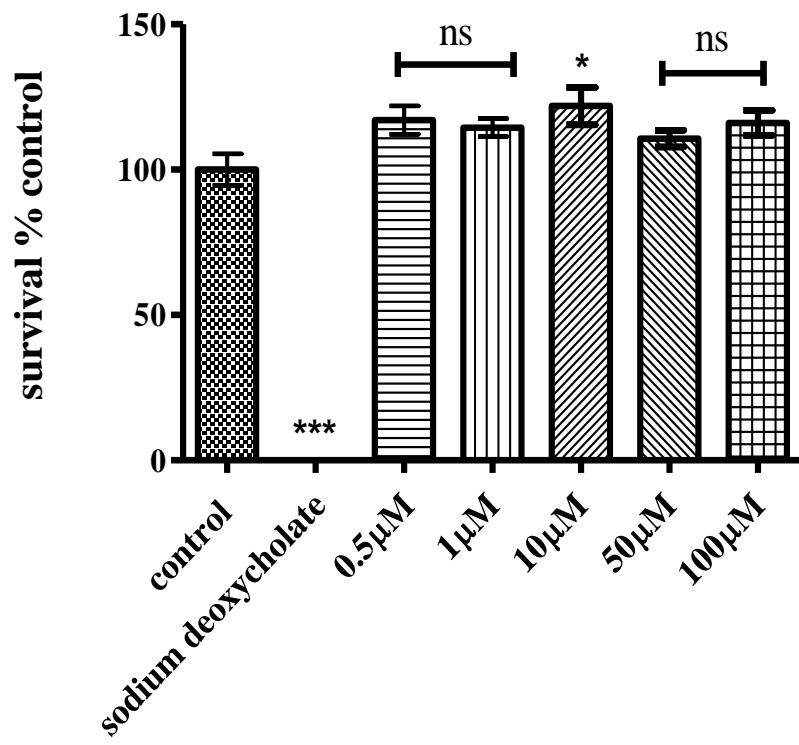
Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αποτελούν τον μέσο όρο σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Ο μέσος όρος σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε για κάθε ομάδα – συνθήκη. Οι απόλυτες τιμές των επιπέδων κυτταρικής επιβίωσης υπολογίστηκαν για κάθε συνθήκη και εκφράστηκαν ως εκατοστιαία μεταβολή σε σχέση με τον απλό μάρτυρα ενώ ακολούθησε ανάλυση ANOVA (analysis of variance) για όλα τα πιθανά ζεύγη και στατιστική μετα-ανάλυση (post hoc analyses) Tukey και Dunnet στην περίπτωση της RT-PCR. Οι βαθμοί της σημαντικότητας ορίστηκαν ως εξής: * $p < 0.05$ (σημαντικό), ** $p < 0.01$ (υψηλά σημαντικό) και *** $p < 0.001$ (εξαιρετικά σημαντικό) ή μη σημαντικό ($p > 0.05$).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

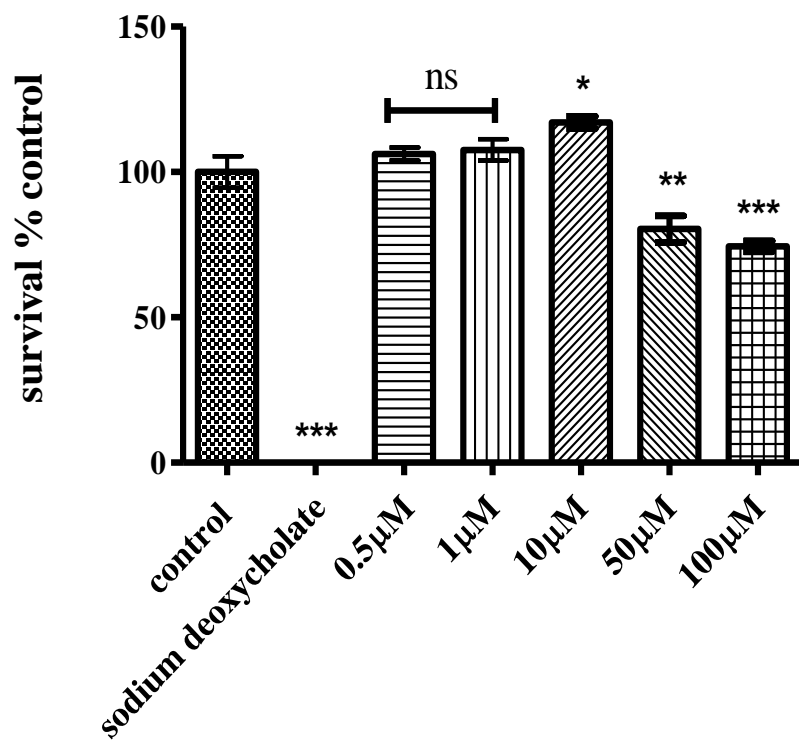
3.1 Αποτελέσματα ελέγχου (α)τοξικής δράσης των Zn(II)-cit, V(IV)-cit και Cr(III)-cit.

3.1.1 Μέτρηση της βιωσιμότητας των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με τις ενώσεις Zn(II)-cit, V(IV)-cit και Cr(III)-cit.

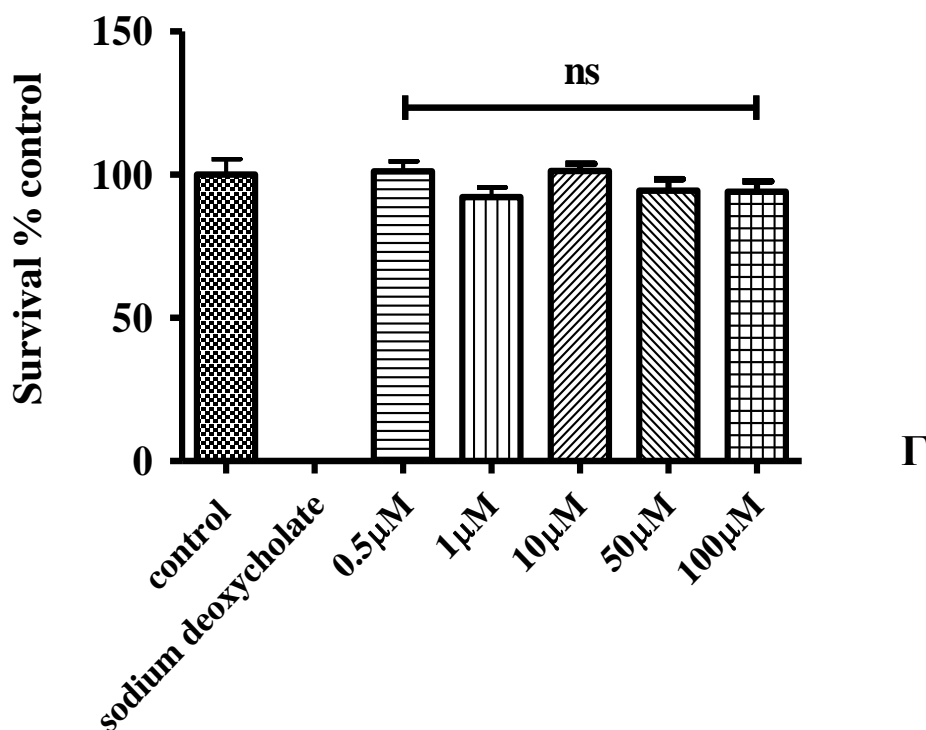
Αρχικά, εξετάστηκε η επίδραση των υπό μελέτη ενώσεων στα επίπεδα κυτταρικής επιβίωσης των πρώιμων λιποκυττάρων 3T3-L1 μετά από σύντομη έκθεση 24 ωρών. Για τον σκοπό αυτό, κύτταρα επιστρώθηκαν σε ειδική πλάκα 96-οπών (2500 κύτταρα/οπή) και επωαστήκαν παρουσία θρεπτικού υλικού. Όλες οι ενώσεις διαλύθηκαν σε θρεπτικό υλικό (10% FBS, 1% P/S) σε αρχική συγκέντρωση 500 μM . Οι τελικές συγκεντρώσεις που διερευνήθηκαν ήταν 0.5, 1, 10, 50 και 100 μM . Το δεοξυχολικό νάτριο (sodiumdeoxycholate) χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας της δοκιμασίας σε τελική αναλογία 1 mg/mL . Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.3.1A η ένωση **Zn(II)-cit** σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων που ελέχθησαν. Η ένωση **V(IV)-cit** είναι επίσης ατοξική σε εύρος συγκεντρώσεων 0.5-50 μM καθώς τα επίπεδα κυτταρικής επιβίωσης μειώνονται κατά ~20% μετά από έκθεση σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 50 μM (εικόνα 3.1.1 B) ($p < 0.001$). Όμοια, η ένωση **Cr(III)-cit** φαίνεται πως δεν έχει καμία επίδραση στην κυτταρική επιβίωση των πρώιμων λιποκυττάρων για το εύρος των συγκεντρώσεων και το χρονικό διάστημα στο οποίο εκτέθηκαν (εικόνα 3.1.1Γ).



A



B

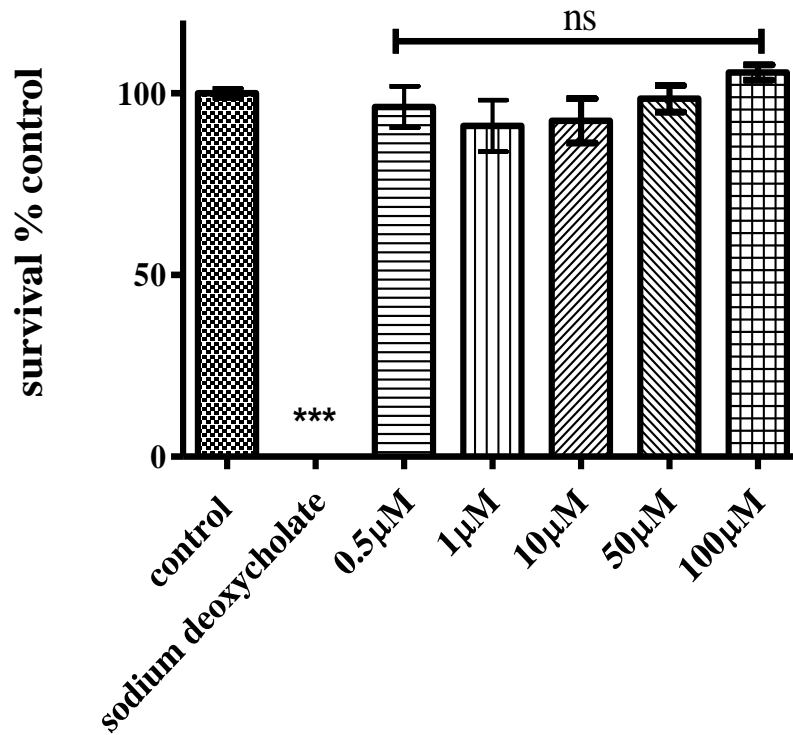


Εικόνα 3.1.1 Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με την ένωση Zn(II)-cit (A), V(IV)-cit (B), και Cr(III)-cit (Γ) σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

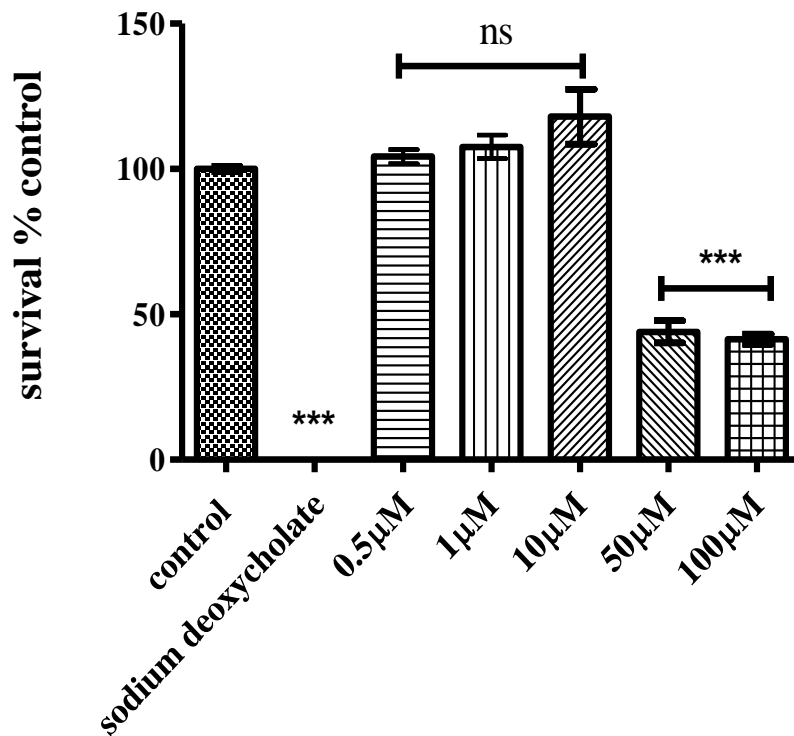
3.1.2 Μέτρηση της βιωσιμότητας των προ-λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με τις ενώσεις Zn(II)-cit, V(IV)-cit και Cr(III)-cit.

Ακολούθως, κρίθηκε απαραίτητη η αξιολόγηση της επίδρασης των υπό μελέτη ενώσεων στα επίπεδα κυτταρικής βιωσιμότητας για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (μακρά διέγερση 48 ωρών) καθώς κατά την διάρκεια της επαγωγής της διαφοροποίησης των προ-λιποκυττάρων, με τις ενώσεις αυτές σε ώριμα λιποκύτταρα, οι ινοβλάστες του λιπώδους ιστού εκτίθενται στις ενώσεις αυτές για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 24 ωρών. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η ένωση **Zn(II)-cit** είναι ατοξική ακόμα και μετά από μακρά έκθεση των κυττάρων σε αυτή (εικόνα 3.1.2A). Η ένωση **V(IV)-cit** είναι ατοξική σε εύρος συγκεντρώσεων 0.5-10 μM ενώ για

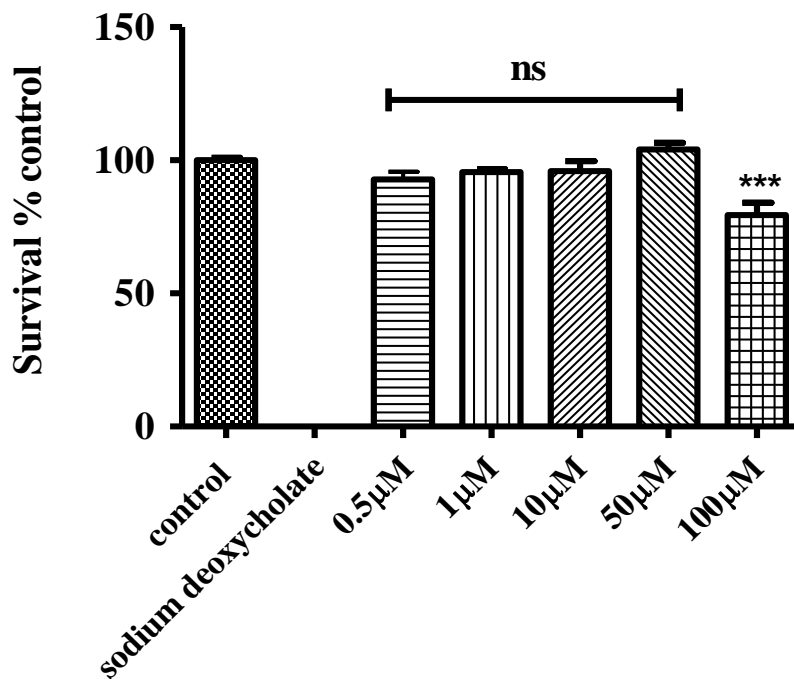
μεγαλύτερες συγκεντρώσεις η κυτταρική βιωσιμότητα μειώνεται σημαντικά έως και 60% (εικόνα 3.1.2B) ($p < 0.001$). Αντίστοιχα, η ένωση **Cr(III)-cit** είναι ατοξική για εύρος συγκεντρώσεων 0,5-50 μM ενώ η τα επίπεδα κυτταρικής επιβίωσης φαίνεται να μειώνονται κατά 20% σε συγκέντρωση 100 μM (εικόνα 3.1.2Γ) ($p < 0.001$).



A



B

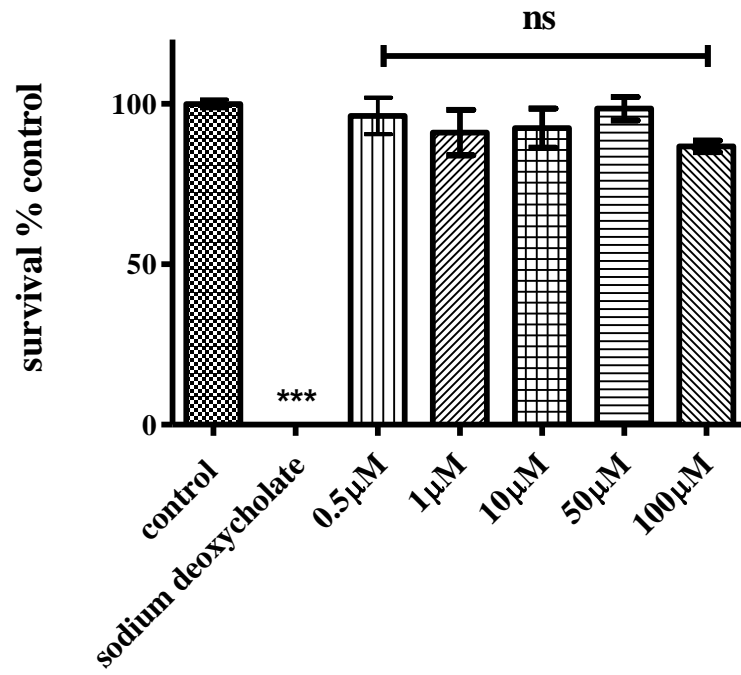


Γ

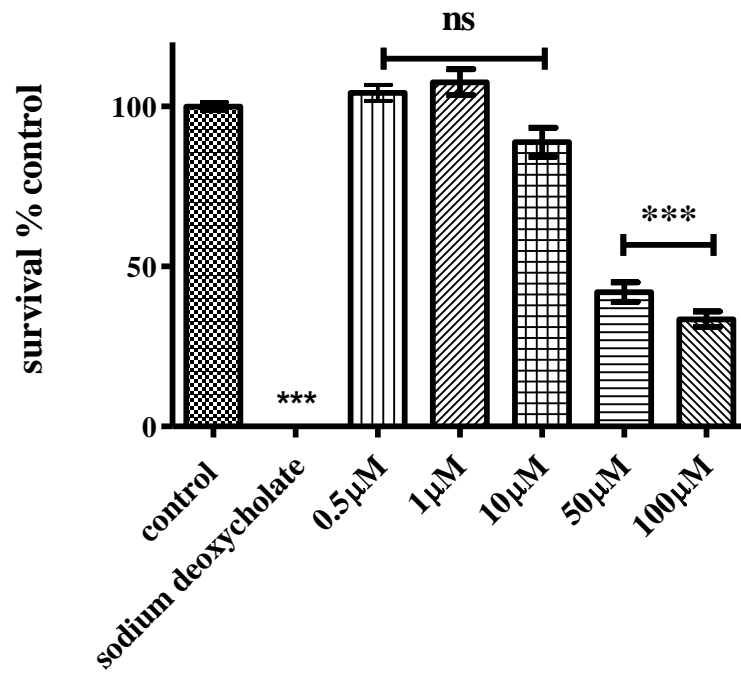
Εικόνα 3.1.2 Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των προ-λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με την ένωση Zn(II)-cit (A), V(IV)-cit (B), και Cr(III)-cit (Γ) σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

3.1.3 Μέτρηση της βιωσιμότητας των ώριμων λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με τις ενώσεις Zn(II)-cit, V(IV)-cit και Cr(III)-cit

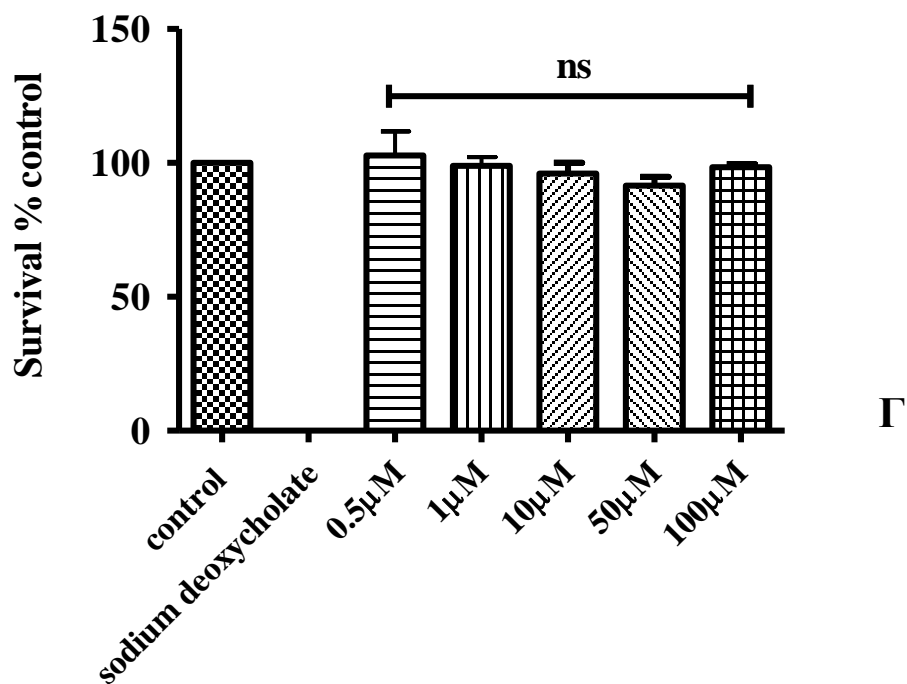
Επιπλέον, έγινε διερεύνηση της ενδεχόμενης τοξικής δράσης των τριών ενώσεων μετά από μακρά διέγερση των ώριμων λιποκυττάρων. Για τον σκοπό αυτό, ώριμα λιποκύτταρα τα οποία βρίσκονταν στην 8^η μέρα της διαφοροποίησης τους με κύριο διαφοροποιητικό παράγοντα την ινσουλίνη διεγέρθηκαν με τις υπό μελέτη ενώσεις για 48 ώρες σε εύρος συγκεντρώσεων 0,5-100 μM . Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ατοξική συμπεριφορά της ένωσης **Zn(II)-cit** σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων που εξετάστηκαν (εικόνα 3.1.3Α) ενώ παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν και για την ένωση **Cr(III)-cit** (εικόνα 3.1.3Γ). Η ένωση **V(IV)-cit** μειώνει την κυτταρική επιβίωση με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 10 μM . Πιο συγκεκριμένα, σε συγκέντρωση 50 μM τα επίπεδα της κυτταρικής επιβίωσης μειώνονται κατά 59% ενώ σε συγκέντρωση 100 μM παρατηρείται μείωση 67% σε σχέση με τον φυσιολογικό μάρτυρα ($p < 0.001$).



A



B



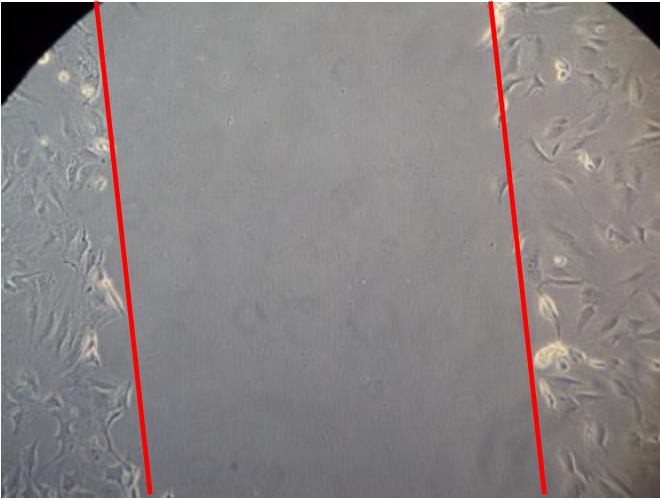
Εικόνα 3.1.3 Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των ώριμων λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με την ένωση Zn(II)-cit (A), V(IV)-cit (B), και Cr(III)-cit (Γ) σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

3.2 Αποτελέσματα εκτίμησης της επίδρασης των Zn(II)-cit, V(IV)-cit και Cr(III)-cit στην φυσιολογική, ενδογενή μεταναστευτικότητα των 3T3-L1 προ-λιποκυττάρων

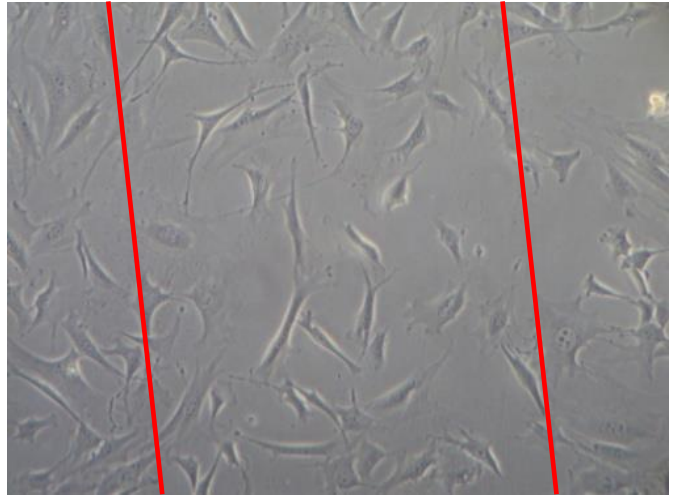
Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση των τριών ενώσεων στην φυσιολογική, ενδογενή μεταναστευτικότητα των 3T3-L1 προ-λιποκυττάρων πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη καλλιέργειας πυκνότητας 80-90 % σε ειδικά πιάτα καλλιέργειας 35 mm. Την χρονική στιγμή $t=0$ η καλλιέργεια διακόπτεται μηχανικά και τα κύτταρα διεγείρονται με τις ενώσεις Zn(II)-cit, V(IV)-cit και Cr(III)-cit σε τελική συγκέντρωση 20 μ M. Κύτταρα τα οποία επώαστηκαν μόνο παρουσία πλήρους θρεπτικού υλικού αποτελούν τον φυσιολογικό μάρτυρα. Μετά από 24 ώρες επώασης το κενό που δημιουργήθηκε μηχανικά τείνει να καλυφθεί στην περίπτωση όπου επικρατούν συνθήκες μάρτυρα. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.2 (10x 5x μεγέθυνση) οι ενώσεις

V(IV)-cit και **Cr(III)-cit** δεν επηρεάζουν την μεταναστευτικότητα των κυττάρων σε σχέση με τον φυσιολογικό μάρτυρα. Αντίθετα, η ένωση **Zn(II)-cit** εμφανίζει ήπια αναστολή του μεταναστευτικού δυναμικού των προ-λιποκυττάρων σε σχέση με τον μάρτυρα.

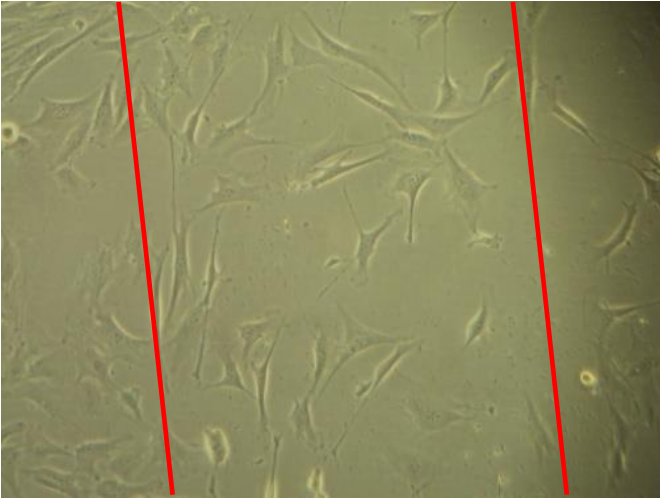
A



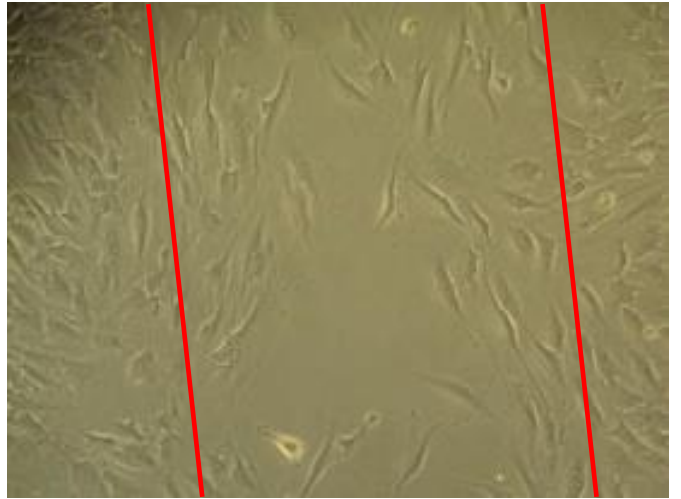
B



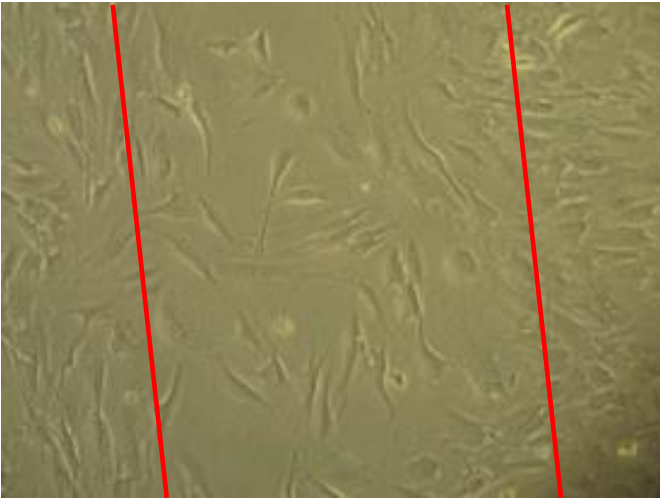
Г



Δ



E



Εικόνα 3.2 Μικροφωτογραφία οπτικού μικροσκοπίου δείγματος καλλιέργειας πρώιμων λιποκυττάρων 3T3-L1 μετά από μηχανική διακοπή της φυσιολογικής συνέχειας της καλλιέργειας με σκοπό την ποιοτική εκτίμηση της ενδεχόμενης αναστολής της φυσιολογικής μεταναστευτικότητας των κυττάρων Α) την χρονική στιγμή $t=0$, Β) 24 ώρες μετά σε συνθήκες μάρτυρα, Γ) 24 ώρες μετά από έκθεση στην ένωση Zn(II)-cit, Δ) 24 ώρες μετά από έκθεση στην ένωση V(IV)-cit, και Ε) 24 ώρες μετά από έκθεση στην ένωση Cr(III)-cit, σε τελική συγκέντρωση 20 μM (10x 5 \times μεγέθυνση).

3.3 Αποτελέσματα επαγωγής της κυτταρικής διαφοροποίησης των 3T3-L1 με χρήση των Zn(II)-cit, V(IV)-cit και Cr(III)-cit

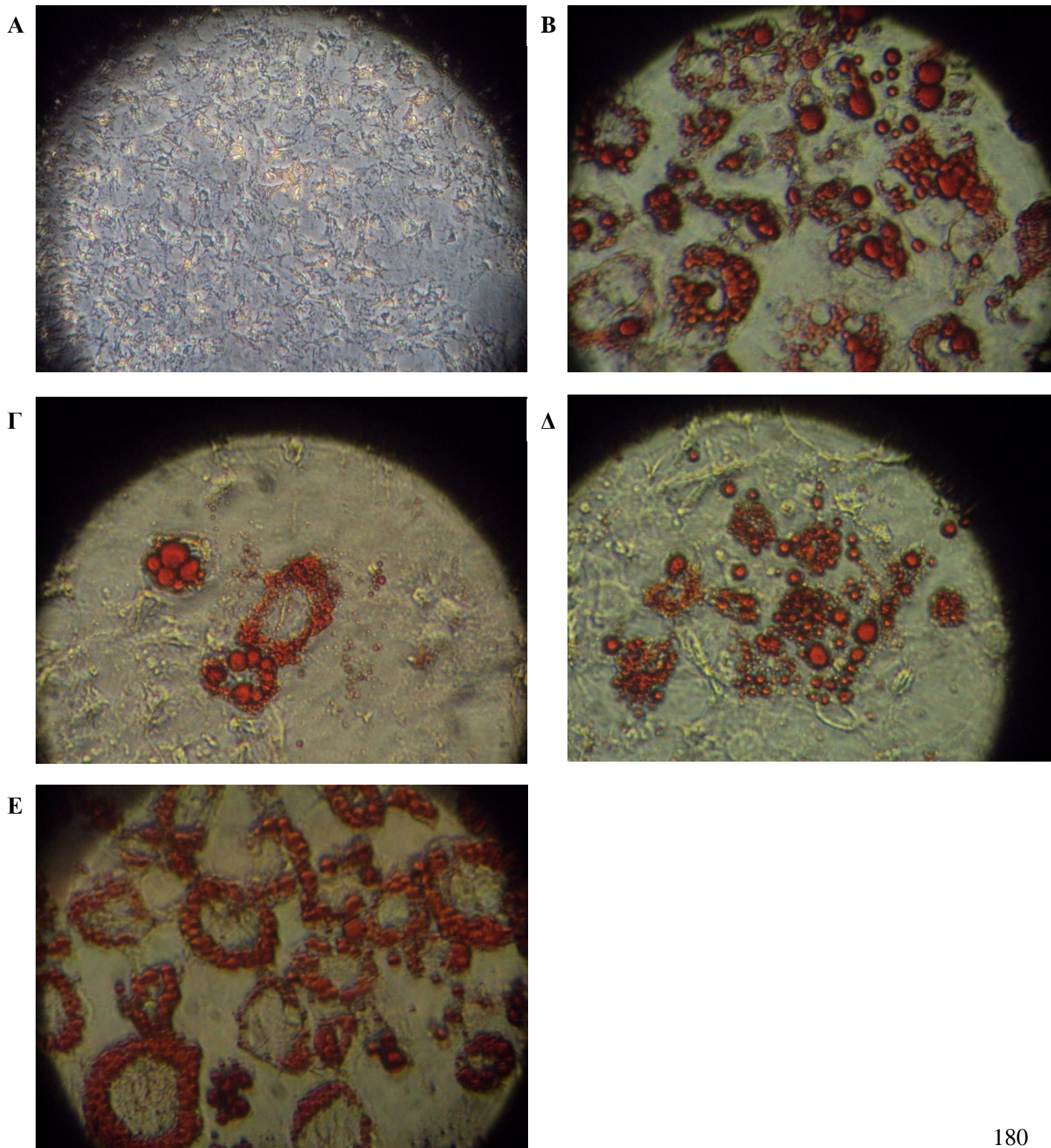
3.3.1 Χρώση των παραγόμενων λιπιδίων μετά από επίδραση με τις ενώσεις Zn(II) και V(IV) (oil red O staining)

Για την *in vitro* αξιολόγηση της ινσουλινομιμητικής δράσης των ενώσεων Zn(II) και V(IV) πρώιμα λιποκύτταρα διαφοροποιήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε παραπάνω αντικαθιστώντας την ινσουλίνη με τις υπό μελέτη ενώσεις ή παρέχοντας τα σε συνδυασμό με αυτή. Η χρώση των λιπιδίων πραγματοποιήθηκε κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης. Η επαγωγή της διαφοροποίησης με ινσουλίνη αποτέλεσε τον θετικό μάρτυρα (εικόνα 3.3.1B). Η διαφοροποίηση των κυττάρων έγινε σε συγκεντρώσεις 0.5 και 25 μM καθώς και σε συνδυασμό με την ινσουλίνη (10ng/mL) στην μέγιστη συγκέντρωση. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν δοσο-εξαρτώμενη δράση του ψευδαργύρου με το φαινόμενο να αυξάνει όσο αυξάνει και η συγκέντρωση ενώ επιπλέον, φαίνεται να δρα συνεργικά με την ινσουλίνη (εικόνα 3.3.1Γ, Δ & Ε). Αντίθετα, το βανάδιο προκαλεί την παραγωγή λιπιδίων σε συγκέντρωση 0.5 μM και όχι σε μεγαλύτερη συγκέντρωση ή σε συνδυασμό με την ινσουλίνη (εικόνα 3.3.1Ζ, Η & Θ). Τέλος ελέγχθηκε κατά πόσο το κιτρικό οξύ προκαλεί την παραγωγή λιπιδίων. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η παραγωγή των λιπιδίων οφείλεται στο μεταλλοϊόν και όχι στον υποκαταστάτη (εικόνα 3.3.1 Ι & Κ).

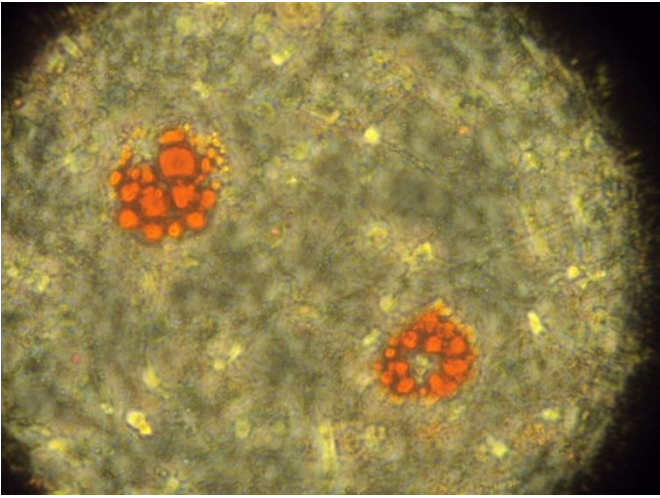
3.3.2 Χρώση των παραγόμενων λιπιδίων μετά από επίδραση με την ένωση Cr(III) (oil red O staining)

Όμοια, χρώση των παραγόμενων λιπιδίων πραγματοποιήθηκε και για την ένωση Cr(III)-cit. Η χρώση των παραγόμενων λιπιδίων πραγματοποιήθηκε την 9^η μέρα της διαφοροποίησης. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η ένωση Cr(III) επάγει την κυτταρική διαφοροποίηση και στις δύο

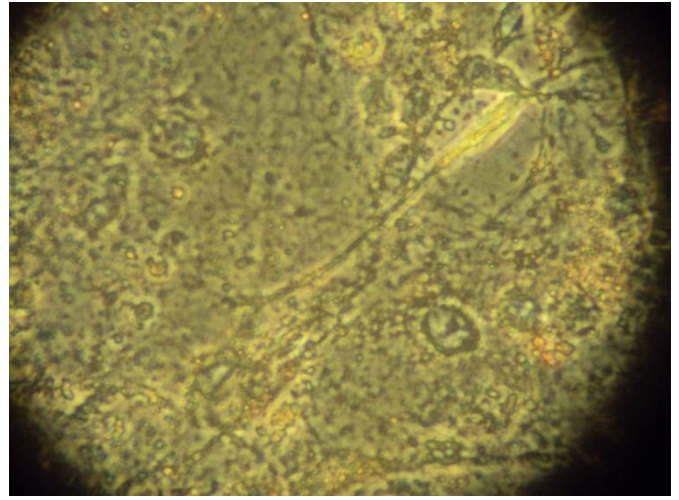
συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκε (0.5 και 10 μM) σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (κύτταρα διαφοροποιημένα με ινσουλίνη) ενώ αντίστοιχο ήταν το αποτέλεσμα όταν η ένωση χρησιμοποιήθηκε στις ίδιες συγκεντρώσεις σε συνδυασμό με την ινσουλίνη υποδεικνύοντας συνεργική ή/και ινσουλινο-ενισχυτική δράση (εικόνα 3.3.2).



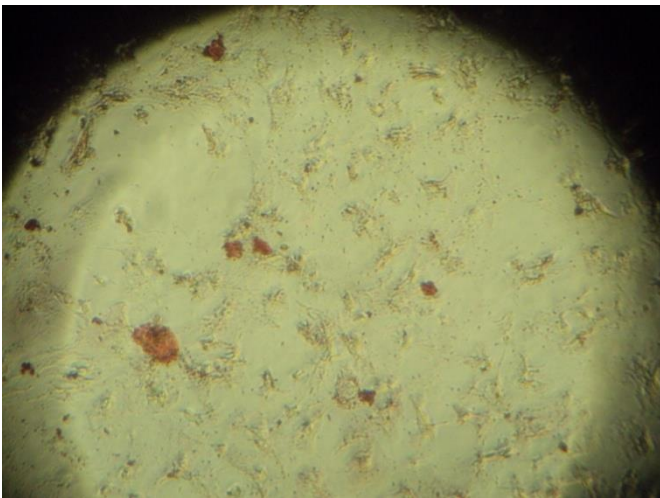
Z



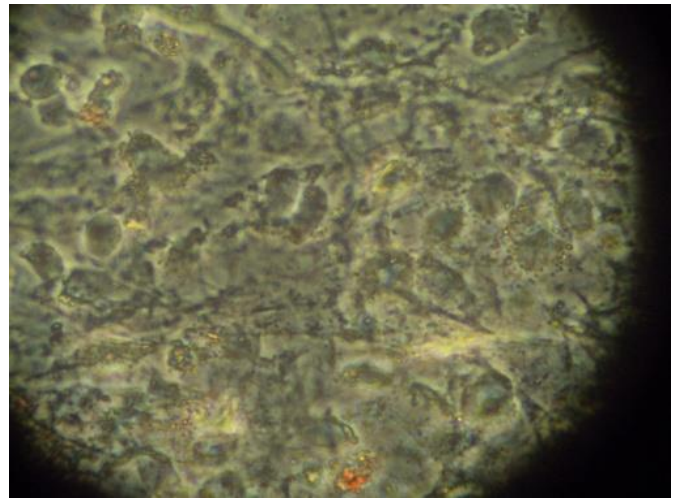
H



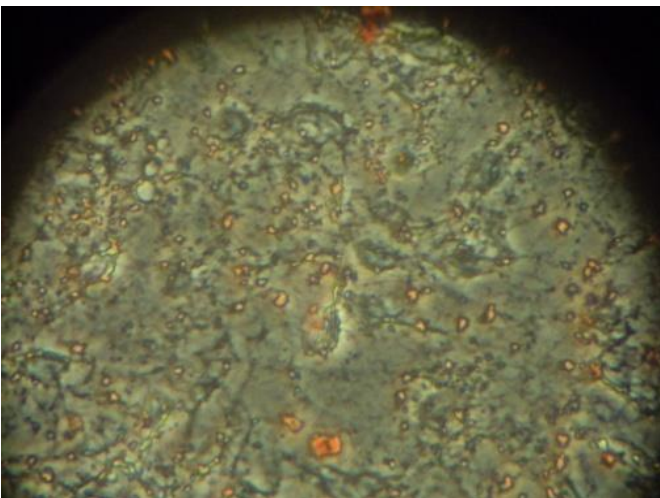
Θ



I

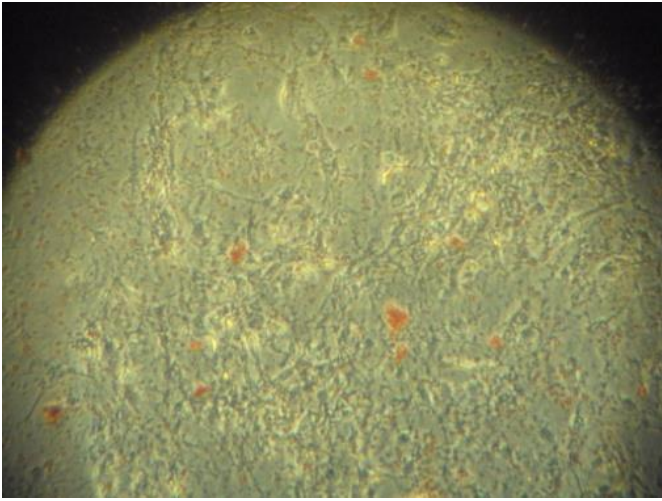


K

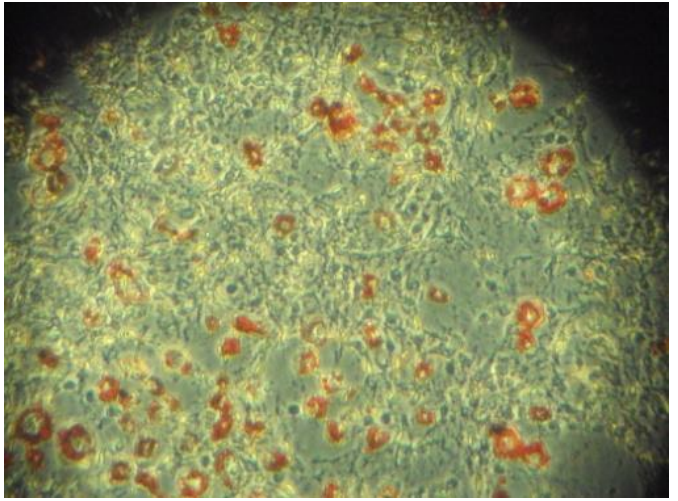


Εικόνα 3.3.1 Μικροφωτογραφίες οπτικού μικροσκοπίου δείγματος καλλιέργειας πρώιμων λιποκυττάρων 3T3-L1 κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης μετά από ειδική χρώση των σχηματιζόμενων λιπιδίων με oilredOstainingA) μη διαφοροποιημένα κύτταρα (προ-λιποκύτταρα), B) διαφοροποιημένα με ινσουλίνη (θετικός μάρτυρας) Γ) διαφοροποιημένα με την ένωση Zn(II)-cit σε συγκέντρωση 0.5 μ M, Δ) διαφοροποιημένα με την ένωση Zn(II)-cit σε συγκέντρωση 25 μ M, E) διαφοροποιημένα με την ένωση Zn(II)-cit σε συγκέντρωση 25 μ M και την ινσουλίνη (10ng/mL) , Z) διαφοροποιημένα με την ένωση V(IV)-cit σε συγκέντρωση 0.5 μ M, H) διαφοροποιημένα με την ένωση V(IV)-cit σε συγκέντρωση 25 μ M, Θ) διαφοροποιημένα με την ένωση V(IV)-cit σε συγκέντρωση 25 μ M και την ινσουλίνη (10ng/mL) I) διαφοροποιημένα με κιτρικό οξύ σε συγκέντρωση 0.5 μ M, και K) διαφοροποιημένα με κιτρικό οξύ σε συγκέντρωση 20 μ M(10x 4 \times μεγέθυνση).

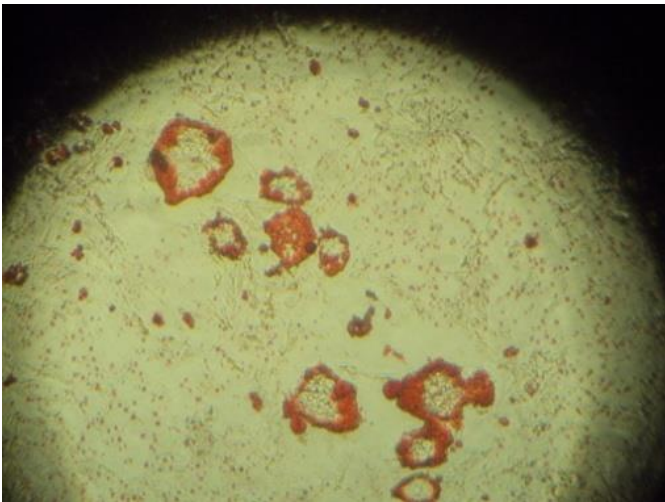
A



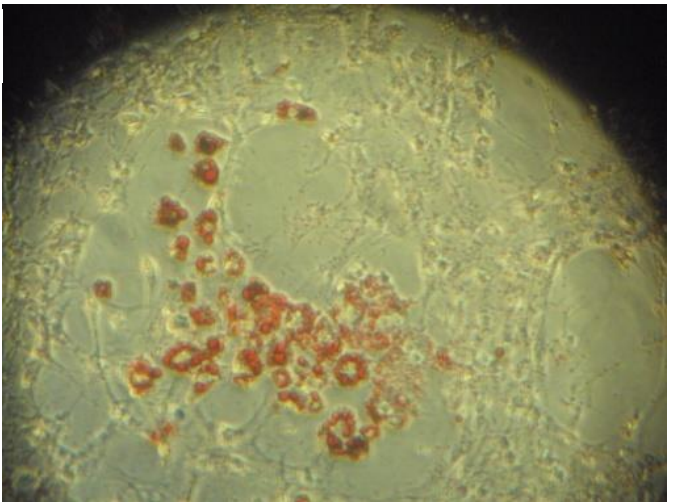
B



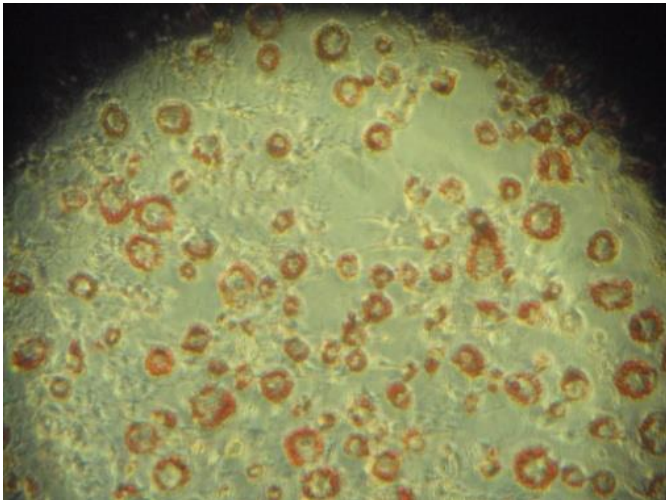
Г



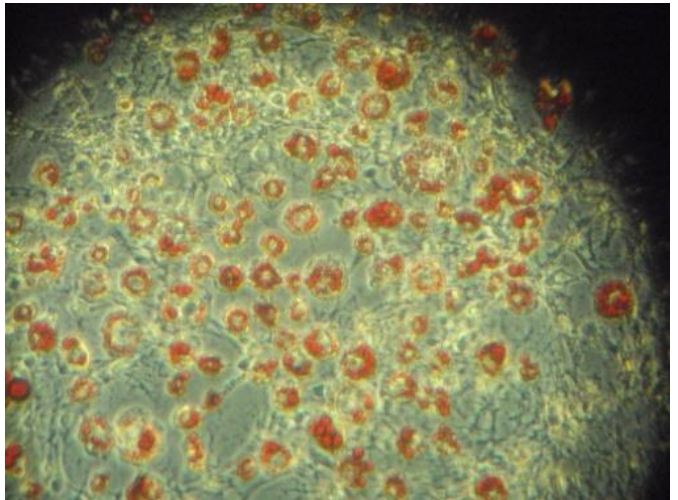
Δ



E



Z



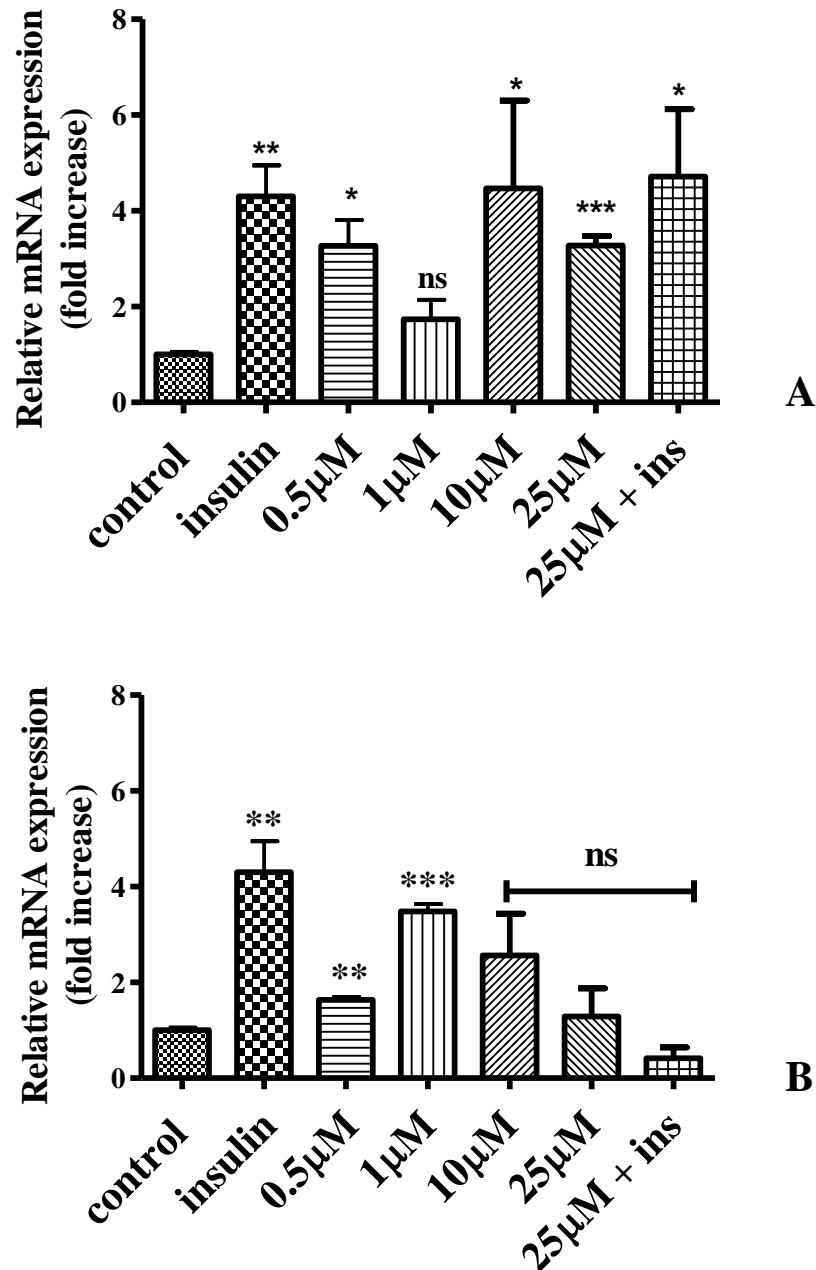
Εικόνα 3.3.2 Μικροφωτογραφίες οπτικού μικροσκοπίου δείγματος καλλιέργειας πρώιμων λιποκυττάρων 3T3-L1 κατά την 9^η μέρα της διαφοροποίησης μετά από ειδική χρώση των σχηματιζόμενων λιπιδίων με oil red O staining A) μη διαφοροποιημένα κύτταρα (προ-λιποκύτταρα), B) διαφοροποιημένα με ινσουλίνη (θετικός μάρτυρας) Γ) διαφοροποιημένα με την ένωση Cr(III)-cit σε συγκέντρωση 0.5 μM, Δ) διαφοροποιημένα με την ένωση Cr(III)-cit σε συγκέντρωση 10 μM, E) διαφοροποιημένα με την ένωση Cr(III)-cit σε συγκέντρωση 0.5 μM και την ινσουλίνη (10 ng/mL) και, Z) διαφοροποιημένα με την ένωση Cr(III)-cit σε συγκέντρωση 10 μM και την ινσουλίνη (10ng/mL) (10x 4x μεγέθυνση).

3.3.3. Ποσοτική εκτίμηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του mRNA στενά συνδεδεμένων μοριακών στόχων μετά από διαφοροποίηση με τις ενώσεις Zn(II)-cit και V(IV)-cit (RT-PCR)

3.3.3.1 Ποσοτική εκτίμηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του mRNA του μεταγραφικού παράγοντα PPAR-γ μετά από διαφοροποίηση με τις ενώσεις Zn(II) και V(IV) (RT-PCR)

Στη συνέχεια κρίθηκε απαραίτητο ο έλεγχος της επιτυχούς διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα μέσω εκτίμησης των σχετικών επιπέδων έκφρασης του γονιδίου PPAR-γ. Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης εκτιμώνται με την βοήθεια της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR, real time polymerase chain reaction). Η σχετική έκφραση υπολογίστηκε σε εύρος συγκεντρώσεων 0.5-25 μM ενώ η μέγιστη συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκε και σε συνδυασμό με την ινσουλίνη. Κύτταρα τα οποία διαφοροποιήθηκαν μόνο με ινσουλίνη αποτέλεσαν τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστιαία μεταβολή σε σχέση με μη διαφοροποιημένα κύτταρα. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα, η έκφραση του PPAR-γ επάγεται μετά από διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα με τρόπο που δεν εξαρτάται από την συγκέντρωση. Τα επίπεδα έκφρασης είναι αυξημένα σε σχέση με τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (από 1.7 έως 4.7) ωστόσο σε καμία συγκέντρωση δεν ξεπερνούν αυτά του θετικού μάρτυρα (4.3). Η συνδυαστική δράση του ψευδαργύρου με την ινσουλίνη υποδεικνύει μη ανταγωνιστική δράση καθώς τα επίπεδα έκφρασης στη συγκεκριμένη συνθήκη είναι ίδια με αυτά παρουσία μόνο της ένωσης στην αντίστοιχη συγκέντρωση ή του θετικού μάρτυρα (εικόνα 3.3.3.1A)

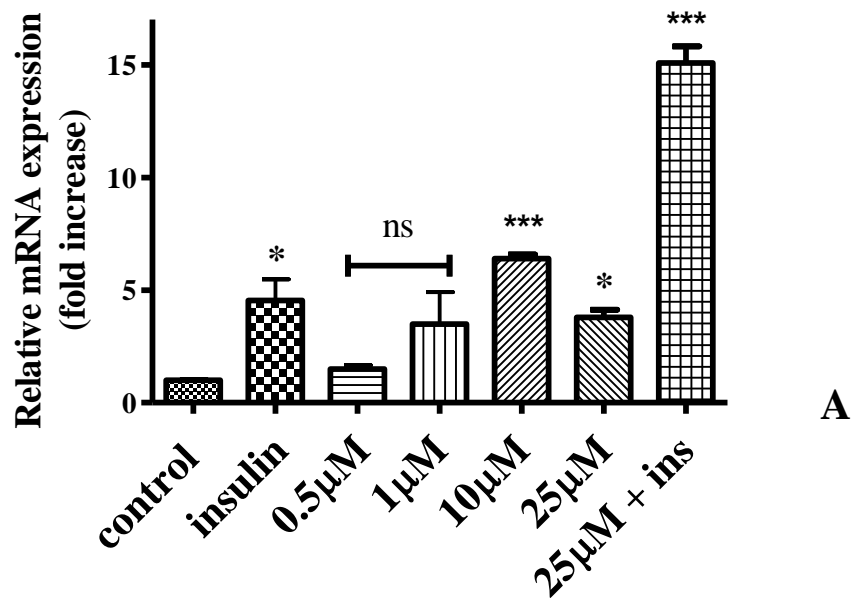
Αντίστοιχα, στην περίπτωση του βαναδίου, υπάρχει σημαντική αύξηση του PPAR- γ σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0.5-1 μ M, 1.6 και 3.4 αντίστοιχα) ωστόσο σε συγκεντρώσεις υψηλότερες των 10 μ M η έκφραση του PPAR- γ μειώνεται σημαντικά όσο αυξάνει η συγκέντρωση. Η συνδυαστική δράση του βαναδίου με την ινσουλίνη υποδεικνύει ανασταλτική/ανταγωνιστική δράση.

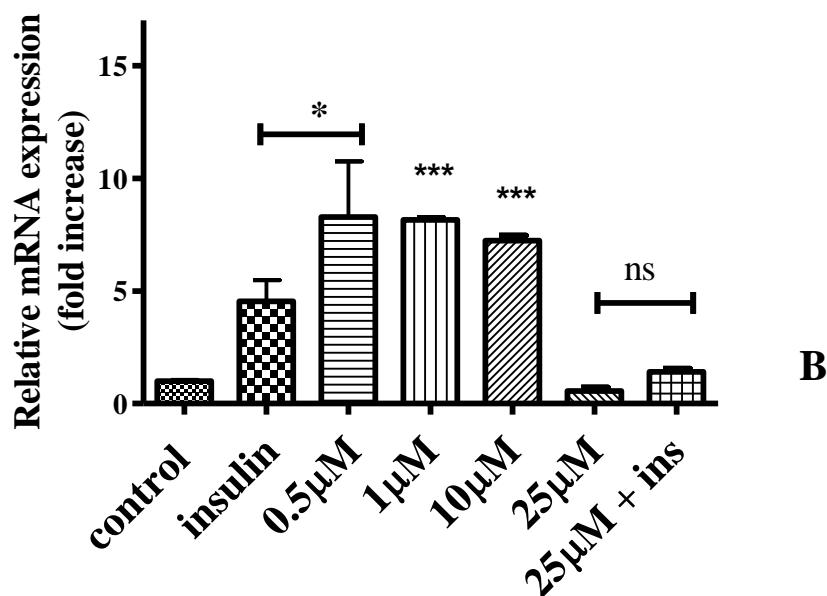


Εικόνα 3.3.3.1 Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την πολλαπλάσια έκφραση σε επίπεδο mRNA του γονιδίου PPAR- γ κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης με την ενωση Zn(II)-cit (A) και V(IV)-cit (B) σε συγκεντρώσεις 0.5-25 μ M ή και με ινσουλίνη σε αναλογία 10 ng/ml. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

3.3.3.2 Ποσοτική εκτίμηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του mRNA του ιστο-ειδικού γλυκοζομεταφορέα GLUT 4 μετά από διαφοροποίηση με τις ενώσεις Zn(II) και V(IV) (RT-PCR)

Ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε και για την εκτίμηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του ιστο-ειδικού, για τον λιπώδη ιστό, γλυκοζομεταφορέα GLUT 4. Η έκφραση του GLUT 4 στην περίπτωση του ψευδαργύρου φαίνεται να αυξάνεται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του 0,5 μM σε σχέση με τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα. Επιπλέον, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν συνεργική δράση της ινσουλίνης με την συγκεκριμένη ένωση καθώς τα επίπεδα έκφρασης αντιστοιχούν σε ~15 φορές υψηλότερα σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (εικόνα 3.3.3.2A). Αντίστοιχα, στην περίπτωση του βαναδίου, υπάρχει σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης του GLUT 4 σε συγκεντρώσεις έως και 10 μM με το ποσοστό έκφρασης να είναι έως και διπλάσιο αυτό του θετικού μάρτυρα. Σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 10 μM καθώς και σε συνδυαστική χορήγηση με την ινσουλίνη παρατηρείται εξαιρετικά χαμηλή έκφραση (ίδια με αυτή στην περίπτωση των μη διαφοροποιημένων κυττάρων) (εικόνα 3.3.3.2).

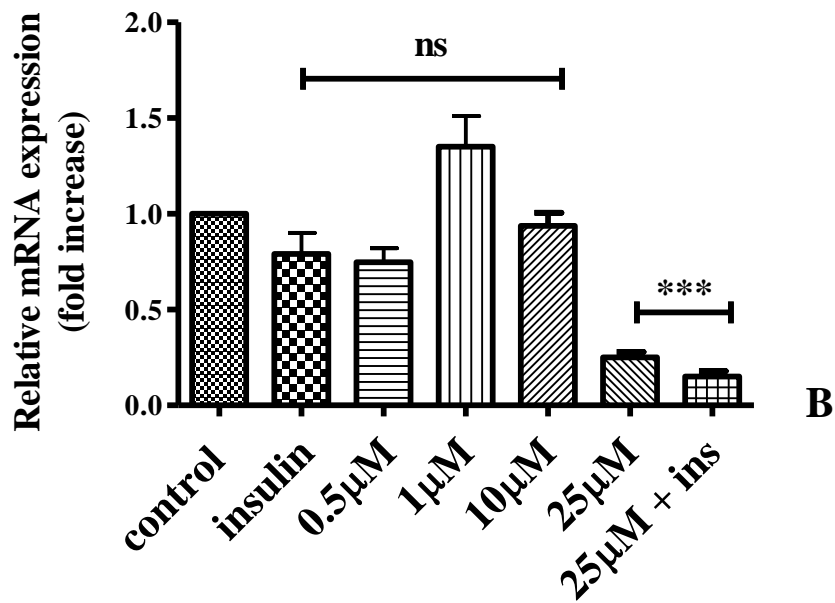
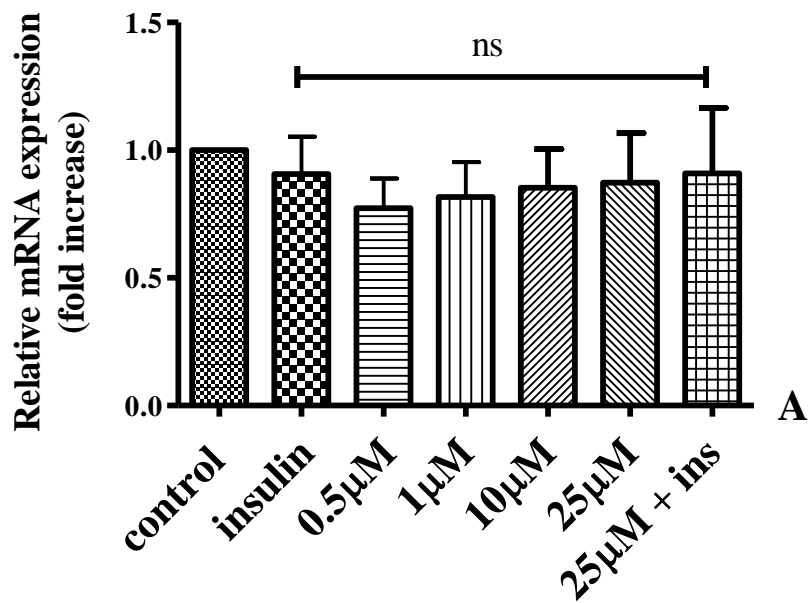




Εικόνα 3.3.3.2 Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την πολλαπλάσια έκφραση σε επίπεδο mRNA του γονιδίου GLUT 4 κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης με την ένωση Zn(II)-cit (A) και V(IV)-cit (B) σε συγκεντρώσεις 0.5-25 μM ή και με ισολίνη σε αναλογία 10 ng/mL. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

3.3.3.3 Ποσοτική εκτίμηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του mRNA του μη ειδικού γλυκοζομεταφορέα GLUT 1 μετά από διαφοροποίηση με τις ενώσεις Zn(II)-cit και V(IV)-cit (RT-PCR)

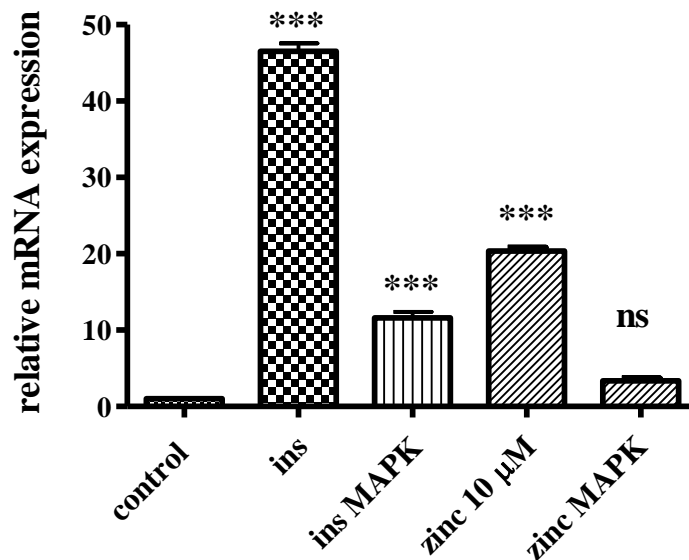
Κατά αντιστοιχία με τα προηγούμενα, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της επίδρασης των ενώσεων Zn(II)-cit και V(IV)-cit στην έκφραση του μη ειδικού γλυκοζομεταφορέα GLUT 1. Όπως είναι αναμενόμενο, η έκφραση του γονιδίου δεν εξαρτάται από το αναπτυξιακό στάδιο του κυττάρου (πρώιμα λιποκύτταρα/ώριμα) καθώς η έκφραση του γονιδίου είναι ίδια στην περίπτωση των μη διαφοροποιημένων κυττάρων, αλλά και του θετικού μάρτυρα. Παρόμοια αποτελέσματα λαμβάνονται και για όλες τις συνθήκες που εξετάστηκαν για κάθε υπό μελέτη ένωση (εικόνα 3.3.3.3).



Εικόνα 3.3.3.3 Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την πολλαπλάσια έκφραση σε επίπεδο mRNA του γονιδίου GLUT 1 κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης με την ένωση Zn(II)-cit (A) και V(IV)-cit (B) σε συγκεντρώσεις 0.5-25 µM ή και με ισολίνη σε αναλογία 10 ng/mL. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

3.3.3.4 Ποσοτική εκτίμηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του mRNA του γλυκοζομεταφορέα GLUT 4 μετά από διαφοροποίηση με την ένωση Zn(II)-cit παρουσία του αναστολέα της MAPK (RT-PCR)

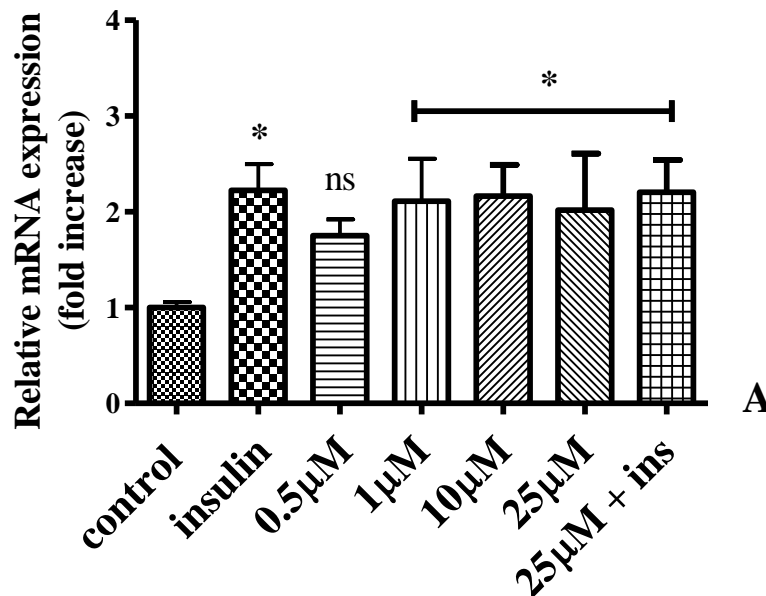
Για τον έλεγχο της επίδρασης του Zn(II)-cit στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης στα προ-λιποκύτταρα κατά την διάρκεια της κυτταρικής ωρίμανσης, πραγματοποιήθηκε αναστολή της MAPK με 100 μM του αναστολέα πριν την χορήγηση της ινσουλίνης ή του Zn(II)-cit. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η έκφραση του GLUT 4 είναι σημαντικά μειωμένη σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα, καθώς και με τα επίπεδα έκφρασης του GLUT 4 παρουσία μόνο Zn(II)-cit σε συγκέντρωση 10 μM υποδεικνύοντας ότι η διαφοροποίηση των λιποκυττάρων λαμβάνει χώρα μέσω της MAPK και ότι ο ψευδάργυρος δρα μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού της συγκεκριμένης πρωτεΐνης.

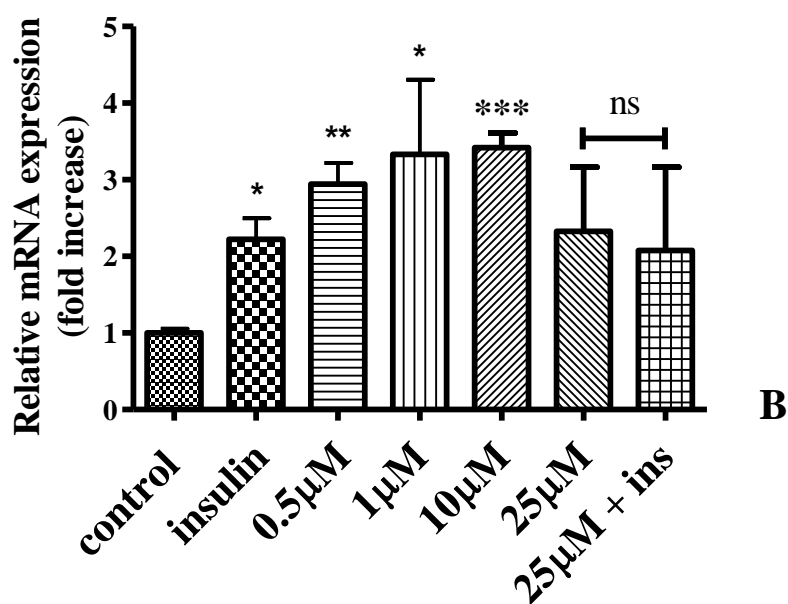


Εικόνα 3.3.3.4 Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την πολλαπλάσια έκφραση σε επίπεδο mRNA του γονιδίου GLUT4 κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης με την ένωση Zn(II)-cit σε συγκέντρωση 10 μM παρουσία του αναστολέα της MAPK. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

3.3.3.5 Ποσοτική εκτίμηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του mRNA του γονιδίου της γλυκοκινάσης (GCK) μετά από διαφοροποίηση με τις ενώσεις Zn(II)-cit και V(IV)-cit (RT-PCR)

Στα ίδια πλαίσια, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του γονιδίου της γλυκοκινάσης η οποία αποτελεί δείκτη μεταβολικώς ενεργών κυττάρων τα οποία είναι σε θέση να μεταβολίζουν την γλυκόζη. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν σαφή διαφορά μεταξύ των πρώιμων λιποκυττάρων και των ώριμων καθώς ο θετικός μάρτυρας παρουσιάζει αύξηση 2,2 φορές σε σχέση με τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα. Στην περίπτωση της ένωσης **Zn(II)-cit** παρατηρείται αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της γλυκοκινάσης ωστόσο με τρόπο που δεν εξαρτάται από την συγκέντρωση. Τα επίπεδα έκφρασης δεν ξεπερνούν σε καμία συνθήκη αυτά του θετικού μάρτυρα (εικόνα 3.3.3.5A). Αντίθετα, στην περίπτωση της ένωσης **V(IV)-cit** φαίνεται πως το γονίδιο της γλυκοκινάσης επάγεται με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Μάλιστα σε συγκέντρωση 10 μM η αύξηση είναι μεγαλύτερη και από τον θετικό μάρτυρα (~3.5) σε σχέση με τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τα επίπεδα φαίνεται να μειώνονται και να ισοδυναμούν με αυτά του θετικού μάρτυρα (εικόνα 3.3.3.5B).



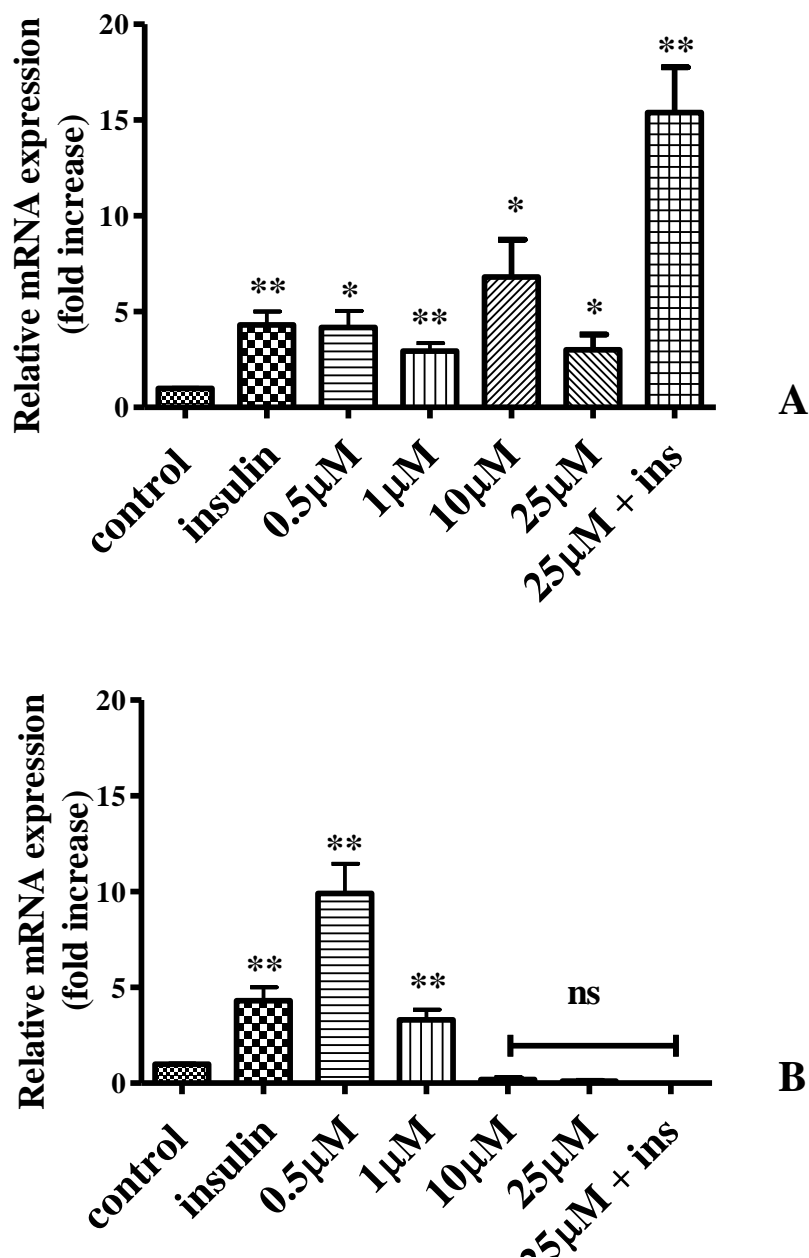


Εικόνα 3.3.3.5 Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την πολλαπλάσια έκφραση σε επίπεδο mRNA του γονιδίου GCK κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης με την ένωση Zn(II)-cit (A) και V(IV)-cit (B) σε συγκεντρώσεις 0.5-25 μM ή/και με ινσουλίνη σε αναλογία 10 ng/mL. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

3.3.3.6 Ποσοτική εκτίμηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του mRNA του γονιδίου της αδιπονεκτίνης (ADIPOQ) μετά από διαφοροποίηση με τις ενώσεις Zn(II)-cit και V(IV)-cit (RT-PCR)

Τέλος, διερευνήθηκε η επίδραση των ενώσεων Zn(II)-cit και V(IV)-cit στην σχετική έκφραση του γονιδίου της αδιπονεκτίνης η οποία είναι κυτοκίνη και αποτελεί ιστο-ειδικό δείκτη των ώριμων λιποκυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, η ένωση Zn(II)-cit επάγει την έκφραση του γονιδίου σε όλες τις συνθήκες που εξετάστηκαν με τρόπο που δεν εξαρτάται από την συγκέντρωση και μάλιστα σε επίπεδα τα οποία δεν ξεπερνούν αυτά του θετικού μάρτυρα. Η συνδυαστική δράση της συγκεκριμένης ένωσης με την ινσουλίνη υποδεικνύει συνεργική/προσθετική δράση καθώς τα επίπεδα έκφρασης είναι ιδιαίτερα υψηλά σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (~17 φορές)

(εικόνα 3.3.3.6A). Στην περίπτωση της ένωσης **V(IV)-cit** η έκφραση του γονιδίου αυξάνεται μόνο σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0.5 και 1 μM) ενώ όσο αυξάνει η συγκέντρωση τα επίπεδα μειώνονται σημαντικά (~ 1) όσο δηλαδή και του απλού μάρτυρα (μη διαφοροποιημένα κύτταρα) (εικόνα 3.3.3.6B).

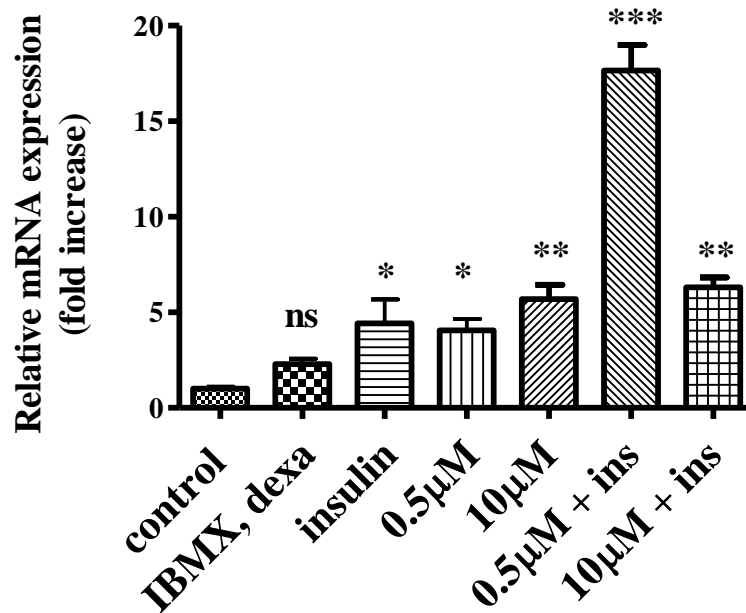


Εικόνα 3.3.3.6 Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την πολλαπλάσια έκφραση σε επίπεδο mRNA του γονιδίου **ADIPOQ** κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης των πρόωμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης με την ένωση **Zn(II)-cit** (A) και **V(IV)-cit** (B) σε συγκεντρώσεις 0.5-25 μM ή και με ισοβλίνη σε αναλογία 10 ng/mL. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

3.3.4. Ποσοτική εκτίμηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του mRNA στενά συνδεδεμένων μοριακών στόχων μετά από διαφοροποίηση με την ένωση Cr(III)-cit (RT-PCR)

3.3.4.1 Ποσοτική εκτίμηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του mRNA του μεταγραφικού παράγοντα PPAR- γ μετά από διαφοροποίηση με την ένωση Cr(III) (RT-PCR)

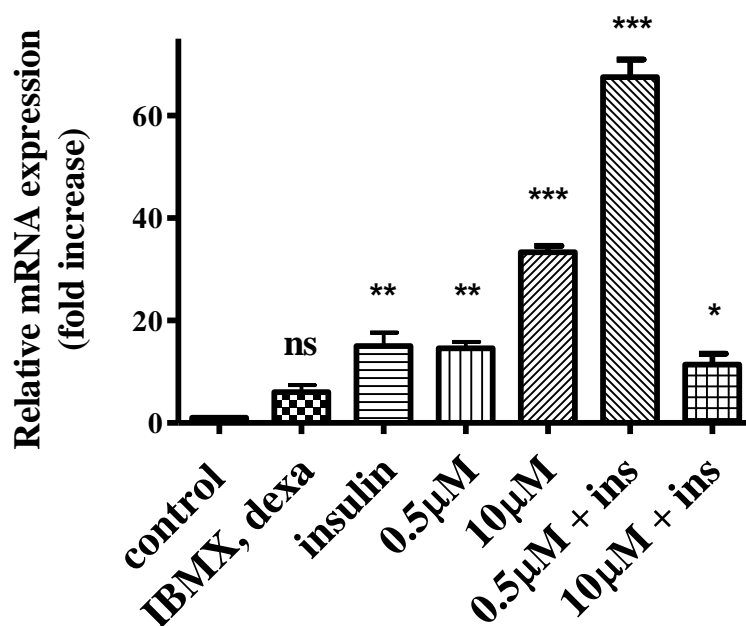
Όπως και στην περίπτωση των ενώσεων Zn(II)-cit και V(IV)-cit, των σχετικών επιπέδων έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα PPAR- γ . Ειδικά για την ένωση Cr(III)-cit τα χρονικά διαστήματα επώασης των κυττάρων κατά την επαγωγή της διαφοροποίησης επεκτάθηκαν στις 72 ώρες (διαφοροποίηση-διατήρηση) καθώς λόγω κινητικής αδράνειας του συγκεκριμένου μεταλλοϊόντος στις 48 ώρες δεν υπήρξε σημαντικό αποτέλεσμα. Στο πλαίσιο αυτό λοιπόν, η εκχύλιση του ολικού mRNA πραγματοποιήθηκε κατά την 9^η μέρα της διαφοροποίησης. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η έκφραση του PPAR- γ αυξήθηκε σημαντικά σε όλες τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται ήπια δόσο-εξερτώμενη σχέση σε συγκεντρώσεις 0.5 και 10 μ M καθώς η σχετική έκφραση είναι 4 και 5.7 αντίστοιχα όταν η έκφραση της ινσουλίνης (θετικός μάρτυρας) είναι 4. Επιπλέον, όταν τα κύτταρα διαφοροποιήθηκαν παρουσία της ένωσης σε συνδυασμό με την ινσουλίνη, η σχετική έκφραση του mRNA ήταν ιδιαίτερα αυξημένη στην περίπτωση των 0.5 μ M (17.6 φορές) και 6.3 φορές σε συγκέντρωση 10 μ M του Cr(III)-cit (εικόνα 3.3.4.1).



Εικόνα 3.3.4.1 Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την πολλαπλάσια έκφραση σε επίπεδο mRNA του γονιδίου PPAR-γ κατά την 9^η μέρα της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης με την ένωση Cr(III)-cit σε συγκεντρώσεις 0.5-10 μM ή/και με ισολίνη σε αναλογία 10 ng/ml. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

3.3.4.2 Ποσοτική εκτίμηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του mRNA του ιστο-ειδικού για τον λιπώδη ιστό γλυκοζομεταφορέα GLUT 4 μετά από διαφοροποίηση με την ένωση Cr(III) (RT-PCR)

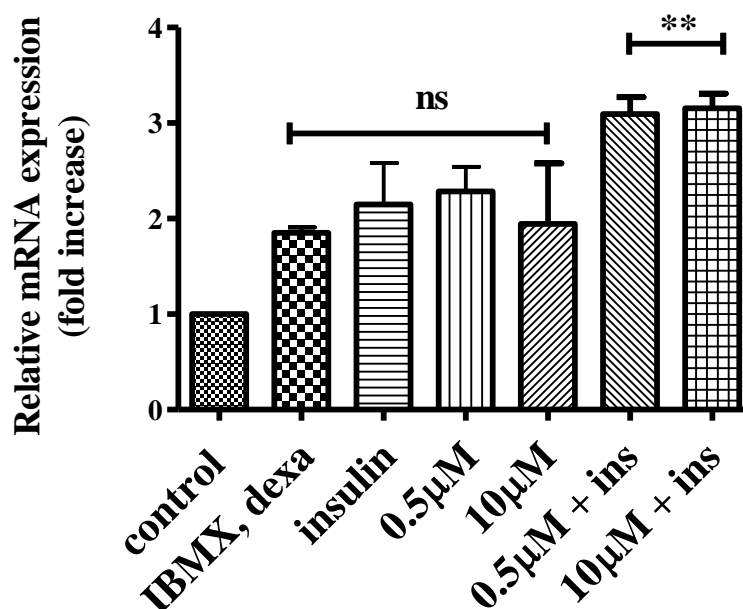
Στο ίδιο πλαίσιο, αξιολογήθηκε η σχετική έκφραση του γονιδίου GLUT 4 κατά την 9^η μέρα της διαφοροποίησης. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν παρόμοιο προφίλ έκφρασης με αυτό του PPAR- γ όταν τα κύτταρα διαφοροποιούνται με την ένωση **Cr(III)-cit**. Ειδικότερα, η έκφραση του mRNA ήταν 14.5 και 33.4 φορές υψηλότερη όταν τα κύτταρα διαφοροποιήθηκαν με 0.5 και 10 μ M του **Cr(III)-cit** αντίστοιχα. Η σχετική έκφραση του GLUT 4 του θετικού μάρτυρα ήταν 15 φορές υψηλότερη σε σχέση με τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα. Όταν το **Cr(III)-cit** χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με την ινσουλίνη η έκφραση του mRNA ήταν 67.5 και 11.4 φορές υψηλότερη σε συγκέντρωση 0.5 και 10 μ M του **Cr(III)-cit** αντίστοιχα (εικόνα 3.3.4.2).



Εικόνα 3.3.4.2 Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την πολλαπλάσια έκφραση σε επίπεδο mRNA του γονιδίου GLUT 4 κατά την 9^η μέρα της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης με την ένωση Cr(III)-cit σε συγκεντρώσεις 0.5-10 μ M ή και με ινσουλίνη σε αναλογία 10 ng/mL. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

3.3.4.3 Ποσοτική εκτίμηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του mRNA του γονιδίου της γλυκοκινάσης GCK μετά από διαφοροποίηση με την ένωση Cr(III) (RT-PCR)

Επιπλέον, εξετάστηκε η έκφραση των σχετικών επιπέδων του γονιδίου της γλυκοκινάσης μετά από διαφοροποίηση των κυττάρων παρουσία του Cr(III)-cit κατά την 9^η μέρα της διαφοροποίησης. Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης ήταν τα ίδια με αυτά του θετικού μάρτυρα όταν τα κύτταρα διαφοροποιήθηκαν με 0.5 και 10 μM της ένωσης αντίστοιχα (~2.2) και σημαντικά αυξημένα σε σχέση με τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα. Υψηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται όταν τα κύτταρα διαφοροποιούνται με συνδυασμό ινσουλίνης και Cr(III)-cit σε συγκέντρωση 0.5 ή 10 μM (3 και 3.1 αντίστοιχα) (εικόνα 3.3.4.3).

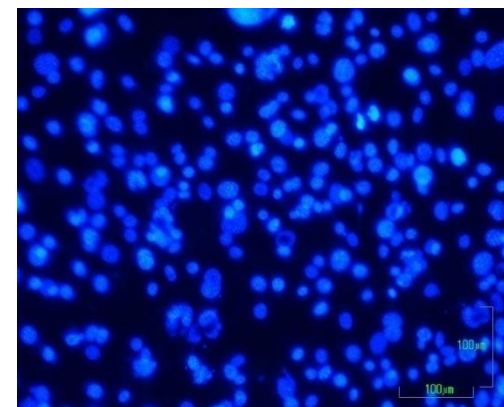
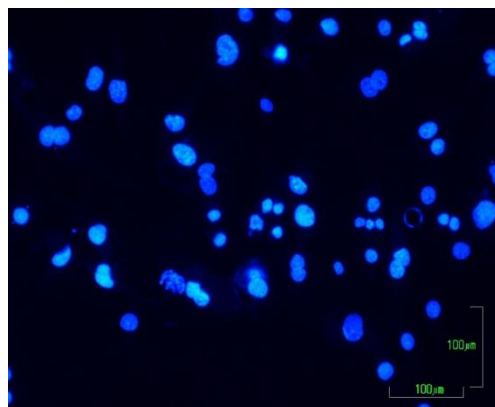
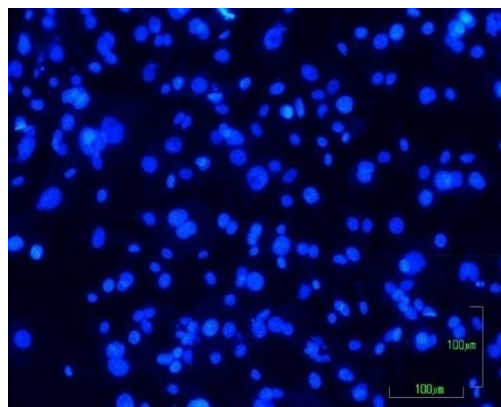


Εικόνα 3.3.4.1 Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την πολλαπλάσια έκφραση σε επίπεδο mRNA του γονιδίου GCK κατά την 9^η μέρα της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης με την ένωση Cr(III)-cit σε συγκεντρώσεις 0.5-10 μM ή και με ινσουλίνη σε αναλογία 10 ng/mL. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

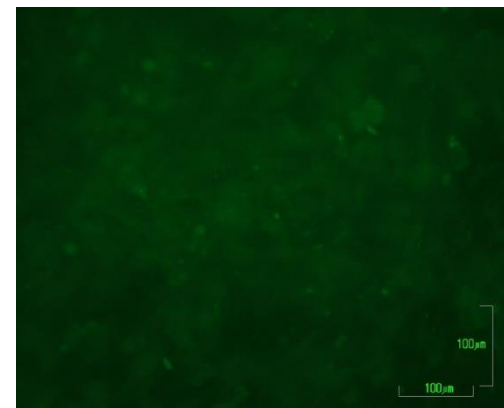
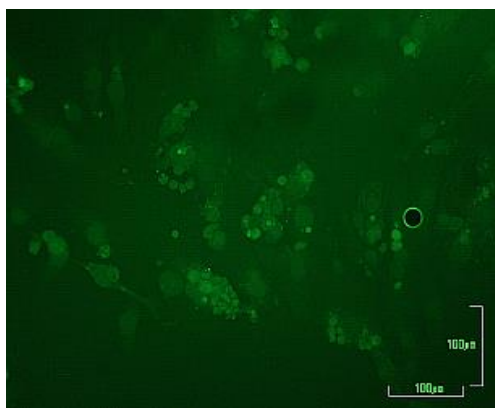
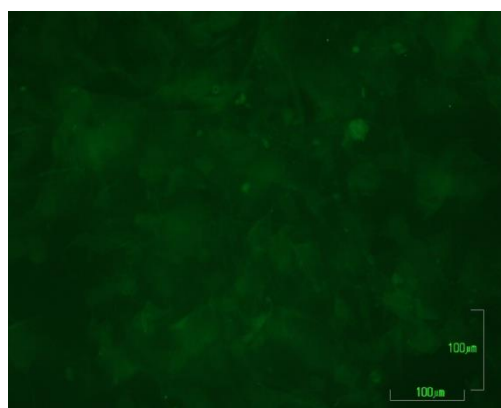
3.4 Εκτίμηση της πρόκλησης οξειδωτικού stress από έκθεση των πρώιμων λιποκυττάρων στην ένωση Cr(III)-cit

Για την διερεύνηση της ενδεχόμενης πρόκλησης οξειδωτικού stress μετά από έκθεση των πρώιμων λιποκυττάρων στην ένωση **Cr(III)-cit**, κύτταρα επώαστηκαν για 72 ώρες (όσες και οι ώρες που εκτέθηκαν τα κύτταρα για την επαγωγή της διαφοροποίησης) σε τελική συγκέντρωση 50 μM της ένωσης. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.4, τα επίπεδα των ROS μετά από ειδική χρώση είναι όμοια με αυτά του απλού μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα) υποδεικνύοντας ότι η ένωση **Cr(III)-cit** δεν συμμετέχει στην πρόκληση οξειδωτικού stress. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε του H_2O_2 όπου παρατηρείται σαφής αύξηση των επιπέδων ROS (εικόνα 3.4B).

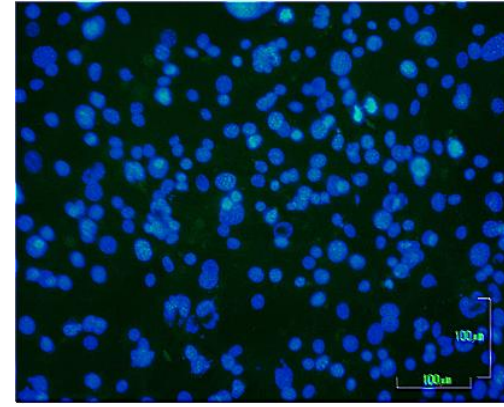
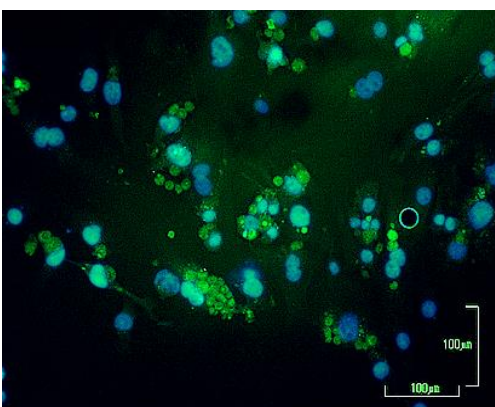
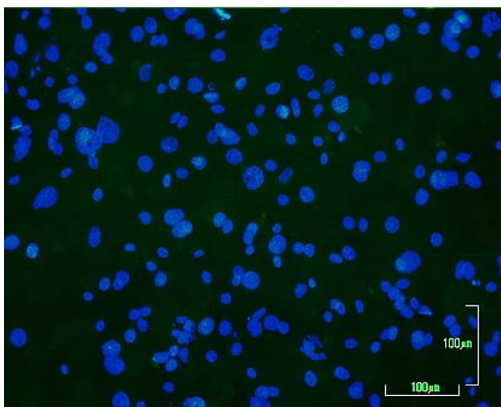
Hoechst



DCFDA



Merge



A

B

Γ

Εικόνα 3.4 Μικροφωτογραφίες μικροσκοπίου φθορισμού δείγματος καλλιέργειας πρώιμων λιποκυττάρων μετά από έκθεση των κυττάρων σε Α) απλό θρεπτικό υλικό (φυσιολογικός μάρτυρας), Β) H_2O_2 σε συγκέντρωση 250 μM (θετικός μάρτυρας) και Γ) Cr(III)-cit σε συγκέντρωση 50 μM . Στην εικόνα παρατίθεται ξεχωριστά η χρώση των πυρήνων (Hoechst), η χρώση των ROS (DCFDA) καθώς και ο συνδυασμός τους (merge).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Περίληπτικά, η αντίσταση στην ινσουλίνη είναι στενά συνδεδεμένη με μια σειρά παθοφυσιολογικών καταστάσεων, όπως είναι ο ΣΔ τύπου 2, η παχυσαρκία, η υπέρταση και το μεταβολικό σύνδρομο. Η αντίσταση στην ινσουλίνη, επιπλέον, αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για καρδιαγγειακές παθήσεις, οι οποίες χαρακτηρίζονται από υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα. Ενίσχυση της δράσης της ινσουλίνης ή/και πλήρης αντικατάστασή της με ινσουλινομιμητικούς παράγοντες φαίνεται πως βελτιώνει τη θεραπεία των μεταβολικών νοσημάτων. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών η εντατική έρευνα έθεσε στόχο τη διερεύνηση των παραγόντων αυτών. Ο ψευδάργυρος και το βανάδιο έχουν γνωστή ινσουλινομιμητική δράση. Επιπλέον, το χρώμιο στην τρισθενή του μορφή έχει δείχθει ότι διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στο μεταβολισμό των υδατανθρακών μέσω ενίσχυσης της σηματοδότησης της ινσουλίνης, αλλά και της ευαισθησίας των ινσουλινοευαίσθητων ιστών. Μια πολύ πιθανή σύνδεση μεταξύ της παχυσαρκίας και του ΣΔ είναι ο λιπώδης ιστός, ο οποίος αποθηκεύει ενέργεια με τη μορφή τριγλυκεριδίων και απελευθερώνει ενέργεια με τη μορφή ελεύθερων λιπαρών οξέων. Αν και η ινσουλινομιμητική δράση των συγκεκριμένων μεταλλοϊόντων είναι η γνωστή, υπάρχει ανεπάρκεια δεδομένων σε ότι αφορά στους α) μηχανισμούς μέσω των οποίων τα μεταλλοϊόντα αυτά μεταβάλλουν τη σηματοδότηση της ινσουλίνης (λιπογένεση), αλλά και β) μοριακούς στόχους που επηρεάζουν. Σκοπός της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η διερεύνηση της δράσης των τριών μεταλλοϊόντων [Zn(II), V(IV) και Cr(III)], χρησιμοποιώντας καλά καθορισμένες μορφές [**Zn(II)-citrate**, **V(IV)-citrate** και **Cr(III)-citrate**], α) στην κυτταρική επιβίωση των προ- και ώριμων λιποκυττάρων (3T3-L1), β) στην φυσιολογική μεταναστευτικότητα, και γ) ως ινσουλινο-μιμητικών/ινσουλινο-ενισχυτικών παραγόντων στην λιπογένεση. Τα αναδυόμενα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι τα **Zn(II)-citrate**, **V(IV)-citrate** και **Cr(III)-citrate** α) είναι (α)τοξικά με δοσο- και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο, β) επιδρούν στην κινητικότητα των πρώιμων λιποκυττάρων γ) επάγουν την κυτταρική ωρίμανση των πρώιμων ινοβλαστών του λιπώδους ιστού επιδρώντας σε γνωστούς ιστοειδικούς και μη βιοδείκτες, και δ) αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα μεταλλο-

επαγόμενης λιπογένεσης θέτοντας τη βάση για την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση αντιδιαβητικών παραγόντων.

4.1 Δομο-ειδική δράση των Zn(II)-cit και V(IV)-cit

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, ο ψευδάργυρος συμμετέχει στη δομή της ινσουλίνης και για το λόγο αυτό πολυάριθμες μελέτες στρέφουν το ενδιαφέρον τους στην αποσαφήνιση των μηχανισμών που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του ψευδαργύρου τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Η χορήγηση ψευδαργύρου, όπως έχει ήδη αναφερθεί, έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση του γλυκαιμικού δείκτη τόσο σε διαβητικά μοντέλα πειραματόζωων όσο και στον άνθρωπο, χαρακτηριστικό που υποδεικνύει την ινσουλινομιμητική του ιδιότητα [24,25,26-29]. Ωστόσο οι μηχανισμοί, οι οποίοι εμπλέκονται στη δράση αυτή, δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένοι. Ο ινσουλινομιμητικός χαρακτήρας του ιόντος του ψευδαργύρου Zn(II) είχε ήδη περιγραφεί το 1982 σε απομονωμένα λιποκύτταρα επίμυος [30]. Ως ενδογενές μέταλλο είναι παρόν σε πολυάριθμες βιολογικές διεργασίες. Αν και η συμβολή του μετάλλου αυτού είναι γνωστή, η αποσαφήνιση των μηχανισμών μέσω των οποίων γίνεται έκδηλη η βιολογική του συμπεριφορά δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί. Τυπικό παράδειγμα αποτελεί η λιπογένεση.

Στο ίδιο πλαίσιο, επιλέχθηκε και το V(IV), το οποίο αν και μη ενδογενές μέταλλο θεωρείται απαραίτητο στην διεκπεραίωση ορισμένων βιολογικών διεργασιών. Επιπρόσθετα, το βανάδιο αποτελεί μέταλλο με γνωστές βιομιμητικές ιδιότητες και χρησιμοποιείται σε μια πληθώρα ενώσεων με γνωστή αντιμικροβιακή, αντιδιαβητική και αντικαρκινική δράση. Η χρήση συμπλόκων βαναδίου στην ιατρική έχει εστιαστεί στην *in vitro* και *in vivo* εφαρμογή του για την αντιμετώπιση της έλλειψης ινσουλίνης στον ΣΔ τύπου 1 αλλά και στην αντίσταση της ινσουλίνης στον ΣΔ τύπου 2. Η βιολογική δράση των ενώσεων του βαναδίου αναφέρεται συχνά ως ινσουλινομίμηση ή/και ινσουλινοενίσχυση. Οι ενώσεις αυτές διεγείρουν την ενδοκυττάρια πρόσληψη της γλυκόζης με αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα, την αναστολή της γλυκονεογένεσης και γλυκογονόλυσης και τη διέγερση της γλυκογένεσης (αναστολή της λιπόλυσης). Όπως και στην περίπτωση του ψευδαργύρου, ο ρόλος του βαναδίου στη λιπογένεση δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένος.

Στην παρούσα μελέτη έγινε επιλογή τριών μεταλλοϊόντων με γνωστή ινσουλινο- μιμητική ή/και ενισχυτική δράση, συναρμοσμένων με κοινό υποκαταστάτη, το κιτρικό οξύ. Η

αξιολόγηση που πραγματοποιήθηκε δίνει έμφαση στη λιπογένεση, η οποία αποτελεί βασική μεταβολική ιδιότητα του σηματοδοτικού μονοπατιού της ινσουλίνης. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην επιλογή του υποστρώματος των μετάλλων αυτών, καθώς το κίτρινο είναι α) φυσιολογικό υπόστρωμα (κύκλος του Krebs), β) προσδίδει οκταεδρικό πεδίο συναρμογής στα τρία επιλεγέντα μεταλλοϊόντα, και γ) το χημικό του προφίλ είναι γνωστό και καλά μελετημένο, θέτοντας έτσι τη βάση για τη διερεύνηση του ρόλου των μεταλλοϊόντων αυτών στο κυτταρικό περιβάλλον με έμφαση την ωρίμανση των πρώιμων λιποκυττάρων του λιπώδους ιστού. Η συμπλοκοποίηση των μεταλλοϊόντων αυτών με κοινό υποκαταστάτη παρέχει το πλεονέκτημα της μεταλλο-εξαρτώμενης αξιολόγησης και σύγκρισης της δράσης των τριών αυτών, ενδογενών και μη, μεταλλοϊόντων στο σηματοδοτικό μονοπάτι της λιπογένεσης θέτοντας τη βάση για την ανάπτυξη βέλτιστων αντιδιαβητικών παραγόντων.

Προϋπόθεση για τη χρήση των υπό μελέτη ενώσεων για την επαγωγή της διαφοροποίησης αποτέλεσε ο έλεγχος του (α)τοξικού τους προφίλ. Στο πλαίσιο αυτό, τα κύτταρα 3T3-L1 εκτέθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις των **Zn(II)-cit** και **V(IV)-cit** για σύντομη (24 ώρες) και μακρά (48 ώρες) διέγερση. Με βάση τα αποτελέσματα, η ένωση **Zn(II)-cit** εμφανίζεται ατοξική στο εύρος των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν (1-100 μM), ενώ η ένωση **V(IV)-cit** παρουσιάζει τοξική δράση σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 10 μM . Όπως είναι γνωστό, η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά εμφανίζει ενδογενή μεταναστευτικότητα, η οποία αποτελεί βασική, φυσιολογική λειτουργία που συνδέεται με την ομοιοστασία του κυττάρου και που εμπλέκει μηχανισμούς του κυτταρικού σκελετού (φιλοπόδια, λαμελιπόδια). Έχει δειχθεί ότι ένας παράγοντας μπορεί να μην εμφανίζεται τοξικός σε ότι αφορά την κυτταρική επιβίωση, ωστόσο μπορεί να επιδρά στη φυσιολογία του κυττάρου. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της επίδρασης των υπό μελέτη ενώσεων στην κινητικότητα των πρώιμων ινοβλαστών του λιπώδους ιστού. Ο ψευδάργυρος αν και δεν μειώνει την κυτταρική επιβίωση, παρουσιάζει ήπια αναστολή της μεταναστευτικότητας των κυττάρων σε αντίθεση με το βανάδιο, το οποίο δεν επιδρά καθόλου στην κινητικότητα των πρώιμων ινοβλαστών. Κατά συνέπεια, συμπεραίνεται ότι ο ψευδάργυρος στην μορφή αυτή προάγει χημειοτακτισμό στα κύτταρα του λιπώδους ιστού.

Μετά την ολοκλήρωση του (α)τοξικού προφίλ των υπό μελέτη ενώσεων, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση του λιπογενετικού τους δυναμικού. Οι ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν σε εύρος συγκεντρώσεων 0.5-25 μM , αντικαθιστώντας την ινσουλίνη κατά τη διάρκεια της

διαφοροποίησης των πρώιμων ινοβλαστών σε ώριμα λιποκύτταρα. Περαιτέρω, οι ενώσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό με την ινσουλίνη προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανή συνεργική, προσθετική ή ανταγωνιστική δράση τους με την ορμόνη.

Η παραγωγή λιπιδίων σε μορφή λιποσταγόνας αποτελεί βασικό μορφολογικό δείκτη της επιτυχούς ωρίμανσης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα του λιπώδους ιστού. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι και τα δύο μεταλλοϊόντα στη μορφή **Zn(II)-cit** και **V(IV)-cit** επάγουν λιπογένεση στο εύρος των συγκεντρώσεων που ελέχθησαν. Πιο ειδικά, στην περίπτωση του ψευδαργύρου, η παραγωγή των λιπιδίων ήταν εμφανής ήδη από την χαμηλότερη συγκέντρωση (0.5 μM), παρουσιάζοντας το μέγιστο αποτέλεσμα όταν χορηγήθηκε σε συνδυασμό με την ινσουλίνη. Όμοια, το βανάδιο επάγει λιπογένεση ωστόσο όχι σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 10 μM , πιθανώς λόγω τοξικής συμπεριφοράς σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.

4.2 Βιολογικό προφίλ των **Zn(II)-cit και **V(IV)-cit** στην λιπογένεση – συσχέτιση με στενά συνδεδεμένους μοριακούς στόχους**

Για την περαιτέρω αξιολόγηση της επίδρασης των υπό μελέτη ενώσεων στη λιπογένεση αξιολογήθηκε η αλληλεπίδρασή τους με γνωστούς μοριακούς στόχους, οι οποίοι αποτελούν κλειδιά στη μοριακή σηματοδότηση της συγκεκριμένης διαδικασίας.

Ο PPAR- γ αποτελεί κύριο μεταγραφικό παράγοντα της λιπογένεσης, ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση ή/και καταστολή πολυάριθμων γονιδίων, τα οποία διαδραματίζουν κύριο ρόλο στη φυσιολογία των ώριμων λιποκυττάρων. Έχει δειχθεί ότι τα επίπεδα του γονιδίου αυτού παρουσιάζουν *in vitro* το μέγιστο της έκφρασής τους κατά την 8^η μέρα της διαδικασίας της διαφοροποίησης. Πιο συγκεκριμένα, η ένωση **Zn(II)-cit** επάγει την έκφραση του PPAR- γ σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν σε σχέση με τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα, ωστόσο τα επίπεδα δεν ξεπερνούν αυτά της ινσουλίνης που αποτελεί το θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Αντίστοιχα, η ένωση **V(IV)-cit** επάγει την έκφραση του γονιδίου, ωστόσο όχι σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 10 μM . Όταν οι υπό μελέτη ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό με την ινσουλίνη, στην περίπτωση του ψευδαργύρου η έκφραση ήταν σημαντικά μεγαλύτερη ακόμα και από αυτήν του θετικού μάρτυρα, υποδεικνύοντας ότι η συγκεκριμένη ένωση δρα συνεργικά με την ινσουλίνη. Αντίθετα, το βανάδιο όταν χορηγείται με την ινσουλίνη συνδυαστικά φαίνεται ότι καταστέλλει τη δράση

της, καθώς τα επίπεδα έκφρασης είναι ανάλογα με αυτά του απλού μάρτυρα (μη διαφοροποιημένα κύτταρα).

Ακολούθως κρίθηκε απαραίτητη η διερεύνηση της δράσης των υπό μελέτη ενώσεων στην έκφραση του γονιδίου του GLUT 4 που αποτελεί ιστο-ειδικό γλυκοζομεταφορέα του λιπώδους ιστού. Όπως είναι αναμενόμενο, το προφίλ έκφρασης μοιάζει με αυτό του PPAR- γ , καθώς η έκφρασή του εξαρτάται από τα επίπεδα έκφρασης του PPAR- γ . Πιο ειδικά, ο ψευδάργυρος επάγει την έκφραση του GLUT 4 σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκε ενώ σε συνδυασμό με την ινσουλίνη παρουσιάζει συνεργική δράση. Η ένωση **V(IV)-cit** επάγει την έκφραση του GLUT 4 σε συγκεντρώσεις μέχρι και 10 μM ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εμφανίζονται ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα του γλυκοζομεταφορέα. Η έκφραση του GLUT 4 υποδεικνύει ότι τα κύτταρα εκφράζουν τον γλυκοζομεταφορέα, ο οποίος μεσολαβεί την ενδοκυττάρια πρόσληψη της γλυκόζης και άρα είναι ικανά να μεταβολίσουν τη γλυκόζη. Ειδικότερα, φαίνεται πως ο ψευδάργυρος δρα μέσω της MAPK, καθώς ο GLUT 4 δεν εκφράζεται όταν αναστέλλει τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη.

Ο GLUT 1 αποτελεί βασικό γλυκοζομεταφορέα των περισσότερων κυττάρων, ο οποίος μεσολαβεί τη βασική πρόσληψη της γλυκόζης στους περισσότερους τύπους κυττάρων χωρίς να υπάρχει διακριτή έκφραση του σε σχέση με τον κυτταρικό τύπο ή το αναπτυξιακό στάδιο των κυττάρων. Όπως είναι αναμενόμενο, δεν παρατηρείται σαφής διαφορά στο επίπεδο έκφρασής του μεταξύ μη και διαφοροποιημένων κυττάρων. Επιπλέον, κύτταρα τα οποία διαφοροποιήθηκαν με την ένωση **Zn(II)-cit** δεν εμφανίζουν διαφορά στα επίπεδα έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου, ενώ το ίδιο παρατηρείται και στην περίπτωση του βαναδίου για συγκεντρώσεις έως και 10 μM .

Για την αξιολόγηση της επιτυχούς λιπογένεσης, αξιολογήθηκε επιπλέον η σχετική έκφραση των γονιδίων της γλυκοκινάσης και της αδιπνεκτίνης. Η γλυκοκινάση, όπως εξηγείται παρακάτω, αποτελεί δείκτη μεταβολικώς ενεργών κυττάρων, ικανών να μεταβολίσουν τη γλυκόζη μετά την πρόσληψή της. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι κύτταρα, τα οποία διαφοροποιήθηκαν με την ένωση **Zn(II)-cit**, εκφράζουν τη γλυκοκινάση σε επίπεδα όμοια με αυτά του θετικού μάρτυρα, υποδεικνύοντας ότι τα ώριμα πλέον λιποκύτταρα είναι ικανά

να μεταβολίσουν τη γλυκόζη. Στην περίπτωση του βαναδίου, παρατηρείται το ίδιο προφίλ έκφρασης, ωστόσο όχι σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 10 μM .

Τέλος διερευνήθηκε η έκφραση του γονιδίου της αδιπονεκτίνης, η οποία αποτελεί βασικό βιοδείκτη των ώριμων λιποκυττάρων. Η αδιπονεκτίνη είναι ορμόνη (κινάση) που εμπλέκεται στη ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης, όπως επίσης και στον καταβολισμό των λιπαρών οξέων. Η ορμόνη αυτή εκκρίνεται αποκλειστικά από το λιπώδη ιστό (και από τον πλακούντα σε περίπτωση εγκυμοσύνης) στην κυκλοφορία του αίματος. Τα επίπεδα της ορμόνης στο αίμα συνδέονται σε μεγάλο βαθμό με το ποσοστό σωματικού λίπους στα ενήλικα άτομα. Η αδιπονεκτίνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην καταστολή των μεταβολικών διαταραχών που σχετίζονται με περιπτώσεις του διαβήτη τύπου 2, της παχυσαρκίας, της αθηροσκλήρωσης και άλλων μεταβολικών συνδρόμων και συνδέεται στενά με το ρόλο του λιπώδους ιστού ως ενδοκρινικού οργάνου. Στην παρούσα μελέτη, το προφίλ έκφρασης της αδιπονεκτίνης μοιάζει, για αμφότερα μεταλλοϊόντα, με αυτά του GLUT 4. Συγκεκριμένα, εκφράζεται για όλο το εύρος των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκε η ένωση **Zn(II)-cit**, επιβεβαιώνοντας περαιτέρω τη συνεργική δράση του μεταλλοϊόντος με την ινσουλίνη, ενώ στην περίπτωση του βαναδίου παρατηρείται σημαντική έκφραση σε συγκέντρωση έως και 10 μM .

Συνολικά, μπορεί να υποστηριχθεί ότι και οι δύο ενώσεις επάγουν τη λιπογένεση των πρώιμων ινοβλαστών σε ώριμα λιποκύτταρα όμοια με την ινσουλίνη και η ιδιότητα αυτή συνδέεται στενά με το (α)τοξικό προφίλ των ενώσεων και άρα τη δομή τους.

4.3 Δομο-ειδική δράση του Cr(III)-cit

Το χρώμιο αποτελεί ένα απαραίτητο για τον οργανισμό στοιχείο το οποίο διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της δράσης της ινσουλίνης καθώς και στη επίδραση που έχει η συγκεκριμένη ορμόνη στον κυτταρικό μεταβολισμό [31]. Διάφορες μελέτες υποστηρίζουν το γεγονός ότι το τρισθενές χρώμιο [Cr(III)] αποτελεί σημαντικό παράγοντα ενίσχυσης της δράσης της ινσουλίνης [32,33]. Έχει γνωστό ότι η διαταραχή της φυσιολογικής δράσης και λειτουργίας της ορμόνης αυτής έχει συνδεθεί με μια σειρά παθοφυσιολογικών καταστάσεων. Παράλληλα, η ύπαρξη ινσουλινοαντίστασης συνηγορεί στην εμφάνιση του μεταβολικού συνδρόμου και του σακχαρώδη διαβήτη τύπου II. Ακόμη η αντίσταση στην ινσουλίνη είναι στενά συνδεδεμένη με μη φυσιολογική ή/και προβληματική

λιπογένεση και άρα παχυσαρκία [1-8]. Πολυάριθμες μελέτες υποστηρίζουν το γεγονός ότι το τρισθενές χρώμιο βελτιώνει τον γλυκαιμικό έλεγχο, μειώνει το φαινόμενο της αντίστασης στην ινσουλίνη, τον κίνδυνο για εμφάνιση ΣΔ II και μπορεί να προφυλάξει από την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων [34,35]. Ο προτεινόμενος μηχανισμός δράσης του χρωμίου αφορά στην ενεργοποίησή του βιολογικά μετά την απορρόφησή του και την συνεπακόλουθη σύνδεσή του με την χρωμοδουλίνη [36,37]. Το σύμπλοκο μετάλλου-πρωτεΐνης που προκύπτει μπορεί να συνδεθεί στον υποδοχέα της ινσουλίνης και να αυξήσει την δράση της κινάσης της τυροσίνης του υποδοχέα της ινσουλίνης και άρα να ενισχύσει το σήμα του ενεργοποιημένου υποδοχέα. [33]. Ως εξωγενές μέταλλο το οποίο μπορεί να είναι συμπαράγοντας της ινσουλίνης, η επίδραση του χρωμίου είναι ενισχυτική ως προς την δράση της ορμόνης. Αν και υπάρχουν αρκετά δεδομένα τα οποία υποστηρίζουν την ινσουλινομιμητική ή/και ενισχυτική δράση του τρισθενούς χρωμίου, ελάχιστα είναι γνωστά για την λιπογενετική του ιδιότητα καθώς η κυτταρική διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων σε ώριμα θεωρείται μία από τις βασικές δράσεις της ινσουλίνης. Στο πλαίσιο αυτό, η παρούσα μελέτη αφορά στη διερεύνηση της ινσουλινο-μιμητικής ή/και ενισχυτικής δράσης του χρωμίου με έμφαση την λιπογένεση. Πιο συγκεκριμένα, η ένωση **Cr(III)-cit** χρησιμοποιήθηκε δίνοντας έμφαση στον υποκαταστάτη ο οποίος είναι φυσικός με αποτέλεσμα α) την αύξηση της διαλυτότητας και της βιοδιαθεσιμότητας και β) μείωση της ενδεχόμενης τοξικότητας. Οι συγκεκριμένες οκταεδρικές μορφές του χρωμίου έχουν χαρακτηριστεί πλήρως σε υδατικά διαλύματα και άρα το καλά μελετημένο χημικό προφίλ αποτελεί κλειδί για την μελέτη της συμπεριφοράς τους στο κυτταρικό περιβάλλον [18]. Σε αντιπαράθεση με την δράση του τρισθενούς χρωμίου, το εξασθενές έχει δειχθεί ότι είναι ιδιαίτερα τοξικό με καρκινογόνο και μεταλλαξιογόνο δράση ενώ ακόμη φαίνεται πως αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ωρίμανση των προ-λιποκυττάρων [35-37]. Παράλληλα, η ένωση Cr(III)-picolinate όταν χρησιμοποιήθηκε για την διερεύνηση της λιπογενετικής του ικανότητας, τα αποτελέσματα που προέκυψαν έδειξαν ότι η ένωση αυτή καταστέλλει την λιπογένεση σε 3T3-L1 προ-λιποκύτταρα [38]. Ενώσεις εξασθενούς χρωμίου αποτελούν γνωστούς παράγοντες πρόκλησης οξειδωτικού stress με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ROS[39]. Ακόμη, έχει δειχθεί ότι η ένωση Cr(III)-picolinate συμμετέχει στον σχηματισμό ROS. Κατά συνέπεια, είναι ιδιαίτερα πιθανό η παρουσία των ROS να αποτελούν τον παράγοντα που ευθύνεται για την αναστολή της λιπογένεσης. Στην παρούσα

εργασία πραγματοποιήθηκε έλεγχος του σχηματισμού ROS έπειτα από διέγερση με την ένωση **Cr(III)-cit**. Τα αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι η υπό μελέτη ένωση ακόμα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις (50 μM) δεν προκαλεί τον σχηματισμό ROS σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (H_2O_2) που αποτελεί γνωστό οξειδωτικό παράγοντα. Τα συνολικά αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η ένωση **Cr(III)-cit** επάγει την κυτταρική διαφοροποίηση των προλιποκυττάρων σε ώριμα. Κατά συνέπεια, το υπόστρωμα στο οποίο το χρώμιο είναι προσδεδεμένο διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην βιολογική συμπεριφορά που αυτό επιδεικνύει. Αξίζει να αναφερθεί ότι επειδή το τρισθενές χρώμιο είναι κινητικά αδρανές, η χρήση του σε *in vitro* μελέτες σχετίζεται με χρονο-εξαρτώμενη απόκριση. Έτσι λοιπόν, επώαση 48 ωρών (όπως προβλέπει το πρωτόκολλο της διαφοροποίησης) οδήγησε σε σημαντικά χαμηλά επίπεδα παραγόμενων λιπιδίων και για τον λόγο αυτό η επώαση αυξήθηκε σε 72 ώρες. Η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων υποστηρίζει τον ζωτικό ρόλο τόσο του υποστρώματος όσο και του μεταλλοϊόντος που χρησιμοποιείται και που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη σε κάθε μελέτη.

4.4 Βιολογικό προφίλ του Cr(III)-cit στην λιπογένεση – συσχέτιση με στενά συνδεδεμένους μοριακούς στόχους

Για την διερεύνηση της λιπογενετικής ικανότητας του **Cr(III)-cit**, κρίθηκε αρχικά απαραίτητο να ελεγχθεί το (α)τοξικό του προφίλ. Στο πλαίσιο αυτό, τα 3T3-L1 προλιποκύτταρα διεγέρθηκαν με την ένωση **Cr(III)-cit** σε διάφορες συγκεντρώσεις και για διάφορα χρονικά διαστήματα. Όπως προέκυψε, το Cr(III) είναι ατοξικό τόσο σε προλιποκύτταρα όσο και σε ώριμα για μακρά και σύντομη χρονική διέγερση. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά παρουσιάζει χημειοτακτικά την κινητικότητα – μεταναστευτικότητα των κυττάρων. Έχει δειχθεί ότι ένας παράγοντας μπορεί να μην εμφανίζεται τοξικός σε ότι αφορά την κυτταρική επιβίωση ωστόσο μπορεί να επιδρά σε άλλες φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου όπως είναι η κυτταρική μεταναστευτικότητα [40]. Η ένωση **Cr(III)-cit** δεν επιδρά στην ενδογενή φυσιολογική κινητικότητα των προλιποκυττάρων. Ο συνολικός χαρακτηρισμός της (α)τοξικής συμπεριφοράς του Cr(III) θέτει τα θεμέλια για περαιτέρω χρήση του στην διερεύνηση του λιπογενετικού του δυναμικού.

Για την αποσαφήνιση του ρόλου του Cr(III) στην επαγωγή της κυτταρικής διαφοροποίησης, η ένωση **Cr(III)-cit** χρησιμοποιήθηκε αντικαθιστώντας την ινσουλίνη που αποτελεί τον κύριο διαφοροποιητικό παράγοντα ή χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με αυτή. Η παραγωγή

λιπιδίων αποτέλεσε την πρώτη ένδειξη του λιπογενετικού δυναμικού του Cr(III). Το φαινόμενο ήταν εμφανές και στις δύο συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν (0.5 και 10 μ M) σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (ινσουλίνη). Το μέγιστο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε όταν το Cr(III) χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με την ινσουλίνη (μεγαλύτερο ακόμα και από αυτό του θετικού μάρτυρα). Η διαδικασία της λιπογένεσης προϋποθέτει την ενεργοποίηση πολυάριθμων μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την έκφραση ή/και αποσιώπηση περισσότερων από 2000 γονιδίων που σχετίζονται με την ρύθμιση της φυσιολογίας και της ομοιοστασία του λιποκυττάρου[41]. Για την περαιτέρω αξιολόγηση του λιπογενετικού δυναμικού του Cr(III), διερευνήθηκε η σχετική έκφραση στενά συνδεδεμένων στόχων όπως είναι οι: PPAR- γ , GLUT4 και GCK. Τα αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι ο PPAR- γ αποτελεί κύριο ρυθμιστή της αποθήκευσης των λιπιδίων και του μεταβολισμού της γλυκόζης. Στην λιπογένεση, ο PPAR- γ διεγείρει την πρόσληψη και συσσώρευση των λιπιδίων. Κατά την διάρκεια της κυτταρικής διαφοροποίησης, ο PPAR- γ δρα ως μεταγραφικός παράγοντας ρυθμίζοντας την έκφραση αρκετών γονιδίων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των λιπιδίων και την ωρίμανση των ινοβλαστών του λιπώδους ιστού σε ώριμα λιποκύτταρα. Έχει δειχθεί ότι σε λιποκύτταρα όπου αποσιωποήθηκε το γονίδιο του PPAR- γ , τα λιποκύτταρα παρουσίασαν χαμηλά επίπεδα πρόσληψης λιπιδίων και έκφραση σχετικών βιοδεικτών [42-46]. Όταν ένα κύτταρο διαφοροποιηθεί σε ώριμο λιποκύτταρο, ο γλυκοζομεταφορέας GLUT 4 διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο καθώς είναι υπεύθυνος για την πρόσληψη της γλυκόζης στο εσωτερικό του κυττάρου [45-47]. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι ο PPAR- γ είναι υπεύθυνος για την έκφραση του ιστο-ειδικού γλυκοζομεταφορέα GLUT 4 και άρα του λιπιδιακού μεταβολισμού [48]. Ακόμη η γλυκοκινάση (GCK) αποτελεί ένζυμο το οποίο εμπλέκεται στον μεταβολισμό της γλυκόζης [49]. Πιο συγκεκριμένα, το ένζυμο αυτό καταλύει την φωσφορυλίωση της γλυκόζης σε glucose-6-phosphate. Στους ιστούς που απαντάται, η γλυκοκινάση διαδραματίζει κύριο ρόλο ρυθμιστή του μεταβολισμού των υδατανθρακών και λειτουργεί ως αισθητήρας των επιπέδων της γλυκόζης ενεργοποιώντας του μηχανισμούς του κυτταρικού μεταβολισμού της γλυκόζης [50]. Στον λιπώδη ιστό, η σύνθεση των τριγλυκεριδίων εξαρτάται από την σύνθεση του glycerol-3-phosphate που προέρχεται είτε από την γλυκόζη μέσω γλυκόλυσης είτε από το γαλακτικό μέσω γλυκερονεογένεσης. Μεταλλάξεις της γλυκοκινάσης σχετίζονται με αιτιολογικά με την εμφάνιση διαβήτη και

υπεργλυκαιμίας [51]. Στα πλαίσια αυτά, η διερεύνηση της επίδραση του Cr(III) στην έκφραση των συγκεκριμένων στόχων (PPAR- γ , GLUT 4 και GCK) αποτελεί κλειδί για την αξιολόγηση του λιπογενετικού δυναμικού του συγκεκριμένου μεταλλοϊόντος. Η αυξημένη έκφραση του PPAR- γ στα ώριμα λιποκύτταρα τα οποία διαφοροποιήθηκαν με Cr(III) επιβεβαιώνει περαιτέρω την λιπογενετική δράση του χρωμίου ενώ παράλληλα η αυξημένη έκφραση του GLUT 4 συνδέεται με την ικανότητα των κυττάρων αυτών να μεσολαβούν την ενδοκυττάρια πρόσληψη της γλυκόζης. Επιπλέον, τα αυξημένα επίπεδα της έκφρασης της γλυκοκινάσης υποδεικνύουν ότι τα διαφοροποιημένα κύτταρα είναι μεταβολικώς ενεργά και άρα μπορούν να μεταβολίσουν την γλυκόζη. Όταν τα προ-λιποκύτταρα διαφοροποιήθηκαν στις ίδιες συγκεντρώσεις χρωμίου σε συνδυασμό με την ινσουλίνη, η έκφραση και των τριών γονιδίων ήταν μεγαλύτερη ακόμα και από αυτά του θετικού μάρτυρα υποδεικνύοντας ότι η ένωση **Cr(III)-cit** παρουσιάζει συνεργική δράση ως προς την ινσουλίνη ωστόσο όχι με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο.

Συνοπτικά, και τα τρία μεταλλοϊόντα, στη μορφή που χρησιμοποιήθηκαν, επάγουν την λιπογένεση αλληλεπιδρώντας με ιστο-ειδικούς μοριακούς στόχους του σηματοδοτικού μονοπατιού της λιπογένεσης. Η διερεύνηση του (α)τοξικού τους προφίλ και η αξιολόγηση της βιομιμητικής τους δράσης συμβάλλει στην αποσαφήνιση του ρόλου των μεταλλοϊόντων αυτών στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης κατά τη διαφοροποίηση των πρώιμων ινοβλαστών του λιπώδους ιστού σε ώριμα λιποκύτταρα, ικανά να προσλαμβάνουν τη γλυκόζη και να τη μεταβολίζουν. Αξίζει να αναφερθεί ότι και οι τρεις ενώσεις, αντικατοπτρίζουν μεταλλοϊόντα συναρμοσμένα σε οκταεδρικό πεδίο, με αριθμό συναρμογής 6. Υπολογίζοντας, λοιπόν, την ιοντική ακτίνα για κάθε μέταλλο προκύπτει το εξής:

ΜΕΤΑΛΛΟΪΟΝ	ΙΟΝΤΙΚΗ ΑΚΤΙΝΑ(Å) ΓΙΑ ΑΡΙΘΜΟ ΣΥΝΑΡΜΟΓΗΣ 6
Zn(II)	0.88
Cr(III)	0.76
V(IV)	0.72

Από τα δεδομένα προκύπτει ότι για τον ίδιο αριθμό συναρμογής παρατηρείται αύξηση της ιοντικής ακτίνας από το βανάδιο στον ψευδάργυρο. Παράλληλα, καθώς μειώνεται η οξειδωτική βαθμίδα, αυξάνει η ιοντική ακτίνα του μεταλλοϊόντος. Λαμβάνοντας υπόψη τη βιολογική συμπεριφορά των μεταλλοϊόντων αυτών, με έμφαση στην επίδρασή τους στην κυτταρική βιωσιμότητα και ακολούθως στην συμπεριφορά τους στο εσωτερικό του κυττάρου, συνάγεται ότι η τοξικότητα που καταγράφεται μειώνεται όσο μειώνεται η οξειδωτική βαθμίδα των συμπλόκων μεταλλοϊοντικών μορφών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] American Diabetes Association, *Diabetes Care* 32 (2009) 62-67.
- [2] J.P. Despres, I. Lemieux, *Nature* 444 (2006) 881–887.
- [3] C.K. Roberts, A.L. Hevener, R.J. Barnard, *Compr. Physiol.* 3(1) (2013) 1-58.
- [4] J. Kaur, *Card. Res. Pract.* (2014) 943162.
- [5] S. Reynisdottir, K. Ellerfeld, H. Wahrenberg, H. Lithell, P. Arner, *J. Clin. Invest.* 93 (6) (1994) 2590-2599.
- [6] G.M. Reaven, *Diabetes* 37 (1988) 1595–1607.
- [7] J.H. Warram, B.C. Martin, A.S. Krolewski, J.S. Soeldner, C.R. Kahn, *Ann. Intern. Med.* 113 (1990) 909–915.
- [8] S. Lillioja, D.M. Mott, B.V. Howard, P.H. Bennett, H. Yki-Järvinen, D. Freymond, B.L. Nyomba, F. Zurlo, B. Swinburn, C. Bogardus, *N. Engl. J. Med.* 318 (1988) 1217–1225.
- [9] O. Sovik, H. Vestergaard, O. Trygstad, O. Pedersen, *Acta Paediatr. Suppl.* 413 (1996) 29–37.
- [10] J. Moitra, M.M. Mason, M. Olive, D. Krylov, O. Gavrilova, B. Marcus-Samuels, L. Feigenbaum, E. Lee, T. Aoyama, M. Eckhaus, M.L. Reitman, C. Vinson, *Genes Dev.* 12 (1998) 3168–3181.
- [11] A. Guilherme, J.V. Virbasius, V. Puri, M.P. Czech, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9(5) (2008) 367–377.
- [12] R.H. Unger, *Diabetes* 44 (1995) 863–870.
- [13] R.H. Unger, *Annu. Rev. Med.* 53 (2002) 319–336.
- [14] M.I. Lefterova, Y. Zhang, D.J. Steger, M. Schupp, J. Schug, A. Cristancho, D. Feng, D. Zhuo, C.J. Jr. Stoeckert, X.S. Liu, M.A. Lazar, *Genes Dev.* 22 (2008) 2941-2952.
- [15] R. Nielsen, T.A. Pedersen, D. Hagenbeek, P. Moulos, R. Siersbaek, E. Megens, S. Denissov, M. Børgesen, K.J. Francoijs, S. Mandrup, H.G. Stunnenberg, *Genes Dev.* 22 (2008) 2953-2967.
- [16] S.M. Phillips, H.J. Green, M.A. Tarnopolsky, G.J.F. Heigenhauser, R.E. Hill, S.M. Grant, *J. Appl. Physiol.* 81 (1996) 2182–2191.
- [17] N.G. Forouhi, G. Jenkinson, E.L. Thomas, S. Mullick, S. Mierisova, U. Bhonsli, P.M. McKeigue, J.D. Bell, *Diabetologia* 42 (1999) 932–935.

- [18] Gabriel, C.; Raptopoulou, C. P.; Drouza, C.; Lalioti, N.; Salifoglou, A. *Polyhedron* 28 (2009) 3209-3220.
- [19] L. Madsen, R.K. Petersen, M.B. Sørensen, C. Jörgensen, P. Hallenborg, L. Pridal, J. Fleckner, E.Z. Amri, P. Krieg, G. Furstenberger, R.K. Berge, K. Kristiansen, *Biochem. J.* 375 (2003) 539–549
- [20] B.E. Wilson, A. Gandy, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 28 (1995) 179-184.
- [21] R Swanson, W. H Ilsley, A.G. Stanislawski, *J. Inorg. Biochem.* 18(1983)187-194.
- [22] M. Tsaramyrsi, M. Kaliva, C.P. Raptopoulou, A. Terzis, V. Tangoulis, J. Giapintzakis, A. Salifoglou, *Inorg. Chem.* 40(2001) 5772-5779.
- [23] D. Porte, R.S. Sherwin, A. Baron. *Ellenberg and Rifkin's Diabetes Mellitus-Theory and Practice*. 6th edition. McGraw-Hill Professional Books, New York, 2003.
- [24] MD Chen, YM Song, PY Lin., *Horm Metab Res* 32(3) (2000) 107–9.
- [25] SF Simon, CG Taylor. *Exp Biol Med* (Maywood) 226(1) (2001) 43–51.
- [26] E Ueda, Y Yoshikawa, Y Ishino, H Sakurai, Y Kojima, *Chem Pharm Bull* (Tokyo) 50(3) (2002) 337–40.
- [27] Y Yoshikawa, E Ueda, H Sakurai, Y Kojima, 51(2) (2003) 230–1.
- [28] Y Adachi, J Yoshida, Y Kodera, A Kato, Y Yoshikawa, Y Kojima, et al. *J Biol Inorg Chem* 9(7) (2004) 885–93.
- [29] Y Adachi, J Yoshida, Y Kodera, T Kiss, T Jakusch, EA Enyedy, et al. *Biochem Biophys Res Commun* 351(1) (2006) 165–70.
- [30] JM May, CS Contoreggi, *J Biol Chem* 257(8) (1982) 4362–8.
- [31] W.T. Cefalu, Z.Q. Wang, X.H. Zhang, L.C. Baldor, J.C. Russell, *J. Nutr.* 132 (2002) 1107-1114.
- [32] B.W. Morris, S. MacNeil, C.A. Hardisty, S. Heller, C. Burgin, T.A. Gray, *J. Trace Elem. Exp. Med.* 13 (1999) 57-61.
- [33] J. Vincent, *J. Nutr.* 130 (2000) 715-718.
- [34] M. Viera, C.M. Davis-McGibony, *Protein J.* 27(6) (2008) 371–375.
- [35] D. Newman, *Glasgow Medical J.* 33 (1890) 469–470.
- [36] S. Langard, *Am. J. Ind. Med.* 17(2) (1990) 189–214.
- [37] C.N. Martini, J.N. Brandani, M. Gabrielli, M.C. Vila, *Toxicol. in vitro* 28 (2014) 700–706.
- [38] T.F. Lien, C.P. Wu, Y.M. Horng, *Nutr. Res.* 27 (2007) 176– 180
- [39] H. Luo, Y.D. Lu, X. Shi, Y. Mao, N.S. Dalal, *Ann. Clin. Lab. Sci.* 26 (1996) 185-191.
- [40] M. Omatsu-Kanb, K. Inoue, Y. Fujii, T. Yamamoto, T. Isono, N. Fujita, H. Matsuura, *Biochem. J.* 393 (2006) 171-80.
- [41] S.R. Farmer, *Cell Metab.* 4(4) (2006) 263–273.
- [42] K. Schoonjans, J. Peinado-Onsurbe, A.M. Lefebvre, R.A. Heyman, M. Briggs, S. Deeb, *EMBO J.* 15 (1996) 5336–5348.
- [43] Z. Wu, E.D. Rosen, R. Brun, S. Hauser, G. Adelmant, A.E. Troy, *Mol. Cell* 3 (1999) 151–158.

- [44] K. Matsusue, J.M. Peters, F.J. Gonzalez, *FASEB* 18 (2004) 1477–1479.
- [45] S.K. Jacobi, N.K. Gabler, K.M. Ajuwon, J.E. Davis, M.E. Spurlock, *J. Anim. Sci.* 84 (suppl.) (2006) 140–149.
- [46] J.L. Miner, *J. Anim. Sci.* 82 (2004) 935–941.
- [47] T.A. Kokta, M.V. Dodson, A. Gertler, R.A. Hill, *Domest. Anim. Endocrinol.* 27 (2004) 303–331.
- [48] M.E. Fernyhough, E. Okine, G. Hausman, J.L. Vierck, M.V. Dodson, *Domest. Anim. Endocrin.* 33 (2007) 367–437.
- [49] P.B. Iynedjian, *Cell. Mol. Life Sci.* 66(1) (2009) 27–42.
- [50] F.M. Matschinsky, *Nat. Rev. Drug Discov.* 8 (2009) 399–416.
- [51] S. Muñoz, S. Franckhauser, I. Elias, T. Ferré, A. Hidalgo, A.M. Monteys, M. Molas, S. Cerdán, A. Pujol, J. Ruberte, F. Bosch, *Diabetologia* 53(11) (2010) 2417–2430.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΣΧΕΣΗ ΔΟΜΗΣ-ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΝΕΟ-ΣΥΝΤΙΘΕΜΕΝΩΝ ΚΑΛΑ ΚΑΘΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΤΡΙΑΔΙΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟ-ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ Zn(II)-Schiff ΥΛΙΚΩΝ. ΒΙΟΜΟΡΙΑΚΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟ ΤΟ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ 3T3-L1 ΠΡΟ-ΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΩΡΙΜΑ ΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΑ.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο ΣΔ αποτελεί μια ομάδα μεταβολικών ασθενειών που χαρακτηρίζονται από υπεργλυκαιμία εξαιτίας της έλλειψης έκκρισης της ινσουλίνης ή/και προβληματικής της δράσης. Η χρόνια υπεργλυκαιμία στον ΣΔ έχει συσχετισθεί με μια σειρά μακροχρόνιων μικρο- και μακρο- αγγειακών παθήσεων οι οποίες οδηγούν σε αύξηση της νοσηρότητας αλλά και της θνησιμότητας των ασθενών με ΣΔ. Ο ΣΔ γενικά διακρίνεται σε τύπο 1 και τύπο 2. Ο ΣΔ τύπου 1 είναι ινσουλινοεξαρτώμενος και οφείλεται σε αυτοάνοση καταστροφή των β- παγκρεατικών κυττάρων ενώ ο ΣΔ τύπου 2 είναι μη ινσουλινοεξαρτώμενος και οφείλεται κυρίως σε ινσουλινοαντίσταση με αποτέλεσμα την έλλειψη απόκρισης των ιστών στόχων στην δράση της ινσουλίνης [1-5]. Η δράση της ινσουλίνης περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του ενδοκυττάριου σηματοδοτικού καταρράκτη ο οποίος εκκινεί μετά από σύνδεση του μορίου της ινσουλίνης στον υποδοχέα της με αποτέλεσμα την αυτοφωσφορυλίωσή του μέσω φωσφορυλίωσης κινάσης της τυροσίνης και των IRS υποστρωμάτων. Στη συνέχεια, ως απόκριση στην ενεργοποίηση των IRS ακολουθεί η ενεργοποίηση της PI3K και της Akt οι οποίες είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση της ενδοκυττάριας πρόσληψης της γλυκόζης. Αν και δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί οι μηχανισμοί που διέπουν την ινσουλινοαντίσταση, αξίζει να αναφερθεί ότι η διαταραχή της ενεργοποίησης της PI3K που εξαρτάται από την ινσουλίνη αλλά και η συνέχιση της σηματοδότησης καθοδικά αυτής θεωρείται ιδιαίτερα κομβικό σημείο στην μη φυσιολογική απόκριση στην ινσουλίνη. Η ινσουλινοαντίσταση στους περιφερικούς ιστούς μπορεί να αποδοθεί εν μέρει σε μειωμένο αριθμό γλυκοζομεταφορέων και κυρίως του γλυκοζομεταφορέα GLUT 4. Σε απομονωμένα κύτταρα ποντικού, η δυσλειτουργία αυτή φαίνεται να οφείλεται σε αποτυχία των κυστιδίων του γλυκοζομεταφορέα να μετατοπιστεί στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Στα λιποκύτταρα η μετατόπιση είναι επίσης περιορισμένη αλλά

ο κύριος μηχανισμός της ινσουλινοανοχής θεωρείται η μείωση των επιπέδων του mRNA του GLUT 4 προ-μεταφραστικά [6,7].

Ο ψευδάργυρος αποτελεί απαραίτητο ενδογενές μέταλλο για τον οργανισμό ρυθμίζοντας την φυσιολογική λειτουργία τουλάχιστον 300 ενζύμων [8,9]. Επιπλέον, ο ψευδάργυρος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε ζωτικές διεργασίες όπως η σύνθεση του DNA και του RNA, την κυτταρική διαίρεση και την απόπτωση καθώς και την βιοσύνθεση, έκκριση και δράση της ινσουλίνης [10-14]. Επιπρόσθετα, ο ψευδάργυρος έχει άμεσα συνδεθεί με την ασθένεια του ΣΔ καθώς αποτελεί μέρος της δομής της ινσουλίνης και μια πληθώρα μελετών στοχεύει στην αποσαφήνιση του τρόπου μεταβολισμού του ψευδαργύρου σε διαβητικά άτομα και πειραματόζωα [15]. Έχει δειχθεί ότι ο ψευδάργυρος ελέγχει την δράση τυροσίνης στον υποδοχέα της ινσουλίνης στον μυϊκό ιστό ποντικών με ΣΔ τύπου 2 με τρόπο όμοιο με αυτό του βαναδίου [16]. Έχει επίσης προταθεί ο ρόλος του ψευδαργύρου στον μεταβολισμό των υδατανθρακών μέσω ενεργοποίησης του υποδοχέα της ινσουλίνης, της πρωτεΐνης PTPB1 αλλά και άλλων μορίων [17]. Πράγματι, ο ψευδάργυρος και ο ΣΔ διαβήτη συσχετίζονται σε μια σειρά κρίσιμων σημείων κατά τον κυτταρικό μεταβολισμό [18,19]. Το 1980, βρέθηκε ότι ο ψευδάργυρος διεγείρει *in vitro* την λιπογένεση, όμοια με την ινσουλίνη [20] και εμφανίζει αντιδιαβητικές ιδιότητες *in vivo* όταν χορηγείται από το στόμα σε απλή ανόργανη μορφή ($ZnCl_2$) σε διαβητικά πειραματόζωα τόσο ΣΔ τύπου 1 (streptozotocin-induced) όσο και σε ΣΔ τύπου 2 [leptin-deficient mice (ob/ob mice)] [21,22]. Καθώς η βιοδιαθεσιμότητα του $ZnCl_2$ είναι σχετικά χαμηλή, διερευνήθηκε η χημεία συναρμογής του ιόντος του $Zn(II)$ και έτσι το 2002 προτάθηκαν τα πρώτα σύμπλοκα ψευδαργύρου [$Zn(II)$ -picolinato] με ινσουλινομιμητική και αντιδιαβητική δράση [23]. Εκ τότε, μια πληθώρα μεταλλοσυμπλόκων ψευδαργύρου με διακριτή συναρμογή έχουν συντεθεί [18-24].

Στοχεύοντας στην ανάδειξη νέων αντιδιαβητικών παραγόντων που περιέχουν ψευδάργυρο και παρουσιάζουν ατοξική συμπεριφορά καθώς και βέλτιστη ινσουλινομιμητική δράση, ιδιαίτερη σημασία δόθηκε στην παρουσία σαφώς καθορισμένων υποστρωμάτων τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην διαμόρφωση της ινσουλινομιμητικής δράσης του ψευδαργύρου [25]. Μεταξύ των οργανικών υποστρωμάτων, οι Schiff Base οργανικοί υποκαταστάτες α) διαθέτουν κοινά χαρακτηριστικά με αυτά φυσιολογικών υποκαταστατών βιολογικών συστημάτων, β) συντίθενται σχετικά απλά και γ) παρουσιάζουν πολύτιμη δομική ευελιξία διευκολύνοντας την

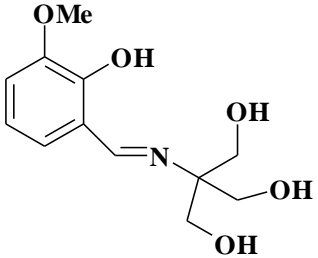
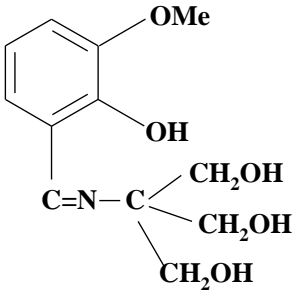
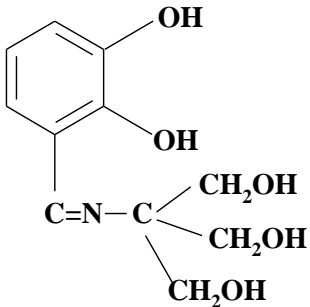
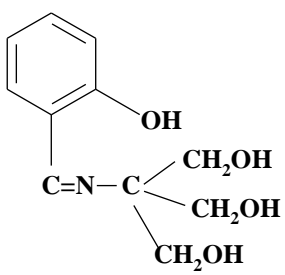
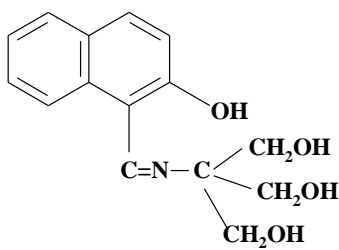
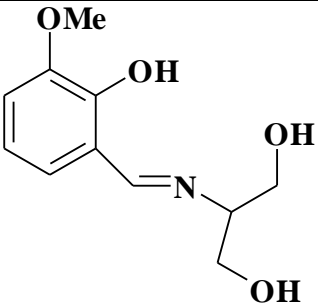
σύνθεση κατάλληλων μορίων με βιοχημική δραστηριότητα [26,27]. Τα συγκεκριμένα οργανικά υποστρώματα έχουν εκτενώς μελετηθεί εξαιτίας του ρόλου του σε ενζυμικές και μη αντιδράσεις γλυκοσυλίωσης αλλά και των σημαντικών βιομηχανικών, αντιβακτηριδιακών, αντιμυκητιακών, αντικαρκινικών αντιδιαβητικών, αντιϊκών και άλλων ιδιοτήτων τους [30-35]. Με γνώμονα ότι κατάλληλα σχεδιασμένοι Schiff Base υποκαταστάτες προάγουν την συμπλοκοποίηση του ψευδαργύρου αναδύοντας βιοδραστικά Zn(II)-L-(L') σύμπλοκα που έχουν την ιδιότητα να μειώνουν τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα, έγινε α) σχεδιασμός και σύνθεση σαφώς καθορισμένων Zn(II)-Schiff συμπλόκων συγκεκριμένης και διακριτής δομής που χαρακτηρίστηκαν φυσικοχημικά β) αξιολόγηση της ικανότητας να επάγουν την κυτταρική διαφοροποίηση των 3T3-L1 ινοβλαστών σε ώριμα λιποκύτταρα, γ) έλεγχος της *in vitro* βιολογικής τους δράσης, δ) διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των συγκεκριμένων συμπλόκων με ιστοειδικούς μοριακούς δείκτες και ε) συσχετισμός των χημικών και δομικών χαρακτηριστικών των τριαδικών συμπλόκων του Zn(II) με την προκύπτουσα, καταγραφόμενη βιολογική δράση.

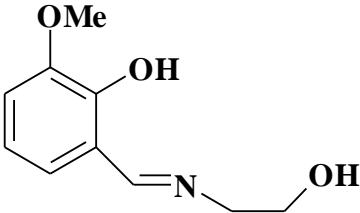
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Σχεδιασμός, σύνθεση και φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των οργανικών υποστρωμάτων και των νεο-συντιθέμενων ενώσεων Zn(II).

Οι υποκαταστάτες που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι ενώσεις που προέκυψαν συντέθηκαν και απομονώθηκαν σε μονοκρυσταλλική μορφή. Χαρακτηρίστηκαν φυσικοχημικά με πληθώρα μεθόδων και τεχνικών (στοιχειακή ανάλυση, FT-IR, κρυσταλλογραφία ακτίνων X, NMR (solid, solution), TGA-DTG).

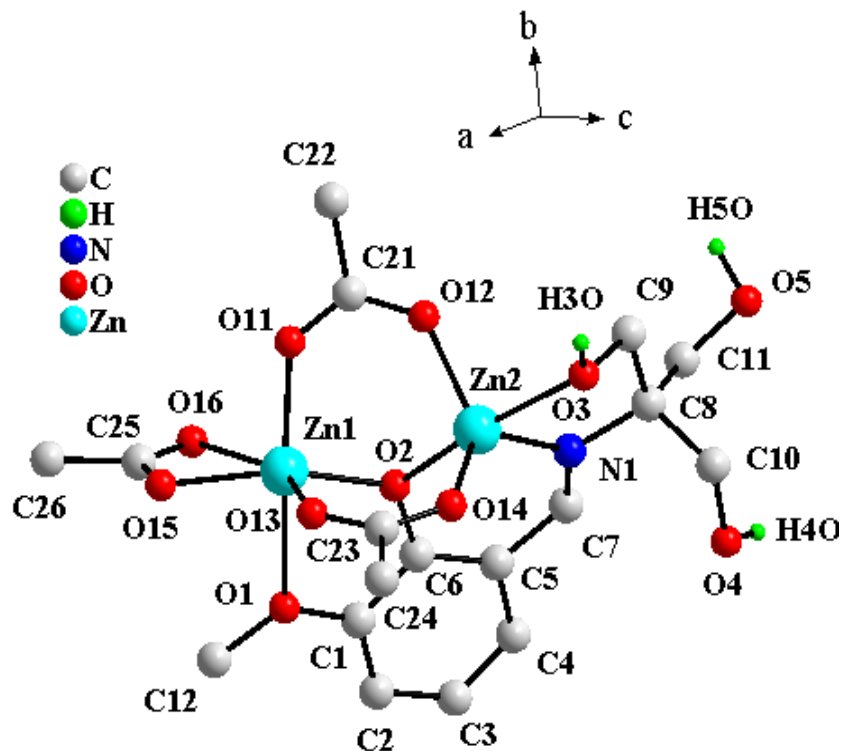
Στον πίνακα που ακολουθεί συνοψίζονται οι υποκαταστάτες των νεο-συντιθέμενων ενώσεων Zn(II).

 <p style="text-align: center;">Zn₂L Zn₂(L₁)(CH₃COO)₃ L₁</p>	 <p style="text-align: center;">Zn₃L₃ Zn₃(L₁)₃(CH₃O)</p>	 <p style="text-align: center;">Zn₄L₄ L₅</p>	 <p style="text-align: center;">ZnL₂ L₆</p>	 <p style="text-align: center;">ZnL₂ L₄</p>
 <p style="text-align: center;">[Zn₂(L₂)(CH₃COO)₃]·H₂O L₂</p>				

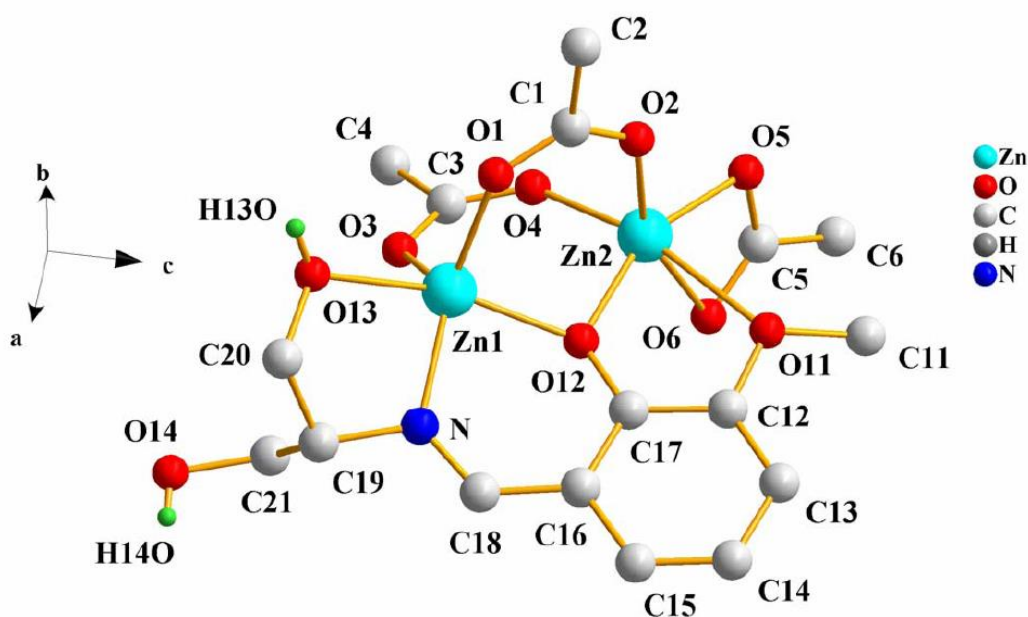
 <p>$\text{Zn}_2(\text{L}_3)_2(\text{CH}_3\text{COO})_2$</p> <p>L₃</p>				
--	--	--	--	--

Οι ενώσεις που προέκυψαν μαζί με τις τρισδιάστατες κρυσταλλικές δομές δίνονται παρακάτω:

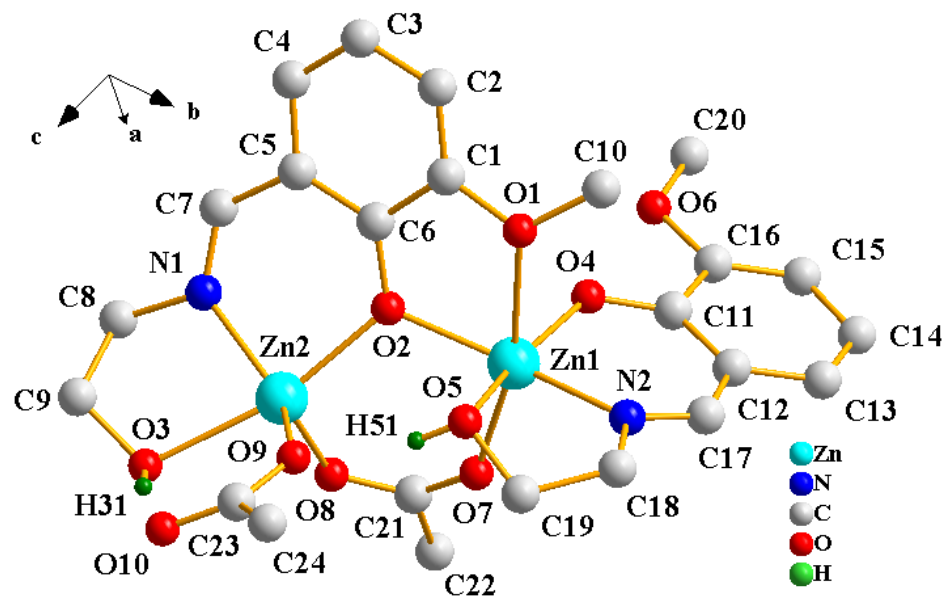
- $[\text{Zn}_2(\text{L}_1)(\text{CH}_3\text{COO})_3]$ (**1**) με $M_r = 562.13$



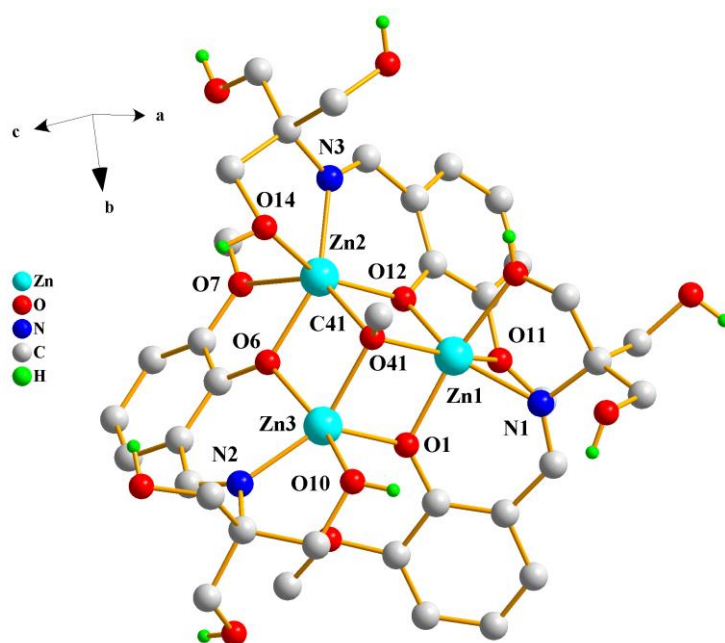
- $[\text{Zn}_2(\text{L}_2)(\text{CH}_3\text{COO})_3] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**2**) $M_r = 550.12$



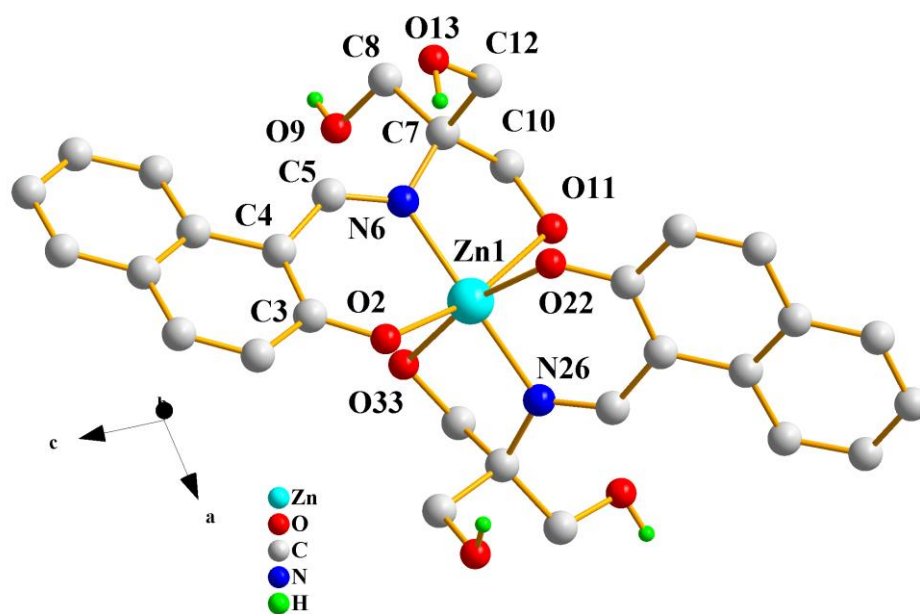
- $\text{Zn}_2(\text{L}_3)_2(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (**3**) $M_r = 637.27$



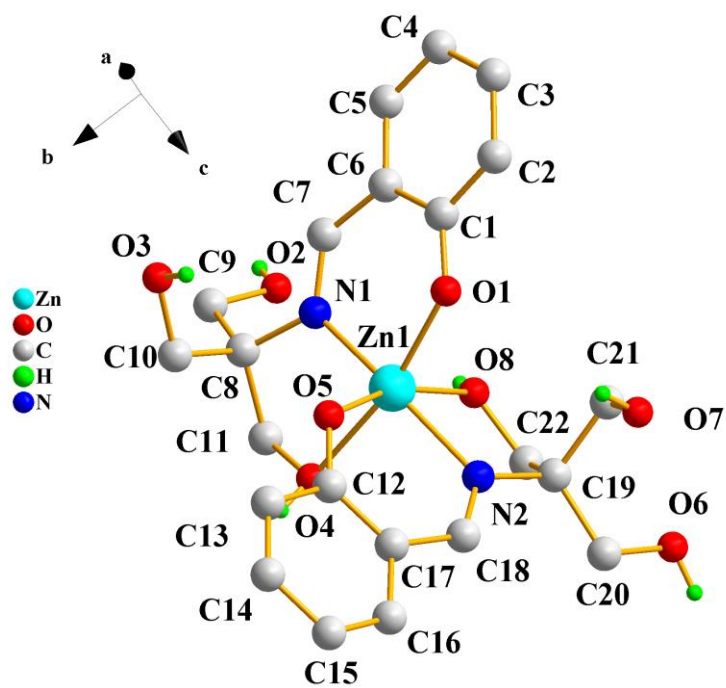
- $[\text{Zn}(\text{II})_3(\text{L}_1)_3](\text{CH}_3\text{O})(\text{NO}_3)_2 \cdot 0.9\text{CH}_3\text{OH} \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ (**4**) $M_r = 1169.80$



- $[\text{Zn}(\text{L}_2)] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**5**) $M_r = 629.97$

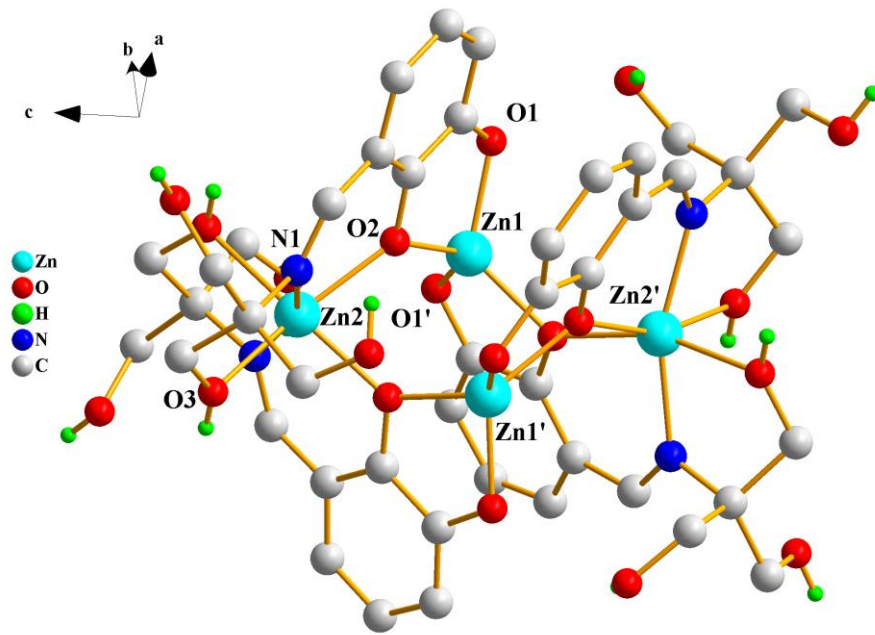


- $[\text{Zn}(\text{L}_2)]\cdot\text{CH}_3\text{OH}$ (6) $M_r = 513.90$



κα1

- $[\text{Zn}_4(\text{L}_1)_4]\cdot 7.4\text{H}_2\text{O}$ (7) $M_r = 1351.69$



2.2 Κυτταρική καλλιέργεια και βιολογικές δοκιμασίες

2.2.1. Ανάπτυξη κυτταρικής καλλιέργειας

Οι κυτταρικές καλλιέργειες τόσο των πρώιμων ινοβλαστών όσο και των ώριμων λιποκυττάρων αναπτύχθηκαν σε ειδικές φλάσκες καλλιέργειας (75 cm²) κάτω από κατάλληλες συνθήκες (5% CO₂, 37°C και σταθερά επίπεδα υγρασίας) σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό DMEM (SigmaD6429) το οποίο εμπλουτίζεται με 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Biochrom) και 1% συνδυασμού αντιβιοτικών (penicillin-streptomycin Biochrom).

2.2.2. Επαγωγή της λιπογένεσης

Οι πρώιμοι ινοβλάστες διαφοροποιήθηκαν σε ώριμα λιποκύτταρα σύμφωνα με γνωστό πρωτόκολλο διαφοροποίησης λιποκυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, δύο μέρες αφού η καλλιέργεια των κυττάρων αποκτήσει πυκνότητα 70% (ημέρα 0), τα κύτταρα διεγείρονται με θρεπτικό υλικό διαφοροποίησης (DMEM) το οποίο περιέχει επιπλέον 0.5 mM IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine) (Sigma), 1.0 μM dexamethazone (Sigma) και 10 ng/mL ινσουλίνης. Δύο μέρες μετά (ημέρα 2), το θρεπτικό υλικό αντικαθίσταται με θρεπτικό υλικό διατήρησης το οποίο περιέχει 10 ng/mL ινσουλίνης. Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αντικαθίσταται κάθε δύο μέρες με απλό DMEM. Όλα τα πειράματα σε ώριμα λιποκύτταρα πραγματοποιήθηκαν την 8^η μέρα της διαφοροποίησης.

2.2.3. Αξιολόγηση της κυτταρικής επιβίωσης

Για την αξιολόγηση των επιπέδων κυτταρικής επιβίωσης μετά από διέγερση με τα νεο-συντιθέμενα σύμπλοκα ψευδαργύρου, τόσο τα προ-λιποκύτταρα όσο και τα ώριμα λιποκύτταρα που διαφοροποιήθηκαν παρουσία της ινσουλίνης, διεγέρθηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις των υπό μελέτη ενώσεων και συμπλόκων και επώαστηκαν για 24 και 48 ώρες αντίστοιχα. Για τον σκοπό αυτό κύτταρα επιστρώθηκαν σε ειδική πλάκα 96 οπών και σε κάθε οπή υπήρχαν 2.500 κύτταρα. Τα υπό μελέτη σύμπλοκα αλλά και οι οργανικοί υποκαταστάτες διαλύθηκαν με την βοήθεια περιδίνησης (vortex) σε αρχική συγκέντρωση 1 mM στο θρεπτικό υλικό επώασης των κυττάρων. Όλα τα διαλύματα παρασκευάστηκαν ακριβώς πριν την χορήγησή τους στα κύτταρα. Οι τελικές συγκεντρώσεις ήταν σε εύρος 1-200 μM . Μετά το πέρας της επώασης με τις υπό μελέτη ενώσεις, χρησιμοποιήθηκε το kit της εταιρείας Promega, Cell Titer Glo, το οποίο προστίθεται σε αναλογία 1:1 με το θρεπτικό υλικό χωρίς αυτό να αφαιρείται. Η δοκιμασία βασίζεται στην ποσοτικοποίηση του ATP των μεταβολικώς ενεργών κυττάρων με χρήση της φωταύγειας. Η ανίχνευση και μέτρηση του παραγόμενου σήματος πραγματοποιήθηκε με το λουμινόμετρο Glomax 96 micro plate luminometer (Promega Corporation, WI, USA).

2.2.4. Επαγωγή της λιπογένεσης με τα Zn(II)-σύμπλοκα

Τα πρώιμα λιποκύτταρα 3T3-L1, διαφοροποιήθηκαν σε ώριμα λιποκύτταρα ακολουθώντας το πρωτόκολλο επαγωγής της κυτταρικής διαφοροποίησης που περιγράφηκε παραπάνω. Τα προ-λιποκύτταρα διεγέρθηκαν είτε με 10 ng/mL ινσουλίνης είτε με διάφορες συγκεντρώσεις των υπό μελέτη συμπλόκων ψευδαργύρου (1-25 μM). Τα σύμπλοκα που χρησιμοποιήθηκαν διαλύθηκαν στο θρεπτικό υλικό επώασης των κυττάρων (DMEM) το οποίο περιείχε 10% FBS και 1% penicillin/streptomycin και προστέθηκαν στα κύτταρα αφού προηγήθηκε φιλτράρισμα όλων των διαλυμάτων. Σε όλα τα πειράματα η ινσουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας. Επιπλέον, ως απλός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία δεν διαφοροποιήθηκαν. Κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης πραγματοποιήθηκε χρώση των παραγόμενων λιπιδίων για την ποιοτική εκτίμηση της επιτυχούς διαφοροποίησης ενώ επίσης έγινε εκχύλιση του ολικού mRNA προκειμένου να εκτιμηθεί με χρήση της RT-PCR τα σχετικά επίπεδα επαγωγής σχετιζόμενων γονιδίων (PPAR- γ και GLUT 4). Το κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τουλάχιστον τρεις φορές.

2.2.5. RT-PCR

Κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης των κυττάρων, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του ολικού mRNA των κυττάρων χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Trizol (Life Science, Chemilab) ακολουθώντας την διαδικασία που έχει ήδη περιγραφεί. Η σύνθεση του cDNA έγινε με χρήση του kit της BioRad και του QuantiTect SYBR Green PCR kit (όπως αναλυτικά περιγράφεται στο κεφάλαιο I και το παράρτημα).

2.2.6. Έλεγχος της επίδρασης των Zn(II)-συμπλόκων στην μεταναστευτικότητα των 3T3-L1 προ-λιποκυττάρων

Η ενδεχόμενη αναστολή της ενδογενούς μεταναστευτικότητας των 3T3-L1 προ-λιποκυττάρων ελέγχθηκε με την χρήση της δοκιμασίας *in vitro* scratch assay. Για τον σκοπό αυτό, προ-λιποκύτταρα επιστρώθηκαν σε ειδικά πιάτα καλλιέργειας (35 mm cell culture dishes) και επώαστηκαν παρουσία μόνο θρεπτικού υλικού. Όταν η καλλιέργεια των κυττάρων έφτασε σε ποσοστό πυκνότητας 70-80% δημιουργήθηκε διακοπή της καλλιέργειας μηχανικά, με την βοήθεια αποστειρωμένου μικρο-ρύγχουσι πιπέτας 100 μL. Στη συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία των υπό μελέτη συμπλόκων για 24 ώρες και τελική συγκέντρωση 25 μM. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε με την βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου (AxioObserverZ1 microscope) και μεγέθυνση 10x. Επιπλέον, ελήφθησαν μικρο-φωτογραφίες με χρήση κάμερας (AxioCamHccamera).

2.2.7. Εκτίμηση της πρόσληψης της γλυκόζης από ώριμα λιποκύτταρα με τις ενώσεις 1 και 2.

Για τον υπολογισμό των επιπέδων αλλά και την αξιολόγηση της ικανότητας τα ώριμα διαφοροποιημένα λιποκύτταρα να προλαμβάνουν την γλυκόζη (glucose uptake), τα προ-λιποκύτταρα διαφοροποιούνται σε ειδική πλάκα καλλιέργειας 12-οπών σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρεται παραπάνω. Κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης, τα κύτταρα διεγείρονται με διάφορες συγκεντρώσεις των υπό μελέτη ενώσεων (1-25 μM) ή της ινσουλίνης (100 nM) που αποτέλεσε τον θετικό μάρτυρα αφού προηγήθηκε 2ωρη επώαση απουσία ορού και γλυκόζης. Ως αρνητικός μάρτυρα χρησιμοποιήθηκε η κυτοχάλασίνη B (27.7 μM) η οποία αποτελεί γνωστό αναστολέα της ενδοκυττάριας πρόσληψης της γλυκόζης. Ως απλός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία είναι διαφοροποιημένα αλλά δεν διεγείρονται παρουσία ινσουλίνης. Η συνολική επώαση διαρκεί 15 λεπτά και στη συνέχεια προστίθεται μίγμα ραδιενεργού 2-δεοξυγλυκόζης-1μCi/mL ³H-2-δεοξυγλυκόζης (Hartmann analytic, MT1611) και μη ραδιενεργού 2-δεοξυγλυκόζης. Ακολουθεί

λύση των κυττάρων και μέτρηση της ραδιενέργειας στον beta counter της Beckman Coulter. Τα αποτελέσματα προκύπτουν σε CPM (counts per minute) (παράρτημα).

2.2.8. Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα αποτελούν τον μέσο όρο σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Ο μέσος όρος σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε για κάθε ομάδα – συνθήκη. Οι απόλυτες τιμές των επιπέδων κυτταρικής επιβίωσης υπολογίστηκαν για κάθε συνθήκη και εκφράστηκαν ως εκατοστιαία μεταβολή σε σχέση με τον απλό μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα) ενώ ακολούθησε ανάλυση one way ANOVA (one way analysis of variance) για όλα τα πιθανά ζεύγη και στατιστική μετα-ανάλυση (post hoc analyses) Tukey και Dunnett στην περίπτωση της RT-PCR καθώς και student t test για την αξιολόγηση των επιπέδων πρόσληψης της γλυκόζης. Οι βαθμοί της σημαντικότητας ορίστηκαν ως εξής: * $p < 0.05$ (σημαντικό), ** $p < 0.01$ (υψηλά σημαντικό) και *** $p < 0.001$ (εξαιρετικά σημαντικό) ή μη σημαντικό ($p > 0.05$).

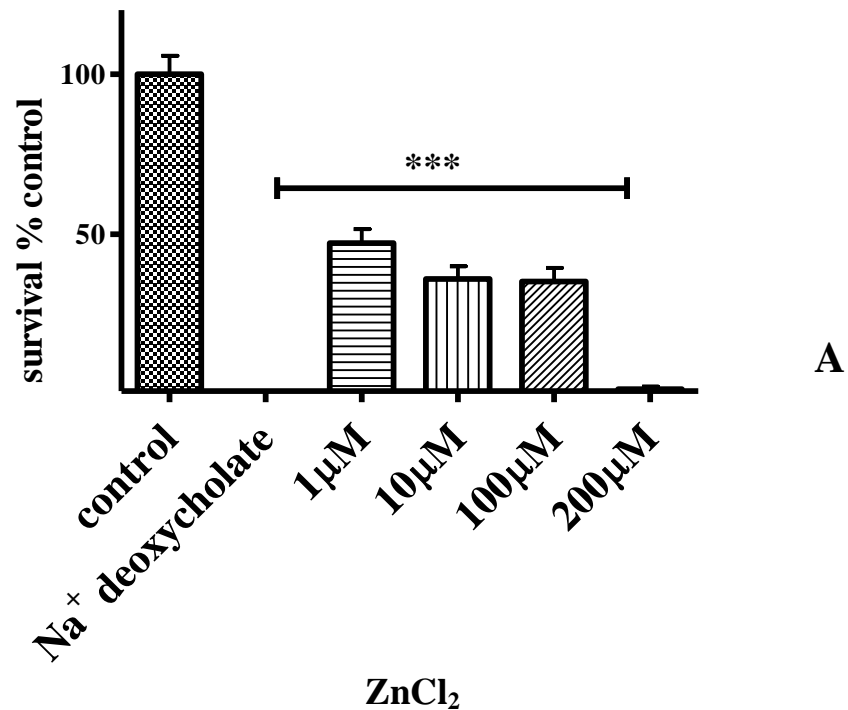
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

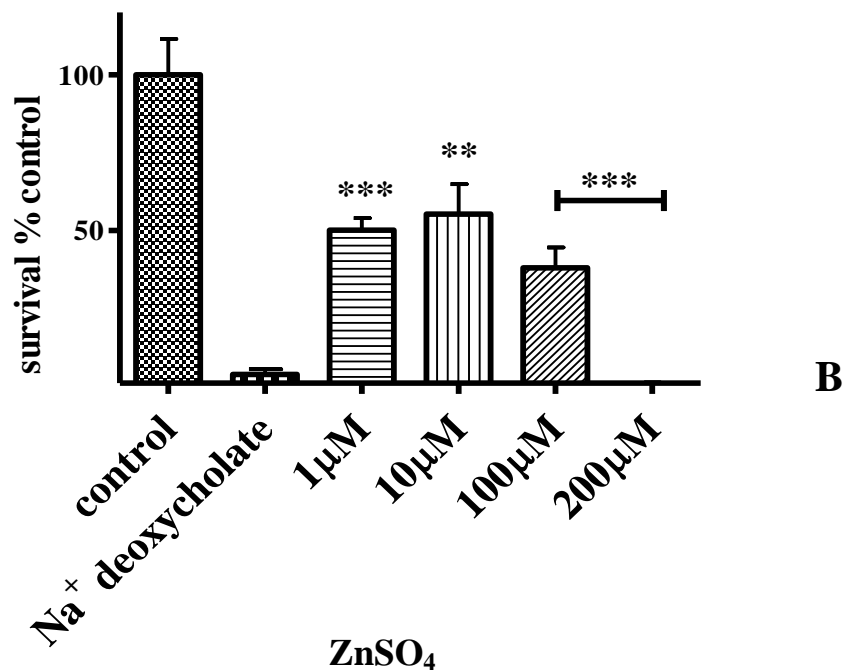
3.1. Αποτελέσματα ελέγχου τοξικής δράσης

3.1.1. Μέτρηση της βιωσιμότητας των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με απλές, ανόργανες μορφές ψευδαργύρου.

Αρχικά κρίθηκε απαραίτητη η διερεύνηση των επιπέδων της κυτταρικής βιωσιμότητας των προ-λιποκυττάρων μετά από έκθεσή τους σε γνωστές, απλές, ανόργανες μορφές ψευδαργύρου. Για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκαν οι ενώσεις $ZnCl_2$ και $ZnSO_4$. Για την αξιολόγηση των επιπέδων της κυτταρικής επιβίωσης των 3T3-L1 προ-λιποκυττάρων μετά από επίδραση με τις συγκεκριμένες ενώσεις, προ-λιποκύτταρα επιστρώθηκαν σε ειδική πλάκα 96-οπών με 2.500 κύτταρα ανά οπή. Τόσο η ένωση $ZnCl_2$ (A) όσο και η ένωση $ZnSO_4$ (B) χρησιμοποιήθηκαν σε τελικές συγκεντρώσεις 1, 10 100 και 200 μM ενώ τα κύτταρα εκτέθηκαν στις συγκεντρώσεις αυτές για 24 ώρες. Το δεοξυχολικό νάτριο (sodiumdeoxycholate) χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας της δοκιμασίας σε τελική αναλογία 1 mg/mL . Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.1 A και 3.1 B και οι δύο ενώσεις μειώνουν σημαντικά την κυτταρική επιβίωση με τρόπο που εξαρτάται από την συγκέντρωση ($p < 0.05$). Πιο συγκεκριμένα, η ένωση $ZnCl_2$ μειώνει την κυτταρική επιβίωση κατά 53% σε

συγκέντρωση 1 μM , 64% σε συγκέντρωση 10 μM , 65% σε συγκέντρωση 100 μM και σχεδόν 100% σε συγκέντρωση 200 μM σε σχέση με τον μάρτυρα που αντιστοιχεί σε κύτταρα τα οποία επωάζονται παρουσία μόνο θρεπτικού υλικού ($p < 0.05$). Αντίστοιχα η ένωση ZnSO_4 μειώνει την κυτταρική επιβίωση κατά 50% σε συγκέντρωση 1 μM , 45% σε συγκέντρωση 10 μM , 62% σε συγκέντρωση 100 μM και σχεδόν 100% στην υψηλή συγκέντρωση των 200 μM σε σχέση με τον μάρτυρα ($p < 0.05$).



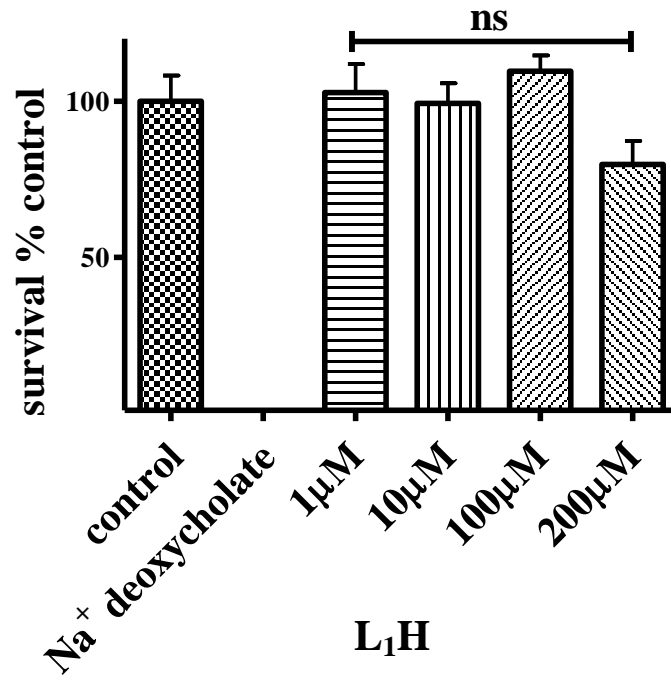


Εικόνα 3.1.1 Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με την ένωση ZnCl₂ (A) και την ένωση ZnSO₄ (B) σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

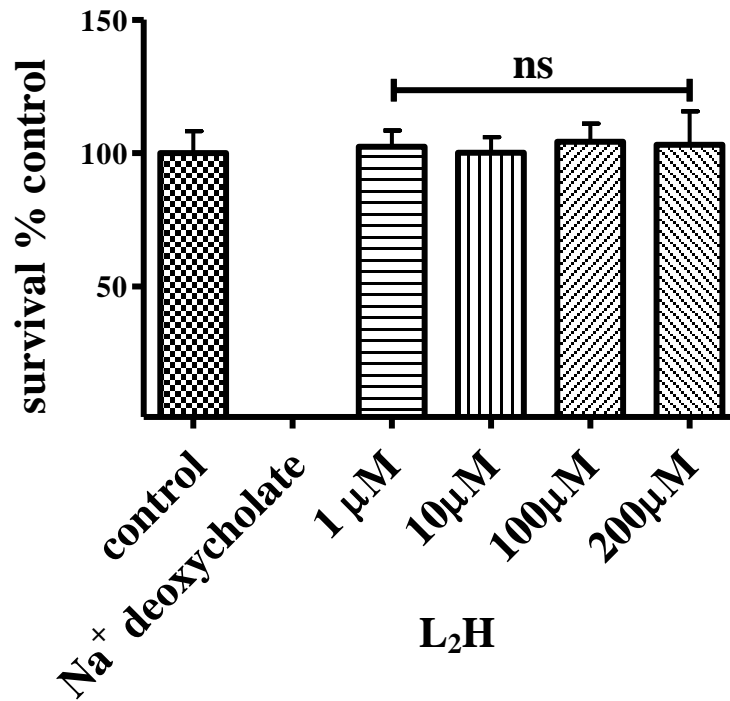
3.1.2 Μέτρηση της βιωσιμότητας των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με τους νεοσυντιθέμενους υποκαταστάτες (LH1, LH2 και LH3).

Προκειμένου να διερευνηθεί η ενδεχόμενη τοξική δράση των οργανικών νεοσυντιθέμενων υποκαταστατών στα 3T3-L1 προ-λιποκύτταρα, τα κύτταρα εκτέθηκαν για 24 ώρες σε διάφορες συγκεντρώσεις (1, 10, 100, 200 μM) των υποκαταστατών LH1, LH2 και LH3. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.1.2, ο οργανικός υποκαταστάτης LH3 μειώνει σημαντικά την κυτταρική επιβίωση με τρόπο που εξαρτάται από την συγκέντρωση σε σχέση με τον μάρτυρα. Πιο συγκεκριμένα, σε συγκέντρωση 1 μM η κυτταρική επιβίωση μειώνεται κατά 28%, σε συγκέντρωση 10 μM η βιωσιμότητα μειώνεται κατά 35%, σε συγκέντρωση 100 μM κατά 70 % ενώ σε συγκέντρωση 200 μM η κυτταρική επιβίωση μειώνεται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90% σε σχέση με τον μάρτυρα (p<0.05). Στην περίπτωση του υποκαταστάτη LH2 παρατηρείται μείωση της κυτταρικής επιβίωσης μόνο σε συγκεντρώσεις

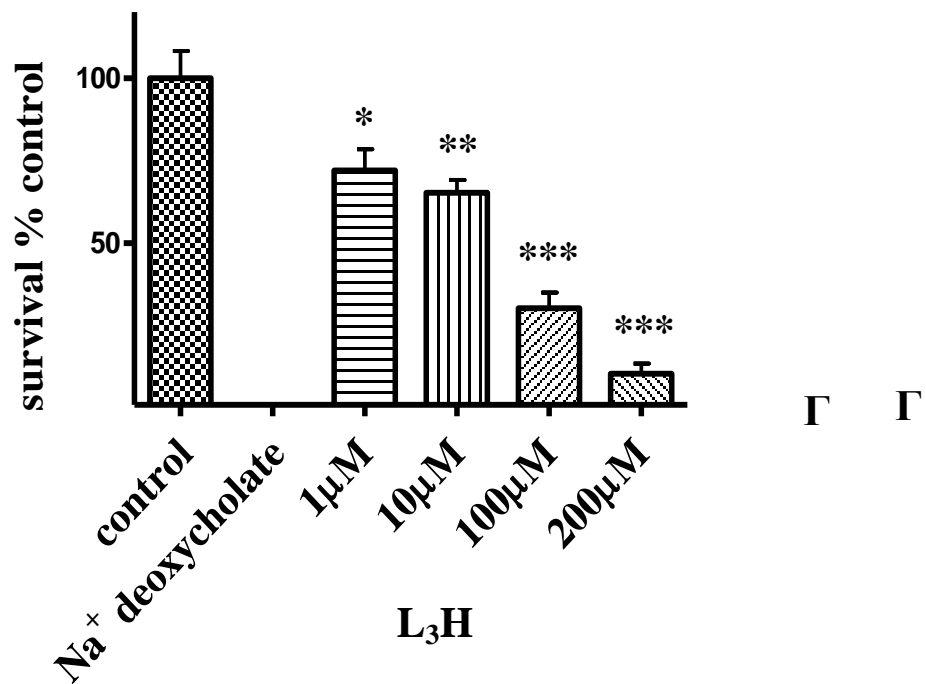
μεγαλύτερες των 200 μM ενώ ο υποκαταστάτης LH1 είναι ατοξικός σε ολόκληρο το εύρος των συγκεντρώσεων (1-200 μM) που μελετήθηκε.



A



B B

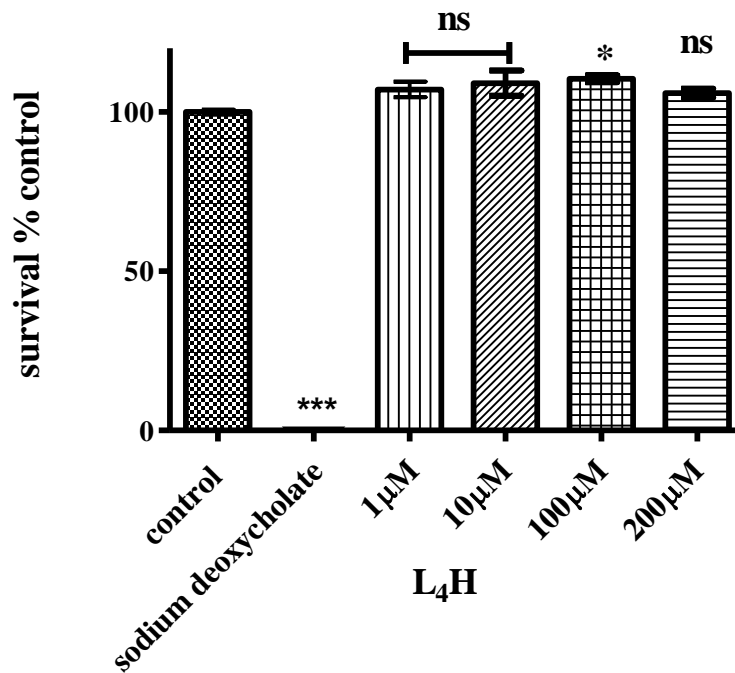


Εικόνα 3.3.2 Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με τους οργανικούς υποκαταστάτες (Α) LH1, (Β) LH2 και (Γ) LH3 σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

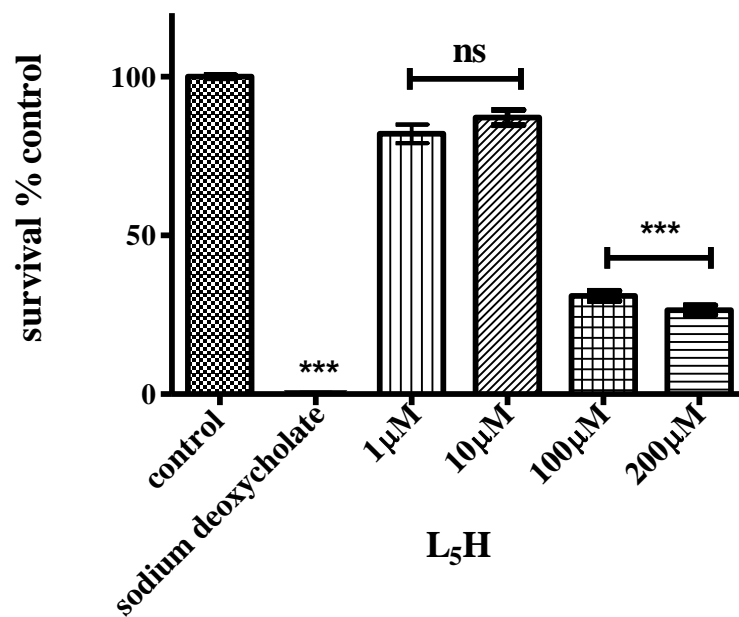
3.1.3. Μέτρηση της βιωσιμότητας των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με τους νεοσυντιθέμενους υποκαταστάτες (LH4, LH5 και LH6).

Όμοια, για την αξιολόγηση της ενδεχόμενης τοξικής δράσης των υποκαταστατών της δεύτερης ομάδας Zn(II)-συμπλόκων, τα πρώιμα λιποκύτταρα 3T3-L1 επώαστηκαν για 24 ώρες παρουσία των υποκαταστατών στο ίδιο εύρος συγκεντρώσεων. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.1.3Α, ο οργανικός υποκαταστάτης LH4 είναι ατοξικός σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων (1-200 μM) σε σχέση με τον φυσιολογικό μάρτυρα. μειώνει σημαντικά την κυτταρική επιβίωση με τρόπο που εξαρτάται από την συγκέντρωση σε σχέση με τον μάρτυρα. Ο υποκαταστάτης LH5 μειώνει την

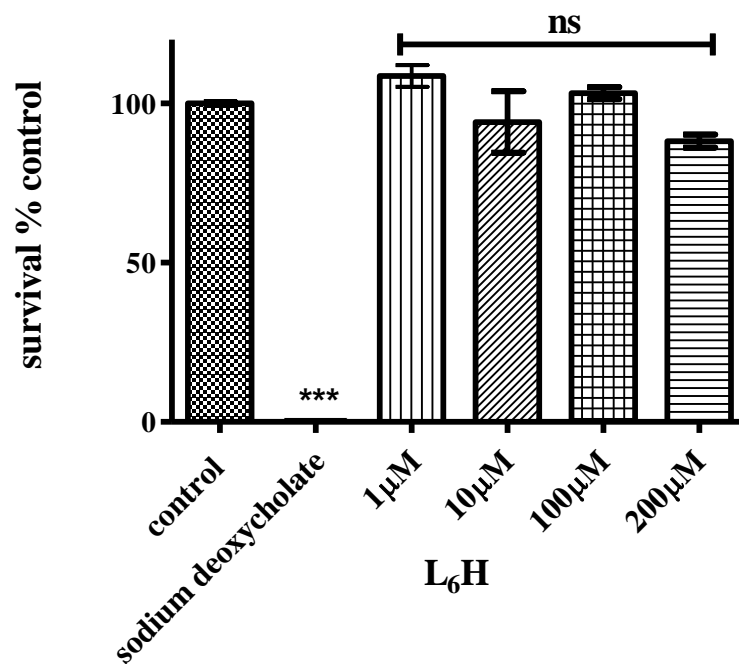
κυτταρική επιβίωση κατά 18% και 13% σε συγκεντρώσει 1 και 10 μM αντίστοιχα, ενώ η τοξική συμπεριφορά της συγκεκριμένη ένωσης εμφανίζεται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 100 μM με τα ποσοστά μείωσης της κυτταρικής επιβίωσης να αντιστοιχούν σε 70% σε σχέση με τον φυσιολογικό μάρτυρα ($p < 0.05$). Στην περίπτωση του υποκαταστάτη LH6 παρατηρείται ήπια μείωση της κυτταρικής επιβίωσης μόνο σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 200 μM (12%).



A



B

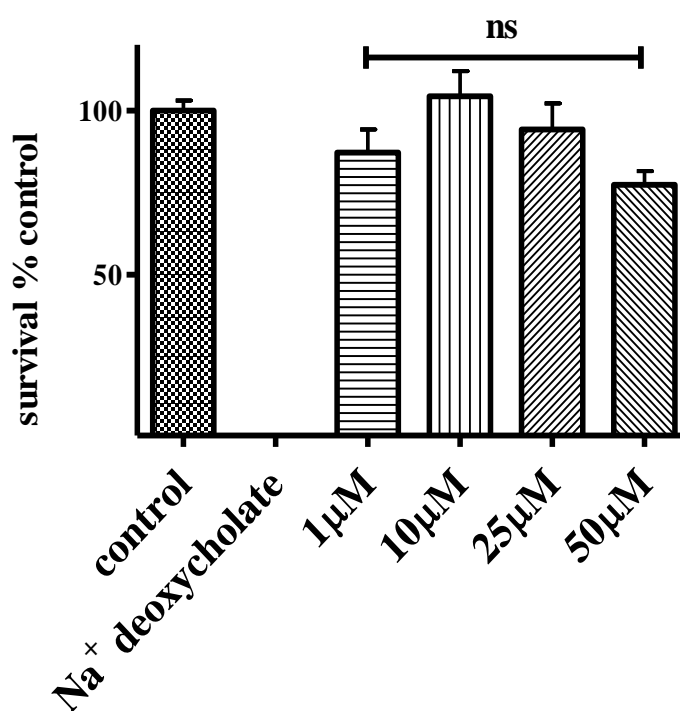


Γ

Εικόνα 3.1.3 Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με τους οργανικούς υποκαταστάτες (Α) LH4, (Β) LH5 και (Γ) LH6 σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

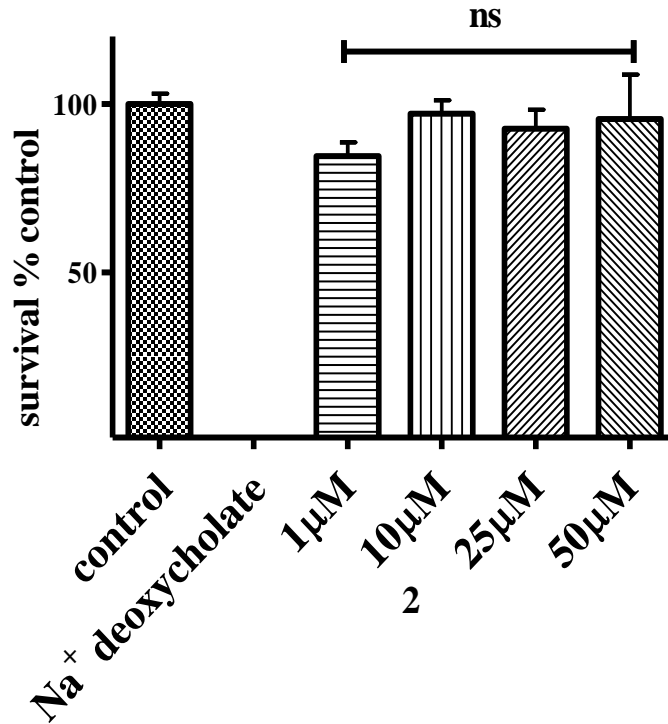
3.1.4. Μέτρηση της βιωσιμότητας των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με τα νεοσυντιθέμενα μεταλλο-σύμπλοκα ψευδαργύρου (1-3).

Για την διερεύνηση της ενδεχόμενης τοξικής δράσης των νεοσυντιθέμενων μεταλλο-συμπλόκων του ψευδαργύρου, τα 3T3-L1 προ-λιποκύτταρα διεγέρθηκαν με τις υπό μελέτη ενώσεις για 24 ώρες σε συγκεντρώσεις 1, 10, 25 και 50 μM . Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.1.4, η ένωση **1** παρουσιάζει τοξικότητα μόνο σε υψηλότερες συγκεντρώσεις με το ποσοστό της μείωσης της κυτταρικής επιβίωσης να αντιστοιχεί σε 33% όταν η συγκέντρωση είναι 50 μM ($p < 0.05$). Η ένωση **2** φαίνεται να είναι ατοξική για το ίδιο εύρος συγκεντρώσεων σε αντίθεση με την ένωση **3** η οποία φαίνεται να είναι τοξική ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις με το ποσοστό βιωσιμότητας να μειώνεται περίπου στο 50% ακόμη και στην συγκέντρωση του 1 μM ($p < 0.05$). Αξίζει να αναφερθεί ότι το προφίλ της τοξικής δράσης αυτών των ενώσεων είναι σε συμφωνία με το αυτό των υποκαταστατών (L1H, L2H και L3H), όπως παρουσιάζεται και παρακάτω, με τους υποκαταστάτες L1H και L2H να είναι ατοξικοί ενώ ο L3H τοξικός για τα προ-λιποκύτταρα σε εύρος συγκεντρώσεων από 1 έως 200 μM .

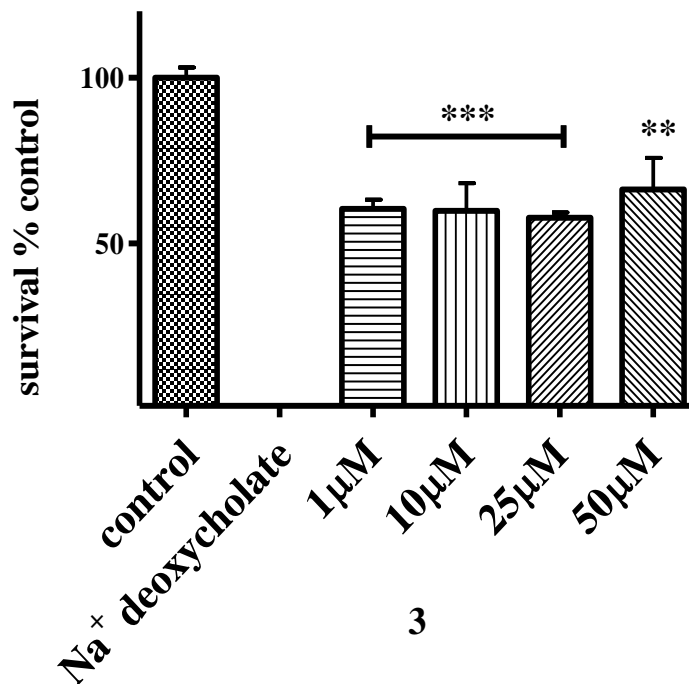


A

1



B

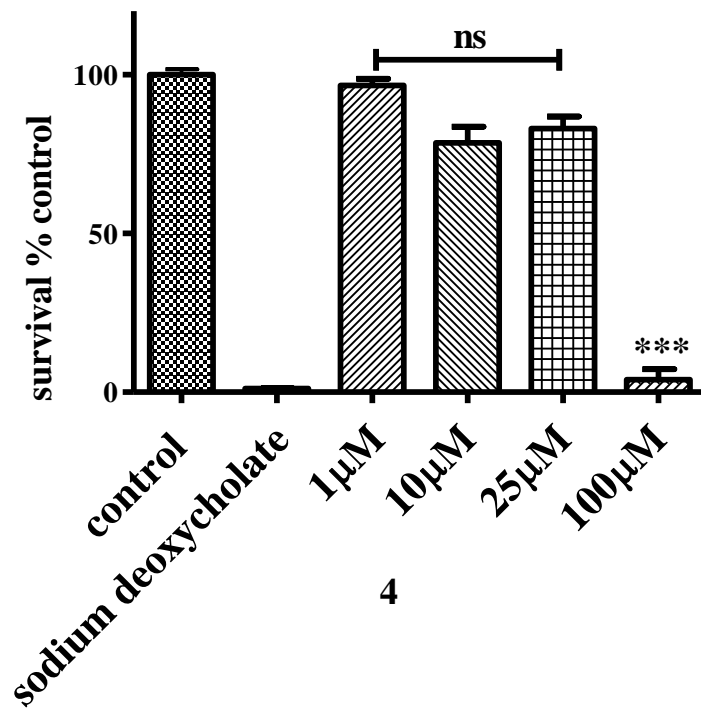


Γ

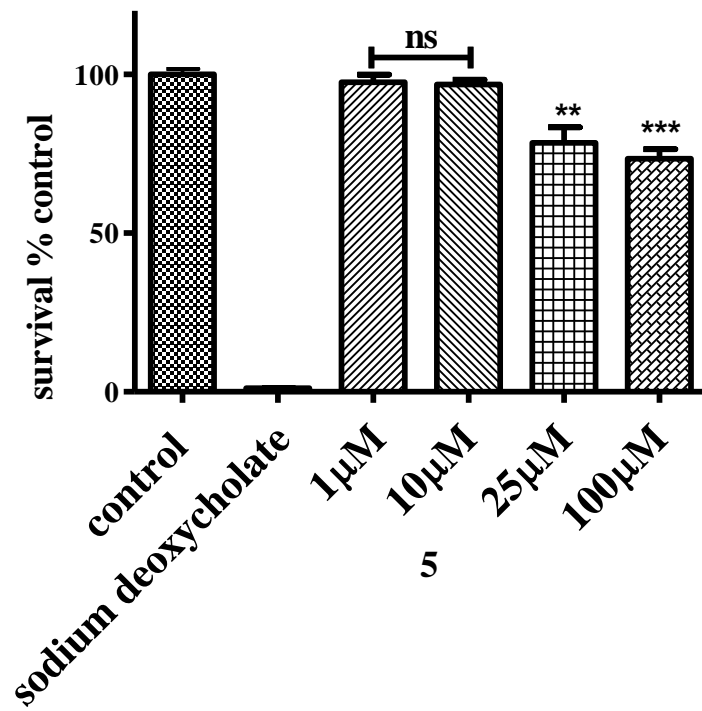
Εικόνα 3.1.4. Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με την ένωση 1 (Α), 2 (Β) και 3 (Γ) σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

3.1.5. Μέτρηση της βιωσιμότητας των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με τα νεοσυντιθέμενα μεταλλο-σύμπλοκα ψευδαργύρου (4-7).

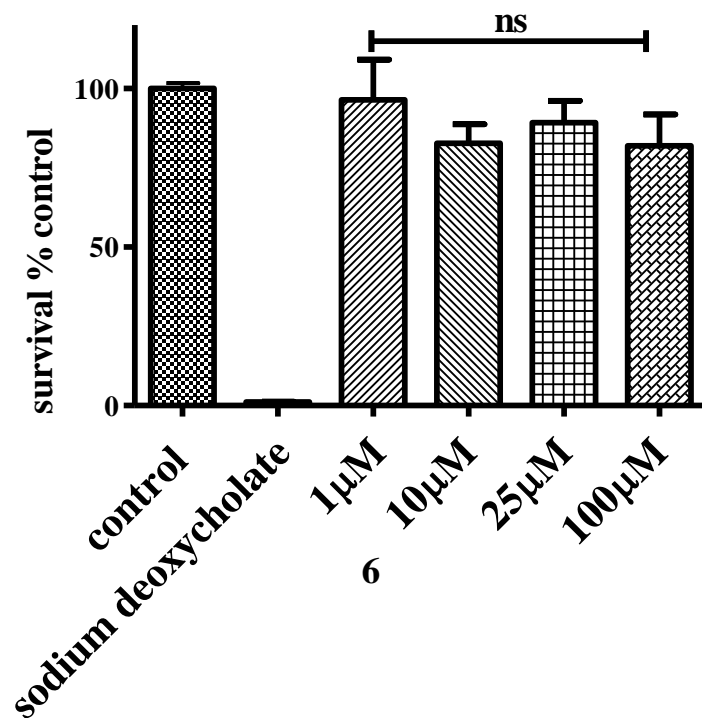
Όμοια, για την διερεύνηση της ενδεχόμενης τοξικής δράσης των νεοσυντιθέμενων μεταλλο-συμπλόκων του ψευδαργύρου της δεύτερης ομάδας, τα 3T3-L1 προ-λιποκύτταρα διεγέρθηκαν με τις υπό μελέτη ενώσεις για 24 ώρες σε συγκεντρώσεις 1, 10, 25 και 100 μM . Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.1.5A, η ένωση **4** είναι ατοξική σε συγκεντρώσεις έως και 25 μM ενώ η κυτταρική επιβίωση φαίνεται να μειώνεται υψηλά σε συγκεντρώσεις ίσες ή μεγαλύτερες των 100 μM (έως και 100%) σε σχέση με τον φυσιολογικό μάρτυρα ($p < 0.05$). Η ένωση **5** είναι ατοξική ακόμα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις με το ποσοστό της κυτταρικής επιβίωσης να μειώνεται κατά 22% και 27% σε συγκεντρώσεις 25 μM και 100 μM αντίστοιχα (Εικόνα 3.1.5 B). Η ένωση **6** φαίνεται να μην επηρεάζει την κυτταρική επιβίωση ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις (εικόνα 3.1.5Γ). Τέλος, η ένωση **7** παρουσιάζει ήπια τοξικότητα, πιο συγκεκριμένα σε συγκέντρωση 1 μM η κυτταρική επιβίωση μειώνεται κατά 17%, σε συγκέντρωση 10 μM το ποσοστό μείωσης είναι 12%, σε συγκέντρωση 25 μM το ποσοστό μείωσης είναι 25% ενώ σημαντικά υψηλή τοξικότητα εμφανίζεται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 100 μM σε σχέση με τον φυσιολογικό μάρτυρα (εικόνα 3.1.5 Δ)($p < 0.05$).



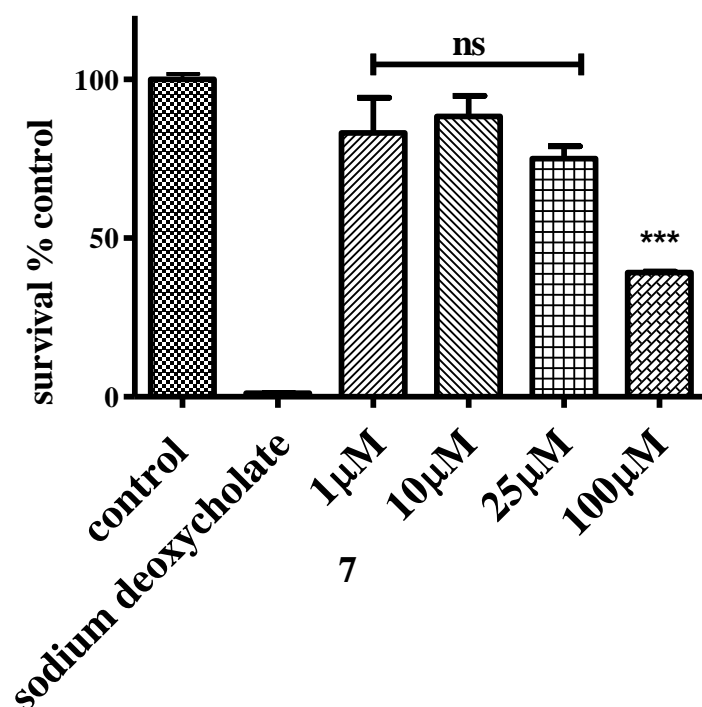
A



B



Γ

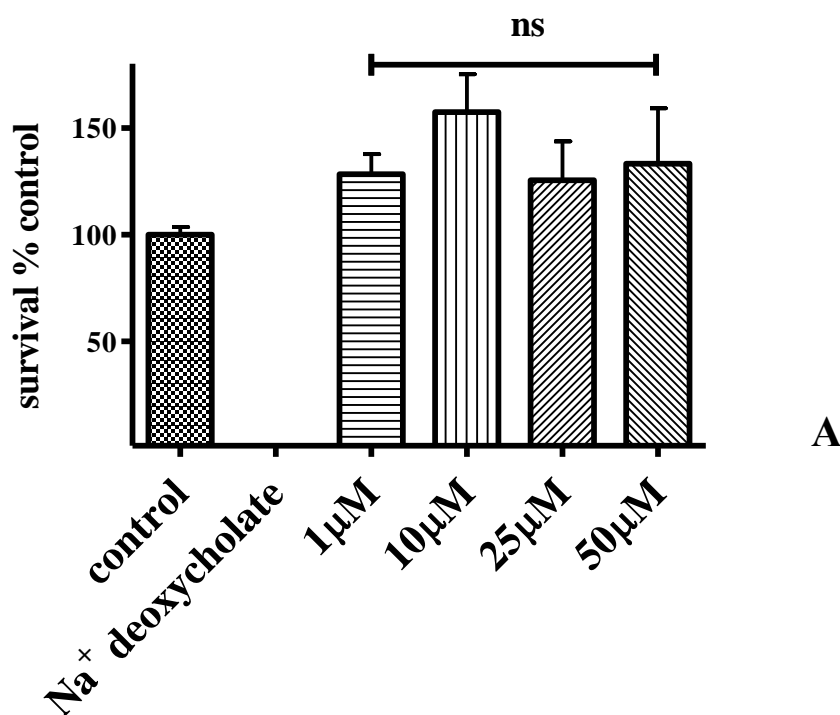


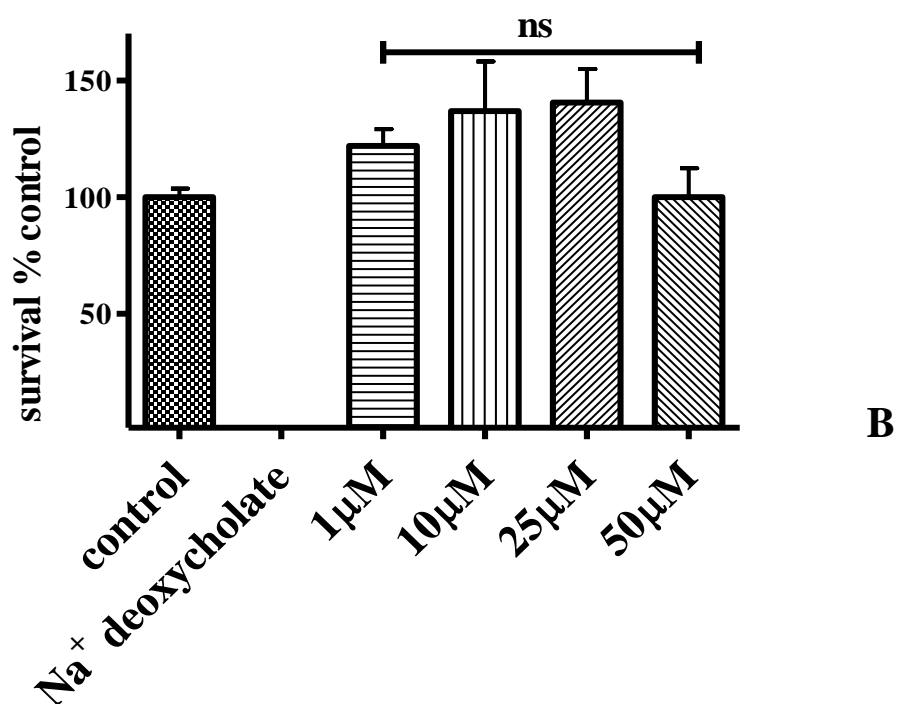
Δ

Εικόνα 3.1.5. Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με την ένωση 4 (Α), 5 (Β), 6 (Γ) και 7 (Δ) σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με τυπικό σφάλμα.

3.1.6. Μέτρηση της βιωσιμότητας των προ-λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με τα νεοσυντιθέμενα μεταλλο-σύμπλοκα ψευδαργύρου (1-2).

Στη συνέχεια κρίθηκε απαραίτητη η αξιολόγηση της επίδρασης των νεοσυντιθέμενων συμπλόκων ψευδαργύρου στα επίπεδα κυτταρικής βιωσιμότητας για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (48 ώρες) καθώς κατά την διάρκεια της επαγωγής της διαφοροποίησης των προ-λιποκυττάρων με τα συγκεκριμένα μεταλλο-σύμπλοκα σε ώριμα λιποκύτταρα, οι ινοβλάστες του λιπώδους ιστού εκτίθενται στις ενώσεις αυτές για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 24 ωρών. Αξίζει να αναφερθεί ότι η ένωση **3** λόγω αυξημένης τοξικότητας σε προ-λιποκύτταρα για σύντομη έκθεση αυτών (24 ώρες) δεν χρησιμοποιείται σε περαιτέρω μελέτες. Για την διερεύνηση της επίδρασης των ενώσεων **1** και **2** στη μείωση της κυτταρικής επιβίωσης, προ-λιποκύτταρα διεγέρθηκαν με τα υπό μελέτη μεταλλο-σύμπλοκα για 48 ώρες με τις εξής συγκεντρώσεις: 1, 10, 25 και 50 μM . Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι τόσο η ένωση **1** όσο και η ένωση **2** είναι ατοξικές για το χρονικό διάστημα των 48 ωρών και στο εύρος των συγκεντρώσεων που αναφέρονται (Εικόνα 3.1.6) και κατά συνέπεια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω μελέτες.



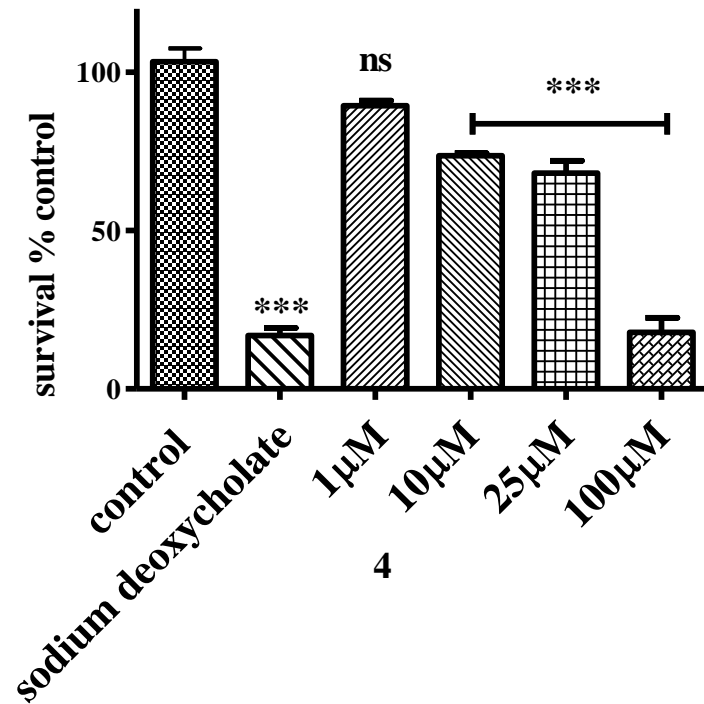


Εικόνα 3.1.6 Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των προ-λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με την ένωση 1 (A) και 2 (B) σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με τυπικό σφάλμα.

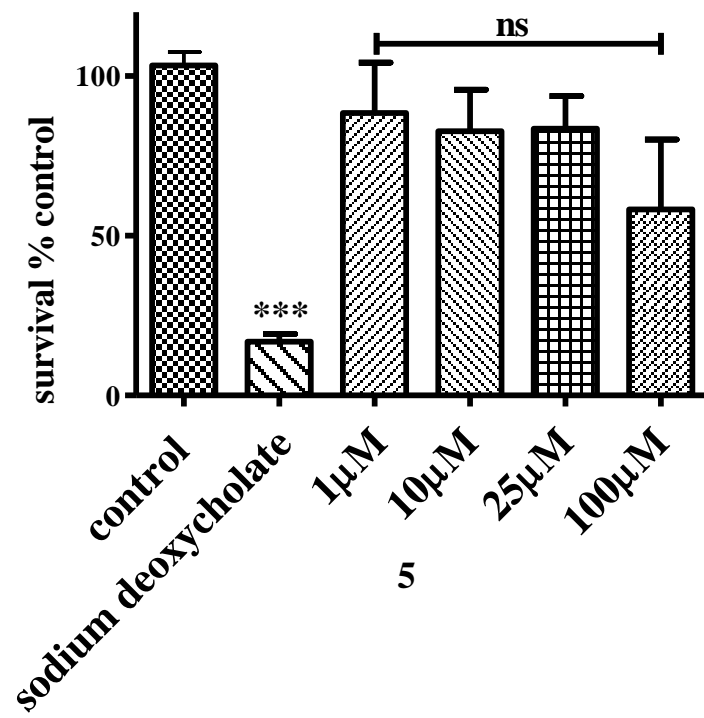
3.1.7. Μέτρηση της βιωσιμότητας των προ-λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με τα νεοσυντιθέμενα μεταλλο-σύμπλοκα ψευδαργύρου (4-7).

Κατά αντιστοιχία με τα παραπάνω, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της επίδρασης των νεοσυντιθέμενων συμπλόκων ψευδαργύρου της δεύτερης ομάδας στα επίπεδα κυτταρικής βιωσιμότητας για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (48 ώρες). Πιο αναλυτικά, η ένωση 4 παρουσιάζει σε συγκέντρωση 1 µM ποσοστό μείωσης της κυτταρικής επιβίωσης κατά 10.5%, σε συγκέντρωση 10 µM ποσοστό μείωσης της βιωσιμότητας των κυττάρων κατά 27%, σε συγκέντρωση 25 µM ποσοστό μείωσης κατά 32% ενώ σε συγκέντρωση 100 µM το ποσοστό επιβίωσης μειώνεται κατά 83% σε σχέση με τον φυσιολογικό μάρτυρα ($p < 0.05$). Η ένωση 5 σε συγκέντρωση 1 µM μειώνει τα επίπεδα κυτταρικής επιβίωσης ~ 15% σε συγκεντρώσεις έως και 25 µM ενώ το ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης μειώνεται κατά 42% σε συγκέντρωση 100 µM. Η ένωση 6 φαίνεται να μην είναι ιδιαίτερα τοξική μετα ποσοστά της επιβίωσης

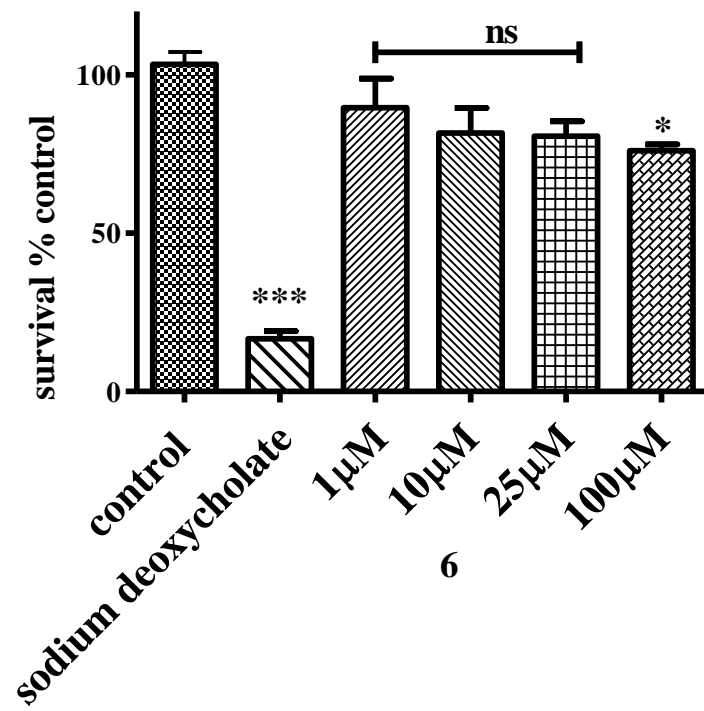
των κυττάρων να μειώνονται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 100 μM . Τέλος, η ένωση 7 φαίνεται ατοξική σε συγκεντρώσεις έως και 25 μM ενώ σε συγκέντρωση μεγαλύτερη των 100 μM τα ποσοστά επιβίωσης των κυττάρων μειώνονται κατά 38% σε σχέση με τον φυσιολογικό μάρτυρα ($p < 0.05$).



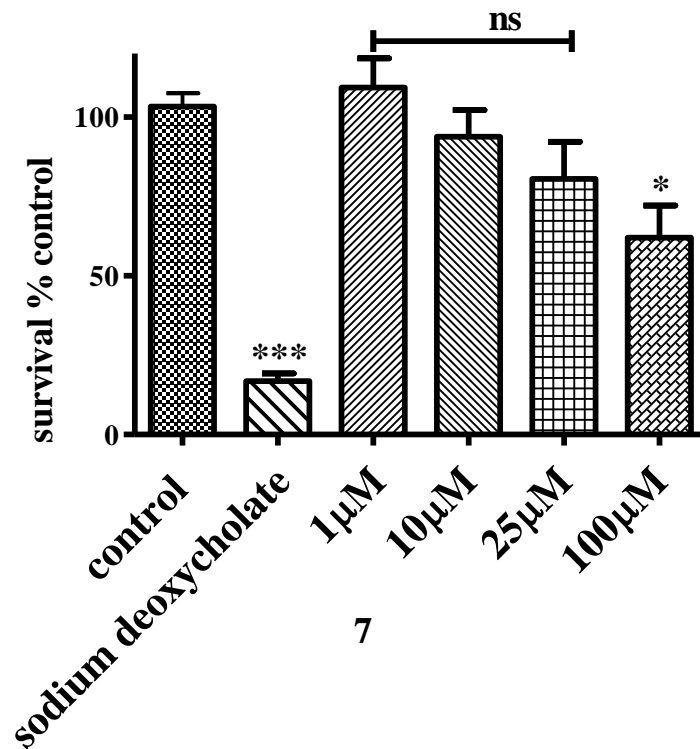
A



B



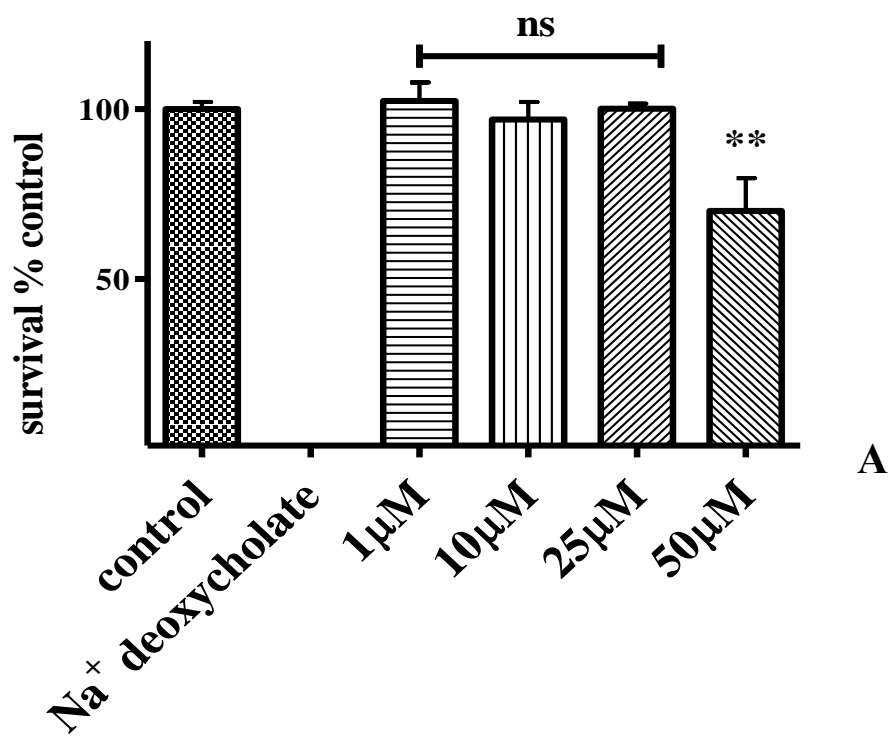
Г

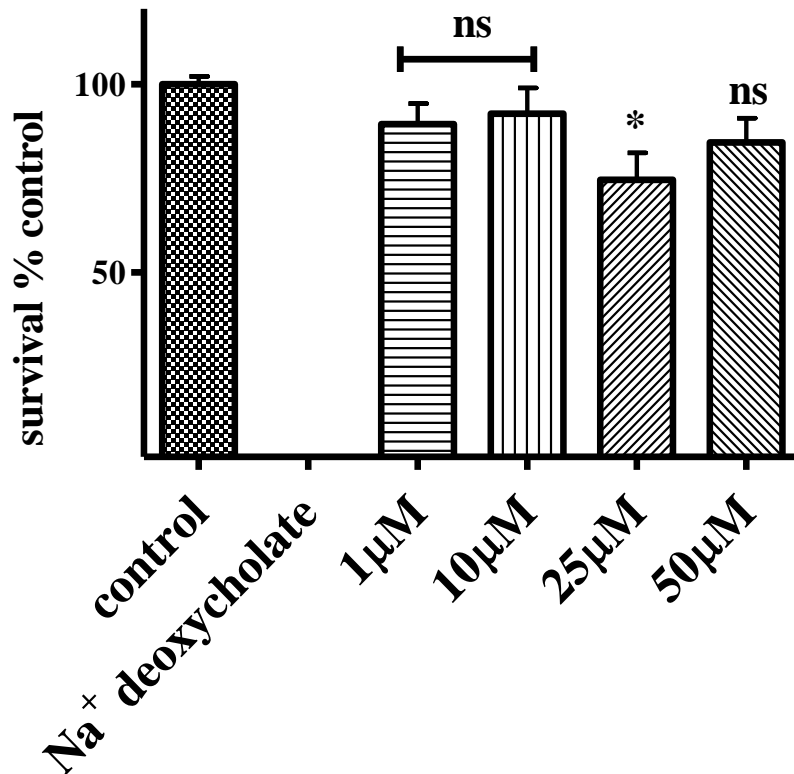


Εικόνα 3.1.7. Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των προ-λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με την ένωση 4 (Α), 5 (Β), 6 (Γ) και 7 (Δ) σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

3.1.8. Μέτρηση της βιωσιμότητας των ώριμων λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με τα νεοσυντιθέμενα μεταλλο-σύμπλοκα ψευδαργύρου (1-2).

Στη συνέχεια κρίθηκε απαραίτητη η διερεύνηση της ενδεχόμενης τοξικής δράσης των νεοσυντιθέμενων μεταλλο-συμπλόκων **1** και **2** μετά από μακρά διέγερση των ώριμων λιποκυττάρων. Για τον σκοπό αυτό, ώριμα λιποκύτταρα τα οποία βρίσκονταν στην 8^η μέρα της διαφοροποίησης τους με κύριο διαφοροποιητικό παράγοντα την ινσουλίνη όπως αναφέρεται και παραπάνω, διεγέρθηκαν με τις ενώσεις **1** και **2** για 48 ώρες σε συγκεντρώσεις 1, 10, 25 και 50 μM . Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.1.8 και οι δύο ενώσεις είναι ατοξικές σε σχέση με τον μάρτυρα με την οποία τοξική δράση να εμφανίζεται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από τα 50 μM .



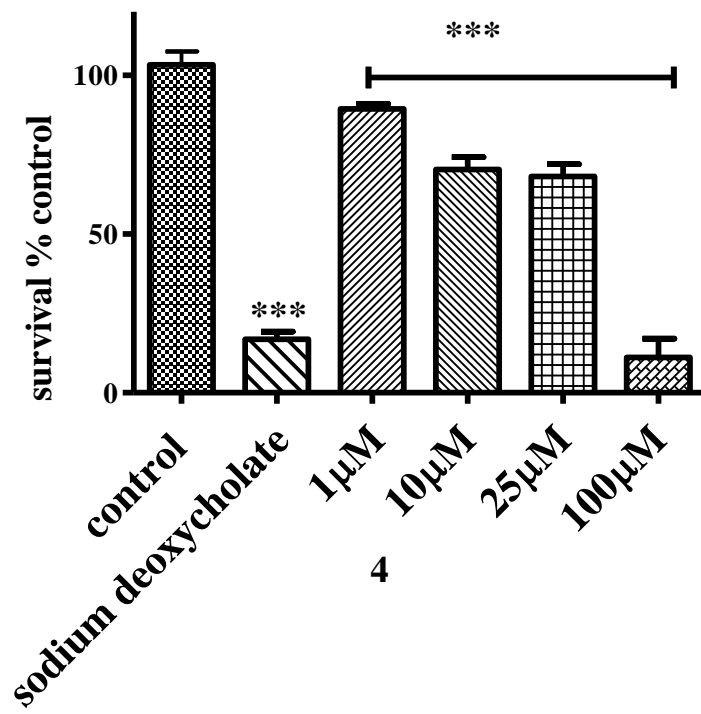


B

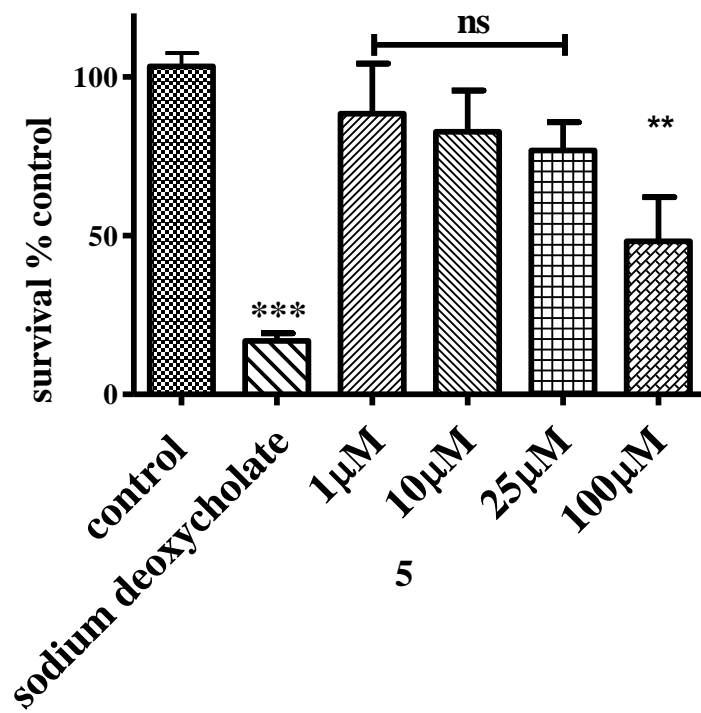
Εικόνα 3.1.8 Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των ώριμων λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με την ένωση 1 (A) και 2 (B) σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με τον μέσο όρο.

3.1.9. Μέτρηση της βιωσιμότητας των ώριμων λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με τα νεοσυντιθέμενα μεταλλο-σύμπλοκα ψευδαργύρου (4-7).

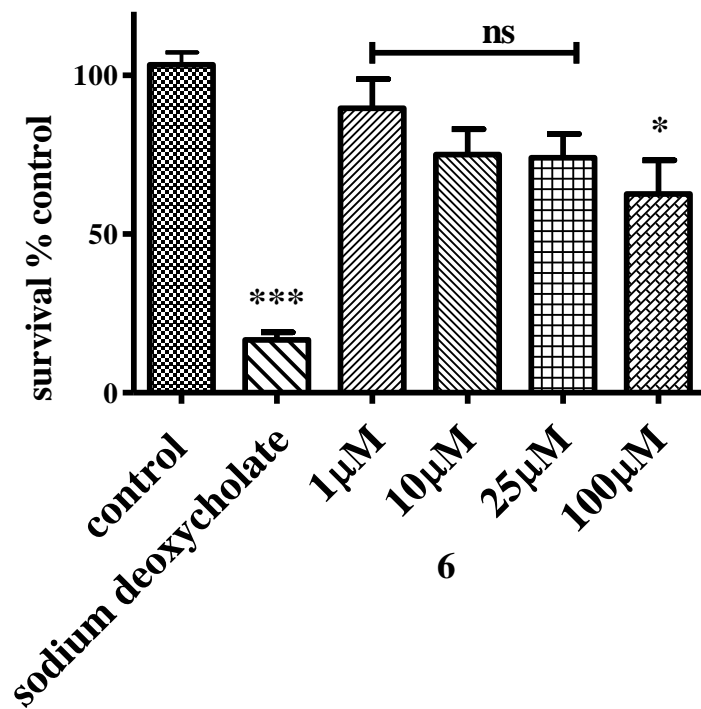
Στη συνέχεια κρίθηκε απαραίτητη η διερεύνηση της ενδεχόμενης τοξικής δράσης των νεοσυντιθέμενων μεταλλο-συμπλόκων 4 -7 μετά από μακρά διέγερση ώριμων λιποκυττάρων. Για τον σκοπό αυτό, ώριμα λιποκύτταρα τα οποία βρίσκονταν στην 8^η μέρα της διαφοροποίησης τους με κύριο διαφοροποιητικό παράγοντα την ινσουλίνη όπως αναφέρεται και παραπάνω, διεγέρθηκαν με τις ενώσεις 4-7 για 48 ώρες σε συγκεντρώσεις 1, 10, 25 και 50 μM. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.1.9 παρατηρείται ήπια μείωση της κυτταρικής επιβίωσης των ώριμων λιποκυττάρων σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα, για την ίδια χρονική διάρκεια διέγερσης (48 ώρες), των πρώιμων λιποκυττάρων.



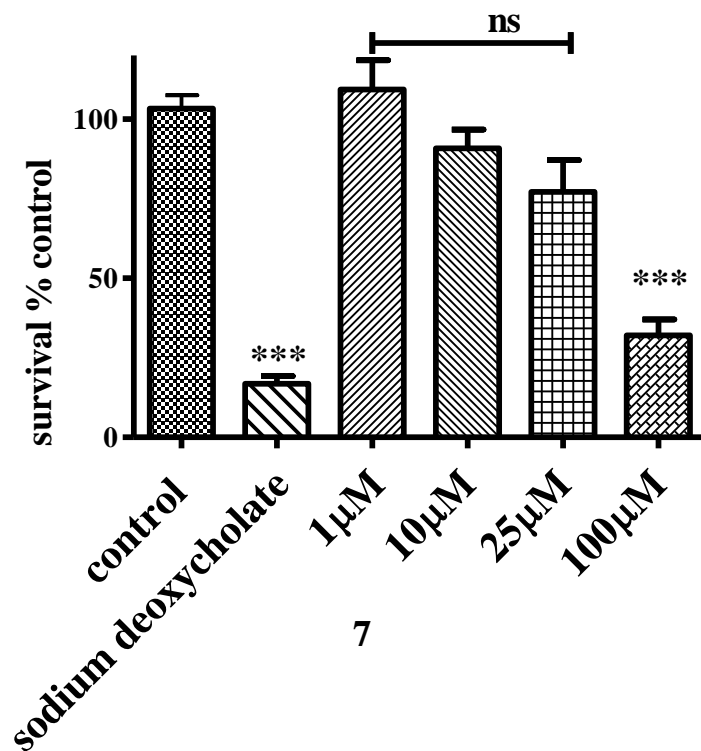
A



B



Γ

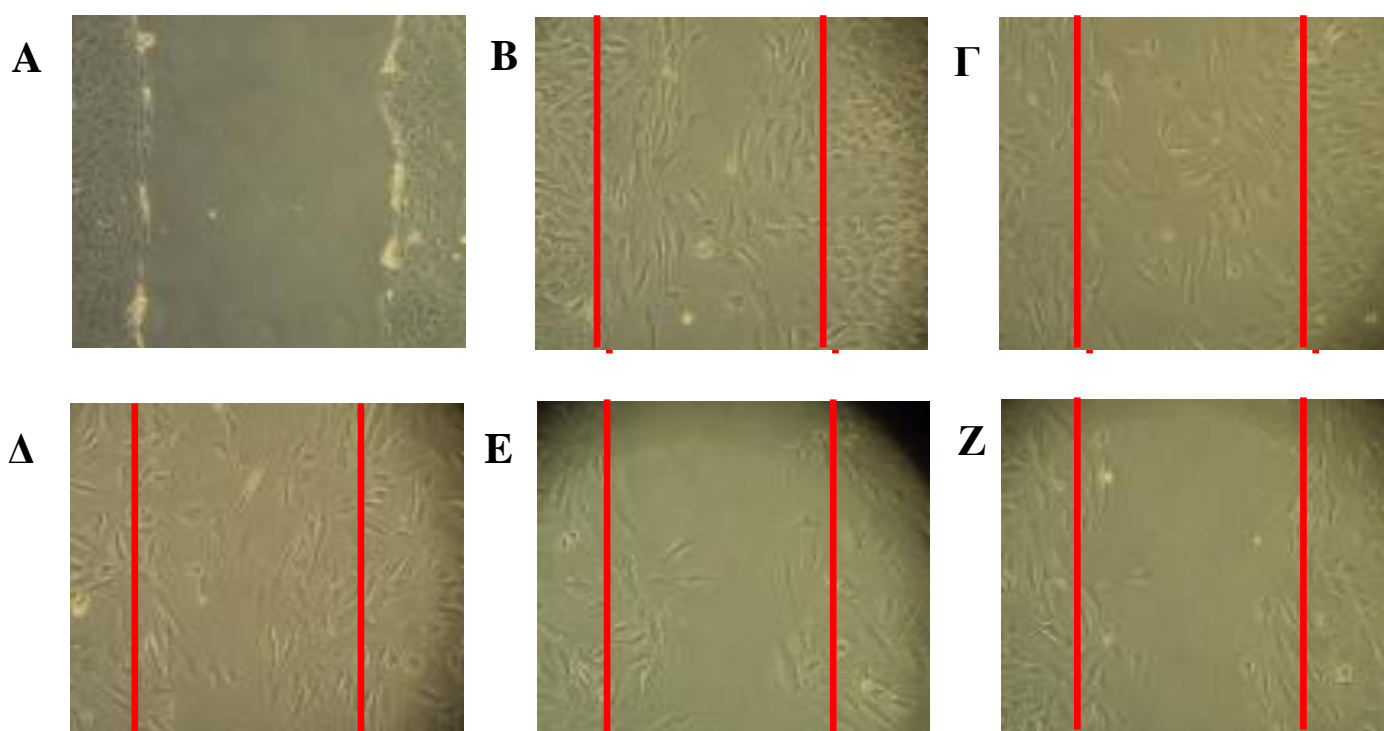


Δ

Εικόνα 3.1.9. Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των ώριμων λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με την ένωση 4 (Α), 5 (Β), 6 (Γ) και 7 (Δ) σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα

3.1.10. Ποιοτική εκτίμηση της αναστολής του μεταναστευτικού δυναμικού των προ-λιποκυττάρων μετά από διέγερση με τις ενώσεις 1 και 2 (*in vitro* scratch assay).

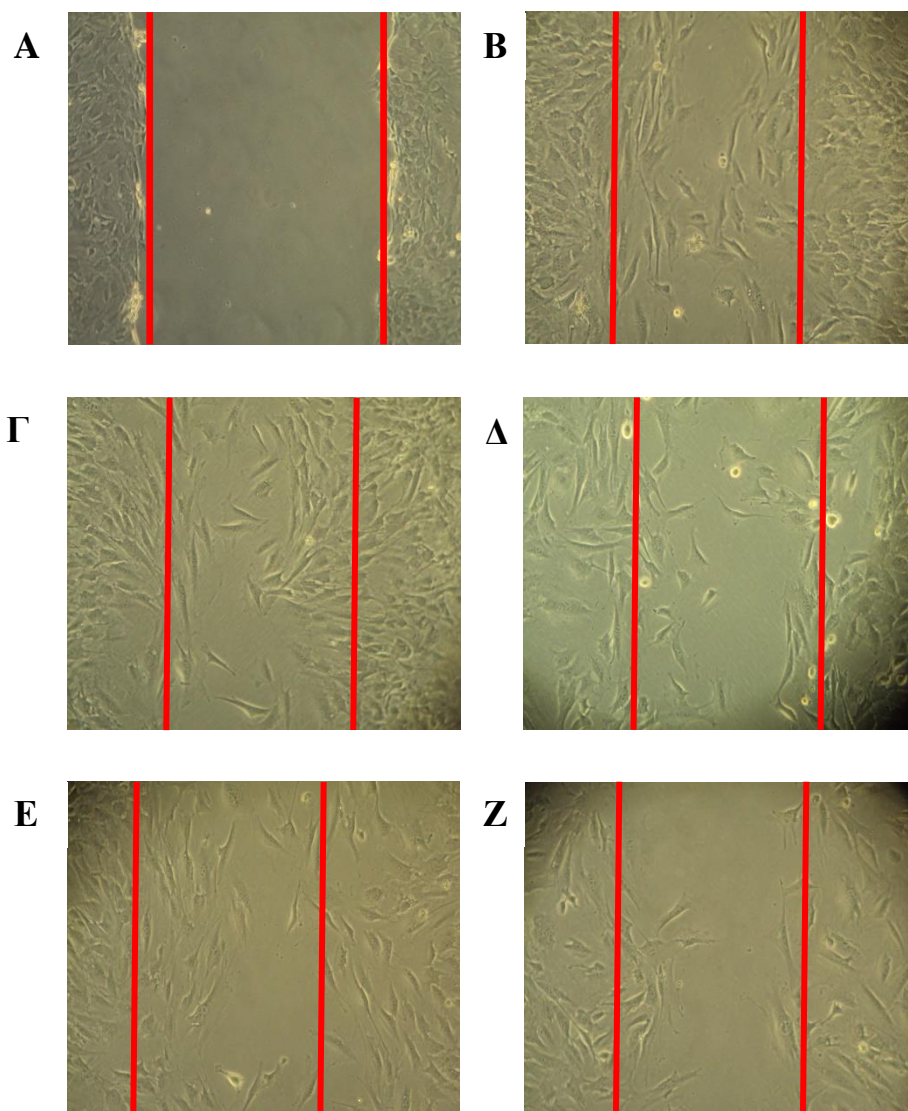
Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση των ενώσεων 1,2 και 3 στην φυσιολογική, ενδογενή μεταναστευτικότητα των 3T3-L1 προ-λιποκυττάρων πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη καλλιέργειας πυκνότητας 80-90 %. Την χρονική στιγμή $t=0$ η καλλιέργεια διακόπτεται μηχανικά και τα κύτταρα διεγείρονται με τις ενώσεις 1, 2 και 3 σε τελική συγκέντρωση 25 μM . Κύτταρα τα οποία επώαστηκαν μόνο παρουσία πλήρους θρεπτικού υλικού αποτελούν τον φυσιολογικό μάρτυρα. Μετά από 24 ώρες επώασης το κενό που δημιουργήθηκε μηχανικά τείνει να καλυφθεί στην περίπτωση όπου επικρατούν συνθήκες μάρτυρα. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.5 (10x 5 \times μεγέθυνση) οι ενώσεις 2 και 3 επιφέρουν σημαντική μείωση στη φυσιολογική μεταναστευτικότητα με την ένωση 3 να την αναστέλλει έως και πλήρως. Αντίθετα, η ένωση 1 παρουσιάζει εικόνα όμοια με αυτή του φυσιολογικού μάρτυρα έχοντας καμία επίδραση στο μεταναστευτικό δυναμικό των κυττάρων.



Εικόνα 3.1.10 Μικροφωτογραφία οπτικού μικροσκοπίου δείγματος καλλιέργειας πρώιμων λιποκυττάρων 3T3-L1 μετά από μηχανική διακοπή της φυσιολογικής συνέχειας της καλλιέργειας με σκοπό την ποιοτική εκτίμηση της ενδεχόμενης αναστολής της φυσιολογικής μεταναστευτικότητας των κυττάρων A) την χρονική στιγμή $t=0$, B, Γ) 24 ώρες μετά σε συνθήκες μάρτυρα, Δ) 24 ώρες μετά από έκθεση στην ένωση 1, E) 24 ώρες μετά από έκθεση στην ένωση 2, Z) 24 ώρες μετά από έκθεση στην ένωση 3 σε τελική συγκέντρωση 25 μM (10x 5 \times μεγέθυνση).

3.1.11. Ποιοτική εκτίμηση της αναστολής του μεταναστευτικού δυναμικού των προ-λιποκυττάρων μετά από διέγερση με τις ενώσεις 4-7 (*in vitro* scratch assay).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ποιοτική εκτίμηση της ενδεχόμενης αναστολής του μεταναστευτικού δυναμικού των προ-λιποκυττάρων και για τη δεύτερη ομάδα των νεοσυντιθέμενων συμπλόκων ψευδαργύρου. Όμοια, την χρονική στιγμή $t=0$ η καλλιέργεια διακόπτεται μηχανικά και τα κύτταρα διεγείρονται με τις ενώσεις **4**, **5**, **6** και **7** σε τελική συγκέντρωση 20 μM . Κύτταρα τα οποία επώαστηκαν μόνο παρουσία πλήρους θρεπτικού υλικού αποτελούν τον φυσιολογικό μάρτυρα. Μετά από 24 ώρες επώασης το κενό που δημιουργήθηκε τείνει να καλυφθεί στην περίπτωση σε συνθήκες μάρτυρα. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.1.11 (10x 5 \times μεγέθυνση) η ένωση **4** δεν έχει σχεδόν καμία επίδραση στην φυσιολογική μεταναστευτικότητα των προ-λιποκυττάρων. Οι ενώσεις **5** και **6** επιφέρουν ήπια μείωση στη φυσιολογική μεταναστευτικότητα σε σχέση με τον φυσιολογικό μάρτυρα ενώ η ένωση **7** την αναστέλλει έως και πλήρως.



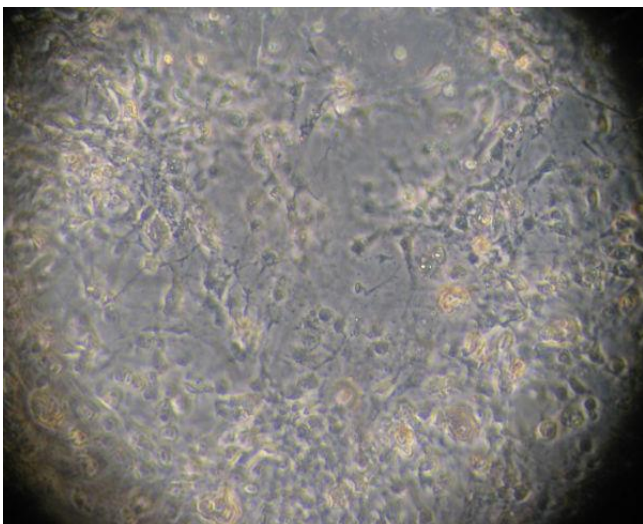
Εικόνα 3.1.11 Μικροφωτογραφία οπτικού μικροσκοπίου δείγματος καλλιέργειας πρώιμων λιποκυττάρων 3T3-L1 μετά από μηχανική διακοπή της φυσιολογικής συνέχειας της καλλιέργειας με σκοπό την ποιοτική εκτίμηση της ενδεχόμενης αναστολής της φυσιολογικής μεταναστευτικότητας των κυττάρων Α) την χρονική στιγμή $t=0$, Β) 24 ώρες μετά σε συνθήκες μάρτυρα, Γ) 24 ώρες μετά από έκθεση στην ένωση 4 , Δ) 24 ώρες μετά από έκθεση στην ένωση 5, Ε) 24 ώρες μετά από έκθεση στην ένωση 6, Ζ) 24 ώρες μετά από έκθεση στην ένωση 7 σε τελική συγκέντρωση 20 μM (10x 5 \times μεγέθυνση).

3.2. Αποτελέσματα κυτταρικής διαφοροποίησης

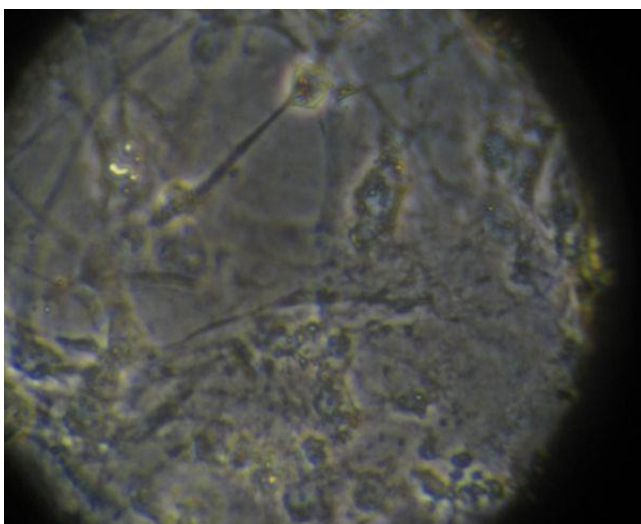
3.2.1. Διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα με τις ενώσεις 1 και 2 (oil red O staining)

Για την *in vitro* αξιολόγηση της ινσουλινομιμητικής δράσης των ενώσεων **1** και **2** πρόιμα λιποκύτταρα διαφοροποιήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε παραπάνω αντικαθιστώντας την ινσουλίνη με τις υπό μελέτη ενώσεις ή παρέχοντας τα σε συνδυασμό με αυτή. Πιο συγκεκριμένα, οι ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν σε εύρος συγκεντρώσεων από 1-25 μM και η ινσουλίνη σε αναλογία 1ng/mL. Για τον έλεγχο της επιτυχούς επαγωγής τη διαφοροποίησης με τις υπό μελέτη ενώσεις πραγματοποιήθηκε ειδική χρώση των λιπιδίων κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.6 η διαφοροποίηση είναι εμφανής ήδη από τις χαμηλές συγκεντρώσεις (0.5 μM). Κύτταρα διαφοροποιημένα με ινσουλίνη αποτελούν τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Η διαφοροποίηση η οποία επάγεται τόσο από την ένωση **1** όσο και από την ένωση **2** παρουσιάζει δοσο-εξαρτώμενο τρόπο με το φαινόμενο να παρουσιάζει το μέγιστο αποτέλεσμα σε συγκέντρωση 25 μM .

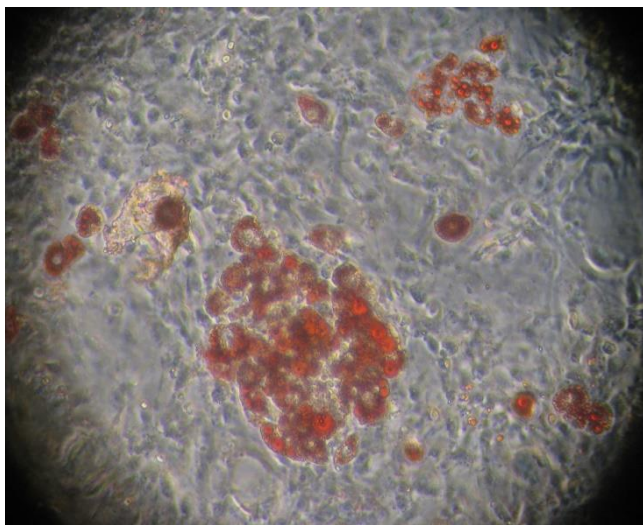
A



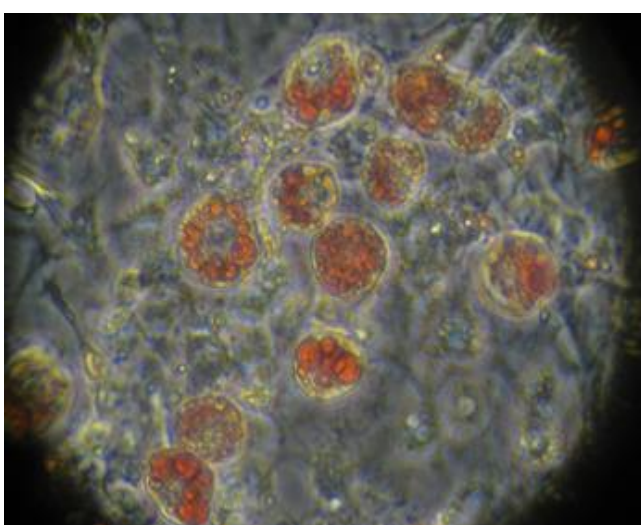
B

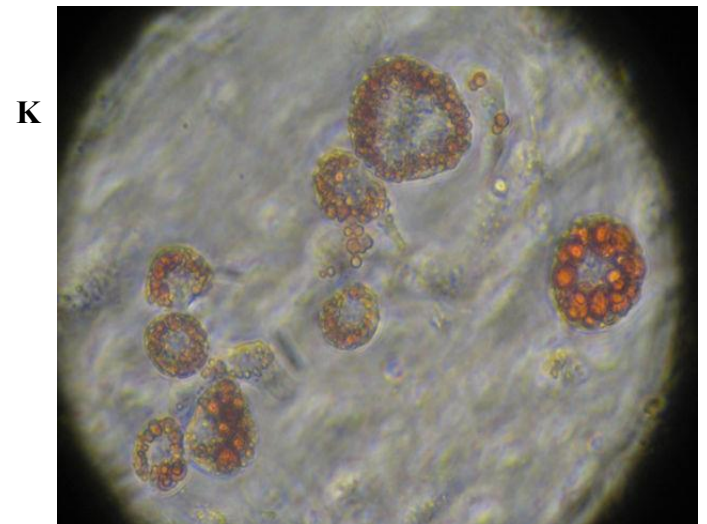
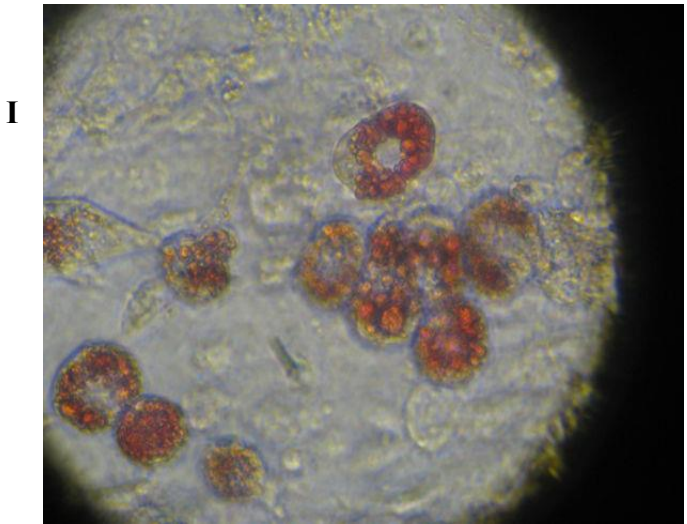
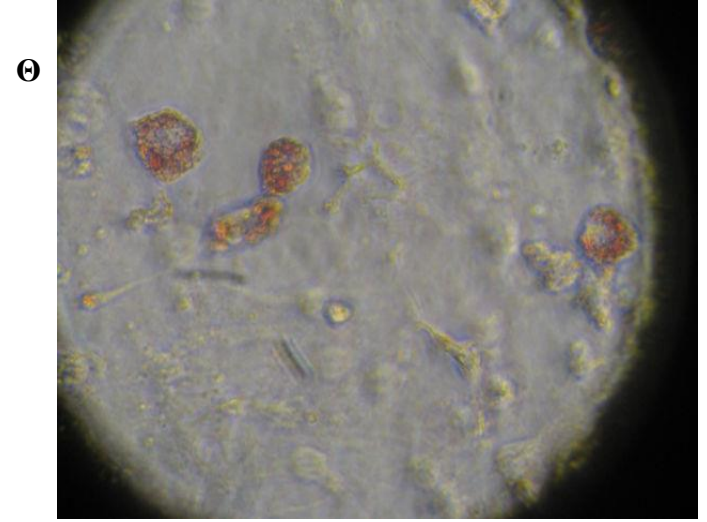
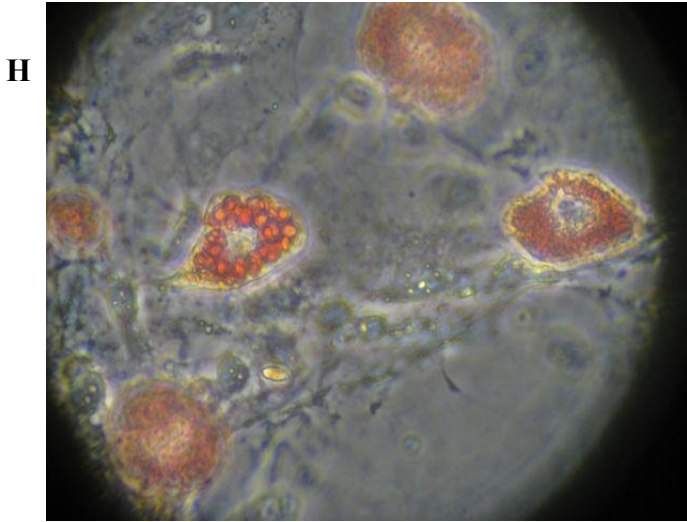
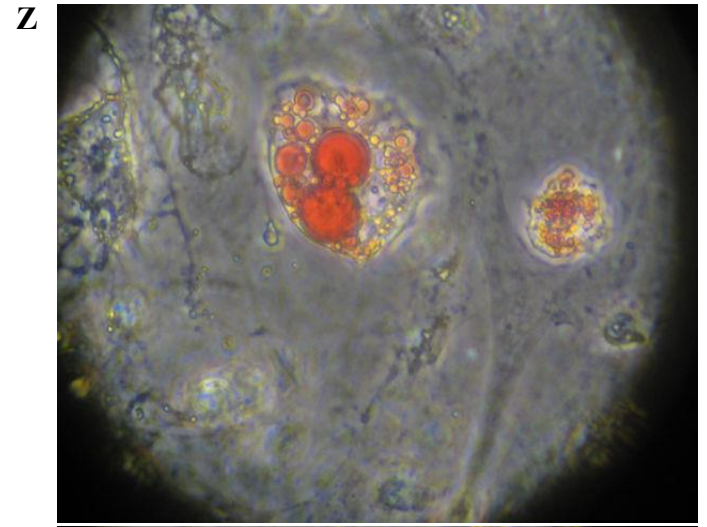
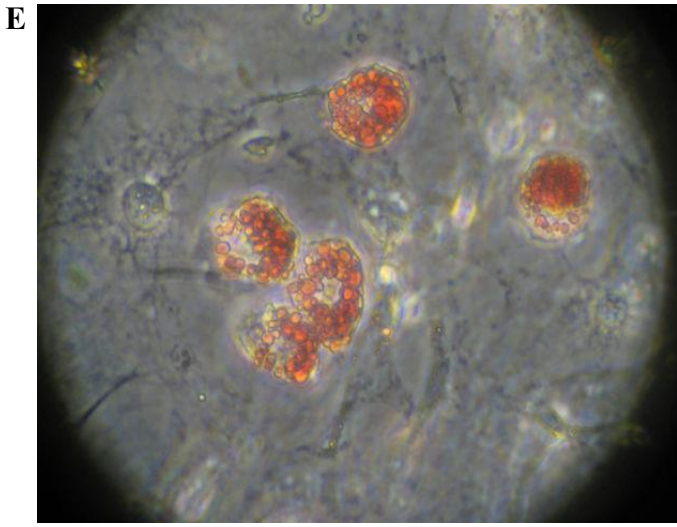


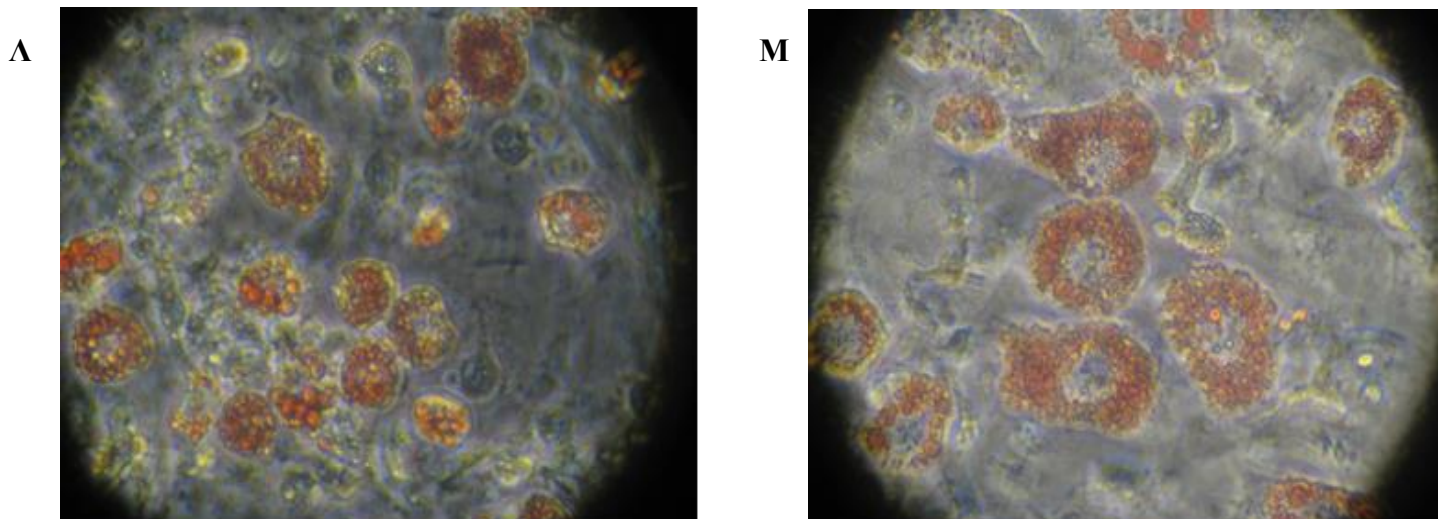
Г



Δ



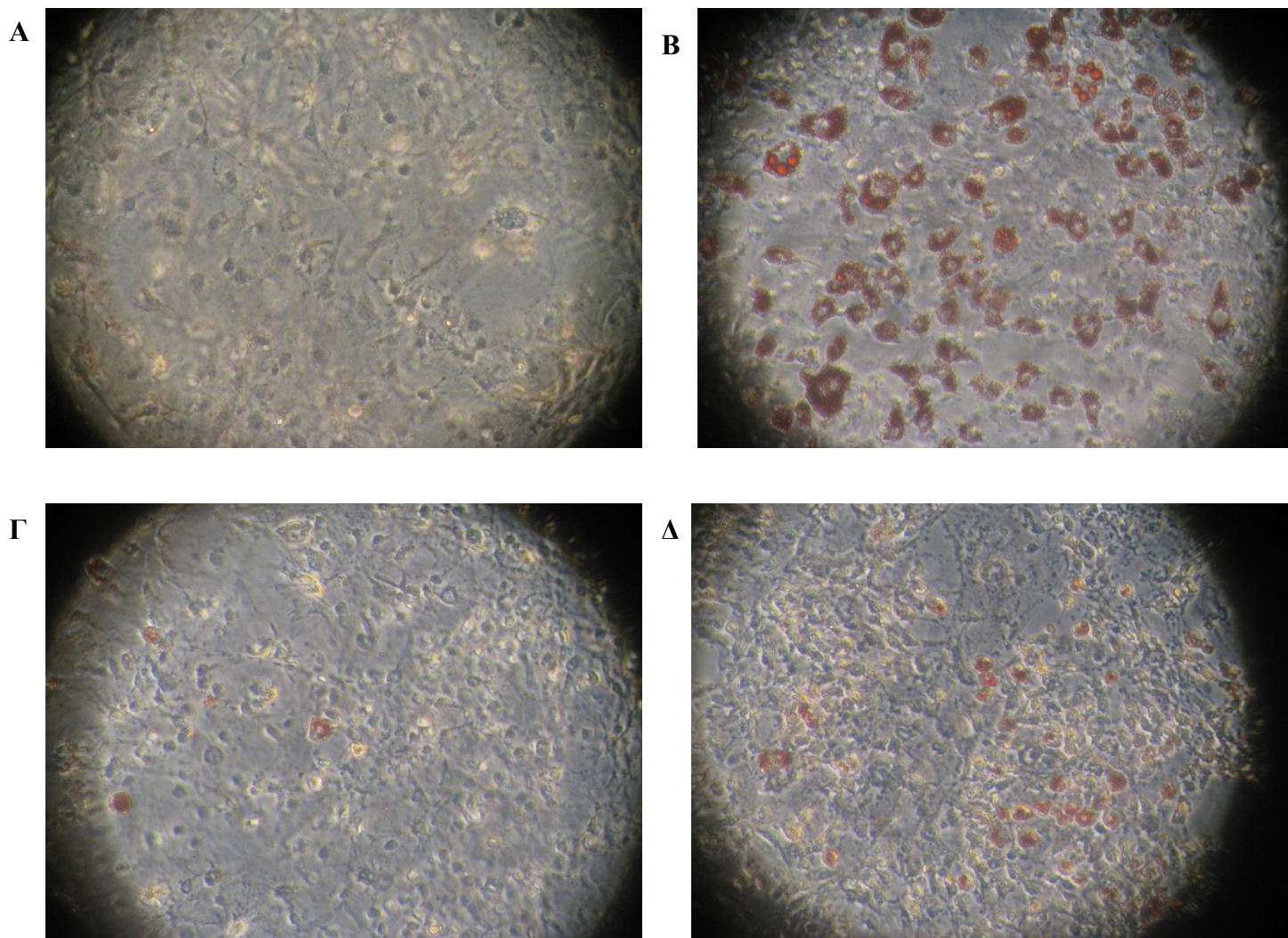


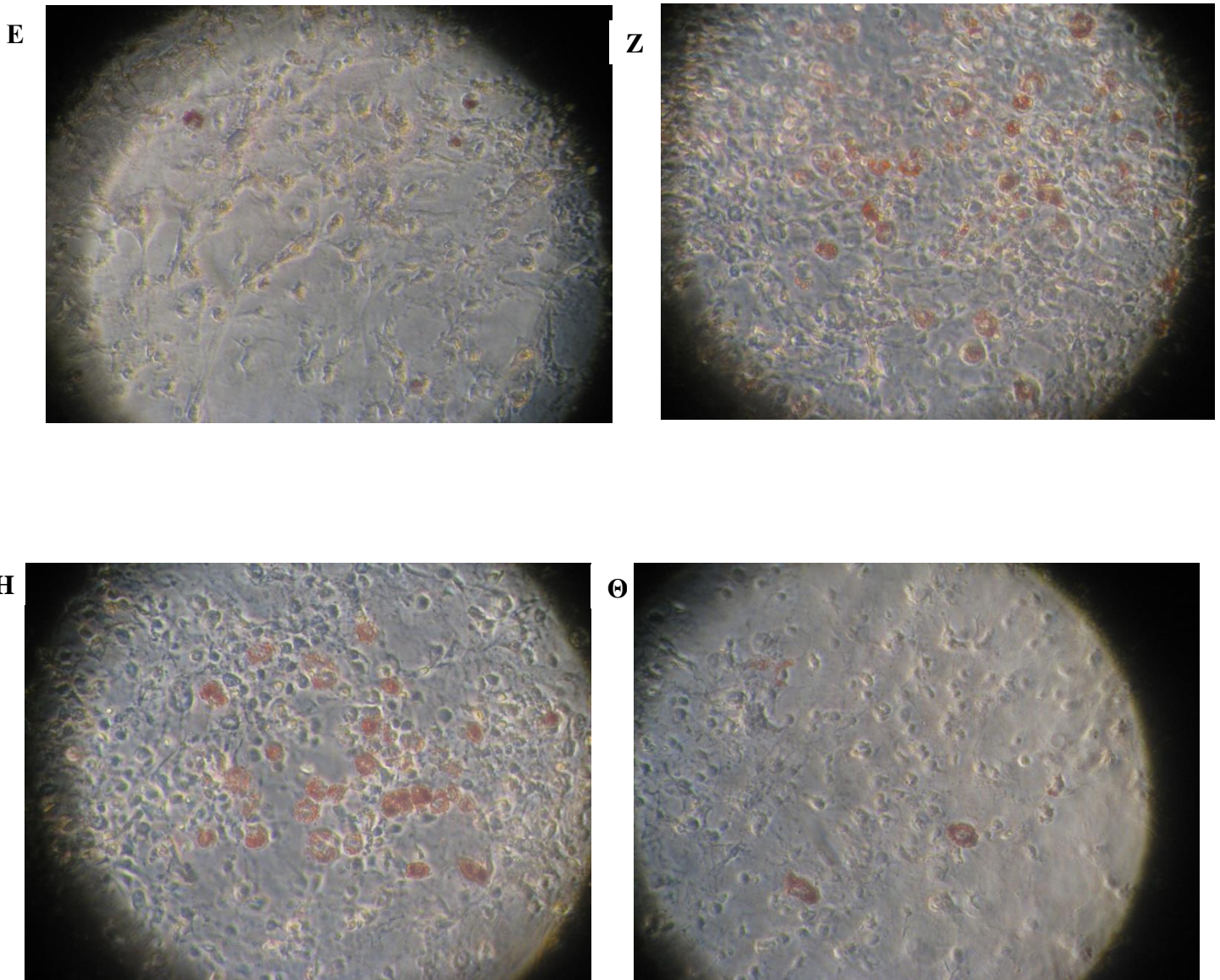


Εικόνα 3.2.1 Μικροφωτογραφίες οπτικού μικροσκοπίου δείγματος καλλιέργειας πρώιμων λιποκυττάρων 3T3-L1 κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης μετά από ειδική χρώση των σχηματιζόμενων λιπιδίων με oil red O staining A, B) μη διαφοροποιημένα κύτταρα (προλιποκύτταρα), Γ, Δ) διαφοροποιημένα με ινσουλίνη (θετικός μάρτυρας) Ε) διαφοροποιημένα με την ένωση 1 σε συγκέντρωση 0.5 μM, Ζ) διαφοροποιημένα με την ένωση 2 σε συγκέντρωση 0,5 μM, Η) διαφοροποιημένα με την ένωση 1 σε συγκέντρωση 1 μM, Θ) διαφοροποιημένα με την ένωση 2 σε συγκέντρωση 1 μM, Ι) διαφοροποιημένα με την ένωση 1 σε συγκέντρωση 10 μM και Κ) διαφοροποιημένα με την ένωση 2 σε συγκέντρωση 10μM Λ) διαφοροποιημένα με την ένωση 1 σε συγκέντρωση 25 μM Μ) διαφοροποιημένα με την ένωση 2 σε συγκέντρωση 25 μM (10x 4× μεγέθυνση).

3.2.2. Διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα με τις ενώσεις 4-7 (oil red O staining)

Όμοια, για την *in vitro* αξιολόγηση της ινσουλινομιμητικής δράσης των ενώσεων 4-7, πρώιμα λιποκύτταρα διαφοροποιήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε παραπάνω αντικαθιστώντας την ινσουλίνη με τις υπό μελέτη ενώσεις ή σε συνδυασμό με αυτή. Οι ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν σε εύρος συγκεντρώσεων από 1-20 μM και η ινσουλίνη σε αναλογία 1ng/mL . Για τον έλεγχο της επιτυχούς επαγωγής τη διαφοροποίησης με τις υπό μελέτη ενώσεις πραγματοποιήθηκε ειδική χρώση των λιπιδίων κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.2.2

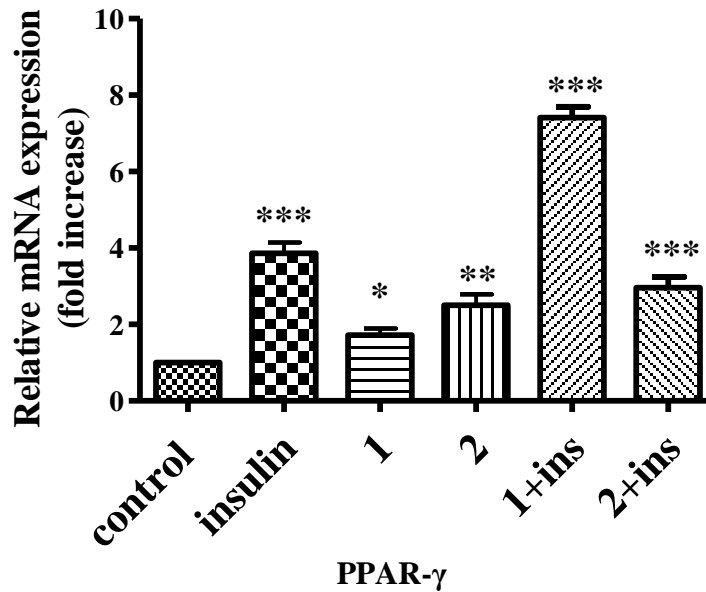




Εικόνα 3.2.2 Μικροφωτογραφίες οπτικού μικροσκοπίου δείγματος καλλιέργειας πρώιμων λιποκυττάρων 3T3-L1 κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης μετά από ειδική χρώση των σχηματιζόμενων λιπιδίων με oil red O staining A) μη διαφοροποιημένα κύτταρα (προ-λιποκύτταρα), B) διαφοροποιημένα με ινσουλίνη (θετικός μάρτυρας), Γ) διαφοροποιημένα με την ένωση 4 σε συγκέντρωση 25 μ M, Δ) διαφοροποιημένα με την ένωση 4 σε συγκέντρωση 25 μ M σε συνδυασμό με την ινσουλίνη, E) διαφοροποιημένα με την ένωση 5 σε συγκέντρωση 25 μ M, Z) την ένωση 5 σε συγκέντρωση 25 μ M σε συνδυασμό με την ινσουλίνη, H) διαφοροποιημένα με την ένωση 6 σε συγκέντρωση 25 μ M, και Θ) την ένωση 6 σε συγκέντρωση 25 μ M σε συνδυασμό με την ινσουλίνη I) διαφοροποιημένα με την ένωση 7 σε συγκέντρωση 25 μ M, K) διαφοροποιημένα με την ένωση 7 σε συγκέντρωση 25 μ M σε συνδυασμό με την ινσουλίνη (10x 4 \times μεγέθυνση).

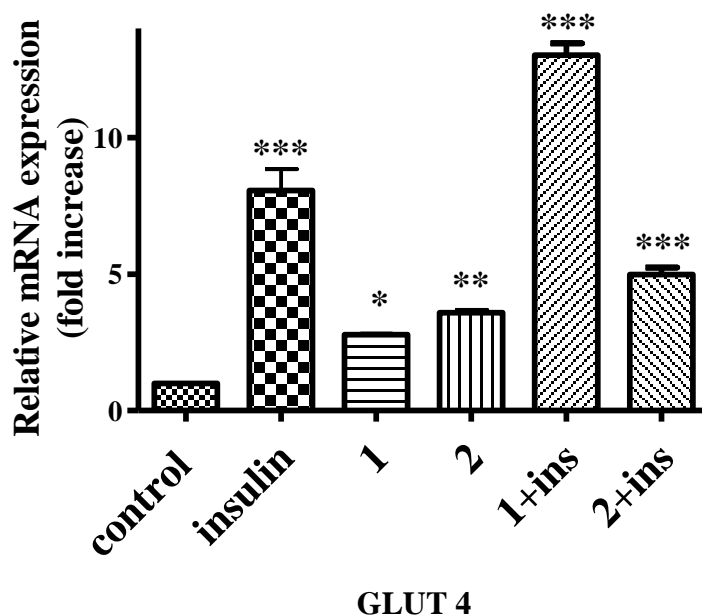
3.2.3. Διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα με τις ενώσεις 1 και 2 (RT-PCR)

Ο έλεγχος της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα πραγματοποιείται επιπρόσθετα με την εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης γονιδίων τα οποία είτε σχετίζονται με την επαγωγή της διαφοροποίησης (PPAR- γ), είτε αποτελούν ιστοειδικούς δείκτες των ώριμων λιποκυττάρων (GLUT 4). Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης εκτιμώνται με την βοήθεια της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR, real time polymerase chain reaction). Για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκε η μέγιστη συγκέντρωση των ενώσεων 1 και 2 όπου με βάση την ειδική χρώση των λιπιδίων διαπιστώθηκε και το μέγιστο αποτέλεσμα. Κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης απομονώνεται το ολικό RNA από τα κύτταρα (πρώιμα και ώριμα) έπειτα από καλλιέργεια για οκτώ μέρες και στη συνέχεια το mRNA αντιγράφεται σε cDNA το οποίο πολλαπλασιάζεται με την επακόλουθη αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης. Κύτταρα διαφοροποιημένα με ινσουλίνη αποτέλεσαν τον θετικό μάρτυρα ενώ ως επιπλέον μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν με διαφοροποιημένα κύτταρα. Αρχικά, ελέχθησαν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου PPAR- γ το οποίο είναι υπεύθυνο για την επαγωγή της διαφοροποίησης δρώντας ως μεταγραφικός παράγοντας πολλών γονιδίων υπεύθυνων για την επιτυχή διαφοροποίηση των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα μεταξύ αυτών και του ιστοειδικού για τα ώριμα λιποκύτταρα γλυκοζομεταφορέα GLUT 4. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.2.3A τόσο ένωση **1** όσο και η ένωση δύο επάγουν σημαντικά την έκφραση του γονιδίου PPAR- γ . Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι όταν τα πρώιμα λιποκύτταρα διαφοροποιήθηκαν συνδυαστικά με την ένωση **1** και την ινσουλίνη, η έκφραση του γονιδίου αυξάνεται πολλές φορές υποδεικνύοντας προσθετική ή συνεργική δράση. Αντίθετα στην περίπτωση της ένωσης **2** φαίνεται να μην υπάρχει καμία συνεργική αλλά ούτε και ανταγωνιστική δράση με την ινσουλίνη.



Εικόνα 3.2.3A Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την πολλαπλάσια έκφραση σε επίπεδο mRNA του γονιδίου PPAR- γ κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης με την ένωση 1 και 2 σε συγκέντρωση 25 μ M ή/και με ινσουλίνη σε αναλογία 10 ng/mL. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα

Επιπλέον, εκτός από την σχετική έκφραση του γονιδίου PPAR- γ , ελέγχθηκε και η έκφραση του ιστοειδικού γλυκοζομεταφορέα GLUT 4. Όπως και στην περίπτωση του γονιδίου PPAR- γ , οι ενώσεις 1 και 2 επάγουν την έκφραση του γονιδίου του γλυκοζομεταφορέα GLUT 4 σε σχέση με τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (3 και 4 φορές περισσότερο αντίστοιχα σε σχέση με τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα). Επιπρόσθετα, η ένωση 1 παρουσιάζει και εδώ προσθετική ή συνεργική δράση με την ινσουλίνη καθώς όταν χρησιμοποιούνται συνδυαστικά για την επαγωγή της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων επιφέρουν πολλαπλάσιο αποτέλεσμα σε σχέση τόσο με τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα αλλά και με την ίδια την ένωση ή την ινσουλίνη από μόνη της. Η ένωση 2 φαίνεται να μην δρα συνεργικά με την ινσουλίνη καθώς τα επίπεδα έκφρασης είναι ίδια με αυτά όταν είτε η ίδια η ένωση είτε η ινσουλίνη χρησιμοποιούνται από μόνες τους για την επαγωγή της διαφοροποίησης.

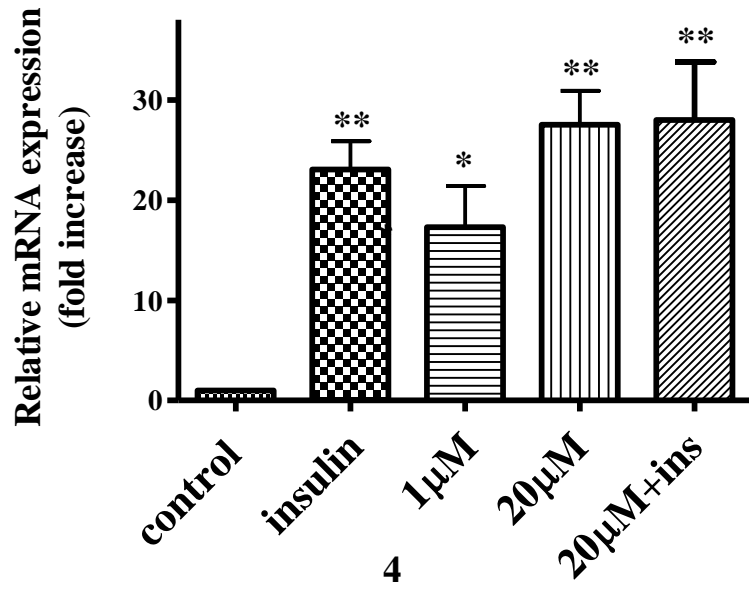


Εικόνα 3.2.3B Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την πολλαπλάσια έκφραση σε επίπεδο mRNA του γονιδίου GLUT 4 κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης με την ένωση 1 και 2 σε συγκέντρωση 25 μM ή/και με ινσουλίνη σε αναλογία 10 ng/ml. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα

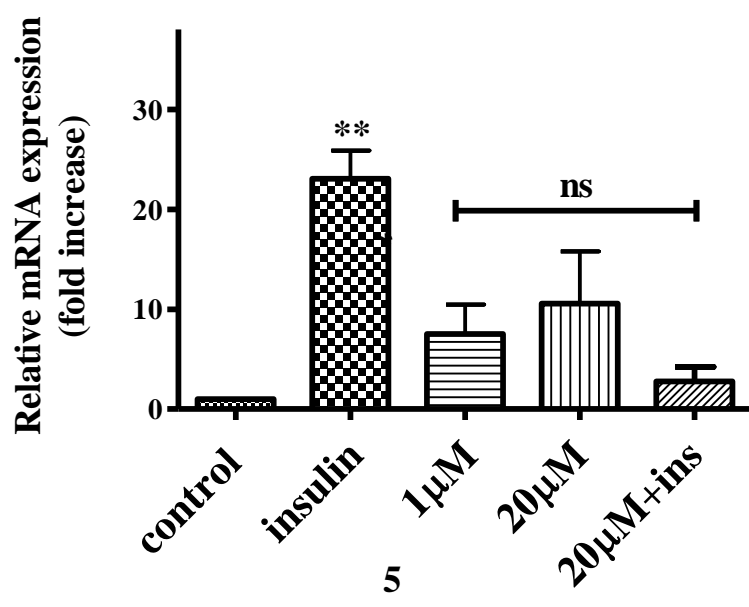
3.2.4. Διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα με τις ενώσεις 4-7 (RT-PCR)

Όμοια, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα και για την δεύτερη ομάδα (4-7) των ενώσεων του Zn(II) με χρήση της real-time PCR. Πιο συγκεκριμένα, έγινε ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του mRNA των ιστο-ειδικών γονιδίων PPAR- γ και GLUT 4. Οι ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν σε δύο συγκεντρώσεις (1 μM και 20 μM) ενώ η μέγιστη συγκέντρωση των 20 μM χρησιμοποιήθηκε επιπλέον σε συνδυασμό με την ινσουλίνη (10ng/mL). Το ολικό mRNA των κυττάρων απομονώθηκε την 8^η μέρα της διαφοροποίησης. Κύτταρα διαφοροποιημένα με ινσουλίνη αποτέλεσαν τον θετικό μάρτυρα ενώ ως επιπλέον μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν με διαφοροποιημένα κύτταρα. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.2.8.1 η ένωση 4 επάγει την έκφραση του PPAR- γ 17 φορές σε σχέση με τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα σε συγκέντρωση 1 μM και 27,5 φορές σε συγκέντρωση 20 μM . Η συνδυαστική της δράση με την

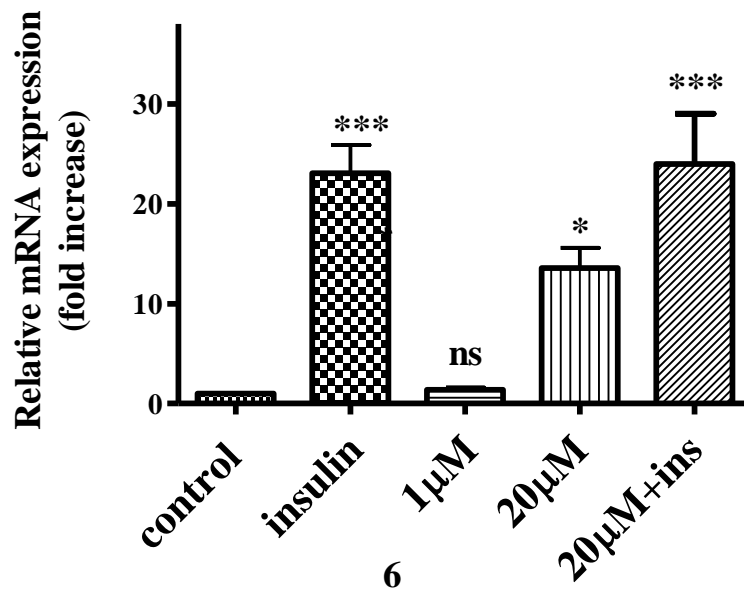
ινσουλίνη επιφέρει την ίδια αύξηση με το σύμπλοκο από μόνο του στην ίδια συγκέντρωση υποδεικνύοντας ότι δεν δρα συνεργικά με την ινσουλίνη. Η ένωση **5** επάγει την έκφραση του PPAR- γ σε χαμηλά επίπεδα σε σχέση με μη διαφοροποιημένα κύτταρα (7 και 10 φορές στις συγκεντρώσεις 1 και 20 μ M αντίστοιχα) ωστόσο σε σχέση με την ινσουλίνη (23 φορές σε σχέση με μη διαφοροποιημένα κύτταρα) φαίνεται πως δεν επάγει σημαντικά την έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου. Αντίστοιχα, η ένωση **6** φαίνεται να επάγει την έκφραση του PPAR- γ με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο (1.3 και 13.5 στις συγκεντρώσεις 1 και 20 μ M αντίστοιχα) σε σχέση με τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα ωστόσο δεν φτάνει τα επίπεδα του θετικού μάρτυρα. Τέλος, η ένωση **7** φαίνεται πως δεν επάγει σημαντικά την έκφραση του PPAR- γ όσο αυξάνεται η συγκέντρωσή της ενώ αξίζει να αναφερθεί ότι ενδεχομένως δρα ανασταλτικά ως προς την δράση της ινσουλίνης καθώς όταν χρησιμοποιείται συνδυαστικά με αυτή τα επίπεδα έκφρασης του PPAR- γ είναι ιδιαίτερα χαμηλά (~4).



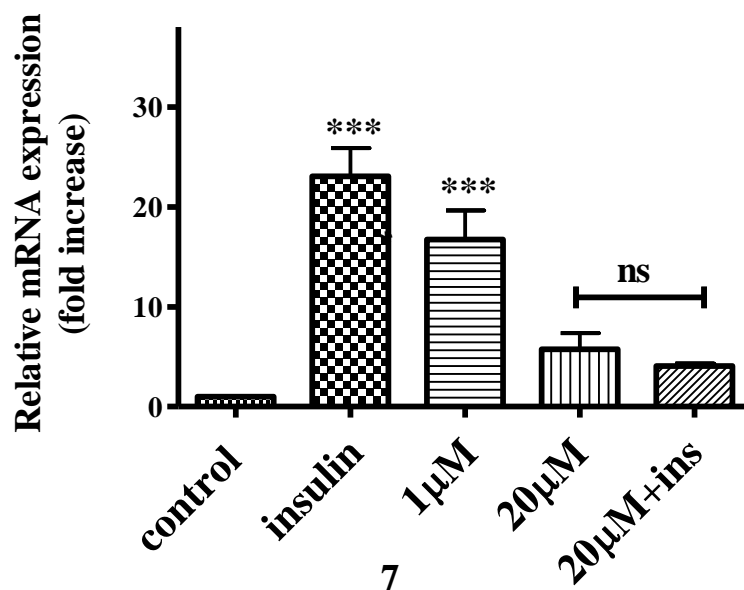
A



B



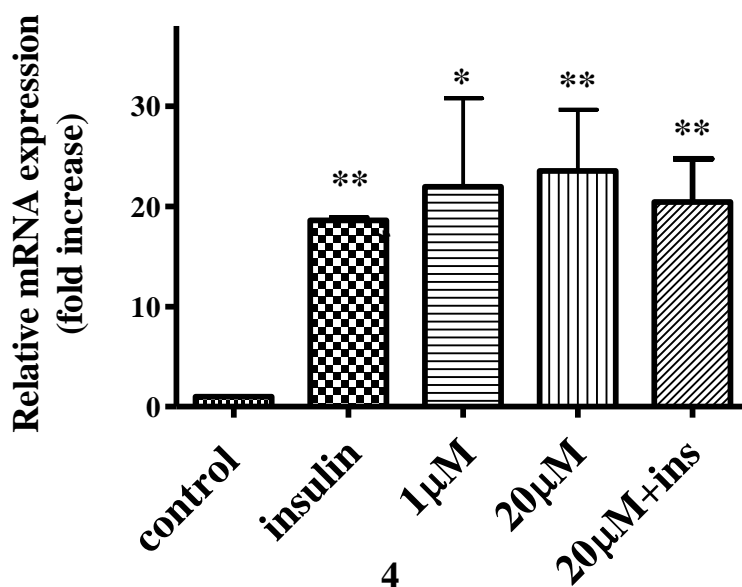
Γ



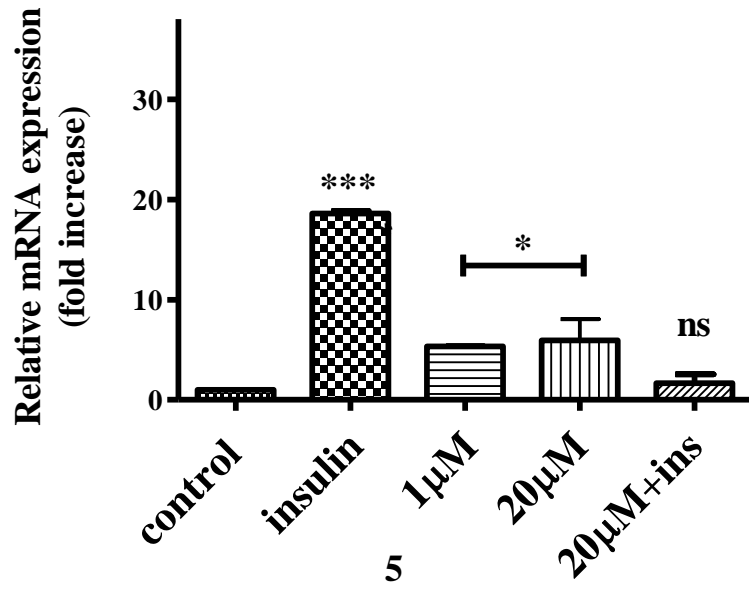
Δ

Εικόνα 3.2.4Α Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την πολλαπλάσια έκφραση σε επίπεδο mRNA του γονιδίου PPAR-γ κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης με τις ενώσεις 4 (Α), 5 (Β), 6 (Γ) και 7 (Δ) σε συγκεντρώσεις 1-20 μM ή/και με ισολίνη σε αναλογία 10 ng/ml. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα

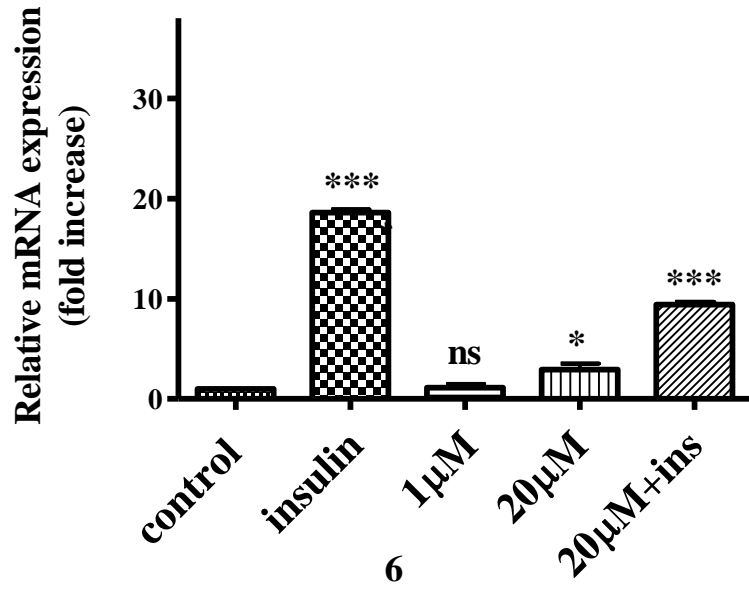
Επιπλέον, εξετάστηκε η έκφραση του ιστο-ειδικού γλυκοζομεταφορέα GLUT 4. Η ένωση 4 επάγει την έκφραση του GLUT 4 με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο χωρίς ωστόσο η δράση της να είναι συνεργική με την ινσουλίνη (εικόνα 3.2.8.2). Πιο συγκεκριμένα, σε συγκέντρωση 1 μM η έκφραση του γονιδίου είναι 21 φορές υψηλότερη σε σχέση με τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα ενώ σε συγκέντρωση 20 μM τα επίπεδα έκφρασης είναι 23.5 φορές υψηλότερα. Η συνδυαστική δράση της ένωσης 4 επιφέρει ~20 φορές αύξηση του GLUT 4 όταν τα επίπεδα του θετικού μάρτυρα είναι ~18. Η ένωση 5 φαίνεται να μην επάγει την έκφραση του GLUT 4 καθώς τα επίπεδα της σχετικής έκφρασης είναι ιδιαίτερα χαμηλά. Η ένωση 6 φαίνεται πως επάγει με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο την έκφραση του GLUT 4 ωστόσο τα επίπεδα έκφρασης είναι ιδιαίτερα χαμηλά σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα. Τέλος η ένωση 7 επίσης δεν επάγει σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης του GLUT 4 ενώ φαίνεται να αναστέλλει την δράση της ινσουλίνης όπως και στην περίπτωση του PPAR- γ .



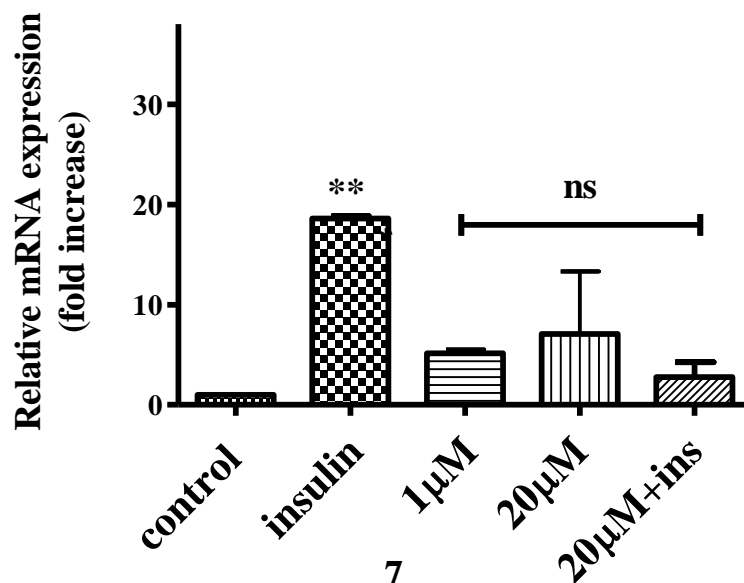
A



B



Γ

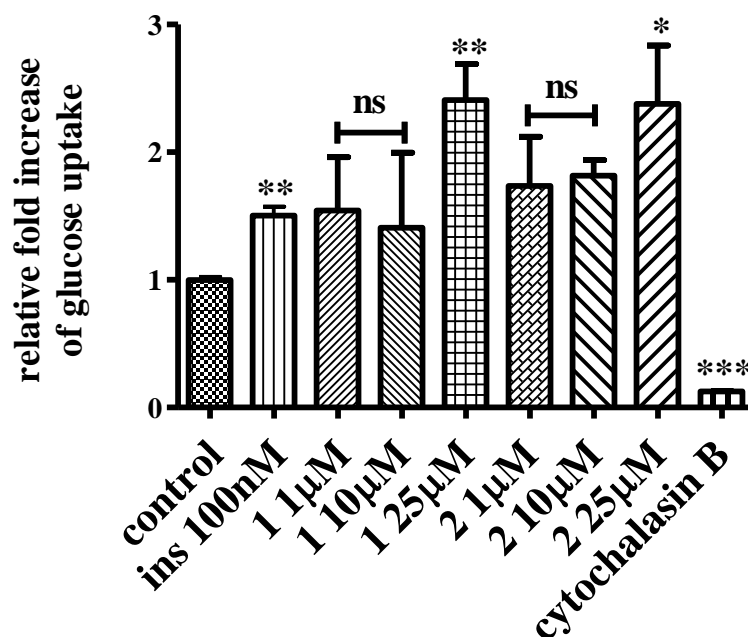


Δ

Εικόνα 3.2.5A Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την πολλαπλάσια έκφραση σε επίπεδο mRNA του γονιδίου GLUT 4 κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης με τις ενώσεις 4 (A), 5 (B), 6 (Γ) και 7 (Δ) σε συγκεντρώσεις 1-20 μM ή/και με ινσουλίνη σε αναλογία 10 ng/ml. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα

3.3.1. Εκτίμηση της πρόσληψης της γλυκόζης από ώριμα λιποκύτταρα με τις ενώσεις 1 και 2.

Προκειμένου να διερευνηθεί η ικανότητα των ώριμων λιποκυττάρων 3T3-L1 να μεσολαβούν την ενδοκυττάρια πρόσληψη της γλυκόζης μετά από διέγερση με τις ενώσεις 1 και 2, ώριμα λιποκύτταρα διεγέρθηκαν με τις υπό μελέτη ενώσεις σε διάφορες συγκεντρώσεις (1-25 μM) αφού προηγήθηκε στέρηση της γλυκόζης. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.3.1.2, τόσο η ένωση 1 όσο και η ένωση 2 προκαλούν την ενδοκυττάρια πρόσληψη της γλυκόζης σε επίπεδα όμοια με αυτά της ινσουλίνης ενώ το φαινόμενο αυξάνεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση. Και οι δύο ενώσεις παρουσιάζουν το μέγιστο αποτέλεσμα σε συγκέντρωση 25 μM (~2.4) ξεπερνώντας το επίπεδο πρόληψης που αντιστοιχεί στην ινσουλίνη (~1.5).



Εικόνα 3.1.1.2 Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την σχετική πολλαπλάσια πρόσληψη της 2-δεοξυγλυκόζης από ώριμα λιποκύτταρα σε διάφορες συγκεντρώσεις των 1 και 2 σε σχέση με μη διεγερμένα κύτταρα. Η ινσουλίνη αποτελεί τον θετικό μάρτυρα (100 nM). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η κυτοχάλασίνη B. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Συνοπτικά, μεταξύ των διαφόρων ρόλων του ψευδαργύρου που έχουν προταθεί μέχρι σήμερα, η εξωγενής του δράση ως ινσουλινομιμητικός παράγοντας αποτελεί μια σύγχρονη πρόκληση προς διερεύνηση με στόχο την εφαρμογή του ως μεταλλοφάρμακο ενάντια στον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2. Προκειμένου να διερευνηθεί το λιπογενετικό δυναμικό του Zn(II) και να διαμορφωθεί κατάλληλα η σφαίρα συντονισμού του μετάλλου σε σαφώς καθορισμένες αντι-διαβητικές μορφές, α) μια σειρά από καλά καθορισμένα διπυρηνικά, δυαδικά και τριαδικά Zn(II)-L (L=Schiff Base) υλικά με διακριτό αριθμό αλκοολικών ομάδων και μεταβαλλόμενο κορμό βανιλίνης, σχεδιάστηκαν, συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν φυσικοχημικά, β) αξιολογήθηκε η ενδεχόμενη κυτταροτοξική τους δράση, γ) ελέγχθηκε η επίδρασή τους στην ενδογενή, φυσιολογική μεταναστευτικότητα των κυττάρων, δ) αξιολογήθηκε η ικανότητά τους να επάγουν την κυτταρική διαφοροποίηση (από πρόιμα λιποκύτταρα σε ώριμα λιποκύτταρα) και ε) αξιολογήθηκε η επίδρασή ή/και η συμμετοχή τους σε

στενά συνδεδεμένους μοριακούς δείκτες που αφορούν στην από τον ψευδάργυρο επαγόμενη λιπογένεση. Τα συνολικά αποτελέσματα υποδεικνύουν α) την σημασία των βασικών δομικών χαρακτηριστικών των Schiff υποκαταστατών που συναρμολογούνται στον ψευδάργυρο επηρεάζοντας την (α)τοξική και ινσουλινομιμητική συμπεριφορά του ψευδαργύρου, και β) την διακριτή δομο-εξαρτώμενη λιπογενετική δράση του συγκεκριμένου μεταλλοϊόντος θέτοντας την βάση για τον σχεδιασμό νέων, αποτελεσματικών αντιδιαβητικών παραγόντων.

4.1 Η έννοια και σπουδαιότητα των Zn(II)-Schiff υλικών

Το περιβάλλον συναρμογής του ψευδαργύρου διαμορφώνει σαφώς την βιολογική δραστικότητα του συγκεκριμένου μεταλλοϊόντος στο κυτταρικό περιβάλλον. Από την άποψη αυτή, η φύση και οι ιδιότητες των υποκαταστατών-υποστρωμάτων του ψευδαργύρου ουσιαστικά διαμορφώνουν το δυναμικό του συγκεκριμένου μεταλλοϊόντος να επάγει φαινοτυπικές μεταβολές ανάλογα με το επιδιωκόμενο αποτέλεσμα (λιπογένεση, επαναφορά των φυσιολογικών επιπέδων της γλυκόζης κ.α.). Μεταξύ των ιδιοτήτων των υποκαταστατών αυτών είναι ο απόλυτος υδρόφοβος-υδρόφιλος χαρακτήρας της συμπλοκοποιημένης μορφής του ψευδαργύρου, η ικανότητα της προώθησης της χηλικοποίησης του ψευδαργύρου μέσω υποκαταστατών με (O,N)-ακροδέκτες, με αποτέλεσμα έτσι να αυξάνεται η σταθερότητα, να μειώνεται η κινητική αστάθεια των υποκαταστατών και άρα να προσδίδεται στον ψευδάργυρο βελτιωμένη βιολογική δραστικότητα για περαιτέρω βιολογικές αλληλεπιδράσεις με συγκεκριμένους κυτταρικούς στόχους. Με βάση τα παραπάνω, τα υποστρώματα που επιλέχθηκαν για την διερεύνηση της χημείας του Zn(II) πληρούν την πλειοψηφία των κριτηρίων που τέθηκαν προκειμένου να υλοποιηθεί η σύνθεση τριαδικών υλικών που έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένους μοριακούς στόχους στο κυτταρικό περιβάλλον με έμφαση στην λιπογένεση και την ενδοκυττάρια πρόσληψη της γλυκόζης στον ΣΔ τύπου 2. Οι Schiff base[36-38] υποκαταστάτες που βασίζονται στην βανιλίνη παρέχουν μια ευέλικτη κοιλότητα για την συμπλοκοποίηση του Zn(II) με τις υπολειπόμενες διαθέσιμες θέσεις συντονισμού να αλληλεπιδρούν με άλλα υποστρώματα όπως είναι τα αλκοολικά άκρα. Ιδιαίτερη έμφαση πρέπει να δοθεί στο γεγονός ότι η παρουσία αλκοολικών ομάδων παρέχουν το δυναμικό για αλληλεπιδράσεις με ενδοκυττάριους μοριακούς στόχους και άρα να προσδίδουν στον Zn(II) την ικανότητα έκφρασης

βιολογικής δραστηριότητας (τοξικότητα, κυτταρική διαφοροποίηση ή/και ινσουλινομιμητική δράση). Στο πλαίσιο αυτό, ο υποκαταστάτης L₁H περιέχει τρία αμινοξικά αλκοολικά άκρα, ο L₂H δύο και ο L₃H μόνο ένα. Αντίστοιχα, οι υποκαταστάτες L₄H-L₆H διατηρούν σταθερό αριθμό αλκοολικών άκρων (τρία) και διαφοροποιούνται ως προς τον κορμό της βανιλίνης. Ο φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των υποκαταστατών καθώς και των Zn(II) υλικών που προέκυψαν επιβεβαιώνει περαιτέρω την φύση τους υποστηρίζοντας έτσι την περαιτέρω χρήση τους σε βιολογικές δοκιμασίες (FT-IR, ESI-MS, NMR και X-ray κρυσταλλογραφία).

4.2 Δομο-εξαρτώμενη βιολογική δραστηριότητα του Zn(II)

Η ανάπτυξη εν δυνάμει μεταλλοφαρμάκων ψευδαργύρου ικανών να προκαλέσουν λιπογένεση προ-λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα στηρίζεται στο σχεδιασμό μεταλλο-οργανικών μορφών του δισθενούς αυτού μεταλλοϊόντος με κατάλληλα δομικά διαμορφωμένα οργανικά υποστρώματα που επάγουν διαφοροποίηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του σε βιολογικό επίπεδο, β) σύνθεση, απομόνωση και φυσικοχημικό χαρακτηρισμό δυαδικών και τριαδικών Zn(II)-οργανικών συμπλόκων μορφών, έτσι ώστε να επιτρέπεται η επιλογή σε δομο-εξαρτώμενη βάση για περαιτέρω διερεύνηση της βιολογικής δραστηριότητας σε επίπεδο λιπογενετικότητας, και γ) τη διερεύνηση των βιολογικών ιδιοτήτων των καλά χαρακτηρισμένων συμπλόκων μορφών του ψευδαργύρου ως προς την λιπογένεση, με βασική ιδιότητα την ατοξικότητα, έτσι ώστε να μπορεί να δημιουργηθεί ένα ολοκληρωμένο προφίλ βιοδραστηριότητας σε σχέση με τη δομή που επάγει βιολογική δράση και τους μοριακούς στόχους σε κυτταρικό επίπεδο που επηρεάζονται κατά την μεταλλο-επαγόμενη λιπογένεση και χαρακτηρίζουν τα προκύπτοντα λιποκύτταρα.

Στην προσπάθεια εκλογίκευσης μιας δομο-εξαρτώμενης σχεδίασης δυαδικών και τριαδικών συμπλόκων μορφών ψευδαργύρου με οργανικά υποστρώματα, διαμορφώθηκε αρχικά η οργανική φύση ενός μεταλλοδεσμευτικού υποκαταστάτη-ligand ικανού να κατασκευάσει το περιβάλλον συναρμογής του ψευδαργύρου με επαρκή δομική ευελιξία που δίνει τη δυνατότητα ανάπτυξης διαφορετικής βιοχημικής δραστηριότητας σε κυτταρικό επίπεδο. Έτσι, η βασική μορφή του οργανικού υποκαταστάτη στηρίχθηκε στον αρωματικό κορμό της βανιλίνης. Η αλδεϋδική ομάδα του οργανικού αυτού υποκαταστάτη, όντας σε θέση να αντιδράσει με αμίνες, έδωσε τη δυνατότητα να προκύψουν προϊόντα συμπύκνωσης Schiff με αμίνες, οι οποίες φέρουν μια, δυο ή και τρεις αλκοολικές επεκτάσεις-ομάδες. Με τον τρόπο

αυτό προέκυψαν τρεις διαφορετικοί υποκαταστάτες-ligands (L1, L2 και L3), οι οποίοι παρουσιάζουν τα εξής χαρακτηριστικά: α) έχουν το ίδιο κορμό βανιλίνης με δυνατότητα μεταλλοδέσμευσης μέσω του φαινολικού υδροξυλίου, του αιθερικού οξυγόνου, του ιμινο αζώτου και των διαφόρου αριθμού αλκοολικών υδροξυλίων, β) διαθέτουν διαφορετικό αριθμό αλκοολών, και άρα εν δυνάμει μεταλλοδεσμευτικών άκρων, γ) λόγω του διαφορετικού αριθμού αλκοολικών άκρων παρουσιάζουν εν δυνάμει διαφορετική δράση ως προς τις αλληλεπιδράσεις τους με μοριακούς στόχους σε κυτταρικό επίπεδο, και δ) διαφέρουν ως προς την υδροφοβικότητα και υδροφιλικότητα, λόγω του διαφορετικού αριθμού των αλκοολών που υπάρχουν (L1 τρεις αλκοόλες, L2 δυο αλκοόλες, και L3 μια αλκοόλη).

Με βάση την προαναφερθείσα βάση σχεδιασμού, συντέθηκαν και απομονώθηκαν τρεις σύμπλοκες μορφές του ψευδαργύρου, δηλ. $Zn_2(L1)(CH_3COO)_3$, $[Zn_2(L2)(CH_3COO)_3] \cdot H_2O$, και $Zn_2(L3)_2(CH_3COO)_2$. Η δομή των ενώσεων αυτών μαρτυρεί τα ακόλουθα: α) όλες οι σύμπλοκες μορφές είναι τριαδικής φύσεως, β) η μείωση του αριθμού των αλκοολών που είναι συνδεδεμένες με τον κορμό της βανιλίνης οδηγεί σε σύμπλοκες μορφές τριαδικής φύσεως με λόγο μεταλλοϊόντος:υποκαταστάτη-ligand μειούμενο από 2:1 (L1) σε 1:1 (L2, L3).

Με ανάλογο τρόπο, επιδιώχθηκε η διαφοροποίηση των μεταλλοδεσμευτικών υποκαταστατών προκειμένου να καλυφθούν οι δυνατές περιπτώσεις δομικής επιρροής στη βιολογική δραστηριότητα του ψευδαργύρου. Έτσι, διατηρώντας σταθερή την ομάδα της τρομεθαμίνης (αμίνης με τις τρεις αλκοολικές επεκτάσεις) ο προηγούμενος οργανικός υποκαταστάτης της βανιλίνης μεταβάλλεται ως προς α) τη φύση των υποκαταστατών του αρωματικού δακτυλίου, και β) το μέγεθος και ο όγκος αυτού. Συγκεκριμένα, σε πρώτη προσέγγιση το αιθερικό μεθύλιο απομακρύνεται δίνοντας τη θέση του σε ακόμη ένα φαινολικό υδροξύλιο ανεβάζοντας έτσι το συνολικό αριθμό σε δυο και δημιουργώντας μια κατεχολική οντότητα, γνωστή ως ομάδα έντονης βιολογικής δραστηριότητας και μεταλλοδεσμευτικής ικανότητας. Σε δεύτερη φάση η μεθοξυ- ομάδα απομακρύνεται τελείως από τον αρωματικό δακτύλιο στερώντας έτσι το μεταλλοϊόν από μια εν δυνάμει μεταλλοδεσμευτική οντότητα. Τέλος, ο όγκος του αρωματικού δακτυλίου μεγαλώνει προσαρτώντας σε αυτόν ακόμη έναν δακτύλιο και δημιουργώντας έτσι τον ναφθαλινικό κορμό με την υδροξυλική

ομάδα να εξακολουθεί να είναι εκεί και μέσω της αλδεϋδικής ομάδας να προσφέρει τη δυνατότητα συμπύκνωσης με την τρομεθαμίνη μέσω αντίδρασης Schiff. Ο μοριακός αυτός εξοπλισμός χρησιμοποιήθηκε για την διερεύνηση της δραστηριότητας τους ιόντος ψευδαργύρου και οδήγησε στα παρακάτω σύμπλοκα: $[Zn_4(L_1)_4] \cdot 7.4H_2O$ (7), $[Zn(L_2)] \cdot CH_3OH$ (6), $[Zn(L_2)] \cdot H_2O$ (5) και $[Zn(II)_3(L_1)_3](CH_3O)(NO_3)_2 \cdot 0.9CH_3OH \cdot 1.5H_2O$ (4). Εκείνο το οποίο παρατηρείται είναι ότι: α) η απομάκρυνση της μεθυλο- ομάδας από την αιθερική ομάδα του οργανικού υποκαταστάτη δημιουργεί την κατεχολική ομάδα και οδηγεί σε τετραπυρηνικό σύμπλοκο (cluster), α) η απομάκρυνση της αιθερικής ομάδας από τον αρωματικό υποκαταστάτη μειώνει την πυρηνικότητα του προκύπτοντος συμπλόκου από 4 σε 1, β) η αύξηση του όγκου του οργανικού υποκαταστάτη διατηρεί την πυρηνικότητα του συμπλόκου (1). Αξιοσημείωτη είναι η χημική δραστηριότητα του αρχικού οργανικού υποκαταστάτη στη μεθανόλη, όπου η αναλογία μεταλλοϊόντος:υποκαταστάτη-ligand 1:1 οδηγεί σε ένα τριπυρηνικό σύμπλοκο (A118) σε αντίθεση με την αναλογία 1:2 στον ίδιο διαλύτη που οδηγεί σε διπυρηνικό σύμπλοκο.

Από τις προαναφερθείσες ευέλικτες δράσεις αποδεικνύεται η ιδιότυπη δομή των μορφών ψευδαργύρου, με το περιβάλλον συναρμογής του να διαμορφώνεται από ευέλικτες δομές υποκαταστατών με συγκεκριμένη σύσταση κορμού (βανιλίνη) και άκρων (τρομεθαμίνη). Οι προκύπτουσες δομές α) είναι χαρακτηρισμένες με πληθώρα φασματοσκοπικών τεχνικών στη στερεά κατάσταση και στο διάλυμα (στοιχειακή ανάλυση, πολυπυρηνική φασματοσκοπία NMR, φασματοφωτομετρία UV-Visible, φωταύγεια, TGA-DTG, κρυσταλλογραφία ακτίνων X), και β) αναδύονται ως υποψήφιες μορφές ψευδαργύρου οι οποίες αναμένονται να δράσουν διαφορετικά ως προς τη βιολογική του δράση έναντι στόχων που αφορούν στην αδιπογενετικότητα.

4.3 Δομο-εξαρτώμενη επίδραση του Zn(II) στην κυτταρική επιβίωση των πρώιμων και ώριμων λιποκυττάρων

Ο ΣΔ αποτελεί ένα σύνολο μεταβολικών νοσημάτων που χαρακτηρίζεται από μη φυσιολογική ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης. Έχει δειχθεί ότι υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ του ψευδαργύρου και του ΣΔ αν και οι βασικοί μηχανισμοί που διέπουν την σχέση αυτή δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί. Ο ψευδάργυρος μπορεί να επηρεάζει άμεσα την έκκριση, σύνθεση αλλά και μοριακή

σηματοδότηση της ινσουλίνης. Με βάση την παρατήρηση αυτή στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η ινσουλινομιμητική δράση επτά νεοσυντιθέμενων ενώσεων του ψευδαργύρου με έμφαση την λιπογενετική δράση του μετάλλου. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ξεκάθαρα την διακριτή βιολογική συμπεριφορά του κάθε συμπλόκου ψευδαργύρου. Τα ιόντα του ψευδαργύρου προερχόμενα από απλές, ανόργανες μορφές ($ZnCl_2$ και $ZnSO_4$) μειώνουν την κυτταρική επιβίωση με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο και η τοξική αυτή συμπεριφορά φαίνεται πως μειώνεται μέσω της συμπλοκοποίησης του μεταλλοϊόντος με κατάλληλους υποκαταστάτες. Συμπερασματικά λοιπόν, η φύση των υποστρωμάτων που συμπλοκοποιούν τον $Zn(II)$ θεωρείται υψηλής σημασίας για το είδος της βιολογικής συμπεριφοράς του μεταλλοϊόντος. Τα αποτελέσματα υποστηρίζουν περαιτέρω την δομο-εξαρτώμενη επιρροή των υποκαταστατών στην κυτταρική επιβίωση των πρώιμων λιποκυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, για την ομάδα των ενώσεων **1-3** το τοξικό προφίλ των συμπλόκων παρουσιάζει την ίδια τάση με αυτή των υποκαταστατών όταν χρησιμοποιούνται από μόνοι τους. Οι ενώσεις **1** και **2** δεν εμφανίζουν τοξικότητα σε αντίθεση με την **3** όπου η τοξικότητα εμφανίζει δόσο-εξαρτώμενο μοτίβο. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η τάση που εμφανίζουν τα επίπεδα τοξικότητας όταν τα πρώιμα λιποκύτταρα διεγείρονται με την ένωση **3** για 24 ώρες είναι ίδια με αυτή όταν τα κύτταρα διεγείρονται με την τον υποκαταστάτη της ένωσης LH3. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι για την ομάδα των ενώσεων **1-3** η εμφάνιση της (α)τοξικότητας που αυτά επιδεικνύουν εξαρτάται άμεσα από τον αριθμό των αλκοολικών ομάδων και μάλιστα τα επίπεδα της τοξικότητας μειώνονται όσο οι ομάδες αυτές αυξάνουν. Διατηρώντας σταθερό λοιπόν τον αριθμό των αλκοολικών άκρων, η (α)τοξικότητα των υποκαταστατών LH4-6 εξαρτάται από τον κορμό της βανιλίνης. Αξίζει να αναφερθεί ότι οι υποκαταστάτες LH4 και LH6 είναι ατοξικοί και αντίστοιχα και οι ενώσεις στις οποίες συμμετέχουν. Ο υποκαταστάτης LH5 μειώνει την κυτταρική επιβίωση σε σχέση με τα υπόλοιπα υποστρώματα ενώ η αντίστοιχη ένωση στην οποία συμμετέχει (ένωση **7**) παρουσιάζει επίσης τοξικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις. Οι ενώσεις **1** και **4** διαφέρουν ως προς τον αριθμό των ιόντων ψευδαργύρου καθώς η **1** φέρει δύο μεταλλοϊόντα και η **4** φέρει τρία. Η αύξηση των αριθμού των μεταλλοϊόντων δικαιολογεί την σχετικά αυξημένη τοξικότητα της ένωσης **4** σχέση με την **1**. Επιπρόσθετα, οι ενώσεις **5** και **6** είναι ατοξικές στο εύρος συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν.

Στα ίδια πλαίσια, για κάθε νεοσυντιθέμενη ένωση, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ενδεχόμενης αναστολής του φυσιολογικού μεταναστευτικού δυναμικού των πρώιμων λιποκυττάρων. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι ενώ μια ένωση μπορεί να εμφανίζεται ατοξική σε επίπεδο κυτταρικής επιβίωσης μπορεί ωστόσο να επιδρά σε άλλα φυσιολογικά χαρακτηριστικά ενός βιολογικού συστήματος που στην προκειμένη περίπτωση είναι η κινητικότητα των κυττάρων. Έτσι, η ένωση **1** και **4** δεν επηρεάζουν την μεταναστευτικότητα των κυττάρων σε αντίθεση με τις **5** και **6** που αν και μη τοξικές επιφέρουν ήπια αναστολή του μεταναστευτικού δυναμικού των κυττάρων.

4.4 Επαγωγή της λιπογένεσης από τον ψευδάργυρο και ινσουλινομιμητική δράση

Η λιπογενετική δράση της ινσουλίνης αποτελεί μια από τις θεμελιώδεις φυσιολογικές τις δράσεις στον λιπώδη ιστό και εξαρτάται από μια σειρά πολυάριθμων σηματοδοτικών μορίων που περιλαμβάνουν τον υποδοχέα της ινσουλίνης, τα IRS υποστρώματα την PI3K και την πρωτεϊνική κινάση B. Η κυτταρική σειρά 3T3-L1 αποτελεί παγιωμένο μοντέλο ελέγχου του λιπογενετικού δυναμικού διαφόρων παραγόντων καθώς η ωρίμανση των πρώιμων λιποκυττάρων μπορεί να πραγματοποιηθεί χημικά. Επιπλέον, η απόκριση του συγκεκριμένου μοντέλου στην δράση της ινσουλίνης καθιστά την κυτταρική αυτή σειρά κατάλληλη για την αξιολόγηση της ινσουλινομιμητικής δράσης διαφόρων χημικών και μη παραγόντων. Ως εκ τούτου, η κυτταρική αυτή σειρά χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη για την διερεύνηση και αξιολόγηση του λιπογενετικού και ινσουλινομιμητικό χαρακτήρα των νεοσυντιθέμενων ενώσεων ψευδαργύρου. Πιο, αναλυτικά οι ενώσεις **1**, **2**, **4** και **6** επάγουν την κυτταρική διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα με τρόπο που εξαρτάται από την συγκέντρωση αλλά και την δομή των συγκεκριμένων ενώσεων. Η αυξημένη έκφραση τόσο του μεταγραφικού παράγοντα της λιπογένεσης, PPAR-γ, όσο και του ιστο-ειδικού γλυκοζομεταφορέα GLUT 4 επιβεβαιώνουν περαιτέρω την ικανότητα των ενώσεων αυτών για λιπογένεση. Η έκφραση του PPAR-γ θεωρείται πρώιμο γεγονός κατά την διάρκεια της κυτταρικής διαφοροποίησης ενώ η έκφραση των επιπέδων του GLUT 4 εξαρτώνται από αυτά του PPAR-γ. Τα ώριμα λιποκύτταρα συμμετέχουν ενεργά στον ρύθμιση των επιπέδων του φυσιολογικού μεταβολισμού με κύριο γλυκοζομεταφορέα τον GLUT 4 ο οποίος θεωρείται βασικός βιοδείκτης της επιτυχούς λιπογένεσης [39,40]. Αξίζει να αναφερθεί ότι η έκφραση του GLUT 4 ακολουθεί την ίδια τάση του PPAR-γ σε όλες

τις ενώσεις και όλες τις συνθήκες που εξετάστηκαν επιβεβαιώνοντας περαιτέρω ότι ο PPAR- γ ως μεταγραφικός παράγοντας ελέγχει την έκφραση του GLUT 4. Η ένωση **1** και **2** επάγει την έκφραση και των δύο γονιδίων με τρόπο που εξαρτάται από την συγκέντρωση ενώ όταν χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό με την ινσουλίνη η έκφραση εμφανίζεται ενισχυμένη σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (ινσουλίνη) υποδεικνύοντας προσθετική ή/και συνεργική δράση. Οι ενώσεις **4** και **6** δρουν δοσο-εξαρτώμενα χωρίς να υπερβαίνουν τα επίπεδα της ινσουλίνης ενώ δεν δρουν συνεργικά με αυτή. Τέλος, οι ενώσεις **5** και **7** προκαλούν ιδιαίτερα χαμηλή έκφραση τόσο του PPAR- γ όσο και του GLUT 4 υποδεικνύοντας χαμηλή έως και καθόλου βιολογική δραστηριότητα. Επιπλέον, η ένωση **7** ενδέχεται να αναστέλλει την δράση της ινσουλίνης καθώς η συνδυαστική τους δράση επιφέρει σημαντικά χαμηλά ποσοστά έκφρασης των δύο βιοδεικτών. Η ινσουλινομιμητική δράση των ενώσεων **1** και **2** εξετάστηκε περαιτέρω διερευνώντας την ικανότητα να μιμούνται την ινσουλίνη σε ότι αφορά την ενδοκυττάρια πρόσληψη της γλυκόζης. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν δοσο-εξαρτώμενο τρόπο δράσης για το εύρος συγκεντρώσεων που εξετάστηκε με τα σύμπλοκα να επιφέρουν επίπεδα πρόσληψης της γλυκόζης ανάλογα ή/ και μεγαλύτερα από αυτά της ινσουλίνης.

Συμπερασματικά λοιπόν, η παρούσα μελέτη α) παρουσιάζει τα πλεονεκτήματα των υποστρωμάτων που συμπλοκοποιούν τον Zn(II) με έμφαση στην δομο-εξαρτώμενη βιολογική δραστηριότητα ως ινσουλινομιμητικούς παράγοντες, και β) περιγράφει την βιολογική συμπεριφορά των αναδυόμενων υλικών στα προ- και ώριμα λιποκύτταρα μέσω εμπλοκής τους με γνωστούς μοριακούς στόχους. Η διακριτή δομή των Schiff base υποστρωμάτων (αριθμός αλκοολικών άκρων, κορμός) διαμορφώνει την ύπαρξη και τον βαθμό της βιολογικής δραστηριότητας των Zn(II)-υλικών που προκύπτουν. Τα συνολικά αποτελέσματα αντικατοπτρίζουν την συσχέτιση κατάλληλα διαμορφωμένων και δομικά επιλεγμένων μορφών Zn(II) με συγκεκριμένο βιολογικό προφίλ θέτοντας την βάση για περαιτέρω ανάπτυξη βέλτιστων αντιδιαβητικών παραγόντων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] J.B. Classen, Evidence childhood epidemics of type 1 and type 2 diabetes are opposite extremes of an immune spectrum disorder induced by immune stimulants. Role of race and associated cortisol activity as a major determining factor of the type of diabetes, *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews* (2008)
- [2] S.E. Khan, *Diabetologia* 46 (2003) 3–19.
- [3] H. Yki-Järvinen, *Diabetologia* 38 (1995) 1378–88.
- [4] A. Gastaldelli, E. Ferrannini, Y. Miyazaki, M. Matsuda, R.A. DeFronzo, *Diabetologia* 47 (2004) 31–9.
- [5] E. Ferrannini, A. Mari, *Diabetologia* 47 (2004) 943–56.
- [6] L. Monnier, C. Colette, D.R. Owens, *Diabetes & Metabolism* 34 (2008) 207–216.
- [7] H. Sakurai, A. Katoh, Y. Yoshikawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 79 (2006) 1645–1664.
- [8] B.L. Vallee, K.H. Falchuk, *Physiol. Rev.* 73 (1993) 79–118.
- [9] N. Wellinghausen, H. Kirchner, L. Rink, *Immunol. Today* 18 (1997) 519–521.
- [10] A.S. Prasad, *Nutrition* 11 (1995) 93–9.
- [11] A.B. Chausmer, *J. Am. Coll. Nutr.* 7 (1998) 109–115.
- [12] A.Q. Truong-Tran, L.H. Ho, F. Chai, P.D. Zalewski, *J. Nutr.* 130 (2000) 1459S–1466S.
- [13] A.Q. Truong-Tran, J. Carter, R.E. Ruffin, P.D. Zalewski, *Biometals* 14 (2001) 315–330.
- [14] H. Haase, E. Mocchegiani, L. Rink, *Biogerontology* 7 (2006) 421–428.
- [15] D.A. Scott, *Biochem. J.* 28(4) (1934) 1592–1602.
- [16] S.F. Simon, C.G. Taylor, *Exp. Biol. Med.* 226 (2001) 43.
- [17] M.M. James, S.C. Charles, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 4362.
- [18] H. Sakurai, Y. Kojima, Y. Yoshikawa, K. Kawabe, H. Yasui, *Coord. Chem. Rev.* 26 (2002) 187.
- [19] C.G. Taylor, *BioMetals* 18 (2005) 305.
- [20] L. Coulson, P. Dandona, *Diabetes* 29 (1980) 665.
- [21] A. Shisheva, D. Gefel, Y. Shechter, *Diabetes* 41 (1992) 982.
- [22] M.D. Chen, S.J. Liou, P.Y. Lin, V.C. Yang, P.S. Alexander, *Biol. Trace Elem. Res.* 61 (1998) 303.
- [23] J. Fugono, K. Fujimoto, H. Yasui, K. Kawabe, Y. Yoshikawa, Y. Kojima, H. Sakurai, *Drug Metab. Pharmacokinet.* 17 (2002) 340.
- [24] H. Sakurai, Y. Adachi, *BioMetals* 18 (2005) 319.
- [25] R.R. Holman, C.A. Cull, R.C. Turner, *DiabetesCare* 22(6) (1999) 960–964.
- [26] S. Patai, *The Chemistry of the Carbon-Nitrogen Double Bond*, J. Wiley & Sons, London (1970).
- [27] E. Jungreis, S. Thabet, *Analytical Applications of Schiff bases*, Marcell Dekker, New York (1969).

- [28] D.H. Brown, W.E. Smith, *Enzyme Chemistry- impact and Applications*, Chapman and Hall, London (1990).
- [29] A.L. Lehninger, *Principles of Biochemistry*, Worth, New York (1975).
- [30] M.B. Ferrari, S. Capacchi, G. Pelosi, G. Reffo, P. Tarasconi, R. Albertini, S. Pinelli, P. Lunghi, *Inorg. Chim. Acta* 286 (1999) 134.
- [31] E. Canpolat, M. Kaya, *J. Coord. Chem.* 57 (2004) 1217.
- [32] M. Yildiz, B. Dulger, S.Y. Koyuncu, B.M. Yapici, *J. Indian Chem. Soc.* 81 (2004) 7.
- [33] K. Singh, M.S. Barwa, P. Tyagi, *Eur. J. Med. Chem.* 42 (2007) 394.
- [34] P.G. Cozzi, *Chem. Soc. Rev.* 33 (2004) 410.
- [35] S. Chandra, *J. Sangeetika, J. Indian Chem. Soc.* 81 (2004) 203.
- [36] M. Odabaşoğlu, C. Albayrak, O. Büyükgüngör, P. Lönnecke, *Acta Cryst.* C59 (2003) o616-o619.
- [37] G.X. Tana, X.C. Liub, *Acta Cryst.* E65 (2009) o559.
- [38] E. Halevas, O. Tsave, M. P. Yavropoulou, A. Hatzidimitriou, J. G. Yovos, V. Psycharis, C. Gabriel, A. Salifoglou, *Inorg. Biochem.* (2015)
- [39] S.W. Cushman, L.J. Wardzala, *J. Biol. Chem.* 255, (1980) 4758-4762.
- [40] K. Suzuki, T. Kono, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77 (1980) 2542-2545.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΔΟΜΟ-ΕΙΔΙΚΟΥ ΛΙΠΟΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΝΕΟ-ΣΥΝΤΙΘΕΜΕΝΩΝ ΣΑΦΩΣ ΚΑΘΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΔΥΑΔΙΚΩΝ V(V)-Schiff ΥΛΙΚΩΝ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗΝ ΕΠΑΓΩΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΟ ΒΑΝΑΔΙΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ 3T3-L1 ΠΡΟ-ΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΩΡΙΜΑ ΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΑ. ΣΧΕΣΗ ΔΟΜΗΣ-ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΜΟΡΙΑΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Από την ανακάλυψη της ινσουλίνης, πολυάριθμα ερευνητικά δεδομένα υπογραμμίζουν την αδιαμφισβήτητη αξία της στην θεραπεία του ΣΔ. Ωστόσο, τις τελευταίες δεκαετίες δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στην ανακάλυψη ινσουλινομιμητικών παραγόντων για την θεραπεία του μη ινσουλινο-εξαρτώμενου ΣΔ τύπου 2 ο οποίος υπολογίζεται ότι αντιπροσωπεύει το 90% των συνολικών διαβητικών ατόμων [1]. Η επιτυχής ανάπτυξη βιολογικών συστημάτων που αποκρίνονται στην ινσουλίνη το 1970 (λιποκύτταρα επίμυ) [2] διευκόλυνε την έρευνα αποσαφήνισης του μηχανισμού δράσης της ινσουλίνης καθώς και της ταυτοποίησης διαφόρων παραγόντων που μιμούνται την δράση της. Μια σειρά ετερογενών παραγόντων όπως διάφορες πρωτεΐνες (θρυψίνη, λεκτίνες, αντισώματα του υποδοχέα της ινσουλίνης), πολυάριθμα μόρια χαμηλού μοριακού βάρους όπως το H₂O₂, ο ψευδάργυρος, τα ιόντα του μαγγανίου και άλλα μπορούν να ενεργοποιούν την ενδοκυττάρια πρόσληψη και μεταβολισμό της γλυκόζης σε λιποκύτταρα επίμυ [3]. Ωστόσο, κανένας από τους παράγοντες που αναφέρθηκαν δεν πληροί τις προϋποθέσεις για απορροφησιμότητα, σταθερότητα στα βιολογικά υγρά, χαμηλά επίπεδα τοξικότητας και διακριτή ινσουλινομιμητική απόκριση [4]. Όπως συμβαίνει και σε μια σειρά άλλων μεταλλοϊόντων, το βανάδιο βρίσκεται σε σύμπλοκη μορφή *in vivo* στα βιολογικά συστήματα. Σχετικά εύκολα συναρμόζεται με πρωτεΐνες όπως η τρανσφερίνη, η αιμογλοβίνη και η αλβουμίνη καθώς και με μόρια χαμηλού μοριακού βάρους όπως η γλουταθειόνη [5]. Το 1980 υποστηρίχθηκε για πρώτη φορά ότι το βανάδιο μιμείται την δράση της ινσουλίνης σε ότι αφορά την πρόσληψη εξοζών και τον μεταβολισμό της γλυκόζης σε λιποκύτταρα επίμυ. Ίδια δράση επέδειξαν τόσο το V(V) (βαναδικό ιόν) όσο και το V(IV) (ιόντα βαναδυλίου) αντίστοιχα [6,7]. Η ινσουλινομιμητική

δράση απλών, ανόργανων μορφών βαναδίου έχει αξιολογηθεί σε μια σειρά βιολογικών συστημάτων που διεγείρονται από την ινσουλίνη υποδεικνύοντας ότι το βανάδιο μιμείται άμεσα τις μεταβολικές επιδράσεις της ινσουλίνης *in vitro*. Διάφορα άλατα βαναδίου ενεργοποιούν την ενδοκυττάρια πρόσληψη της γλυκόζης τόσο στον λιπώδη όσο και στον μυϊκό ιστό ωστόσο σε υψηλές συγκεντρώσεις ($ED_{50}=100-200$ μM) [7]. Τα συνολικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η χορήγηση βαναδίου επαναφέρει τα φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και βελτιώνει την ομοιοστασία της γλυκόζης τόσο σε πειραματόζωα με ινσουλινο-αντίσταση όσο και σε πειραματόζωα με πλήρη έλλειψη έκκρισης της ινσουλίνης [8,9,10]. Οι κύριοι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην δράση αυτή είναι η αναστολή της PTP (protein-phosphotyrosinephosphatases) και ενεργοποίηση της κινάσης τυροσίνης χωρίς αυτό να απαιτεί την μεσολάβηση του υποδοχέα της ινσουλίνης [8,9,10]. Έχει δειχθεί ότι η ένωση vanadate ενεργοποιεί τον μεταβολισμό της γλυκόζης *in vitro* ανοδικά της ενεργοποίησης της PI3K [11]. Επιπλέον, η ίδια ένωση αναστέλλει αρκετά ένζυμα-κλειδιά του μεταβολισμού στο ήπαρ, τον μυϊκό ιστό και τον λιπώδη με βασικό παρονομαστή την προαγωγή της ενδοκυττάριας πρόληψης της γλυκόζης και την αναστολή της δράσης ορμονών που δρουν αντίθετα της ινσουλίνης (π.χ. γλυκαγόνη) [12]. Διάφορες προκαταρκτικές κλινικές μελέτες υποστηρίζουν επίσης την ωφέλιμη δράση του βαναδίου. Ωστόσο, η μελλοντική χρήση του βαναδίου στην θεραπεία του ΣΔ στηρίζεται στην βελτίωση της ινσουλινομιμητικής του δράσης χωρίς όμως παράλληλα να αυξάνεται η τοξικότητά του. Για τον σκοπό αυτό σχεδιάστηκαν μια σειρά από οργανικά υποστρώματα τα οποία βελτιώνουν την βιοδραστικότητα του βαναδίου σε σχέση με τις αντίστοιχες απλές ανόργανες μορφές του [13,14,15,16]. Για την ανάπτυξη νέων αντιδιαβητικών παραγόντων που περιέχουν V(IV,V) και που διαθέτουν ατοξική συμπεριφορά, βέλτιστη ινσουλινομιμητική δράση και ικανότητα να διαπερνούν την πλασματική μεμβράνη, απαιτείται η δημιουργία υποκαταστατών που θα μπορούσαν να διαδραματίσουν ρόλο υποστρώματος του βαναδίου [17]. Μεταξύ τέτοιων οργανικών υποκαταστατών, ιδιαίτερη σημασία αποκτούν οι Schiff Base υποκαταστάτες οι οποίοι διαθέτουν δομικές ομοιότητες με φυσιολογικές ενώσεις πολλών βιολογικών συστημάτων [18, 19].

Με βάση το γεγονός ότι κατάλληλα σχεδιασμένοι Schiff Base υποκαταστάτες προάγουν την συμπλοκοποίηση του V(IV,V) με αποτέλεσμα την ανάπτυξη βιοδραστικών ινσουλινομιμητικών συμπλόκων βαναδίου, έγινε α) σχεδιασμός και

σύνθεση Schiff Base οργανικών υποκαταστατών με διακριτή δομή, β) σύνθεση διαδυκών V(IV,V)-υλικών που χαρακτηρίστηκαν φυσικοχημικά, γ) αξιολόγηση της ινσουλινομιμητικής τους δράσης με έμφαση στο λιπογενετικό δυναμικό τους, δ) διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων αυτών με ιστοειδικούς στόχους του σηματοδοτικού μονοπατιού της ινσουλίνης, και ε) συσχετισμός των χημικών και δομικών χαρακτηριστικών αυτών με την αναδύμενη βιολογική συμπεριφορά.

2.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1.Σχεδιασμός, σύνθεση και φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των υλικών

2.1.1 Schiff-Base οργανικά υποστρώματα

Για την μελέτη της δομο-εξαρτώμενης λιπογενετικής ικανότητας του V(V) χρησιμοποιήθηκαν οι υποκαταστάτες που LH1, LH2 και LH3 που περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.

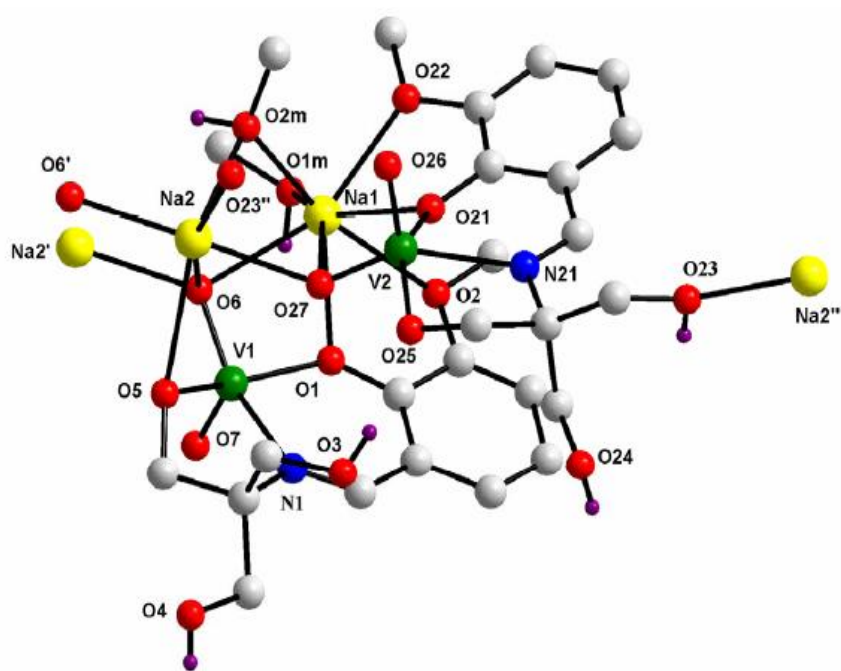
2.1.2 V(V)-Schiff Base υλικά

Στη συνέχεια, παρατίθενται οι ενώσεις που προέκυψαν μετά από συμπλοκοποίηση του V(V) με τους υποκαταστάτες Schiff.

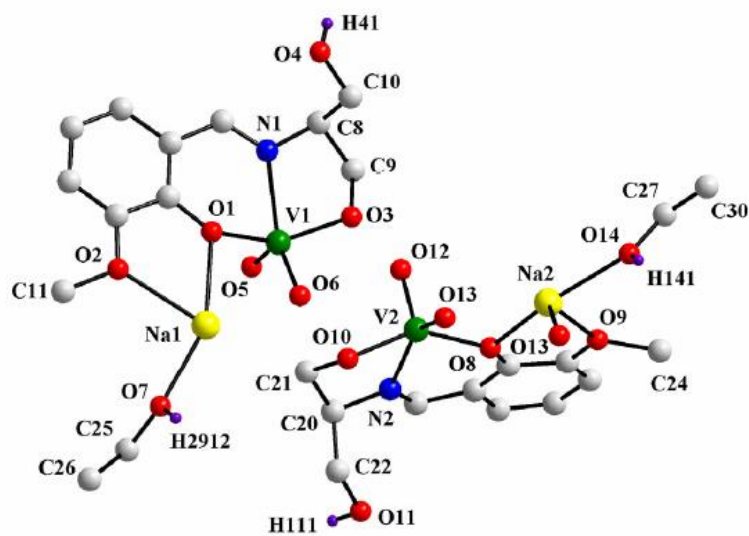
Οι ενώσεις συντέθηκαν και απομονώθηκαν σε μονοκρυσταλλική μορφή. Χαρακτηρίστηκαν φυσικοχημικά με πληθώρα μεθόδων και τεχνικών (στοιχειακή ανάλυση, FT-IR, κρυσταλλογραφία ακτίνων X, NMR (solid, solution), TGA-DTG).

Οι ενώσεις που προέκυψαν μαζί με τις τρισδιάστατες κρυσταλλικές δομές δίνονται παρακάτω:

- $\{[(VO_2)_2(L_1H_1)_2]Na_2(CH_3OH)_2\}_n$ (**1**) ($M_r=782.44$)

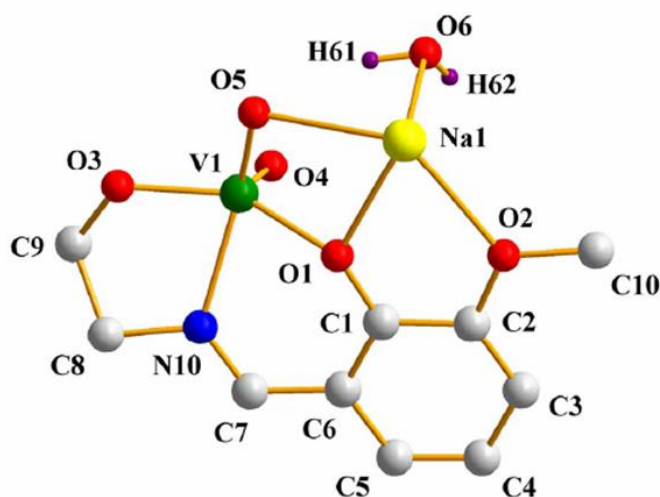


- $\{[(VO_2)(L_2H_1)]Na(C_2H_5OH)\}_n$ (**2**) ($M_r=375.23$)



K001

- $\{[(VO_2)(L_3H_1)(H_2O)]Na\}_n$ (**3**) ($M_r=317.15$)



2.2. Ανάπτυξη κυτταρικής καλλιέργειας και βιολογικές δοκιμασίες

2.2.1. Ανάπτυξη κυτταρικής καλλιέργειας

Η ανάπτυξη της κυτταρικής καλλιέργειας τόσο των πρώιμων ινοβλαστών όσο και των ώριμων λιποκυττάρων πραγματοποιήθηκε σε φλάσκες καλλιέργειας (75 cm²) όπως έχει ήδη αναφερθεί. Οι συνθήκες καλλιέργειας ήταν 5% CO₂, θερμοκρασία 37°C και σταθερά επίπεδα υγρασίας. Η επώαση των κυττάρων έγινε σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό DMEM (Sigma) το οποίο εμπλουτίζεται με 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Biochrom) και 1% αντιβιοτικών (penicillin-streptomycin, Biochrom).

2.2.2. Επαγωγή της λιπογένεσης

Τα 3T3-L1 προ-λιποκύτταρα διαφοροποιήθηκαν σε ώριμα λιποκύτταρα σύμφωνα με γνωστό πρωτόκολλο διαφοροποίησης λιποκυττάρων το οποίο έχει ήδη περιγραφεί σε προηγούμενα κεφάλαια. Συνοπτικά, αφού η καλλιέργεια των κυττάρων φτάσει σε πυκνότητα 70% (ημέρα 0), τα κύτταρα διεγείρονται με θρεπτικό υλικό διαφοροποίησης (DMEM) το οποίο περιέχει 0.5 mM IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine) (Sigma), 1.0 μM dexamethazone (Sigma) και 10 ng/mL ινσουλίνης. Δύο μέρες μετά (ημέρα 2), το θρεπτικό υλικό αντικαθίσταται με θρεπτικό υλικό διατήρησης το οποίο περιέχει 10 ng/mL ινσουλίνης. Στη συνέχεια, το θρεπτικό υλικό αντικαθίσταται κάθε δύο μέρες με απλό DMEM και το σύνολο των πειραματικών διαδικασιών πραγματοποιήθηκε κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης.

2.2.3. Αξιολόγηση της κυτταρικής επιβίωσης

Για την διερεύνηση των επιπέδων της κυτταρικής επιβίωσης των κυττάρων μετά από διέγερση με τους οργανικούς υποκαταστάτες αλλά και τα νεο-συντιθέμενα σύμπλοκα βαναδίου, τόσο τα προ-λιποκύτταρα όσο και τα ώριμα λιποκύτταρα, που διαφοροποιήθηκαν παρουσία της ινσουλίνης, διεγέρθηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις των υπό μελέτη ενώσεων και επώαστηκαν για 24 και 48 ώρες, αντίστοιχα. Συνοπτικά, κύτταρα επιστρώθηκαν σε ειδική πλάκα 96 οπών (2500 κύτταρα/οπή). Τα υπό μελέτη σύμπλοκα αλλά και οι οργανικοί υποκαταστάτες διαλύθηκαν με την βοήθεια περιδίνησης (vortex) σε αρχική συγκέντρωση 500 μM στο θρεπτικό υλικό επώασης των κυττάρων. Όλα τα διαλύματα ήταν φρέσκα καθώς παρασκευάστηκαν ακριβώς πριν την χορήγησή τους στα κύτταρα. Οι τελικές συγκεντρώσεις ήταν σε εύρος 1-200 μM . Μετά το πέρας της επώασης με τις υπό μελέτη ενώσεις, χρησιμοποιήθηκε το kit εταιρείας Promega Cell Titer GLo το οποίο προστίθεται σε αναλογία 1:1 με το θρεπτικό υλικό χωρίς αυτό να αφαιρείται. Η ανίχνευση και μέτρηση του παραγόμενου σήματος πραγματοποιήθηκε με το λουμιόμετρο Glomax 96 micro plate luminometer (Promega Corporation, WI, USA).

2.2.4. Επαγωγή της λιπογένεσης με τα V(V)-σύμπλοκα

Για την επαγωγή της κυτταρικής ωρίμανσης τα πρώιμα λιποκύτταρα 3T3-L1, διαφοροποιήθηκαν σε ώριμα λιποκύτταρα ακολουθώντας το πρωτόκολλο επαγωγής της κυτταρικής διαφοροποίησης που περιγράφηκε παραπάνω. Τα προ-λιποκύτταρα διεγέρθηκαν είτε με 10 ng/mL ινσουλίνης είτε με διάφορες συγκεντρώσεις των υπό μελέτη συμπλόκων βαναδίου (1-20 μM) αντικαθιστώντας την ινσουλίνη ή σε συνδυασμό με αυτή. Τα σύμπλοκα που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά διαλύθηκαν στο θρεπτικό υλικό επώασης των κυττάρων (DMEM) το οποίο περιείχε 10% FBS και 1% penicillin/streptomycin και στη συνέχεια προστέθηκαν στα κύτταρα αφού προηγήθηκε φιλτράρισμα όλων των διαλυμάτων στις τελικές επιθυμητές συγκεντρώσεις. Σε όλα τα πειράματα η ινσουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας. Επιπρόσθετα, ως απλός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία δεν διαφοροποιήθηκαν. Κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης έγινε χρώση των παραγόμενων λιπιδίων για την ποιοτική εκτίμηση της επιτυχούς διαφοροποίησης ενώ ακόμη έγινε εκχύλιση του ολικού mRNA προκειμένου να εκτιμηθεί με χρήση της RT-PCR η επαγωγή σχετιζόμενων γονιδίων-στόχων (PPAR- γ , και GLUT 4). Το κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τουλάχιστον τρεις φορές.

2.2.5. Ποσοτική εκτίμηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του mRNA στενά συνδεδεμένων μοριακών στόχων μετά από διαφοροποίηση με τις νεοσυντιθέμενες ενώσεις V(V) (RT-PCR)

Για την εκτίμηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων, κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης των κυττάρων, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του ολικού mRNA των κυττάρων χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Trizol (LifeScience, Chemilab) ακολουθώντας την διαδικασία που έχει ήδη περιγραφεί. Η σύνθεση του cDNA έγινε με χρήση του kit της BioRad και του QuantiTect SYBR Green PCR kit.

2.2.6. Έλεγχος της επίδρασης των V(V)-συμπλόκων στην μεταναστευτικότητα των 3T3-L1 προ-λιποκυττάρων

Η αξιολόγηση της πιθανής αναστολής της φυσιολογικής μεταναστευτικότητας των 3T3-L1 προ-λιποκυττάρων έγινε με χρήση της δοκιμασίας *in vitro* scratch assay. Για τον σκοπό αυτό, προ-λιποκύτταρα επιστρώθηκαν σε ειδικά πιάτα καλλιέργειας (35 mm cell culture dishes) και επώαστηκαν παρουσία μόνο θρεπτικού υλικού. Όταν η καλλιέργεια των κυττάρων έφτασε σε ποσοστό πυκνότητας 70-80% δημιουργήθηκε διακοπή της καλλιέργειας με την βοήθεια αποστειρωμένου μικρο-ρύγχους πιπέτας 100 μ L. Στη συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία των υπό μελέτη ενώσεων για 24 ώρες και τελική συγκέντρωση 20 μ M. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε με την βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου (AxioObserverZ1 microscope) και μεγέθυνση 10x. Επιπλέον, ελήφθησαν μικρο-φωτογραφίες με χρήση κάμερας (AxioCamHccamera).

2.2.7. Στατιστική ανάλυση

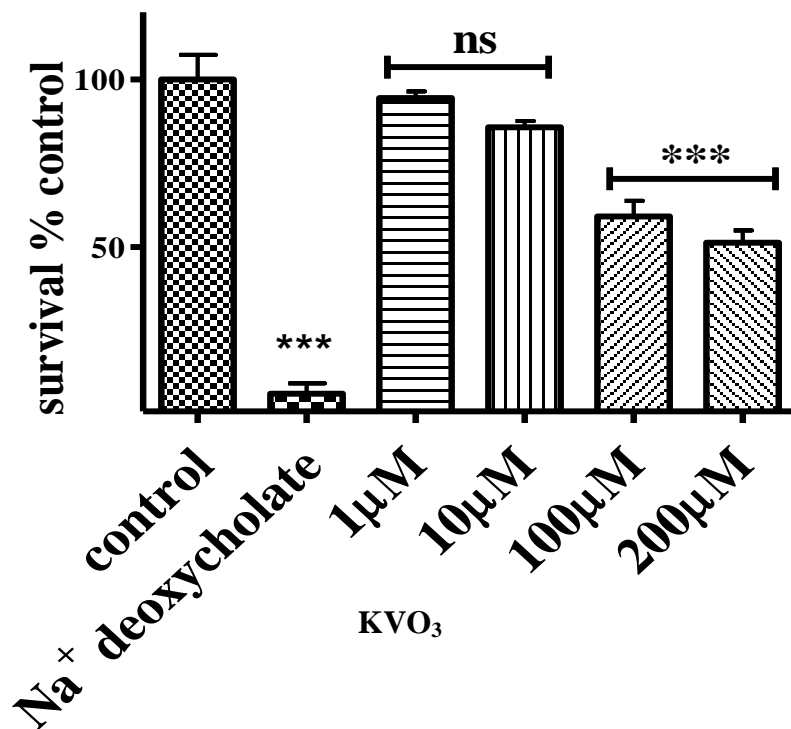
Τα αποτελέσματα αποτελούν τον μέσο όρο σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Ο μέσος όρος σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε για κάθε ομάδα – συνθήκη. Οι απόλυτες τιμές των επιπέδων κυτταρικής επιβίωσης υπολογίστηκαν για κάθε συνθήκη και εκφράστηκαν ως εκατοστιαία μεταβολή σε σχέση με τον απλό μάρτυρα ενώ ακολούθησε ανάλυση ANOVA (analysis of variance) για όλα τα πιθανά ζεύγη και στατιστική μετα-ανάλυση (post hoc analyses) Tukey και Dunnet στην περίπτωση της RT-PCR. Οι βαθμοί της σημαντικότητας ορίστηκαν ως εξής: * $p < 0.05$ (σημαντικό), ** $p < 0.01$ (υψηλά σημαντικό) και *** $p < 0.001$ (εξαιρετικά σημαντικό) ή μη σημαντικό ($p > 0.05$).

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Αποτελέσματα κυτταρικής επιβίωσης

3.1.1. Μέτρηση της βιωσιμότητας των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με απλές, ανόργανες μορφές βαναδίου.

Όπως και στην περίπτωση του ψευδαργύρου, κρίθηκε και εδώ απαραίτητη η διερεύνηση της ενδεχόμενης τοξικής δράσης απλών, ανόργανων, μη συμπλοκοποιημένων μορφών βαναδίου. Για το σκοπό αυτό, προ-λιποκύτταρα εκτέθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις πεντασθενούς βαναδίου V(V) για σύντομο χρονικό διάστημα 24 ωρών. Η ένωση που επιλέχθηκε είναι η KVO_2 . Οι συγκεντρώσεις οι οποίες ελέγχισαν είναι 1, 10, 100 και 200 μM . Το δεοξυχολικό νάτριο (sodiumdeoxycholate) χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας της δοκιμασίας σε αναλογία 1 mg/mL. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.3.1 η ένωση KVO_3 μειώνει σημαντικά την κυτταρική βιωσιμότητα με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο σε σχέση με τον φυσιολογικό μάρτυρα ο οποίος αντιστοιχεί σε κύτταρα τα οποία επώαστηκαν μόνο σε πλήρες θρεπτικό υλικό ($p < 0.05$). Πιο αναλυτικά, η κυτταρική βιωσιμότητα φαίνεται να μην επηρεάζεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις (1, 10 μM) του KVO_3 ενώ οι συγκεντρώσεις των 100 και 200 μM επιφέρουν μείωση κατά 40% και 50% αντίστοιχα των επιπέδων κυτταρικής επιβίωσης σε σχέση με τον μάρτυρα ($p < 0.05$).



Εικόνα 3.3.1 Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με την ένωση KVO₃ σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

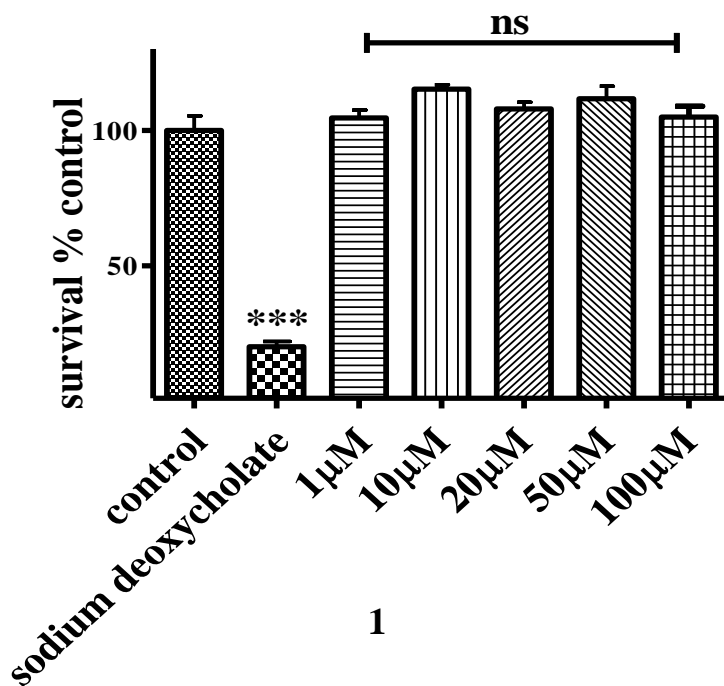
3.1.2 Μέτρηση της βιωσιμότητας των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με τους νεοσυντιθέμενους υποκαταστάτες (LH1-LH3).

Προκειμένου να διερευνηθεί η ενδεχόμενη τοξική δράση των οργανικών νεοσυντιθέμενων υποκαταστατών στα 3T3-L1 προ-λιποκύτταρα, τα κύτταρα εκτέθηκαν για 24 ώρες σε διάφορες συγκεντρώσεις (1, 10, 100, 200 µM) των LH1, LH2 και LH3. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.3.2, ο οργανικός υποκαταστάτης LH3 μειώνει σημαντικά την κυτταρική επιβίωση με τρόπο που εξαρτάται από την συγκέντρωση σε σχέση με τον μάρτυρα. Πιο συγκεκριμένα, σε συγκέντρωση 1 µM η κυτταρική επιβίωση μειώνεται κατά 28%, σε συγκέντρωση 10 µM η βιωσιμότητα μειώνεται κατά 35%, σε συγκέντρωση 100 µM κατά 70 % ενώ σε συγκέντρωση 200

μM η κυτταρική επιβίωση μειώνεται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90% σε σχέση με τον μάρτυρα ($p < 0.05$). Στην περίπτωση του υποκαταστάτη LH2 παρατηρείται μείωση της κυτταρικής επιβίωσης μόνο σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 200 μM ενώ ο υποκαταστάτης LH1 είναι ατοξικός σε ολόκληρο το εύρος των συγκεντρώσεων (1-200 μM) που μελετήθηκε.

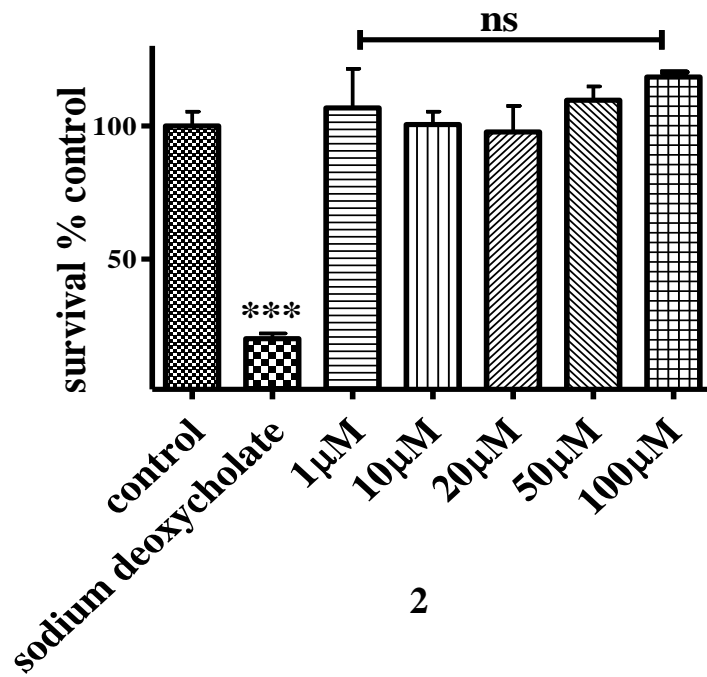
3.1.3 Μέτρηση της βιωσιμότητας των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με τα νεοσυντιθέμενα μεταλλο-σύμπλοκα βαναδίου (1-3).

Για την αξιολόγηση της τοξικής δράσης των νεοσυντιθέμενων συμπλόκων βαναδίου 1-3, τα 3T3-L1 προ-λιποκύτταρα διεγέρθηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις των υπό μελέτη συμπλόκων οι οποίες αντιστοιχούν σε εύρος 1-100 μM για 24 ώρες. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.1.3. κανένα από τα τρία σύμπλοκα δεν μειώνουν την κυτταρική επιβίωση ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις (100 μM) ($p > 0.05$) σε σχέση με τον μάρτυρα. Αξίζει να αναφερθεί ότι ακόμα και το σύμπλοκο 3 εμφανίζεται μη τοξικό αν και ο υποκαταστάτης από μόνος του μειώνει σημαντικά την κυτταρική επιβίωση (περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο) στο ίδιο εύρος συγκεντρώσεων.

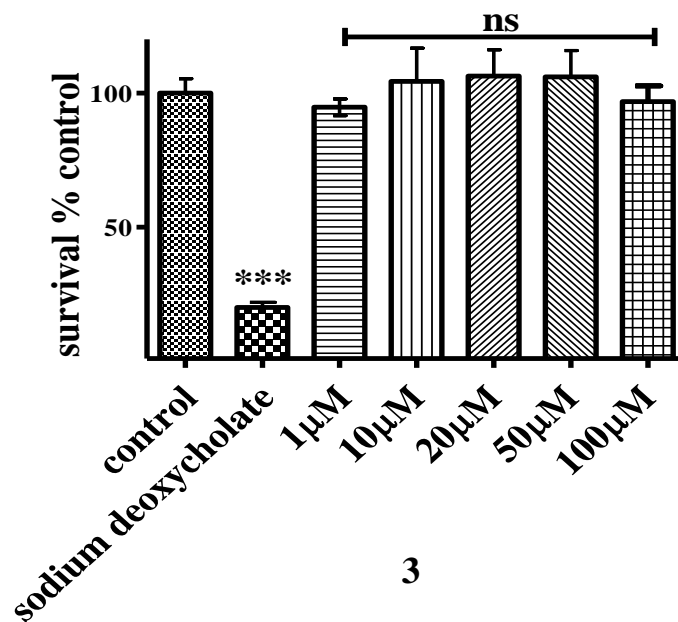


A

1



B

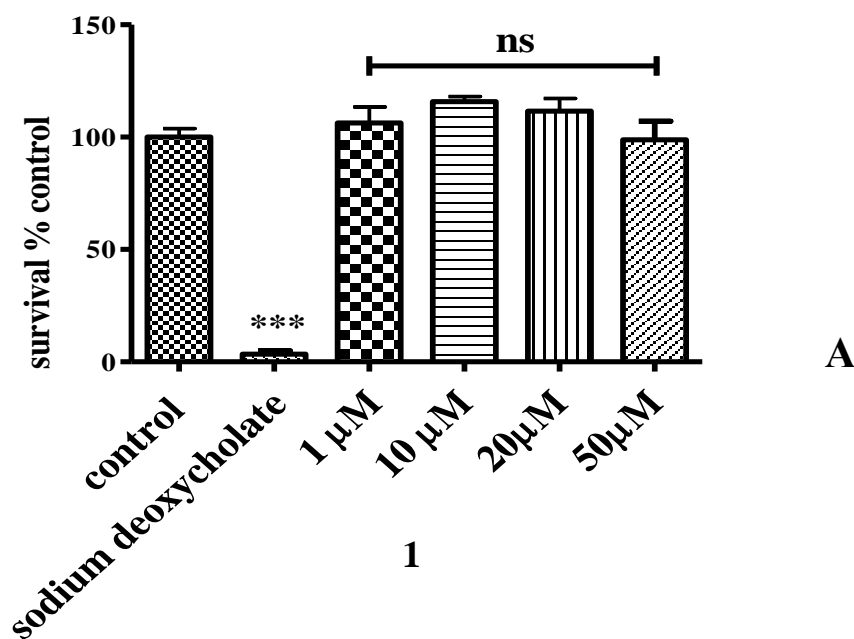


Γ

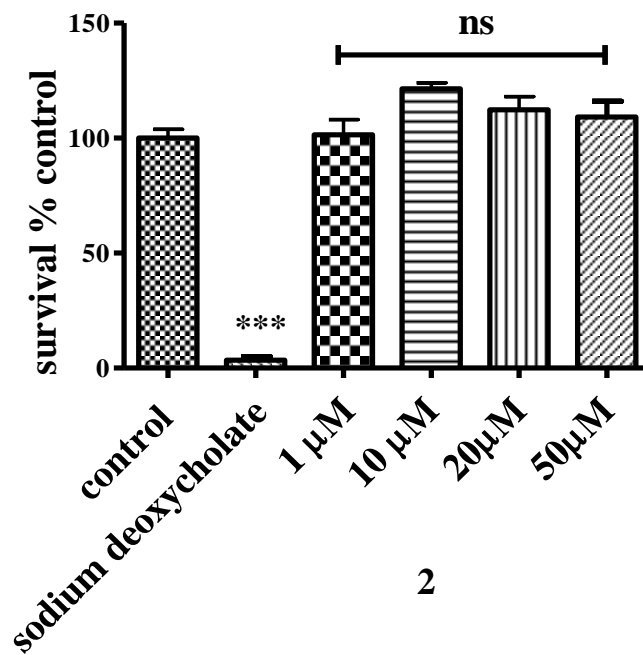
Εικόνα 3.1.3 Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με τις ενώσεις 1-3 σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

3.1.4. Μέτρηση της βιωσιμότητας των προ-λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με τα νεοσυντιθέμενα μεταλλο-σύμπλοκα βαναδίου (1-3).

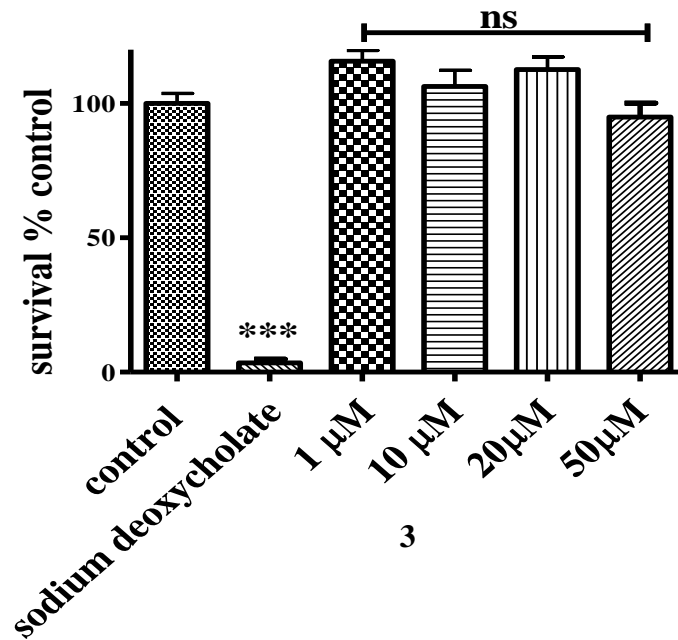
Κατά την διάρκεια της διαφοροποίησης των προ-λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα παρουσία των νεοσυντιθέμενων συμπλόκων βαναδίου, τα πρώιμα λιποκύτταρα εκτίθενται στις υπό μελέτη ενώσεις για περισσότερο από 24 ώρες. Για τον λόγο αυτό ελέγχθηκε η πιθανή τοξική δράση των ενώσεων **1-3** σε διάφορες συγκεντρώσεις (1-50 μM) για 48 ώρες. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι και τα τρία σύμπλοκα είναι ατοξικά στο εύρος συγκεντρώσεων που μελετήθηκε σε σχέση με τον μάρτυρα ($p > 0.05$) όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 3.3.5. Κατά συνέπεια και τα τρία σύμπλοκα βαναδίου μπορούν να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω για την αξιολόγηση του λιπογενετικού τους δυναμικού.



1



B

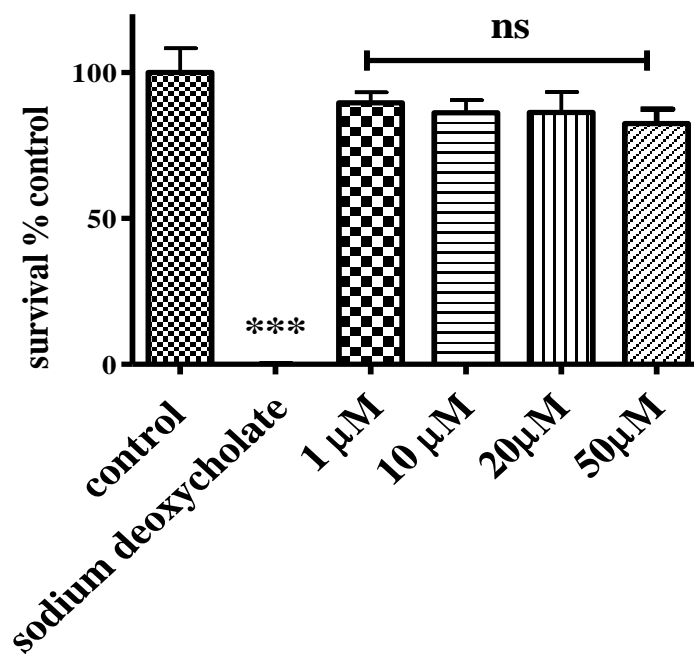


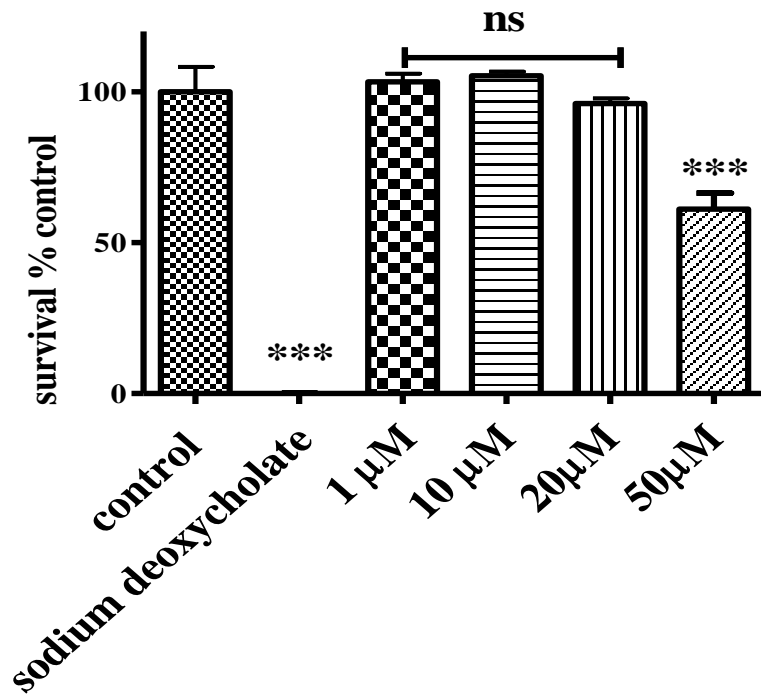
Γ

Εικόνα 3.3.5 Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των προ-λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με τις ενώσεις 1-3 σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

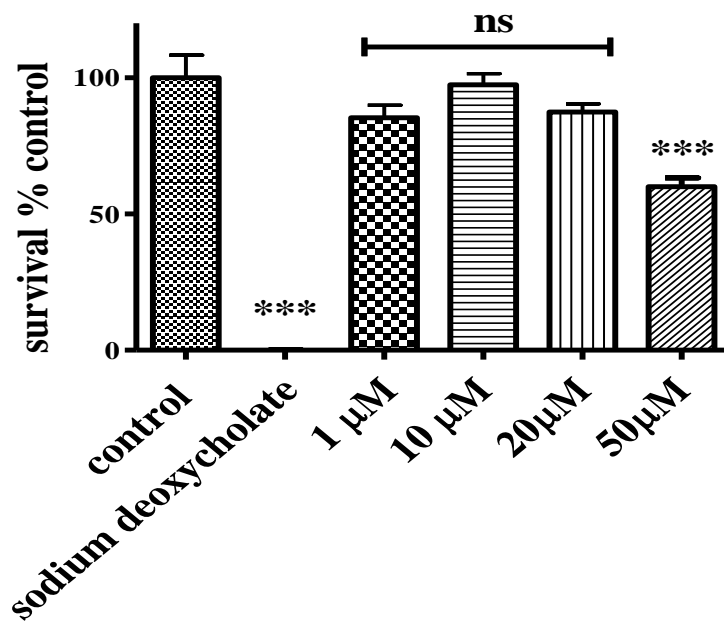
3.1.5. Μέτρηση της βιωσιμότητας των ώριμων λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με τα νεοσυντιθέμενα μεταλλο-σύμπλοκα βαναδίου (1-3).

Κατά αντιστοιχία, πραγματοποιήθηκε μέτρηση των επιπέδων κυτταρικής επιβίωσης των ώριμων λιποκυττάρων μετά από μακρά διέγερση 48 ωρών. Για τον σκοπό αυτό ώριμα λιποκύτταρα τα οποία προηγουμένως διαφοροποιήθηκαν παρουσία ινσουλίνης επωάστηκαν με τα νεοσυντιθέμενα σύμπλοκα βαναδίου **1-3** σε διάφορες συγκεντρώσεις εύρους 1-50 μM . Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.1.7 η ένωση **1** δεν είναι τοξική για το εύρος των συγκεντρώσεων που ελέγχθησαν ενώ οι ενώσεις **2** και **3** εμφανίζουν τοξικότητα σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 20 μM σε σχέση με τον μάρτυρα ($p > 0.05$).





2

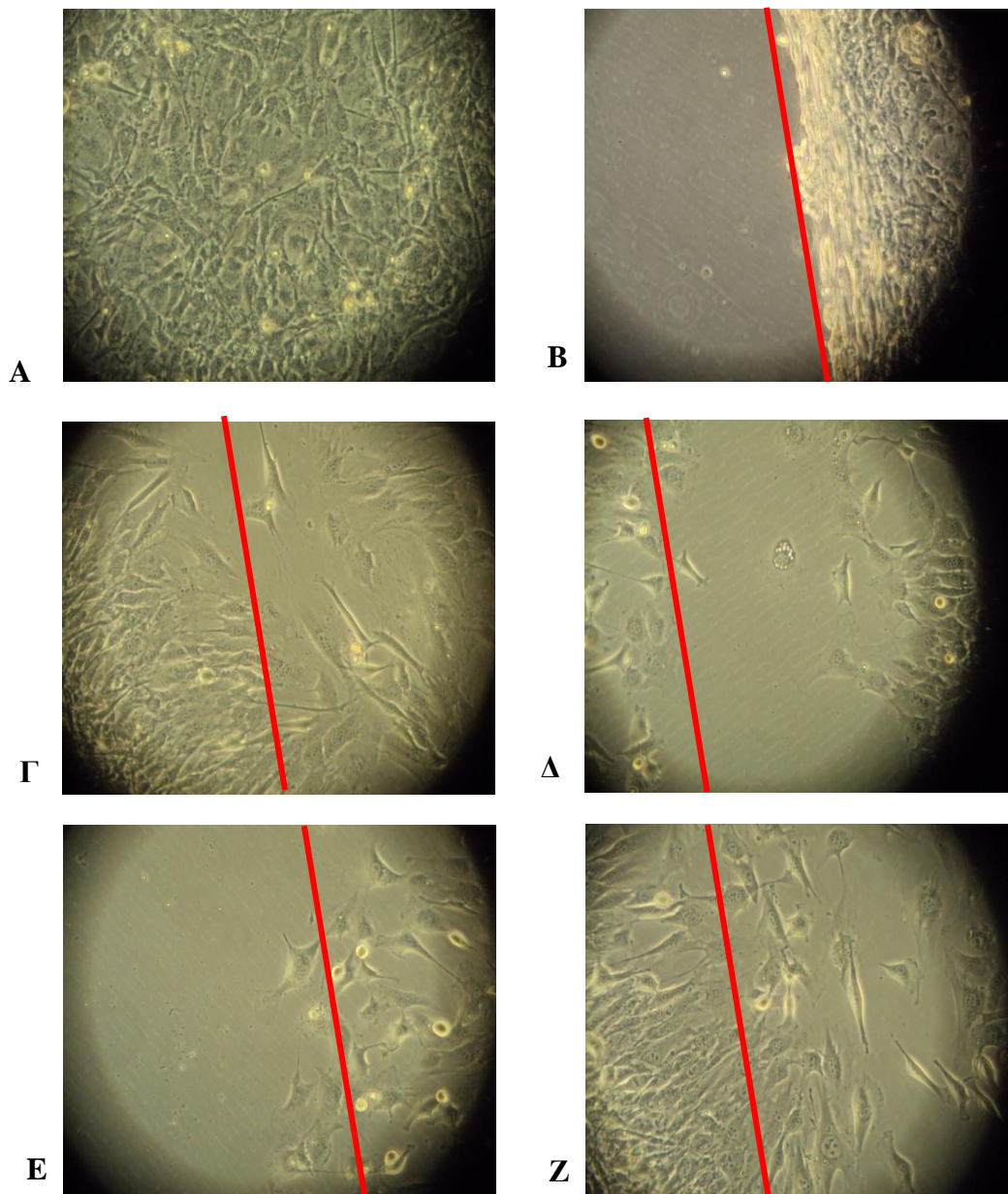


3

Εικόνα 3.1.5 Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των ώριμων λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με τις ενώσεις 1-3 σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

3.1.6. Έλεγχος της επίδρασης των V(V)-συμπλόκων στην μεταναστευτικότητα των 3T3-L1 προ-λιποκυττάρων (1-3).

Για την αξιολόγηση της επίδρασης των νεοσυντιθέμενων συμπλόκων βαναδίου στην φυσιολογική, ενδογενή μεταναστευτικότητα των 3T3-L1 προ-λιποκυττάρων, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία scratch assay. Τα κύτταρα διεγέρθηκαν με τελική συγκέντρωση 20 μM του κάθε συμπλόκου. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία εκτέθηκαν μόνο σε θρεπτικό υλικό (DMEM). Τα κύτταρα διεγέρθηκαν για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η ένωση **2** και **3** αναστέλλουν την φυσιολογική κυτταρική μετανάστευση (Εικόνα 3.1.8) σε αντίθεση με την ένωση 1 η οποία φαίνεται ως δεν αναστέλλει στην κυτταρική μεταναστευτικότητα καθώς η πυκνότητα της οπής που δημιουργήθηκε είναι όμοια με αυτή του μάρτυρα.

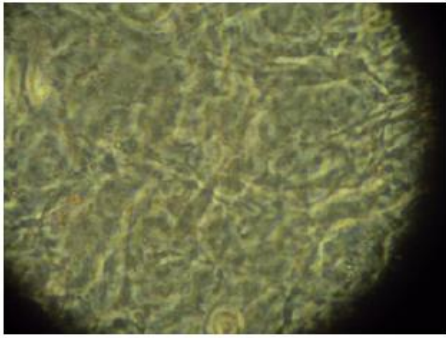


Εικόνα 3.1.6 Μικροφωτογραφία οπτικού μικροσκοπίου δείγματος καλλιέργειας πρώιμων λιποκυττάρων 3T3-L1 μετά από μηχανική διακοπή της φυσιολογικής συνέχειας της καλλιέργειας με σκοπό την ποιοτική εκτίμηση της ενδεχόμενης αναστολής της φυσιολογικής μεταναστευτικότητας των κυττάρων Α) πριν την διακοπή της καλλιέργειας, Β) την χρονική στιγμή $t=0$, Γ) 24 ώρες μετά σε συνθήκες μάρτυρα, Δ) 24 ώρες μετά από έκθεση στην ένωση 1, Ε) 24 ώρες μετά από έκθεση στην ένωση 2, Ζ) 24 ώρες μετά από έκθεση στην ένωση 3 σε τελική συγκέντρωση 20 μM (10x 5 \times μεγέθυνση).

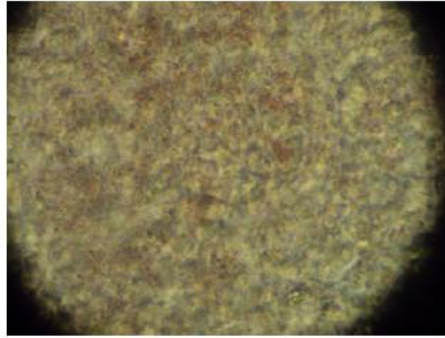
3.2 Αποτελέσματα κυτταρικής διαφοροποίησης

3.2.1. Διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα με τις ενώσεις 1-3 (oil red O staining)

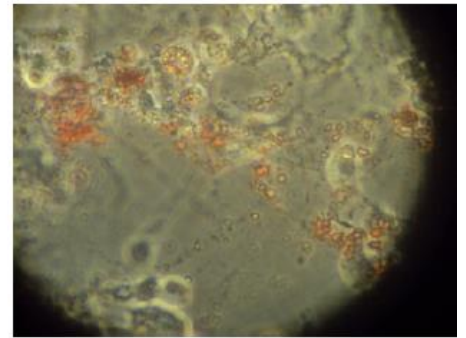
Για την διερεύνηση του λιπογενετικού δυναμικού των νεοσυντιθέμενων συμπλόκων βαναδίου, τα πρώιμα λιποκύτταρα 3T3-L1 διεγέρθηκαν με τις υπό μελέτη ενώσεις ακολουθώντας γνωστό πρωτόκολλο διαφοροποίησης αντικαθιστώντας την ινσουλίνη ή χρησιμοποιούμενα σε συνδυασμό με αυτή. Και τα τρία σύμπλοκα επάγουν την κυτταρική διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα στις συγκεντρώσεις που ελέγησαν (1-20 μM). Η παραγωγή των λιπιδίων είναι εμφανής ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις (1 μM). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η ινσουλίνη ενώ ακόμη τα τρία σύμπλοκα χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό με την ινσουλίνη προκειμένου να ελεγχθεί η συνεργική ή ανταγωνιστική τους δράση με την ορμόνη.



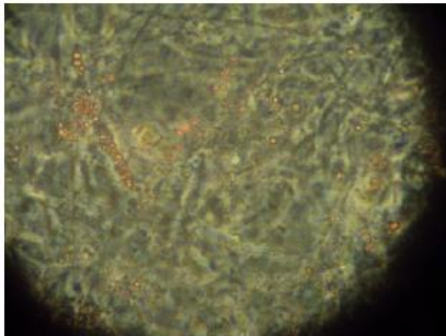
control



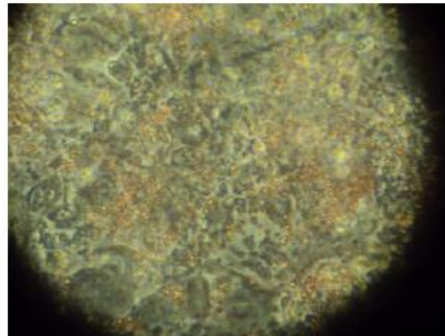
Insulin (10×4x)



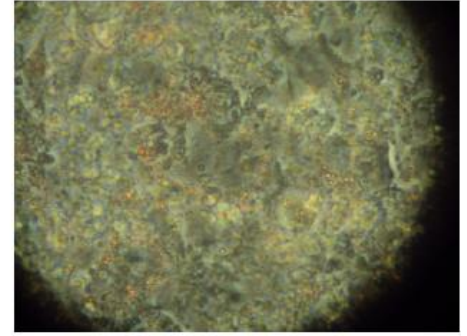
Insulin (40×4x)



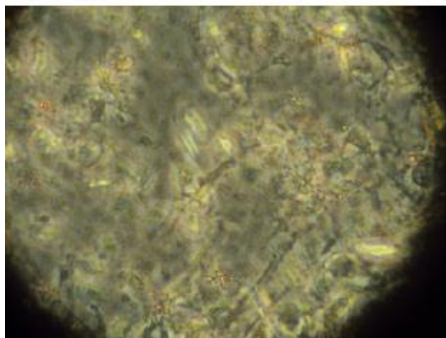
1 (1μM)



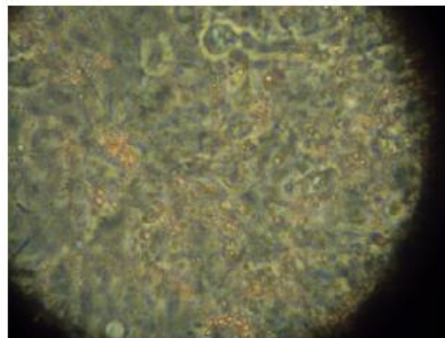
1 (20 μM)



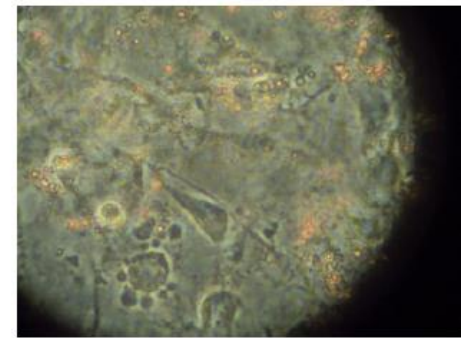
1 (V-I)



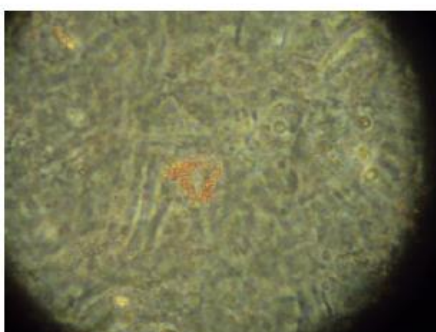
2 (1μM)



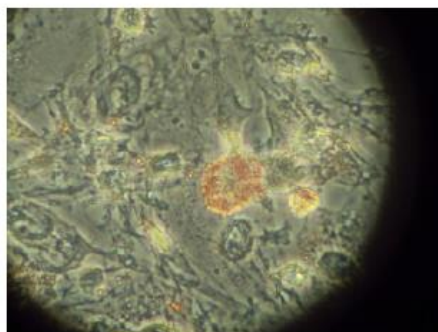
2 (20 μM)



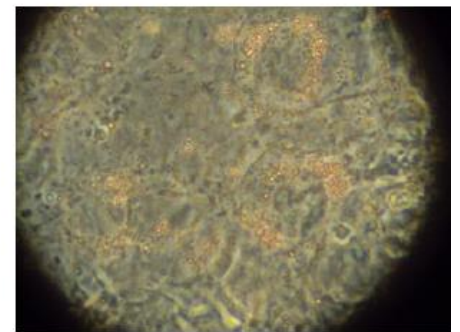
2 (V-I)



3 (1 μM)



3 (20 μM)

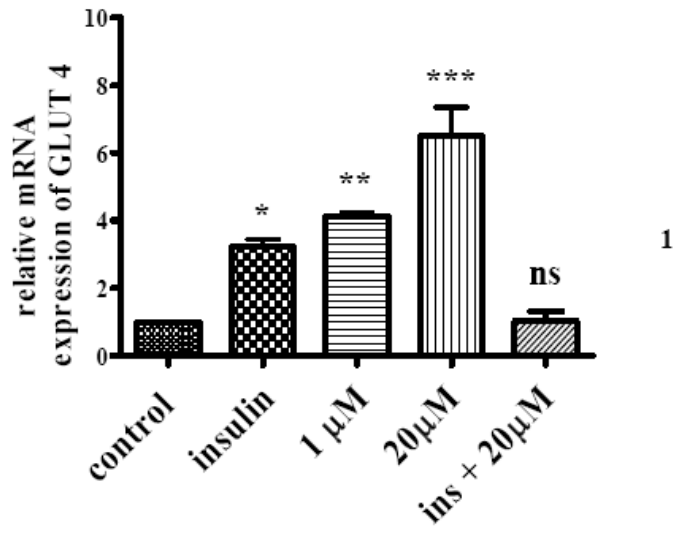


3 (V-I)

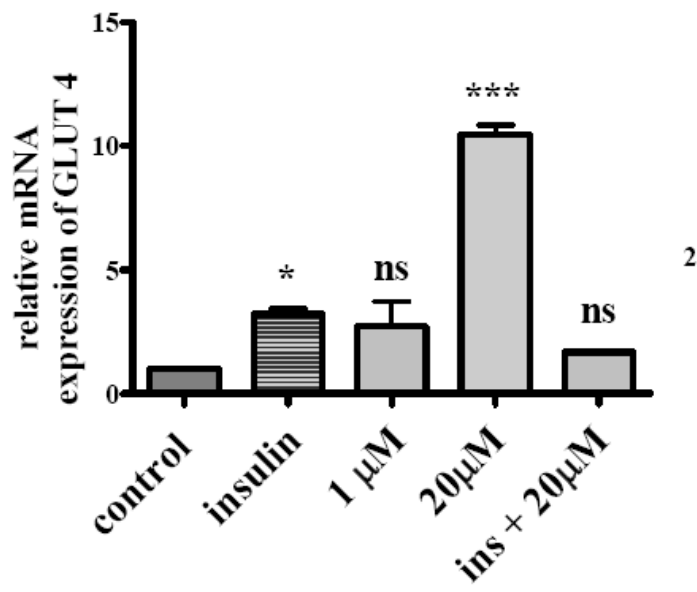
Εικόνα 3.2.1 Μικροφωτογραφίες οπτικού μικροσκοπίου δείγματος καλλιέργειας πρώιμων λιποκυττάρων 3T3-L1 κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης μετά από ειδική χρώση των σχηματιζόμενων λιπιδίων με oilredOstainingA) μη διαφοροποιημένα κύτταρα (προ-λιποκύτταρα), Β, Γ) διαφοροποιημένα με ινσουλίνη (θετικός μάρτυρας) Δ) διαφοροποιημένα με την ένωση 1 σε συγκέντρωση 1 μM , Ζ) διαφοροποιημένα με την ένωση 1 σε συγκέντρωση 20 μM , Η) διαφοροποιημένα με την ένωση 1 σε συγκέντρωση 20 μM και ινσουλίνη 10 ng/ml, Θ) διαφοροποιημένα με την ένωση 2 σε συγκέντρωση 1 μM , Ι) διαφοροποιημένα με την ένωση 2 σε συγκέντρωση 20 μM , και Κ) διαφοροποιημένα με την ένωση 2 σε συγκέντρωση 20 μM και και ινσουλίνη 10 ng/ml, Λ) διαφοροποιημένα με την ένωση 3 σε συγκέντρωση 1 μM , Μ) διαφοροποιημένα με την ένωση 3 σε συγκέντρωση 20 μM , και Ν) διαφοροποιημένα με την ένωση 3 σε συγκέντρωση 20 μM και ινσουλίνη και ινσουλίνη 10 ng/ml. (10x 4 \times μεγέθυνση).

3.2.3. Διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα με τις ενώσεις 1-3 (RT-PCR)

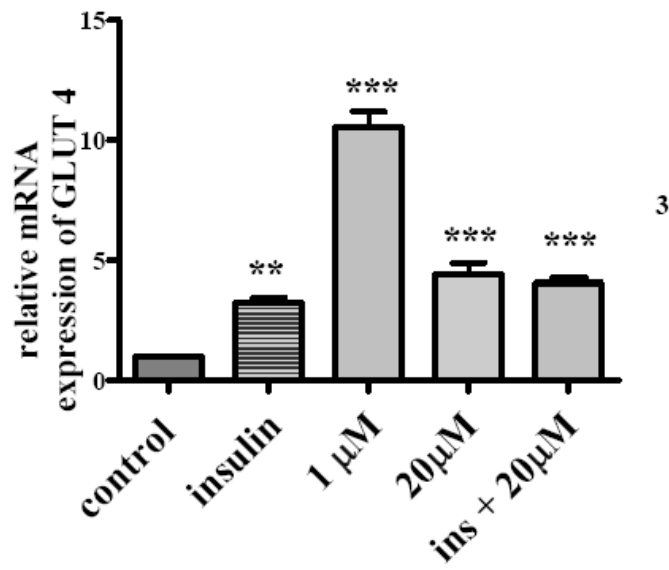
Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση ή/και εμπλοκή των νεοσυντιθέμενων συμπλόκων βαναδίου στην έκφραση των γονιδίων GLUT 4 και PPAR- γ , κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης έγινε απομόνωση του ολικού mRNA των κυττάρων. Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης εκτιμώνται με την βοήθεια της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR, real time polymerase chain reaction). Οι συνθήκες που ελέγχθηκαν ήταν 1 μ M και 20 μ M ενώ επίσης εξετάστηκε η ενδεχόμενη συνεργική ή ανταγωνιστική δράση της ινσουλίνης. Κύτταρα διαφοροποιημένα με ινσουλίνη αποτέλεσαν τον θετικό μάρτυρα ενώ ως επιπλέον μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν με διαφοροποιημένα κύτταρα. Αρχικά, ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου PPAR- γ το οποίο είναι υπεύθυνο για την επαγωγή της διαφοροποίησης δρώντας ως μεταγραφικός παράγοντας πολλών γονιδίων υπεύθυνων για την επιτυχή διαφοροποίηση των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα μεταξύ αυτών και του ιστοειδικού για τα ώριμα λιποκύτταρα γλυκοζομεταφορέα GLUT 4. Πιο συγκεκριμένα, το μέγιστο αποτέλεσμα εμφανίζεται σε συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε 20 μ M όταν τα κύτταρα διαφοροποιούνται παρουσία των ενώσεων **1** και **2**. Αντίθετα, η ένωση **3** εμφανίζει το μέγιστο αποτέλεσμα σε συγκέντρωση 1 μ M. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου GLUT 4 αντιστοιχούν σε 6.4 φορές υψηλότερα σε σχέση με τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα όταν η διαφοροποίηση πραγματοποιείται με την ένωση **1** σε συγκέντρωση 20 μ M. αντίστοιχα, παρουσία της ένωσης **2** τα επίπεδα έκφρασης του GLUT 4 αντιστοιχούν σε 10.4 φορές υψηλότερα σε σχέση με τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ένωση **3** καθώς όπως αναφέρθηκε το μέγιστο αποτέλεσμα αντιστοιχεί στην συγκέντρωση 1 μ M με τα επίπεδα του GLUT 4 να είναι σχεδόν 11 φορές υψηλότερα σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διαφοροποιημένα κύτταρα). Επιπλέον, όταν τα κύτταρα διαφοροποιήθηκαν παρουσία των ενώσεων σε συνδυασμό με την ινσουλίνη, τα επίπεδα έκφρασης ήταν ιδιαίτερα χαμηλά σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (ινσουλίνη) στην περίπτωση των ενώσεων **1** και **2**. Όταν τα κύτταρα διαφοροποιήθηκαν με την ένωση **3** σε συνδυασμό με την ινσουλίνη τα επίπεδα έκφρασης του GLUT 4 ήταν ίδια με αυτά όταν τα κύτταρα διαφοροποιήθηκαν μόνο παρουσία της ένωσης **3**.



A



B



C

Εικόνα 3.2.7 Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την ποσοστιαία έκφραση σε επίπεδο mRNA του γονιδίου GLUT 4 κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης με τις ενώσεις A) 1, B) 2, και Γ) 3 σε συγκεντρώσεις 1-20 μ M ή/και με ινσουλίνη σε αναλογία 10 ng/ml. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η πολυπλοκότητα του ρόλου του βαναδίου στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση, τον ενεργειακό μεταβολισμό αλλά και την ινσουλινομιμητική δράση, αποτελεί το έναυσμα για περαιτέρω διερεύνηση της χρήσης του ως μεταλλοφάρμακο στην αντιμετώπιση του ΣΔ τύπου 2. Με βάση αυτό το χαρακτηριστικό, μελετήθηκε η λιπογενετική δράση του βαναδίου σε σχέση με την ανάπτυξη αντιδιαβητικών παραγόντων που βασίζονται στο βανάδιο. Για τον σκοπό αυτό α) σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν κατάλληλοι οργανικοί Schiff base υποκαταστάτες, β) μια σειρά καλά καθορισμένων, φυσικοχημικά χαρακτηρισμένων και διαλυτών δυαδικών V(V)-L υλικών, γ) αξιολογήθηκε η επίδρασή τους στην κυτταρική βιωσιμότητα προ- και ώριμων λιποκυττάρων σε συνδυασμό με την ικανότητά τους να επάγουν την λιπογένεση, και δ) εξετάστηκε η επίδρασή ή/και εμπλοκή τους στην επαγωγή της έκφρασης στενά συνδεδεμένων βιοδεικτών. Τα συλλογικά αποτελέσματα α) υποδεικνύουν την σημασία των Schiff base υποκαταστατών στην διακριτή συμπεριφορά του βαναδίου με έμφαση την λιπογένεση, β) συνεισφέρουν στην ανάδειξη μοριακών στόχων που επηρεάζονται από συγκεκριμένες μορφές βαναδίου, γ) υπογραμμίζουν την αλληλεπίδραση της δομικής ειδοκατανομής του βαναδίου και της λιπογένεσης θέτοντας την βάση για την ανάπτυξη νέων μεταλλοφαρμάκων έναντι του ΣΔ τύπου 2.

4.1 Σχεδιασμός και σύνθεση των V(V)-Schiff υλικών

Το προφίλ της βιολογικής συμπεριφοράς του V(V) φαίνεται πως σχετίζεται άμεσα και εξαρτάται από το περιβάλλον συναρμογής του. Η παρατήρηση αυτή αναδύεται έπειτα από κατάλληλη επιλογή οργανικών υποστρωμάτων τα οποία συμπλοκοποιούν το συγκεκριμένο μεταλλοϊόν. Συνεπώς, η φύση των υποκαταστατών η οποία

καθορίζεται με βάση χημικά και δομικά χαρακτηριστικά επηρεάζει την χημική συγγένεια του μεταλλοϊόντος αυτού και πιθανόν την (βιο)χημική του δραστηριότητα. Στοχευμένη και προσεκτική επιλογή υδρόφοβων/υδροφιλων χαρακτηριστικών ομάδων (O,N) προωθούν την χηλικοποίηση του V(V) συμβάλλοντας στο τελικό περιβάλλον συντονισμού του βαναδίου. Τα καλά καθορισμένα σύμπλοκα του βαναδίου καθορίζουν την αλληλεπίδραση του μεταλλοϊόντος (κινητικά ή/και θερμοδυναμικά) με συγκεκριμένους στόχους του κυτταρικού περιβάλλοντος. Κατά συνέπεια, το συλλογικό προφίλ των συμπλόκων του βαναδίου μπορεί να θεωρηθεί κατάλληλο για την ανάδειξη αποτελεσματικών ινσουλινομιμητικών παραγόντων στον ΣΔ τύπου 2. Για την επίτευξη τέτοιων καλά διαμορφωμένων ειδών βαναδίου, τα οργανικά υποστρώματα που επιλέχθηκαν ικανοποιούν αρκετές από τις προαναφερθείσες προϋποθέσεις με αποτέλεσμα η σύνθεση των δυαδικών V(V)-Schiff base υλικών να οδηγεί σε αλληλεπίδραση με κυτταρικούς στόχους που εμπλέκονται στο μεταβολισμό, όπως η λιπογένεση και η μείωση της υπεργλυκαιμίας στον ΣΔ τύπου 2. Στο πλαίσιο αυτό, η επιλογή των υποκαταστατών βασίστηκε α) στο γεγονός ότι περιέχουν κοινό κορμό βανιλίνης ως δομικό μοτίβο, και β) στην ύπαρξη μεταβλητού αριθμού αλκοολικών άκρων (ένα έως τρία) τα οποία προσδίδουν δομική διαφοροποίηση και την ικανότητα για διακριτή αλληλεπίδραση των εν λόγω συμπλόκων του βαναδίου. Ο πυρήνας της βανιλίνης παρέχει μια καλά διαμορφωμένη κοιλότητα για την σύνδεση του V(V) μέσω φαινολικών και ιμινο- ομάδων, αφήνοντας διαθέσιμες θέσεις για δυναμική συναρμογή με δύο οξο-ομάδες μέσω διπλών δεσμών και τις αλκοολικές ομάδες του Schiff υποστρώματος. Η παρουσία των χαρακτηριστικών αλκοολικών ομάδων προσδίδει την δυνατότητα για σύνδεση άλλων υποστρωμάτων για την εγκαθίδρυση αλληλεπιδράσεων μέσω δεσμών υδρογόνου με κυτταρικούς στόχους, διευκολύνοντας με τον τρόπο αυτό την βιοδραστηριότητα του V(V) η οποία μεταφράζεται σε (α)τοξικότητα, λιπογένεση ή/και ινσουλινομιμητική συμπεριφορά. Έτσι, η σύνθεση των οργανικών υποστρωμάτων και η επακόλουθη σύνθεση των δυαδικών υλικών V(V) συνδέεται στενά με τον πιθανό τους ρόλο στην διερεύνηση και αξιολόγηση της βιοχημικής δραστηριότητας του συγκεκριμένου μεταλλοϊόντος. Ο φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των υλικών βασίστηκε σε στοιχειακή ανάλυση, FT-IR, ESI-MS, NMR και κρυσταλλογραφία ακτινών X παρέχοντας ισχυρή απόδειξη για την χρήση τους σε βιολογικές δοκιμασίες.

4.2 Σχέση δομής-βιολογικής δράσης

Τα V(V)-υλικά (1-3) που προκύπτουν διατηρούν τα βασικά χαρακτηριστικά που διαθέτουν και οι ελεύθεροι υποκαταστάτες και αποτελούν κατάλληλες, δομικά, διαμορφωμένες ενώσεις που διαθέτουν ανάλογη βιολογική δραστηριότητα. Τα υλικά αυτά διαθέτουν αρκετά βασικά χαρακτηριστικά τα οποία επιτρέπουν την κατάταξή τους στην ίδια οικογένεια. Τα κοινά αυτά χαρακτηριστικά είναι τα εξής: α) και τα τρία υλικά περιέχουν έναν Schiff υποκαταστάτη ανά μεταλλοϊόν V(V) (η ένωση 1 περιέχει δύο υποκαταστάτες ανά δύο V(V) στην στερεά κατάσταση), β) σε όλες τις ενώσεις ο Schiff υποκαταστάτης είναι διπλά αποπρωτονιωμένος, με το πρώτο σημείο να είναι η φαινολική ομάδα και το δεύτερο η ένα από τα αλκοολικά άκρα, και γ) η αποπρωτονιωμένη ομάδα είναι αυτή που συμμετέχει στην σύνδεση του V(V) ενώ τα υπόλοιπα άκρα βρίσκονται απομακρυσμένα από το κέντρο συντονισμού του μεταλλοϊόντος. Στα πλαίσια αυτά, στην ένωση 1 η μόνη αποπρωτονιωμένη ομάδα συνδέεται με το V(V) ενώ οι υπόλοιπες τρεις παραμένουν ελεύθερες. Αντίστοιχα, στην 2, η μία ομάδα συνδέεται με το V(V) ενώ η δεύτερη βρίσκεται ελεύθερη και απομακρυσμένη και στην 3 η μόνη αποπρωτονιωμένη ομάδα βρίσκεται συνδεδεμένη με το V(V). Η περιγραφή αυτή υποδεικνύει διακριτά είδη σε στερεά κατάσταση με συγκεκριμένη δομική αρχιτεκτονική ενώ η ύπαρξη μεταβλητού αριθμού αλκοολικών ομάδων προσδίδει την ικανότητα για πολλαπλές, διαφορετικές αλληλεπιδράσεις (δεσμοί υδρογόνου) με κυτταρικούς στόχους.

Συλλογικά, οι αναφερόμενες ομοιότητες και διαφορές των υλικών 1-3 επισημαίνουν ορισμένους βασικούς παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την δράση των ενώσεων αυτών σε βιολογικό επίπεδο με έμφαση στην τοξικότητα και την ινσουλινομιμητική δράση μέσω της κυτταρικής διαφοροποίησης. Αδιαμφισβήτητα, ωστόσο, τα κοινά δομικά χαρακτηριστικά των τριών αυτών υλικών υποστηρίζουν την χρήση τους ως διακριτές μορφές βαναδίου ασκώντας βιολογική δράση στην φυσιολογία των πρώιμων ινοβλαστών του λιπώδους ιστού και τον κυτταρικό μεταβολισμό. Παράλληλα, η σύγκριση των δομικών χαρακτηριστικών των υλικών αυτών θέτει την βάση για ουσιαστική σύγκριση των ιδιοτήτων τους και κατ' επέκταση της βιολογικής τους δράσης.

4.3 Σχέση βαναδίου βιολογικής δραστηριότητας

Το βανάδιο, έχει δείχθει ότι, μμεείται την δράση της ινσουλίνης με διάφορους τρόπους όπως είναι η αύξηση της λιπογένεσης, η μείωση της γλυκόζης του αίματος, η αναστολή της λιπόλυσης κ.α.. Στα πλαίσια αυτά στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε διερεύνηση του ινσουλινομιμητικού χαρακτήρα των ενώσεων 1-3 σε σχέση με την επαγωγή της κυτταρικής διαφοροποίησης των πρώιμων ινοβλαστών του λιπώδους ιστού σε ώριμα λιποκύτταρα. Πρωταρχικής σημασίας αποτέλεσε η αξιολόγηση της ενδεχόμενης τοξικής δράσης των συγκεκριμένων ενώσεων τόσο σε προ- όσο και σε ώριμα λιποκύτταρα για εύρος συγκεντρώσεων από 1 μM έως 100 μM . Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν σαφώς το λιπογενετικό δυναμικό των ενώσεων αυτών. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η απλή, ανόργανη μορφή KVO_3 για την αξιολόγηση της τοξικότητας με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το V(V) μειώνει τα επίπεδα της κυτταρικής βιωσιμότητας. Η χρήση των υποκαταστατών σε ελεύθερη μορφή αλλά και συμπλοκοποιημένων με το V(V) δίνει έμφαση στην διαφορετική βιολογική συμπεριφορά που παρατηρείται στις ενώσεις και που εξαρτάται από την φύση των υποστρωμάτων που επιλέγονται για την συμπλοκοποίηση του V(V). Το (α)τοξικό προφίλ των υποκαταστατών σε εύρος συγκεντρώσεων 1-100 μM τονίζει την εξάρτηση από την φύση και τον αριθμό των αλκοολικών άκρων σε κάθε ένωση που εξετάστηκε. Συνεπώς, τα υποστρώματα LH1 και LH2 είναι ατοξικά σε εύρος συγκεντρώσεων 1-100 μM σε αντίθεση με το LH3 το οποίο εμφανίζεται τοξικό για το ίδιο εύρος συγκεντρώσεων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι το δυαδικό σύμπλοκο V(V)-LH3 είναι ατοξικό για το ίδιο εύρος συγκεντρώσεων. Η αξιολόγηση της επίδρασης των ενώσεων **1-3** έλαβε χώρα *in vitro* σε εύρος συγκεντρώσεων 1-100 μM για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το τοξικό προφίλ του V(V) μειώνεται μέσω της συμπλοκοποίησης. Ειδικότερα, και οι τρεις ενώσεις εμφανίζονται ατοξικές τόσο μετά από σύντομη διέγερση των κυττάρων (24 ώρες, 1-100 μM) όσο και για πιο μακρά διέγερση (48 ώρες 1-50 μM). Συνεπώς, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η φύση των υποκαταστατών που συμπλοκοποιούν το V(V) είναι ζωτικής σημασίας για τον ρόλο που διαδραματίζει το συγκεκριμένο μεταλλοϊόν στην κυτταρική επιβίωση των πρώιμων λιποκυττάρων. Με βάση το παραπάνω προφίλ κυτταροτοξικότητας των ενώσεων, ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και στην περίπτωση των ώριμων, διαφοροποιημένων λιποκυττάρων για μακρά διέγερση 48 ωρών. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η τοξικότητα των ενώσεων **2** και **3** γίνεται εμφανής σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των

50 μM . Η ένωση **1** είναι ατοξική στις ίδιες συνθήκες και φια το ίδιο εύρος συγκεντρώσεων (1-50 μM). Παράλληλα, για την περαιτέρω αξιολόγηση του (α)τοξικού προφίλ του βαναδίου, εξετάστηκε η επίδρασή του στην φυσιολογική μεταναστευτικότητα των κυττάρων. Με βάση τα αποτελέσματα μόνο η ένωση **1** δεν επηρεάζει την κινητικότητα των κυττάρων καθώς τόσο η ένωση **2** όσο και η ένωση **3** προκαλούν αναστολή του μεταναστευτικού δυναμικού των πρώιμων λιποκυττάρων.

4.4 Επαγωγή της διαφοροποίησης με V(V)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η λιπογενετική δράση της ινσουλίνης θεωρείται θεμελιώδης βιολογική δράση της ορμόνης αυτής. Η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της ινσουλίνης στον λιπώδη ιστό εξαρτάται από διάφορα μόρια όπως είναι ο υποδοχέας της ινσουλίνης, τα υποστρώματα του υποδοχέα IRS 1 και 2, η πρωτεΐνη PI3K και η πρωτεϊνική κινάση B. Η κυτταρική σειρά 3T3-L1 αποτελεί καθιερωμένο μοντέλο με απόκριση στην ινσουλίνη όπου η επαγωγή της διαφοροποίησης μπορεί να γίνει χημικά και άρα αποτελεί ιδανικό σύστημα για την μελέτη της λιπογένεσης. Στα πλαίσια αυτά η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά χρησιμοποιήθηκε για την *in vitro* αξιολόγηση του λιπογενετικού δυναμικού των ενώσεων **1-3**. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι οι ενώσεις **1** και **2** επάγουν την κυτταρική διαφοροποίηση των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα με τρόπο που εξαρτάται από την συγκέντρωση της κάθε ένωσης σε εύρος συγκεντρώσεων από 1 έως 20 μM με τα επίπεδα της διαφοροποίησης να είναι ίδια με αυτά του θετικού μάρτυρα (ινσουλίνη). Η ένωση **3** χρησιμοποιήθηκε στο ίδιο εύρος συγκεντρώσεων ωστόσο το βέλτιστο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε σε συγκέντρωση 1 μM . Έκτος από την χρώση των παραγόμενων λιπιδίων που επιβεβαιώνει ποιοτικά την επιτυχή κυτταρική διαφοροποίηση των λιποκυττάρων, ελέγχθηκε η σχετική έκφραση του mRNA του γονιδίου του ιστο-ειδικού για τον λιπώδη ιστό γλυκοζομεταφορέα GLUT 4. Από τα αποτελέσματα προκύπτει σαφής αύξηση της έκφρασης του GLUT 4 επιβεβαιώνοντας περαιτέρω την λιπογενετική δράση των τριών ενώσεων. Η έκφραση του GLUT 4 είναι ινσουλινο-εξαρτώμενη διαδικασία καθώς αναστολή της δράσης της ινσουλίνης οδηγεί σε αναστολή της λιπογένεσης στον λιπώδη ιστό [20]. Τα συλλογικά αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το V(V) στις τρεις μορφές που χρησιμοποιήθηκε, μπορεί να διεγείρει την κυτταρική διαφοροποίηση όμοια με την ινσουλίνη. Ειδικότερα, η ένωση **1** και **2** προκαλεί ~ 6.5 και ~10.5 φορές αύξηση της έκφρασης του GLUT 4 σε συγκέντρωση 20 μM

αντίστοιχα σε σχέση με τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα όταν τα επίπεδα στην περίπτωση της ινσουλίνης αντιστοιχούν σε 3.0 φορές αύξηση. Επιπλέον, στην περίπτωση της ένωσης **3** το μέγιστο φαινόμενο που παρατηρείται σε συγκέντρωση 1 μM αντιστοιχεί σε 11 φορές μεγαλύτερη αύξηση σε σχέση με τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα. Όταν τα κύτταρα διεγέρθηκαν με τις υπό μελέτη ενώσεις σε συνδυασμό με την ινσουλίνη, η σχετική έκφραση του GLUT 4 δεν παρουσίασε αύξηση γεγονός που υποδηλώνει μη συνεργική ή/και προσθετική δράση των ενώσεων με την ινσουλίνη για τις συνθήκες που εξετάστηκαν. Στα πλαίσια αυτά πρέπει να ληφθεί υπόψη η ύπαρξη δεδομένων που υποστηρίζουν ότι το βανάδιο (στη μορφή vanadate) μπορεί να μεταβάλλει ή ακόμα και να αναστέλλει ορισμένες από τις φυσιολογικές δράσεις της ινσουλίνης [21]. Για την αποσαφήνιση του μηχανισμού αυτού απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση.

Συνολικά, τα αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι α) οι ενώσεις είναι ατοξικές σε εύρος συγκεντρώσεων 1-50 μM τόσο σε προ- όσο και σε ώριμα λιποκύτταρα μετά από σύντομη (24 ώρες) και μακρά (48 ώρες) διέγερση, β) δεν επηρεάζουν την φυσιολογική μεταναστευτικότητα των πρώιμων λιποκυττάρων, και γ) μπορούν να επάγουν την κυτταρική διαφοροποίηση σε ώριμα λιποκύτταρα σε συγκεντρώσεις μM υποδεικνύοντας ινσουλινομιμητική δράση.

4.Συμπεράσματα

Στοχεύοντας στον σχεδιασμό βιοδραστικών υβριδικών μεταλλοφαρμάκων βαναδίου για την αντιμετώπιση του ΣΔ, χρησιμοποιήθηκαν σαφώς καθορισμένα υποστρώματα Schiff Base με διακριτό, μεταβλητό αριθμό αλκοολικών ομάδων σε συνδυασμό με σταθερό κορμό βανιλίνης ώστε να αποτελέσουν υποστρώματα για την συμπλοκοποίηση του βαναδίου. Στα πλαίσια αυτά πραγματοποιήθηκε σύνθεση δυαδικών V(V)-υλικών υπό συγκεκριμένες στοιχειομετρικές συνθήκες. Τα υλικά που προέκυψαν χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένη αρχιτεκτονική που δηλώνει την παρουσία και επιρροή των τερματικών αλκοολικών ομάδων στο δομικό μοτίβο των υλικών αυτών. Αξιολόγηση της (α)τοξικής δράσης των υποκαταστατών αλλά και των διαλυτών υλικών που προέκυψαν οδήγησε στην διαμόρφωση του διακριτού βιολογικού τους προφίλ σε σχέση με τα πρώιμα λιποκύτταρα. Στοχευμένη επιλογή με βάση το ατοξικό προφίλ των ενώσεων οδήγησε σε περαιτέρω διερεύνηση της

βιολογικής τους δράσης υποστηρίζοντας για πρώτη φορά την ινσουλινομιμητική δράση του V(V) με έμφαση την λιπογένεση στον λιπώδη ιστό. Η ινσουλινομιμητική δράση του βαναδίου αξιολογήθηκε περαιτέρω μέσω του ιστο-ειδικού βιοδείκτη GLUT 4 ως καθοδικό σημείο στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης στον λιπώδη ιστό. Η βιολογική δράση των ενώσεων φαίνεται να εξαρτάται ξεκάθαρα από την ύπαρξη και αριθμό των αλκοολικών ομάδων που συνδέονται στον κορμό της βανιλίνης. Συνεπώς, τα αποτελέσματα υποστηρίζουν σαφώς καθαρτισμένη δομο-εξαρτώμενη βιολογική δράση του βαναδίου στην διαδικασία της λιπογένεσης θέτοντας την βάση στην ανάπτυξη αποτελεσματικών αντιδιαβητικών παραγόντων.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] S.N. Davis, D.K. Graner, in: J.G. Hardman, L.E. Limbird, R.W. Ruddon, A.G. Gilman (Eds.), Goodman and Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, ninth ed, Pergamon Press, New York, 1996, p. 1487.
- [2] M. Rodbell, J. Biol. Chem. 239 (1964) 375.
- [3] M.P. Czech, Ann. Rev. Biochem. 46 (1977) 359.
- [4] Y. Shechter, I. Goldwasser, M. Mironchik, M. Fridkin, D. Gefel, Coordin. Chem. Rev. 237 (2003) 3-11.
- [5] N.D. Chasteen, E.M. Lord, H.J. Thompson, J.K. Grady, Biochim. Biophys. Acta 884 (1986) 84.
- [6] Y. Shechter, S.J.D. Karlsh, Nature 284 (1980) 556.
- [7] G.R. Dubyak, A. Klienzer, J. Biol. Chem. 255 (1980) 5306.
- [8] F. Bosch, M. Hatzoglov, E.A. Park, R.W. Hanson, J. Biol. Chem. 265 (1990) 13677.
- [9] J. Singh, R.C. Nordlie, R.A. Jorgenson, Biochim. Biophys. Acta 678 (1981) 477.
- [10] M.H. Rider, R. Bartrons, L. Hue, Eur. J. Biochem. 190 (1990) 53.
- [11] H. Degani, M. Gochin, S.J.D. Karlsh, Y. Shechter, Biochemistry 20 (1981) 5795.
- [12] Y. Shechter, Diabetes 39 (1990) 1.
- [13] Y. Shechter, A. Shisheva, A.C. Lazar, J. Libman, A. Shanzer, Biochemistry 31 (1992) 2063.
- [14] H. Watanabe, M. Nakai, K. Komazawa, H. Sakurai, J. Med. Chem. 37 (1994) 876.
- [15] H. Sakurai, K. Fujii, H. Watanabe, H. Tamura, Biochem. Biophys. Res. Commun. 214 (1995) 1095.
- [16] K.H. Thompson, J.H. McNeill, C. Orvig, Chem. Rev. 99 (1999) 2561.
- [17] R.R. Holman, C.A. Cull, R.C. Turner, Diabetes Care 22 (6) (1999) 960–964.

- [18] S. Patai, *The Chemistry of the Carbon-Nitrogen Double Bond*, J. Wiley & Sons, London (1970).
- [19] E. Jungreis, S. Thabet, *Analytical Applications of Schiff bases*, Marcell Dekker, New York (1969).
- [20] T. Furuyashiki, H. Nagayasu, Y. Aoki, H. Bessho, T. Hashimoto, K. Kanazawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68 (2004) 2353–2359.
- [21] I. G. Fantus, E. Tsiani, *Mol. Cell. Biochem.* 182 (1998) 109-119.

ΜΕΡΟΣ ΙΙΙ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

ΔΙΑΒΗΤΗΤΙΚΗ ΝΕΥΡΟΠΑΘΕΙΑ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΛΛΟΪΟΝΤΩΝ ΣΤΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ. *IN VITRO* ΚΑΙ *EX VIVO* ΜΕΛΕΤΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το νευρικό σύστημα αποτελεί ένα καλά δομημένο σύστημα επικοινωνίας το οποίο επιτρέπει στους οργανισμούς να αλληλεπιδρούν κατάλληλα με το εξωτερικό περιβάλλον και παράλληλα είναι υπεύθυνα για την επικοινωνία και τον συντονισμό των ιστών και των οργάνων μεταξύ τους. Το νευρικό σύστημα μπορεί να διαιρεθεί σε κεντρικό (εγκέφαλος και νωτιαίος μυελός) και περιφερικό (σωματικό και αυτόνομο σύστημα) σύστημα το οποίο και μελετάται στην παρούσα εργασία. Οι νευρικές ίνες του περιφερικού νευρικού συστήματος μπορεί να εκτίθενται σε μία πληθώρα παραγόντων, χημικών ή μη, οι οποίοι μπορεί να είναι εν δυνάμει τοξικοί. Η έκθεση των ιών του περιφερικού νευρικού συστήματος μπορεί να είναι άμεση, δηλαδή μετά από επαφή, ή έμμεση, κυρίως μέσω της τροφικής αλυσίδας. Ανεξάρτητα της οδού έκθεσης των ιών σε τοξικούς παράγοντες οι συνέπειες που υπεισέρχονται αφορούν τόσο σε λειτουργικές όσο και σε δομικές μεταβολές. Κύρια ομάδα καταπονητικών παραγόντων των ιών του περιφερικού νευρικού συστήματος αποτελούν οι μεταλλοτοξίνες. Η έκθεση σε αυτές μπορεί να είναι είτε άμεση είτε έμμεση και οι μηχανισμοί πρόκλησης τοξικότητας περιλαμβάνουν ποικίλες και ετερογενείς οδούς. Τα μεταλλικά αυτά ιόντα μπορεί να είναι εξωγενή ή και ενδογενή και η διαταραχή της ομοιοστασίας τους οδηγεί σε πρόκληση τοξικότητας. Η επαφή των μεταλλοτοξινών με τις ίνες του ΠΝΣ μπορεί να γίνει άμεσα μέσω της τροφικής αλυσίδας και του πόσιμου νερού, έμμεσα μέσω της διαταραχής των φυσιολογικών επιπέδων ενδογενών μετάλλων, όπως είναι χαλκός, ή ακόμα και μέσω φαρμακευτικών θεραπειών που στηρίζονται σε μεταλλοφάρμακα όπως είναι τα αντικαρκινικά οξαλιπλατίνα και cis-πλατίνη. Επιπλέον, καταπονητικοί παράγοντες μπορούν να θεωρηθούν οι παράγοντες που συνοδεύουν μια ασθένεια όπως είναι η υπεργλυκαιμία στην περίπτωση του Σακχαρώδη Διαβήτη. Οποιοσδήποτε και να είναι ο τύπος της καταπόνησης, η επίδραση που μπορεί να έχει αφορά σε μία πληθώρα φυσιολογικών μηχανισμών των νευρικών ιών. Στους φυσιολογικούς αυτούς μηχανισμούς εμπλέκονται τα τασεοελεγχόμενα κανάλια ιόντων νατρίου και καλίου που απαντώνται στην κυτταρική μεμβράνη της νευρικής ίνας, σε αντλίες ιόντων, σε

συγκεκριμένα οργανίδια του κυτταροπλάσματος όπως είναι τα μιτοχόνδρια καθώς και στη μυελίνη η οποία είναι υπεύθυνη για την δομική και ενεργειακή στήριξη των νευρικών ινών καθώς και την μετάδοση των ηλεκτρικών σημάτων. Βασικός μηχανισμός επίδρασης των διαφόρων μεταλλοτοξινών στις νευρικές ίνες του ΠΝΣ αποτελεί το μεταλλοεπαγόμενο οξειδωτικό stress. Το νευρικό σύστημα είναι ιδιαίτερα ευάλωτο σε οξειδωτική καταπόνηση. Αξίζει να αναφερθεί ότι μόλις το 1% της μιτοχονδριακής ροής των ηλεκτρονίων αρκεί να οδηγήσει στον σχηματισμό $O_2^{\cdot -}$.

Στην παρούσα εργασία γίνεται προσπάθεια καθορισμού του βαθμού επιρροής των μεταλλοτοξινών στον νευρικό ιστό καθώς και αποσαφήνισης των μηχανισμών καταπόνησης. Επιπλέον μελετάται η πιθανή νευροπροστατευτική δράση, γνωστών χηλικοποιητικών και αντιοξειδωτικών μορίων έναντι των μεταλλοϊόντων. Ενώ επιπρόσθετα, γίνεται συσχετισμός με την επίδραση των μεταλλοτοξινών αυτών στο κεντρικό νευρικό σύστημα και πιο συγκεκριμένα στον ιπποκαμπιαίο ιστό.

1.1.1 ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΚΑΙ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Δομή Περιφερικού Νευρικού Συστήματος

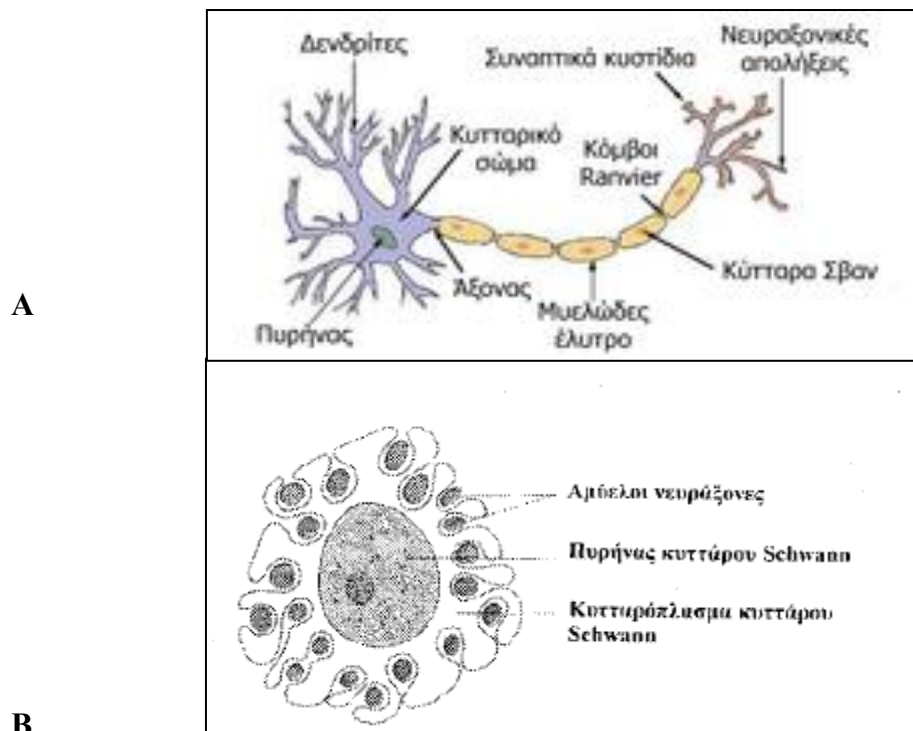
Το περιφερικό νευρικό σύστημα περιλαμβάνει τις ρίζες, τις διακλαδώσεις και τις τελικές απολήξεις των κρανιακών και νωτιαίων νεύρων, καθώς και τμήμα του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Δομικό στοιχείο του περιφερικού όπως και του κεντρικού συστήματος είναι το νευρικό κύτταρο ή νευρώνας. Ένας τυπικός νευρώνας αποτελείται από το σώμα τους δενδρίτες και μία μεγάλη αποφυάδα τον νευρίτη ή νευράξονα ή νευρική ίνα. Το σώμα και οι αποφυάδες αποτελούνται από κυτταρόπλασμα (αξόπλασμα), που περιβάλλεται από κυτταρική μεμβράνη (αξονική μεμβράνη).

Τα είδη των νευρώνων είναι:

1. Αισθητικοί ή κεντρομόλοι. Βρίσκονται στα γάγγλια των νωτιαίων ριζών και διαθέτουν ειδικές αισθητικές απολήξεις, τους υποδοχείς, στους οποίους εκκινούν τα ερεθίσματα και κατόπιν με τους νευράξονες μεταδίδονται στον νωτιαίο μυελό.
2. Συμπαθητικοί. Βρίσκονται στον νωτιαίο μυελό ή στην συμπαθητική αλυσίδα.

3. Κινητικοί. Είναι ειδικά ανεπτυγμένοι ώστε να μεταδίδουν τα ερεθίσματα στα όργανα κίνησης (μύες).
4. Διάμεσοι. Αποτελούν ένα ενδιάμεσο δίκτυο συνάψεων μεταξύ των κεντρομόλων ή αισθητικών και φυγόκεντρων (κινητικών και συμπαθητικών) νευρώνων.

Οι λειτουργικές μονάδες των περιφερικών νευρών είναι οι νευράξονες ή νευρικές ίνες οι οποίες διακρίνονται σε εμύελες και αμύελες (**Εικόνα 1.1.1**).



Εικόνα 7.1.1: Α) Δομή εμύελης νευρικής ίνας. Β) τομή αμύελων νευρικών ινών.

Οι εμύελες νευρικές ίνες περιβάλλονται από ένα μεμβρανώδες περίβλημα το οποίο σχηματίζεται από ένα κύτταρο Schwann περιελιγμένο γύρω από τον νευράξονα ώστε να δημιουργεί ένα σωλήνα από πολλαπλές στοιβάδες φωσφολιπιδίων, το λεγόμενο έλυτρο μυελίνης. Κάθε κύτταρο του Schwann εκτείνεται συνήθως για 1mm (στις βραχείες νευρικές ίνες για 50μm) [1]. Στις συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων Schwann, τις λεγόμενες περισφίξεις του Ranvier, απουσιάζει η μυελίνη. Μεγάλος αριθμός διαύλων Na^+ , οι οποίοι διαδραματίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην μετάδοση του ερεθίσματος, απαντάται στις συγκεκριμένες περισφίξεις. Οι αμύελες ίνες περιβάλλονται από μια αλυσίδα κυττάρων του Schwann και επομένως ελύτρου

μυελίνης. Τα περιφερικά νεύρα περιλαμβάνουν τόσο κεντρομόλες όσο και φυγόκεντρες νευρικές ίνες.

Δομή των περιφερικών νεύρων

Κάθε τυπικό περιφερικό νεύρο, αποτελείται από δεσμίδες νευραξόνων. Κάθε νευράξονας περιβάλλεται από το ενδονεύριο, από ίνες κολλαγόνου, ενώ κάθε δεσμίδα νευραξόνων περιβάλλεται από στρώματα λείων συμπλεκόμενων κυττάρων που αποτελούν το περινεύριο. Τέλος μια μάζα σπογγώδους συνδετικού ιστού περιβάλλει το περινεύριο και ονομάζεται επινεύριο. Αγγεία σχηματίζουν πλέγματα στο περινεύριο ενώ στο ενδονεύριο βρίσκονται μόνο τριχοειδήαγγεία [1].

Τα παραπάνω δομικά στοιχεία συμβάλλουν αφενός μεν στην σύνδεση των ιών μεταξύ τους, αφετέρου δε στην προστασία τους. Παράγοντες μεγάλης σημασίας για την διάχυση των διαφόρων χημικών παραγόντων είναι το επινεύριο, η παρουσία ή μη ελύτρου μυελίνης καθώς και το μέγεθος και η θέση των νευραξόνων στο κέντρο ή στην περιφέρεια της δεσμίδας.

1.1.2 Φυσιολογία της Αγωγής του Νευρικού Ερεθίσματος

Η γένεση και η αγωγή του ερεθίσματος στα νευρικά όπως και στα μυϊκά κύτταρα εξαρτάται από την ροή ειδικών ιόντων διαμέσου των πρωτεϊνικών διαύλων που βρίσκονται στην αξονική μεμβράνη. Η κατανόηση του ρόλου των διαύλων ιόντων στην παραγωγή και μετάδοση των ερεθισμάτων συμβάλει στην ερμηνεία του τρόπου δράσης πολλών χημικών ουσιών και των ανεπιθύμητων ενεργειών τους στο ΚΝΣ και ΠΝΣ.

Δυναμικό Ηρεμίας

Η αξονική μεμβράνη διατηρεί μια διαφορά δυναμικού μεταξύ εσωτερικού και εξωτερικού του νευρώνα της τάξης των -60 mV ως -90 mV που είναι γνωστή ως δυναμικό ηρεμίας [1]. Το δυναμικό ηρεμίας είναι το πολύπλοκο αποτέλεσμα πολλών παραγόντων οι σπουδαιότεροι από τους οποίους είναι η αξιοσημείωτη διαφορά στην συγκέντρωση ιόντων εκατέρωθεν της μεμβράνης καθώς και οι δυνάμεις που τείνουν να διατηρήσουν αυτή την διαφορά και ιδιαίτερα η εκλεκτική διαπερατότητα στα ιόντα. Η διαφορά συγκέντρωσης σε συνδυασμό με τα ήδη υπάρχοντα ηλεκτρικά δυναμικά παράγουν δυνάμεις που τείνουν να μετακινήσουν τα ιόντα αυτά. Παράλληλα οι εκλεκτικές μεταβολές στην διαπερατότητα επιτρέπουν την μετακίνηση

ιόντων στοιχείων από τα οποία την μεγαλύτερη σημασία για την γένεση και μετάδοση του ερεθίσματος κατέχουν τα ιόντα νατρίου (Na^+) και καλίου (K^+).

Η συγκέντρωση των ιόντων καλίου μέσα στο κύτταρο είναι 30 φορές μεγαλύτερη από εκείνη στον εξωκυττάριο χώρο, ενώ το αντίθετο συμβαίνει με τα ιόντα νατρίου. Μια ειδική πρωτεΐνη της μεμβράνης γνωστή ως αντλία νατρίου – καλίου μεταφέρει ενεργά ιόντα K^+ ενδοκυτταρικά και ιόντα Na^+ έξω από το κύτταρο χρησιμοποιώντας ως πηγή ενέργειας το ATP που παράγεται από τον μεταβολισμό του νευρικού κυττάρου. Σε κατάσταση ηρεμίας η μεμβράνη εμφανίζει μια εκλεκτική διαπερατότητα στα K^+ με συνέπεια το αξόπλασμα να είναι ηλεκτρικά αρνητικό ενώ το εξωτερικό της μεμβράνης ηλεκτρικά θετικό. Τότε λαμβάνει χώρα το προαναφερθέν διαμεμβρανικό δυναμικό ηρεμίας των -60 mV έως -90 mV [1].

Δυναμικό Ενέργειας

Τα ιόντα Na^+ τείνουν να εισέλθουν στον νευράξονα εξαιτίας της μεγαλύτερης εξωκυττάριας συγκέντρωσης τους και του ηλεκτρικά αρνητικού εσωτερικού του κυττάρου. Μια λειτουργία θετικής παλίνδρομης ρύθμισης αποτελεί την βάση της εμφάνισης των δυναμικών δράσης στα νευρικά κύτταρα. Έναυσμα για την έναρξη αυτού του κύκλου αποτελεί η επίδραση εξωτερικού ερεθίσματος σε κάποια περιοχή της αξονική μεμβράνης. Η μεμβράνη αρχίζει να εκπολώνεται και το δυναμικό της γίνεται λιγότερο αρνητικό. Τότε ανοίγουν οι ειδικοί διάυλοι που επιτρέπουν την είσοδο Na^+ στο κύτταρο. Το άνοιγμα των διαύλων οφείλεται σε ενδογενή συμπεριφορά του πρωτεϊνικού τους μορίου. Όσο λιγότερο αρνητικό καθίσταται το δυναμικό της μεμβράνης τόσο περισσότεροι διάυλοι Na^+ ανοίγουν. Παράλληλα αυξάνεται το ρεύμα των ιόντων Na^+ προς τα έσω το οποίο αρχικά ευθύνεται για την έναρξη του ερεθίσματος και τελικά οδηγεί το κύτταρο σε εκπόλωση, δηλαδή σε δυναμικό $+20 \text{ mV}$ [2].

Επαναπόλωση, επάνοδος στο δυναμικό ηρεμίας συμβαίνει διότι:

1. Όσο θετικοποιείται το εσωτερικό του κυττάρου δηλαδή όσο το δυναμικό γίνεται λιγότερο αρνητικό, τόσο ελαττώνεται η μετακίνηση Na^+ προς τα μέσα.
2. Κατά την διάρκεια της εκπόλωσης οι διάυλοι Na^+ τελικά κλείνουν, ακολούθως ανοίγουν οι διάυλοι K^+ οι οποίοι επιτρέπουν την προς τα έξω είσοδο ενός μεγάλου ρεύματος K^+ , ώστε το δυναμικό του κυττάρου να επιστρέψει στην αρχική τιμή ηρεμίας.

Έτσι λοιπόν, τα ερεθίσματα ακολουθούνται από μια φάση εκπόλωσης και μια φάση επαναπόλωσης της μεμβράνης. Προς τα έξω ρεύματα μεταφερόμενα με ιόντα Na^+ εκπολώνουν το κύτταρο, ενώ προς τα έξω ρεύματα μεταφερόμενα με ιόντα K^+ επαναπολώνουν το κύτταρο. Η διαδικασία εκπόλωσης – επαναπόλωσης είναι γνωστή ως δυναμικό δράσης ή ενέργειας [2].

Αξίζει να τονιστεί ότι ο συνολικός αριθμός των ιόντων που μετακινούνται εκατέρωθεν της μεμβράνης είναι μικρός, η δε αρχική διαφορά συγκεντρώσεων επανέρχεται σε λίγα δευτερόλεπτα λόγω διέγερσης της αντλίας $\text{K}^+ - \text{Na}^+$ από τις παραπάνω μεταβολές.

Αγωγή του ερεθίσματος

Είναι γνωστό ότι στις νευρικές απολήξεις υπάρχουν υποδοχείς για την ανίχνευση των διαφόρων ερεθισμάτων όπως είναι η μηχανική παραμόρφωση, η μεταβολή της θερμοκρασίας, ο πόνος, η παρουσία χημικών νευροδιαβιβαστών κ.α. Τα α δυναμικά δράσης εμφανίζονται στα άκρα των νευρών μετά από επίδραση στους υποδοχείς καταλλήλου ερεθίσματος το οποίο προκαλεί το αρχικό άνοιγμα κάποιων διαύλων Na^+ . Έτσι αρχίζει η εκπόλωση της μεμβράνης. Η μετάδοση της διέγερσης ακολουθεί τον νόμο «όλα ή τίποτα», δηλαδή δεν πραγματοποιείται αν δεν φθάσει η μεμβράνη τον κρίσιμο ουδικό σημείο. Με ένα ανεπαρκές ερέθισμα λαμβάνει χώρα μία μικρή τοπική εκπόλωση της μεμβράνης. Με ένα επαρκές ερέθισμα η εκπόλωση της μεμβράνης φτάνει από τα -90mV στα -45mV , δηλαδή φτάνει τον λεγόμενο κρίσιμο ουδικό δυναμικό. Τότε αρχίζει το άνοιγμα άλλων διαύλων Na^+ που διαθέτουν υποδοχείς ευαίσθητους στην διαφορά δυναμικού (voltage dependent), με αποτέλεσμα την γένεση ενός πλήρους δυναμικού δράσης και την επακόλουθη μετάδοσή του [2].

Το ερέθισμα άγεται με μια συνεχή σύζευξη μεταξύ διεγερμένων και μη περιοχών της μεμβράνης. Ρεύματα ιόντων που εισέρχονται στον νευράξονα από την διεγερμένη – εκπολωμένη περιοχή, εξέρχονται από την αξονική μεμβράνη και εκπολώνουν την παρακείμενη περιοχή. Μολονότι το τοπικό ρεύμα τρέχει από την διεγερμένη περιοχή και προς τις δύο κατευθύνσεις, η περιοχή πίσω από το ερέθισμα έχοντας μόλις υποστεί εκπόλωση είναι ανερέθιστη και η μετάδοση γίνεται προς μια κατεύθυνση [2].

Το τοπικό ρεύμα έχει μόνο προς τα πίσω πορεία, διότι η μετακίνηση των K^+ προς τα έξω για την εξισορρόπηση της αύξησης του δυναμικού της μεμβράνης είναι παρατεταμένη και καθυστερεί το κλείσιμο των διαύλων K^+ . Επίσης οι διάλυτοι Na^+ έχουν την ιδιότητα μετά την εκπόλωση της μεμβράνης να αδρανοποιούνται προσωρινά, οπότε και η νευρική ίνα δεν διεγείρεται υπό την επίδραση ερεθισμάτων. Το χρονικό διάστημα το οποίο δεν μπορεί να εκλυθεί ένα δεύτερο δυναμικό ενεργείας, ονομάζεται απόλυτη ανερέθιστη περίοδος. Στις νευρικές ίνες ταχείας αγωγής έχει υπολογιστεί ότι διαρκεί από 0,4 ως 0,5 msec και το νευρικό κύτταρο επανέρχεται σε φάση ηρεμίας μέσα σε 2-3msec. Οι διάλυτοι Na^+ ανοίγουν διότι αρχίζουν και πάλι να επανέρχονται σε ενεργό κατάσταση. Η περίοδος αυτή της αποκατάστασης της λειτουργίας των διαύλων καλείται και σχετική ανερέθιστη περίοδος. Κατά την διάρκεια της περιόδου αυτής η νευρική ίνα είναι δυνατόν να διεγερθεί μόνο με πολύ ισχυρά ερεθίσματα. Στις αμύελες ίνες το ερέθισμα μεταδίδεται σχεδόν σαν κύμα κατά μήκος του νευράξονα, ενώ στις εμμύελες όπου οι διάλυτοι Na^+ εντοπίζονται σχεδόν αποκλειστικά στην περιοχή των περισφιζέων Ranvier, τα τοπικά ρεύματα μεταπηδούν από την μία περίσφιξη στην επόμενη. Τότε η ενδιάμεση περιοχή μεταξύ δύο περισφιζέων εκπολώνεται ταχέως. Αυτή η αγωγιμότητα «με άλματα» ερμηνεύει τον ταχύτερο ρυθμό μετάδοσης του ερεθίσματος στις εμμύελες ίνες [2].

1.1.3 Δομή του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος

Το κεντρικό νευρικό σύστημα περιλαμβάνει τον νωτιαίο μυελό και τον εγκέφαλο. Ο εγκέφαλος διαιρείται περαιτέρω σε πέντε κύριες περιοχές οι οποίες αντιστοιχούν στον έσχατο, τον πρόσθιο, τον μέσο, τον διάμεσο και τον τελικό εγκέφαλο.

Κυτταρική σύσταση

Ο νευρικός ιστός αποτελείται κυρίως από νευρώνες και νευρογλοία. Οι νευρώνες διαδραματίζουν ρόλο επικοινωνίας με την περιφέρεια. Στους νευρώνες που επικοινωνούν με την περιφέρεια περιλαμβάνονται τα αισθητικά υποδοκτικά κύτταρα και οι σωματικοί και αυτόνομοι κινητικοί νευρώνες. Γενικά, συναντάται μεγάλη ποικιλία σχημάτων και μεγεθών καθώς υπάρχει πλήθος δραστηριοτήτων που διεκπεραιώνονται από τους νευρώνες.

Στήριξη στους νευρώνες παρέχουν τα νευρογλοιακά κύτταρα. Στα κύτταρα αυτά περιλαμβάνονται τα αστροκύτταρα και τα ολιγοδενδροκύτταρα. Επιπλέον, στη κατηγορία αυτή ανήκουν η μικρογλοία και τα επενδυματικά κύτταρα. Η μυελίνη εμφανίζεται και στο ΚΝΣ και πιο συγκεκριμένα στα ολιγοδενδροκύτταρα. Τα αστροκύτταρα αν και έχουν επαφή με τμήμα μόνο της επιφάνειας των κεντρικών νευρώνων, οι αποφυάδες τους εφάπτονται των τριχοειδών και του συνδετικού ιστού στην επιφάνεια του ΚΝΣ συμβάλλοντας έτσι στον περιορισμό της ελεύθερης διάχυσης ουσιών στο ΚΝΣ. Η μικρογλοία αποτελείται από φαγοκύτταρα τα οποία απομακρύνουν τα προϊόντα κυτταρικής βλάβης. Τα επενδυματικά κύτταρα σχηματίζουν ένα επιθήλιο το οποίο διαχωρίζει το ΚΝΣ από τις κοιλίες του εγκεφάλου οι οποίες περιέχουν εγκεφαλονωτιαίο υγρό [3].

Αιματοεγκεφαλικός φραγμός

Η μεταφορά μεγάλων μορίων και ιδιαίτερα φορτισμένων ιόντων από το αίμα προς τον εγκέφαλο αλλά και τον νωτιαίο μυελό ελέγχεται και περιορίζεται αυστηρά από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Η περιορισμένη αυτή διαλογή επιτυγχάνεται εν μέρει στην παρουσία στενών συνδέσεων ανάμεσα στα τριχοειδή ενδοθηλιακά κύτταρα και το ΚΝΣ. Περιορισμός της κίνησης ορισμένων ουσιών μπορεί να οφείλεται και στην

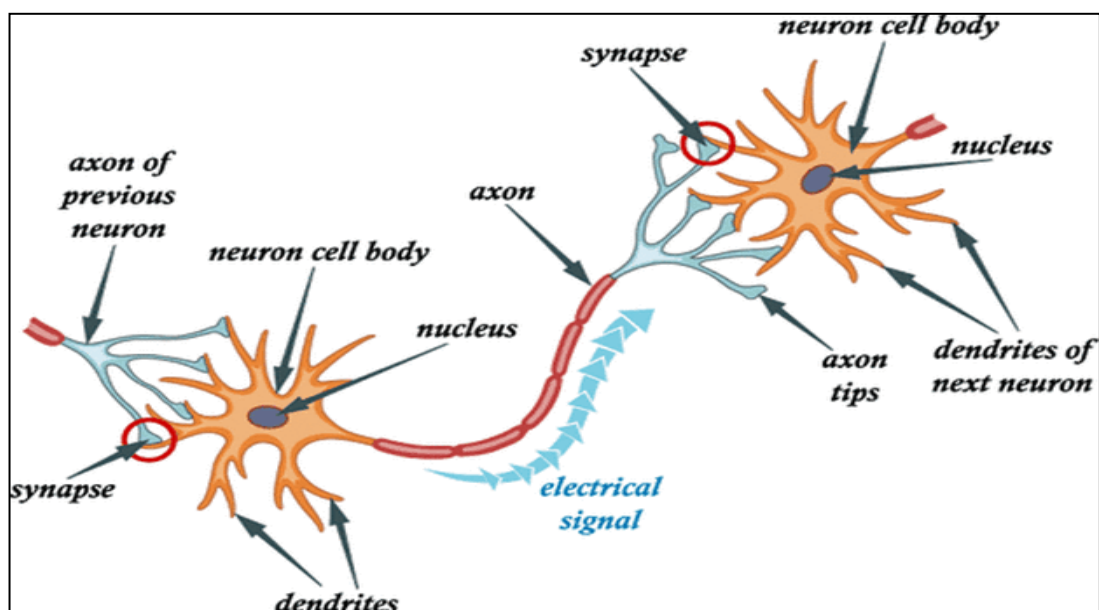
παρουσία αστροκυττάρων ενώ η ρύθμιση και η απομάκρυνση μπορεί να γίνεται και με μηχανισμούς μεταφοράς[3].

Δομή του νευρώνα

Η πλειοψηφία των νευρώνων αποτελείται από το κυτταρικό σώμα, ένα ή περισσότερους δενδρίτες και έναν νευράξονα. Το κυτταρικό σώμα περιέχει τον πυρήνα και τον πυρινίσκο ενώ ακόμα, περιέχει ιδιαίτερα ανεπτυγμένο βιοσυνθετικό σύστημα προκειμένου να καλύψει τις απαιτητικές και εξειδικευμένες λειτουργίες του νευρικού ιστού. Δεσπόζουσα θέση κατέχει και το σύστημα Golgi. Οι δενδρίτες είναι προεκτάσεις του κυτταρικού σώματος και σε ορισμένους νευρώνες κατέχουν περισσότερο από το 90% της συνολικής έκτασης των νευρώνων. Ο νευράξονας εκφύεται από το κυτταρικό σώμα και σε σπάνιες περιπτώσεις από το δενδρίτη. Οι νευράξονες μπορεί να περιβάλλονται από έλυτρο ή να είναι γυμνοί. Στο ΚΝΣ, οι εμμέλοι νευράξονες περιβάλλονται από έλυτρο ολιγοδενροκυττάρων ενώ οι υπόλοιποι είναι αμύελοι.

Συναπτική διαβίβαση

Οι νευρώνες επικοινωνούν μεταξύ τους με εξειδικευμένες συνδέσεις, τις συνάψεις. Οι συνάψεις σχηματίζονται ανάμεσα στις απολήξεις του νευράξονα ενός νευρώνα και τους δενδρίτες ενός άλλου. Οι συνάψεις αυτές καλούνται νευραξονοδενδριτικές συνάψεις.



Εικόνα 1.1.3 Σχηματική απεικόνιση του σχηματισμού συνάψεων μεταξύ δύο νευρώνων.

1.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΚΑΤΑΠΙΟΝΗΣΗΣ

1.2.1 ΜΕΤΑΛΛΟΪΟΝΤΑ - ΜΕΤΑΛΛΟΤΟΞΙΝΕΣ

Μια πληθώρα μεταλλοϊόντων είναι απαραίτητη για την φυσιολογική λειτουργία των οργανισμών όπως και άλλα δομικά στοιχεία (λίπη, υδρογονάνθρακες και πρωτεΐνες). Σήμερα, η έρευνα γύρω από τα μεταλλοϊόντα συγκεντρώνει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και έχει οδηγήσει στην ανακάλυψη ενός σημαντικού συνόλου δυσλειτουργιών οι οποίες σχετίζονται με την διαταραχή της ομοιοστασίας των μετάλλων αυτών. Διάφορα μεταλλοϊόντα θεωρούνται απαραίτητα για την διατήρηση της φυσιολογίας του κυττάρου όπως είναι τα Na, K, Ca, Mg, Fe, Co, Mn, Cu, και Zn. Ο τομέας της τοξικολογίας έχει προσφέρει αρκετά δεδομένα τα οποία αφορούν στην επίδραση των μετάλλων αυτών ως τοξικοί παράγοντες τόσο για τους έμβιους οργανισμούς όσο και για το περιβάλλον. Ωστόσο, μέχρι και πρόσφατα λίγα είναι τα δεδομένα τα οποία ανάγουν τα μεταλλοϊόντα αυτά σε παράγοντες αιτιοπαθογένειας πολλών νευροεκφυλιστικών ασθενειών του κεντρικού νευρικού συστήματος ή νευροπάθειας του περιφερικού νευρικού συστήματος. Σήμερα, ολοένα και κερδίζει έδαφος ο τομέας της *μεταλλονευροχημείας* όπου αξιολογείται η δράση διαφόρων μετάλλων ως παράγοντες ή συμπαράγοντες στην αιτιοπαθογένεια διαφόρων ασθενειών του νευρικού συστήματος.

Η πλειοψηφία των μεταλλοϊόντων που βρίσκονται στο έμβιο ή μη περιβάλλον, απαντώνται σε ποικίλες μορφές οι οποίες συνήθως είναι ανάλογες με το ρόλο που διαδραματίζουν σε αυτό. Κάθε μεταλλοϊόν είναι δυνατό να διαδραματίσει διαφορετικούς και ποικίλους ρόλους με θετικές ή αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον όπου βρίσκεται. Οι ιδιότητες των μετάλλων και άρα η συγκεκριμένη βιολογική δράση που αυτά παρουσιάζουν ποικίλει ανάλογα με το ίδιο το μέταλλο, την φύση των ενώσεων που σχηματίζει, το σύστημα στο οποίο εμπλέκεται, την συγκέντρωση του μετάλλου, το pH του περιβάλλοντος καθώς και άλλους παράγοντες. Μέταλλα όπως το νάτριο, το κάλιο, το ασβέστιο χαρακτηρίζονται συνήθως ως μακροστοιχεία και εμπλέκονται σε λειτουργίες ζωτικής σημασίας για τους οργανισμούς όπως είναι η αναπνοή, η ανάπτυξη, η αναπαραγωγή και άλλες βιοχημικές διεργασίες. Ως μακροστοιχεία βέβαια δεν εννοούνται μόνο τα μέταλλα αλλά και άλλα αμέταλλα όπως είναι το άζωτο, ο φώσφορος, το οξυγόνο και το θείο. Μεταβατικά μέταλλα όπως είναι ο σίδηρος, το μαγγάνιο, το κοβάλτιο, το νικέλιο και ο χαλκός συνήθως αναφέρονται ως ιχνοστοιχεία και εμπλέκονται και αυτά σε φυσικές

και βιολογικές διεργασίες. Τα στοιχεία αυτά χαρακτηρίζονται ως απαραίτητα ή χρήσιμα στοιχεία καθώς ο ρόλος τους είναι συνήθως πολύ συγκεκριμένος και τις περισσότερες φορές αναντικατάστατος. Τα δισθενή ή τρισθενή κυρίως μέταλλα με υψηλή βιολογική δράση δε βρίσκονται σε στοιχειακή ή ελεύθερη μορφή καθώς θα ήταν ιδιαίτερα τοξικά για το περιβάλλον όπου βρίσκονται. Τα διάφορα μεταλλοϊόντα είναι δυνατό να ανταγωνίζονται το ένα με το άλλο για την συμμετοχή τους σε χημικές και βιολογικές διεργασίες με αποτέλεσμα την εμφάνιση πιθανών τοξικών συνεπειών. Διάφοροι παράγοντες όπως η συγκέντρωση του μεταλλοϊόντος ή το pH ενδέχεται να ενεργοποιήσουν την τοξική δράση ενός μεταλλοϊόντος στον οργανισμό. Ο χαλκός αποτελεί απαραίτητο ιχνοστοιχείο για όλους τους οργανισμούς. Το μέταλλο αυτό βρίσκεται στο ενεργό κέντρο πολλών πρωτεϊνών και ενζύμων όπως είναι η σερουλοπλασμίνη, η αλβουμίνη, η οξειδάση του κυτοχρώματος c και η σουπεροξειδική δισμουτάση (SOD). Σε πολλά μαλάκια και αρθρόποδα περιέχεται στην χρωστική ανθοκυανίνη με βασικό ρόλο την μεταφορά του οξυγόνου. Αποτέλεσμα της παρουσίας του χαλκού στην αιμοκυανίνη είναι το μπλε χρώμα του αίματος, όταν οξυγονώνεται κατά αντιστοιχία με το κόκκινο χρώμα στους ανθρώπους λόγω της παρουσίας του σιδήρου. Επίσης, ο χαλκός βρίσκεται στο έδαφος με τη μορφή των κατιόντων του Cu(II) και απορροφάται από τα φυτά. Χαλκός, επίσης, εντοπίζεται στα φύλλα και ειδικά στους χλωροπλάστες όπου συμμετέχει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Η έλλειψη χαλκού προκαλεί ελάττωση της φωτοσυνθετικής δράσης. Επίσης απαραίτητο μεταλλοϊόν για όλους του οργανισμούς είναι ο ψευδάργυρος [4]. Όμοια με τον χαλκό, ο ψευδάργυρος απαντάται στο ενεργό κέντρο πολλών μεταλλοενζύμων, όπως είναι η καρβονική ανυδράση που δρα ως λειτουργικός, δομικός ή ρυθμιστικός συμπαράγοντας σε πολλά ένζυμα. Επιπλέον, ο ψευδάργυρος είναι παράγοντας κλειδί για την καλή λειτουργία των αδένων και την ανάπτυξη των οργάνων. Στα φυτά, ο ψευδάργυρος εμπλέκεται στον μεταβολισμό των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και του RNA. Άλλα απαραίτητα ιχνοστοιχεία όπως είναι το μαγγάνιο, το κοβάλτιο, ο σίδηρος και το νικέλιο συμμετέχουν και αυτά σε μια πληθώρα βιοχημικών διεργασιών. Επιπλέον, υπάρχουν μεταλλοϊόντα τα οποία βρίσκονται στην φύση και δρουν εξ' αρχής ως τοξικά με διάφορες ανεπιθύμητες συνέπειες με τελικούς αποδέκτες τους έμβιους οργανισμούς.

Με τον όρο τοξικότητα εννοείται κάθε αρνητική δράση μιας ουσίας στο περιβάλλον όπου βρίσκεται και ουσιαστικά αποτελεί τη διαβάθμιση της δυνατότητας μια ουσίας

να προκαλέσει βλάβη σε έναν οργανισμό. Σημαντικό ποσοστό στην λίστα με τους τοξικούς παράγοντες κατέχουν τα βαρέα μέταλλα. Παραδείγματα τοξικών μετάλλων αποτελούν το νικέλιο, ο χαλκός, το κοβάλτιο, ο σίδηρος καθώς και άλλα. Τα βαρέα μέταλλα περιλαμβάνουν μέταλλα με σχετικά υψηλή πυκνότητα. Παραδείγματα βαρέων μετάλλων αποτελούν ο υδράργυρος, το κάδμιο, το αρσενικό, το χρώμιο, το θάλλιο, και ο μόλυβδος. Τα τοξικά μέταλλα είναι χημικά στοιχεία που υπάρχουν στη φύση είτε ως ιχνοστοιχεία είτε σε μεγάλες ποσότητες. Ορισμένα από αυτά δρουν ως απαραίτητα ιχνοστοιχεία για τους έμβιους οργανισμούς όπως ενδεικτικά αναφέρθηκε παραπάνω για την περίπτωση του χαλκού και του ψευδαργύρου, αλλά ωστόσο είναι δυνατό τα ίδια απαραίτητα μεταλλοϊόντα σε μεγάλες συγκεντρώσεις να δράσουν ως τοξικά. Αντίθετα, τα βαρέα τοξικά μέταλλα υπάρχουν και αυτά στη φύση, αλλά έχουν ως βασικό χαρακτηριστικό την βιοσυσσωρευση.

Τα μεταλλοϊόντα που χαρακτηρίζονται ως τοξικά, είναι δυνατό να επιφέρουν αρνητικές συνέπειες τους έμβιους οργανισμούς μέσω της μόλυνσης του πόσιμου νερού (π.χ. σωλήνες μόλυβδου), από τις υψηλές περιβαλλοντικές συγκεντρώσεις τους στον αέρα κοντά στις πηγές εκπομπής ή μέσω της εισαγωγής τους στην τροφική αλυσίδα. Η βιοσυσσωρευση είναι στην πραγματικότητα η αύξηση της συγκέντρωσης μιας χημικής ουσίας και αναφέρεται ως αύξηση της συγκέντρωσης κάποιου τοξικού μεταλλοϊόντος σε έναν οργανισμό ή στο περιβάλλον με το πέρασ του χρόνου. Οι τοξικές ενώσεις συσσωρεύονται στον περιβάλλοντα χώρο, λαμβάνονται και αποθηκεύονται ή εκκρίνονται. Τα βαρέα μέταλλα μπορούν να εισαχθούν στην παροχή του νερού από τα βιομηχανικά και καταναλωτικά απόβλητα ή ακόμα και από την όξινη βροχή, με αποτέλεσμα την απελευθέρωσή τους στα ρεύματα, στις λίμνες, στους ποταμούς, και στα υπόγεια νερά. Τα πιο επικίνδυνα βαρέα μέταλλα είναι ο μόλυβδος, ο υδράργυρος και το κάδμιο [5]. Οι μεταλλοτοξίνες αυτές καθώς και άλλα μέταλλα που μπορούν να δράσουν ως τοξικά, έχουν συνδεθεί με πολλές αρνητικές συνέπειες. Στους ανθρώπους, η έκθεση στο μόλυβδο για παράδειγμα μπορεί να οδηγήσει σε ευρύ φάσμα αρνητικών βιολογικών αποτελεσμάτων ανάλογα με το επίπεδο και τη διάρκεια της έκθεσής τους. Ο υδράργυρος είναι επίσης μια πολύ τοξική ουσία που δεν έχει καμία ακόμη γνωστή λειτουργία στην ανθρώπινη βιοχημεία ή τη φυσιολογία και δεν εμφανίζεται στα βιολογικά συστήματα. Ο υδράργυρος είναι το μόνο υγρό μέταλλο και παρουσιάζει σύνθετες και ασυνήθιστες φυσικοχημικές ιδιότητες. Το κάδμιο είναι επίσης μια ιδιαίτερα επικίνδυνη

μεταλλοτοξίνηγια τα φυτά, τα ζώα αλλά και τους ανθρώπους. Αξίζει να αναφερθεί ότι το κάδμιο παρουσιάζει χημική ομοιότητα με τον ψευδάργυρο. Το κάδμιο κατά τη βιοσυσσώρευσή του μπορεί να οδηγήσει σε νεφρική ανεπάρκεια στον ανθρώπινο οργανισμό. Η υψηλή έκθεση σε κάδμιο μπορεί να οδηγήσει επίσης σε πνευμονικές ασθένειες και έχει συνδεθεί άμεσα με το καρκίνο των πνευμόνων. Επιπλέον, η έκθεση των ανθρώπων και των ζώων σε κάδμιο, έχει συνδεθεί με ατέλειες των οστών, όπως η οστεομαλάκυνση και οστεοπόρωση. Η ασθένεια Itai-Itai(πόνος-πόνος) οφείλεται σε δηλητηρίαση από κάδμιο[6]. Η μέση καθημερινή έκθεση καδμίου για τους ανθρώπους υπολογίζεται σε 0.15 μg από τον αέρα και 1 μg από το νερό. Άλλο τοξικό μέταλλο είναι το χρώμιο το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στα κράματα και σε χρωστικές ουσίες. Ωστόσο, η μακροπρόθεσμη έκθεση σε χρώμιο, μπορεί να προκαλέσει ζημιά στα νεφρά και στο συκώτι, ενώ έχει συνδεθεί και με καρκινογένεση.

ΣΙΔΗΡΟΣ

Ο σίδηρος αποτελεί το έκτο πιο άφθονο στοιχείο στον πλανήτη. Ο σίδηρος συμβολίζεται ως Fe και έχει ατομικό αριθμό 26. Ανήκει στην όγδοη ομάδα και τέταρτη περίοδο του περιοδικού πίνακα. Στις χημικές ενώσεις, ο Fe εμφανίζεται σε ποικίλες οξειδωτικές καταστάσεις (Fe(II), Fe(III), Fe(IV), κ.ά.), αλλά οι πιο συνηθισμένες είναι οι Fe(II) και Fe(III). Η ηλεκτρονική διαμόρφωση του σιδήρου στη στοιχειακή κατάσταση είναι [Ar]3d⁶4s². Ο μεταλλικός σίδηρος είναι λαμπερός, έχει ασημένιο χρώμα, είναι μαλακός, και χαρακτηρίζεται ως σιδηρομαγνητικό στοιχείο. Οξειδώνεται εύκολα στον αέρα και στο νερό με αποτέλεσμα το σχηματισμό οξειδίων, ενώ πολύ σπάνια βρίσκεται στην ατομική του μορφή.

Πίνακας 1: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του σιδήρου

Χημικό σύμβολο	Fe
Ατομικός αριθμός	26
Ατομικό βάρος	55.85 g/mol
Χημική ομάδα	8η ομάδα
Πυκνότητα	7.87 g/cm ³ στους 20 0C
Σημείο τήξης	1538 °C
Σημείο βρασμού	2862 °C
Μοριακή θερμοχωρητικότητα	(25 °C) 25.10 J· mol ⁻¹ · K ⁻¹

Ο σίδηρος ανήκει στα μεταβατικά μέταλλα και έχει πάρα πολλές εφαρμογές στον τομέα των υλικών και τη βιομηχανία, αλλά και πολλές εφαρμογές στον τομέα της βιολογίας, της ιατρικής, της φαρμακευτικής και αλλού. Οι τόσες πολλές εφαρμογές είναι αποτέλεσμα των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων του, που μελετώνται εδώ και πολλά χρόνια. Ο σίδηρος μπορεί να βρεθεί σε απλές ανόργανες ενώσεις (άλατα, οξείδια), αλλά και σε περίπλοκες οργανικές ενώσεις (πρωτεΐνες) παρουσιάζοντας μοναδικούς και αναντικατάστατους ρόλους.

Ο σίδηρος είναι απαραίτητο χημικό στοιχείο για όλους τους έμβιους οργανισμούς (βακτήρια, ζώα, φυτά, ανθρώπους) [7]. Αποθηκεύεται στα κέντρα διαφόρων μεταλλοπρωτεϊνών με βιοδιαθέσιμες μορφές και όχι σε ελεύθερη μορφή, καθώς έτσι θα λειτουργούσε καταλυτικά για τον σχηματισμό ελεύθερων δραστικών ριζών που μπορούν να οδηγήσουν σε οξειδωτική καταστροφή και συνεπώς σε κάποια μορφή τοξικότητας. Σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς, ο σίδηρος συνδέεται στην αίμη. Το μόριο αυτό περιλαμβάνει ένα χαρακτηριστικό ετεροκυκλικό οργανικό δακτύλιο που ονομάζεται πορφυρίνη. Η αίμη είναι σημαντικό συστατικό των κυτοχρωμάτων (πρωτεΐνες), τα οποία συμμετέχουν στην ανάπτυξη οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, καθώς και άλλων πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη μεταφορά οξυγόνου, δηλαδή της αιμογλοβίνης και της μυογλοβίνης.

Η αιμογλοβίνη είναι μεταλλοπρωτεΐνη που περιέχει σίδηρο και είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά του οξυγόνου στα ερυθρά αιμοσφαίρια των σπονδυλωτών και είναι εύκολα αναγνωρίσιμη λόγω του χαρακτηριστικού κόκκινου χρώματος της. Αλλαγή του

χρώματός της παρατηρείται σε περιπτώσεις αναιμίας, υποξίας, κ.ά.. Στα θηλαστικά, η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί περίπου το 97% του ξηρού βάρους των ερυθρών αιμοσφαιρίων, και περίπου το 35% του συνολικού ποσοστού συμπεριλαμβανομένου και του νερού. Η αιμογλοβίνη είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά του οξυγόνου από τους πνεύμονες ή τα βράγχια στα υπόλοιπα μέρη του σώματος, όπως στους μυς, και απελευθερώνει το οξυγόνο στα μέρη αυτά για να χρησιμοποιηθεί από τα κύτταρα. Τέλος, έχει ποικίλους άλλους ρόλους στη μεταφορά και στη μετατροπή του οξυγόνου που α) ποικίλλουν από είδος σε είδος, και β) μπορεί να είναι αρκετά διαφορετικοί σε κάποια ασπόνδυλα.

Αξίζει να αναφερθεί ότι, η κατανομή του σιδήρου πρέπει να είναι ελεγχόμενη στα θηλαστικά, κυρίως γιατί ο σίδηρος συνδέεται με πιθανή βιοτοξικότητα. Η τρανσφερίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη (glycoprotein) του πλάσματος στο αίμα. Αν και ο σίδηρος που δεσμεύεται από την τρανσφερίνη είναι λιγότερος από 0.1% (4 mg) του συνολικού σιδήρου, εντούτοις χαρακτηρίζεται ως η σημαντικότερη θέση σιδήρου. Η πρωτεΐνη αυτή έχει μοριακό βάρος περίπου 80 kDa (περίπου 700 αμινοξέα) και στη δομή της περιέχονται δυο ενεργά κέντρα Fe(III). Αποτελείται από α-έλικες και β-πτυχωτές επιφάνειες (β sheets). Τα ιόντα σιδήρου είναι ενωμένα με δυο μόρια τυροσίνης, ένα μόριο ασπαρτικού οξέος, ένα μόριο ιστιδίνης και ένα ανθρακικό ανιόν. Σε όξινα περιβάλλοντα μειώνεται η δράση της τρανσφερίνης, ενώ σε pH 7.4 υπάρχει η μεγαλύτερη συγκέντρωση σιδήρου στην τρανσφερίνη. Τέλος, η τρανσφερίνη, σε αντίθεση με τη αιμογλοβίνη και τη μυογλοβίνη, δεν περιέχει στο μόριο της το μόριο της αίμης. Πρόκειται, συνεπώς, για μια μη αιμική πρωτεΐνη δέσμευσης σιδήρου. Στο ανθρώπινο σώμα, ο σίδηρος συμμετέχει σε πολλές διεργασίες και ο ρόλος του χαρακτηρίζεται αναντικατάστατος. Γι'αυτό και η πιθανή ανεπάρκεια σιδήρου ή η πιθανή υπερβολική συγκέντρωση σιδήρου μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητα αποτελέσματα για την ανθρώπινη φυσιολογία.

Η ανεπάρκεια σιδήρου (ή σιδηροπενία) είναι η πιο συνηθισμένη θρεπτική ανεπάρκεια που συναντάται στις σύγχρονες κοινωνίες. Η ανεπάρκεια σιδήρου μπορεί να γίνει τόσο σοβαρή ώστε να α) παρεμποδίζονται λειτουργίες ζωτικής σημασίας και β) οδηγήσει σε νοσηρότητα και θνησιμότητα. Η άμεση συνέπεια της ανεπάρκειας σιδήρου είναι η αναιμία ανεπάρκειας σιδήρου (Iron Deficiency Anemia, IDA)[8]. Οι ομάδες που είναι περισσότερο επιρρεπείς είναι τα παιδιά και οι γυναίκες πριν την εμμηνόπαυση. Η ανεπάρκεια αναπτύσσεται όταν η απώλεια σιδήρου δεν

αντισταθμίζεται αρκετά μέσω της διατροφής. Τροφές πλούσιες σε σίδηρο είναι το συκώτι, το σπανάκι, οι φακές, κ.ά.. Τις περισσότερες φορές, όμως, η διατροφή δεν είναι αρκετή για να λυθεί το πρόβλημα, οπότε οι ασθενείς λαμβάνουν σίδηρο (γλουταμικός σίδηρος) σε μορφή χαπιών $[Fe(C_6H_{11}O_7)_2]$. Η υπερβολική συγκέντρωση σιδήρου στους ιστούς οδηγεί σε βιοτοξικότητα, με αποτέλεσμα να επηρεάζονται ζωτικά όργανα, όπως το συκώτι, η καρδιά και το πάγκρεας. Η βιοτοξικότητα του σιδήρου είναι αποτέλεσμα του σχηματισμού ελευθέρων ριζών (ROS) είτε με τη μορφή υπεροξειδίου (O_2^-) είτε με τη μορφή υδροξειδίου (OH^-). Άρα, η υπερβολική συγκέντρωση σιδήρου οδηγεί σε ανεπιθύμητα αποτελέσματα παρόμοια με την ανεπάρκεια. Η σιδηροφιλία (siderophilia) είναι μια κληρονομική ασθένεια που χαρακτηρίζεται από υπερβολική απορρόφηση του σιδήρου άρα και μη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού που την εμφανίζει. Επίσης, ασθενείς που κάνουν συχνά μεταγγίσεις αίματος, κινδυνεύουν να παρουσιάσουν αυξημένη συγκέντρωση σιδήρου με ανεπιθύμητες συνέπειες. Γι'αυτό το λόγο κρίνεται πολύ σημαντικό οι ασθενείς αυτοί να διατηρούν τα ποσοστά του σιδήρου ελεγχόμενα.

ΚΟΒΑΛΤΙΟ

Το κοβάλτιο είναι σιδηρομαγνητικό μέταλλο. Η λέξη κοβάλτιο προέρχεται από τη γερμανική λέξη *kobalt*, από το *kobald* ή *goblin*, που ερμηνεύεται ως κακό πνεύμα. Ο όρος αυτός αποδόθηκε από τους ανθρακωρύχους για τα μεταλλεύματα του κοβαλτίου, γιατί είχαν την εντύπωση ότι δεν είχε καμιά αξία ενώ αντίθετα κατανοούσαν ότι ήταν δηλητηριώδες, καθώς μόλυνε τα άλλα ορυκτά εξαιτίας της περιεκτικότητας του σε αρσενικό και θείο. Δεν απαντάται ελεύθερο στη φύση, αλλά ενώσεις του κοβαλτίου είναι συνήθεις υπό μορφή ορυκτών. Μικρές ποσότητες κοβαλτίου μπορούν να βρεθούν στις πέτρες, το χώμα, τα φυτά και τα ζώα. Στη φύση συχνά σχετίζεται με το νικέλιο ενώ και τα δύο αυτά είναι χαρακτηριστικά συστατικά του μετεωρικού σιδήρου. Το κοβάλτιο έχει μαγνητική διαπερατότητα περίπου στα δύο τρίτα της διαπερατότητας του σιδήρου, καθώς οι φυσικές του ιδιότητες είναι παρόμοιες με εκείνες του σιδήρου και του νικελίου. Το κοβάλτιο είναι χημικά ενεργό στοιχείο και απαντάται με ποικίλες μορφές αλάτων όπως νιτρικό, χλωρίδιο, οξικό κλπ. Συνήθως συναντάται ως μεταλλικό ιόν με φορτίο +2 και +3, μολονότι σπανιότερα συναντάται και με φορτίο +1.

Πίνακας 2: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του κοβαλτίου

Χημικό σύμβολο	Co
Ατομικός αριθμός	27
Ατομικό βάρος	58.933195(5) g/mol
Χημική ομάδα	Μεταβατικό μέταλλο
Πυκνότητα	8.90 g·cm ⁻³
Σημείο τήξης	1768 K
Σημείο βρασμού	3200 K
Μοριακή θερμοχωρητικότητα	(25 °C) 24.81 J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹

Οι ενώσεις κοβαλτίου χρησιμοποιούνται εδώ και πολλά χρόνια κυρίως λόγω του χαρακτηριστικού μπλε χρώματος που μπορούν να αποδώσουν σε γυάλινα σκεύη, σε κεραμικά και σε βερνίκια. Επιπλέον, οι ενώσεις του κοβαλτίου χρησιμοποιούνται στην παραγωγή μελανιών, χρωμάτων και βερνικιών. Ακόμη, το κοβάλτιο χρησιμοποιείται στην παρασκευή κραμάτων υψηλών θερμοκρασιών γνωστών ως υπεραγωγία κράματα (περιέχουν κοβάλτιο σε αναλογία 60 %). Το κοβάλτιο, που εμφανίζεται σε ποικίλες μορφές [CoCl₂, Co(CH₃COO)₂, Co(NO₃)₂] έχει συσχετιστεί με ευεργετικές δράσεις στην υγεία των ζώων. Το έδαφος για να θεωρείται κατάλληλο για ζωική διατροφή πρέπει να περιέχει από 0.13 ως 0.30 ppm κοβάλτιο. Αυτός είναι και ο λόγος που αν δεν επαρκεί, τότε προστίθεται εξωγενώς στις ζωοτροφές και στα λιπάσματα. Το ισότοπο ⁶⁰Co έχει πολλαπλές χρήσεις ως πηγή εκπομπής γ-ακτινοβολίας. Χρησιμοποιείται ευρέως στη θεραπευτική και στη βιοϊατρική τεχνολογία, στις βιομηχανικές ακτινογραφίες για την ανίχνευση των δομικών ρωγμών στα μέταλλα, στην παστερίωση ή αποστείρωση τροφίμων καθώς και σε θεραπείες για διάφορες μορφές καρκίνου. Το κοβάλτιο είναι ευεργετικό για τον άνθρωπο και μπορεί να προσληφθεί μέσω της τροφής κυρίως από το κόκκινο κρέας, τα στρείδια, τα μύδια, τα πουλερικά, το πλήρες γάλα καθώς και από διάφορα πράσινα λαχανικά και φρούτα. Το κοβάλτιο εισέρχεται στον οργανισμό μέσω της εισπνοής, του νερού ακόμη και της επαφής με το δέρμα.

Το κοβάλτιο σε όξινο κυρίως περιβάλλον, βρίσκεται στην ένυδρη ιοντική μορφή [Co(H₂O)₆]²⁺ (hexa-aqua Co(II)). Το ένυδρο ιόν κοβαλτίου μπορεί έτσι να αλληλεπιδράσει με συστατικά του αίματος υψηλής μοριακής μάζας, δηλαδή πρωτεΐνες και μόρια χαμηλής μοριακής μάζας, όπως διάφορα οργανικά οξέα όπως

μηλικό, κитρικó, γαλακτικό, αμινοξέα κ.ά..Καθώς πραγματοποιούνται ποικίλες αντιδράσεις, αναπτύσσονται διαδοχικά δυαδικά και τριαδικά συστήματα, χαμηλής και υψηλής μοριακής μάζας, προς σχηματισμό υδατοδιαλυτών και βιοδιαθέσιμων μορφών του κοβαλτίου.Μια σημαντική βιολογική εφαρμογή του κοβαλτίου είναι η παρουσία του στη βιταμίνη B12 [9]. Η βιταμίνη B12 είναι υδατοδιαλυτή βιταμίνη που παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία του εγκεφάλου, του νευρικού συστήματος και στο σχηματισμό του αίματος.Στην πραγματικότητα, ο όρος βιταμίνη B12 α) αναφέρεται σε μια κατηγορία ενώσεων με παρόμοια χημική δομή, και β) συνδέεται με τη χαρακτηριστική δράση των βιταμινών. Η βιταμίνη B12 χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της μεγαλοβλαστικής αναιμίας στις εγκύους, καθώς επιταχύνει την παραγωγή ερυθροκυττάρων.Τέτοιες ενώσεις του κοβαλτίου είναι η υδροξυκοβαλαμίνη και η κυανοκοβαλαμίνη. Η υδροξυκοβαλαμίνη αποτελεί σήμερα το φάρμακο για τη θεραπεία της μεγαλοβλαστικής αναιμίας που παρουσιάζεται μετά από έλλειψη βιταμίνης B12 [10]. Σε αυτή την περίπτωση, η βιταμίνη B12 λόγω του ότι μπορεί να δεσμεύεται σε μεγάλο ποσοστό από τις πρωτεΐνες του πλάσματος, παραμένει περισσότερο χρόνο στο αίμα. Η κυανοκοβαλαμίνη από την άλλη, έχει σχετικά μικρότερο χρόνο δράσης. Σε κλινικό επίπεδο, όμως, είναι εξίσου αποτελεσματική με την υδροξυκοβαλαμίνη. Ενώ, η παρουσία κοβαλτίου για τον ανθρώπινο οργανισμό φαίνεται να είναι σημαντική και απαραίτητη, εντούτοις η υπερβολική συγκέντρωση κοβαλτίου στα βιολογικά υγρά (παρόμοια δηλαδή με άλλα μεταλλοϊόντα όπως Mn(II), Fe(III), Cu(II), κ.ά.) μπορεί να επιφέρει αντίθετες συνέπειες και να προκαλέσει προβλήματα όπως άσθμα και πνευμονία, ειδικότερα σε ανθρώπους που έρχονται συχνά σε επαφή με αυτό.

Τέλος, το ισότοπο ^{60}Co είναι ένα ραδιενεργό μέταλλο που χρησιμοποιείται συχνά στην ακτινοθεραπεία. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ο λόγος της χρήσης του ισότοπου αυτού είναι η ικανότητά του να παράγει ακτίνες γ με ενέργειες των 1.17 MeV και 1.33 MeV. Το κοβάλτιο είναι ευεργετικό και σημαντικό για την ανθρώπινη υγεία. Εντούτοις, οι πολύ υψηλές συγκεντρώσεις του μπορούν επιφέρουν τα αντίθετα αποτελέσματα.Καθώς τα φυτά αναπτύσσονται σε ρυπασμένο έδαφος, είναι πολύ πιθανό να συσσωρεύονται πολλές και ανεπιθύμητες ουσίες, ή να γίνονται αντιδράσεις και να παράγονται ανεπιθύμητες ουσίες. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, το κοβάλτιο σε διάφορες μορφές, είναι δυνατό να συσσωρευτεί στα φυτά και ειδικά στα μέρη των φυτών που τρώγονται, όπως τα φρούτα και οι σπόροι. Στα εδάφη κοντά σε ορυχεία, είναι πολύ πιθανό να περιέχονται μεγάλες συγκεντρώσεις κοβαλτίου, με αποτέλεσμα

η πρόσληψή του από ανθρώπους, φυτά και ζώα να μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στην υγεία. Τα προβλήματα που παρουσιάζονται από τη μεγάλη συγκέντρωση κοβαλτίου είναι τα εξής: έμετος και ναυτία, προβλήματα όρασης, καρδιακά προβλήματα, βλάβη του θυρεοειδούς και αναπνευστικά προβλήματα.

Πέρα από την άμεση ή έμμεση πρόσληψη του κοβαλτίου από τις τροφές, αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία μπορούν να προκληθούν και από την ακτινοβολία των ραδιενεργών ισοτόπων κοβαλτίου. Η έκθεση στην ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει στειρότητα, τριχόπτωση, εμετό, αιμορραγία, διάρροια, κώμα, ακόμη και θάνατο.

Η σκόνη κοβαλτίου μπορεί επίσης να προκαλέσει άσθμα (ασθένεια με συμπτώματα που κυμαίνονται από βήχα, συντομία της αναπνοής και δύσπνοια που οφείλονται στη μειωμένη πνευμονική λειτουργία, κονδυλώδεις ινώσεις, μόνιμη ανικανότητα) και θάνατο. Η έκθεση στο κοβάλτιο μπορεί να προκαλέσει απώλεια βάρους, δερματίτιδα και αναπνευστική υπερευαισθησία. Η θανάσιμη δόση του σε ποντίκια, δηλαδή η ποσότητα που λαμβάνεται από το στόμα και προκαλεί θάνατο στο 50% του πληθυσμού τους, είναι $LD50 = 6171 \text{ mg/kg}$.

ΧΡΩΜΙΟ

Το χρώμιο (Chromium) είναι χημικό στοιχείο με σύμβολο Cr και ατομικό αριθμό 24. Είναι αργυρόλευκο, σκληρό μέταλλο με υψηλό σημείο τήξης. Το όνομά του προέρχεται από την ελληνική λέξη «χρώμα», καθώς έχει πολλές έγχρωμες ενώσεις. Εξαιτίας του έντονου λαμπερού μεταλλικού του χρώματος χρησιμοποιείται στην βιομηχανία για την παρασκευή εντυπωσιακών μεταλλικών αντικειμένων. Ανήκει στην ομάδα της 1ης κύριας σειράς των στοιχείων μετάπτωσης και οι ενώσεις του είναι συνήθως τοξικές.

Πίνακας 3: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του χρωμίου

Χημικό σύμβολο	Cr
Ατομικός αριθμός	24
Χημική ομάδα	Στοιχείο μετάπτωσης
Πυκνότητα	$7.19 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$
Χρώμα	Αργυρόλευκο

Σημείο τήξης	1907 °C
Σημείο βρασμού	2671 °C
Μοριακή θερμοχωρητικότητα	23.35 J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹
Ηλεκτρική αγωγιμότητα	(20 °C) 125 nΩ·m

Το χρώμιο έχει αξιοσημείωτες μαγνητικές ιδιότητες. Είναι το μόνο στερεόστοιχείο που μπορεί, όταν βρίσκεται στη φύση σε στοιχειακή μορφή και όχι σε ενώσεις, να μην έλκεται μαγνητικά σε θερμοκρασία δωματίου (ή χαμηλότερη). Ωστόσο, πάνω από τους 38°C έρχεται σε παραμαγνητική κατάσταση. Η μεγαλύτερη ποσότητα χρωμίου χρησιμοποιείται στην παραγωγή ανοξείδωτου χάλυβα. Τα χρωμικά σύμπλοκα συχνά χρησιμοποιούνται ως χρωστικές στη φωτογραφία. Ο χρωμικός μολυβδος (PbCrO₄), γνωστός ως κίτρινο του χρωμίου (Chrome Yellow) είναι μια εξαιρετικής ποιότητας κίτρινη χρωστική που χρησιμοποιείται στο χρωματισμό του βινυλίου, του ελαστικού (rubber) και του χαρτιού, αλλά λόγω της μεγάλης τοξικότητάς του η χρήση του πλέον μειώνεται. Επίσης οι ενώσεις του Cr(VI) χρησιμοποιούνται σε βαφές υφασμάτων και δέρματος, χρώματα και μελάνια. Εκτεταμένη χρήση των αλάτων του Cr(VI) (κυρίως του χρωμικού νατρίου και αμμωνίου) γίνεται στη βυρσοδεψία για την κατεργασία δερμάτων (δέψη, leathertanning). Το χρώμιο συναντιέται επίσης στα οδοντοτεχνικά κράματα όπως είναι το CoCr και το NiCr. Το χρώμιο εισέρχεται στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω της αναπνοής και της κατανάλωσης τροφής και ποτών που το περιέχουν. Το τρισθενές χρώμιο, Cr(III), θεωρείται απαραίτητο ιχνοστοιχείο για τον οργανισμό, αφού φαίνεται να συμμετέχει στον παράγοντα ανοχής της γλυκόζης (Glucose Tolerance Factor, GTF). Γενικά, ενδείκνυται πρόσληψη 30 έως 50 μg Cr(III) ημερησίως, ενώ για ποσότητες μέχρι 200 μg δεν έχει αναφερθεί ότι προκαλούν προβλήματα. Το Cr(III) δεν είναι τόσο επικίνδυνο γιατί οι ενώσεις του λόγω του μεγάλου όγκου τους και της δυσδιαλυτότητας τους διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη αργά ή και καθόλου. Αντίθετα, το εξασθενές χρώμιο Cr(VI) έχει χαρακτηριστεί ως αποδεδειγμένο καρκινογόνο. Υπάρχουν αρκετά πειραματικά δεδομένα ότι ενώσεις του Cr(VI) καταστρέφουν το DNA και προκαλούν μεταλλάξεις. Επιδημιολογικές μελέτες σε εργάτες παραγωγής χρωμικών και μεταλλικών νεπιστρώσεων χρωμίου έδειξαν ότι εισπνοή σκόνης που περιέχει Cr(VI) προκαλεί καρκίνο του πνεύμονα και της ρινικής κοιλότητας (sinonasal cavity). Επίσης, εισπνοή σωματιδίων που περιέχουν σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις Cr(VI)

μπορεί να προκαλέσει έλκος, αιμορραγία, κνησμό και φτέρνισμα. Η κατάποση υψηλών ποσοτήτων Cr(VI) μπορεί να προκαλέσει καταστροφή των νεφρών και του ήπατος, έλκος στομάχου και γαστρεντερικό ερεθισμό, ακόμα και θάνατο. Τέλος, ακόμη και ηδερματική έκθεση σε ενώσεις του Cr(VI) προκαλεί δερματικά έλκη και δριμύεις αλλεργικές αντιδράσεις, ιδιαίτερα από ενδύματα και υποδήματα από δέρμα που έχει κατεργαστεί με Cr(VI) [11].

Εξασθενές χρώμιο

Το Cr(VI) έχει πολλές βιομηχανικές χρήσεις (INCHEM, 1988). Οι μεταλλοβιομηχανίες χρησιμοποιούν πολλές ενώσεις του Cr(VI) ως επιστρώσεις προστασίας μεταλλικών επιφανειών από τη διάβρωση (anti-corrosion and conversion coatings).

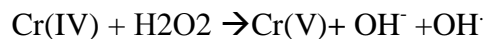
Πολλά χρωμικά και διχρωμικά άλατα χρησιμοποιούνται ως παρεμποδιστές διάβρωσης (corrosion inhibitors), αλλά η υψηλή τους τοξικότητα έχει οδηγήσει τη βιομηχανία στην σταδιακή αντικατάστασή τους [12].

Η διεργασία επίστρωσης με χρωμικά (chromate conversion coating, CCC) εφαρμόζεται για την παθητικοποίηση (passivation) μεταλλικών επιφανειών αλουμινίου, ψευδαργύρου, καδμίου, χαλκού, άργυρου, μαγνησίου, κασσιτέρου και κραμάτων τους. Τα κυριότερα χρωμικά άλατα που χρησιμοποιούνται σε αυτή τη διεργασία είναι το χρωμικό ασβέστιο, το χρωμικό στρόντιο και ο χρωμικός ψευδάργυρος. Για την ίδια διεργασία χρησιμοποιείται και το τριοξείδιο του χρωμίου

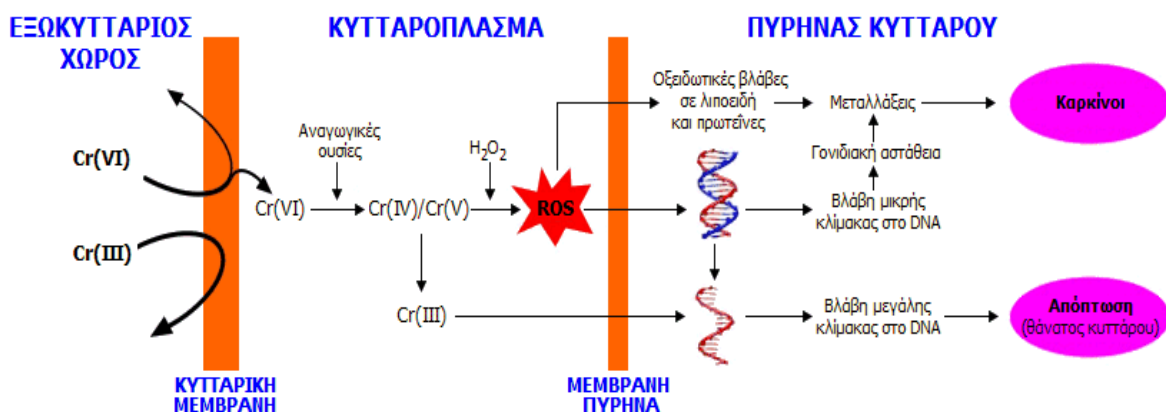
Το Cr(VI), ως χρωμικά ιόντα, λόγω δομικής ομοιότητας με τα θειικά και τα φωσφορικά ιόντα, εισέρχεται σαν "Δούρειος Ίππος" στα κύτταρα μέσω της κυτταρικής μεμβράνης χρησιμοποιώντας το φυσιολογικό σύστημα διακίνησης αυτών των ιόντων. Στο εσωτερικό των κυττάρων αντιδρά με τις αναγωγικές ουσίες που θα βρει εκεί και ανάγεται σε Cr(III) το οποίο φαίνεται ότι είναι και ο "πραγματικός κίνδυνος". Αντίθετα, οι οκταεδρικής σύνταξης ενώσεις του Cr(III), λόγω του όγκου και της δυσδιαλυτότητας πολλών από αυτές, διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη αργά ή και καθόλου. Για τον λόγο αυτό το Cr(VI) είναι η επικίνδυνη μορφή του χρωμίου και όχι το Cr(III). Υπάρχουν πολλές δεδομένα τα οποία υποστηρίζουν τους μηχανισμούς δράσης του Cr(VI), όταν εισέρχεται στο κύτταρο και του Cr(III), που παράγεται μέσα στο κύτταρο με αναγωγή του Cr(VI) [13].

Η πορεία αναγωγής Cr(VI) σε Cr(III) εντός του κυττάρου μπορεί να προκαλέσει καταστροφή του DNA, όπως οξειδωτικές βλάβες, θραύση των κλώνων του, σχηματισμό ενώσεων προσθήκης Cr(III)-DNA, διακλωνικές συνδέσεις και συνδέσεις πρωτεϊνών-DNA.

Έρευνες έδειξαν ότι με την είσοδο του Cr(VI) στο κύτταρο, αυτό ανάγεται από το πλήθος των αναγωγικών ουσιών και ενζύμων (όπως η γλουταθειόνη) κατά στάδια σε χαμηλότερο επίπεδο σθένους. Τα ενδιάμεσα προϊόντα αναγωγής του χρωμίου με το υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂), ενός φυσικού συστατικού του κυτταροπλάσματος (σε πολύ μικρές βέβαια συγκεντρώσεις), παράγουν δραστικές οξυγονούχες ρίζες (ιδιαίτερα τη ρίζα υδροξυλίου, OH[·]), (ROS). Έρευνες έδειξαν ότι το Cr(V), Cr(IV) και Cr(III) με το H₂O₂ μπορούν να δημιουργήσουν τις ρίζες OH[·] με αντιδράσεις Fenton όπως:



Οι ρίζες OH[·] είναι σε θέση να προκαλέσουν οξειδωτικές βλάβες στο DNA και συγκεκριμένα παρέχουν την οξειδωμένη μορφή της γουανοσίνης, την 8-υδροξυδεοξυγουανοσίνη (8-OHdG).



Εικόνα 1.2.1Α Συνοπτικός πιθανός μηχανισμός δράσης βιοχημικής δράσης του Cr(VI): Το Cr(VI) μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη σε αντίθεση με το Cr(III), του οποίου η ισχυρή εφυδάτωση δεν επιτρέπει τη διέλευση μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Στο κυτταρόπλασμα, διάφορες αναγωγικές οργανικές ουσίες προκαλούν τη σταδιακή αναγωγή του Cr(VI) προς Cr(III). Οι ενδιάμεσες οξειδωτικές καταστάσεις Cr(V) και Cr(VI) αντιδρούν με το υπεροξείδιο του υδρογόνου που είναι προϊόν άλλων βιοχημικών διεργασιών δημιουργώντας δραστικές οξυγονούχες ουσίες, ROS, (κυρίως ρίζες OH·) οι οποίες επιφέρουν οξειδωτικές βλάβες σε λιποειδή και πρωτεΐνες και βλάβες μικρής κλίμακας στο DNA, οι οποίες οδηγούν σε γονιδιακή αστάθεια, μεταλλάξεις και τελικά στον καρκίνο. Ανάλογη δράση έχει το τελικό προϊόν αναγωγής, το Cr(III), το οποίο μπορεί να συνδεθεί με το DNA προκαλώντας διάνοιξη και θραύση των κλώνων του.

ΑΡΓΙΛΙΟ

Το αργίλιο είναι χημικό στοιχείο με σύμβολο Al και ατομικό αριθμό 13. Το αργίλιο αποτελεί ένα από τα πιο διαδεδομένα μέταλλα στην φύση. Το στοιχείο αυτό δεν απαντάται ελεύθερο αλλά βρίσκεται συμπλοκοποιημένο με κάποιο υποκαταστάτη. Το αργίλιο έχει χρώμα αργυρόλευκο και θεωρείται ελαφρύ μέταλλο. Είναι περίπου τρεις φορές ελαφρύτερο από τον σίδηρο και είναι κακός αγωγός θερμότητας και ηλεκτρισμού. Το αργίλιο έχει την ιδιότητα να σχηματίζει οξειδία του αργιλίου εάν θερμανθεί μαζί με κάποιο οξύδιδο άλλου μετάλλου και για τον λόγο αυτό θεωρείται άριστο αναγωγικό μέσο. Επιπλέον, το αργίλιο χαρακτηρίζεται ως επαμφοτερίζον στοιχείο καθώς έχει την ικανότητα να αντιδρά με πολλά αμέταλλα όπως είναι το υδροχλωρικό οξύ αλλά και με ισχυρές βάσεις. Ιδιαίτερα χρήσιμη ένωση του αργιλίου είναι η κοινή στυπτηρία η οποία χρησιμοποιείται στις βιομηχανίες βαφής, βυρσοδεψίας και χαρτοποιίας ενώ ακόμη το αργίλιο χρησιμοποιείται και ως αιμοστατικό. Την δεκαετία του 1980, η ευρωπαϊκή κοινοτική οδηγία (European Community Directive) και η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας, (The World Health Organization, WHO) καθόρισαν τα 200μg/λως το ανώτατο αποδεκτό όριο συγκέντρωσης του Al(III) στο πόσιμο νερό. Ωστόσο, η αναγνώριση του αργιλίου ως νευροτοξικού παράγοντα έγινε το 1988 και προστέθηκε στην λίστα υποψηφίων παραγόντων μόλυνσης από την υπηρεσία περιβαλλοντικής προστασίας των ΗΠΑ.

Το αργίλιο εμφανίζει μια πολύπλοκη χημεία σε υδατικά διαλύματα και η διαλυτότητα του αργιλίου είναι ιδιαίτερα εξαρτώμενη από το pH. Σε διαλύματα με pH μικρότερο από 5,5 τα ελεύθερα ιόντα του Al(III) με οκταεδρική μορφή του $[Al(H_2O)_6]^{3+}$ εμφανίζεται ως η κυρίαρχη μορφή. Σε pH 7.4 συμπλοκοποιητικών μορίων το σύμπλοκο ιόν $[Al(OH)_4]^-$ είναι η κυρίαρχη μορφή του διαλυτού μονοπυρηνικού Al [14]. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν το είδος και η ποσότητα των υποκαταστατών που βρίσκονται στο ίδιο διάλυμα με τους οποίους το Al(III) μπορεί να σχηματίσει σύμπλοκα. Στον ανθρώπινο οργανισμό, οι ένδο- και έξω-κυτταρικές συγκεντρώσεις των φωσφορικών έχουν βρεθεί από 2 έως 10 mM, συγκεντρώσεις οι οποίες σε συνδυασμό με το Al(III) σχηματίζουν το αδιάλυτο άλας $AlPO_4 \cdot 2H_2O$ που αντιστοιχεί στον ορυκτό βαρισκίτη. Έχει υπολογιστεί ότι μόνο το ελεύθερο Al(III) μπορεί να υπάρχει σε τέτοιου είδους διαλύματα, αλλά με πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις [15]. Πρέπει να αναφερθεί ότι αυτή η ισχυρή συγγένεια του αργιλίου

με τα φωσφορικά άλατα εξηγεί εν μέρει την υψηλή συγγένεια του αργιλίου με τον πυρήνα του κυττάρου όπου η συγκέντρωση των φωσφορικών φτάνει τα 60mM.

Δεν είναι ακόμα πλήρως αποσαφηνισμένο ποιες είναι εκείνες οι ενώσεις οι οποίες είναι υπεύθυνες για τις τοξικές επιδράσεις του αργιλίου στα διάφορα βιολογικά συστήματα. Θεωρείται ότι τα ιδιαίτερα δραστικά ιόντα του Al(III) είναι υπεύθυνα για τις τοξικές επιδράσεις του αργιλίου καθώς τα ιζήματα δεν εμφανίζουν καμία ουσιαστικά βιοδιαθεσιμότητα. Σε βιολογικά συστήματα, το ποσό των ελεύθερων ιόντων Al(III) εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το ποσό των δεσμευμένων ιόντων σε σύμπλοκα με υποκαταστάτες. Όσον αφορά στην τοξικότητα, ο σχηματισμός συμπλόκων καθίσταται απαραίτητος καθώς η συμπλοκοποίηση είναι αυτή που προωθεί ή μειώνει αντίστοιχα την βιοδιαθεσιμότητα των ιόντων Al(III) και καθορίζει επίσης το σημείο σχηματισμού του συμπλόκου. Έχει υπολογιστεί ότι το 90% των ειδών του Al(III) στο εγκεφαλικό εξωκυττάριο υγρό είναι το σύμπλοκο Al-citrate. Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι το αργίλιο που παραμένει για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο από 24 ώρες ενσωματώνεται σε μία ομάδα ή σε περιοχή με αργίλιο στον ιστό όπου οι ρυθμοί εισροής-εκροής είναι πολύ χαμηλοί (Eggers, 2007). Η τρανσφερίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη υπεύθυνη για την μεταφορά του Fe(III) ωστόσο, μπορεί επίσης μεταφέρει και άλλα μεταλλικά ιόντα, συμπεριλαμβανομένου και του Al(III). Η τρανσφερίνη είναι ο βασικός μεταφορέας του αργιλίου στο πλάσμα. Κάθε μόριο της τρανσφερίνης διαθέτει δύο περιοχές δέσμευσης μεταλλοϊόντων με πάνω από το 30% να μην καλύπτεται από τον σίδηρο οπότε το αργίλιο δεν χρειάζεται να ανταγωνίζεται με τον σίδηρο για την περιοχής σύνδεσης. Η τρανσφερίνη είναι παρούσα στον εγκέφαλο και το αίμα. Έχει δειχθεί ότι η πρόσληψη του αργιλίου στον εγκέφαλο επιτυγχάνεται μέσω του τρανσφερινικού υποδοχέα με ενδοκύτωση [16].

Το αργίλιο δεν μπορεί να συμμετέχει σε αντιδράσεις οξειδωαναγωγής λόγω του σταθερού αριθμού οξείδωσης (+3) που διαθέτει. Επιπλέον, τα ιόντα του Al(III) παρουσιάζουν πολύ αργό ρυθμό αντίδρασης και συνήθως καταβυθίζονται με οξείδια σε pH 7. Ενδέχεται αυτός να είναι και ο πιθανός λόγος για τον οποίο στην εξέλιξη δεν βρέθηκε χρήση για το μέταλλο αυτό σε βιολογικά συστήματα. Παρά το γεγονός ότι το αργίλιο δεν είναι ουσιώδες στοιχείο, είναι παρόν σε μικρές ποσότητες σε όλα σχεδόν τα μέρη του οργανισμού. Στον άνθρωπο, υπό φυσιολογικές συνθήκες, η συνολική ποσότητα του αργιλίου είναι 35-40 mg, υπάρχει σε ποικίλες μορφές και δεν αυξάνεται με την ηλικία παρά μόνο στους πνεύμονες και τον εγκέφαλο. Οι περιοχές

του εγκεφάλου που πλήττονται κύρια κατά την παθολογία της νόσου Alzheimer είναι παρεγκεφαλίδα και ο ιππόκαμπος. Στα τελικά στάδια της νόσου η εκφύλιση των κυττάρων επεκτείνεται και όλα σχεδόν τα τμήματα του εγκεφάλου.

Η καθημερινή έκθεση του ανθρώπου στο αργίλιο εκτιμάται ότι είναι 5-10 mg. Κατά μέσο όρο το πόσιμο νερό περιέχει 70μg/ml, αν και μπορεί να φτάσει και ως 4 mg/ml σε ορισμένες περιοχές. Το δέρμα, οι πνεύμονες και ο γαστρεντερικός σωλήνας παρεμποδίζουν την απορρόφηση του αργιλίου από το σώμα. Μόλις το 0,1-0,4% της δόσης του μετάλλου απορροφάται κατά την κατάποση και η μεγαλύτερη ποσότητα απεκκρίνεται σχεδόν άμεσα με τα ούρα [17]. Το αργίλιο δεν κατανέμεται εξίσου στους διάφορους ιστούς. Το υψηλότερο ποσοστό απαντάται στους πνεύμονες κυρίως λόγω απόθεσης των σωματιδίων που δεσμεύονται από τον βλεννογόνο. Μόλις το 1% του καθαρού βάρους του αργιλίου βρίσκεται στον εγκέφαλο και η συγκεκριμένη ποσότητα είναι πολύ μικρή σε σχέση με τους υπόλοιπους ιστούς του σώματος. Μετρήσεις σε δείγματα εγκεφάλου ασθενών με την νόσο Alzheimer έδειξαν ότι η περιεκτικότητα του αργιλίου στον εγκεφαλικό ιστό είναι 970μM σε αντίθεση με τα 25μM που υπάρχουν σε φυσιολογικές συνθήκες [18]. Το συνολικό καθαρό βάρος του αργιλίου και η συγκέντρωσή του στους διάφορους ιστούς δεν έχουν καμία ιδιαίτερη σημασία για την τοξικότητά του καθώς οι διάφοροι τύποι κυττάρων παρουσιάζουν πολύ διαφορετική ευαισθησία στην συγκεκριμένη μεταλλοτοξίνη. Τα εγκεφαλικά κύτταρα φαίνεται πως είναι τα πιο ευαίσθητα. Οι νευροτοξικές και νευροεκφυλιστικές ιδιότητες του αργιλίου είναι γνωστές. Ωστόσο, οι πιθανές αρνητικές επιδράσεις της περιβαλλοντικής έκθεσης σε αργίλιο κατά την διάρκεια ζωής του γενικού πληθυσμού δεν έχουν τεκμηριωθεί ακόμα.

Διάφορες επιδημιολογικές μελέτες υποστηρίζουν την συσχέτιση μεταξύ του αργιλίου και της νόσου Alzheimer σε περιοχές όπου υπάρχουν αυξημένες συγκεντρώσεις αργιλίου στο πόσιμο νερό. Επιπλέον, σημαντικά αυξημένα επίπεδα αργιλίου παρατηρούνται στους ιστούς, το αίμα και τον εγκέφαλο μετά από ορισμένες θεραπείες όπως είναι η αιμοκάθαρση ή η θεραπεία αντιόξινων και ενδέχεται να προκαλέσουν το Σύνδρομο Εγκεφαλοπάθειας ή δηλητηριάσεις από αργίλιο. Η σκλήρυνση κατά πλάκας και η νόσος του Parkinson έχουν επίσης περιγραφεί σε άτομα που ζουν σε περιοχές όπου υπάρχουν υψηλές συγκεντρώσεις αργιλίου στο πόσιμο νερό. Είναι λοιπόν σαφές ότι το αργίλιο έχει νευροτοξικές ιδιότητες στον άνθρωπο οι οποίες σχετίζονται με τον σχηματισμό νευροϊνδιακές μεταβολές οι

οποίες με την σειρά τους οδηγούν σε νευροεκφύλιση των κυττάρων. Τα νευροϊνιδώδη συμπλέγματα της σκλήρυνσης κατά πλάκας και της νόσου Parkinson είναι πανομοιότυπα από δομικής, ιστολογικής και βιοχημικής άποψης με τα νευροϊνιδώδη συμπλέγματα της νόσου Alzheimer [19]. Ωστόσο, ο σχηματισμός της β-αμυλοειδούς πλάκας είναι παρόν μόνο στην νόσο Alzheimer.

ΔΗΜΗΤΡΙΟ

Το δημήτριο είναι εξίσου κοινό στη φύση όσο ο χαλκός, με αποτέλεσμα να είναι μια από τις πιο άφθονες σπάνιες γαίες. Το χημικό στοιχείο δημήτριο είναι μέταλλο με ατομικό αριθμό 58 και ατομικό βάρος 140,12 . Έχει θερμοκρασία τήξης 795 C° και θερμοκρασία βρασμού 3257 C°. Το χημικό σύμβολο του είναι Ce. Το Δημήτριο ανήκει στις σπάνιες γαίες ή «λανθανίδες» και στον περιοδικό πίνακα κατατάσσεται στη πρώτη ομάδα αυτών.

Συχνά μετατρέπεται σε οξείδιο του δημητρίου, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως λόγω της ικανότητας του να στυλβώνει το γυαλί και στους ημιαγωγούς. Το οξείδιο του δημητρίου (CeO₂) είναι επίσης απαραίτητο στους καταλυτικούς μετατροπείς καυσαερίων, όπου βοηθά στη μετατροπή των μορίων της αιθαλομίχλης σε διοξείδιο του άνθρακα, καθώς και στα τεράστια φωτιστικά τόξου άνθρακα που χρησιμοποιούνται στα κινηματογραφικά πλάτο. Οξείδια του δημητρίου έχουν χρησιμοποιηθεί ως αντιοξειδωτικά μέσα σε *in vitro* μοντέλα της νόσου Alzheimer. Τα οξείδια του δημητρίου δεν δρουν άμεσα ως αντιοξειδωτικά μόρια ωστόσο έμμεσα επιδρούν σε κυτταρικούς μηχανισμούς που αφορούν στον κυτταρικό θάνατο και την προστασία από το οξειδωτικό stress [20].

ΧΑΛΚΟΣ

ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΧΑΛΚΟΥ

Ο χαλκός είναι χημικό στοιχείο που ανήκει στα μέταλλα και ειδικότερα στα στοιχεία μετάπτωσης. Ο ατομικός αριθμός του χαλκού είναι 29 και το ατομικό του βάρος είναι 63,546. Ο χαλκός συμβολίζεται με Cu από την λατινική λέξη και ανήκει στην ομάδα της 1^{ης} κύριας σειράς των στοιχείων μετάπτωσης του περιοδικού πίνακα. Ως μέταλλο έχει χαρακτηριστικό χρώμα – ερυθρό του χαλκού - και χαρακτηριστική μεταλλική λάμψη. Επιπλέον, ο χαλκός είναι μαλακός, δύστηκτος, ιδιαίτερα ελατός και όλκιμος καθώς και καλός αγωγός του ηλεκτρισμού και της θερμότητας ενώ επίσης δεν εμφανίζει μαγνητικές ιδιότητες.

Ο χαλκός εμφανίζει δύο αριθμούς οξείδωσης, +1 και +2. Ως μέταλλο δεν είναι ιδιαίτερα δραστικό και για τον λόγο αυτό δεν αντιδρά εύκολα με άλλα στοιχεία και

σπάνια χρησιμοποιείται ως αναγωγικό. Γενικά, αντιδρά με το οξυγόνο και το θείο ενώ δεν προσβάλλεται από αραιά οξέα και πυκνό θειικό οξύ, ωστόσο προσβάλλεται από το νιτρικό οξύ (HNO_3).

Στους έμβιους οργανισμούς, ο χαλκός αποτελεί απαραίτητο ιχνοστοιχείο τόσο στα ζώα όσο και στα φυτά. Απαντάται σε μεγάλο αριθμό ενζύμων όπως είναι η υπεροξειδάση του κυτοχρώματος C και η υπεροξειδική δισμουτάση. Έχει παρατηρηθεί ότι στα ανώτερα ζώα η παρουσία του χαλκού διευκολύνει την απορρόφηση του σιδήρου. Στον ανθρώπινο οργανισμό, ο χαλκός αποτελεί απαραίτητο ιχνοστοιχείο. Στους ζωικούς οργανισμούς, ο χαλκός μεταπίπτει μεταξύ των μορφών του μονοσθενούς (Cu^{+1}) και δισθενούς χαλκού (Cu^{+2}) αντίστοιχα. Εξαιτίας της ευκολίας του να παίρνει και να δίνει ηλεκτρόνια, μετέχει σε αντιδράσεις οξειδωσης και αναγωγής καθώς και σε αντιδράσεις δέσμευσης ελεύθερων ριζών.

Ο χαλκός χρησιμοποιείται ευρέως στην βιομηχανία (ηλεκτρικά και ηλεκτρονικά είδη, αγωγοί, πηνία, γεννήτριες κ.α.), τη χημεία (καταλύτες), σε νοσοκομειακές εγκαταστάσεις καθώς αποτελεί βιοστατικό στοιχείο παρεμποδίζοντας έτσι την ανάπτυξη μικροοργανισμών στην επιφάνειά του, ενώ ακόμα χρησιμοποιείται ευρέως σε κράματα (ορείχαλκος, μπρούντζος) και δεν αλλοιώνεται από οργανικούς διαλύτες.

Η μετατροπή του στοιχειακού χαλκού στο νερό είναι περίπλοκη και επηρεάζεται από το pH, την διαλυμένη σε αυτό ποσότητα οξυγόνου καθώς και την παρουσία οξυγόνου, οξειδωτικών παραγόντων, χηλικοποιητικών μορίων και ιόντων. Ο χαλκός παρουσιάζει επιφανειακή οξείδωση και μπορεί να μετασχηματιστεί σε οξείδιο (CuO) ή σε υδροξείδιο [$\text{Cu}(\text{OH})_2$] του χαλκού. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων ο μονοσθενής χαλκός (Cu^{+1}) μετατρέπεται σε δισθενή (Cu^{+2}). Τα σύμπλοκα του χαλκού σε υδατικά διαλύματα με αμμώνιο ή χλώριο είναι ιδιαίτερα σταθερά. Στο καθαρό νερό ο δισθενής χαλκός (Cu^{+2}) δημιουργεί ενώσεις με ανθρακικά ανιόντα (CO_3)²⁻ ή με υδροξύλια (OH)⁻. Σε όξινο νερό ($\text{pH} \leq 6$) ο χαλκός απαντάται ως δισθενής, σε τιμές $6 \leq \text{pH} \leq 9.3$ απαντάται με την μορφή ανθρακικού χαλκού (CuCO_3) ενώ σε τιμές $9.3 \leq \text{pH} \leq 10.7$ υπερσχύουν τα ανιόντα [$\text{Cu}(\text{CO}_3)_2$]⁻.

Ο χαλκός αποτελεί απαραίτητο συστατικό πολλών ενζύμων του ανθρώπινου οργανισμού. Τα ένζυμα αυτά είναι γνωστά ως χαλκοένζυμα (cuproenzymes). Η λειτουργία των ενζύμων αυτών εξαρτάται από τον χαλκό. Μερικά από τα ένζυμα αυτά καθώς και οι λειτουργίες τους αναφέρονται παρακάτω.

- Η οξειδάση c διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην παραγωγή της κυτταρικής ενέργειας. Ο καταλυτικός ρόλος της οξειδάσης έγκειται στην αναγωγή του μοριακού οξυγόνου (O_2) σε H_2O παράγοντας έτσι ηλεκτρική τάση απαραίτητη για την αποθήκευση του ATP από τα μιτοχόνδρια.
- Η λυσική οξειδάση απαιτείται για την διασύνδεση του κολλαγόνου και της ελαστίνης, συστατικά απαραίτητα για τον σχηματισμό του ισχυρού συνδετικού ιστού. η λυσική οξειδάση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της ακεραιότητας του συνδετικού ιστού στην καρδιά καθώς και στα αιμοσφαίρια του αίματος.
- Οι σιδηροξειδάσες I και II έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν τον σίδηρο από Fe^{+2} σε Fe^{+3} , την μορφή δηλαδή εκείνη του σιδήρου η οποία μπορεί να συνδεθεί στην τρασφερίνη για την μεταφορά του στην περιοχή σχηματισμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων του αίματος.
- Πολλά ένζυμα του χαλκού καταλύουν μια ποικιλία ουσιαστικών αντιδράσεων προκειμένου να διατηρηθεί η κανονική και φυσιολογική λειτουργία του εγκεφάλου και του νευρικού συστήματος.
- Η ντοπαμίνη – β μονοξυγενάση καταλύει την μετατροπή της ντοπαμίνης σε νορεπινεφρίνη (νοραδρεναλίνη) η οποία έχει ρόλο νευροδιαβιβαστή.
- Η μονοαμινική οξειδάση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό διαφόρων νευροδιαβιβαστών (νορεπινεφρίνη, επινεφρίνη, ντοπαμίνη).
- Η τυροσινάση απαιτείται για τον σχηματισμό της χρωστικής ουσίας μελανίνης. Η μελανίνη σχηματίζεται στα μελανοκύτταρα και είναι υπεύθυνη για το χρώμα των τριχών του δέρματος και των ματιών.
- Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) λειτουργεί ως αντιοξειδωτικό καταλύοντας την μετατροπή των υπεροξειδίων των ριζών (ελεύθερες ρίζες, ROS) σε υπεροξειδικό υδρογόνο το οποίο με την σειρά του μπορεί να αναχθεί σε νερό από άλλα ένζυμα του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Υπάρχουν δύο μορφές της πρωτεΐνης αυτής, η SODχαλκού/ψευδαργύρου η οποία βρίσκεται στα περισσότερα κύτταρα του σώματος και η εξωκυττάρια SODη οποία περιέχει χαλκό και απαντάται κυρίως στους πνεύμονες [21].

Ο χαλκός που περιέχεται στο πρωτεολυτικό ένζυμο του ορού λειτουργεί ως αντιοξειδωτικό του ορού του αίματος απομακρύνοντας ελεύθερες ρίζες. Επιπλέον, ο χαλκός ρυθμίζει την μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων με αποτέλεσμα τα κυτταρικά επίπεδα του χαλκού να έχουν άμεση επίπτωση στη σύνθεση των πρωτεϊνών με την ενίσχυση ή την καταστολή της μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων.

Αξίζει να αναφερθεί ότι η αύξηση της πρόσληψης ψευδαργύρου μπορεί να οδηγήσει σε ανεπάρκεια χαλκού στον οργανισμό. Τα υψηλά επίπεδα ψευδαργύρου οδηγούν στη σύνθεση της μεταλλοθειονίνης η οποία σχετίζεται με την δέσμευση ορισμένων μετάλλων μεταξύ των οποίων και του χαλκού και παράλληλα αποτρέπει την απορρόφησή τους από τον εντερικό ιστό. Αντίστροφα, η υψηλή πρόσληψη χαλκού δεν έχειδειχθεί να έχει επιπτώσεις στα επίπεδα του ψευδαργύρου.

Πίνακας 4: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του χαλκού

Χημικό σύμβολο	Cu
Ατομικός αριθμός	29
Μοριακό βάρος	63.546
Χημική ομάδα	Στοιχείο μετάπτωσης
Πυκνότητα	8,96 g*cm ³
Χρώμα	Ερυθρό
Σημείο τήξης	1084,62 °C
Σημείο βρασμού	2562 °C
Μοριακή θερμοχωρητικότητα	24.440 Jmol ⁻¹ K ⁻¹
Ηλεκτρική αγωγιμότητα	20 °C) 16.78 nΩ *m
Θερμική αγωγιμότητα	401 W*m ⁻¹ *K ⁻¹

ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΧΑΛΚΟΥ

Η πλειοψηφία των ενώσεων του χαλκού αντιμετωπίζονται ως τοξικές. Έχειδειχθεί ότι στο πόσιμο νερό το προτεινόμενο ασφαλές επίπεδο χαλκού κυμαίνεται από 1.5 έως 2 mg/ml ενώ το ανώτερο αποδεκτό όριο πρόσληψης σε ενήλικα οργανισμό αντιστοιχεί σε 10 mg/ml ημερησίως. Για τον άνθρωπο η κύρια πηγή πρόσληψης του

χαλκού είναι η τροφή και το πόσιμο νερό. Η διαιτητική πρόσληψη του χαλκού για τους ενήλικες κυμαίνεται από 1–3 mg Cu/24h. Η χρήση συμπληρωμάτων διατροφής μπορεί να αυξήσει την πρόσληψη του χαλκού κατά 2 mg επιπλέον. Το πόσιμο νερό συμβάλλει στην πρόσληψη χαλκού 0.1–1.0 mg Cu/24h. Έτσι, η ημερησία πρόσληψη χαλκού για ενήλικες υπολογίζεται από 1-5 mg/24h. Η απορρόφηση του χαλκού πραγματοποιείται κυρίως από το στομάχι και το λεπτό έντερο και εξαρτάται από την ποσότητα που προσλαμβάνεται. Έτσι σε λήψη 7.5mgCu απορροφάται το 12% ενώ σε λήψη 0.8 mgCu απορροφάται το 56%. Η απορρόφησή του μπορεί να φτάσει και το 71% αν η λήψη του είναι μεταξύ 0.96–1.2 mg/24h. Το πόσιμο νερό επιτρέπεται να έχει χαλκό, ενώ η περιεκτικότητα του χαλκού στα συντηρημένα τρόφιμα είναι 50-100 mg Cu/kg. Η συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη (RDA) για ενήλικες και εφήβους υπολογίζεται στα 1.5–3 mg Cu/24h. Για τα παιδιά κυμαίνεται μεταξύ 0.7–2.0 mg Cu/24h. Για τα νεογέννητα μέχρι 6 μηνών η πρόσληψη είναι 0.4–0.6 mg Cu/24h και από 6 – 12 μηνών 0.6 – 0.7 mg Cu/24h. Το RDA της Ευρωπαϊκής Ένωσης για το γενικό πληθυσμό υπολογίζεται στα 1.15 mg Cu/24h.

Η ανεπάρκεια του χαλκού είναι σχετικά σπάνια. Ένα από τα πιο κοινά κλινικά σημάδια της ανεπάρκειας του χαλκού είναι η μικροκυτταρική αναιμία. Η ανεπάρκεια χαλκού μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλά μη φυσιολογικά επίπεδα λευκών αιμοσφαιρίων (φαγοκυτταρική πενία) μια πάθηση η οποία μπορεί να συνοδεύεται από αυξανόμενη ευαισθησία στη μόλυνση και άρα σε αυξημένη ευαισθησία σε λοιμώξεις. Η οστεοπόρωση καθώς και άλλες ανωμαλίες στην ανάπτυξη των οστών οι οποίες σχετίζονται με την ανεπάρκεια του χαλκού απαντώνται κυρίως στη νηπιακή ηλικία. Επιπλέον, ανεπάρκεια χαλκού μπορεί να επιφέρει διαταραχές στο χρώμα του δέρματος.

Γενικά η τοξικότητα από χαλκό είναι σπάνια στο γενικό πληθυσμό. Η οξεία και άμεση δηλητηρίαση από χαλκό γίνεται έκδηλη με κοιλιακούς πόνους, ναυτία, εμετό, ίλιγγο και διάρροια. Σοβαρότερες κλινικές εκδηλώσεις περιλαμβάνουν ηπατική και νεφρική ανεπάρκεια, κώμα ακόμα και θάνατο. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι άτομα με κληρονομικές παθήσεις όπως είναι η ασθένεια Wilson, η ινδική κίρρωση παιδικής ηλικίας και η ιδιοπαθής τοξίνωση χαλκού) οι οποίες σχετίζονται με τον μεταβολισμό του χαλκού, ενδέχεται να διατρέξουν μεγαλύτερο κίνδυνο από τα δυσμενή αποτελέσματα της χρόνιας τοξικότητας του.

Για τον άνθρωπο οι κύριες οδοί έκθεσης στον χαλκό αποτελούν η τροφή, το πόσιμο νερό ο αναπνεόμενος αέρας καθώς και το δέρμα. Στον οργανισμό, οι διάφορες ενώσεις του χαλκού εισέρχονται κυρίως μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα και ειδικότερα μέσω του δωδεκαδάκτυλου με ενεργό μεταφορά και σπανιότερα μέσω του αναπνευστικού βλεννογόνου. Μετά την απορρόφησή του ο χαλκός οδηγείται κυρίως στο ήπαρ, τα νεφρά και τον μυελό των οστών όπου και απαντάται συνδεδεμένος με την πρωτεΐνη μεταλλοθειονίνη. Ο χαλκός μπορεί επίσης να βρεθεί στους μύες, την καρδιά, τον εγκέφαλο και τα οστά. Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι στο ήπαρ η συγκέντρωση του χαλκού είναι 0.7 mg Cu/100g ιστού σε φυσιολογικές συνθήκες ενώ στην νόσο Wilson τα επίπεδα αυτά μπορεί να φτάσουν έως και 15-60. Κύρια οδός αποβολής του Cu θεωρούνται τα κόπρανα μετά την απέκκριση του μετάλλου από την χολή η οποία θεωρείται και η βασική απεκκριτική οδός. Επίσης πολύ σημαντική απεκκριτική οδός είναι αυτή μέσω των ούρων. Σε παθολογικές καταστάσεις όπως είναι η αιμοχρωμάτωση, διάφορες λοιμώξεις, κίρρωση του ήπατος και νόσο του Wilson οι συγκεντρώσεις του απεκκρινόμενου χαλκού είναι σαφώς υψηλότερες.

Ο ακριβής μηχανισμός της τοξικής δράσης του χαλκού δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Είναι γνωστό ότι ο χαλκός καταστρέφει την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Πιο συγκεκριμένα τα ιόντα χαλκού (Cu^{+2}) ανάγονται από τιςθειολικές ομάδες της κυτταρικής μεμβράνης προς Cu^{+1} . Ο Cu^{+1} στη συνέχεια οξειδώνεται προς Cu^{+2} από το οξυγόνο ενώ το οξυγόνο μετατρέπεται από σε ROO^{\cdot} . Βασική κληρονομική διαταραχή η οποία σχετίζεται με τον μεταβολισμό του χαλκού είναι η νόσος Wilson και που χαρακτηρίζεται από υπερβολική εναπόθεση χαλκού στο ήπαρ, τον εγκέφαλο, τα νεφρά και τον κερατοειδή. Η συσσώρευση χαλκού στο ΚΝΣ προκαλεί καταστροφή των νευρικών κυττάρων του κελύφους, του φακοειδούς και του εγκεφαλικού φλοιού. Η σημαντική εναπόθεση χαλκού στο ήπαρ προκαλεί κίρρωση και η διάγνωση βασίζεται στην παρατήρηση αλάτων του χαλκού στον κερατοειδή. Άλλη γενετική διαταραχή που σχετίζεται με την απορρόφηση του χαλκού είναι η νόσος Menkes η οποία χαρακτηρίζεται από βοστρύχωση των τριχών, σοβαρή διανοητική καθυστέρηση, εκτεταμένες εκφυλιστικές αλλοιώσεις του εγκεφαλικού φλοιού και της λευκής ουσίας καθώς επίσης και νευρολογικές διαταραχές. Ασθενείς με την νόσο αυτή συνήθως πεθαίνουν πριν το 30 έτος της ηλικίας τους.

ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΟΥ ΧΑΛΚΟΥ

Αντικείμενο βιολογικών μελετών αποτελούν εδώ και πολλά χρόνια ο χαλκός και οι ενώσεις του για την αντιρρευματική, αντιμικροβιακή και αντικαρκινική τους δράση. Ωστόσο, υπήρχε η πεποίθηση ότι οι ενώσεις του χαλκού ήταν καρκινογόνες και έτσι άργησαν να μελετηθούν ως αντικαρκινικά φάρμακα. Αναφορικά με τα σύμπλοκα χαλκού, αποδείχθηκε ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντικαρκινικά χημειοθεραπευτικά. Έχουν παρασκευασθεί σύμπλοκα δισθενούς χαλκού με αμινικά, πυριδινικά υποστρώματα (ligands) τα οποία μπορούν και δρουν ως εξειδικευμένες νουκλεάσες προκαλώντας ρήξη σε συγκεκριμένες βάσεις του DNA. Εκτός από την αντιμικροβιακή δράση του ίδιου του μετάλλου, έχει αποδειχθεί ότι τα σύμπλοκα του χαλκού έχουν την δική τους αντιμικροβιακή δράση όπως για παράδειγμα αυτά με υδροξινιτροκουμαρίνες, με πυριδοκαρβοξυλικά κ.ά. Τέλος, οι σύμπλοκες ενώσεις του χαλκού φημίζονται και για αντιφλεγμονώδη και αντι-ελκική δράση με διάφορα υποστρώματα. Σύμφωνα με έρευνες η αύξηση των επιπέδων του χαλκού στον ορό οφείλεται στη μειωμένη δραστηριότητα της σουπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), οπότε τα σύμπλοκα του χαλκού θα μπορούσαν να αντικαθιστούν τη δράση αυτού του ενζύμου. Γενικά η βιολογική δράση των συμπλόκων του Cu(II) οφείλεται στο γεγονός ότι αυτά διευκολύνουν ή προάγουν τις διαδικασίες επιδιόρθωσης των ιστών όπου απαιτούνται ένζυμα εξαρτώμενα από τον χαλκό.

Δύο είναι οι μηχανισμοί με τους οποίους απορροφάται ο χαλκός και αυτοί είναι: το ενεργητικό σύστημα μεταφοράς που υφίσταται κορεσμό και η παθητική διάχυση, διαδικασία η οποία δεν υφίσταται κορεσμό. Σύμφωνα και με άλλα συστήματα μεταφοράς, οι χαμηλές συγκεντρώσεις διαιτητικού χαλκού διακινούνται κυρίως μέσω του ενεργητικού συστήματος της διάχυσης. Κάποιοι μεταφορείς του χαλκού είναι οι hCtr1,2 και 3. Συγκεκριμένα ο μεταφορέας hCtr1 έχει βρεθεί σε αρκετούς ιστούς του σώματος με μεγαλύτερη έκφραση να εμφανίζεται στο ήπαρ, την καρδιά και το πάγκρεας και με μέτρια έκφραση στο έντερο. Άλλα παραδείγματα μεταφορέων Cu²⁺ πιο περιορισμένης έκτασης είναι η πρωτεΐνη των μακροφάγων (mrap2) και ο μεταφορέας των δισθενών κατιόντων/μετάλλων 1 (DC/MT). Ο χαλκός μπορεί επίσης να χρησιμοποιήσει ενεργητικά συστήματα μεταφοράς αμινοξέων, όπως αυτό που χρησιμοποιείται για την απορρόφηση της ιστιδίνης.

Η ημερήσια δίαιτα περιέχει 10 mg χαλκού, ωστόσο σχεδόν η μισή ποσότητα απορροφάται αλλά εκκρίνεται στα κόπρανα. Συνήθως πάνω από το 50% του χαλκού που προσλαμβάνεται απορροφάται από τον γαστρεντερικό σωλήνα. Η διατροφική κατάσταση του χαλκού καθώς και η βιοδιαθεσιμότητα του διαιτητικού χαλκού φαίνεται να επηρεάζει το ποσοστό του χαλκού που απορροφάται. Σε περιόδους χαμηλής διαιτητικής πρόσληψης, η απορρόφηση του χαλκού είναι σημαντικά υψηλότερη από ότι σε περιόδους υψηλής διαιτητικής πρόσληψης. Έχει βρεθεί ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις χαλκού της τάξης άνω των 5 mg/ημέρα η απορρόφηση του χαλκού κυμαίνεται μόνο στο 20% ενώ αυξάνεται πάνω από ο 50% με προσλήψεις κάτω του 1 mg/ημέρα [22].

ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΟΥ ΧΑΛΚΟΥ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ

Μελέτες έδειξαν ότι το ήπαρ έχει την ικανότητα να κατανέμει το χαλκό σε άλλους ιστούς αλλά άγνωστο παραμένει με ποιούς μηχανισμούς το καταφέρει. Τα ηπατοκύτταρα παίζουν σπουδαίο ρόλο στο μεταβολισμό του χαλκού εξομαλύνοντας την ομοιόσταση του χαλκού σε άτομα με αυξημένο φορτίο χαλκού στη νόσο Wilson μετά από μεταμόσχευση ήπατος. Ακόμη, είναι ικανά να καθορίζουν το ισοζύγιο του χαλκού και να ρυθμίζουν την έκκριση του χαλκού στη χολή ανάλογα με την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του μετάλλου. Έτσι με αυτόν τον τρόπο τα ηπατοκύτταρα ως απάντηση στην αύξηση του φορτίου του χαλκού αυξάνουν με γρήγορη ταχύτητα την χολική απέκκριση του χαλκού. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, η αύξηση του φορτίου χαλκού να είναι ασυνήθιστη κάτω από κανονικές συνθήκες. Καθώς δεν υπάρχει εντερο-ηπατική κυκλοφορία του μετάλλου, έχει τη μορφή συμπλόκου μόλις απομακρυνθεί στη χολή που δεν απορροφάται αλλά απεκκρίνεται αμέσως στα κόπρανα [23].

Η μεταφορά του χαλκού διαμέσου της μεμβράνης της ψηκτροειδούς παρυφής επηρεάζεται από μία ποικιλία διαιτητικών συστατικών, εκ των οποίων κάποια ασκούν θετική και κάποια αρνητική επίδραση [23].

Τα αμινοξέα και κυρίως η ιστιδίνη είναι κάποιες από τις ουσίες που μπορούν να διευκολύνουν την απορρόφηση του χαλκού. Ειδικότερα, η ιστιδίνη συνδέεται με το χαλκό και επιτυγχάνεται έτσι η απορρόφηση του μέσω ενός συστήματος μεταφοράς αμινοξέων. Ακόμη, ο χαλκός σχηματίζει συνδέσεις με τις σουλφυδρικές ομάδες αμινοξέων σε ενώσεις όπως η γλουταθειόνη. Επίσης, οργανικά οξέα διαφορετικά από τη βιταμίνη C στα τρόφιμα μπορούν να βελτιώσουν την απορρόφηση του χαλκού. Συγκεκριμένα, το κιτρικό, το γλυκονικό, το γαλακτικό, το οξικό και το μηλικό οξύ βελτιώνουν την διαλυτότητα του χαλκού άρα και την απορρόφησή του. Το κιτρικό έχει βρεθεί ότι σχηματίζει ένα σταθερό σύμπλοκο με το χαλκό και βελτιώνει έτσι την απορρόφηση του.

Η πρόσληψη σιδήρου σε σχετικά μεγάλες ποσότητες μειώνει την απορρόφηση χαλκού τόσο σε ανθρώπους όσο και σε πειραματόζωα. Έχει βρεθεί ότι η απορρόφηση του χαλκού σε νεογνά που τρέφονταν με βρεφικό γάλα εμπλουτισμένο σε σίδηρο (10,8 mg σιδήρου/L) ήταν σημαντικά χαμηλότερη από ότι σε νεογνά στα οποία το βρεφικό γάλα παρείχε μόνο 1,8 mg σιδήρου/L.

Δύο κύρια ανόργανα συστατικά το ασβέστιο και ο φώσφορος μειώνουν την απορρόφηση του χαλκού. Έχει παρατηρηθεί ότι το ασβέστιο (2.382 mg ως γλυκονικό ασβέστιο) και ο φώσφορος (2.442 mg ως φωσφορική γλυκερόλη) αυξάνουν την απέκκριση του χαλκού στα κόπρανα σε σύγκριση με δίαιτες που περιέχουν μέτριες ποσότητες ασβεστίου (780 mg ως γλυκονικό ασβέστιο) και υψηλή ή μέτρια περιεκτικότητα σε φώσφορο (2442 και 843 mg ως φωσφορική γλυκερόλη). Οι απώλειες χαλκού με τα ούρα ήταν επίσης υψηλότερες με την δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε ασβέστιο και φώσφορο από ότι με δίαιτα μέτριας περιεκτικότητας στα στοιχεία αυτά.

Η βιταμίνη C μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον χαλκό μειώνοντας την απορρόφηση του εξαιτίας της αναγωγής του χαλκού από τη δισθενή (Cu^{2+}) στη λιγότερο απορροφήσιμη μονοσθενή κατάσταση (Cu^+). Έχει προταθεί επίσης ότι η βιταμίνη C μειώνει την κατακράτηση του χαλκού.

ΟΞΕΙΑ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΗ

Τα άλατα χαλκού και συγκεκριμένα τα ευδιάλυτα άλατα όπως ο θειικός χαλκός και ο νιτρικός χαλκός, έχουν έντονη ερεθιστική ενέργεια όταν έρθουν σε επαφή με το

δέρμα καθώς και επί εσωτερικής λήψεως στο βλεννογόνο του στόματος και του εντέρου. Αυτή η ερεθιστική ενέργεια οφείλεται στη καθίζηση τοπικά των πρωτεϊνών των κυττάρων από την ηλεκτροαρνητική ρίζα του άλατος. Αναφορικά, ύστερα από τη λήψη διαλύματος CuSO_4 , προκαλείται βλάβη στο βλεννογόνο του γαστρεντερικού σωλήνα όμοια με αυτό που προκαλούν τα διαβρωτικά οξέα.

ΧΡΟΝΙΑ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΗ

Η χρόνια έκθεση και δηλητηρίαση από το χαλκό δημιουργεί αρκετά προβλήματα στο ήπαρ καθώς εκεί κυρίως αποθηκεύεται αφού πρώτα απορροφηθεί και μπει στην κυκλοφορία του αίματος. Ύστερα από έρευνες βρέθηκε ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της χρόνιας έκθεσης στο χαλκό και στα μειωμένα επίπεδα νοημοσύνης στους εφήβους.

Η χρόνια δηλητηρίαση μπορεί να οφείλεται είτε λόγω επαγγελματικών συνθηκών (με τη μορφή του πυρετού εκ μεταλλοχυσίας, με την εισπνοή αερολυμάτων που περιέχουν χαλκό κτλ.) είτε λόγω κληρονομικών διαταραχών του μεταβολισμού του χαλκού (νόσος Wilson, ιδιοπαθής τοξίνη χαλκού-ICT). Για την θεραπεία και την αντιμετώπιση των δηλητηριάσεων από το χαλκό χορηγούνται ειδικά μη τοξικά και την αποβολή του μέσω των ούρων.

ΧΑΛΚΟΣ ΚΑΙ ΕΓΚΕΦΑΛΟΣ – ΝΟΣΟΣ ALZHEIMER

Έχει βρεθεί ότι ο χαλκός συμβάλλει θετικά στην φυσιολογική λειτουργία του εγκεφάλου και στην ανάπτυξη του ενώ η μείωση του μπορεί να προκαλέσει διαταραχές στην μνήμη και στην σκέψη. Εκτός από την οξειδάση του κυτοχρώματος c είναι απαραίτητη για την παραγωγή ενέργειας στον εγκέφαλο, ο χαλκός χρησιμοποιείται από την ντοπαμίνη β μονοξυγενάση και από την πεπτιδυλτρανσφεράση α μονοξυγενάση οι οποίες και οι δύο είναι απαραίτητες για την βιοσύνθεση νευροδιαβιβαστών. Η διανομή του χαλκού εντός του εγκεφάλου γίνεται από την πρωτεΐνη ATP7B, η οποία σε περίπτωση μετάλλαξης οδηγεί σε σοβαρή ανεπάρκεια του χαλκού στον εγκέφαλο. Επίσης πολύ σημαντική για τη φυσιολογική λειτουργία του εγκεφάλου είναι και η βιοδιαθεσιμότητα του χαλκού καθώς οι χρόνιες υψηλές ή χαμηλές τιμές του οδηγούν σε σημαντικές ανωμαλίες όπως η νόσος Menkes και η νόσος Wilson. Στοιχεία έδειξαν ότι ακόμα και κάποιες ανεπαίσθητες αλλαγές

στην ομοιόσταση του χαλκού έχει σοβαρές συνέπειες στον εγκέφαλο. Ωστόσο απαιτείται περισσότερο έρευνα για να εξακριβωθούν οι ακριβείς μηχανισμοί αυτών των σχέσεων [24].

Οι έρευνες σχετικά με την ύπαρξη ή μη συσχέτισης του χαλκού με την νευροεκφυλιστική νόσο του Αλτσχάιμερ βρίσκονται ακόμα σε ερευνητικό επίπεδο. Αρκετές είναι οι πρωτεΐνες οι οποίες παίζουν ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του χαλκού. Η νόσος του Αλτσχάιμερ έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με τη συσσώρευση μιας πρωτεΐνης, της β-αμυλοειδούς (β-APP) στον εγκέφαλο η οποία επηρεάζει το μεταβολισμό του χαλκού. Στη νόσο του Αλτσχάιμερ τα επίπεδα ορού του χαλκού είναι αυξημένα αλλά δεν έχει προσδιοριστεί αν αυτή η αύξηση των επιπέδων οφείλεται στη παθογένεια της νόσου ή είναι αποτέλεσμα της. Είναι γνωστό ότι κατά τη γήρανση η λειτουργία του ήπατος είναι μειωμένη επομένως τα αυξημένα επίπεδα ορού του χαλκού ίσως προκύπτουν από την αδυναμία του ήπατος να απομακρύνει χαλκό [25]. Ωστόσο, κάποιοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι ο χαλκός βοηθάει στην προστασία του εγκεφάλου από την νόσο του Αλτσχάιμερ και συγκεκριμένα η Εταιρεία Νευροεκφυλιστικών Διαταραχών ανέπτυξε ένα πειραματικό φάρμακο (PBT2). Το φάρμακο αυτό βελτίωσε την αποκατάσταση της γνωστικής λειτουργίας (μνήμης και σκέψης) σε πάσχοντες από την νόσο Αλτσχάιμερ με τη δράση ενεργών μετάλλων συμπεριλαμβανομένου του χαλκού και του ψευδαργύρου σε νευρώνες του εγκεφάλου που έχουν πληγεί από την ασθένεια. Ακόμη βρέθηκε ότι οι μεταλλαγές της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) έχουν σημαντική επίδραση στον εκφυλισμό μηχανικών νευρώνων όπως αυτής στη νόσο του Αλτσχάιμερ.

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΧΑΛΚΟΥ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ – ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΩΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

Ακραία χαμηλές αλλά και υψηλές τιμές της συγκέντρωσης του χαλκού έχουν συνδεθεί με μια πληθώρα παθολογικών καταστάσεων οι οποίες μπορεί να αποβούν ακόμα και θανάσιμες. Ωστόσο, μέχρι και σήμερα, κανένας πλήρως πιστοποιημένος νευροτοξικός βιοδείκτης που να συνδέεται με την ανομοιοστασία του χαλκού δεν έχει οριστεί [26]. Η ακραία εκδήλωση τοξικότητας εξαιτίας του χαλκού είναι σχετικά εύκολο να εντοπιστεί λόγω των εμφανών κλινικών συμπτωμάτων που παρουσιάζει. Παρόλα αυτά είναι σχεδόν αδύνατο να αναγνωριστούν τα οριακά εκείνα πλεονασματικά επίπεδα συγκέντρωσης του χαλκού, καθώς και οι βιολογικές

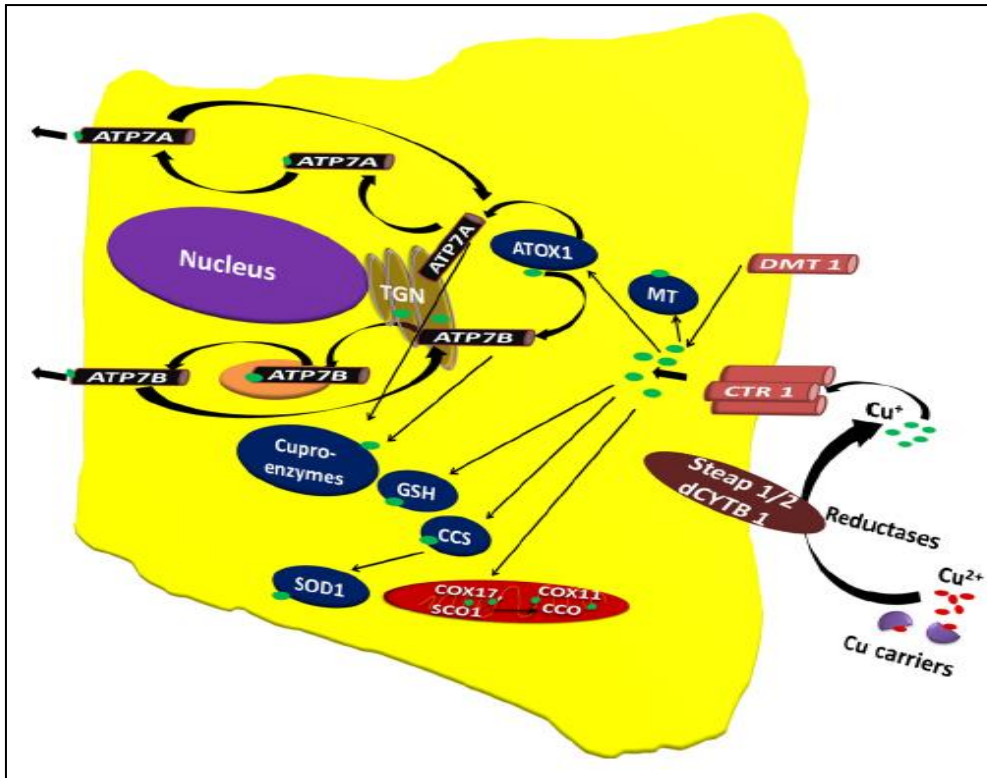
επιπτώσεις που πηγάζουν από την κατάσταση αυτή. Σύμφωνα με τους Brewer και Althaus (2008) δεν υπάρχει κάποιος τρόπος προς το παρόν να εκτιμηθεί αυτή η οριακή κατάσταση των συγκεντρώσεων του στοιχείου. Παρ' όλα αυτά, ο χαλκός που δεσμεύεται από τον ορρό του αίματος, ανεξάρτητα από την σερουλοπλασμίνη, (που μπορεί να χαρακτηρίσει και ως «ελεύθερος» χαλκός) μπορεί να αποτελέσει έναν δείκτη εκτίμησης σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως στην ασθένεια Wilson, όπου χρησιμοποιείται η «ελεύθερη» ποσότητα του χαλκού ως βιολογικός δείκτης, και ακολούθως για την νόσο του Alzheimer, όπου χρησιμοποιείται ο πλεονάζων «ελεύθερος» χαλκός. Στα πλαίσια αυτά, κρίνεται απαραίτητη η ανάπτυξη βιοδεικτών υψηλής ευαισθησίας προκειμένου να πραγματοποιείτε έγκαιρη και ακριβής ανίχνευση των μη φυσιολογικών τιμών του χαλκού.

Η ποσοτική εκτίμηση της συγκέντρωσης του χαλκού στο ήπαρ, μέσα από βιοψία του ίδιου του ιστού, θεωρείται ως η πιο καθιερωμένη τακτική για την επιβεβαίωση της ασθένειας του Wilson. Ωστόσο, η βιοψία του ήπατος κρίνεται δικαιολογημένη μόνο όταν υπάρχουν στιβαρές ενδείξεις καταστροφής και υπολειτουργίας του οργάνου λόγω υπερβολικής συσσώρευσης του μέταλλου. Τα επίπεδα σερουλοπλασμίνης αποτελούν τους πιο κοινούς εργαστηριακούς δείκτες για την ανίχνευση και την επίβλεψη των ασθενών από την νόσο του Wilson. Αξίζει να αναφερθεί ότι η ανάπτυξη κατάλληλων και αποτελεσματικών βιοδεικτών εξαρτάται άμεσα από το φύλο, την ηλικία, το ορμονικό προφίλ του ατόμου, την ύπαρξη φλεγμονής καθώς και από άλλους ποικίλους και ετερογενείς παράγοντες. Υψηλά επίπεδα διαιτητικού χαλκού δεν φαίνεται να επηρεάζουν τα επίπεδα της σερουλοπλασμίνης, τόσο στο επίπεδο της μεταγραφής του mRNA όσο και στο επίπεδο της πρωτεϊνοσύνθεσης. Αντίθετα, πρόσφατα δεδομένα αναφέρουν πως τα επίπεδα έκφρασης της σερουλοπλασμίνης αυξάνονται σε ποντικούς Wistar, στους οποίους προηγουμένως είχε χορηγηθεί χαλκός μέσω της τροφής [27]. Ωστόσο, καμιά άλλη σημαντική επίδραση πάνω στα επίπεδα mRNA της σερουλοπλασμίνης δεν παρατηρήθηκε στην εν λόγω μελέτη. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της σερουλοπλασμίνης είναι πως αν και περιέχει την επικρατέστερη μορφή του χαλκού στον ορό του αίματος, απουσία ή δυσλειτουργία του μορίου δεν οδηγεί σε μεταβολές της ομοιόστασης του στοιχείου, άλλα αντίθετα επιφέρει επιλεκτικά αποτελέσματα στην ομοιόσταση του σιδήρου. Οι δύο επικρατέστεροι τρόποι ανίχνευσης των επιπέδων της σερουλοπλασμίνης είναι α)

ενζυματικά (με χρήση της π-φαινυλενοδιαμίνης ή της ο-διυδροχλωρικής διανισιδίνης ως υπόστρωμα) και β) ανοσολογικά (με χρήση αντισωμάτων).

Επιπλέον, έγινε προσπάθεια συσχέτισης των επιπέδων του χαλκού στον ορό του αίματος με την εμφάνιση της νόσου Alzheimer. Έχει δειχθεί ότι τα ποσοστά «ελεύθερου» χαλκού αυξάνεται σε ασθενείς με την νόσο αυτή [28] καθώς και σε άτομα φορείς του γονιδίου ε4 [απολιποπρωτεΐνη E (APOE4)].

Η ομοιόσταση του χαλκού ασφαλώς εξαρτάται από μεταβολές τόσο στην απορροφητική ικανότητα όσο και στην χολική απέκκριση του χαλκού. Επιπρόσθετα, η συνθέτη αλληλεπίδραση ανάμεσα στις πρωτεΐνες συνόδους και άλλους μεταφορείς του χαλκού, και στις διαφορές πρωτεΐνες και ένζυμα που δεσμεύουν το στοιχείο αυτό, βοηθά στην διατήρηση της φυσιολογικής ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης του χαλκού. Η ακραία πρόσληψη χαλκού αποσταθεροποιεί αυτό το σύστημα, οδηγώντας στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες με αποτέλεσμα την κυτταρική καταστροφή. Η ποσοτικοποίηση των διαφόρων επιπέδων των πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον χαλκό σε επίπεδο πρωτεϊνών αλλά και mRNA, μαζί με την δραστηριότητα διαφόρων «χαλκοενζύμων», χρησιμοποιούνται σήμερα για τηναξιολόγησητουπλεονάζονταχαλκού στον άνθρωπο.

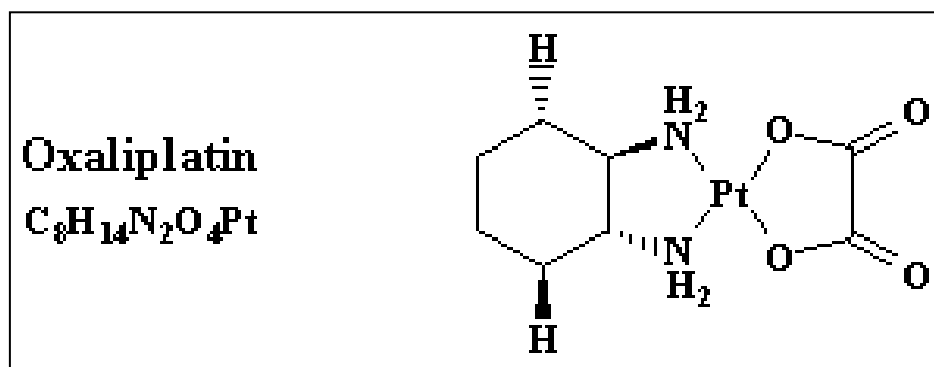


Εικόνα 8.3 Β Κατανομή και ομοίωση του χαλκού σε ένα γενικευμένο κύτταρο θηλαστικού. Στα εξωκυττάρια υγρά, ειδικοί μεταφορείς και ένζυμα ειδικά ως προς τον χαλκό συνδέονται με τον Cu(II) (κόκκινοι κύκλοι). Οι CTR1 και DMT1 είναι μεταφορείς του Cu(I) (πράσινοι κύκλοι) οι οποίοι εδράζονται στην κυτταρική μεμβράνη και μετά την αναγωγή του χαλκού από ρεδουκτάσες (dCYTB και STEAP 1\2) τον μεταφέρουν στο εσωτερικό του κυττάρου. Οι πρωτεΐνες CCS, ATOX1, Cox17, Cox 11 και Sco1 αποτελούν παραδείγματα μοριακών νταντάδων του χαλκού και η λειτουργία τους είναι η μεταφορά του χαλκού σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες και οργανίδια. Η δέσμευση και η αποθήκευση του χαλκού εξαρτάται από την μεταλλοθειονίνη (MT). Οι πρωτεΐνες ATP7A και ATP7B απαιτούνται για την μεταφορά του χαλκού στον αυλό του TGN (trans Golgi δίκτυο) με στόχο την ωρίμανση των εκκρινόμενων χαλκοενζύμων όπως είναι η σερουλοπλασμίνη (Cr), η ντοπαμίνη-β-υδροξυλάση και η πεπτιδογλυκάνη α-αμιδο μονοοξυγενάση. Οι μεταφορείς ATP7A/B μετατοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη από το TGN υπό συνθήκες ενδοκυτταρικής περίσσειας του χαλκού και συντελούν στην αποβολή του.

1.2.2 ΜΕΤΑΛΛΟΦΑΡΜΑΚΑ - ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

ΟΞΑΛΙΠΛΑΤΙΝΑ

Η οξαλιπλατίνα ανήκει στους αλκυλιωτικούς παράγοντες. Η ονομασία της κατά IUPAC είναι [(1*R*,2*R*)-cyclohexane-1,2-diamine](ethanedioato-*O,O'*)platinum(II) και το μοριακό της βάρος είναι 397,2858 gr/mol. Η ένωση αυτή διαθέτει ένα τετραγωνικό επίπεδο λευκόχρυσου (II) στο κέντρο. Σε αντίθεση με την *cis*-πλατίνη και την καρβοπλατίνη, η οξαλιπλατίνη διαθέτει το *trans*-1,2-διαμινοκυκλοεξάνιο στη θέση των δύο αμινικών μονοδοντικών υποκαταστατών. Διαθέτει επίσης μια ομάδα *trans*-οξαλικού.



Εικόνα 9.2A Σχηματική απεικόνιση της χημικής δομής του μορίου της οξαλιπλατίνας.

Η οξαλιπλατίνα αποτελεί φάρμακο (μεταλλοφάρμακο) τρίτης γενιάς το οποίο παράγεται με βάση την πλατίνα. Η χρήση της οξαλιπλατίνας στην αντιμετώπιση καρκινικών όγκων πραγματοποιείται τουλάχιστον τα τελευταία δέκα χρόνια. Παρόλα αυτά έχει σχετιστεί με διάφορες μορφές τοξικότητας. [29] και θα μπορούσε να κατηγοριοποιηθεί έμμεσα ως πιθανή μεταλλοτοξίνη. Όπως και η *cis*-πλατίνη έτσι και η οξαλιπλατίνα συνδέθηκε με την πρόκληση μιας ασυνήθιστης και πολύ έντονης και επώδυνης περιφερικής νευροπάθειας. Όπως και η *cis*-πλατίνη έτσι και η οξαλιπλατίνα συνδέθηκε με την πρόκληση μιας ασυνήθιστης και πολύ έντονης και επώδυνης περιφερικής νευροπάθειας [30].

Ο χρόνος ημιζωής της κυμαίνεται από 10-25 λεπτά ενώ στο ανθρώπινο σώμα είναι περίπου 14 λεπτά. Ο μικρός χρόνος ημιζωής σχετίζεται εν μέρη με την

αλληλεπίδραση της με το χλώριο, την γλουταθειόνη, την μεθειονίνη, και την κυστεΐνη σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις. Στο αίμα η συγκέντρωση της οξαλιπλατίνας είναι 3.6 μM δυο ώρες μετά την χορήγηση της με δεδομένο ότι η αρχική ποσότητα είναι 85 mg/m^2 .

Η αλληλεπίδραση συμπλοκών που περιέχουν ως βάση την πλατίνα, με βιομόρια που περιέχουν θείο έχει πολλές φορές ως αποτέλεσμα την εμφάνιση τοξικότητας του γαστρικού, των νεφρών, της καρδιάς, του ακουστικού και νευρικού συστήματος.

Η αντινεοπλασματική δράση της οξαλιπλατίνας οφείλεται στις κυτταροτοξικές της ιδιότητες. Τα φάρμακα αυτής της κατηγορίας δημιουργούν σύμπλοκα με το 1,2-διαμινοκυκλοεξανιο (DACH) και με μια οξαλική ομάδα. Τα ενυδατωμένα παράγωγα που προέρχονται από την βιομετατροπή της οξαλιπλατίνας αλληλεπιδρούν με το DNA σχηματίζοντας ένδο- και διακλονικές διασταυρούμενες γέφυρες, αναστέλλοντας με αυτό τον τρόπο την σύνθεση του DNA που έχει ως αποτέλεσμα την κυτταροτοξική και κατ'επέκταση την αντικαρκινική δράση. Η ανάπτυξη ωτοτοξικότητας έχει συνδεθεί με την χρήση άλλων συμπλόκων της πλατίνας όπως είναι η cis-πλατίνη και η οξαλιπλατίνα. Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι οι ενώσεις αυτές ενεργοποιούν τις κασπάσες 3 και 7 καθώς και άλλες μη αναγνωρισμένες πρωτεάσες που είναι ειδικές για την ακολουθία Asp-Glu-Val-Asp (δηλαδή DEVD). Πιο ειδικά, ανεπιθύμητες ενέργειες μπορεί να παρατηρηθούν σε τελείως διαφοροποιημένα κύτταρα όπως είναι αυτά του οργάνου του Corti. Πιθανός αιτιολογικός παράγοντας της ωτοτοξικότητας θεωρείται το οξειδωτικό στρες. Έχει δειχθεί ότι το σύστημα της θειορεδοξίνης (thioredoxin) που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αποτοξίνωση και στα συστήματα οξειδοαναγωγής του κυττάρου, μπορεί να δεχτεί ισχυρό πλήγμα εξαιτίας της ευαισθησίας που παρουσιάζουν οι ρεδοκτάσες του συστήματος σε ενώσεις όπως η οξαλιπλατίνη ή η cis-πλατίνη. Η αναστολή αυτών των ενζύμων οδηγεί σε τοξικότητα του κυττάρου [31].

Η χρήση ωστόσο της οξαλιπλατίνας ενέχεται και για νευροτοξικότητα. Τα χαρακτηριστικά της νευροτοξικότητας περιλαμβάνουν σπασμούς, μυοτονία αλλά και δεσμίδωση των μυών του σαγονιού και των άκρων. Τα συμπτώματα κάνουν την εμφάνιση τους έως και μερικές ώρες από την έκθεση του οργανισμού στα συγκεκριμένα φάρμακα. Οι εκδηλώσεις βέβαια αυτές δεν είναι τόσο συχνές. Έχουν όμως αναφερθεί και περιστατικά οξείας νευροτοξικότητας με συμπτώματα

παραισθήσεων, αίσθησης κρύου καθώς και μη αίσθησης του λαρυγγοφαρυγγικού συστήματος [32]. Το κεντρικό νευρικό σύστημα είναι σχετικά προστατευμένο από ενώσεις της πλατίνας καθώς υπάρχει χαμηλή διαπερατότητα εξαιτίας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Παρόλα αυτά έχουν καταγραφεί και τέτοια περιστατικά.

Η οξαλιπλατίνη είναι δυνατό να επηρεάσει τα κανάλια νατρίου και καλίου σε εύρος συγκεντρώσεων από 1-500μM. Ενώ είναι ιδιαίτερα πιθανό οι αρνητικές της επιπτώσεις να οφείλονται σε προϊόντα της βιομετατροπής της.

Υπάρχουν διάφορες μελέτες που υποστηρίζουν την συμμετοχή των τασεοελεγχόμενων ιοντικών καναλιών στην εμφάνιση νευροτοξικότητας. Ένας προτεινόμενος μηχανισμός για την εξήγηση ορισμένων επιπτώσεων σχετικά με την χορήγηση της συγκεκριμένης ουσίας είναι η χηλίωση του εξωκυττάριου ασβεστίου καθώς και η δέσμευση των ιοντικών καναλιών από προϊόντα του μεταβολισμού της οξαλιπλατίνας.

Η οξαλιπλατίνη λειτουργεί ως χηλική ένωση για το μαγνήσιο αλλά και το ασβέστιο. Σε γενικές γραμμές είναι αποδεκτό το γεγονός ότι η εξάρτηση των τασεοελεγχόμενων καναλιών από την συγκέντρωση των ιόντων μπορεί να μεταβάλλεται. Έχει προταθεί ότι η αίσθηση του διαμεμβρανικού ηλεκτρικού πεδίου πραγματοποιείται από τους αισθητήρες των καναλιών. Οι αισθητήρες αυτοί είναι πρωτεΐνες με μορφή θετικά φορτισμένης α έλικας η οποία αποκρίνεται σε μεταβολές του ηλεκτρικού πεδίου ανοίγοντας τελικά ή κλείνοντας αντίστοιχα το σημείο εισόδου του καναλιού. Τα μεταλλικά ιόντα μπορούν να μετατοπίσουν την τάση εξάρτησης των καναλιών. Μια αύξηση στη συγκέντρωση των θετικά φορτισμένων ιόντων έχει ως αποτέλεσμα την δυσχέρεια των θετικά φορτισμένων αισθητήρων των καναλιών να ανοίξουν εν τέλει τα κανάλια. Αντίστοιχα μείωση της συγκέντρωσης των θετικά φορτισμένων ιόντων διευκολύνει ουσιαστικά τον αισθητήρα των καναλιών να τα ανοίξει. Τέτοια μόρια με δυνατότητα μετατόπισης της τάσης είναι και τα πολυακόρεστα ελευθέρως λιπαρά οξέα. Επομένως τα αποτελέσματα που μπορεί να επιφέρει η οξαλιπλατίνη είναι δυνατό να αποδοθούν είτε έμμεσα μέσω χηλίωσης του εξωκυττάριου ασβεστίου είτε άμεσα μέσω πρόσδεσης των παραγώγων της βιομετατροπής της μετά από αλληλεπίδραση με το χλώριο στα ιοντικά κανάλια. Επιπλέον, η αλλαγή της αζονικής διεγερσιμότητας των νευρικών ινών οφείλεται σε μεταβολή των TEKNa [30] με τη

δράση της οξαλιπλατίνας να είναι δοσοεξαρτώμενη [30]. Οι Grolleau et al., (2001) [33] συνέδεσαν τη μεταβολή στα ΤΕΚΝα και τη μείωση του ύψους του ΣΔΕ που παρατηρήθηκε με το ασβέστιο το οποίο ενεργοποιείται από τον μεταβολίτη της οξαλιπλατίνας. Οι μεταβολές στο ύψος του ΣΔΕ στην εργασία των Adelsberger et al., 2000 συνδυάστηκε και με την αύξηση της ανερέθιστης περιόδου επιβεβαιώνοντας την επίδραση της οξαλιπλατίνας στα ΤΕΚΝα. Η οξαλιπλατίνα συγκρινόμενη με γνωστούς αναστολείς των ΤΕΚΚ είναι πιο δραστική προκαλώντας εμφάνιση δευτερευόντων εκπολώσεων και αύξηση της διάρκειας του ΣΔΕ κάτι που δεν παρατηρείται μετά από έκθεση του ισχιακού νεύρου του επίμυος σε 4-αμινοπυριδίνη και τετρααιθυλαμμώνιο [34].

Cis-πλατίνη

Το σύμπλοκο *cis*-διαμμινοδιχλωρολευκόχρυσος(II) είναι ευρύτερα γνωστό ως *cisplatin* ή *σισπλατίνη*. Παρασκευάστηκε για πρώτη φορά από τον M. Peyrone και είναι γνωστό ως άλας του Peyrone (Peyrone's salt) το 1845. Η δομή του μελετήθηκε και βρέθηκε ότι υπάρχει σε δύο δομές *cis*- και *trans*- από τον χημικό Alfred Werner το 1893. Η *σισπλατίνη* είναι από τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα και αποτελεσματικότερα κυτταροστατικά φάρμακα για τη θεραπεία πρώτης και δεύτερης γραμμής νεοπλασιών όπως του καρκίνου του πνεύμονα, του οισοφάγου, του στομάχου και του λοιπού γαστρεντερικού συστήματος, του μαστού, του μελανώματος, της κεφαλής και του τραχήλου, των ωθηκών, της ουροδόχου κύστεως και των όρχεων. Συνολικά, χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση πάνω από το 50% των περιστατικών νεοπλασίας στον άνθρωπο. Η έρευνα για τα σύμπλοκα λευκοχρύσου και άλλων ευγενών μετάλλων επικεντρώθηκε κατά τα τελευταία χρόνια κυρίως στο μηχανισμό με τον οποίο εισάγονται στο ζωντανό οργανισμό, διαχέονται στα διάφορα όργανα και δρουν σε συγκεκριμένες θέσεις της δομής των νουκλεϊνικών οξέων (DNA, RNA) προκαλώντας αναστολή της ανάπτυξης των κακοήθων κυττάρων. Συνήθως το ενέσιμο υλικό εισάγεται στην κοιλιακή χώρα και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος το φάρμακο κατευθύνεται στα διάφορα όργανα.

Πιστεύεται ότι η *σισπλατίνη* υδρολύεται σε δύο στάδια και μετά εισχωρεί σε προσιτές θέσεις του κυτταρικού DNA (υπάρχει και το μιτοχονδριακό DNA) και κυρίως σε θέσεις πλούσιες στις βάσεις γουανίνη (G) και αδενίνη (A), όπου πραγματοποιεί πυρηνόφιλες υποκαταστάσεις. Ο τρόπος αυτός δράσης κατατάσσει τη *σισπλατίνη*

στους δραστικούς αλκυλιωτικούς παράγοντες. Πρέπει να σημειωθεί ότι ουσίες με αυτές τις ιδιότητες είναι και καρκινογόνες ενώσεις.

Οι διάφορες μελέτες έδειξαν ότι η κυτταροστατική δράση της *cis*-πλατίνης οφείλεται στη δομή της, γιατί η *trans*-μορφή του συμπλόκου δεν παρουσιάζει αντικαρκινικές ιδιότητες. Οι προσπάθειες των επιστημόνων επικεντρώθηκαν στη διερεύνηση του τρόπου με τον οποίο ειδικές κυτταρικές πρωτεΐνες αναγνωρίζουν τα σύμπλοκα *cis*-πλατίνης-DNA. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών αυτών με τα σύμπλοκα οδηγεί σε προγραμματισμένο θάνατο (απόπτωση) των κακοήθων κυττάρων. Η *cis*-πλατίνη, ωστόσο, παρουσιάζει διάφορες παρενέργειες, όπως νεφροτοξικότητα, περιφερική νευροπάθεια, απώλεια ακοής, αλωπεκία (απώλεια των μαλλιών), εμετό και ναυτία και οστεομυελική αναστολή (καταστολή της ανάπτυξης του μυελού των οστών, λευκοπενία, θρομβοπενία). Για τον λόγο αυτό η *cis*-πλατίνη χορηγείται ταυτόχρονα με πολύ μεγάλη λήψη νερού από τον ασθενή και παράλληλα χορηγείται μαννιτόλη, που επιτείνει τη διέλευση υγρών από τα νεφρά βοηθώντας στην απαλλαγή του οργανισμού από αυτό το τοξικό φάρμακο.

Περιφερική νευροτοξικότητα και νευροπάθεια αποτελούν το πιο κοινό περιορισμό για την χορήγηση της *cis*-πλατίνης [35]. Ένας αριθμός παθοφυσιολογικών μηχανισμών έχουν προταθεί για να εξηγήσουν το φαινόμενο αυτό. Αρκετά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η *cis*-πλατίνη προσβάλλει τα κακοήθη κύτταρα και τους περιφερικούς νευρώνες μέσω ενός παρόμοιου μηχανισμού απόπτωσης. Περιφερική νευροτοξικότητα αναπτύσσεται σε περίπου 50% των ασθενών που έλαβαν *cis*-πλατίνη, αλλά η εμφάνιση της τοξικότητας καθυστερήσει μέχρι μία αθροιστική δόση υψηλότερη από 300 mg/m². Τα συμπτώματα της περιφερικής νευροτοξικότητας περιλαμβάνουν την απώλεια της αισθητικότητας, απώλεια της αίσθησης θέσης, μυρμήγκιασμα παραισθησία, αδυναμία, τρόμο και την απώλεια της γεύσης, τόσο στα άνω όσο και στα κάτω άκρα. Έχουν επίσης περιγραφεί επιληπτικές κρίσεις και λευκοεγκεφαλοπάθεια. Μετά τη διακοπή της θεραπείας, η νευρολογική δυσλειτουργία μπορεί να βελτιώσει σταδιακά, να διαρκέσει για μεγάλο χρονικό διάστημα, ή μπορεί να είναι και μόνιμη.

1.3 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ STRESS

Η αντιοξειδωτική κατάσταση στους έμβιους οργανισμούς χαρακτηρίζεται από την ισορροπία μεταξύ του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος και των προ-οξειδωτικών παραγόντων. Στον ανθρώπινο οργανισμό η ισορροπία αυτή συγκλίνει σε μικρό βαθμό προς οξειδωτικές διαδικασίες οι οποίες είναι απαραίτητες για την παραγωγή ενέργειας. Για το λόγο αυτό, ο οργανισμός έχει αναπτύξει μηχανισμούς επιδιόρθωσης οι οποίοι περιλαμβάνουν διάφορα ένζυμα όπως οι λιγάσες, νουκλεάσες, πολυμεράσες, πρωτεϊνάσες και φωσφολιπάσες. Η μεγαλύτερη του φυσιολογικού προτίμηση ως προς τις οξειδωτικές διεργασίες στον οργανισμό, αναφέρεται ως οξειδωτικό stress. Οι καταστροφικές συνέπειες της μη ελεγχόμενης οξείδωσης των βιομορίων προέρχεται κατά ένα μεγάλο μέρος από πού διεθνώς καλείται ενεργές μορφές οξυγόνου (reactiveoxygenspecies, ROS). Αν και τα ROS από εξωγενείς πηγές, όπως είναι η υπεριώδης ακτινοβολία ή η περιβαλλοντική μόλυνση μπορούν να επηρεάσουν δυσμενώς τα βιομόρια, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η μεγαλύτερη απειλή προέρχεται από την ενδογενή παραγωγή ROS. Ο όρος ROS χρησιμοποιείται για να καλύψει τα οξειδωτικά συμβάντα τα οποία οφείλονται τόσο σε ελεύθερες όσο και μη ελεύθερες ρίζες. Τα ROS των ελεύθερων ριζών είναι άτομα ή στοιχεία τα οποία περιέχουν ένα ή περισσότερα μη συζευγμένα ηλεκτρόνια στις εξωτερικές τους τροχιές. Ανάμεσα στα πλέον ισχυρά και ιδιαίτερα διαδεδομένα περιλαμβάνεται το υπεροξείδιο και το οξείδιο του υδροξυλίου και του νιτρικού [36].

Τα ελεύθερα αυτά οξειδωτικά προϊόντα όντας ασταθή διατηρούνται για εξαιρετικά μικρά χρονικά διαστήματα (μικρο- ή νάνο- δευτερόλεπτα) πριν από την πρόκληση αλυσιδωτών αντιδράσεων οδηγώντας έτσι στον σχηματισμό ακόμη πιο καταστρεπτικών στοιχείων. Οι κύριες μη ελεύθερες οξειδωτικές ουσίες είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το υποχλωρικό οξύ και το ελεύθερο οξυγόνο. Οι ουσίες αυτές μπορούν να διατηρηθούν περισσότερο χρονικά (μερικά λεπτά) όπως στην περίπτωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου προκαλώντας οξειδωτική καταστροφή σε βιομόρια.

Επιπρόσθετα, υπάρχουν και τα reactive nitrogen species (RNS) τα οποία προκαλούν ανάλογες νιτρικές επιδράσεις.

Αν και τα RNS δεν έχουν μελετηθεί όσο τα ROS, φαίνεται να μην παρουσιάζουν την ίδια σημαντικότητα στην πρόκληση καταστροφής σε σχέση με τα ROS. Αξίζει να αναφερθεί ότι δεν έχει όλη η παραγωγή ROS αρνητικές συνέπειες.

Περίπου το 10% των ROS που παράγεται σε ζωικά κύτταρα εντοπίζεται σε περιορισμένο περιβάλλον συνήθως από εξειδικευμένα ένζυμα όπως είναι οι οξειδάσες του NADPH και συνθετάσες του NO. Τα παραγόμενα ROS διοχετεύονται με τέτοιο τρόπο ώστε να χρησιμοποιηθούν σε σημαντικές για το κύτταρο λειτουργίες όπως είναι η κυτταρική σηματοδότηση, η ρύθμιση της χαλάρωσης των λείων μυϊκών ινών, η ρύθμιση της αιματικής ροής καθώς και των αμυντικών μηχανισμών του ανοσοποιητικού συστήματος.

Στα κύτταρα των ανώτερων οργανισμών η ενέργεια παράγεται υπό την μορφή ATP, το οποίο προέρχεται από τα μιτοχόνδρια μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (electrontransportchain, ETC). Ποσοστό μεγαλύτερο του 80% του συνολικού οξυγόνου που χρησιμοποιείται από τα κύτταρα καταναλώνεται από το ETC. Μια πληθώρα μελετών *invitro* δείχνουν ότι το 1-2% των μορίων του οξυγόνου που χρησιμοποιείται μπορεί να μετατραπεί σε ανιόντα υπεροξειδίου. Αν και *invivo* το ποσοστό αυτό είναι ακόμη μικρότερο (0,2%), τα ανιόντα αυτά συνιστούν ένα ιδιαίτερα σημαντικό ποσοστό.

Το οξειδωτικό stress προκύπτει εξαιτίας ενζυμικών και μη ενζυμικών διεργασιών όταν οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί αποτυγχάνουν να εξουδετερώσουν τα παραγόμενα ROS. Αποτέλεσμα αυτού του γεγονότος είναι η παραμονή αυτών των μορίων για χρονικό διάστημα τέτοιο που είναι ικανό να προκαλέσει περαιτέρω αντιδράσεις. Η έκταση αυτής της καταστροφής εξαρτάται από το πόσο επιρρεπή είναι τα διάφορα βιομόρια να ενωθούν με τα υπάρχοντα ROS. Γίνεται λοιπόν σαφές ότι υψηλά επίπεδα ROS δεν οδηγούν κατ' ανάγκη σε οξειδωτικό stress. Πρακτικά λοιπόν το οξειδωτικό stress μπορεί να αξιολογηθεί μετρώντας την απόσβεση ή την παρουσία αυξημένων επιπέδων ROS.

Πίνακας 5: Διάκριση ενεργών μορφών οξυγόνου

$O_2^{\cdot -}$	$ONOO^-$
$\cdot HO_2$	H_2O_2
$OH \cdot$	$ROOH$
$ROO \cdot$	
$NO \cdot$	
R	
$O \cdot$	

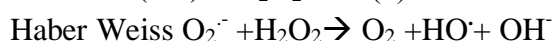
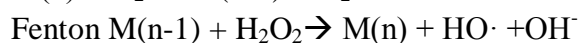
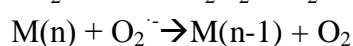
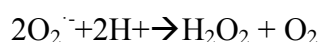
1.3.1 ΜΕΤΑΛΛΟ-ΕΠΑΓΟΜΕΝΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ STRESS

Η έκθεση σε βαρέα μέταλλα και μη είναι ένα συνηθισμένο φαινόμενο λόγω της μεγάλης διεισδυτικότητας τους στο περιβάλλον. Είναι ευρέως γνωστό ότι τα βαρέα μέταλλα προκαλούν τοξικότητα και ιδιαίτερα νευροτοξικότητα, γονιδιακή τοξικότητα και τοξικότητα που σχετίζεται με καρκίνο καθώς και πληθώρα παθολογικών καταστάσεων. Ο κύριος μηχανισμός πρόκλησης τοξικότητας για όλα αυτά τα μέταλλα είναι η παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου και αζώτου. Οι τοξικές εκδηλώσεις αυτών των μετάλλων προκαλούνται κυρίως λόγω της ανισορροπίας μεταξύ της προ-οξειδωτικής και αντιοξειδωτικής ομοιόστασης όπως ήδη έχει αναφερθεί. Τα μέταλλα αυτά έχουν μεγάλη τάση να προσδένονται σε θειολικές ομάδες που περιέχουν τα ένζυμα και οι πρωτεΐνες. Μεγάλη περίοδος έκθεσης σε αυτά τα μέταλλα μπορεί να προκαλέσει προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) ενώ πολλά μόρια σηματοδότησης επηρεάζονται όπως υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, μεταγραφικοί παράγοντες και πρωτεΐνες όπως οι MAP κινάσες και G πρωτεΐνες. Η πιο γνωστή **θεραπεία** ενάντια στην τοξικότητα αυτών των μετάλλων θεωρείται η χηλικοποίηση καθώς και η χρήση αντιοξειδωτικών μορίων που αποσβένουν ROS.

Τα βαρέα μέταλλα είναι φυσικά συστατικά όλων των οικοσυστημάτων και η παρουσία τους στο περιβάλλον προκύπτει ως αποτέλεσμα φυσικών διεργασιών όπως είναι η διάβρωση και η βακτηριακή δραστηριότητα αλλά και της ανθρώπινης δραστηριότητας όπως είναι οι βιομηχανικές και γεωργικές εργασίες. Ως βαρέα μέταλλα χαρακτηρίζονται όλα εκείνα τα μέταλλα με ατομικό αριθμό μεγαλύτερο του σιδήρου. Τις τελευταίες δεκαετίες ο όρος έχει συσχετισθεί με μια ομάδα μετάλλων τα οποία σχετίζονται με μόλυνση και δυνητική τοξικότητα. Τα βαρέα μέταλλα είναι φυσικά παρόντα στα πετρώματα και τα μεταλλεύματα και γι' αυτό εμφανίζονται πάντα στο έδαφος, τα ιζήματα, τα προϊόντα και σε ζωντανούς οργανισμούς. Η υπερβολική, ασυνήθιστη συγκέντρωση των βαρέων μετάλλων σε ιδιαίτερα μέσα οδηγεί σε μόλυνση. Τα μέταλλα σε αντίθεση με τις περισσότερες τοξικές οργανικές ενώσεις δεν αποικοδομούνται, και γι' αυτό συσσωρεύονται στο περιβάλλον. Τελικά, ένα μέρος αυτών καταλήγει με τη βιολογική τροφική αλυσίδα στον άνθρωπο αλλά και άλλους έμβιους οργανισμούς προκαλώντας χρόνιες ή οξείες βλάβες.

Τα βαρέα μέταλλα αποτελούν ιδιαίτερα σημαντική απειλή για τον άνθρωπο κυρίως εξαιτίας της ικανότητάς τους να βιοσυσσωρεύονται. Μέταλλα όπως ο χαλκός, ο σίδηρος, το νικέλιο και ο ψευδάργυρος είναι απαραίτητα για την διεκπεραίωση φυσιολογικών και βιοχημικών διεργασιών στον οργανισμό, τα μέταλλα αυτά καλούνται ενδογενή μέταλλα. Ωστόσο η παρουσία τους σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να θεωρηθεί τοξική. Μέταλλα όπως το αλουμίνιο, το κάδμιο και ο μόλυβδος θεωρούνται μη-απαραίτητα και είναι δυνατό να προκαλέσουν τοξικές αντιδράσεις ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις [37]. Τα όρια τοξικότητας των βαρέων μετάλλων διαφέρουν μεταξύ των οργανισμών καθώς αναπτύσσουν διαφορετική ανοχή. Τα βαρέα μέταλλα έχουν χαρακτηριστεί ως ιδιαίτερα τοξικά μόρια κυρίως λόγω της ικανότητάς τους να προκαλούν ή να συνεισφέρουν στην παραγωγή οξειδωτικού stress. Η πρόκληση οξειδωτικού stress έπεται από έκθεση σε βαρέα μέταλλα έχει παρατηρηθεί εξίσου σε ζωικού και φυτικού οργανισμού [37]. Διακρίνονται δύο μηχανισμοί με τους οποίους τα βαρέα μέταλλα μπορεί να προκαλέσουν οξειδωτικό stress και αυτοί είναι οι εξής:

- Άμεση εμπλοκή στην παραγωγή των ROS. Η διαδικασία αυτή αφορά σε μέταλλα τα οποία συμμετέχουν σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις οδηγώντας άμεσα σε παραγωγή ROS μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss. Τέτοια μέταλλα είναι ο χαλκός και ο σίδηρος.



- Έμμεση εμπλοκή στην παραγωγή ROS. τα μη οξειδοαναγωγικά μέταλλα όπως είναι το κάδμιο, ο μόλυβδος και ο ψευδάργυρος είναι δυνατό να προκαλέσουν την παραγωγή ROS έμμεσα κυρίως μέσω της αναστολής των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Τα μόρια που πλήττονται περισσότερο είναι αυτά που περιέχουν θείο (θειόλες) όπως η γλουταθειόνη η οποία αποτελεί και τον κύριο στόχο του Cd²⁺. Επιπλέον τα μέταλλα αυτά μπορούν να αντικαταστήσουν οξειδοαναγωγικώς ενεργά ιόντα μετάλλων σε πρωτεΐνες ή άλλα μόρια οδηγώντας τελικά στη μη φυσιολογική αύξηση της συγκέντρωσης αυτών.

Και στις δύο περιπτώσεις τα βαρέα μέταλλα είναι δυνατό να επάγουν την αύξηση της παραγωγής των ROS όπως είναι η υδροξυλική ρίζα (HO.) και το σουπεροξείδιο (O₂.). Το σουπεροξείδιο με την σειρά του μπορεί να αντιδράσει με άλλες ελεύθερες ρίζες όπως είναι το NO με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενεργών μορφών αζώτου ή να σχηματίσει εν τέλει H₂O₂ με την δράση της σουπεροξειδικής δισμουτάσης.

1.3.2 ANΤΙΟΞΕΙΔΩΣΗ

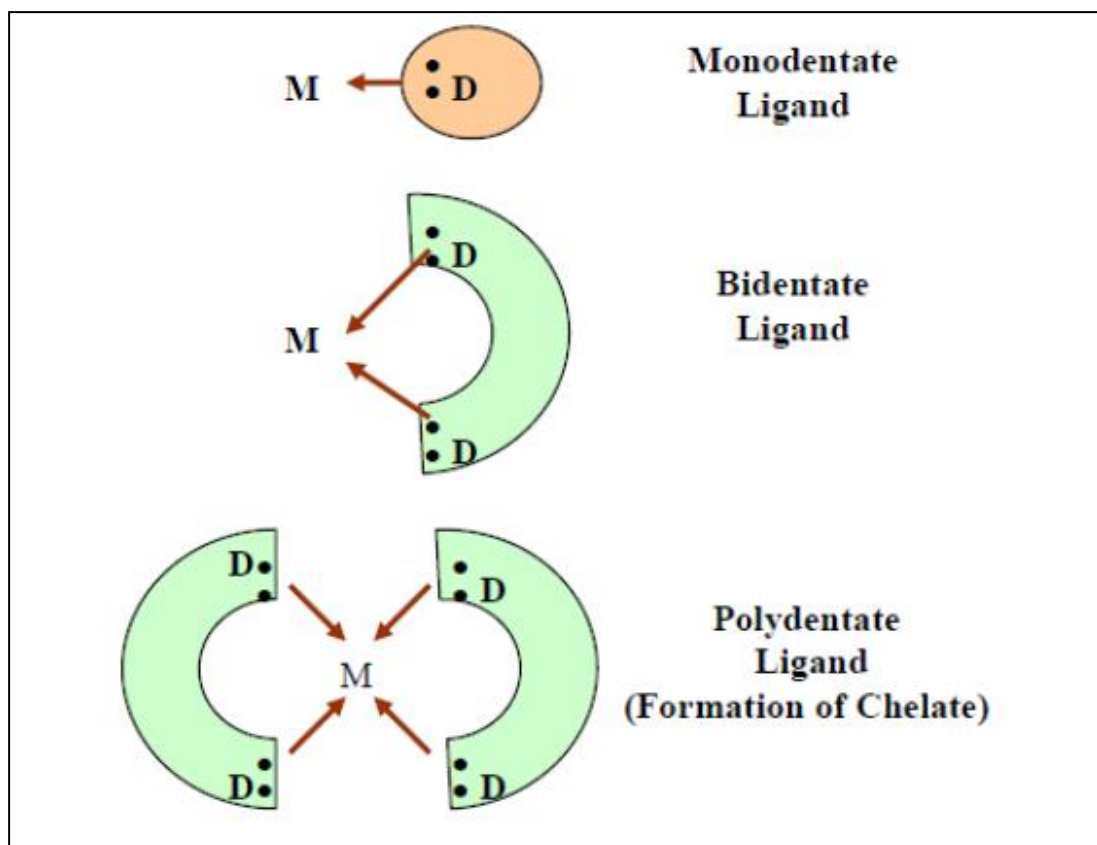
Ως αντιοξειδωτικό αναφέρεται κάθε ένωση η οποία εμποδίζει ή καθυστερεί μια διαδικασία οξείδωσης. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι η ένωση αυτή εμποδίζει το σχηματισμό των ROS ή απενεργοποιεί τις ήδη σχηματισμένες ελεύθερες ρίζες. Τα αντιοξειδωτικά κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με την προέλευσή τους. Στα φυσικά και στα συνθετικά αντιοξειδωτικά. Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά είναι συχνά ενώσεις φαινολικής φύσης τα οποία περιέχουν στο μόριό τους διάφορους αλκυλο υποκαταστάτες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα συνθετικών αντιοξειδωτικών είναι τα 2,6-δι-^t-βουτυλ-4-μεθυλο-φαινόλη (BHT), 2- ή 3-^t-βουτυλ-4-υδροξυ-ανισόλη (BHA), γαλλικός προπυλεστέρας (propylgallate) και ^t-βουτυλ-υδροξυ-κινόνη (TBHQ). Τα φυσικά αντιοξειδωτικά είναι συνήθως φαινολικές ενώσεις, κινόνες ή λακτόνες καθώς και πολυφαινόλες. Ο μηχανισμός αντιοξειδωτικής δράσης των συνθετικών αντιοξειδωτικών είναι γνωστός. Για τα φυσικά αντιοξειδωτικά ωστόσο, ο μηχανισμός δράσης τους είναι γνωστός μόνο για ορισμένες τάξεις ενώσεων όπως οι τοκοφερόλες και τα καροτενοειδή.

Οι κύριοι μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης είναι τρεις: α) η διακοπή της αλυσιδωτής αντίδρασης ελευθέρων ριζών μέσω απενεργοποίησης των σχηματιζόμενων ριζών, β) ο μηχανισμός αποτροπής της οξείδωσης μέσω χηλικοποίησης των μεταλλικών καταλυτών της αντίδρασης και γ) η καταστολή του οξυγόνου απλής κατάστασης. Ο μηχανισμός διακοπής της αλυσιδωτής αντίδρασης ελευθέρων ριζών περιλαμβάνει δύο υποκατηγορίες μηχανισμών. Ο πρώτος αφορά τα αντιοξειδωτικά τα οποία δρουν ως δότες ηλεκτρονίων, ενώ ο δεύτερος αφορά τα αντιοξειδωτικά τα οποία δρουν ως δέκτες ηλεκτρονίων. Και οι δύο μηχανισμοί βρίσκουν άμεση εφαρμογή στην οξείδωση των λιπιδίων.

1.3.3 ΧΗΛΙΚΟΠΟΙΗΣΗ

Αν και η έννοια της χηλικοποίησης βασίζεται στην απλή χημική ιδιότητα της συναρμογής, η εύρεση ενός ιδανικού χηλικοποιητή και η ανάπτυξη αποτελεσματικής θεραπείας χηλικοποίησης για την απομάκρυνση τοξικών μετάλλων από το επιθυμητό σημείο στον οργανισμό απαιτεί μια πιο ολοκληρωμένη προσέγγιση σχεδιασμού φαρμάκων. Τα χηλικοποιητικά μόρια κατηγοριοποιούνται σε οργανικές και ανόργανες ενώσεις οι οποίες είναι ικανές να δεσμεύουν μεταλλικά ιόντα προς

σχηματισμό συμπλόκων, συνήθως με μορφή δακτυλίου. Οι χηλιοποιητικοί παράγοντες στο σημείο του προσδέτη έχουν άτομα τα οποία σχηματίζουν δύο ή ένα ομοιοπολικό δεσμό και one co-ordinate or two co-ordinate linkages στην περίπτωση που αυτοί είναι δισχιδείς. Τα άτομα που λειτουργούν συνήθως ως ‘συνδετήρες’ είναι το S, N και O σχηματίζοντας χημικές ομάδες όπως είναι οι: $-SH$, $-S-S$, $-NH_2$, $=NH$, $-OH$, $-OPO_3H$, ή $>C=O$. Οι δισχιδείς ή πολυσχιδείς υποκαταστάτες σχηματίζουν δομές δακτυλίου οι οποίοι περιλαμβάνουν το μεταλλικό ιόν καθώς και τα δύο άτομα-συνδετήρες που συνδέονται στο ιόν. Πολλά μόρια δότες δρουν ως συνδέτες διπλή συναρμογής. Οι πενταμελείς χηλιοποιητικοί δακτύλιοι είναι ιδιαίτερα σταθεροί και συνήθως σχηματίζονται από προσδέτες των οποίων ο σκελετός είναι της μορφής $Y-CH_2-CH_2-Y$, $Y-CO-CH_2-Y$ (όπου Y υποδηλώνει OR, NR_2 , O, S, NR). Υπάρχουν επίσης παραδείγματα ανόργανων χηλιοποιητικών μορίων τα οποία σχηματίζουν πενταμελείς δακτυλίους με τα μεταλλικά ιόντα. Άλλοι τύποι υποκαταστατών όπως είναι το $EDTA^{4-}$ μπορεί να σχηματίζουν εξαμελείς δακτυλίους.



Εικόνα 10.3.Α: Ενδεικτική σχηματική απεικόνιση μονο- δι- και πολυ-δοντικού υποκαταστάτη.

Η σταθερά συναρμογής ενός συμπλόκου μπορεί να εκφραστεί ποσοτικά με τιμές εξισώσεων ισορροπίας οι οποίες εξαρτώνται από την ατομική δομή των μετάλλων

που χηλικοποιούνται. Ως παράδειγμα στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται οι σταθερές συναρμογής που εμφανίζει το χηλικοποιητικό μόριο EDTA με τα διάφορα μέταλλα και που αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας.

Metal	Na	Li	Ba	Sr	Mg	Ca	Mn	Fe	Co	Zn	Cd	Pb	Ni
K	1.7	2.8	7.8	8.6	8.7	10.6	13.4	14.4	16.1	16.1	16.4	18.3	18.4

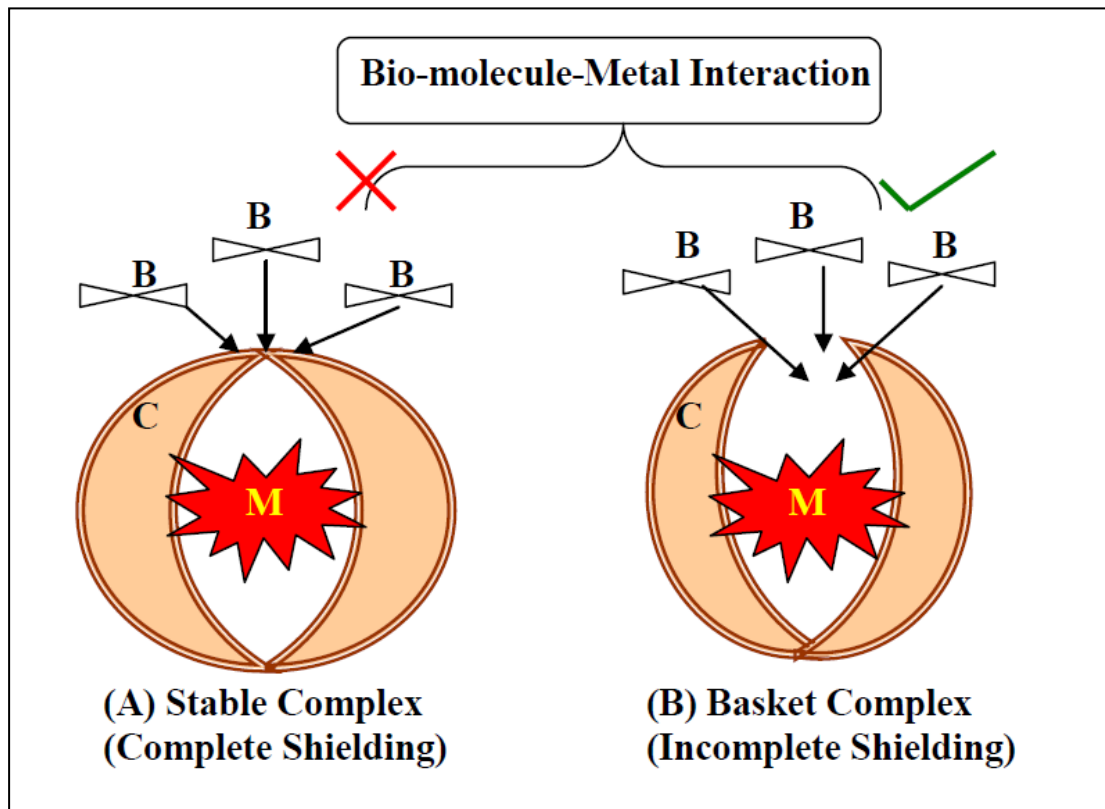
(log)

Πρέπει να αναφερθεί ότι ένα μέταλλο με μεγαλύτερη σταθερά συναρμογής ανταγωνίζεται, για την σύνδεση του με τον χηλικοποιητικό παράγοντα, με ένα μέταλλο μικρότερης σταθεράς συναρμογής απομακρύνοντας εν τέλει το τελευταίο. Ωστόσο και άλλες παράμετροι, όπως ο αριθμός των ετεροκυκλικών δακτυλίων που σχηματίζονται καθώς και η σχετική συγκέντρωση των μετάλλων διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως προς την εκλεκτικότητα της σύνδεσης. Για τον λόγω αυτό το ιοντικό ασβέστιο το οποίο είναι ευκολότερα διαθέσιμο στον οργανισμό συνδέεται επιλεκτικά με το Na_2EDTA παρά την μεγαλύτερη σταθερά σύνδεσης που εμφανίζει ο Pb. Επιπλέον, η προβλεψιμότητα της έκβασης της χηλικοποίησης είναι περιορισμένη. Μια χημική ένωση η οποία πληροί της προϋποθέσεις ενός ιδανικού χηλικοποιητή *in vitro* δεν θα μπορούσε να χαρακτηριστεί το ίδιο και *in vivo* καθώς η απαιτούμενη σχετική της συγκέντρωση μπορεί να αποβεί τοξική λόγω της παρουσίας ενδογενών ουσιών όπως είναι αιμοσφαιρίνη και το κυτόχρωμα τα οποία συμπεριφέρονται επίσης χηλικοποιητικά και έτσι να ανταγωνίζονται για της θέσεις σύνδεσης. Ένας άλλος παράγοντας, ο οποίος είναι ιδιαίτερα σημαντικός για τον σχηματισμό του συμπλόκου αλλά και την σταθερότητα αυτού, είναι το pH. Οι περισσότεροι παράγοντες συμπλοκοποίησης είναι ασταθής σε χαμηλές τιμές pH ενώ σε υψηλό pH τα μέταλλα τείνουν να σχηματίζουν αδιάλυτα υδροξείδια τα οποία είναι λιγότερο 'προσιτά' στους χηλικοποιητικούς παράγοντες. Το χαρακτηριστικό αυτό γίνεται ιδιαίτερα εμφανές σε παθολογικές καταστάσεις οι οποίες οδηγούν σε αλκάλωση ή οξέωση.

Συνεπώς, είναι ιδιαίτερα σημαντικό ένας χηλικοποιητής να ικανοποιεί ορισμένα κριτήρια επιτρέποντάς του α) την μεταφορά του στα σημεία συσσώρευσης του μετάλλου διαπερνώντας τα φυσιολογικά εμπόδια των βιολογικών συστημάτων, β) τον σχηματισμό σταθερού συμπλόκου με το μέταλλο και μάλιστα ισχυρότερο από τον προσδέτη του στο σημείο συσσώρευσης και γ) τον σχηματισμό μη τοξικού

συμπλόκου του οποίου οι ιδιότητες διευκολύνουν την έκκρισή του όχι μόνο από το σημείο εναπόθεσης αλλά και από τον οργανισμό.

Ένας ιδανικός χηλικοποιητής θα πρέπει να έχει υψηλή διαλυτότητα στο νερό, αντοχή σε οποιαδήποτε βιομετατροπή, την ικανότητα να φθάνει σε θέσεις αποθήκευσης του μετάλλου, να διατηρεί την ικανότητα συμπλοκοποίησης στο pH των υγρών του σώματος και τέλος την ικανότητα να σχηματίζει μεταλλικά σύμπλοκα τα οποία είναι λιγότερο τοξικά από την ελεύθερη μορφή του μεταλλικού ιόντος.



Εικόνα 1.3.3B: Σχηματική απεικόνιση δύο διαφορετικών συμπλόκων μετάλλων-χηλικοποιητικών παραγόντων. Στο σχήμα A το σύμπλοκο που σχηματίζεται είναι σταθερό αποτρέποντας έτσι το μέταλλο να αλληλεπιδράσει με βιομόρια, ενώ στο σχήμα B η αλληλεπίδραση επιτρέπεται λόγω ατελούς συμπλοκοποίησης. Με B συμβολίζεται το βιομόριο, με C το χηλικοποιητικό μόριο και με M το μέταλλο.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ANATOMIA

Για την λήψη του βιολογικού ιστού χρησιμοποιήθηκαν επίμυες του γένους *Rattusnorvegicus* (*Wistar*) αρσενικού και θηλυκού φύλου. Το βάρος των ζώων κυμαίνεται από 250-350 γραμμάρια. Επιπλέον, για την πραγματοποίηση των πρωτογενών κυτταρικών καλλιεργειών υποκαμψιαίου ιστού χρησιμοποιήθηκαν νεογνά ζώα του ίδιου είδους ηλικίας 2-3 ημερών. Οι επίμυες διατηρούνται σε συνθήκες οι οποίες προβλέπονται από τους κανόνες της Κτηνιατρικής υπηρεσίας (No 13/4712-29.04.2010) Πριν από την έναρξη κάθε πειραματικής διαδικασίας οι επίμυες αρχικά αναισθητοποιούνται με χρήση διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) και στην συνέχεια πραγματοποιείται εξάρθρωση του αυχένα για την θανάτωσή τους. Η παραπάνω διαδικασία υπόκειται στους κανόνες της Κτηνιατρικής υπηρεσίας και είναι σύμφωνη με τη νομοθεσία της Ευρωπαϊκής ένωσης.

2.1.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΙΣΧΙΑΚΟΥ ΝΕΥΡΟΥ

Αρχικά, αφαιρείται το τρίχωμα και το δέρμα του ζώου από την ραχιαία πλευρά έως και τα δύο κάτω άκρα προκειμένου να αποκαλυφθούν οι μύες των ποδιών οι οποίοι αντιστοιχούν στους: δικέφαλο και τετρακέφαλο μηριαίο και της ράχης, τον γλουτιαίο και τον πλατύ ραχιαίο. Ακολούθως, πραγματοποιείται αφαίρεση του συνδετικού ιστού στην μηριαία περιοχή ώστε να αποκαλυφθεί το ισχιακό νεύρο. Το ισχιακό νεύρο λαμβάνεται από την περιοχή έκφυσης στην σπονδυλική στήλη μέχρι και την άρθρωση του γονάτου όπου και διακλαδίζεται. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται και στα δύο άκρα και έτσι από κάθε ζώο απομονώνονται δύο ισχιακά νεύρα. Καθ' όλη την διάρκεια της ανατομίας αλλά και μετά την λήψη του ισχιακού νεύρου, ο ιστός βρίσκεται σε φυσιολογικό οξυγονωμένο ορό κατάλληλης σύστασης για τους επίμυες σε θερμοκρασία δωματίου. Η σύσταση του ορού είναι η εξής: 136 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.4 mM CaCl₂, 11.1 mM γλυκόζης, 1 mM NaHCO₃, 1.1 mM MgCl₂ και 10 mM HEPES. Το pH του ορού ρυθμίζεται με διαλύματα NaOH και HCl στην τιμή 7.3 ενώ η θερμοκρασία του είναι 25±1°C (θερμοκρασία δωματίου). Ο ορός που

χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα οξυγονώθηκε με 100% οξυγόνο για 20-25 λεπτά. Στη συνέχεια γίνεται καθαρισμός από προσκείμενους ιστούς και αιμοφόρα αγγεία που μπορεί να λαμβάνονται παράλληλα με την απομόνωση του ισχιακού νεύρου. Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία προϋποθέτουν την παρουσία ή απουσία του επινευρίου. Η αφαίρεση του επινευρίου από το ισχιακό νεύρο πραγματοποιείται με την χρήση ειδικών μικροεργαλείων (λαβίδα, ψαλίδι) κάτω από στερεοσκόπιο εφαρμόζοντας την λιγότερο δυνατή τάση καθώς και επαφή με τις νευρικές ίνες προκειμένου να αποφευχθεί ο τραυματισμός του υπό μελέτη ιστού.

2.1.2 ΛΗΨΗ ΙΠΠΟΚΑΜΠΙΑΙΟΥ ΙΣΤΟΥ

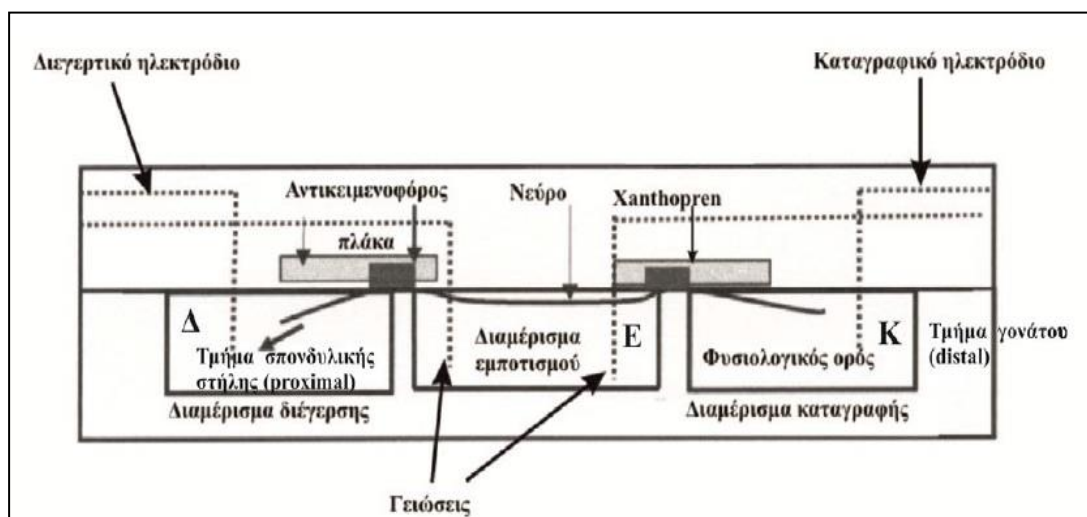
Για την λήψη του ιπποκαμπιαίου ιστού, χρησιμοποιήθηκαν νεογνά επίμυων ηλικίας 2-3 ημερών. Η διαδικασία απομόνωσης του ιστού πραγματοποιείται στο εσωτερικού UV απαγωγού στρωτής ροής αέρα για αποφυγή επιμόλυνσης του ιστού. Το κάθε ζώο τοποθετείται ξεχωριστά πάνω σε διηθητικό φίλτρο το οποίο προηγουμένως έχει αποστειρωθεί με 90% αιθανόλη. Αρχικά, αφαιρείται το τμήμα του κρανίου με νυστέρι ενώ στη συνέχεια αφαιρείται το δέρμα του κρανίου με επιμήκη τομή από την ρινική περιοχή μέχρι και την αυχενική αποκαλύπτοντας του υποκείμενο κρανίο. Ακολουθούν τομές κατά μήκος του πρόσθιου-οπίσθιου άξονα του κρανίου ώστε το κρανίο να διαιρεθεί σε δύο τμήματα. Επιπλέον, πραγματοποιείται μία τρίτη και μία τέταρτη τομή κατά μήκος της ραφής του κρανίου επιτρέποντας την αναδίπλωση των σκληρών ιστίων προς τα πίσω καθιστώντας δυνατή την πρόσβαση στον εγκέφαλο του ζώου. Ο νωτιαίος μυελός και ο οσφρητικός βολβός αποκόπτονται από την κοιλιακή πλευρά του εγκεφάλου με τέτοιο τρόπο ώστε ο εγκέφαλος να μπορεί να απομακρυνθεί με την βοήθεια μικρής σπάτουλας διατηρώντας παράλληλα την δομή του. Η ανατομία του εγκεφάλου πραγματοποιείται με διαίρεση της μέσης σχισμής διαχωρίζοντας έτσι πλήρως τα δύο εγκεφαλικά ημισφαίρια ώστε να αποκαλυφθεί ο ιππόκαμπος σε κάθε ημισφαίριο αντίστοιχα. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται τομές στο πρόσθιο και οπίσθιο άκρο κάθε ιπποκάμπου με την χρήση σπάτουλας και διατηρώντας ανέπαφο το σύνολο του επιθυμητού ιστού. Καθ'όλη την διάρκεια της ανατομίας οι ιστοί διαβρέχονται με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (HepesBufferSaline) η σύσταση του οποίου είναι 130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES και 25 mM γλυκόζης. Ο απομονωμένος

πλέον ιπποκαμπιαίος ιστός μεταφέρεται σε ρυθμιστικό διάλυμα (HBS) το οποίο βρίσκεται σε πάγο. Με την ολοκλήρωση της μακρο-ανατομίας ακολουθεί αφαίρεση τυχόν πλεονάζοντος ιστού καθώς και των αιμοφόρων αγγείων κάτω από στερεοσκόπιο με την βοήθεια μικροεργαλείων (νυστέρι, λαβίδα) διασφαλίζοντας έτσι την λήψη μόνο ιπποκαμπιαίων κυττάρων προς ανάπτυξη πρωτογενούς καλλιέργειας.

2.2. ΗΛΕΚΤΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΓΡΑΦΕΣ (*ex vivo*)

Τα απομονωμένα πλέον ισχιακά νεύρα τοποθετούνται σε κατάλληλα διαμορφωμένο τρίχωρο θάλαμο καταγραφής. Ο θάλαμος αυτός αποτελείται από Plexiglas και η χρήση του είναι γνωστή και από άλλες εργασίες με στόχο την *ex vivo* αξιολόγηση της νευροτοξικής δράσης διαφόρων ενώσεων στο απομονωμένο ισχιακό νεύρο των θηλαστικών και των αμφιβίων [34,38]. Ο τρίχωρος αυτός θάλαμος καταγραφής αποτελείται από τρία διαμερίσματα. Τα διαμερίσματα αυτά αντιστοιχούν στο διαμέρισμα διέγερσης (Δ), το κεντρικό διαμέρισμα (Ε) το οποίο είναι και το διαμέρισμα εμποτισμού καθώς και το διαμέρισμα καταγραφής (Κ). Στο διαμέρισμα διέγερσης τοποθετείται το άκρο του νεύρου το οποίο αντιστοιχεί το σημείο έκφυσης από την σπονδυλική στήλη (proximal) και εκεί επίσης τοποθετείται το ηλεκτρόδιο διέγερσης. Στο κεντρικό διαμέρισμα του θαλάμου τοποθετείται η μεγαλύτερη μάζα του ισχιακού νεύρου που αντιστοιχεί περίπου στο 80% του ιστού καθώς και οι γειώσεις του συστήματος. Στο κεντρικό διαμέρισμα προστίθεται και η υπό μελέτη ένωση ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες που εφαρμόζονται κάθε φορά. Στο τρίτο διαμέρισμα, αυτό της καταγραφής, τοποθετείται το άκρο του ισχιακού που προέρχεται από την κλείδωση του γονάτου (distal) καθώς και το ηλεκτρόδιο καταγραφής. Το καταγραφικό ηλεκτρόδιο συνδέεται με τον ενισχυτή. Ο κάθε θάλαμος περιέχει τον συνδυασμό των τριών διαμερισμάτων σε δύο επαναλήψεις. Οι διαστάσεις του κάθε διαμερίσματος είναι 20 mm μήκος, 35 mm πλάτος και 8 mm ύψος με το κάθε διαμέρισμα να έχει χωρητικότητα περίπου 10-12 ml. Τα τοιχώματα που διαχωρίζουν τα διαμερίσματα του θαλάμου έχουν πάχος 4 mm. Η τοποθέτηση του νεύρου γίνεται κατά μήκος των τριών διαμερισμάτων και στερεώνεται σε ειδικές εγκοπές στα διαχωριστικά τοιχώματα. Η πλήρης στερέωση του νεύρου στην συγκεκριμένη θέση γίνεται με την χρήση οδοντιατρικής πάστας που ονομάζεται Xanthopren (Heraeus Kulzer, Germany) και την επικάλυψη από αντικειμενοφόρο

πλάκα. Συγκριτικά με άλλες πάστες, η πάστα Xanthopren έχει την ελάχιστη τοξική δράση στον νευρικό ιστό [39]. Επιπλέον, ο ρόλος της πάστας εκτός από την στερέωση του νεύρου είναι και μονωτικός καθώς με τον τρόπο αυτό αποκλείεται η οποιαδήποτε εισροή ή εκροή ορού από το ένα διαμέρισμα στο άλλο. Μετά την σταθεροποίηση της πάστας ακολουθεί τοποθέτηση των αντίστοιχων ηλεκτροδίων στις θέσεις που περιγράφηκαν και προηγουμένως. Τα ηλεκτρόδια στην παρούσα εργασία αρχικά ήταν φτιαγμένα από άργυρο. Ωστόσο στα πλαίσια βελτίωσης του συστήματος τα ηλεκτρόδια αντικαταστάθηκαν από ηλεκτρόδια χρυσού 24 καρατίων. Το σύνολο των πειραμάτων της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία δωματίου 25°C γεγονός που επιτυγχάνεται με χρήση κυκλοφορητή για την συνεχή ροή νερού διαμέσου του θαλάμου και κάτω από τα διαμερίσματα όπου βρίσκεται το νεύρο. Τέλος, και τα τρία διαμερίσματα πληρούνται με οξυγονωμένο φυσιολογικό ορό υπό συνεχή ανάδευση.



Εικόνα 2.2.Α: Σχηματική απεικόνιση του κατάλληλα διαμορφωμένου τριχώρου θαλάμου καταγραφής όπου υποδεικνύονται τα τρία διαμερίσματα: Το διαμέρισμα διέγερσης (Δ), το κεντρικό διαμέρισμα εμποτισμού (E) και το διαμέρισμα καταγραφής (K). Επιπλέον, στο σχήμα φαίνονται τα διεγερτικά και καταγραφικά ηλεκτρόδια, το απομονωμένο ισχιακό νεύρο και οι πλάκες κάλυψης με την οδοντιατρική πάστα.

Για την αξιολόγηση της φυσιολογικής δραστηριότητας των νευρικών αξόνων (ινών) του ισχιακού νεύρου χρησιμοποιήθηκε σαν μετρήσιμη ένδειξη το σύνθετο δυναμικό ενέργειας (ΣΔΕ). Η μέθοδος βασίζεται στην καταγραφή της διαφοράς δυναμικού που

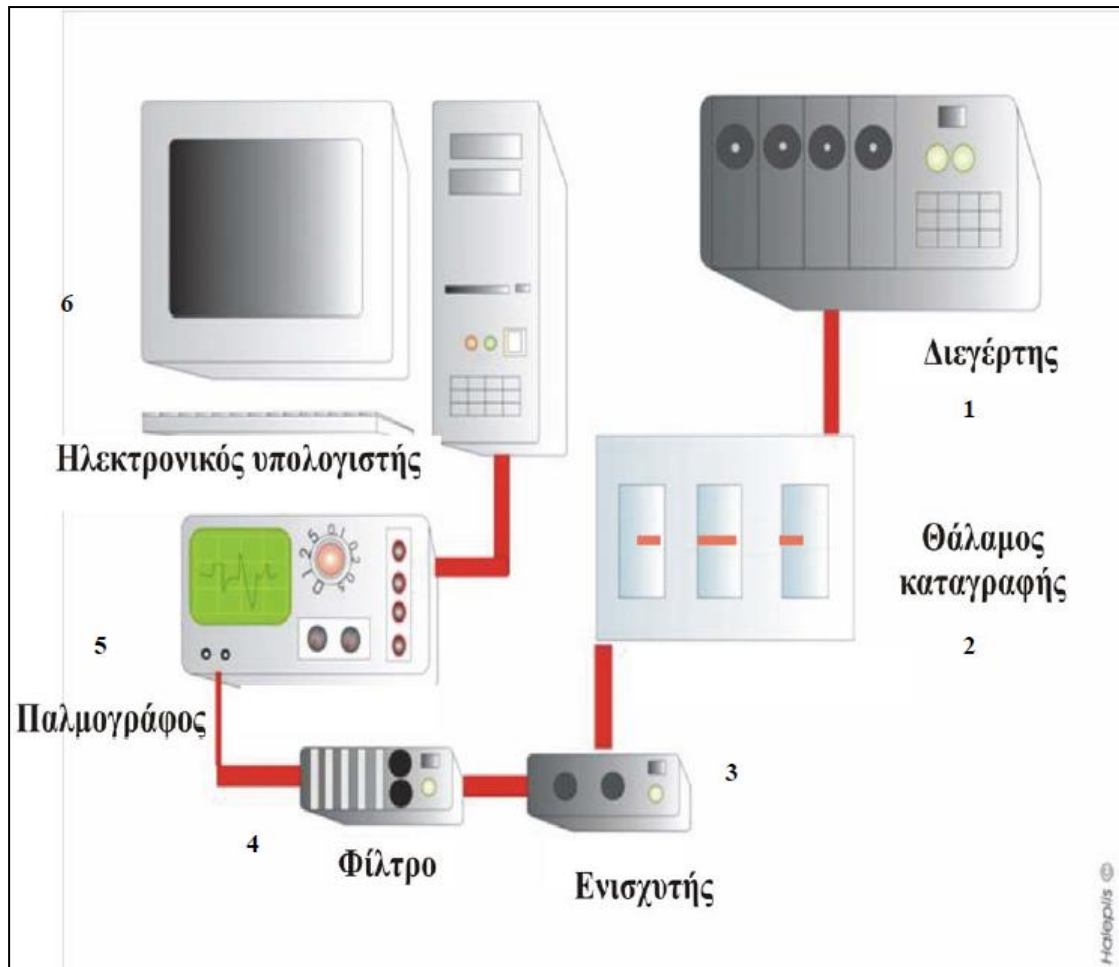
δημιουργείται από την μετακίνηση των ιόντων εκατέρωθεν της μεμβράνης. Η καταγραφή της διαφοράς δυναμικού επιτυγχάνεται από τα δύο ηλεκτρόδια κατά μήκος του ισχιακού νεύρου.

Με βάση τις ηλεκτροφυσιολογικές μεθόδους που εφαρμόζονται, το ΣΔΕ χρησιμοποιήθηκε ως ένδειξη της βιωσιμότητας καθώς και της φυσιολογικής λειτουργίας των περιφερικών νευρικών ινών. Για τον έλεγχο της βιωσιμότητας αλλά και της λειτουργικότητας των νευρικών ινών, ο ιστός διεγείρεται συνεχώς σε όλη την πειραματική διαδικασία με την μέγιστη τάση διέγερσης. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιείται ειδική διάταξη διέγερσης. Ο διεγέρτης είναι συνεχούς και σταθερής τάσης (Digitimer DS9A, England, UK) και το ερέθισμα που προκαλεί αντιστοιχεί σε σταθερό δυναμικό ύψους 4-5V με διάρκεια 0,01ms ενώ η συχνότητα του ερεθίσματος μπορεί να μεταβάλλεται (1, 10, 100Hz) ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες. Το σήμα που λαμβάνεται από τα καταγραφικά ηλεκτρόδια, αρχικά περνά από τον ενισχυτή της διάταξης (Neurolog NL822, Digitimer, England, UK) και στη συνέχεια εμφανίζεται σε παλμογράφο (Hameg 205). Το σήμα ψηφιοποιείται και καταγράφεται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με την χρήση δύο λογισμικών τα οποία είναι τα HAMEG και Labview 5.1.

Για την αξιολόγηση της νευροτοξικής δράσης χημικών παραγόντων καθώς και της καταπόνησης από την εφαρμογή δεύτερου ερεθίσματος (ηλεκτρικού παλμού) στην σχετική περίοδο ανερεθιστότητας του δυναμικού ενέργειας στην βιωσιμότητα και την φυσιολογική λειτουργία (ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες) των περιφερικών νευρικών ινών έγινε χρήση τριών παραμέτρων του ΣΔΕ. Η πρώτη παράμετρος αντιστοιχεί στο ύψος του ΣΔΕ και είναι η παράμετρος εκείνη που καθορίζει και την βιωσιμότητα των νευρικών ινών που απαρτίζουν το νεύρο. Το ύψος του ΣΔΕ αποτελεί το μέγιστο ύψος που μπορεί φτάσει το δυναμικό μετά από διέγερση του συνόλου των νευρικών αξόνων τόσο της μικρής όσο και της μεγάλης διαμέτρου. Συνεπώς, διέγερση του απομονωμένου ισχιακού νεύρου οδηγεί σε πλήρη διέγερση των επιμέρους νευρικών ινών που απαρτίζουν το ισχιακό νεύρο. Το ΣΔΕ που καταγράφεται αντιστοιχεί στο άθροισμα του συνόλου των δυναμικών ενέργειας που παράγονται από τις επιμέρους νευρικές ίνες. Συνεπώς, όσοι περισσότεροι νευρικοί άξονες διεγείρονται τόσο μεγαλύτερο είναι και το ύψος του ΣΔΕ που καταγράφεται. Αξίζει να αναφερθεί ότι

όταν το νεύρο αρχικά διεγείρεται οι πρώτες ίνες που διεγείρονται είναι και αυτές που διαθέτουν την μεγαλύτερη διάμετρο. Η αύξηση του ύψους του ΣΔΕ γίνεται σταδιακά μέχρις ότου να διεγερθούν όλες οι νευρικές ίνες ακόμα και αυτές με την μικρότερη διάμετρο και το ΣΔΕ να φτάσει τελικά στην μέγιστη τιμή του. Το ύψος του ΣΔΕ εκφράζεται σε Volts. Παράλληλα με το ύψος μετράται και αξιολογείται ο χρόνος ανόδου του ΣΔΕ (risingtime) που αντιστοιχεί στον χρόνο εκπόλωσης (είσοδος ιόντων Na^+ , έξοδος ιόντων K^+) καθώς και το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την ολοκλήρωση της εκπολωτικής και επαναπολωτικής φάσης του ΣΔΕ. Ο υπολογισμός των παραμέτρων που αναφέρθηκαν στηρίζεται στην θεωρία της αναλογικής/ψηφιακής ανάλυσης και επεξεργασίας. Ο χρόνος ανόδου και η διάρκεια του ΣΔΕ εκφράζονται σε msec.

Η βιωσιμότητα των περιφερικών νευρικών ινών καθορίζεται από την τιμή IT_{50} και αντιστοιχεί στον χρόνο που απαιτείται προκειμένου το ύψος του ΣΔΕ να ελαττωθεί στο 50% της αρχικής (μέγιστης) τιμής του. Στα πειράματα όπου πραγματοποιήθηκε έλεγχος διαφορετικών συγκεντρώσεων του ίδιου χημικού παράγοντα γίνεται επιπλέον υπολογισμός της ελάχιστης εκείνης συγκέντρωσης όπου παρατηρείται τοξική δράση. Η τιμή αυτή αναφέρεται ως NOEC (no-observed-effectconcentration) ενώ επιπρόσθετα υπολογίζεται και η συγκέντρωση στην οποία η τιμή του IT_{50} βρίσκεται στο 50% της τιμής του μάρτυρα και καλείται IC_{50} (inhibitory concentration to 50).



Εικόνα 2.2B: Σχηματική απεικόνιση του συστήματος λήψης βιοηλεκτρικών σημάτων. Στο σχήμα απεικονίζονται ο διεγέρτης (1), ο καταγραφικός θάλαμος (2), ο ενισχυτής (3), το φίλτρο (4), ο παλμογράφος (5) και ο ηλεκτρονικός υπολογιστής (6), όπου γίνεται καταγραφή του σήματος.

2.3. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΥΡΩΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΓΛΟΙΑΔΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ (*in vitro*)

2.3.1 ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΙΑΙΟΥ ΙΣΤΟΥ

Οι απομονωμένοι πλέον ιστοί επωάζονται σε διάλυμα πρωτεασών το οποίο αποτελείται από πρωτεάση X και XIV (Sigma) σε διάλυμα HBS και σε αναλογία 1/1 για 40 λεπτά. Οι ιστοί τεμαχίζονται προκειμένου να αυξηθεί η επιφάνεια επαφής του

ιστού με τα ένζυμα εξασφαλίζοντας την πλήρη αποδιοργάνωση του εξωκυτταρικού δικτύου που περιβάλλει τα ιποκαμπιαία κύτταρα. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης το σύνολο του ιστού μεταφέρεται σε φιλτραρισμένο (25mmsyringefilter) διάλυμα HBS ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του διαλύματος των πρωτεασών. Ακολουθούν συνεχείς αναρροφήσεις με χρήση γυάλινης πιπέτας μεσαίας διαμέτρου προκειμένου ο ιστός να ομογενοποιηθεί μηχανικά. Τα τμήματα του ιστού που δεν ομογενοποιούνται μεταφέρονται σε δεύτερο σωλήνα για περαιτέρω ομογενοποίηση και ακολουθεί φυγοκέντρηση με 1600 στροφές / λεπτό για 3 λεπτά. Στην συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο και γίνεται επαναιώρηση του ιζήματος σε ισοσταθμισμένο, αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό (*Dulbecco's Modified Eagle's medium-DMEM*) κατάλληλο για την ανάπτυξη κυτταρικών καλλιιεργειών. Τα δύο εναιωρήματα ενώνονται και ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρηση στις 1400 στροφές / λεπτό για 2 λεπτά. Στην συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται και πάλι σε θρεπτικό υλικό (DMEM). Με την βοήθεια πιπέτας το εναιώρημα των κυττάρων μοιράζεται σε πιάτα καλλιιεργειας (Petridishes, 35mm). Στη συνέχεια τα τριβλία τοποθετούνται για 1 ώρα σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας, υγρασίας και επιπέδων CO₂ προκειμένου τα κύτταρα να προσκολληθούν στο τριβλίο όπου προηγουμένως έχει προστεθεί διάλυμα πολυ-L-λυσίνης. Μετά την επώαση γίνεται προσθήκη 2 ml θρεπτικού υλικού . Αξίζει να σημειωθεί ότι ο συγκεκριμένος τύπος κυττάρων είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος σε μηχανικές καταπονήσεις οπότε ο χρόνος και η ένταση των αναρροφήσεων με την πιπέτα περιορίζονται στο ελάχιστο δυνατό.

2.3.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Κατά τα πρώτα στάδια την κυτταρικής ωρίμανσης, οι νευρώνες παρουσία γλοιαδικών κυττάρων εκκινούν φυσιολογικές διαδικασίες όπως είναι ο σχηματισμός παραφυάδων, η κυτταρική προσκόλληση και η συναπτική διαμόρφωση. Ανάλογα με τις μεταβολικές απαιτήσεις που χαρακτηρίζουν κάθε στάδιο ανάπτυξης, η κυτταρική καλλιέργεια αναπτύσσεται και σε διαφορετικό θρεπτικό υλικό. Συνεπώς, για τις δύο πρώτες ημέρες η ανάπτυξη των κυττάρων πραγματοποιείται σε θρεπτικό υλικό ενώ στην συνέχεια αντικαθίσταται από θρεπτικό υλικό (Neurobasal medium) το οποίο καλύπτει τις μεταβολικές απαιτήσεις των νευρώνων και επιτρέπει την συνεχή ανάπτυξη και ωρίμανση. Πριν από οποιαδήποτε πειραματική διαδικασία, οι καλλιέργειες πρέπει να επωαστούν σε θρεπτικό μέσο Neurobasal στον επωαστικό κλίβανο για τουλάχιστον 2-3 ημέρες επιπλέον. Στο χρονικό αυτό διάστημα η αναλογία των νευρώνων-γλοιαδικών κυττάρων σε κάθε πιάτο καλλιέργειας φτάνει στην επιθυμητή πυκνότητα για την εφαρμογή οποιασδήποτε πειραματικής συνθήκης και η ανάπτυξη των νευρώνων πλέον προσομοιάζει στο μέγιστο δυνατό τις *in vivo* συνθήκες.

2.4. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Η μικροσκοπία φθορισμού αφορά στη μελέτη ουσιών που μπορούν να διεγερθούν και να φθορίσουν. Βασική αρχή λειτουργίας είναι ο φθορισμός ο οποίος είναι το φαινόμενο κατά το οποίο ορισμένα σώματα εκπέμπουν φως όταν αυτά διεγείρονται από κάποια ακτινοβολία. Η εκπομπή φωτός σταματάει αμέσως με τη παύση της διεγείρουσας ακτινοβολίας. Αν και μεσολάβησαν αρκετές δεκαετίες από τότε που χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά τα μικροσκόπια αυτά, τα τελευταία χρόνια η χρήση τους έχει δώσει μια νέα ώθηση στις επιστήμες που τα χρησιμοποιούν. Το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που παράγεται (φθορισμός) είναι μεγαλύτερο από εκείνο της διεγείρουσας ακτινοβολίας (νόμος του Stokes). Επομένως μια φθορίζουσα ουσία μπορεί να διεγερθεί με μια ακτινοβολία της περιοχής του υπεριώδους που είναι αόρατη και να παραχθεί μια ακτινοβολία που να είναι ορατή να εκπέμπει δηλαδή στο ορατό. Το φαινόμενο αυτό χρησιμοποιείται στη μικροσκοπία φθορισμού για τη παρατήρηση ουσιών ή κυτταρικών δομών που είτε φθορίζουν από τη φύση τους είτε

γίνονται φθορίζουσες με τη χρήση χημικών ουσιών, "χρωστικών", που φθορίζουν. Ο εξειδικευμένος αυτός φθορισμός μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση φθοριοχρωμάτων. Οι ουσίες αυτές χρησιμοποιούνται όπως ακριβώς και οι συνηθισμένες ιστολογικές χρωστικές. Ο φθορισμός που παρατηρείται στα παρασκευάσματα που έχουν υποστεί χρώση με φθοριοχρώματα αναφέρεται ως "δευτερογενής φθορισμός".

- Συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με ακτίνες Laser. (Confocal Laser Scanning Microscope)

Η συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης αν και βρίσκεται σε πολύ γρήγορη εξέλιξη τα τελευταία χρόνια, η αρχή της λειτουργίας της πρωτοπεριγράφηκε από τον Minsky το 1961. Αντίθετα με το κλασικό τρόπο φωτισμού και παρατήρησης που λαμβάνει χώρα στο κοινό μικροσκόπιο, η συνεστιακή μικροσκοπία στηρίζεται στο γεγονός ότι και ο φωτισμός και η παρατήρηση είναι περιορισμένα σε ένα σημείο του παρασκευάσματος. Αυτό επιτυγχάνεται με τη τοποθέτηση ενός πολύ μικρού διαφράγματος, που μπορεί να είναι μικρότερο από 10 μm, στους οπτικούς άξονες του αντικειμενικού και του συγκεντρωτή φακού. Η εικόνα σχηματίζεται με σάρωση όλων των σημείων του πεδίου του μικροσκοπίου. Αρχικά το παρασκεύασμα παρατηρείται με φως ορατού μήκους κύματος ή με υπεριώδεις και στη συνέχεια επιλέγεται η ακτίνα Laser αργού (με πιο χρήσιμα peaks στα 488 και 514 nm που συμπίπτουν με το μήκος κύματος που διεγείρει στο μέγιστο τη φλουορεσκίνη και τη ροδαμίνη) ή ηλίου-νέου (με peak στα 633 nm για άλλα φθοριοχρώματα) ή και με τα δυο συγχρόνως. Οι εικόνες δεν είναι άμεσα ορατές (realtime), αλλά η παρατήρηση γίνεται στην οθόνη του μικροϋπολογιστή του μικροσκοπίου και φυσικά μπορούν να ψηφιοποιηθούν για αποθήκευση ή εκτύπωση. Το σημαντικότερο πλεονεκτήματα του συνεστιακού μικροσκοπίου είναι ότι σε αυτό ελαττώνονται κατά πολύ τα μηνύματα από τα μη εστιασμένα σημεία του παρασκευάσματος με αποτέλεσμα να ενισχύεται η αντίθεση (contrast) του παρασκευάσματος. Αυτό το χαρακτηριστικό επιτρέπει τη σάρωση του παρασκευάσματος όχι μόνο ως προς τους άξονες x και y αλλά και ως προς τον z (βάθος) με αποτέλεσμα να λαμβάνονται καλά εστιασμένες τρισδιάστατες εικόνες που όμως δεν παρατηρούνται άμεσα, αλλά μέσω μικροϋπολογιστή με ειδικά προγράμματα (software) που κάνουν ψηφιοποίηση και ανακατασκευή της εικόνας. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει αυτού του τύπου η μικροσκοπία σε συνδυασμό με το φθορισμό. Είναι γνωστό ότι είναι αδύνατον να παρατηρηθούν φθορίζοντα

παρασκευάσματα πάχους μεγαλύτερου των 10 μm λόγω του σημαντικού θορύβου από τα μη εστιασμένα σημεία του παρασκευάσματος με τρισδιάστατες καλά εστιασμένες εικόνες που συγκρίνονται με εκείνες του ΗΜΣ αλλά που να μας δείχνουν συγχρόνως και τη κατανομή των φθοριοχρωμάτων.

- Ιχνηθέτες φθορισμού (φθοριοχρώματα)

Ένα χρωμοφόρο ή ιχνηθέτης φθορισμού για ένα βιολογικό σύστημα, είναι ένα μικρό μόριο το οποίο παρέχει πληροφορίες για την περιορισμένη περιοχή στην οποία βρίσκεται (π.χ. θέση, ένταση). Οι μετρήσεις φθορισμού σχετίζονται είτε με την δομή του συστήματος το οποίο μετράται, είτε με την απόκριση του σε αλλαγές που οφείλονται στην αλληλεπίδραση του με το περιβάλλον. Τα χρωμοφόρα φθορισμού είναι οργανικά μόρια τα οποία παρουσιάζουν είτε επιλεκτικότητα σε συστατικά του κυττάρου είτε είναι ευαίσθητα σε ενδοκυτταρικές αλλαγές. Οι ουσίες αυτές εισέρχονται στο κύτταρο είτε με μικροέγχυση, είτε με μια χημική μορφή η οποία μπορεί να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη. Η συνήθης μέθοδος είναι η εισαγωγή του χρωμοφόρου με την μορφή ακετοξυμεθυλεστέρα (AM), ο οποίος μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη. όταν ο εστέρας βρεθεί στο εσωτερικό του κυττάρου, υδρολύεται από τις εστεράσες και το χρωμοφόρο μετατρέπεται στην ελεύθερη μορφή του η οποία είναι ικανή να δεσμευθεί από τις αντίστοιχες δομές ή τα ιόντα ανάλογα με την επιλεκτικότητα του. Τα χρωμοφόρα φθορισμού διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τα σταθερού μήκους κύματος και τα μεταβλητού μήκους κύματος. Τα πρώτα κατά την δέσμευση των ιόντων μεταβάλλουν την ένταση του φθορισμού τους, ενώ τα δεύτερα μπορούν να μεταβάλλουν τόσο την ένταση του φθορισμού όσο και το μήκος κύματος, στο οποίο εμφανίζουν τη μέγιστη εκπομπή ή απορρόφηση.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα φθοριοχρώματα

- Προπίδιοτιουωδίου (propidium iodide) (maximum excitation spectra of 493 nm and emission 636 nm).
- Καλσεΐνη (calcein AM) (maximum excitation spectra of 495 nm and emission 516 nm)
- Διχλωροφλουροσκεΐνη (DCFDA) (maximum excitation spectra of 495 nm - emission 529 nm).

2.5. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ

2.5.1 ΜΕΤΑΛΛΟΤΟΞΙΝΕΣ

Στα πειράματα όπου μελετήθηκε η δράση των διαφόρων μεταλλοϊόντων, το ισχιακό νεύρο του επίμυος τοποθετείται στον τρίχωρο θάλαμο καταγραφής και παραμένει για μία ώρα χωρίς την προσθήκη της υπό μελέτης ουσίας (μόνο φυσιολογικός ορός) προκειμένου το ΣΔΕ να σταθεροποιηθεί. Ανάλογα με τις πειραματικές που εφαρμόζονται το νεύρο τοποθετείται παρουσία ή απουσία του επινευρίου. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη της υπό μελέτη χημικής ουσίας στην επιθυμητή συγκέντρωση. Τα διαλύματα των ουσιών παρασκευάζονται πριν από την διεξαγωγή του κάθε πειράματος προκειμένου να διατηρήσουν άρτια την χημική τους σύσταση. Η προσθήκη γίνεται με αντικατάσταση του φυσιολογικού ορού που υπάρχει στο διαμέρισμα επώασης κατά την σταθεροποίηση, με νέο φυσιολογικό ορό στον οποίο έχει διαλυθεί η χημική ένωση που εξετάζεται κάθε φορά στην επιθυμητή συγκέντρωση. Όλες οι μεταλλοτοξίνες εξετάστηκαν σε συγκέντρωση 500μM ενώ ειδικότερα ο Cu(II) ελέγχθηκε στις συγκεντρώσεις 1, 25, 75, 125, 250 και 500μM.

Στα πειράματα όπου ελέγχθηκε η επαναφορά του ΣΔΕ μετά από επίδραση με την εξεταζόμενη χημική ουσία, ο φυσιολογικός ορός με την διαλυμένη χημική ένωση αντικαθίσταται μετά το πέρας συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος και όταν το ΣΔΕ έχει ελαττωθεί τουλάχιστον κάτω από το 70% του αρχικού.

Προκειμένου να αποσαφηνιστεί η δράση του Cu(II) αλλά παράλληλα να εκτιμηθεί και η δράση γνωστών αντιοξειδωτικών και χηλικοποιητικών μορίων έναντι της τοξικής δράσης του Cu(II), πραγματοποιήθηκε προεπώαση του ισχιακού νεύρου του επίμυος για μια ώρα με διάφορες συγκεντρώσεις (125, 250, 500 μM και 1mM) της N-ακετυλ-κυστεΐνης (NAC), του αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA), του κινικού οξέος (QA) καθώς και της N-τερτ-βουτυλ-α-φαινυλνιτρονης (PBN). Αξίζει να αναφερθεί ότι το NAC δεν είναι τοξικό για το ισχιακό νεύρο του επίμυος σε συγκέντρωση μέχρι και 1 mM όπως έχει δειχθεί και σε προηγούμενη εργασία (Moschou et al., 2008). Το EDTA είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο χηλικοποιητικό μόριο, αποτελεί πολύτιμη θεραπεία έναντι στην δηλητηρίαση από μέταλλα με μεγαλύτερη σταθερά συναρμογής από ότι το ιοντικό ασβέστιο. Το κινικό

οξύ αποτελεί πολυλειτουργικό συνδέτη, αλληλεπιδρώντας με μεταλλικά στοιχεία με ποικίλους τρόπους και είναι φυσικό αντιοξειδωτικό που απαντάται σε διάφορα φυτά όπως τα καρότα και τα φύλλα του καπνού σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις. Τέλος το PBN, είναι μια χημική ένωση η οποία δεσμεύει όλων των ειδών τις ελεύθερες ρίζες και όχι μόνο τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου όπως γίνεται με το NAC. Ειδικότερα για το EDTA και το QA πραγματοποιήθηκαν ανεξάρτητα πειράματα όπου προστίθεται μόνο η κάθε χημική ένωση αντίστοιχα προκειμένου να εκτιμηθεί η ενδεχόμενη τοξική δράση του αντιοξειδωτικού ή χηλικοποιητικού παράγοντα πριν εξετασθεί συνδυαστικά με τον Cu(II). Οι συγκεντρώσεις που ελέχθησαν είναι 0,5 και 1 mM και προκύπτουν από την στοιχειομετρική αναλογία με την μεταλλοτοξίνη του Cu(II). Όλες οι χημικές ενώσεις που εξετάζονται είναι υδατοδιαλυτές και τα διαλύματα παρασκευάζονται πάντα πριν από την προσθήκη τους στο διαμέρισμα εμποτισμού.

2.5.2 ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

2.5.2.1 Cis-platin

Στα πειράματα όπου έγινε έλεγχος της δράσης της αντικαρκινικής ουσίας cis-platin, μετά την τοποθέτηση του ισχιακού νεύρου του επίμυος (απαλλαγμένο από το επινεύριο) στον τρίχωρο θάλαμο καταγραφής το νεύρο παραμένει για μια ώρα στον τρίχωρο θάλαμο χωρίς την προσθήκη της υπό μελέτη χημικής ένωσης προκειμένου να σταθεροποιηθεί το ύψος του ΣΔΕ. Οι επίμυες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν είτε φυσιολογικοί είτε διαβητικοί (πρόκληση επίκτητου σακχαρώδη διαβήτη με εφαρμογή συγκεκριμένου πρωτοκόλλου). Στην συνέχεια γίνεται η προσθήκη της cis-platin στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν και οι οποίες ήταν 100 και 200 μΜ. Η cis-platin ήταν διαλυμένη σε διάλυμα NaCl 0.09% σε συμπυκνωμένο διάλυμα 1mM και αποθηκευόταν στην κατάψυξη (-20 °C).

2.5.2.2 Οξαλιπλατίνα

Η οξαλιπλατίνα αποτελεί και αυτή ένωση η οποία χρησιμοποιείται ευρέως ως αντικαρκινικό φάρμακο. Στόχος της εργασίας αποτέλεσε η σύγκριση του τρόπου δράσης των δύο αντικαρκινικών παραγόντων στο ισχιακό νεύρο του επίμυος τόσο σε φυσιολογικά άτομα όσο και σε διαβητικά. Η οξαλιπλατίνη χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 100 μΜ η οποία εμπίπτει σε προηγούμενη εργασία του εργαστηρίου [34]. Η οξαλιπλατίνα προστίθεται στο διαμέρισμα εμποτισμού αφού πρώτα διαλυθεί σε φυσιολογικό ορό. Η οξαλιπλατίνα ήταν διαλυμένη σε γλυκόζη 5% σε συμπυκνωμένο διάλυμα 5mg/ml και αποθηκευόταν στην κατάψυξη (-20 °C).

2.5.3 ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΠΙΝΕΥΡΙΟΥ

Είναι γνωστό ότι το επινεύριο διαδραματίζει ρόλο αιματο-νευρικού φραγμού για το ισχιακό νεύρο έχοντας ανάλογο ρόλο με τον αιματο-εγκεφαλικό φραγμό. Με βάση αυτό το χαρακτηριστικό, στην παρούσα εργασία έγινε μελέτη του ρόλου του επινευρίου στο ΠΝΣ παρουσία χημικών ενώσεων και πιο συγκεκριμένα του Cu(II) στο ισχιακό νεύρο του επίμυος. Η μελέτη βασίζεται στην σύγκριση της απόκρισης του ισχιακού νεύρου κατά την παρουσία και απουσία αντίστοιχα του επινευρίου. Στα πειράματα όπου απαιτείται η απουσία του επινευρίου, γίνεται αφαίρεση αυτού κάτω από στερεοσκόπιο με χρήση μικροεργαλείων. Τα νεύρα τοποθετούνται και πάλι στον τρίχωρο θάλαμο καταγραφής και η υπό μελέτη ουσία προστίθεται στην επιθυμητή συγκέντρωση μετά από μία ώρα σταθεροποίησης του ΣΔΕ. Η συγκέντρωση που εξετάστηκε ήταν η μέγιστη που ελέγχθηκε στην παρούσα εργασία (500 μΜ). Η ίδια

συγκέντρωση ελέγχθηκε και στην περίπτωση παρουσίας του επινευρίου. Ο υπολογισμός του συντελεστή του επινευρίου γίνεται λαμβάνοντας τον λόγο του IT_{50} του ΣΔΕ απουσία του επινευρίου προς το IT_{50} του ΣΔΕ παρουσία του επινευρίου.

2.5.4 ΣΗΜΑΝΣΗ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΦΘΟΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΣ ΔΙΧΛΩΡΟΦΛΟΥΡΟΣΚΕΪΝΗ (DCFDA)

Η χρωστική DCFDA χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση ελεύθερων ριζών μετά από την επίδραση με 500 μ M Cu(II). Στα πειράματα αυτά κρίθηκε αναγκαίο να χρησιμοποιηθεί απλός μάρτυρας αλλά και θετικός μάρτυρας. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) καθώς αποτελεί γνωστό οξειδωτικό παράγοντα που οδηγεί στον σχηματισμό ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS). Αρχικά, τα ισχιακά νεύρα εκτίθενται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και Cu(II) αντίστοιχα. Στη συνέχεια, τα ισχιακά νεύρα επωάζονται σε διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline) στο οποίο είχε προστεθεί DCFDA σε τελική συγκέντρωση 5 και 10 μ M για 45 λεπτά σε σκοτεινό θάλαμο. Το DCFDA ήταν διαλυμένο σε DMSO σε συμπυκνωμένο διάλυμα 100 μ M στους $-20^\circ C$. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης, τα δείγματα αφαιρούνται από το διάλυμα του DCFDA και πλένονται με PBS. Η διαδικασία της πλύσης επαναλαμβάνεται τουλάχιστον τρεις φορές προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια της χρωστικής. Το κάθε παρασκεύασμα τοποθετείται σε αντικειμενοφόρο πλάκα μαζί με διάλυμα PBS και αφού τοποθετηθεί καλυπτρίδα γίνεται παρατήρηση και λήψη εικόνων σε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης.

2.5.5 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ – ΕΦΑΡΜΟΓΗ 2^{ΟΥ} ΗΛΕΚΤΡΙΚΟΥ ΠΑΛΜΟΥ ΣΤΗΝ ΣΧΕΤΙΚΗ ΑΝΕΡΕΘΙΣΤΗ ΠΕΡΙΟΔΟ

Ανερέθιστη περίοδος

Όταν ένα νευρικό κύτταρο διεγείρεται, η πλασματική του μεμβράνη μπορεί να παραμένει εντελώς ανεπηρέαστη σε μια περαιτέρω διέγερση κατά το μέγιστο της διάρκειας του δυναμικού ενέργειας.

Το χαρακτηριστικό αυτό υποδεικνύει ότι όσο έντονος και αν είναι ο ερεθισμός που μπορεί να δεχθεί, δεν είναι δυνατή η πυροδότηση ενός δεύτερου δυναμικού ενέργειας. Η κατάσταση αυτή όπου δεν είναι δυνατό να πυροδοτηθεί ένα δεύτερο δυναμικό ενέργειας αντιστοιχεί στην απόλυτη ανερέθιστη περίοδο. Κατά την

διάρκεια της ανερέθιστης περιόδου παρατηρείται ταυτοελεγχόμενη αδρανοποίηση των περισσότερων διαύλων Na^+ με αποτέλεσμα να μην ανοίγουν ξανά πριν η μεμβράνη επαναπολωθεί και πάλι. Προκειμένου να πυροδοτηθεί ένα δεύτερο δυναμικό ενέργειας κατά το τελευταίο στάδιο της διάρκειας ενός δυναμικού απαιτείται ερέθισμα ισχυρότερο από το κανονικό. Το χρονικό αυτό διάστημα στο οποίο μπορεί να πυροδοτηθεί ένα δεύτερο δυναμικό ενέργειας καλείται σχετική ανερέθιστη περίοδος. Στην αρχή της περιόδου αυτής όπου το δυναμικό ενέργειας δεν έχει επανέλθει πλήρως στα επίπεδα του δυναμικού ηρεμίας, ορισμένοι διάυλοι Na^+ έχουν υποστεί ταυτοελεγχόμενη αδρανοποίηση και για τον λόγο αυτό απαιτείται ισχυρότερο ερέθισμα ώστε να ανοίξει ο κρίσιμος εκείνος αριθμός διαύλων Na^+ που απαιτείται για να πυροδοτηθεί ένα δυναμικό ενέργειας. Επιπλέον, καθόλη την διάρκεια της ανερέθιστης περιόδου παρατηρείται αυξημένη αγωγιμότητα ως προς τα ιόντα καλίου. Το γεγονός αυτό παρεμποδίζει την εκπόλωση της πλασματικής μεμβράνης συμβάλλοντας έτσι στην ανερεθιστότητα [3].

Η εφαρμογή δεύτερου ερεθίσματος κατά το τελευταίο στάδιο της διάρκειας ενός δυναμικού ενέργειας, δηλαδή η εφαρμογή δεύτερου παλμού κατά την διάρκεια της σχετικής ανερέθιστης περιόδου, χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία α) για την ανάπτυξη μοντέλου αξιολόγησης και ανίχνευσης περιφερικής νευροπάθειας η οποία οφείλεται στον σακχαρώδη διαβήτη, β) για την αξιολόγηση και περαιτέρω εφαρμογή του μοντέλου στην ανίχνευση περιφερικής νευροπάθειας από καταπονητικούς παράγοντες και γ) για την αξιολόγηση της πιθανής νευροπροστατευτικής δράσης διαφόρων χημικών ενώσεων έναντι των καταπονητικών παραγόντων που μελετώνται. Στην παρούσα εργασία, αξιολογήθηκε η νευροπροστατευτική δράση του χηλικοποιητικού μορίου EDTA έναντι στην τοξική δράση του μεταλλοϊόντος Cu(II) .

Αρχικά κρίθηκε απαραίτητος ο έλεγχος της απόδοσης της μεθόδου. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν ζώα φυσιολογικά, ενήλικα τα οποία ήταν ηλικιακά μεγαλύτερα των 3-4 μηνών καθώς και ζώα διαβητικά. Είναι γνωστό ότι ο σακχαρώδης διαβήτης είναι στενά συνδεδεμένος με πρόκληση νευροπάθειας.

Για την εκτέλεση των συγκεκριμένων πειραμάτων δεν απαιτείται η αφαίρεση του επινευρίου. Το ισχιακό νεύρο τοποθετείται στον τρίχωρο θάλαμο καταγραφής όπως και στην περίπτωση των εξωκυττάρων ηλεκτροφυσιολογικών καταγραφών η οποία περιγράφεται παραπάνω. Το ισχιακό νεύρο παραμένει στον τρίχωρο θάλαμο για μία

ώρα προκειμένου να σταθεροποιηθεί το ΣΔΕ και στη συνέχεια διεγείρεται με συχνότητα μεγαλύτερη του 1Hz(που εφαρμόζεται σε όλα τα άλλα πρωτόκολλα που αναφέρθηκαν) ενώ παράλληλα με χρήση ειδικής διάταξης εφαρμόζεται δεύτερος ηλεκτρικός παλμός σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα της σχετικής ανερεθιστής περιόδου. Για την αξιολόγηση του μοντέλου πέραν από τις δύο διακριτές ομάδες ζώων πραγματοποιήθηκε και παραμετροποίηση του συστήματος και έτσι τα πειράματα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Αρχικά εφαρμόστηκε υψηλή συχνότητα διέγερσης 90Hz και ο δεύτερος παλμός εφαρμόστηκε 2,2 msec ή 4,2 msec από την έναρξη της σχετικής περιόδου ανερεθιστότητας. Στην δεύτερη ομάδα πειραμάτων η συχνότητα μειώθηκε στα 50Hz και η χρονική στιγμή εφαρμογής του δεύτερου παλμού ήταν 2,2 msec μετά την έναρξη της σχετικής περιόδου ανερεθιστότητας. Επιπλέον στα πλαίσια αξιολόγησης του μοντέλου ελέγχθηκε και η βιωσιμότητα του ισχιακού νεύρου του επίμυος υπό την εφαρμογή απλού παλμού σε συνθήκες αυξημένης διέγερσης (100 Hz) τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε διαβητικά ζώα.

2.5.6 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΧΗΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΟΥΣΙΩΝ *in vitro*

2.5.6.1 Αξιολόγηση βιωσιμότητας-Προσδιορισμός ζωντανών / νεκρών κυττάρων
Προκειμένου να διερευνηθεί η νευροτοξική δράση διαφόρων ουσιών είναι απαραίτητη σε διακριτά και συγκεκριμένα στάδια της ανάπτυξης της καλλιέργειας η χρήση συγκεκριμένων ουσιών για την ανίχνευση και μελέτη δυνητικά τοξικών παραγόντων. Για να αξιολογηθεί η βιωσιμότητα των νευρωνικών και γλοιαδικών κυττάρων οι χρωστικές αυτές πρέπει να έχουν α) την ιδιότητα να ανιχνεύουν και προσδένονται μόνο σε ζωντανά κύτταρα, β) την ικανότητα ανίχνευσης και πρόσδεσης σε μη ζωντανά κύτταρα και γ) να μπορούν να αποδίδουν μια συνολική εικόνα όλων των κυττάρων σε ένα δείγμα της καλλιέργειας. Σημαντική προϋπόθεση στα πειράματα αυτά αποτέλεσε η ύπαρξη ανιχνευτών οι οποίοι φέρουν διαφορετικό χαρακτηριστικό χρώμα ο καθένας το οποίο εκπέμπει σε συγκεκριμένο μήκος κύματος χωρίς αλληλοεπικάλυψη με την απορρόφηση τους στο φως.

Για τον προσδιορισμό των ζωντανών και νεκρών κυττάρων στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το kit: Live/Dead Cell Double Staining Kit (Sigma) κατάλληλο για μέτρηση φθορισμού. Η καλσεΐνη (Calcein-AM) είναι λιπόφιλο μόριο το οποίο διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη. Η ουσία αυτή είναι μη φθορίζουσα όταν

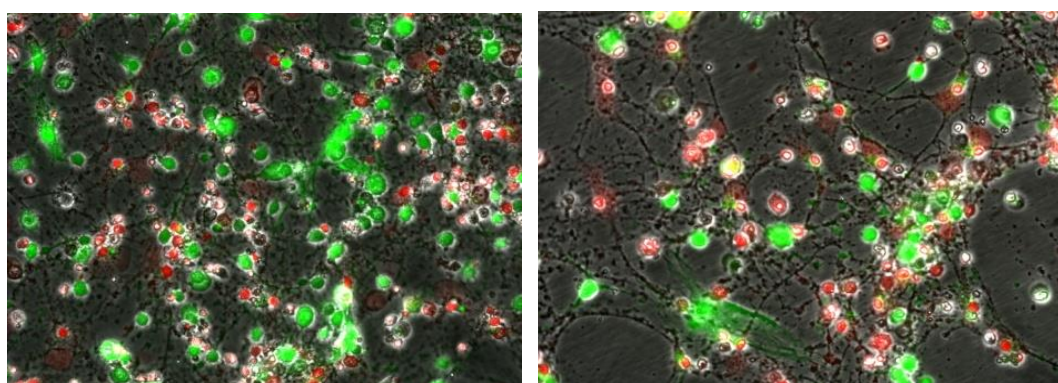
βρίσκεται εντός των κυττάρων ωστόσο μετά από την ενζυματική της διάσπαση από μια εστεράση καθίσταται φθορίζουσα. Η καλσεΐνη διαθέτει μόρια τα οποία φθορίζουν σε πράσινο φάσμα φωτός. Πιο συγκεκριμένα, η ουσία αυτή διεγείρεται σε μήκος κύματος 495nm και εκπέμπει στα 516nm. Όταν τα κύτταρα επωαστούν με καλσεΐνη και ακολουθήσει διέγερση στα 490 nm, αυτό υποδεικνύει ότι η ενζυματική δραστηριότητά τους δεν έχει διαταραχθεί και άρα η βιώσιμη κυτταρική δραστηριότητα είναι ανιχνεύσιμη. Αντίθετα, όταν τα κύτταρα δεν φθορίζουν τότε είναι νεκρά.

Συνδυαστικά με την καλσεΐνη χρησιμοποιείται το ιωδιούχο προπίδιο (PI). Το PI είναι μια χρωστική της πυρηνικής μεμβράνης η οποία εισέρχεται στα κύτταρα μόνο όταν χαθεί η ακεραιότητα της μεμβράνης, υποδεικνύοντας με τον τρόπο αυτό την νέκρωση ή απόπτωσή τους. Η βέλτιστη διέγερση του PI είναι στα 535 nm και εκπέμπει στα 636nm.

Η αναλογία που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι 10 μlκαλσεΐνης μαζί με 2 μlPIσε 5 mlδιαλύματος HBSσε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση των κυττάρων με τις υπό μελέτη τοξίνες ή νευροπροστατευτικούς παράγοντες και ανάλογα πάντα με το πρωτόκολλο του πειράματος που εφαρμόζεται, τα κύτταρα πλένονται με προθερμασμένο διάλυμα HBSκαι στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα μίγματος Calcein/PI. Ακολούθως, τα κύτταρα επωάζονται σε σκοτεινό θάλαμο για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και πάλι ακολουθούν δύο πλύσεις με HBS. Η απεικόνιση και παρατήρηση γίνεται άμεσα σε μικροσκόπιο φθορισμού διεγείροντας στα 490 και 535 nm. Τα εκπεμπόμενα μήκη κύματος λαμβάνονται με χρήση κατάλληλων φίλτρων FITC(πράσινο) για την καλσεΐνη και Rhod (κόκκινο) για το PI.

2.5.6.2 ΛΗΨΗ ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΩΝ ΝΕΥΡΩΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΓΛΟΙΑΔΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Κάθε επεξεργασμένο τριβλίο θεωρείται ανεξάρτητο δείγμα της καλλιέργειας. Κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων, έξι περιοχές της καλλιέργειας σε κάθε τριβλίο επελέγησαν για λήψη των εικόνων με εναλλασσόμενη διέγερση (multichannelacquisition) στα 490 και 535 nm. Επιπλέον, σε κάθε λήψη περιλαμβάνεται και μια λήψη στο φως εκπομπής (transmitted) για την διευκόλυνση της διάκρισης και αναγνώρισης των νευρωνικών και γλοιαδικών κυττάρων.



Εικόνα 2.5.6.2: Μικροφωτογραφία δείγματος πρωτογενούς μονοστρωματικής κυτταρικής καλλιέργειας μετά από χρώση με calcein AM και PI για τον προσδιορισμό της κυτταρικής επιβίωσης.

2.5.6.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ Cu(II)-glycinate(*in vitro*)

Οι καλλιέργειες επιλέγονται για την διεξαγωγή των πειραμάτων συνήθως αφού συμπληρωθεί χρονικό διάστημα 5-10 ημερών *in vitro*. Τα δείγματα που επιλέγονται πρέπει να διατηρούν στο μέγιστο δυνατό ενιαία ποιότητα, σύνθεση και πυκνότητα των κυττάρων. Οι υπό μελέτη ουσίες όπως είναι ο γλυκινικός χαλκός που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, διαλύεται σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (HBS) στην επιθυμητή συγκέντρωση και στην συνέχεια προστίθενται στην καλλιέργεια. Κάθε τριβλίο αντιστοιχεί σε μία συνθήκη. Η επώαση των κυτταροκαλλιεργειών πραγματοποιείται για το επιθυμητό χρονικό διάστημα (στην προκειμένη περίπτωση, 3 ώρες) σε επωαστικό κλίβανο σταθερών συνθηκών 5% CO₂, 37°C.

2.5.6.4 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ EDTA και QA

Για την μελέτη της νευροπροστατευτικής δράσης του EDTA έναντι του Cu(II), οι καλλιέργειες επώαστηκαν για μία ώρα μετά την προσθήκη του EDTA σε HBS σε διάφορες συγκεντρώσεις (10, 200, 400 μM) και στη συνέχεια προστέθηκε Cu(II)-glycinate χωρίς να προηγηθεί αφαίρεση του διαλύματος που περιέχει το EDTA. Η επώαση με τον Cu(II)-glycinate διήρκεσε 3 ώρες. Οι συγκεντρώσεις του Cu(II) εξαρτώνται από την συγκέντρωση του χαλκού προκειμένου να ελεγχθεί η στοιχειομετρική αναλογία μεταλλοτοξίνης-νευροπροστατευτικού παράγοντα και διαμορφώνονται ως εξής [(10 μM EDTA – 10 μM Cu(II), (20 μM EDTA – 10 μM Cu(II), (100 μM EDTA – 100 μM Cu(II), (200 μM EDTA – 100 μM Cu(II), (200 μM EDTA – 200 μM Cu(II), (400 μM EDTA – 200 μM Cu(II)]. Η επώαση των κυτταροκαλλιιεργειών πραγματοποιείται για το επιθυμητό χρονικό διάστημα σε επωαστικό κλίβανο σταθερών συνθηκών 5% CO₂, 37 °C. Αντίστοιχη διαδικασία πραγματοποιείται και στην περίπτωση του QA με αναλογίες συγκεντρώσεων : (10 μM QA – 10 μM Cu(II), (20 μM QA – 10 μM Cu(II), (100 μM QA – 100 μM Cu(II), (200 μM QA – 100 μM Cu(II), (200 μM QA – 200 μM Cu(II), (400 μM QA – 200 μM Cu(II).

2.6. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ – ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων του ύψους αλλά και των άλλων παραμέτρων που υπολογίζονται από την πειραματική διαδικασία, λαμβάνονται οι πραγματικές τιμές. Η κάθε ομάδα πειραμάτων αντιπροσωπεύει μια συνθήκη και η ομάδα αυτή αποτελείται από ανεξάρτητα πειράματα των οποίων οι επαναλήψεις είναι τουλάχιστον τρεις. Η χρονική διάρκεια του πειράματος εξαρτάται από το πειραματικό πρωτόκολλο που εφαρμόζεται κάθε φορά και μπορεί να κυμαίνεται από 20 λεπτά έως και 30 ώρες. Κάθε πείραμα ξεκινούσε την χρονική στιγμή $t=0$. Όλες οι τιμές των πειραμάτων που αποτελούν μια ομάδα διαιρούνται με το μέσο όρο και με τον τρόπο αυτό εκφράζονται σαν ποσοστό του μέσου όρου. Στη συνέχεια ακολούθησε εξαγωγή του μέσου όρου και του τυπικού σφάλματος από όλες τις τιμές των επιμέρους πειραμάτων και έκφρασή τους σε εκατοστιαίο ποσοστό. Τα

αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσοι όροι σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα ($\text{mean} \pm \text{SEM}$). Επιπλέον, πέραν των διαγραμμάτων της μεταβολής του ύψους ΣΔΕ σε σχέση με το χρόνο έγιναν και τα διαγράμματα δοσο-εξάρτησης. Για την εξαγωγή των διαγραμμάτων αυτών οι τιμές του IT_{50} των διαφορετικών συγκεντρώσεων μιας χημικής ένωσης εκφράστηκε σαν εκατοστιαίο ποσοστό της τιμής του IT_{50} του μάρτυρα μέσω του προγράμματος Prism 5 της εταιρείας Graph Pad Software και ακολούθως δημιουργήθηκε το διάγραμμα της εκατοστιαίας μεταβολής του IT_{50} σε σχέση με τη συγκέντρωση. Από το διάγραμμα αυτό υπολογίστηκε η τιμή του IC_{50} , της τιμής της συγκέντρωσης στην οποία η τιμή του IT_{50} βρίσκεται στο 50 % σε σχέση με την τιμή του μάρτυρα. Τα λογισμικά προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων ήταν το Microsoft Excel 2003, το Origin Lab 7.5 και το Origin Lab 8.0 ενώ η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα InStat της εταιρείας Graph Pad Software. Οι τιμές του IT_{50} και του IC_{50} υπολογίστηκαν μέσω του προγράμματος Prism 5 της εταιρείας Graph Pad Software. Ο υπολογισμός των τιμών αυτών έγινε με τη χρήση των εκατοστιαίων ποσοστών των επιμέρους διαγραμμάτων και χρησιμοποιώντας το κατάλληλο μοντέλο συνάρτησης για κάθε διάγραμμα έγινε εξαγωγή των τιμών αυτών.

Στην περίπτωση των *invitro* πειραμάτων, τα κύτταρα τα οποία επισημαίνονται με πράσινο αντιστοιχούν στα ζωντανά κύτταρα ενώ αυτά που επισημαίνονται με κόκκινο αντιστοιχούν στα νεκρά. Από τις έξι συνολικά εικόνες που λαμβάνονται από το κάθε τριβλίο υπολογίζεται ο συνολικός αριθμός των κυττάρων, ο αριθμός των ζωντανών καθώς και ο αριθμός των νεκρών από κάθε διαφορετική συνθήκη. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με χρήση του λογισμικού GraphpadPrism®, έκδοση 5 Graphpadsoftware, SanDiego, CA, USA. Η ανάλυση όλων των αποτελεσμάτων έγινε με One-way Analysis of Variance (ANOVA) και posttest αναλύσεις (Tukey). Όλα τα αποτελέσματα εκφράζονται ως εκατοστιαία μεταβολή των μέσων όρων σε σχέση με τον μάρτυρα ενώ επιπλέον υπολογίζεται το στατιστικό λάθος ($\text{standard error mean-SEM}$).

2.7. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥΛΙΚΟ

Rattus norvegicus (Wistar)

Ταξινομική κατάταξη των επίμυων:

Βασίλειο:	Ζώα (Animalia)
Φύλο:	Χορδωτά (Chordata)
Κλάση:	Θηλαστικά (Mammalia)
Τάξη:	Τρωκτικά (Rodentia)
Υπεροικογένεια:	Muridea
Οικογένεια:	Muridae
Υποοικογένεια:	Murinae
Γένος:	<i>Rattus</i>
Είδος:	<i>norvegicus</i>

2.8. ΧΗΜΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

2.8.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΜΟΝΟΪΔΡΙΚΟΣ *cis* ΔΙΣ(ΓΛΥΚΙΝΙΚΟΣ)ΧΑΛΚΟΣ(II) *cis*-Cu(gly)₂H₂O

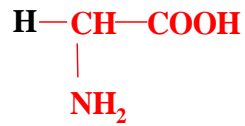
Τα φυσικά αμινοξέα αποτελούν τη βάση της πρωτοταγούς δομής των πρωτεϊνών και διαφόρων ενζύμων. Παράλληλα, τα αμινοξέα στηρίζουν σημαντικά ανώτερες πρωτεϊνικές δομές και πιο συγκεκριμένα στην δευτεροταγή, τριτοταγή και τετεροταγή δομή τους. Έχει δειχθεί ότι τα αμινοξέα όντας δομικές μονάδες πολλών βιολογικών μεταλλομορίων μπορεί να αλληλεπιδρούν με μεταλλοϊόντα προσδίδοντας τους λειτουργικότητα. Κατά συνέπεια, η συναρμογή οργανικών μορίων, αμινοξέα, με μεταλλοϊόντα προσδίδει βιολογικές ιδιότητες τόσο στα αμινοξέα όσο και στα συναρμοζόμενα μεταλλοϊόντα. Το είδος της συναρμογής αυτής διακρίνεται σε μονοδοντική για κάθε αμινοξύ και πολυδοντική ανάλογα με την φύση του αμινοξέος καθώς και την φύση του μεταλλοϊόντος. Το χαρακτηριστικό αυτό επάγει φυσικοχημικές αλλαγές οι οποίες συνεπάγονται βιολογικές επιπτώσεις ήπιας ή δραστηκής μορφής. Κλασική περίπτωση συναρμογής αμινοξέος με μεταλλοϊόντα, όπως είναι ο χαλκός (Cu(II)), είναι η διαδικασία της χηλικοποίησης. Η χηλικοποίηση βασίζεται σε θερμοδυναμικά κριτήρια ως προς την εκλεκτικότητα σύνδεσης ενός μεταλλοϊόντος ενώ παράλληλα επηρεάζει τις φυσιολογικές βιολογικές διεργασίες είτε διατηρώντας την ακεραιότητα των φυσιολογικών αυτών διεργασιών

είτε προκαλώντας αποκλίσεις από την κυτταρική ομοιοστασία οδηγώντας έτσι σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις όπως είναι ο καρκίνος και ο νευροεκφυλισμός.

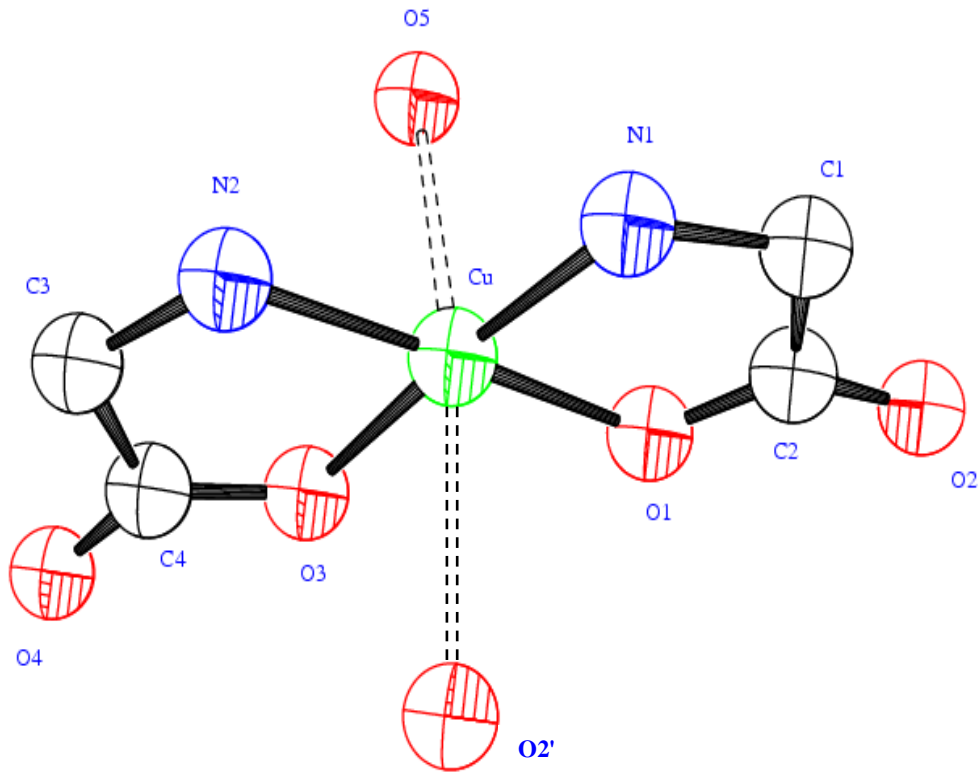
Εξέχοντα ρόλο στην βιολογική δραστικότητα ενός μεταλλοϊοντικού συμπλόκου διαδραματίζει η σχετική θέση των ατόμων του συναρμοζόμενου υποκαταστάτη γύρω από το μεταλλοϊόν. Συνεπώς, η γεωμετρική ισομέρεια σε ένα μεταλλοσύμπλοκο είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς η φυσικοχημική ταυτότητα συνδέεται άμεσα με την βιολογική δράση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το σύμπλοκο του λευκόχρυσου Pt με τους μονοδοντικούς υποκαταστάτες αμμωνία και Cl⁻, όπου το cis ισομερές [Pt(NH₃)₂Cl₂] είναι βιολογικά δραστικό αντικαρκινικό φάρμακο ενώ το trans ισομερές δεν εμφανίζει καμία δραστικότητα. Αν και η φύση του υποκαταστάτη που συναρμόζεται με το μεταλλοϊόν είναι και στις δύο περιπτώσεις μονοδοντική, η έννοια της επιλεκτικής βιολογικής δράσης εξαιτίας της διαφορετικής ισομέρειας γίνεται εμφανής. Αντίστοιχο παράδειγμα αποτελεί το αργίλιο όπου η συμπλοκοποίηση του με διαφορετικό υποκαταστάτη επηρεάζει την διαλυτότητα, την βιοδιαθεσιμότητα και άρα τον βαθμό της δράσης του σε διάφορα βιολογικά συστήματα όπως είναι το κεντρικό νευρικό σύστημα.

Στην παρούσα εργασία για τον έλεγχο της νευροτοξικής δράσης του Cu(II) επιλέχθηκε η cis μορφή του μονοϋδρικού γλυκινικού χαλκού. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε απομόνωση, σύνθεση και χαρακτηρισμός του cis-Cu(gly)₂·H₂O. Ο cis-γλυκινικός χαλκός είναι υδατοδιαλυτός και άρα κατάλληλος για την χρήση στα συγκεκριμένα πρωτόκολλα προκειμένου να μελετηθεί δράση του Cu(II) σε βιολογικά συστήματα σε αντίθεση με την ένωση CuCl₂ η οποία είναι αδιάλυτη σε pH 7.4 σε υδατικό διαλύτη. Η σύνθεση του επιθυμητού συμπλόκου πραγματοποιείται σε ποτήρι ζέσεως όπου διαλύεται ποσότητα μονοϋδρικού οξικού χαλκού (Cu(CH₃COOH)₂·H₂O σε 25 ml θερμού νερού. Στο διάλυμα αυτό προστίθενται 25 ml θερμής αιθανόλης και το διάλυμα που προκύπτει διατηρείται θερμό. Στη συνέχεια ποσότητα γλυκίνης ίση με 1.5 γραμμάρια (0.020 mol) διαλύεται σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει 25ml θερμού νερού. Τα δύο διαλύματα αναμιγνύονται και διατηρούνται σε θερμοκρασία περίπου 70°C. Ακολουθεί ψύξη σε παγόλουτρο και σε σύντομο χρονικό διάστημα εμφανίζεται ίζημα το οποίο επικάθεται με την μορφή λεπτών βελονών. Το προϊόν απομονώνεται και ξηραίνεται.

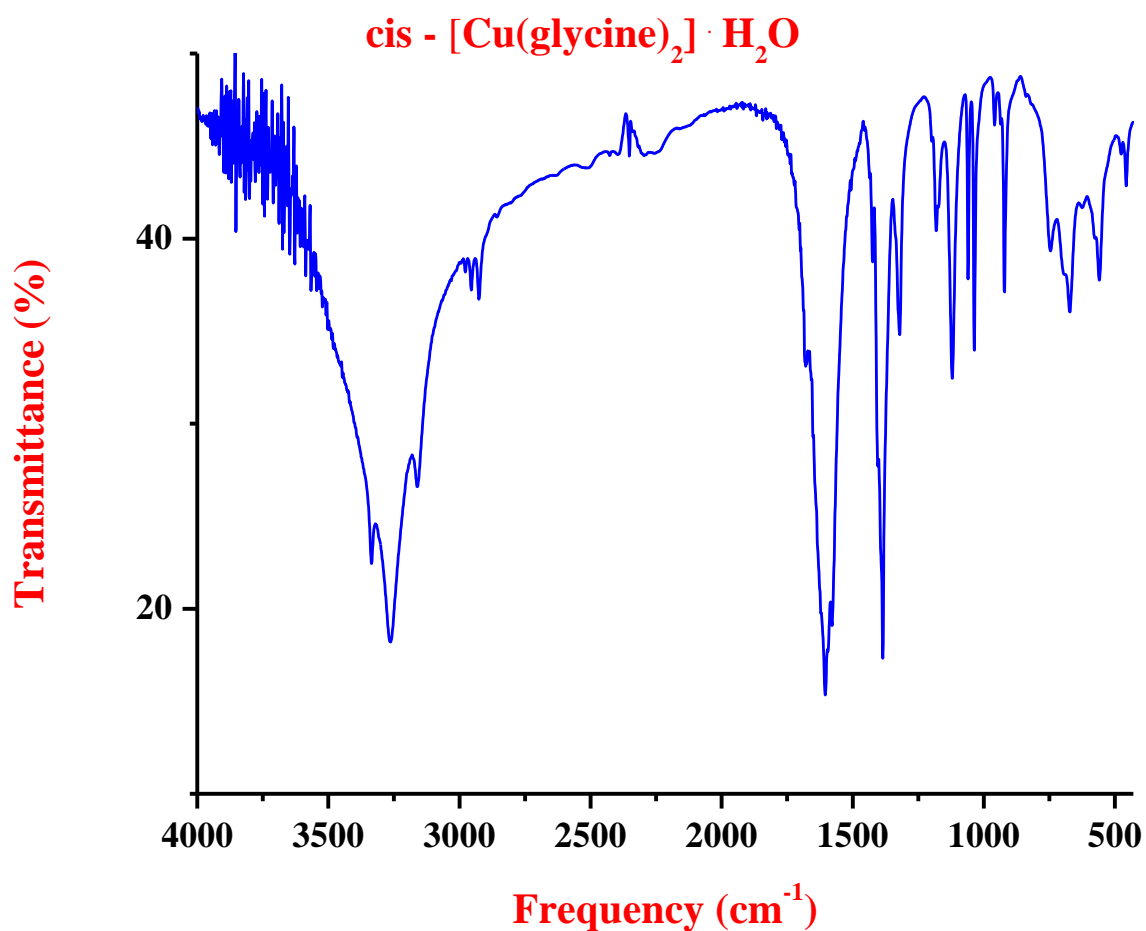
Σημαντικό μέρος της διαδικασίας χαρακτηρισμού ενός υλικού αποτελεί ο προσδιορισμός της κρυσταλλικής δομής του. Στην προκειμένη περίπτωση ο χαρακτηρισμός του συμπλόκου πραγματοποιείται με χρήση κρυσταλλογραφίας ακτινών X ώστε να αποσαφηνιστεί η τρισδιάστατη δομή της ένωσης $\text{cis-Cu}(\text{gly})_2\cdot\text{H}_2\text{O}$. Η κρυσταλλική δομή του cis ισομερούς του μονοεδρικού δις(γλυκινικού)χαλκού(II) υποδεικνύει την παρουσία δύο μορίων γλυκίνης τα οποία είναι συναρμοσμένα στο ιόν του Cu(II) . Τα δύο μόρια της γλυκίνης περιέχουν αποπρωτονιωμένα καρβοξύλια μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η συναρμογή του μεταλλοϊόντος. Κατά συνέπεια, το ολικό φορτίο του συμπλόκου που προκύπτει είναι μηδέν. Η συναρμογή των δύο αυτών υποκαταστατών γύρω από το μεταλλοϊόν του Cu(II) είναι τέτοια που οδηγεί στον σχηματισμό επίπεδου cis γεωμετρικού ισομερούς. Τα άτομα των O(1), O(3), N(1) και N(2) των δύο υποκαταστατών βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο, με τις αποκλίσεις από το επίπεδο ελαχίστων τετραγώνων να κυμαίνεται από 0.019 έως 0.037 Å. Το ιόν του Cu(II) βρίσκεται 0.05 Å έξω από το επίπεδο αυτό προς την πλευρά του H_2O . Το τελευταίο βρίσκεται σε απόσταση 2.405(11) Å από το ιόν του χαλκού αναπτύσσοντας έτσι μια ασθενή αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο. Επιπλέον, μια ακόμη ασθενέστερη αλληλεπίδραση αναπτύσσεται μεταξύ του ιόντος του Cu(II) και του οξυγόνου O(2'), το οποίο ανήκει στο καρβοξύλιο μορίου γλυκίνης ενός συμπλόκου του Cu(II) μιας γειτονικής ασύμμετρης μοναδιαίας κυψελίδας. Η απόσταση $\text{Cu}\dots\text{O}(2')$ υπολογίζεται σε 2.741(9) Å. Με βάση την περιγραφή του περιβάλλοντος συναρμογής οντότητας του Cu(II) που προηγήθηκε, η κρυσταλλογραφία δείχνει ότι το ιόν του Cu(II) βρίσκεται σε επίπεδη τετραγωνική γεωμετρία τύπου cis ενώ επιπλέον βρίσκεται σε παραμορφωμένη οκταεδρική γεωμετρία όταν στη σφαίρα συναρμογής περιλαμβάνονται οι ασθενείς αλληλεπιδράσεις με τα δύο άτομα οξυγόνου από το μόριο του νερού (O(5)) και το καρβοξύλιο (O(2')) της γλυκίνης γειτονικού μορίου. Οι τελευταίες αλληλεπιδράσεις δεν είναι δυνατό να χαρακτηρισθούν ως χημικοί δεσμοί καθώς τα μήκη τους είναι μεγαλύτερα από τα κλασικά μήκη δεσμών $\text{Cu}\dots\text{O}$ (1.946(9) – 1.957(9) Å).



Σχήμα 1: Το αμινοξύ γλυκίνη (gly)



Η ένωση $[\text{Cu}(\gamma\lambda\upsilon\kappa\iota\upsilon\alpha\tau\omicron)_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ εμφανίζεται με δύο ισομερή, το cis- $[\text{Cu}(\gamma\lambda\upsilon\kappa\iota\upsilon\alpha\tau\omicron)_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ και το trans- $[\text{Cu}(\gamma\lambda\upsilon\kappa\iota\upsilon\alpha\tau\omicron)_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ ισομερές. Από πλευράς συμμετρίας, το cis- $[\text{Cu}(\gamma\lambda\upsilon\kappa\iota\upsilon\alpha\tau\omicron)_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ ισομερές επιδεικνύει περισσότερες ζώνες απορρόφησης στο IR(Σχήμα) από ότι το trans- $[\text{Cu}(\gamma\lambda\upsilon\kappa\iota\upsilon\alpha\tau\omicron)_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ ισομερές. Τα φάσματα υπερύθρου (IR) έχουν μελετηθεί και για τα δύο ισομερή cis και trans.



Σχήμα: FT-IR φάσμα [Cu(γλυκινάτο)₂]:H₂O

Για την διεξαγωγή της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν επίσης τα ακόλουθα χημικά αντιδραστήρια:

- 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate διχλωροφλουροσκεΐνη (C₂₄H₁₆Cl₂O₇) από την Sigma-Aldrich (Munich, Γερμανία)
- Ιωδιούχο προπίδιο (C₂₇H₃₄I₂N₄) από την Sigma-Aldrich (Munich, Γερμανία)
- N-ακετυλ-κυστεΐνη (HSCH₂CH(NHCOCH₃)CO₂H) από την Sigma-Aldrich (Munich, Γερμανία)
- PBN *N-tert*-Butyl- α -phenylnitron από την Sigma-Aldrich (Munich, Γερμανία)

- Το αντικαρκινικό φάρμακο οξαλιπλατίνα ($C_8H_{14}N_2O_4Pt$) από την Sanofi-Aventis (Γαλλία)
- Το αντικαρκινικό φάρμακο cisplatin από την Sigma-Aldrich (Munich, Γερμανία)
- Όξινο ανθρακικό νάτριο ($NaHCO_3$) από την Merck (Darmstadt, Γερμανία)
- Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) από την Sigma-Aldrich (Munich, Γερμανία)
- Χλωριούχο ασβέστιο ($CaCl_2$) από την Sigma-Aldrich (Munich, Γερμανία)
- Χλωριούχο κάλιο (KCl) από την Panreac (Barcelona, Ισπανία)
- Χλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2$) από την Panreac (Barcelona, Ισπανία)
- Χλωριούχο νάτριο (NaCl) από την Panreac (Barcelona, Ισπανία)
- Xanthopren από την Heraeus Kulzer (Germany)
- HEPES από την Sigma-Aldrich (Munich, Γερμανία)
- Χρωμιο (K_2CrO_4) από την Sigma-Aldrich (Munich, Γερμανία)
- Σιδηρος ($FeCl_3$) την Sigma-Aldrich (Munich, Γερμανία)
- Κοβάλτιο $CoCl_2$ την Sigma-Aldrich (Munich, Γερμανία)
- Καλσεΐνη (Biochrom)
- Γλυκόζη την Sigma-Aldrich (Munich, Γερμανία)

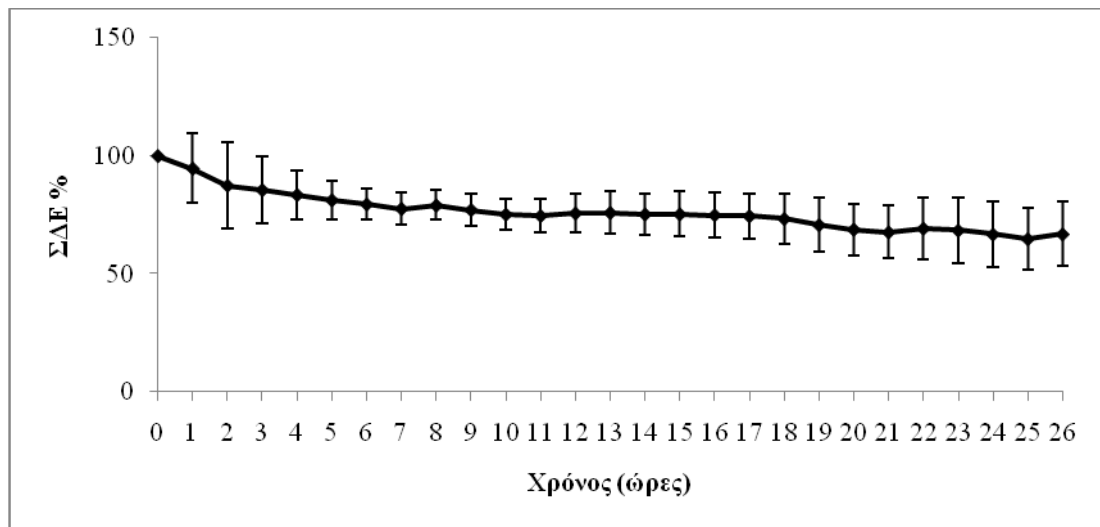
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Βιωσιμότητα του ισχιακού νεύρου υπό μακροχρόνιες κανονικές συνθήκες (*ex vivo*)

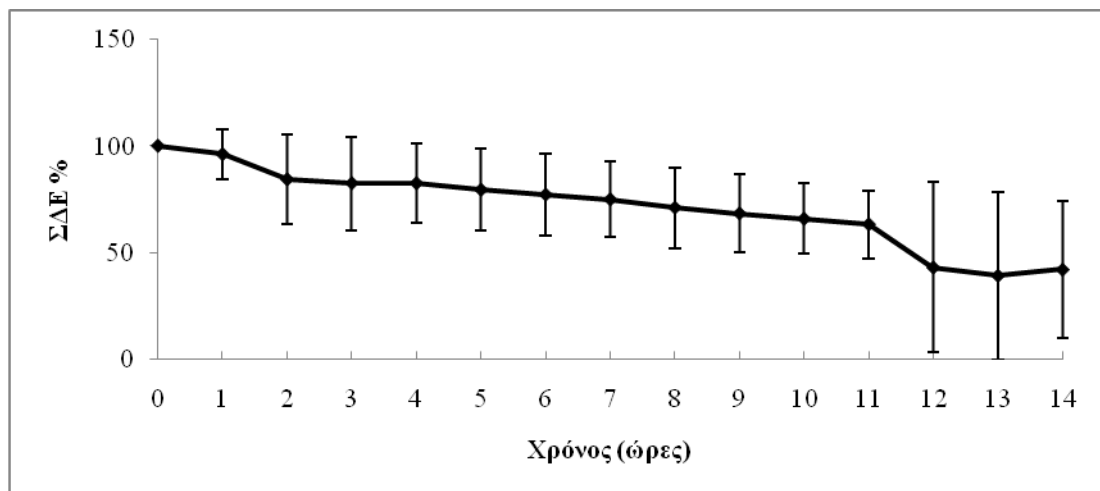
Για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας του ισχιακού νεύρου χρησιμοποιήθηκε η μεταβολή του ύψους του ΣΔΕ. Η βιωσιμότητα είναι δυνατό να ελεγχθεί και μέσω της μεταβολής της ενέργειας του ΣΔΕ η οποία αντιστοιχεί στο ολοκλήρωμα της καμπύλης που προκύπτει από το ΣΔΕ. Ωστόσο, ο υπολογισμός της ενέργειας δίνει αντίστοιχα αποτελέσματα με αυτά που προκύπτουν από τον υπολογισμό του ύψους. Επειδή ο υπολογισμός του ύψους μετράται πιο εύκολα συγκριτικά με την ενέργεια για το σύνολο των πειραμάτων στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιείται η μεταβολή του ΣΔΕ. Η βιωσιμότητα του ισχιακού νεύρου του επίμυος αξιολογήθηκε τόσο παρουσία όσο και απουσία του επινευρίου καθώς η αφαίρεσή του κρίθηκε αναγκαία σε ορισμένες ομάδες πειραμάτων προκειμένου να διευκολυνθεί η πρόσβαση της χημικής ουσίας που μελετάται στις νευρικές ίνες. Αρχικά, ο τρίχωρος θάλαμος καταγραφής, ο οποίος περιγράφεται παραπάνω, έφερε ηλεκτρόδια από άργυρο. Ενώ στη συνέχεια, στα πλαίσια βελτίωσης του συστήματος καταγραφής και αναζήτησης των βέλτιστων συνθηκών, τα ηλεκτρόδια αντικαταστάθηκαν από χρυσό. Η βελτιστοποίηση της βιωσιμότητας καθώς και η λήψη σταθερών μακροχρόνιων καταγραφών θεωρείται απαραίτητη για τον έλεγχο της επίδρασης χημικών ενώσεων των οποίων ο χρόνος δράσης είναι άγνωστος για το παρασκεύασμα που χρησιμοποιείται στην μελέτη αυτή.

Η παράμετρος που χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας του ισχιακού νεύρου είναι η τιμή IT_{50} , η οποία αντιστοιχεί στον χρόνο που απαιτείται ώστε το ύψος του ΣΔΕ να μειωθεί στο 50% της αρχικής του τιμής.

A

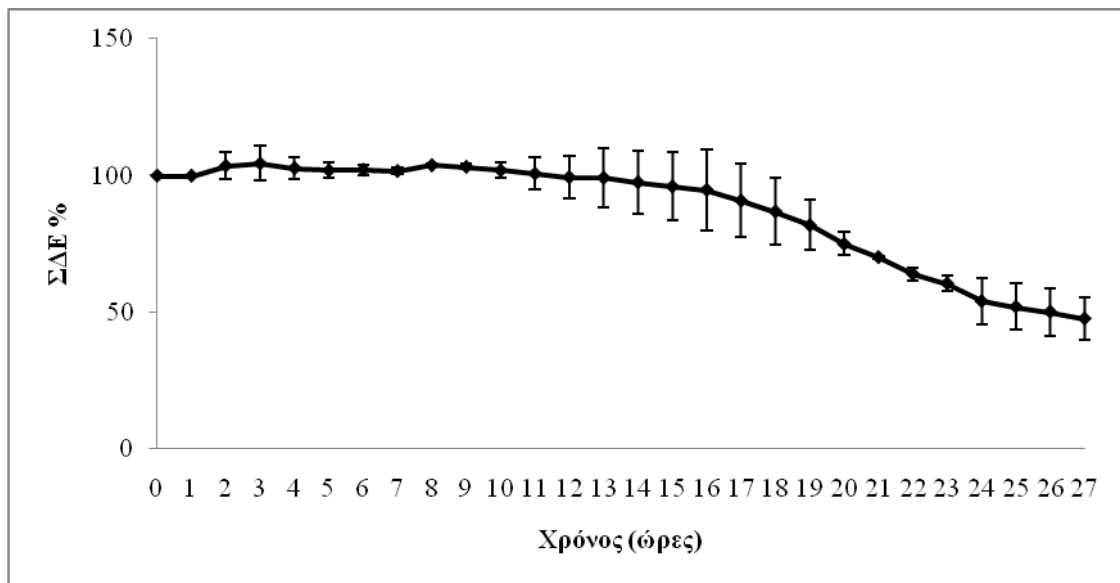


B

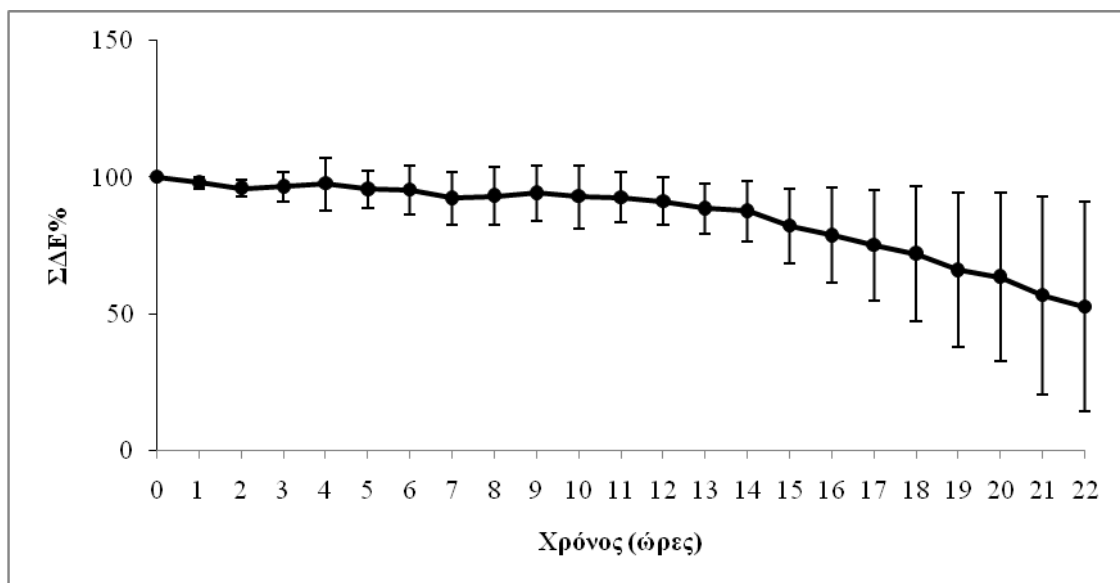


Εικόνα 3.1.A: Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμουσ σε συνάρτηση με τον χρόνο παρουσία του επινευρίου (A) και απουσία του επινευρίου (B) σε συνθήκες μάρτυρα (φυσιολογικός οξυγονωμένος ορός) με χρήση ηλεκτροδίων αργύρου στον τρίχωρο θάλαμο καταγραφής. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με την τυπική απόκλιση.

A

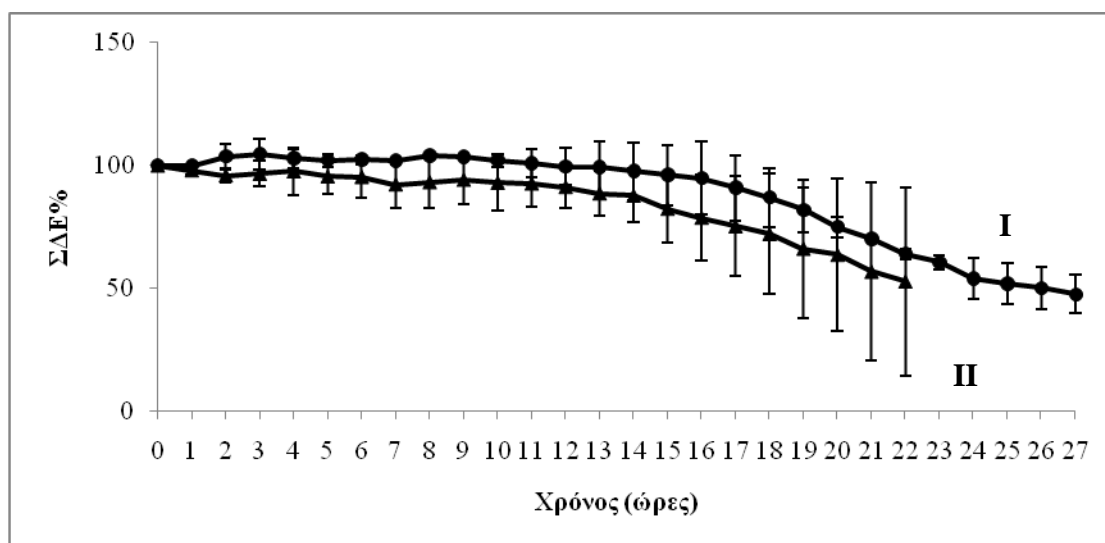


B



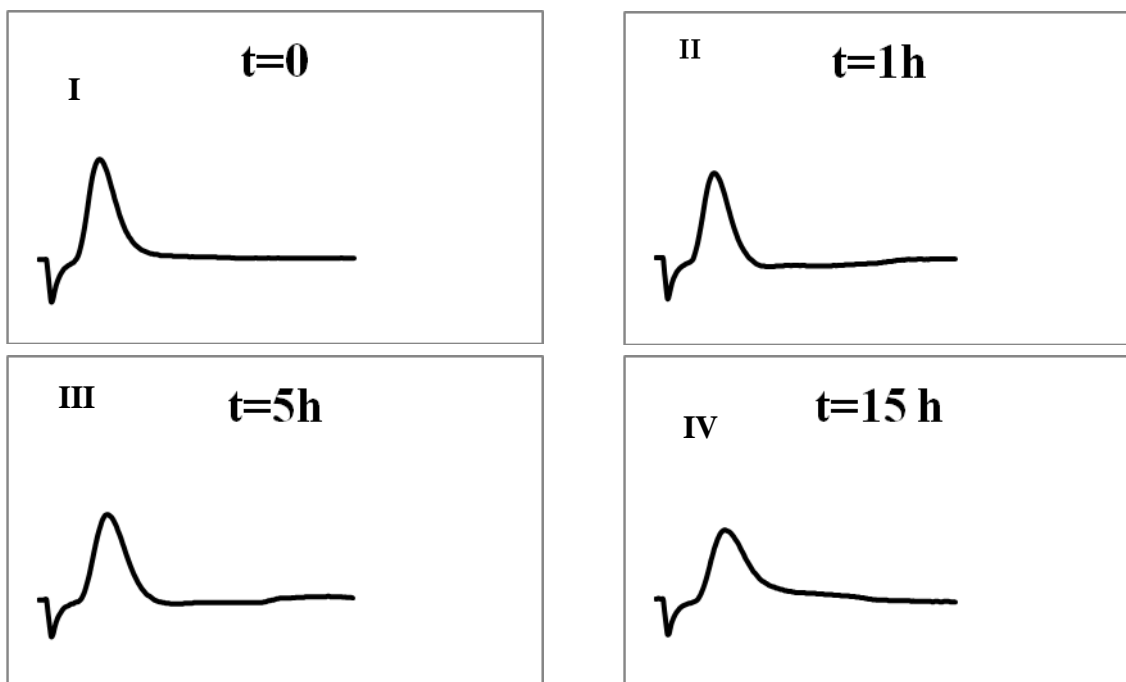
Εικόνα 3.1.B: Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμουσ σε συνάρτηση με τον χρόνο παρουσία του επινευρίου (A) και απουσία του επινευρίου (B) σε συνθήκες μάρτυρα (φυσιολογικός οξυγονωμένος ορός) με χρήση ηλεκτροδίων χρυσού στον τρίχωρο θάλαμο καταγραφής. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με την τυπική απόκλιση.

Η τιμή του IT_{50} παρουσία επινευρίου είναι μεγαλύτερη των 26 ωρών ενώ απουσία του επινευρίου η τιμή του IT_{50} μειώνεται στις 11,5 ώρες. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην οξειδωτική δράση του αργύρου. Ο άργυρος είναι φωτοευαίσθητος και κατά την διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος ενδέχεται να παράγονται οξείδια τα οποία καταπονούν οξειδωτικά τις νευρικές ίνες του ισχιακού νεύρου. Η οξειδωτική καταπόνηση γίνεται περισσότερο εμφανής στην περίπτωση όπου απουσιάζει το επινεύριο αφού οι ίνες έτσι είναι περισσότερο προσβάσιμες στις παραγόμενες ρίζες που μπορεί να παράγονται. Για τον λόγο αυτό τα ηλεκτρόδια του αργύρου αντικαταστάθηκαν με ηλεκτρόδια χρυσού. Ο χρυσός θεωρείται λιγότερο ενεργός χημικά σε σχέση με τον άργυρο χαρακτηριστικό που επιβεβαιώνεται από την σειρά δραστηρότητας των μετάλλων. Η τιμή του IT_{50} μετά την αντικατάσταση των ηλεκτροδίων αργύρου με ηλεκτρόδια χρυσού, έχει τιμή 24 ώρες παρουσία επινευρίου και 22 ώρες απουσία του επινευρίου. Στην συνέχεια γίνεται σύγκριση των δύο συνθηκών (παρουσία – απουσία του επινευρίου) όπου φαίνεται ότι η διατήρηση ή μη του επινευρίου δεν επηρεάζει την βιωσιμότητα των νευρικών ιών σε συνθήκες μάρτυρα.



Εικόνα 3.1.Γ: Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος σε συνάρτηση με τον χρόνο παρουσία του επινευρίου (I) και απουσία του επινευρίου (II) σε συνθήκες μάρτυρα (φυσιολογικός οξυγονωμένος ορός) με χρήση ηλεκτροδίων χρυσού στον τρίχωρο θάλαμο καταγραφής. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με την τυπική απόκλιση.

Πέρα από την μεταβολή του ΣΔΕ, υπολογίστηκαν οι α) η μεταβολή του χρόνου της ανόδου καθώς και η διάρκεια του ΣΔΕ. Οι παράμετροι αυτές παρέμειναν σταθερές κατά την διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος χωρία να παρουσιάζουν κάποια αξιοσημείωτη μεταβολή.

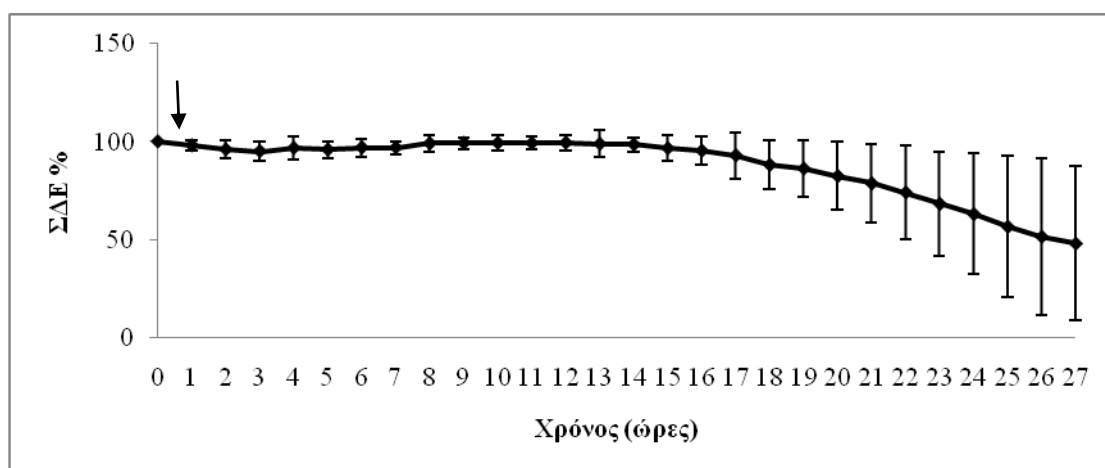


Εικόνα 3.1.Δ: Καταγραφές του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος απουσία του επινευρίου σε συνθήκες μάρτυρα (φυσιολογικός οξυγονωμένος ορός) με χρήση ηλεκτροδίων χρυσού στον τρίχωρο θάλαμο καταγραφής την χρονική στιγμή $t=0$ (I), μετά από 1 ώρα (II), 5 ώρες (III) και 15 ώρες (IV).

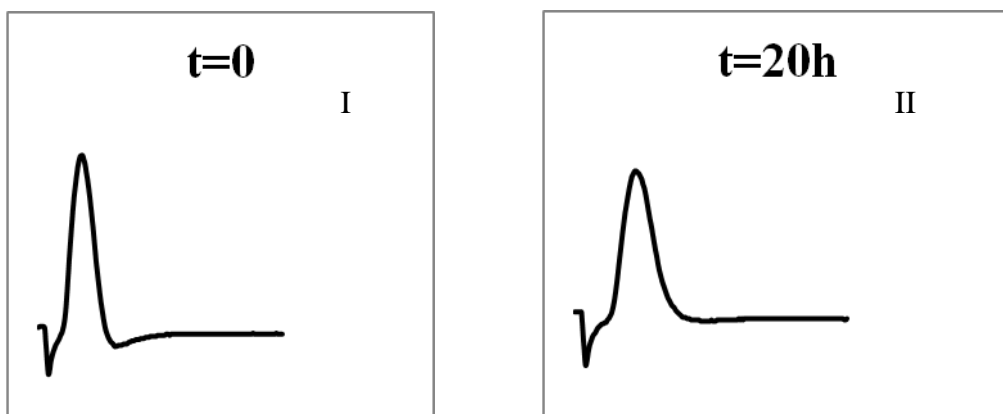
3.2 Βιωσιμότητα των περιφερικών ιών του ισχιακού νεύρου του επίμυος υπό την επίδραση μεταλλοτοξινών

3.2.1 Σίδηρος

Για την αξιολόγηση της δράσης του σιδήρου στις νευρικές ίνες του ισχιακού νεύρου χρησιμοποιήθηκε η ένωση χλωριούχος σίδηρος (FeCl_3) η οποία είναι υδατοδιαλυτή σε συγκέντρωση 500 μM . Από το ισχιακό νεύρο αφαιρείται το επινεύριο και μετά από μία ώρα καταγραφής προκειμένου να σταθεροποιηθεί το $\Sigma\Delta\text{E}$, στον ενδιάμεσο χώρο του τρίχωρου θαλάμου, στο διαμέρισμα εμποτισμού προστίθεται FeCl_3 . Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως ο FeCl_3 δεν έχει καμία επίδραση επί των νευρικών ιών καθώς η τιμή του IT_{50} ισούται με 25.5 ± 0.1 και δεν έχει σημαντική διαφορά από εκείνη του μάρτυρα για το ίδιο χρονικό διάστημα καταγραφών. Επιπλέον, ο FeCl_3 φαίνεται πως δεν επιδρά ούτε στον χρόνο ανόδου αλλά ούτε και στην διάρκεια του $\Sigma\Delta\text{E}$.



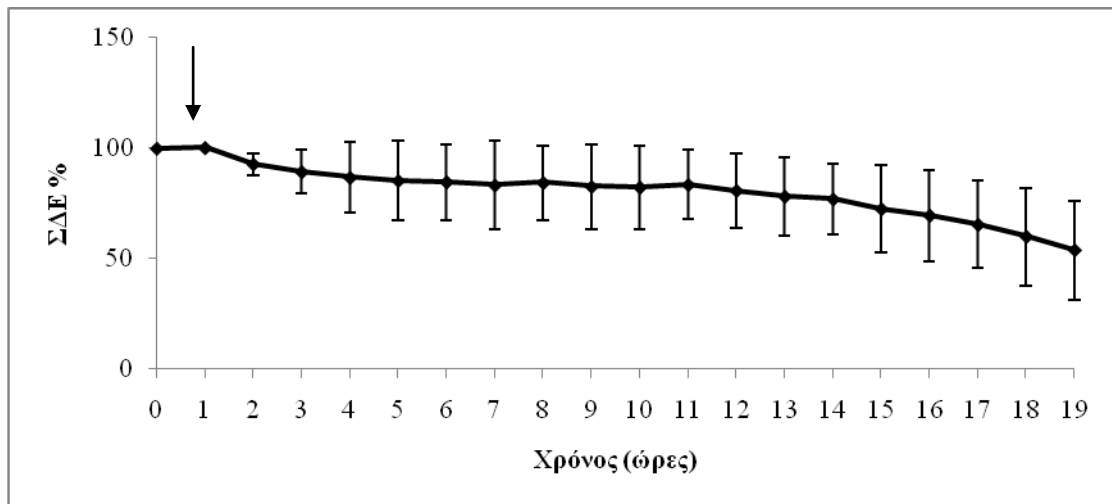
Εικόνα 3.2.1Α: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του $\Sigma\Delta\text{E}$ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του FeCl_3 σε συγκέντρωση 500 μM ($n=4$). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του FeCl_3 . Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.



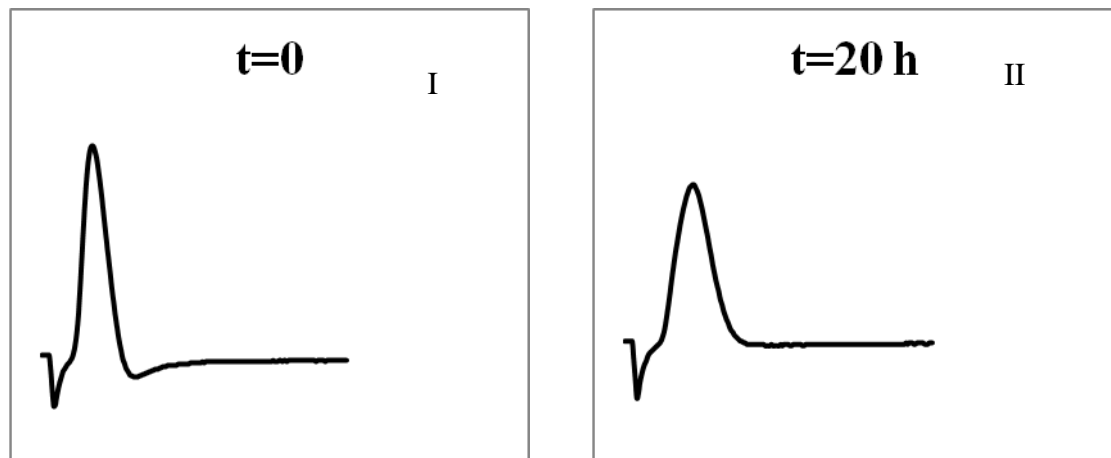
Εικόνα 3.1.2B: Καταγραφές του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος απουσία του επινευρίου την χρονική στιγμή $t=0$ (I) και έπειτα από 20 ώρες (II).

3.2.2 Κοβάλτιο

Όμοια, για την αξιολόγηση της δράσης του κοβαλτίου στις νευρικές ίνες του ισχιακού νεύρου χρησιμοποιήθηκε η ένωση χλωριούχο κοβάλτιο CoCl_2 , η οποία είναι και αυτή υδατοδιαλυτή, σε συγκέντρωση 500 μM . Από το ισχιακό νεύρο αφαιρείται το επινεύριο και μετά από μία ώρα καταγραφής προκειμένου να σταθεροποιηθεί το ΣΔΕ, στον ενδιάμεσο χώρο του τρίχωρου θαλάμου, στο διαμέρισμα εμποτισμού προστίθεται CoCl_2 . Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως το CoCl_2 δεν έχει σχεδόν καμία επίδραση επί των νευρικών ιών καθώς η τιμή του IT_{50} δεν έχει ιδιαίτερα σημαντική διαφορά από εκείνη του μάρτυρα για το ίδιο χρονικό διάστημα καταγραφών. Επιπλέον, όπως και ο FeCl_3 φαίνεται πως δεν επιδρά ούτε στον χρόνο ανόδου αλλά ούτε και στην διάρκεια του ΣΔΕ.



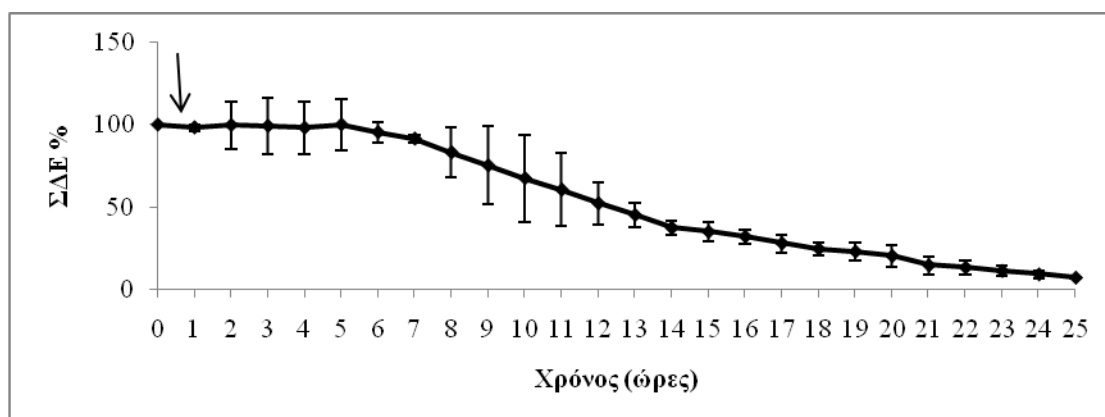
Εικόνα 3.2.2Α: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του CoCl_2 σε συγκέντρωση $500 \mu\text{M}$ ($n=3$). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του CoCl_2 . Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.



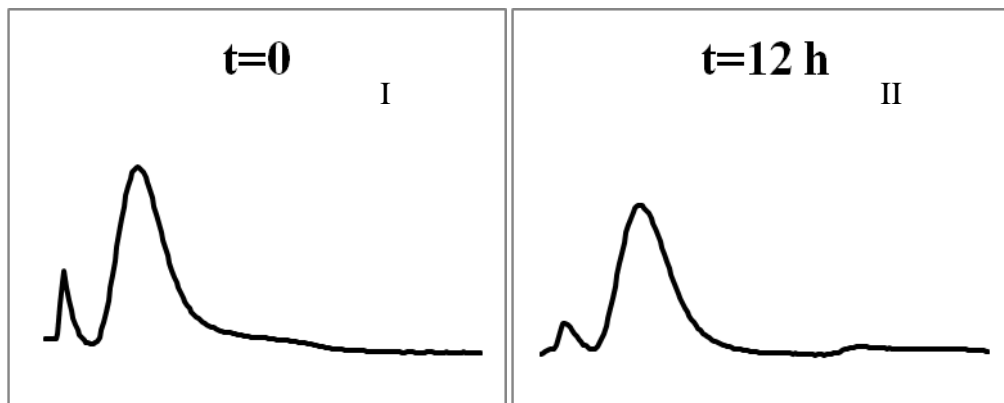
Εικόνα 3.2.2Β: Καταγραφές του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος απουσία του επινευρίου την χρονική στιγμή $t=0$ (I) και έπειτα από 20 ώρες (II).

3.2.3 Δημήτριο

Στα ίδια πλαίσια, για την αξιολόγηση της δράσης του ιόντος του δημητρίου στις νευρικές ίνες του ισχιακού νεύρου χρησιμοποιήθηκε η ένωση χλωριούχο δημήτριο CeCl_3 , η οποία είναι και αυτή υδατοδιαλυτή, σε συγκέντρωση 500 μM . Από το ισχιακό νεύρο αφαιρείται το επινεύριο και μετά από μία ώρα καταγραφής προκειμένου να σταθεροποιηθεί το $\Sigma\Delta\text{E}$, στον ενδιάμεσο χώρο του τρίχωρου θαλάμου, στο διαμέρισμα εμποτισμού προστίθεται CeCl_3 . Από τα αποτελέσματα προκύπτει πως το CeCl_3 έχει σχεδόν ήπια επίδραση επί των νευρικών ιών καθώς η τιμή του IT_{50} αντιστοιχεί σε 12.22 ± 0.24 ώρες η οποία παρουσιάζει διαφορά από εκείνη του μάρτυρα για το ίδιο χρονικό διάστημα καταγραφών. Ωστόσο, το CeCl_3 φαίνεται πως δεν επιδρά ούτε στον χρόνο ανόδου αλλά ούτε και στην διάρκεια του $\Sigma\Delta\text{E}$.



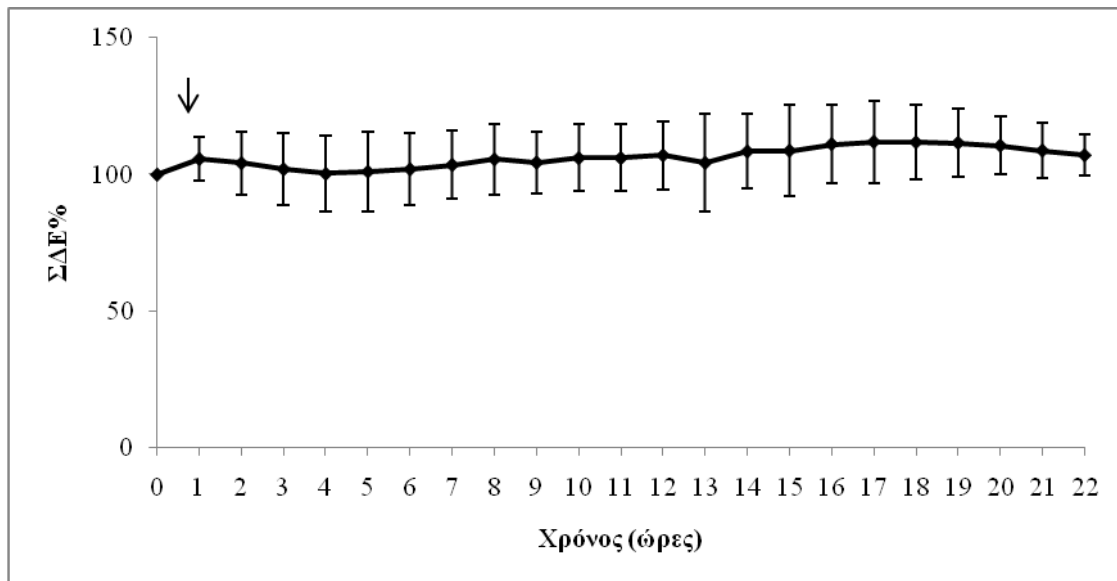
Εικόνα3.2.3Α: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του $\Sigma\Delta\text{E}$ του ισχιακού νεύρου του επίμοου, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του CeCl_3 σε συγκέντρωση 500 μM ($n=3$). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του CeCl_3 . Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.



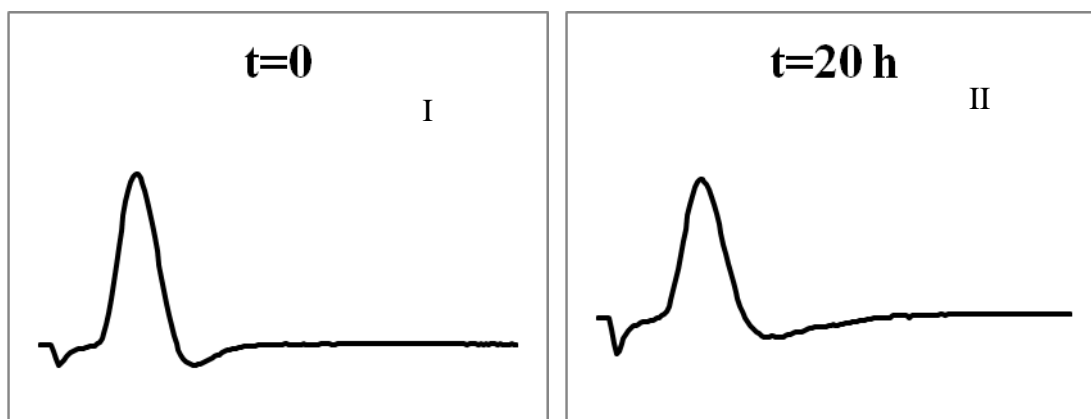
Εικόνα 3.2.3Α: Καταγραφές του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος απουσία του επινευρίου την χρονική στιγμή $t=0$ (I) και έπειτα από 12 ώρες (II).

3.2.4 Αργίλιο

Για την αξιολόγηση της δράσης του αργιλίου στις νευρικές ίνες του ισχιακού νεύρου χρησιμοποιήθηκε η ένωση χλωριούχο αργίλιο (AlCl_3), η οποία είναι υδατοδιαλυτή σε συγκέντρωση 500 μM . Από το ισχιακό νεύρο αφαιρείται το επινεύριο και μετά από μία ώρα καταγραφής προκειμένου να σταθεροποιηθεί το ΣΔΕ, στον ενδιάμεσο χώρο του τρίχωρου θαλάμου, στο διαμέρισμα εμποτισμού προστίθεται AlCl_3 . Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως το AlCl_3 δεν έχει καμία επίδραση επί των νευρικών ινών καθώς η τιμή του IT_{50} δεν έχει σημαντική διαφορά από εκείνη του μάρτυρα για το ίδιο χρονικό διάστημα καταγραφών. Επιπλέον, το AlCl_3 φαίνεται πως δεν επιδρά ούτε στον χρόνο ανόδου, αλλά ούτε και στην διάρκεια του ΣΔΕ.



Εικόνα 3.2.4Α: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμους, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του AlCl_3 σε συγκέντρωση $500 \mu\text{M}$ ($n=3$). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του AlCl_3 . Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

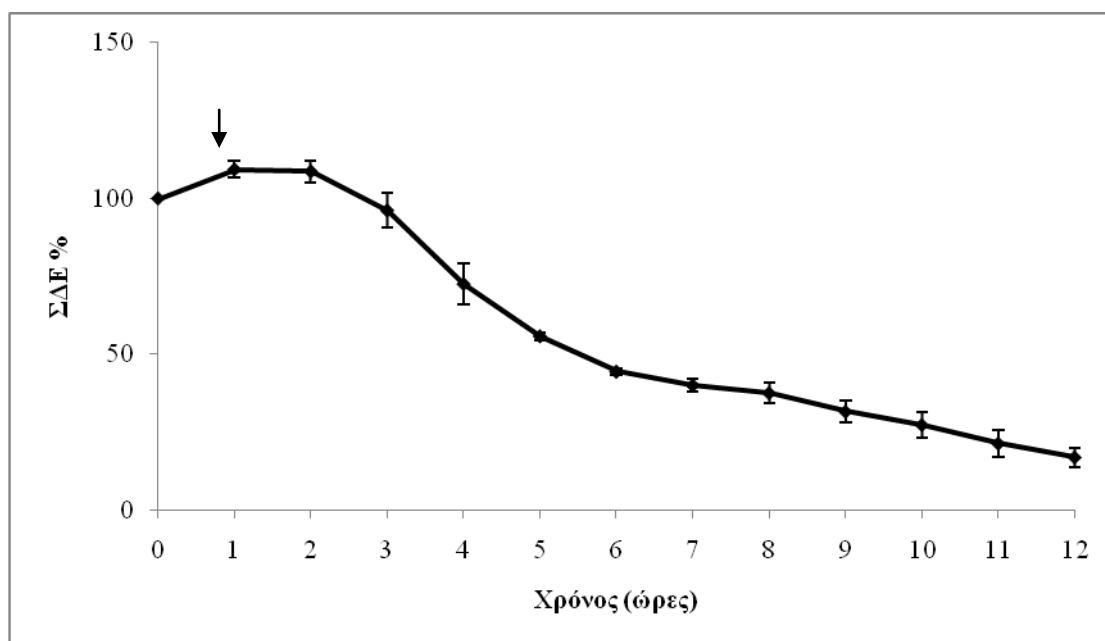


Εικόνα 3.2.4Β: Καταγραφές του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμους απουσία του επινευρίου την χρονική στιγμή $t=0$ (I) και έπειτα από 20 ώρες (II).

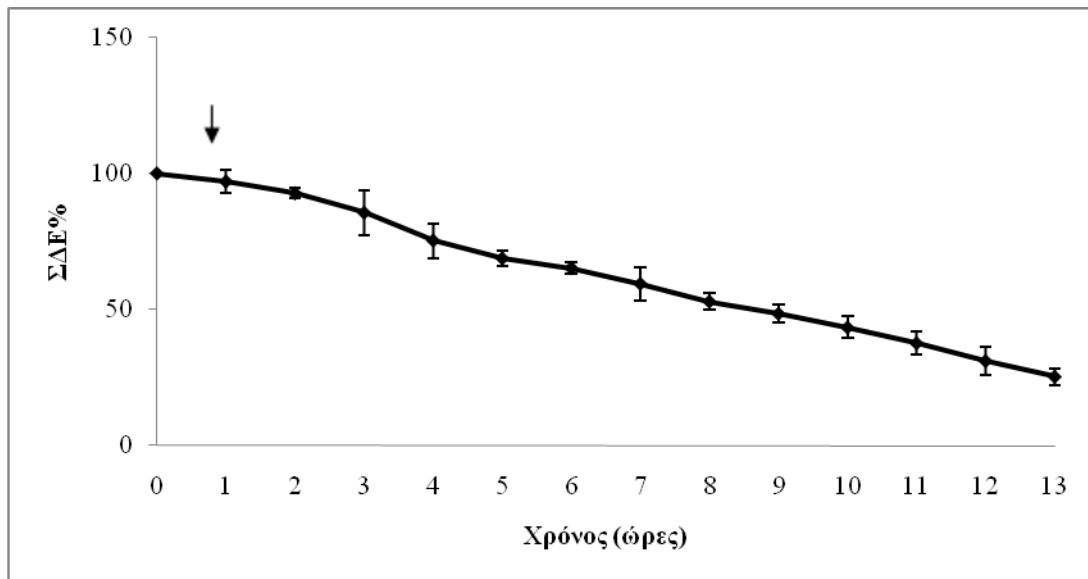
3.2.5 Χρώμιο

Όμοια, για την αξιολόγηση της δράσης του εξασθενούς χρωμίου στις νευρικές ίνες του ισχιακού νεύρου χρησιμοποιήθηκε η ένωση χρωμικό κάλιο (K_2CrO_4), η οποία είναι και αυτή υδατοδιαλυτή σε αντίθεση με το χλωριούχο χρώμιο το οποίο σε pH 7.4 είναι αδιάλυτο σε υδατικό διαλύτη. Η συγκέντρωση που ελέγχθηκε είναι και εδώ $500 \mu\text{M}$. Από το ισχιακό νεύρο αφαιρείται το επινεύριο και μετά από μία ώρα καταγραφής προκειμένου να σταθεροποιηθεί το ΣΔΕ, στον ενδιάμεσο χώρο του

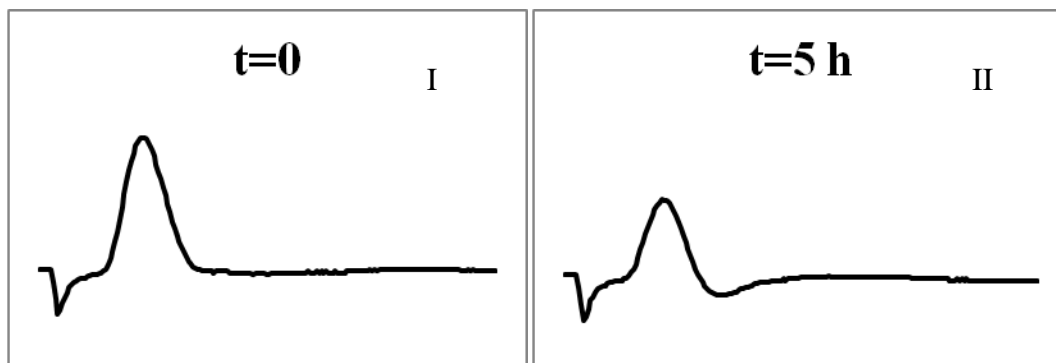
τρίχωρου θαλάμου, στο διαμέρισμα εμποτισμού προστίθεται το υπό μελέτη ιόν. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως το Cr(VI) έχει σαφή επίδραση επί των νευρικών ιών καθώς η τιμή του IT₅₀ παρουσιάζει ιδιαίτερα σημαντική διαφορά από εκείνη του μάρτυρα για το ίδιο χρονικό διάστημα καταγραφών. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε έλεγχος και σε χαμηλότερη συγκέντρωση η οποία αντιστοιχεί σε 200 μM. Όμοια, παρατηρείται σημαντική διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα, ωστόσο με σχετικά μεγαλύτερο IT₅₀ υποδεικνύοντας τοξικότητα η οποία μπορεί να εξαρτάται από την συγκέντρωση του υπό μελέτη παράγοντα. Πιο συγκεκριμένα, η τιμή IT₅₀ είναι 5.7±0.4 μετά από επίδραση με 500 μM και 7.8±0.2 ώρες μετά από επίδραση με 200μM. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω το χρώμιο στην εξασθενή του μορφή επιδεικνύει έντονη βιολογική δραστηριότητα σε αντίθεση με το τρισθενές χρώμιο το οποίο βιολογικά αδρανές.



Εικόνα 3.2.5A: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμου, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του K₂CrO₄ σε συγκέντρωση 500 μM (n=3). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του K₂CrO₄. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.



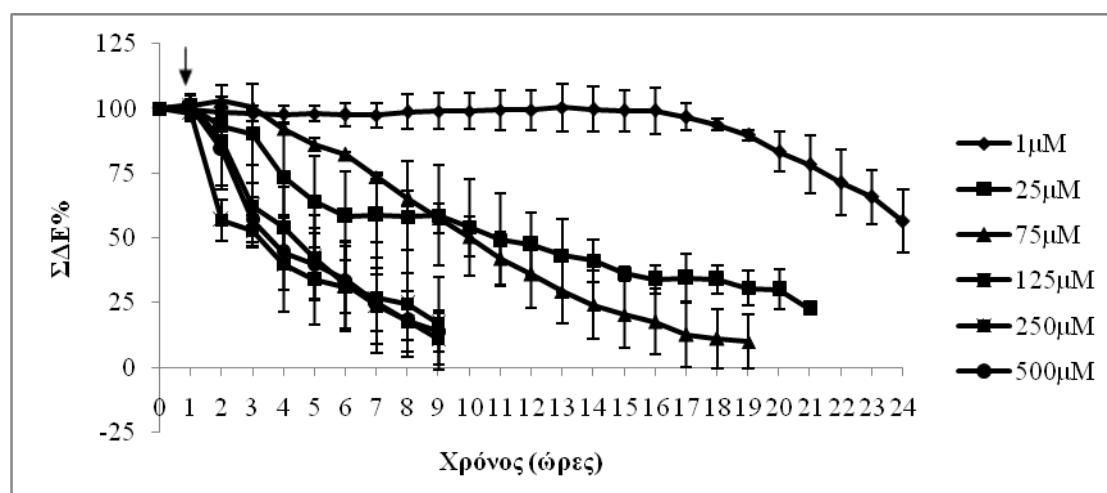
Εικόνα 3.2.5.Β: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμους, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του K_2CrO_4 σε συγκέντρωση 200 μM ($n=3$). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του K_2CrO_4 . Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.



Εικόνα 3.2.5.Γ: Καταγραφές του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμους απουσία του επινευρίου την χρονική στιγμή $t=0$ (I) και έπειτα από 5 ώρες (II) μετά από επώαση σε 500 μM εξασθενούς χρωμίου.

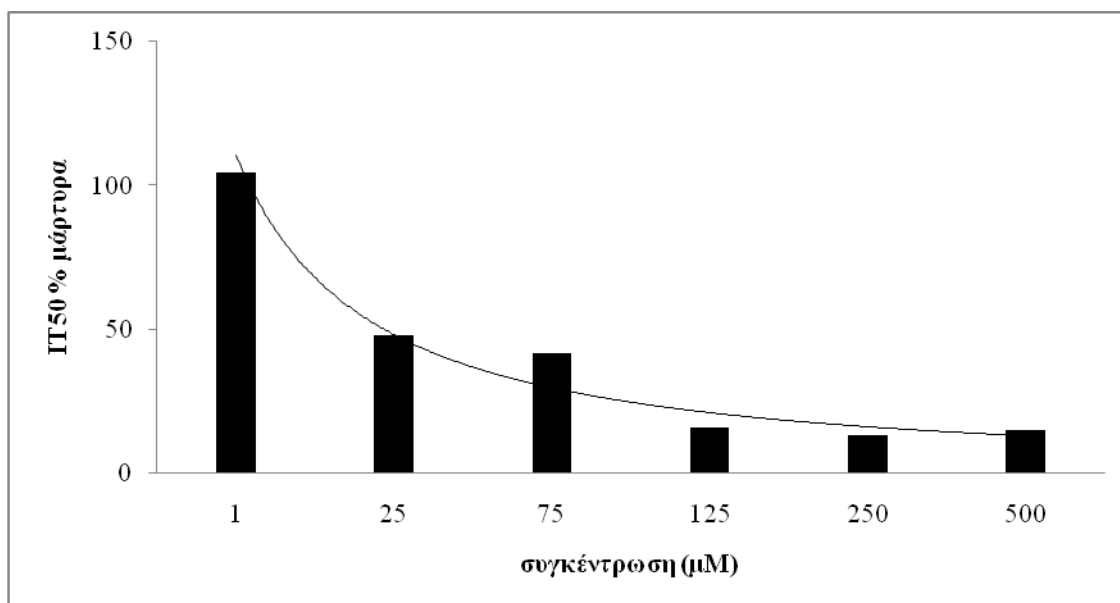
3.2.6 Χαλκός

Τέλος πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της δράσης του χαλκού στις νευρικές ίνες του ισχιακού νεύρου. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η ένωση γλυκινικός χαλκός $cis-[Cu(II)(glycinate)_2] \cdot H_2O$ ($cis-CuGly$) η οποία είναι υδατοδιαλυτή σε συγκεντρώσεις 1, 25, 75, 125, 250 και 500 μM . Από το ισχιακό νεύρο αφαιρείται το επινεύριο και μετά από μία ώρα καταγραφής, προκειμένου να σταθεροποιηθεί το ΣΔΕ, στον ενδιάμεσο χώρο του τρίγωνου θαλάμου, στο διαμέρισμα εμποτισμού προστίθεται $Cu(II)$. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως το ιόν του δισθενούς χαλκού παρουσιάζει σαφή νευροτοξική δράση με τρόπο που εξαρτάται από την συγκέντρωση του μεταλλοϊόντος. Αξίζει να αναφερθεί ότι ο χρόνος ανόδου καθώς και η διάρκεια του ΣΔΕ δεν επηρεάζονται από την παρουσία της συγκεκριμένης μεταλλοτοξίνης



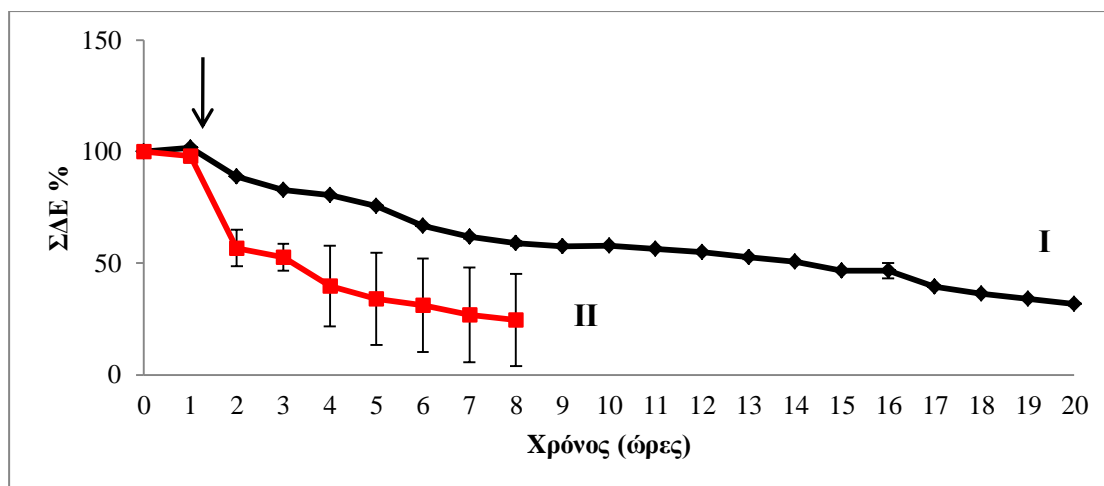
Εικόνα 3.2.6Α: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμουσ, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του $Cu(II)$ σε συγκεντρώσεις από 1 μM έως 500 μM ($n=3$, ανά συνθήκη). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του $Cu(II)$. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

$cis-[Cu(II)-glycinate]$						
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (μM)	1	25	75	125	250	500
IT₅₀	23.55±0.14	10.84±0.54	9.39±0.17	3.64±0.23	2.98±0.46	3.4±0.31



3.2.6.1 Συντελεστής διαπερατότητας επινευρίου

Για τον καθορισμό της διαπερατότητας του επινευρίου του ισχιακού νεύρου του επίμυος υπολογίστηκε η τιμή του λόγου του IT_{50} παρουσία του επινευρίου προς την τιμή του IT_{50} απουσία του επινευρίου για την συγκεκριμένη χημική ένωση που μελετάται [Cu(II)]. Για τον υπολογισμό της τιμής αυτής επιλέχθηκε η συγκέντρωση των 250μM. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι τα νεύρα που εκτέθηκαν στο μεταλλοϊόν του χαλκού με διατήρηση του επινευρίου παρουσίασαν μικρότερη μείωση της βιωσιμότητας στον ίδιο χρονικό διάστημα σε σχέση με αυτά όπου το επινεύριο αφαιρέθηκε. Πιο συγκεκριμένα το IT_{50} παρουσία του επινευρίου έχει τιμή 12.56 ± 0.53 ενώ όπως αναφέρθηκε και παραπάνω το IT_{50} μετά από αφαίρεση του επινευρίου αντιστοιχεί σε 2.56 ± 0.46 . Συνεπώς, η παρουσία του επινευρίου επιφέρει 4.2 φορές πιο αργή μείωση του ΣΔΕ μετά από επίδραση με Cu(II) και άρα το επινεύριο δεν είναι πλήρως και άμεσα περατό από τα μεταλλοϊόντα του χαλκού.



Εικόνα3.2.6.1.A: Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος σε συνάρτηση με τον χρόνο παρουσία του επινευρίου (I) και απουσία του επινευρίου (II) χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του Cu(II) σε συγκέντρωση 250μM (n=3, ανά συνθήκη). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του Cu(II). Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

$$\frac{IT_{50}(\text{παρουσία επινευρίου})}{IT_{50}(\text{απουσία επινευρίου})}$$

$$IT_{50}(\text{παρουσία επινευρίου}) = 12.56 \pm 0.53$$

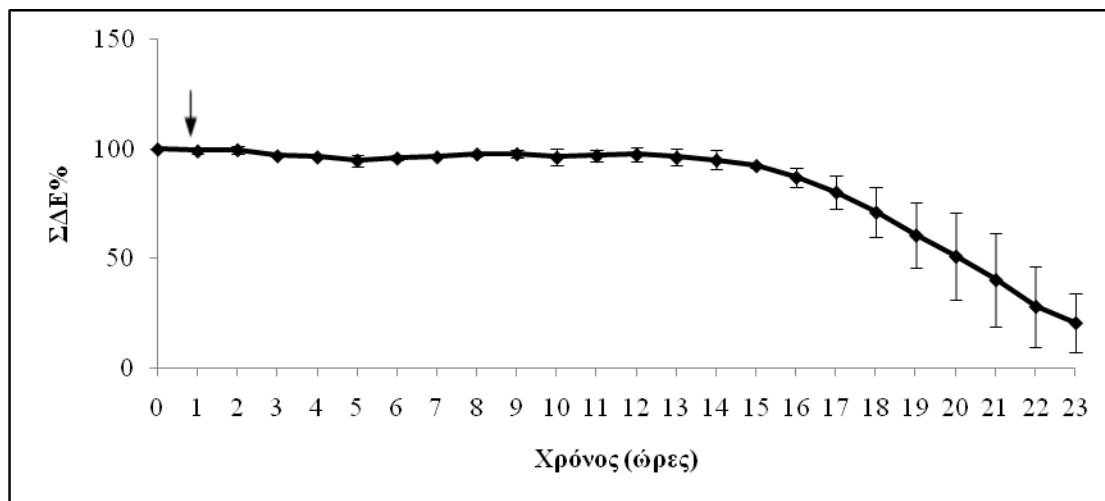
$$IT_{50}(\text{απουσία επινευρίου}) = 2.98 \pm 0.46$$

$$\text{Συντελεστής διαπερατότητας επινευρίου} \rightarrow 4.214765$$

3.2.6.2 Γλυκίνη

Στην συνέχεια έγινε προσπάθεια αποσαφήνισης της νευροτοξικής δράσης του συγκεκριμένου συμπλόκου cis [Cu(II)-glycinate]. Για τον λόγο αυτό αρχικά πραγματοποιήθηκε έκθεση των νευρικών ινών για το ίδιο χρονικό διάστημα μόνο στον υποκαταστάτη του γλυκινικού χαλκού, το αμινοξύ γλυκίνη και σε συγκέντρωση 500 μM. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως η παρουσία της γλυκίνης ακόμη και σε μεγάλη συγκέντρωση δεν επηρεάζει την βιωσιμότητα του ισχιακού νεύρου κάνοντας

παράλληλα σαφές πως η όποια τοξικότητα παρατηρείται μετά από επώαση με [Cu(II)-glycinate], οφείλεται στην παρουσία του μεταλλοϊόντος. Η τιμή του IT_{50} ισούται με 19.05 ± 0.08 ώρες.

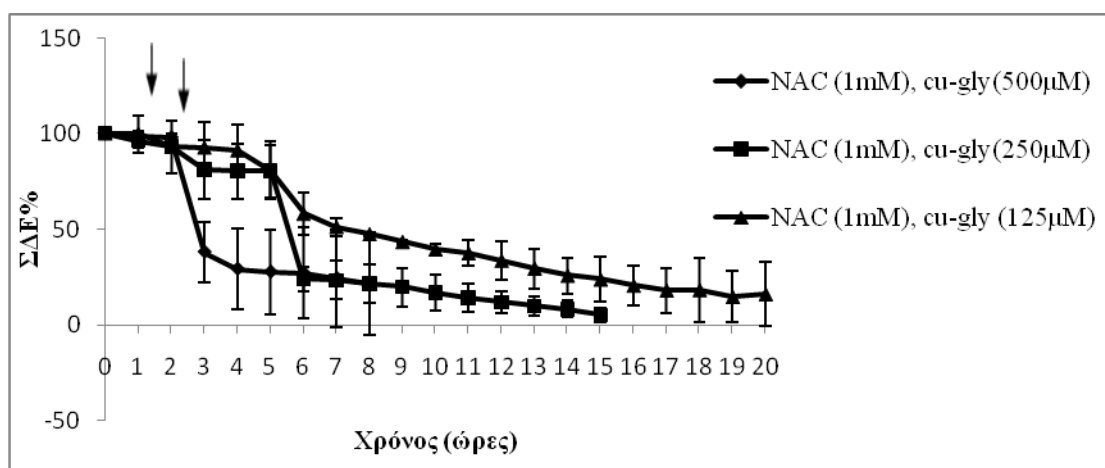


Εικόνα 3.2.6.2: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του αμινοξέος γλυκίνη σε συγκέντρωση $500 \mu\text{M}$ ($n=3$). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του αμινοξέος. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

3.2.6.3 N-ακετυλοκυστεΐνη (NAC)

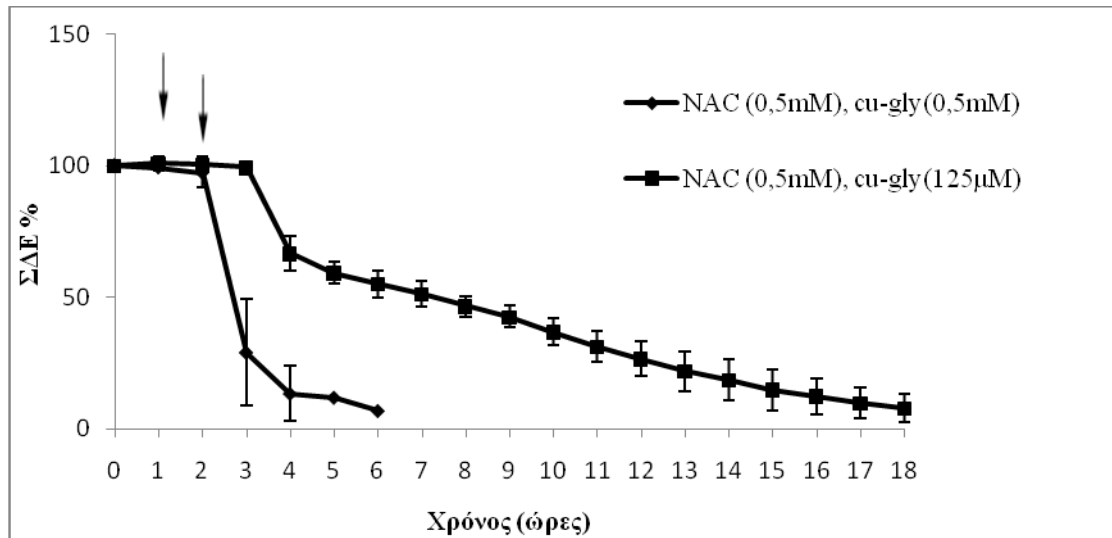
Προκειμένου να διερευνηθεί η εμπλοκή της παραγωγής ελεύθερων ριζών στην μεταβολή του ΣΔΕ που παρατηρείται μετά από επίδραση με Cu(II), χρησιμοποιήθηκε το γνωστό αντιοξειδωτικό μόριο N-ακετυλοκυστεΐνη (NAC). Το NAC έχει την ιδιότητα να δεσμεύει την τις παραγόμενες ελεύθερες ρίζες οξυγόνου με αποτέλεσμα να αναστέλλει την τοξική τους δράση όπως έχει δειχθεί και σε άλλες εργασίες. Το NAC δεν επηρεάζει την βιωσιμότητα του ισχιακού νεύρου σε συγκέντρωση μέχρι και 1mM . Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε προ-επώαση του ισχιακού νεύρου για μία ώρα με NAC (1mM ή 0.5mM) αφού σταθεροποιήθηκε το ΣΔΕ και στην συνέχεια προστέθηκε Cu(II) σε τελική συγκέντρωση 125 , 250 και $500 \mu\text{M}$ προκειμένου να διερευνηθεί η σχετική αναλογία (στοιχειομετρικά) όπου το NAC μπορεί να δράσει νευροπροστατευτικά έναντι του Cu(II). Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως η παρουσία του NAC οδηγεί σε μικρή αύξηση του IT_{50} του ισχιακού νεύρου όταν εκτίθεται σε Cu(II) ωστόσο η αντιοξειδωτική του δράση εξαρτάται από την συγκέντρωση της μεταλλοτοξίνης. Προεπώαση του ισχιακού

νεύρου με 1mM NAC και στη συνέχεια προσθήκη 500 μ M αντιστοιχεί σε IT_{50} ίσο με 1.69 ± 0.51 . Επιπλέον, προεπώαση με 1 mM NAC και ακόλουθη προσθήκη 250 και 125 μ M Cu(II) οδηγεί σε IT_{50} ίσο με 3.79 ± 0.33 και 7.26 ± 0.41 ώρες. Προεπώαση του ισχιακού νεύρου με 0,5 mM NAC και στη συνέχεια προσθήκη 500 μ M Cu(II) αντιστοιχεί σε IT_{50} ίσο με 6.04 ± 0.35 ενώ προεπώαση του ισχιακού νεύρου με 0.5 mM NAC και στη συνέχεια προσθήκη 125 μ M αντιστοιχεί σε IT_{50} ίσο με 2.7 ± 0.12 . Ακόμα, Συμπεραίνεται λοιπόν ότι η παρουσία του Cu(II) συντελεί στην παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου.



Εικόνα 3.2.6.3.A: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του Cu(II) σε συγκεντρώσεις 152,250 και 500 μ M (n=3 ανά συνθήκη) μετά από προ-επώαση με 1 mM NAC. Τα βέλη υποδεικνύουν την χρονική στιγμή προσθήκης της κάθε ουσίας αντίστοιχα. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

NAC (1mM)			
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	125	250	500
Cu(II) (μM)			
IT ₅₀	1.69±0.51	3.79±0.33	7.26±0.41

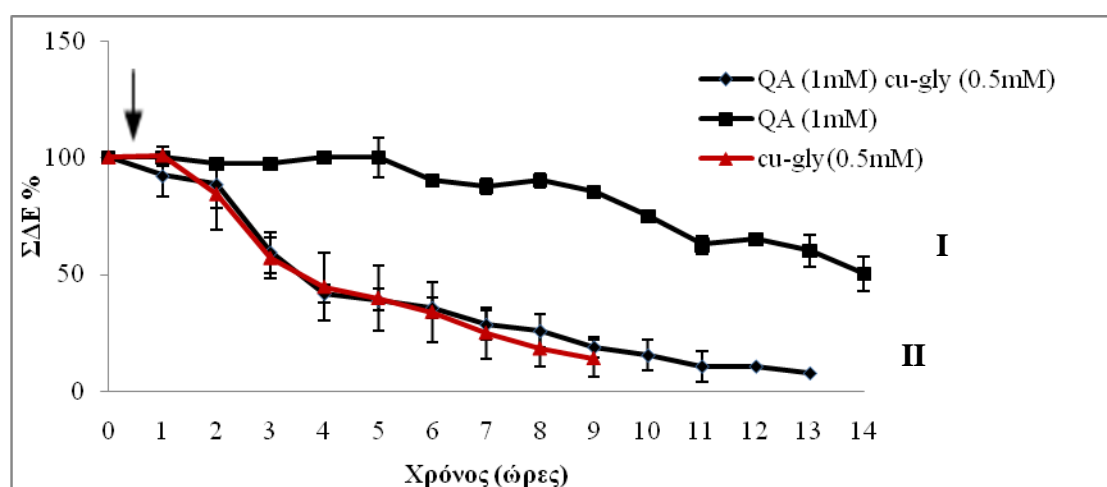


Εικόνα 3.2.6.3.B: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του Cu(II) σε συγκεντρώσεις 152, 250 και 500 μM (n=3 ανά συνθήκη) μετά από προ-επώαση με 1 0.5 mM NAC. Τα βέλη υποδεικνύουν την χρονική στιγμή προσθήκης της κάθε ουσίας αντίστοιχα. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

NAC (0,5 mM)		
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	125	500
Cu(II) (μM)		
IT ₅₀	6.04±0.38	2.7±0.12

3.2.6.4 Κινικό οξύ (quinic acid- QA)

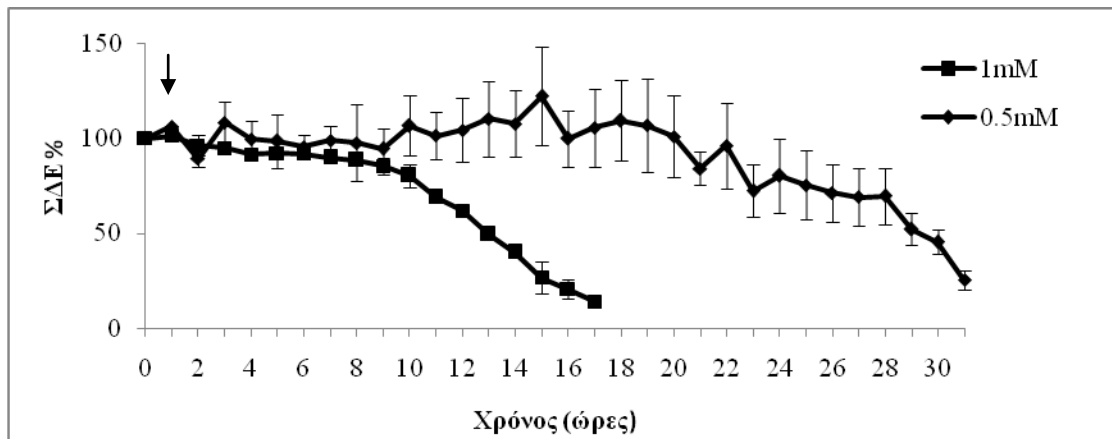
Όμοια πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της νευροπροστατευτικής δράσης του αντιοξειδωτικού και χηλικοποιητικού μορίου κινικό οξύ. Το κινικό οξύ είναι φυσικό μόριο και απαντάται κυρίως στα φυτά σε συγκεντρώσεις της τάξης των mM. Επιπλέον χρησιμοποιείται ως υποκαταστάτης πολλών μετάλλων λόγω της ιδιότητάς του να χηλικοποιεί. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 1mM. Το ισχιακό νεύρο επώαστηκε για μία ώρα με QA και στην συνέχεια προστέθηκε το Cu(II) σε τελική συγκέντρωση 500 μ M. Παράλληλα ελέγχθηκε η επίδραση του κινικού οξέος στην βιωσιμότητα του ισχιακού νεύρου σε συγκέντρωση 1mM. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι μειώνει ελάχιστα την βιωσιμότητα των ιών του ισχιακού νεύρου. Ωστόσο, φαίνεται να μην επιφέρει καμία μεταβολή στην τοξική επίδραση η οποία οφείλεται στην δράση της μεταλλοτοξίνης [(IT₅₀ παρουσία QA/Cu(II) ίσο με IT₅₀ παρουσία Cu(II)]. Η παρατήρηση αυτή ενδεχομένως να οφείλεται και σε θερμοδυναμικά δεδομένα καθώς η συμπλοκοποίηση του κινικού οξέος με τον χαλκό δεν είναι σταθερή με αποτέλεσμα του κινικού οξέου να μη μπορεί να δράσει χηλικοποιητικά έναντι του χαλκού.



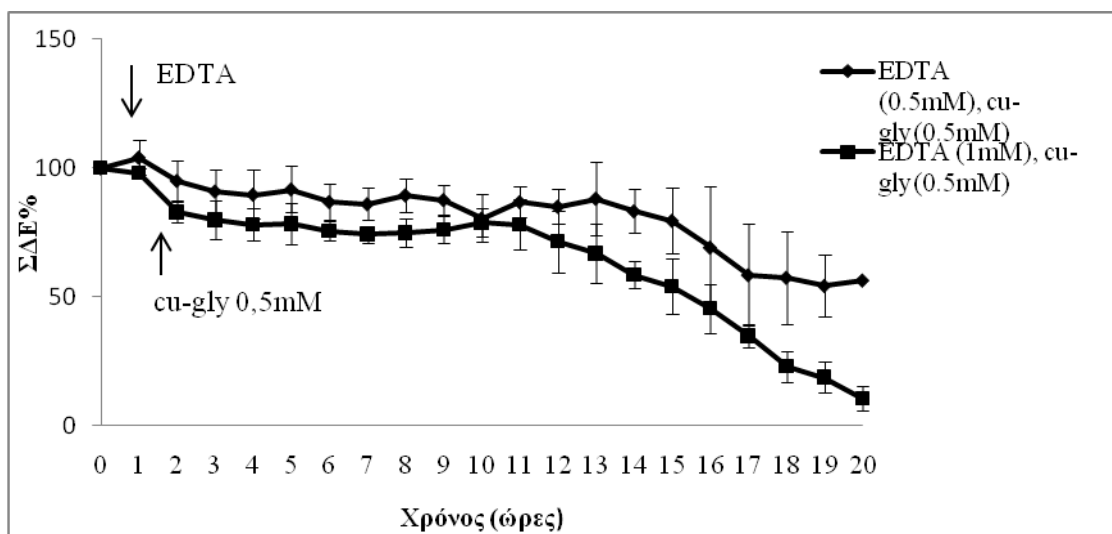
Εικόνα 3.2.6.4: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού (I) 1 mM QA, (II) του Cu(II) σε συγκέντρωση 500 μ M (n=3 ανά συνθήκη) μετά από προ-επώαση με 1 mM QA. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζεται η καμπύλη βιωσιμότητας του ισχιακού νεύρου όταν εκτίθεται σε 500 μ M του Cu(II). Τα βέλη υποδεικνύουν την χρονική στιγμή προσθήκης της κάθε ουσίας αντίστοιχα. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

3.2.6.5 EDTA

Το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) είναι ο γνωστότερος και πλέον τυπικός εκπρόσωπος μιας σειράς ενώσεων, οι οποίες γενικά ονομάζονται πολυαμινοκαρβοξυλικά οξέα και χαρακτηρίζονται από μια εξαιρετικά έντονη συμπλεκτική ικανότητα ως προς τα περισσότερα μεταλλοϊόντα. Το EDTA είναι χηλικός εξαδοντικός υποκαταστάτης (hexadentatechelator) διαθέτοντας 2 θέσεις σύνδεσης από τις αμινομάδες και 4 θέσεις σύνδεσης από τις καρβοξυλομάδες. Η σταθερότητα των συμπλόκων που σχηματίζει οφείλεται στις πολλές θέσεις σύνδεσης του μορίου του EDTA (μονήρη ζεύγη ηλεκτρονίων ατόμων αζώτου και οξυγόνου), το οποίο είναι ένας τυπικός πολυσχιδής (ή πολυδοντικός) υποκαταστάτης (multi dentate ligand). Όμοια, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της νευροπροστατευτικής δράσης του χηλικοποιητικού μορίου EDTAέναντι στην τοξικότητα που επάγεται από την επίδραση του Cu(II). Αρχικά, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της δράσης του EDTAστην βιωσιμότητα του ισχιακού νεύρου σε δύο συγκεντρώσεις (0,5 και 1 mM) καθώς δεν υπήρχαν αντίστοιχα δεδομένα από την βιβλιογραφία. Το ισχιακό νεύρο επώαστηκε στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις μετά από μια ώρα σταθεροποίησης. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το EDTAσε συγκέντρωση 0,5 mMδεν επηρεάζει την βιωσιμότητα των νευρικών ινών (IT_{50} 28.04±0.42). Ωστόσο, σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είναι πιθανό να χηλικοποιεί και να απομακρύνει άλλα ενδογενή – απαραίτητα μέταλλα των οποίων η έλλειψη οδηγεί σε πτώση της βιωσιμότητας (IT_{50} 11.93±0.11). Στη συνέχεια, το ισχιακό νεύρο επώαστηκε για μία ώρα με EDTA(0.5 mM) και ακολούθως προστέθηκε ο Cu(II) σε τελική συγκέντρωση 500 μM [αναλογία EDTA/Cu(II) → 1/1] (IT_{50} = 13.4±0.53). Παράλληλα ελέγχθηκε η επίδραση του EDTA σε μεγαλύτερη στοιχειομετρική αναλογία [αναλογία EDTA/Cu(II) → 2/1] σε σχέση με τον χαλκό (IT_{50} = 19.86±0.73). Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι το EDTA χηλικοποιεί αποτελεσματικά τον χαλκό ενώ η στοιχειομετρική αναλογία φαίνεται να μην επηρεάζει την αλληλεπίδραση των δύο μορίων.



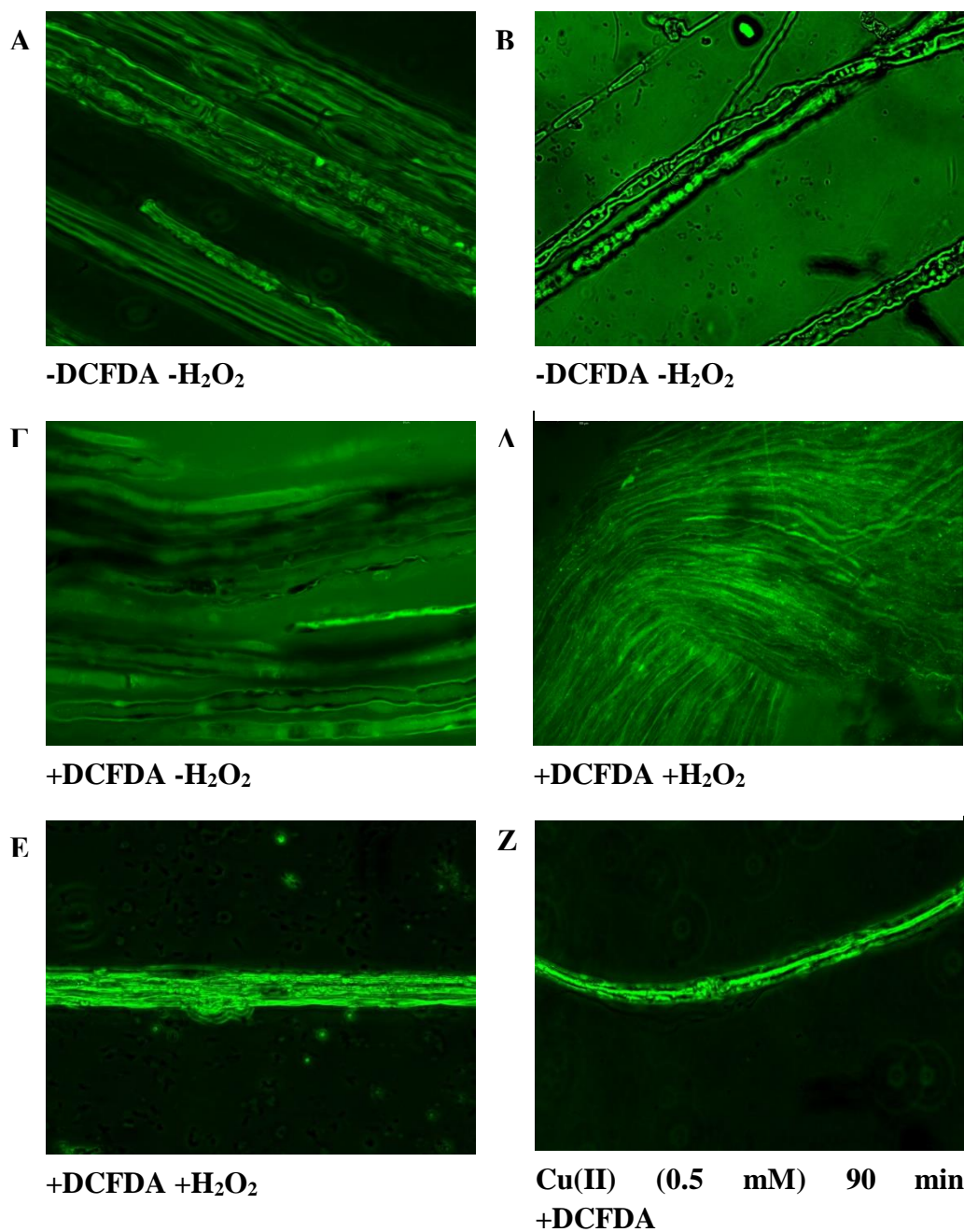
Εικόνα 3.2.6.5A: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του EDTA σε συγκεντρώσεις 0.5 mM και 1 mM (n=3, ανά συνθήκη). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του EDTA. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.



Εικόνα 3.2.6.5B: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού (I) 500 μΜ Cu(II) μετά από προ-επώαση με 1 mM EDTA, (II) του Cu(II) σε συγκέντρωση 500 μΜ μετά από προ-επώαση με 0.5 mM EDTA (n=3 ανά συνθήκη). Τα βέλη υποδεικνύουν την χρονική στιγμή προσθήκης της κάθε ουσίας, αντίστοιχα. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

3.3 Ιστολογική διερεύνηση της σχέσης της δράσης του Cu(II) με τον σχηματισμό ενεργών μορφών οξυγόνου.

Ο χαλκός ως οξειδοαναγωγικά ενεργό μεταλλοϊόν συμβάλλει στην παραγωγή ελεύθερων ριζών και γενικά δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) μέσω αντιδράσεων Fenton και Fenton-Weiss. Προκειμένου να διερευνηθεί η συμμετοχή των ενεργών μορφών οξυγόνου στην παρατηρούμενη μείωση της βιωσιμότητας των νευρικών ινών μετά από επίδραση με την μεταλλοτοξίνη του χαλκού χρησιμοποιήθηκε και ιστολογική μέθοδος. Για το σκοπό αυτό ισχιακά νεύρα που είχαν εκτεθεί σε Cu(II) στη συγκέντρωση των 500 μM καθώς και νεύρα που αποτελούσαν το μάρτυρα επισημάνθηκαν με τη φθορίζουσα χημική ένωση DCFDA η οποία έχει την ικανότητα να δεσμεύεται στις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Στην Εικόνα 3.3A,B φαίνονται νεύρα τα οποία δεν έχουν υποστεί καμία επίδραση. Στη φωτογραφία 3.3 Γ φαίνονται νευρικές ίνες μετά από χρώση με DCFDA χωρίς την επίδραση κάποιας χημικής ένωσης, όπου φαίνεται ότι δεν υπάρχουν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου κατά μήκος των νευρικών ινών σε νεύρο το οποίο αποτελεί το μάρτυρα παρά μόνο παρατηρούνται μικρά συσσωματώματα τα οποία πιθανόν να αντιστοιχούν σε περιοχές με έντονο μεταβολισμό και κατά συνέπεια μεγαλύτερη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Οι εικόνες 3.3 Δ και Ε αντιστοιχούν στον θετικό μάρτυρα, ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) καθώς αποτελεί γνωστό οξειδωτικό παράγοντα που οδηγεί στον σχηματισμό ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS). Στην εικόνα 3.3Z φαίνονται νευρικές ίνες οι οποίες εκτέθηκαν σε Cu(II) 500 μM για 90 λεπτά και στην οποία φαίνεται ότι υπάρχει παραγωγή ελεύθερων ριζών κατά μήκος του κυτταροπλάσματος σχεδόν παρόμοια με αυτή μετά την επίδραση με υπεροξείδιο του υδρογόνου.



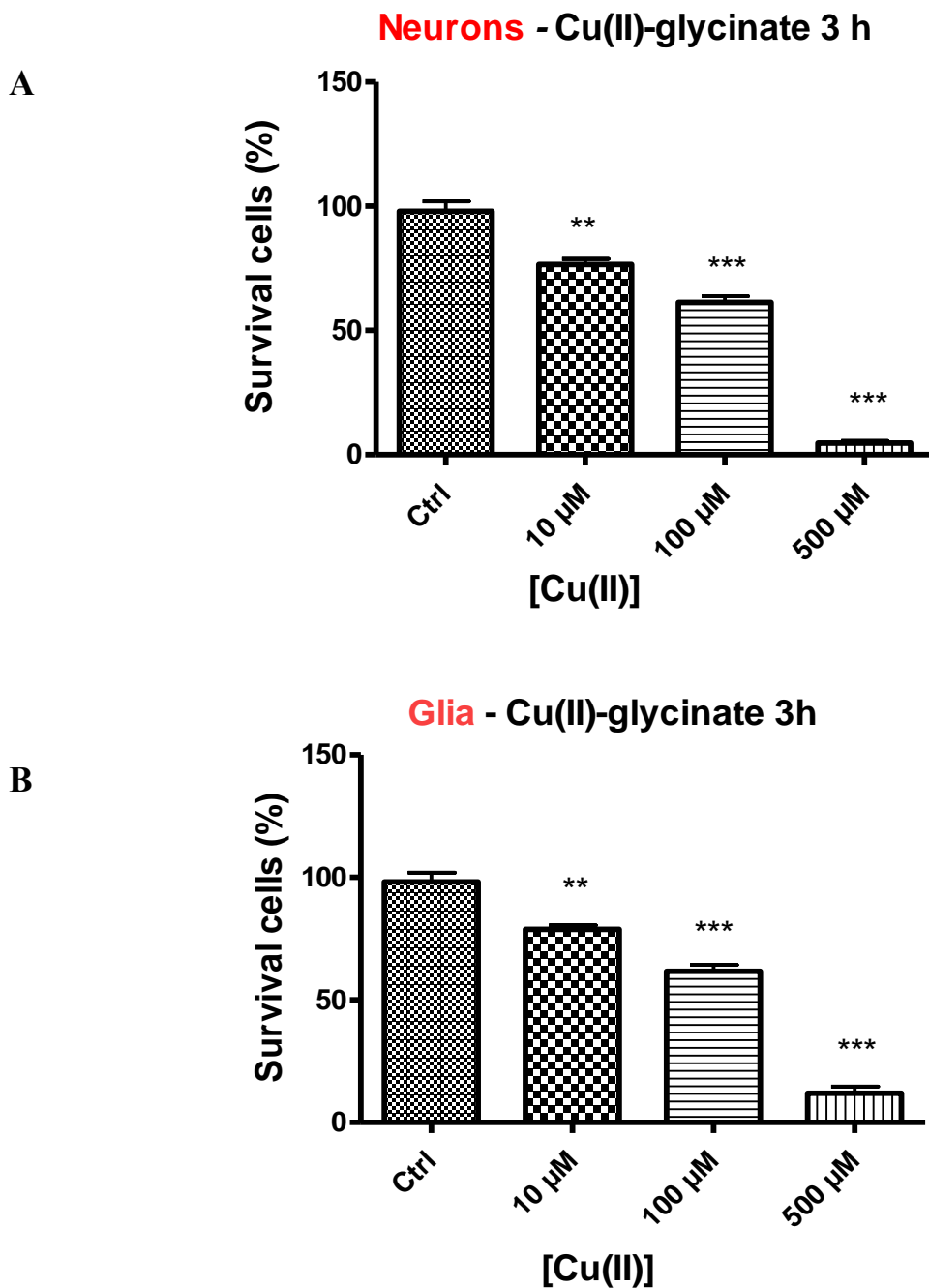
Εικόνα 3.3: Μικροφωτογραφία συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης λέιζερ νευρικών ινών του ισχιακού νεύρου του επίμυος μετά από σήμανση με την φθορίζουσα DCFDA για την σήμανση ελεύθερων ριζών οξυγόνου (Α,Β) απουσία χημικής επίδρασης και φθορίζουσας χρωστικής, (Γ) παρουσία χρωστικής – μάρτυρας, (Δ,Ε) μετά από επίδραση με H₂O₂ – θετικός μάρτυρας, και (Ζ) μετά από επώαση με 500 μM Cu(II) για 90 λεπτά (x40).

3.4 Βιωσιμότητα πρωτογενούς καλλιέργειας ιπποκαμπιαίου ιστού υπό βραχυπρόθεσμες συνθήκες (*in vitro*)

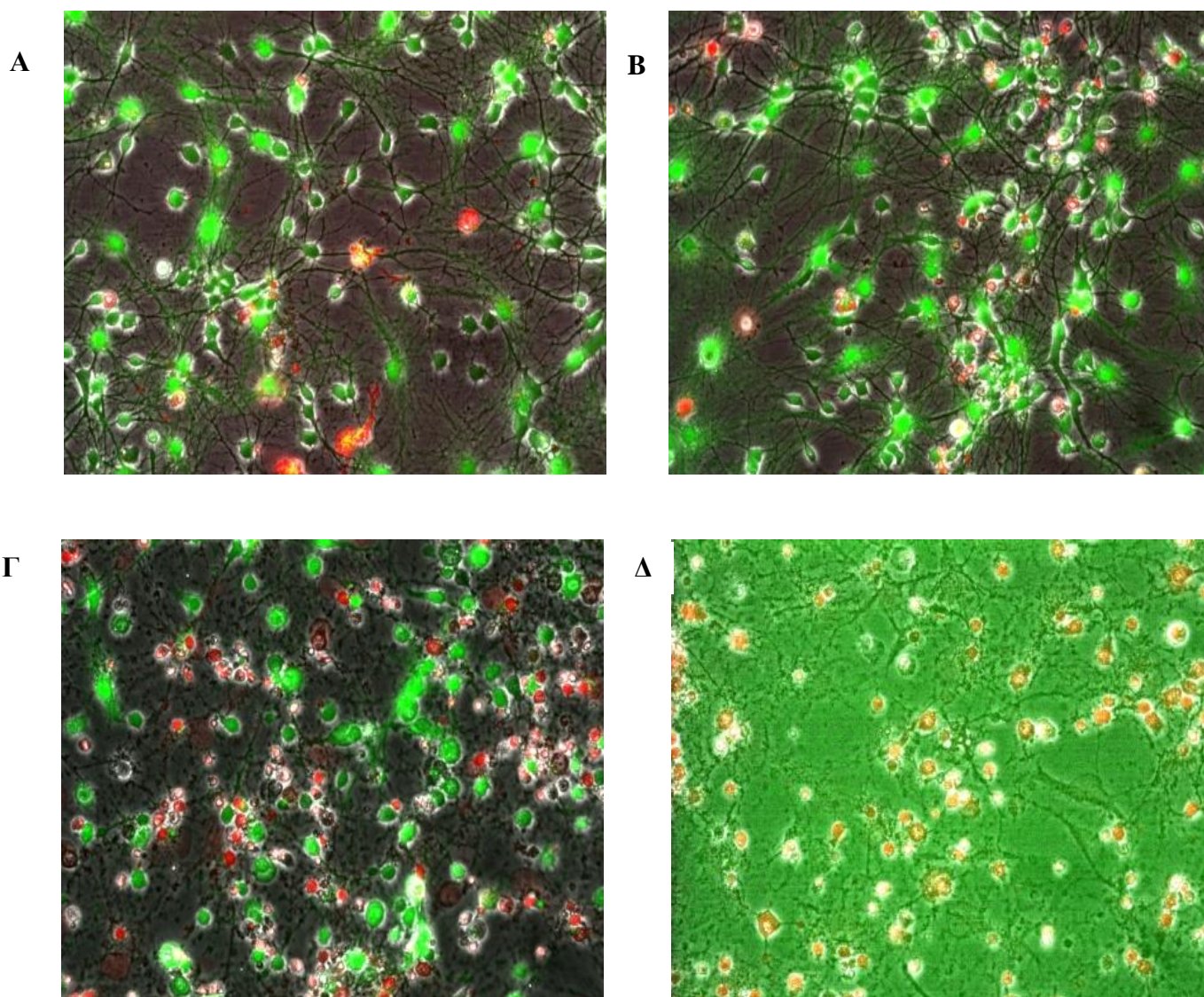
Η τοξικότητα που επάγεται από το μεταλλοϊόν του χαλκού και η ενδεχόμενη νευροπροστατευτική δράση χημικών ενώσεων αξιολογήθηκε επιπλέον και σε *invitro* μοντέλο σε πρωτογενή καλλιέργεια ιπποκαμπιαίου ιστού. Η επιλογή του συγκεκριμένου ιστού πραγματοποιήθηκε στοχευμένα καθώς έχει δειχθεί ότι η συγκέντρωση του χαλκού αυξάνει σε ιστούς του εγκεφάλου σε διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες ανάγοντας συχνά την παράμετρο αυτή σε παθολογοανατομικό δείκτη των ασθενειών αυτών.

3.4.1 Εκτίμηση της νευροτοξικής δράσης του *cis*-[Cu(II)-glycinate]

Για την διερεύνηση της τοξικής δράσης του Cu(II) *invitro*, κύτταρα (νευρώνες και γλοία) του ιπποκαμπιαίου ιστού νεογνών αρουραίων διεγέρθηκαν για 3 ώρες με Cu(II)-glycinate σε συγκεντρώσεις 10, 100 και 500 μ M ενώ σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα χωρίς καμία επίδραση. Όπως αναφέρεται και παραπάνω, η μορφή αυτή του χαλκού είναι υδατοδιαλυτή. Όλα τα διαλύματα παρασκευάζονται άμεσα πριν την εφαρμογή των πειραματικών συνθηκών. Τα πειράματα βραχυπρόθεσμης έκθεσης πραγματοποιήθηκαν παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος HBS όπου και διαλύεται ο Cu(II)-glycinate στις τελικές συγκεντρώσεις που αναφέρονται. Στην εικόνα 3.4.1 A και B φαίνεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης μετά από 3 ώρες επώασης με Cu(II)-glycinate σε τρεις διακριτές συγκεντρώσεις στη γλοία (A) και τους νευρώνες (B). Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν σαφή δόσο-εξερτώμενη τοξικότητα του Cu(II) και στους δύο κυτταρικούς τύπους η οποία εμφανίζεται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 10 μ M. Αξίζει να αναφερθεί ότι η γλοία εμφανίζει σχετικά πιο αυξημένα ποσοστά επιβίωσης, ιδιαίτερα σε υψηλές συγκεντρώσεις, παρατήρηση αναμενόμενη καθώς έχει προστατευτικό και στηρικτικό ρόλο ως προς τους νευρώνες.



Εικόνα 3.4.1.A Εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής βιωσιμότητας μετά από την επίδραση Cu(II) σε συγκεντρώσεις 10, 100 και 500 μ M για 3 ώρες (A) νευρώνων και (B) γλοίας. Τα ποσοστά αντιστοιχούν σε μέσους όρους και το τυπικό σφάλμα τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.



Εικόνα 3.4.1.B: Μικροφωτογραφίες μικροσκοπίου φθορισμού από δείγματα πρωτογενούς και μονοστρωματικής καλλιέργειας γλοίας και νευρώνων μετά από ταυτόχρονη χρώση με καλσεΐνη (Calcein-AM) και προπίδιο του ιωδίου (PI). Με πράσινο χρώμα επισημαίνονται τα ζωντανά κύτταρα ενώ με κόκκινο τα νεκρά. (A) μάρτυρας, (B) 10 μM , (Γ) 100 μM και (Δ) 500 μM Cu(II) μετά από επώαση 3 ωρών (x10).

ΣΥΝΘΗΚΗ	ΝΕΥΡΩΝΕΣ				ΓΛΟΙΑ			
	μάρτυρας	10 μM	100 μM	500 μM	μάρτυρας	10 μM	100 μM	500 μM
% κυτταρική επιβίωση	97% \pm 4.06	76% \pm 2.2	61.3 \pm 2.5	4.6% \pm 0.8	98.2% \pm 3.7	78.7% \pm 1.6	61.7% \pm 2.5	11.9% \pm 0.7

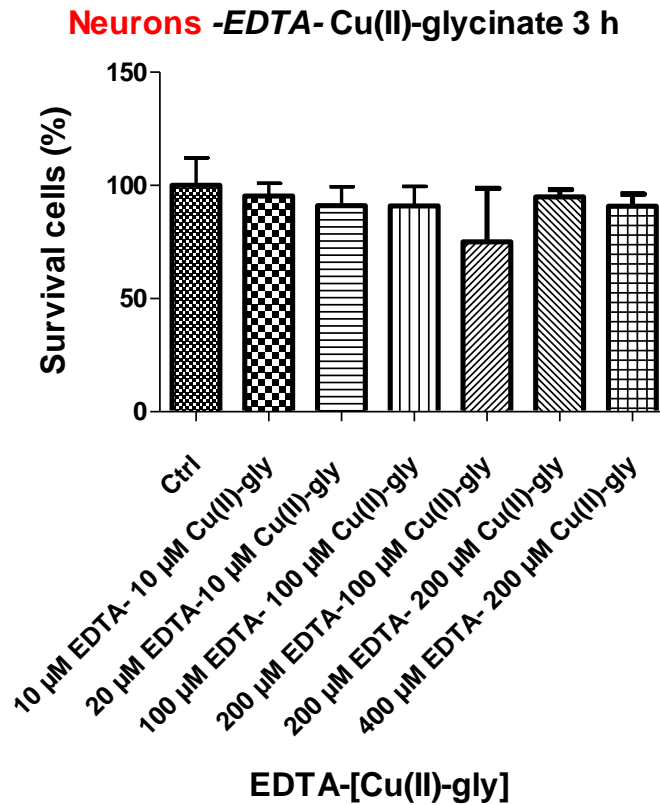
3.4.2 Εκτίμηση της νευροπροστατευτικής δράσης του EDTA και QA.

Για την μελέτη της νευροπροστατευτικής δράσης του EDTA έναντι του Cu(II), οι καλλιέργειες επώαστηκαν για μία ώρα παρουσία του EDTA ή του QA σε HBS σε διάφορες συγκεντρώσεις (10, 200, 400 μM) και στη συνέχεια προστέθηκε Cu(II)-glycinate χωρίς να προηγηθεί αφαίρεση του διαλύματος που περιέχει το EDTA ή το QA. Η επώαση με τον Cu(II)-glycinate διήρκεσε 3 ώρες. Οι συγκεντρώσεις του Cu(II) εξαρτώνται από την συγκέντρωση του υπό μελέτη νευροπροστατευτικού μορίου προκειμένου να ελεγχθεί η στοιχειομετρική αναλογία μεταλλοτοξίνης-νευροπροστατευτικού παράγοντα και διαμορφώνονται ως εξής : [(10 μM EDTA – 10 μM Cu(II), (20 μM EDTA – 10 μM Cu(II), (100 μM EDTA – 100 μM Cu(II), (200 μM EDTA – 100 μM Cu(II), (200 μM EDTA – 200 μM Cu(II), (400 μM EDTA – 200 μM Cu(II)]. Αντίστοιχη διαδικασία πραγματοποιείται και στην περίπτωση του QA με αναλογίες συγκεντρώσεων : 10 μM QA – 10 μM Cu(II), (100 μM QA – 100 μM Cu(II), (400 μM QA – 200 μM Cu(II).

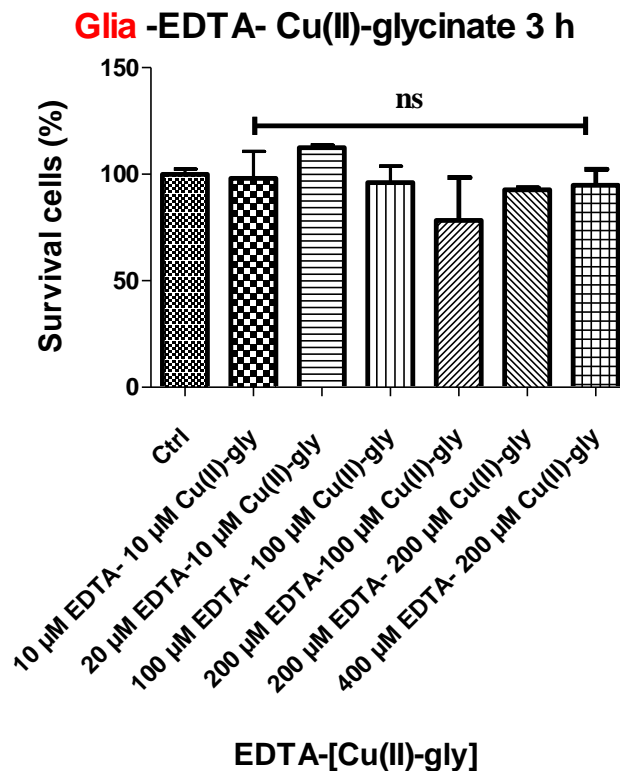
Στην εικόνα 3.4.2 A και B φαίνεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση των κυττάρων με EDTA και την ακόλουθη προσθήκη του Cu(II). Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν σαφή και σχεδόν απόλυτη προστασία του EDTA έναντι στην επαγόμενη από τον χαλκό τοξικότητα. Η κυτταρική επιβίωση δεν επηρεάστηκε από την μεταβολή της στοιχειομετρικής αναλογίας EDTA/Cu(II). Συνεπώς, το EDTA αναδεικνύεται σε αποτελεσματικό και παράλληλα ατοξικό χηλικοποιητικό παράγοντα.

Στην εικόνα 3.4.2 A και B φαίνεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση των κυττάρων με QA και την ακόλουθη προσθήκη του Cu(II). Το QA δείχνει να μην επηρεάζει ιδιαίτερα την επαγόμενη από το χαλκό τοξικότητα σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ την ενισχύει στις υψηλές.

A

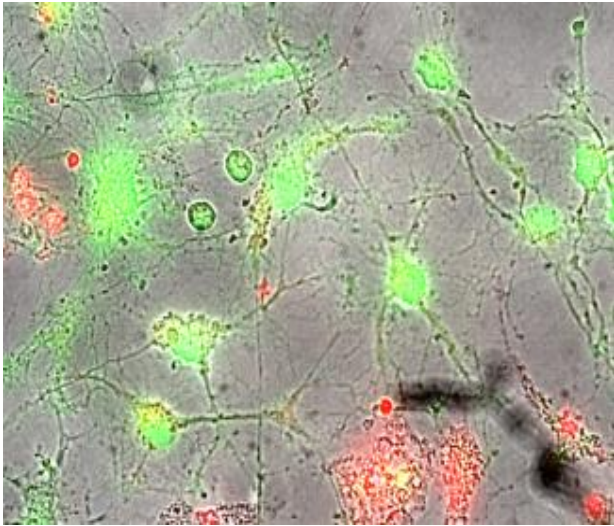


B

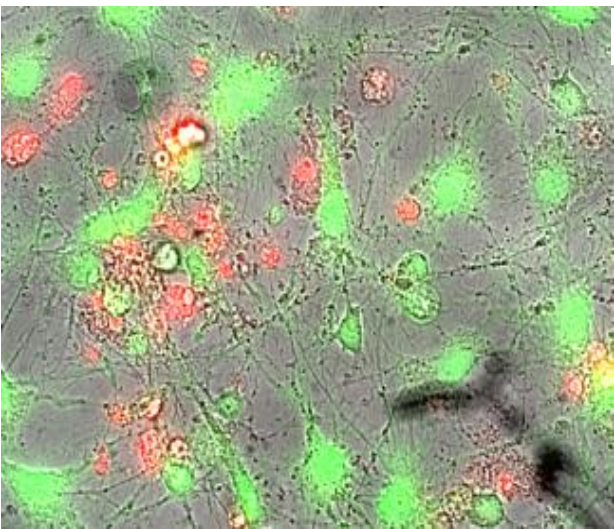


Εικόνα 3.4.2A: Εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής βιωσιμότητας μετά από την επίδραση EDTA και Cu(II) σε συγκεντρώσεις: (10μM EDTA – 10μM Cu(II), (20μM EDTA – 10μM Cu(II), (100μM EDTA – 100μM Cu(II), (200μM EDTA – 100μM Cu(II), (200μM EDTA – 200μM Cu(II), (400μM EDTA – 200μM Cu(II), (A) νευρώνων και (B) γλοίας. Τα ποσοστά αντιστοιχούν σε μέσους όρους και το τυπικό σφάλμα τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

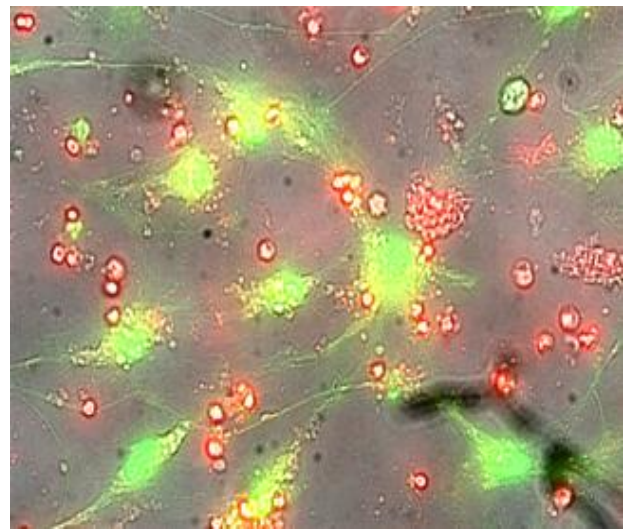
A



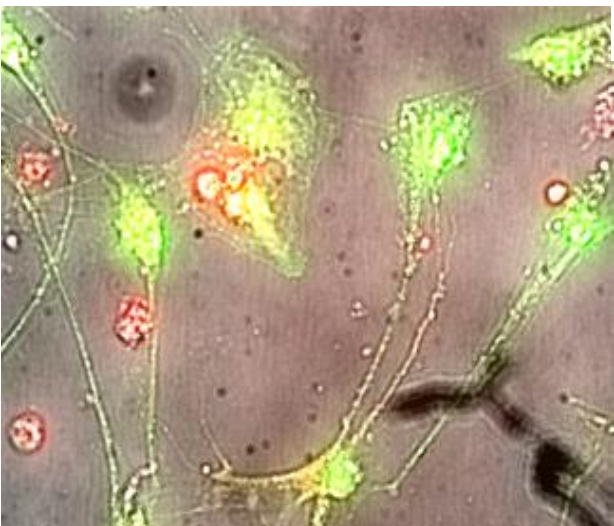
B



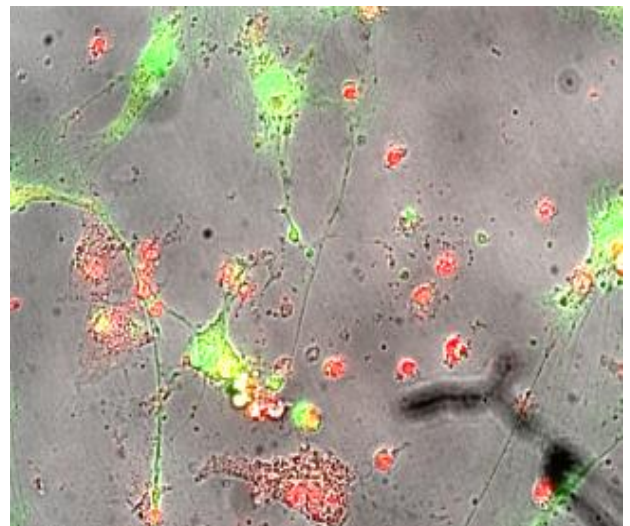
Г

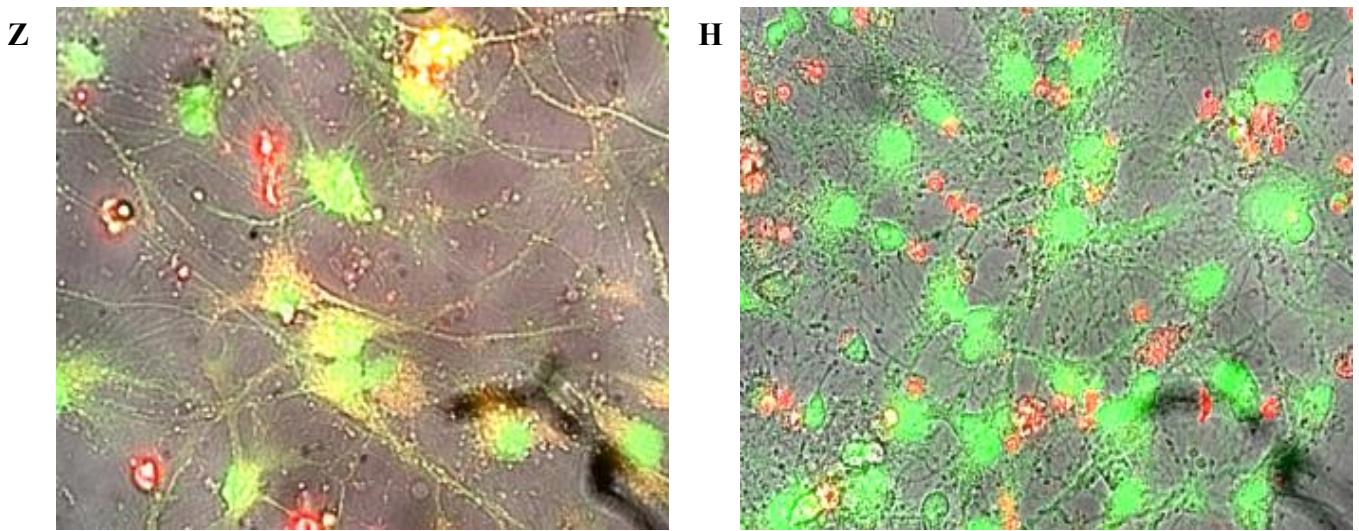


Δ



E

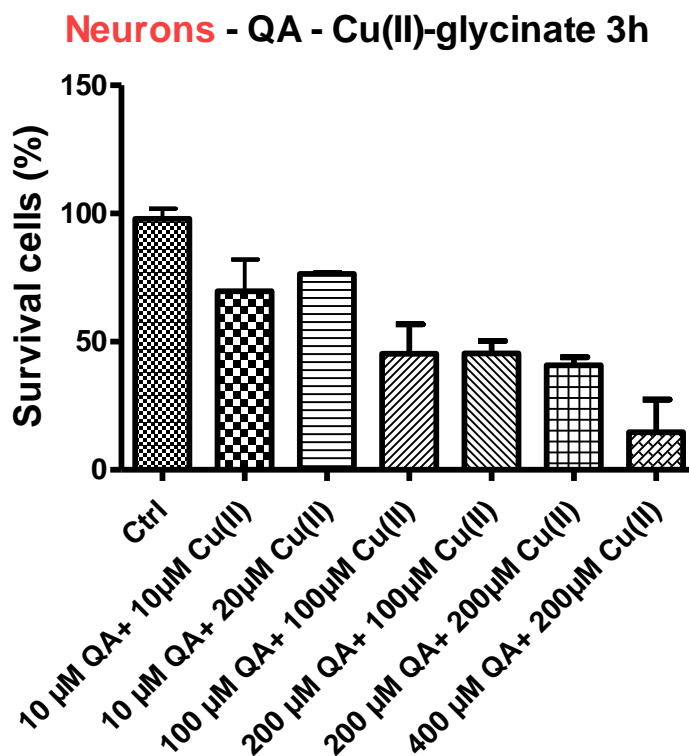




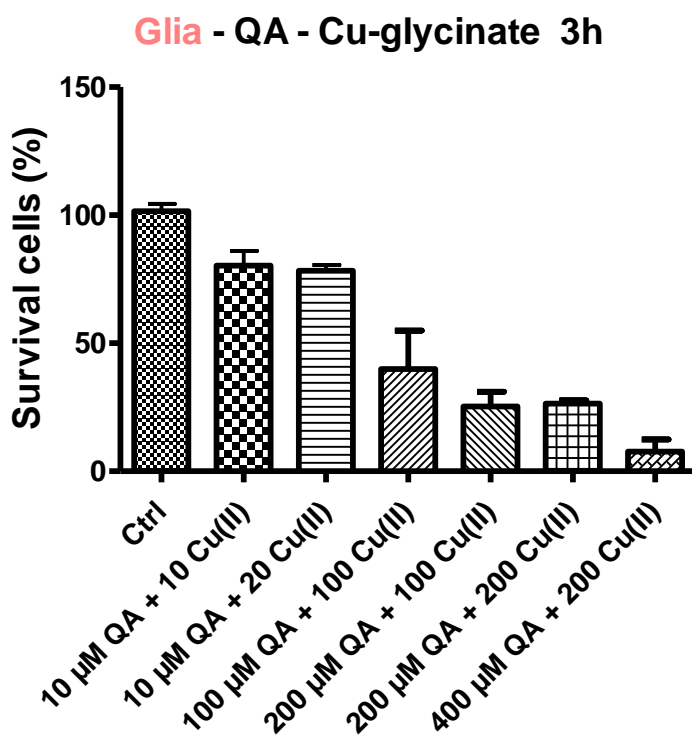
Εικόνα 3.4.2B: Μικροφωτογραφίες μικροσκοπίου φθορισμού από δείγματα πρωτογενούς και μονοστρωματικής καλλιέργειας γλοίας και νευρώνων μετά από ταυτόχρονη χρώση με καλσεΐνη (Calcein-AM) και προπίδιο του ιωδίου (PI). Με πράσινο χρώμα επισημαίνονται τα ζωντανά κύτταρα ενώ με κόκκινο τα νεκρά. (Α) μάρτυρας, (Β) (10 μ M EDTA – 10 μ M Cu(II)), (Γ) (20 μ M EDTA – 10 μ M Cu(II)), (Δ) (100 μ M EDTA – 100 μ M Cu(II)), (Ε) (200 μ M EDTA – 100 μ M Cu(II)), (Ζ) (200 μ M EDTA – 200 μ M Cu(II)), και (Η) (400 μ M EDTA – 200 μ M Cu(II))

ΝΕΥΡΩΝΕΣ							
ΣΥΝΘΗΚΗ	μάρτυρας	10 μ M EDTA – 10 μ M Cu(II)	20 μ M EDTA – 10 μ M Cu(II)	100 μ M EDTA – 100 μ M Cu(II)	200 μ M EDTA – 100 μ M Cu(II)	200 μ M EDTA – 200 μ M Cu(II)	400 μ M EDTA – 200 μ M Cu(II)
% κυτταρική επιβίωση	100% \pm 12.2	95.35% \pm 5.6	91.02 \pm 8.4	90.95% \pm 8.6	75.01% \pm 23.6	94.97% \pm 3.2	90.81% \pm 5.3
ΓΛΟΙΑ							
ΣΥΝΘΗΚΗ	μάρτυρας	10 μ M EDTA – 10 μ M Cu(II)	20 μ M EDTA – 10 μ M Cu(II)	100 μ M EDTA – 100 μ M Cu(II)	200 μ M EDTA – 100 μ M Cu(II)	200 μ M EDTA – 200 μ M Cu(II)	400 μ M EDTA – 200 μ M Cu(II)
% κυτταρική επιβίωση	100% \pm 2.3	98.04% \pm 12.6	112.4% \pm 1.2	96.05% \pm 7.7	78.31% \pm 20.1	92.73% \pm 0.8	94.87% \pm 7.4

A

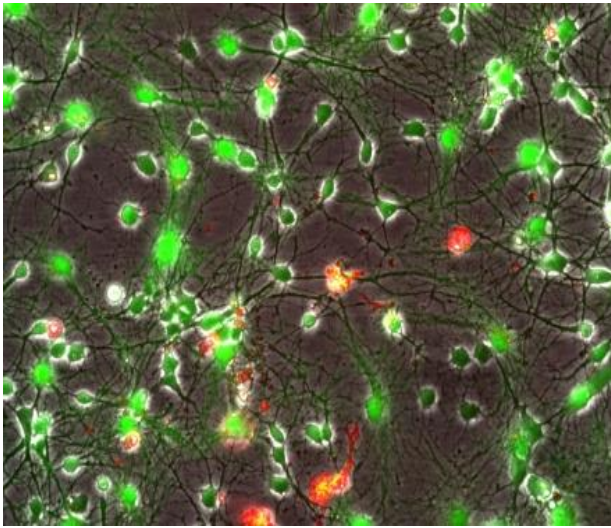


B

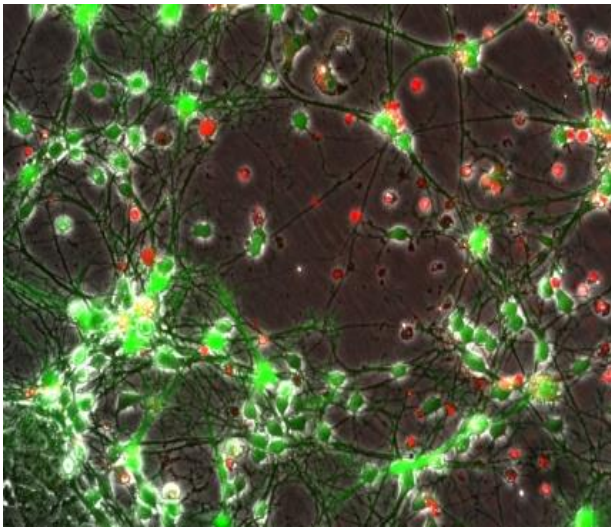


Εικόνα 3.4.2.Γ:Εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής βιωσιμότητας μετά από την επίδραση EDTA και Cu(II) σε συγκεντρώσεις : (10μM QA – 10μM Cu(II), (20μM QA – 10μM Cu(II), (100μM QA – 100μM Cu(II), (200μM QA – 100μM Cu(II), (200μM QA – 200μM Cu(II), (400μM QA – 200μM Cu(II), (A) νευρώνων και (B) γλοίας. Τα ποσοστά αντιστοιχούν σε μέσους όρους και το τυπικό σφάλμα

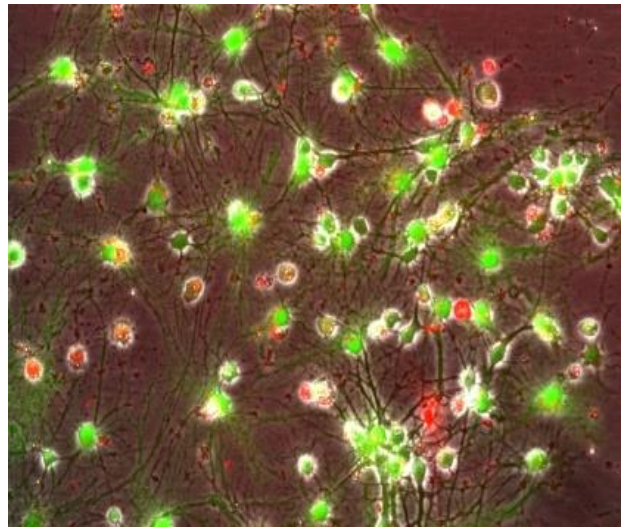
A



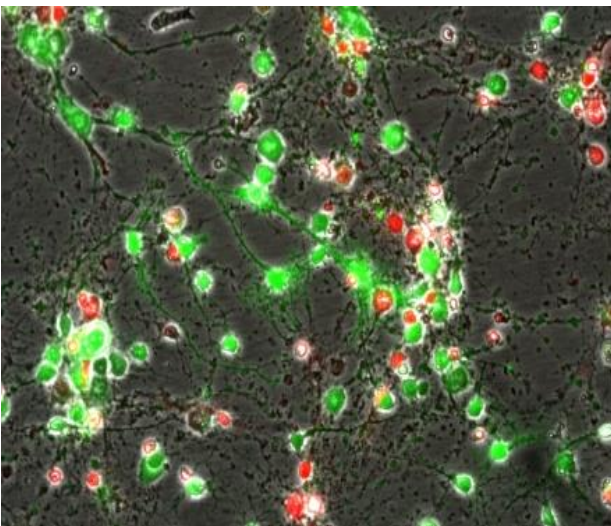
B



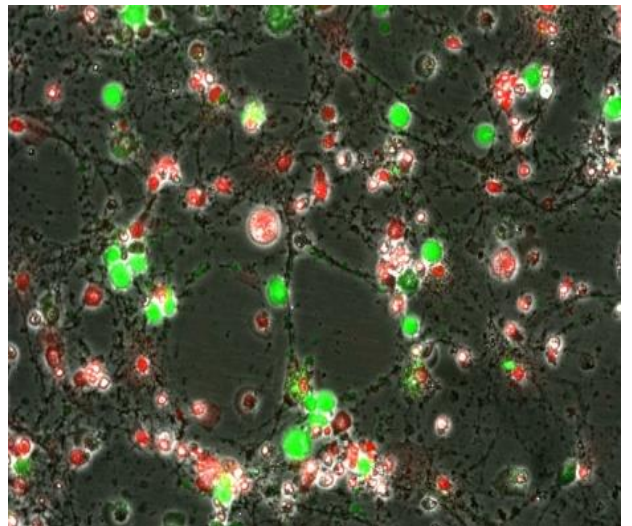
Г

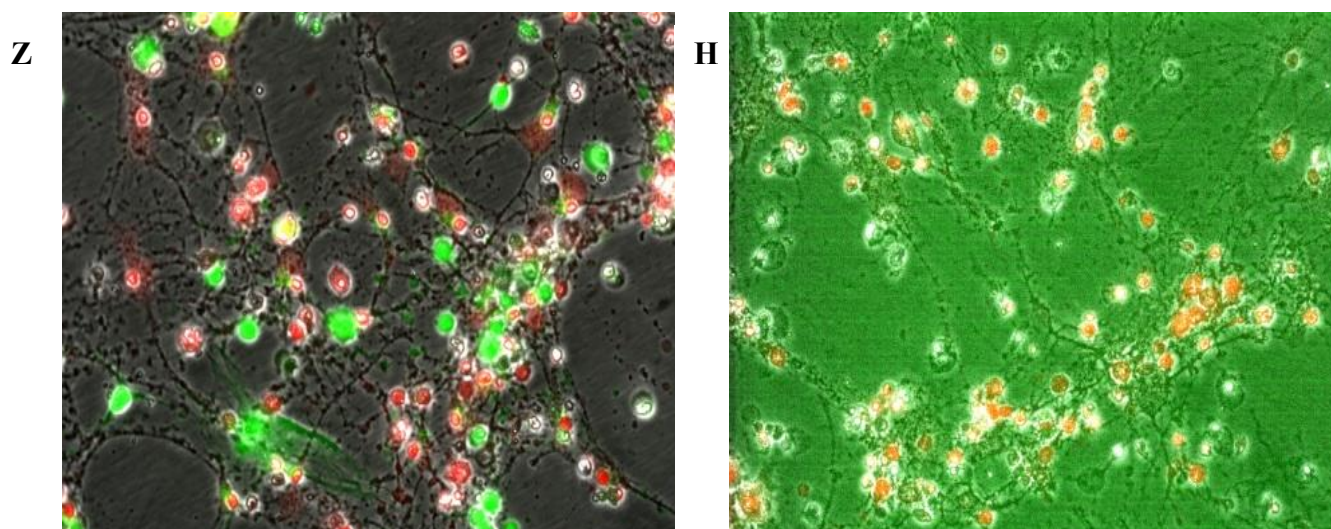


Δ



E





Εικόνα 3.4.2.Γ: Μικροφωτογραφίες μικροσκοπίου φθορισμού από δείγματα πρωτογενούς και μονοστρωματικής καλλιέργειας γλοίας και νευρώνων μετά από ταυτόχρονη χρώση με καλσεΐνη (Calcein-AM) και προπίδιο του ιωδίου (PI). Με πράσινο χρώμα επισημαίνονται τα ζωντανά κύτταρα ενώ με κόκκινο τα νεκρά. (Α) μάρτυρας, (Β) (10μM QA – 10μM Cu(II)), (Γ) (20μM QA – 10μM Cu(II)), (Δ) (100μM QA – 100μM Cu(II)), (Ε) (200μM QA – 100μM Cu(II)), (Ζ) (200μM QA – 200μM Cu(II), και (Η) (400μM QA – 200μM Cu(II) (x32).

ΝΕΥΡΩΝΕΣ							
ΣΥΝΘΗΚΗ	μάρτυρας	10μM QA – 10μM Cu(II)	20μM QA – 10μM Cu(II)	100μM QA – 100μM Cu(II)	200μM QA – 100μM Cu(II)	200μM QA – 200μM Cu(II)	400μM QA – 200μM Cu(II)
% κυτταρική επιβίωση	97.89%±4.06	69.67%±12.35	76.43±0.75	45.37%±11.39	45.45%±4.8	40.79%±3.18	14.6%±12.7
ΓΛΟΙΑ							
ΣΥΝΘΗΚΗ	μάρτυρας	10μM QA – 10μM Cu(II)	20μM QA – 10μM Cu(II)	100μM QA – 100μM Cu(II)	200μM QA – 100μM Cu(II)	200μM QA – 200μM Cu(II)	400μM QA – 200μM Cu(II)
% κυτταρική επιβίωση	101.5%±2.95	80.35%±5.6	78.3%±2.3	39.88%±15.5	25.33%±5.7	26.48%±1.18	7.72%±4.7

3.5 Ανάπτυξη μοντέλου εκτίμησης περιφερικής νευροπάθειας

3.5.1 Συχνότητα διέγερσης-εφαρμογή 2^{ου} ηλεκτρικού παλμού στην σχετική ανερέθιστη περίοδο.

Προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση μεταλλοτοξινών στην επαγωγή περιφερικής νευροπάθειας, κρίθηκε αρχικά απαραίτητη η ανάπτυξη ενός μοντέλου διάκρισης της φυσιολογικής από την παθολογική κατάσταση. Για τον σκοπό πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων όπου χρησιμοποιήθηκαν δύο ομάδες ζώων, φυσιολογικοί ενήλικοι αρουραίοι και αρουραίοι οι οποίοι ήταν διαβητικοί. Ο διαβήτης στα ζώα αυτά προκαλείται επίκτητα μετά από χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης (Regup CC (1970)). Η ένωση αυτή επιδρά στα β-κύτταρα του παγκρέατος και η χρήση της είναι κοινή στα περισσότερα πρωτόκολλα για την ανάπτυξη *in vivo* μοντέλων Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 και 2.

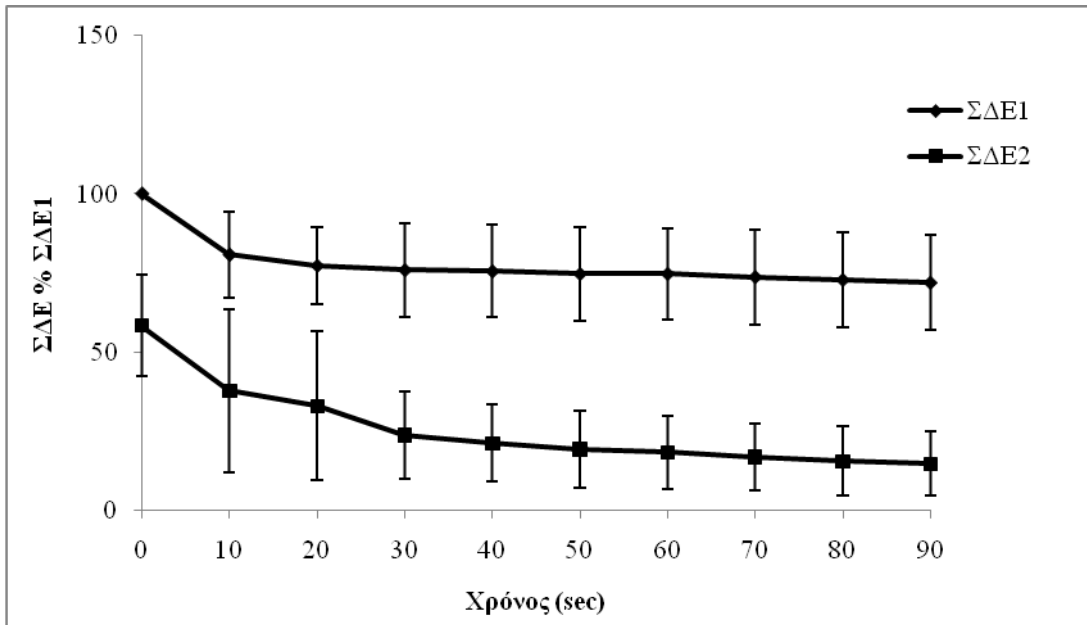
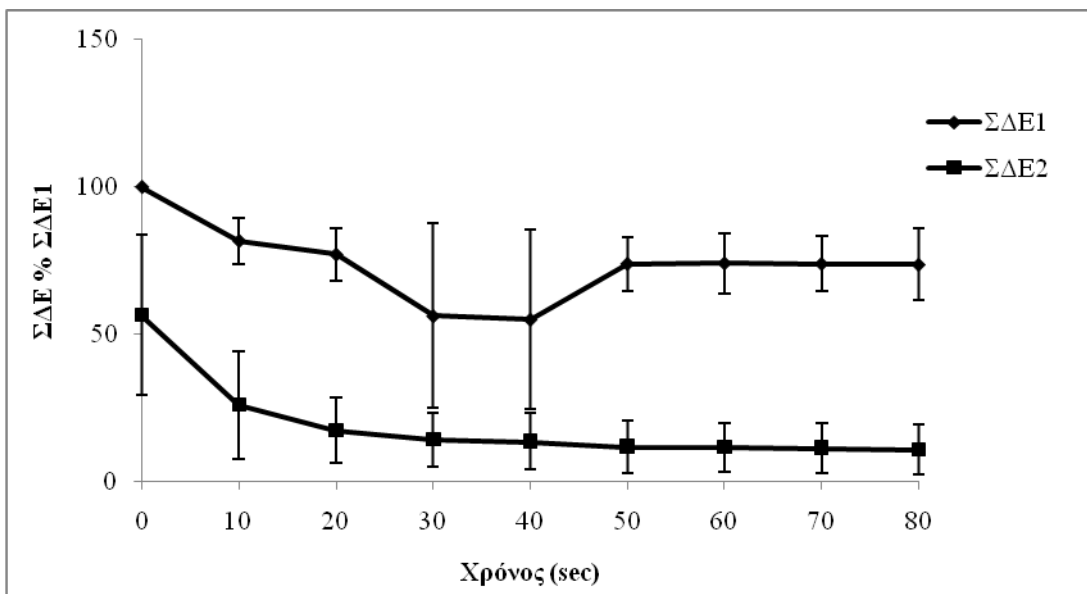
Με τον όρο Διαβητική Νευροπάθεια νοείται μια ομάδα κλινικών νοσημάτων, τα οποία είτε το καθένα από μόνο του, είτε σε συνδυασμό μεταξύ τους προσβάλλουν διαφορετικά τμήματα του νευρικού συστήματος. Ιδιαίτερη μορφή επώδυνης νευροπάθειας αποτελεί η νευροπάθεια των περιφερικών ινών όπου προσβάλλονται οι μικρές εμμύελες ίνες καθώς και οι αμύελες.

Για την ανάπτυξη του συγκεκριμένου μοντέλου πραγματοποιήθηκε καταπόνηση μέσω εφαρμογής 2^{ου} παλμού στην περίοδο σχετικής ανερεθιστότητας. Για την εκτέλεση των συγκεκριμένων πειραμάτων δεν απαιτείται η αφαίρεση του επινευρίου. Το ισχιακό νεύρο τοποθετείται στον τρίχωρο θάλαμο καταγραφής όπως και στην περίπτωση των εξωκυττάρων ηλεκτροφυσιολογικών καταγραφών. Το ισχιακό νεύρο παραμένει στον τρίχωρο θάλαμο για μία ώρα προκειμένου να σταθεροποιηθεί το ΣΔΕ και στη συνέχεια διεγείρεται με συχνότητα μεγαλύτερη του 1Hz ενώ παράλληλα με χρήση ειδικής διάταξης εφαρμόζεται δεύτερος ηλεκτρικός παλμός σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα της σχετικής ανερέθιστης περιόδου.

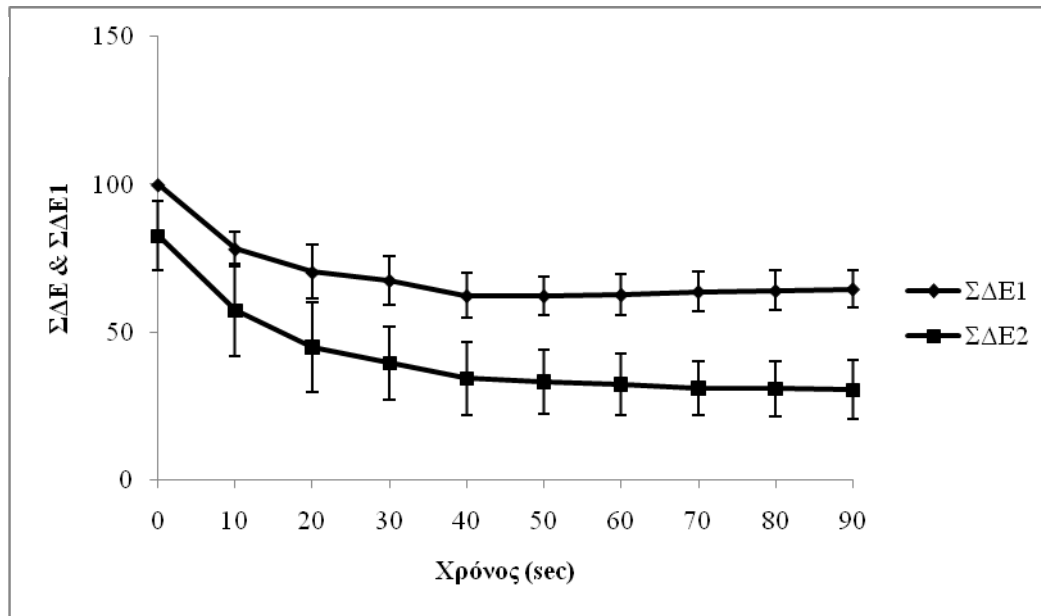
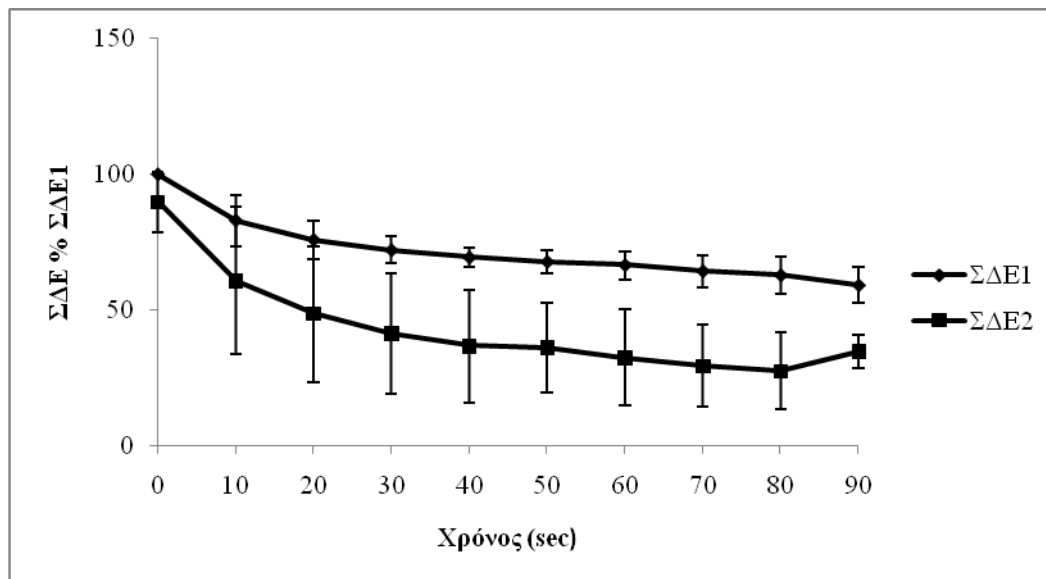
Τόσο οι νευρικές ίνες του ισχιακού νεύρου φυσιολογικών ζώων, όσο και των διαβητικών διεγέρθηκαν σε τρεις διακριτές συνθήκες οι οποίες έχουν ως εξής: συχνότητα διέγερσης 80-90 Hz και 4.2 msec από την απόλυτη ανερέθιστη περίοδο, 80-90 Hz και 2.2 msec και 50 Hz και 2.2 msec αντίστοιχα. Από τις τρεις διακριτές συνθήκες που εφαρμόστηκαν, προκύπτει ότι η διέγερση με 50 Hz 2.2 msec μετά την απόλυτη περίοδο ανερεθιστότητας επιτρέπει σαφή διάκριση μεταξύ της

φυσιολογική από την παθολογική κατάσταση. Πιο συγκεκριμένα, όταν το ισχιακό νεύρο φυσιολογικού αρουραίου διεγείρεται με συχνότητα 80-90 Hz 4.2 msec μετά την απόλυτη περίοδο ανερεθιστότητας, το ΣΔΕ1 μειώνεται στο 69% ± 5.6 ενώ το ΣΔΕ2 μειώνεται στο 14% ± 3.8 ενώ στην περίπτωση του ισχιακού νεύρου διαβητικού ζώου το ΣΔΕ1 μειώνεται στο 73% ± 6,08 και το ΣΔΕ2 μειώνεται στο 10% ± 4.2. Όταν, το ισχιακό νεύρο φυσιολογικού αρουραίου διεγείρεται με την ίδια συχνότητα αλλά 4,2 msec από την απόλυτη ανερέθιστη περίοδο, το ΣΔΕ1 μειώνεται στο 64% ± 2.6 και το ΣΔΕ2 στο 30% ± 4.04 ενώ στην περίπτωση του διαβητικού ζώου το ΣΔΕ1 μειώνεται στο 62% ± 2.5 και το ΣΔΕ2 μειώνεται στο 28% ± 4.4. Αντίστοιχα, όταν το ισχιακό νεύρο φυσιολογικού αρουραίου διεγείρεται με συχνότητα 50 Hz και ο δεύτερος παλμός εφαρμόζεται 2.2 msec μετά την απόλυτη ανερέθιστη περίοδο το ΣΔΕ1 μειώνεται στο 91% ± 4.7 και το ΣΔΕ2 αντιστοιχεί στο 42% ± 5.2 ενώ στην περίπτωση του διαβητικού ζώου το ΣΔΕ1 μειώνεται στο 71% ± 6.7 και το ΣΔΕ2 στο 23% ± 3.2. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται και στον παρακάτω πίνακα.

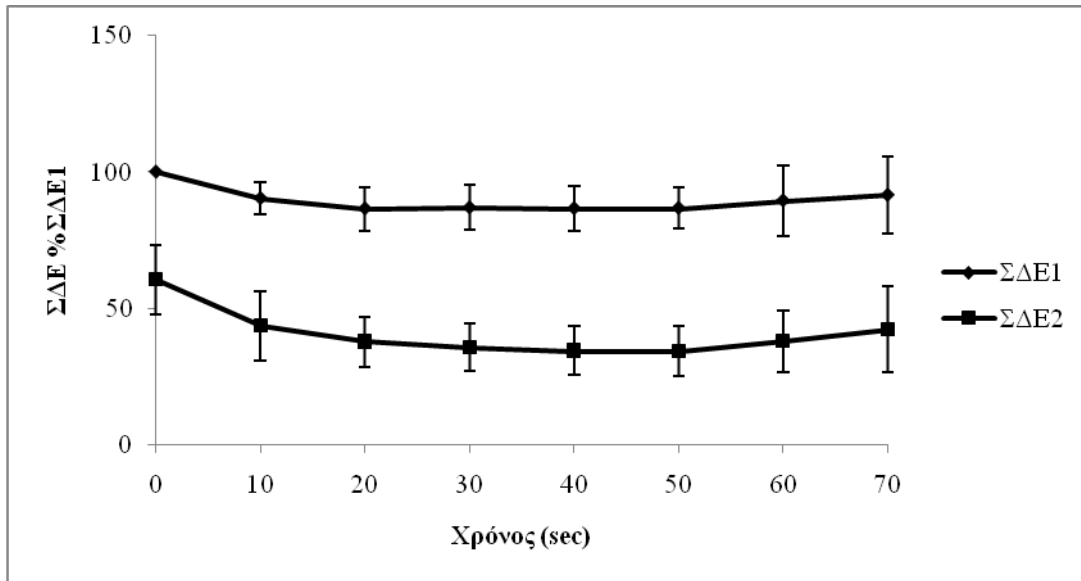
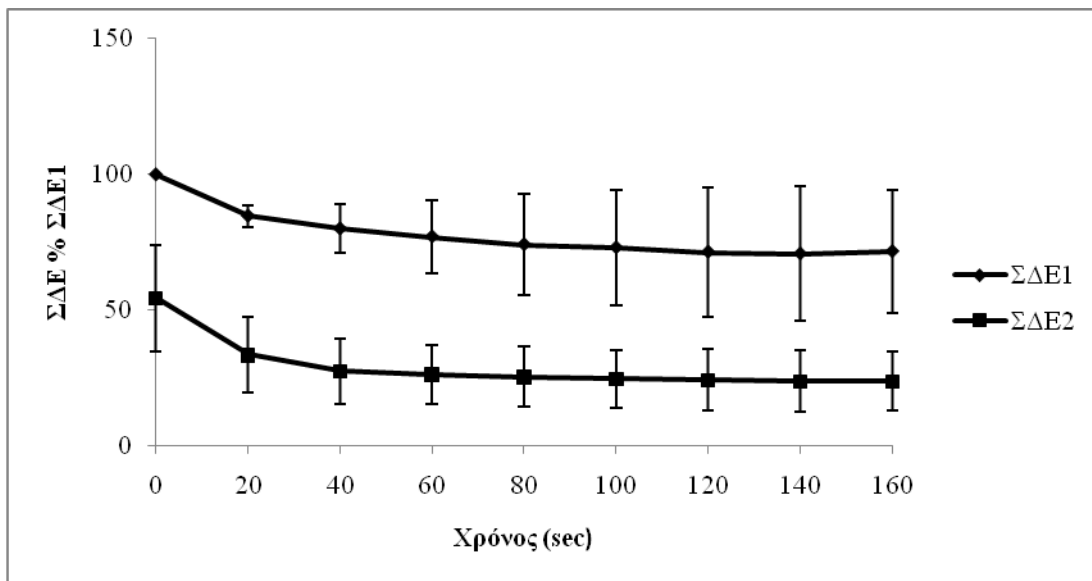
	80-90 Hz 4,2 msec		80-90 Hz 2,2 msec		50 Hz 2,2 msec	
ΣΔΕ	ΣΔΕ1	ΣΔΕ2	ΣΔΕ1	ΣΔΕ2	ΣΔΕ1	ΣΔΕ2
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΤΙΜΗΣ μάρτυρας	69% ± 5.6	14% ± 3.8	64% ± 2.6	30% ± 4.04	91% ± 4.7	42% ± 5.2
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΤΙΜΗΣ διαβητικό	73% ± 6.08	10% ± 4.2	62% ± 2.5	28% ± 4.4	71% ± 6.7	23% ± 3.2

A**B**

Εικόνα 3.5.1.A: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου κατά την εφαρμογή του πρώτου παλμού (ΣΔΕ1) καθώς και του ΣΔΕ μετά την εφαρμογή δευτέρου παλμού (ΣΔΕ2), ως προς το πρώτο ΣΔΕ. (A) σε συνθήκες μάρτυρα, και (B) σε διαβητικά ζώα. Οι συνθήκες διέγερσης αντιστοιχούν σε συχνότητα 80-90 Hz και 2.2 msec μετά την απόλυτη ανερέθιστη περίοδο. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων (n=7) σε συνδιασμό με την τυπική απόκλιση.

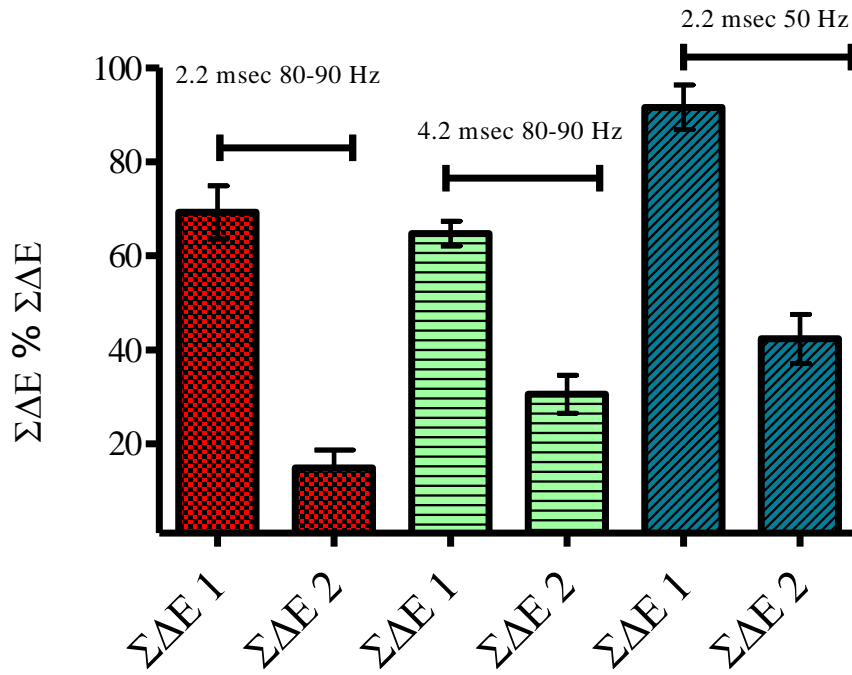
A**B**

Εικόνα 3.5.1.B: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου κατά την εφαρμογή του πρώτου παλμού (ΣΔΕ1) καθώς και του ΣΔΕ μετά την εφαρμογή δευτέρου παλμού (ΣΔΕ2), ως προς το πρώτο ΣΔΕ. (A) σε συνθήκες μάρτυρα, και (B) σε διαβητικά ζώα. Οι συνθήκες διέγερσης αντιστοιχούν σε συχνότητα 80-90 Hz και 4.2 msec μετά την απόλυτη ανερέθιστη περίοδο. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων (n=7) σε συνδιασμό με την τυπική απόκλιση.

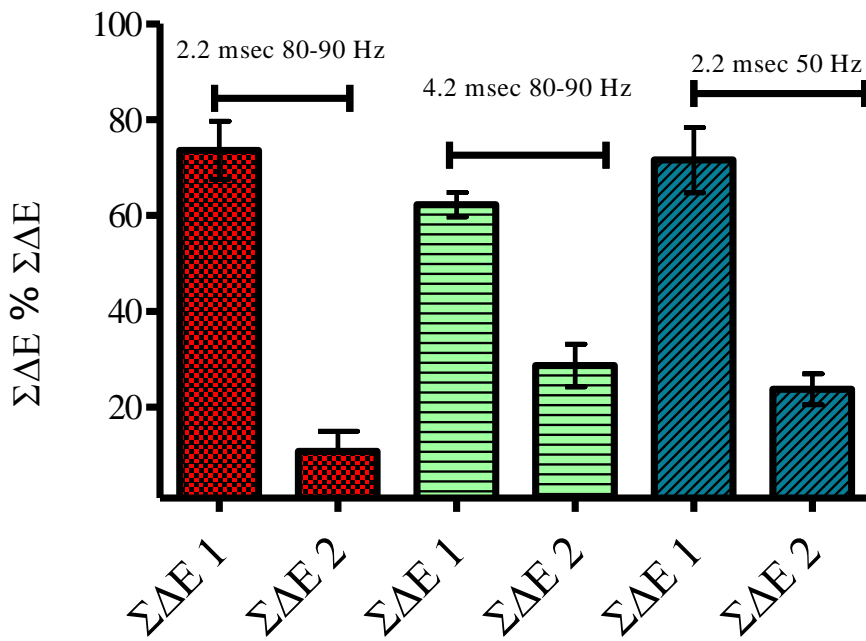
A**B**

Εικόνα 3.5.1.Γ: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου κατά την εφαρμογή του πρώτου παλμού (ΣΔΕ1) καθώς και του ΣΔΕ μετά την εφαρμογή δευτερου παλμού (ΣΔΕ2), ως προς το πρώτο ΣΔΕ. (A) σε συνθήκες μάρτυρα, και (B) σε διαβητικά ζώα. Οι συνθήκες διέγερσης αντιστοιχούν σε συχνότητα 50 Hz και 2.2 msec μετά την απόλυτη ανερέθιστη περίοδο. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων (n=11) σε συνδιασμό με την τυπική απόκλιση.

A

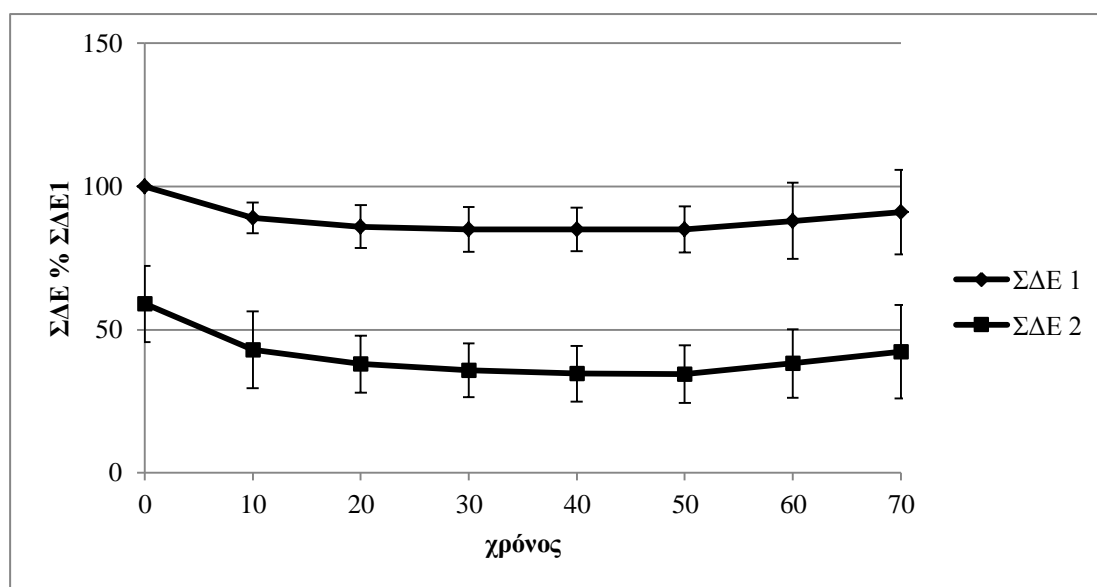


B



Εικόνα 3.5.1Δ: Συγκριτική απεικόνιση των τριών διακριτών συνθηκών. Οι τιμές αντιστοιχούν σε μέσους όρους και τυπικό σφάλμα της ελάχιστης τιμής του ΣΔΕ για το ίδιο χρονικό διάστημα καταπόνησης. (Α) σε συνθήκες μάρτυρα, και (Β) σε διαβητικά ζώα.

Για την εκτίμηση της προστατευτικής δράσης του EDTA έναντι στην τοξικότητα που προέρχεται μετά από έκθεση των ινών σε χαλκό επιλέχθηκε ο τρίτος συνδυασμός συνθηκών δηλαδή διέγερση με συχνότητα 50 Hz και 2.2 msec από την ανερέθιστη περίοδο. Τα νεύρα για τον σκοπό αυτό διεγέρθηκαν μετά προεπώαση σε EDTA σε συγκέντρωση 0,5mM και ακόλουθη προσθήκη Cu(II) για τουλάχιστον μία ώρα (Εικόνα 55).



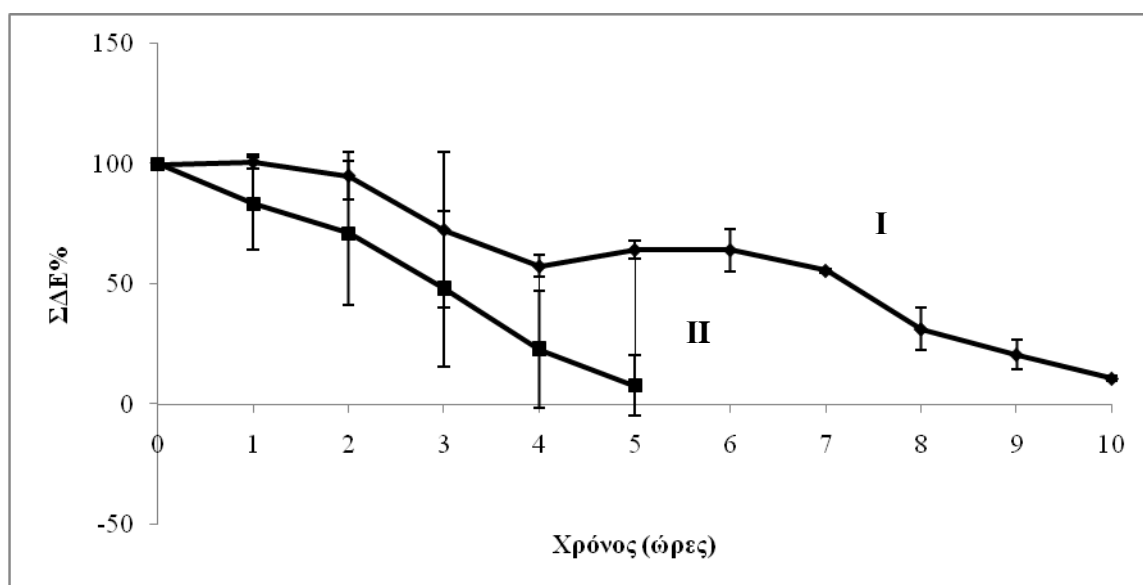
Εικόνα 3.5.1.Α: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου κατά την εφαρμογή του πρώτου παλμού (ΣΔΕ1) καθώς και του ΣΔΕ μετά την εφαρμογή δεύτερου παλμού (ΣΔΕ2), ως προς το πρώτο ΣΔΕ μετά από προεπώαση με EDTA (0.5mM) και την ακόλουθη προσθήκη Cu(II) σε συγκέντρωση 0,5mM. Οι συνθήκες διέγερσης αντιστοιχούν σε συχνότητα 50 Hz και 2.2 msec μετά την απόλυτη ανερέθιστη περίοδο. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων (n=3) σε συνδυασμό με την τυπική απόκλιση.

3.5.2 Βιωσιμότητα του ισχιακού νεύρου υπό μακροχρόνιες συνθήκες σε συχνότητα διέγερσης 100 Hz (*ex vivo*)

Στα πλαίσια ανάπτυξης μοντέλου διάκρισης της φυσιολογικής από την παθολογική κατάσταση, εφαρμόστηκε επιπλέον μια δοκιμασία όπου το ισχιακό νεύρο διεγείρεται με απλό παλμό όπως στην περίπτωση των κανονικών καταγραφών, ωστόσο στην περίπτωση αυτή η συχνότητα διέγερσης αυξάνεται από 1 σε 100 Hz. Το ισχιακό νεύρο τοποθετείται στον κατάλληλα διαμορφωμένο τρίχωρο θάλαμο και μετά από μία ώρα σταθεροποίησης (συχνότητα διέγερσης 1 Hz), διεγείρεται με συχνότητα 100 Hz. Τα πειράματα αυτά διακρίνονται και πάλι σε δύο ομάδες, αυτά των φυσιολογικών

ζώων (μάρτυρες) και αυτά των διαβητικών. Στην εικόνα φαίνεται η εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν σαφή καταπόνηση και στις δύο ομάδες ζώων καθώς το ΣΔΕ μειώνεται σημαντικά σε σχέση με αυτό υπό φυσιολογικές συνθήκες καταγραφής. Επιπλέον, φαίνεται ότι το ΣΔΕ μειώνεται πιο γρήγορα στην περίπτωση των ισχιακών νεύρων που προέρχονται από διαβητικά ζώα. Πιο συγκεκριμένα, η τιμή του IT_{50} στην περίπτωση του μάρτυρα αντιστοιχεί σε 7.2 ± 0.36 ώρες ενώ στην περίπτωση των ισχιακών νεύρων από διαβητικά ζώα η τιμή του IT_{50} είναι 3.87 ± 0.07 ώρες. Η βιωσιμότητα δηλαδή των νεύρων των διαβητικών ζώων μειώνεται σχεδόν δύο φορές πιο γρήγορα υπό συνθήκες αυξημένης συχνότητας διέγερσης.

Η μορφή αυτή της καταπόνησης συνδέεται με ενεργειακή εξάντληση. Η περιφερική νευροπάθεια η οποία οφείλεται στον Σακχαρώδη Διαβήτη έχει συνδεθεί με ενεργειακές μεταβολές στους νευρώνες λόγω διαταραχών στην πρόσληψη και τον μεταβολισμό της γλυκόζης.

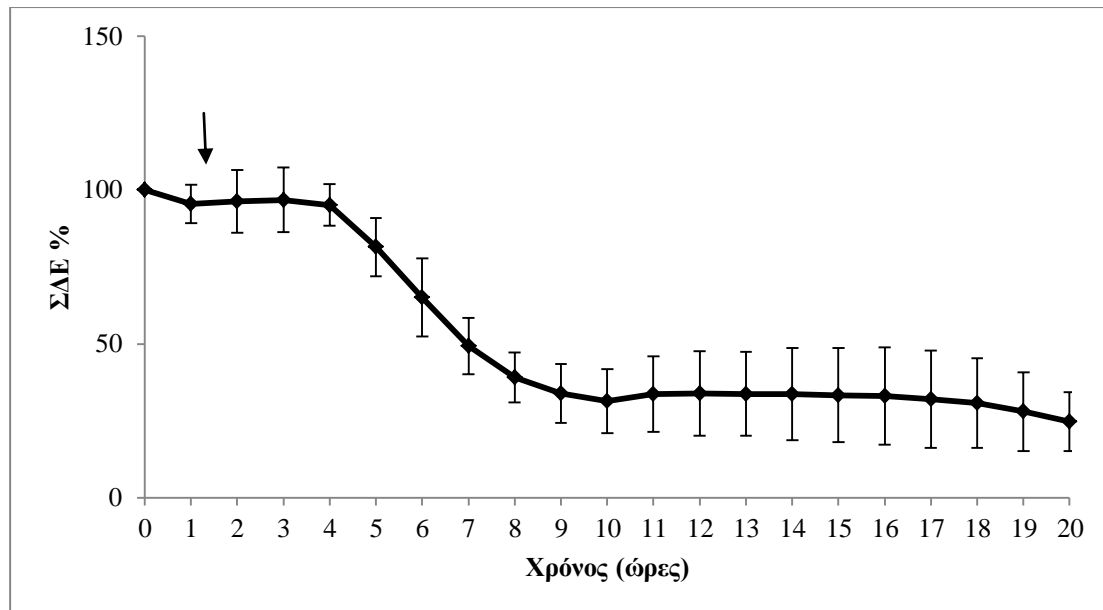


Εικόνα 3.5.2: Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος σε συνάρτηση με τον χρόνο παρουσία του επινευρίου (I) σε συνθήκες μάρτυρα (φυσιολογικός οξυγονωμένος ορός), (II) σε διαβητικά ζώα μετά από διέγερση με συχνότητα 100 Hz. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων (n=4) σε συνδυασμό με την τυπική απόκλιση.

3.6 Αντικαρκινικά φάρμακα

ΟΞΑΛΙΠΛΑΤΙΝΑ

Η απόκριση των νευρικών ινών, μπορεί εκτός από μείωση του ύψους του δυναμικού που αντιστοιχεί στην βιωσιμότητα, μπορεί να εκφράζεται και μέσω άλλων χαρακτηριστικών όπως είναι η μεταβολή της διάρκειας του δυναμικού που συνδέεται σε μεγάλο βαθμό με την εκπολωτική, επαναπολωτική και υπερπολωτική φάση του δυναμικού. Στα πλαίσια αυτά, μελετήθηκε η δράση του αντικαρκινικού φαρμάκου οξαλιπλατίνα η οποία χρησιμοποιείται σε θεραπευτικά πρωτόκολλα κατά του παχέος εντέρου και έχει συνδεθεί με πρόκληση οξείας μορφής νευροπάθειας. Η οξαλιπλατίνα κατηγοριοποιείται ως αναστολέας των τασεοελεγχόμενων καναλιών νατρίου. Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία έγιναν σε συγκέντρωση 100μΜ (0.039mg/ml). Το IT_{50} αντιστοιχεί σε 8 ± 0.5 ώρες παρουσιάζοντας σαφή διαφορά από αυτό του μάρτυρα. Επιπλέον, όπως φαίνεται και από τις καταγραφές του ΣΔΕ, η οξαλιπλατίνα δεν επηρεάζει τον χρόνο ανόδου του ΣΔΕ. Ωστόσο, μετά από το πέρας της πρώτης ώρας έκθεσης των νευρών στην οξαλιπλατίνα, εμφανίζονται δευτερογενείς εκπολωτικές φάσεις οι οποίες διατηρούνται για τουλάχιστον 8 ώρες. Η σημαντική διαφορά του χρόνου επαναφοράς το ΣΔΕ υποδηλώνει την αλληλεπίδραση της συγκεκριμένης ουσίας με τα τασεοελεγχόμενα κανάλια νατρίου τα οποία σχετίζονται με την επαναπολωτική και υπερπολωτική φάση του δυναμικού.



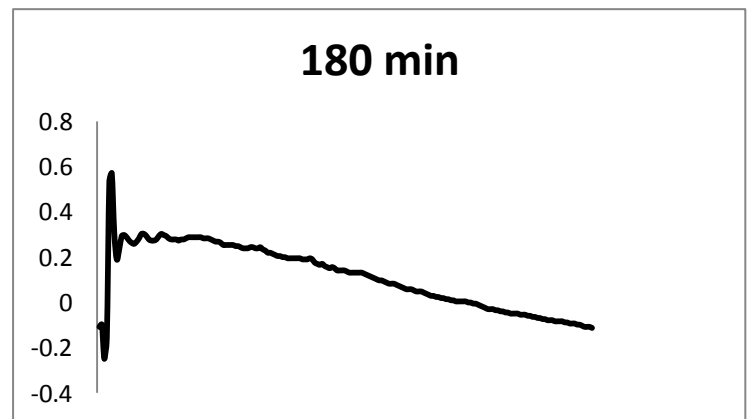
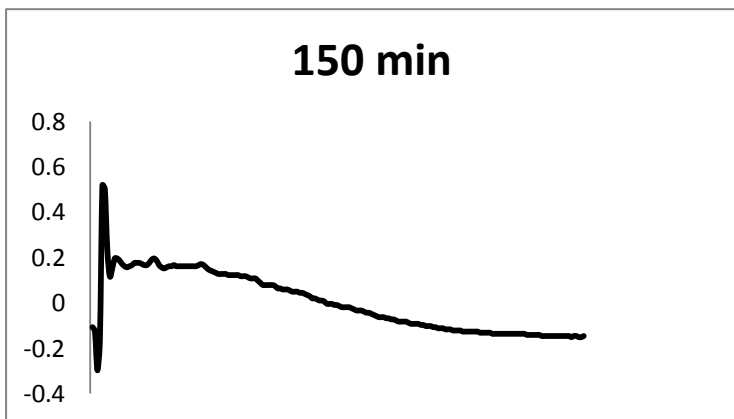
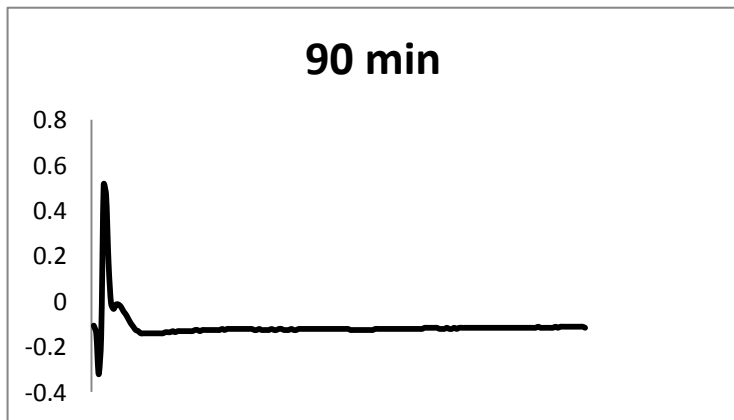
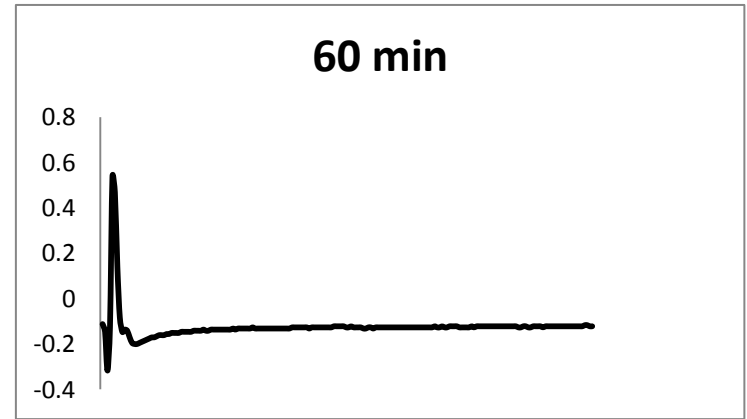
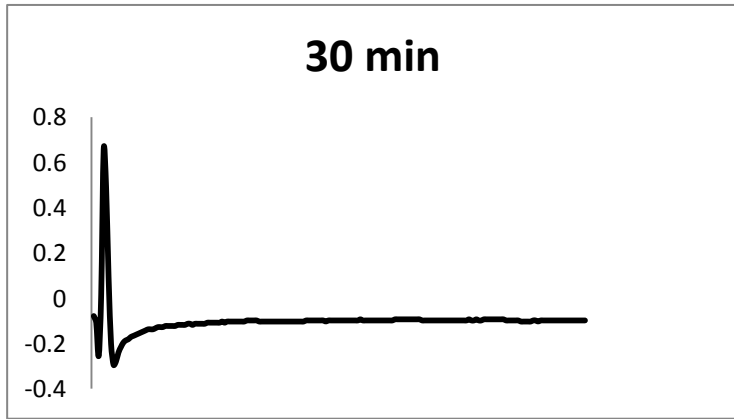
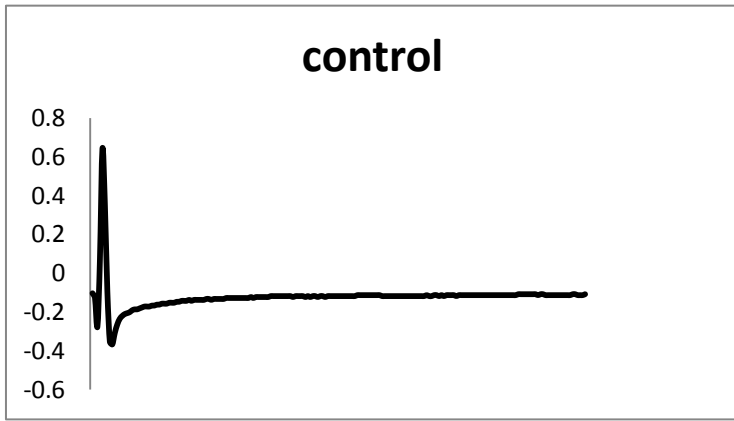
Εικόνα3.6.Α: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του αντικαρκινικού φαρμάκου οξαλιπλατίνα σε συγκέντρωση 100 μ M (n=4). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του αμινοξέος. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

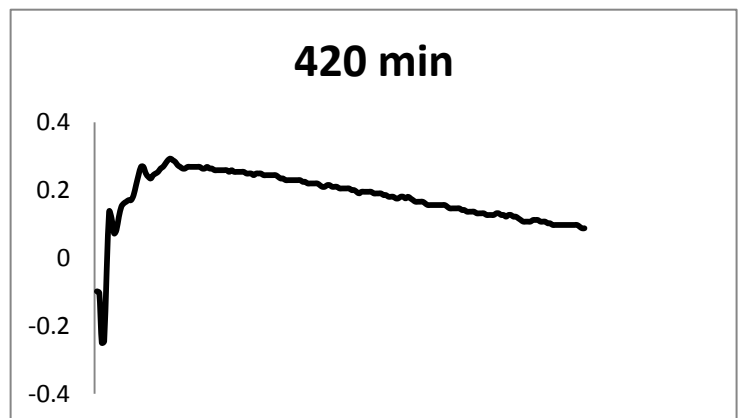
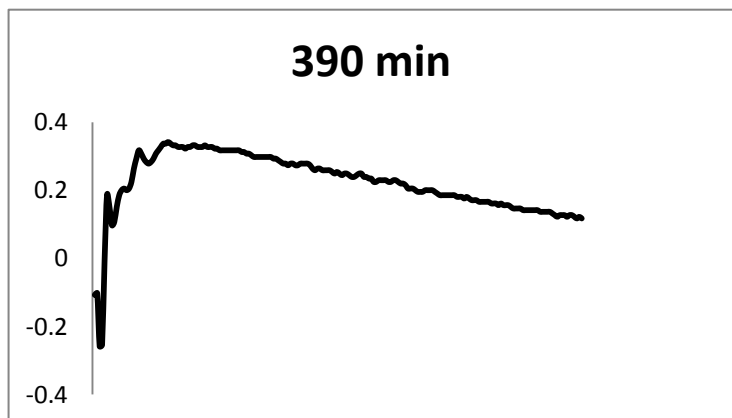
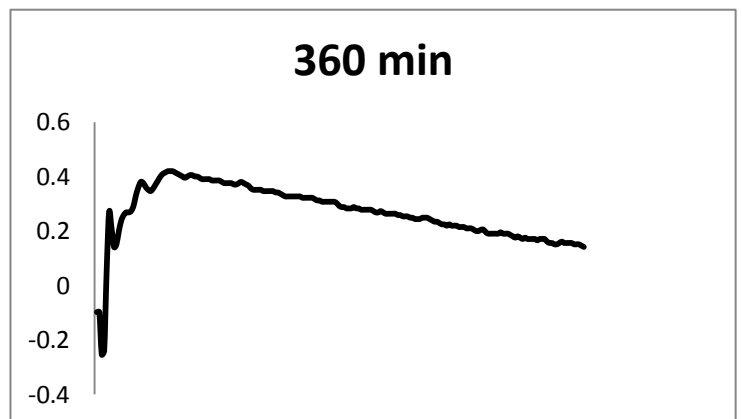
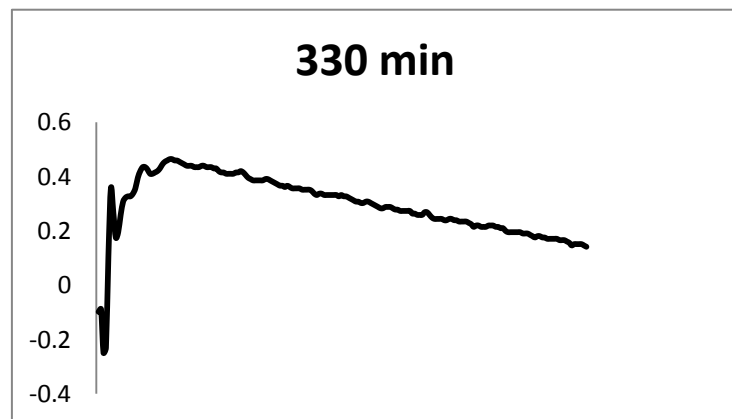
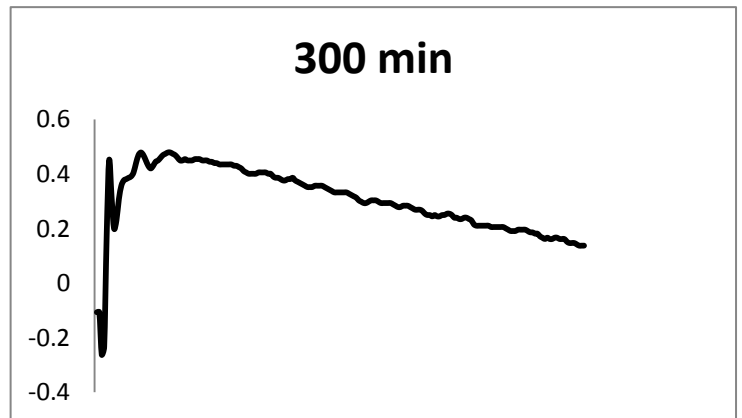
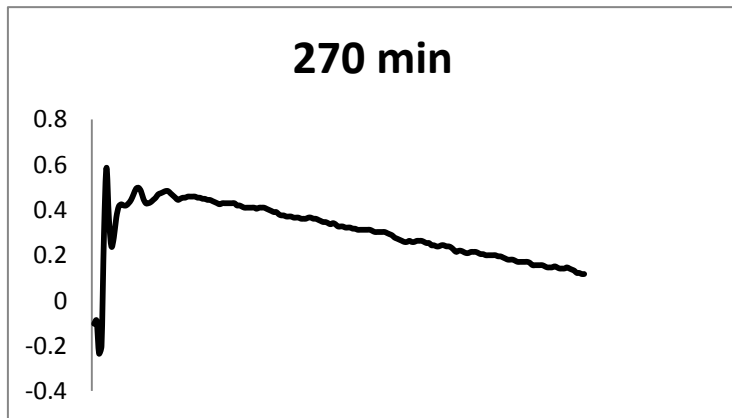
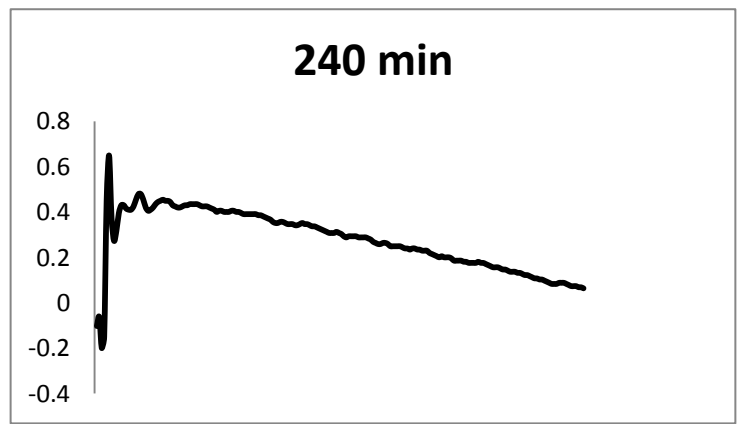
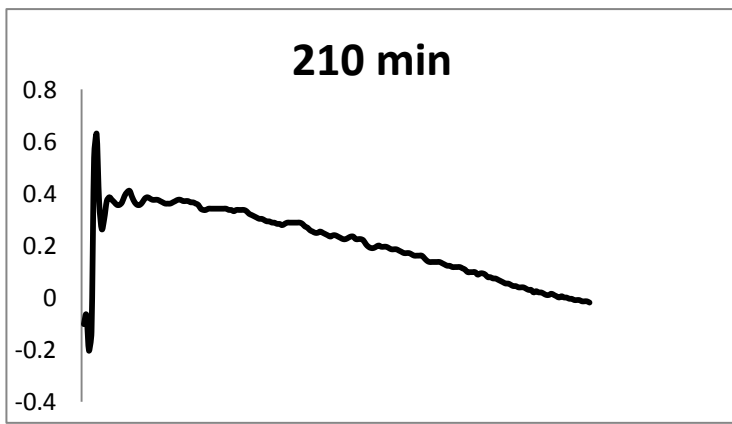
Πίνακας 6: Το ύψος και ο χρόνος ανόδου του ΣΔΕ σε συνθήκες μάρτυρα απουσία επινευρίου εκφρασμένο σε εκατοστιαίο ποσοστό της αρχικής τιμής του ΣΔΕ. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

Χρόνος (λεπτά) Φυσιολογικός ορός n=4	1	60	120	240	300	600
ΣΔΕ %	100	108.89 ±7,17	107.30±6.01	100.84±3.20	100.06±2.78	99.73±4.06
Χρόνος ανόδου (ms)	0.60± 0.06	0.62±0.06	0.60±0.06	0.61±0.06	0.63±0.06	0.61±0.06

Πίνακας 7: Το ύψος και ο χρόνος ανόδου του ΣΔΕ μετά από προσθήκη 100μΜ οξαλιπλατίνας απουσία επινευρίου εκφρασμένο σε εκατοστιαίο ποσοστό της αρχικής τιμής του ΣΔΕ. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

Χρόνος (λεπτά) Oxaliplatin 100μM n=4	1	60	120	240	300	600
ΣΔΕ %	100	97.52 ± 6.88	100.21 ± 7.86	103.26 ±2.11	86.14 ± 4.3	35.41 ±4.72
Χρόνος ανόδου (ms)	0.53 ± 0.067	0.56 ± 0.13	0.53 ± 0.18	0.53 ± 0.13	0.60 ± 0.11	1.20 ± 0.5





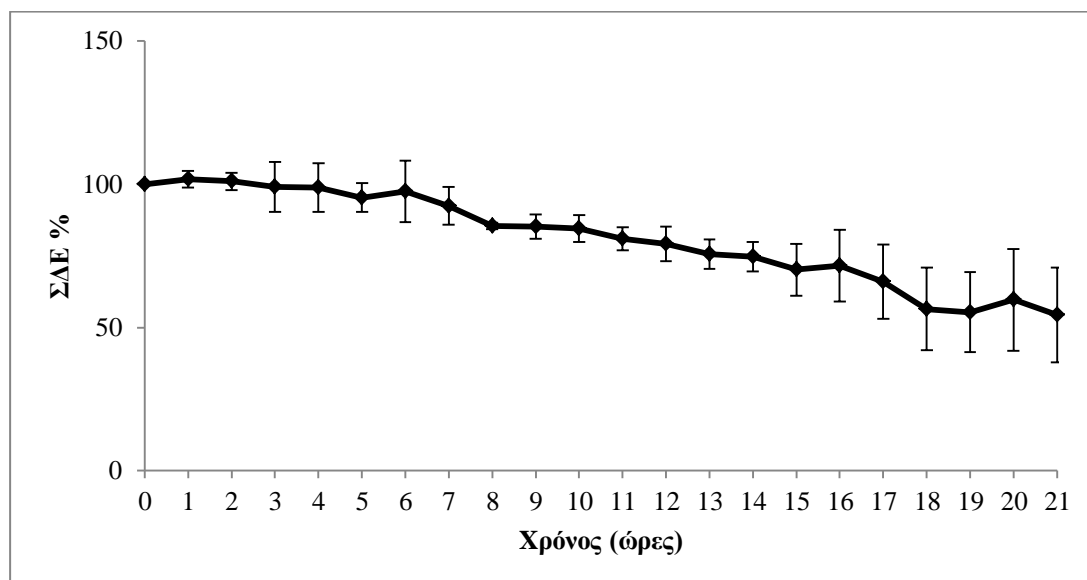
Εικόνα 3.6.B: Καταγραφές του ΣΔΕ απουσία επινευρίου μετά την προσθήκη του αντικαρκινικού φαρμάκου οξαλιπλατίνα σε συγκέντρωση 100μΜ.

Cis-πλατίνη

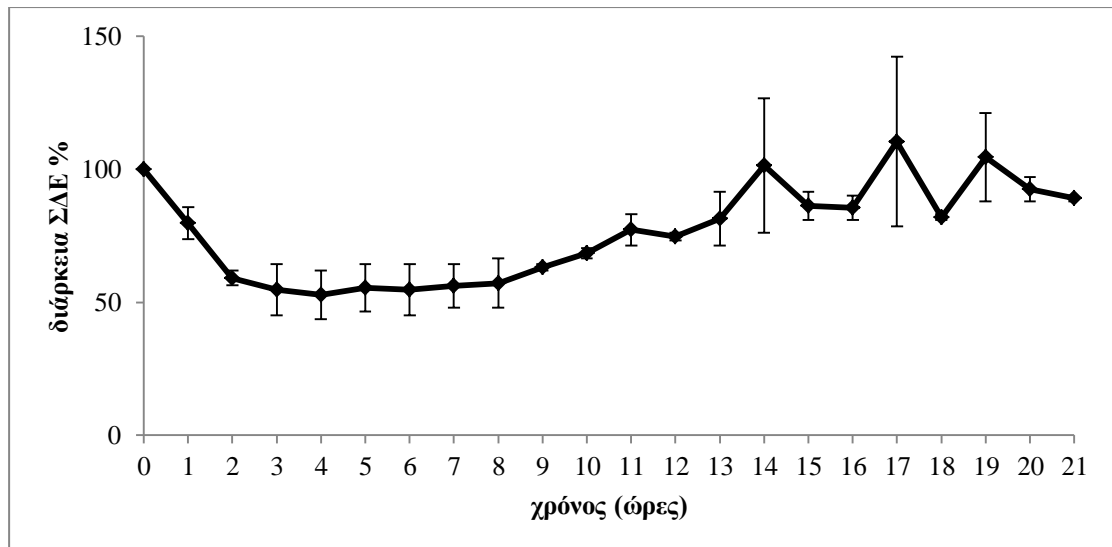
Στα ίδια πλαίσια και προκειμένου να πραγματοποιηθεί σύγκριση μεταξύ των δύο αντικαρκινικών φαρμάκων τα οποία έχουν ως βάση την πλατίνη, χρησιμοποιήθηκε η ένωση cis-πλατίνη. Όπως και στην περίπτωση της οξαλιπλατίνης, η ανάπτυξη περιφερικής νευροτοξικότητας και νευροπάθειας αποτελούν το πιο κοινό περιορισμό για την χορήγηση της cis-πλατίνης. Η cis-πλατίνη διαλύεται αρχικά σε DMSO, χρησιμοποιώντας την ελάχιστη δυνατή ποσότητα διαλύτη για αποφυγή της γνωστής τοξικής του δράσης. Η τελική αναλογία στο διαμέρισμα εμποτισμού είναι 0,039mg/ml που αντιστοιχούν σε 130μΜ.

Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως η συγκεκριμένη ένωση δεν έχει καμία σχεδόν επίδραση στην βιωσιμότητα των περιφερικών νευρικών ιών καθώς το ΣΔΕ δεν μειώνεται σημαντικά ειδικά στις πρώτες ώρες του πειράματος. Το IT_{50} αντιστοιχεί σε $19,93 \pm 0,4$ ώρες τιμή η οποία πλησιάζει αυτή του μάρτυρα για το ίδιο χρονικό διάστημα.

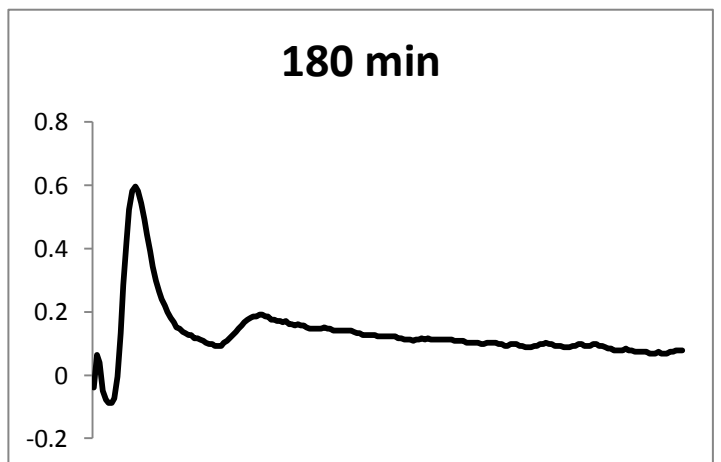
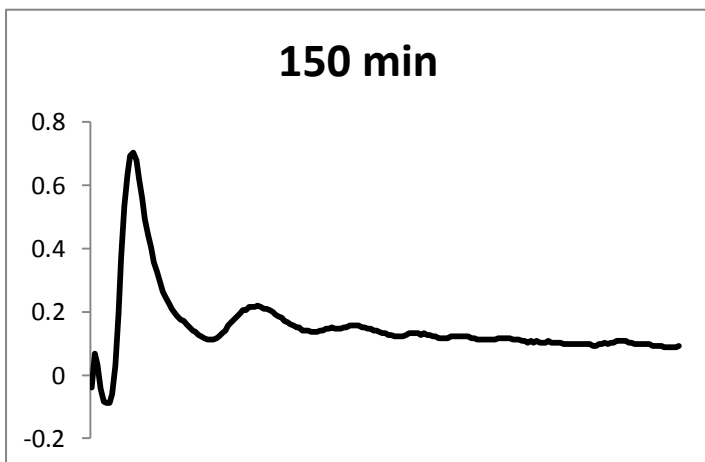
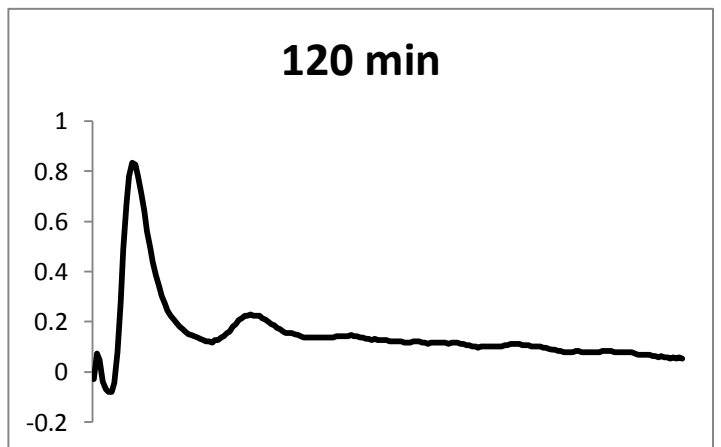
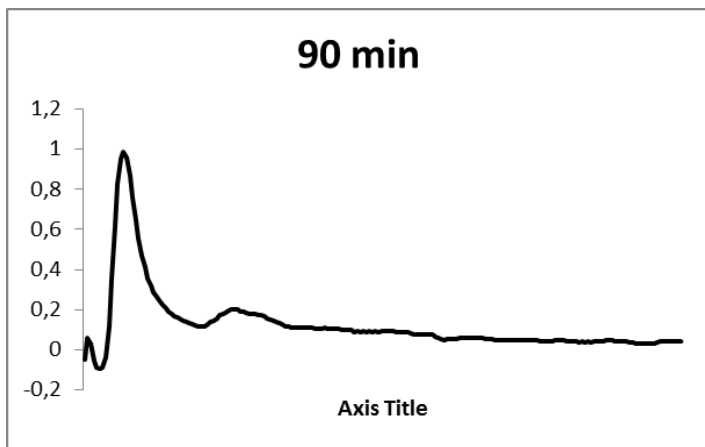
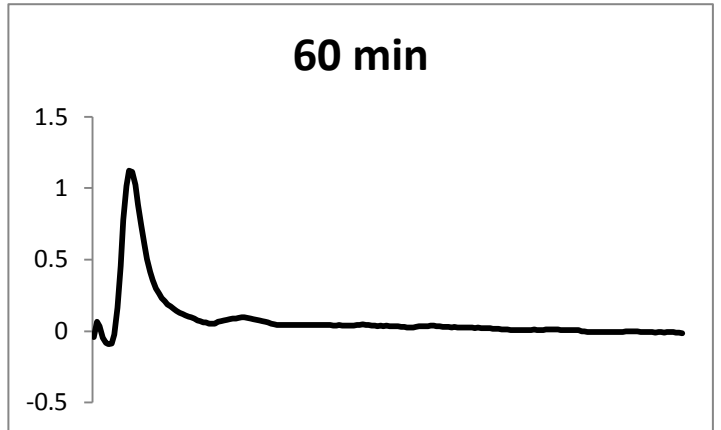
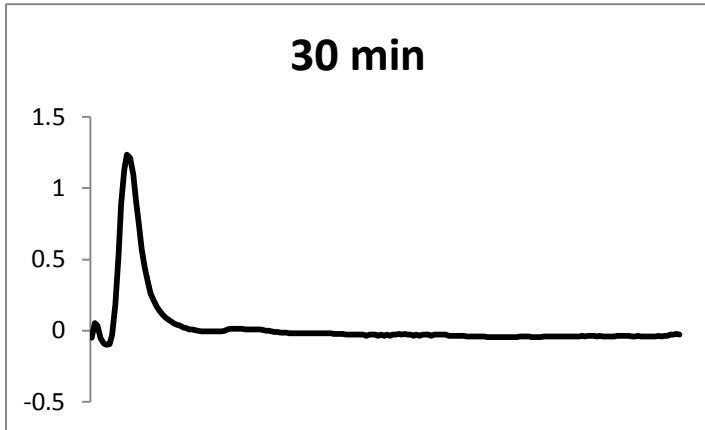
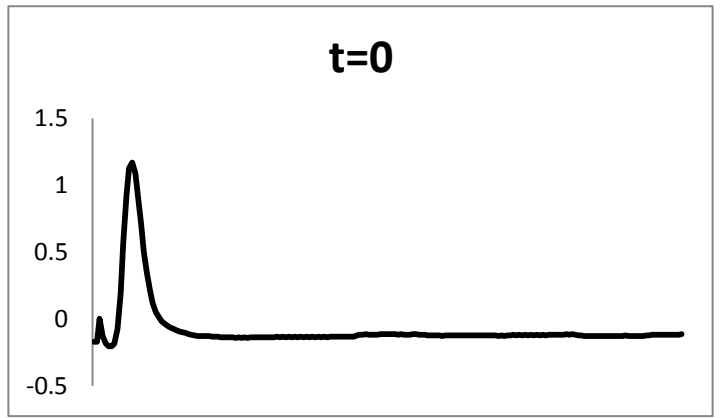
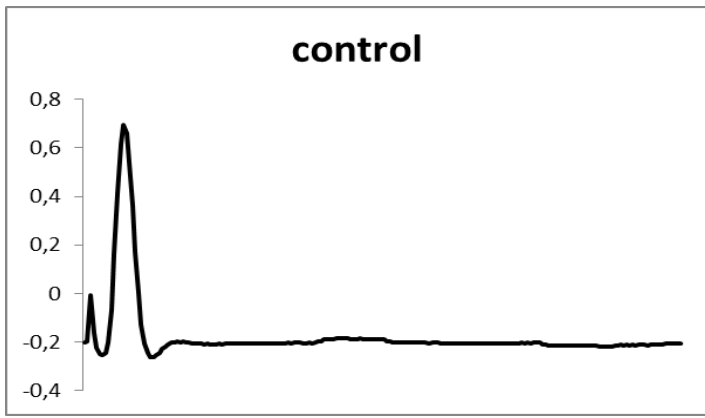
Ωστόσο, παρατηρείται σημαντική επίδραση στην διάρκεια του ΣΔΕ και μεταβολές που αντιστοιχούν στην επαναπολωτική και υπερπολωτική φάση του δυναμικού.

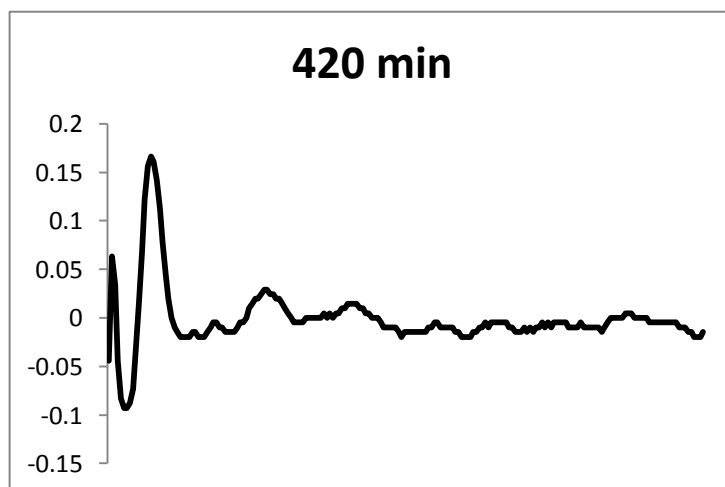
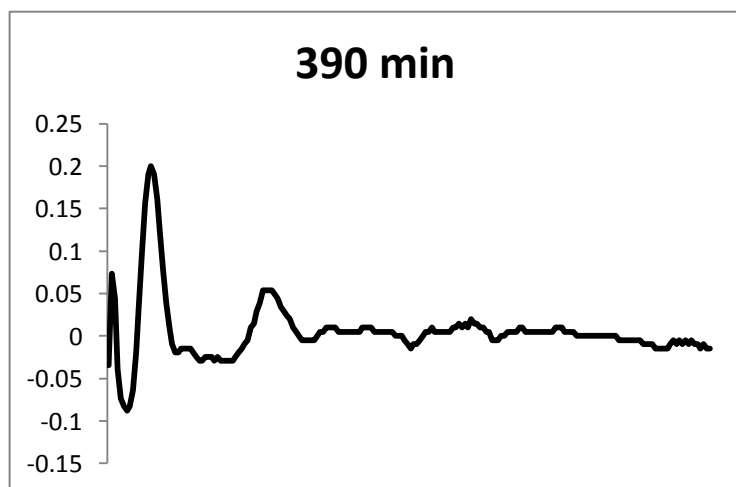
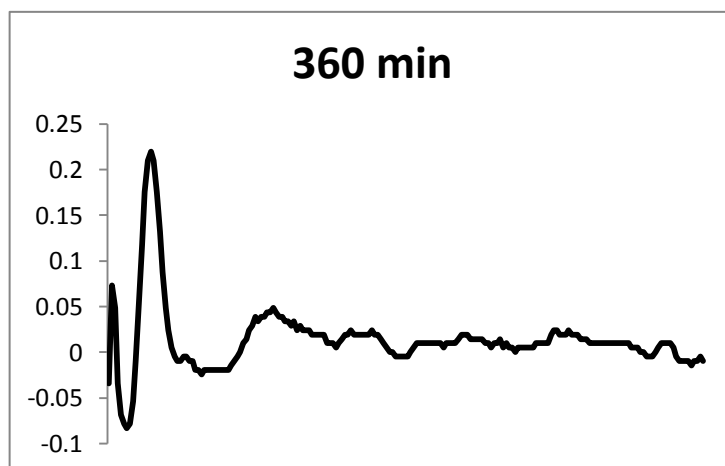
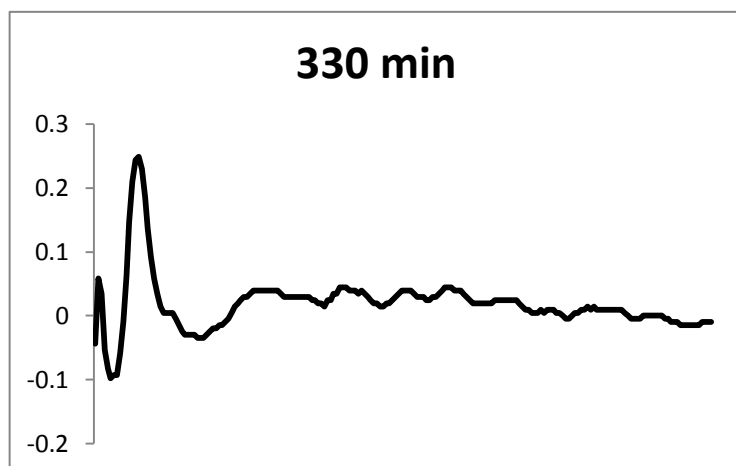
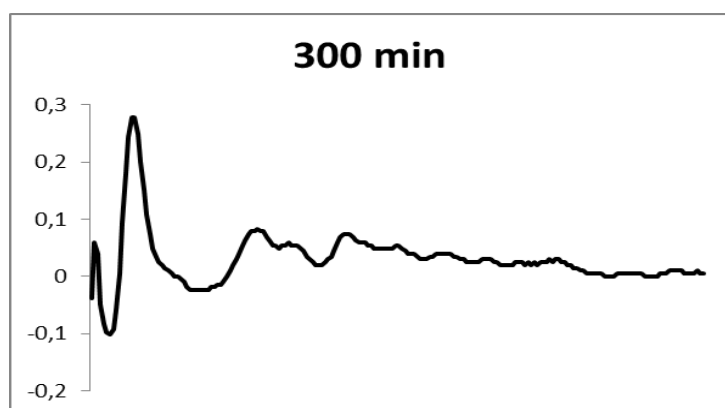
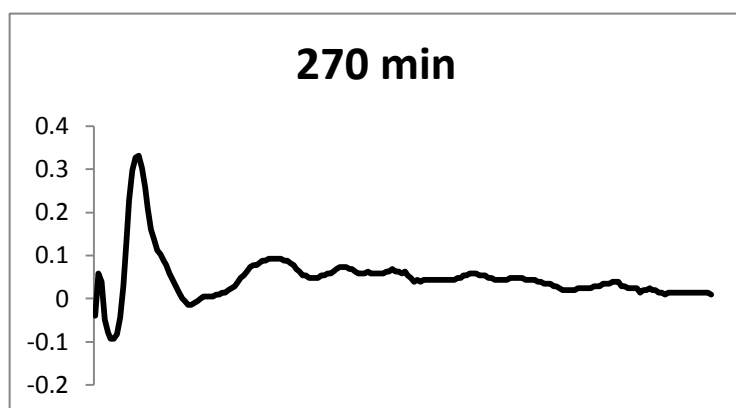
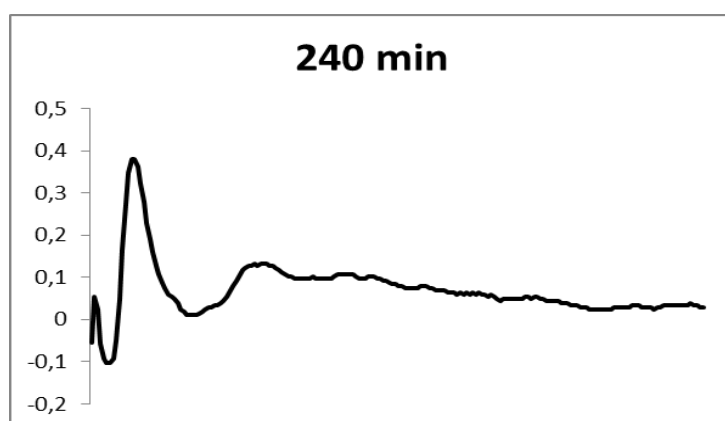
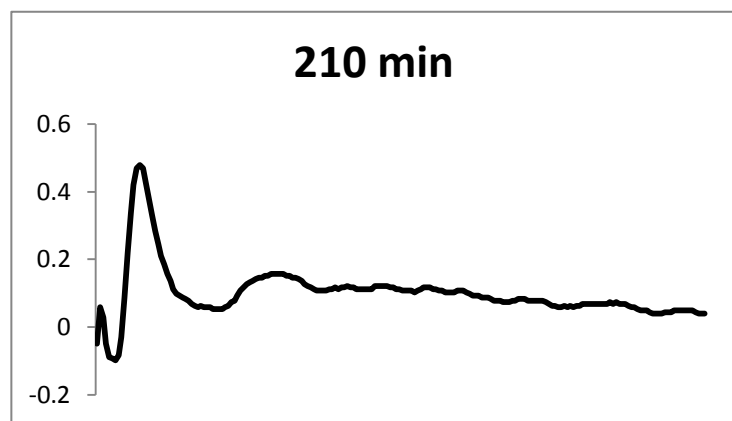


Εικόνα3.6.Γ:Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμου, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του αντικαρκινικού φαρμάκου cis-platin σε συγκέντρωση 130 μΜ (n=3). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του φαρμάκου. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.



Εικόνα3.6.Δ:Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή της διάρκειας του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του αντικαρκινικού φαρμάκου cis-platin σε συγκέντρωση 130 μ M (n=3). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του φαρμάκου. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.





Εικόνα 3.6.Ε: Καταγραφές του ΣΔΕ απουσία επινευρίου μετά την προσθήκη του αντικαρκινικού φαρμάκου *cis*-πλατίνη σε συφκέντρωση 130 μ M.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Νευροτοξική δράση μεταλλοϊόντων και νευροπροστατευτική δράση χημικών παραγόντων (*ex vivo*)

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν διάφοροι παράγοντες καταπόνησης των περιφερικών νευρικών ινών των θηλαστικών. Οι παράγοντες αυτοί περιλαμβάνουν μεταλλοτοξίνες οι οποίες μπορεί να έρθουν σε επαφή με το περιφερικό νευρικό σύστημα μέσω του περιβάλλοντος, της τροφικής αλυσίδας ή ακόμα κατά την διάρκεια ή μετά από θεραπευτική αγωγή όπως στην περίπτωση των αντικαρκινικών φαρμάκων. Οι παράγοντες αυτοί ομαδοποιούνται κάτω από τον όρο χημική καταπόνηση και η διερεύνηση της δράσης τους αποτέλεσε τον στόχο της παρούσας εργασίας.

Ένας μεγάλος αριθμός μεταλλοϊόντων θεωρείται απαραίτητος για την φυσιολογική λειτουργία των οργανισμών και τα μεταλλοϊόντα αυτά θεωρούνται ενδογενή. Επιπλέον, υπάρχουν μεταλλοϊόντα τα οποία δεν υπάρχουν στον οργανισμό και μπορεί δυνητικά να προκαλέσουν τοξικότητα. Τόσο τα ενδογενή όσο και τα εξωγενή μεταλλοϊόντα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες όπως είναι η συγκέντρωση του ίδιου του μετάλλου, το pH του μικροπεριβάλλοντος στο οποίο υπάρχει καθώς και η φύση των ενώσεων που σχηματίζει και η αλληλεπίδραση με συγκεκριμένα μόρια μπορεί να οδηγήσουν σε βλάβη του οργανισμού. Ακόμη, υπάρχουν μεταλλοϊόντα τα οποία βρίσκονται στην φύση και δρουν εξ' αρχής ως τοξικά με διάφορες ανεπιθύμητες συνέπειες με τελικούς αποδέκτες τους έμβιους οργανισμούς. Στα πλαίσια της εργασίας αυτής έγινε προσπάθεια ποσοτικοποίησης αλλά και ποιοτικής διερεύνησης της δράσης ορισμένων μεταλλοϊόντων στις περιφερικές νευρικές ίνες των θηλαστικών.

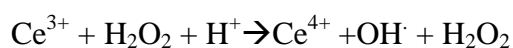
ΣΙΔΗΡΟΣ

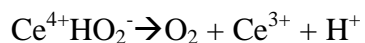
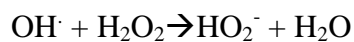
Ο σίδηρος αποτελεί στοιχείο ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό όλων των ανθρώπινων κυττάρων και είναι απαραίτητος σε βασικές κυτταρικές διεργασίες όπως στην παραγωγή ενέργειας. Στο νευρικό σύστημα, ο σίδηρος χρησιμοποιείται για την φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων του εγκεφάλου ενώ ακόμη εμπλέκεται στη σύνθεση νευροδιαβιβαστών και πιθανώς της μυελίνης. Ο ουσιαστικός βιολογικός ρόλος του σιδήρου βασίζεται στην ιδιότητα του

να μεταβάλλεται εύκολα από την δισθενή στην τρισθενή μορφή. Ο σίδηρος είναι οξειδωαναγωγικά ενεργό μέταλλο συμμετέχοντας έτσι στον σχηματισμό οξειδωτικού stress. Διαταραχές στην ομοιόσταση του σιδήρου έχουν συνδεθεί με την εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων του νευρικού συστήματος όπως είναι η νόσος Alzheimer και Parkinson. Επίδραση του σιδήρου στις περιφερικές νευρικές ίνες δεν μειώνει την βιωσιμότητά τους καθώς το IT_{50} είναι ίδιο σχεδόν με αυτό του αντίστοιχου μάρτυρα (25.5 ± 0.1). Η ιδιαίτερα υψηλή συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με το γεγονός ότι δεν εμφανίζεται τοξικότητα οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η μορφή του μεταλλοϊόντος και πιο συγκεκριμένα η βιοδιαθεσιμότητά του. Επιπλέον, είναι πιθανό ο τρισθενής σίδηρος να μετατρέπεται σε δισθενή κατά την διάρκεια των μακροχρόνιων καταγραφών ή ακόμα και να μειώνεται η διαλυτότητά του και άρα η βιοδιαθεσιμότητά του στο υπό μελέτη σύστημα.

ΔΗΜΗΤΡΙΟ

Το δημήτριο είναι μέταλλο το οποίο ανήκει στις σπάνιες γαίες. Ως μέταλλο δεν παρουσιάζει καμία βιολογική δραστηριότητα. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια τα οξείδια του δημητρίου έχουν χρησιμοποιηθεί στην κατασκευή ικτριωμάτων διαφόρων καταλυτών. Επιπλέον, τα ίδια τα οξείδια του δημητρίου επιδεικνύουν καταλυτικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες τόσο σε ιστούς όσο και σε *in vivo* μοντέλα πειραματοζώων [20]. Είναι γνωστό ότι το δημήτριο εμφανίζεται σε δύο οξειδωτικές βαθμίδες, +3 και +4. Στην παρούσα εργασία το δημήτριο εξετάστηκε στην οξειδωτική βαθμίδα +3. Για το χρονικό διάστημα των καταγραφών το ΣΔΕ δεν μειώθηκε σε σχέση με τον μάρτυρα ενώ επίσης δεν επηρεάστηκε καμία άλλη ηλεκτροφυσιολογική παράμετρος όπως είναι η διάρκεια το δυναμικού ή ο χρόνος εκπόλωσης. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως το δημήτριο στην συγκεκριμένη οξειδωτική βαθμίδα ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις της τάξης των millimolar, δεν επηρεάζει την βιωσιμότητα του ισχιακού νεύρου των θηλαστικών και δεν αλληλεπιδρά με τα τασεοελεγχόμενα κανάλια νατρίου ή καλίου. Ωστόσο, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση της συμπεριφοράς του Ce(III) σε συνθήκες οξειδωτικού stress. Έχει δειχθεί ότι το Ce(III), παρουσία H_2O_2 μπορεί να συμμετέχει σε αντιδράσεις Fenton\HaberWeissως εξής:





Η μεταλλοεπαγόμενη οξειδωση πρωτεϊνών, λιπιδίων και νουκλεϊκών οξέων αποτελεί κύρια πηγή οξειδωτικού stress για τα κύτταρα. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι υψηλές συγκεντρώσεις νανοσωματιδίων δημητρίου μπορεί να συνεισφέρουν στην παραγωγή οξειδωτικού stress τόσο σε κυτταροκαλιέργειες [30,40].

ΚΟΒΑΛΤΙΟ

Το κοβάλτιο είναι ευεργετικό και σημαντικό για την ανθρώπινη υγεία. Εντούτοις, οι πολύ υψηλές συγκεντρώσεις του μπορεί να επιφέρουν τα αντίθετα αποτελέσματα (D. Beyersmann & Hartwig, 1992). Η παρουσία κοβαλτίου για τον ανθρώπινο οργανισμό φαίνεται να είναι σημαντική και απαραίτητη, εντούτοις η υπερβολική συγκέντρωση κοβαλτίου στα βιολογικά υγρά (παρόμοια δηλαδή με άλλα μεταλλοϊόντα όπως Mn(II), Fe(III), Cu(II), κ.ά.) μπορεί να επιφέρει αντίθετες συνέπειες και να προκαλέσει προβλήματα όπως άσθμα και πνευμονία, ειδικότερα σε ανθρώπους που έρχονται συχνά σε επαφή με αυτό. Όπως και στην περίπτωση του σιδήρου, δεν επιδρά στην βιωσιμότητα των περιφερικών νευρικών ιών ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις (500 μM) καθώς το IT_{50} αντιστοιχεί σε αυτή του μάρτυρα.

ΑΡΓΙΛΙΟ

Το αργίλιο αποτελεί ένα από τα πιο διαδεδομένα μέταλλα στην φύση. Το στοιχείο αυτό δεν απαντάται ελεύθερο αλλά βρίσκεται συμπλοκοποιημένο με κάποιο υποκαταστάτη. Η αναγνώριση του αργιλίου ως νευροτοξικού παράγοντα έγινε το 1988 και προστέθηκε στην λίστα υποψηφίων παραγόντων μόλυνσης από την υπηρεσία περιβαλλοντικής προστασίας των Η.Π.Α.. Όπως και τα δύο προηγούμενα μέταλλα που εξετάστηκαν έτσι και στην περίπτωση του αργιλίου δεν φαίνεται καμία ουσιαστική επίδραση του αργιλίου στις περιφερικές νευρικές ίνες. Η παρατήρηση αυτή σχετίζεται με την ιδιαίτερα πολύπλοκη χημεία του συγκεκριμένου μετάλλου σε υδατικά διαλύματα. Αξίζει να αναφερθεί ότι η διαλυτότητα του αργιλίου είναι ιδιαίτερα εξαρτώμενη από το pH. Επιπλέον, η βιολογική δράση του αργιλίου και άρα η εμφάνιση οποιασδήποτε μορφής τοξικότητας είναι πολύ στενά συνδεδεμένη με την φύση του υποκαταστάτη του μετάλλου αυτού. Δεν είναι ακόμα πλήρως αποσαφηνισμένο ποιες είναι εκείνες οι ενώσεις, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τις

τοξικές επιδράσεις του αργιλίου στα διάφορα βιολογικά συστήματα. Θεωρείται ότι τα ιδιαίτερα δραστικά ιόντα του $Al(III)$ είναι υπεύθυνα για τις τοξικές επιδράσεις του αργιλίου καθώς τα ιζήματα δεν εμφανίζουν καμία ουσιαστικά βιοδιαθεσιμότητα. Σε βιολογικά συστήματα, το ποσό των ελεύθερων ιόντων $Al(III)$ εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το ποσό των δεσμευμένων ιόντων σε σύμπλοκα με υποκαταστάτες. Όσον αφορά στην τοξικότητα, ο σχηματισμός συμπλόκων καθίσταται απαραίτητος καθώς η συμπλοκοποίηση είναι αυτή που προωθεί ή μειώνει αντίστοιχα την βιοδιαθεσιμότητα των ιόντων $Al(III)$ και καθορίζει επίσης το σημείο σχηματισμού του συμπλόκου. Επιπλέον, το αργίλιο δεν μπορεί να συμμετέχει σε αντιδράσεις οξειδωαναγωγής λόγω του σταθερού αριθμού οξείδωσης (+3) που διαθέτει. Η τοξική του δράση σε ορισμένα *invitro* συστήματα ωστόσο υποδεικνύει περαιτέρω διερεύνηση σε ότι αφορά τη φύση του υποκαταστάτη στο οποίο συναρμόζεται το ιόν του αργιλίου, τις φυσικοχημικές συνθήκες του μικροπεριβάλλοντος όπου μπορεί να δράσει τοξικά το αργίλιο καθώς και ο χρόνος έκθεσης.

ΧΡΩΜΙΟ

Το χρώμιο ανάλογα με την οξειδωτική βαθμίδα που εμφανίζει μπορεί να είναι τοξικό η μη, ενδογενές ή εξωγενές. Το χρώμιο εισέρχεται στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω της αναπνοής και της κατανάλωσης τροφής και ποτών που το περιέχουν. Το τρισθενές χρώμιο, $Cr(III)$, θεωρείται απαραίτητο ιχνοστοιχείο για τον οργανισμό και παράλληλα βιολογικά αδρανές. Αντίθετα, το εξασθενές χρώμιο $Cr(VI)$ έχει χαρακτηριστεί ως αποδεδειγμένο καρκινογόνο. Το εξασθενές χρώμιο, έχει δειχθεί ότι προκαλεί καρδιοτοξικότητα και άλλες μορφές τοξικότητας κυρίως μέσω πρόκλησης σχηματισμού οξειδωτικού stress. Στις περιφερικές νευρικές ίνες, το εξασθενές χρώμιο έχει σαφή επίδραση την βιωσιμότητα των ινών. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως το $Cr(VI)$ έχει σαφή επίδραση επί των νευρικών ινών καθώς η τιμή του IT_{50} παρουσιάζει ιδιαίτερα σημαντική διαφορά από εκείνη του μάρτυρα για το ίδιο χρονικό διάστημα καταγραφών. Πιο συγκεκριμένα, η τιμή IT_{50} είναι 5.7 ± 0.4 μετά από επίδραση με $500 \mu M$ και 7.8 ± 0.2 ώρες μετά από επίδραση με $200 \mu M$ υποδεικνύοντας ότι τοξικότητα μπορεί να εξαρτάται από την συγκέντρωση της συγκεκριμένης μεταλλοτοξίνης.

ΧΑΛΚΟΣ

Ο χαλκός αποτελεί σημαντικό ιχνοστοιχείο για πολλούς αερόβιους οργανισμούς, συμμετέχοντας σε πληθώρα βιοχημικών διεργασιών. Μετέχει εξίσου ως δομικό συστατικό πολλών κρισίμων πρωτεϊνών και ενζύμων που συμβάλλουν σε αντιδράσεις παραγωγής ενέργειας στα μιτοχόνδρια, σε αντιδράσεις οξειδίας φάσης, και βοηθά στην ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος. Εμφανιζόμενος με δυο οξειδωτικές μορφές, Cu(I) και Cu(II), ο χαλκός συνεισφέρει στο σχηματισμό ελευθέρων δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS). Ακραίες τιμές συγκέντρωσης του στοιχείου έχουν αποδειχθεί τοξικές, ενώ ακόμα μελέτες έχουν δείξει ότι συσσωρεύεται και απορροφάται από πληθώρα βιολογικών ιστών, όπως τα νευροϊνιδώδη συμπλέγματα και οι πλάκες γήρανσης. Για τον άνθρωπο οι κύριες οδοί έκθεσης στον χαλκό αποτελούν η τροφή, το πόσιμο νερό ο αναπνεόμενος αέρας καθ'ως και το δέρμα. Στον οργανισμό, οι διάφορες ενώσεις του χαλκού εισέρχονται κυρίως μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα και ειδικότερα μέσω του δωδεκαδάκτυλου με ενεργό μεταφορά και σπανιότερα μέσω του αναπνευστικού βλεννογόνου. Ο ακριβής μηχανισμός της τοξικής δράσης του χαλκού δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Είναι γνωστό ότι ο χαλκός καταστρέφει την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Πιο συγκεκριμένα τα ιόντα χαλκού (Cu^{+2}) ανάγονται από τις θειολικές ομάδες της κυτταρικής μεμβράνης προς Cu^+ . Ο Cu^+ στη συνέχεια οξειδώνεται προς Cu^{+2} από το οξυγόνο ενώ το οξυγόνο μετατρέπεται από σε ROO^\cdot . Βασική κληρονομική διαταραχή η οποία σχετίζεται με τον μεταβολισμό του χαλκού είναι η νόσος Wilson και που χαρακτηρίζεται από υπερβολική εναπόθεση χαλκού στο ήπαρ, τον εγκέφαλο, τα νεφρά και τον κερατοειδή. Η συσσώρευση χαλκού στο ΚΝΣ προκαλεί καταστροφή των νευρικών κυττάρων του κελύφους, του φακοειδούς και του εγκεφαλικού φλοιού. Αντικείμενο βιολογικών μελετών αποτελούν εδώ και πολλά χρόνια ο χαλκός και οι ενώσεις του για την αντιρρευματική, αντιμικροβιακή και αντικαρκινική τους δράση. Ωστόσο, το είδος του υποκαταστάτη δηλαδή το μόριο στο οποίο συναρμόζεται το μεταλλοϊόν του χαλκού διαδραματίζει εξέχοντα ρόλο στον βαθμό και την δράση που επιδεικνύει το κάθε σύμπλοκο. Ανάλογα λοιπόν με το μόριο και την φύση του υποκαταστάτη μπορεί να μεταβληθεί η διαλυτότητα και η βιοδιαθεσιμότητα του μετάλλου. Για την αξιολόγηση της δράσης του δισθενούς χαλκού, στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε ο γλυκινικός χαλκός ο οποίος παρουσιάζει υψηλή βιοδιαθεσιμότητα καθώς η γλυκίνη είναι αμινοξύ που μπορεί

φυσιολογικά να βρεθεί στον οργανισμό και παράλληλα το σύμπλοκο αυτό είναι υδατοδιαλυτό σε αντίθεση με άλλα σύμπλοκα ή ενώσεις του χαλκού όπως είναι το CuCl_2 . Στις περιφερικές νευρικές ίνες των θηλαστικών, ο χαλκός παρουσιάζει σαφή δόσο-εξαρτώμενη νευροτοξικότητα σε εύρος συγκεντρώσεων από 1-500 μM . Από τα αποτελέσματα προκύπτει σημαντική πτώση του ΣΔΕ, σε μικρό χρονικό διάστημα από την προσθήκη του κυρίως στις υψηλές συγκεντρώσεις. Πιο συγκεκριμένα, το IT_{50} για την συγκέντρωση των 500 μM είναι 3.4 ± 0.3 , των 250 μM είναι 2.98 ± 0.46 , των 125 μM είναι 3.64 ± 0.23 , των 75 μM είναι 9.39 ± 0.17 , των 25 μM είναι 10.84 ± 0.54 ενώ για συγκέντρωση 1 μM το IT_{50} είναι 23.55 ± 0.14 το οποίο είναι σχεδόν ίσο με αυτό του μάρτυρα. Στις τρεις υψηλότερες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν το IT_{50} είναι σχεδόν το ίδιο συμπεραίνοντας ότι συγκεντρώσεις υψηλότερες από τα 100 μM και μέχρι τα 500 μM τουλάχιστον ανήκουν στο πλατώ τοξικότητας του συγκεκριμένου μετάλλου για το σύστημα το οποίο μελετάται. Σε συγκέντρωση 500 μM το ΣΔΕ μειώνεται 6.61 φορές πιο γρήγορα σε σχέση με τον μάρτυρα. Ωστόσο, η επίδραση του χαλκού δεν επηρεάζει άλλες ηλεκτροφυσιολογικές παραμέτρους όπως είναι ο χρόνος εκπόλωσης ή διάρκεια του ΣΔΕ. Επιπλέον υπολογίστηκε και το IC_{50} δηλαδή η συγκέντρωση εκείνη που επιφέρει μείωση του ΣΔΕ στο 50% του μάρτυρα με χρήση του προγράμματος GraphpadPrism 5 και που αντιστοιχεί στα 60 μM .

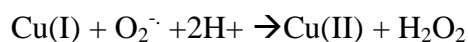
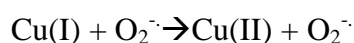
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω το επινεύριο διαδραματίζει προστατευτικό ρόλο εμποδίζοντας ή καθυστερώντας την πρόσβαση ορισμένων ουσιών στις νευρικές ίνες. Το IT_{50} παρουσία του επινευρίου έχει τιμή 12.56 ± 0.53 ενώ όπως αναφέρθηκε και παραπάνω το IT_{50} μετά από αφαίρεση του επινευρίου αντιστοιχεί σε 2.56 ± 0.46 . Συνεπώς, η παρουσία του επινευρίου επιφέρει 4,2 φορές πιο αργή μείωση του ΣΔΕ μετά από επίδραση με Cu(II) και άρα το επινεύριο δεν είναι πλήρως και άμεσα περατό από τα μεταλλοϊόντα του χαλκού.

Μετά την επιβεβαίωση της νευροτοξικής δράσης του χαλκού στο συγκεκριμένο εύρος συγκεντρώσεων, έγινε προσπάθεια αποσαφήνισης του μηχανισμού της τοξικής του δράσης. Για τον σκοπό αυτό αρχικά, τα νεύρα εκτάθηκαν σε συγκέντρωση 500 μM στον υποκαταστάτη του υπό μελέτη συμπλόκου, δηλαδή την γλυκίνη. Το IT_{50} για την γλυκίνη αντιστοιχεί σε 19.05 ± 0.08 ώρες, τιμή η οποία πλησιάζει αρκετά αυτή του μάρτυρα. Συνεπώς η τοξική δράση που παρατηρείται στις νευρικές ίνες

μετά από επώαση με γλυκινικό χαλκό οφείλεται στο μεταλλοϊόν και όχι στον υποκαταστάτη του συμπλόκου.

N-ακετυλοκυστεΐνη

Ο χαλκός είναι οξειδωαναγωγικά ενεργό μεταλλοϊόν οπότε μέσω αντιδράσεων Fenton και Fenton-Weiss είναι δυνατό να συμμετέχει στον σχηματισμό ενεργών μορφών οξυγόνου. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η ένωση N-ακετυλοκυστεΐνη (NAC). Το NAC είναι γνωστό αντιοξειδωτικό μόριο και έχει την ιδιότητα να δεσμεύει την τις παραγόμενες ελεύθερες ρίζες οξυγόνου με αποτέλεσμα να αναστέλλει την τοξική τους δράση όπως έχει δειχθεί και σε άλλες εργασίες [41]. Το NAC δεν επηρεάζει την βιωσιμότητα του ισχιακού νεύρου σε συγκέντρωση μέχρι και 1 mM. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε προεπάση του νεύρου με NAC σε συγκεντρώσεις 1 και 0,5 mM και έπειτα προστέθηκε ο χαλκός σε διάφορες συγκεντρώσεις (125, 250 και 500 μ M) προκειμένου να διερευνηθεί η σχετική αναλογία (στοιχειομετρικά) όπου το NAC μπορεί να δράσει νευροπροστατευτικά έναντι του Cu(II). Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως η παρουσία του NAC οδηγεί σε μικρή αύξηση του IT_{50} του ισχιακού νεύρου όταν εκτίθεται σε Cu(II) ωστόσο η αντιοξειδωτική του δράση εξαρτάται από την συγκέντρωση της μεταλλοτοξίνης. Προεπάση του ισχιακού νεύρου με 1 mM NAC και στη συνέχεια προσθήκη 500 μ M αντιστοιχεί σε IT_{50} ίσο με 1.69 ± 0.51 . Επιπλέον, προεπάση με 1 mM NAC και ακόλουθη προσθήκη 250 και 125 μ M Cu(II) οδηγεί σε IT_{50} ίσο με 3.79 ± 0.33 και 7.26 ± 0.41 ώρες. Προεπάση του ισχιακού νεύρου με 0.5 mM NAC και στη συνέχεια προσθήκη 500 μ M Cu(II) αντιστοιχεί σε IT_{50} ίσο με 6.04 ± 0.35 ενώ προεπάση του ισχιακού νεύρου με 0.5 mM NAC και στη συνέχεια προσθήκη 125 μ M αντιστοιχεί σε IT_{50} ίσο με 2.7 ± 0.12 . Ακόμα, συμπεραίνεται λοιπόν ότι η παρουσία του Cu(II) συντελεί στην παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου. Ωστόσο, η ιδιαίτερα μικρή διαφοροποίηση του IT_{50} σε συνδυασμό με την ελάττωσή του όταν η στοιχειομετρική αναλογία ήταν 1\1 σε υψηλές συγκεντρώσεις (0.5 mM NAC-0.5 mM Cu(II)), δικαιολογείται από την ιδιότητα του χαλκού να αντιδρά με τις θειόλες προς σχηματισμό H_2O_2 . Σε *invitro* καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων, το NAC έχει χρησιμοποιηθεί επικουρικά με τον δισθενή χαλκό με στόχο τον κυτταρικό θάνατο μέσω παραγωγής H_2O_2 [42]. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα έχουν ως εξής:



Κατά συνέπεια, η αλληλεπίδραση του δισθενούς χαλκού με θειόλες όπως είναι η Ν-ακετυλοκυστεΐνη είναι δυνατό να συνεισφέρει στην παραγωγή υεροξειδίου του υδρογόνου με τρόπο ωστόσο που εξαρτάται από την σχετική στοιχειομετρική αναλογία των αντιδρώντων όπως προκύπτει και από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας.

Κινικόοξύ (quinicacid- QA)

Στα ίδια πλαίσια πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της νευροπροστατευτικής δράσης του αντιοξειδωτικού και χηλικοποιητικού μορίου κινικό οξύ. Το κινικό οξύ είναι φυσικό μόριο και απαντάται κυρίως στα φυτά σε συγκεντρώσεις της τάξης των mM. Επιπλέον χρησιμοποιείται ως υποκαταστάτης πολλών μετάλλων λόγω της ιδιότητάς του να χηλικοποιεί. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 1mM. Η παρουσία του κινικού οξέος φαίνεται να μην επιφέρει καμία μεταβολή στην τοξική επίδραση η οποία οφείλεται στην δράση της μεταλλοτοξίνης [(IT₅₀ παρουσία QA/Cu(II) ίσο με IT₅₀ παρουσία Cu(II)]. Η παρατήρηση αυτή ενδεχομένως να οφείλεται και σε θερμοδυναμικά δεδομένα καθώς η συμπλοκοποίηση του κινικού οξέος με τον χαλκό δεν είναι σταθερή με αποτέλεσμα του κινικό οξύ να μη μπορεί να δράσει χηλικοποιητικά έναντι του χαλκού.

Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA)

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η δράση ενός ισχυρού χηλικοποιητικού μορίου, του EDTA. Η σταθερότητα των συμπλόκων που σχηματίζει οφείλεται στις πολλές θέσεις σύνδεσης του μορίου του EDTA (μονήρη ζεύγη ηλεκτρονίων ατόμων αζώτου και οξυγόνου), το οποίο είναι ένας τυπικός πολυσχιδής (ή πολυδοντικός) υποκαταστάτης (multidentateligand). Το EDTA σε παρόλο που φαίνεται να μην είναι τοξικό, σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι δυνατό να χηλικοποιεί και να απομακρύνει από το σύστημα άλλα ενδογενή απαραίτητα μέταλλα. Για τον λόγο αυτό σε συγκέντρωση 1 mM το IT₅₀ αντιστοιχεί σε 11.93±0.11 ώρες ενώ σε συγκέντρωση 0.5 mM IT₅₀ είναι

IT₅₀ 28.04±0.42, τιμή που επιτρέπει την χρήση έναντι της δράσης του χαλκού. Το EDTAχρησιμοποιήθηκε σε στοιχειομετρική αναλογία, σε σχέση με τον χαλκό, 1/1 και 1/2. Το IT50 στην πρώτη περίπτωση είναι 13.4±0.53 ώρες ενώ στην δεύτερη IT₅₀ = 19.86±0.73. Το EDTAχηλικοποιεί αποτελεσματικά τον χαλκό ενώ η στοιχειομετρική αναλογία φαίνεται να μην επηρεάζει σημαντικά την αλληλεπίδραση των δύο μορίων.

Η χρήση αντιοξειδωτικών και χηλικοποιητικών μορίων προκειμένου να διερευνηθεί ο μηχανισμός δράσης του χαλκού επί των περιφερικών νευρικών ινών προσφέρει έμμεσα δεδομένα τα οποία υποδεικνύουν την εμπλοκή του συγκεκριμένου μεταλλοϊόντος στο σχηματισμό οξειδωτικού stress. Για την επιβεβαίωση της συμμετοχής των ενεργών μορφών οξυγόνου στην παρατηρούμενη μείωση της βιωσιμότητας των νευρικών ινών μετά από επίδραση με την μεταλλοτοξίνη του χαλκού χρησιμοποιήθηκε και ιστολογική μέθοδος και πιο συγκεκριμένα χρώση με το φθοριόχρωμα διχλωροφλουροσκεΐνη. Στα αποτελέσματα φαίνεται ότι υπάρχει παραγωγή ελεύθερων ριζών κατά μήκος του κυτταροπλάσματος σχεδόν παρόμοια με αυτή μετά από επίδραση με υπεροξείδιο του υδρογόνου το οποίο είναι γνωστό οξειδωτικό μέσο και χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας.

4.2 Νευροτοξική δράση του cis-[Cu(II)-glycinate] (*in vitro*)

Η τοξικότητα που επάγεται από το μεταλλοϊόν του χαλκού και η ενδεχόμενη νευροπροστατευτική δράση χημικών ενώσεων αξιολογήθηκε επιπλέον και σε *in vitro* μοντέλο σε πρωτογενή καλλιέργεια ιπποκαμπιαίου ιστού. Η επιλογή του συγκεκριμένου ιστού πραγματοποιήθηκε στοχευμένα καθώς έχει δείχθει ότι η συγκέντρωση του χαλκού αυξάνει σε ιστούς του εγκεφάλου σε διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες ανάγοντας συχνά την παράμετρο αυτή σε παθολογοανατομικό δείκτη των ασθενειών αυτών.

Για την διερεύνηση της τοξικής δράσης του Cu(II) *in vitro*, κύτταρα (νευρώνες και γλοία) του ιπποκαμπιαίου ιστού νεογνών αρουραίων διεγέρθηκαν για σύντομο χρονικό διάστημα (3 ώρες) με Cu(II)-glycinate σε συγκεντρώσεις 10, 100 και 500 μM ενώ σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα χωρίς καμία επίδραση. Και στην περίπτωση των κυτταροκαλιεργειών τα αποτελέσματα υποδεικνύουν σαφή δόσο-εξερτώμενη τοξικότητα του Cu(II) και στους δύο κυτταρικούς τύπους η οποία εμφανίζεται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 10 μM. Πιο συγκεκριμένα το

ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης για τους νευρώνες είναι $76\% \pm 2.2$ ενώ για την γλοία είναι $78.7\% \pm 1.6$. Αξίζει να αναφερθεί ότι η γλοία εμφανίζει σχετικά πιο αυξημένα ποσοστά επιβίωσης, ιδιαίτερα σε υψηλές συγκεντρώσεις (2.58 φορές σε συγκέντρωση 500 μM), παρατήρηση η οποία επιβεβαιώνει τον προστατευτικό και στηρικτικό ρόλο ως προς τους νευρώνες.

Εκτίμηση της νευροπροστατευτικής δράσης του EDTA και QA

Όπως και στην περίπτωση των ηλεκτροφυσιολογικών καταγραφών (*ex vivo*), έγινε χρήση του χηλικοποιητικού μορίου EDTA καθώς και του αντιοξειδωτικού και χηλικοποιητικού μορίου κινικό οξύ. Το EDTA χρησιμοποιήθηκε σε διάφορες στοιχειομετρικές αναλογίες σε σχέση με το μεταλλοϊόν του χαλκού και τα αποτελέσματα δείχνουν σαφή και νευροπροστατευτική δράση καθώς το ποσοστό της κυτταρικής επιβίωσης είναι ίδια με αυτό του μάρτυρα τόσο στους νευρώνες όσο και στην γλοία. Η νευροπροστατευτική δράση του EDTA ως χηλικοποιητικού παράγοντα, σε αλληλεπίδραση με τις διαλύτες και τις βιοδιαθέσιμες μορφές του Cu(II) , αναδεικνύεται ως σημαίνον θέμα προς περαιτέρω μελέτη.

Αντίθετα, το κινικό οξύ φαίνεται να μην έχει σχεδόν καμία επίδραση στην προκαλούμενη από τον χαλκό τοξικότητα και μάλιστα φαίνεται να ενισχύει σε μικρό βαθμό την τοξική δράση του χαλκού τόσο στην γλοία όσο και στους νευρώνες. Το κινικό οξύ έχει χρησιμοποιηθεί ως νευροπροστατευτικός παράγοντας έναντι της τοξικότητας του σιδήρου σε πρωτογενείς υποκαμπιαίες καλλιέργειες [43], αλλά και έναντι του αργιλίου [44] όπου βραχεία έκθεση 3 ωρών καθώς και μακρά έκθεση 24 ωρών των καλλιεργειών σε Fe(III) και Al(III) υποδεικνύει σαφή διαφορά της επίδρασης του σε κύτταρα της γλοίας και των νευρικών κυττάρων όσον αφορά την βιωσιμότητα αυτών και η χρήση του κινικού οξέος στην ελεύθερη και δεσμευμένη του μορφή παρουσιάζει βασικές δομικές και χημικές ιδιότητες των φυσικών χηλικοποιητών μεταλλικών ιόντων. Η νευροπροστατευτική επίδραση του QA οφείλεται α) στην ικανότητά του να χηλικοποιεί τα αντίστοιχα μεταλλοϊόντα επηρεάζοντας έτσι τη χημική τους δραστηριότητα, και τελικά επηρεάζοντας την τοξικότητα τους στη γλοία και στους νευρώνες. Η έλλειψη νευροπροστατευτικής δράσης του κινικού οξέος έναντι στον νευροτοξικότητα του χαλκού οφείλεται βέβαια σε θερμοδυναμικά δεδομένα όπως αναφέρθηκε και παραπάνω.

4.3 Αξιολόγηση της δράσης αντικαρκινικών μεταλλοφαρμάκων

Οξαλιπλατίνα – cis-πλατίνη

Η απόκριση των νευρικών ινών, μπορεί εκτός από μείωση του ύψους του δυναμικού που αντιστοιχεί στην βιωσιμότητα, να εκφράζεται και μέσω άλλων χαρακτηριστικών όπως είναι η μεταβολή της διάρκειας του δυναμικού που συνδέεται σε μεγάλο βαθμό με την επαναπολωτική και υπερπολωτική φάση του δυναμικού. Στα πλαίσια αυτά, μελετήθηκε η δράση των αντικαρκινικών φαρμάκων οξαλιπλατίνα και cis-πλατίνη.

Η οξαλιπλατίνη και η cis-πλατίνη αποτελούν αντινεοπλασματικά φάρμακα για διάφορους τύπους καρκίνου. Η οξαλιπλατίνα χρησιμοποιείται κυρίως στην αντιμετώπιση του καρκίνου του παχέος εντέρου και αποτελεί αντικαρκινικό φάρμακο τρίτης γενιάς αντικαθιστώντας σε πολλές περιπτώσεις την cis-platin.

Και τα δύο αυτά φάρμακα έχουν συνδεθεί με την πρόκληση ασυνήθιστης και πολύ έντονης και επώδυνης νευροπάθειας. Η δράση τους επικεντρώνεται στο ΠΝΣ καθώς δεν είναι δυνατό να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Υπάρχουν αρκετές μελέτες οι οποίες ασχολούνται με την διερεύνηση του μηχανισμού δράσης των ουσιών αυτών καθώς και με την πρόκληση περιφερικής νευροπάθειας. Τα αντικαρκινικά φάρμακα τα οποία έχουν ως βάση την πλατίνα ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς ενώ ακόμη μπορεί να δρουν επί των ιοντικών καναλιών που εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη (Rosettoetal., 2006). Έχει δειχθεί ότι η οξαλιπλατίνα μπορεί να μεταβάλει την αξονική διεγερσιμότητα των νευρικών ινών, ιδιότητα η οποία οφείλεται σε μεταβολή της φυσιολογικής λειτουργίας των τασσεοελεγχόμενων καναλιών νατρίου (TEKNa) και μάλιστα με τρόπο που εξαρτάται από την συγκέντρωση της ένωσης [30]. Παρόλο που η οξαλιπλατίνα είναι σαφώς πιο υδατοδιαλυτή σε σχέση με την cis-πλατίνη, η χρόνια χορήγηση των ουσιών αυτών επιφέρει περιφερική νευροπάθεια ίδιου τύπου. Σε επίμυες η χρόνια χορήγηση των αντικαρκινικών αυτών φαρμάκων οδήγησε σε περιφερική νευροπάθεια όμοια με αυτή σε ανθρώπους και σχετίζεται με την προσβολή των γαγγλίων της ραχιαίας ρίζας. Η πρόκληση βλάβης του γάγγλιου της ραχιαίας ρίζας μετά από έκθεση σε cis-πλατίνη οφείλεται σε ενεργοποίηση αποπτωτικών μηχανισμών. Η οξαλιπλατίνα σε κύτταρα του νευροβλαστώματος της σειράς SH-SY5Y παρουσιάζει την ίδια νευροτοξική δράση με την cis-πλατίνη ενεργοποιώντας σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν σε

αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο, μειώνοντας την αντιαποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 και αυξάνοντας παράλληλα την προαποπτωτική πρωτεΐνη p53 [45].

Στις περιφερικές νευρικές ίνες του επίμουσ η οξαλιπλατίνα ($IT_{50}=8\pm 0.5$ μειώνει το ΣΔΕ αμεσότερα σε σχέση με την cis-πλατίνη ($IT_{50}=19.93\pm 0.4$). Και τα δύο φάρμακα σε αναλογία $0,039\text{mg/ml}$ προκαλούν την εμφάνιση δευτερογενών εκπολώσεων με το φαινόμενο να είναι σαφώς πιο έντονο στην περίπτωση της οξαλιπλατίνας ειδικότερα κατά το πρώτο χρονικό διάστημα και μέχρι το πέρας των πρώτων 5 ωρών μετά την χορήγηση των ενώσεων αντίστοιχα.

Συμπερασματικά, στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της επίδρασης διαφόρων ενδογενών και μη μεταλλοϊόντων στο περιφερικό και κεντρικό νευρικό σύστημα. Επιπλέον, έγινε προσπάθεια αποσαφήνισης του μηχανισμού δράσης των μεταλλοϊόντων αυτών καθώς και αξιολόγηση του νευροπροστατευτικού δυναμικού γνωστών αντιοξειδωτικών και χηλικοποιητικών παραγόντων.

Η διάφοροι χημικοί παράγοντες καταπόνησης έχουν ως στόχο δράσης την συνολική δομή των νευρώνων καθώς και τα τασεοελεγχόμενα κανάλια τα οποία εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη. Ο τρόπος δράσης των παραγόντων αυτών μπορεί να είναι άμεσος ή έμμεσος μέσω ενεργοποίησης μηχανισμών που δεν αποτελούν τον πρωταρχικό στόχο.

- Ο σίδηρος και το αργίλιο δεν επηρεάζουν την βιωσιμότητα του ισχιακού νεύρου ενώ το κοβάλτιο και το δημήτριο εμφανίζουν ήπια τοξικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις.
- Ο χαλκός και το χρώμιο μειώνουν την βιωσιμότητα του ισχιακού νεύρου με τρόπο που εξαρτάται από την συγκέντρωση. Η τοξικότητα αυτή οφείλεται σε πρόκληση οξειδωτικού stress και γίνεται έκδηλη μέσω μείωσης του ΣΔΕ.
- Ο χαλκός εκτός από τις περιφερικές νευρικές ίνες, επιδρά και στα κύτταρα του ιπποκάμπου του εγκεφάλου και η τοξικότητα αυτή είναι δόσο-εξαρτώμενη.
- Τα αντικαρκινικά φάρμακα, οξαλιπλατίνα και cis-πλατίνη τα οποία ανήκουν στις αντινεοπλασματικές ενώσεις με βάση την πλατίνη επηρεάζουν το ΣΔΕ μειώνοντάς το. Ωστόσο, επιδρούν άμεσα στα τασεοελεγχόμενα κανάλια

Na⁺ και K⁺. Η δράση αυτή γίνεται έκδηλη με παρατεταμένη εκπολωτική και επαναπολωτική περίοδο.

- Η Ν-ακετυλο-κυστεΐνη, παρότι αναγωγικό μόριο, δρα επικουρικά με τον χαλκό ενισχύοντας σε πολλές περιπτώσεις την νευροτοξική του δράση καθώς αντιδρά με τον Cu(II) προς παραγωγή H₂O₂.
- Το κινικό οξύ δεν έχει καμία επίδραση στην προκαλούμενη από το χαλκό τοξικότητα ενώ το EDTA χηλικοειί αποτελεσματικά το χαλκό προστατεύοντας τον νευρικό ιστό στο σύνολό του.
- Η προστατευτική δράση των διαφόρων χημικών παραγόντων εξαρτάται από θερμοδυναμικά δεδομένα καθώς και από την φύση των μορίων που συμπλοκοποιούν τα εκάστοτε μεταλλοϊόντα.
- Η νευροτοξική και καταπονητική δράση των μεταλλοϊόντων διακρίνεται ανάλογα με τον στόχο και το τελικό αποτέλεσμα που επιφέρουν σε: άμεση ή έμμεση, δομική ή λειτουργική.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] G.R. Strichard, C.B. Berde, *Anesthesia* (1994) 490-521.
- [2] A.G. Guyton, *Textbook of medical Physiology* (1991) 51-66.
- [3] R.M. Berne, M.N. Levy, *Αρχές Φυσιολογίας τόμος I* (2003) 95-109.
- [4] T. Jaccard, D. Ariztegui, K.J. Wilkinson, *Chem. Geol.* 258 (2009) 362-367.
- [5] J.M. Pacyna, E.G. Pacyna, A. Wenche, *Atmosph. Env.* 43 (2009) 117-127.
- [6] Y. Sun, Q. Zhou, L. Wang, W. Liu W, *J. Haz.* 161(2) (2009) 808-814.
- [7] J.P. Fett, K. LeVier, M.L. Guerinot, *Met. Ions Biol. Syst.* 35 (1998) 187-214.
- [8] R. Paesano, M. Pietropaoli, S. Gessani, P. Valenti, *Biochimie* 91(1) (2009) 44-51.
- [9] T.T. Chandra, K.T. Brown, *Tetrahedron* 64(1) (2008) 9-38.
- [10] A. Caban-Holt, M. Mattingly, G. Cooper, F.A. Schmitt, *Neurol. Clin.* 23(2) (2005) 485-521.
- [11] Ν. Θωμαΐδης, Θ. Βαλαβανίδης, Κ. Ευσταθίου, *Η χημική ένωση του μήνα* (2007).
- [12] M.W. Kendig, R.G. Buchheit, *Corrosion* 59(5) (2003) 379-400.
- [13] V. Voitkun, A. Zhitkovich, M. Costa, *Nucleic Acids Res.* 26(8) (1998) 2024-2030.
- [14] S. Dupont, *Morphologie* 87(276) (2003) 5-9.
- [15] H. Matsuda, *Neuropathology* 27(6) (2007) 570-577.
- [16] N. Brouwers, K. Slegers, C. Van Broeckhoven, *Ann. Med.* 40(8) (2008) 562-583.
- [17] G. Candore, C.R. Balistreri, M.P. Grimaldi, S. Vasto, F. Listì, M. Chiappelli, F. Licastro, D. Lio, C. Caruso, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1089 (2006) 472-486.
- [18] A. Nunomura, P.I. Moreira, A. Takeda, M.A. Smith, G. Perry, *Curr. Med. Chem.* 14(28) (2007) 2968-2975.

- [19] T.D. Bird, *Genet. Med.* 10(4) (2008) 231-239.
- [20] B. D'Angelo, S. Santucci, E. Benedetti, S. Di Loreto, R.A. Phani, S. Falone, F. Amicarelli, M.P. Cerù, A. Cimini, *Current Nanoscience* 5(2) (2009) 167-176.
- [21] F. Tisato, C. Marzano, M. Porchia, M. Pellei, C. Santini, *Med. Res. Rev.* 30(4) (2010) 708-749.
- [22] P. Johnson, D. Milne, G. Lykken, *Am. J. Clin. Nutr.* 56(5) (1992) 917-925.
- [23] J. Lee, J.R. Prohaska, D.J. Thiele, *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 98(12) (2001) 6842-6847.
- [25] A.I. Bush, D. Strozyk, *Arch. Neurol.* 61(5) (2004) 631-632.
- [26] M. Olivares, M.A. Mendez, P.A. Astudillo, F. Pizarro, *Am. J. Clin. Nutr.* 88(3) 859S-862S.
- [27] P.N. Ranganathan, Y. Lu, L. Jiang, C. Kim, J.F. Collins, *Blood* 118(11) (2011) 3146-3153.
- [28] R. Squitti, P. Pasqualetti, G. Dal Forno, F. Moffa, E. Cassetta, D. Lupoi, F. Vernieri, L. Rossi, M. Baldassini, P.M. Rossini, *Neurology* 64(6) (2005) 1040-1046.
- [29] C.A. Rabik, M.E. Dolan, *Cancer Treat. Rev.* 33(1) (2007) 9-23.
- [30] S.B. Park, C.S. Lin, A.V. Krishnan, D. Goldstein, M.L. Friedlander, M.C. Kiernan, *Plos One* 6(4) (2011) e18469.
- [31] S. Gromer, S. Urig, K. Becker, *Med. Res. Rev.* 24(1) (2004) 40-89.
- [32] R.H. Wilson, T. Lehky, R.R. Thomas, M.G. Quinn, M.K. Floeter, J.L. Grem, *J. Clin. Oncol.* 20(7) (2002) 1767-1774.
- [33] F. Grolleau, L. Gamelin, M. Boisdron-Celle, B. Lapied, M. Pelhate, E. Gamelin, *J. Neurophysiol.* 85(5) (2001) 2293-2297.
- [34] A. Kagiava, A. Tsingotjidou, C. Emmanouilides, G. Theophilidis, *Neurotoxicology* 29(6) (2008) 1100-1106.
- [35] S. Quasthoff, H.P. Hartung, *J. Neurol.* 249(1) (2002) 9-17.
- [36] T. Finkel, N.J. Holbrook, *Nature* 408(6809) (2000) 239-247.
- [37] E. Keunen, T. Remans, S. Bohler, J. Vangronsveld, A. Cuypers, *Int. J. Mol. Sci.* 12(10) (2011) 6894-6918.
- [38] G. Theophilidis, M. Benaki, E. Papadopoulou-Mourkidou, *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 118(1) (1997) 97-103.
- [39] A. Andreou, N. Dabarakis, A. Kagiava, E.K. Kosmidis, A. Geronikaki, G. Theophilidis, *Toxicol. In vitro* 21(1) (2007) 103-108.
- [40] W. Lin, Y.W. Huang, X.D. Zhou, Y. Ma, *Int. J. Toxicol.* 25(6) (2006) 451-457.
- [41] C. Papaefthimiou, E. Antonopoulou, G. Theophilidis, *Toxicol. In vitro* 23(2) (2009) 272-280.
- [42] J. Zheng J, J.R. Lou, X.X. Zhang, D.M. Benbrook, M.H. Hanigan, S.E. Lind, W.Q. Ding, *Cancer Lett.* 298(2) (2010) 186-94.
- [43] C.M. Nday, G. Malollari, S. Petanidis, A. Salifoglou, *J Inorg Biochem.* 117 (2012) 342-350.
- [44] C.M. Nday, B.D. Drever, T. Salifoglou, B. Platt, *Brain Res.* 1352 (2010) 265-276.

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο σύγχρονος τρόπος ζωής με κύρια χαρακτηριστικά αυτά του δυτικού τρόπου ζωής (διαιτητικές επιλογές, καθιστική ζωή) σε συνδυασμό με τη επίδραση της γενετικής προδιάθεσης καθώς και άλλων παραγόντων που ξεκινούν νωρίς από την ενδομήτρια ζωή του ανθρώπου, έχουν οδηγήσει στην εμφάνιση νοσημάτων και παθολογικών καταστάσεων που σχετίζονται με τον μεταβολισμό.

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης (ΣΔ), που για καιρό θεωρήθηκε ασθένεια ήσσονος σημασίας για την παγκόσμια υγεία, παίρνει τώρα την θέση του ως μια από τις κύριες απειλές για την υγεία του ανθρώπου στον 21ο αιώνα. Η ασθένεια του ΣΔ αποτελεί ομάδα μεταβολικών διαταραχών η οποία χαρακτηρίζεται από επίμονη υπεργλυκαιμία (αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα - υψηλότερα από τα φυσιολογικά) και μπορεί να προκύψει από προβληματική έκκριση της ινσουλίνης, μειονεκτική δράση της ή/και τα δύο. Η ασθένεια αυτή αντιπροσωπεύει ομάδα μεταβολικών νοσημάτων με κοινό χαρακτηριστικό τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα (υπεργλυκαιμία). Η υπεργλυκαιμία εμφανίζεται ως το καταληκτικό χαρακτηριστικό μετά από μια σειρά παθολογικών καταστάσεων που σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με την αδυναμία ή/και ανεπάρκεια παραγωγής της ινσουλίνης. Η αντιμετώπιση των σοβαρών προβλημάτων που σχετίζονται με την φύση και την χορήγηση των σημερινών φαρμακευτικών παραγόντων αντιμετώπισης του ΣΔ αποτελεί σύγχρονη πρόκληση στον τομέα της έρευνας και την φαρμακοβιομηχανίας. Με βάση το γεγονός ότι α) ενδογενή και εξωγενή μεταλλοϊόντα διαθέτουν γνωστή βιομimetική δράση σε διάφορες ασθένειες, β) μια σειρά μεταλλο-φαρμάκων χρησιμοποιούνται ήδη στην αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών και γ) σαφώς καθορισμένα, ατοξικά, βιολογικά και χημικά χαρακτηρισμένα μεταλλο-φάρμακα με ινσουλινο-μιμητική δράση δόθηκε έμφαση στην ανάπτυξη και διερεύνηση της δράσης τους σε σχέση με γνωστούς, στενά συνδεδεμένους στόχους. Η διερεύνηση αυτή θέτει τους στόχους για την ανάπτυξη βιοτεχνολογίας σε φαρμακευτικό επίπεδο. Για το σκοπό αυτό, σχεδιάστηκαν, συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν φυσικοχημικά (κρυσταλλογραφία ακτίνων X, αναλυτικές τεχνικές, φασματοσκοπίες NMR, TGA-DTG, ESI-MS, κ.ά.) α) ειδικά δομημένοι οργανικοί υποκαταστάτες, β) μια οικογένεια από καλώς καθορισμένες σύμπλοκες ενώσεις [Zn(II), V(IV,V) και Cr(III)]. Για τη διερεύνηση της δομο-εξαρτώμενης και μεταλλο-εξαρτώμενης βιολογικής δραστηριότητας των

νεοσυντιθέμενων μορφών (Zn(II), V(IV,V) και Cr(III)) χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά λιπώδους ιστού, 3T3-L1, όπου πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση του α) (α)τοξικού χαρακτήρα των υπό μελέτη υλικών, β) αδιπογενετικού δυναμικού, και γ) βαθμού επιρροής στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με την κυτταρική διαφοροποίηση (PPAR- γ) και την ενδοκυττάρια πρόσληψη γλυκόζης (GLUT 1, 4) καθώς και των γονιδίων της γλυκοκινάσης και αδιπονεκτίνης. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν α) σαφή σχέση δομής-βιολογικής δραστηριότητας (κυτταρική επιβίωση, μεταναστευτικότητα, λιπογένεση) των διακριτών μορφών Zn(II), V(IV,V) και Cr(III), και β) θέτουν τα θεμέλια για την ανάπτυξη μοριακής τεχνολογίας αντιμετώπισης της υπεργλυκαιμίας μέσω ατοξικών, βιοδιαθέσιμων δραστικών μορφών Zn(II), V(IV,V) και Cr(III).

Επιπρόσθετα, περαιτέρω έρευνα στο ευρύτερο πεδίο περιφερικής νευροπάθειας και νευροτοξικότητας που λαμβάνουν χώρα σε πολλές περιπτώσεις ΣΔ οδήγησε στο κεντρικό νευρικό (ΚΝΣ) και περιφερικό νευρικό (ΠΝΣ) σύστημα. Οι ιστοί αυτοί θεωρούνται ιδιαίτερα ευάλωτοι, καθώς είναι εύκολα προσβάσιμοι σε πληθώρα καταπονητικών παραγόντων. Στην περίπτωση αυτή εξετάσθηκαν συγκεκριμένα μεταλλοϊόντα, ενδογενή ή μη, εν δυνάμει τοξικά για το νευρικό σύστημα ως συνάρτηση της συγκέντρωσής τους ή κατά τη διατάραξη της ομοιόστασής τους. Για την αξιολόγηση της επίδρασης των μεταλλοϊόντων αυτών (κοβάλτιο, δημήτριο, αργίλιο, χρώμιο, χαλκός καθώς και αντικαρκινικά φάρμακα με βάση το λευκόχρυσο) χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο του απομονωμένου ισχιακού νεύρου των θηλαστικών (επίμυες *ex vivo*). Ακόμη, *in vitro* αξιολόγηση της δράσης των μεταλλοϊόντων πραγματοποιήθηκε σε πρωτογενείς καλλιέργειες ιπποκαμπιαίου ιστού. Συνολικά, η δομο- και μεταλλο-εξαρτώμενη συμπεριφορά μεταλλοϊόντων σε κλινικά απαιτητικές παθολογίες αντικατοπτρίζουν την ύπαρξη συγκεκριμένων φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των οργανικών υποστρωμάτων που όταν είναι παρόντα επηρεάζουν ουσιαστικά τη βιολογική δραστηριότητα αυτών (ΣΔ και περιφερική νευροπάθεια). Συνοπτικά λοιπόν:

- Αναδεικνύεται η δομική επιλογή βιο-δραστικών μορφών μεταλλοφαρμάκων
- Αποδεικνύεται η σημασία των βασικών δομικών χαρακτηριστικών των οργανικών υποστρωμάτων που συναρμόζονται στα μεταλλοϊόντα Zn(II), V(IV,V) και Cr(III).

- Και τα τρία μεταλλοϊόντα που εξετάστηκαν επάγουν την κυτταρική διαφοροποίηση των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα με τρόπο που εξαρτάται από τη φύση του συμπλόκου, του μετάλλου, την συγκέντρωση αλλά και τον χρόνο έκθεσης.
- Το (α)τοξικό προφίλ των Zn(II), V(IV,V) και Cr(III) εξαρτάται από την φύση του συμπλόκου όπου συμμετέχουν, την συγκέντρωση, τον χρόνο αλλά και το αναπτυξιακό στάδιο των κυττάρων που εκτίθενται.
- Για τον ίδιο αριθμό συναρμογής, όσο αυξάνεται η ιοντική ακτίνα του μεταλλοϊόντος (αυξάνει η οξειδωτική βαθμίδα) παρατηρείται μείωση της τοξικότητας.
- Η κυτταρική μεταναστευση των πρώιμων λιποκυττάρων επηρεάζεται δομο- και μεταλλο-εξαρτώμενα.
- Η συμπλοκοποίηση των Zn(II), V(IV,V) και Cr(III) μειώνει την τοξικότητα των αντίστοιχων απλών ανόργανων μορφών.
- Η λιπογένεση στα πρώιμα λιποκύτταρα του λιπώδους ιστού διαμορφώνεται με βάση το είδος του μεταλλοϊόντος, τη μορφή και φύση της ένωσης όπου συμμετέχει το εκάστοτε μεταλλοϊόν καθώς και την συγκέντρωση και τον χρόνο έκθεσης σε αυτά.
- Η έκφραση του μεταφορέα GLUT 4 εξαρτάται από τα επίπεδα έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα PPAR-γ.
- Η διερεύνηση της επίδραση των Zn(II), V(IV,V) και Cr(III) στην έκφραση των μοριακών στόχων (PPAR-γ, GLUT 4, GCK και ADIPOQ) αποτελεί κλειδί για την αξιολόγηση του αδιπογενετικού δυναμικού των συγκεκριμένων μεταλλοϊόντων.
- Η επαγωγή της έκφρασης στενά συνδεδεμένων μοριακών στόχων του σηματοδοτικού μονοπατιού της ινσουλίνης στην λιπογένεση μεταβάλλεται ανάλογα με την μορφή και την φύση των Zn(II), V(IV,V) και Cr(III).
- Τα μεταλλο-σύμπλοκα του Zn(II) διεγείρουν την ενδοκυττάρια πρόσληψη της γλυκόζης.
- Το V(V) εμφανίζει σημαντικότερη λιπογενετική δράση σε σχέση με το V(IV).
- Και τα τρία μεταλλοϊόντα δρουν συνεργικά με την ινσουλίνη, ωστόσο αυτό εξαρτάται από τη μορφή και τη φύση τους.

- Η φύση του υποκαταστάτη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διαλυτότητα, την βιοδιαθεσιμότητα και την βιοδραστική συμπεριφορά του εκάστοτε μεταλλοϊόντος.
- Η διακριτή δομή των Schiffbase υποστρωμάτων (αριθμός αλκοολικών άκρων, κορμός) διαμορφώνει την ύπαρξη και τον βαθμό της βιολογικής δραστικότητας των Zn(II) και V(V) υλικών που προκύπτουν.
- Αποδειχθηκε για πρώτη φορά η λιπογενετική ικανότητα του V(V).
- Η φύση του υποκαταστάτη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό ROS.
- Η διάφοροι χημικοί παράγοντες καταπόνησης έχουν ως στόχο δράσης την συνολική δομή των νευρώνων καθώς και τα τασεοελεγχόμενα κανάλια τα οποία εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη.
- Ο σίδηρος και το αργίλιο δεν επηρεάζουν την βιωσιμότητα του ισχιακού νεύρου, ενώ το κοβάλτιο και το δημήτριο εμφανίζουν ήπια τοξικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις.
- Ο χαλκός και το χρώμιο μειώνουν την βιωσιμότητα του ισχιακού νεύρου με τρόπο που εξαρτάται από την συγκέντρωση. Η τοξικότητα αυτή οφείλεται σε πρόκληση οξειδωτικού stress και γίνεται έκδηλη μέσω μείωσης του ΣΔΕ.
- Ο χαλκός εκτός από τις περιφερικές νευρικές ίνες, επιδρά και στα κύτταρα του ιπποκάμπου του εγκεφάλου και η τοξικότητα αυτή είναι δόσο-εξαρτώμενη.
- Τα αντικαρκινικά φάρμακα, οξαλιπλατίνα και cis-πλατίνη, τα οποία ανήκουν στις αντινεοπλασματικές ενώσεις με βάση την πλατίνα επηρεάζουν το ΣΔΕ μειώνοντάς το. Ωστόσο, επιδρούν άμεσα στα τασεοελεγχόμενα κανάλια Na^+ και K^+ . Η δράση αυτή γίνεται έκδηλη με παρατεταμένη εκπολωτική και επαναπολωτική περίοδο.
- Η N-ακετυλο-κυστεΐνη, παρότι αναγωγικό μόριο, δρα επικουρικά με το χαλκό ενισχύοντας σε πολλές περιπτώσεις την νευροτοξική του δράση καθώς αντιδρά με τον Cu(II) προς παραγωγή H_2O_2 .
- Το κινικό οξύ δεν έχει καμία επίδραση στην προκαλούμενη από το χαλκό τοξικότητα ενώ το EDTA χηλικοποιεί αποτελεσματικά το χαλκό προστατεύοντας το νευρικό ιστό στο σύνολό του.

- Η προστατευτική δράση των διαφόρων χημικών παραγόντων εξαρτάται από θερμοδυναμικά δεδομένα καθώς και από τη φύση των μορίων που συμπλοκοποιούν τα εκάστοτε μεταλλοϊόντα.
- Η απόκριση σε καταπονητικούς παράγοντες όπως είναι αντικαρκινικά φάρμακα που βασίζονται στο λευκόχρυσο επηρεάζεται από την ύπαρξη ανεξάρτητης παθογένειας όπως είναι η ύπαρξη μεταβολικού νοσήματος (π.χ. ΣΔ).
- Η νευροτοξική και καταπονητική δράση των μεταλλοϊόντων διακρίνεται ανάλογα με τον στόχο και το τελικό αποτέλεσμα που επιφέρουν σε: άμεση ή έμμεση, δομική ή λειτουργική.

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

- Δομο-εξαρτώμενη σχεδίαση δυαδικών και τριαδικών σύμπλοκων μορφών άλλων μεταλλοϊόντων με οργανικά υποστρώματα και μελέτη του αδιπογενετικού τους δυναμικού.
- Μελέτη του αδιπογενετικού και ινσουλινομιμητικού δυναμικού των Zn(II), V(IV,V) και Cr(III) συναρμοσμένα σε νέους υποκαταστάτες.
- Διερεύνηση της δράσης των Zn(II), V(IV,V) και Cr(III) σε διακριτά σημεία-κλειδιά του σηματοδοτικού μονοπατιού της ινσουλίνης.
- Διερεύνηση της δράσης των Zn(II), V(IV,V) και Cr(III) στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης με έμφαση σε άλλες μεταβολικές δράσεις της ινσουλίνης (π.χ. ως μιτογενετικός παράγοντας).
- Διερεύνηση της δράσης των Zn(II), V(IV,V) και Cr(III) ως μεταγραφικοί παράγοντες στενά συνδεδεμένων και μη στόχων του σηματοδοτικού καταρράκτη της ινσουλίνης.
- Διερεύνηση της δράσης των Zn(II), V(IV,V) και Cr(III) στην αποδιαφοροποίηση των ώριμων λιποκυττάρων σε πρώιμους ινοβλάστες και πολυδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα.
- Μέταλλο- και δομο-εξαρτώμενη διερεύνηση του ρόλου των Zn(II), V(IV,V) και Cr(III) στην ενδοκυττάρια πρόσληψη της γλυκόζης (*in vitro* και *in vivo*).
- Έλεγχος του ινσουλινομιμητικού χαρακτήρα άλλων μεταλλοϊόντων όπως το κοβάλτιο και το τιτάνιο.
- Ολοκλήρωση του μοντέλου (*ex vivo*) περιφερικής νευροπάθειας με στόχο την αποσαφήνιση του ρόλου διαφόρων καταπονητικών παραγόντων (π.χ. μεταλλοφάρμακα) με έμφαση στα μεταβολικά νοσήματα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. Η κυτταρική σειρά 3T3-L1

Η διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών του λιπογενετικού δυναμικού και η αξιολόγηση της δράσης των υπό μελέτη μεταλλο-συμπλόκων στα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην λιπογένεση κατέστησαν εφικτές μετά από μελέτες με χρήση της κυτταρικής σειράς 3T3-L1 λευκών λιποκυττάρων τα οποία προέρχονται από αθανатоποιημένα προ-λιποκύτταρα ποντικών.

Πιο συγκεκριμένα, ο ιστός από τον οποίο προέρχονται τα κύτταρα αυτά είναι εμβρυϊκής προέλευσης και ανήκει στο είδος *mus musculus* (mouse). Ο κυτταρικός τύπος αντιστοιχεί σε ινοβλάστες του λιπώδους ιστού. Οι καλλιέργειες που αναπτύσσονται από την συγκεκριμένη κυτταρική σειρά είναι κατάλληλες για μετασχηματισμό (transfection) ενώ είναι μονοστρωματικές και παρουσιάζουν την ικανότητα προσκόλλησης σε επιφάνειες.

Ο όρος L1 αναφέρεται σε συνεχές υποστέλεχος της κυτταρικής σειράς 3T3 (Swiss albino) η οποία δημιουργήθηκε μετά από κλωνική επιλογή. Η κυτταρική σειρά 3T3-L1 εκφράζει τον υποδοχέα της ινσουλίνης καθώς και γονίδια και προϊόντα αυτών τα οποία σχετίζονται με τα τριγλυκερίδια. Τα κύτταρα υπεισέρχονται σε διαδικασία διαφοροποίησης από προ- σε ώριμα λιποκύτταρα ξεκινώντας από το στάδιο του γρήγορου πολλαπλασιασμού και περνώντας στο στάδιο όπου λόγω υψηλής πυκνότητας της καλλιέργειας η κυτταρική αύξηση αναστέλλεται. Η υψηλή συγκέντρωση ορού στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, οδηγεί στην συσσώρευση λιπιδίων. Ενώ η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά παρέχει το πλεονέκτημα της χημικής επαγόμενης διαφοροποίησης κάνοντας την κατάλληλο μοντέλο για την μελέτη και αξιολόγηση του λιπογενετικού δυναμικού διαφόρων χημικών παραγόντων καθώς και την διερεύνηση των μηχανισμών εκείνων που εμπλέκονται στα σηματοδοτικά μονοπάτια που συνδέονται με την λιπογένεση, την πρόσληψη της γλυκόζης αλλά και του μεταβολισμού της καθώς επίσης και όλων εκείνων των μηχανισμών που εμπλέκονται σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως είναι η παχυσαρκία, η αντίσταση στην ινσουλίνη, η ανάπτυξη σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 και πολλών άλλων μεταξύ των οποίων το μεταβολικό σύνδρομο.

2.Μέθοδος καλλιέργειας

Το βασικό θρεπτικό υλικό το οποίο είναι κατάλληλο για την συγκεκριμένη κυτταρική σειρά είναι το Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma). Για την παρασκευή του πλήρους θρεπτικού υλικού απαιτείται η προσθήκη ορού εμβρύου μόσχου (Fetal Bovine Serum, FBS) σε αναλογία 10% καθώς και συνδυασμό αντιβιοτικών πενικιλίνης\στρεπτομυκίνης (1%, 100U/ml penicillin και 100μg/ml streptomycin).

Η μακροχρόνια διατήρηση της καλλιέργειας πραγματοποιείται σε υγρό άζωτο (-196). Μετά την απόψυξη της καλλιέργειας, η οποία περιγράφεται λεπτομερώς παρακάτω, τα κύτταρα εναιωρούνται σε πλήρες θρεπτικό υλικό και τοποθετούνται σε ειδικές φλάσκες καλλιέργειας (Cellstar, Greiner, bioone). Η επώαση και διατήρηση της καλλιέργειας απαιτεί τις εξής συνθήκες: 5% διοξείδιο του άνθρακα και θερμοκρασία 37°C. Η αλλαγή του θρεπτικού μέσου απαιτείται κάθε 2-3 μέρες. Ιδιαίτερα σημαντικό θεωρείται να διατηρείται η καλλιέργεια σε πυκνότητα όχι μεγαλύτερη από 70-80% καθώς σε υψηλές τιμές πυκνότητας τα κύτταρα υπεισέρχονται σε αναστολή της κυτταρικής αύξησης.

3.Αναπτυξη υπό-καλλιεργείων

Η διαδικασία ανα-καλλιέργειας και η ανάπτυξη υπό-καλλιεργείων από την αρχική καλλιέργεια απαιτεί την κυτταρική αποκόλληση και την αραιώση των κυττάρων. Για την διαδικασία αυτή αρχικά αφαιρείται το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό και η καλλιέργεια "πλένεται" με 10 ml PBS (phosphate buffer saline) η σύσταση του οποίου αναφέρεται παρακάτω για την απομάκρυνση περίσσειας θρεπτικού υλικού. Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται για παρουσία διαλύματος 2ml του ενζύμου θρυψίνης – EDTA (Trypsin-EDTA) για 3 έως 6 λεπτά στους 37°C (5% CO₂) έως ότου τα κύτταρα αποκολληθούν. Αφού διαπιστωθεί η πλήρης αποκόλληση των κυττάρων με χρήση οπτικού μικροσκοπίου, το ένζυμο της θρυψίνης απενεργοποιείται με 6-8 ml πλήρους θρεπτικού υλικού και ακολουθούν συνεχείς αναρροφήσεις με χρήση προσαρμοζόμενης σε πιπεταδόρο (pipettegun) αποστειρωμένης πιπέτας. Ακολούθως, δημιουργούνται οι επιθυμητές αραιώσεις αναπτύσσονται οι νέες

καλλιέργειες σε καινούργιες φλάσκες καλλιέργειας (Cornig[®]T-75). Σε περίπτωση που απαιτείται η πλήρης απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού και η απομόνωση των κυττάρων από το εναιώρημα στο σημείο αυτό πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε σωλήνες των 15 ml για 5 λεπτά στους 18°C και στις 1200 στροφές ανά λεπτό. Μετά από την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης τα κύτταρα σχηματίζουν πελέτα στο κάτω κωνικό τμήμα του σωλήνα και το υπερκείμενο απομακρύνεται με χρήση μικροπιπέτας. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε νέο θρεπτικό υλικό επιθυμητού όγκου. Ανάπτυξη καλλιέργειας πυκνότητας μεγαλύτερης του 70% και η ακόλουθη υπο-κάλλιέργεια αυξάνει τα κύτταρα κατά ένα 'πέρασμα' (passage). Αξίζει να αναφερθεί ότι η αξιοπιστία των πειραματικών αποτελεσμάτων απαιτεί σχετικά χαμηλό αριθμό passage.

4.Κρυοαποθήκευση 3T3-L1 προ-λιποκυττάρων σε υγρό άζωτο

Τα κύτταρα αποθηκεύονται το υγρό άζωτο διαλυμένα σε διάλυμα κρυοσυντήρησης (freezing medium, αποτελούμενο από DMEM, 10% FBS, 1% P/S, και 7,5% DMSO) σε κατάλληλες αμπούλες κρυοκατάψυξης (Cryo.SGreiner bioone) με 1 ml σε κάθε αμπούλα. Προκειμένου η ψύξη να γίνει ομαλά, οι αμπούλες τοποθετούνται σε ειδικό δοχείο MrFrosty (NALGENE[™] Cryo 1°C freezing container) το οποίο περιέχει ισοπροπυλική αλκοόλη και τοποθετείται στους -80°C για 16-18 ώρες (overnight). Το δοχείο Mrfrosty επιτρέπει την πτώση της θερμοκρασίας στο εσωτερικό του κατά 1°C ανά λεπτό με αποτέλεσμα τα κύτταρα να ψύχονται σταδιακά και έτσι να αυξάνονται τα ποσοστά επιβίωσης τους μετά την απόψυξη. Το διμέθυλοσουλφοξείδιο (dimethylsulfoxide, DMSO, Applichem) περιέχεται στο διάλυμα κρυοσυντήρησης αποτρέπει τον σχηματισμό παγοκρυστάλλων στο κυτταρόπλασμα που θα οδηγούσε σε κυτταρικό θάνατο, ωστόσο σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 0°C είναι τοξικό για τα κύτταρα γι' αυτό και απαιτείται η άμεση εναιώρηση των κυττάρων σε πλήρες θρεπτικό υλικό πριν λιώσουν και οι τελευταίοι κρυσταλλοί. Με το πέρας των 16-18 ωρών οι αμπούλες μεταφέρονται σε ειδικά κάνιστρα και τοποθετούνται σε υγρό άζωτο σε θερμοκρασία -196.

5.Μετρηση βιωσιμότητας και αριθμού προ-λιποκυττάρων με την μέθοδο του TrypanBlue

Προκειμένου να υπολογιστεί ο αριθμός των ζώντων κυττάρων καθώς και ο συνολικός αριθμός των κυττάρων, λαμβάνονται από εναιώρημα καλλιέργειας 10 μl κυττάρων

σε πλήρες θρεπτικό υλικό και αναμιγνύονται με χρήση μικροπιπέττας με 10 μ l trypan blue. Το trypan blue (μπλε του τρυπανίου) είναι μια χημική ένωση η οποία έχει την ικανότητα να διαπερνά την πλασματική μεμβράνη μόνο των νεκρών κυττάρων (όχι των βιώσιμων) με αποτέλεσμα να χρωματίζονται μπλε. Στη συνέχεια λαμβάνονται 10 μ L από το μίγμα εναιωρήματος – trypan blue και τοποθετούνται με την βοήθεια μικρού ρύγχους κάτω από καλυπτρίδα σε πλάκα αιματοκυτταρομέτρου (Neubauer Improved Marienfeld, Germany). Το δείγμα απλώνεται κάτω από την καλυπτρίδα εξαιτίας του τριχοειδούς φαινομένου και πραγματοποιείται μέτρηση των κυττάρων με την χρήση οπτικού μικροσκοπίου σε μεγέθυνση 10x. Μετά από την μέτρηση όλων των βιώσιμων κυττάρων στα τέσσερα μεγάλα τετράγωνα της πλάκας Neubauer κάθε ένα από τα οποία περιλαμβάνει δεκαέξι μικρότερα τετράγωνα, υπολογίζεται ο συνολικός αριθμός στο εναιώρημα με βάση το τύπο: $(N/4) \times 2 \times 10^4 \times V$ όπου N ο αριθμός των κυττάρων στα τέσσερα τετράγωνα της πλάκας Neubauer δια τέσσερα για να βρεθεί ο μέσος όρος των τετραγώνων, επί δύο λόγω της αραιώσης που πραγματοποιείται με το trypan blue και V ο όγκος του συνολικού αρχικού εναιωρήματος σε ml.

6. Απόψυξη προ-λιποκυττάρων και ώριμων λιποκυττάρων από το υγρό άζωτο

Μια αμπούλα κυττάρων λαμβάνεται από το υγρό άζωτο και τοποθετείται στο υδατόλουτρο στους 37°C. Πριν λιώσει εντελώς ο πάγος τα κύτταρα εναιωρούνται σε 7ml πλήρους θρεπτικού υλικού σε δοχείο falcon των 15 ml και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1200 στροφές ανά λεπτό στους 18°C για 5 λεπτά. Έπειτα από απόρριψη του υπερκειμένου τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 2-3ml θρεπτικού υλικού. Ακολούθως τα κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τις εκάστοτε πειραματικές συνθήκες. Η ταχεία απόψυξη των κυττάρων προσφέρει υψηλά επίπεδα βιωσιμότητας σε σχέση με την αργή (τοποθέτηση στους -80°C, MrFrosty). Θα πρέπει να αναφερθεί ότι όλα τα διαλύματα έχουν προηγουμένως αποστειρωθεί και όλη η διαδικασία απομόνωσης και καλλιέργειας των κυττάρων πραγματοποιούνται υπο αυστηρά στείρες συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής (Laminar Flow) ώστε να αποφευχθούν τυχόν επιμολύνσεις των κυττάρων.

7. Διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα

Για την διαφοροποίηση τους τα προ-λιποκύτταρα καλλιεργούνται σε φλάσκες καλλιέργειας ή ειδικές πλάκες πολλαπλών οπών (multi-well plates, Cellstar, Greiner,

bioone) σε επωαστικό θάλαμο καλλιέργειας (CO₂ incubator) με παροχή 5% διοξειδίου του άνθρακα στους 37°C. Όπως ήδη αναφέρθηκε, η καλλιέργεια είναι μονοστρωματική και διατηρείται σε θρεπτικό υλικό (DMEM) εμπλουτισμένο με 10% FBS και 1% P/S. Το πλήρες θρεπτικό υλικό αλλάζεται κάθε δύο μέρες και ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες οι τις ανάγκες της καλλιέργειας. Δύο μέρες αφού τα κύτταρα φτάσουν σε πυκνότητα 100%, το θρεπτικό υλικό αλλάζει με το μέσο επαγωγής της διαφοροποίησης (induction medium) το οποίο περιέχει 0.5mM IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine), 1μM dexamethasone και 1μg/ml ινσουλίνης (Sigma). Η καλλιέργεια επωάζεται με το μέσο διαφοροποίησης για 48 ώρες ενώ στην συνέχεια το μέσο αυτό αντικαθίσταται με το μέσο διατήρησης το οποίο περιέχει ινσουλίνη στην ίδια αναλογία με το μέσο επαγωγής αλλά χωρίς τους προ-διαφοροποιητικούς παράγοντες (IBMX και dexamethazone). Την τέταρτη μέρα της διαφοροποίησης, το μέσο αλλάζει με πλήρες θρεπτικό υλικό και η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται κάθε 2 μέρες μέχρι και την 8^η μέρα όπου τα κύτταρα είναι πλέον ώριμα λιποκύτταρα.

8. Έλεγχος της διαφοροποίησης με οπτική μικροσκοπία

Ο έλεγχος της διαφοροποίησης των προ-λιποκυττάρων σε ώριμα πραγματοποιείται αρχικά με παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο. Τα ώριμα λιποκύτταρα είναι περισσότερο ωοειδή και φωτεινά ενώ τα συσσωρευμένα λιπίδια στο εσωτερικό τους είναι εμφανή και παρουσιάζουν λιγότερες κυτταροπλασματικές προεκβολές σε σχέση με τα προ-λιποκύτταρα. Επιπλέον, τα λιπίδια μπορεί να είναι διάχυτα στο μέσο της καλλιέργειας κάνοντας το περισσότερο κολλώδες (αύξηση του ιξώδους). Με βάση τα προαναφερθέντα μορφολογικά χαρακτηριστικά πραγματοποιείται ο πρώτος έλεγχος επιβεβαίωσης της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα.

9. Έλεγχος της διαφοροποίησης με χρώση oil red O staining

Ο περαιτέρω έλεγχος της επιτυχούς διαφοροποίησης πραγματοποιείται με την ειδική για τα λιπώδη κύτταρα χρώση oil red O staining. Η χρωστική oil red O αποτελεί μια διαζωνιακή λιπόφιλη ένωση η οποία χρωματίζει τα λιπίδια των κυττάρων. Μετά την σύνδεση της χρωστικής με τα λιπίδια, τα λιπίδια αποκτούν κόκκινο-πορτοκαλί χρώμα. Η χρώση βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής να είναι πιο διαλυτή στις λιπώδεις ουσίες σε σχέση τους συνήθεις υδροαλκοολικούς διαλύτες των χρωστικών. Εξαιτίας της σχετικής αδράνειας των λιπαρών οξέων δεν είναι δυνατό να δημιουργηθεί δεσμός με την χρωστική και άρα δεν πραγματοποιείται κάποια

αντίδραση. Ωστόσο, η χρωστική εγκαθίσταται στις λιπώδεις περιοχές του κυττάρου λόγω μεγαλύτερης διαλυτότητας στις περιοχές αυτές.

Αναλυτικότερα, έπειτα από την απομάκρυνση του υπερκειμένου των καλλιιεργειών τα κύτταρα πλένονται με dH₂O (1mlόταν πρόκειται για πλάκα 6 οπών) για την απομάκρυνση των λιπιδίων που υπάρχουν στον εξωκυττάριο χώρο. Στη συνέχεια τα κύτταρα μονιμοποιούνται με διάλυμα 10% φορμαλίνης (4% φορμαλδεϋδης σε PBS 1x) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η μονιμοποίηση πραγματοποιείται με φορμαλδεϋδη διότι οι αλκοόλες διαλύουν τα λιπίδια. Μετά το πέρας της μονιμοποίησης η παραφορμαλδεϋδη αφαιρείται προσεκτικά και ακολουθούν δύο πλύσεις με dH₂O. Στη συνέχεια τα κύτταρα επώζονται σε 2 mlφρέσκου διαλύματος 3mg/ml oil red σε ισοπροπυλική αιθανόλη σε αναλογία 3:2 με απεσταγμένο νερό για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια το διάλυμα oil red απομακρύνεται και ακολουθούν δύο πλύσεις με dH₂O. Επιπρόσθετα, ακολουθεί χρώση των πυρήνων των κυττάρων με 2 ml αιματοξυλίνη για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια και έπειτα από δύο πλύσεις με dH₂O, τα κύτταρα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο και φωτογραφίζονται.

10. Έλεγχο με Real – Time PCR

Ο έλεγχος της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα πραγματοποιείται επιπρόσθετα με την εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης γονιδίων τα οποία είτε σχετίζονται με την επαγωγή της διαφοροποίησης (PPAR-γ), είτε αποτελούν ισθειδικούς δείκτες των ώριμων λιποκυττάρων (GLUT 4). Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης εκτιμώνται με την βοήθεια της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR, real time polymerase chain reaction). Για τον σκοπό αυτό απομονώνεται το ολικό RNA από τα κύτταρα (πρώιμα και ώριμα) έπειτα από καλλιέργεια για οκτώ μέρες και στη συνέχεια το mRNA αντιγράφεται σε cDNA το οποίο πολλαπλασιάζεται με την επακόλουθη αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.

10.1 Εκχύλιση – απομόνωση RNA

Πιο αναλυτικά, για τον σκοπό αυτό πραγματοποιείται αρχικά απομόνωση του ολικού RNA με ειδική διαδικασία η οποία βασίζεται στην μέθοδο trizol-χλωροφόρμιο-ισοπροπανόλη-αιθανόλη. Ειδικότερα, την 8^η μέρα της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από την καλλιέργεια και τα κύτταρα

πλένονται με PBS 1x. Στη συνέχεια προστίθεται στα κύτταρα 1 ml trizol και τοποθετούνται για τουλάχιστον 16-18 ώρες στους -80°C προκειμένου να γίνει αποτελεσματική λύση των κυττάρων (διάρρηξη μεμβρανών). Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, η ειδική πλάκα καλλιέργειας αφήνεται να ξεπαγώσει και σταδιακά πάνω σε παγοκύστη σε θερμοκρασία δωματίου και έξω από τον απαγωγό σε χώρο ο οποίος έχει αποστειρωθεί κατάλληλα με 70% αιθανόλη, ειδικό διάλυμα απομάκρυνση RNAσών και χρήση ακτινοβολίας UV. Αφού ξεπαγώσει του περιεχόμενο κάθε οπής, πραγματοποιούνται συνεχείς αναρροφήσεις με χρήση πιπέτας και στη συνέχεια το κάθε δείγμα μεταφέρεται σε φιαλίδια τύπου erppendorf των 1.5 ml. Ακολούθως, για κάθε 1 ml trizol προστίθενται 200 μL χλωροφορμίου και γίνεται πολύ καλή ανάμειξη έως ότου το μίγμα λάβει την μορφή γαλακτώματος. Στη συνέχεια τα δείγματα αφήνονται ακίνητα για 3-5 λεπτά και μετά σφυγμομετρούνται για 5 λεπτά στους 4°C , στις 12.000 στροφές ανά λεπτό. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρωσης, το περιεχόμενο μίγμα διαχωρίζεται σε τρεις διακριτές ζώνες (κλάσματα) που αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες, το DNA και το RNA. Η υπερκείμενη ζώνη είναι διαυγής και περιέχει το ολικό RNA. Από την ζώνη αυτή απομονώνεται η μέγιστη δυνατή ποσότητα (συνήθως 300-400 μL) με ιδιαίτερη προσοχή να μην ληφθεί μέρος των άλλων ζωνών ώστε να μην υπάρχει επιμόλυνση από κάποιο άλλο κλάσμα και μεταφέρεται σε νέα φιαλίδια. Στη συνέχεια σε κάθε δείγμα προστίθενται 500 μL ισοπροπανόλης και τα δείγματα αφήνονται ακίνητα σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 12.000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά στους 4°C . Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα που λαμβάνεται αφήνεται να στεγνώσει μέσα στο φιαλίδιο και πάνω σε διηθητικό χαρτί (περίπου 10 λεπτά). Στη συνέχεια σε κάθε δείγμα προστίθεται 1 ml αιθανόλης/ddH₂O (75%) και ανακινείται έως ότου αποκολληθεί η πελέτα. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 7.500 στροφές ανά λεπτό για 5 λεπτά στους 4°C . Έπειτα, το υπερκείμενο απορρίπτεται και πάλι και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει για τουλάχιστον 30 λεπτά έως ότου απομακρυνθεί ή όποια περίσσεια αιθανόλης. Στη συνέχεια το ίζημα διαλύεται σε συγκεκριμένο όγκο αποστειρωμένου ddH₂O και τα δείγματα φυλάσσονται στους -80°C .

Η απόδοση της απομόνωσης του RNA ελέγχεται φωτομετρικά σε φωτόμετρο (Spectrophotometer, Biorad). Η συγκέντρωση του απομονωμένου RNA αντιστοιχεί σε 278 $\mu\text{g/ml}$ κατά μέσο όρο.

10.2 Σύνθεση cDNA – ανάστροφη μεταγραφή

Για την μετατροπή του RNA σε cDNA χρησιμοποιήθηκε το kit iScript™ cDNA Synthesis της εταιρίας Biorad (Cat. No. 170-8891). Η αντίδραση βασίζεται στην ιδιότητα της αντίστροφης μεταγραφάσης να συνθέτει δίκλωνο DNA με μήτρα RNA. Η διαδικασία αυτή απαιτεί την παρουσία εκκινητών οι οποίοι μπορεί να είναι oligoT (σύνδεση σε polyA ουρές του mRNA) είτε τυχαία εξαμερή. Το συγκεκριμένο kit περιέχει και τα δύο είδη καθώς επίσης νουκλεοτίδια για την σύνθεση του DNA (dNTPs), MgCl₂ και ρυθμιστικά διαλύματα απαραίτητα για την λειτουργία του ενζύμου.

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης αντιστοιχεί σε 20 μL. Για κάθε αντίδραση απαιτούνται 4 μL του μίγματος που αναφέρθηκε (5x Reaction Mix) και 1 μL του ενζύμου. Σε κάθε αντίδραση προστίθενται 5 μL από το RNA που θα αποτελέσει την μήτρα για την σύνθεση ενώ ο όγκος ατός μπορεί να μεταβάλλεται ανάλογα με την απόδοση της απομόνωσης του RNA και που προκύπτει φωτομετρικά όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώνεται με νερό απαλλαγμένο από νουκλεάσες (Nuclease-free water). Μετά την προετοιμασία των αντιδράσεων τα δείγματα τοποθετούνται σε θερμοκυκλοποιητή (Thermocycler) και εφαρμόζεται το εξής πρόγραμμα: 25°C για 5 λεπτά, 42°C για 30 λεπτά και 85°C για 5 λεπτά.

Αξίζει να αναφερθεί ότι ειδικά τα σωληνάρια eppendorf που χρησιμοποιούνται για την ανάμειξη των αντιδραστηρίων είναι κατάλληλα επεξεργασμένα για την απομάκρυνση των νουκλεασών ενώ πριν την έναρξη της αντίδρασης πραγματοποιείται ήπια φυγοκέντρηση για λίγα δευτερόλεπτα ώστε να απομακρυνθεί το δείγμα από τα τοιχώματα του σωληναρίου.

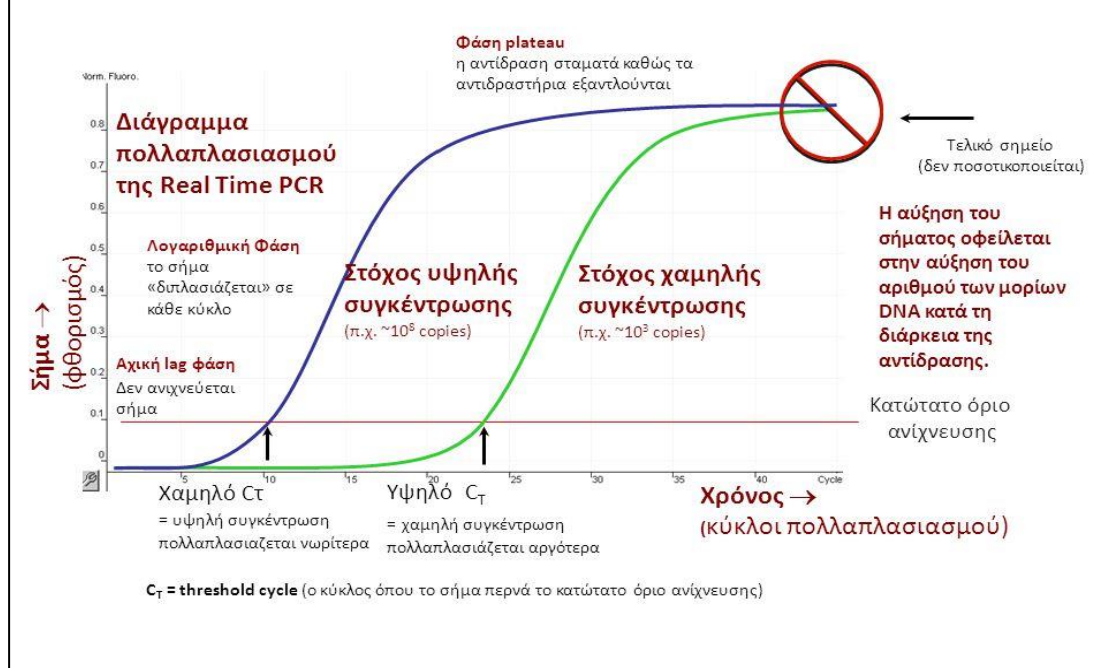
Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, τα δείγματα τοποθετούνται στους -20 °C ώστε να χρησιμοποιηθούν ακολούθως για την real time PCR.

10.3 Ποσοτικοποίηση με real-time PCR

Η real-time PCR, αναφέρεται στη μεγέθυνση DNA με PCR που ελέγχεται ενώ συμβαίνει η μεγέθυνση, δηλαδή σε πραγματικό χρόνο. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η δυνατότητα που προσφέρει να καθορίζει με περισσότερη ακρίβεια το ποσό του αρχικού DNA στο δείγμα πριν τη μεγέθυνση με PCR. Η real-time PCR αποτελεί μία ποσοτική αντίδραση PCR κατά την οποία η μεγέθυνση του DNA στόχου και η ανίχνευση του προϊόντος γίνονται ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάριο, διότι το προϊόν που παράγεται συνδέεται με φθορίζουσα χρωστική που ανιχνεύεται από το οπτικό σύστημα του ειδικού κυκλοποιητή που χρησιμοποιείται στη real-time PCR. Με το όργανο αυτό καταγράφεται η κινητική της μεγέθυνσης του DNA από την ένταση του σήματος του φθορισμού που αντανακλά το ποσό του συντιθέμενου νέου DNA. Έτσι μπορεί να μετρηθεί επακριβώς το ποσό του DNA.

Η real-time PCR μετράει τα προϊόντα PCR καθώς συσσωρεύονται ή μετράει σε πραγματικό χρόνο το ποσό των PCR προϊόντων σε σημείο όπου η αντίδραση βρίσκεται ακόμη στην εκθετική φάση χρησιμοποιώντας την τεχνολογία των φθορίζουσών χρωστικών. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR, ένα κατώφλι- σήμα φθορίζουσας χρωστικής καθορίζει σε πιο σημείο όλα τα δείγματα μπορούν να συγκριθούν. Αυτό το κατώφλι υπολογίζεται ως συνάρτηση του ποσού του υπόβαθρου της φθορίζουσας χρωστικής και τελικά ο κλασματικός αριθμός των κύκλων PCR που απαιτούνται για να παράγουν αρκετό σήμα φθορίζουσας χρωστικής που θα φθάσει σε αυτό το κατώφλι χαρακτηρίζεται ως κατώφλι κύκλου (cycle threshold, Ct). Οι τιμές Ct εξαρτώνται απόλυτα από το αρχικό ποσό του δείγματος και είναι η βάση για τον υπολογισμό των DNA αντιγράφων ή των επιπέδων έκφρασης του mRNA.

Κινητική της Real Time PCR



Εικόνα 1 Κινητική της Real-Time PCR

Η γραφική παράσταση πολλαπλασιασμού είναι η συνάρτηση του φθορισμού σε σχέση με τον αριθμό των κύκλων. Ως baseline ορίζονται οι κύκλοι PCR κατά τους οποίους το σήμα συσσωρεύεται μεν αλλά είναι κάτω από τα όρια ανίχνευσης από το μηχάνημα. Αυτό το σήμα χρησιμοποιείται για τη προσέγγιση-χάραξη του κατωφλιού. Το κατώφλι υπολογίζεται επί 10 φορές της κανονικής παρέκκλισης από το μέσο σήμα της χρωστικής της baseline. Σήμα χρωστικής το οποίο ανιχνεύεται πάνω από το κατώφλι θεωρείται πραγματικό και χρησιμοποιείται για το καθορισμό του κατωφλικού κύκλου (C_T) για ένα δείγμα. Οι τιμές του C_T καθορίζονται από τον κλασματικό αριθμό των PCR κύκλων, κατά τους οποίους το σήμα της χρωστικής είναι μεγαλύτερο από ένα ελάχιστο επίπεδο ανίχνευσης. Στη συνέχεια οι τιμές του C_T των διαφόρων δειγμάτων χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της σχετικής ποσότητας του κάθε δείγματος.

Σε αυτή τη γραφική παράσταση (Εικόνα 1) η ενιαία γραμμή τέμνει το κατώφλι στον PCR κύκλο 18, ενώ η κηλιδωτή καμπύλη στον κύκλο 20, υπάρχει δηλαδή μία διαφορά 2 κύκλων μεταξύ αυτών των δύο δειγμάτων ή διαφορά $C_T = 2$. Εξαιτίας της εκθετικής φύσης της μεθόδου PCR, η τιμή C_T μετατρέπεται σε μία γραμμική μορφή του 2 ή σε τετραπλάσια διαφορά. Αυτός ο υπολογισμός χρησιμοποιείται κατά τη

σχετική ποσοτική αναλυτική μέθοδο. Με τη real-time PCR, εκτός από την ποσοτική ανάλυση του προϊόντος της PCR, γίνεται και ποιοτική ανάλυση με βάση τη μελέτη της καμπύλης τήξης του προϊόντος (melting curve analysis), κατά την οποία οι μεγεθυμένες αλληλουχίες μπορούν να χαρακτηριστούν με βάση το σημείο τήξης τους (T_m), το οποίο είναι συνάρτηση του μήκους και της σύνθεσης των βάσεων του προϊόντος. Το σημείο τήξης είναι μοναδικό για κάθε αλληλουχία και χαρακτηριστικό για αυτήν. Η ικανότητα ελέγχου της προόδου του πολλαπλασιασμού του DNA σε πραγματικό χρόνο, η οποία επιτυγχάνεται κατά τη μεθοδολογία της real-time PCR, πραγματοποιείται με τη βοήθεια ειδικών χημικών αντιδράσεων και ανιχνευτών (probes). Σε γενικές γραμμές, χρησιμοποιούνται σημασμένοι ανιχνευτές διαφόρων τύπων, όπου ο καθένας έχει μοναδικά χαρακτηριστικά με στόχο να προκαλέσουν μια αλλαγή κατά τον πολλαπλασιασμό του DNA. Σήμερα οι πιο κοινές μέθοδοι χημείας που χρησιμοποιούνται στη real-time PCR είναι: α) η SYBR green I χρωστική η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, β) οι ανιχνευτές υδρόλυσης (Hydrolysis probes) και γ) οι ανιχνευτές υβριδοποίησης (Hybridization probes).

Για την ποσοτική μελέτη της σχετικής έκφρασης των γονιδίων στόχων χρησιμοποιήθηκε το kitiTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (lifesciences) της εταιρίας Biorad. Όπως και στην περίπτωση της σύνθεσης του cDNA, η αντίδραση για την ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιείται σε ειδικά σωληνάρια. Για κάθε αντίδραση απαιτούνται 10 μ L του mastermix που παρέχεται από το kit και περιέχει το ένζυμο της πολυμεράσης καθώς και όλα α απαραίτητα συστατικά προκειμένου να λειτουργήσει το ένζυμο. Επιπλέον, απαιτούνται 9 μ L νερού απαλλαγμένου από νουκλεάσες, οι εκκινητές του υπο μελέτη γονιδίου, και 1 μ L από το cDNA του κάθε δείγματος που προετοιμάστηκε στο προηγούμενο βήμα. Στην περίπτωση πολλαπλών αντιδράσεων το μίγμα αυτό παρασκευάζεται πολλαπλασιαζόμενο με τον αριθμό των αντιδράσεων και κατόπιν μοιράζεται σε κάθε σωληνάριο αντίδρασης πριν προστεθεί το δείγμα του cDNA. Επιπρόσθετα υπολογίζεται μία ακόμη αντίδραση όπου αντί για cDNA προστίθεται νερό και αυτό αποτελεί το δείγμα αρνητικού ελέγχου (non template control).

Το γονίδιο αναφοράς για κάθε δείγμα αποτελεί το ιδιοστατικά εκφραζόμενο (housekeeping gene) γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί για την ακτίνη β (actin b) και οι αλληλουχίες των εκκινητών είναι οι εξής: ανοδικός (forward- GCGCGGCTACAGCTTCACCA και καθοδικός (reverse-

GGGCAGCGGAACCGCTCATT (5'→3'). Το ζεύγος εκκινητών για το γονίδιο που κωδικοποιεί την ακτίνη β δίνει τελικό προϊόν μήκους 189 ζευγών βάσεων. Η θερμοκρασία τήξεως (T_m) και η περιεκτικότητα σε γουανίνες και κυτοσίνες (GC%) ήταν παρόμοιες για τους δύο εκκινητές και αντιστοιχούν σε 60.8°C και 62.9 °C και 65% και 65%.

Για την εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης του τόσο του γονιδίου PPAR-γ όσο και του GLUT 4 οι εκκινητές σχεδιάστηκαν. Ο σχεδιασμός των εκκινητών πραγματοποιείται με χρήση του προγράμματος Primer-BLAST από την σελίδα του NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (National Center for Biotechnology Information).

Προκειμένου να έχει η αντίδραση της PCR τη μέγιστη απόδοση θα πρέπει οι προς σχεδιασμό εκκινητές να πληρούν της παρακάτω βασικές προϋποθέσεις:

1. Το μήκος τους θα πρέπει να κυμαίνεται από 18-24 νουκλεοτίδια, ώστε να είναι συμπληρωματικοί με μία μόνο περιοχή της αλυσίδας-μήτρας και η υβριδοποίηση να μην γίνεται σε τυχαίο σημείο.
2. Το ποσοστό των αζωτούχων βάσεων GC θα πρέπει να αποτελείται από 40-60% του συνολικού αριθμού νουκλεοτιδίων του εκκινητή για να επιτευχθεί έτσι ισχυρότερη πρόσδεση με την αλληλουχία στόχο.
3. Στο 3'- άκρο θα πρέπει να περιέχονται οι βάσεις A, T ώστε να διευκολυνθεί η επιμήκυνση της νέας αλυσίδας από την πολυμεράση.
4. Οι θερμοκρασίες υβριδοποίησης των δύο εκκινητών θα πρέπει να είναι παραπλήσιες και να κυμαίνονται από 50C° -70C°. Οι θερμοκρασίες αυτές υπολογίζονται με βάση την T_{melting} (T_m) των εκκινητών η οποία ορίζεται ως η θερμοκρασία εκείνη στην οποία το 50% του DNA είναι δίκλωνο και το άλλο 50% μονόκλωνο. Ο τύπος με τον οποίο γίνεται ο υπολογισμός αυτός είναι $T_m=4(G+C)+2(A+T)$.
5. Οι εκκινητές δεν θα πρέπει να φέρουν στην αλληλουχία τους διαδοχικές επαναλήψεις του ίδιου νουκλεοτιδίου, ώστε να αποφευχθεί η πρόσδεσή τους σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίας της μήτρας.
6. Οι αλληλουχίες των δύο εκκινητών δεν πρέπει να είναι συμπληρωματικές μεταξύ τους διαφορετικά είναι πιθανό να υβριδοποιηθούν μεταξύ τους και να μην προσδέσουν στο DNA-στόχο.

7. Οι αλληλουχίες των εκκινητών δεν πρέπει να είναι παλινδρομικές δηλαδή δεν πρέπει να υπάρχει συμπληρωματικότητα μεταξύ των διαφορετικών περιοχών του ίδιου εκκινητή. Αν συμβεί αυτό είναι πολύ πιθανό ο εκκινητής να εμφανίσει δευτεροταγείς δομές (φουρκέτα ή θηλιά) οι οποίες δεν θα επιτρέψουν την πρόσδεσή του στο DNA-στόχο.

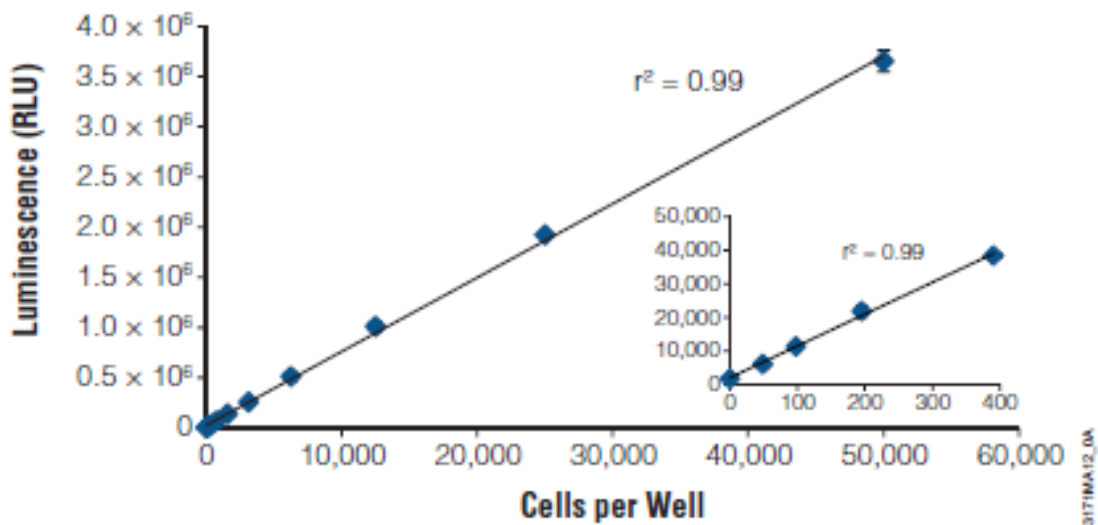
Ακολούθως, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα OligoAnalyser 1.2, το οποίο παρέχεται από το πακέτο ανάλυσης OligoSoftware και προσφέρει αυστηρότερο έλεγχο της καταλληλότητας των εκκινητών που πρόκειται να επιλεγθούν.

- **mPPAR-γ** forward 5'-GTCAGCGACTGGGACTTTTC-3' και reverse 5'-CGAGGACATCCAAGACAACC-3',
- **mGLUT 4** forward 5'-AACCAGCATCTTCGAGTCGG-3' και reverse 5'-TAAGAGCACCGAGACCAACG-3',
- **mGLUT 1** forward 5'-CTCACCACGCTTTGGTCTCT-3' και reverse 5'-CGCCTGCCAAAGCGATTAAC-3'
- **mGCK** forward 5' -CACGTATGGAACAGGGTGCT-3' και reverse 5'-TAGCCACGGAACCTTCCAAC-3'
- **mADIPOQ** forward: 5'-AAGGAGATCCAGGTCTTATTGG-3', και reverse: 5'-ACCTTCAGCCCCGGGTAC-3'.

Μετά το πέρας των αναμίξεων τα σωληνάρια σφυγμομετρούνται για λίγα δευτερόλεπτα και τοποθετούνται στο όργανο RotorGene 6000 Corbett Research.

11. Μέτρηση της βιωσιμότητας των προ- και ώριμων λιποκυττάρων με χρήση της φωταύγειας (luminescence assay)

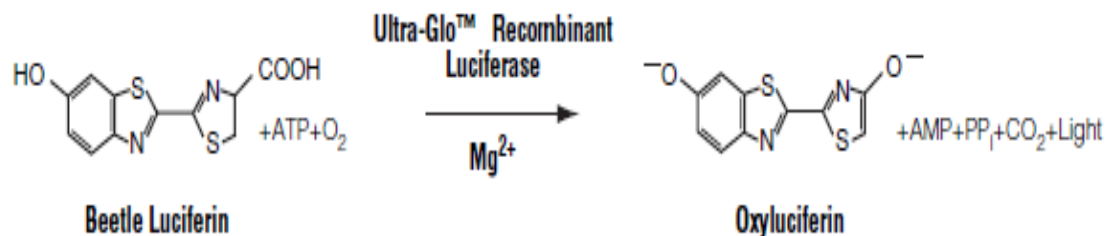
Για τον υπολογισμό των βιώσιμων κυττάρων (προ-λιποκυττάρων και ώριμων) μετά από διέγερση με τις υπο μελέτη ενώσεις (μεταλλο-σύμπλοκα ψευδαργύρου, βαναδίου και χρωμίου) χρησιμοποιήθηκε το kit Cell Titer-Glo® Luminescent Cell Viability της εταιρίας Promega. Το kit βασίζεται στην ποσοτικοποίηση των επιπέδων του ATP που σηματοδοτεί την παρουσία μεταβολικά ενεργών κυττάρων. Το ποσοστό του ATP είναι ευθέως ανάλογο με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων που υπάρχουν σε μια καλλιέργεια.



Εικόνα 2 Γραμμική σχέση σήματος – αριθμού κυττάρων (HEK293).

Η δοκιμασία αυτή χρησιμοποιεί τις ιδιότητες του θερμοσταθερού ενζύμου λουσιφεράση όπου οι κατάλληλες συνθήκες του επιτρέπουν την παραγωγή φωτός (λάμψη) ενώ παράλληλα γίνεται αναστολή όλων των ενδογενών ενζύμων που απελευθερώνονται κατά την διάρκεια της λύσης των κυττάρων όπως είναι οι ΑΤΡάσες. Οι απελευθέρωση ΑΤΡάσεων θα είχε άμεση επιρροή στην ακριβή μέτρηση των επιπέδων του ΑΤΡ. Το ένζυμο της λουσιφεράσης (LucPpy) απομονώθηκε από το έντομο *Photinus pyralis* (πυγολαμπίδα) και χρησιμοποιείται σε διάφορες δοκιμασίες αξιολόγησης των επιπέδων του ΑΤΡ. Στο συγκεκριμένο kit γίνεται χρήση του ενζύμου LucPpe2 από το είδος *Photuris pennsylvanica* καθώς είναι πιο σταθερό *in vitro* και λιγότερο ευαίσθητο σε χημική καταπόνηση (pH, απορρυπαντικά κ.α.).

Η αντίδραση μέσω της οποίας παράγεται φως είναι η εξής:



Πιο αναλυτικά, για την αξιολόγηση των επιπέδων του ΑΤΡ και άρα των ζωντανών κυττάρων το αντιδραστήριο που φυλάσσεται στους -20°C αφήνεται να ξεπαγώσει αργά σε θερμοκρασία δωματίου. Παράλληλα, η καλλιέργεια αφήνεται να έρθει σε ισορροπία με την θερμοκρασία δωματίου από του 37°C που επικρατούν στον θάλαμο

επώασης για 30-40 λεπτά περίπου. Στη συνέχεια και χωρίς να απομακρυνθεί το υπερκείμενο μέσο από τα κύτταρα προστίθεται το αντιδραστήριο του kit σε αναλογία 1:1 με τον όγκο του μέσο καλλιέργειας (συνήθως 100 μ L του αντιδραστηρίου για κάθε 100 μ L θρεπτικού σε μία πλάκα 96-οπών). Ακολουθεί ήπια συνεχής ανάδευση σε ειδικό αναδευτήρα πλακών (plate shaker) πολλαπλών οπών για 2 λεπτά προκειμένου να ολοκληρωθεί η λύση των κυττάρων και να προκύψει ομογενοποίηση. Μετά την ανάδευση η πλάκα αφήνεται ακίνητη για 10 λεπτά ώστε να σταθεροποιηθεί το σήμα που παράγεται και ακολουθεί απευθείας μέτρηση σε λουμινόμετρο 96-οπών της εταιρείας Promega (GloMax luminometer) με χρήση κατάλληλου προγράμματος. Το σήμα είναι σταθερό για αρκετές ώρες με χρόνο ημιζωής περίπου 5 ώρες.

Κάθε συνθήκη επαναλαμβάνεται τουλάχιστον τρεις φορές. Κύτταρα τα οποία δεν έχουν διεγερθεί με κάποια ένωση (καλλιέργεια σε πλήρες θρεπτικό υλικό) αποτελούν τον φυσιολογικό μάρτυρα του πειράματος ενώ επίσης κύτταρα τα οποία εκτίθενται στον γνωστό κυτταροτοξικό παράγοντα δεοξυχολικό νάτριο (sodium deoxycholate, Sigma) σε συγκέντρωση 1mg/ml αποτελούν τον θετικό μάρτυρα. Πρέπει να αναφερθεί ότι αντιδραστήριο προστίθεται και καταγράφεται στη συνέχεια το σήμα και σε οπές που περιέχουν μόνο θρεπτικό υλικό προκειμένου να καταγραφεί ο αυτοφθορισμός του μέσου (background luminescence signal).

Πριν από την εφαρμογή της συγκεκριμένης δοκιμασίας σε καλλιέργειες όπου τα κύτταρα είχαν διεγερθεί με κάποια ένωση, πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες εύρεσης του κατάλληλου αριθμού και πυκνότητας κυττάρων σε κάθε οπή για την συγκεκριμένη κυτταρική σειρά. Αξίζει να αναφερθεί ότι ο ακριβής αριθμός κυττάρων σε κάθε οπή είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την σωστή εξαγωγή των αποτελεσμάτων κατά την μέτρηση των επιπέδων του ATP και άρα των ποσοστών κυτταρικής επιβίωσης.

12. Ποιοτική εκτίμηση της αναστολής του μεταναστευτικού δυναμικού των προλιποκυττάρων (*in vitro* scratch assay)

Η δοκιμασία του *in vitro* scratch αποτελεί μια άμεση και απλή μέθοδο για την μελέτη της κυτταρικής μετανάστευσης η μέθοδος βασίζεται στην παρατήρηση της μετακίνησης των κυττάρων στο κενό διάστημα που δημιουργείται μετά από επίκτητη διακοπή της μονοστρωματικής καλλιέργειας. Η μετακίνηση των κυττάρων έχει ως στόχο την πλήρωση του χώρου αυτού και την αποκατάσταση της κυτταρικής διεπαφής όπως πριν αυτή διαταραχτεί. Το βασικό βήμα της μεθόδου προϋποθέτει την

δημιουργία κενού (η καλλιέργεια χαράσσεται) και την συστηματική απεικόνιση σε διακριτά χρονικά σημεία προκειμένου να καταστεί δυνατή η σύγκριση και η αξιολόγηση του μεταναστευτικού δυναμικού των κυττάρων. Το κυριότερο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι μιμείται σε κάποιο βαθμό την κυτταρική μετανάστευση *in vivo*. Για παράδειγμα η διακοπή της συνέχειας του ενδοθηλίου στα αγγεία του αίματος από εξωγενή παράγοντα διεγείρει την κυτταρική μετανάστευση στο συγκεκριμένο σημείο με στόχο την επούλωση της μηχανικής βλάβης. Επιπλέον, μοτίβα κυτταρικής μετανάστευσης σε περίπτωση χαλαρά συνδεδεμένων πληθυσμών όπως είναι οι ινοβλάστες μιμούνται επίσης την συμπεριφορά αυτών των κυττάρων κατά την διάρκεια της μετανάστευσης *in vivo*.

Η παρατήρηση της κυτταρικής κίνησης πραγματοποιείται με χρήση της οπτικής μικροσκοπίας.

Πιο αναλυτικά, μετά την ανάπτυξη της καλλιέργειας προ-λιποκυττάρων σε ειδική πλάκα 6-οπών και αφού σχηματιστεί πυκνή (80-90%) μονοστρωματική καλλιέργεια, με χρήση ρύγχους μικροπιπέτας των 100 μL δημιουργείται προσεκτικά κενό στην καλλιέργεια. Το μήκος του "διαδρόμου" που δημιουργείται αντιστοιχεί στη διάμετρο της οπής της ειδικής πλάκας. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται ώστε το πλάτος του διαδρόμου να είναι ίδιο σε όλα τα δείγματα της καλλιέργειας ώστε τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα με περισσότερη ακρίβεια. , μετά την χάραξη του διαδρόμου απαραίτητη είναι η αλλαγή του θρεπτικού υλικού καθώς και η πλύση με 1x PBS προκειμένου να απομακρυνθούν τα κυτταρικά θραύσματα που δημιουργήθηκαν από την χάραξη του κενού. Ιδιαίτερη σημαντικό είναι και τοπ μαρκάρισμα του διαδρόμου στην πλαστική επιφάνεια της πλάκα καλλιέργειας ώστε να διευκολύνεται η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων σε μεταγενέστερα χρονικά σημεία. Η επώαση των προ-λιποκυττάρων και η ενδεχόμενη αναστολή του μεταναστευτικού δυναμικού ελέγχθηκε 24 ώρες μετά την δημιουργία του κενού και την διέγερση με τις υπο μελέτη ενώσεις στις επιθυμητές τελικές συγκεντρώσεις. Μετά την ολοκλήρωση των πειραματικών συνθηκών, 24 ώρες μετά, τα κύτταρα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο και λαμβάνονται φωτογραφίες προς περαιτέρω ανάλυση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

13. Εκτίμηση της πρόσληψης της γλυκόζης από ώριμα λιποκύτταρα

Για τον υπολογισμό των επιπέδων αλλά και την αξιολόγηση της ικανότητας τα ώριμα διαφοροποιημένα λιποκύτταρα να προλαμβάνουν την γλυκόζη (glucose uptake) ,τα προ- λιποκύτταρα διαφοροποιούνται σε ειδική πλάκα καλλιέργειας 12-οπών σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρεται παραπάνω. Δώδεκα ώρες πριν συμπληρωθούν οι απαιτούμενες οκτώ ημέρες της διαφοροποίησης, το θρεπτικό υλικό αλλάζει και αντικαθίσταται και πάλι με πλήρες θρεπτικό υλικό.

Κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό και πραγματοποιούνται δύο πλύσεις με θερμό DMEM το οποίο στερείται ορού (FBS free) αλλά περιέχει γλυκόζη. Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση στους 37°C για δύο ώρες τουλάχιστον σε θρεπτικό υλικό το οποίο στερείται τόσο ορού όσο και γλυκόζης (serum and glucose free DMEM). Η ποσότητα του υλικού που προστίθεται αντιστοιχεί σε 500 μ L ανά συνθήκη. Μετά το πέρας των δύο ωρών ακολουθούν δύο πλύσεις με διάλυμα KRH το οποίο δεν περιέχει γλυκόζη και έχει την εξής σύνθεση: 121 mM NaCl, 4.9 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 0.33 mM CaCl₂, 12 mM HEPES και pH 7.4. Η ποσότητα που προστίθεται και πάλι σε κάθε οπή αντιστοιχεί σε 500 μ L . Στη συνέχεια το υπερκείμενο απομακρύνεται και πάλι. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι η κάθε συνθήκη εξετάζεται εις τριπλούν ενώ για κάθε συνθήκη πρέπει να υπολογιστεί και μία ακόμη η οποία θα αντιστοιχεί στον αρνητικό μάρτυρα. Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου λοιπόν σε κάθε οπή προστίθενται 450 μ L KRH το οποίο δεν περιέχει γλυκόζη και η επώαση διαρκεί 14 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C. Με την ολοκλήρωση της 14-λεπτης επώασης σε μία οπή κάθε συνθήκης (από τις συνολικά τέσσερις) προστίθενται 2.5 μ L κυτοχλασίνης B (cytochalasinB, Sigma) η οποία διατηρείται σε stock διαλυμένη σε 100% αιθανόλη και σε συγκέντρωση 5 mM στους -20°C. Η τελική συγκέντρωση της κυτοχλασίνης B σε κάθε συνθήκη αντιστοιχεί σε 27.7 μ M. Η συνθήκη αυτή αντιστοιχεί στον μάρτυρα της ραδιενέργειας η οποία προσκολλάται στα κύτταρα ενώ δεν έχει προσληφθεί και η τιμή της πρέπει να αφαιρεθεί. Η επώαση αυτή πραγματοποιείται για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί προσθήκη μίγματος ραδιενεργού και μη ραδιενεργού 2-δεοξυγλυκόζης και η ποσότητα αυτή αντιστοιχεί σε 50 μ L ανά συνθήκη. Το μίγμα διαλύεται σε θερμό KRH. Για την Παρασκευή του μίγματος προστίθενται 5 μ L ραδιενεργού 2-δεοξυγλυκόζης-1 μ Ci/ml ³H-2-δεοξυγλυκόζης (Hartmann analytic, MT1611) και 1 μ L μη ραδιενεργού 2-δεοξυγλυκόζης της οποίας

το stock είναι 1 M και παρασκευάζεται την ίδια μέρα. Η προσθήκη γίνεται με αυστηρά διαστήματα 20 δευτερολέπτων, ώστε σε 4 λεπτά να έχει ολοκληρωθεί ολόκληρη η πλάκα και η διακοπή της αντίδρασης στο επόμενο βήμα να γίνει ταυτόχρονα σε όλες τις οπές.

Η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη 50 μL ανά οπή κρύου KRH το οποίο περιέχει κυτοχλασίνη Β σε συγκέντρωση 5 μM ($1\mu\text{L} \setminus 1000 \mu\text{L}$) καθώς και 25 mM γλυκόζης. Στο σημείο αυτό η πλάκα καλλιέργειας τοποθετείται σε πάνω σε παγοκύστη. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται τρεις πλύσεις με κρύο KRH το οποίο περιέχει 25 mM γλυκόζης. Η ποσότητα που προστίθεται αντιστοιχεί σε 500 μL ανά οπή. Ακολούθως, προστίθενται 400 μL κρύου διαλύματος λύσης 0,1% Triton X-100 σε KRH buffer και πραγματοποιείται επώαση για τουλάχιστον 30 λεπτά πάνω σε πάγο. Στη συνέχεια γίνονται συνεχείς αναρροφήσεις με χρήση πιπέτας προκειμένου να γίνει λύση των κυττάρων και το περιεχόμενο κάθε συνθήκης μεταφέρεται σε φιαλίδια erpendorf. Το κάθε φιαλίδιο ανακινείται με χρήση vortex για περίπου 30 δευτερόλεπτα ώστε να σπάσουν όλα τα συσσωματώματα. Από τα 400 μL συνολικά τα 300 μL μεταφέρονται σε ειδικό σωληνάκι μέτρησης β ακτινοβολίας ενώ τα υπόλοιπα 100 μL κρατούνται και χρησιμοποιούνται για μέτρηση πρωτεΐνης με BCA. Ως επιπλέον control “total counts”, 10 μl από το μίγμα ραδιενεργού και μη ραδιενεργού 2-δεοξυγλυκόζης προστίθενται σε 290 μl 0.1% Triton X-100 σε KRH buffer. Και αυτό το δείγμα προστίθεται σε ένα σωληνάκι για μέτρηση β ακτινοβολίας. Η μέτρηση αυτή αντιστοιχεί στο ποσοστό της ραδιενέργειας, από την ολική, που προσλαμβάνεται πραγματικά από τα κύτταρα (specific activity). Στη συνέχεια σε κάθε σωληνάκι προστίθενται 3 ml διαλύματος υγρού σπινθηρισμού το οποίο έχει την εξής σύσταση: 30% Triton X-100, 70% Toluene, 0.1 mg/ml POPOP, 4 mg/ml PPO. Ακολουθεί ανάδευση του κάθε σωλήνα με το χέρι και μέτρηση της ραδιενέργειας στον beta counter της Beckman Coulter. Τα αποτελέσματα προκύπτουν σε CPM (counts per minute).

ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΜΕΡΟΣ Ι

Εικόνα 11.3.A Αριθμός ατόμων με Σακχαρώδη Διαβήτη (σε εκατομμύρια) για το 2000 και το 2010 και η εκατοστιαία αύξηση των κρουσμάτων.

Εικόνα 1.3.B Αριθμός ατόμων με Σακχαρώδη Διαβήτη (σε εκατομμύρια) για το 2000 και το 2030 και η εκατοστιαία αύξηση των κρουσμάτων.

Εικόνα 1.5.1.A Προτεινόμενο σχήμα για την έναρξη του διαβήτη τύπου 1.

Εικόνα 1.5.1.B Προτεινόμενο σχήμα των μηχανισμών θανάτου των β-κυττάρων.

Εικόνα 1.5.2 Σχηματική απεικόνιση της ινσουλινο-ανοχής και των συνεπειών της κατά τον ΣΔ τύπου 2 (B) σε σχέση με την φυσιολογική κατάσταση (A).

Εικόνα 1.5.2.1.A Η αμινοξική ακολουθία των πεπτιδικών αλυσίδων της ορμόνης της ινσουλίνης. Στο σχήμα φαίνεται η σύνδεση των αλυσίδων A και B με δισουλφιδικούς δεσμούς.

Εικόνα 1.5.2.1.B Σχηματική απεικόνιση του ετεροτετραμερούς του υποδοχέα της ινσουλίνης.

Εικόνα 1.5.2.2.A Οι κύριες δράσεις της ινσουλίνης.

Εικόνα 1.5.2.3.A Σηματοδοτικοί καταρράκτες που εκκινούν από την ενεργοποίηση του υποδοχέα της ινσουλίνης.

Εικόνα 1.5.2.3.B Σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης.

Εικόνα 1.5.2.4.A Το σηματοδοτικό μονοπάτι CAP/Cbl/TC10 το οποίο δρα παράλληλα με αυτό της PI3K για την στρατολόγηση του GLUT 4.

Εικόνα 1.5.2.4.B Το σηματοδοτικό μονοπάτι Ras-p38/MAPK και η εκκίνηση του από την ενεργοποίηση των υποστρωμάτων IRS.

Εικόνα 1.5.2.6.A Σχηματική απεικόνιση της δράσης της ινσουλίνης στους κύριους ινσουλινο-ευαίσθητους ιστούς μετά την διέγερση της έκκρισής της από το πάγκρεας.

Εικόνα 2.1 Ιστολογική απεικόνιση του λιπώδους ιστού.

Εικόνα 2.12 (A) φαιός λιπώδης ιστός, (B) λευκός λιπώδης ιστός.

Εικόνα 2.13 Σχηματική απεικόνιση του λιποκυττάρου.

Εικόνα 2.14 Βασικές λειτουργίες του λιπώδους ιστού.

Εικόνα 2.1.3 Σηματοδοτικό μονοπάτι μεταβολισμού των λιπιδίων.

Εικόνα 2.1.4 A Σχηματική απεικόνιση της ενδοκυττάριας πρόσληψης της γλυκόζης.

Εικόνα 2.1.4 Β Σηματοδοτικό μονοπάτι του μεταβολισμού της γλυκόζης.

Εικόνα 2.2.1.3 Σχηματική αναπαράσταση της πορείας της λιπογένεσης από πρόιμα μεσεγγυματικά κύτταρα έως τα ώριμα λιποκύτταρα.

Εικόνα 2.2.1.6 Συνοπτική απεικόνιση των σηματοδοτικών μονοπατιών που λαμβάνουν χώρα κατά την λιπογένεση.

Εικόνα 15 Η υπερπλασία και η υπερτροφία των λιποκυττάρων σχετίζονται με την αύξηση της μάζας του λιπώδους ιστού δηλαδή την παχυσαρκία.

Εικόνα 2.3B Υπερτροφία του λιπώδους ιστού και σχετιζόμενα χαρακτηριστικά.

Εικόνα 16 (A) Προτεινόμενος μηχανισμός πρόκλησης ινσουλινοαντίστασης στον μυϊκό ιστό όπως περιγράφηκε από τους Randle et al. **(B)** προτεινόμενος εναλλακτικός μηχανισμός για την πρόκληση ινσουλινοαντίστασης υπό την επίδραση των FFA στον μυϊκό ιστό.

Εικόνα 2.4A Διαγραμματική απεικόνιση της επίδρασης των αυξημένων επιπέδων των FFA και της υπεργλυκαιμίας στα κύτταρα του λιπώδους ιστού και των μυϊκών κυττάρων σε παχύσαρκα άτομα.

Εικόνα 2.4.1A Λιπογένεση και λιποτοξικότητα: ο ρόλος του PPAR- γ και του (PPAR- γ) συνενεργοποιητή-1 (PGC1).

Εικόνα 2.5A Η χρόνια φλεγμονή στον λιπώδη ιστό ευθύνεται για την ινσουλινοαντίσταση στον μυϊκό ιστό.

Εικόνα 2.5B Η χρόνια φλεγμονή επιδρά στην εναπόθεση τριγλυκεριδίων στον λιπώδη ιστό.

Εικόνα 3.2.1 Δομή της ινσουλίνης όπου φαίνεται το μεταλλοϊόν του ψευδαργύρου.

Εικόνα 3.2.5 A Σύνοψη των πιθανών σημείων δράσης του ψευδαργύρου (κόκκινο: απουσία/πράσινο: παρουσία) στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης.

Εικόνα 3.2.5 B Επίδραση του ψευδαργύρου στη καταστροφή των β κυττάρων που μεσολαβείται από κυτοκίνες.

Εικόνα 3.3.1 Συμπλοκα βαναδίου που συμμετέχουν σε βιολογικές διεργασίες.

Εικόνα 3.3.7 Πιθανά σημεία δράσης του βαναδίου στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης.

Εικόνα 3.3.8 Προτεινόμενοι μηχανισμοί αναστολής της ηπατικής γλυκονεογένεσης από το βανάδιο.

Εικόνα 3.4.5.7 Πιθανοί μηχανισμοί μέσω των οποίων το χρώμιο ενισχύει την ενδοκυττάρια πρόσληψη της γλυκόζης.

ΜΕΡΟΣ II

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Εικόνα 3.1.1 Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με την ένωση Zn(II)-cit (A), V(IV)-cit (B), και Cr(III)-cit (Γ) σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

Εικόνα 3.1.2 Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των προ-λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με την ένωση Zn(II)-cit (A), V(IV)-cit (B), και Cr(III)-cit (Γ) σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

Εικόνα 3.1.3 Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των ώριμων λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με την ένωση Zn(II)-cit (A), V(IV)-cit (B), και Cr(III)-cit (Γ) σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

Εικόνα 3.2 Μικροφωτογραφία οπτικού μικροσκοπίου δείγματος καλλιέργειας πρώιμων λιποκυττάρων 3T3-L1 μετά από μηχανική διακοπή της φυσιολογικής συνέχειας της καλλιέργειας με σκοπό την ποιοτική εκτίμηση της ενδεχόμενης αναστολής της φυσιολογικής μεταναστευτικότητας των κυττάρων A) την χρονική στιγμή $t=0$, B) 24 ώρες μετά σε συνθήκες μάρτυρα, Γ) 24 ώρες μετά από έκθεση στην ένωση Zn(II)-cit, Δ) 24 ώρες μετά από έκθεση στην ένωση V(IV)-cit, και E) 24 ώρες μετά από έκθεση στην ένωση Cr(III)-cit, σε τελική συγκέντρωση 20 μM (10x 5x μεγέθυνση).

Εικόνα 3.3.1 Μικροφωτογραφίες οπτικού μικροσκοπίου δείγματος καλλιέργειας πρώιμων λιποκυττάρων 3T3-L1 κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης μετά από ειδική χρώση των σχηματιζόμενων λιπιδίων με oil red O staining A) μη διαφοροποιημένα κύτταρα (προ-λιποκύτταρα), B) διαφοροποιημένα με ινσουλίνη (θετικός μάρτυρας) Γ) διαφοροποιημένα με την ένωση Zn(II)-cit σε συγκέντρωση 0.5 μM , Δ) διαφοροποιημένα με την ένωση Zn(II)-cit σε συγκέντρωση 25 μM , E) διαφοροποιημένα με την ένωση Zn(II)-cit σε συγκέντρωση 25 μM και την ινσουλίνη (10ng/mL), Z) διαφοροποιημένα με την ένωση V(IV)-cit σε συγκέντρωση 0.5 μM , H) διαφοροποιημένα με την ένωση V(IV)-cit σε συγκέντρωση 25 μM , Θ) διαφοροποιημένα με την ένωση V(IV)-cit σε συγκέντρωση 25 μM και την ινσουλίνη (10ng/mL) I) διαφοροποιημένα με κιτρικό οξύ σε συγκέντρωση 0.5 μM , και K) διαφοροποιημένα με κιτρικό οξύ σε συγκέντρωση 20 μM (10x 4x μεγέθυνση).

Εικόνα 3.3.2 Μικροφωτογραφίες οπτικού μικροσκοπίου δείγματος καλλιέργειας πρώιμων λιποκυττάρων 3T3-L1 κατά την 9^η μέρα της διαφοροποίησης μετά από ειδική χρώση των σχηματιζόμενων λιπιδίων με oil red O staining A) μη διαφοροποιημένα κύτταρα (προ-λιποκύτταρα), B) διαφοροποιημένα με ινσουλίνη (θετικός μάρτυρας) Γ) διαφοροποιημένα με την ένωση Cr(III)-cit σε συγκέντρωση 0.5 μM, Δ) διαφοροποιημένα με την ένωση Cr(III)-cit σε συγκέντρωση 10 μM, E) διαφοροποιημένα με την ένωση Cr(III)-cit σε συγκέντρωση 0,5 μM και την ινσουλίνη (10 ng/mL) και, Z) διαφοροποιημένα με την ένωση Cr(III)-cit σε συγκέντρωση 10 μM και την ινσουλίνη (10ng/mL) (10x 4× μεγέθυνση).

Εικόνα 3.3.3.1 Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την πολλαπλάσια έκφραση σε επίπεδο mRNA του γονιδίου PPAR-γ κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης με την ένωση Zn(II)-cit (A) και V(IV)-cit (B) σε συγκεντρώσεις 0.5-25 μM ή και με ινσουλίνη σε αναλογία 10 ng/mL. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

Εικόνα 3.3.3.2 Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την πολλαπλάσια έκφραση σε επίπεδο mRNA του γονιδίου GLUT 4 κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης με την ένωση Zn(II)-cit (A) και V(IV)-cit (B) σε συγκεντρώσεις 0.5-25 μM ή και με ινσουλίνη σε αναλογία 10 ng/mL. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

Εικόνα 3.3.3.3 Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την πολλαπλάσια έκφραση σε επίπεδο mRNA του γονιδίου GLUT 1 κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης με την ένωση Zn(II)-cit (A) και V(IV)-cit (B) σε συγκεντρώσεις 0.5-25 μM ή και με ινσουλίνη σε αναλογία 10 ng/mL. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

Εικόνα 3.3.3.4 Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την πολλαπλάσια έκφραση σε επίπεδο mRNA του γονιδίου GLUT4 κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης με την ένωση Zn(II)-cit σε συγκεντρώση 10 μM παρουσία του αναστολέα της MAPK. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

Εικόνα 3.3.3.5 Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την πολλαπλάσια έκφραση σε επίπεδο mRNA του γονιδίου GCK κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης με την ένωση Zn(II)-cit (A) και V(IV)-cit (B) σε συγκεντρώσεις 0.5-25 μM ή και με ινσουλίνη σε αναλογία 10 ng/mL. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

Εικόνα 3.3.3.6 Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την πολλαπλάσια έκφραση σε επίπεδο mRNA του γονιδίου ADIPOQ κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης με την ένωση Zn(II)-cit (A) και V(IV)-cit (B) σε συγκεντρώσεις 0.5-25 μ M ή και με ινσουλίνη σε αναλογία 10 ng/mL. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

Εικόνα 3.3.4.1 Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την πολλαπλάσια έκφραση σε επίπεδο mRNA του γονιδίου PPAR- γ κατά την 9^η μέρα της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης με την ένωση Cr(III)-cit σε συγκεντρώσεις 0.5-10 μ M ή και με ινσουλίνη σε αναλογία 10 ng/mL. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

Εικόνα 3.3.4.2 Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την πολλαπλάσια έκφραση σε επίπεδο mRNA του γονιδίου GLUT 4 κατά την 9^η μέρα της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης με την ένωση Cr(III)-cit σε συγκεντρώσεις 0.5-10 μ M ή και με ινσουλίνη σε αναλογία 10 ng/mL. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

Εικόνα 3.3.4.3 Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την πολλαπλάσια έκφραση σε επίπεδο mRNA του γονιδίου GCK κατά την 9^η μέρα της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης με την ένωση Cr(III)-cit σε συγκεντρώσεις 0.5-10 μ M ή και με ινσουλίνη σε αναλογία 10 ng/mL. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

Εικόνα 3.4 Μικροφωτογραφίες μικροσκοπίου φθορισμού δείγματος καλλιέργειας πρώιμων λιποκυττάρων μετά από έκθεση των κυττάρων σε A) απλό θρεπτικό υλικό (φυσιολογικός μάρτυρας), B) H₂O₂ σε συγκέντρωση 250 μ M (θετικός μάρτυρας) και Γ) Cr(III)-cit σε συγκέντρωση 50 μ M. Στην εικόνα παρατίθεται ξεχωριστά η χρώση των πυρήνων (Hoechst), η χρώση των ROS (DCFDA) καθώς και ο συνδυασμός τους (merge).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Εικόνα 3.3.1 Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με την ένωση ZnCl₂ (A) και την ένωση ZnSO₄ (B) σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

Εικόνα 3.3.2 Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με τους

οργανικούς υποκαταστάτες (Α) LH1, (Β) LH2 και (Γ) LH3 σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

Εικόνα 3.1.3 Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με τους οργανικούς υποκαταστάτες (Α) LH4, (Β) LH5 και (Γ) LH6 σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

Εικόνα 3.1.4. Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με την ένωση 1 (Α), 2 (Β) και 3 (Γ) σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

Εικόνα 3.1.5. Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με την ένωση 4 (Α), 5 (Β), 6 (Γ) και 7 (Δ) σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με τυπικό σφάλμα.

Εικόνα 3.1.6 Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των προ-λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με την ένωση 1 (Α) και 2 (Β) σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με τυπικό σφάλμα.

Εικόνα 3.1.7. Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των προ-λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με την ένωση 4 (Α), 5 (Β), 6 (Γ) και 7 (Δ) σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

Εικόνα 3.1.8 Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των ώριμων λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με την ένωση 1 (Α) και 2 (Β) σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με τον μέσο όρο.

Εικόνα 3.1.9. Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των ώριμων λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με την ένωση 4 (Α), 5 (Β), 6 (Γ) και 7 (Δ) σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα

Εικόνα 3.1.10 Μικροφωτογραφία οπτικού μικροσκοπίου δείγματος καλλιέργειας πρώιμων λιποκυττάρων 3T3-L1 μετά από μηχανική διακοπή της φυσιολογικής συνέχειας της καλλιέργειας με σκοπό την ποιοτική εκτίμηση της ενδεχόμενης αναστολής της φυσιολογικής μεταναστευτικότητας των κυττάρων Α) την χρονική στιγμή $t=0$, Β, Γ) 24 ώρες μετά σε συνθήκες μάρτυρα, Δ) 24 ώρες μετά από έκθεση στην ένωση 1, Ε) 24 ώρες μετά από έκθεση στην ένωση 2, Ζ) 24 ώρες μετά από έκθεση στην ένωση 3 σε τελική συγκέντρωση 25 μM (10x 5 \times μεγέθυνση).

Εικόνα 3.1.11 Μικροφωτογραφία οπτικού μικροσκοπίου δείγματος καλλιέργειας πρώιμων λιποκυττάρων 3T3-L1 μετά από μηχανική διακοπή της φυσιολογικής συνέχειας της καλλιέργειας με σκοπό την ποιοτική εκτίμηση της ενδεχόμενης αναστολής της φυσιολογικής μεταναστευτικότητας των κυττάρων Α) την χρονική στιγμή $t=0$, Β) 24 ώρες μετά σε συνθήκες μάρτυρα, Γ) 24 ώρες μετά από έκθεση στην ένωση 4, Δ) 24 ώρες μετά από έκθεση στην ένωση 5, Ε) 24 ώρες μετά από έκθεση στην ένωση 6, Ζ) 24 ώρες μετά από έκθεση στην ένωση 7 σε τελική συγκέντρωση 20 μM (10x 5 \times μεγέθυνση).

Εικόνα 3.2.1 Μικροφωτογραφίες οπτικού μικροσκοπίου δείγματος καλλιέργειας πρώιμων λιποκυττάρων 3T3-L1 κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης μετά από ειδική χρώση των σχηματιζόμενων λιπιδίων με oil red O staining Α,Β) μη διαφοροποιημένα κύτταρα (προ-λιποκύτταρα), Γ,Δ) διαφοροποιημένα με ινσουλίνη (θετικός μάρτυρας) Ε) διαφοροποιημένα με την ένωση 1 σε συγκέντρωση 0.5 μM , Ζ) διαφοροποιημένα με την ένωση 2 σε συγκέντρωση 0.5 μM , Η) διαφοροποιημένα με την ένωση 1 σε συγκέντρωση 1 μM , Θ) διαφοροποιημένα με την ένωση 2 σε συγκέντρωση 1 μM , Ι) διαφοροποιημένα με την ένωση 1 σε συγκέντρωση 10 μM και Κ) διαφοροποιημένα με την ένωση 2 σε συγκέντρωση 10 μM Λ) διαφοροποιημένα με την ένωση 1 σε συγκέντρωση 25 μM Μ) διαφοροποιημένα με την ένωση 2 σε συγκέντρωση 25 μM (10x 4 \times μεγέθυνση).

Εικόνα 3.2.2 Μικροφωτογραφίες οπτικού μικροσκοπίου δείγματος καλλιέργειας πρώιμων λιποκυττάρων 3T3-L1 κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης μετά από ειδική χρώση των σχηματιζόμενων λιπιδίων με oil red O staining Α) μη διαφοροποιημένα κύτταρα (προ-λιποκύτταρα), Β) διαφοροποιημένα με ινσουλίνη (θετικός μάρτυρας) Γ) διαφοροποιημένα με την ένωση 4 σε συγκέντρωση 25 μM , Δ) διαφοροποιημένα με την ένωση 4 σε συγκέντρωση 25 μM σε συνδυασμό με την ινσουλίνη, Ε) διαφοροποιημένα με την ένωση 5 σε συγκέντρωση 25 μM , Ζ) την ένωση 5 σε συγκέντρωση 25 μM σε συνδυασμό με την ινσουλίνη, Η) διαφοροποιημένα με την ένωση 6 σε συγκέντρωση 25 μM και Θ) την ένωση 6 σε

συγκέντρωση 25 μM σε συνδυασμό με την ινσουλίνη) διαφοροποιημένα με την ένωση 7 σε συγκέντρωση 25 μM K) διαφοροποιημένα με την ένωση 7 σε συγκέντρωση 25 μM σε συνδυασμό με την ινσουλίνη (10x 4× μεγέθυνση).

Εικόνα 3.2.3A Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την πολλαπλάσια έκφραση σε επίπεδο mRNA του γονιδίου PPAR- γ κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης με την ένωση 1 και 2 σε συγκέντρωση 25 μM ή και με ινσουλίνη σε αναλογία 10 ng/ml. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα

Εικόνα 3.2.3B Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την πολλαπλάσια έκφραση σε επίπεδο mRNA του γονιδίου GLUT 4 κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης με την ένωση 1 και 2 σε συγκέντρωση 25 μM ή και με ινσουλίνη σε αναλογία 10 ng/ml. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα

Εικόνα 3.2.4A Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την πολλαπλάσια έκφραση σε επίπεδο mRNA του γονιδίου PPAR- γ κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης με τις ενώσεις 4 (A), 5(B), 6(Γ) και 7(Δ) σε συγκεντρώσεις 1-20 μM ή και με ινσουλίνη σε αναλογία 10 ng/ml. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα

Εικόνα 3.2.5A Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την πολλαπλάσια έκφραση σε επίπεδο mRNA του γονιδίου GLUT 4 κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης με τις ενώσεις 4 (A), 5(B), 6(Γ) και 7(Δ) σε συγκεντρώσεις 1-20 μM ή και με ινσουλίνη σε αναλογία 10 ng/ml. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα

Εικόνα 3.1.1.2 Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την σχετική πολλαπλάσια πρόσληψη της 2-δεοξυγλυκόζης από ώριμα λιποκύτταρα σε διάφορες συγκεντρώσεις των 1 και 2 σε σχέση με μη διεγερμένα κύτταρα. Η ινσουλίνη αποτελεί τον θετικό μάρτυρα (100 nM). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η κυτοχλασίνη B. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Εικόνα 3.3.1 Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με την ένωση KVO₃ σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

Εικόνα 3.3.3 Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των προ-λιποκυττάρων μετά από 24ωρη διέγερση με τις ενώσεις 1-3 σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

Εικόνα 3.3.5 Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των προ-λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με τις ενώσεις 1-3 σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

Εικόνα 3.1.5 Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής επιβίωσης των ώριμων λιποκυττάρων μετά από 48ωρη διέγερση με τις ενώσεις 1-3 σε σχέση με τον μάρτυρα (μη διεγερμένα κύτταρα). Το δεοξυχολικό νάτριο αποτελεί τον θετικό μάρτυρα της δοκιμασίας. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα.

Εικόνα 3.1.6 Μικροφωτογραφία οπτικού μικροσκοπίου δείγματος καλλιέργειας πρώιμων λιποκυττάρων 3T3-L1 μετά από μηχανική διακοπή της φυσιολογικής συνέχειας της καλλιέργειας με σκοπό την ποιοτική εκτίμηση της ενδεχόμενης αναστολής της φυσιολογικής μεταναστευτικότητας των κυττάρων Α) πριν την διακοπή της καλλιέργειας, Β) την χρονική στιγμή $t=0$, Γ) 24 ώρες μετά σε συνθήκες μάρτυρα, Δ) 24 ώρες μετά από έκθεση στην ένωση 1, Ε) 24 ώρες μετά από έκθεση στην ένωση 2, Ζ) 24 ώρες μετά από έκθεση στην ένωση 3 σε τελική συγκέντρωση 20 μM (10x 5 \times μεγέθυνση).

Εικόνα 3.2.1 Μικροφωτογραφίες οπτικού μικροσκοπίου δείγματος καλλιέργειας πρώιμων λιποκυττάρων 3T3-L1 κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης μετά από ειδική χρώση των σχηματιζόμενων λιπιδίων με oil red O staining Α) μη διαφοροποιημένα κύτταρα (προ-λιποκύτταρα), Β, Γ) διαφοροποιημένα με ινσουλίνη (θετικός μάρτυρας) Δ) διαφοροποιημένα με την ένωση 1 σε συγκέντρωση 1 μM , Ζ) διαφοροποιημένα με την ένωση 1 σε συγκέντρωση 20 μM , Η) διαφοροποιημένα με την ένωση 1 σε συγκέντρωση 20 μM και ινσουλίνη 10 ng/ml, Θ) διαφοροποιημένα με την ένωση 2 σε συγκέντρωση 1 μM , Ι) διαφοροποιημένα με την ένωση 2 σε συγκέντρωση 20 μM και Ι) διαφοροποιημένα με την ένωση 2 σε συγκέντρωση 20 μM και ινσουλίνη 10 ng/ml, Λ) διαφοροποιημένα με την ένωση 3 σε συγκέντρωση 1 μM Μ) διαφοροποιημένα με την ένωση 3 σε συγκέντρωση 20 μM και Ν) διαφοροποιημένα με την ένωση 3 σε συγκέντρωση 20 μM και ινσουλίνη και ινσουλίνη 10 ng/ml. (10x 4 \times μεγέθυνση).

Εικόνα 3.2.7 Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την ποσοστιαία έκφραση σε επίπεδο mRNA του γονιδίου GLUT 4 κατά την 8^η μέρα της διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης με τις ενώσεις Α) 1, Β) 2, και Γ) 3 σε συγκεντρώσεις 1-20 μM ή/και με ινσουλίνη σε

αναλογία 10 ng/ml. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με το τυπικό σφάλμα

ΜΕΡΟΣ ΙΙΙ

Εικόνα 17.1.1 Α) Δομή εμύελης νευρικής ίνας. Β) τομή αμύελων νευρικών ινών.

Εικόνα 1.1.3 Σχηματική απεικόνιση του σχηματισμού συνάψεων μεταξύ δύο νευρώνων.

Εικόνα 1.2.1Α Συνοπτικός πιθανός μηχανισμός δράσης βιοχημικής δράσης του Cr(VI)

Εικόνα 18.3 Β Κατανομή και ομοιόσταση του χαλκού σε ένα γενικευμένο κύτταρο θηλαστικού.

Εικόνα 19.2Α Σχηματική απεικόνιση της χημικής δομής του μορίου της οξαλιπλάτινας.

Εικόνα 20.3.Α Ενδεικτική σχηματική απεικόνιση μονο- δι- και πολυ-δοντικού υποκαταστάτη.

Εικόνα 1.3.3Β Σχηματική απεικόνιση δύο διαφορετικών συμπλόκων μετάλλων-χηλικοποιητικών παραγόντων.

Εικόνα 2.2.Α Σχηματική απεικόνιση του κατάλληλα διαμορφωμένου τρίχωρου θαλάμου καταγραφής όπου υποδεικνύονται τα τρία διαμερίσματα.

Εικόνα 2.2Β Σχηματική απεικόνιση του συστήματος λήψης βιοηλεκτρικών σημάτων.

Εικόνα 2.5.6.2 Μικροφωτογραφία δείγματος πρωτογενούς μονοστρωματικής κυτταρικής καλλιέργειας μετά από χρώση με calcein AM και PI για τον προσδιορισμό της κυτταρικής επιβίωσης.

Εικόνα 3.1.Α Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος σε συνάρτηση με τον χρόνο παρουσία του επινευρίου (Α) και απουσία του επινευρίου (Β) σε συνθήκες μάρτυρα (φυσιολογικός οξυγονωμένος ορός) με χρήση ηλεκτροδίων αργύρου στον τρίχωρο θάλαμο καταγραφής. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με την τυπική απόκλιση.

Εικόνα 3.1.Β Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος σε συνάρτηση με τον χρόνο παρουσία του επινευρίου (Α) και απουσία του επινευρίου (Β) σε συνθήκες μάρτυρα (φυσιολογικός οξυγονωμένος ορός) με χρήση ηλεκτροδίων χρυσού στον τρίχωρο θάλαμο

καταγραφής. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με την τυπική απόκλιση.

Εικόνα 3.1.Γ Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος σε συνάρτηση με τον χρόνο παρουσία του επινευρίου (I) και απουσία του επινευρίου (II) σε συνθήκες μάρτυρα (φυσιολογικός οξυγονωμένος ορός) με χρήση ηλεκτροδίων χρυσού στον τρίχωρο θάλαμο καταγραφής. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων σε συνδυασμό με την τυπική απόκλιση.

Εικόνα 3.1.Δ Καταγραφές του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος απουσία του επινευρίου σε συνθήκες μάρτυρα (φυσιολογικός οξυγονωμένος ορός) με χρήση ηλεκτροδίων χρυσού στον τρίχωρο θάλαμο καταγραφής την χρονική στιγμή $t=0$ (I), μετά από 1 ώρα (II), 5 ώρες (III) και 15 ώρες (IV).

Εικόνα 3.2.1Α Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του FeCl_3 σε συγκέντρωση $500 \mu\text{M}$ ($n=4$). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του FeCl_3 . Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

Εικόνα 3.1.2B Καταγραφές του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος απουσία του επινευρίου την χρονική στιγμή $t=0$ (I) και έπειτα από 20 ώρες (II).

Εικόνα 3.2.2Α Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του CoCl_2 σε συγκέντρωση $500 \mu\text{M}$ ($n=3$). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του CoCl_2 . Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

Εικόνα 3.2.2B Καταγραφές του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος απουσία του επινευρίου την χρονική στιγμή $t=0$ (I) και έπειτα από 20 ώρες (II).

Εικόνα 3.2.3Α Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του CeCl_3 σε συγκέντρωση $500 \mu\text{M}$ ($n=3$). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του CeCl_3 . Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

Εικόνα 3.2.3Α Καταγραφές του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος απουσία του επινευρίου την χρονική στιγμή $t=0$ (I) και έπειτα από 12 ώρες (II).

Εικόνα 3.2.4Α Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του AlCl_3 σε συγκέντρωση $500 \mu\text{M}$ ($n=3$). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του AlCl_3 . Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

Εικόνα 3.2.4B Καταγραφές του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος απουσία του επινευρίου την χρονική στιγμή $t=0$ (I) και έπειτα από 20 ώρες (II).

Εικόνα 3.2.5A Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του K_2CrO_4 σε συγκέντρωση 500 μM ($n=3$). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του K_2CrO_4 . Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

Εικόνα 3.2.5.B Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του K_2CrO_4 σε συγκέντρωση 200 μM ($n=3$). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του K_2CrO_4 . Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

Εικόνα 3.2.5.Γ Καταγραφές του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος απουσία του επινευρίου την χρονική στιγμή $t=0$ (I) και έπειτα από 5 ώρες (II) μετά από επώαση σε 500 μM εξασθενούς χρωμίου.

Εικόνα 3.2.6A Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του $Cu(II)$ σε συγκεντρώσεις από 1 μM έως 500 μM ($n=3$, ανά συνθήκη). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του $Cu(II)$. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

Εικόνα 3.2.6.1.A Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος σε συνάρτηση με τον χρόνο παρουσία του επινευρίου (I) και απουσία του επινευρίου (II) χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του $Cu(II)$ σε συγκέντρωση 250 μM ($n=3$, ανά συνθήκη). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του $Cu(II)$. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

Εικόνα 3.2.6.2: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του αμινοξέος γλυκίνη σε συγκέντρωση 500 μM ($n=3$). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του αμινοξέος. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

Εικόνα 3.2.6.3.A: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του $Cu(II)$ σε συγκεντρώσεις 152,250 και 500 μM ($n=3$ ανά συνθήκη) μετά από προ-επώαση με 1 mM NAC. Τα βέλη υποδεικνύουν την χρονική στιγμή προσθήκης της κάθε ουσίας αντίστοιχα. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

Εικόνα 3.2.6.3.B: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του Cu(II) σε συγκεντρώσεις 152,250 και 500 μM ($n=3$ ανά συνθήκη) μετά από προ-επώαση με 1 0,5 mM NAC. Τα βέλη υποδεικνύουν την χρονική στιγμή προσθήκης της κάθε ουσίας αντίστοιχα. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

Εικόνα 3.2.6.4: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού (I) 1 mM QA, (II) του Cu(II) σε συγκέντρωση 500 μM ($n=3$ ανά συνθήκη) μετά από προ-επώαση με 1 mM QA. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζεται η καμπύλη βιωσιμότητας του ισχιακού νεύρου όταν εκτίθεται σε 500 μM του Cu(II). Τα βέλη υποδεικνύουν την χρονική στιγμή προσθήκης της κάθε ουσίας αντίστοιχα. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

Εικόνα 3.2.6.5A: Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του EDTA σε συγκεντρώσεις 0.5 mM και 1 mM ($n=3$, ανά συνθήκη). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του EDTA. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

Εικόνα 3.2.6.5B Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού (I) 500 μM Cu(II) μετά από προ-επώαση με 1 mM EDTA, (II) του Cu(II) σε συγκέντρωση 500 μM μετά από προ-επώαση με 0.5 mM EDTA ($n=3$ ανά συνθήκη). Τα βέλη υποδεικνύουν την χρονική στιγμή προσθήκης της κάθε ουσίας αντίστοιχα. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

Εικόνα 3.3 Μικροφωτογραφία συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης λέιζερ νευρικών ινών του ισχιακού νεύρου του επίμυος μετά από σήμανση με την φθορίζουσα DCFDA για την σήμανση ελεύθερων ριζών οξυγόνου (A,B) απουσία χημικής επίδρασης και φθορίζουσας χρωστικής, (Γ) παρουσία χρωστικής – μάρτυρας, (Δ,Ε) μετά από επίδραση με H_2O_2 – θετικός μάρτυρας, και (Ζ) μετά από επώαση με 500 μM Cu(II) για 90 λεπτά ($\times 40$).

Εικόνα 3.4.1.A Εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής βιωσιμότητας μετά από την επίδραση Cu(II) σε συγκεντρώσεις 10, 100 και 500 μM για 3 ώρες (Α) νευρώνων και (Β) γλοίας. Τα ποσοστά αντιστοιχούν σε μέσους όρους και το τυπικό σφάλμα τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Εικόνα 3.4.1.B Μικροφωτογραφίες μικροσκοπίου φθορισμού από δείγματα πρωτογενούς και μονοστρωματικής καλλιέργειας γλοίας και νευρώνων μετά από

ταυτόχρονη χρώση με καλσεΐνη (Calcein-AM) και προπίδιο του ιωδίου (PI). Με πράσινο χρώμα επισημαίνονται τα ζωντανά κύτταρα ενώ με κόκκινο τα νεκρά. (A) μάρτυρας, (B) 10 μM , (Γ) 100 μM και (Δ) 500 μM Cu(II) μετά από επώαση 3 ωρών ($\times 10$).

Εικόνα 3.4.2A Εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής βιωσιμότητας μετά από την επίδραση EDTA και Cu(II) σε συγκεντρώσεις : (10 μM EDTA – 10 μM Cu(II), (20 μM EDTA – 10 μM Cu(II), (100 μM EDTA – 100 μM Cu(II), (200 μM EDTA – 100 μM Cu(II), (200 μM EDTA – 200 μM Cu(II), (400 μM EDTA – 200 μM Cu(II), (A) νευρώνων και (B) γλοίας. Τα ποσοστά αντιστοιχούν σε μέσους όρους και το τυπικό σφάλμα τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Εικόνα 3.4.2B Μικροφωτογραφίες μικροσκοπίου φθορισμού από δείγματα πρωτογενούς και μονοστρωματικής καλλιέργειας γλοίας και νευρώνων μετά από ταυτόχρονη χρώση με καλσεΐνη (Calcein-AM) και προπίδιο του ιωδίου (PI). Με πράσινο χρώμα επισημαίνονται τα ζωντανά κύτταρα ενώ με κόκκινο τα νεκρά. (A) μάρτυρας, (B) (10 μM EDTA – 10 μM Cu(II), (Γ) (20 μM EDTA – 10 μM Cu(II), (Δ) (100 μM EDTA – 100 μM Cu(II), (E) (200 μM EDTA – 100 μM Cu(II), (Z) (200 μM EDTA – 200 μM Cu(II), και (H) (400 μM EDTA – 200 μM Cu(II) ($\times 32$).

Εικόνα 3.4.2.Γ Εκατοστιαία μεταβολή της κυτταρικής βιωσιμότητας μετά από την επίδραση EDTA και Cu(II) σε συγκεντρώσεις : (10 μM QA – 10 μM Cu(II), (20 μM QA – 10 μM Cu(II), (100 μM QA – 100 μM Cu(II), (200 μM QA – 100 μM Cu(II), (200 μM QA – 200 μM Cu(II), (400 μM QA – 200 μM Cu(II), (A) νευρώνων και (B) γλοίας. Τα ποσοστά αντιστοιχούν σε μέσους όρους και το τυπικό σφάλμα τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Εικόνα 3.4.2.Γ Μικροφωτογραφίες μικροσκοπίου φθορισμού από δείγματα πρωτογενούς και μονοστρωματικής καλλιέργειας γλοίας και νευρώνων μετά από ταυτόχρονη χρώση με καλσεΐνη (Calcein-AM) και προπίδιο του ιωδίου (PI). Με πράσινο χρώμα επισημαίνονται τα ζωντανά κύτταρα ενώ με κόκκινο τα νεκρά. (A) μάρτυρας, (B) (10 μM QA – 10 μM Cu(II), (Γ) (20 μM QA – 10 μM Cu(II), (Δ) (100 μM QA – 100 μM Cu(II), (E) (200 μM QA – 100 μM Cu(II), (Z) (200 μM QA – 200 μM Cu(II), και (H) (400 μM QA – 200 μM Cu(II) ($\times 32$).

Εικόνα 3.5.1.A Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου κατά την εφαρμογή του πρώτου παλμού (ΣΔΕ1) καθώς και του ΣΔΕ μετά την εφαρμογή δεύτερου παλμού (ΣΔΕ2), ως προς το πρώτο ΣΔΕ. (A) σε συνθήκες μάρτυρα, και (B) σε διαβητικά ζώα. Οι συνθήκες διέγερσης αντιστοιχούν σε συχνότητα 80-90 Hz και 2,2 msec μετά την απόλυτη ανερέθιστη περίοδο. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων ($n=7$) σε συνδυασμό με την τυπική απόκλιση.

Εικόνα 3.5.1.B Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου κατά την εφαρμογή του πρώτου παλμού (ΣΔΕ1) καθώς και του ΣΔΕ μετά την εφαρμογή δεύτερου παλμού (ΣΔΕ2), ως προς το πρώτο ΣΔΕ. (A) σε

συνθήκες μάρτυρα, και (B) σε διαβητικά ζώα. Οι συνθήκες διέγερσης αντιστοιχούν σε συχνότητα 80-90 Hz και 4,2 msec μετά την απόλυτη ανερέθιστη περίοδο. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων (n=7) σε συνδυασμό με την τυπική απόκλιση.

Εικόνα 3.5.1.Γ Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου κατά την εφαρμογή του πρώτου παλμού (ΣΔΕ1) καθώς και του ΣΔΕ μετά την εφαρμογή δεύτερου παλμού (ΣΔΕ2), ως προς το πρώτο ΣΔΕ. (A) σε συνθήκες μάρτυρα, και (B) σε διαβητικά ζώα. Οι συνθήκες διέγερσης αντιστοιχούν σε συχνότητα 50 Hz και 2,2 msec μετά την απόλυτη ανερέθιστη περίοδο. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων (n=11) σε συνδυασμό με την τυπική απόκλιση.

Εικόνα 3.5.1Δ Συγκριτική απεικόνιση των τριών διακριτών συνθηκών. Οι τιμές αντιστοιχούν σε μέσους όρους και τυπικό σφάλμα της ελάχιστης τιμής του ΣΔΕ για το ίδιο χρονικό διάστημα καταπόνησης. (A) σε συνθήκες μάρτυρα, και (B) σε διαβητικά ζώα.

Εικόνα 3.5.1Δ Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου κατά την εφαρμογή του πρώτου παλμού (ΣΔΕ1) καθώς και του ΣΔΕ μετά την εφαρμογή δεύτερου παλμού (ΣΔΕ2), ως προς το πρώτο ΣΔΕ μετά από προ-επώαση με EDTA (0.5mM) και την ακόλουθη προσθήκη Cu(II) σε συγκέντρωση 0,5mM. Οι συνθήκες διέγερσης αντιστοιχούν σε συχνότητα 50 Hz και 2,2 msec μετά την απόλυτη ανερέθιστη περίοδο. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων (n=3) σε συνδυασμό με την τυπική απόκλιση.

Εικόνα 3.5.2 Διάγραμμα όπου παρουσιάζεται η εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος σε συνάρτηση με τον χρόνο παρουσία του επινευρίου (I) σε συνθήκες μάρτυρα (φυσιολογικός οξυγονωμένος ορός), (II) σε διαβητικά ζώα μετά από διέγερση με συχνότητα 100 Hz. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο επιμέρους ανεξάρτητων πειραμάτων (n=4) σε συνδυασμό με την τυπική απόκλιση.

Εικόνα 3.6.A Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του αντικαρκινικού φαρμάκου οξαλιπλατίνα σε συγκέντρωση 100 μ M (n=4). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του αμινοξέος. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

Εικόνα 3.6.B Καταγραφές του ΣΔΕ απουσία επινευρίου μετά την προσθήκη του αντικαρκινικού φαρμάκου οξαλιπλατίνα σε συγκέντρωση 100 μ M.

Εικόνα 3.6.Γ Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του αντικαρκινικού φαρμάκου cis-platin σε συγκέντρωση 130 μ M (n=3). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή

προσθήκης του φαρμάκου. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

Εικόνα 3.6.Δ Διάγραμμα που παρουσιάζει την εκατοστιαία μεταβολή της διάρκειας του ΣΔΕ του ισχιακού νεύρου του επίμυος, απουσία επινευρίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο μετά από την προσθήκη στο διαμέρισμα εμποτισμού του αντικαρκινικού φαρμάκου cis-platin σε συγκέντρωση 130 μM (n=3). Το βέλος υποδεικνύει την χρονική στιγμή προσθήκης του φαρμάκου. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο επιμέρους πειραμάτων καθώς και την τυπική απόκλιση.

Εικόνα 3.6.Ε Καταγραφές του ΣΔΕ απουσία επινευρίου μετά την προσθήκη του αντικαρκινικού φαρμάκου cis-πλατίνη σε συγκέντρωση 130 μM .

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Εικόνα 3 Κινητική της Real-Time PCR

Εικόνα 4 Γραμμική σχέση σήματος – αριθμού κυττάρων (HEK293).