



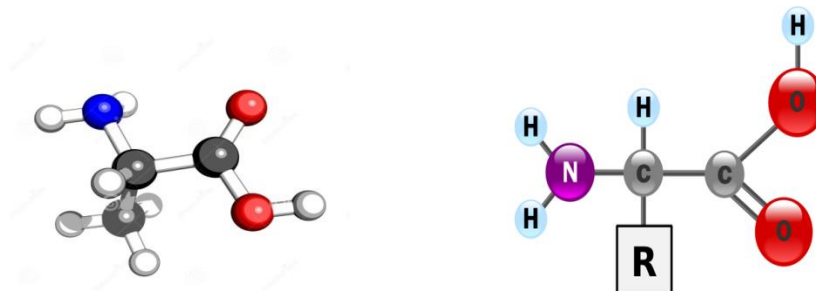
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
<<ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ>>



ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ
ΜΕ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΣ NMR ΤΩΝ
ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΩΝ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΑ ΑΜΙΝΟΞΕΑ
ΔΙΑΚΛΑΔΙΣΜΕΝΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΔΗΜΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ : ΜΠΑΪΡΑΚΤΑΡΗ ΕΛΕΝΗ
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΙΟΥΛΙΟΣ 2017

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας κα. Μπαϊρακτάρη Ελένη (Επιβλέπουσα)

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιατρική Σχολή, Εργαστήριο Κλινικής Χημείας

Καθηγητής Παθολογίας κ. Ελισάφ Μωυσής (Μέλος)

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιατρική Σχολή, Παθολογική Κλινική

Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας κ. Λιάμης Γεώργιος (Μέλος)

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιατρική Σχολή, Παθολογική Κλινική

Στο λατρεμένο μου πατέρα, Δημήτρη

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κλινικής Χημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στα πλαίσια του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών <<Ιατρική Χημεία>>.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω εγκάρδια την κα. Ε. Μπαϊρακτάρη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την ανάθεση του θέματος, τη συνεχή καθοδήγηση και ηθική συμπαράστασή της σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Θα ήθελα επίσης να την ευχαριστήσω για τη δυνατότητα που μου έδωσε να γνωρίσω καλύτερα τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και τις εφαρμογές της στην επιστήμη της Ιατρικής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον κ. Κ. Τσιαφούλη επιστημονικό υπεύθυνο του κέντρου NMR του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την υποδειγματική φιλοξενία και τις πολύτιμες συμβουλές που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια λήψης των ^1H NMR φασμάτων. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Ι. Γεωργίου, Καθηγητή Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη διάθεση της φυγοκέντρου του ερευνητικού εργαστηρίου του.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην Δρ. Χ. Κωσταρά, πανεπιστημιακή υπότροφο του εργαστηρίου Κλινικής Χημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη γενικότερη συμβολή και βοήθειά της κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής, σε επιστημονικό, συναδελφικό και προσωπικό επίπεδο.

Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω τον κ. Γ. Παρασκευά, ιατρό Παθολόγο καθώς και τον κ. Γ. Νταλέκο Καθηγητή Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τα δείγματα των ασθενών της παρούσας μελέτης.

Τέλος, απέραντη ευχαρίστηση οφείλω να εκφράσω στους γονείς μου που με έμαθαν να αγωνίζομαι για τους στόχους μου με αξιοπρέπεια και επιμονή, στον αδερφό μου που ήταν πάντα δίπλα μου και τους φίλους μου για την συμπαράστασή τους κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	8
1.1 Αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας (Branched-Chain Amino Acids, BCAAs)	8
1.2 Μεταβολισμός των BCAAs	9
1.2.1 Η πορεία των BCAAs στον ανθρώπινο οργανισμό.....	11
1.3 Κλινικές διαταραχές του μεταβολισμού των BCAAs.....	14
1.3.1 Εκ γενετής μεταβολικές διαταραχές.....	14
1.3.2 Μεταβολικές διαταραχές που οφείλονται στα ένζυμα BCAT και BCKD.....	15
1.3.3 Μεταβολικές διαταραχές των BCAAs σε καταστάσεις έλλειψης ή αντίστασης στη δράση της ινσουλίνης.....	16
1.3.3.1 Ρόλος της ινσουλίνης στο μεταβολισμό των BCAAs σε υγιή άτομα.....	16
1.3.3.2 Ρόλος των BCAAs στην επαγόμενη αντίσταση στην ινσουλίνη μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού mTORC1	16
1.3.3.3 BCAAs και παχυσαρκία	18
1.3.3.4 BCAAs και Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2	18
1.3.4 Μεταβολικές διαταραχές των BCAAs σε άλλες παθολογικές καταστάσεις	20
1.3.4.1 BCAAs και χρόνια νεφρική νόσος (CKD).....	20
1.3.4.2 BCAAs και ηπατική νόσος.....	20
1.3.4.3 BCAAs και καρκίνος.....	21
1.3.4.4 BCAAs και καρδιαγγειακή νόσος(CVD)	22
1.3.4.5 BCAAs και επιληψία	23
1.4 Αναγκαιότητα ποσοτικοποίησης των BCAAs	24
1.5 Ποσοτικοποίηση των BCAAs στον ορό του αίματος.....	25
1.5.1 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).....	25
1.5.1.1 Κλασική-Κβαντομηχανική προσέγγιση	25
1.5.1.2 Αλληλεπίδραση πυρηνικών στροφορμών με μεταβαλλόμενο μαγνητικό πεδίο.....	26
1.5.1.3 Αποκατάσταση ισορροπίας ενεργειακών καταστάσεων. Spin-πλέγμα και spin-spin χρόνοι αποκατάστασης.....	27
1.5.1.4 Παλμική ακολουθία CPMG	28
1.5.1.5 Χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR, η παράμετρος δ	29
1.5.1.6 Σταθερές Σύζευξης ^1H NMR- Πολλαπλότητα κορυφών	29
1.5.1.7 Παλμική φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier- Οργανολογία.....	30
1.6 Σκοπός	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	34
2.1 Πληθυσμός της μελέτης	34
2.1.1 Συλλογή και προεργασία των δειγμάτων	34

2.1.2 Καταστολή του σήματος των μακρομορίων με την παλμική ακολουθία CPMG	34
2.1.3 Διήθηση του ορού του αίματος	35
2.1.4 Προετοιμασία δειγμάτων για τη λήψη των φασμάτων ^1H NMR	36
2.1.5 Λήψη και επεξεργασία των φασμάτων ^1H NMR	37
2.1.6 Ποσοτικοποίηση των BCAAs	37
2.1.7 Στατιστική Ανάλυση Δεδομένων	39
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	40
3.1 Το ^1H NMR φάσμα του ορού του αίματος	40
3.2 Δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά στοιχεία του πληθυσμού της μελέτης ..	43
3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός των BCAAs από τα φάσματα ^1H NMR	44
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 : ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 : ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	51

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

Val : Valine (Βαλίνη)

Leu : Leucine (Λευκίνη)

Ile : Isoleucine (Ισολευκίνη)

BCAAs : Branched-Chain Amino Acids (αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας)

BCKAs : Branched-chain α-keto acids (α-κετοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας)

BCAT : Branched-chain amino acid aminotransferase (αμινομεταφοράση αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας)

BCKD : Branched-chain keto acid dehydrogenase (αφυδρογονάση των α-κετοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας)

mTOR : mammalian target of rapamycin

S6K1 : ribosomal protein S6 kinase

TSC1/TSC2 : complex of tuberous sclerosis proteins 1 & 2

AMPK : adenosine monophosphate kinase

GDH : glutamate dehydrogenase (αφυδρογονάση του γλουταμινικού)

PI3K : phosphatidylinosotide 3-kinases

ATP : adenosine triphosphate

IRS-1 : insulin receptor substrate 1

AH : Autoimmune hepatitis (Αυτοάνοση Ηπατίτιδα)

PBC : Primary Billiary Cirrosis (Πρωτοπαθής Χολική Κίρρωση)

ΣΔΤ2 : Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2

CVD : Cardiovascular Disease

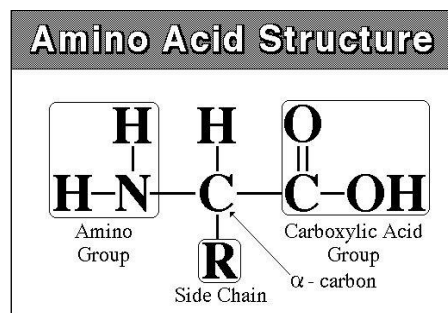
NMR: Nuclear Magnetic Resonance (πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός)

CPMG : Carr-Pursell-Meiboom-Gill experiment

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

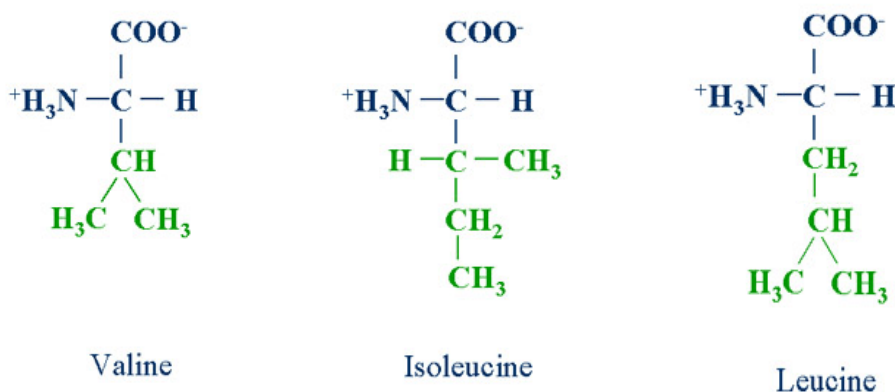
1.1 Αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας (Branched-Chain Amino Acids, BCAAs)

Τα αμινοξέα, όπως υποδηλώνει και η ονομασία τους, περιέχουν δύο λειτουργικές ομάδες, τη βασική αμινομάδα και την όξινη καρβοξυλομάδα. Αυτά που απαντούν συνήθως στις πρωτεΐνες είναι α-αμινοξέα, που σημαίνει ότι σε όλα η αμινομάδα αποτελεί υποκαταστάτη στο άτομο άνθρακα που βρίσκεται σε θέση α ως προς το καρβονύλιο^[1]. (Εικ.1)



Εικόνα 1: Γενικός συντακτικός τύπος δομής των α-αμινοξέων

Ως αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας (BCAAs) αναφέρονται η βαλίνη (Val), η λευκίνη (Leu) και η ισολευκίνη (Ile). Όπως φαίνεται από τη δομή τους στην **εικόνα 2**, είναι α-αμινοξέα, με τη βαλίνη να διαθέτει ως πλευρική αλυσίδα (side chain, R), μια ισοπροπυλο ομάδα ($R=(\text{CH}_3)_2\text{CH}-$) με διακλάδωση στο β-άνθρακα (επισήμανση με πράσινο χρώμα, **εικ.2**), η λευκίνη μια ισοβουτυλο ομάδα ($R=(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2-$) με διακλάδωση στο γ-άνθρακα και η ισολευκίνη μια δευτεροταγή βουτυλο ομάδα ($R=\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$) με διακλάδωση στο β-άνθρακα^[2]. Εξαιτίας των πλευρικών αλυσίδων τους που είναι αλκυλομάδες, ταξινομούνται στα μη πολικά, υδρόφοβα αμινοξέα.



Εικόνα 2 : Χημική δομή των BCAAs

Ανήκουν στα απαραίτητα αμινοξέα, δηλαδή δεν μπορεί να τα βιοσυνθέσει ο ανθρώπινος οργανισμός από άλλα συστατικά στο επίπεδο που απαιτείται για φυσιολογική ανάπτυξη, γι' αυτό πρέπει να λαμβάνονται έτοιμα, με την τροφή. Τα BCAAs είναι τα πιο

άφθονα από τα απαραίτητα αμινοξέα, καθώς οι περισσότερες πρωτεΐνες που προσλαμβάνονται με τη διατροφή τα περιέχουν περίπου σε ποσοστό 15-20% και αναλογούν στο 35% των ημερήσιων αναγκών σε απαραίτητα αμινοξέα στα θηλαστικά⁽³⁾.

1.2 Μεταβολισμός των BCAAs

Τα αμινοξέα που βρίσκονται σε ποσότητες μεγαλύτερες εκείνων που απαιτούνται για βιοσύνθεση δεν είναι δυνατόν να αποθηκευτούν, ούτε να απεκκριθούν, γι' αυτό αποικοδομούνται⁽⁴⁾. Απομακρύνεται η α-αμινική ομάδα και ο εναπομένον ανθρακικός σκελετός μετατρέπεται σε ένα κύριο μεταβολικό ενδιάμεσο που καταλήγει σε γλυκόζη ή οξειδώνεται με τον κύκλο του κιτρικού οξέος⁽⁴⁾.

Το πρώτο βήμα στο μεταβολισμό των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας είναι μια αντιστρεπτή αντίδραση τρανσαμίνωσης (μεταφορά α-αμινομάδας), με αποτέλεσμα το σχηματισμό των α-κετοξέων (branched-chain α-keto acids, BCKAs), η οποία καταλύεται από το ένζυμο αμινομεταφοράση (ή τρανσαμινάση) αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (branched-chain amino acid aminotransferase BCAT)⁽²⁾ (**Εικ.3**). Έτσι, η λευκίνη μετατρέπεται σε α-κετοϊσοκαπροϊκό (KIC), η βαλίνη σε α-κετοϊσοβαλερικό (KIV) και η ισολευκίνη σε α-κετο-β-μεθυλογλουταρικό οξύ (KIM)⁽²⁾. Ο δέκτης της αμινομάδας είναι το α-κετογλουταρικό για το σχηματισμό γλουταμινικού.

Όταν η αντίδραση τρανσαμίνωσης γίνεται στην αντίθετη κατεύθυνση τα διακλαδισμένης αλυσίδας α-κετοξέα παίρνουν μια αμινομάδα από το γλουταμινικό και δίνουν αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας και α-κετογλουταρικό. Έτσι η αντίδραση τρανσαμίνωσης εκτελεί αντιστρεπτή μετατροπή μεταξύ γλουταμινικού και αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας⁽²⁾.

Η αμινομεταφοράση (BCAT), που καταλύει την παραπάνω αντίδραση απαιτεί την παρουσία μιας προσθετικής ομάδας, της φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP), η οποία παράγεται από την πυριδοξίνη (βιταμίνη B6) και λειτουργεί ως ενδιάμεσος φορέας αμινομάδων⁽⁴⁾. Δύο γονίδια στους ανθρώπους BCT1 (βρίσκεται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 12) και το BCT2 (βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19) κωδικοποιούν την έκφραση δυο ισομορφών του ενζύμου BCAT: την κυτοσολική (BCATc) και τη μιτοχονδριακή (BCATm)⁽⁵⁾.

Η δραστηριότητα του ενζύμου είναι μεγαλύτερη στους νεφρούς, ακολουθεί ο εγκέφαλος, το στομάχι και η καρδιά⁽⁶⁾. Παρόμοια και μικρότερη δραστηριότητα της αμινομεταφοράσης εντοπίζεται στο ήπαρ, το λεπτό και το παχύ έντερο ενώ τέλος ελάχιστη παρατηρείται στο μυϊκό, το λιπώδη ιστό⁽⁶⁾ και ίσως και στο πάγκρεας, όπως έδειξε μια μικρή μελέτη⁽⁷⁾. Το κυτοσολικό ισοένζυμο στους ανθρώπους περιορίζεται στον εγκέφαλο⁽⁶⁾.

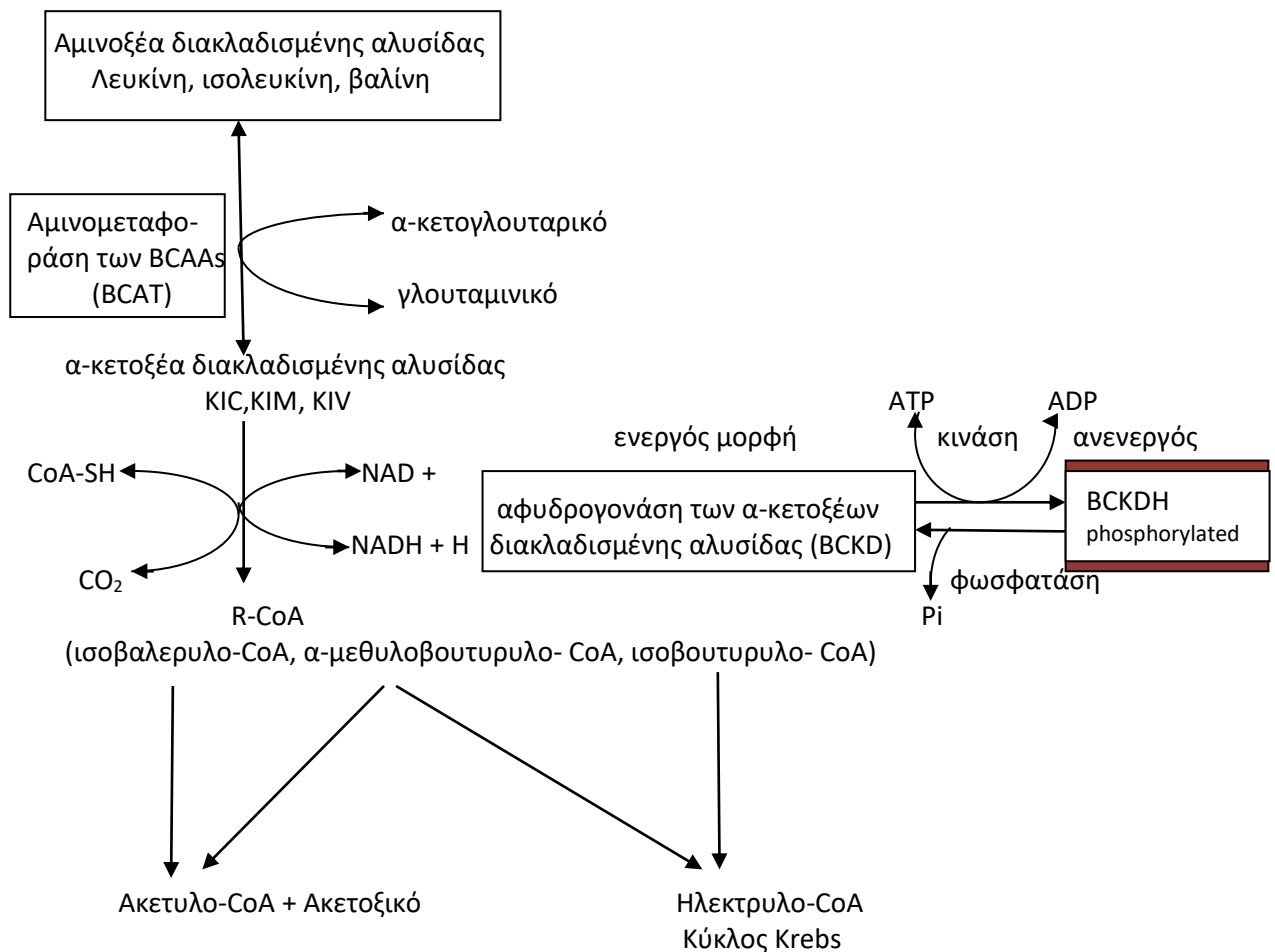
Το δεύτερο βήμα στον καταβολισμό των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας είναι η οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση των α-κετοξέων από το σύμπλοκο της αφυδρογονάσης των α-κετοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (branched-chain keto acid dehydrogenase, BCKD), ένα εσωτερικό πολυενζυμικό σύμπλεγμα της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Αυτό το ενζυμικό βήμα είναι μη αντιστρεπτό και δεσμεύει τα α-κετοξέα προς οξείδωση, με αποτέλεσμα να παράγεται τελικά NADH, CO₂ και τα αντίστοιχα ακυλο-CoA παράγωγα για κάθε αμινοξύ⁽²⁾.



Έτσι από το α-κετοϊσοκαπροϊκό (KIC) προκύπτει το ισοβαλερυλο-CoA (μετατροπή λευκίνης), από το α-κετοϊσοβαλερικό (KIV) το ισοβουτυρυλο-CoA (μετατροπή βαλίνης) και από το α-κετο-β-μεθυλογλουταρικό (KIM) το α-μεθυλοβουτυρυλο-CoA (μετατροπή ισολευκίνης)⁽²⁾.

Η δραστικότητα του συμπλόκου της αφυδρογονάσης BCKD, ρυθμίζεται με ένα κύκλο φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης: όταν η αφυδρογονάση φωσφορυλιώνεται από μια ειδική κινάση (κινάση της BCKD) αδρανοποιείται ενώ όταν αποφωσφορυλιώνεται από μια ειδική φωσφατάση (φωσφατάση της BCKD) ενεργοποιείται⁽⁸⁾. Η υψηλότερη ενζυμική δραστικότητα ανιχνεύεται στα νεφρά, μετά στο ήπαρ, στον εγκέφαλο και την καρδιά. Παρόμοια και συγκριτικά λιγότερη εμφανίζεται σε μύες, στομάχι και έντερο, ενώ η μικρότερη δραστικότητα εντοπίζεται σε λιπώδη ιστό και λεπτό έντερο. Μεγαλύτερη συγκέντρωση της κινάσης η οποία είναι υπεύθυνη για την αδρανοποίηση του συμπλόκου της αφυδρογονάσης έχει βρεθεί στους σκελετικούς μύες, ενώ η μικρότερη δραστικότητα αυτής εντοπίζεται στους νεφρούς⁽⁶⁾.

Τελικά, η λευκίνη δίνει ακετοξικό και ακετυλο-CoA και ανήκει στα κετογενετικά αμινοξέα γιατί η αποικοδόμησή της οδηγεί σε παραγωγή κετονοσωμάτων ή λιπαρών οξέων, η βαλίνη δίνει ηλεκτρυλο-CoA που μετατρέπεται τελικά σε γλυκόζη και ανήκει στα γλυκογενετικά αμινοξέα, και η ισολευκίνη μπορεί να αποικοδομηθεί και σε ηλεκτρυλο-CoA και σε ακετυλο-CoA, οπότε είναι και γλυκογενετικό και κετογενετικό αμινοξύ⁽²⁾.



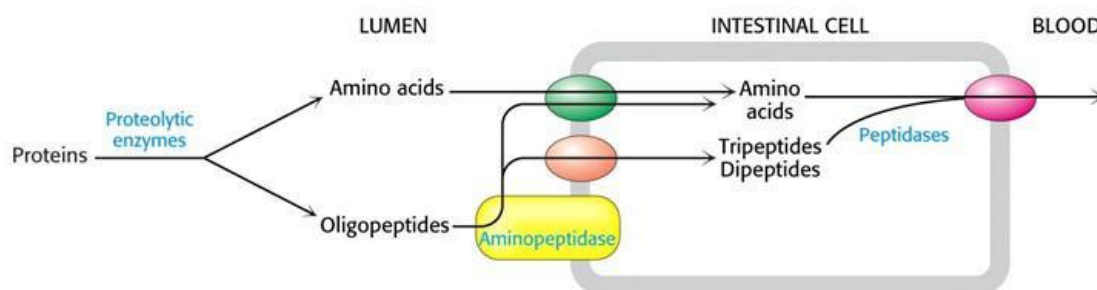
Εικόνα 3 : Συνοπτική παρουσίαση του μεταβολισμού των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας.

Στο πλάσμα των υγιών ανθρώπων τα BCAAs βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από τα αντίστοιχα α-κετοξέα. Η δραστικότητα των ενζύμων BCAT και BCKD σε έναν ιστό δείχνει την ικανότητά του για τρανσαμίνωση και οξείδωση των BCAAs. Ο σκελετικός μυς, εξαιτίας της έκτασής του στον ανθρώπινο οργανισμό, εμφανίζει συνολικά

το μεγαλύτερο ποσοστό αυτής της ικανότητας. Ωστόσο, επειδή εκεί το σύμπλοκο BCAT εμφανίζει μεγαλύτερη ενεργότητα από το σύμπλοκο BCKD, στους μύες γίνεται κυρίως τρανσαμίνωση των BCAAs⁽⁹⁾. Αντίθετα, στο νεφρό που εμφανίζεται η υψηλότερη δρατικότητα του συμπλόκου BCKD, απουσιάζει η ικανότητα αναστολής της ενζυμικής του δράσης με αποτέλεσμα τα BCAAs να οξειδώνονται ακατάπαυστα. Έτσι φαίνεται ότι η οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση αυτών των αμινοξέων λαμβάνει χώρα κυρίως στο ήπαρ και τους νεφρούς. Τέλος τα περιφερειακά λεμφοκύτταρα φέρουν και το σύμπλοκο BCAT και το BCKD αλλά εκεί γίνεται κυρίως τρανσαμίνωση των BCAAs και ιδιαίτερα της λευκίνης⁽¹⁰⁾.

1.2.1 Η πορεία των BCAAs στον ανθρώπινο οργανισμό

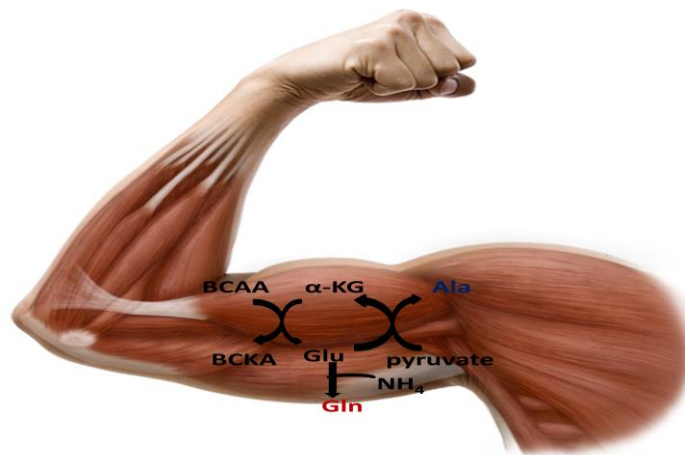
Τα BCAAs ανήκουν στα απαραίτητα αμινοξέα τα οποία ο οργανισμός εξασφαλίζει από γεύματα πλούσια σε ζωική πρωτεΐνη, όπου περιέχονται σε ποσοστό 20%. Με τη διαδικασία της πέψης οι πρωτεΐνες των τροφών διασπώνται σε αμινοξέα τα οποία μέσω της κυκλοφορίας του αίματος μεταφέρονται στους ιστούς. Η πέψη των πρωτεϊνών ξεκινά στο στομάχι με τη δράση του υδροχλωρικού οξέος που περιέχεται στο γαστρικό υγρό. Το υδροχλωρικό οξύ αποδιατάσσει την τεταρτοταγή, την τριτοταγή και τη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών και οδηγεί στη μετατροπή του πεψινογόνου σε πεψίνη. Η πεψίνη διασπά τις πρωτεΐνες σε μικρότερα πολυπεπτίδια. Η διαδικασία της πέψης συνεχίζεται στο δωδεκαδάκτυλο από τα παγκρεατικά ένζυμα θρυψίνη και χυμοθρυψίνη. Τα ένζυμα αυτά ανήκουν στις ενδοπεπτιδάσες και υδρολύουν περισσότερο τους πεπτιδικούς δεσμούς που βρίσκονται ενδιάμεσα της αλυσίδας πολυπεπτιδίων, δημιουργώντας έτσι ολιγοπεπτίδια (κυρίως τριπεπτίδια και διπεπτίδια) καθώς και λίγα αμινοξέα. Στη συνέχεια οι πεπτιδάσες (καρβοξυπεπτιδάση, αμινοπεπτιδάση, διπεπτιδάση), που ανήκουν στις εξωπεπτιδάσες ολοκληρώνουν την πέψη της πρωτεΐνης στον ειλεό, κόβοντας τους ακραίους πεπτιδικούς δεσμούς. Έπειτα, τα αμινοξέα περνούν από τον εντερικό βλεννογόνο και εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος (**Εικ.4**). Έτσι, μετά από ένα πλούσιο σε ζωική πρωτεΐνη γεύμα τα επίπεδα των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας παρουσιάζουν σημαντική αύξηση στην κυκλοφορία του αίματος⁽¹¹⁾. Στη συνέχεια, με τη δράση της ισουλίνης τα BCAAs μεταφέρονται στους περιφερικούς ιστούς και κυρίως στο μυϊκό. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από μελέτες σύμφωνα με τις οποίες, μετά από γεύματα πλούσια σε λευκίνη ή ενδοφλέβια έγχυση αυτής, το 65% του συνολικού ποσοστού της εισέρχεται στο μυϊκό ιστό, το 10% στον εγκέφαλο και το υπόλοιπο 25% στους άλλους ιστούς⁽¹³⁾.



Εικόνα 4: Αποικοδόμηση πρωτεϊνών

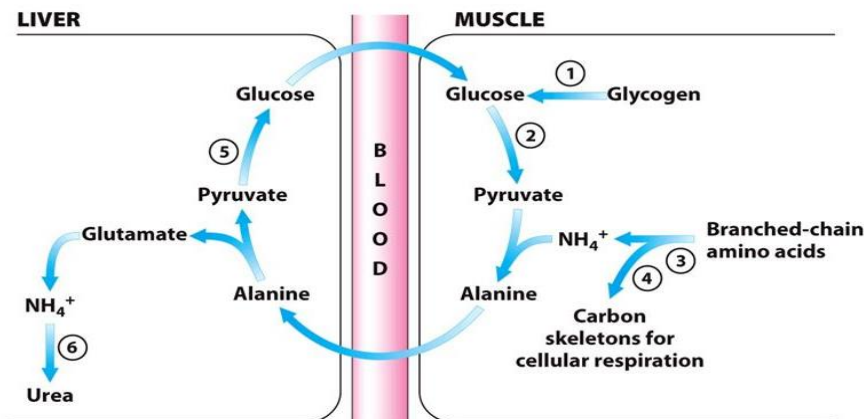
Στους μύες τα BCAAs χρησιμοποιούνται στη μυϊκή πρωτεϊνοσύνθεση και η περίσσειά τους καταβολίζεται. Το πρώτο βήμα στον καταβολισμό είναι η απομάκρυνση της α-αμινικής ομάδας των αμινοξέων με τρανσαμίνωση προς ένα α-κετοξύ. Η αμινομάδα των BCAAs μεταφέρεται στο α-κετογλουταρικό για το σχηματισμό γλουταμινικού, το οποίο στη

συνέχεια ακολουθεί δύο δρόμους (σύνθεση γλουταμίνης, κύκλος γλυκόζης-αλανίνης) (Εικ.5).



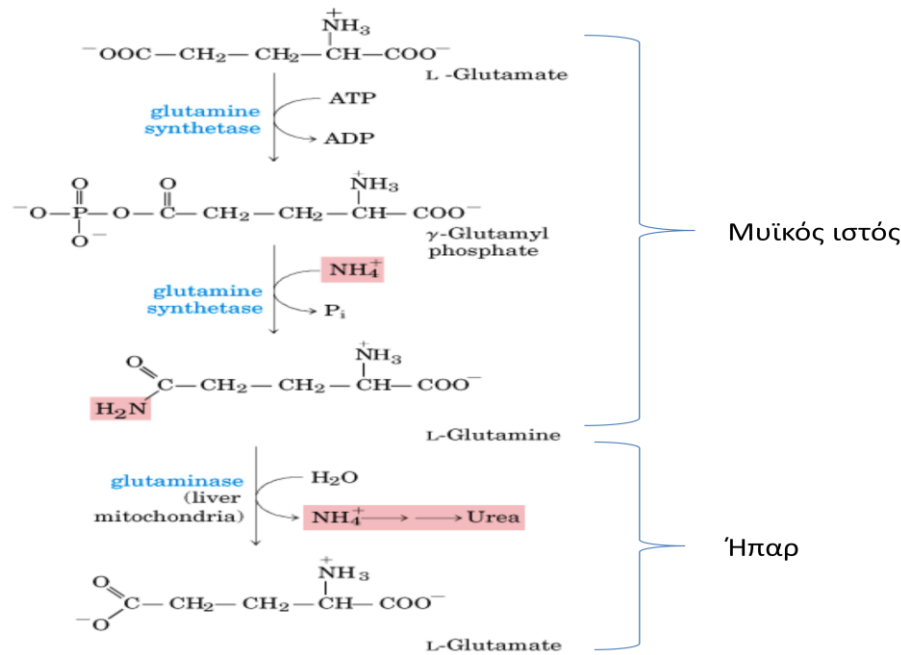
Εικόνα 5 : Καταβολισμός των BCAAs και σύνθεση αλανίνης, γλουταμίνης στο μυϊκό ιστό

Ο ένας δρόμος περιλαμβάνει την απαμίνωση του γλουταμινικού προς πυροσταφυλικό για το σχηματισμό αλανίνης, με τη βοήθεια του ενζύμου αμινομεταφοράς της αλανίνης, η οποία στη συνέχεια απελευθερώνεται στο αίμα. Το ήπαρ απορροφά την αλανίνη, απομακρύνει το άζωτο για απόσυρση ως ουρία και μετατρέπει το προκύπτον πυροσταφυλικό σε γλυκόζη (κύκλος γλυκόζης-αλανίνης) (Εικ.6).



Εικόνα 6: Κύκλος γλυκόζης - αλανίνης

Ο δεύτερος δρόμος περιλαμβάνει τη μετατροπή του γλουταμινικού σε γλουταμίνη, με τη βοήθεια του ενζύμου συνθετάσης της γλουταμίνης. Η γλουταμίνη λειτουργεί επίσης ως μη τοξικός μεταφορέας αμμωνίας από τους ιστούς στο ήπαρ για απόσυρση ως ουρία (Εικ.7). Αυτή η παρεμβολή των δύο αμινοξέων, αλανίνη και γλουταμίνη, στην απομάκρυνση του αζώτου από τους μύες κρίνεται απαραίτητη καθώς αυτοί στερούνται των ενζύμων του κύκλου της ουρίας και έτσι το άζωτο πρέπει να μεταφερθεί σε μια μορφή που να μπορεί να απορροφηθεί από το ήπαρ και να μετατραπεί σε ουρία.



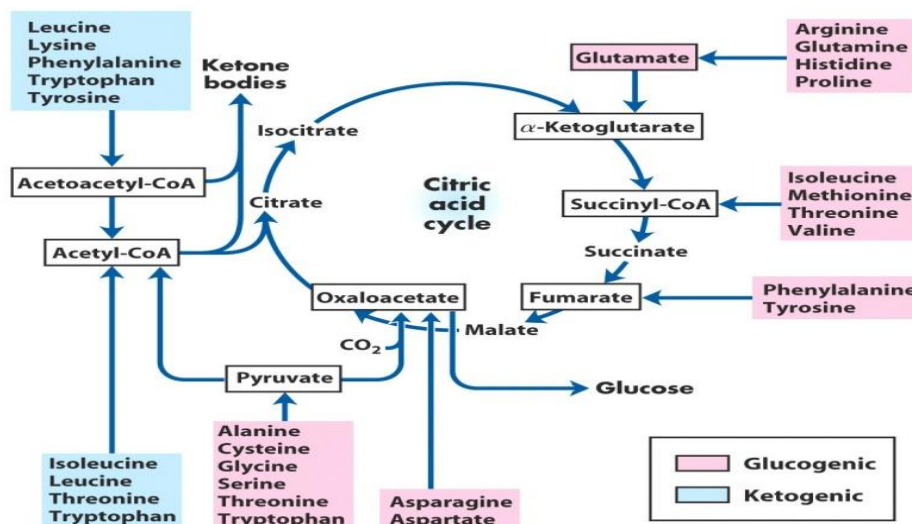
Εικόνα 7 : Σύνθεση γλουταμίνης

Στη μεταγευματική περίοδο, τα αμινοξέα και κυρίως η λευκίνη διεγείρουν την έκκριση ινσουλίνης η οποία αναστέλλει τη γλυκονεογένεση στο ήπαρ και προάγει τη σύνθεση γλυκογόνου στο ήπαρ και τους μύες. Στην κατάσταση αυτή παρατηρείται εκροή αμινοξέων από το μυϊκό ιστό και κυρίως γλουταμίνης. Σύμφωνα με μελέτες, το άζωτο της αμινομάδας των BCAAs, εξέρχεται από το μυ ως γλουταμίνη⁽¹²⁾. Η πορεία αυτή επιβεβαιώνεται επίσης από μελέτες στις οποίες μετά από ενδοφλέβια έγχυση μίγματος αμινοξέων που δεν περιέχουν γλουταμίνη, ακολουθεί σημαντική αύξηση της εκροής γλουταμίνης από το σκελετικό μυ⁽¹⁴⁾. Έτσι στη μεταγευματική περίοδο φαίνεται ότι το γλουταμινικό που προκύπτει από τον καταβολισμό των BCAAs, ακολουθεί την πορεία σύνθεσης γλουταμίνης, καθώς η είσοδος των BCAAs στους μύες έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου συνθετάση της γλουταμίνης που καταλύει τη συγκεκριμένη συνθετική οδό.

Στη μεταπορροφητική κατάσταση, αρκετές ώρες μετά το γεύμα, τα επίπεδα της γλυκόζης του αίματος μειώνονται, οδηγώντας έτσι στη μείωση της έκκρισης ινσουλίνης και στην αύξηση της έκκρισης γλυκαγόνης. Η γλυκαγόνη εκκρίνεται από τα α κύτταρα των νησιδίων του παγκρέατος ως απόκριση στα μειωμένα επίπεδα γλυκόζης και συμβάλλει στην ομοιοστασία της κυρίως ενεργοποιώντας τη γλυκογονόλυση στο ήπαρ. Έτσι καθώς το γλυκογόνο του ήπατος μειώνεται, ευοδώνεται η γλυκονεογένεση. Η αυξημένη γλυκονεογένεση του ήπατος, προάγει την απελευθέρωση των γλυκογενετικών υποστρωμάτων κυρίως από τους σκελετικούς μύες (αλανίνη, γλουταμίνη, γαλακτικό) και από το λιπώδη ιστό (γλυκερόλη). Έτσι στην κατάσταση αυτή παρατηρείται απελευθέρωση αμινοξέων από το σκελετικό μυ, με αλανίνη και γλουταμίνη να κυριαρχούν σε ποσοστό 60-80% του συνόλου των αμινοξέων⁽¹⁵⁾. Μελέτες έχουν δείξει ότι ως επί το πλείστο τα δύο αυτά αμινοξέα προέρχονται από "de novo" σύνθεση και όχι από πρωτεόλυση. Συγκεκριμένα έχει διαπιστωθεί ότι, η κύρια πηγή αζώτου για τη σύνθεσή τους προέρχεται από την απαμίνωση των BCAAs⁽¹⁶⁾.

Ακολουθεί η αποικοδόμηση των ανθρακικών σκελετών των BCAAs κυρίως στο ήπαρ για την παραγωγή γλυκόζης, κετονοσωμάτων ή ενέργειας μέσω του κύκλου του Krebs. Συγκεκριμένα η λευκίνη καταβολίζεται σε ακετυλο-CoA και έτσι αποτελεί υπόστρωμα για

την παραγωγή κετονοσωμάτων ή λιπαρών οξέων. Η βαλίνη αποικοδομείται σε ηλεκτρολυλο-CoA το οποίο μέσω του κύκλου του Krebs μετατρέπεται σε οξαλοξικό. Στη συνέχεια το οξαλοξικό μπορεί να μετατραπεί σε φωσφοενολοπυροσταφυλικό που αποτελεί πρόδρομο μόριο για την παραγωγή γλυκόζης. Τέλος, ο καταβολισμός της ισολευκίνης μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τόσο την παραγωγή γλυκόζης όσο και την παραγωγή κετονοσωμάτων (Εικ.8).



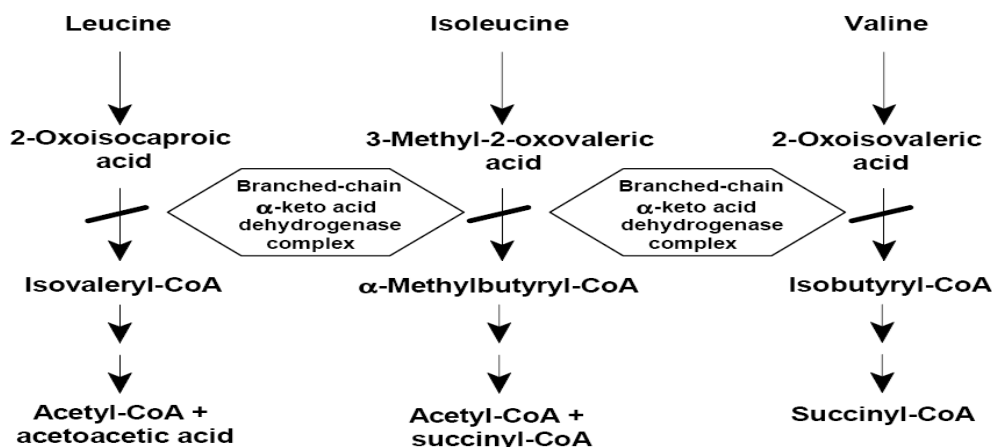
Εικόνα 8 : Μεταβολικές τύχες του ανθρακικού σκελετού των αμινοξέων

1.3 Κλινικές διαταραχές του μεταβολισμού των BCAAs

1.3.1 Εκ γενετής μεταβολικές διαταραχές

Οι διαταραχές του μεταβολισμού και των τριών BCAAs δεν είναι αμελητέες και αφορούν 1:10000 γεννήσεις. Στην πλειονότητά τους, οι διαταραχές αυτές οφείλονται σε ανεπαρκή δραστηριότητα ενζύμων που συμμετέχουν στον ενδιάμεσο μεταβολισμό των αμινοξέων αυτών με κυριότερες τις παρακάτω: 1) η νόσος με ούρα σαν σιρόπι σφενδάμου, 2) η υπερλευκιναιμία-ισολευκιναιμία, 3) η υπερβαλιναιμία, 4) η ισοβαλική οξυαιμία, 5) η 3-μεθυλοκροτωνυλογλυκιναιμία, 6) η πολλαπλή ανεπάρκεια καρβοξυλάσης, 7) η 3-μεθυλογλουτακονική οξυουρία, 8) η 3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρική οξυαιμία, 9) η γλουταρική οξυαιμία τύπου II, 10) η προπιονική οξυαιμία, 11) η μεθυλομηλονική οξυαιμία, 12) η μεθυλακετοξική οξυουρία και 13) η μεθακρλική οξυουρία. Εκδηλώνονται συνήθως στη νεογνική ή στη βρεφική ηλικία, με δυσκολία στη σίτιση, εμετούς, κετοξέωση, σπασμούς και κώμα⁽¹⁸⁾.

Μεταξύ των νοσημάτων του μεταβολισμού των BCAAs ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η νόσος με ούρα σαν σιρόπι σφενδάμου (maple syrup urine disease). Στη νόσο αυτή, η οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση των α-κετοξέων που παράγονται από τη βαλίνη, τη λευκίνη και την ισολευκίνη, παρεμποδίζεται διότι η αφυδρογονάση των α-κετοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (BCKD) λείπει ή είναι ελαττωματική (Εικ.9). Συγκεκριμένα έχουν βρεθεί πέντε μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί σε κωδικεύουσα αλληλουχία του γονιδίου που ελέγχει την πρωτεϊνική φωσφατάση 2 Cm (PP2Cm), η οποία φαίνεται ότι παίζει ρυθμιστικό ρόλο στη δραστηριότητα του συμπλόκου BCKD⁽¹⁷⁾.



Εικόνα 9: Νόσος των ούρων ως οσμή σφενδάμου- ανεπάρκεια του συμπλόκου της αφυδρογονάσης των α -κετοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας.

Η ύπαρξη αυτής της νόσου έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνονται τα επίπεδα των BCAAs και των παραγόμενων από αυτά α -κετοξέων, στο αίμα και τα ούρα. Τα ούρα των ασθενών έχουν τη χαρακτηριστική οσμή σφενδάμου, απ' όπου και η ονομασία της ασθένειας (καλείται επίσης κετοξουρία διακλαδισμένης αλυσίδας). Τα υψηλά επίπεδα λευκίνης μπορεί να προκαλέσουν βλάβη στον εγκέφαλο εκτός εάν ο ασθενής τεθεί σε διαιτολόγιο χαμηλό σε BCAAs, νωρίς στη ζωή του^[4]. Η νευροτοξική δράση της νόσου σχετίζεται και με τη μεταβολή στον ενεργειακό μεταβολισμό του εγκεφάλου από την ανεπαρκή είσοδο αμινοξέων μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Συγκεκριμένα, η αύξηση της λευκίνης στο αίμα αναστέλλει την είσοδο άλλων ουδέτερων αμινοξέων στον εγκέφαλο, οδηγώντας σε μειωμένη ενδοκυττάρια παραγωγή πρωτεϊνών και τελικά στη διαταραχή της φυσιολογικής λειτουργίας των νευρικών κυττάρων^[131].

Η ασθένεια μπορεί εύκολα να διαγνωστεί σε νεογέννητα με δοκιμασία δειγμάτων ούρων με 2,4-δινιτροφαινυλο-υδραζίνη, η οποία αντιδρά με τα α -κετοξέα προς σχηματισμό παραγώγων της 2,4-δινιτροφαινυλο-υδραζόνης^[4].

1.3.2 Μεταβολικές διαταραχές που οφείλονται στα ένζυμα BCAT και BCKD

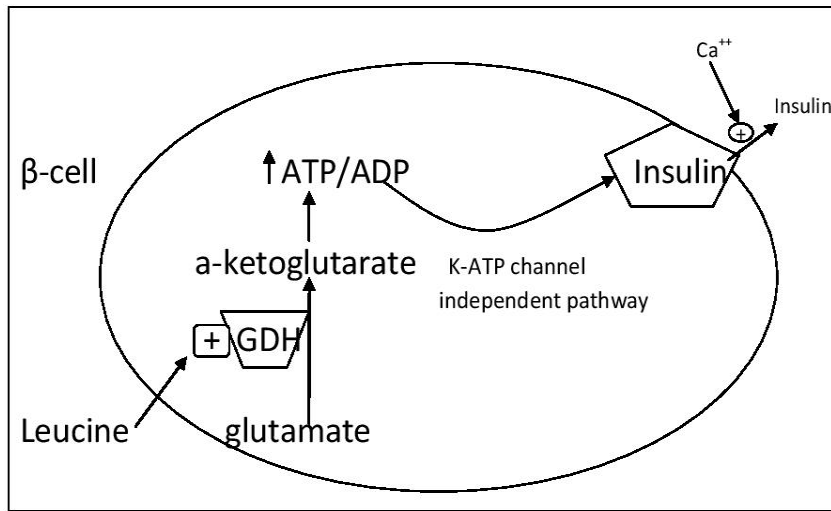
Αυξημένος καταβολισμός των BCAAs και συγκεκριμένα αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου BCAT έχει συνδεθεί με διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως επιτάχυνση της ανάπτυξης κακοηθών γλιωμάτων^[19], μειωμένη επιβίωση εξαιτίας σήψης^[20] και αυξημένη συσσώρευση λίπους στο ήπαρ^[21] με αποτέλεσμα μεγάλο αριθμό μεταβολικών ασθενειών^[22]. Η συστηματική διαταραχή της δράσης του ισοενζύμου BCATm, έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη ενεργειακή δαπάνη και τη μείωση του σωματικού βάρους σε πειραματικά μοντέλα^[23].

Είναι γνωστό ότι ορισμένοι παράγοντες επηρεάζουν τη δράση του συμπλόκου BCKD και επακόλουθα την οξείδωση των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας. Στα φυσιολογικά άτομα η ινσουλίνη καταστέλλει την οξείδωση της λευκίνης (KIC), φαινόμενο το οποίο είναι αμβλυμένο στο σακχαρώδη διαβήτη^[24]. Επίσης, τα αυξημένα επίπεδα λιπαρών οξέων μακριάς αλυσίδας, εν αντιθέσει με τα τριγλυκερίδια μέσης αλυσίδας μειώνουν την οξείδωση της λευκίνης^[25]. Εν αντιθέσει, η οξείδωσή της ενεργοποιείται με τη δράση της γλυκαγόνης^[26], μετά τη θεραπεία με κορτικοστεροειδή^[27] και κατά την επαγόμενη από το χλωριούχο αμμώνιο των τροφών μεταβολική οξείωση^[28].

1.3.3 Μεταβολικές διαταραχές των BCAAs σε καταστάσεις έλλειψης ή αντίστασης στη δράση της ινσουλίνης

1.3.3.1 Ρόλος της ινσουλίνης στο μεταβολισμό των BCAAs σε υγιή άτομα

Σε υγιή άτομα η κατανάλωση ενός γεύματος κρέατος ή από του στόματος χορήγηση λευκίνης αυξάνει τα επίπεδα ινσουλίνης στον ορό. Στο β-κύτταρο η λευκίνη δρα ως θετικός αλλοστερικός τροποποιητής της αφυδρογονάσης του γλουταμινικού⁽²⁹⁾. Η οξείδωση του γλουταμινικού σε α-κετογλουταρικό οδηγεί στην αύξηση του λόγου ATP/ADP και την αναστολή της δράσης των εξαρτώμενων από ATP διαύλων καλίου, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της εισροής Ca^{2+} στο κύτταρο για απελευθέρωση της αποθηκευμένης ινσουλίνης(Εικ.10).



Εικόνα 10 : Διέγερση της έκκρισης ινσουλίνης από τη δράση της λευκίνης στο β-κύτταρο.

Στη μεταγευματική περίοδο, η ινσουλίνη συμβάλλει στη μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης και των αμινοξέων στο πλάσμα, διευκολύνοντας την είσοδο των τελευταίων σε περιφερικούς ιστούς συμπεριλαμβανομένου των μυών. Η πιο σημαντική μείωση, παρατηρείται για τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας, την τυροσίνη, τη φαινυλαλανίνη και τη μεθειονίνη⁽¹²⁾.

Στη μεταπορροφητική κατάσταση, η ινσουλίνη καταστέλλει την αποικοδόμηση των μυϊκών πρωτεϊνών με αποτέλεσμα μόνο μια μικρή ποσότητα αμινοξέων να απελευθερώνεται από το μυϊκό ιστό⁽³¹⁾. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από πειράματα με εξωγενή έγχυση ινσουλίνης σε υγιή άτομα, όπου παρατηρείται σταθερή μείωση στη μυϊκή απελευθέρωση των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας, την τυροσίνη, τη φαινυλαλανίνη, τη θρεονίνη και τη γλυκίνη ενώ η αλανίνη δεν επηρεάζεται σημαντικά⁽³⁰⁾. Τέλος, η δράση της ινσουλίνης έχει ως αποτέλεσμα και τη μείωση της συγκέντρωσης στο αίμα των διακλαδισμένης αλυσίδας α-κετοξέων⁽³²⁾.

1.3.3.2 Ρόλος των BCAAs στην επαγόμενη αντίσταση στην ινσουλίνη μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού mTORC1

Διατροφή ιδιαίτερα εμπλουτισμένη σε πρωτεΐνες, έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μιας ευαίσθητης σερίνο/θρεονινο κινάσης, το σύμπλεγμα στόχου της ραπαμυκίνης στα θηλαστικά (mTORC1), το οποίο είναι ένας κύριος ρυθμιστής της πρωτεϊνοσύνθεσης, βιοσύνθεσης λιπιδίων⁽⁴⁰⁾, μεταγραφής γονιδίων⁽⁴¹⁾ και των μονοπατιών αυτοφαγίας⁽³⁴⁾. Η ενεργοποίηση του mTORC1 εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα επαρκών συγκεντρώσεων αμινοξέων, ιδιαίτερα των BCAAs⁽³⁵⁾. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και

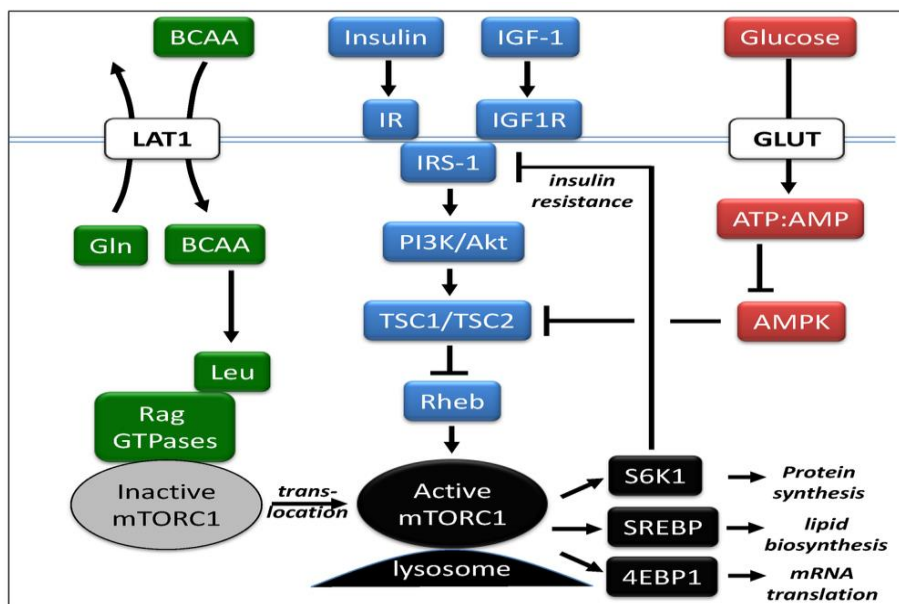
από μελέτες σε κύτταρα θηλαστικών οι οποίες έδειξαν ότι η στέρηση αυτών των αμινοξέων μπορεί γρήγορα να καταστείλει το συγκεκριμένο σηματοδοτικό μονοπάτι. **(Εικ.11).**

Η δραστηριότητά του διαμορφώνεται από τρεις βασικές οδούς : 1) Η μία οδός περιλαμβάνει αυξητικούς παράγοντες, όπως ινσουλινόμορφο αυξητικό παράγοντα της ινσουλίνης 1 (IGF-1) σε συνδυασμό με ινσουλίνη. Οι παράγοντες αυτοί, ενεργοποιούν το σύμπλοκο PI3K (κινάση 3 της φωσφατυδιλοϊνσοϊτόλης) /Akt (πρωτεϊνική κινάση Β) οδηγώντας σε φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης της οζώδους σκλήρυνσης (TSC2) και επακόλουθη εξασθένιση της ανασταλτικής λειτουργίας του συμπλέγματος TSC1/ TSC2⁽³⁶⁾⁽³⁷⁾. Αυτό, έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της μικρής GTPασης RAS (ένζυμα υδρόλυσης τριφωσφορικής γουανοσίνης) (ομόλογη εμπλουτισμένη στον εγκέφαλο-Rheb) και τελικά την ενεργοποίηση του mTORC1⁽³⁸⁾. Καθοδικά του mTORC1, η ενεργοποίηση της ριβοσωμικής πρωτεϊνικής κινάσης S6, (S6K1) επάγει την πρωτεϊνοσύνθεση⁽³⁹⁾ αλλά οδηγεί και στη φωσφορυλίωση της σερίνης του υποστρώματος του υποδοχέα της ινσουλίνης (IRS-1) με αποτέλεσμα την επαγόμενη αντίσταση στη δράση της ορμόνης⁽⁴²⁾.

2) Η δεύτερη οδός περιλαμβάνει το μονοπάτι της κινάσης του AMP (AMPK). Όταν τα επίπεδα γλυκόζης είναι υψηλά, ο λόγος ATP/AMP αυξάνεται, οδηγώντας σε αδρανοποίηση της AMPK. Όπως το σύμπλεγμα PI3K/ Akt, έτσι και η AMPK αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο TSC1/TSC2 οδηγώντας στην καθοδική ενεργοποίηση του mTORC1⁽³⁷⁾, με επακόλουθη αντίσταση στην ινσουλίνη. Έχει αποδειχθεί επίσης, ότι η λευκίνη αλληλεπιδρά με το μονοπάτι της AMPK. Σε μια μελέτη με χρήση σκελετικών μυών αρουραίου, αυξημένες συγκεντρώσεις τόσο λευκίνης όσο και γλυκόζης βρέθηκε ότι μειώνουν τη δραστηριότητα της κινάσης AMPK και επάγουν αντίσταση στην ινσουλίνη⁽⁴¹⁾.

3) Το τρίτο μονοπάτι που οδηγεί σε ενεργοποίηση του mTORC1 , εξαρτάται από τη δράση της λευκίνης η οποία συνδέεται και ενεργοποιεί την αφυδρογονάση του γλουταμινικού (GDH)⁽⁴⁴⁾, με αποτέλεσμα τη μετατόπιση του ανενεργού mTORC1 στα διαμερίσματα των λυσοσωμάτων που περιέχουν ενεργοποιημένο Rheb⁽⁴³⁾.

Συμπερασματικά, τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας και κυρίως η λευκίνη, έχουν συσχετιστεί με διέγερση της πρωτεϊνοσύνθεσης των σκελετικών μυών μέσω του mTORC1⁽³⁵⁾ αλλά και με επαγόμενη αντίσταση στην ινσουλίνη.



Εικόνα 11: Κύρια μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης μέσω του mTORC1.

Έχει παρατηρηθεί ότι, ο μεταβολισμός των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας μεταβάλλεται σε καταστάσεις έλλειψης ινσουλίνης ή αντίστασης του ιστού στη δράση της ορμόνης. Αυτές οι διαταραχές του μεταβολισμού, εντοπίζονται στην παχυσαρκία, στο σακχαρώδη διαβήτη, στα καρδιαγγειακά νοσήματα καθώς και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις όπως η νεφρική και ηπατική νόσος.

1.3.3.3 BCAAs και παχυσαρκία

Σύμφωνα με μελέτες, στην παχυσαρκία παρατηρείται αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης στο σκελετικό μυ η οποία επηρεάζει το μεταβολισμό των πρωτεϊνών^(45,47). Όλο και περισσότερα στοιχεία αποκαλύπτουν ότι στην παχυσαρκία ο εξασθενημένος καταβολισμός των BCAAs στο λιπώδη ιστό, έχει ως αποτέλεσμα την παρατηρούμενη αύξηση των επιπέδων τους στην κυκλοφορία του αίματος⁽⁵¹⁾. Επιπλέον, εξαιτίας του διαταραγμένου μεταβολισμού τους παρατηρείται συσσώρευση των δυνητικά τοξικών BCKAs και των αντίστοιχων ακυλο-CoA παραγώγων τους (προϊόντα του μεταβολισμού των BCAAs), που με τη σειρά τους ενεργοποιούν τη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, και την οξειδοαναγωγική σηματοδότηση που σχετίζεται με αντίσταση στην ινσουλίνη, μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού του mTOR. (περιγράφηκε παραπάνω)⁽³³⁾.

Μετά από εξωγενή έγχυση γλυκόζης σε παχύσαρκους ασθενείς, διαπιστώθηκε ότι για να υπάρξει μείωση της συγκέντρωσης των αμινοξέων στο πλάσμα και ειδικά των BCAAs, πρέπει να αυξηθεί η έκκριση ινσουλίνης⁽⁴⁶⁾. Κατά συνέπεια, στη μεταπορροφητική κατάσταση τα επίπεδα ινσουλίνης ορού έχουν βρεθεί υψηλά σε παχύσαρκα άτομα αλλά η ορμόνη είναι λιγότερο αποτελεσματική στην καταστολή της πρωτεόλυσης, οδηγώντας έτσι στην αυξημένη εκροή αμινοξέων από το σκελετικό μυ⁽⁴⁵⁾. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της μεταπορροφητικής συγκέντρωσης στο πλάσμα των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας, της φαινυλαανίνης και της τυροσίνης⁽⁴⁵⁾. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αύξηση στη γλυκονογένεση με κύρια υποστρώματα τα αμινοξέα και το γαλακτικό οξύ αντί της γλυκερόλης. Το γεγονός αυτό γίνεται φανερό και από την αύξηση του κλάσματος της γλυκονογένεσης από φωσφοενολοπυροσταφυλικό⁽⁴⁷⁾.

Η συσχέτιση της αντίστασης στη δράση της ινσουλίνης με τη ρύθμιση του καταβολισμού των BCAAs στο λιπώδη ιστό, επιβεβαιώνεται και από μελέτη σε παχύσαρκα μονοζυγωτικά δίδυμα. Συγκεκριμένα στα δίδυμα αυτά, βρέθηκε μεγαλύτερη συγκέντρωση ινσουλίνης πλάσματος σε σχέση με τα υγιή δίδυμα αλλά μικρότερη ευαισθησία στη δράση της ορμόνης στους περισσότερους ιστούς⁽⁵⁰⁾.

Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι τα αυξημένα επίπεδα των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας σε παχύσαρκους και υπέρβαρους ασθενείς σχετίζονται γραμμικά με το μοντέλο αξιολόγησης για την ανίχνευση ινσουλινοαντίστασης, δείκτης HOMA⁽⁴⁸⁾. Ωστόσο, σύμφωνα με μελέτες η απώλεια βάρους οδηγεί σε πτώση των επιπέδων ινσουλίνης στον ορό και επακόλουθη μείωση της συγκέντρωσης των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας, της φαινυλαανίνης και της τυροσίνης⁽⁴⁹⁾.

1.3.3.4 BCAAs και Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 αποτελεί σοβαρό πρόβλημα δημόσιας υγείας που λαμβάνει διαστάσεις «επιδημίας» σε παγκόσμιο επίπεδο. Είναι ένα σύνδρομο με ετερογενές και πολυπαραγοντικό υπόστρωμα, που χαρακτηρίζεται από διαταραχές του μεταβολισμού των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων⁽⁵¹⁾, οι οποίες οφείλονται σε έλλειψη ινσουλίνης (πλήρη ή μερική), σε ελάττωση της βιολογικής δραστηριότητάς της στους περιφερικούς ιστούς-στόχους ή και στα δύο.

Όπως έχει διαπιστωθεί, δίαιτες με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη σχετίζονται με διαταραγμένη ανοχή στη γλυκόζη, αντίσταση στην ινσουλίνη και αυξημένη συχνότητα

εμφάνιση ΣΔΤ2^[48]. Σύμφωνα με μελέτες, στα άτομα με διαταραγμένη γλυκόζη νηστείας, τα επίπεδα των BCAAs είναι αυξημένα στην κυκλοφορία του αίματος σε σχέση με τους υγιείς, αποτελώντας έτσι δείκτη για τη μελλοντική εμφάνιση της νόσου^[52,53]. Συγκεκριμένα, μια μελέτη ασθενών-υγιών έδειξε ότι τα αυξημένα επίπεδα των BCAAs και δύο αρωματικών αμινοξέων (τυροσίνη και φαινυλαλανίνη) παρέχουν προγνωστική αξία εμφάνισης ΣΔΤ2 έως και 12 χρόνια μετά την αρχική εξέταση^[53].

Προκειμένου να μελετηθεί περαιτέρω η εμπλοκή των BCAAs πλάσματος στη μελλοντική εμφάνιση διαβήτη και κατά πόσο η σχέση αυτή ισχύει για όλους τους εθνικούς πληθυσμούς με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης της νόσου, πραγματοποιήθηκε η πολυεθνική μελέτη (IRAS, The Insulin Resistance Atherosclerosis Study)^[66]. Συμπερασματικά στους συμμετέχοντες στη μελέτη IRAS χωρίς διαβήτη (290 Καυκάσιοι, 165 Αφροαμερικάνοι, 230 Ισπανόφωνοι), τα αυξημένα επίπεδα BCAAs πλάσματος συνδυάστηκαν με υψηλές συγκεντρώσεις ινσουλίνης αλλά με εξασθενημένη ευαισθησία των ιστών στη δράση της ορμόνης. Με βάση την εθνικότητα, αντίστροφη συσχέτιση επιπέδων BCAAs πλάσματος και ευαισθησίας στην ινσουλίνη ήταν εμφανής στη συνδυαστική ομάδα Ισπανόφωνων και Καυκάσιων. Στις δύο αυτές πληθυσμιακές ομάδες τα αυξημένα επίπεδα των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας συνδέθηκαν με την εμφάνιση διαβήτη τύπου 2^[66].

Όπως είναι γνωστό, οι διαβητικοί ασθενείς εμφανίζουν υψηλά επίπεδα νηστείας και μεταγευματικής γλυκαγόνης. Στο γεγονός αυτό φαίνεται ότι εμπλέκονται και τα αμινοξέα, καθώς ασκούν πολλαπλές δράσεις στα κύτταρα των παγκρεατικών νησιδίων. Συγκεκριμένα η αργινίνη και η λευκίνη διεγείρουν την έκκριση γλυκαγόνης, με τη δεύτερη να συμβάλλει και στη διεγερση της έκκρισης ινσουλίνης από το πάγκρεας^[57]. Σύμφωνα με μελέτες, η μακροχρόνια χορήγηση λευκίνης σε πειραματόζωα, οδήγησε σε υπεργλυκαγοναιμία από τα α-παγκρεατικά κύτταρα, α-TC1-6, και ταυτόχρονα φάνηκε να καταστέλλεται η έκκριση γλυκόζης ενώ διεγείροταν η έκκριση ινσουλίνης^[51]. Έτσι, διαπιστώνεται ότι η μακροχρόνια έκθεση σε λευκίνη αυξάνει την έκφραση του γονιδίου που εμπλέκεται στη σύνθεση γλυκαγόνης, επιπλέον συμβάλλει στη συσσώρευση χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων και ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των α-κυττάρων^[58].

Σε προδιαβητικές καταστάσεις, πριν την εκδήλωση αντίστασης στην ινσουλίνη, η κάθαρσή της από την κυκλοφορία του αίματος μειώνεται επιτυγχάνοντας έτσι τη βιωσιμότητα των β-κυττάρων^[63]. Πρόσφατα στοιχεία αποδεικνύουν μια συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των BCAAs του πλάσματος και της κάθαρσης της ινσουλίνης κυρίως σε υπέρβαρα άτομα που υποβλήθηκαν σε δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε κορεσμένα λιπαρά^[64]. Σε πειραματικά μοντέλα φάνηκε ότι η αντίσταση στην ινσουλίνη που προκαλείται από την προσθήκη αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας σε μια δίαιτα υψηλή σε λιπαρά, αντιστρέφεται με χορήγηση του αναστολέα του mTOR, τη ραπαμυκίνη^[48].

Στον αρρύθμιστο διαβήτη, η ανεπάρκεια ινσουλίνης και η αντίσταση στη δράση της έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή της μυϊκής πρωτεΐνης και επακόλουθα απώλεια μυϊκής μάζας, ενώ η θεραπεία με ινσουλίνη βελτιώνει την ισορροπία σε άζωτο^[2]. Επιπλέον, σύμφωνα με μελέτες η αύξηση των επιπέδων BCAAs στο πλάσμα που είναι χαρακτηριστική στη διαβητική κετοξέωση και η αυξημένη ουρική απέκκριση αυτών^[56] ομαλοποιείται αμέσως μετά την έναρξη θεραπείας με ινσουλίνη και ελέγχου της νόσου^{[54][55]}.

Διάφορες επιδημιολογικές μελέτες, χρησιμοποιώντας τεχνικές Metabolomics έδειξαν ότι αυξημένα επίπεδα στο πλάσμα αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας συνδέονται με αντίσταση στην ινσουλίνη^[59] και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες εμφάνισης διαβήτη τύπου 2^[60,65], σε λευκούς Ευρωπαίους, Κινέζους, νοτιοασιάτες, μέσω μηχανισμών που περιλαμβάνουν μειωμένη έκφραση καταβολικών ενζύμων των BCAAs και αυξημένη αποικοδόμηση μυϊκών πρωτεϊνών^[33]. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι αυξημένα επίπεδα στο πλάσμα αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας μαζί με υπερινσουλιναιμία ασκούν αυξημένη εκκριτική πίεση στα β-κύτταρα του παγκρέατος και τελικά συμβάλλουν στη δυσλειτουργία τους^[61].

Αυτές οι μελέτες έχουν ιδιαίτερη σημασία για τη διερεύνηση του διαβήτη τύπου 2, διότι η νόσος αυτή χαρακτηρίζεται από μια παρατεταμένη και σιωπηλή περίοδο προοδευτικής πτώσης της ευαισθησίας/ έκκρισης ινσουλίνης πριν την κλινική εμφάνιση της ασθένειας⁽⁶²⁾.

1.3.4 Μεταβολικές διαταραχές των BCAAs σε άλλες παθολογικές καταστάσεις

1.3.4.1 BCAAs και χρόνια νεφρική νόσος (CKD)

Η αντίσταση στην ινσουλίνη, η οποία παρατηρείται στους ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο καθώς και στους ασθενείς σε αιμοκάθαρση οφείλεται, σύμφωνα με μελέτες στη μεταβολική οξέωση⁽⁶⁷⁾. Η μεταβολική οξέωση προκύπτει από τη μειωμένη απέκκριση ιόντων υδρογόνου που προέρχονται κυρίως από τον καταβολισμό αμινοξέων με υδροθειομάδες (-SH). Για τη διόρθωσή της χρησιμοποιούνται κυρίως ρυθμιστικά διαλύματα διττανθρακικών. Στη χρόνια νεφρική νόσο, η παρουσία μεταβολικής οξέωσης φαίνεται να είναι η αιτία του αυξημένου καταβολισμού των μυϊκών πρωτεϊνών⁽⁶⁹⁾. Ωστόσο, η διόρθωσή της με διττανθρακικά οδηγεί στη μείωση της πρωτεόλυσης⁽⁶⁸⁾.

Παρά την αυξημένη πρωτεόλυση, στους ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο και μεταβολική οξέωση, η ενδομυϊκή συγκέντρωση των BCAAs⁽⁷²⁾ καθώς και η μεταπορροφητική συγκέντρωσή τους στο πλάσμα είναι μειωμένη, ενώ η διόρθωση της μεταβολικής οξέωσης επάγει μια αύξηση στα επίπεδά τους^(2,75). Επιπλέον, η συγκέντρωση πλάσματος νηστείας των BCAAs και ιδιαίτερα της βαλίνης έχει βρεθεί μειωμένη στους ασθενείς αυτούς σε σύγκριση με τους υγιείς⁽⁷²⁾ γεγονός που φαίνεται ότι σχετίζεται με το φλεβικό pH⁽⁷⁰⁾.

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι και στους ασθενείς σε αιμοκάθαρση, όπου τα επίπεδα πλάσματος νηστείας των BCAAs ανευρίσκονται μειωμένα⁽⁷¹⁾, η διόρθωση της μεταβολικής οξέωσης με όξινο ανθρακικό νάτριο επάγει αύξηση στα επίπεδά τους, εν αντιθέσει με τη χορήγηση χλωριούχου νατρίου όπου δεν παρατηρείται κάποια αλλαγή⁽⁷⁰⁾.

Επιπλέον, στα παιδιά με ουραιμικό σύνδρομο παρατηρείται μειωμένη συγκέντρωση βαλίνης και ισολευκίνης στα ερυθροκύτταρα⁽⁷²⁾, γεγονός που φαίνεται να οφείλεται στη μειωμένη απελευθέρωση των BCAAs στην κυκλοφορία του αίματος τόσο από τους νεφρούς όσο και από τους σκελετικούς μύες⁽²⁾.

Τέλος, στους ασθενείς με νεφρική νόσο και σε αιμοκάθαρση παρατηρούνται μειωμένα επίπεδα στο πλάσμα των α-κετοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας^(74,76). Συγκεκριμένα, μελέτες που διεξήχθησαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό της λευκίνης και του α-κετοϊσοκαπροϊκού (προϊόν τρυσάμινωσης της λευκίνης), στο πλάσμα των ασθενών αυτών υποστηρίζουν ότι τα χαμηλά επίπεδα των δύο αυτών μεταβολιτών πιθανά συνδέονται με αυξημένη οξείδωση της λευκίνης στους νεφρούς⁽⁷⁷⁾.

1.3.4.2 BCAAs και ηπατική νόσος

Το ήπαρ συμβάλλει στην ομοιοστασία του οργανισμού, αφού εμπλέκεται στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπιδίων, των πρωτεϊνών, των ορμονών, των θρεπτικών ουσιών, των φαρμάκων και των τοξινών. Νοσήματα του ήπατος όπως η αλκοολική και μη αλκοολική λιπώδη διήθηση, η στεατοηπατίτιδα, οι ιογενείς ηπατίτιδες και ο ηπατοκυτταρικός καρκίνος έχουν μελετηθεί με σκοπό την ανάδειξη καινούργιων βιοδεικτών. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, γίνεται ποσοτικός προσδιορισμός των BCAAs σε ασθενείς με δύο αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος, την Αυτοάνοση Ηπατίτιδα (ΑΗ) και την Πρωτοπαθή Χολική Κίρρωση (ΠΧΚ).

Η αυτοάνοση ηπατίτιδα (ΑΗ) είναι χρόνια νόσος άγνωστης αιτιολογίας, η οποία προκαλείται από ανοσολογική αντίδραση. Πιθανά, η έναρξή της σχετίζεται με την έκθεση γενετικά προδιατεθειμένων ατόμων σε εκλυτικούς παράγοντες (μικρόβια, ιοί, ξενοβιοτικά).

Τα ευρήματα των ορολογικών εξετάσεων έχουν ιδιαίτερη διαγνωστική αξία και χρησιμεύουν για τη διάκριση της αυτοάνοσης ηπατίτιδας σε δύο μεγάλες κατηγορίες: 1) στην αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 1, όπου ανιχνεύονται αντισώματα εναντίον των λείων μυϊκών ινών (ASMA) και αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA) και 2) στην αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 2, που είναι η συχνότερη μορφή νόσου της παιδικής ηλικίας και χαρακτηρίζεται από την παρουσία αντισωμάτων έναντι των μικροσωματικών ενζύμων ήπατος/νεφρού τα οποία συμμετέχουν στο σύστημα του κυτοχρώματος P₄₅₀. Στον ορό όλων των ασθενών ανιχνεύονται αυξημένα επίπεδα IgG ανοσοσφαιρινών. Παρά την καλή ανταπόκριση στη θεραπεία με κορτικοστεροειδή, το 45% των ασθενών με νόσο τύπου 1 και πάνω από το 80% των ασθενών με νόσο τύπου 2 τελικά αναπτύσσει κίρρωση. Η αυτοάνοση ηπατίτιδα προσβάλλει κυρίως νεαρές γυναίκες και σε ποσοστό περίπου 20% των ασθενών εμφανίζουν μια μορφή νόσου η οποία παρουσιάζει επικάλυψη με την πρωτοπαθή χολική κίρρωση. Σ' αυτούς τους ασθενείς ανιχνεύονται αντιμιτοχονδριακά αντισώματα ενώ η βιοψία ήπατος αποκαλύπτει εικόνα βαριάς χολαγγειίτιδας⁽¹³⁰⁾.

Η πρωτοπαθής χολική κίρρωση (Primary Billiary Cirrosis, PBC) χαρακτηρίζεται από ανοσολογικά επαγόμενη καταστροφή μέσω και μικρών ενδοηπατικών χοληφόρων. Οι γυναίκες προσβάλλονται συχνότερα από τους άντρες και η διάγνωσή της τίθεται όταν πληρούνται δύο από τα τρία κριτήρια: χολόσταση>6 μήνες, παρουσία αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων (AMA), ιστολογικά χολαγγειίτιδα με καταστροφή μέσω/μικρών χοληφόρων. Αντιμιτοχονδριακά αντισώματα (AMA) ανιχνεύονται σε περισσότερο από το 90% των ασθενών τα οποία σύμφωνα με μελέτες στρέφονται εναντίον της E2 υπομονάδας του συμπλέγματος της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης, διυδρολιπούλο-τρανσακετυλάση. Σχεδόν όλοι οι ασθενείς τελικά αναπτύσσουν κίρρωση σε 10-15 χρόνια από την αρχική διάγνωση της νόσου⁽¹³⁰⁾.

Γενικά, η αντίσταση στην ινσουλίνη που παρατηρείται στις ηπατικές νόσους φαίνεται ότι επηρεάζει τόσο το μεταβολισμό της γλυκόζης όσο και το μεταβολισμό των BCAAs⁽²⁾. Σύμφωνα με μελέτες στους ασθενείς με ηπατική δυσλειτουργία οι συγκεντρώσεις των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας καθώς και των α-κετοξέων στο πλάσμα παρατηρούνται μειωμένες σε σχέση με τους υγιείς^(31,80). Ειδικά στην κίρρωση ανευρίσκονται υψηλά επίπεδα ινσουλίνης πλάσματος αλλά η επίδραση της ορμόνης στο μεταβολισμό των BCAAs είναι μειωμένη σε σχέση με τα controls^(78,79). Έτσι στους ασθενείς με κίρρωση παρατηρείται μειωμένη ενδομυϊκή συγκέντρωση βαλίνης και ισολευκίνης ενώ για τη λευκίνη δεν διαπιστώνεται μεταβολή των επιπέδων της⁽⁸¹⁾. Έτσι, τα χαμηλότερα επίπεδα των BCAAs στο πλάσμα των ασθενών με ηπατική νόσο φαίνεται ότι οφείλονται κυρίως στη μείωση του ρυθμού απελευθέρωσή τους σ' αυτό από τους σκελετικούς μύες⁽⁸²⁾.

Συμπερασματικά, σε αντίθεση με την παχυσαρκία και το διαβήτη και παρά την ύπαρξη αντίστασης στην ινσουλίνη τόσο η ηπατική όσο και η νεφρική νόσος χαρακτηρίζονται από μειωμένες συγκεντρώσεις των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας στο πλάσμα υποδηλώνοντας ότι τόσο τα νεφρά όσο και το ήπαρ εμπλέκονται στη διατήρηση των επιπέδων των BCAAs στην κυκλοφορία του αίματος. Συγκεκριμένα, όπως αναφέρθηκε, στη χρόνια νεφρική νόσο, η ενδομυϊκή συγκέντρωση των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας είναι μειωμένη σε σχέση με τα υγιή άτομα, ενώ στην ηπατική δυσλειτουργία παρατηρείται κυρίως μείωση στη μυϊκή συγκέντρωση βαλίνης και ισολευκίνης⁽²⁾.

1.3.4.3 BCAAs και καρκίνος

Όλο και περισσότερα ευρήματα μελετών, αποκαλύπτουν ότι ο διαβήτης τύπου 2 σχετίζεται με κίνδυνο εμφάνισης ορισμένων τύπων καρκίνου⁽⁸³⁾ όπως στο πάγκρεας, στο ήπαρ, στο ενδομήτριο, στο μαστό, στο παχύ έντερο την ουροδόχο κύστη και τα νεφρά⁽⁸⁴⁾.

Πολλοί καρκινικοί τύποι συνοδεύονται από σημαντικές αλλαγές στο μεταβολισμό των αμινοξέων εξαιτίας των απαιτήσεων του όγκου και της αλληλεπίδρασής του με τον ξενιστή⁽⁸⁵⁾. Όπως έχει αναφερθεί η απαμίνωση των BCAAs, αποτελεί σημαντική πηγή αζώτου για τη σύνθεση γλουταμίνης⁽⁸⁹⁾. Το συγκεκριμένο αμινοξύ βρίσκεται με μεγάλη συγκέντρωση στην κυκλοφορία του αίματος και χρησιμεύει ως ένα σημαντικό βιοενεργητικό υπόστρωμα για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Σύμφωνα με μελέτες, τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν αυξημένες απαιτήσεις για διαθεσιμότητα γλουταμίνης, την οποία χρησιμοποιούν για να καλύψουν τις ανάγκες πολλαπλασιασμού του όγκου. Προς αυτή την κατεύθυνση η γλουταμίνη σε συνδυασμό με τη λευκίνη συμβάλλουν στην ενεργοποίηση του mTOR και επακόλουθα των μεταγραφικών παραγόντων⁽⁸⁷⁾. Επιπλέον, η αυξημένη γλουταμινόλυση στα καρκινικά κύτταρα παρέχει σημαντικό κλάσμα NADPH που είναι απαραίτητο για τον πολλαπλασιασμό τους⁽⁹⁰⁾.

Οι ασθενείς με καρκίνο βιώνουν συχνά μια σημαντική ακούσια απώλεια βάρους συνοδευόμενη από έντονη μυϊκή εξασθένηση γνωστή ως καχεξία⁽⁸⁶⁾. Η κατάσταση αυτή χαρακτηρίζεται από αυξημένη πρωτεόλυση και εν αντιθέσει μειωμένη πρωτεϊνοσύνθεση για την τόνωση της οποίας μελετάται η χορήγηση συμπληρωμάτων BCAAs⁽⁸⁸⁾. Σύμφωνα με μελέτες στους ασθενείς αυτούς παρά την αυξημένη πρωτεόλυση, παρατηρείται μείωση των συγκεντρώσεων των BCAAs στην κυκλοφορία του αίματος⁽⁸⁸⁾. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την αύξηση του ρυθμού οξειδωσής τους καθώς ο ίδιος ο όγκος τα χρησιμοποιεί στην πρωτεϊνοσύνθεση. Επιπλέον εξαιτίας της χρόνιας φλεγμονής που παρατηρείται στην καχεξία του καρκίνου, οι κυτοκίνες διεγείρουν την ηπατική σύνθεση πρωτεϊνών οξείας φάσης επάγοντας μείωση στα επίπεδα των αμινοξέων στην κυκλοφορία του αίματος. Αυτές οι κυτοκίνες φαίνεται ότι ενεργοποιούν το σύμπλοκο της BCKDH με αποτέλεσμα την αυξημένη οξείδωση των BCAAs⁽⁸⁷⁾.

1.3.4.4 BCAAs και καρδιαγγειακή νόσος(CVD)

Ο όρος «καρδιαγγειακή νόσος» περιλαμβάνει όλες τις παθολογικές μεταβολές που αφορούν την καρδιά και/ή τα αιμοφόρα αγγεία. Τα στατιστικά στοιχεία που σχετίζονται με τον επιπολασμό της νόσου εμφανίζονται δυσοίωνα σε παγκόσμιο επίπεδο καθώς αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου στις αναπτυσσόμενες χώρες. Αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου παρουσιάζουν οι ασθενείς με διαβήτη τύπου 2⁽⁹¹⁾. Μέχρι και σήμερα, οι εντατικές θεραπείες για τη μείωση των επιπέδων της γλυκόζης στο διαβήτη, δεν έχουν καταφέρει να εξαλείψουν τον κίνδυνο καρδιαγγειακών συμβαμάτων⁽⁹²⁾.

Όπως έχει αναφερθεί η αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης συνδέεται με παθολογικές καταστάσεις όπως ο διαβήτης τύπου 2. Σύμφωνα με μελέτες, τα αυξημένα επίπεδα αμινοξέων επάγουν άμεσα αντίσταση στην ινσουλίνη μέσω της ενεργοποίησης σηματοδοτικών μονοπατιών (mTOR, JUN, IRS1) στους σκελετικούς μύες^(95,96). Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τη μελέτη MDC Cardiovascular Cohort (MDC-CC)⁽⁹⁴⁾, τα αυξημένα επίπεδα στο πλάσμα τριών αμινοξέων, ισολευκίνης, τυροσίνης και φαινυλαλανίνης (τα επίπεδα αυτών αποτελούν το DM-AA score ή βαθμολογία DM-AA) συνδέονται όχι μόνο με τον κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη⁽⁹³⁾ αλλά και καρδιαγγειακής νόσου. Ειδικότερα στη μελέτη αυτή βρέθηκε θετική συσχέτιση του DM-AA score με την παρουσία υποκλινικής καρωτιδικής αθηροσκλήρωσης η ύπαρξη της οποίας επιβεβαιώθηκε και από το αυξημένο πάχος έσω-μέσου χιτώνα της καρωτίδας.

Επιπλέον, εξετάστηκε αν η διατροφική πρόσληψη πρωτεΐνης, κυρίως μέσω της αυξημένης κατανάλωσης γαλακτοκομικών προϊόντων, επιφέρει διαφοροποίηση στα επίπεδα των τριών αυτών αμινοξέων και επακόλουθα μείωση του κινδύνου καρδιαγγειακής νόσου. Ωστόσο, ενώ έχει προταθεί ότι η συχνή κατανάλωση γάλακτος μειώνει την εμφάνιση διαβήτη και CVD, στην παρούσα μελέτη υπήρξε αρνητική συσχέτιση του DM-AA score με την κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων⁽⁹⁷⁾.

Συμπερασματικά, τα ευρήματα αυτής της μελέτης δείχνουν ότι τα επίπεδα ισολευκίνης, τυροσίνης και φαινυλαλανίνης πλάσματος νηστείας, συνδέονται με την εμφάνιση διαβήτη και καρδιαγγειακών επεισοδίων πιθανά μέσω της αυξημένης τάσης για αθηροσκλήρωση. Επιπλέον, φαίνεται ότι το DM-AA score σχετίζεται με την επαγόμενη από άσκηση ισχαιμίας του μυοκαρδίου σε μια υψηλού κινδύνου ομάδα που υποβάλλεται σε τεστ κοπώσεως⁽⁹³⁾.

Μία άλλη μελέτη, PREDIMED (Prevenzion con Dieta Mediterranea)⁽⁹⁸⁾, έδειξε ότι υψηλές συγκεντρώσεις BCAAs σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο CVD και με εγκεφαλικά επεισόδια. Συγκεκριμένα φάνηκε ότι η αύξηση των επιπέδων των BCAAs στην κυκλοφορία του αίματος οφείλεται εν μέρει σε μια συσχετιζόμενη με την παχυσαρκία μείωση του καταβολισμού τους στο λιπώδη ιστό⁽⁹⁹⁾. Σαν συνέπεια ο διαταραγμένος καταβολισμός των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας οδηγεί σε συσσώρευση τόσο των ίδιων όσο και των ενδιάμεσων προϊόντων τους στο πλάσμα, προκαλώντας τελικά οξειδωτικό στρες⁽¹⁰⁰⁾. Ειδικά η λευκίνη μπορεί να συμβάλλει στην αναστολή της σύνθεσης NO σε ενδοθηλιακά κύτταρα και αυτή η μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα του NO, προκαλεί την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία⁽¹⁰¹⁾. Επιπλέον υψηλά επίπεδα BCAAs οδηγούν σε αυξημένη δραστηριότητα του mTOR, με αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση του μεταβολισμού πρωτεϊνών, λιπιδίων, νουκλεοτιδίων καθώς επίσης και διαταραχή της ρύθμισης αυτοφαγίας της καρδιάς⁽¹⁰⁰⁾. Η αυτοφαγία αποτελεί βασική κυτταρική λειτουργία για τη διατήρηση της καρδιαγγειακής ομοιόστασης, ωστόσο η ενεργοποίηση του mTOR φαίνεται ότι την καταστέλλει.

Όσον αφορά τη συσχέτιση των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας με τα εγκεφαλικά επεισόδια, διαπιστώθηκε ότι αυξημένες συγκεντρώσεις των BCAAs στο πλάσμα οδηγούν σε αυξημένη εισροή τους στον εγκέφαλο, με επακόλουθη μείωση των αρωματικών αμινοξέων, γεγονός που μπορεί να προκαλεί ορμονικές διαταραχές και αύξηση της αρτηριακής πίεσης⁽¹⁰²⁾.

Τέλος, στη μελέτη αυτή φάνηκε ότι η υιοθέτηση μιας μεσογειακού τύπου δίαιτας εμπλουτισμένη σε ξηρούς καρπούς ασκεί καρδιοπροστατευτική δράση, η οποία όμως δε φαίνεται να οφείλεται στη μεταβολή των επιπέδων των BCAAs⁽⁹⁸⁾. Πιθανή εξήγηση για την αντιαθηρογόνο δράση των ξηρών καρπών που είναι πλούσιοι σε αργινίνη, αποτελεί ο ρόλος του συγκεκριμένου αμινοξέος ως πρόδρομο μόριο της σύνθεσης μονοξειδίου του αζώτου, για την εύρυθμη λειτουργία του ενδοθηλίου.

1.3.4.5 BCAAs και επιληψία

Το γλουταμινικό είναι ο κυριότερος διεγερτικός νευροδιαβιβαστής του εγκεφάλου⁽¹⁰³⁾. Ωστόσο, η παρουσία του σε μεγάλες ποσότητες έχει βλαβερή επίδραση στα νευρικά κύτταρα, οδηγώντας σε νοσήματα του νευρικού συστήματος. Υπερβολική διέγερση των υποδοχέων του μπορεί να προκαλέσει καταστροφή των νευρώνων, ιδιαίτερα υπό συνθήκες ενεργειακής ένδειας και αυξημένου οξειδωτικού stress, οδηγώντας στην επιληπτογένεση⁽¹⁰⁵⁾. Έτσι, ο εγκέφαλος θα πρέπει να εξασφαλίζει μία σταθερή παροχή γλουταμινικού προς τους νευρώνες και παράλληλα να διατηρεί χαμηλή τη συγκέντρωσή του στον ενδοσυναπτικό χώρο⁽¹⁰⁴⁾. Προς αυτή την κατεύθυνση, τα BCAAs και κυρίως η λευκίνη, συμβάλλουν με τρεις τρόπους:

1. λειτουργώντας ως δότες των αμινοομάδων στον κύκλο γλουταμινικού-γλουταμίνης. Η παρουσία της κυτταροπλασματικής αμινοτρανσφοράσης των BCAAs (BCATc) στους γλουταμινεργικούς και στους GABAνεργικούς νευρώνες, επιβεβαιώνει τον ρόλο των BCAAs ως δότες αζώτου για τη σύνθεση του γλουταμινικού και τη χρησιμοποίησή του ως νευροδιαβιβαστή και ως πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση γλουταμίνης⁽¹⁰⁶⁾. Συμμετέχοντας στον κύκλο αυτό τα BCAAs συμβάλλουν στη διατήρηση χαμηλής της συγκέντρωσης του γλουταμινικού στον ενδοσυναπτικό χώρο.

2. με την συμμετοχή της λευκίνης στον κύκλο λευκίνης-γλουταμινικού συμβάλλουν στη συνεχόμενη ανταλλαγή αμινομάδων μεταξύ νευρώνων και αστροκυττάρων διατηρώντας έτσι τα αποθέματα γλουταμινικού στον εγκέφαλο.
3. ενεργοποιώντας τη γλουταμινική δεϋδρογονάση (GDH) αυξάνουν την μετατροπή της περίσσειας του γλουταμινικού σε α-κετογλουταρικό συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση σταθερών των επιπέδων του γλουταμινικού στον εγκέφαλο^{106}.

Η αντιεπιληπτική δράση των BCAAs σχετίζεται και με τον ρόλο τους ως δότες αζώτου στον εγκέφαλο για την παραγωγή αμμωνίας. Η αύξηση της αμμωνίας επηρεάζει την διεγερσιμότητα των εγκεφαλικών κυττάρων, προκαλώντας αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης K^+ in vivo. Τα BCAAs αυξάνοντας την παραγωγή αμμωνίας ενισχύουν την αντιεπιληπτική της δράση^{107}.

1.4 Αναγκαιότητα ποσοτικοποίησης των BCAAs

Από τα παραπάνω καθίσταται σαφής ο σημαντικός ρόλος των BCAAs, ως πιθανοί βιοδείκτες του μεταβολικού συνδρόμου και η εμπλοκή τους κυρίως μέσω του μεταβολισμού τους καθώς και μέσω κρίσιμων σηματοδοτικών μονοπατιών σε νοσολογικές καταστάσεις.

Σύμφωνα με μελέτες τα επίπεδα των BCAAs στην κυκλοφορία του αίματος ανευρίσκονται αυξημένα σε ασθένειες όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 και η καρδιαγγειακή νόσος. Στις ασθένειες αυτές διερευνάται η πιθανή προγνωστική τους αξία. Αντίθετα στη νεφρική και ηπατική δυσλειτουργία παρά την ύπαρξη αντίστασης στην ινσουλίνη, τα επίπεδα των BCAAs στην κυκλοφορία του αίματος εντοπίζονται μειωμένα, γεγονός που υποδηλώνει ότι στις νόσους αυτές εμπλέκονται με διαφορετικό μηχανισμό.

Οστόσο, πρέπει να τονιστεί και ο ευεργετικός ρόλος των BCAAs. Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν ότι τα BCAAs που προέρχονται από διατροφή πλούσια σε πρωτεΐνες, έχουν θετική επίδραση στην ενεργειακή ομοιόσταση και στο αίσθημα κορεσμού. Στη γαστρεντερική οδό και στο λιπώδη ιστό τα BCAAs και ιδιαίτερα η λευκίνη επηρεάζουν την έκκριση ορμονών (λεπτίνη, γκρελίνη) οι οποίες ρυθμίζουν την ενεργειακή πρόσληψη^{114,115,116}. Επιπλέον, η λευκίνη φαίνεται να επηρεάζει τη λειτουργία του υποθαλάμου και του στελέχους του εγκεφάλου που συνδέεται με το αίσθημα κορεσμού^{113}.

Σε κάποιες περιπτώσεις συνίσταται η χορήγηση των BCAAs για θεραπευτικούς σκοπούς. Για παράδειγμα στην ηπατική και τη νεφρική δυσλειτουργία^{108}, αυξάνεται η είσοδος των αρωματικών αμινοξέων στον εγκέφαλο και η παραγωγή σεροτονίνης, ντοπαμίνης και νορεπινεφρίνης, ενώ ελαττώνεται η είσοδος των BCAAs. Αυτές οι βιοχημικές μεταβολές συνδέονται με την ανάπτυξη της ηπατικής και ουραιμικής εγκεφαλοπάθειας κατάσταση στην οποία συστήνεται θεραπευτικά η χορήγηση των BCAAs.

Τέλος σε άλλες καταστάσεις όπως στην καχεξία του καρκίνου, αλλά και στη φυσιολογική γήρανση με την έντονη σαρκοπενία, μελετάται η χρήση των συμπληρωμάτων BCAAs για τόνωση της πρωτεϊνοσύνθεσης. Στους ηλικιωμένους, όπου η δράση της λευκίνης στη ρύθμιση του μεταβολισμού των μυϊκών πρωτεϊνών είναι εξασθενημένη σε σχέση με τα νεαρά άτομα, αυξάνονται οι απαιτήσεις σε λευκίνη^{109,110}. Τα BCAAs και ιδιαίτερα η λευκίνη σε επιθυμητές συγκεντρώσεις φαίνεται ότι συμβάλλουν στη μείωση της πρωτεόλυσης και αντίθετα ενισχύουν την πρωτεϊνοσύνθεση στο μυϊκό ιστό^{117}.

Γι' αυτούς τους λόγους κρίνεται σημαντική η εύρεση αξιόπιστης και επαναλήψιμης μεθόδου για τον προσδιορισμό των BCAAs στον ορό του αίματος.

1.5 Ποσοτικοποίηση των BCAAs στον ορό του αίματος

Ο καθιερωμένος ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας γίνεται με τεχνικές υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)⁽¹¹¹⁾. Κυρίως χρησιμοποιείται στήλη αντίστροφης φάσης και ανιχνευτής φθορισμού⁽¹¹⁸⁾. Πρόσφατα, έχουν αναπτυχθεί και άλλες μέθοδοι για την ποσοτικοποίηση των BCAAs, όπως υγρή χρωματογραφία/ φασματοσκοπία μάζας (LC-MS/MS) καθώς επίσης και τεχνικές βασιζόμενες στον Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό (NMR)⁽¹¹⁹⁾. Στην παρούσα μελέτη η ποσοτικοποίηση των BCAAs θα γίνει με τεχνικές NMR.

1.5.1 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

1.5.1.1 Κλασική-Κβαντομηχανική προσέγγιση

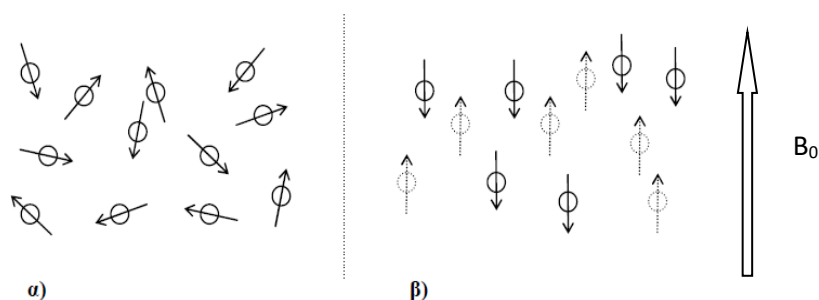
Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear magnetic resonance) (NMR) βασίζεται στη διέγερση μαγνητικών πυρήνων που βρίσκονται σε ισχυρό και ομογενές μαγνητικό πεδίο. Ο πυρήνας των ατόμων παρουσιάζει δύο φαινόμενα: το πυρηνικό spin (nuclear spin) και τη στροφορμή (angular momentum) που είναι το αποτέλεσμα της περιστροφής γύρω από τον άξονά του.

Το πυρηνικό spin είναι η συνιστώσα των spin των πρωτονίων και των νετρονίων του πυρήνα, μετριέται σε πολλαπλάσια του $h/2\pi$ (όπου h η σταθερά του Planck) και χαρακτηρίζεται από τον κβαντικό αριθμό πυρηνικού spin I ($I=0,1/2,1,3/2\dots$). Επειδή ο πυρήνας είναι φορτισμένος, η περιστροφή γύρω από τον άξονά του δημιουργεί ένα μαγνητικό δίπολο, του οποίου το μέγεθος εκφράζεται από την πυρηνική μαγνητική ροπή μ :

$$\mu = \frac{\gamma I h}{2\pi}$$

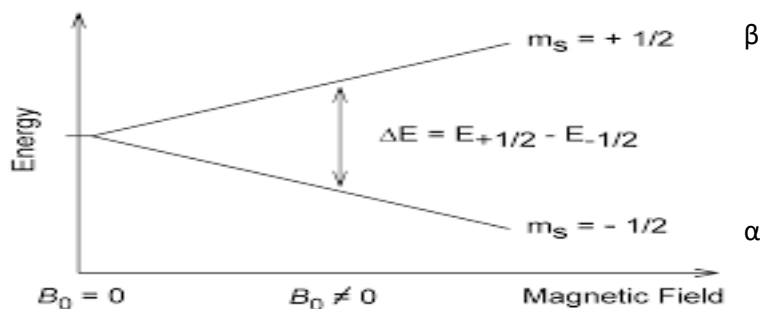
όπου γ είναι μια σταθερά αναλογίας, που καλείται γυρομαγνητικός λόγος και είναι χαρακτηριστικός για κάθε πυρήνα.

Εκτός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου τα διανύσματα των μαγνητικών ροπών μ του πυρήνα μπορεί να έχουν οποιοδήποτε προσανατολισμό (εκφυλισμένη κατάσταση). Εντός όμως ομογενούς εξωτερικού μαγνητικού πεδίου B_0 , οι προσανατολισμοί των ανυσμάτων μ ως προς αυτό είναι ορισμένοι (**εικ.12**), ο δε αριθμός τους είναι ίσος με $(2I+1)$.



Εικόνα 12 : Προσανατολισμός των διανυσμάτων των πυρηνικών μαγνητικών διπολικών ροπών μ . α) απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, β) παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου.

Εάν πυρήνες υδρογόνου, $I = 1/2$, τεθούν σε μαγνητικό πεδίο, το άνυσμα του spin της στροφικής τους ορμής έχει δύο προσανατολισμούς σε σχέση με τη διεύθυνση του εξωτερικού πεδίου. Ο παράλληλος προσανατολισμός με $I=+1/2$, που συμβολίζεται με α (**εικ. 13**) αποτελεί τη βασική στάθμη ενέργειας ενώ ο αντιπαράλληλος προσανατολισμός με $I=-1/2$ που συμβολίζεται με β , τη διεγερμένη.



Εικόνα 13 : Στάθμες ενέργειας πυρήνα ^1H σε μαγνητικό πεδίο

Η ενέργεια κάθε προσανατολισμού (ενεργειακή στάθμη) δίνεται από τη σχέση :

$$E = -\frac{h}{2\pi} \gamma \cdot B_0 I$$

ενώ για τη διαφορά ενέργειας ΔE ισχύει :

$$\Delta E = h \cdot \nu = \frac{h}{2\pi} \gamma \cdot B_0 \quad (1)$$

όπου γ ο γυρομαγνητικός λόγος του πυρήνα και B_0 η ένταση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου.

Επομένως αν σε πυρήνες υδρογόνου εντός μαγνητικού πεδίου επιδράσει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία συχνότητας ν , επέρχεται συντονισμός με απορρόφηση ενέργειας. Η διαφορά ενέργειας ΔE που αντιστοιχεί στις διεγέρσεις των πυρήνων είναι εξαιρετικά μικρή, γι αυτό υπάρχει πολύ μικρή περίσσεια πυρήνων που βρίσκονται στη βασική κατάσταση $N_{1/2}$ σε σχέση με τη διεγερμένη $N_{-1/2}$. Ο λόγος $N_{-1/2} / N_{1/2}$ καθορίζεται από την κατανομή Boltzmann :

$$\frac{N_{-1/2}}{N_{+1/2}} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} = e^{-\frac{2\mu\pi B_0}{kT}}$$

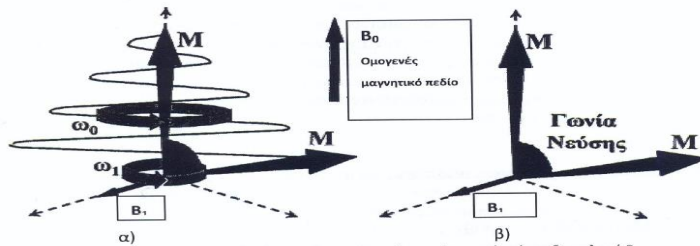
όπου k η σταθερά Boltzmann και T η απόλυτη θερμοκρασία. Η διαφορά $N_{1/2} - N_{-1/2}$ παρόλο που είναι πολύ μικρή είναι ικανή για την εμφάνιση του σήματος συντονισμού. Εξαιτίας του μη ευνοϊκού παράγοντα Boltzmann, η φασματοσκοπία NMR έχει πολύ μικρότερη ευαισθησία σε σχέση με τις άλλες φασματοσκοπικές μεθόδους.

1.5.1.2 Αλληλεπίδραση πυρηνικών στροφορμών με μεταβαλλόμενο μαγνητικό πεδίο

Το NMR είναι ένα φαινόμενο διπλού χρόνου. Στον πρώτο χρόνο οι πυρήνες των ατόμων (δέκτες) διεγείρονται κατά την αλληλεπίδραση τους με παλμούς ραδιοσυχνότητας από το πηνίο εκπομπής (πομπός). Στο δεύτερο χρόνο οι ίδιοι πυρήνες, λειτουργώντας ως πομποί, αποδιεγείρονται κατά την αλληλεπίδρασή τους με το γειτονικό μοριακό τους περιβάλλον, εκπέμποντας ενέργεια με τη μορφή ραδιοσυχνότητας που λαμβάνεται από το πηνίο λήψης (δέκτης). Το σήμα καταγράφεται στη διάρκεια του 2ου χρόνου, δηλαδή κατά την αποδιέγερση των πυρήνων από τη διεγερμένη κατάσταση στην κατάσταση θερμοδυναμικής ισορροπίας (Θ. Ι.).

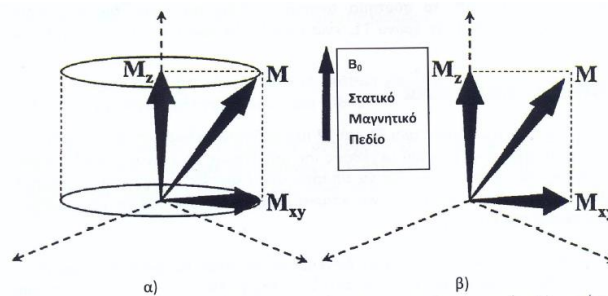
Πρώτος χρόνος – Διέγερση πυρήνων. Η διέγερση όλων των μαγνητικών πυρήνων επιτυγχάνεται συγχρόνως με τη χρήση ραδιοπαλμών, δηλαδή χρονικά μεταβαλλόμενων μαγνητικών πεδίων B_1 , πολύ μικρότερης έντασης από το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο B_0 κατά μήκος του άξονα x , όπου θεωρείται ότι βρίσκεται συμβατικά το πηνίο ραδιοσυχνοτήτων.

Τότε στο σταθερό σύστημα αναφοράς, το διάνυσμα της μαγνήτισης M , εκτελεί μια αργή μεταπτωτική κίνηση γύρω από τον άξονα εφαρμογής του B_1 με γωνιακή ταχύτητα $\omega_1 = \gamma B_1$, ενώ γίνεται παράλληλα και μια επιπλέον εκτροπή του άξονα μετάπτωσης των ισοχρωματικών συνιστωσών M_c (εικ.14α). Με τον όρο ισοχρωματικές συνιστώσες M_c αναφέρονται οι επιμέρους ομάδες των μ που προέρχονται από μικροσκοπικούς όγκους του υλικού. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται νεύση και αν t_p είναι η χρονική διάρκεια εφαρμογής του B_1 και ν_1 η συχνότητα μετάπτωσης του M γύρω από το B_1 , τότε η αντίστοιχη γωνία νέυσης η του M θα είναι: $\omega_1 = \gamma B_1 = \eta/t_p \rightarrow \eta = \gamma B_1 t_p$. Στο περιστρεφόμενο σύστημα αναφοράς το διάνυσμα της μαγνήτισης παριστάνεται ως στάσιμο (εικ.14β).



Εικόνα 14 : Νεύση του διανύσματος της ολικής μαγνήτισης M μετά την εφαρμογή ενός ραδιοπαλμού B_1 . α) σταθερό, β) περιστρεφόμενο σύστημα αναφοράς.

Δεύτερος χρόνος – αποδιέγερση πυρήνων : Όταν σταματήσει η εφαρμογή του ραδιοπαλμού το σύστημα των πυρηνικών στροφορμών επιστρέφει από τη διεγερμένη κατάσταση στην κατάσταση θερμοδυναμικής ισορροπίας ($\Theta.I$), φαινόμενο που χαρακτηρίζεται ως μαγνητική αποκατάσταση. Σε μια τυχαία χρονική στιγμή της μαγνητικής αποκατάστασης το διάνυσμα M αναλύεται σε δύο συνιστώσες M_z και M_{xy} σε σχέση με τον άξονα εφαρμογής του B_0 , οι οποίες καλούνται αντίστοιχα διαμήκης και εγκάρσια (εικ.15). Η καθεμία από αυτές τις δύο συνιστώσες μεταβάλλονται με διαφορετικούς ρυθμούς και έτσι η μαγνητική αποκατάσταση χαρακτηρίζεται από δύο χρονικές παραμέτρους που καλούνται αντίστοιχα χρόνοι μαγνητικής αποκατάστασης T_1 και T_2 . Ο χρόνος T_1 περιγράφει τη συμπεριφορά της διαμήκους μαγνητικής αποκατάστασης M_z , ενώ ο T_2 τη συμπεριφορά της εγκάρσιας μαγνητικής αποκατάστασης M_{xy} και ονομάζονται αντίστοιχα χρόνοι διαμήκους και εγκάρσιας μαγνητικής αποκατάστασης.



Εικόνα 15 : Η πυρηνική μαγνήτιση M , η διαμήκης συνιστώσα M_z και η εγκάρσια συνιστώσα M_{xy} μετά την εφαρμογή ραδιοπαλμού 90° και πριν την αποκατάσταση $\Theta. I$. α) σταθερό, β) περιστρεφόμενο σύστημα αναφοράς

1.5.1.3 Αποκατάσταση ισορροπίας ενεργειακών καταστάσεων. Spin- πλέγμα και spin-spin χρόνοι αποκατάστασης.

Για να αποκατασταθεί ένα διεγερμένο σύστημα πυρήνων πρέπει να αλληλεπιδράσει μαγνητικά με το γειτονικό του περιβάλλον. Γι' αυτό είναι απαραίτητη η παρουσία πεδίων ραδιοσυχνότητας που εξαναγκάζουν αυτή την αποκατάσταση. Τα πεδία

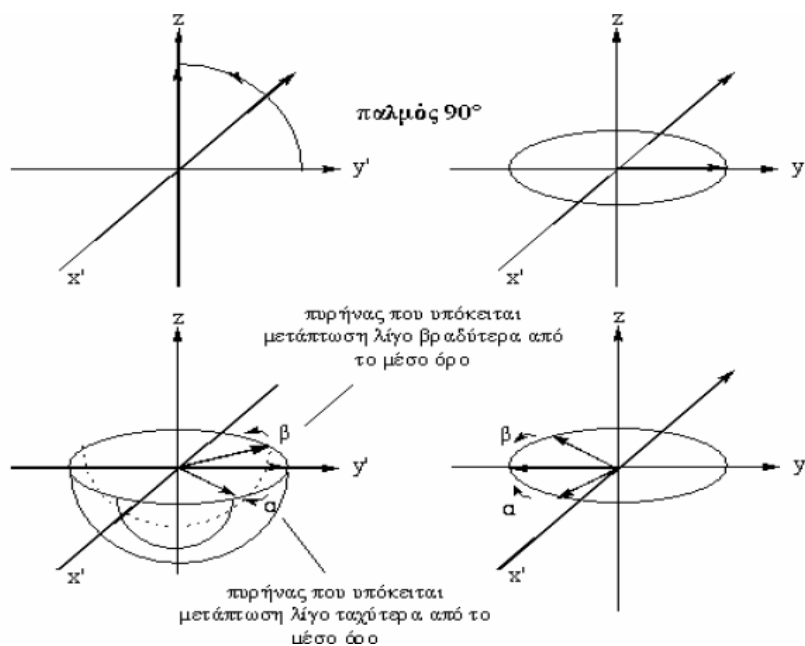
αυτά οφείλονται κατά κύριο λόγο στη σύζευξη των μαγνητικών διπολικών ροπών των γειτονικών πυρήνων και είναι υπεύθυνα τόσο για διαδικασίες T1 όσο και για διαδικασίες T2.

Ο χρόνος T1 χαρακτηρίζει το μηχανισμό spin-πλέγματος και ο χρόνος T2 το μηχανισμό spin-spin. Η αποκατάσταση spin- πλέγματος οφείλεται στην αλληλεπίδραση του διπόλου του πυρηνικού spin με τυχαία ταλαντούμενα μαγνητικά πεδία και προκαλεί διεύρυνση ή πλάτυνση των φασματικών ταινιών στα φάσματα του NMR. Η αποκατάσταση spin-spin οφείλεται στην αλληλεπίδραση ομοειδών πυρήνων γειτονικών μεταξύ τους που ανταλλάσσουν ενέργεια και ο μηχανισμός αυτός δίνει τη λεγόμενη <<λεπτή υφή>> του φάσματος NMR.

1.5.1.4 Παλμική ακολουθία CPMG

Η παλμική ακολουθία CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) η αλλιώς τεχνική spin ηχώ χρησιμοποιείται για τη μερική ή πλήρη καταστολή των σημάτων συντονισμού των μακρομορίων (π.χ πρωτεϊνών). Η εξασθένηση των σημάτων των πρωτονίων των πρωτεϊνών βασίζεται στους μικρότερους χρόνους αποκατάστασης T2 αυτών σε σχέση με τους αντίστοιχους των μορίων μικρού μοριακού βάρους. Με τον τρόπο αυτό αναδεικνύεται το σήμα των τελευταίων στο φάσμα NMR.

Κατά την τεχνική αυτή εφαρμόζεται αρχικά στο σύστημα των spin ένας παλμός 90° . Όταν τα spin βρεθούν στο επίπεδο $x'y'$ αρχίζουν να χάνουν συνοχή φάσης γεγονός που οφείλεται στην ανομοιογένεια του μαγνητικού πεδίου και στη διεργασία αποκατάστασης spin- spin (**Εικ.16**). Στη συνέχεια εφαρμόζεται παλμός 180° .



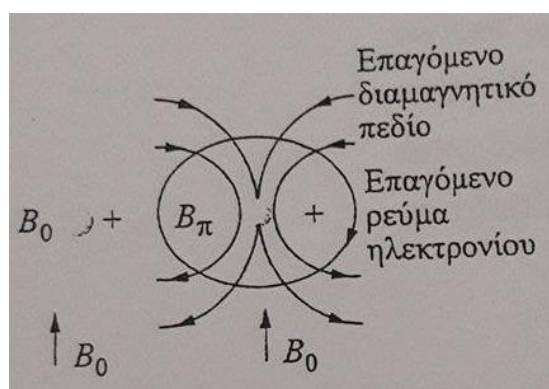
Εικόνα 16 : Σχηματική παράσταση της τεχνικής CPMG

Μετά την εφαρμογή του παλμού 180° οι συνισταμένες μαγνήτισης θα στραφούν στην αντίθετη κατεύθυνση. Όταν οι πυρήνες α και β (**Εικ.16**), υπόκεινται σε μετάπτωση με διαφορετικές ταχύτητες, μετά από χρόνο τ εφαρμογής του παλμού 180° και 2τ από την εφαρμογή του αρχικού παλμού των 90° , ο πυρήνας α θα φτάσει ταχύτερα την ολική συνισταμένη της μαγνήτισης ενώ ο πυρήνας β θα καθυστερήσει. Έτσι προκύπτει

επανεστίαση του σχηματισμού των spin ως μια ηχώ του αρχικού σχηματισμού των spin. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται με ένα δεύτερο παλμό 180°.

1.5.1.5 Χημικές μετατοπίσεις ¹H NMR, η παράμετρος δ

Η μελέτη των πυρήνων NMR είναι δυνατή από μια χαρακτηριστική παράμετρο των χημικών ουσιών που εκφράζει απόλυτα τη δομή του μορίου του δείγματος και καλείται χημική μετατόπιση (chemical shift). Όταν ένα μόριο που περιέχει τον παρατηρούμενο πυρήνα τοποθετηθεί μέσα σε ένα μαγνητικό πεδίο, τα ηλεκτρόνια του μορίου “θωρακίζουν” τους πυρήνες από το εξωτερικό πεδίο. Τα ηλεκτρόνια δηλαδή δημιουργούν επαγωγικό πεδίο αντίθετο του εφαρμοζόμενου (**Εικ.17**). Έτσι ο πυρήνας υφίσταται τη λεγόμενη ηλεκτρονική προστασία, που είναι τόσο μεγαλύτερη, όσο μεγαλύτερη είναι η ηλεκτρονική πυκνότητα γύρω από τον πυρήνα υδρογόνου.



Εικόνα 17 : Ηλεκτρονική προστασία του πυρήνα

Η ένταση του πεδίου B_π που πραγματικά εφαρμόζεται στον πυρήνα δίνεται από την εξίσωση : $B_\pi = B_0(1-\sigma)$, όπου B_0 είναι η ένταση του πεδίου που εφαρμόζεται στον ελεύθερο πυρήνα και σ είναι ο παράγοντας χημικής μετατόπισης ή η σταθερά πυρηνικής προστασίας (nuclear shielding constant). Οι τιμές της είναι της τάξης των $10^{-6} \sim 10^{-5}$.

Για τη δημιουργία κλίμακας που είναι ανεξάρτητη από την ένταση του εφαρμοζόμενου πεδίου καθορίστηκε η παράμετρος δ (ppm, parts per million) :

$$\delta = (\Delta/\Delta_0) \times 10^6$$

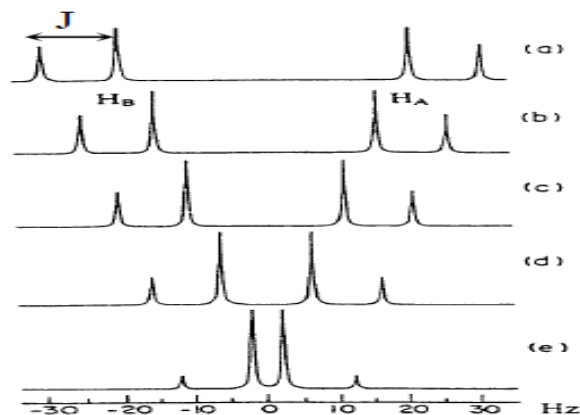
όπου Δ_0 είναι η βασική συχνότητα λειτουργίας του οργάνου NMR και Δ η διαφορά συχνότητας συντονισμού σε Hz μεταξύ του πυρήνα που μελετάται και των πρωτονίων μιας πρότυπης ένωσης.

1.5.1.6 Σταθερές Σύζευξης ¹H NMR- Πολλαπλότητα κορυφών

Τα σήματα συντονισμού πρωτονίων που γειτνιάζουν με άλλα πρωτόνια ή άλλους μαγνητικούς πυρήνες εμφανίζονται με τη μορφή πολλαπλών κορυφών που έχουν ορισμένη κανονικότητα και συμμετρία. Η πολλαπλότητα αυτή των σημάτων συντονισμού καλείται σύζευξη spin-spin (spin-spin coupling) και οφείλεται στη μέσω των δεσμών αλληλεπίδραση με τα spin των γειτονικών μαγνητικών πυρήνων. Χαρακτηριστικό των πολλαπλών κορυφών είναι ότι ισαπέχουν μεταξύ τους κατά μια σταθερά J που ονομάζεται σταθερά σύζευξης, είναι ανεξάρτητη από την ένταση του πεδίου B_0 και εκφράζεται σε Hz.

Για να ερμηνευθεί το φαινόμενο αυτό ας θεωρήσουμε δύο γειτονικούς πυρήνες υδρογόνου (H_A , H_B) μιας χημικής ένωσης. Στο φάσμα της ένωσης αντί για τις δύο θεωρητικά αναμενόμενες κορυφές συντονισμού για τα H_A και H_B , θα παρατηρούσαμε ότι εμφανίζονται τέσσερις κορυφές (**εικ.18**). Αυτό συμβαίνει διότι το αποτελεσματικό μαγνητικό πεδίο στον

πυρήνα A θα έχει μία από τις δύο δυνατές τιμές που εξαρτώνται από το κατά πόσο ο προσανατολισμός του ανύσματος της στροφικής ορμής του γειτονικού πρωτονίου B είναι παράλληλος προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο ή αντιπαράλληλος. Ως αποτέλεσμα προκύπτουν δύο φασματικές γραμμές για τον πυρήνα A και ανάλογα επηρεάζεται και ο πυρήνας B. Η διαφορά στη συχνότητα των δύο φασματικών γραμμών είναι η σταθερά σύζευξης J_{AB} .

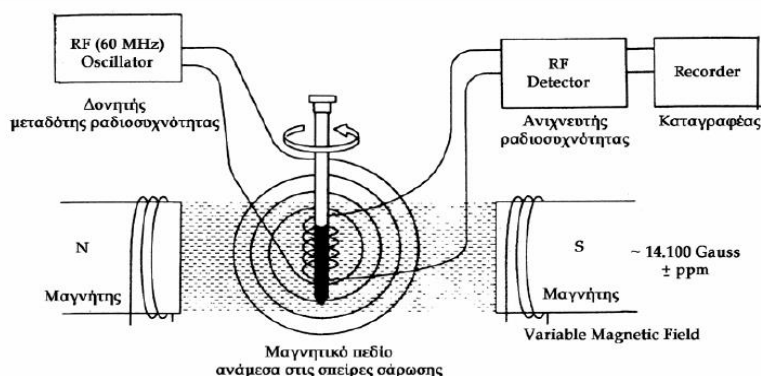


Εικόνα 18 : Φάσμα των πρωτονίων H_A και H_B σε διαφορετικής έντασης πεδία B_0 $J=10\text{Hz}$ και $J/\Delta\nu =$ α) 0.2, b) 0.25, c) 0.33, d) 0.5 και e) 1

Η τιμή της σταθεράς σύζευξης παραμένει η ίδια όποια και αν είναι η ένταση του εφαρμοζόμενου πεδίου. Επομένως η σύζευξη spin-spin μπορεί να διακριθεί από τη χημική μετατόπιση, αυξάνοντας π.χ. την ένταση του πεδίου B_0 . Στην περίπτωση αυτή οι αποστάσεις των κορυφών λόγω σύζευξης (J) παραμένουν σταθερές (Hz), ενώ οι αποστάσεις των κορυφών λόγω χημικών μετατοπίσεων ($\Delta\nu = \nu_B - \nu_A$) αυξάνουν (ppm), όπου ν_A και ν_B οι συχνότητες συντονισμού των H_A και H_B αν δεν υπήρχε η σύζευξη spin-spin, στο μέσο δηλαδή των διπλών κορυφών(εικ.18).

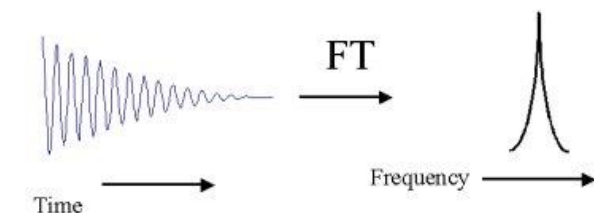
1.5.1.7 Παλμική φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier- Οργανολογία

Ο φασματογράφος NMR αποτελείται από το μαγνήτη που δημιουργεί το ομογενές σταθερό πεδίο B_0 , από το ραδιοπομπό RF που δημιουργεί το διεγείρον ηλεκτρομαγνητικό πεδίο B_1 , που είναι κάθετο προς το B_0 , καθώς και από το σύστημα ανίχνευσης, ενίσχυσης και καταγραφής του σήματος απορρόφησης κατά το συντονισμό. Όταν η συχνότητα του RF είναι ίση με τη συχνότητα συντονισμού του πυρήνα, γίνεται απορρόφηση ενέργειας που συνεπάγεται διαταραχή στη ροή του ρεύματος στο κύκλωμα του ραδιοπομπού(εικ.19).



Εικόνα 19 : Σχηματική διάταξη φασματογράφου NMR

Στην παλμική φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier οι πυρήνες διεγείρονται ταυτόχρονα με διακοπτόμενους παλμούς διάρκειας ορισμένων μs. Με τη διακοπή του παλμού τα spin αποδιεγείρονται και γίνεται καταγραφή του χρονικού σήματος στον Η/Υ. Η διεργασία παλμός-καταγραφή του χρονικού σήματος επαναλαμβάνεται μέχρι να ληφθεί φάσμα ικανοποιητικού λόγου σήματος προς θόρυβο (signal/noise S/N). Το συνολικό χρονικό σήμα μετασχηματίζεται σε φάσμα συχνοτήτων με τη μαθηματική μεθοδολογία Fourier(Εικ.20).

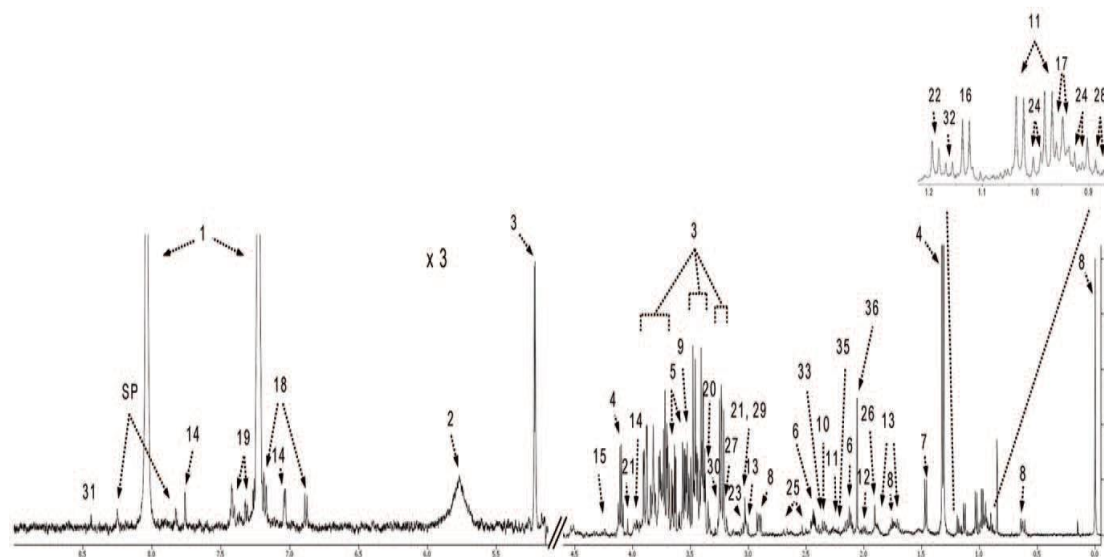


Εικόνα 20: Μετασχηματισμός Fourier του χρονικού σήματος

Για τη λήψη του φάσματος το διάλυμα της ένωσης φέρεται σε ειδικό μαγνητικά ισότροπο γυάλινο σωλήνα που περιστρέφεται γύρω από τον άξονά του για την επίτευξη καλύτερης ομοιογένειας του πεδίου. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι χημικά αδρανείς, μαγνητικά ισότροποι και να στερούνται υδρογόνων. Γι αυτό συνήθως επιλέγονται οι δευτεριωμένοι διαλύτες για να μην επέρχεται επικάλυψη των σημάτων συντονισμού από αυτά των πρωτονίων του διαλύτη.

Ως πρότυπες ενώσεις αναφοράς χρησιμοποιούνται το τετραμεθυλοπυρίτιο, $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ (TMS) ή το άλας $[\text{C}_6\text{H}_9\text{D}_4\text{NaO}_2\text{Si}]$ (TSP). Είναι ενώσεις χημικά αδρανείς, αναμειγνύονται εύκολα με τους περισσότερους οργανικούς διαλύτες και συντονίζονται σε μικρότερες συχνότητες σε σχέση με τις περισσότερες οργανικές ενώσεις. Συνήθως χρησιμοποιούνται ως εσωτερικά πρότυπα σε συγκέντρωση $<1\text{mM}$.

Από τα φάσματα NMR διαφόρων πυρήνων ξεχωρίζουν τα φάσματα πυρήνων υδρογόνου (^1H NMR) και πυρήνων άνθρακα-13 (^{13}C NMR). Ενδεικτικά με τη χρήση φασματογράφου NMR που εκπέμπει στα 500MHz, σε ορό υγιών ατόμων λαμβάνουμε το φάσμα ^1H NMR^[12] (Εικ.21).

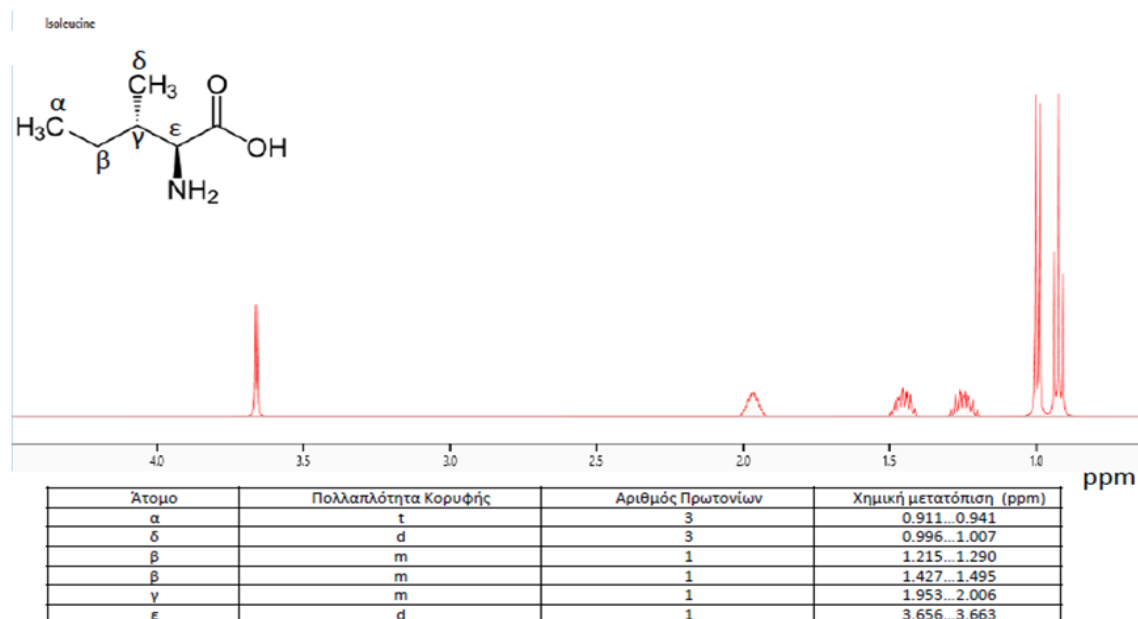
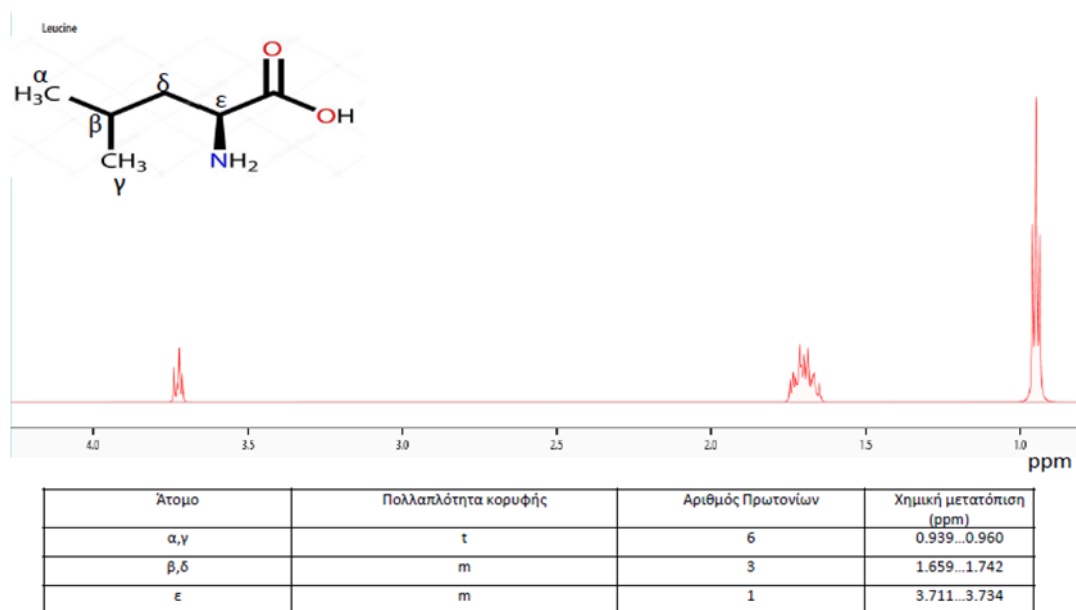


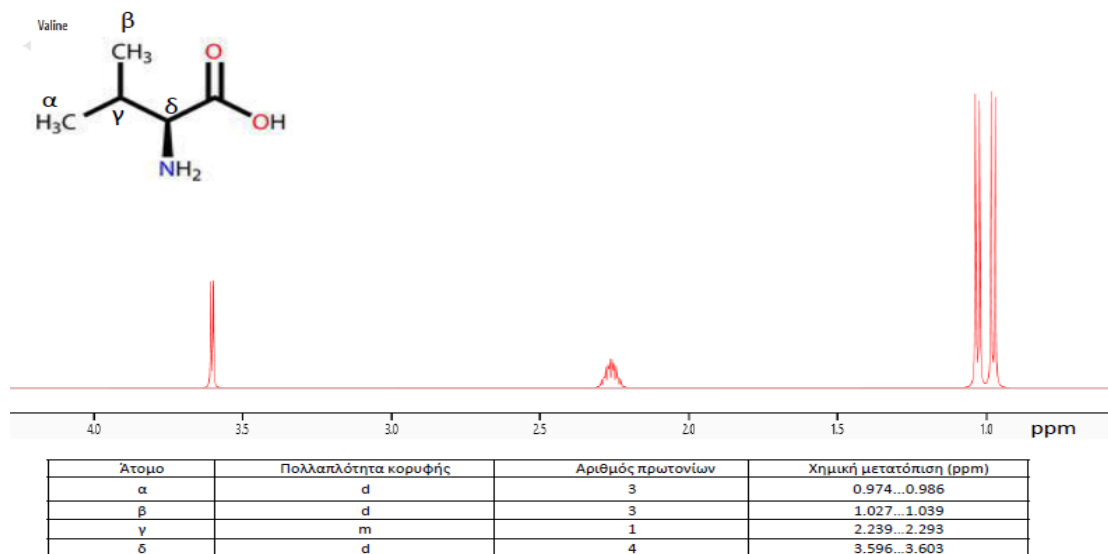
Εικόνα 21: Typical 500 MHz ^1H -NMR spectrum of healthy human serum. Numbers indicate the following metabolites: 1,imidazole; 2,urea; 3, D-glucose; 4, L-lactic acid; 5, glycerol; 6, L-glutamine; 7, L-alanine; 8, DSS; 9, glycine; 10, L-glutamic acid; 11, L-valine; 12, L-proline; 13, L-lysine; 14, L-histidine; 15, L-threonine; 16, propylene glycol; 17, L-leucine; 18, L-tyrosine; 19, L-phenylalanine; 20, methanol; 21,creatinine; 22, 3-hydroxybutyric acid;

23, ornithine; 24, L-isoleucine; 25, citric acid; 26, acetic acid 27, carnitine; 28, 2-hydroxybutyric acid; 29, creatine; 30, betaine; 31, formic acid; 32, isopropyl alcohol; 33, pyruvic acid; 34, choline; 35, acetone; 36, glycerol.

Οι κορυφές από λευκίνη, ισολευκίνη και βαλίνη εντοπίζονται χωρίς αλληλοεπικάλυψη στην περιοχή του φάσματος από 0.93-1.04 ppm. Μετά από ποσοτικοποίηση των BCAAs σε μια ομάδα υγιών ατόμων, η συγκέντρωση της λευκίνης βρέθηκε $98.7 \pm 11.5 \mu\text{M}$ (βιβλιογραφική τιμή $123 \mu\text{M}$ με εύρος (98-144)), της ισολευκίνης $60.7 \pm 18.6 \mu\text{M}$ (βιβλιογραφική τιμή $62 \mu\text{M}$ με εύρος (48-76)) και της βαλίνης $212.3 \pm 61.3 \mu\text{M}$ (βιβλιογραφική τιμή $233 \mu\text{M}$ με εύρος (190-276))⁽¹¹²⁾.

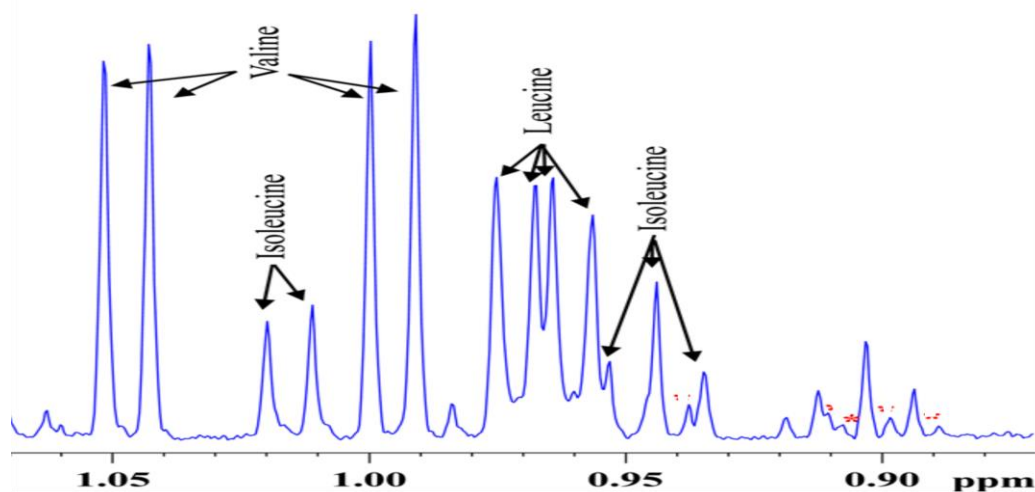
Στη συνέχεια (**Εικ.22**) παρουσιάζονται τα πρότυπα ^1H NMR φάσματα ορού των τριών αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας. Τα φάσματα αυτά προέρχονται από τη βιβλιοθήκη του προγράμματος Chenomx, η λήψη των οποίων έγινε σε φασματογράφο 500 MHz, με την ακολουθία noesy.





Εικόνα 22: Πρότυπα ^1H NMR φάσματα ορού των BCAAs

Τέλος, στην **εικόνα 23** απεικονίζονται οι χημικές μετατοπίσεις των BCAAs σε φάσμα ορού ^1H NMR 800 MHz, υγιούς ατόμου. Τα σήματα συντονισμού των συγκεκριμένων αμινοξέων εντοπίζονται χωρίς αλληλοεπικάλυψη με τα σήματα συντονισμού άλλων μεταβολιτών στην περιοχή του φάσματος από 0.93-1.04 ppm.



Εικόνα 23 : Χημική μετατόπιση των BCAAs σε φάσμα ορού ^1H NMR 800 MHz υγιούς ατόμου εστιασμένο στην περιοχή 0.90-1.05 ppm.

1.6 Σκοπός

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας, είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας στον ορό του αίματος ομάδων ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2, Πρωτοπαθή Χολική Κίρρωση και Αυτοάνοση Ηπατίτιδα. Ο προσδιορισμός θα γίνει με φασματοσκοπία NMR στην οποία θα γίνει διερεύνηση των

τεχνικών καταστολής του σήματος των μακρομορίων (λιπιδίων και πρωτεϊνών) με σκοπό την ανάδειξη του σήματος των μορίων μικρού μοριακού βάρους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πληθυσμός της μελέτης

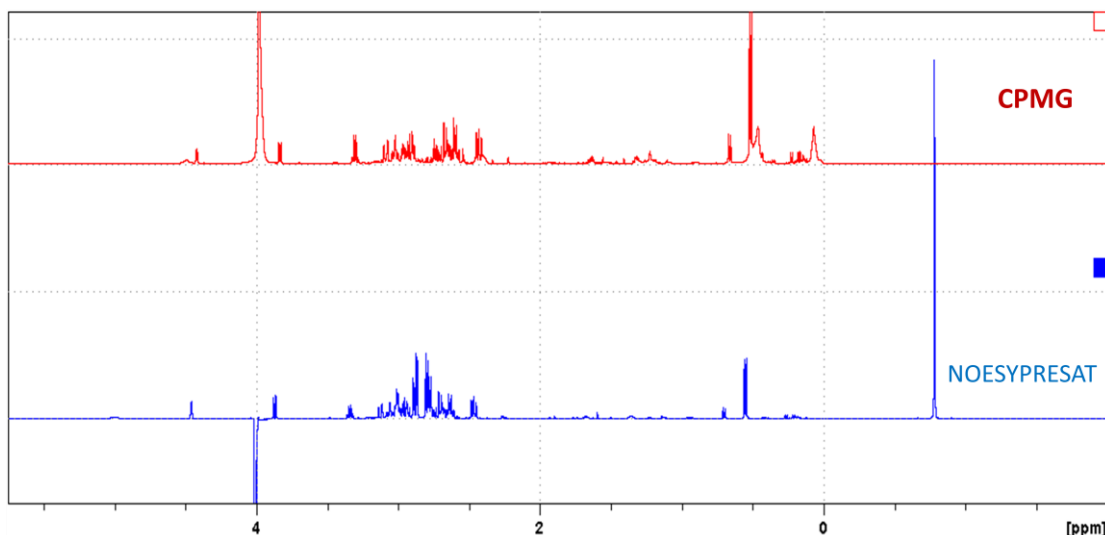
Για τη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη επιλέχθηκαν δείγματα ορού αίματος που ανήκαν σε τρεις ομάδες ασθενών: 1) 20 ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2, 2) 20 ασθενείς με Πρωτοπαθή Χολική Κίρρωση (Primary Biliary Cirrhosis, PBC), 3) 20 ασθενείς με Αυτοάνοση Ηπατίτιδα (ΑΗ). Στους ασθενείς με διαγνωσμένο Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2, οι οποίοι βρισκόταν υπό θεραπευτική αγωγή με μετφορμίνη πραγματοποιήθηκε ο καθιερωμένος βιοχημικός και αιματολογικός έλεγχος και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της γλυκωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA_{1c}). Στις άλλες δύο ομάδες ασθενών διεξήχθη επίσης βιοχημικός (γλυκόζη, ουρία, κρεατινίνη, αλβουμίνη, ολική και HDL χοληστερόλη, ηπατικά ένζυμα ορού, ανοσοσφαιρίνη γ) και αιματολογικός (αριθμός αιμοπεταλίων, χρόνος προθρομβίνης) έλεγχος και τα δείγματα αίματος ελήφθησαν πριν την έναρξη θεραπευτικής αγωγής.

2.1.1 Συλλογή και προεργασία των δειγμάτων

Από κάθε ασθενή έγινε λήψη δείγματος αίματος σε ειδικά σωληνάρια αιμοληψίας Vacutainer SST II. Αφού παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) για 15-30 min, ώστε να ολοκληρωθεί η διαδικασία της πήξης, στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 15 min στις 3000 στροφές ανά λεπτό. Ο ορός που συλλέχθηκε μεταφέρθηκε σε πλαστικά σωληνάκια και καταψύχθηκε στους -80°C μέχρι τα επόμενα στάδια της πειραματικής διαδικασίας.

2.1.2 Καταστολή του σήματος των μακρομορίων με την παλμική ακολουθία CPMG

Αρχικά, η καταγραφή του συνόλου των μεταβολιτών του ορού του αίματος στα δείγματα των ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα, έγινε με τη λήψη του φάσματος NMR εφαρμόζοντας την ακολουθία Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG). Με την τεχνική αυτή καταστέλλεται σε σημαντικό βαθμό το σήμα NMR των μακρομορίων, όπως οι πρωτεΐνες και αναδεικνύεται το σήμα των μορίων μικρού μοριακού βάρους. Εφαρμόσαμε αρχικά τη μεθοδολογία αυτή σε ένα μικρό αριθμό δειγμάτων και τη συγκρίναμε με την τεχνική απομάκρυνσης των μακρομορίων με φυγοκέντρηση με ειδικά φίλτρα με cut-off 3 KDa. Για την καταστολή του σήματος του νερού χρησιμοποιήθηκε η ακολουθία παλμού 1D, NOESYPRESAT. Όπως φαίνεται και στην **εικόνα 24**, τα σήματα συντονισμού των μελετώμενων μεταβολιτών στα φάσματα που ελήφθησαν με την ακολουθία NOESYPRESAT μετά από φυγοκέντρηση του ορού, εμφανίζουν μικρότερη αλληλοεπικάλυψη με τα σήματα άλλων μεταβολιτών. Το γεγονός αυτό φανερώνει ότι αυτή η πειραματική διαδικασία, με μικρή προεργασία του δείγματος, οδηγεί σε βελτιστοποίηση της ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας. Με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής αποφασίσαμε να τροποποιήσουμε την πειραματική διαδικασία της παρούσας μελέτης και καταγράψαμε το μεταβολικό προφίλ των δειγμάτων στο διήθημα ορού που συλλέχθηκε μετά από διήθηση.



Εικόνα 24 : Σύγκριση φασμάτων ορού ^1H NMR 500 MHz που έχουν ληφθεί με δύο διαφορετικές ακολουθίες (CPMG, NOESYPRESAT)

2.1.3 Διήθηση του ορού του αίματος

Για την απομάκρυνση των μακρομορίων με φυγοκέντρηση του ορού, χρησιμοποιήθηκαν τα φίλτρα Amicon® Ultra-2 Centrifugal Filter Devices (**εικ.25**). Με τα συγκεκριμένα φίλτρα επιτυγχάνεται ταχεία υπερδιήθηση διαλυμάτων, καθώς επιτρέπουν τη διήθηση συστατικών μεγέθους έως 3kDa. Με βάση το μοριακό βάρος των μεταβολιτών ο χρόνος διήθησης του δείγματος καθορίστηκε στα 60 min.



Εικόνα 25 : Φίλτρα Amicon Ultra-2 Centrifugal Filter Devices (for volumes up to 2 mL)

Η φυγοκέντρηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε φυγόκεντρο υψηλής ταχύτητας με ελεγχόμενη θερμοκρασία θαλάμου (Thermo Scientific SL16R) και με κεφαλή ταλαντευόμενων υποδοχέων (swinging bucket rotor).

Υλικά-Αντιδραστήρια

- ✓ Φίλτρα χωρητικότητας 2mL (Amicon Ultra-2 Centrifugal Filter Devices for volumes up to 2 mL, για διήθηση συστατικών έως 3kDa)
- ✓ Πιπέτες: 200-1000 μL , 10-100 μL (Finnipipette Thermo Labsystems)
- ✓ Απεσταγμένο Ύδωρ

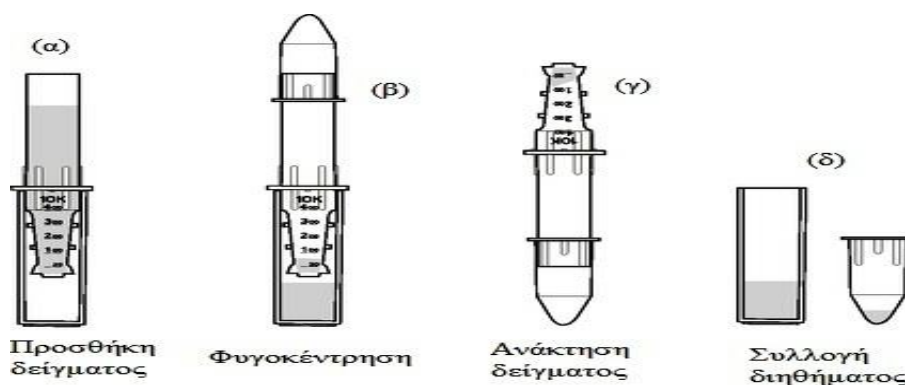
- ✓ Πλαστικά σωληνάκια Cryovials (Cryo Tube™ Vials, NUNC)

Όργανα

- ✓ Φυγόκεντρος (Thermo Scientific SL16R)

Το πειραματικό πρωτόκολλο^(120,121) που ακολουθήθηκε περιελάμβανε τα παρακάτω βήματα :

1. Πλύσιμο φίλτρων (έκπλυση) με προσθήκη 1,5mL απεσταγμένου ύδατος για να απομακρυνθούν τα ίχνη γλυκερόλης που βρίσκονται στα φίλτρα.
2. Φυγοκέντρωση στα 4000g για 1h σε θερμοκρασία δωματίου (25°C).
3. Προσθήκη 1,2 mL ορού αίματος σε κάθε φίλτρο.
4. Φυγοκέντρωση στα 4000g για 1h σε θερμοκρασία δωματίου (25°C).
5. Συλλογή ποσότητας διηθήματος περίπου 800μL σε πλαστικά σωληνάκια Cryovials (Cryo Tube™ Vials, NUNC).
6. Αποθήκευση στους -80°C. (εικ.26)



Εικόνα 26 : Βήματα χρήσης συσκευής φιλτραρίσματος δείγματος ορού

2.1.4 Προετοιμασία δειγμάτων για τη λήψη των φασμάτων ¹H NMR

Υλικά- Αντιδραστήρια

- Γυάλινα σωληνάκια NMR διαμέτρου 5 mm (Wilmad 535-PP, Sigma-Aldrich)
- Κωνικά σωληνάκια Eppendorf 1,5 mL
- Πιπέτες : 50μL, 200-1000μL (Finnipipette Thermo Labsystems)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (0.2MNa₂HPO₄/ 0.2 M NaH₂PO₄, pH 7.4. Na₂HPO₄, M=141.96 g/mol, Riedel-de Haen, NaH₂PO₄, M=156.01 g/mol, Merck)
- Διάλυμα D₂O/TSP [Δευτεριωμένο Ύδωρ (D₂O, M=20.03 g/mol, Sigma-Aldrich, βαθμού δευτερίωσης 99.9%) περιεκτικότητας 0.075% σε δευτεριωμένο άλας sodium 3-trimethylsilyl-(2,2,3,3-2H4)-1-propionate (TSP,M=172.28 g/mol, Sigma-Aldrich)]

Όργανα

- Φασματογράφος Bruker Avance DRX 500MHz
- Φυγόκεντρος Centrifuge 5415 D, Eppendorf

Αρχικά, τα αποθηκευμένα στους -80°C διηθήματα ορού παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) για την απόκτηση θερμικής ισορροπίας. Στη συνέχεια σε ποσότητα διηθήματος ορού 400μL προστίθενται 200μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών για την όσο το δυνατόν αποτελεσματικότερη ελαχιστοποίηση των μεταβολών του pH και καλύτερη σταθεροποίηση στην περιοχή 7.4 ± 0.5 ^[122]. Ακολουθεί ήπια ανάδευση στο μίγμα των 600μL, αναμονή 10min για πλήρη ανάμειξη του ορού με το ρυθμιστικό διάλυμα και εν συνεχεία φυγοκέντρηση (Centrifuge 5415 D, Eppendorf) σε 8000 στροφές/λεπτό για 5 min για την απομάκρυνση τυχόν ιζημάτων^[123]. Μεταφορά κατόπιν 500μL από το διαυγές υπερκείμενο σε γυάλινο σωληνάριο NMR διαμέτρου 5mm και προσθήκη 50μL διαλύματος $\text{D}_2\text{O}/\text{TSP}$. Το D_2O προστέθηκε ως διαλύτης για το lock της συχνότητας πεδίου (field frequency lock solvent) του φασματογράφου NMR ενώ το TSP αποτέλεσε την εσωτερική ουσία αναφοράς ($\delta^1\text{H}$ 0.0) για τη βαθμονόμηση των χημικών μετατοπίσεων.

2.1.5 Λήψη και επεξεργασία των φασμάτων ^1H NMR

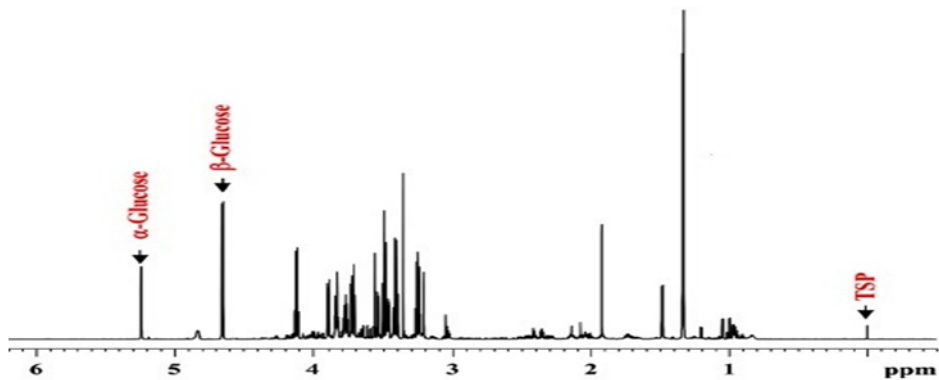
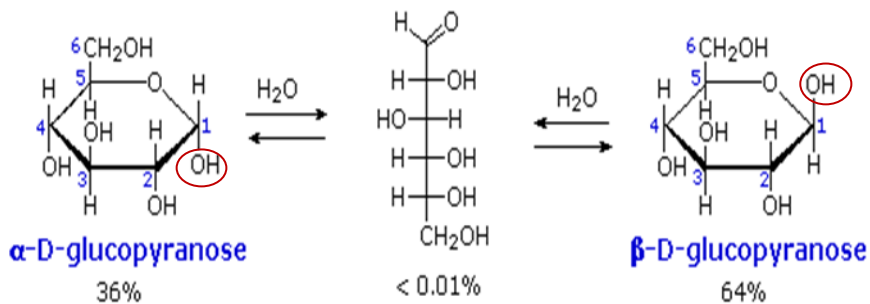
Η λήψη των φασμάτων ^1H NMR έγινε στους 300K, στο φασματογράφο 500 MHz Avance Bruker DRX, εντάσεως μαγνητικού πεδίου 11,74 Tesla, στο Κέντρο NMR του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Για την καταστολή του σήματος του νερού χρησιμοποιήθηκε η 1D παλμική ακολουθία NOESYPRESAT ($\text{RD}-90^{\circ}-\text{t}1-90^{\circ}-\text{tm}-90^{\circ}-\text{FID}$ λήψη)^[124]. Σε κάθε φάσμα έγινε συλλογή 256 σαρώσεων (scans), 64K δεδομένων (data points) με φασματικό εύρος 6009.6 Hz (αντιστοιχεί σε 12.02 ppm) και παλμό 90° διάρκειας 8-10μs.

Τα φάσματα επεξεργάστηκαν με το λογισμικό πρόγραμμα Bruker Topspin 3.5r16 (Bruker-Franzen Analytik GmbH). Αρχικά για την αύξηση της ευαισθησίας οι FIDs πολλαπλασιάστηκαν με κατάλληλη εκθετική συνάρτηση ($\text{LB}=0.3$) (exponential weighting function) που αντιστοιχούσε σε διεύρυνση γραμμών (line broadening) πλάτους 0.3 Hz. Στη συνέχεια μετά το μετασχηματισμό Fourier σε φάσμα συνάρτησης συχνότητας, έγινε βαθμονόμηση (Calibration) με βάση το σήμα συντονισμού του δευτεριωμένου άλατος TSP στα 0.000 ppm. Ακολούθησε διόρθωση φάσης (Phase Correction), μηδενικής και πρώτης τάξης για τη βελτίωση της συμμετρίας των κορυφών του φάσματος και τέλος διόρθωση γραμμής βάσης (Baseline Correction). Η διόρθωση της γραμμής βάσης έγινε με τη χρήση μιας απλής πολυωνυμικής συνάρτησης $5^{\text{ου}}$ βαθμού (Automatic Using Polynomial of Degree ABSG) και ακολούθησε ο ποσοτικός προσδιορισμός των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (BCAAs).

2.1.6 Ποσοτικοποίηση των BCAAs

Για να είναι ευδιάκριτες οι κορυφές συντονισμού των BCAAs στα φάσματα NMR έγινε πολλαπλασιασμός των FIDs με τη συνάρτηση Squared Sine-Bell ($\text{SSB}=4$) καθώς και με τη συνάρτηση Squared Sine-Bell ($\text{SSB}=8$), όπου κρίθηκε απαραίτητο.

Η ταυτοποίηση των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας έγινε σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία βάσει των χημικών τους μετατοπίσεων και της πολλαπλότητας των κορυφών συντονισμού^[125,126] (<http://www.hmdb.ca/>). Για να γίνει η ποσοτικοποίηση των BCAAs χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι. Στα φάσματα των ασθενών με ΣΔΤ2 η ποσοτικοποίηση έγινε ως προς την τιμή της γλυκόζης η οποία προσδιορίστηκε με την καθιερωμένη βιοχημική μέθοδο. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε ολοκλήρωση (Integration) των κορυφών του φάσματος που προέρχονται από τα σήματα συντονισμού για κάθε αμινοξύ. Για τη γλυκόζη, η οποία σε βιολογικά δείγματα βρίσκεται σε μείγμα ισορροπίας που περιέχει περίπου 1/3 α-ανωμερές, 2/3 β-ανωμερές και λιγότερο από 1% μορφή ανοιχτής αλυσίδας (**εικ.27**), υπολογίστηκε το άθροισμα των ολοκληρωμάτων των δύο ανωμερών της.



Εικόνα 27: Προβολές κατά Haworth, χημική μετατόπιση και πολλαπλότητα των δύο ανωμερών της γλυκόζης.

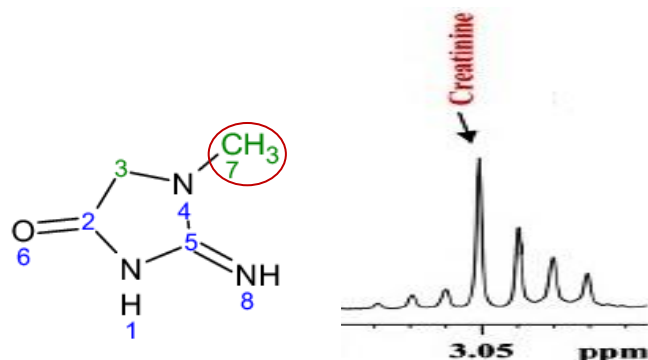
Έτσι, αρχικά το ολοκλήρωμα της διπλής (doublet) κορυφής του πρωτονίου του άνθρακα 1 της β -D-Γλυκόζης ($\delta=4,65\text{ppm}$) τίθεται ίσο με 1 και εν συνεχεία υπολογίζεται το ολοκλήρωμα της διπλής (doublet) κορυφής του πρωτονίου του άνθρακα 1 της α -D-Γλυκόζης ($\delta=5,23\text{ppm}$) (εικ.27) καθώς και τα ολοκληρώματα των κορυφών συντονισμού των μελετώμενων αμινοξέων. Τέλος γίνεται αναγωγή των τιμών των ολοκληρωμάτων των BCAAs ως προς το άθροισμα των ολοκληρωμάτων των δύο ανωμερών της γλυκόζης, λαμβάνοντας υπόψη κάθε φορά τον αριθμό των πρωτονίων που αντιστοιχούν σε κάθε κορυφή.

Συνοπτικά για τον ποσοτικό προσδιορισμό των BCAAs σε mmol/L στα φάσματα των ασθενών με ΣΔΤ2 ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα :

1. $[\text{Συγκέντρωση γλυκόζης (mg/dl)} / 180] \times 10 = \text{Συγκέντρωση γλυκόζης (mmol/l)}$
2. $\text{Συγκέντρωση γλυκόζης (mmol/l)} / (\text{άθροισμα ολοκληρωμάτων των κορυφών συντονισμού της γλυκόζης}) = \text{conc.index}_1^*$
3. $(\text{Ολοκλήρωμα αμινοξέος} / \text{αριθμό πρωτονίων που συμμετέχουν στην κορυφή συντονισμού για το συγκεκριμένο αμινοξύ}) \times \text{conc.index} = \text{mmol/l αμινοξέος}$

* $\text{conc.index}_1 =$ συντελεστής μετατροπής σε συγκέντρωση με βάση την τιμή της γλυκόζης

Στα φάσματα των ασθενών με αυτοάνοση ηπατίτιδα και πρωτοπαθή χολική κίρρωση η ποσοτικοποίηση των BCAAs έγινε ως προς την τιμή της κρεατινίνης που προσδιορίστηκε με την καθιερωμένη βιοχημική μέθοδο στον ορό. Αρχικά το ολοκλήρωμα της μονής (singlet) κορυφής συντονισμού των πρωτονίων της μεθυλομάδας (-CH₃) της κρεατινίνης στα 3.05 ppm τέθηκε ίσο με 1 (Εικ 28). Η ολοκλήρωση δεν έγινε ως προς την κορυφή συντονισμού της μεθυλενικής ομάδας της κρεατινίνης στα 4.06 ppm διότι τα πρωτόνια που αντιστοιχούν σ' αυτήν την κορυφή είναι εύκολα αποσπώμενα με αποτέλεσμα να ανταλλάσσονται με το δευτέριο του διαλύτη (D₂O).



Εικόνα 28 : Χημική μετατόπιση της μεθυλομάδας της κρεατινίνης σε $\delta=3.05\text{ppm}$

Στη συνέχεια υπολογίστηκαν τα ολοκληρώματα των κορυφών των BCAAs λαμβάνοντας κάθε φορά υπόψη τον αριθμό των πρωτονίων που αντιστοιχούσαν σε κάθε κορυφή.

Συνοπτικά για τον ποσοτικό προσδιορισμό των BCAAs σε mmol/L στα φάσματα των ασθενών με AH και PBC ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

1. $[\text{Συγκέντρωση κρεατινίνης (mg/dl)} / 113] \times 10 = \text{Συγκέντρωση κρεατινίνης σε mmol/L} = \text{conc.index}_2^*$
2. $[(3 \times \text{Ολοκλήρωμα Αμινοξέος}) / \text{αριθμός πρωτονίων που συμμετέχουν στην κορυφή συντονισμού για το συγκεκριμένο αμινοξύ}] \times \text{conc.index}_2 = \text{mmol/L αμινοξέος}$

* $\text{conc.index}_2 =$ συντελεστής μετατροπής σε συγκέντρωση με βάση την τιμή της κρεατινίνης

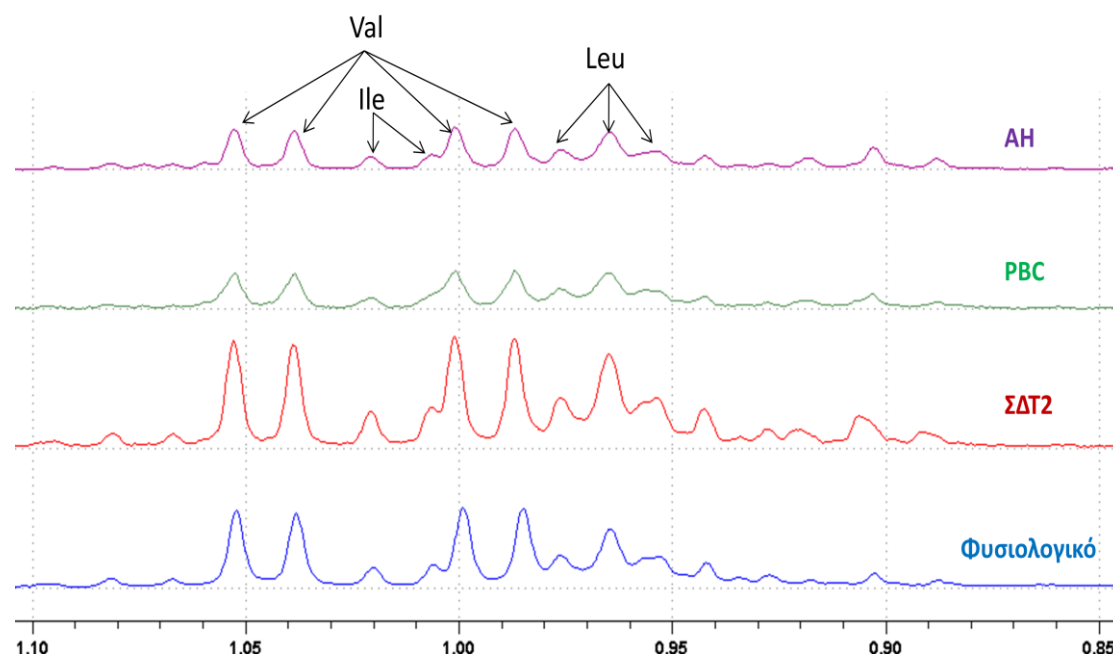
2.1.7 Στατιστική Ανάλυση Δεδομένων

Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Microsoft Office Excel 2007. Το επίπεδο εμπιστοσύνης ορίστηκε σε $p < 0.05$ και τα αποτελέσματα προσδιορίστηκαν ως μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση (Mean \pm SD).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Το ^1H NMR φάσμα του ορού του αίματος

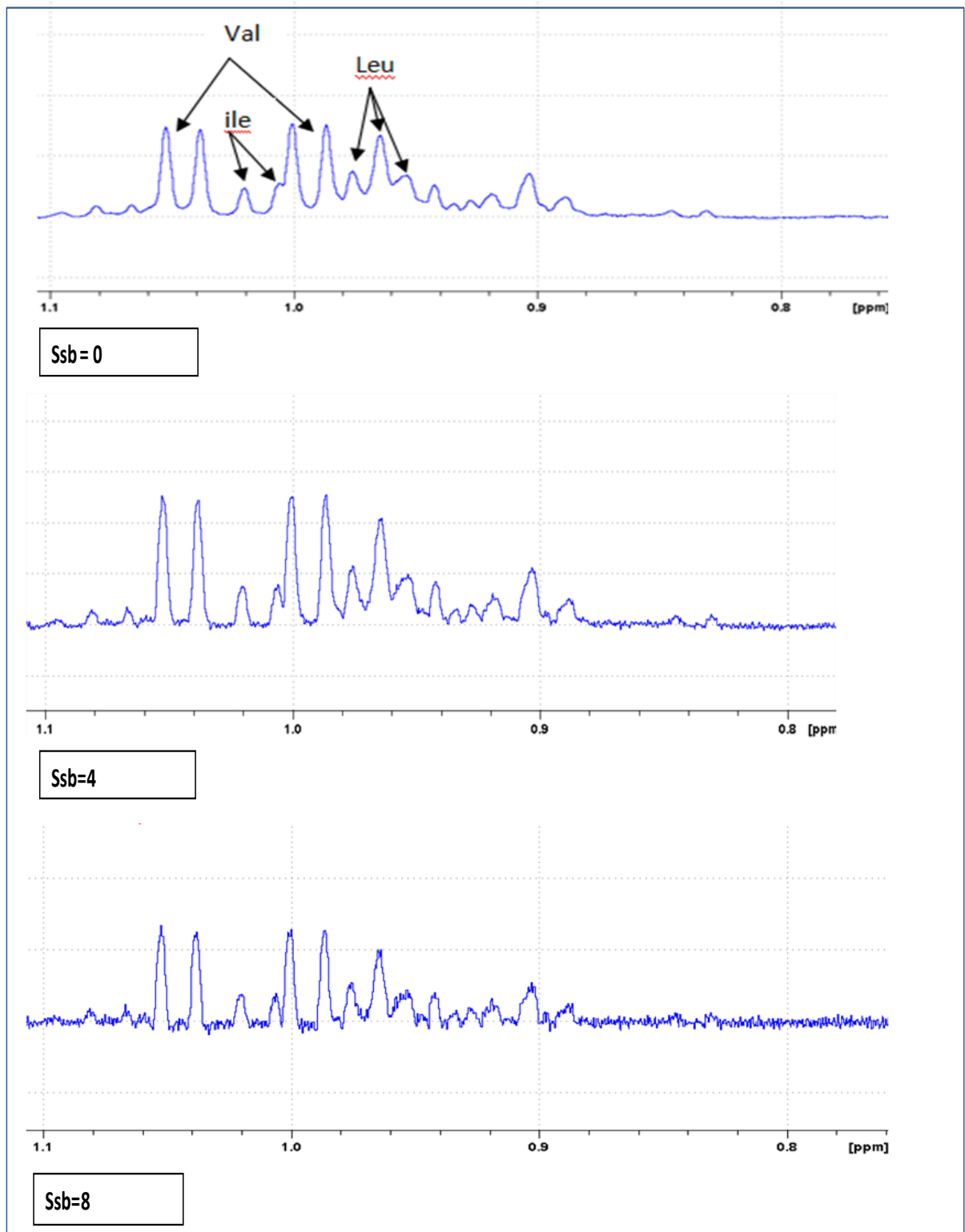
Στην **εικόνα 29** παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά φάσματα ορού ^1H NMR 500 MHz, επικεντρωμένα στην περιοχή 0.96-1.04 ppm όπου εντοπίζονται οι χημικές μετατοπίσεις των BCAAs. Συγκεκριμένα, παραθέτονται : 1) φάσμα ορού υγιούς ατόμου, 2) ασθενούς με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2, 3) ασθενούς με Πρωτοπαθή Χολική Κίρρωση και 4) ασθενούς με Αυτοάνοση Ηπατίτιδα.



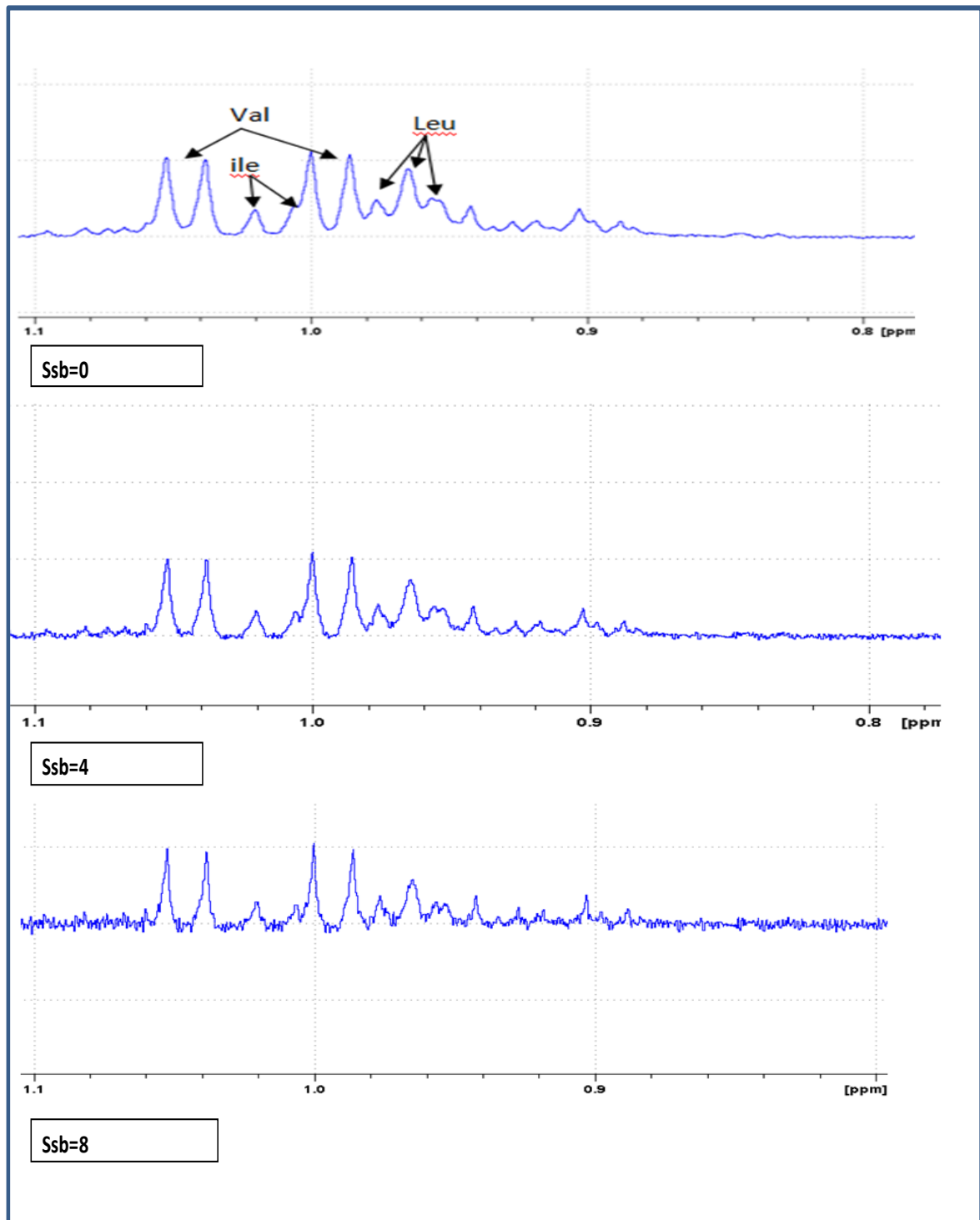
Εικόνα 29: ^1H NMR Φάσματα με τις χημικές μετατοπίσεις των BCAAs από το πρόγραμμα Bruker Topspin 3.5. Με μπλε χρώμα δίνεται ένα φυσιολογικό φάσμα, με κόκκινο χρώμα ένα φάσμα ασθενή με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2, με πράσινο χρώμα ένα φάσμα ασθενούς με Πρωτοπαθή Χολική Κίρρωση και με μωβ χρώμα ένα φάσμα ασθενούς με Αυτοάνοση Ηπατίτιδα.

Με βάση τα παραπάνω φάσματα (**εικόνα 29**), οι κορυφές που επελέγησαν για την ποσοτικοποίηση των συγκεκριμένων αμινοξέων, ήταν αυτές των παρακάτω χημικών μετατοπίσεων (ppm): για τη βαλίνη στα 1,04 (διπλή), για την ισολευκίνη στα 1,01 (διπλή) και για τη λευκίνη στα 0,95 (τριπλή). Για να επιτευχθεί όσο το δυνατόν μικρότερη αλληλεπικάλυψη των κορυφών των προσδιοριζόμενων αμινοξέων, τα FIDs των αρχικών φασμάτων πολλαπλασιάστηκαν με τις συναρτήσεις Squared Sine-Bell 4 (Ssb=4) και Squared Sine-Bell 8 (Ssb=8), όπου κρίθηκε απαραίτητο.

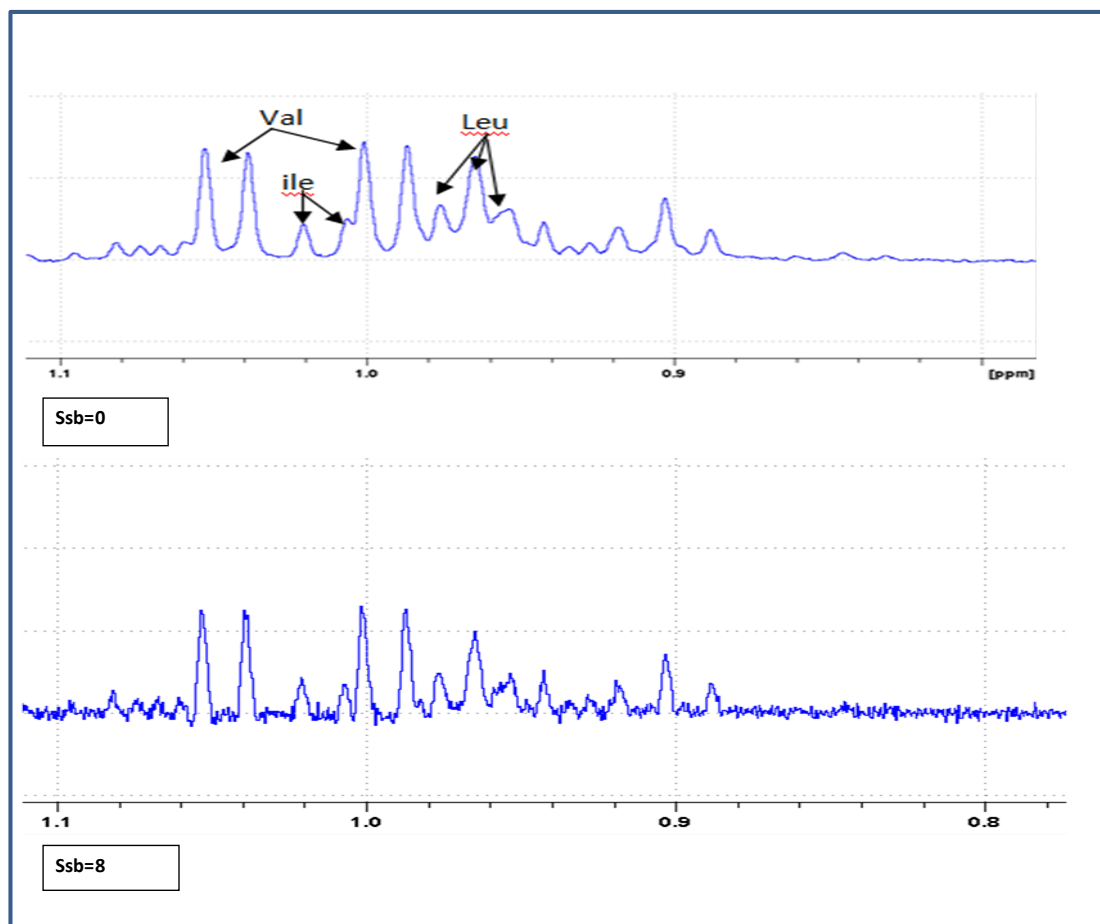
Χημικές μετατοπίσεις των BCAAs σε ασθενή με ΣΔΤ2



Χημικές μετατοπίσεις των BCAAs σε ασθενή με PBC



Χημικές μετατοπίσεις των BCAAs σε ασθενή με ΑΗ



3.2 Δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά στοιχεία του πληθυσμού της μελέτης

Στους παρακάτω πίνακες αναγράφονται τα δημογραφικά στοιχεία και οι βιοχημικές και αιματολογικές παράμετροι των 60 ασθενών που συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη. (Στην Πρωτοπαθή Χολική Κίρρωση ο αριθμός των αντρών είναι μικρότερος διότι η συγκεκριμένη αυτοάνοση ασθένεια έχει επιπολασμό σε τυχαίο πληθυσμό, γυναίκες: άντρες= 6:1)

Διαβήτης τύπου 2			
	Άντρες	Γυναίκες	Τιμές Αναφοράς
N	10	10	-
Ηλικία (Ετη)	65,8±7,9	69,1±10,7	-
Βάρος (kg)	78,0±11,6	83,8±15,4	-
Γλυκόζη (mg/dl)	133±30	134±52	90±20
Κρεατινίνη (mg/dl)	0,9±0,1	0,9±0,2	0,9±0,3
HbA_{1c} (%)	7,2±1,5	7,4±1,4	5,0±1,0

Πρωτοπαθής Χολική Κίρρωση			
	Άντρες	Γυναίκες	Τιμές αναφοράς
	Άντρες/Γυναίκες		
N	4	16	-
Κρεατινίνη(mg/dl)	0,9±0,1	0,8±0,1	0,9±0,3
AST (U/L)	40±26	53±40	27±13/13±11
ALT (U/L)	59±45	75±60	25±15/21±14
γGT (U/L)	132±105	270±25	27±20/15±10
PT (sec)	13,2±0,3	13,9±1,2	11,7±2,1
Αλβουμίνη (g/dl)	4,3±0,5	4,1±0,6	4,2±0,8

Αυτοάνοση Ηπατίτιδα			
	Άντρες	Γυναίκες	Τιμές αναφοράς
	Άντρες/Γυναίκες		
N	10	10	-
Ηλικία (Έτη)	44,9±21,1	56,1±19,1	-
AST (U/L)	324±290	282±263	27±13/13±11
ALT (U/L)	541±530	447±432	25±15/21±14
γGT(U/L)	176±164	71±60	27±20/15±10
IgG (mg/dl)	1702±453	1909±552	1179±412
Κρεατινίνη(mg/dl)	1,0±0,2	0,9±0,2	0,9±0,3
PT (sec)	13,1±0,5	13,7±1,2	11,7±2,1
Αλβουμίνη (g/dl)	4,2±0,4	4,0±0,3	4,2±0,8

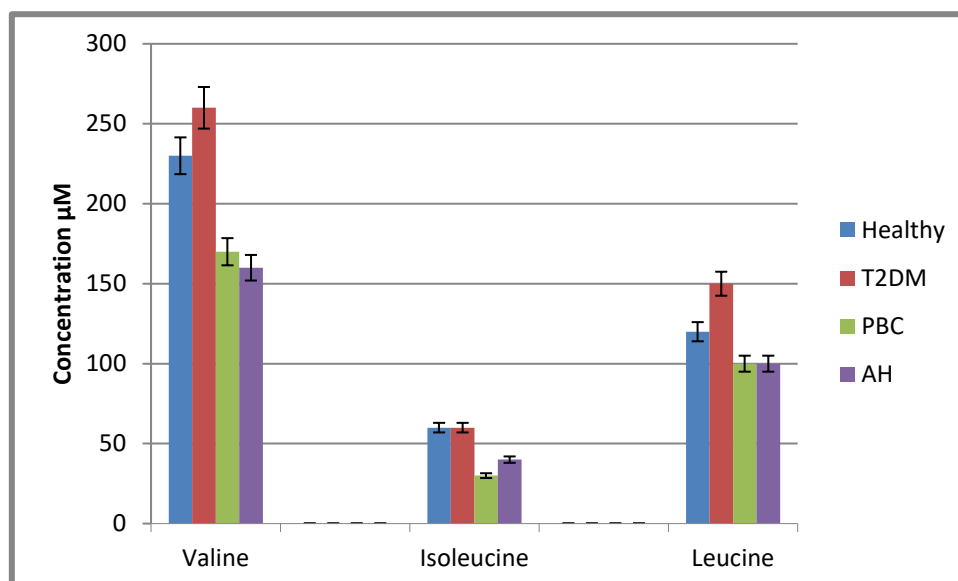
3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός των BCAAs από τα φάσματα ¹H NMR

Στον παρακάτω πίνακα (Π.3.3.1) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα με τις συγκεντρώσεις των BCAAs στις διερευνώμενες ασθένειες (ΣΔΤ2, ΠΧΚ, ΑΗ) καθώς και οι αντίστοιχες βιβλιογραφικές τιμές υγιών ατόμων⁽¹¹²⁾.

Ομάδες μελέτης Επίπεδα μεταβολιτών (μM)	Φυσιολογικοί (Βιβλιογραφικά δεδομένα)	Ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2	Ασθενείς με Πρωτοπαθή Χολική Κίρρωση	Ασθενείς με Αυτοάνοση Ηπατίτιδα
Λευκίνη	120±30	150±70	100±20	100±30
Ισολευκίνη	60±10	60±40	30±10	40±10
Βαλίνη	230±40	260±120	170±40	160±40

Πίνακας 3.3.1: Συγκεντρώσεις (μM) των BCAAs (Mean ±SD)

Γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων και σύγκριση των συγκεντρώσεων των BCAAs με τα δεδομένα από τη βιβλιογραφία γίνεται στο **διάγραμμα 3.3.2**.



Διάγραμμα 3.3.2 : Επίπεδα των BCAAs σε δείγματα ορού αίματος υγιών (βιβλιογραφικά) και ασθενών με ΣΔΤ2, ΠΧΚ και ΑΗ . Γραμμές σφάλματος στο επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

Με βάση τα αποτελέσματα αυτά παρατηρούμε ότι στο Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2 οι συγκεντρώσεις της λευκίνης και της βαλίνης παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη τάση αύξησης, συγκριτικά με τις αναφερόμενες βιβλιογραφικά φυσιολογικές τιμές ενώ η συγκέντρωση της ισολευκίνης φαίνεται να παραμένει στα ίδια επίπεδα. Στην Πρωτοπαθή Χολική Κίρρωση παρατηρούμε συνολική τάση μείωσης για τα BCAAs, με μεγαλύτερη όμως μείωση στη συγκέντρωση της ισολευκίνης. Τα ίδια ισχύουν και για την Αυτοάνοση Ηπατίτιδα, με συνολική τάση μείωσης για τα BCAAs και κυρίως για τη βαλίνη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε ποσοτικός προσδιορισμός των BCAAs στον ορό ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2 (ΣΔΤ2), Αυτοάνοση Ηπατίτιδα (ΑΗ) και Πρωτοπαθή Χολική Κίρρωση (ΠΧΚ). Για το σκοπό αυτό, εφαρμόστηκε φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) σε δείγματα ορού των ασθενών της μελέτης στα οποία με κατάλληλη πειραματική επεξεργασία προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των BCAAs. Στους ασθενείς με ΣΔΤ2, μια νόσος που χαρακτηρίζεται από σημαντική διαταραχή του μεταβολισμού, τα επίπεδα της βαλίνης και της λευκίνης στον ορό του αίματος βρέθηκαν αυξημένα σε σχέση με τις βιβλιογραφικές τιμές αναφοράς για τα υγιή άτομα, ενώ τα επίπεδα της ισολευκίνης δεν παρουσίασαν μεταβολή. Στους ασθενείς με Αυτοάνοση Ηπατίτιδα, μια χρόνια νόσος που χαρακτηρίζεται από ανοσολογική απόκριση του ήπατος και προοδευτική ηπατοκυτταρική νέκρωση, τα επίπεδα των BCAAs βρέθηκαν μειωμένα στον ορό του αίματος, με τη σημαντικότερη μείωση να καταγράφεται για τη βαλίνη. Τέλος, στους ασθενείς με Πρωτοπαθή Χολική Κίρρωση, μια προοδευτικά επιδεινούμενη αυτοάνοση χολοστατική νόσο του ήπατος, τα επίπεδα όλων των BCAAs βρέθηκαν μειωμένα

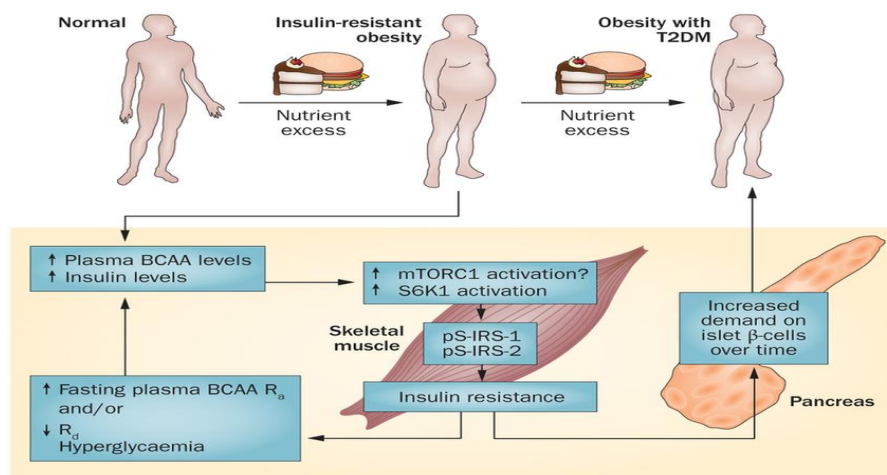
στον ορό του αίματος, με τη μεγαλύτερη μείωση να εμφανίζεται στα επίπεδα της ισολευκίνης.

BCAAs και Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, τα επίπεδα των BCAAs είναι αυξημένα σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2^(53,60). Στη δική μας μελέτη τα επίπεδα της βαλίνης και της λευκίνης βρέθηκαν αυξημένα σε ασθενείς με ΣΔΤ2, ενώ τα επίπεδα της ισολευκίνης παρέμειναν στα φυσιολογικά επίπεδα. Όπως παρατηρείται στην **εικόνα 29**, οι κορυφές συντονισμού της ισολευκίνης παρουσιάζουν αλληλοεπικάλυψη με το ένα ζεύγος κορυφών της βαλίνης στα 0,99 ppm, γεγονός το οποίο μπορεί να οδήγησε σε μειωμένη ακρίβεια του ποσοτικού προσδιορισμού της.

Δύο κυρίως πιθανοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για την ερμηνεία των αυξημένων επιπέδων των BCAAs στο ΣΔΤ2.

α) Περίσσεια θρεπτικών συστατικών που συμβάλλουν στην παχυσαρκία έχουν ως αποτέλεσμα και την αύξηση των μεταγευματικών επιπέδων των BCAAs στην κυκλοφορία του αίματος. Αυξημένα επίπεδα λευκίνης σε συνδυασμό με την αυξημένη ινσουλίνη ενεργοποιούν τον mTORC1 και τη ριβοσωμική πρωτεϊνική κινάση S6 με αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση της σερίνης του υποστρώματος του υποδοχέα της ινσουλίνης που οδηγεί σε αντίσταση στη δράση της με συνέπεια να εκδηλώνεται υπεργλυκαιμία και να ενεργοποιείται η πρωτεόλυση. Επομένως, τα αυξημένα επίπεδα των BCAAs στην κυκλοφορία οφείλονται αφενός στη μείωση του ρυθμού απομάκρυνσής τους λόγω ανεπαρκούς δράσης της ινσουλίνης, αφετέρου λόγω αυξημένης αποικοδόμησης των πρωτεϊνών⁽³³⁾. **(Εικ.30)**



Εικόνα 30 : Παχυσαρκία - ΣΔΤ2

β) Ο δεύτερος μηχανισμός συσχετίζει τα αυξημένα λόγω της παχυσαρκίας επίπεδα των BCAAs με τη δυσλειτουργία των β-κυττάρων του παγκρέατος. Πιο συγκεκριμένα, θεωρείται ότι τα αυξημένα επίπεδα των BCAAs οδηγούν σε συσσώρευση δυνητικά τοξικών ενδιάμεσων συστατικών του καταβολισμού τους (BCKAs, acyl-CoA) τα οποία προάγουν μιτοχondριακή δυσλειτουργία β-κυττάρων, σηματοδοτούν διαδικασία στρες και οδηγούν στην απόπτωση που σχετίζεται με το ΣΔΤ2. Η θεωρία αυτή ενισχύεται από μελέτες σε πειραματικά μοντέλα⁽³³⁾ και θα μπορούσε να αιτιολογεί τη συσχέτιση των αυξημένων επιπέδων των BCAAs στον ορό του αίματος με την εξέλιξη του ΣΔΤ2.

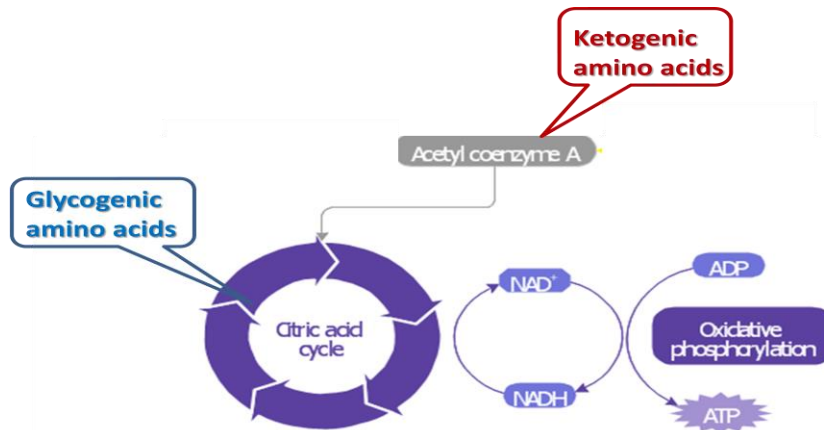
Ενώ στην κετοξουρία διακλαδισμένης αλυσίδας θεωρείται δεδομένη η τοξική δράση των ενδιάμεσων του μεταβολισμού των BCAAs καθώς εκφράζονται πολύ έντονα, στο ΣΔΤ2 η έκφρασή τους δεν έχει ακόμα μελετηθεί. Θεωρείται ότι στο ΣΔΤ2 έχουμε μιας μικρής κλίμακας νόσου διακλαδισμένων αλυσίδων, γεγονός το οποίο μπορεί να διερευνηθεί με γονιδιακή ανάλυση.

BCAAs και αυτοάνοσα νοσήματα ήπατος

Σύμφωνα με περιορισμένο αριθμό μελετών που έχουν γίνει για τα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος, τα επίπεδα των BCAAs είναι μειωμένα τόσο σε ασθενείς με Αυτοάνοση Ηπατίτιδα όσο και σε ασθενείς με Πρωτοπαθή Χολική Κίρρωση^{127,132}. Ιδιαίτερα στο στάδιο της κίρρωσης που δυνητικά αποτελεί μετεξέλιξη των δύο αυτών αυτοάνοσων νοσημάτων, εκτενέστερες μελέτες αποκαλύπτουν σημαντικότερη μείωση στα επίπεδα βαλίνης και ισολευκίνης^{128}. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, η συγκέντρωση των BCAAs στον ορό του αίματος βρέθηκε μειωμένη σε σχέση με τους υγιείς, τόσο στην ΑΗ όσο και στην ΠΧΚ. Στην ΑΗ, σημαντικότερη μείωση παρατηρήθηκε στα επίπεδα της βαλίνης ενώ στην ΠΧΚ στα επίπεδα της ισολευκίνης.

Σύμφωνα με μεταβολομικές αναλύσεις, στους ασθενείς με ΑΗ παρατηρούνται υψηλά επίπεδα γλυκόζης στον ορό του αίματος^{127}, τα οποία πιθανά συνδέονται με αυξημένη γλυκονογένεση στο ήπαρ. Ως γλυκογενετικά υποστρώματα το ήπαρ μπορεί να χρησιμοποιήσει το γαλακτικό και την αλανίνη από τους μύες. Η σύνθεση της αλανίνης στους μύες γίνεται όπως έχει αναφερθεί, κατά ένα μεγάλο ποσοστό από την τρανσαμίνωση αμινοξέων με διακλαδισμένες αλυσίδες και στη συνέχεια μεταφέρεται στο ήπαρ όπου μπορεί να μετατραπεί σε γλυκόζη. Επιπλέον η βαλίνη, που τα επίπεδά της παρουσίασαν τη σημαντικότερη μείωση σε σχέση με τα υπόλοιπα BCAAs, ανήκει στα αμιγώς γλυκογενετικά αμινοξέα. Όπως έχει αναφερθεί, ο ανθρακικός σκελετός της αποικοδομείται σε ηλεκτρυλο-CoA το οποίο μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος μετατρέπεται σε οξαλοξικό, στη συνέχεια σε φωσφο-ενολοπυροσταφυλικό και οδηγεί στην παραγωγή γλυκόζης. Έτσι στις παραπάνω περιπτώσεις μπορεί να δικαιολογηθούν τα μειωμένα επίπεδα των BCAAs στην ΑΗ καθώς φαίνεται ότι σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με τη γλυκονογένεση στο ήπαρ.

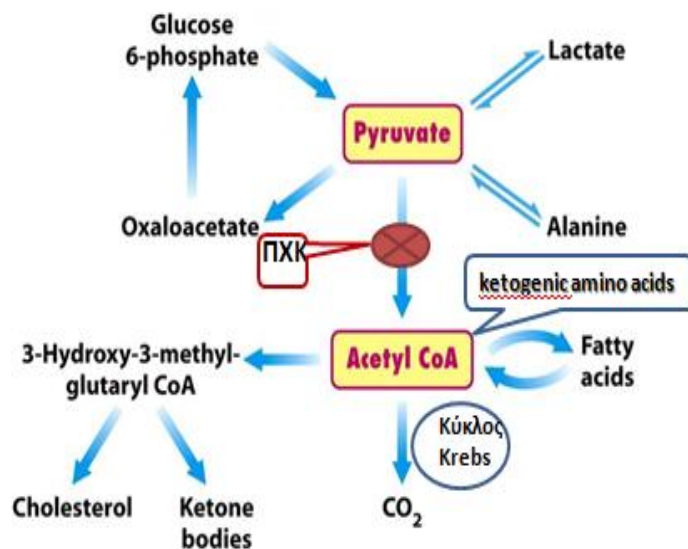
Η ανοσολογική απόκριση του ήπατος, που παρατηρείται στην αυτοάνοση ηπατίτιδα, είναι ενεργειακά εξαρτώμενη διαδικασία, άρα παρουσιάζει αυξημένες απαιτήσεις για παραγωγή ATP. Το ακετυλο-CoA από τα κετογενετικά αμινοξέα (λευκίνη, ισολευκίνη) καθώς και το ηλεκτρυλο-CoA από τα γλυκογενετικά αμινοξέα (βαλίνη, ισολευκίνη) εισέρχονται στον κύκλο του Krebs. Από τον κύκλο του Krebs, σχηματίζεται NADH και FADH₂ που οξειδώνονται μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η μεταφορά ηλεκτρονίων από τις δύο αυτές ενώσεις στο O₂, τον τελικό αποδέκτη e⁻, δημιουργεί μια βαθμίδωσης συγκέντρωσης πρωτονίων μεταξύ των δύο πλευρών της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Αυτή η πρωτονιοκίνητη δύναμη παρέχει την ενέργεια για την παραγωγή της ATP (**Εικ.31**).



Εικόνα 31 : Κύκλος του Krebs και οξειδωτική φωσφορλίωση για τη σύνθεση ATP.

Τέλος, στην αυτοάνοση ηπατίτιδα οι κυτοκίνες που παράγονται ως απάντηση στα φλεγμονώδη ερεθίσματα διεγείρουν την ηπατική σύνθεση πρωτεϊνών οξείας φάσης και κατά συνέπεια μειώνεται η διαθεσιμότητα των αμινοξέων. Επίσης, οι κυτοκίνες φαίνεται ότι επάγουν την οξείδωση των BCAAs ενεργοποιώντας BCKDH⁽⁸⁷⁾. Για τους ανωτέρω λόγους θα μπορούσε να δικαιολογηθεί η παρατηρούμενη μείωση των επιπέδων των BCAAs.

Σύμφωνα με μελέτες στην Πρωτοπαθή Χολική Κίρρωση παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα κετονοσωμάτων⁽¹³²⁾. Τα κετονοσώματα συντίθενται από ακετυλο-CoA στα μιτοχόνδρια των ηπατοκυττάρων. Το ακετυλο-CoA, προέρχεται από οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού, από τη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων καθώς και από τα κετογενετικά αμινοξέα. Η οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού σε ακετυλο-CoA είναι μια μη αντιστρεπτή αντίδραση που λαμβάνει χώρα στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων και καταλύεται από το σύμπλεγμα της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης. Ωστόσο τα αντιμιτοχονδριακά αντισώματα που ανιχνεύονται στην ΠΧΚ στρέφονται εναντίον της E2 υπομονάδας του συμπλέγματος της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης με αποτέλεσμα να μην σχηματίζεται ακετυλο-CoA. Η σύνθεση του τελευταίου εκτός από τη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων μπορεί να γίνει και από κετογενετικά αμινοξέα όπως η λευκίνη και η ισολευκίνη. Έτσι τα μειωμένα επίπεδα των BCAAs και ιδιαίτερα της ισολευκίνης αντικατοπτρίζουν αυτήν την αυξημένη χρησιμοποίησή τους ως εναλλακτικά υποστρώματα για την κετογένεση (Εικ.32).



Στις χρόνιες ηπατικές νόσους, στις οποίες συγκαταλέγονται και τα δύο αυτοάνοσα νοσήματα της παρούσας μελέτης εξετάζεται η χορήγηση συμπληρωμάτων BCAAs. Τα BCAAs και ιδιαίτερα η λευκίνη, έχουν την ικανότητα να διέρχονται τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό μέσω ειδικού μεταφορέα των L-αμινοξέων και να ανταγωνίζονται την σύνδεσή τους στο μεταφορέα αυτό με τα αρωματικά αμινοξέα. Η είσοδος κάθε κατηγορίας αμινοξέων στον εγκέφαλο δεν εξαρτάται μόνο από τα επίπεδά της στην κυκλοφορία του αίματος αλλά και από τα επίπεδα των ανταγωνιστών αμινοξέων. Έτσι σε παθήσεις του ήπατος που τα επίπεδα των BCAAs στο πλάσμα μειώνονται ενώ η συγκέντρωση των αρωματικών αμινοξέων σ' αυτό αυξάνεται, παρατηρείται αυξημένη είσοδος των τελευταίων στον εγκέφαλο και αντίστοιχα μειωμένη είσοδος των BCAAs. Επειδή όμως τα αρωματικά αμινοξέα τρυπτοφάνη, φαινυλαλανίνη και τυροσίνη αποτελούν πρόδρομες ενώσεις για τη σύνθεση του νευροδιαβιβαστή σεροτονίνη και των κατεχολαμινών ντοπαμίνη και νορεπινεφρίνη, η αύξηση των επιπέδων τους επιφέρει διαταραχές στην εγκεφαλική λειτουργία. Αυτές οι βιοχημικές μεταβολές συνδέονται με την ηπατική εγκεφαλοπάθεια και προκειμένου να μειωθεί ο κίνδυνος εμφάνισής της προτείνεται η θεραπευτική χορήγηση των BCAAs.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε ποσοτικοποίηση των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας στον ορό του αίματος σε τρεις ομάδες ασθενών, με χρήση της φασματοσκοπίας ^1H NMR. Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού αποτελεί μια γρήγορη, μη επεμβατική αναλυτική τεχνική που παρέχει τη δυνατότητα διερεύνησης του μεταβολικού προφίλ ενός ατόμου.

Στο Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι παρατηρείται αύξηση των επιπέδων των BCAAs στον ορό του αίματος όπως και η παρούσα μελέτη, ωστόσο μένει να εξακριβωθεί αν αυτή η αύξηση αποτελεί προγνωστικό δείκτη της νόσου και με ποιό μηχανισμό συμβάλλει στην παθογένειά της. Ο πιο αποδεκτός μηχανισμός που αιτιολογεί τη διαταραχή του μεταβολισμού των BCAAs είναι, η μέσω της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού mTORC1, αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης. Επίσης πρέπει να διερευνηθεί αν η αποτελεσματική ρύθμιση του νοσήματος θα οδηγήσει σε επαναφορά των BCAAs σε φυσιολογικά επίπεδα.

Όσον αφορά τα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος όπως η Πρωτοπαθής Χολική Κίρρωση και η Αυτοάνοση Ηπατίτιδα, όπου τα επίπεδα των BCAAs ανευρίσκονται μειωμένα, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση σχετικά με το ρόλο τους στην παθογένεια των συγκεκριμένων ασθενειών. Επικρατέστερη θεωρία φαίνεται να αποτελεί η χρησιμοποίηση των συγκεκριμένων αμινοξέων για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών του ήπατος μέσω του κύκλου του Krebs καθώς και για την παραγωγή γλυκόζης και κετονοσωμάτων. Επιπλέον, στα παραπάνω νοσήματα κρίνεται απαραίτητος ο ποσοτικός προσδιορισμός των BCAAs για την πιθανή χορήγηση συμπληρωμάτων τους έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος της ηπατικής εγκεφαλοπάθειας.

Ωστόσο απαιτούνται περισσότερες μελέτες και σε μεγαλύτερο εύρος πληθυσμού για να διαπιστωθεί κατά πόσο τα επίπεδα των BCAAs στον ορό του αίματος αποτελούν πιθανούς διαγνωστικούς δείκτες των μελετώμενων νοσολογικών καταστάσεων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 : ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (BCAAs) στον ορό του αίματος διαφοροποιούνται σε σχέση με τους υγιείς στην παρουσία σοβαρών νοσολογικών καταστάσεων όπως ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2 (ΣΔΤ2) και τα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος (ΑΗ,ΠΧΚ). Ωστόσο λίγα στοιχεία είναι γνωστά για τους μηχανισμούς συσχέτισης των BCAAs με τις παραπάνω ασθένειες. Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε ποσοτικός προσδιορισμός των BCAAs στον ορό του αίματος ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2, Πρωτοπαθή Χολική Κίρρωση και Αυτοάνοση Ηπατίτιδα και προτάθηκαν πιθανοί μηχανισμοί συσχέτισης.

Μέθοδος ανάλυσης: Στους 60 ασθενείς της μελέτης (20 ασθενείς με ΣΔΤ2, 20 ασθενείς με ΑΗ, 20 ασθενείς με ΠΧΚ) έγινε αρχικά λήψη δειγμάτων αίματος, ακολούθησε διήθηση του ορού για την απομάκρυνση των μακρομορίων και εν συνεχεία έγινε λήψη φασμάτων ¹H NMR 500 MHz. Πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των BCAAs ως προς την τιμή της γλυκόζης ή της κρεατινίνης όπως αυτές προσδιορίστηκαν με τον καθιερωμένο βιοχημικό τρόπο και οι συγκεντρώσεις των μελετώμενων αμινοξέων εκφράστηκαν σε μmol/l.

Αποτελέσματα: Οι συγκεντρώσεις της βαλίνης και της λευκίνης βρέθηκαν αυξημένες στον ορό του αίματος ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2, ενώ η ισολευκίνη διατηρήθηκε στα φυσιολογικά επίπεδα. Στην Αυτοάνοση Ηπατίτιδα τα επίπεδα των BCAAs βρέθηκαν μειωμένα σε σχέση με τους υγιείς με τη σημαντικότερη μείωση να καταγράφεται στα επίπεδα της βαλίνης. Μείωση των επιπέδων των BCAAs και κυρίως για την ισολευκίνη παρατηρήθηκε και στην Πρωτοπαθή Χολική Κίρρωση.

Συμπεράσματα: Ο πιθανός μηχανισμός συσχέτισης των BCAAs με το ΣΔΤ2 φαίνεται να περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού mTORC1 με αποτέλεσμα την επαγόμενη αντίσταση στην ινσουλίνη. Στις ηπατικές νόσους τα BCAAs φαίνεται να αξιοποιούνται από το ηπατοκύτταρο για κάλυψη ενεργειακών αναγκών μέσω του κύκλου του Krebs, για γλυκονεογένεση και για κετογένεση. Ωστόσο χρειάζεται περαιτέρω μελέτη των μηχανισμών συσχέτισης των BCAAs με τις παραπάνω ασθένειες και διερεύνηση της πιθανής διαγνωστικής τους αξίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 : ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. John McMurry (2008), Οργανική Χημεία Τόμος II, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
2. Maria M. Adeva, Jesus Calvino, Gema Souto, Cristobal Donapetry (2011), Insulin resistance and the metabolism of branched-chain amino acids in humans, Springer-Verlag 1 : 171-81.
3. Brosnan J & Brosnan M (2006) Branched chain amino acids: enzyme and substrate regulation; J. Nutr 136: 207-211.
4. Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer (2010), Βιοχημεία Τόμος I, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
5. Naylor SL, Shows TB (1980) Branched-chain aminotransferase deficiency in Chinese hamster cells complemented by two independent genes on human chromosomes 12 and 19. Somatic Cell Genet 6:641–652.
6. Suryawan A, Hawes JW, Harris RA et al (1998) A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism. Am J Clin Nutr 68:72–81.
7. Goto M, Shinno H, Ichihara A (1977) Isozyme patterns of branched chain amino acid transaminase in human tissues and tumors. Gann 68:663–667.
8. Harris R, Joshi M, Jeough NH, Obayashi M (2005) Overview of the molecular and biochemical basis of branched chain amino acid catabolism; J. Nutr. 135: 1527-1530.
9. Matthews DE, Bier DM, Rennie MJ et al (1981) Regulation of leucine metabolism in man: a stable isotope study. Science 214:1129–1131.
10. Schauder P, Schafer G (1987) Oxidation of leucine in human lymphocytes. Scand J Clin Lab Invest 47:447–453.
11. Aoki TT, Muller WA, Brennan MF et al (1973) Blood cell and plasma amino acid levels across forearm muscle during a protein meal. Diabetes 22:768–775.
12. Aoki TT, Brennan MF, Fitzpatrick GF et al (1981) Leucine meal increases glutamine and total nitrogen release from forearm muscle. J Clin Invest 68:1522–1528.
13. Hagenfeldt L, Eriksson S, Wahren J (1980) Influence of leucine on arterial concentrations and regional exchange of amino acids in healthy subjects. Clin Sci (Lond) 59:173–181.
14. Gelfand RA, Glickman MG, Jacob R et al (1986) Removal of infused amino acids by splanchnic and leg tissues in humans. Am J Physiol 250(4 Pt 1):E407–E413.
15. Felig P (1975) Amino acid metabolism in man. Annu Rev Biochem 44:933–955.
16. Darmaun D, Dechelotte P (1991) Role of leucine as a precursor of glutamine alpha-amino nitrogen in vivo in humans. Am J Physiol 260(2 Pt 1):E326–E329.
17. Lu G, Sun H, She P et al (2009) Protein phosphatase 2Cm is a critical regulator of branched-chain amino acid catabolism in mice and cultured cells. J Clin Invest 119:1678–1687.
18. Chuang DT, Chuang GL, Wynn RM, (2005) Lessons from genetic disorders of branched chain amino acid metabolism : J. Nutr 136 : 243-249.
19. Tonjes, M. et al. (2013) BCAT1 promotes cell proliferation through amino acid catabolism in gliomas carrying wild-type IDH1. Nat. Med. 19, 901–908.
20. Lang, C. H., Lynch, C. J. & Vary, T. C. (2010) BCATm deficiency ameliorates endotoxin-induced decrease in muscle protein synthesis and improves survival in septic mice. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 299, R935–R944.
21. Greco, D. et al. (2008) Gene expression in human NAFLD. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol. 294, G1281–G1287.
22. Angulo, P. (2002) Nonalcoholic fatty liver disease. N. Engl. J. Med. 346, 1221–1231.

23. Hall, T. R., Wallin, R., Reinhart, G. D. & Hutson, S. M. (1993) Branched chain aminotransferase isoenzymes. Purification and characterization of the rat brain isoenzyme. *J. Biol. Chem.* 268, 3092–3098.
24. Tessari P, Nosadini R, Trevisan R et al (1986) Defective suppression by insulin of leucine-carbon appearance and oxidation in type 1, insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for insulin resistance involving glucose and amino acid metabolism. *J Clin Invest* 77:1797–1804.
25. Keller U, Turkalj I, Laager R et al (2002) Effects of medium- and long-chain fatty acids on whole body leucine and glucose kinetics in man. *Metabolism* 51:754–760.
26. Pacy PJ, Cheng KN, Ford GC et al (1990) Influence of glucagon on protein and leucine metabolism: a study in fasting man with induced insulin resistance. *Br J Surg* 77:791–794.
27. Zimmerman T, Horber F, Rodriguez N et al (1989) Contribution of insulin resistance to catabolic effect of prednisone on leucine metabolism in humans. *Diabetes* 38:1238–1244.
28. Reaich D, Channon SM, Scrimgeour CM et al (1992) Ammonium chloride-induced acidosis increases protein breakdown and amino acid oxidation in humans. *Am J Physiol* 263(4 Pt1):E735–E739.
29. Stanley CA, Lieu YK, Hsu BY et al (1998) Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene. *N Engl J Med* 338:1352–1357
30. Pozefsky T, Felig P, Tobin JD et al (1969) Amino acid balance across tissues of the forearm in postabsorptive man. Effects of insulin at two dose levels. *J Clin Invest* 48:2273–2282
31. Hagenfeldt L, Eriksson LS, Wahren J (1983) Amino acids in liver disease. *Proc Nutr Soc* 42:497–506.
32. Schauder P, Schroder K, Matthaei D et al (1983) Influence of insulin on blood levels of branched chain keto and amino acids in man. *Metabolism* 32:323–327
33. Lynch CJ, Adams SH. (2014) Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol*; 10: 723–736.
34. Wang, X.; Proud, C.G. (2011) mTORC1 signaling: What we still don't know. *J. Mol. Cell Biol*, 3, 206–220.
35. Kimball, S.R.; Jefferson, L.S. (2006) Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. *J. Nutr.*, 136, 227S–231S.
36. Inoki, K.; Li, Y.; Zhu, T.; Wu, J.; Guan, K.L. (2002) TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat. Cell Biol.*, 4, 648–657.
37. Inoki, K.; Zhu, T.; Guan, K.L.(2003) TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, 115, 577–590.
38. Sancak, Y.; Bar-Peled, L.; Zoncu, R.; Markhard, A.L.; Nada, S.; Sabatini, D.M.(2010) Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell*, 141, 290–303.
39. Um, S.H.; D'Alessio, D.; Thomas, G. (2006) Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1. *Cell Metab.*, 3, 393–402.
40. Peterson, T.R.; Sengupta, S.S.; Harris, T.E.; Carmack, A.E.; Kang, S.A.; Balderas, E.; Guertin, D.A.; Madden, K.L.; Carpenter, A.E.; Finck, B.N.; et al.(2011) mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell*, 146, 408–420.
41. Long, W.; Saffer, L.; Wei, L.; Barrett, E.J. (2000) Amino acids regulate skeletal muscle PHAS-I and p70 S6-kinase phosphorylation independently of insulin. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 279, E301–E306.

42. Zick, Y. (2005) Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: A molecular basis for insulin resistance. *Sci. STKE*, pe4.
43. Duran, R.V.; Oppliger, W.; Robitaille, A.M.; Heiserich, L.; Skendaj, R.; Gottlieb, E.; Hall, M.N. (2012) Glutaminolysis activates Rag-mTORC1 signaling. *Mol. Cell*, 47, 349–358.
44. Li, M.; Li, C.; Allen, A.; Stanley, C.A.; Smith, T.J. (2012) The structure and allosteric regulation of mammalian glutamate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 2012, 519, 69–80.
45. Chevalier S, Marliss EB, Morais JA et al (2005) 9 Whole-body protein anabolic response is resistant to the action of insulin in obese women. *Am J Clin Nutr* 82:355–365
46. Felig P, Marliss E, Cahill GF Jr (1969a) Plasma amino acid levels and insulin secretion in obesity. *N Engl J Med* 281:811–816
47. Chevalier S, Burgess SC, Malloy CR et al (2006) The greater contribution of gluconeogenesis to glucose production in obesity is related to increased whole-body protein catabolism. *Diabetes* 55:675–681
48. Newgard CB, An J, Bain JR et al (2009) A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab* 9:311–326
49. She P, Van Horn C, Reid T et al (2007) Obesity-related elevations in plasma leucine are associated with alterations in enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E1552–E1563
50. Pietilainen KH, Naukkarinen J, Rissanen A et al (2008) Global transcript profiles of fat in monozygotic twins discordant for BMI: pathways behind acquired obesity. *PLoS Med* 5:e51
51. Xiaoping Chen, Wenying Yang (2015) Branched-chain amino acids and the association with type 2 diabetes, *J Diabetes Invest* Vol. 6 No. 4 July 2015
52. Xu F, Tavintharan S, Sum CF, et al. (2013) Metabolic signature shift in type 2 diabetes mellitus revealed by mass spectrometry based metabolomics. *J Clin Endocrinol Metabol*; 98: E1060–E1065.
53. Wang TJ, Larson MG, Vasan RS, et al. (2011) Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med*; 17: 448–453.
54. Vannini P, Marchesini G, Forlani G et al (1982) Branched-chain amino acids and alanine as indices of the metabolic control in type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 22:217–219
55. Szabo A, Kenesei E, Korner A et al (1991) Changes in plasma and urinary amino acid levels during diabetic ketoacidosis in children. *Diabetes Res Clin Pract* 12:91–97
56. Sasaki M, Sato K, Maruhama Y (1988) Rapid changes in urinary serine and branched-chain amino acid excretion among diabetic patients during insulin treatment. *Diabetes Res Clin Pract* 5:219–224
57. Leclercq-Meyer V, Marchand J, Woussen-Colle MC, et al. (1985) Multiple effects of leucine on glucagon, insulin, and somatostatin secretion from the perfused rat pancreas. *Endocrinology*; 116: 1168–1174.
58. Chen X, Hermansen K, Jeppesen PB.(2012) Impact of glucagon-like peptide-1(7-36) amide, isosteviol and 5-aminoimidazole-4-carboxamide 1-beta-d-ribofuranoside on leucine-mediated alpha-cell dysfunction. *Diabetes Obes Metab*; 14: 1020–1031.
59. Tai ES, Tan ML, Stevens RD et al (2010) Insulin resistance is associated with a metabolic profile of altered protein metabolism in Chinese and Asian-Indian men. *Diabetologia* 53:757–767
60. Tillin T, Hughes AD, Wang Q, et al. (2015) Diabetes risk and amino acid profiles: cross-sectional and prospective analyses of ethnicity, amino acids and diabetes in a

- South Asian and European cohort from the SABRE (South all And Brent RE visited) Study. *Diabetologia*; 58:968–979
61. Muoio DM, Newgard CB. (2008) Mechanisms of disease: Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*;9:193–205
 62. Bain JR, Stevens RD, Wenner BR, Ilkayeva O, Muoio DM, Newgard CB.(2009) Metabolomics applied to diabetes research: moving from information to knowledge. *Diabetes*; 58:2429–2443
 63. Mittelman SD, Van Citters GW, Kim SP, et al. (2000) Longitudinal compensation for fat-induced insulin resistance includes reduced insulin clearance and enhanced beta-cell response. *Diabetes*; 49:2116–2125
 64. Chiu S, Williams PT, Dawson T, et al.(2014) Diets high in protein or saturated fat do not affect insulin sensitivity or plasma concentrations of lipids and lipoproteins in overweight and obese adults. *J Nutr* ;144:1753–1759
 65. Floegel A, Stefan N, Yu Z et al. Identification of serum metabolites associated with risk of type 2 diabetes, using a targeted metabolomic approach. *Diabetes* 2013; 62: 639-648
 66. C. Christine Lee, Steve M. Watkins, Carlos Lorenzo, Lynne E. Wagenknecht, Dora Ilyasova, Yii-Der I. Chen, Steven M. Haffner, and Anthony J.(2016) Hanley Branched-Chain Amino Acids and Insulin Metabolism: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) *Diabetes Care* 4:582-8
 67. DeFronzo RA, Alvestrand A, Smith D et al (1981) Insulin resistance in uremia. *J Clin Invest* 67:563–568
 68. Boirie Y, Broyer M, Gagnadoux MF et al (2000) Alterations of protein metabolism by metabolic acidosis in children with chronic renal failure. *Kidney Int* 58:236–241
 69. Lofberg E, Gutierrez A, Anderstam B et al (2006) Effect of bicarbonate on muscle protein in patients receiving hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 48:419–429
 70. Mak RH (1999) Effect of metabolic acidosis on branched-chain amino acids in uremia. *Pediatr Nephrol* 13:319–322
 71. Małgorzewicz S, Debska-Slizien A, Rutkowski B et al (2008) Serum concentration of amino acids versus nutritional status in hemodialysis patients. *J Ren Nutr* 18:239–247
 72. Canepa A, Filho JC, Gutierrez A et al (2002) Free amino acids in plasma, red blood cells, polymorphonuclear leukocytes, and muscle in normal and uraemic children. *Nephrol Dial Transplant* 17:413–421
 73. Lofberg E, Wernerman J, Anderstam B et al (1997) Correction of acidosis in dialysis patients increases branched-chain and total essential amino acid levels in muscle. *Clin Nephrol* 48:230–237
 74. Garibotto G, Tessari P, Robaudo C et al (1997) Leucine metabolism and protein dynamics in the human kidney. *Contrib Nephrol* 121:143–148
 75. Garibotto G, Russo R, Sofia A et al (1994b) Skeletal muscle protein synthesis and degradation in patients with chronic renal failure. *Kidney Int* 45:1432–1439
 76. Schauder P, Matthaei D, Henning HV et al (1980) Blood levels of branched-chain amino acids and alpha-ketoacids in uremic patients given keto analogues of essential amino acids. *Am J Clin Nutr* 33:1660–1666
 77. Garibotto G, Paoletti E, Fiorini F et al (1993b) Peripheral metabolism of branched-chain keto acids in patients with chronic renal failure. *Miner Electrolyte Metab* 19:25–31
 78. Marchesini G, Bianchi G, Zoli M et al (1983a) Plasma amino acid response to protein ingestion in patients with liver cirrhosis. *Gastroenterology* 85:283–290

79. Marchesini G, Forlani G, Zoli M et al (1983b) Effect of euglycemic insulin infusion on plasma levels of branched-chain amino acids in cirrhosis. *Hepatology* 3:184–187
80. Schauder P, Schroder K, Herbertz L et al (1984b) Evidence for valine intolerance in patients with cirrhosis. *Hepatology* 4:667–670.
81. Plauth M, Egberts EH, Abele R et al (1990) Characteristic pattern of free amino acids in plasma and skeletal muscle in stable hepatic cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 37:135–139
82. Marchesini G, Bianchi GP, Vilstrup H et al (1987) Plasma clearances of branched-chain amino acids in control subjects and in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 4:108–117
83. Gallagher, E.J.; Leroith, D. (2013) Epidemiology and molecular mechanisms tying obesity, diabetes and the metabolic syndrome with cancer. *Diabetes Care*, 36, S233–S239.
84. Johnson, J.A.; Carstensen, B.; Witte, D.; Bowker, S.L.; Lipscombe, L.; Renehan, A.G.(2012) Diabetes and cancer (1): Evaluating the temporal relationship between type 2 diabetes and cancer incidence. *Diabetologia*, 55, 1607–1618.
85. Kroemer, G.; Pouyssegur, J. (2008) Tumor cell metabolism: Cancer’s Achilles’ heel. *Cancer Cell*,13, 472–482
86. Dewys, W.D.; Begg, C.; Lavin, P.T.; Band, P.R.; Bennett, J.M.; Bertino, J.R.; Cohen, M.H.; Douglass, H.O., Jr.; Engstrom, P.F.; Ezdinli, E.Z.; et al. (1980) Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group. *Am. J. Med.*, 69,491–497.
87. Thomas M. O Connell, (2013): The Complex Role of Branched Chain Amino Acids in Diabetes and Cancer, *Metabolites.*; 3(4): 931–945
88. Eley, H.L.; Russell, S.T.; Tisdale, M.J. (2007) Effect of branched-chain amino acids on muscle atrophy in cancer cachexia. *Biochem. J.*, 407, 113–120.
89. Odessey, R.; Goldberg, A.L. (1972) Oxidation of leucine by rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, 223, 1376–1383.
90. Eagle, H. (1955) Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*, 122, 501–514.
91. Cowie CC, Rust KF, Ford ES, Eberhardt MS, Byrd-Holt DD, Li C, Williams DE, Gregg EW, Bainbridge KE, Saydah SH, Geiss LS. (2009) Full accounting of diabetes and pre-diabetes in the U.S. population in 1988–1994 and 2005–2006. *Diabetes Care*; 32:287–294.
92. Gerstein HC, Miller ME, Byington RP, Goff DC Jr, Bigger JT, Buse JB, Cushman WC, Genuth S, Ismail-Beigi F, Grimm RH Jr, Probstfield JL, Simons-Morton DG, Friedewald WT.(2008) Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N Engl J Med*; 358: 2545–2559.
93. Martin Magnusson, Gregory D. Lewis, Ulrika Ericson, Marju Orho-Melander, Bo Hedblad, Gunnar Engstrom, Gerd Ostling, Clary Clish, Thomas J. Wang†, Robert E. Gerszten, and Olle Melander (2013) : A diabetes-predictive amino acid score and future cardiovascular disease *European Heart Journal* 34, 1982–1989 : 10.1093 / eur hear tj/ ehs 424
94. Rosvall M, Janzon L, Berglund G, Engstrom G, Hedblad B. (2005) Incidence of stroke is related to carotid IMT even in the absence of plaque. *Atherosclerosis*; 179: 325–331.
95. Patti ME, Brambilla E, Luzi L, Landaker EJ, Kahn CR.(1998) Bidirectional modulation of insulin action by amino acids. *J Clin Invest*; 101 : 1519–1529.
96. Um SH, D’ Alessio D, Thomas G. (2006) Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1. *Cell Metab*; 3 : 393–402.

97. Elwood PC, Givens DI, Beswick AD, Fehily AM, Pickering JE, Gallacher J. (2008) The survival advantage of milk and dairy consumption: an overview of evidence from cohort studies of vascular diseases, diabetes and cancer. *J Am Coll Nutr*; 27:723S–734S
98. Miguel Ruiz-Canela, et al (2016) : Plasma Branched-Chain Amino Acids and Incident Cardiovascular Disease in the PREDIMED Trial *Clinical Chemistry* 62:4000–000
99. Newgard CB. (2012) Interplay between lipids and branched chain amino acids in development of insulin resistance. *Cell metabolism*; 15 : 606 –14.
100. Sun H, Wang Y. (2015) Branched chain amino acids in heart failure. In: Rajendram R, Preedy VR, Patel VB, editors. *Branched chain amino acids in clinical nutrition*. Vol 2. New York: Springer; 81– 8.
101. Yang Y, Wu Z, Meininger CJ, Wu G. (2015) I-Leucine and NO mediated cardiovascular function. *Amino Acids*; 47:435– 47.
102. Fernstrom JD. (2005) Branched-chain amino acids and brain function. *J Nutr.* ;135: 1539S – 46S.
103. Shepherd JD, Hungarin RL(2007) The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking; *Annu Rev Cell Dev Biol* 23: 613-643
104. Mattson MP (2008) Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease; *Ann N Y Acad Sci* 1144: 97-112
105. Zeng LH, Ouyang Y, Gazit V, Cirrito JR, Jansen LA, Ess KC, Yamada KA, Wozniak DF, Holtzman DM, Gutman DH, Wong M(2007) Abnormal glutamate homeostasis and impaired synaptic plasticity and learning in a mouse model of tuberous sclerosis complex ; *Neurobiol Dis.* 28: 184-196
106. Yudkoff Marc (1997) Brain metabolism of branched chain amino acids; *Glia* 21: 92-98
107. Dufour Franc, Katarzyna A. Nalecz, Maciej J. Nalecz, Astrid Nehling (2001) Modulation of absence seizures by branched –chain amino acids: correlation with brain amino acid concentrations; *Neuroscience Research* 40: 255-263
108. Shimomura Y, Honda T, Shiraki M, Murakami T, Sato J, Kobayashi H, Mawatari K, Obayashi M, Harris R (2006) Branched chain amino acid catabolism in exercise and liver disease; *J. Nutr.* 136: 250-253
109. Benjamin Caballero (1991) : Plasma amino acid concentrations in healthy elderly men and women *Am J Clin Nutr* ;53: 1249-52.
110. Fukagawa NK, Minaker KL, Rowe JW, Young VR (1987) Plasma tryptophan and total neutral amino acid levels in men: influence of hyperinsulinemia and age. *Metabolism* Jul; 36(7):683-6.
111. Θ.Π ΧΑΤΖΗΩΑΝΝΟΥ, Μ.Α. ΚΟΥΠΠΑΡΗ, Ενόργανη ανάλυση (2010): Πανεπιστήμιο Αθηνών
112. Psychogios N, Hau DD, Peng J, Guo AC, Mandal R, et al. (2011) The Human Serum Metabolome. *PLoS ONE* 6(2): e16957:10.1371/journal
113. Blouet, C., Jo, Y. H., Li, X. & Schwartz, G. J. (2009) Mediobasal hypothalamic leucine sensing regulates food intake through activation of a hypothalamus– brainstem circuit. *J. Neurosci.* 29, 8302–8311.
114. Chen, Q. & Reimer, R. A. (2009) Dairy protein and leucine alter GLP-1 release and mRNA of genes involved in intestinal lipid metabolism in vitro. *Nutrition* 25, 340–349.
115. Lynch, C. J. et al. (2006) Leucine in food mediates some of the postprandial rise in plasma leptin concentrations. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291, E621–E630.
116. Xu, G. et al. (2009) Gastric mammalian target of rapamycin signaling regulates ghrelin production and food intake. *Endocrinology* 150, 3637–3644.

117. Dodd, K. M. & Tee, A. R. (2012) Leucine and mTORC1: a complex relationship. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302, E1329–E1342.
118. Qureshi GA, (1987) High performance liquid chromatographic methods with fluorescence detection for the determination of branched-chain amino acids and their alpha-keto analogues in plasma samples of healthy subjects and uraemic patients. *J Chromatogr.*; 400:91-9.
119. Ghosh S, Sengupta A, Chandra K,(2015) Quantitative metabolic profiling of NMR spectral signatures of branched chain amino acids in blood serum. *Amino Acids.*; 47(10):2229-36.
120. Wevers RA, Engelke U, Heerschap A.(1994) High-resolution ¹H-NMR spectroscopy of blood plasma for metabolic studies. *Clin Chem.*; 40(7 Pt 1):1245-50.
121. Bahado-Singh RO, Akolekar R, Mandal R, Dong E, Xia J, Kruger M, Wishart DS, Nicolaides K. (2012) Metabolomics and first-trimester prediction of early-onset preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.*; 25(10):1840-7. Epub 2012 Apr 28.
122. Dumas, M. E., Maibaum, E. C., Teague, C., Ueshima, H., Zhou, B., Lindon, J. C., Nicholson, J.K., Stamler, J., Elliott, P., Chan, Q. and Holmes E. (2006) Assessment of analytical reproducibility of ¹H NMR spectroscopy based metabonomics for large-scale epidemiological research: the INTERMAP Study. *Anal. Chem.* 78, 2199-2208.
123. Solanky, K. S., Bailey, N. J., Beckwith-Hall, B. M., Bingham, S., Davis, A., Holmes, E., Nicholson, J. K. and Cassidy, A. (2005) Biofluid ¹H NMR-based metabonomic techniques innutrition research - metabolic effects of dietary isoflavones in humans. *J. Nutr. Biochem.* 16, 236-244.
124. Nicholson, J. K., Foxall, P. J., Spraul, M., Farrant, R. D. and Lindon, J. C. (1995) 750 MHz ¹H and ¹H-¹³C NMR spectroscopy of human blood plasma. *Anal. Chem.* 67, 793-811.
125. Nagana Gowda GA, Gowda YN, Raftery D. (2015) Expanding the limits of human blood metabolite quantitation using NMR spectroscopy. *Anal Chem.* 2015 Jan 6; 87(1):706-15. Epub 2014 Dec 8.
126. Nagana Gowda GA, Raftery (2014) Quantitating metabolites in protein precipitated serum using NMR spectroscopy. *D. Anal Chem.* 2014 Jun 3; 86(11):5433-40. Epub 2014 May 14.
127. Wang JB et al (2014) Metabolomic Profiling of Autoimmune Hepatitis: The Diagnostic Utility of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J Proteome Res.* 2014 Jun 30.
128. Beyoğlu D, Idle JR (2013). The metabolomic window into hepatobiliary disease. *J Hepatol.* 2013 Oct; 59(4):842-58.
129. Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer (2010), Βιοχημεία Τόμος II, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
130. Ivan Damjanov (2009), Pathophysiology, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Παρισιάνου.
131. Yudkoff Marc, Yeevgeny Daikhin, Ilana Nissim, Oksana Horyn, Adam Lazarow (2005) Brain amino acid requirements and toxicity: the example of leucine; *The Journal of Nutrition* 135: 1-6.
132. Bell LN, Wulff J, Comerford M, Vuppalanchi R, Chalasani N (2015). Serum metabolic signatures of primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Liver Int.* 2015 Jan; 35(1):263-74. doi: 10.1111/liv.12680. Epub 2014 Sep 22.