



# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Διατμηματικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών  
“Ιατρική Χημεία”  
Εργαστήριο Κλινικής Χημείας

## Διαταραχές του Μεταβολικού Προφίλ των Ούρων στη Διαβητική Νεφροπάθεια

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΓΚΟΥΣΗΣ ΓΡΗΓΟΡΙΟΣ**

A.M : 267

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΤΣΙΜΙΧΟΔΗΜΟΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ  
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΑΠΡΙΛΙΟΣ 2022

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας κ. Τσιμιχόδημος Βασίλειος (Επιβλέπων)**

Παθολογική Κλινική, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο  
Ιωαννίνων

**Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας κα. Μπαϊρακτάρη Ελένη**

Εργαστήριο Κλινικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο  
Ιωαννίνων

**Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας κα. Μαγκλάρα Αγγελική**

Εργαστήριο Κλινικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο  
Ιωαννίνων

## **ΠΡΟΛΟΓΟΣ**

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο “Διαταραχές του Μεταβολικού Προφίλ Ούρων Στην Διαβητική Νεφροπάθεια” εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κλινικής Χημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στα πλαίσια του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών “Ιατρική Χημεία”.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογίας κ. Τσιμιχόδημο Βασίλειο καθώς και την καθηγήτρια Κλινικής Χημείας κα. Ελένη Μπαϊρακτάρη για την συνεχή επίβλεψη, καθοδήγηση και την ουσιαστική συμμετοχή της στην ερευνητική διαδικασία. Εν συνεχεία θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους υποψήφιους διδάκτορες Κλινική Χημείας Κατερίνα Δήμου, Παναγιώτη Νταφόπουλο και Κυριακή Καρακίτσου για την καθοριστική συμβολή τους και την άμεση συνεργασία, την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Τέλος, οφείλω να εκφράσω την απέραντη ευγνωμοσύνη στους γονείς μου, Ανδριανή και Κωνσταντίνο για τη συνεχή υποστήριξη και την συμπαράστασή τους.

## Περίληψη

Η διαβητική νεφροπάθεια (ΔΝ) είναι παγκοσμίως η κύρια αιτία της νεφρικής νόσου τελικού σταδίου και αν δεν αντιμετωπιστεί εγκαίρως μπορεί να αποβεί θανατηφόρα. Σε διαβητικούς ασθενείς, η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (ΧΝΑ) είναι συνέπεια της προοδευτικής απώλειας της νεφρικής λειτουργίας, που προκαλείται κυρίως από υπεργλυκαιμία και υπέρταση. Η αυξανόμενη συχνότητα εμφάνισης ΔΝ, το υψηλό κόστος των θεραπειών και η κακή ποιότητα ζωής των ασθενών υποδεικνύουν την ανάγκη για έγκαιρη διάγνωση της έναρξης της νόσου. Μια ελάχιστα επεμβατική στρατηγική για τον εντοπισμό των βιοδεικτών που σχετίζονται με την εξέλιξη της νόσου παρέχεται από τη μια σχετικά πρόσφατα χρησιμοποιούμενη μέθοδο, αυτή της μεταβολομικής ανάλυσης, η οποία παρέχει μια συνολική εικόνα της υγείας του ατόμου αναλύοντας κυρίως δείγματα ορού, πλάσματος και ούρων. Η παρούσα εργασία αποσκοπεί στη καταγραφή του μεταβολικού προφίλ των ούρων ασθενών με διαβητική νεφροπάθεια (ΔΝ) που συλλέχθηκαν 3 χρόνια πριν την εμφάνιση της νόσου σε σύγκριση με ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (ΣΔΤ2) χωρίς επιπλοκές με τη χρήση της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου  $^1\text{H-NMR}$ , καθώς και στην ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση μεταβολιτών που θα μπορούσαν να αποτελέσουν πιθανούς βιοδείκτες για την πρόωγη διάγνωση της νόσου. Μέσω των στοιχείων αυτών ελήφθησαν πληροφορίες για τις μεταβολικούς οδούς που διαταράσσονται κατά την παθογένεση της ΔΝ. Οι κυριότερες μεταβολικές διαταραχές που φαίνονται να εμπλέκονται στην ΔΝ είναι αυτή της κετογένεσης, του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων, του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος και των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας.

Λέξεις Κλειδιά: Διαβητική Νεφροπάθεια, Σακχαρώδης Διαβήτης, Ούρα, Μεταβολομική, Φασματοσκοπία Πυρηνικού Συντονισμού Πρωτονίου

## **Abstract**

Diabetic kidney disease (DKD) is the leading cause of end-stage renal disease (ESRD) worldwide and if left untreated can become fatal. In diabetic patients, chronic renal failure is a consequence of the progressive loss of renal function caused mainly by hyperglycemia and hypertension. The increasing incidence of DKD, the high cost of treatment and the poor quality of life of the patients indicate the need for early diagnosis of the onset of the disease. A minimally invasive strategy for detecting biomarkers associated with disease progression is provided by a relatively recent method, metabonomics data analysis, which provides an overview of a person's health by analyzing biological fluids, mainly serum, plasma, and urine. The aim of the present study was to record the metabolic profile of the urine of patients with DKD, collected 3 years before the onset of the disease, compared to patients with uncomplicated type 2 diabetes mellitus (T2DM) using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy  $^1\text{H-NMR}$  and the identification and quantification of metabolites that could be potential biomarkers for early diagnosis of the disease. Through these data, information was obtained on the metabolic pathways that are disrupted during the pathogenesis of DKD. The main metabolic disorders that appear to be involved in DKD are those of ketogenesis, fatty acid metabolism, the tricarboxylic acid cycle, and branched chain amino acids.

Keywords : Diabetic Kidney Disease (DKD), Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM), Urine, Metabonomics, Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy ( $^1\text{H-NMR}$ )

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>1</b>
I.1 Σακχαρώδης Διαβήτης.....	1
I.2 Διαβητικές Επιπλοκές.....	1
<b>II. ΔΙΑΒΗΤΙΚΗ ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑ</b> .....	<b>1</b>
II.1 Εισαγωγή.....	2
II.2 Ανατομία Νεφρού.....	3
II.2.1 Νεφρώνας.....	4
II.2.2 Νεφρικό Σωμάτιο – Σπείραμα.....	5
II.2.3 Σπειραματική Βασική Μεμβράνη.....	8
II.2.4 Σπειραματικό Φράγμα Διήθησης.....	9
II.2.5 Σωληναριακό Σύστημα.....	11
II.3 Παθοφυσιολογία Διαβητικής Νεφροπάθειας.....	15
II.3.1 Σπειραματική και Νεφρική Υπερτροφία – Ρύθμιση Γλυκόζης.....	16
II.3.2 Σωληναριακή και Νεφρική Υπερτροφία.....	17
II.3.3 Σπειραματική Υπερδιήθηση.....	17
II.3.4 Τραυματισμός Ποδοκυττάρων – Ποδοκυτταρική Υπερτροφία.....	19
II.3.5 Συσχέτιση GFR και Αλβουμινουρίας.....	22
II.4 Οξειδωτικό Stress στην Διαβητική Νεφροπάθεια.....	23
II.4.1 Ενδογενείς Οξειδωτικοί Οδοί.....	24
II.4.2 Αλληλεπίδραση Οξειδωτικών Οδοί.....	27
<b>III. ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΗ ΣΤΗΝ ΔΙΑΒΗΤΙΚΗ ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑ</b> .....	<b>27</b>
III.1 Μεταβολομική (Metabolomics).....	27
III.2 Αναλυτικές Τεχνικές Μεταβονομικής.....	27
III.2.1 Φασματοσκοπικές Τεχνικές.....	28

III.2.1.1 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού $^1\text{H-NMR}$ .....	28
III 2.2 Στατιστική Ανάλυση.....	29
III.2.3 Πολυπαραγοντική Ανάλυση (Multivariate Data Analysis, MDA).....	29
III.2.3.1 Αξιολόγηση Εγκυρότητας Πολυπαραγοντικής Ανάλυσης.....	32
III.3 Ανάλυση Μεταβολικών Οδών.....	32
III.3 Μελέτες Μεταβολομικής Στην Διαβητική Νεφροπάθεια.....	34
<b>IV. ΣΚΟΠΟΣ</b> .....	<b>44</b>
<b>V. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΜΕΡΟΣ</b> .....	<b>44</b>
V.1 Πληθυσμός Μελέτης.....	44
V.2. Συλλογή Δειγμάτων.....	44
V.3 Υλικά και Αντιδραστήρια.....	45
V.4 Όργανα.....	45
V.5 Πειραματική Διαδικασία.....	46
V.6 Λήψη φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ και επεξεργασία δεδομένων.....	46
V.7 Στοχευμένη Ανάλυση Μεταβολικού προφίλ.....	46
V.7.1 Στατιστική Ανάλυση Δεδομένων.....	46
V.8 Μη Στοχευμένη Ανάλυση.....	47
<b>VI. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>47</b>
VI.1 Δημογραφικά και Κλινικά Στοιχεία.....	47
VI.2 Φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ ούρων.....	48
VI.3 Στοχευμένη Ανάλυση - Ποσοτικός Προσδιορισμός Μεταβολιτών και Στατιστική Ανάλυση.....	49
VI.4 Μη Στοχευμένη Ανάλυση - Πολυπαραγοντική Ανάλυση.....	51
<b>VII ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	<b>54</b>
<b>VIII ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>62</b>
<b>XI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>63</b>

---

## I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

### I.1 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

Ο σακχαρώδης διαβήτης (diabetes mellitus) αποτελεί μια μεταβολική διαταραχή πολλαπλής αιτιολογίας που χαρακτηρίζεται από χρόνια υπεργλυκαιμία με διαταραχές του μεταβολισμού των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών, που προκύπτουν από ανεπάρκεια στην έκκριση ινσουλίνης, της δράση της ινσουλίνης ή και τα δύο. Οι επιπτώσεις του σακχαρώδους διαβήτη περιλαμβάνουν μακροχρόνια βλάβη, δυσλειτουργία και ανεπάρκεια διαφόρων οργάνων [1].

Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι διαβήτη, ο τύπου 1 και ο τύπου 2 :

- ❖ **Τύπου 1** : Στον διαβήτη τύπου 1 (ΣΔΤ1), η υπεργλυκαιμία εμφανίζεται ως αποτέλεσμα μίας σύνθετης διαδικασίας ασθένειας (complex disease process), όπου γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες οδηγούν σε μια αυτοάνοση απόκριση. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, τα β-παγκρεατικά κύτταρα των νησίδων του Langerhans καταστρέφονται, με αποτέλεσμα οι ασθενείς να βασίζονται ουσιαστικά σε χορήγηση εξωγενούς ινσουλίνης για την επιβίωσή τους [2].
- ❖ **Τύπου 2** : Στον τύπου 2 διαβήτη (ΣΔΤ2) παρουσιάζεται αντίσταση των περιφερειακών ιστών στη δράση της ινσουλίνης με συνεπακόλουθη ανάγκη για υπερέκκριση ινσουλίνης από τα β-παγκρεατικά κύτταρα. Η μακροχρόνια εξασθένηση των β-παγκρεατικών κυττάρων επάγει τη μειωμένη παραγωγή ινσουλίνης και έτσι τελικά προκύπτει ανεπαρκής ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης. Ο τύπος αυτός αποτελεί το 85% των περιπτώσεων των ατόμων με διαβήτη [2].

### I.2 ΔΙΑΒΗΤΙΚΕΣ ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ

Η χρόνια παρουσία του διαβήτη αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης πολλών σοβαρών επιπλοκών. Μια από τις πιο σοβαρές επιπλοκές που μπορεί να προκαλέσει ο διαβήτης είναι μια μικροαγγειακή πάθηση η οποία ονομάζεται διαβητική νεφροπάθεια [2].



---

## II. ΔΙΑΒΗΤΙΚΗ ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑ

---

### II.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

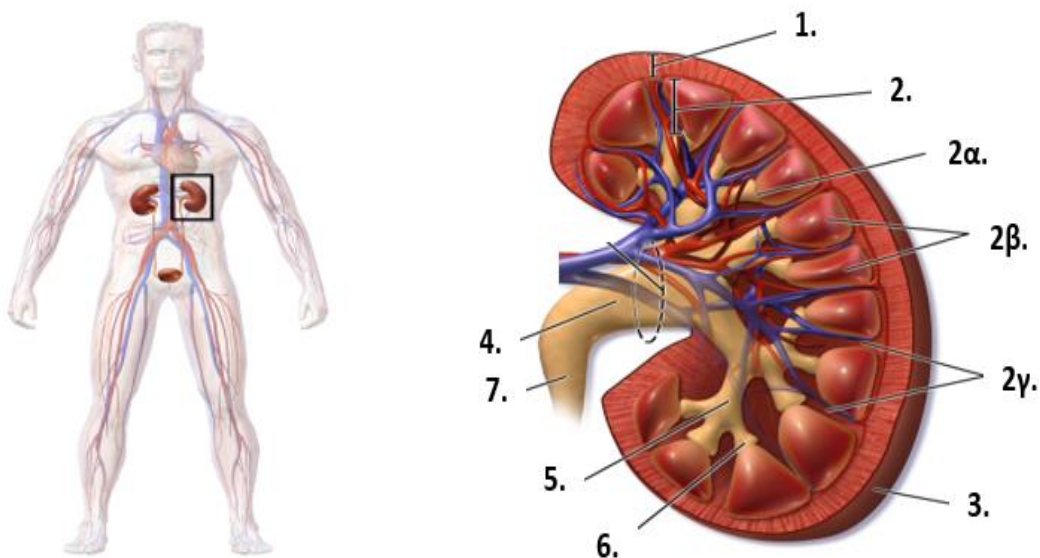
Η διαβητική νεφροπάθεια αντιπροσωπεύει την κύρια αιτία της νεφρικής ανεπάρκειας τελικού σταδίου στις δυτικές κοινωνίες. Κλινικά χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη πρωτεϊνουρίας με μεταγενέστερη επακόλουθη μείωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης, η οποία εξελίσσεται για μεγάλο χρονικό διάστημα, συχνά πάνω από 10-20 χρόνια. Εάν αφεθεί χωρίς θεραπεία, η ουραιμία που προκύπτει είναι θανατηφόρα. Είναι σημαντικό ότι η νεφρική νόσος είναι επίσης ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη μακροαγγειακών επιπλοκών όπως τα καρδιακά και τα εγκεφαλικά επεισόδια [2].

❖ **Παράγοντες Κινδύνου:** Ο αναποτελεσματικός γλυκαιμικός έλεγχος (υπεργλυκαιμία) και η υπέρταση συχνά προηγούνται της εμφάνισης της διαβητικής νεφροπάθειας, αν και ένα υποσύνολο ασθενών αναπτύσσει νεφροπάθεια παρά τον καλό γλυκαιμικό έλεγχο και φυσιολογική αρτηριακή πίεση. Μόλις διαγνωστεί η νεφροπάθεια, η αρτηριακή πίεση συχνά φαίνεται να αυξάνεται αλλά βραχυπρόθεσμα στο στάδιο αυτό, περιέργως, μπορεί να παρουσιαστεί βελτίωση στον γλυκαιμικό έλεγχο ως αποτέλεσμα της μείωσης της κάθαρσης ινσουλίνης από τους νεφρούς.

Η ανάπτυξη και η εξέλιξη της νεφροπάθειας είναι πολυσύνθετη δεδομένης της ποικιλομορφίας των κυτταρικών πληθυσμών που υπάρχουν στα νεφρά και τους διάφορους φυσιολογικούς ρόλους αυτού του οργάνου. Αυτές περιλαμβάνουν τη ρύθμιση της ισορροπίας των υγρών και των ηλεκτρολυτών του σώματος, την παραγωγή σημαντικών ορμονών όπως η ερυθροποιητίνη, η βιταμίνη D και η ρενίνη και την αποβολή των τελικών προϊόντων του μεταβολισμού, των φαρμάκων και των τοξινών. Εκτός από τη διήθηση των τοξινών από το αίμα για απέκκριση, είναι δύσκολο να εντοπιστεί ποιες άλλες λειτουργικές πτυχές του νεφρού επηρεάζονται περισσότερο από τον διαβήτη. Οι υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης προκαλούν συγκεκριμένες κυτταρικές επιδράσεις, που προσβάλλουν διάφορους τύπους νεφρικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των σπειραματικών ενδοθηλιακών κυττάρων, τα κύτταρα λείου μυός, τα μεσαγγειακά κύτταρα, τα ποδοκύτταρα, κύτταρα του σωληναριακού και συλλεκτικού αγωγού, τα φλεγμονώδη κύτταρα και τους μυοϊνοβλάστες [2].

## II.2 ANATOMIA ΝΕΦΡΟΥ

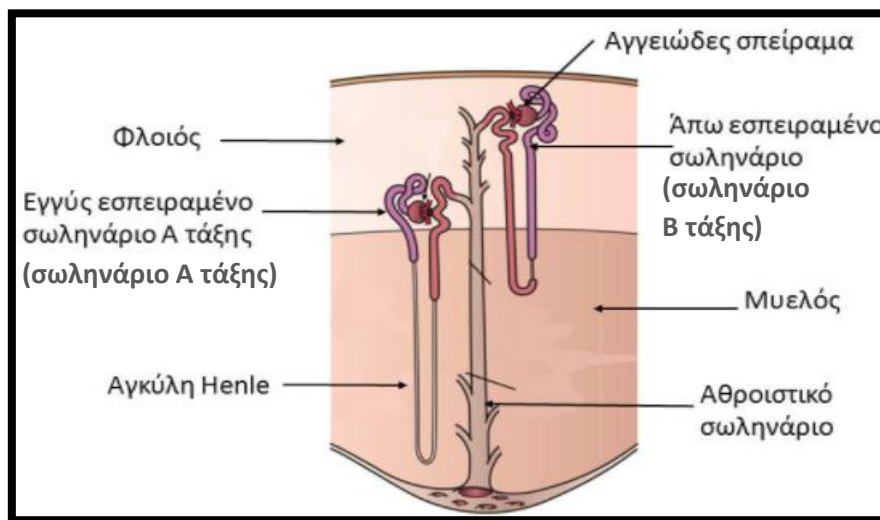
Οι νεφροί βρίσκονται στον οπισθοπεριτοναϊκό χώρο και των δύο πλευρών της σπονδυλικής στήλης στο ύψος του 3<sup>ου</sup> οσφυϊκού σπονδύλου και περιβάλλονται από την νεφρική ινώδη κάψα [3]. Η κάθετη διατομή κατά μήκος του νεφρού (**Εικόνα 1**), παρουσιάζει δύο διαφορετικές στιβάδες, την εσωτερική (μυελός ή μυελώδης μοίρα) και την περιβάλλουσα εξωτερική (φλοιός ή φλοιώδης μοίρα). Ο μυελός διαιρείται σε 8 - 18 κωνικές λωρίδες που ονομάζονται νεφρικές πυραμίδες. Οι βάσεις των πυραμίδων φθάνουν μέχρι τη περιοχή όπου ο φλοιός συνορεύει με τον μυελό. Η κορυφή των πυραμίδων οδηγείται προς την πύελο, κάτι που έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία των νεφρικών θηλών. Οι γειτονικές νεφρικές θηλές στην συνέχεια συνδέονται και σχηματίζουν τους ελάσσονες κάλυκες οι οποίοι με τη σειρά τους μαζί δημιουργούν τους τρεις μείζονες κάλυκες. Εν τέλη, η συνένωση των τριών μείζονων καλύκων διαμορφώνει την νεφρική πύελο. Η κορυφή της κάθε θηλής έχει μικρές οπές που σχηματίζουν το απώτερο τελικό μέρος των αθροιστικών σωληνάριων. Ο φλοιός φθάνει και καταλαμβάνει τους χώρους ανάμεσα στις πυραμίδες, δημιουργώντας έτσι τις νεφρικές στήλες. Οι στήλες αυτές αποτελούν προεκβολές του νεφρικού φλοιού οι οποίες επεκτείνονται μέχρι τη νεφρική πύελο [4].



**Εικόνα 1.** Απεικόνιση κάθετης τομής νεφρού. Τον νεφρό αποτελούν 1. Ο νεφρικός φλοιός, 2. ο νεφρικός μυελός (2α. νεφρικές θηλή, 2β. νεφρικές πυραμίδες και 2γ. οι νεφρικές στήλες), 3. η ινώδη κάψα, 4. ο νεφρικός πύελος, 5. οι μείζονες κάλυκες, 6. οι ελάσσονες κάλυκες και 7. Ο ουρητήρας

## II.2.1 ΝΕΦΡΩΝΑΣ

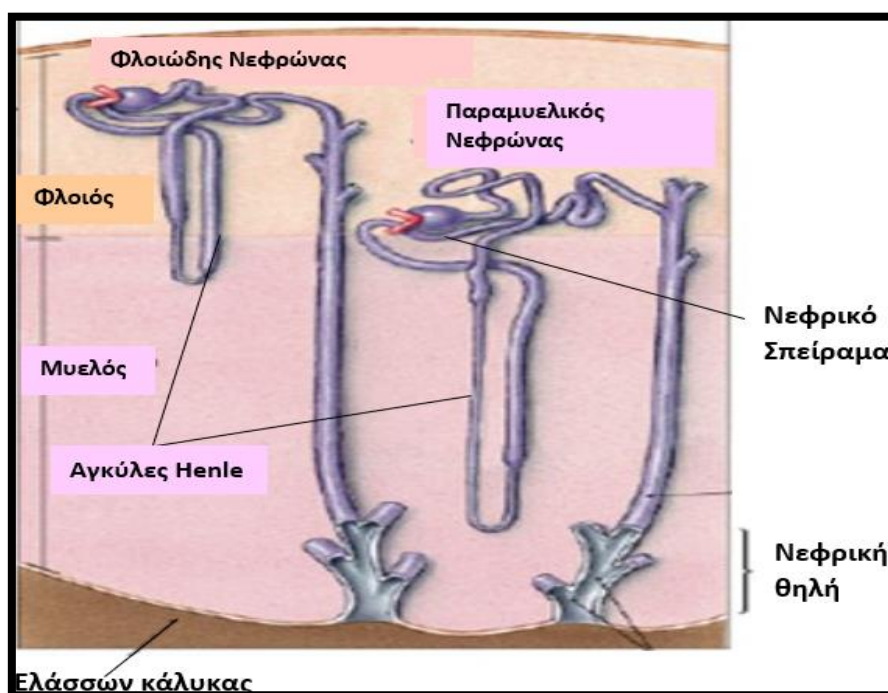
Στο κάθε νεφρό υπάρχουν περίπου 1 εκατομμύριο νεφρώνες οι οποίοι αποτελούν τη μικρότερη ανατομική και λειτουργική μονάδα στο νεφρό . Ο νεφρώνας (**Εικόνα 2**) απαρτίζεται από το νεφρικό σωματίο και το σωληναριακό τμήμα του το οποίο αρχίζει από το νεφρικό σωματίο. Το νεφρικό σωματίο αποτελείται σχεδόν εξ' ολοκλήρου από το νεφρικό σπείραμα και ένα επιθηλιακό έλυτρο, που ονομάζεται κάψα Bowman και καλύπτει το σπείραμα. Τα νεφρικό σπείραμα βρίσκεται μόνο στο νεφρικό φλοιό και σε αυτό οφείλεται η χαρακτηριστική κοκκώδη μορφή του φλοιού. Το σωληναριακό μέρος αποτελείται από το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο (σωληνάριο A τάξης), την αγκύλη του Henle, με το ανιόν και κατιόν σκέλος, το άπω εσπειραμένο σωληνάριο (σωληνάριο B τάξης) και το αθροιστικό σωληνάριο. Σε κάθε αθροιστικό σωληνάριο καταλήγουν πέραν του ενός νεφρώνα μέσω του συνδετικού σωληναρίου το οποίο αποτελεί επέκταση του άπω εσπειραμένου σωληναρίου [4].



**Εικόνα 2.** Τα τμήματα που αποτελούν το νεφρώνα.

Ανάλογα με το μήκος και τη θέση τους στο νεφρικό φλοιό, οι νεφρώνες χωρίζονται σε φλοιώδεις και σε παραμυελικούς νεφρώνες (ή νεφρώνες εν τω βάθει μυελώδους μοίρας) (**Εικόνα 3**). Οι φλοιώδεις νεφρώνες έχουν μικρό μήκος, με τα σπειράματά τους να βρίσκονται στην φλοιώδη μοίρα και την αγκύλη του Henle μόλις που φθάνει στην εξωτερική πλευρά της μυελώδους μοίρας. Σε σχέση με τους φλοιώδεις, το μήκος των παραμυελικών νεφρώνων είναι πολύ μεγαλύτερο, με τα σπειράματά

τους να βρίσκονται στο τελικό εσωτερικό τμήμα της φλοιώδους μοίρας και η αγκύλη του Henle να εισέρχεται βαθιά μέσα στη μυελώδη μοίρα, φθάνοντας έτσι μέχρι και τις νεφρικές θηλές [3].

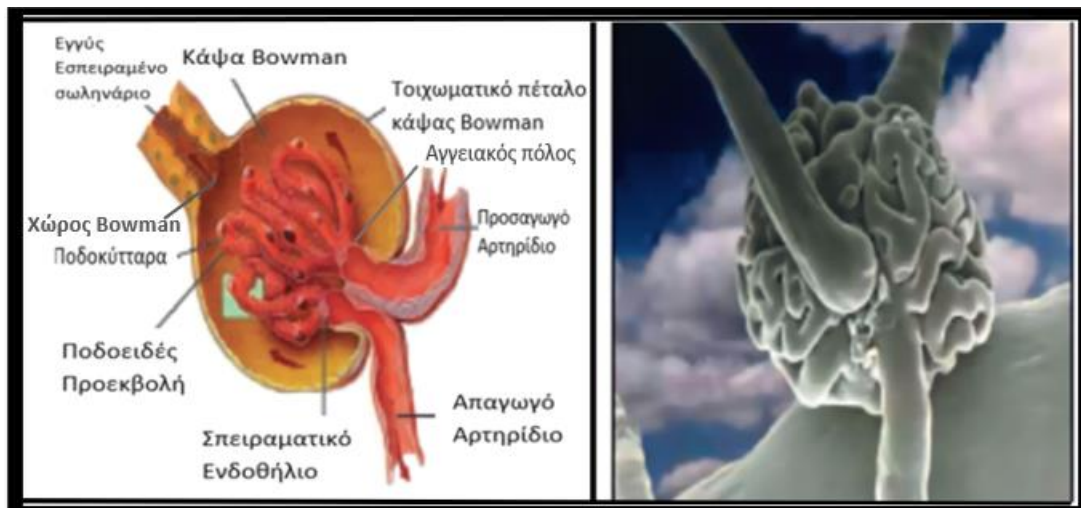


**Εικόνα 3.** Τύποι νεφρώνων. Ανάλογα με τη θέση των νεφρικών σωματίων στο φλοιό διακρίνονται δύο κατηγορίες νεφρώνων α) οι φλοιώδεις νεφρώνες όπου στην περίπτωση αυτή τα νεφρικά σπειράματα βρίσκονται εξωτερικά (προς το νεφρικό φλοιό) και β) οι παραμυελικοί νεφρώνες όπου τα νεφρικά σπειράματα των νεφρώνων αυτών βρίσκονται στην παραμυελώδη περιοχή, δηλαδή στην περιοχή μετάπτωσης του φλοιού προς στο μυελό.

## 11.2.2 ΝΕΦΡΙΚΟ ΣΩΜΑΤΙΟ - ΣΠΕΙΡΑΜΑ

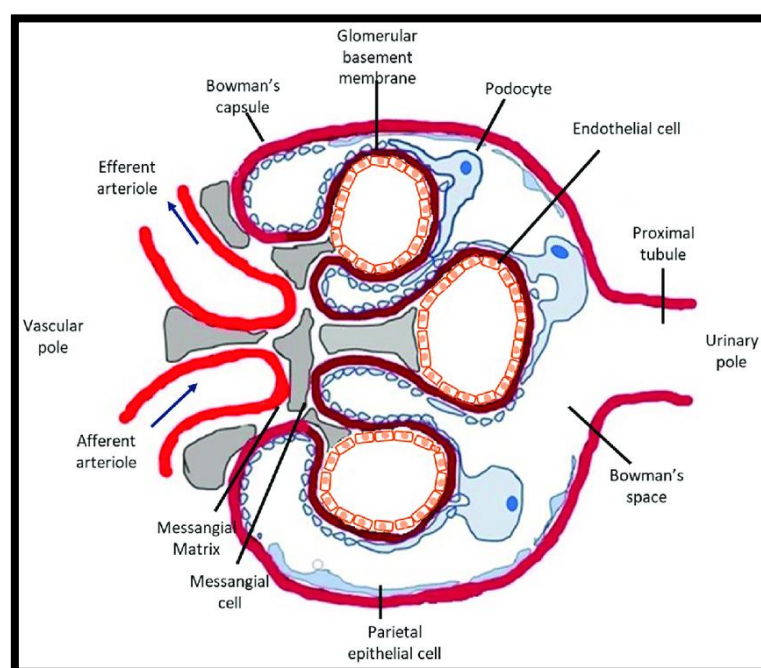
Όπως προαναφέρθηκε, το νεφρικό σωματίο αποτελείται από το νεφρικό σπείραμα και ένα επιθηλιακό έλυτρο, την κάψα Bowman, το οποίο καλύπτει το σπείραμα (**Εικόνα 4**). Το σπείραμα αποτελείται από ένα θύσανο τριχοειδικών αγκυλών οι οποίες ξεκινούν από το προσαγωγό αρτηρίδιο. Για να γίνει αντιληπτή η ανατομική σχέση σπειράματος και κάψας του Bowman, το σπείραμα παρουσιάζεται σαν μια γροθιά που βυθίζεται σε ένα μπαλόνι (κάψα του Bowman) χωρίς να φτάνει στην απέναντι πλευρά. Στην πλευρά που το σπείραμα βυθίζεται στην κάψα του Bowman, βρίσκεται ο αγγειακός πόλος του σπειράματος, όπου εισέρχεται το προσαγωγό αρτηρίδιο και από όπου εξέρχεται το απαγωγό αρτηρίδιο, το οποίο σχηματίζεται από τη συνένωση των τριχοειδικών αγκυλών. Στην απέναντι πλευρά από τον αγγειακό πόλο και καθώς το σπείραμα δεν φτάνει μέχρι

αυτή, σχηματίζεται ένας χώρος εντός του νεφρικού σωματίου, ο ουροφόρος χώρος ή χώρος του Bowman. Ο χώρος Bowman υποδέχεται το σπειραματικό διήθημα και από αυτόν ξεκινά το σωληναριακό τμήμα του νεφρώνα με το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο να αποτελεί το πρώτο του τμήμα.



**Εικόνα 4.** α) Το νεφρικό σπείραμα σχηματικά και β) όπως φαίνεται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Όπως φαίνεται πιο λεπτομερώς και στην **εικόνα 5** το νεφρικό σπείραμα αποτελείται από τα τριχοειδή αγγεία, τα περιφερειακά επιθηλιακά κύτταρα, το μεσάγγειο και τα μεσαγγειακά κύτταρα, τα ποδοκύτταρα, τα σπειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα και την σπειραματική βασική μεμβράνη (ΣΒΜ). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα ποδοκύτταρα και η ΣΒΜ αποτελούν το σπειραματικό φράγμα διήθησης.



**Εικόνα 5.** Σχηματική αναπαράσταση του νεφρικού σπειράματος. Κάθε σπείραμα αποτελείται από τρεις διαφορετικούς τύπους κυττάρων: μεσαγγειακά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα και ποδοκύτταρα. Τα μεσαγγειακά κύτταρα και η μεσαγγειακή μήτρα παρέχουν δομική υποστήριξη για τα σπειραματικά τριχοειδή αγγεία, τα οποία είναι επενδυμένα από εξειδικευμένα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία είναι περιφραγμένα με μικρά ανοίγματα. Τα ποδοκύτταρα και σπειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα μοιράζονται μια κοινή εξωκυττάρια μήτρα, η οποία ονομάζεται βασική σπειραματική μεμβράνη

Αρχικά τα **τριχοειδή αγγεία** (Glomerular Capillaries) δημιουργούν ένα δίκτυο που μοιάζει σαν μια δέσμη όπου βρίσκεται στην αρχή ενός νεφρού και αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του νεφρικού σπειράματος [5].

Τα **Περιφερειακά Επιθηλιακά κύτταρα** (Parietal Epithelial Cells, PECs) είναι τα κύτταρα που καλύπτουν την κάψουλα του Bowman, μέσα στην οποία τα προ-ούρα συγκεντρώνονται και προωθούνται στο εγγύς σωληνάριο [6].

Το **Μεσάγγειο** είναι μία δενδροειδής δομή που παρέχει την κεντρική υποστήριξη στο δίκτυο των σπειραματικών τριχοειδών του νεφρικού σπειράματος και αποτελείται από τα μεσαγγειακά κύτταρα και τα συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας (Extracellular Matrix, ECM) που αυτά εκκρίνουν. Μια κανονική μεσαγγειακή μήτρα αποτελείται κυρίως από κολλαγόνα IV και VI, λαμινίνη, φμπρονεκτίνη, θρομβοσπονδίνη, χονδροϊτίνη και θεικές πρωτεογλυκάνες [7,8].

Τα **Ποδοκύτταρα**, τα οποία ονομάζονται και σπλαχνικά επιθηλιακά κύτταρα (visceral epithelial cells) στηρίζουν και τυλίγονται σφικτά γύρω από τα σπειραματικά τριχοειδή αγγεία μέσω ενός πολύπλοκου δικτύου συνδετικών προεκβολών που λέγονται ποδοειδείς προεκβολές (foot processes, FP).

Μεταξύ των ποδοειδών προεκβολών υπάρχει μια πορώδης μεμβράνη που ονομάζεται **σχισμοειδές διάφραγμα** (slit diaphragm), που μέσω των πρωτεϊνών του όπως η νεφρίνη, ποδοκίνη κ.α. δρα ως γέφυρα και επιτρέπει την επαφή μεταξύ των ποδοκυττάρων, ενώνοντας τις προεκβολές μεταξύ τους και επομένως και τα ποδοκύτταρα, επιτρέποντας έτσι την επαφή μεταξύ των ποδοκυττάρων [6].

Τα **Σπειραματικά Ενδοθηλιακά Κύτταρα** (Glomerular Endothelial Cells, GECs) που αποτελούν το σπειραματικό ενδοθήλιο καλύπτουν την αυλική (luminal) επιφάνεια των σπειραματικών τριχοειδών και βρίσκονται σε απευθείας επικοινωνία με το αίμα. Τα GECs έχουν με μικρά ανοίγματα ή πόρους (fenestrae) και η δομή αυτή επιτρέπει υψηλή διαπερατότητα νερού που απαιτείται για τους μεγάλους όγκους διήθησης που περνάνε από το σπείραμα. Η υψηλότερη επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων καλύπτεται από τον αρνητικά φορτισμένο ενδοθηλιακό γλυκοκάλυκα και τη στιβάδα ενδοθηλιακής επιφάνειας (ESL), ενδοθηλιακή επιφανειακή στιβάδα τα οποία καλύπτουν

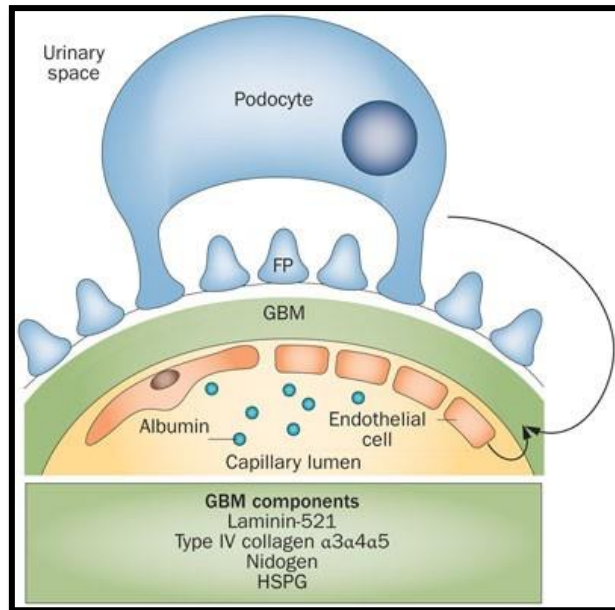


και επιπλέον τα τριχοειδή αγγεία και είναι βασικός παράγοντας στην ακεραιότητα του φράγματος σπειραματικής διήθησης. Η σημαντικότητα του γλυκοκάλυκα στην ομοίωση έχει προοδευτικά αναγνωριστεί, εν μέρει λόγω της επιλεκτικότητας υψηλού φορτίου του που περιορίζει τη διέλευση αρνητικά φορτισμένων μορίων όπως η αλβουμίνη. Η παρουσία του γλυκοκάλυκα δημιουργεί επίσης ένα χώρο μεταξύ του αίματος και του ενδοθηλίου και έτσι ελέγχει την αγγειακή διαπερατότητα, η οποία οδηγεί στη ρύθμιση της εκροής νερού [6]. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα μαζί με τα ποδοκύτταρα μοιράζονται μια κοινή εξωκυττάρια μήτρα, η οποία ονομάζεται σπειραματική βασική μεμβράνη (glomerular basement membrane) [5].

### II.2.3 ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΒΑΣΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ

Η σπειραματική βασική μεμβράνη (ΣΒΜ) είναι μία λεπτή, εύκαμπτη, μοιάζοντας με φύλλο, εξωκυττάρια μήτρα που υποστηρίζει δομικά τους βασικούς τύπους κυττάρων που αποτελούν το νεφρικό σπείραμα [9, 10]. Η εξωτερική της επιφάνεια καλύπτεται εξ ολοκλήρου από τα ποδοκύτταρα και το εσωτερικό της αποτελείται από τα ενδοθηλιακά και μεσαγγειακά κύτταρα [11]. Λειτουργικά η ΣΒΜ διευκολύνει και ρυθμίζει τη συνεχή ροή μακρομορίων, όπως της αλβουμίνης, διαμέσου του φράγματος σπειραματικής διήθησης, ενώ επωμίζεται το αιμοδυναμικό και μηχανικό stress. **(Εικόνα 6)** [10].

Τα κύρια συστατικά της ΣΒΜ περιλαμβάνουν το κολλαγόνο τύπου IV, τις πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαρίνης και τη λαμινίνη. Το κολλαγόνο τύπου IV αποτελεί τον αντιγονικό στόχο στη νόσο του Goodpasture, ενώ μεταλλάξεις σε αυτό θεωρούνται υπεύθυνες για το σύνδρομο Alport. Οι κύριες γλυκοπρωτεΐνες της ΣΒΜ είναι η λαμινίνη και το νιδογόνο (nidogen) ή ενδακτίνη (entactin). Η αρνητική φόρτιση της ΣΒΜ οφείλεται κυρίως στην παρουσία πολυανιόντικων πρωτεογλυκανών (περλεκίνη και αγρίνη)[10].



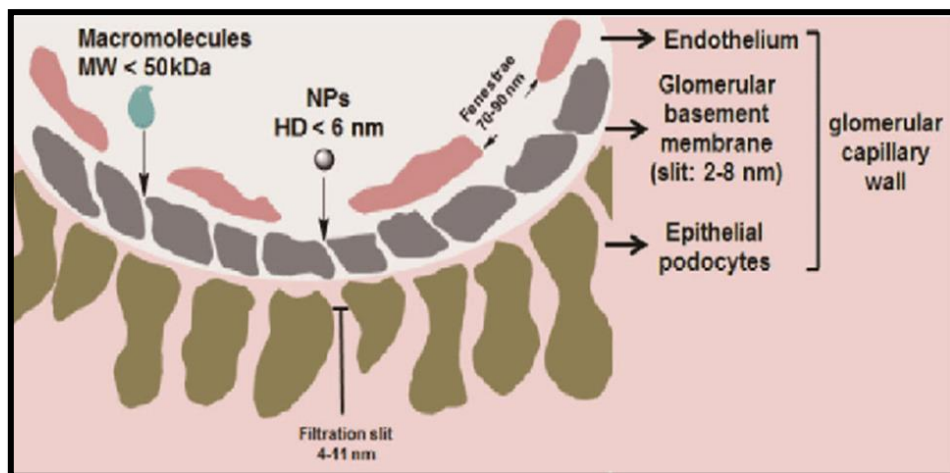
**Εικόνα 6.** Απεικόνιση Σπειραματικής Βασικής Μembrάνης (ΣΒΜ). Το εξωτερικό της καλύπτεται από τα Ποδοκύτταρα (podocytes) και τις ποδοειδές προεκβολές (podocyte foot, FP) με τις οποίες αυτά συνδέονται στην ΣΒΜ ενώ τα κύρια συστατικά του αποτελούν το κολλαγόνο τύπου IV, η λαμίνη και το νιδογόνο.

### II.2.3 ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΦΡΑΓΜΑ ΔΙΗΘΗΣΗΣ

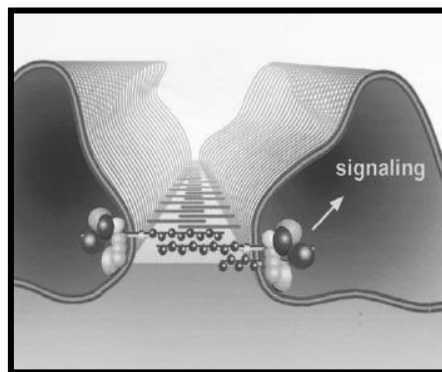
Το Σπειραματικό Φράγμα Διήθησης (ΣΦΔ) (**Εικόνα 7**) ή αλλιώς σπειραματικό τριχοειδές τείχος αποτελεί μια εξαιρετικά εξειδικευμένη μονάδα του νεφρικού σπειράματος, που είναι υπεύθυνη για την επιλεκτική υπερδιήθηση του αίματος και αποτελείται από τα σπειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα, την ΣΒΜ και τα ποδοκύτταρα που, μέσω των ποδοειδών προσεκβολών και του σχισμοειδούς διαφράγματός τους, συνδέονται στην ΣΒΜ. Το ΣΦΔ επιτρέπει την ελεύθερη διαπερατότητα του νερού και των μικρών διαλυτών ουσιών, αλλά αποτρέπει την απώλεια μακρομορίων και κυττάρων από το αίμα [10]. Σε αυτό συμβάλει σε σημαντικό βαθμό το σχισμοειδές διάφραγμα (**Εικόνα 8**) των ποδοκυττάρων, που συμβάλει στην διατήρηση της φυσιολογική λειτουργίας του φράγματος διήθησης.

Σχηματίζοντας τη μόνη σύνδεση μεταξύ γειτονικών ποδοκυττάρων, το σχισμοειδές διάφραγμα περιορίζει τη διαρροή πρωτεϊνών λειτουργώντας ως φράγμα μεγέθους (size barrier), ανάλογο με ένα κόσκινο. Μπορεί επίσης να λειτουργεί ως φράγμα φόρτισης, καθώς ορισμένες από αυτές τις πρωτεΐνες φωσφορυλιώνονται. Επιπλέον, ορισμένες πρωτεΐνες του διαφράγματος συμμετέχουν ενεργά στη σηματοδότηση των ποδοκυττάρων, επιτρέποντας έτσι σε αυτό να επικοινωνεί με άλλες πρωτεΐνες όπως οι κυτταροσκελετικές ακτίνες [12].





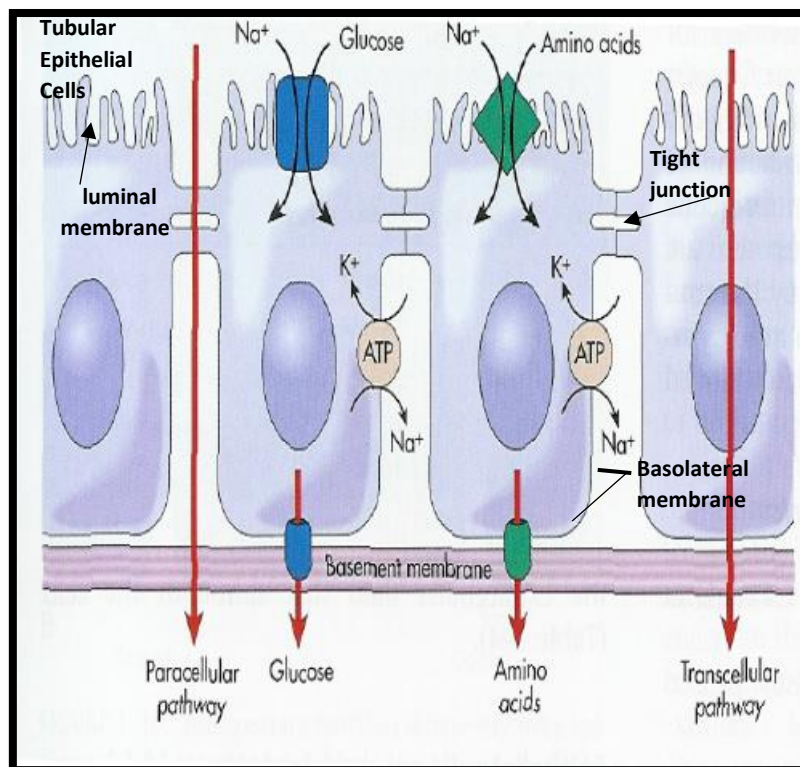
**Εικόνα 7.** Το Σπειραματικό Φράγμα Διήθησης (ΣΦΔ) αποτελείται από τρία εξειδικευμένα στρώματα: το ενδοθήλιο με τα ενδοθηλιακά κύτταρα (70-90 nm), τη σπειραματική βασική μεμβράνη (2-8 nm) και τα επιθηλιακά ποδοκύτταρα με την σχισμή διήθησης (4-11 nm)



**Εικόνα 8.** Το σχισμοειδές διάφραγμα (slit diaphragm) των ποδοκυττάρων είναι μια εξειδικευμένη κυτταρική σύνδεση με σηματοδοτικές ιδιότητες. Συνδέει τις ποδοειδές προεκβολές που χρησιμεύουν ως βασικό μέρος του φράγματος σπειραματικής διήθησης. Οι πρωτεΐνες του σχισμοειδούς διαφράγματος όπως η νεφρίνη προσλαμβάνουν κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες προσαρμογής για να ξεκινήσουν την μεταγωγή σήματος.

### II.2.3 ΣΩΛΗΝΑΡΙΑΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Το σωληναριακό σύστημα απαρτίζεται από το εγγύς εσπειραμένο, την αγκύλη του Henle, το άπω εσπειραμένο και το αθροιστικό σωληνάριο. Τα σωληνάκια αποτελούνται από τα επιθηλιακά κύτταρα που βρίσκονται στη βασική μεμβράνη και ενώνονται μεταξύ τους κυρίως μέσω στενών συνάψεων (tight junctions). Με αυτό τον τρόπο δημιουργούνται δύο οδοί για την διέλευση ουσιών, αυτή της διακυτταρικής οδού (transcellular pathway) κατά την οποία την μεταφορά τους γίνεται μέσω της αυλικής μεμβράνης (luminal membrane), της βασικής μεμβράνης (basement membrane) και του επιθηλιακού κυτταροπλάσματος και αυτή της παρακυτταρικής οδού (paracellular pathway), όπου λαμβάνει χώρα μεταφορά ουσιών μέσω των συνάψεων των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων (Εικόνα 9) [3].

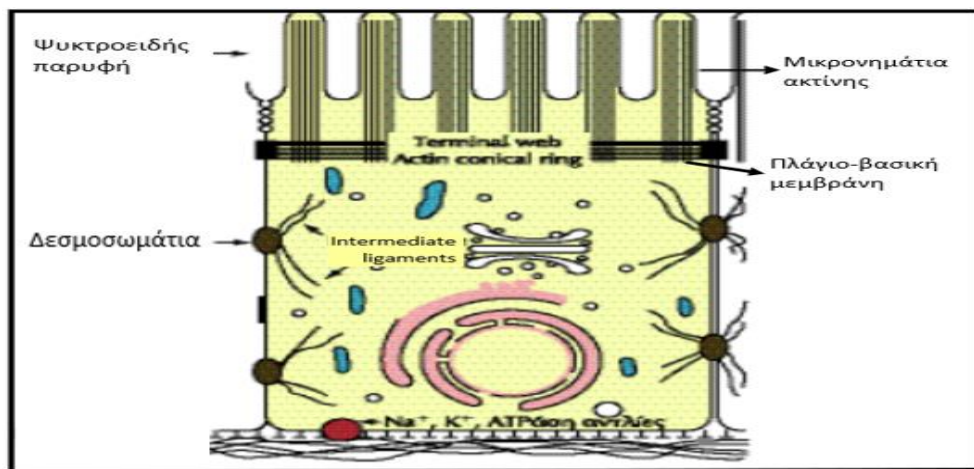


Εικόνα 9. Οδοί Σωληναριακής Μεταφοράς.

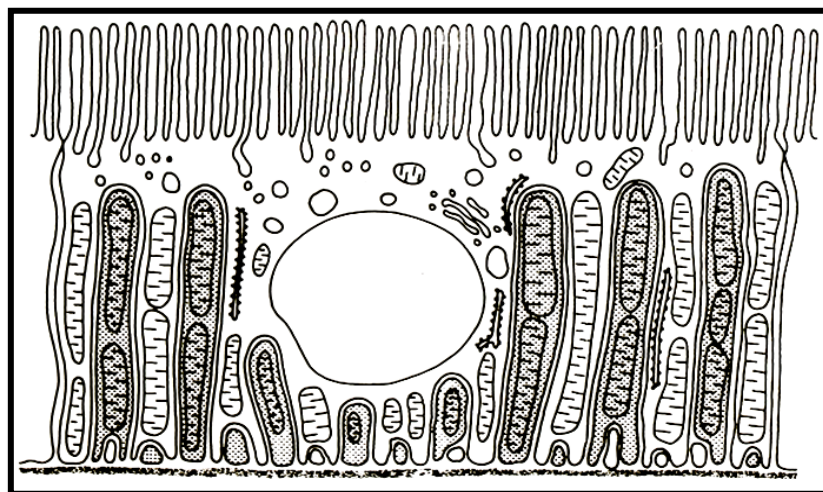
#### ➤ Εγγύς Εσπειραμένο Σωληνάριο

Η κυριότερη λειτουργία του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου (Εικόνα 10 και 11) είναι η επαναρρόφηση του μεγαλύτερου ποσοστού του διηθημένου νερού και ηλεκτρολυτών όπως νάτριο, κάλιο, ασβέστιο, καθώς επίσης και η επαναρρόφηση απαραίτητων συστατικών όπως η γλυκόζη και τα αμινοξέα. Η αυλική του επιφάνεια αποτελείται από μια ψηκτροειδή παρυφή μέσω της οποίας

αυξάνεται σημαντικά το εμβαδόν της επιφάνεια επαναρρόφησης. Η πλάγιο-βασική (basolateral) του μεμβράνη αποτελείται από μικρονημάτια ακτίνης, ενώ σε αυτή βρίσκονται πολλές ενδιάμεσες συνδέσεις (intermediate ligaments) μέσω των οποίων αλληλοσυνδέονται τα δεσμοσωμάτια. Οι ενεργειακές απαιτήσεις της αντλίας  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPάση}$ , η οποία αποτελεί κινητήρια δύναμη για την διακυτταρική οδό μεταφοράς ουσιών, καλύπτονται μέσω των πολλών μιτοχονδρίων που βρίσκονται στην πλάγιο-βασική μεμβράνη των επιθηλιων του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου. Στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο ακόμα βρίσκεται ένα σύστημα λυσοσωματίων, του οποίου ρόλος είναι η επαναρρόφηση μακρομορίων, όπως πολυπεπτίδια και πρωτεΐνες σαν την αλβουμίνη [3].



**Εικόνα 10.** Το επιθηλιακό κύτταρο του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου. Παρουσιάζεται η ψηκτροειδής παρυφή και η πλάγιο-βασική μεμβράνη την οποία αποτελούν μικρονημάτια ακτίνης.



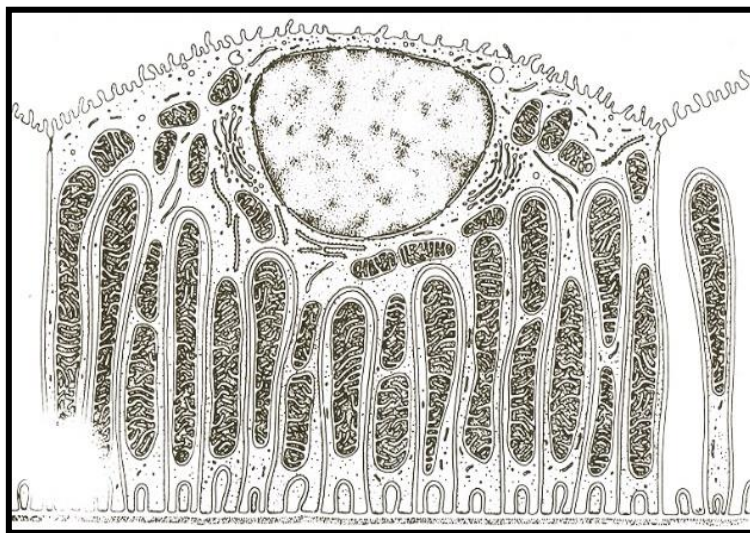
**Εικόνα 11.** Κύτταρο εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου. Παρουσιάζεται ο μεγάλος αριθμός μιτοχονδρίων που βρίσκονται σε αυτό.

### ➤ Αγκύλη Henle

Τα μέρη την αγκύλης Henle, τα οποία επίσης αποτελούν το ευθύ μέρος και συνέχεια του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου, είναι το λεπτό κατιόν, το λεπτό ανιόν και το παχύ ανιόν σκέλος. Εν αντίθεση με το λεπτό ανιόν, λόγω της παρουσίας της ακουαπορίνης 1, το λεπτό κατιόν όπως και το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο είναι εξαιρετικά διαπερατό στο νερό και αδιαπέραστο στα ιόντα. Το γεγονός αυτό συντελεί στο να αναπτυχθεί διαφορά ωσμωτικής πίεσης στη μυελώδη μοίρα. Στο αδιαπέραστο στο νερό παχύ ανιόν επαναρροφάται μεγάλη ποσότητα νατρίου κάτι το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα να δημιουργηθεί μια κατάσταση όπου το νάτριο εξέρχεται από τη μυελώδη μοίρα ενώ το νερό εισέρχεται στη φλοιώδη μοίρα και ακολούθως στη συστηματική κυκλοφορία [3].

### ➤ Άπω Εσπειραμένο Σωληνάριο

Το επιθήλιο του άπω εσπειραμένου σωληναρίου (**Εικόνα 12**) αποτελεί το μέρος του σωληναρίου όπου βρίσκεται ο μεγαλύτερος αριθμός μιτοχονδρίων από όλα τα άλλα κύτταρα του νεφρώνα και αυτό οφείλεται στις αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις. Το άπω εσπειραμένο σωληνάριο είναι μικρότερο σε μήκος από το εγγύς και δεν παρουσιάζει τη χαρακτηριστική ψηκτροειδή παρυφή. Ο μεταφορέας  $\text{Na}^+$  του άπω εσπειραμένου σωληναρίου είναι και ο συμμεταφορέας  $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$  [3].



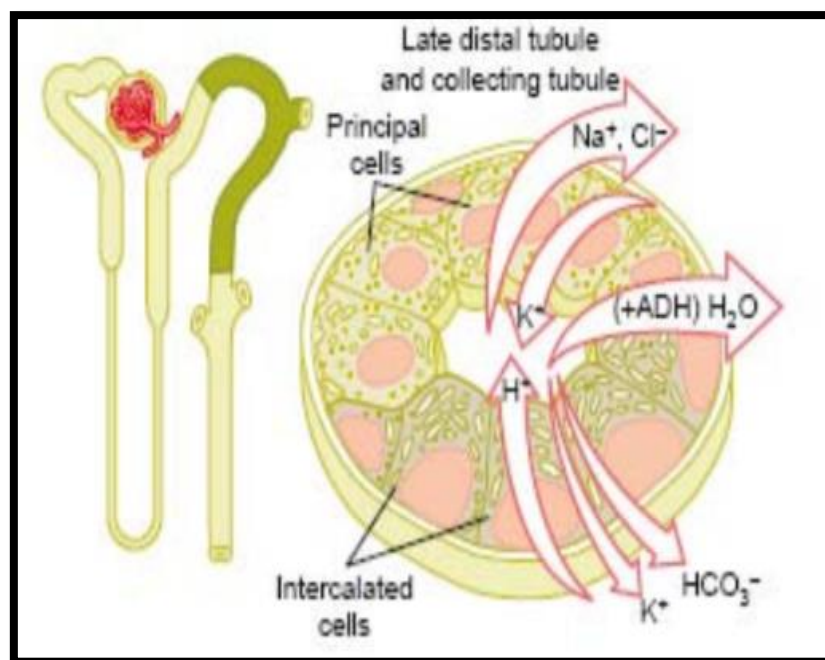
**Εικόνα 12.** Κύτταρο άπω εσπειραμένου σωληναρίου

### ➤ Αθροιστικό Σωληνάριο

Τα αθροιστικά σωληνάκια δημιουργούν ένα σύστημα σωληναρίων, το οποίο υποδιαιρείται σε τέσσερα τμήματα, τα συνδετικά σωληνάκια, τα φλοιώδη αθροιστικά, τα έξω μυελώδη αθροιστικά και τα έσω μυελώδη αθροιστικά σωληνάκια. Χαρακτηριστικό των φλοιωδών και έξω μυελωδών



σωληναρίων είναι η ύπαρξη τριών ξεχωριστών τύπων κυττάρων σε αυτά, σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα τμήματα των σωληναρίων, όπου υπάρχει ένας τύπος κυττάρων. Έτσι παρουσιάζονται τα κύρια ή θεμέλια κύτταρα (principal cells) και τα εμβόλιμα κύτταρα (intercalated cells, IC) τύπου A και τύπου B (**Εικόνα 13**). Λόγω των διαφορετικών διαύλων ιόντων που περιέχουν οι κυτταρικοί τύποι αυτοί έχουν και ξεχωριστές λειτουργικές ιδιότητες. Οπότε τα κύρια κύτταρα, υπό τη ρυθμιστική δράση της αλδοστερόνης, συμβάλουν στην επαναρρόφηση νατρίου και απέκκριση καλίου ενώ τα εμβόλιμα κύτταρα τύπου A συμμετέχουν στην απέκκριση υδρογονοκατιόντων και τη ρύθμιση της οξεοβασικής ισορροπίας και τα εμβόλιμα κύτταρα τύπου B στην απέκκριση διττανθρακικών με την παράλληλη επαναρρόφηση χλωρίου (**Εικόνα 13**) [4]. Βάση αυτών των στοιχείων τα αθροιστικά σωληνάκια αποτελούν την τελευταία θέση στη ρύθμιση της ομοιόστασης των υγρών του σώματος και με τη δράση της αντιδιουρητικής ορμόνης ρυθμίζουν την ωσμωτικότητα των ούρων [11].



**Εικόνα 13.** Ωσμωτική ρύθμιση από το άπω εσπειραμένο προς το αθροιστικό σωληνάριο.

## II.3 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΔΙΑΒΗΤΙΚΗΣ ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑΣ

Μια από τις πρώτες δομικές αλλαγές που υφίσταται ο νεφρός στα αρχικά στάδια της διαβητικής νεφροπάθειας είναι η διόγκωσή του (νεφρική υπερτροφία) λόγω των υψηλών επιπέδων γλυκόζης [2]. Ανάλογα αν η διόγκωση οφείλεται σε αύξηση του μεγέθους ενδοθηλιακών κυττάρων στο νεφρικό σπείραμα ή στα ενδοθηλιακά κύτταρα του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου διαχωρίζεται σε σπειραματική και σωληναριακή υπερτροφία [13].

### II.3.1 ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΝΕΦΡΙΚΗ ΥΠΕΡΤΡΟΦΙΑ – ΡΥΘΜΙΣΗ ΓΛΥΚΟΖΗΣ

Σύντομα μετά την έναρξη της υπεργλυκαιμίας στον διαβήτη, εκκρίνονται αυξητικοί παράγοντες και κυρίως ο αυξητικός παράγοντας β (TGF-β), που προκαλεί αύξηση του όγκου των σπειραματικών επιθηλιακών κυττάρων, με αποτέλεσμα την σπειραματική υπερτροφία και επακολούθως την συνολική υπερτροφία του νεφρού (whole kidney hypertrophy) [14]. Η υπερτροφία λόγω των αυξημένων επιπέδων γλυκόζης και των αυξητικών παραγόντων οδηγεί σε αύξηση της συσσώρευσης συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας (ECM), που εκκρίνουν τα κύτταρα του μεσαγγείου όπως κολλαγόνο IV, VI, λαμινίνες, ινονεκτίνες, θρομβοσπονδίνες και πρωτεογλυκάνες της σουλφιδικής χονδροϊτίνης, με αποτέλεσμα την διαστολή του συνόλου του μεσαγγείου. Επιπλέον, η μη ενζυματική γλυκίωση των ECM συστατικών επιβραδύνει την αποδόμησή τους και συμβάλει στην περαιτέρω συσσώρευση τους. Τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης επίσης οδηγούν στην αύξηση της μάζας της διακυλογλυκερόλης η οποία ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C, η οποία με την σειρά της ενισχύει την συσσώρευση των ECM συστατικών και την αύξηση της έκφρασης των mRNA από τα μεσαγγειακά κύτταρα για έκκριση περαιτέρω αυξητικών παραγόντων.

Όλες αυτές οι διεργασίες συσσώρευσης ECM συστατικών συνολικά έχουν σαν αποτέλεσμα την διαστολή του μεσαγγείου, την πάχυνση της ΣΒΜ στην οποία το μεσαγγείο βρίσκεται και εν τέλη την διατάραξη του σπειραματικού φράγματος διήθησης [14]. Ρόλο στην βλάβη του ΣΦΔ έχει και ο τραυματισμός των ποδοκυττάρων η επίδραση του οποίου θα συζητηθεί πιο λεπτομερώς παρακάτω.

#### ➤ Αλβουμινουρία

Η κύρια συνέπεια από την πάχυνση της ΣΒΜ και την δυσλειτουργία της λειτουργίας φραγής του ΣΦΔ είναι η διαρροή πρωτεϊνών μέσω αυτού στα ούρα, και ειδικότερα της μεσαίου μοριακού

βάρους αλβουμίνης. Η κατάσταση αυτή ονομάζεται αλβουμινουρία και αποτελεί την κύρια ένδειξη για την ύπαρξη της διαβητικής νεφροπάθειας [10,15].

Τα επίπεδα της αλβουμίνης στα ούρα δείχνουν σε πιο σημείο βρίσκεται η νόσος. Στις αρχές της πάθησης παρουσιάζεται μικρή αύξηση στην συγκέντρωση της αλβουμίνης στα ούρα (30-300 mg/24hr) σε σχέση με τα φυσιολογικά επίπεδα (<30 mg/24hr), με την κατάσταση αυτή να ονομάζεται μικροαλβουμινουρία και να είναι και η πρώτη ένδειξη για την ύπαρξη βλάβης στους νεφρούς λόγω διαβήτη. Με την εξέλιξη της νόσου και την απέκκριση μεγαλύτερων ποσοστών αλβουμίνης στα ούρα εκδηλώνεται η μακροαλβουμινουρία (>300 mg/24hr), που υποδηλώνει ότι η νόσος βρίσκεται σε προχωρημένο στάδιο και ότι υπάρχει κίνδυνος εξέλιξης σε νεφρική νόσο τελικού σταδίου (end stage renal disease, ESRD) [15].

### **II.3.2 ΣΩΛΗΝΑΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΝΕΦΡΙΚΗ ΥΠΕΡΤΡΟΦΙΑ**

Μία άλλη δομική αλλαγή που παρατηρείται στα πρώτα στάδια της ΔΝ είναι η υπερτροφία και υπερπλασία του εγγύς (εσπειραμένου) σωληναρίου και η επακόλουθη νεφρική διόγκωση. Αν και υπάρχει αύξηση στον όγκο του σπειράματος, η διόγκωση του νεφρού οφείλεται σε σημαντικό βαθμό και στην διαστολή του εγγύς σωληναρίου καθώς αποτελεί ένα μεγάλο μέρος της φλοιώδης μάζας του νεφρού [16].

Έχει προταθεί ότι η σωληναριακή επαναρρόφηση γλυκόζης, που σχετίζεται με την υπεργλυκαιμία, είναι κυρίαρχη κινητήρια δύναμη στην διόγκωση του σωληναρίου, οδηγώντας σε αυξημένη έκφραση κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων, όπως ο μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας β (transforming growth factor-β, TGF-β), ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Vascular endothelial growth factor, VEGF) και αυξητικός παράγοντας like-insulin (Insulin like growth factor, IGF) [16].

Η νεφρική υπερτροφία, μέσω αυξημένης σωληναριακής επαναρρόφησης, είναι η κύρια δυσλειτουργία στην εξέλιξη της διαβητικής νεφροπάθειας και συνεπάγεται αύξηση του GFR ως δευτερογενές συμβάν. Με την πάροδο των ετών, η υπερτροφία διατηρείται, αλλά παρόλο που το σωληνάριο διατηρεί την ικανότητα υπερδιήθησης, το σπείραμα χάνει σταδιακά τη δραστηριότητά του [17].

### **II.3.3 ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΥΠΕΡΔΙΗΘΗΣΗ**

Η κατάσταση στην οποία ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης (GFR) ολικού νεφρού είναι ασυνήθιστα αυξημένος σε σχέση με τις φυσιολογικές τιμές (120-140 ml/min/1.73m<sup>2</sup>) ονομάζεται

σπειραματική υπερδιήθηση και σχετίζεται άμεσα με την νεφρική υπερτροφία [16,18,19]. Η κατάσταση χαρακτηρίζει σημαντικά την πάθηση της διαβητικής νεφροπάθειας και όπως θα δούμε σχετίζεται σημαντικά με τα επίπεδα της αλβουμινουρίας. Εμφανίζεται στα πρώιμα στάδια της νόσου και αποτελεί ένα τυπικό χαρακτηριστικό ασθενών με διαβήτη τύπου 1, αλλά επίσης παρατηρείται και σε τύπου 2 διαβητικούς ασθενείς [16].

#### ➤ **Παράγοντες Σπειραματικής Υπερδιήθησης**

Όπως προαναφέρθηκε, η νεφρική υπερτροφία είναι άμεσα συνδεδεμένη με την σπειραματική υπερδιήθηση και έτσι αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες που συμβάλλει στην ανάπτυξη της κατάστασης αυτής. Κατά τη νεφρική υπερτροφία, λόγω αύξησης του όγκου του μεγέθους του νεφρού, αυξάνεται η ροή νεφρικού πλάσματος (renal plasma flow) και έτσι και η υδροστατική πίεση και πίεση διήθησης που ασκείται στα σπειραματικά τριχοειδή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την συνεπακόλουθο αύξηση του GFR και την δημιουργία της σπειραματικής υπερδιήθησης. Η σπειραματική υπερτροφία σε διαβητικές συνθήκες ακόμα οδηγεί σε σημαντική αύξηση της συνολικής επιφάνειας διήθησης (filtration surface area) με επακόλουθη αύξηση στο συντελεστή υπερδιήθησης (ultrafiltrate coefficient), που μπορεί να ενισχύσει περαιτέρω την σπειραματική υπερδιήθηση [19].

Σημαντικό παράγοντα επίσης αποτελούν τα υψηλά επίπεδα της συστηματικής αρτηριακής πίεσης του αίματος, όπου ανεξαρτήτως της υπερτροφίας, αυξάνουν την διασπειραματική πίεση συμβάλλοντας στην επακόλουθη αύξηση του GFR [20]. Τέλος όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, η αυξημένη σωληναριακή επαναρρόφηση γλυκόζης ενισχύει περαιτέρω την σπειραματική υπερδιήθηση.

#### ➤ **Σύνδεση Σπειραματικής Υπερδιήθησης με Τραυματισμό Σπειραματικού Φράγματος Διήθησης (ΣΦΔ)**

Η αυξημένη πίεση διήθησης, όπως και ο επακόλουθος αυξημένος ρυθμός ροής του υπερδιηθήματος επηρεάζουν το ΣΦΔ όπως και τις σπειραματικές και διασωληναριακές δομές που έπονται της διήθησης (post-filtration glomerular and tubulo-interstitial structures). Αυτό γίνεται λόγω της δράσης των μηχανικών και φυσικών δυνάμεων οι οποίες αποτελούν άμεση συνέπεια της αυξημένης πίεσης των τριχοειδών αγγείων σε συνθήκες υπερδιήθησης [21].

#### ➤ **Δράση Μηχανικών Δυνάμεων στο Φράγμα Διήθησης**



Οι κυριότερες δυνάμεις που ασκούνται σε καταστάσεις υπερδιήθησης προκύπτουν από δύο διαφορετικές κινήσεις των ρευστών, του αίματος που ρέει στα πειραματικά τριχοειδή αγγεία και του υπερδιήθηματος που ρέει από τα τριχοειδή αγγεία στο χώρο του Bowman. Οι κινήσεις αυτές οδηγούν σε μηχανικό stress στο ΣΦΔ, το οποίο μετράται ως το ποσό της δύναμης ανά μονάδα επιφάνειας. Υπάρχουν δύο τύποι stress που δρουν στην επιφάνεια του σπειράματος. Το ελαστικό stress (tensile stress) και το διατμητικό stress (ή τάση) (shear stress) [21].

#### 1) Ελαστικό Stress

Το ελαστικό stress εφαρμόζεται στο ΣΦΔ από το αίμα που ρέει στα τριχοειδή, είτε ως αξονικό stress είτε ως περιμετρικό stress. Τα κύρια μέρη του νεφρικού σπειράματος που υπόκεινται σε αυτό είναι τα ενδοθηλιακά κύτταρα, η ΣΒΜ και τα ποδοκύτταρα. Αύξηση στην τριχοειδή και υδροστατική πίεση μεταξύ των πειραματικών τριχοειδών και της περιοχής του Bowman δημιουργεί αυξημένο ελαστικό stress που οδηγεί στην άμεση αύξηση στο πάχος και στην επιφάνεια της πειραματικής μεμβράνης. Αυτή η αλλαγή στη γεωμετρία συμβαίνει λόγω της ελαστικής διαστολής της ΣΒΜ. Αυτή η αύξηση πάχους της ΣΒΜ σχετίζεται με διαστολή του μήκους των ποδοειδών προεκβολών. Έτσι, μετά από οξεία πίεση στη ΣΒΜ, ο κυτταροσκελετός των ποδοειδών προεκβολών τροποποιείται με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να διατηρεί την επαρκή κάλυψη της ΣΒΜ με τις ποδοειδείς προεκβολές.

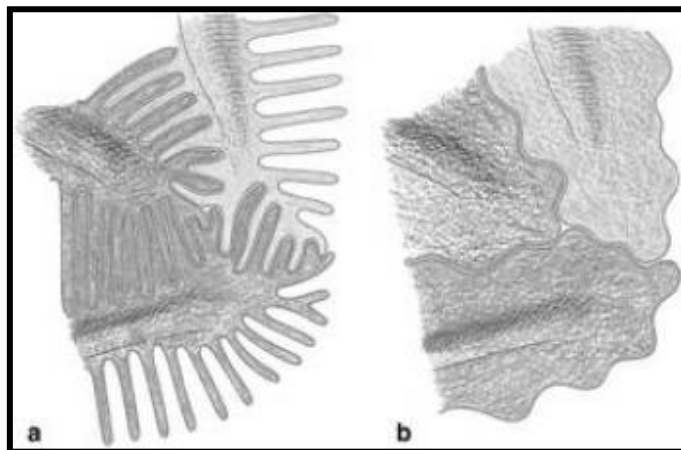
#### 2) Διατμητικό Stress (Τάση)

Η αύξηση στη ροή του υπερδιηθήματος εφαρμόζει εφαπτόμενες δυνάμεις και αυξημένο διατμητικό stress στα ποδοκύτταρα σε δύο διαφορετικές τοποθεσίες του, στις ποδοειδείς προεκβολές, καθώς το υπερδιήθημα ρέει μέσω του σχισμοειδούς διαφράγματος και στην επιφάνεια του σώματος των ποδοκυττάρων, καθώς το υπερδιήθημα ακολουθεί την πορεία του μέσα στο χώρο του Bowman [21].

### II.3.4 ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟΣ ΠΟΔΟΚΥΤΤΑΡΩΝ – ΠΟΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΥΠΕΡΤΡΟΦΙΑ

Κατά την επαγόμενη από το ελαστικό stress διαστολή και τραυματισμό της ΣΒΜ δημιουργείται μια ανάγκη για μεγαλύτερο αριθμό ποδοκυττάρων για να καλύψουν την επιφάνειά της. Έτσι τα ποδοκύτταρα αναγκάζονται να διασταλούν με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί μια παθολογική κατάσταση, η οποία ονομάζεται ποδοκυτταρική υπερτροφία [21]. Κατά την υπερτροφία το σώμα των ποδοκυττάρων τεντώνεται, οι ποδοειδείς προεκβολές τους παραμορφώνονται και εξαλείφονται (**Εικόνα 14**). Δηλαδή, η συχνότητα των σχισμών διήθησης μειώνεται, δίνοντας την εμφάνιση ενός συνεχούς κυτταροπλασματικού φύλλου που καλύπτει τη

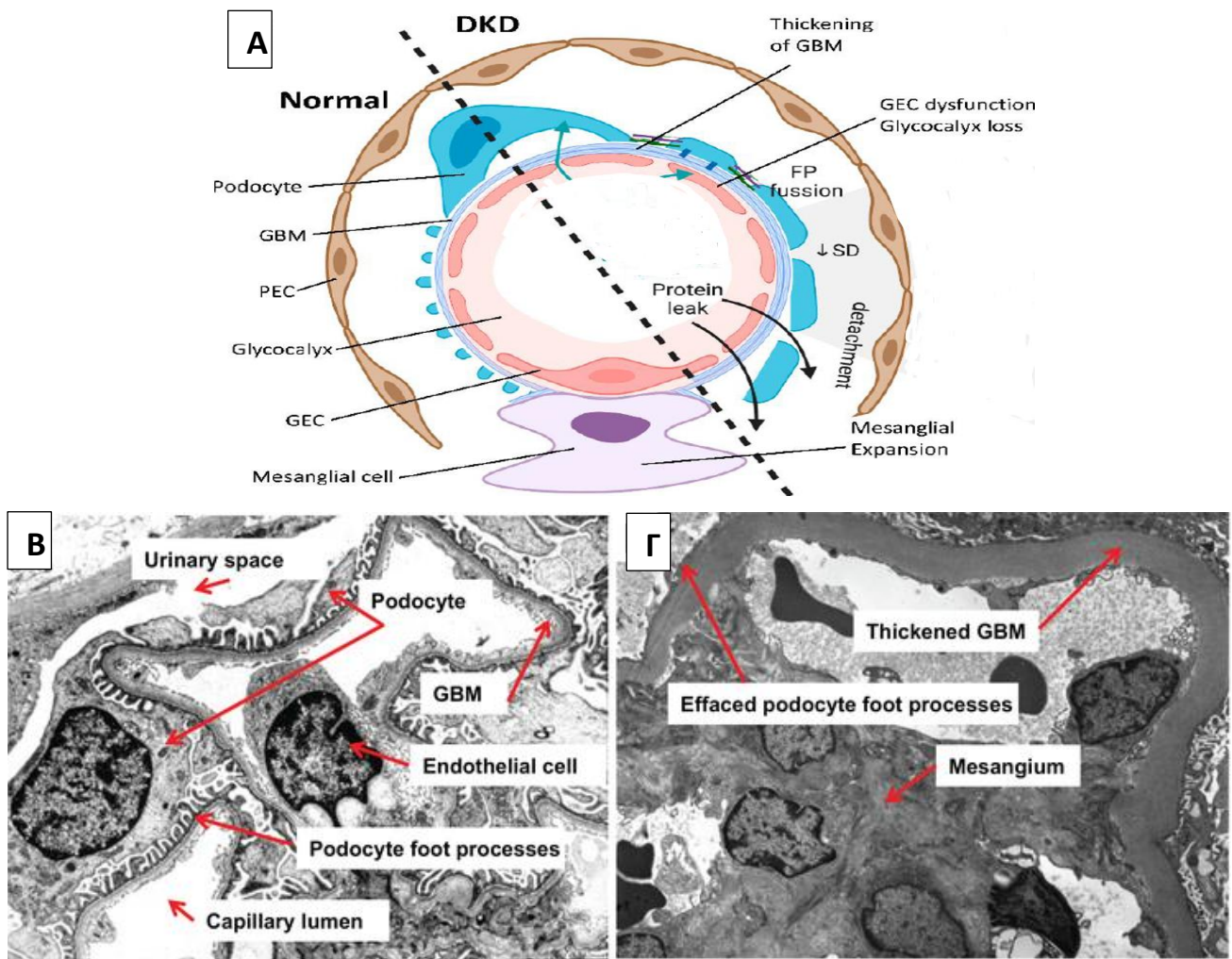
ΣΒΜ. Σύμφωνα με πειραματικά δεδομένα, το μήκος των ποδοειδών εκβολών μειώνεται έως και 70% και το πλάτος αυξάνεται έως και 60% σε σύγκριση με το κανονικό εύρος. Η εξέλιξη αυτή ονομάζεται εξάλειψη ποδοειδών προεκβολών (foot process effacement) (FPE) [12,21].



**Εικόνα 14.** Διαδικασία εξάλειψης ποδοειδών προεκβολών (FPE). a) φυσιολογικό ποδοκύτταρο b) ποδοκύτταρο μετά την εξάλειψη ποδοειδών προεκβολών

Κατά τη διαδικασία της εξάλειψης ποδοειδών προεκβολών προκαλείται παραμόρφωση της δομής του σχισμοειδούς διαφράγματος και αυτό οδηγεί στην αποσύνδεση και αποδιοργάνωση των ποδοειδών προεκβολών και συνολικά των ποδοκυττάρων μεταξύ τους και έτσι στην αποκόλλησή τους από την ΣΒΜ, αφήνοντάς την εκτεθειμένη. Έχει προταθεί ότι η παραμόρφωση της δομής των ποδοειδών προεκβολών αρχίζει με την αναδιάταξη του σκελετού ακτίνης των ποδοκυττάρων, η οποία φυσιολογικά καθορίζει και το σχήμα τους. Οπότε, οποιαδήποτε αναδιάταξη στην ακτίνη του κυτταροσκελετού οδηγεί και σε αλλαγή του σχήματος των ποδοκυττάρων και κατ' επέκταση των ποδοειδών προεκβολών του και του σχισμοειδούς διαφράγματος. Η παραμόρφωση στην δομή του σχισμοειδούς διαφράγματος των ποδοκυττάρων οδηγεί στην διατάραξη της φυσιολογικής λειτουργίας τους, και κατ' επέκταση του ΣΦΔ με αποτέλεσμα τη διαρροή πρωτεϊνών στα ούρα και αλβουμίνης μέσω της ΣΒΜ και έτσι στη δημιουργία της αλβουμινουρίας, που όπως προαναφέρθηκε είναι και η κύρια ένδειξη διαβητικής νεφροπάθειας.

Ο ποδοκυτταρικός τραυματισμός εκτός από την αλβουμινουρία επίσης μπορεί να οδηγήσει και σε σπειραματοσκλήρυνση, νεφρικό σύνδρομο και, με την εξέλιξη της νόσου, σε χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (ΧΝΑ) [12]. Όλες οι μορφολογικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα στο ΣΦΔ του νεφρικού σπειράματος κατά την παθοφυσιολογία της ΔΝ συνοψίζονται στην **εικόνα 15**.



**Εικόνα 15. Α.** Σχηματική απεικόνιση ενός σπειραματικού φράγματος διήθησης (ΣΦΔ) που αποτελεί την κύρια μονάδα διήθησης του νεφρού. Αριστερά απεικονίζονται τα φυσιολογικά μορφολογικά χαρακτηριστικά του ΣΦΔ ενώ δεξιά αυτά κατά τη διαβητική νεφροπάθεια. Το ΣΦΔ αποτελείται από εξειδικευμένες δομές: τα περιφερειακά επιθηλιακά κύτταρα (PECs), τα μεσαγγειακά κύτταρα, τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα (ποδοκύτταρα) με τις αλληλοδιαχωριστικές ποδοκυτταρικές προεκβολές (FP) προσαρτημένες στη σπειραματική βασική μεμβράνη (ΣΒΜ) (GBM), τα σπειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα (GEC) και τον γλυκοκάλυκα. Μεταξύ των ποδοκυτταρικών προεκβολών βρίσκεται το σχισμοειδές διάφραγμα που σχηματίζει μια γέφυρα ενώνοντας τις προεκβολές αυτές μαζί.

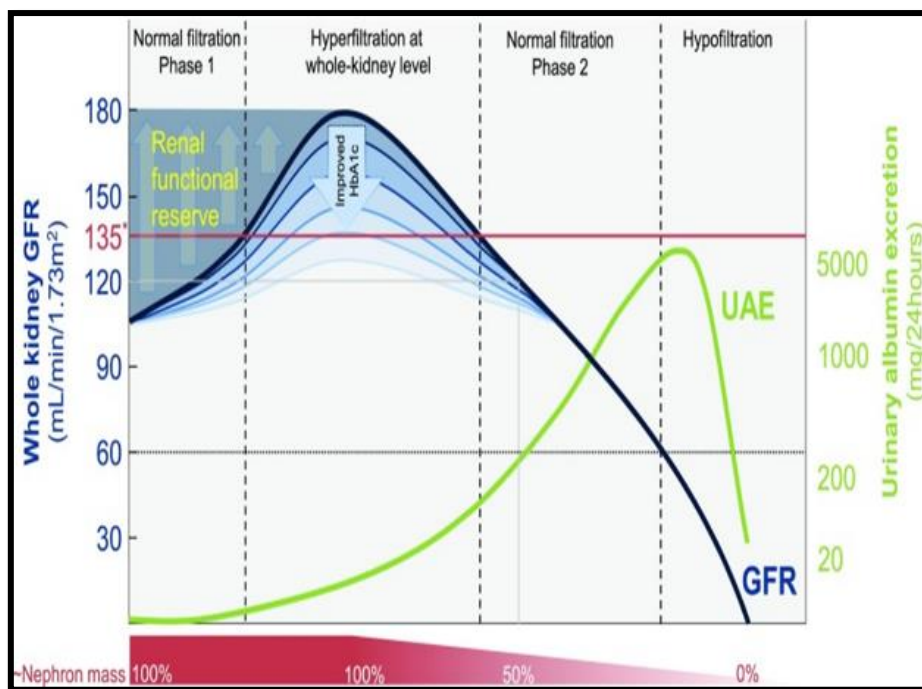
Στην ΔΝ, δημιουργούνται σημαντικές μορφολογικές αλλαγές στο νεφρικό σπείραμα που περιλαμβάνουν την πάχυνση της ΣΒΜ, τη διαστολή της μεσαγγειακής μήτρας με την αυξημένη εναπόθεση εξωκυττάριας μήτρας και την επακόλουθη απόφραξη τα σπειραματικών τριχοειδών. Πρόσθετες αλλαγές είναι η δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων, η αποικοδόμηση του γλυκοκάλυκα τους, η εξάλειψη των ποδοκυτταρικών προεκβολών, η διατάραξη της αρχιτεκτονικής του σχισμοειδούς διαφράγματος, η αποκόλληση ποδοκυττάρων από την ΣΒΜ και επακόλουθη διαρροή πρωτεϊνών στα ούρα. **Β και Γ.** Η φυσιολογική και παθολογική μορφολογία αντιστοιχώς του ΣΦΔ από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

### II.3.5 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ GFR ΚΑΙ ΑΛΒΟΥΜΙΝΟΥΡΙΑΣ

Στα αρχικά στάδια της νόσου η υπερδιήθηση και το υψηλό GFR παρέχουν μια ένδειξη έναρξης της διαβητικής νεφροπάθειας (ΔΝ). Αντίθετα, το μειωμένο GFR, όταν βρίσκεται σε τιμές  $>60\text{ml}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ , μαζί με την αλβουμινουρία, αποτελούν το βασικό δείκτη κινδύνου ΧΝΑ και νεφρικού θανάτου στον διαβήτη.

Στην κλασική, πρωτεϊνουρική οδό πέντε σταδίων της ΔΝ, η αρχική φάση χαρακτηρίζεται από μια απόλυτη αύξηση του συνολικού ρυθμού σπειραματικής διήθησης, GFR, όλων των λειτουργικών νεφρώνων γνωστή ως σπειραματική υπερδιήθηση (**Εικόνα 16**). Οι αναφερόμενες τιμές της υπερδιήθησης των νεφρών διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό: μεταξύ 10% και 67% σε ΣΔΤ1 (με τιμές GFR έως  $162\text{ ml} / \text{min}$  ανά  $1,73\text{ m}^2$ ) και 6% - 73% σε ασθενείς με ΣΔΤ2 (έως  $166\text{ ml} / \text{min}$  ανά  $1,73\text{ m}^2$ ). Γενικά, ο GFR αυξάνεται κατά περίπου 27% και 16% σε πρόσφατα διαγνωσμένους ασθενείς με T1DM και T2DM, αντίστοιχα. Η επικρατούσα υπόθεση είναι ότι η υπερδιήθηση στο διαβήτη προηγείται της έναρξης της αλβουμινουρίας και της μειωμένης νεφρικής λειτουργίας. Τα υψηλότερα επίπεδα του GFR εμφανίζονται λίγο μετά την διάγνωση του διαβήτη ή ακόμη και στον προ-διαβήτη υποδεικνύοντας την προοδευτική βλάβη του νεφρού λόγω της αυξημένης σπειραματικής υδραυλικής πίεσης ( $P_{\text{GLO}}$ ) και της τριχοειδούς ροής κυρίως του υπερδιήθηματος και λιγότερο των μακρομορίων όπως η αλβουμίνη. Επιπλέον, το αυξημένο GFR στους εναπομείναντες λειτουργικούς νεφρώνες επιταχύνει τη μείωση της νεφρικής λειτουργίας στον μακροχρόνιο διαβήτη [22].

Ο GFR παραμένει αυξημένος μέχρι το στάδιο όπου τα επίπεδα της αλβουμίνης στα ούρα είναι ακόμα χαμηλά, όταν δηλαδή έχουμε μικροαλβουμινουρία. Ωστόσο, μετά την εναπόθεση μεγαλύτερων ποσοτήτων αλβουμίνης στα ούρα δηλαδή στην μακροαλβουμινουρία, το GFR αρχίζει να μειώνεται σταδιακά και όπως προαναφέραμε ο συνδυασμός αυτών των δύο καταστάσεων είναι μια σοβαρή ένδειξη για κίνδυνο ανάπτυξης ΧΝΑ [16,22].



**Εικόνα 16.** Κλασική πορεία του ρυθμού σπειραματικής διήθησης GFR και της ουρικής έκκρισης αλβουμίνης UAE σύμφωνα με τη φυσική εξέλιξη της διαβητικής νεφροπάθειας. Τα μέγιστα επίπεδα του GFR μπορεί να παρατηρηθούν σε προ διαβήτη ή λίγο μετά τη διάγνωση του διαβήτη και μπορεί να φτάσουν έως και 180 ml/min. Ο GFR παρουσιάζεται αυξημένος μέχρι ώσπου τα επίπεδα αλβουμίνης στα ούρα είναι ακόμα χαμηλά, στην μικροαλβουμινουρία. Κατά τον σχηματισμό της μακροαλβουμινουρίας το GFR αρχίζει να μειώνεται σταδιακά και ο συνδυασμός των δύο αυτών καταστάσεων αποτελεί σοβαρή ένδειξη για κίνδυνο ανάπτυξης χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας.

## II.4 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ STRESS ΣΤΗΝ ΔΙΑΒΗΤΙΚΗ ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑ

Εκτός από όλα τα παραπάνω αίτια και μηχανισμούς που συμβάλουν στη δημιουργία και εξέλιξη της διαβητικής νεφροπάθειας (ΔΝ), σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και το οξειδωτικό stress και οι επιπτώσεις του [6].

Το οξειδωτικό stress επηρεάζει κυρίως τα ενδοθηλιακά-κύτταρα του σπειράματος, ο τραυματισμός των οποίων συμβάλλει στην παθογένεση της ΔΝ. Ένας πιθανός μηχανισμός τραυματισμού των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι μέσω των δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), που παίζουν άμεσο ρόλο στο διαβήτη και τις επιπλοκές του συμπεριλαμβανομένης της νεφροπάθειας. Μεταξύ αυτών είναι οι ελεύθερες ρίζες, όπως του υπεροξειδίου  $O_2^{\bullet-}$  ή η υδροξυλική ρίζα ( $OH^{\bullet}$ ) και μη ριζικά ROS, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ). Οι ROS κατέχουν σημαντικό φυσιολογικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση ως προς τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την επιβίωση, η οποία υπόκειται σε αυστηρή ρύθμιση και εξισορρόπηση από την

αντιοξειδωτική απόκριση του κυττάρου. Η περίσσεια των ROS, με την εξαίρεση της ανάπτυξης υψηλών τοπικών επιπέδων για την καταπολέμηση των παθογόνων, οδηγεί σε οξειδωτικό stress με αποτέλεσμα κυτταρικές αλλαγές που μπορεί να οδηγήσουν σε δυσλειτουργία των οργάνων. Το οξειδωτικό stress προερχόμενο από τις κύριες πηγές ROS έχει αναφερθεί ως μηχανισμός στην αγγειακή απορρύθμιση ασθενειών όπως ο διαβήτης και οι επιπλοκές του. Μεταβολικές αλλαγές (π.χ. υπεργλυκαιμία) που συνοδεύουν την διαβητική παθολογία οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα επιβλαβών ουσιών στην κυκλοφορία (π.χ. γλυκιωμένες πρωτεΐνες και ελεύθερα λιπαρά οξέα), κορεσμό των οδών μεταβολισμού της γλυκόζης και διαταραγμένη ισορροπία κυτταρικής οξειδοαναγωγής. Στα πειράματα, συγκεκριμένα, το διαβητικό περιβάλλον προκαλεί οξειδωτικές αντιδράσεις stress σε όλα τα κύτταρα μέσω διαφόρων ενδογενών οδών, συμπεριλαμβανομένης της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια και των NADPH (NOX) οξειδασών [6].

Μελέτες [23] που χρησιμοποίησαν αυξημένη εξωκυτταρική γλυκόζη (30 mmol/L) βρήκαν ότι μπορεί να διεγείρει υπό συγκεκριμένες συνθήκες γρήγορα την ενδοκυτταρική δημιουργία ROS στα ποδοκύτταρα μέσω της οξειδάσης NADPH. Η αύξηση του μιτοχονδριακού ROS και η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία παίζει επίσης κρίσιμο ρόλο στην παθογένεση της ΔΝ. Υπάρχουν πλέον αρκετά στοιχεία που υποστηρίζουν ότι οι διάφορες πηγές των ROS, η χρονική στιγμή, η τοποθεσία και ο τύπος της οξειδωτικής βλάβης που δημιουργείται είναι σημαντικά για την έναρξη και την εξέλιξη των νεφρικών παθήσεων [6].

#### **II.4.1 ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΟΔΟΙ**

##### **➤ Οξειδάση NADPH (NOX)**

Έχει προταθεί ότι οι οξειδάσες NADPH (NADPH Oxidases, NOX) συμβάλλουν στην έναρξη και την εξέλιξη της ΔΝ και άλλων διαβητικών επιπλοκών και ότι η δραστηκότητά τους αυξάνεται σημαντικά ακολουθώντας την έναρξη της υπεργλυκαιμίας, την αυξημένη κυκλοφορία της αγγειοτενσίνης II (Ang II), των τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκίωσης (Advanced Glycation End Products, AGEs) και του αυξητικού παράγοντα TGFβ1 [24]. Η βιολογική λειτουργία των ενζύμων NOX είναι η παραγωγή ROS με μεταφορά ηλεκτρονίων διαμέσου των βιολογικών μεμβρανών. Υπάρχουν επτά ισομορφές οξειδάσης NADPH, NOX 1-5 και οι διπλές οξειδάσες (DUOX) 1 και 2. Όλες οι ισομορφές καταλύουν τη μείωση του μοριακού οξυγόνου ( $O_2$ ) στο υπεροξειδίο ( $O_2^-$ ) χρησιμοποιώντας την NADPH ως δότη ηλεκτρονίων. Ο νεφρός έχει ξεχωριστό προφίλ έκφρασης των NOX εντός των νεφρικών σωληναριακών κυττάρων, των πειραματικών κυττάρων και στο αγγειακό σύστημα.

Την τελευταία δεκαετία, σημαντική ερευνητική προσπάθεια έχει επικεντρωθεί στη λειτουργία των NOX στο διαβητικό νεφρό και ιδιαίτερα στη NOX4 λόγω του εμπλουτισμού της στους νεφρικούς ιστούς. Στο σπείραμα, η υπερέκφραση της NOX4 στα μεσαγγειακά κύτταρα σε απόκριση στην Ang II σχετίστηκε με υπερτροφία και συσσώρευση ινονεκτίνης και μαζί με την NOX1 και το κυτόχρωμα CYP4A αποδείχθηκε ότι συμβάλλουν στην αυξημένη παραγωγή ROS στα ποδοκύτταρα σε απόκριση στα υψηλά επίπεδα γλυκόζης [25]. Αντίθετα, άλλες μελέτες [26] δείχνουν ότι τα επίπεδα έκφρασης NOX4 ήταν χαμηλά αντί να υπερεκφράζονται σε σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα στη χρόνια νεφρική νόσο (XNN). Είναι ενδιαφέρον ότι η υπερέκφραση ανθρώπινου NOX2 σε ενδοθηλιακά κύτταρα Akita ΣΔΤ1 ποντικών οδήγησε σε αυξημένη παραγωγή υπεροξειδίου, μειωμένο πάχος του ενδοθηλίου, διαστολή της μεσαγγειακής μήτρας και αυξημένη βλάβη ποδοκυττάρων με πρωτεϊνουρία, σε πειραματικά μοντέλα που αποτελούν σχετικά ανθεκτικό στέλεχος στην ανάπτυξη ΔΝ. Αυτές οι μελέτες υποδηλώνουν ότι η ειδική για τα ενδοθηλιακά κύτταρα παραγωγή ROS μέσω της οξειδάσης NOX μπορεί να οδηγήσει σε πειραματικό τραυματισμό στην ΔΝ [6].

#### ➤ **Οξειδοαναγωγή Ξανθίνης (Xanthine Oxidoreductase, XOR)**

Οι οξειδοαναγωγάσες της ξανθίνης (XOR) είναι η αφυδρογονάση της ξανθίνης (XDH) και η οξειδάση της ξανθίνης (XO), οι οποίες αποτελούν εναλλακτικές μορφές του ίδιου ενζύμου που κωδικοποιείται από το γονίδιο XDH. Καταλύουν την οξείδωση υποστρώματων πουρίνης, ξανθίνης και υποξανθίνης και χρησιμοποιούν το  $\text{NAD}^+$  ως δέκτη ηλεκτρονίων. Στους ανθρώπους, η ενζυματική οξείδωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη και περαιτέρω στο ουρικό οξύ από τη XO χρησιμοποιεί το  $\text{O}_2$  ως δέκτη ηλεκτρονίων και παράγει  $\text{H}_2\text{O}_2$  και  $\text{O}_2^-$ . Το ουρικό οξύ (UA) είναι το τελικό σημείο του μεταβολισμού της πουρίνης στους ανθρώπους και τόσο η υπερουριχαιμία όσο και η υποουριχαιμία μπορεί να έχουν αρνητική επίπτωση στην υγεία των νεφρών. Έχει βρεθεί ότι η υψηλή δραστηριότητα της XOR συσχετίζεται με υψηλά επίπεδα UA ορού, καθώς και με την αντίσταση στην ινσουλίνη, την παχυσαρκία και την υποκλινική φλεγμονή, και ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας διαβητικών επιπλοκών στους ασθενείς με ΣΔΤ2 [27]. Είναι σημαντικό ότι η αυξημένη XOR στην κυκλοφορία έχει ισχυρή συσχέτιση με την νεφρική νόσος τελικού σταδίου και έχει αποδειχθεί ότι είναι παράγοντας κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα και ΔΝ [6].

### ➤ Μιτοχονδριακό ROS

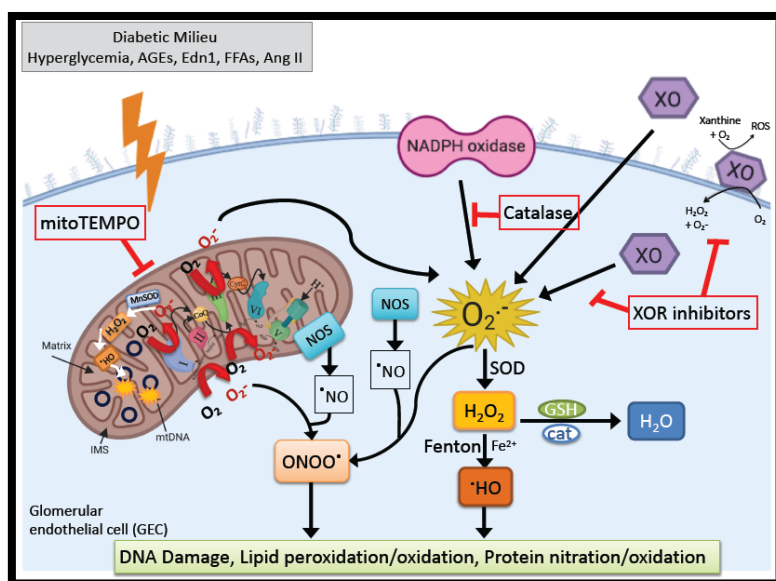
Τα μιτοχόνδρια είναι τα οργανίδια που παράγουν ενέργεια στα κύτταρα μέσω της παραγωγής ATP με τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Ο νεφρός καταναλώνει μεγάλη ποσότητα ενέργειας για την επαναρρόφηση μεγάλων ποσοτήτων υγρών και διαλυμάτων στο νεφρικό σωληναριακό επιθήλιο. Ως εκ τούτου, η νεφρική νόσος μπορεί να παρατηρηθεί σε κληρονομικές μιτοχονδριακές διαταραχές, συμπεριλαμβανομένων των συνδρόμων Kearns – Sayre, Pearson, DIDMOAD (σύνδρομο Wolfram) και το σύνδρομο Leigh. Οι μιτοχονδριακές μεταλλάξεις έχουν συσχετιστεί με την έναρξη της εστιακής τμηματικής σπειραματοσκλήρυνσης (FSGS) στην παιδική ηλικία και στο ανθεκτικό στα στεροειδή νεφρωτικό σύνδρομο και η μιτοχονδριακή λειτουργία φαίνεται να είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας του ΣΦΔ. Αυτό συμβαίνει παρόλο που τα ποδοκύτταρα υπό φυσιολογικές συνθήκες βασίζονται στην αναερόβια γλυκόλυση ως κυριότερη πηγή ενέργειας. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα ομοίως παράγουν >75% του ATP μέσω γλυκόλυσης παρά την πρόσβαση στο οξυγόνο.

Οι ROS είναι παραπροϊόντα της αντίδρασης της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και σημαντικό μέρος των ηλεκτρονίων που κανονικά διαφεύγουν από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων ως ανιόντα υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ). Αυτό το ποσοστό μπορεί να αυξηθεί έως και 2% υπό συνθήκες οξειδωτικού stress, με αποτέλεσμα βλάβη στα μιτοχόνδρια και ενεργοποίηση ενός φαύλου κύκλου μεγαλύτερης παραγωγής ROS, που τελικά οδηγεί σε απώλεια της λειτουργίας του κυττάρου και των ιστών. Η επιβλαβής επίδραση της περίσσειας μιτοχονδριακού ROS, μαζί με τη μείωση των αντιοξειδωτικών αμυντικών συστημάτων εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της ΔΝ, που επηρεάζει τόσο το πειραματικό όσο και το σωληναριακό σύστημα. Σε μια έρευνα [28] το οξειδωτικό stress και η βλάβη του DNA σε ευαίσθητα στην ΔΝ ποντίκια οδήγησε σε απώλεια των ενδοθηλιακών πόρων (fenestrae) και σε μεταγενέστερη εξάντληση των ποδοκυττάρων. Άλλες μελέτες [29] έχουν δείξει ότι το προφίλ mRNA απομονωμένων ενδοθηλιακών και ποδοκυττάρων από διαβητικούς νεφρούς ποντικών έδειξαν διακριτούς ενισχυμένους μεταβολικούς δρόμους που εμπλέκουν μιτοχονδριακή λειτουργία και οξειδωτικό stress στο ενδοθηλιακό τμήμα. Παράλληλα, οι αλλαγές στη ρύθμιση των γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης ήταν τα σημαντικότερα μονοπάτια που επηρεάστηκε σε ποδοκύτταρα που απομονώθηκαν από διαβητικούς ποντικούς. Επιπρόσθετα, οι επιβλαβείς επιδράσεις στο ενδοθηλιακό γλυκοκάλυκα λόγω αυξημένης έκθεσης σε μιτοχονδριακά ROS συμβάλλουν στην αποικοδόμηση του ΣΦΔ [6].



## II. 4.2 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΟΔΩΝ ROS

Στο διαβήτη, το οξειδωτικό stress μπορεί να προκύψει από μια αλληλεπίδραση μεταξύ διαφορετικών πηγών ROS και αυτό μπορεί να διαταράξει τη λειτουργία των σπειραματικών ενδοθηλιακών κυττάρων (**Εικόνα 17**). Τόσο το ROS όσο και το UA είναι προϊόντα αντίδρασης XOR και έχει φανεί ότι επάγουν μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, μειωμένη μιτοχονδριακή μάζα και παραγωγή ATP στον διαβήτη. Τέλος, η αυξημένη ενεργοποίηση της οξειδάσης NADPH που εξαρτάται από την αγγειοτενσίνη II στον διαβήτη μπορεί να επάγει μιτοχονδριακή δυσλειτουργία με επακόλουθο σχηματισμό ROS από τα μιτοχόνδρια.



**Εικόνα 17.** Δημιουργία περίσσειας δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Παθολογικές μεταβολικές καταστάσεις που σχετίζονται με σακχαρώδη διαβήτη στο νεφρό (συμπεριλαμβανομένης της υπεργλυκαιμίας, της αυξημένης κυκλοφορίας των τελικών προϊόντων γλυκοζυλίωσης (AGEs) και ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFAs)), καθώς επίσης και η ενεργοποίηση του RAAS που οδηγεί στην απελευθέρωση της αγγειοτενσίνης II (Ang II) που μπορεί να επιδεινώσει την παραγωγή ROS πάνω από την αντιοξειδωτική ικανότητα του κυττάρου και αυτή η ανισορροπία συμβάλλει στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία στο DKD. Τα ROS παράγονται από ενζυματικές και μη ενζυματικές αντιδράσεις οξειδοαναγωγής κατά τη διάρκεια του κυτταρικού μεταβολισμού υπό φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Το ανιόν υπεροξειδίου (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), που παράγεται στα μιτοχόνδρια, στην πλασματική μεμβράνη, στα υπεροξισώματα και στο κυτοσόλιο, γίνεται η πρόδρομη ελεύθερη ρίζα για τη δημιουργία άλλων μορίων ROS. Στη συνέχεια, η κυτοσολική υπεροξειδική δισμουτάση CuZn (SOD) και το μιτοχονδριακό MnSOD μετατρέπουν το O<sub>2</sub><sup>-</sup> σε H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, το οποίο αποδίδει εξαιρετικά δραστικές ρίζες υδροξυλίου ·OH μέσω αλληλεπίδρασης με ανηγμένα ιόντα μετάλλων μετάπτωσης (όπως Fe και Cu) σε μια αντίδραση Fenton. Εκτός από τις ROS, τα κύτταρα δημιουργούν επίσης δραστικές μορφές αζώτου (RNS). Τα κύρια RNS περιλαμβάνουν μονοξείδιο του αζώτου (NO), τα υπεροξυνιτρώδη (ONOO<sup>-</sup>), και διοξείδιο του αζώτου (NO<sub>2</sub>). Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) παράγεται από τρεις ισομορφές συνθάσες

νιτρικού οξειδίου (NOS). Τέλος, η περίσσεια ROS που παράγεται προκαλεί οξειδωτική βλάβη στο μιτοχονδριακό και πυρηνικό DNA, οξείδωση λιπιδίων και πρωτεϊνών, νίτρωση πρωτεϊνών και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία.

---

### III. Η ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΗ ΣΤΗΝ ΔΙΑΒΗΤΙΚΗ ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑ

---

Τα παραπάνω στοιχεία αποδεικνύουν το σημαντικό ρόλο που έχει η πρόληψη, διάγνωση και διαχείριση της διαβητικής νεφροπάθειας. Παρ' όλα αυτά είναι δύσκολο να προσδιοριστεί ποιοι ασθενείς με ΣΔΤ2 έχουν υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης ΔΝ βάσει του ρυθμού σπειραματικής διήθησης και της αλβουμινουρίας. Ως εκ τούτου, υπάρχει επιτακτική ανάγκη εύρεσης βιοδεικτών που μπορούν να αναγνωρίσουν πληθυσμούς υψηλού κινδύνου για ανάπτυξη ΔΝ, μέσω των οποίων να μπορούμε να προβλέψουμε τη νόσο και να αποτρέψουμε την εξέλιξή της από το αρχικό στάδιο.

Η μεταβολομική αποτελεί μια νέα προσέγγιση και σημαντικό εργαλείο για την ταχεία αναγνώριση των ολικών μεταβολικών και βιοχημικών αλλαγών στα βιολογικά συστήματα. Η συγκεκριμένη προσέγγιση έχει εφαρμοστεί εκτενώς για τη διάγνωση και την αξιολόγηση διαβητικών ασθενών, την ταυτοποίηση πιθανών ενδογενών βιοδεικτών και την καταχώριση σημαντικών πληροφοριών για την παθογένεση και παθοφυσιολογία της νόσου με βασικό πλεονέκτημα τη δυνατότητα αξιολόγησης συστημικών αποκρίσεων σε κάθε μικρή μεταβολική διαταραχή [30].

#### III.1 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ (METABOLOMICS)

Η μεταβολομική είναι η επιστημονική μελέτη βιοχημικών διεργασιών, που περιλαμβάνουν μεταβολίτες, δηλαδή υποστρώματα μικρών μορίων, ενδιάμεσα προϊόντα και τελικά προϊόντα διεργασιών κυτταρικού μεταβολισμού. Το σύνολο των μεταβολιτών αυτών ονομάζεται μεταβόλωμα (metabolome). Συγκεκριμένα, η μεταβολική χαρακτηρίζεται ως η «συστηματική μελέτη των μοναδικών χημικών δακτυλικών αποτυπωμάτων που αφήνουν πίσω οι συγκεκριμένες κυτταρικές διεργασίες» μέσω της μελέτης του μεταβολικού προφίλ [31,32].

Η μεταβονομική ορίζεται ως η ποσοτική μέτρηση των πολυπαραμετρικών μεταβολικών αποκρίσεων των ζωντανών συστημάτων σε παθοφυσιολογικά ερεθίσματα ή γενετικές τροποποιήσεις [33]. Επίσης αποτελεί ένα σύστημα στατιστικής επεξεργασίας του συνολικού προφίλ των μεταβολιτών που ανιχνεύονται στα βιολογικά υγρά και αντανακλά φυσιολογικές καταστάσεις και την απόκριση του οργανισμού σε διάφορες παθολογικές οντότητες [34]. Στην παρούσα εργασία η μελέτη του μεταβολικού προφίλ των ούρων της διαβητικής νεφροπάθειας έγινε με μεταβονομική ανάλυση.

## III.2 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΗΣ

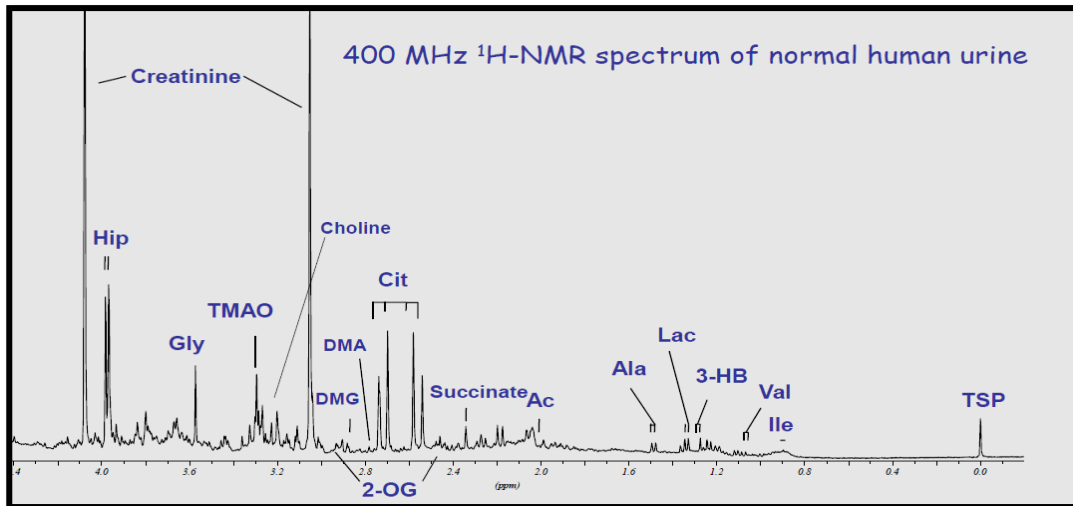
### III.2.1 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Οι κυριότερες φασματοσκοπικές τεχνικές στη μεταβολομική που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των διαφόρων μεταβολιτών είναι η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου ( $^1\text{H-NMR}$ , Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy), ο συνδυασμός αέριας χρωματογραφίας/φασματομετρίας μάζας (GC/MS, Gas Chromatography / Mass Spectrometry) και η υγρή χρωματογραφία/φασματομετρία μάζας (LC-MS, Liquid Chromatography/Mass Spectrometry). Στην παρούσα εργασία για τη μελέτη της διαβητικής νεφροπάθειας θα χρησιμοποιηθεί η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου  $^1\text{H-NMR}$  λόγω των πλεονεκτημάτων που έχει η τεχνική αυτή στην ανάλυση βιολογικών υγρών και ειδικότερα των ούρων [28].

#### III.2.1.1 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΟΝΙΟΥ $^1\text{H-NMR}$

Η φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$  είναι εξαιρετικά αναπαραγώγιμη, ποσοτική τεχνική, που απαιτεί ελάχιστη προετοιμασία δείγματος, γεγονός που την καθιστά ιδανική τεχνική για ανάλυση βιολογικών υγρών όπως τα ούρα (**Εικόνα 18**). Η μονοδιάστατη (1D) φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$  είναι η πιο συνήθης μέθοδος ανάλυσης του μεταβολικού προφίλ σε σύγκριση με την διδιάστατη (2D) NMR της οποίας η εφαρμογή είναι πιο περιορισμένη [35].

Η μεταβολομική ανάλυση βασισμένη στην τεχνική  $^1\text{H-NMR}$  μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για τη στοχευμένη (targeted) όσο και για τη μη στοχευμένη (untargeted) προσέγγιση. Στην στοχευμένη ανάλυση επιλέγονται συγκεκριμένοι μεταβολίτες για ποσοτικοποίηση, ενώ η μη στοχευμένη προσέγγιση της μεταβολομικής παρέχει πληροφορίες για το σύνολο των μεταβολιτών που περιέχονται στα φάσματα που λαμβάνονται από τη φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$ . Η τελευταία χρησιμοποιεί μια αμερόληπτη προσέγγιση και αναζητά όλους τους μεταβολίτες σε ένα συγκεκριμένο εύρος αναλυτικών παραμέτρων, καθώς παρέχει μόνο δεδομένα σχετικά με τις διαφορές στην αφθονία των μεταβολιτών παρά στις απόλυτες συγκεντρώσεις [36].



Εικόνα 18. Τυπικό φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  δείγματος ούρων υγιούς ατόμου.

### ➤ Επεξεργασία Φασμάτων $^1\text{H-NMR}$

Για να απαντηθούν σημαντικά ερωτήματα είναι απαραίτητος ο κατάλληλος χειρισμός των δεδομένων. Συνήθως αυτό περιλαμβάνει την επεξεργασία των φασμάτων (ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση μεταβολιτών) και εν συνεχεία τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων [28]. Πιο συγκεκριμένα, τα φασματοσκοπικά δεδομένα του δείγματος ούρων, που λαμβάνονται από την τεχνική του  $^1\text{H-NMR}$ , αρχικά πρέπει να υποβληθούν σε μια προεπεξεργασία η οποία περιλαμβάνει διόρθωση της φάσης και βασικής γραμμής του φάσματος καθώς και τη βαθμονόμησή του. Επίσης όταν πρόκειται για μη στοχευμένη ανάλυση μπορεί να απαιτείται η αποκοπή συγκεκριμένων περιοχών του φάσματος, οι οποίες σχετίζονται με κατάλοιπα νερού και ουρίας (π.χ 4.63-5.05 ppm και 5.54-6.0 ppm) [37].

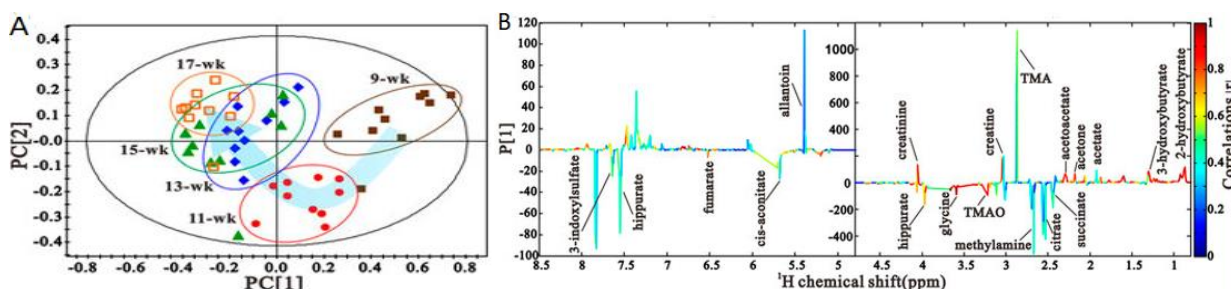
### III.2.2 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα δεδομένα που λαμβάνονται από την στοχευμένη ανάλυση πρέπει να υποβληθούν σε στατιστική ανάλυση έτσι ώστε να γίνει αναγνώριση στατιστικά σημαντικών βιοδεικτών και διάκριση ομοιοτήτων ή να διαπιστωθούν διαφορές μεταξύ της φυσιολογικής κατάστασης και της υπό εξέταση παθολογικής κατάστασης [38].

### III.2.3 ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ (MULTIVARIATE DATA ANALYSIS, MDA)

Η επεξεργασία του συνόλου των δεδομένων που λαμβάνεται από τις διάφορες αναλυτικές διαδικασίες ονομάζεται πολυπαραγοντική ανάλυση δεδομένων (Multivariate Data Analysis, MDA). Η πιο γνωστή μέθοδος της πολυπαραγοντικής ανάλυσης είναι η μη εποπτευόμενη τεχνική της

ανάλυσης κυρίων συνιστωσών (PCA-Principal Component Analysis) και οι εποπτευόμενες τεχνικές, όπως η διαχωριστική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA- Partial Least Squares Discriminant Analysis) και η διαχωριστική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων σε ορθογώνια προβολή (OPLS DA- Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis) [31,32]. Αυτές οι μέθοδοι στοχεύουν στη διάκριση των υπό μελέτη ομάδων και στον προσδιορισμό μεταβολιτών σε περίπλοκα σύνολα δεδομένων [39]. Για το διαχωρισμό και τη διαφοροποίηση των μεταβολιτών οι μέθοδοι αυτοί στηρίζονται στην χρήση δύο κυρίων συνιστωσών, την PC1 στον Χ άξονα και την PC2 στον Υ άξονα και την PLS1 και PLS2 αντιστοίχως με την βοήθεια ενός διαγράμματος το οποίο ονομάζεται scores plot (**Εικόνα 19.A**), ενώ επίσης χρησιμοποιείται το γράφημα φορτίων (loadings plot) για την παρουσίαση της συμβολής των μεταβολιτών στη διάκριση των πληθυσμών της προς μελέτη νόσου, στην δική μας περίπτωση στη διαβητική νεφροπάθεια (**Εικόνα 19.B**) [39][40]. Οι μέθοδοι αυτοί λόγω του ότι δεν χρησιμοποιούνται τόσο για ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων μεταβολιτών παρά για μια συνολική εικόνα του μεταβολικού προφίλ, αποτελούν κυρίως μη στοχευμένες προσεγγίσεις (untargeted) [36] [41].



**Εικόνα 19. (A)** Το scores plots της μεθόδου PLS-DA βασισμένα σε φασματοσκοπικά δεδομένα <sup>1</sup>H-NMR από δείγμα ούρων διαβητικών ποντικών ηλικίας 9-εβδομάδων (■), 11 εβδομάδων (●), 13 εβδομάδων (◆), 15 εβδομάδων (▲) και 17 εβδομάδων (□). **(B)** Το γράφημα φορτίων (loadings plot) που αποκαλύπτει του μεταβολίτες με τις μεγαλύτερες εντάσεις που είναι υπεύθυνες για τον διαχωρισμό των ομάδων στο αντίστοιχο scores plot [40].

### ➤ Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA)

Όπως προαναφέρθηκε η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA) αποτελεί μία μη εποπτευόμενη τεχνική και είναι η πιο χρησιμοποιούμενη μέθοδος πολυπαραγοντικής ανάλυσης. Η PCA στοχεύει στη μείωση των αρχικών μεταβλητών με νέες μεταβλητές τις οποίες αποτελούν οι κύριες συνιστώσες και προέρχονται από το γραμμικό συνδυασμό των αρχικών μεταβλητών. Η πρώτη κύρια συνιστώσα (PC1) αφορά τη μεγαλύτερη δυνατή διακύμανση που δημιουργείται μεταξύ των αρχικών μεταβλητών με τη δεύτερη κύρια συνιστώσα (PC2) να έχει την αμέσως επόμενη μεγαλύτερη

διακύμανση, και ούτω καθεξής. Η PCA συνολικά στοχεύει στην όσο δυνατή ελάττωση του αριθμού των κύριων συνιστωσών έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί καλύτερη εξήγηση των δεδομένων και μεταβλητών της ανάλυσης. Στη μεταβιομική η PCA χρησιμοποιείται κυρίως ως αρχική προσέγγιση για να ληφθεί μια γενική εικόνα των προς μελέτη μεταβολικών προφίλ, παρέχοντας πληροφορίες όσο αφορά τις τάσεις (trends) σε αυτά, και σε λιγότερο βαθμό την εύρεση στοιχείων με ακραίες τιμές, τα outliers.

➤ **Προβολή Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων σε Λανθάνουσες Τιμές (Partial Least Square analysis, PLS)**

Η προβολή μερικών ελαχίστων τετραγώνων σε λανθάνουσες δομές (Partial Least Squares analysis, PLS) αποτελεί μία εποπτευόμενη μέθοδο και στις πιο πολλές μεταβολομικές μελέτες είναι συμπληρωματική και συνδυάζεται με την PCA για την λήψη ακριβέστερων αποτελεσμάτων. Όπως και η PCA, η PLS στοχεύει στην μείωση των αρχικών μεταβλητών με την διαφορά ότι τις νέες μεταβλητές αποτελούν οι λανθάνουσες μεταβλητές. Συχνά στην μεταβολομική χρησιμοποιείται ο όρος PLS-DA, δηλαδή ανάλυση προβολών μερικών ελαχίστων τετραγώνων σε λανθάνουσες τιμές με διαχωρισμό (Partial Least Squares-Discriminant Analysis, PLS-DA). Με χρήση της σχέσης μεταξύ των μεταβλητών ενδιαφέροντος στην PLS-DA γίνεται διαχωρισμός των δειγμάτων προς σύγκριση βάση της τάξης στην οποία έχουν κατηγοριοποιηθεί, όπως π.χ. υγιείς άτομα και ασθενείς και αυτό ενισχύει τον διαχωρισμό μεταξύ των συγκεκριμένων ομάδων, παρέχοντας παράλληλα πληροφορίες για τις μεταβολικές διαφορές ανάμεσα τους.

➤ **Ορθογώνια προβολή ελαχίστων τετραγώνων σε λανθάνουσες δομές (Orthogonal Partial Least Squares, O-PLS)**

Ένα μειονέκτημα της μεθόδου PLS (και PLS-DA) είναι ότι ορισμένα μεταβολικά χαρακτηριστικά δεν σχετίζονται με τις μεταβλητές ενδιαφέροντος (λανθάνουσες μεταβλητές) και μπορούν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος, αναπτύχθηκε η ορθογώνια προβολή σε λανθάνουσες δομές O-PLS (Orthogonal Partial Least Squares), με την αντίστοιχη OPLS-DA, που επίσης αποτελεί μια εποπτευόμενη μέθοδο. Η O-PLS εξελίχθηκε από τα μοντέλα PLS και στοχεύει στην παραγοντοποίηση της διακύμανσης δεδομένων σε δύο συστατικά: ένα πρώτο στοιχείο που συσχετίζεται με τη μεταβλητή ενδιαφέροντος και ένα δεύτερο μη σχετιζόμενο στοιχείο, δηλαδή το ορθογώνιο που βοηθά περαιτέρω στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

### III.2.3.1 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑΣ ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

#### ➤ Διασταυρούμενη Επικύρωση (Cross-Validation)

Η εγκυρότητα των μοντέλων διαχωρισμού των μεταβολικών προφίλ αρχικά αξιολογείται από τις στατιστικές παραμέτρους ποιότητας  $R^2$  (δείκτης αξιολόγησης της ικανότητας διαχωρισμού του μοντέλου) και  $Q^2$  (δείκτης εκτίμησης της προσαρμογής του μοντέλου) που προκύπτουν από μια διαδικασία που ονομάζεται διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation). Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την χρήση 10 υποσυνόλων με το ένα από αυτά να αποτελεί το σύνολο επικύρωσης (test set) και τα υπόλοιπα 9 να ενώνονται και να δημιουργούν το σύνολο εκπαίδευσης (training set). Το μοντέλο εκπαιδεύεται χρησιμοποιώντας το σύνολο εκπαίδευσης και δοκιμάζεται έναντι του συνόλου επικύρωσης. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται πολλές φορές, χρησιμοποιώντας κάθε φορά ένα διαφορετικό σύνολο ως σύνολο επικύρωσης και τα υπόλοιπα εννέα ως σύνολο εκπαίδευσης. Στο τέλος υπολογίζεται η μέση επίδοση του μοντέλου με τις στατιστικές παραμέτρους  $R^2$  και  $Q^2$ .

#### ➤ Ανάλυση μετάθεσης (Permutation Test)

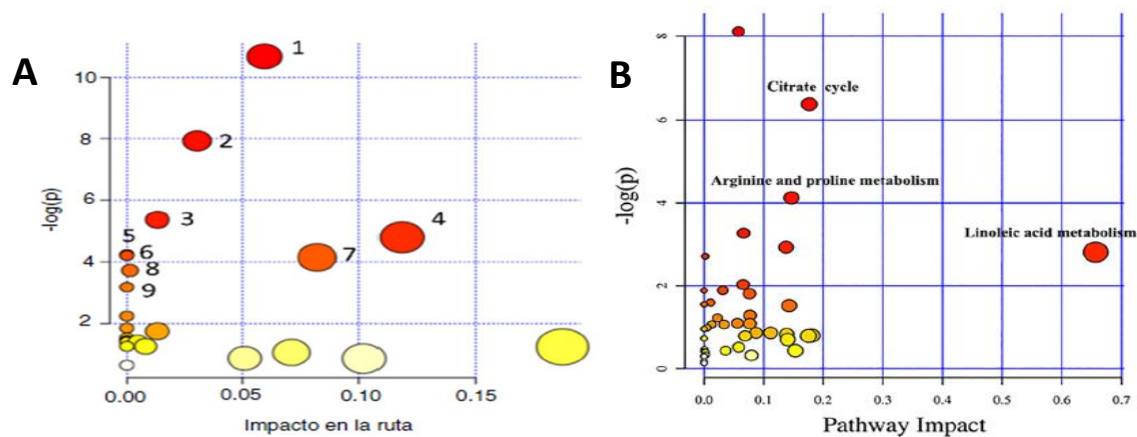
Εκτός από την διασταυρούμενη επικύρωση, η ανάλυση μετάθεσης (permutation test) αποτελεί ακόμη μια μέθοδος αξιολόγησης των μοντέλων διαχωρισμού PLS και O-PLS. Συγκεκριμένα, αποτελεί ένα μέτρο αξιολόγησης των στατιστικών παραμέτρων ποιότητας  $Q^2$  (δείκτης αξιολόγησης της ικανότητας πρόβλεψης του μοντέλου) και  $R^2$  (δείκτης για την εκτίμηση της προσαρμογής του μοντέλου). Στην μέθοδο αυτή για την επικύρωση της στατιστικής σημασίας του μοντέλου χρησιμοποιείται ένα σύνολο δεδομένων στο οποίο λαμβάνουν χώρα τυχαίες επαναλαμβανόμενες μεταθέσεις. Εάν η στατιστική τιμή  $p$  των μετατιθέμενων δεδομένων αυτών είναι μικρότερη του 0.05 τότε μοντέλο θεωρείται έγκυρο, ενώ με τιμή  $p > 0.05$  οι τιμές αυτές και το μοντέλο δεν μπορούν να θεωρηθούν αξιόπιστες για την εξαγωγή συμπερασμάτων και ερμηνεία αποτελεσμάτων.

### III.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΟΔΩΝ

Καθώς τα μεταβολομικά δεδομένα που δημιουργούνται από τις αναλυτικές μεθόδους που περιγράφονται παραπάνω γίνονται όλο και πιο περίπλοκα, υπάρχει μια επιτακτική ανάγκη για καλύτερη οπτικοποίηση και ποσοτική ανάλυση των δεδομένων που θα βοηθήσει να ερμηνεύσουμε τις πειραματικά παρατηρούμενες αλλαγές. Μια ευρέως χρησιμοποιούμενη προσέγγιση για την ερμηνεία των δεδομένων μεταβολομικής και ιδιαιτέρως στην μελέτη διαβητικών επιπλοκών, όπως η διαβητική νεφροπάθεια, είναι η χαρτογράφηση (mapping) τους σε μεταβολικές οδούς. Η



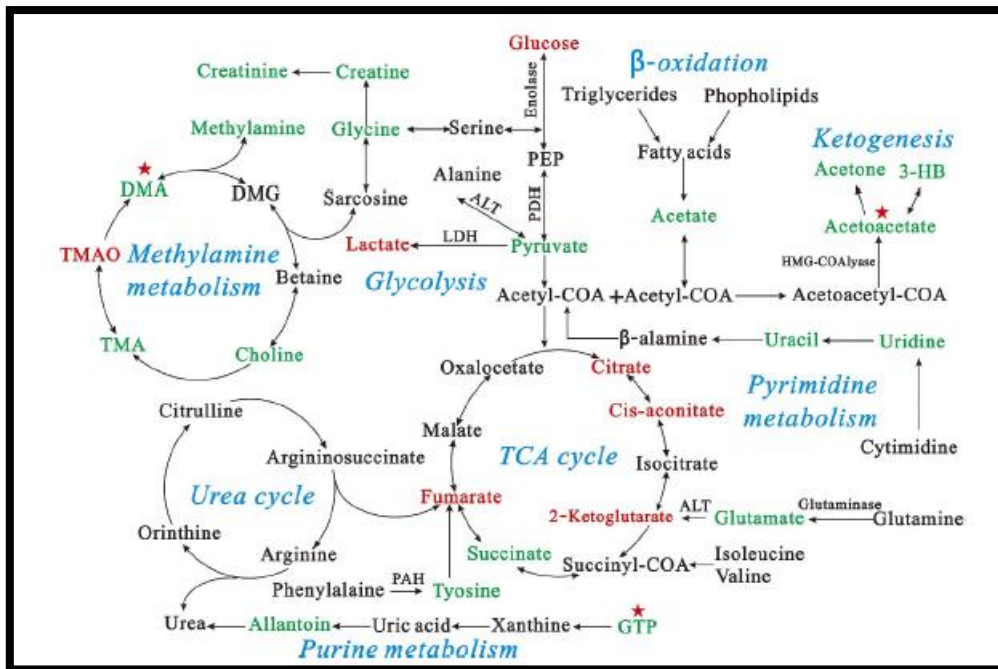
χαρτογράφηση αυτή μας παρέχει πληροφορίες σχετικά με το πόσο σημαντικοί είναι οι συγκεκριμένοι μεταβολίτες και το κατά πόσο επηρεάζονται από την πάθηση που εξετάζεται [42]. Στην δική μας περίπτωση λαμβάνονται πληροφορίες όσον αφορά τις μεταβολικές οδούς που σχετίζονται με τους μεταβολίτες των ούρων και βιοδείκτες στη διαβητική νεφροπάθεια , όπως για παράδειγμα στην **Εικόνα 20.A** και **20.B** [38] [43].



**Εικόνα 20.** Γραφήματα συσχέτισης της σημαντικότητας και επιρροής των μεταβολικών οδών, που λήφθηκε μετά από μεταβονομική ανάλυση σε δείγμα ούρων σε καταστάσεις διαβητικής νεφροπάθειας. Το χρώμα των κύκλων: από λευκό (λιγότερο) σε κόκκινο (περισσότερο) και το μέγεθος (από μικρό σε μεγάλο) αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά επίπεδα σημαντικότητας των οδών. Όσο μεγαλύτερος είναι ο κύκλος τόσο μεγαλύτερη επίδραση έχει η συγκεκριμένη οδός. Η υψηλή τιμή  $-\log(p)$  σημαίνει μεγαλύτερη στατιστική σημαντικότητα των μεταβολικών οδών. Στην πρώτη περίπτωση, **(A)** ο κύκλος του κιτρικού οξέος(4) έχει την πιο μεγάλη επιρροή και ο μεταβολισμός των πουρινών (1) τη μεγαλύτερη σημαντικότητα ενώ στη δεύτερη περίπτωση, **(B)** ο κύκλος του κιτρικού οξέος τη μεγαλύτερη σημαντικότητα και ο μεταβολισμός του λινολεϊκού οξέος τη μεγαλύτερη επιρροή [38][43].

Ένας από τους περιορισμούς της οπτικοποίησης δεδομένων μέσω μεταβολικών οδών πηγάζει από το γεγονός οι μεταβολίτες συχνά εμπλέκονται σε πολλαπλά μονοπάτια. Για να κατανοήσουμε τη συνολική επίδραση της μεταβολής στα επίπεδα ενός μεταβολίτη, ο χρήστης πρέπει να διερευνήσει πολλά μονοπάτια και να κατανοήσει τις συνδέσεις μεταξύ τους. Μια εναλλακτική λύση είναι η δημιουργία ενός δικτύου μεταβολικών δρόμων, όπου πολλαπλά μονοπάτια μπορούν να συνδεθούν μεταξύ τους (**Εικόνα 21**). Τέτοια δίκτυα παρέχουν ένα εύκολο τρόπο για τη γρήγορη διερεύνηση δεδομένων και μια λογική δημιουργία υποθέσεων και ερμηνείας αποτελεσμάτων (computational approaches) [40] [42].





**Εικόνα 21.** Διαταραγμένες μεταβολικοί οδοί που σχετίζονται με την παθοφυσιολογία της διαβητικής νεφροπάθειας. Οι αλλαγές στους μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν με ανάλυση  $^1\text{H-NMR}$  δειγμάτων ούρων και ο μεταβολικός χάρτης που αναφέρεται στη βάση δεδομένων KEGG δείχνουν τη σχέση μεταξύ των μεταβολικών οδών που διαταράσσονται σε διαβητικά ποντίκια. Οι μεταβολίτες με κόκκινο και πράσινο χρώμα αντιπροσωπεύουν αύξηση και μείωση των επιπέδων, αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα μη διαβητικά ποντίκια [40].

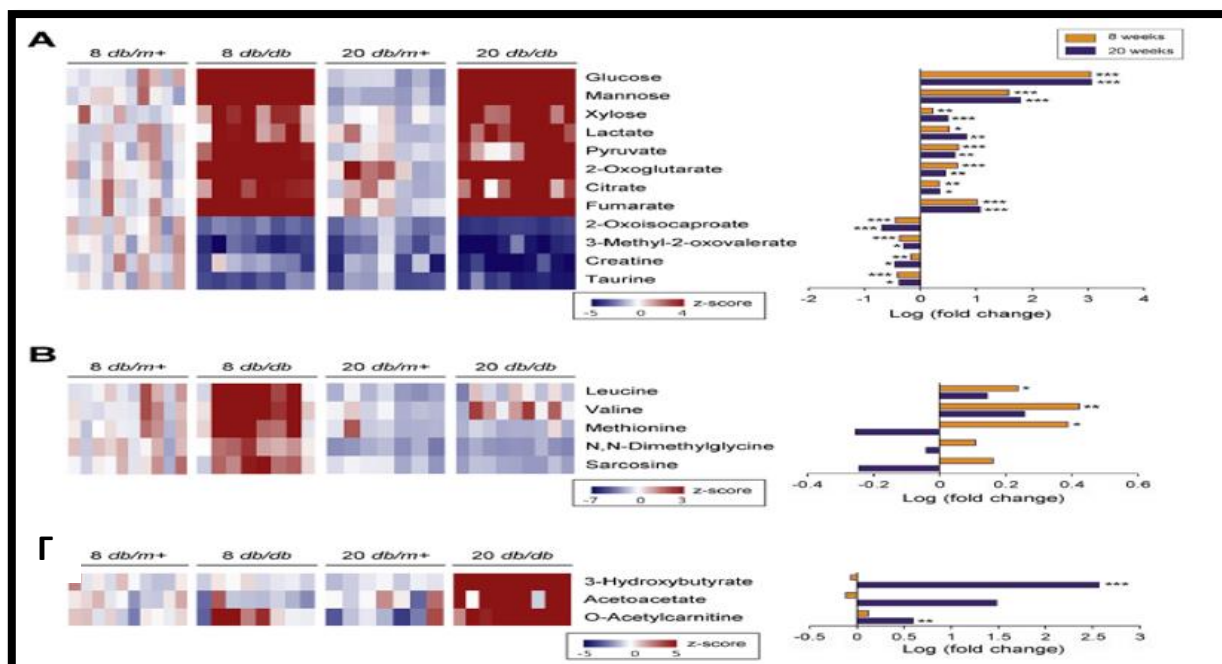
### III.4 ΜΕΛΕΤΕΣ ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΗΣ ΣΤΗ ΔΙΑΒΗΤΙΚΗ ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑ

Με την εξέλιξη της μεταβονομικής βάση της φασματοσκοπίας  $^1\text{H-NMR}$  αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για τον προσδιορισμό μεταβολιτών των ούρων ως πιθανών βιοδεικτών για την πρόληψη της ΔΝ, όπως και για τον εντοπισμό διαταραγμένων μεταβολικών οδών από τα αρχικά προς τα προχωρημένα στάδια της νόσου.

Βάση των μελετών αυτών κυρίαρχες διαταραχές στον μεταβολικό προφίλ της ΔΝ αποτελούν αυτές του μεταβολισμού της γλυκόζης, της κετογένεσης, της β-οξείδωσης των λιπαρών οξέων, του μεταβολισμού των ενδιάμεσων προϊόντων του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος (Tricarboxylic acid, TCA), των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας BCAAS (branched-chain amino acids) και άλλων απαραίτητων αμινοξέων όπως και της απορρύθμισης των ενδιάμεσων προϊόντων στο μεταβολικό μονοπάτι των μεθυλαμινών [30][40][44][45][46].

Μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Kim et al [44] (**Εικόνα 22**) σύγκρινε δείγματα ούρων πειραματικών μοντέλων ποντικών με ΔΝ (db/db) 8 και 20 εβδομάδων με τα αντίστοιχα διαβητικά

control δείγματα ίδιας ηλικίας (db/m). Αυτή έδειξε ότι το μεταβολικό τους προφίλ παρουσίασε σημαντική αύξηση στα επίπεδα των σακχάρων (γλυκόζη, μαννόζη, ξυλόζη), των προϊόντων γλυκόλυσης (γαλακτικό, πυροσταφυλικό οξύ) και των ενδιάμεσων προϊόντων κύκλου TCA (κιτρικό, φουμαρικό, 2-κετογλουταρικό οξύ) στα db/db μοντέλα και στις δύο ηλικίες. Καθώς ο κύκλος του TCA συνδέεται άμεσα με τον μεταβολισμό της γλυκόζης, οι αυξημένοι μεταβολίτες του ενδεχομένως να αντικατοπτρίζουν το συστημικό στρες και την επακόλουθη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία που δημιουργείται από την υπεργλυκαιμία ή τις τοπικές επιδράσεις στη μεταφορά των νεφρικών σωληναρίων. Αντιθέτως, ο μεταβολισμός των δύο BCAAs (λευκίνη, βαλίνη) ενεργοποιήθηκε νωρίς στην νόσο με τις συγκεντρώσεις τους να αυξάνονται στις 8 εβδομάδες και να ελαττώνονται σε σημαντικό βαθμό στις 20. Το γεγονός αυτό συμφωνεί με τον παθοφυσιολογικό ρόλο των BCAA στην ΔN και ΧNΝ καθώς στα προχωρημένα στάδια της νόσου διεγείρεται η αύξηση του καταβολισμού τους και προκύπτει μειωμένη συνεισφορά των νεφρών στην πρωτεϊνοσύνθεση. Στην μείωση των επιπέδων BCAAs επίσης συμβάλει η αυξημένη κατανάλωση τους στην γλυκονεογένεση και η επίδραση της ινσουλινοαντίστασης. Παρόμοια τάση ακολούθησαν οι μεταβολίτες του κύκλου της ομοκυστεΐνης-μεθειονίνης. Η υπερομοκυστεΐναιμία έχει αναγνωριστεί ως καλός προγνωστικός παράγοντας για μελλοντική επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας σε ασθενείς με νορμο- ή μικροαλβουμινουρία και παρόλο που στη συγκεκριμένη μελέτη δεν εντοπίστηκε ομοκυστεΐνη στα ούρα, που είναι ο πιο γνωστός μεταβολίτης του καταβολισμού της μεθειονίνης, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα στα ούρα μεθειονίνης, διμεθυλογλυκίνης και σαρκοσίνης στο αρχικό στάδιο της ΔN. Αυτό πιθανά να αντανakλά την ενεργοποίηση της οδού ομοκυστεΐνης προς μεθειονίνη μεσολαβούμενη από το ένζυμο BHMT (μεθυλοτρανσφεράση βεταΐνης-ομοκυστεΐνης). Τα κετονοσώματα 3-υδροξυβουτυρικό οξύ (3-HB) και ακετοξικό οξύ αλλά και η ακετυλοκαρνιτίνη ως προϊόν β-οξειδωσης λιπαρών οξέων μεταβλήθηκαν δραματικά στην τελευταία φάση της μελέτης καθώς τα επίπεδα τους αυξήθηκαν μόνο στα db/db μοντέλα 20 εβδομάδων σε σχέση με τα controls. Τα στοιχεία αυτά υποδηλώνουν ότι η διαταραγμένη κετογένεση και β-οξείδωση λιπαρών οξέων μπορεί να είναι βασικές μεταβολικές αλλαγές στα προχωρημένα στάδια της ΔN [44].

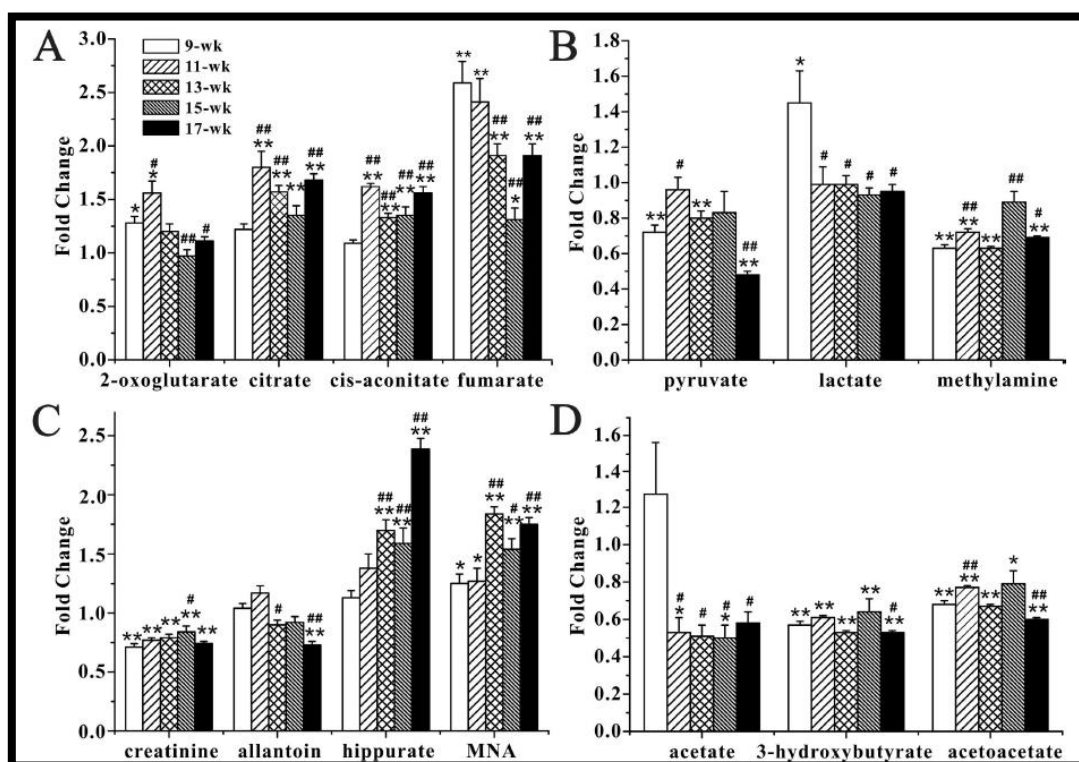


**Εικόνα 22.** Οπτικοποίηση όλων των σημαντικών μεταβολιτών ούρων. Ο χάρτης θερμότητας δείχνει το z-score που αντιπροσωπεύει τα σχετικά επίπεδα κάθε μεταβολίτη ούρων στις 8 και 20 εβδομάδες σε πειραματικά μοντέλα ΔΝ (db/db) σε σχέση με τα control μοντέλα (db / m) της ίδιας ηλικίας . Οι αποχρώσεις του κόκκινου ( z-score > 0) αντιπροσωπεύουν αυξημένους μεταβολίτες και αποχρώσεις του μπλε (z score < 0) αντιπροσωπεύουν μειωμένους μεταβολίτες σε σχέση με τα μέσα επίπεδα μεταβολίτη. Τα ραβδογραφήματα δείχνουν τις πολλαπλασιαστικές μεταβολές (fold change) που μετατρέπονται σε λογάριθμους στα db / db μοντέλα σε σύγκριση με τα db/m σε ηλικία 8 και 20 εβδομάδων. **(Α)** Μεταβολίτες οι οποίοι μεταβλήθηκαν σημαντικά με την ίδια τάση στις 8 και 20 εβδομάδες, **(Β)** μεταβολίτες που αυξήθηκαν σημαντικά στις 8 εβδομάδες αλλά μειώθηκαν στις 20 και **(Γ)** μεταβολίτες που παρουσίασαν σημαντικές μεταβολές μόνο στις 20 εβδομάδες. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 διαφορά μεταξύ db/m και db/db κάθε χρονική περίοδο.

Σε μια άλλη παρόμοια μελέτη οι Wei et al [40] **(Εικόνα 23)** ανέλυσαν χρονοεξαρτώμενες μεταβολές σε ούρα db/db ποντικών 9, 11, 13, 15 και 17 εβδομάδων σε σχέση με τα αντίστοιχα διαβητικά ποντικά άγριου τύπου (wildtype) που αποτέλεσαν τα controls. Σε συμφωνία με τους Kim et al, αυξημένα επίπεδα των περισσότερων ενδιάμεσων προϊόντων του κύκλου TCA (2-κετογλουταρικό, κιτρικό, cis-ακονιτικό και φουμαρικό οξύ) ήταν εμφανή στα db/db μοντέλα. Στις 9 εβδομάδες, δεν υπήρχαν εμφανείς αλλαγές στα επίπεδα κιτρικού και cis-ακονιτικού μεταξύ db/db και control δειγμάτων, ωστόσο, τα επίπεδά τους ήταν υψηλότερα κατά τη διάρκεια του μεσαίου και τελικού σταδίου της ΔΝ. Το 2-κετογλουταρικό (2-OG) και φουμαρικό οξύ ήταν αυξημένα στο αρχικό στάδιο της ΔΝ και έφτασαν εν μέρει σε επίπεδα control κατά τα τελευταία στάδια. Το ηλεκτρικό οξύ

ήταν το μοναδικό ενδιάμεσο του κύκλου TCA το οποίο παρουσιάστηκε μειωμένο στα db/db μοντέλα κατά την πορεία της μελέτης. Το πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο παράγεται από το μεταβολισμό της γλυκόζης, μειώθηκε δραστικά κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του ΔN με την μείωση αυτή να παρατηρείται στις 17 εβδομάδες σε db/db μοντέλα. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα γαλακτικού οξέος αυξήθηκαν σε db/db μοντέλα 9 εβδομάδων και αυτό είναι ενδεικτικό της αυξημένης γλυκόλυσης. Οι μεταβολικές αλλαγές αυτές αποτελούν ένδειξη ότι η διατάραξη του μεταβολισμού της γλυκόζης παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη της ΔN. Σε αντίθεση με την προηγούμενη μελέτη τα κετονοσώματα (3-HB, ακετοξικό οξύ) όπως και το οξικό οξύ, μειώθηκαν στα db/db μοντέλα σε σχέση με τα control καθ'όλη την πειραματική περίοδο, υποδηλώνοντας μειωμένο ρυθμό κετογένεσης και μεταβολισμού λιπαρών οξέων στην ΔN. Η κρεατινίνη, ένας δείκτης του GFR, σχηματίζεται αποκλειστικά από την κρεατίνη στο σώμα. Τα επίπεδα κρεατινίνης ήταν χαμηλότερα στα δείγματα ούρων που συλλέχθηκαν στα πέντε διαφορετικά χρονικά σημεία στα db/db μοντέλα, υποδεικνύοντας νεφρική δυσλειτουργία, ήπια ή σοβαρή, σε όλη την πειραματική περίοδο. Περαιτέρω, οι μειωμένες συγκεντρώσεις μεθυλαμίνης, διμεθυλαμίνης (DMA) και τριμεθυλαμίνης (TMA) στα db/db μοντέλα υποδηλώνουν την μειωμένη ενεργοποίηση (downregulation) του κύκλου της μεθυλαμίνης στην ΔN. Καθώς αρκετοί μεταβολίτες του κύκλου αυτού αποτελούν και νεφρικούς ωσμωλύτες, η μείωση τους θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι οφείλεται σε ωσμωτική αντιστάθμιση για τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα ή σε δυσλειτουργία των νεφρικών θηλών στην ΔN. Το ιππουρικό οξύ γενικά ανιχνεύεται στα ούρα και η συγκέντρωσή του αντανακλά τη μικροβιακή δραστηριότητα και τη σύνθεση του εντέρου. Αυξημένα επίπεδα ιππουρικού οξέος που βρέθηκαν στα ούρα db/db μοντέλων ηλικίας 13 μέχρι 17 εβδομάδων υποδηλώνουν ότι υπάρχουν αλλοιώσεις στη εντερική μικροχλωρίδα. Το ιππουρικό οξύ ούρων ακόμα έχει αναφερθεί ότι είναι ένας πρώιμος βιοδείκτης νεφροτοξικότητας που προκύπτει από τη χορήγηση νεφροτοξίνης σε αρουραίους. Η υψηλή απέκκριση του ιππουρικού στα ούρα επίσης έχει βρεθεί ότι συσχετίζεται με μειωμένο GFR και σωληναριακή επαναρρόφηση. Επομένως, τα αυξημένα επίπεδα ιππουρικού οξέος στα db/db μοντέλα πιθανόν επίσης να αντικατοπτρίζουν αλλοιωμένη σπειραματική διήθηση. Η αλλαντοΐνη παρατηρήθηκε μειωμένη στα db/db μοντέλα 17 εβδομάδων και επειδή αποτελεί ένα μεταβολίτη που δεν επαναρροφάται στο εγγύς σωληνάριο, η μείωση της συγκέντρωσής της στα ούρα πιστεύεται ότι αντανακλά με ακρίβεια τον GFR. Επομένως, η μειωμένη αλλαντοΐνη στις 17 εβδομάδες αποτελεί και ένας δείκτη τελικού σταδίου της ΔN. Τέλος, στα ούρα db/db ποντικών βρέθηκε αυξημένη συγκέντρωση του μεθυλονικοταμιδίου (MNA). Επειδή το MNA επηρεάζει τις οξειδωτικές και γλυκοξειδωτικές διεργασίες έχει εξεταστεί για πιθανές εφαρμογές στην πρόληψη

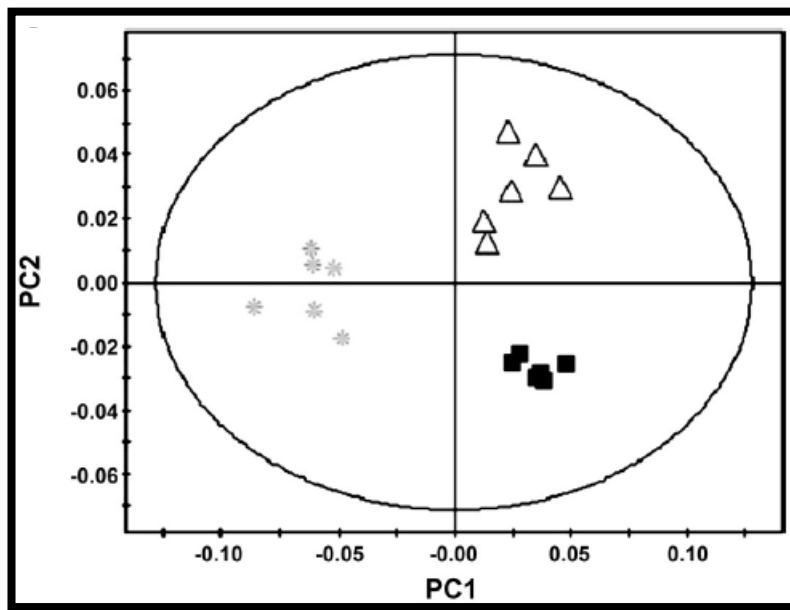
και τη θεραπεία διαφόρων επιπλοκών που συνοδεύουν τον σακχαρώδη διαβήτη. Καθώς ο μεταβολίτης παρουσιάστηκε αυξημένος στα ούρα db/db ποντικών, αυτό υποδεικνύει και τις πιθανές προστατευτικές επιδράσεις του μεταβολίτη στη ΔΝ [40].



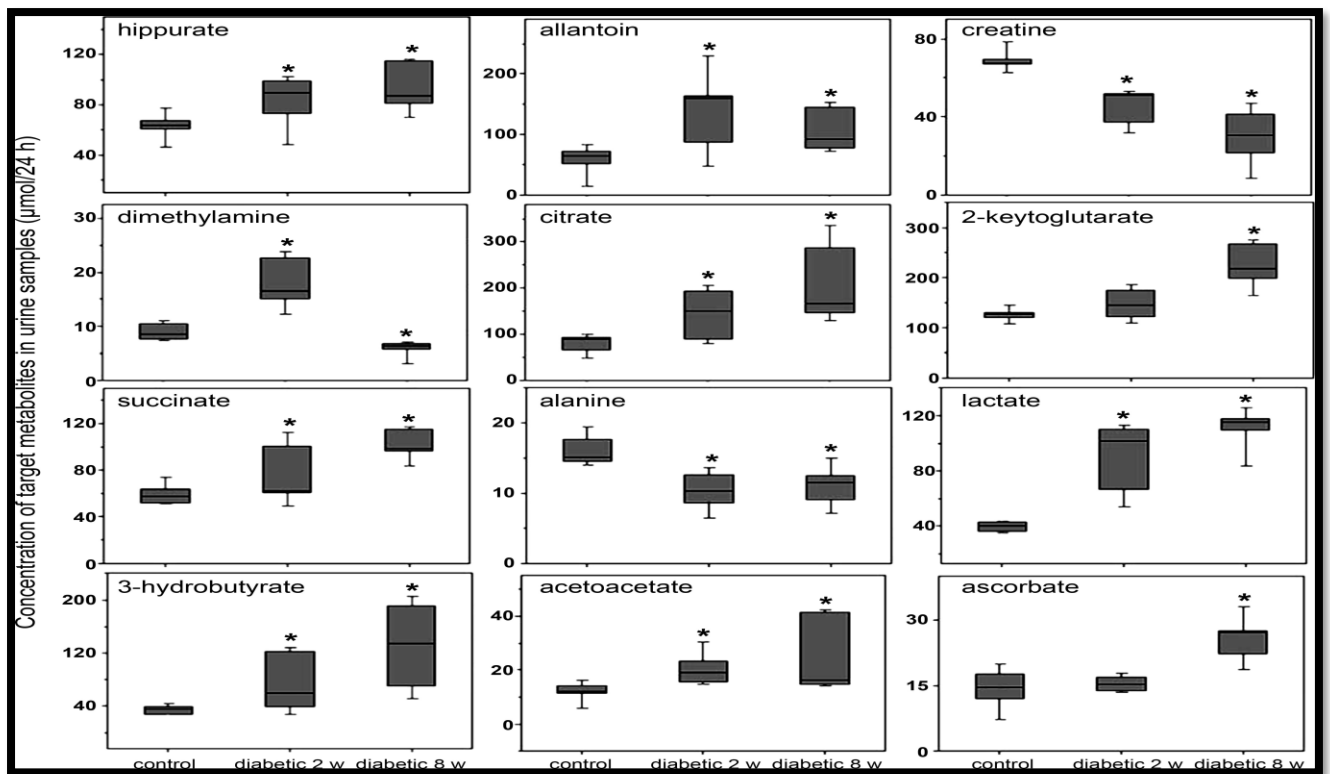
**Εικόνα 23.** Ποσοτική ανάλυση μεταβολιτών ούρων. Σχετικές συγκεντρώσεις μεταβολιτών που λαμβάνονται από Φάσματα  $^1\text{H}$  NMR δειγμάτων ούρων που συλλέχθηκαν από τα ποντίκια db/db και τα ποντίκια άγριου τύπου στις 9-εβδομάδες, 11-εβδομάδες, 13-εβδ., 15 εβδομάδων και 17 εβδομάδων, αντίστοιχα. \* $P < 0,05$  και \*\* $P < 0,01$  σε σύγκριση με ποντίκια άγριου τύπου της αντίστοιχης ηλικίας. # $P < 0,05$  και ## $P < 0,01$  σε σύγκριση με τα ποντίκια db/db στις 9-εβδομάδες.

Οι Zhao L et al [30] χρησιμοποίησαν στρεπτοζοκίνη (STZ) για την επαγωγή ΔΝ και την ποσοτική ανάλυση των μεταβολικών αλλαγών σε διαβητικούς αρουραίους 2 και 8 εβδομάδων σε σχέση με τα αντίστοιχα control. Η πολυπαραγοντική ανάλυση των ούρων έδειξε ότι οι δύο διαβητικές ομάδες διαχωρίστηκαν σαφώς από την ομάδα ελέγχου (**Εικόνα 24**), υποδηλώνοντας ότι τα χαρακτηριστικά του μεταβολικού τους προφίλ ήταν αισθητά διαφορετικά από των control. Σε παρόμοια αποτελέσματα με τις δυο προηγούμενες μελέτες ΔΝ σε πειραματικά μοντέλα, οι διαβητικοί αρουραίοι 8 εβδομάδων έδειξαν χαμηλότερα επίπεδα κρεατίνης, διμεθυλαμίνης και αλανίνης και υψηλότερα επίπεδα κιτρικού, ηλεκτρικού, 2-OG, 3-HB, γαλακτικού οξέος, αλλαντοΐνης, ιππουρικού

και ασκορβικού οξέος στα δείγματα ούρων αρουραίων με ΔN σε σχέση με τα control (**Εικόνα 25**). Όπως και στις δύο προηγούμενες μεταβολομικές μελέτες ΔN σε πειραματικά μοντέλα οι παρατηρούμενες μεταβολικές αλλαγές συνεπάγονται διαταραγμένη οδό της σύνθεσης είτε των λιπιδίων είτε των κετονοσωμάτων και μείωση της οδού του κύκλου TCA και της γλυκόλυσης σε ΔN αρουραίους σε σύγκριση με τον έλεγχο. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι ενεργειακές μεταβολικές αλλαγές επίσης σχετίζονται με την παθολόγο διαδικασία της ΔN. Επιπλέον, καθώς το ασκορβικό οξύ αποτελεί ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό, η αύξηση του πιθανώς να αντανάκλα την ενισχυμένη οδό του οξειδωτικού stress στην ΔN, ενώ, όπως προαναφέρθηκε, η αύξηση του ιππουρικού οξέος συσχετίζεται με αλλοιώσεις στην εντερική μικροχλωρίδα [30].



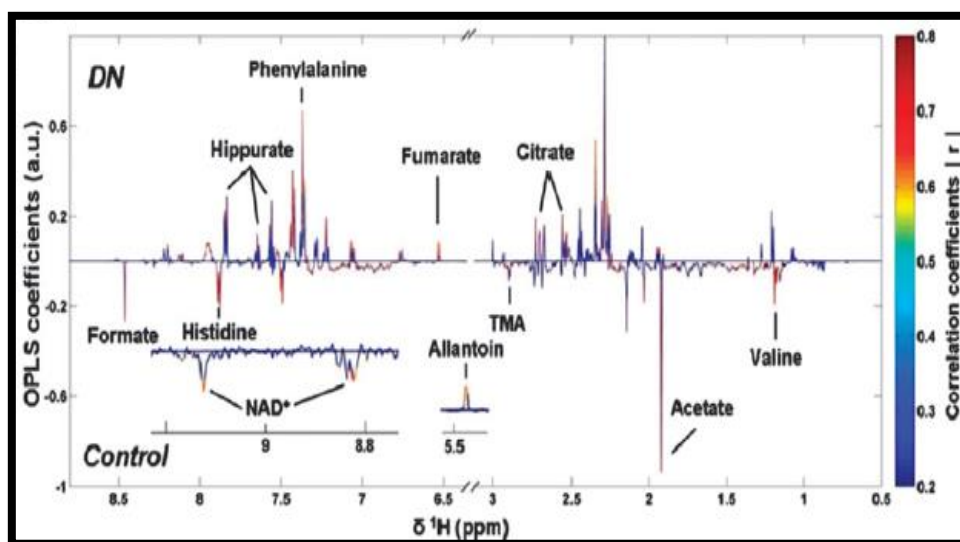
**Εικόνα 24.** Διάγραμμα OPLS-DA score βάση των φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  ούρων από διαβητικούς αρουραίους 2 ( $\Delta$ ) και 8 εβδομάδων (\*) και αρουραίους control ( $\blacksquare$ ).



**Εικόνα 25.** Ραβδογράμματα συγκεντρώσεων μεταβολιτών-στόχων σε δείγματα ούρων από διαφορετικές ομάδες αρουραίων.

Για να αποκαλυφθούν οι συστηματικές μεταβολικές αλλαγές που σχετίζονται με νεφρική βλάβη οι Jingpin Liu et al [45] πραγματοποίησαν μεταβονομική ανάλυση σε ούρα που ελήφθησαν από πειραματικά μοντέλα πιθήκων με ΔΝ. Τα αποτελέσματά έδειξαν ότι τα ούρα των ΔΝ πιθήκων σε σχέση με τα διαβητικά control εμφάνισαν ένα ξεχωριστό μεταβολικό προφίλ, συμπεριλαμβανομένων υψηλότερων επιπέδων κιτρικού και φουμαρικού οξέος, αλλαντοΐνης, τριμεθυλαμίνης (TMA) και ιππουρικού οξέος, καθώς και χαμηλότερα επίπεδα NAD<sup>+</sup>, ακετοξικού οξέος, ιστιδίνης και φορμικού οξέος (**Εικόνα 26 και Πίνακας 1**). Συνολικά οι σημαντικότερες μεταβολικές διαταραχές που σχετίστηκαν με την ΔΝ στην συγκεκριμένη μελέτη ήταν αρχικά ο αλλοιωμένος μεταβολισμός του NAD<sup>+</sup> με τα μειωμένα επίπεδα του να συνδέονται με οξειδωτική βλάβη και μειωμένη δραστηριότητα της πρωτεΐνης Sirt1. Η sirt1 έχει συνδεθεί με την ενεργειακό μεταβολισμό ενώ εμπλέκεται στην ρύθμιση νεφρικών βλαβών συμπεριλαμβανομένης της νεφρικής βλάβης που σχετίζεται με τη γήρανση, της νεφρικής υποξίας, τη νεφρική ίνωση και την απόπτωση σωληναριακών κυττάρων. Η αυξημένη αλλαντοΐνη επίσης μπορεί να αποτελέσει ένα βιοδείκτη οξειδωτικού stress καθώς αποτελεί ένα προϊόν οξείδωσης του ουρικού οξέος το οποίο συνδέεται σημαντικά με την οδό ενεργοποίησης της οξειδάσης της ξανθίνης XO στην ΔΝ. Μια άλλη διαταραχή στο μεταβολικό προφίλ των ούρων πιθήκων με ΔΝ ήταν ενδεικτική δυσλειτουργίας νεφρικής σωληναριακής επαναρρόφησης, καθώς

παρατηρήθηκε αυξημένη απέκκριση κιτρικού, φουμαρικού και ιππουρικού οξέος σε πιθήκους ΔΝ. Το κιτρικό οξύ είναι ένα σημαντικό υπόστρωμα στον μεταβολισμό των νεφρικών κυττάρων και 65–90% του κιτρικού οξέος επαναρροφάται στα εγγύς νεφρικά σωληνάκια. Η υψηλή απέκκριση του ιππουρικού οξέος στα ούρα έχει συσχετιστεί με μειωμένο GFR και σωληναριακή επαναρρόφηση ενώ επίσης όπως αναφέρθηκε και στις παραπάνω μελέτες αποτελεί μια ένδειξη για αλλοιώσεις στην εντερική μικροχλωρίδα [45].



**Εικόνα 26.** Διάγραμμα φορτίου OPLS-DA από τα φάσματα NMR ούρων των ομάδων ΔΝ και control. Οι έγχρωμοι συντελεστές συσχέτισης υποδεικνύουν τους σημαντικούς μεταβολίτες που συμβάλλουν στη διαφοροποίηση της ομάδας.

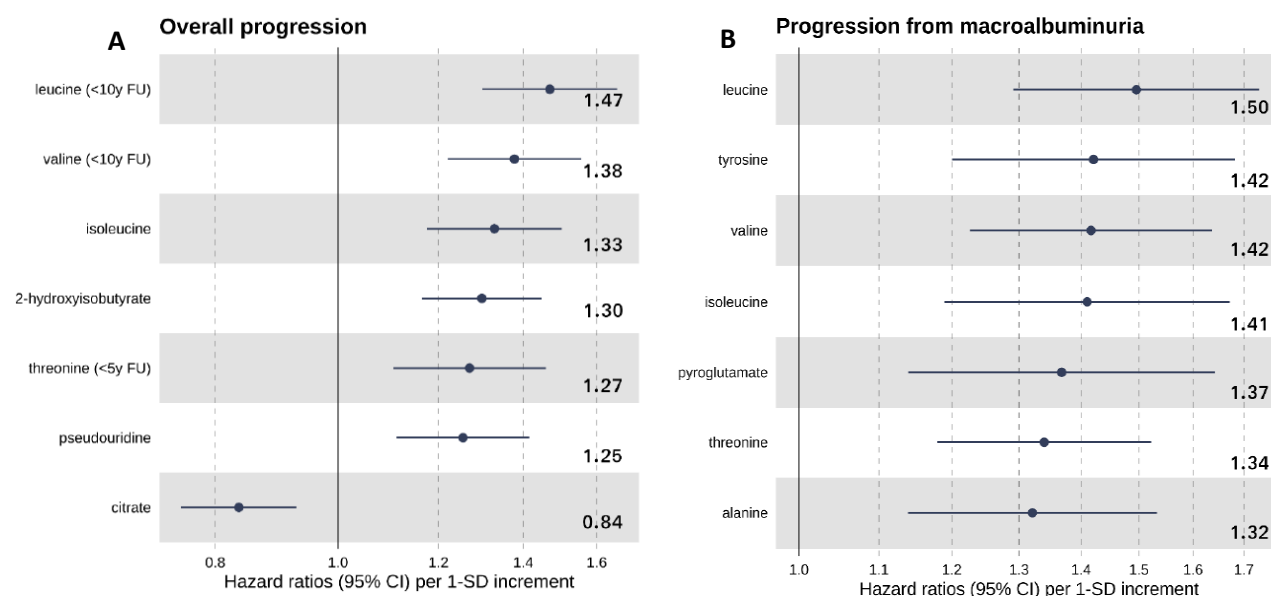
Metabolites	$\delta \text{ } ^1\text{H}$ (ppm)	Normalized integrals (%)	
		Control	DN
Acetate	1.92	0.88 ± 0.25	0.51 ± 0.25 <sup>b</sup>
Citrate	2.53	0.45 ± 0.50	1.48 ± 0.61 <sup>c</sup>
TMA	2.92	1.39 ± 1.73	2.14 ± 0.96 <sup>b</sup>
Allantoin	5.40	0.51 ± 0.31	0.89 ± 0.35 <sup>b,c</sup>
Fumarate	6.53	0.21 ± 0.18	1.21 ± 1.08 <sup>b,c</sup>
Phenylalanine	7.38	0.69 ± 0.27	1.24 ± 0.47 <sup>b,c</sup>
Benzoate	7.49	0.58 ± 0.15	1.02 ± 0.31 <sup>b</sup>
Hippurate	7.56	0.52 ± 0.17	0.96 ± 0.58 <sup>b,c</sup>
Histidine	7.88	2.46 ± 1.24	0.91 ± 0.52 <sup>b,c</sup>
Formate	8.46	5.11 ± 2.86	1.06 ± 0.44 <sup>b,c</sup>
NAD <sup>+</sup>	9.12	0.15 ± 0.06	0.06 ± 0.04 <sup>b,c</sup>

**Πίνακας 1.** Οι σχετικές συγκεντρώσεις των ουρικών μεταβολιτών σε μοντέλα με ΔΝ και στα control δείγματα.



Σε μια πρόσφατη κλινική μελέτη από τους Stefan Mutter et al [46] συλλέχθηκαν δείγματα ούρων 24 ωρών από 2670 άτομα με ΣΔΤ1 και τα άτομα παρακολούθηθηκαν για  $9.0 \pm 5.0$  χρόνια μέχρι το πρώτο σημάδι εξέλιξης της ΔΝ και ΧΝΝ (**Εικόνα 27**). Διαπιστώθηκε ότι δέκα από τους 51 ουρικούς μεταβολίτες συσχετίστηκαν με την συνολική εξέλιξη της ΔΝ ακόμη αφού πρώτου είχαν κατηγοριοποιηθεί βάση αύξησης της αλβουμινουρίας και της διάγνωσης για ΧΝΝ. Στην συνολική πρόοδο της ΔΝ παρουσιάστηκαν διαφορές μεταξύ της εξέλιξης από νορμο-προς μακροαλβουμινουρία και από μακροαλβουμινουρία προς ΧΝΝ. Το 2-υδροξυισοβουτυρικό οξύ (2-HIB) ήταν ο μεταβολίτης που συνδέθηκε περισσότερο με την εξέλιξη της νορμοαλβουμινουρίας προς τη μακροαλβουμινουρία ενώ τα αμινοξέα και, ειδικότερα, τα BCAAs (λευκίνη, ισολευκίνη, βαλίνη) συνδέθηκαν έντονα με την εξέλιξη της μακροαλβουμινουρίας προς ΧΝΝ. Οι μεταβολίτες αυτοί επίσης δηλώνουν μια σύνδεση μεταξύ ινσουλινοαντίστασης και εξέλιξης της ΔΝ. Η σύνδεση των ουρικών BCAAs με την αντίσταση στην ινσουλίνη αποτελεί επιπρόσθετο στοιχείο στην μεταβολομική του αίματος όπου τα αμινοξέα αυτά αντιπροσωπεύουν τους πιο συνεπείς βιοδείκτες στην πρόγνωση κινδύνου ανάπτυξης ΣΔΤ2. Επιπλέον, η αντίσταση στην ινσουλίνη έχει παρατηρηθεί σε άτομα με ΣΔΤ1 και συνδέεται με τον αυξανόμενο επιπολασμό της παχυσαρκίας στον ΣΔΤ1. Στην συγκεκριμένη μελέτη, οι ασθενείς σε προχωρημένο στάδιο ήταν πιο πιθανό να είναι παχύσαρκοι κατά την έναρξη. Σημαντικό είναι ότι στον ΣΔΤ1 η αντίσταση στην ινσουλίνη έχει βρεθεί ότι προηγείται της μικροαλβουμινουρίας [47]. Το 2-HIB ούρων είναι ένας άλλος μεταβολίτης που συνδέει την εξέλιξη της ΔΝ με την αντίσταση στην ινσουλίνη και προέρχεται από τον εκφυλισμό των πρωτεϊνών από την εντερική μικροχλωρίδα. Τα επίπεδα του 2-HIB έχουν βρεθεί υψηλότερα στους παχύσαρκους, με αντίσταση στην ινσουλίνη άνδρες σε σύγκριση με τους αντίστοιχους αδύνατους συμμετέχοντες της ίδιας ηλικίας [48]. Επιπλέον, κλινικά σχετικές συγκεντρώσεις 2-HIB που χορηγήθηκε σε μια ανθρώπινη κυτταρική σειρά εγγύς σωληναρίου είχε ως αποτέλεσμα υψηλότερη έκφραση μεσεγγυματικών δεικτών και απώλεια χαρακτηριστικών επιθηλίου χωρίς να επηρεάζουν τη μιτοχονδριακή του δραστηριότητα [49]. Το χαμηλό κιτρικό οξύ συσχετίστηκε με τη συνολική εξέλιξη της ΔΝ. Αυτή η παρατήρηση είναι σύμφωνη με μια μελέτη που δείχνει ότι η χορήγηση του τα κιτρικά άλατα μειώνει τη σωληναριακή βλάβη και επιβραδύνει την μείωση του eGFR. Επίσης αφορά την σωληναριακή βλάβη, παρατηρήθηκε η παρουσία γλυκίνης με τα επίπεδά της να σχετίζονται με διαφορετικά στάδια της ΔΝ. Χαμηλότερη γλυκίνη στα ούρα σχετίστηκε ελάχιστα με την εξέλιξη της νορμοαλβουμινουρίας και η υψηλότερη γλυκίνη με την αυτή της μακροαλβουμινουρίας. Σε ζωικά μοντέλα, η προσλαμβανόμενη γλυκίνη έχει αποδειχθεί ότι προστατεύει από εγγύς σωληναριακή βλάβη που προκαλείται από κυκλοσπορίνη. Τέτοια βλάβη

μπορεί να συμβεί νωρίς στη νεφρική νόσο και μπορεί ακόμη και να προηγείται των σπειραματικών αλλαγών. Η θρεονίνη της οποίας η αποικοδόμηση οδηγεί στον σχηματισμό γλυκίνης παρουσίασε ίδια συσχέτιση με την εξέλιξη στην αλβουμινουρία. Τα αυξημένα επίπεδα αλανίνης επίσης συσχετίστηκαν με ΧΝΝ σε άτομα με μακροαλβουμινουρία. Τέλος, τα υψηλά επίπεδα της ουρικής τυροσίνης συσχετίστηκαν με την εξέλιξη της ΔΝ προς ΧΝΝ σε ασθενείς με μακροαλβουμινουρία. Η τυροσίνη αποτελεί ένα μεταβολίτη που προηγουμένως έχει συνδεθεί με αποκρίσεις σε οξειδωτικό stress και υποξία. Το οξειδωτικό στρες είναι χαρακτηριστικό της ΧΝΝ και σε συνδυασμό με την υποξία αυτά συμβάλουν σε κρίσιμο βαθμό στην νεφρική βλάβη [46].



**Εικόνα 27.** Στανταρισμένος λόγος κινδύνου (Hazard Ratio, HR) και διάστημα εμπιστοσύνης (Confidence Interval, CI) 95% για μεταβολίτες των ούρων που **(Α)** σχετίζονται σημαντικά ( $p < 0.001$ ) με τη συχνότητα της συνολικής εξέλιξης της ΔΝ και στα 2670 άτομα και που **(Β)** σχετίζονται σημαντικά ( $p < 0.001$ ) με τη συχνότητα της εξέλιξης προς ΧΝΝ σε 347 άτομα με μακροαλβουμινουρία. Η κλιμάκωση των μεταβολιτών των ούρων έγινε βάση της κρεατινίνης και μετασχηματίστηκαν λογαριθμικά. Η ανάλυση προσαρμόστηκε στο φύλο και την αρχική ηλικία, το έτος διάγνωσης του διαβήτη και τον αρχικό γλυκαιμικό έλεγχο ( $HbA1c > 58,5$  mmol/mol ή 7,5%) και έγινε κατηγοριοποίηση βάση το στάδιο της ΧΝΝ και της αλβουμινουρίας. Τα HR κλιμακώθηκαν σε μονάδες SD.

---

## IV. ΣΚΟΠΟΣ

---

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η καταγραφή του μεταβολικού προφίλ των ούρων ασθενών με διαβητική νεφροπάθεια (ΔΝ) που συλλέχθηκαν 3 χρόνια πριν την εμφάνιση της νόσου σε σύγκριση με ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 χωρίς επιπλοκές με τη χρήση της φασματοσκοπίας  $^1\text{H-NMR}$  και η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση μεταβολιτών που θα μπορούσαν να αποτελέσουν πιθανούς βιοδείκτες για την πρόιμη διάγνωση της νόσου.

---

## V. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---

### V.1 ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στην παρούσα πειραματική μελέτη συλλέχθηκαν δείγματα ούρων ασθενών που ανήκαν σε δύο ομάδες: 1) 25 ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2 χωρίς επιπλοκές και 2) 22 ασθενείς με Διαβητική Νεφροπάθεια.

### V.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Από κάθε ασθενή συλλέχθηκαν δείγματα αίματος και ούρων το πρωί, μετά από νηστεία. Τα δείγματα ούρων φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 2000 στροφές μετρήθηκε η κρεατινίνη με βιοχημική μέθοδο και αποθηκευτήκαν στους  $-80^\circ\text{C}$  μέχρι την NMR ανάλυση.

Σε όλους τους ασθενείς πραγματοποιήθηκε ο καθιερωμένος βιοχημικός και αιματολογικός έλεγχος που περιλάμβανε: γλυκόζη, ουρία, κρεατινίνη, αλβουμίνη, ολική και HDL χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, γενική αίματος και γλυκιωμένη αιμοσφαιρίνη ( $\text{HbA}_{1c}$ ).

### V.3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Γυάλινα σωληνάρια NMR διαμέτρου 5 mm (Wilmad 535 PP, Sigma-Aldrich)
- Κωνικά σωληνάρια Eppendorf 1,5 mL

- Πιπέτες : 50μL, 200-1000μL. (Finnipipette Thermo Labsystems)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> /0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> , pH 7.4. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MB = 141.96g / mol, Riedel-de Haen, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> MB = 156.01g / mol, Merck)
- Διάλυμα D<sub>2</sub>O / TSP [Δευτεριωμένο Ύδωρ (D<sub>2</sub>O M = 20.03g / mol , Sigma-Aldrich, βαθμού δευτερίωσης 99.9%) περιεκτικότητας 0.075% σε δευτεριωμένο άλας sodium, 3-trimethylsilyl-(2,2,3,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>)-1 -propionate (TSP, MB=172.28 g/mol Sigma Aldrich)]

#### V.4 ΟΡΓΑΝΑ

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

#### V.5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Τα δείγματα ούρων προς φασματοσκοπική ανάλυση που αποθηκευτήκαν στους -80 °C, αποψύχθηκαν και παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου 25 °C μέχρι να επιτευχθεί θερμική ισορροπία. Στη συνέχεια ακολούθησε ήπια ανάδευση 400 μL ούρων (Vortex, VELP Scientifica), και ανάμειξη με 200 μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/ 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, M=141.96 g/mol, Riedel-de Haën, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, M=156.01 g/mol, Merck). Το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών χρησιμοποιήθηκε έτσι ώστε να επιτευχθεί όσο το δυνατόν αποτελεσματικότερη ελαχιστοποίηση των μεταβολών του pH και καλύτερη σταθεροποίησή του στην περιοχή 7.4 ± 0.5. Το διάλυμα των 600μl αφέθηκε για 10 λεπτά για την πλήρη ανάμειξη των ούρων με το ρυθμιστικό διάλυμα και στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση (Centrifuge 5415 D, Eppendorf) σε 8.000 στροφές ανά λεπτό για 5 λεπτά με στόχο την απομάκρυνση πιθανών ιζημάτων. Το διαυγές υπερκείμενο 500μl αναμίχθηκε με 50 μl διαλύματος δευτεριωμένου νερού (D<sub>2</sub>O, M=20.03 g/mol, Sigma-Aldrich, βαθμού δευτερίωσης 99.9%) που περιείχε 0.075% δευτεριωμένο άλας sodium 3-trimethylsilyl-(2,2,3,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>)-1-propionate (TSP, M=172.28 g/mol, Sigma-Aldrich) με τελική συγκέντρωση 0.456mM TSP. Το μείγμα μεταφέρθηκε σε γυάλινα σωληνάρια διαμέτρου 5mm για τις μετρήσεις NMR. Το D<sub>2</sub>O χρησιμοποιήθηκε για το lock της συχνότητας πεδίου (field frequency lock-solvent) του φασματογράφου και προστέθηκε πριν την εκτέλεση των πειραμάτων <sup>1</sup>H-NMR για την ελαχιστοποίηση της ανταλλαγής μεταξύ των εύκολα αποσπώμενων πρωτονίων ορισμένων μεταβολιτών με το δευτέριο, όπως συμβαίνει π.χ. με τα πρωτόνια της κορυφής της μεθυλενικής

ομάδας της κρεατινίνης ( $\delta$   $^1\text{H}$  4.06ppm). Το TSP χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο ( $\delta$  $^1\text{H}$  0.0) για τη βαθμονόμηση των χημικών μετατοπίσεων. Η διαδικασία αυτή ακολουθήθηκε για κάθε δείγμα ούρων.

## **V.6 ΛΗΨΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ $^1\text{H}$ -NMR ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ**

Τα φάσματα  $^1\text{H}$ -NMR ούρων καταγράφηκαν στους 298K σε φασματογράφο Avance III 500 MHz (Bruker BioSpin GmbH). Για την καταστολή του σήματος του νερού χρησιμοποιήθηκε η 1D ακολουθία παλμών NOESYPRESAT (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy Presaturation) με χρόνο ανάμειξης 0,1s. Για κάθε φάσμα, συνολικά συλλέχθηκαν 128 σαρώσεις (scans) σε 64K δεδομένα (data points) με εύρος φάσματος 10,000 Hz και χρόνο λήψης 3.28s. Τα FID (free-induction decays) των φασμάτων ούρων που λήφθηκαν υπέστησαν επεξεργασία κατά την οποία πολλαπλασιάστηκαν με συνάρτηση εκθετικής line broadening (lb) ίση με 0.3 Hz, πριν να ακολουθήσει ο μετασχηματισμός Fourier. Τα φάσματα διορθώθηκαν ως προς τη φάση (phase) και τη γραμμή βάσης (baseline) (Topspin 4.0.8, Bruker Biospin, Rheinstetten, Γερμανία).

## **V.7 ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ**

Η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Chenomx NMR Suite 9.0 Profiler (Chenomx Edmonton, Καναδάς), τις διαθέσιμες βάσεις δεδομένων όπως το Human Metabolome Database και το Biological Magnetic Resonance Data Bank. Η πρότυπη βιβλιοθήκη 500 MHz του λογισμικού Chenomx NMR Suite 9.0 χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών, η κρεατινίνη ούρων χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο και οι τιμές εκφράστηκαν ως μmoles του μεταβολίτη προς mmol κρεατινίνης ( $\mu\text{M}/\text{mM}$ ).

### **V.7.1 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ**

Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS όπου έγινε το t-test για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών με στατιστικά σημαντική μεταβολή μεταξύ των δύο ομάδων προς μελέτη. Το επίπεδο εμπιστοσύνης ορίστηκε σε  $p < 0.05$  και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση (Mean  $\pm$  SD).

## V.8 ΜΗ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Κατά την πολυπαραγοντική ανάλυση (multivariate analysis) το μοντέλο PCA χρησιμοποιήθηκε για μια γενική επισκόπηση των δειγμάτων και την πρώτη διάκριση πιθανών ομάδων (clusters), τάσεων (trends) ή ακραίων τιμών (outliers) και ακολούθησε η ανάλυση PLS-DA με τα διαγράμματα scores plots. Το μοντέλο PLS-DA αξιολογήθηκε με βάση τους συντελεστές σημαντικότητας  $R^2$  και  $Q^2$  όπως προέκυψαν από το cross validation test. Για την αξιολόγηση της στατιστικής σημαντικότητας του μοντέλου διαχωρισμού PLS-DA χρησιμοποιήθηκε επίσης το permutation test. Βάση της μη στοχευμένης ανάλυσης λήφθηκε το γράφημα του VIP (Variable Important Projection) score για την καταγραφή των στατιστικά σημαντικών μεταβολιτών (τιμή VIP >1) και τα αποτελέσματα του VIP συγκρίθηκαν με αυτά των t-test στην στοχευμένη ανάλυση.

---

## VI. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

---

### VI.1 ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των 25 ασθενών με ΣΔΤ2 χωρίς επιπλοκές σε σχέση με αυτά των 22 διαβητικών ασθενών με ΔΝ 3 χρόνια πριν εμφανίσουν νεφροπάθεια παρουσιάζονται στον **πίνακα 2**. Μέσω στατιστικής ανάλυσης paired t-test επίσης έγινε σύγκριση των κλινικών παραμέτρων στους διαβητικούς ασθενείς ίδιας ομάδας, 3 χρόνια πριν (pre-DKD) και αφότου ανέπτυξαν ΔΝ (**Πίνακας 3**). Συνολικά, η αλβουμίνη ούρων εμφανίστηκε αυξημένη στους ασθενείς που ανέπτυξαν ΔΝ ενώ τα δημογραφικά στοιχεία και οι υπόλοιποι κλινικοί παράμετροι δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές μεταξύ των ομάδων προς σύγκριση.

**Πίνακας 2.** Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΣΔΤ2 (T2DM) χωρίς επιπλοκές και των διαβητικών ασθενών με ΔΝ 3 χρόνια πριν εμφανίσουν την νόσο (pre-DKD).

	<b>T2DM (mean ± SD), N=25</b>	<b>pre-DKD (mean ± SD), N=22</b>	<b>P value</b>
Age (y)	64.36 ± 5.21	66.95 ± 12.03	NS
Height (cm)	166.50 ± 8.17	167.09 ± 9.62	NS
Glu (mg/dL)	171.04 ± 52.93	156.36 ± 60.29	NS

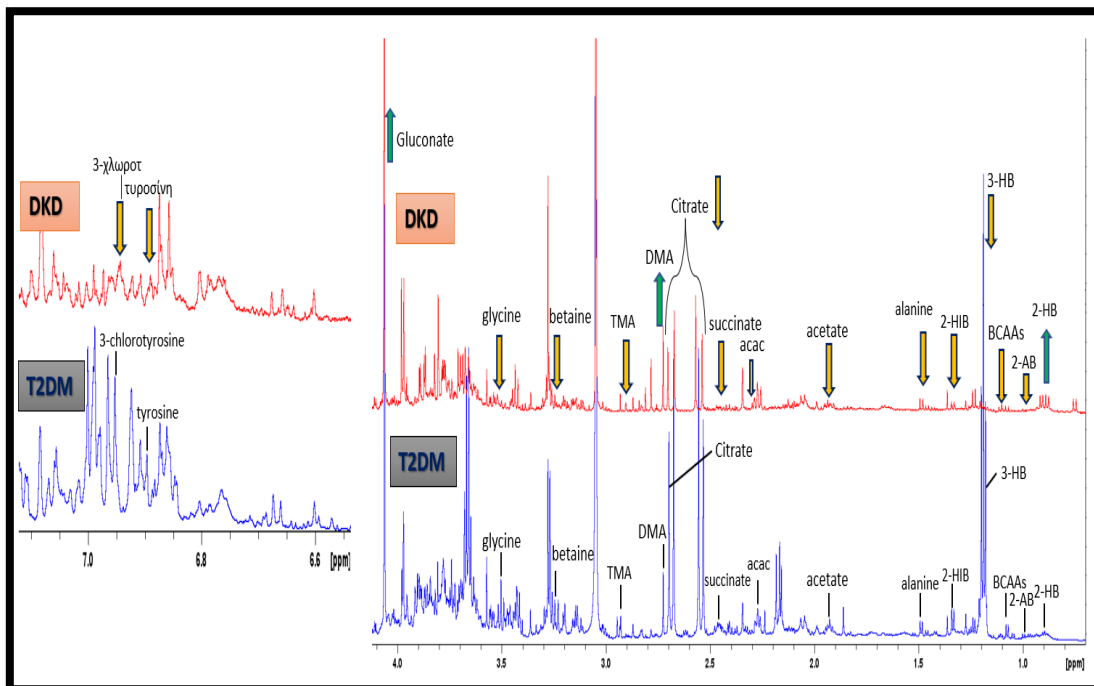
Urea (mg/dL)	36.04 ± 8.34	39.50 ± 9.81	NS
Creatinine (mg/dL)	0.88 ± 0.19	0.94 ± 0.19	NS
HbA1c (%)	7.53 ± 1.25	7.32 ± 1.51	NS

**Πίνακας 3.** Τα κλινικά χαρακτηριστικά των διαβητικών ασθενών 3 χρόνια πριν (pre-DKD) και αφότου ανέπτυξαν ΔΝ (DKD).

	pre-DKD (mean ± SD), N=22	DKD (mean ± SD), N=22	P value
Glu (mg/dL)	156.36 ± 60.29	154.73 ± 48.79	NS
Urea (mg/dL)	47.50 ± 27.81	52.00 ± 26.68	NS
Creatinine (mg/dL)	1.10 ± 0.34	1.22 ± 0.47	NS
HbA1c (%)	7.32 ± 1.51	7.43 ± 1.57	NS
Urine Alb (mg/g Creat)	25 ± 13	278 ± 89	<0.001

## VI.2 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ <sup>1</sup>H-NMR ΟΥΡΩΝ

Στην **εικόνα 28** παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά φάσματα <sup>1</sup>H-NMR 700 MHz ούρων ασθενών με ΣΔΤ2 και ΔΝ με τις μεταβολές και χημικές μετατοπίσεις των προσδιορισθέντων μεταβολιτών στις δύο ομάδες προς μελέτη.



**Εικόνα 28.** Σύγκριση φασμάτων <sup>1</sup>H-NMR ούρων. Με μπλε χρώμα παρουσιάζεται το φάσμα ούρων για τους ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (T2DM) και με κόκκινο χρώμα των ασθενών με διαβητική

νεφροπάθεια (DKD). Όπου 3-HB (3-hydroxybutyrate) : 3-υδροξυβουτυρικό οξύ, 2-HB (2-hydroxybutyrate): 2-υδροξυβουτυρικό οξύ, 2-HIB (3-hydroxybutyrate) : 2-υδροξυισοβουτυρικό οξύ, 2-AB (2-aminobutyrate) 2-αμινοβουτυρικό οξύ, DMA (Dimethylamine) : διμεθυλαμίνη, TMA : Trimethylamine (Τριμεθυλαμίνη), acac (acetoacetate) : Ακετοξικό, BCAAs (Branched Chain Amino Acids) : Αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας (Βαλίνη, Λευκίνη, Ισολευκίνη).

### VI.3 ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΑΠΟ ΤΑ <sup>1</sup>H-NMR ΦΑΣΜΑΤΑ ΟΥΡΩΝ ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Μετά από την ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών από τα <sup>1</sup>H-NMR φάσματα ούρων ασθενών μέσω του προγράμματος SPSS πραγματοποιήθηκε η στατιστική ανάλυση t-test και καταγράφηκαν οι μέσες τιμές και η τυπική απόκλιση (mean ± SD) των μεταβολιτών και η στατιστική σημαντικότητα βάση της τιμής p (**Πίνακας 4**). Από τους 48 μεταβολίτες που ποσοτικοποιήθηκαν στα δείγματα ασθενών με ΔN, 26 παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές σε σύγκριση με τις τιμές των δειγμάτων των ΣΔΤ2 ασθενών χωρίς επιπλοκές. Από αυτούς, οι 23 μεταβολίτες βρέθηκαν μειωμένοι σε ασθενείς με ΔN, ενώ μόνο 3 εμφάνισαν αύξηση. Μειωμένα ήταν τα ενδιάμεσα προϊόντα του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος (κιτρικό, ηλεκτρικό οξύ), τα κετονοσώματα (3-υδροξυβουτυρικό (3-HB), ακετοξικό οξύ), τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας BCAAs (λευκίνη, ισολευκίνη, βαλίνη) και τα ενδιάμεσα προϊόντα οξείδωσής τους (2-υδροξυ-3-μεθυλοβαλερικό, 2-υδροξυϊσοβαλερικό, 3-μεθυλο-οξοβαλερικό οξύ, N-ισοβαλεροϋλογλυκίνη), τα γλυκογενετικά αμινοξέα (γλυκίνη, αλανίνη), οι μεταβολίτες που εμπλέκονται στον κύκλο μεταβολισμού της μεθυλαμίνης (βεταΐνη, τριμεθυλαμίνη, σαρκοσίνη), το οξικό οξύ, η N-μεθυλοϋδαντοΐνη, το 2-υδροξυϊσοβουτυρικό οξύ (2-HIB), το 2-αμινοβουτυρικό οξύ, η 3-χλωροτυροσίνη και η μεθανόλη. Σε σχέση με τα υπόλοιπα ενδιάμεσα του μονοπατιού μεταβολισμού της μεθυλαμίνης, η διμεθυλαμίνη (DMA) εμφάνισε στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα στα ούρα ασθενών με ΔN, ενώ στην ίδια ομάδα ασθενών αυξημένα επίσης παρατηρήθηκαν το 2-υδροξυβουτυρικό οξύ (2-HB) και το γλυκονικό οξύ.

Metabolites ( $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine)	T2DM (n=25)	DKD (n=22)	P value	VIP
2-aminobutyrate	6.75 ± 2.70	3.40 ± 1.89	<0.001	
2-hydroxy-3-methylvalerate	10.37 ± 7.18	4.70 ± 2.77	<0.01	
2-hydroxybutyrate	1.33 ± 1.05	4.59 ± 2.02	<0.01	↑
2-hydroxyisobutyrate	8.70 ± 3.06	4.97 ± 1.95	<0.001	
2-hydroxyisovalerate	4.75 ± 1.41	1.51 ± 0.58	<0.001	↓
2-hydroxyvalerate	7.00 ± 3.79	5.17 ± 1.73	NS	



3-chlorotyrosine	24.78 ± 20.60	9.31 ± 6.53	<0.01	
3-hydroxybutyrate	53.52 ± 46.26	4.75 ± 2.30	<0.01	↓
3-hydroxyisobutyrate	9.68 ± 5.63	7.13 ± 4.77	NS	
3-hydroxyisovalerate	4.27 ± 2.19	3.84 ± 2.52	NS	↑
3-indoxylsulfate	32.52 ± 15.18	33.24 ± 16.65	NS	
3-methyl-2-oxovalerate	10.57 ± 6.79	4.41 ± 2.47	<0.001	
4-hydroxybenzoate	4.53 ± 3.75	4.80 ± 3.79	NS	↑
Acetate	28.73 ± 7.95	4.97 ± 3.59	<0.001	↓
Acetoacetate	50.56 ± 20.01	8.19 ± 3.03	<0.001	↓
Acetone	2.98 ± 1.96	3.97 ± 3.67	NS	
Alanine	41.39 ± 26.30	21.15 ± 19.53	<0.01	
Betaine	79.84 ± 47.44	16.84 ± 12.61	<0.001	↓
Carnitine	9.10 ± 7.98	5.37 ± 5.83	NS	
Choline	6.72 ± 5.64	4.77 ± 3.40	NS	
Cis-aconitate	16.34 ± 7.96	18.18 ± 8.24	NS	↑
Citrate	336.45 ± 225.22	174.96 ± 144.84	<0.01	
Dimethylamine	3.45 ± 1.50	32.52 ± 13.13	<0.001	↑
Formate	23.71 ± 12.22	16.92 ± 12.26	NS	
Fumarate	0.95 ± 0.75	0.92 ± 1.01	NS	
Gluconate	39.58 ± 22.31	66.75 ± 32.32	<0.01	↑
Glycine	115.35 ± 73.22	59.29 ± 47.79	<0.01	
Hippurate	324.57 ± 225.81	273.92 ± 232.11	NS	
Isoleucine	6.32 ± 3.70	2.41 ± 2.40	<0.001	
Lactate	13.84 ± 9.39	9.87 ± 5.43	NS	
Leucine	11.52 ± 3.68	3.46 ± 2.67	<0.001	↓
Methanol	24.72 ± 11.47	9.57 ± 6.87	<0.001	↓
Methylamine	5.35 ± 3.72	3.81 ± 3.02	NS	
Myo inositol	102.18 ± 88.97	60.57 ± 57.95	NS	
N,N Dimethylglycine	4.49 ± 3.48	5.79 ± 3.67	NS	↓
N-Isovalerylglycine	3.38 ± 2.04	1.48 ± 0.51	<0.01	
N-Methylhydantoin	20.52 ± 9.33	5.03 ± 3.63	<0.001	↓
N-Phenylacetyl-glycine	52.82 ± 32.32	50.90 ± 23.13	NS	↑
Phenylalanine	51.30 ± 42.18	40.04 ± 25.69	NS	
Pyruvate	5.18 ± 3.21	4.17 ± 2.42	NS	
Sarcosine	62.14 ± 28.55	2.08 ± 1.02	<0.001	↓
Succinate	13.09 ± 5.62	3.11 ± 1.80	<0.001	
Threonine	35.86 ± 20.08	30.78 ± 29.35	NS	
Trigonelline	40.92 ± 30.82	43.08 ± 42.57	NS	
Trimethylamine	3.20 ± 1.38	1.18 ± 0.51	<0.01	
Trimethylamine-N-oxide	39.30 ± 45.00	57.90 ± 35.35	NS	
Tyrosine	18.16 ± 6.60	7.93 ± 5.46	<0.001	↓
Valine	8.11 ± 3.73	4.08 ± 2.82	<0.001	

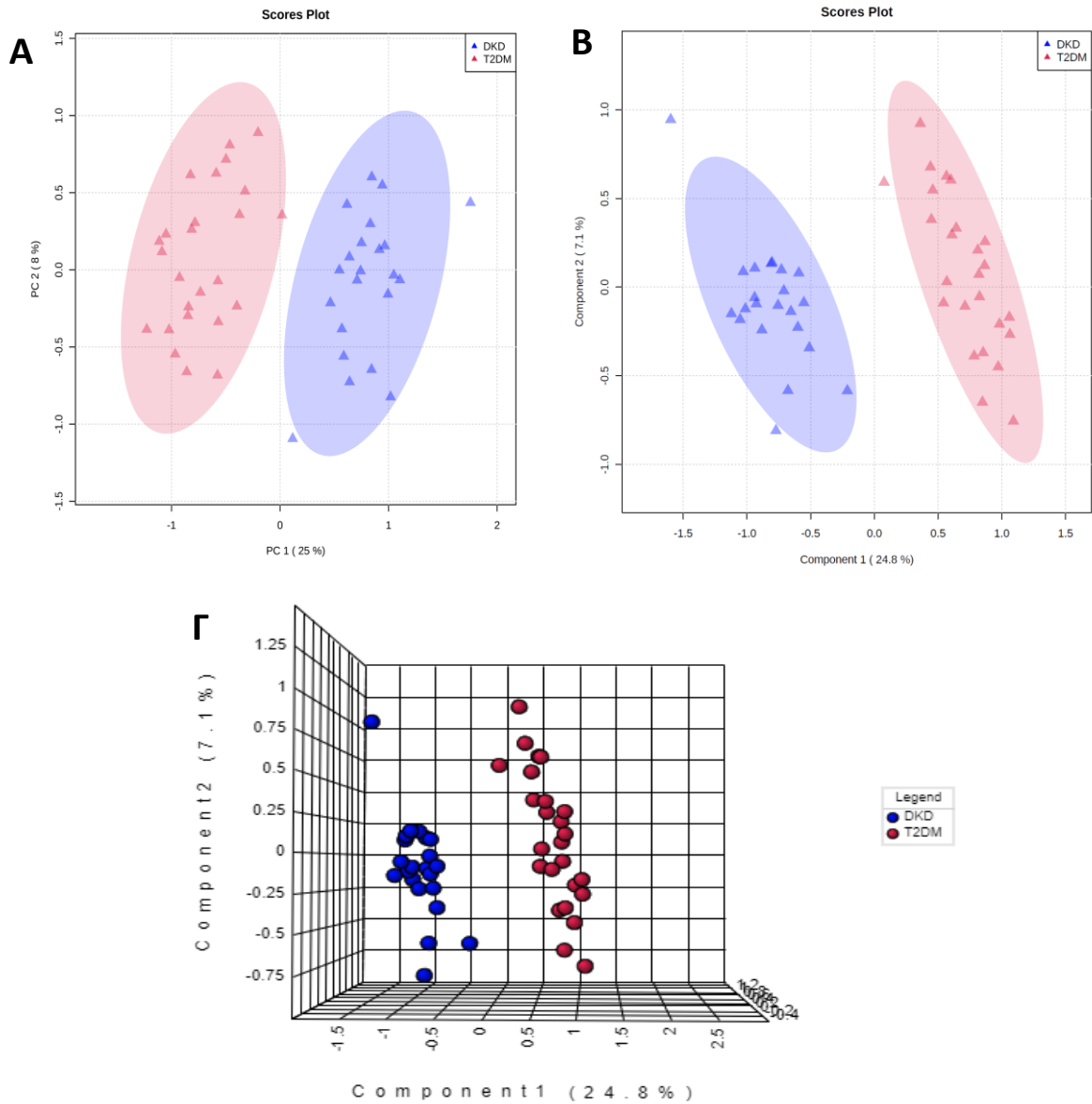
**Πίνακας 4.** Συγκεντρώσεις (Mean ± SD) μεταβολιτών στα ούρα ασθενών με διαβητική νεφροπάθεια (DKD/ΔΝ, n=22) και ασθενών με διαβήτη τύπου 2 χωρίς επιπλοκές (T2DM/ΣΔΤ2, n=25).

\* P value από τη στατιστική ανάλυση για τις ομάδες DKD και T2DM, τιμές p<0.05 θεωρούνται στατιστικά σημαντικές. \*\* Μεταβολές βάση των VIP values όπως προκύπτουν από την πολυπαραγοντική ανάλυση.

## VI.4 ΜΗ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ (MULTIVARIATE ANALYSIS)

Σύμφωνα με τη μη στοχευμένη ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με την πλατφόρμα Metaboanalyst ελήφθησαν αρχικά τα PCA score plot, με την κάθε κουκίδα να αντιστοιχεί σε ένα ξεχωριστό φάσμα, που σκοπό είχε να λάβουμε μια πιο γενική εικόνα όσον αφορά την σύγκριση των δειγμάτων ασθενών των δύο ομάδων προς μελέτη, δηλαδή αυτών με ΔΝ και αυτών με ΣΔΤ2 χωρίς επιπλοκές, που αποτελούν τα control. Λαμβάνοντας το PCA score plot **(Εικόνα 29.A)** δεν εμφανίστηκαν ιδιαίτερα ακραίες τιμές για την κάθε ομάδα, ενώ παρατηρήθηκε ένας σχετικά καλός διαχωρισμός μεταξύ των δύο ομάδων ως προς και τις δύο κύριες συνιστώσες PC1 και PC2.

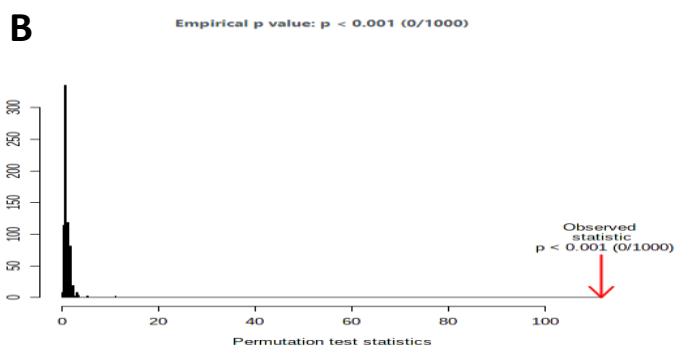
Όσον αφορά τα PLS-DA scores plots **(Εικόνα 29.B - 28.Γ)** παρουσιάστηκε ένας πολύ σαφής διαχωρισμός μεταξύ των δύο ομάδων και ομοιογένεια στο μεταβολικό προφίλ της κάθε ομάδας ξεχωριστά, κάτι που υποδεικνύει ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων. Η εγκυρότητα του διαχωρισμού αξιολογήθηκε από τις στατιστικές παραμέτρους ποιότητας  $R^2$  και  $Q^2$  (0.91 και 0.85 αντιστοίχως) **(Εικόνα 30.A)** και από την τιμή  $p$  του permutation test ( $p < 0.001$ ) **(Εικόνα 30.B)**. Τα στοιχεία αυτά επιβεβαιώνουν ότι λήφθηκε ένα πολύ καλό μοντέλο διαχωρισμού στο μεταβολικό προφίλ ανάμεσα στις δύο προς μελέτη ομάδες.



**Εικόνα 29.** (Α) Τα PCA και (Β) PLS-DA στατιστικά μοντέλα των δεδομένων ούρων από ασθενείς με ΣΔΤ2 (T2DM) χωρίς επιπλοκές (▲) και από ασθενείς με ΔΝ (DKD) (▲) όπου κάθε σημείο αντιστοιχεί σε ένα δείγμα. Στην εικόνα Γ παρουσιάζεται το PLS-DA σε τρισδιάστατη μορφή.

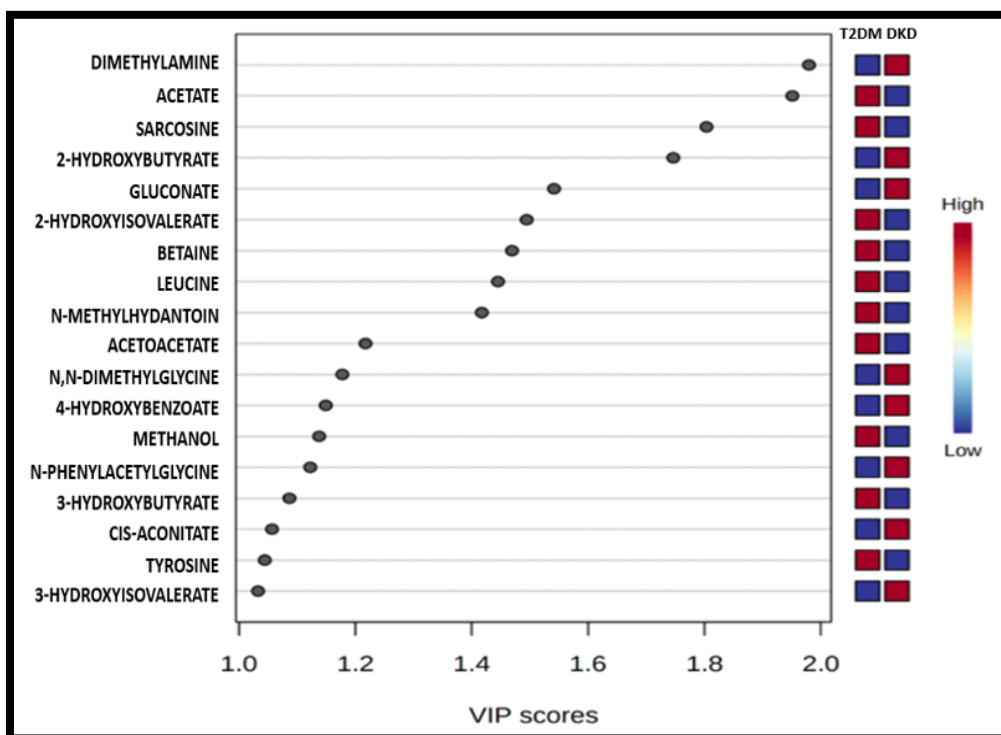
**PLS-DA Cross Validation details**

Measure	Component 2
Accuracy	1.0
R <sup>2</sup>	0.91
Q <sup>2</sup>	0.85



**Εικόνα 30. (A)** Οι συντελεστές σημαντικότητας του μοντέλου PLS-DA,  $R^2$  (0.91) και  $Q^2$ (0.85) που ελήφθησαν από το cross-validation test και **(B)** η τιμή  $p$  ( $p < 0.001$ ) από τις 1000 επαναλήψεις permutation test.

Με βάση τις τιμές των VIP scores (**Εικόνα 31**) από τη μη στοχευμένη ανάλυση μπορούσαμε να διακρίνουμε ποιοι μεταβολίτες συμβάλλουν περισσότερο στο διαχωρισμό των δύο ομάδων. Πιο συγκεκριμένα σύμφωνα με τις τιμές  $VIP > 1$ , η ομάδα της ΔN μπορεί να διακριθεί από την ομάδα του ΣΔΤ2 από τα αυξημένα επίπεδα της διμεθυλαμίνης, 2-υδροξυβουτυρικού οξέος (2-HB) (1.7464), γλυκονικού οξέος(1.5414), N,N-διμεθυλογλυκίνης (1.9796), N-φαινυλακετυλογλυκίνης (1.1226), 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος (1.1493), cis-ακονιτικού οξέος (1.0569), 3-υδροξυϊσοβαλερικού οξέος (1.0867) και τα μειωμένα επίπεδα του 3-υδροξυβουτυρικού (3-HB) (1.0867), ακετοξικού (1.2174) και οξικού οξέος (1.9510), 2-υδροξυϊσοβαλερικού οξέος (1.4945), της σαρκosίνης (1.8034), βεταΐνης (1.4692), λευκίνης (1.4451), N-μεθυλοϋδαντοΐνης (1.4174), μεθανόλης (1.1378) και της τυροσίνης (1.043). Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε σχετική συμφωνία με τα αποτελέσματα της στοχευμένης ανάλυσης με το 3-υδροξυϊσοβαλερικό οξύ, το 4-υδροξυβενζοϊκό, το cis-ακονιτικό οξύ, τη N,N-διμεθυλογλυκίνη και τη N-φαινυλακετυλογλυκίνη να αποτελούν τους επιπλέον στατιστικά σημαντικούς μεταβολίτες που προέκυψαν (**Πίνακας 4**).



**Εικόνα 31.** Οι μεταβολίτες με VIP (Variable Importance Plot) ( $> 1$ ) που συμβάλλουν στο διαχωρισμό των δύο ομάδων, ΔN (DKD) και ΣΔΤ2 (T2DM). Σύμφωνα με τις τιμές  $VIP > 1$ , η ομάδα της ΔN μπορεί να διακριθεί από την ομάδα του ΣΔΤ2 από τα αυξημένα (κόκκινο χρώμα) επίπεδα της διμεθυλαμίνης, του 2-υδροξυβουτυρικού

οξέος (2-HB) (1.7464), του γλυκονικού οξέος (1.5414), της N,N-διμεθυλογλυκίνης (1.9796), της N-φαινυλακετυλογλυκίνης (1.1226), του 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος (1.1493), του cis-ακονιτικού οξέος (1.0569), του 3-υδροξυϊσοβαλερικού οξέος (1.0867) και από τα μειωμένα επίπεδα (μπλε χρώμα) του 3-υδροξυβουτυρικού οξέος (3-HB) (1.0867), του ακετοξικού οξέος (1.2174), του οξικού οξέος (1.9510), του 2-υδροξυϊσοβαλερικού οξέος (1.4945), της σαρκοσίνης (1.8034), της βεταΐνης (1.4692), της λευκίνης (1.4451), της N-μεθυλοϋδαντοΐνης (1.4174), της μεθανόλης (1.1378) και της τυροσίνης (1.043).

---

## VII. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

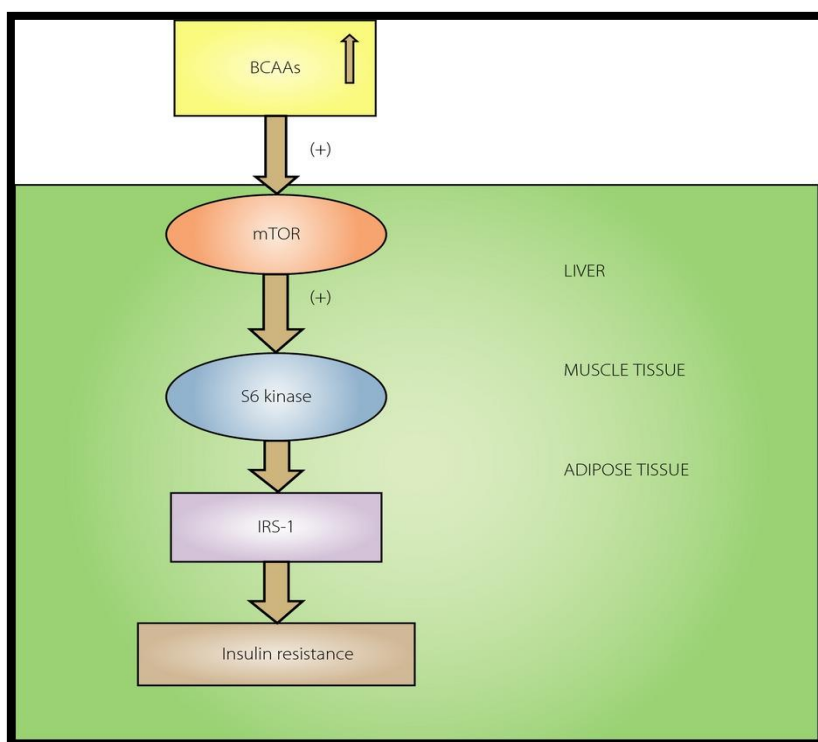
Στην παρούσα εργασία διαπιστώθηκε ότι, ασθενείς με διαβητική νεφροπάθεια παρουσίασαν ένα διαφοροποιημένο μεταβολικό προφίλ ούρων σε σχέση με τους ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 χωρίς επιπλοκές (ΣΔΤ2).

Σύμφωνα με την μη στοχευμένη, κλασική στατιστική ανάλυση οι κυριότερες αλλαγές που χαρακτηρίζουν το μεταβολικό προφίλ των ασθενών με ΔΝ αφορούν στις συγκεντρώσεις των κετονοσωμάτων, του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων, των ενδιάμεσων προϊόντων του κύκλου τρικαρβοξυλικού οξέος και των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας BCAAs. Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες [40] παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντική μείωση στα κετονοσώματα (3-HB, ακετοξικό οξύ), όπως και στο οξικό οξύ, που αποτελεί προϊόν β-οξειδωσης λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια. Οι μεταβολές αυτές αντανακλούν την μειωμένη δράση του μονοπατιού της κετογένεσης και διαταραχή στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια, αλλαγές στο ενεργειακό μεταβολισμό των νεφρικών κυττάρων και συνολικά δηλώνουν ότι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην παθογένεση της ΔΝ [40]. Λόγω της μειωμένης οξειδωσης των λιπαρών οξέων παρατηρείται συσσώρευση τους, κάτι το οποίο επηρεάζει τα ποδοκύτταρα και μεταγενέστερα οδηγεί σε αποκόλληση τους από τη ΣΒΜ. Η αποκόλλησή τους από την ΣΒΜ έχει σαν αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία του ΣΦΔ και έτσι τη διαρροή αλβουμίνης στα ούρα [50].

Σε παρόμοιο μηχανισμό βλάβης των μιτοχονδρίων πιθανόν να αποδίδονται και τα μειωμένα επίπεδα των ενδιάμεσων προϊόντων κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος (κιτρικό, ηλεκτρικό οξύ). Τα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια έχουν πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε μιτοχόνδρια και εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η μείωση των ενδιάμεσων

προϊόντων αυτών είναι ενδεικτική της διαταραχής του ενεργειακού μεταβολισμού και της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας [51] και σε προηγούμενες μελέτες έχει συνδεθεί με την εξέλιξη της διαβητικής νεφροπάθειας και την ΧΝΝ σε διαβητικά μοντέλα [46]. Συγκεκριμένα για το κιτρικό οξύ έχει βρεθεί ότι χορήγηση κιτρικού άλατος νατρίου συνδέεται με νεφροπροστασία, καθώς έχει παρατηρηθεί ότι μειώνει την σωληναριακή βλάβη και καθυστερεί την μείωση του GFR [52].

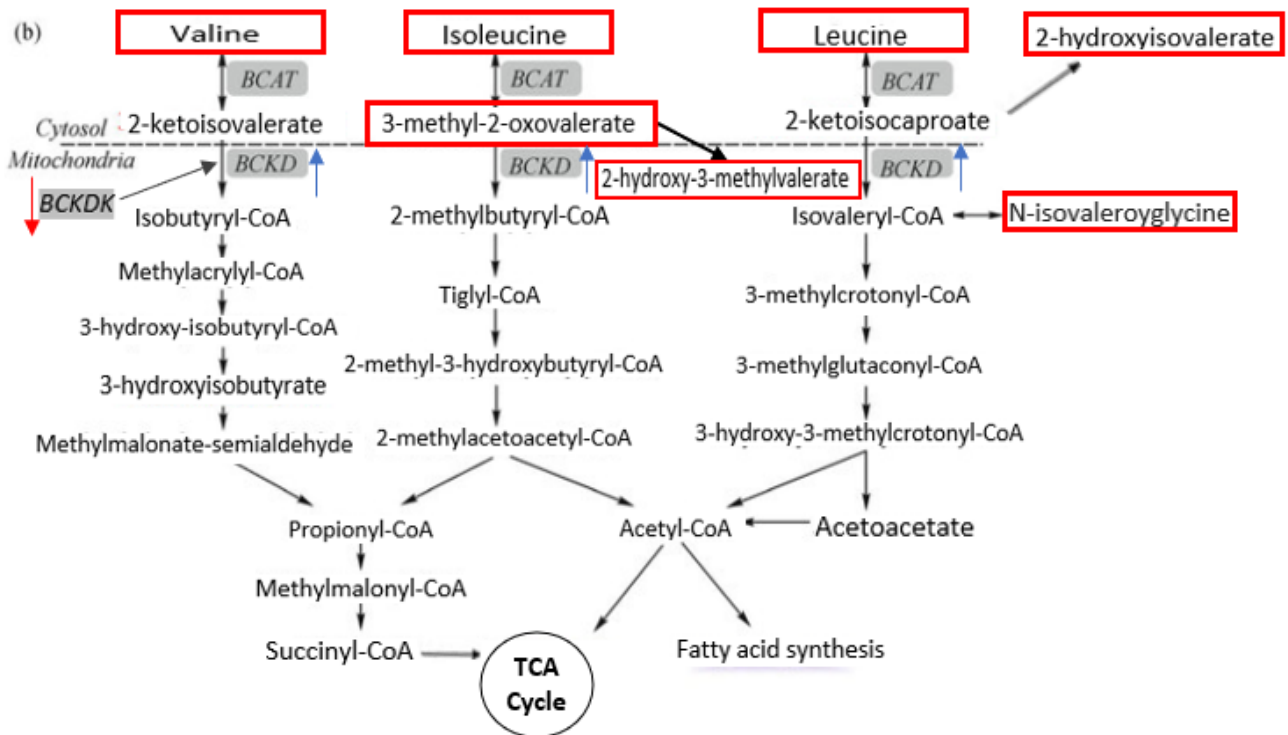
Εν συνεχεία, τα επίπεδα των BCAAs παρουσιάζονται αυξημένα στους ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 και μειωμένα στους ασθενείς με ΔΝ. Η αύξηση των επιπέδων τους στον διαβήτη χωρίς επιπλοκές αποτελεί ισχυρή ένδειξη αντίστασης στην ινσουλίνη. Τα υψηλά επίπεδα BCAAs ενεργοποιούν τον mTORC1 (σύμπλοκο mTOR1) έχοντας ως αποτέλεσμα την επαγόμενη αντίσταση στην ινσουλίνη μέσω της ενεργοποίησης της κινάσης S6 (S6K1), η οποία με την σειρά της οδηγεί στη φωσφορυλίωση της σερίνης του υποστρώματος του υποδοχέα ινσουλίνης (IRS-1) (**Εικόνα 32**) [53].



**Εικόνα 32.** Ο προτεινόμενος μηχανισμός επαγωγής της αντίστασης στην ινσουλίνη από τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας BCAAs. Τα αυξημένα BCAAs είναι σε θέση να ενεργοποιήσουν τον μηχανισμό mTOR στο ήπαρ, στους μυς και στον λιπώδη ιστό. Η ενεργοποίηση της κινάσης S6 από τα BCAAs οδηγεί σε φωσφορυλίωση της σερίνης του υποστρώματος-1 του υποδοχέα ινσουλίνης (IRS-1) και συνεπώς στην αναστολή του IRS-1. Αυτή η διεργασία θα μπορούσε να οδηγήσει σε αντίσταση στην ινσουλίνη [54].

Αντίθετα, όπως φαίνεται σε προηγούμενες μελέτες [44], παρόλο που η ΔΝ αποτελεί κατάσταση πρωτεϊνικού καταβολισμού, τα επίπεδα των BCAA στην νόσο εμφανίζονται μειωμένα.

Κατά την διάρκεια της ΧΝΝ εμφανίζεται μεταβολική οξέωση και στην κατάσταση αυτή μια προτεραιότητα του μεταβολισμού πρωτεϊνών και αμινοξέων είναι η αύξηση των διττανθρακικών μέσω της παραγωγής αμμωνίας από τα νεφρά και της απέκκρισης στα ούρα συμβάλλοντας έτσι στην ρύθμιση της οξεοβασικής ισορροπίας. Ο μεταβολισμός της γλουταμίνης από μόνος του δεν ευθύνεται για την παραγωγή αμμωνίας από τους νεφρούς. Η παραγωγή αμμωνίας από άλλα αμινοξέα, που αντιπροσωπεύει το 20% της παραγωγής αμμωνίας υπό κανονικές συνθήκες, αυξάνεται κατά τη διάρκεια της οξέωσης. Σε αυτό το πλαίσιο, αποδείχθηκε ότι η μεταβολική οξέωση διεγείρει την οξείδωση BCAA (**Εικόνα 33**) στα κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων αυξάνοντας τόσο την ποσότητα όσο και την κατάσταση ενεργοποίησης της αφυδρογονάσης α-κετο οξέος διακλαδισμένης αλυσίδας (BCKDH ή BCKD) μέσω της μείωσης της κινάσης της αφυδρογονάσης α-κετο οξέος διακλαδισμένης αλυσίδας (BCKDK) [55][56]. Η οξέωση είναι γνωστό ότι αυξάνει τη διάσπαση των πρωτεϊνών καθώς και την οξείδωση των BCAAs, γεγονός που εξηγεί τη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων διττανθρακικών στο πλάσμα και των επιπέδων BCAAs σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση. Ως εκ τούτου ο καταβολισμός των μυϊκών BCAAs εμφανίζεται ως στοιχείο ενός ολοκληρωμένου ρυθμιστικού μηχανισμού για την καταπολέμηση της μεταβολικής οξέωσης [55]. Η εξάντληση των BCAAs πιθανόν να οφείλεται και στην αυξημένη συμμετοχή τους ως υποστρώματα γλυκονεογένεσης, στη μειωμένη συνεισφορά των νεφρών στην πρωτεϊνοσύνθεση και στην ινσουλινοαντίσταση [44]. Στην παρούσα μελέτη επίσης παρατηρήσαμε μειωμένα 4 παράγωγα του καταβολισμού των BCAAs (2-υδρόξυ-3-μεθυλοβαλερικό, 2-υδροξυϊσοβαλερικό, 3-μεθυλο-2-οξοβαλερικό οξύ και N-ισοβαλεροϋγκλίνη), σε ασθενείς με ΔN, για τα οποία παράγωγα λαμβάνουν χώρα παρόμοιοι μηχανισμοί στην διαταραχή του μεταβολισμού τους.



**Εικόνα 33.** Το μονοπάτι του καταβολισμού των BCAAs και των παραγώγων τους. Κατά την προχωρημένη νεφρική νόσο η μεταβολική οξέωση διεγείρει την οξείδωση BCAAs στα κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων αυξάνοντας την ενεργοποίηση της αφυδρογονάσης των α-κετοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (BCKD) μέσω της μείωσης της δράσης της κινάσης της αφυδρογονάσης των α-κετοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (BCKDK). Με κόκκινο χρώμα φαίνονται οι μεταβολίτες που ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένοι στην εργασία μας σε ούρα ασθενών με ΔΝ [57].

Παράλληλα, όπως και άλλες μελέτες [30][46] σε ασθενείς με ΔΝ, παρουσιάστηκαν μειωμένα τα επίπεδα των γλυκογενετικών αμινοξέων (αλανίνη, γλυκίνη) και αυτό οφείλεται στην αυξημένη κατανάλωση τους ως υπόστρωμα παραγωγής αμμωνίας και γλυκονεογένεσης, των οποίων οι απαιτήσεις αυξάνονται με την εξέλιξη του διαβήτη [51]. Επιπρόσθετα, μελέτες έχουν δείξει ότι η χαμηλή γλυκίνη ούρων συσχετίζεται με την εξέλιξη από νορμοαλβουμινουρία σε ΔΝ [46], ενώ σε άλλες [58] έχει συσχετιστεί με μειωμένα επίπεδα GFR.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της δικής μας εργασίας, τα επίπεδα της τυροσίνης σε ούρα ασθενών με ΔΝ ήταν χαμηλότερα σε σχέση με αυτά στους διαβητικούς ασθενείς χωρίς επιπλοκές. Η έκκριση της τυροσίνης από το νεφρό προέρχεται σε μεγάλο βαθμό από την υδρόλυση της φαινυλαλανίνης, καθώς ο νεφρός είναι υπεύθυνος για την πρόσληψή της. Σε προχωρημένη ΧΝΑ, η μετατροπή της φαινυλαλανίνης σε τυροσίνη μειώνεται λόγω απώλειας δραστηριότητας της νεφρικής υδροξυλάσης της φαινυλαλανίνης (PAH) [59]. Οπότε, το γεγονός αυτό αιτιολογεί τα μειωμένα



επίπεδα της τυροσίνης στα ούρα ασθενών με ΔΝ, καθώς μπορεί να λαμβάνει χώρα ο μηχανισμός αυτός.

Ακόμα ένα εύρημα της εργασίας μας είναι η στατιστικά σημαντική μείωση ενός ωσμωλύτη, της βεταΐνης. Σε ένα φυσιολογικό νεφρό οι ωσμωλύτες βρίσκονται στον νεφρικό μυελό όπου προστατεύουν τα νεφρικά κύτταρα από υπερτονικότητα [60]. Εκτός από τον ρόλο της ως ωσμωλύτη, η βεταΐνη παρουσιάζει και νεφροπροστατευτικές ιδιότητες. Μελέτες έχουν δείξει επίσης ότι η βεταΐνη έχει σημαντικές αντι-φλεγμονώδεις ιδιότητες [61] και ότι βελτιώνει τη λειτουργία των μιτοχονδρίων [62]. Έτσι μπορούμε να υποθέσουμε ότι μείωση του μεταβολίτη αυτού σε δείγματα ούρων ασθενών με ΔΝ είναι ενδεικτική βλάβης στους νεφρούς.

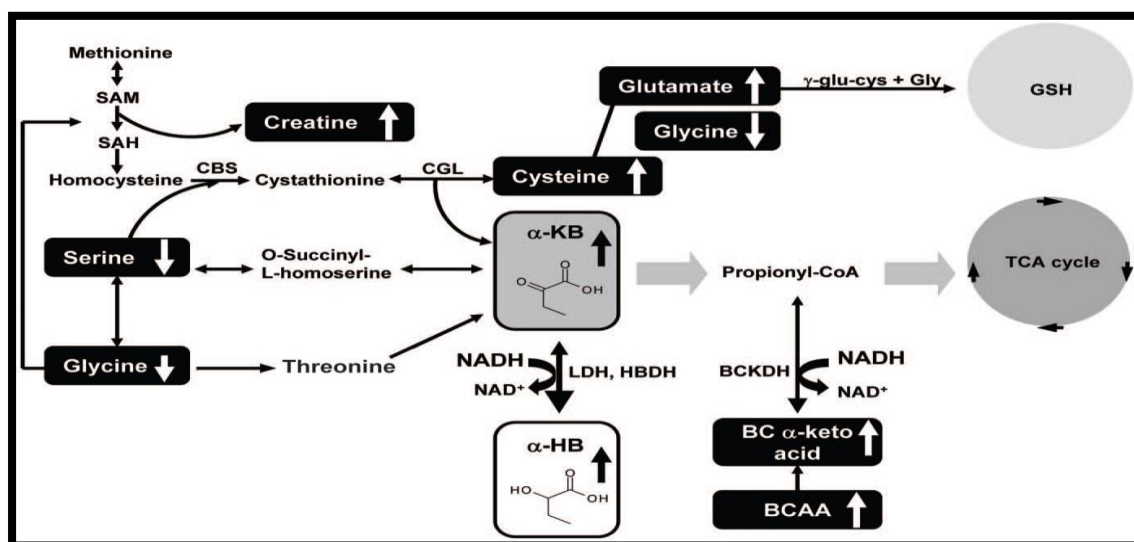
Η Ν-μεθυλοϋδαντοΐνη είναι ένας οξειδωτικός μεταβολίτης της κρεατινίνης και προηγούμενες μελέτες σε πειραματικά μοντέλα αποκάλυψαν ότι παρουσιάζει σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες και μπορεί να προστατέψει τα σωληναριακά κύτταρα από διάφορες τοξικές επιδράσεις [63][64]. Υποθέτουμε ότι η μείωσή της αντανακλά την εξέλιξη του ΣΔΤ2 προς ΔΝ, καθώς το οξειδωτικό στρες αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό της τελευταίας.

Τέλος, μειωμένα επίπεδα σε ούρα ασθενών ΔΝ σε σχέση με τους διαβητικούς ασθενείς χωρίς επιπλοκές παρατηρήθηκαν σε λιγότερους μελετημένους μεταβολίτες, όπως στο 2-αμινοβουτυρικό οξύ, 3-χλωροτυροσίνη, 2-υδροξυϊσοβουτυρικό οξύ (2-HIB) και μεθανόλη. Παρ'όλα αυτά, η μειωμένη έκκριση του 2-αμινοβουτυρικού ενδεχομένως να συνδέεται με ένα μεταβολίτη που ονομάζεται μεθυλογλυοξάλη και ο οποίος αποτελεί κύρια πρόδρομη ένωση για μη ενζυματική γλυκοζυλίωση οδηγώντας στην δημιουργία AGEs τα οποία αποτελούν σημαντικό παράγοντα για την εμφάνιση διαβήτη και των επιπλοκών του [65]. Η μεθυλογλυοξάλη παράγεται από το καταβολισμό της θρεονίνης και το γεγονός ότι το 2-αμινοβουτυρικό οξύ, το οποίο επίσης αποτελεί ένα παραπροϊόν του καταβολισμού της θρεονίνης [51], βρίσκεται μειωμένο σε ασθενείς με ΔΝ στην δική μας μελέτη ίσως να αποτελεί μια ένδειξη ότι ευνοείται ο σχηματισμός της μεθυλογλυοξάλης παρά άλλων μεταβολιτών.

Όσον αφορά την 3-χλωροτυροσίνη αν και στην δική μας εργασία παρατηρήθηκε μειωμένη σε ασθενείς με ΔΝ, σε άλλες μελέτες τα υψηλά επίπεδα της στα ούρα έχουν αναφερθεί ως προγνωστικός δείκτης σοβαρότητας της ΧΝΑ [51]. Σχετικά με την μείωση του 2-HIB και τη μεθανόλη δεν έχουν βρεθεί ιδιαίτερα στοιχεία που να τη συνδέουν με τη ΔΝ ή ΣΔΤ2, παρόλα αυτά τα αυξημένα επίπεδα του 2-HIB έχουν αναφερθεί ως δείκτης αντίστασης στην ινσουλίνη [46].

Οι στατιστικά σημαντικά αυξημένοι μεταβολίτες σε ούρα ασθενών με ΔΝ σε σχέση με τους διαβητικούς ασθενείς ήταν το 2-υδροξυβουτυρικό οξύ, η διμεθυλαμίνη και το γλυκονικό οξύ. Το 2-

υδροξυβουτυρικό οξύ (2-HB) είναι ένα οργανικό οξύ που προέρχεται από το α-κετοβουτυρικό οξύ. Το α-κετοβουτυρικό παράγεται από τον καταβολισμό αμινοξέων (θρεονίνη και μεθειονίνη) και τον αναβολισμό της γλουταθειόνης (οδός σχηματισμού κυστεΐνης) και μεταβολίζεται σε προπιονύλο-CoA και διοξείδιο του άνθρακα. Το 2-HB σχηματίζεται ως παραπροϊόν από το σχηματισμό α-κετοβουτυρικού οξέος μέσω μιας αντίδρασης που καταλύεται από την γαλακτική αφυδρογονάση (LDH) και παράγεται κυρίως σε ηπατικούς ιστούς θηλαστικών που καταβολίζουν την L-θρεονίνη ή συνθέτουν γλουταθειόνη [66]. Η συσσώρευση 2-HB θεωρείται ότι συμβαίνει *in vivo* όταν είτε (α) ο σχηματισμός α-KB υπερβαίνει τον ρυθμό του καταβολισμού του, που οδηγεί σε συσσώρευση υποστρώματος, ή (β) υπάρχει αναστολή της αφυδρογονάσης που καταλύει τη μετατροπή του α-KB σε προπιονυλ-CoA [67][68]. Το α-KB παράγεται επίσης ως αποτέλεσμα της μετατροπής της κυσταθειονίνης στην κυστεΐνη [69]. Σε μια μελέτη, το 2-HB σχετίστηκε με υπερβολική ανάγκη για σύνθεση γλουταθειόνης και διαταραγμένο μιτοχondριακό ενεργειακό μεταβολισμό υποστηρίζοντας την ιδέα ότι το αυξημένο 2-HB μπορεί να σχετίζεται με αυξημένο οξειδωτικό στρες σε καταστάσεις ινσουλινοαντίστασης [69]. Ένας άλλος μηχανισμός που οδηγεί στην συσσώρευση του 2-HB είναι η αύξηση της αναλογίας NADH/NAD<sup>+</sup>, που προκύπτει από την αυξημένη οξείδωση λιπιδίων και η αυξημένη αναλογία αυτή φαίνεται να προτιμά την αναγωγή του α-KB προς 2-HB. Τα στοιχεία αυτά δείχνουν ότι το 2-HB αποτελεί ένα πρώιμο δείκτη τόσο για την αντίσταση στην ινσουλίνη όσο και για τη μειωμένη ρύθμιση της γλυκόζης που φαίνεται να προκύπτει λόγω της αυξημένης οξείδωσης των λιπιδίων και του οξειδωτικού stress (**Εικόνα 34**) [66].



**Εικόνα 34.** Ένα μοντέλο της βιοσύνθεσης του α-HB και των σχετικών μεταβολικών οδών με την αντίσταση στην ινσουλίνη. Το 2-HB παράγεται από τη μετατροπή του α-KB σε μια αντίδραση που καταλύεται από την

LDH και συμβαίνει όταν η αναλογία NADH/NAD<sup>+</sup> είναι αυξημένη ενώ μπορεί να συμβεί και λόγω αυξημένης οξειδωσης λιπιδίων.

Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες [70] αποτελεί η στατιστικά σημαντική αύξηση του γλυκονικού οξέος σε δείγματα ασθενών με διαβητική νεφροπάθεια, καθώς ο μεταβολίτης αυτός αποτελεί την οξειδωμένη μορφή της γλυκόζης, η οποία αυξάνεται με την εξέλιξη του διαβήτη και η αυξημένη οξειδωση της σε γλυκονικό οξύ αντανακλά αυτή την παθολογική κατάσταση.

Τέλος, όσο αφορά τα αποτελέσματα από την κλασική στατιστική ανάλυση, αν και για την αύξηση των επιπέδων της διμεθυλαμίνης (DMA) δεν έχουν βρεθεί πολλά στοιχεία, η αύξηση αυτή πιθανόν να αντικατοπτρίζει απορρύθμιση του μονοπατιού μεταβολισμού της μεθυλαμίνης [30] κατά την διαβητική νεφροπάθεια και αυτό φαίνεται και από την μείωση των επιπέδων των επίσης ενδιάμεσων του κύκλου μεθυλαμίνης, την βεταΐνη, τριμεθυλαμίνη (TMA) και σαρκosίνη.

Βάση της μη στοχευμένης ανάλυσης, από τα VIP scores προέκυψαν 5 ακόμα στατιστικά σημαντικοί αυξημένοι μεταβολίτες σε ούρα ασθενών με ΔΝ οι οποίοι ήταν η N,N-διμεθυλογλυκίνη (DMG), η N-φαινυλακετυλογλυκίνη, το 3-υδροξυϊσοβαλερικό οξύ, το cis-ακονιτικό οξύ και το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ.

Ως ενδιάμεσο του κύκλου της ομοκυστεΐνης-μεθειονίνης, η αυξημένη DMG στα ούρα ασθενών με ΔΝ αποτελεί μια ένδειξη ενίσχυσης του μονοπατιού αυτού και, όπως προαναφέρθηκε, η υπερομοκυστεΐναιμία έχει αναγνωριστεί ως προγνωστικός παράγοντας πιθανής μελλοντικής επιδείνωσης της νεφρικής λειτουργίας σε ασθενείς με νορμο- ή μικροαλβουμινουρία [44]. Η DMG επίσης αποτελεί ένα μεταβολίτη του κύκλου της μεθυλαμίνης και η αύξηση της ενισχύει περαιτέρω την υπόθεση για απορρύθμιση του μονοπατιού αυτού στην ΔΝ.

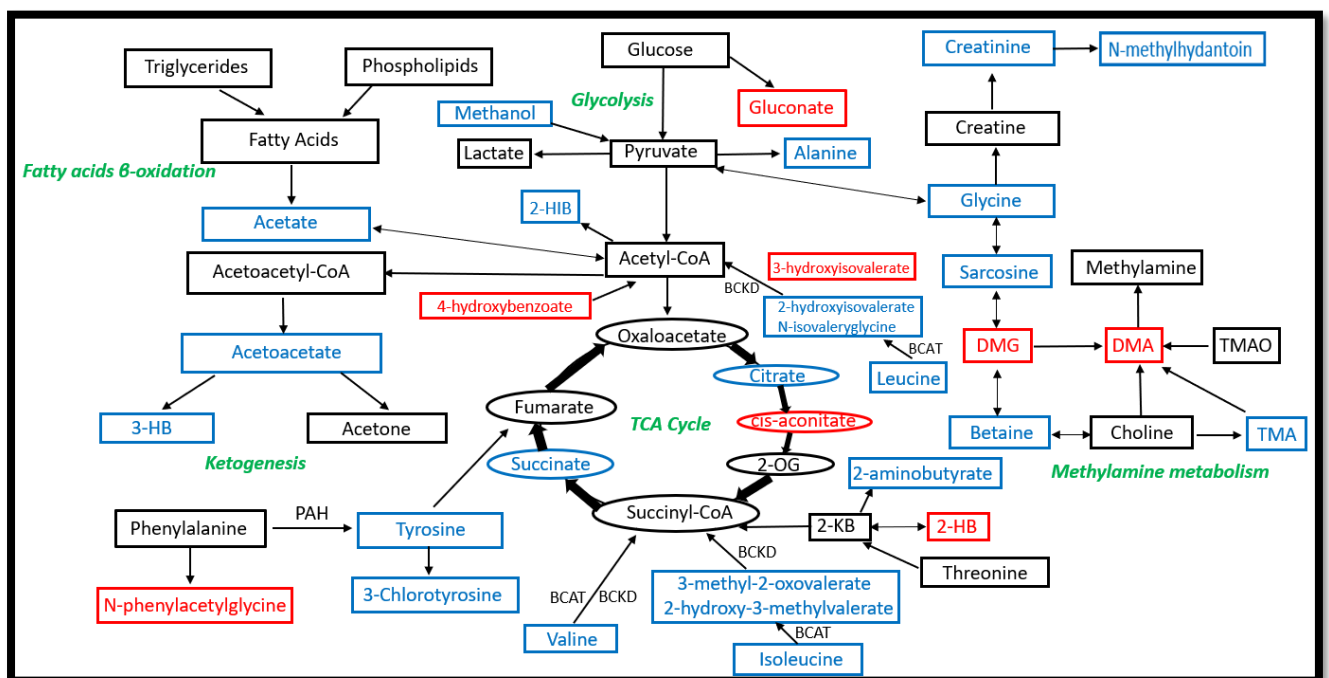
Η N-φαινυλακετυλογλυκίνη αποτελεί ένα προϊόν μεταβολισμού της φαινυλαλανίνης, της οποίας ο μεταβολισμός επηρεάζεται από τη εντερική χλωρίδα και η αύξηση της στα ούρα έχει συσχετιστεί με την ΧΝΝ [71], με μια άλλη μελέτη να δείχνει σημαντικές μεταβολές στη δομή και τη λειτουργία της μικροβιακής χλωρίδας του εντέρου σε ανθρώπους και με ΧΝΝ [72], παρουσιάζοντας και την συσχέτιση της διαταραχής του μεταβολισμού της φαινυλαλανίνης με την νόσο αυτή.

Από τα συνολικά 5 στατιστικά σημαντικά παράγωγα του καταβολισμού των BCAAs, και συγκεκριμένα της λευκίνης, το 3-υδροξυϊσοβαλερικό οξύ ήταν το μοναδικό που παρουσιάστηκε αυξημένο στους ασθενείς με ΔΝ. Όταν βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα, το 3-υδροξυϊσοβαλερικό οξύ μπορεί να συμβάλει στην οξεογένεση. Η διαδικασία αυτή προκαλεί οξέωση [73] και όπως αναφέρθηκε η μεταβολική οξέωση αποτελεί κινητήρια δύναμη στην διέγερση του καταβολισμού των BCAAs από το νεφρό [55] [56].

Σε αντίθεση με τα άλλα δύο ενδιάμεσα προϊόντα του κύκλου του TCA που προσδιορίστηκαν στην δική μας εργασία, το cis-ακονιτικό, όπως και σε άλλες μελέτες [33] παρουσιάστηκε αυξημένο σε ούρα ασθενών με ΔN παρέχοντας ακόμα μια ένδειξη για την διαταραχή του μεταβολισμού του κύκλου αυτού και της μιτοχονδριακής λειτουργίας.

Τέλος, για τον μεταβολίτη 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ που βρέθηκε αυξημένο σε ασθενείς με ΔN, δεν έχουν βρεθεί μελέτες που να τον συσχετίζουν με τον διαβήτη, τη ΔN και τις επιπλοκές που συνοδεύουν τις παθήσεις αυτές.

Στην **εικόνα 35** συνοψίζονται όλες βιοχημικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα κατά την ΔN και οι μεταβολές που παρουσίασαν οι σχετικοί μεταβολίτες στην εργασίας μας.



**Εικόνα 35.** Οι διαταραγμένες μεταβολικές οδοί που σχετίζονται με την ΔN με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Με μπλε χρώμα παρουσιάζονται οι μεταβολίτες των οποίων τα επίπεδα σε ασθενείς με ΔN βρέθηκαν μειωμένα σε σχέση με τους ασθενείς με ΣΔΤ2, ενώ με κόκκινο οι μεταβολίτες που παρατηρήθηκαν αυξημένοι.

---

### VIII. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

---

Στη παρούσα εργασία με τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR έγινε καταγραφή του μεταβολικού προφίλ των ούρων ασθενών με διαβητική νεφροπάθεια και ασθενών με διαβήτη τύπου 2 χωρίς επιπλοκές. Η ταυτοποίησης και ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών από τα φάσματα NMR και στη συνέχεια η ανάλυση των δεδομένων με την κλασική στατιστική ανάλυση καθώς και με την πολυπαραγοντική ανάλυση (Multivariate Data Analysis) ανέδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο προς μελέτη ομάδες. Στα ούρα των ασθενών με ΔΝ σε σχέση με τους ασθενείς με ΣΔΤ2 χωρίς επιπλοκές παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση σε 23 μεταβολίτες και αξιοσημείωτη ήταν αυτή των επιπέδων των κετονοσωμάτων (3-HB και ακετοξικό οξύ), του οξικού οξέος ως προϊόν β-οξειδωσης λιπαρών οξέων, των ενδιάμεσων προϊόντων του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος και των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (λευκίνη, ισολευκίνη, βαλίνη). Οι μεταβολίτες που παρουσιάστηκαν αυξημένοι σε ασθενείς με ΔΝ ήταν η διμεθυλαμίνη, το 2-HB και το γλυκονικό οξύ, η N,N-διμεθυλογλυκίνη (DMG), η N-φαινυλακετογλυκίνη, το 3-υδροξυισοβαλερικό οξύ, το cis-ακονιτικό οξύ και το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ. Τα στοιχεία αυτά, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, αποτελούν ένδειξη ότι η μειωμένη κετογένεση, η διαταραχή του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων, του ενεργειακού μεταβολισμού και ο αυξημένος καταβολισμός των BCAAs αποτελούν σημαντικούς παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της ΔΝ. Κατά τη σύγκριση των μεταβολικών προφίλ ασθενών των δύο ομάδων προς μελέτη με την χρήση των PLS-DA στατιστικών μοντέλων παρατηρήθηκε πλήρης διαχωρισμός μεταξύ τους, το οποίο δείχνει πως υπάρχουν στατιστικά σημαντικά διαφορετικά μεταβολικά χαρακτηριστικά ανάμεσα στον ΣΔΤ2 και στη ΔΝ μια από τις σημαντικότερες επιπλοκές του.

Εν κατακλείδι, οι μεταβολίτες που θα μπορούσαν να αποτελέσουν πιθανούς βιοδείκτες για την πρόωμη διάγνωση και εξέλιξη της ΔΝ είναι τα κετονοσώματα (3-HB και ακετοξικό οξύ), το οξικό οξύ, τα ενδιάμεσα προϊόντων του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος (κιτρικό, ηλεκτρικό οξύ) και τα BCAAs (λευκίνη, ισολευκίνη, βαλίνη).

---

## ΙΧ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- 1) World Health Organization (WHO) - **"ABOUT DIABETES"**
- 2) Josephine M. Forbes and Mark E. Cooper et al **"MECHANISMS OF DIABETIC COMPLICATIONS"** *Physiol Rev* 93: 137–188, 2013.
- 3) Διδακτορική Διατριβή Ευάγγελου Παπαχρήστου Ιατρού Νεφρολόγου **"Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΣΟΛΑΒΗΤΩΝ ΤΗΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΒΛΑΒΗΣ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΙΔΙΟΥ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΣΩΛΗΝΑΡΙΑΚΑ ΚΑΙ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΝΕΦΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ"** - Πανεπιστήμιο Πατρών, Σχολή Θετικών Επιστημών, Ιατρική Σχολή, Νεφρολογικό Κέντρο, 2009.
- 4) Νεφρολογικό Ιατρείο Πάτρας – Διάγνωση & Αντιμετώπιση Νεφρικών Νοσημάτων & Υπέρτασης. **"Ανατομία Νεφρού"**
- 5) Hermann Pavenstädt, Wilhelm Kriz, and Matthias Kretzler – **"Cell Biology of the Glomerular Podocyte"** - American Physiological Society. 2003 Jan;83(1):253-307.
- 6) Emelie Lassén and Ilse S. Daehn **"Molecular Mechanisms in Early Diabetic Kidney Disease: Glomerular Endothelial Cell Dysfunction "** *Int J Mol Sci.* 2020 Dec; 21(24): 9456.
- 7) S.Akilesh. **"Normal Kidney Function and Structure"** August 2014. *Pathobiology of Human Disease.*
- 8) Christie K. Abrass, **"Diabetic Nephropathy: Mechanisms of Mesangial Matrix Expansion"** *West J Med* 1995 Apr;162(4):318-21.
- 9) Rei Sekiguchi and Kenneth M. Yamada **"Basement membranes in development and disease"**. *Curr Top Dev Biol* 2018 ; 130:143-191.
- 10) Caroline B. Marshall **"Rethinking glomerular basement membrane thickening in diabetic nephropathy: adaptive or pathogenic?"** *Am J Physiol Renal Physiol.* 2016 Nov 1.
- 11) **"Επίτομη Κλινική Νεφρολογία"**. Εκδόσεις Ροτόντα. Οκτώβριος 2007.
- 12) Mirjana Sabljarić Matovinović **"Podocyte Injury in Glomerular Diseases "** © 2009 International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC).
- 13) Samy L Habib **"Kidney atrophy vs hypertrophy in diabetes: which cells are involved?"** *Cell Cycle* 2018;17(14):1683-1687.
- 14) Christine K. Abrass **"Diabetic Nephropathy: Mechanisms of Mesangial Matrix Expansion"** *West J Med* 1995 Apr;162(4):318-21.
- 15) Carole G. Campion, Sanchez-Ferras et al. **"Potential Role of Serum and Urinary Biomarkers in Diagnosis and Prognosis of Diabetic Nephropathy"** *Canadian Journal of Kidney Health and Disease.* Volume 4: 1– 18. 2017.
- 16) Roberto Trevisan Alessandro Roberto Dodesini, USC Malattie Endocrine **"The Hyperfiltering Kidney in Diabetes"** – *Nephron*, 2017;136(4):277-280.
- 17) Gianpaolo Zerbini, Riccardo Bonfanti, Franco Meschi et al. **"Persistent Renal Hypertrophy and Faster Decline of Glomerular Filtration Rate Precede the Development of Microalbuminuria in Type 1 Diabetes"** *Diabetes*, 2006 Sep;55(9):2620-5.
- 18) Imed Helal, Godela M. Fick-Brosnahan et al. **"Glomerular hyperfiltration: definitions, mechanisms and clinical implications** *Nature Reviews Nephrology*, volume 8, pages 293–300. February 2012.
- 19) Gunter Wolf and Fuad N. Ziyadeh **"Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy"**. *Kidney Int* 1999 Aug;56(2):393-405.

- 20) Francesca Conserva, Loreto Gesualdo and Massimo Papale **"A Systems Biology Overview on Human Diabetic Nephropathy: From Genetic Susceptibility to Post-Transcriptional and Post-Translational Modifications "** . J Diabetes Res 2016.
- 21) Avry Chagnac, Boris Zingerman et al **"Consequences of Glomerular Hyperfiltration: The Role of Physical Forces in the Pathogenesis of Chronic Kidney Disease in Diabetes and Obesity "** Nephron 2019;143(1):38-42.
- 22) Dr Lennart Tonneijck , Marcel H A Muskiet et al **"Glomerular Hyperfiltration in Diabetes: Mechanisms Clinical Significance, and Treatment"** J Am Soc Nephrol 2017 Apr;28(4):1023-1039
- 23) Susztak, Amanda C Raff et al **"Glucose-induced reactive oxygen species cause Apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy"** Diabetes 2006, 55, 225–233.
- 24) Tomoko Kakehi, Chichiro Yabe-Nishimura **"NOX enzymes and diabetic complications"** Semin. Immunopathol" 2008 Jul;30(3):301-14.
- 25) Karen Block, Assad Eid, Kathy K Griendling, et al **"Nox4 NAD(P)H oxidase mediates Src-dependent tyrosine phosphorylation of PDK-1 in response to angiotensin II: Role in mesangial cell hypertrophy and fibronectin expression"** J. Biol. Chem" 2008, 283, 24061–24076.
- 26) Assad Eid, Yves Gorin, Bridget M. Fagg, et al. **"Mechanisms of Podocyte Injury in Diabetes: Role of Cytochrome P450 and NADPH Oxidases."** Diabetes 2009, 58, 1201–1211.
- 27) Dijana Miric, Bojana M. Kistic, Snezana Filipovic-Danic et al **" Oxidase Activity in Type 2 Diabetes Mellitus Patients with and without Diabetic Peripheral Neuropathy"** J. Diabetes Res.2016, 1–7.
- 28) Haiying Qi, Gabriella Casalena et al. **"Glomerular Endothelial Mitochondrial Dysfunction Is Essential and Characteristic of Diabetic Kidney Disease Susceptibility"** - Diabetes 2016, 66, 763–778.
- 29) Jia Fu, Chenguang Wei, Kyung Lee et al. **"Comparison of Glomerular and Podocyte mRNA Profiles in Streptozotocin-Induced Diabetes"** J. Am. Soc. Nephrol. 2015, 27, 1006–1014.
- 30) Liangcai Zhao, Hongchang Gao et al **" <sup>1</sup>H NMR -based metabonomic analysis of metabolic profiling in diabetic nephropathy rats induced by streptozotocin"** Am J Physiol Renal Physiol 300: F947–F956, 2011.
- 31) Daviss B (April 2005). **"Growing pains for metabolomics"** The Scientist. 2011;19(8): 25–28.
- 32) Rocio Rivera, Nicolas Garrid, **"Oxidants, Antioxidants and Impacts of the Oxidative Status in Male Reproduction"** Pages 277-287, Chapter 4.4 : Metabolomics 12, 2015.
- 33) Johan H. Faber, Ph.D, Daniel Malmmodin et al **"Metabonomics in Diabetes Research"** J Diabetes Sci Technol. 2007; Jul 1 (4): 549 – 557.
- 34) Nicholson JK, Connolly J, Lindon JC, Holmes E. **"Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function"** .Nat Rev Drug Discov. 2002;1:153-61.
- 35) Manjula Darshi, Benjamin Van Espen, Kumar Sharma. **"Metabolomics in Diabetic Kidney Disease: Unraveling the Biochemistry of a Silent Killer"** Am J Nephrol 2016.
- 36) Jacopo Troisi, Pierpaolo Cavallo, et al **"Chapter Three - Metabolomics in genetic testing"** Advances in Clinical Chemistry. Volume 94, 2020, Pages 85-153.
- 37) Mimi Guan, Liyun Xie, Chengfeng Diao et al, **"Systemic Perturbations of Key Metabolites in Diabetic Rats During the Evolution of Diabetes Studied by Urine Metabonomics"** PLoS One, 2013;8(4):e60409.
- 38) Paula Cordero-Pérez, L. Saucedo et al, **"Metabolomics of the diabetic nephropathy: behind the fingerprint of development and progression indicators"** Nefrologia (Engl Ed), Nov-Dec

2020;40(6):585-596.

- 39) Bradley Worley and Robert Powers **"Multivariate Analysis in Metabolomics"** Current Metabolomics.2013;1(1):92-107.
- 40) Tingting Wei, Liangcai Zhao et al. **"Metabonomic analysis of potential biomarkers and drug targets involved in diabetic nephropathy mice"** Sci Rep. 2015 Jul 7;5:11998.
- 41) Center for Innovative Technology, Vanderbilt University **"Untargeted or Targeted Metabolomics – Which Approach is Right for You?"** - A Molecular Omics Resource.
- 42) Kelli M. Sas, Alla Karnovsky, George Michailidis et al **"Metabolomics and Diabetes: Analytical and Computational Approaches"** Diabetes 2015;64:718–732.
- 43) Qian Feng<sup>1</sup>, Yuanmeng Li, Yuwei Yang and Jiafu Feng . **'Urine Metabolomics Analysis in Patients With Normoalbuminuric Diabetic Kidney Disease'** Front Physiol 2020 Oct 6;11:578799.
- 44) Nan Hee Kima, Jin Seong Hyeon et al **Metabolic changes in urine and serum during progression of diabetic kidneydisease in a mouse model'**. Archives of Biochemistry and Biophysics 646 (2018) 90–97.
- 45) Jingping Liu, Dan Wang et al **"<sup>1</sup>H NMR - based metabonomic analysis of serum and urine in a nonhuman primate model of diabetic nephropathy"** Mol Biosyst. 2013 Nov;9(11):2645-52.
- 46) Stefan Mutter, Erkkka Valo et al **"Urinary metabolite profiling identifies biomarkers for risk progression of diabetic nephropathy in 2,670 individuals with type 1 diabetes"** Diabetologia. 2022 Jan;65(1):140-149.
- 47) A V Ekstrand , P H Groop, C Grönhagen-Riska **"Insulin resistance precedes microalbuminuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus"** - Nephrol Dial Transplant. 1998 Dec;13(12):3079-83.
- 48) R Calvani , A Miccheli, G Capuani, A Tomassini Miccheli et al **"Gut microbiome-derived metabolites characterize a peculiar obese urinary metabotype"** Int Obes (Lond) 2010 Jun;34(6):1095-8.
- 49) Henricus A M Mutsaers , Udo F H Engelke, Martijn J G Wilmer et al **"Optimized Metabolomic approach to identify uremic solutes in plasma of stage 3–4 chronic kidney disease patients"** PLoS One. 2013 Aug 2;8(8):e71199.
- 50 ) Josephine M. Forbes and David R. Thorburn **"Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease"** Nat Rev Nephrol 2018 May;14(5):291-312.
- 51 ) Evdoxia Bletsa, Eleni Bairaktari, Vasilis Tsimihodimos et al **" Effect of Dapagliflozin on Urine Metabolome in Patients with Type 2 Diabetes"** J Clin Endocrinol Metab 2021 Apr 23;106(5):1269-1283.
- 52) Phisitkul S, Khanna A, Simoni J et al **"Amelioration of metabolic acidosis in patients with low GFR reduced kidney endothelin production and kidney injury, and better preserved GFR"** DE Kidney Int. 77: 617–623, 2010.
- 53) Mee-Sup Yoon. **"The Emerging Role of Branched-Chain Amino Acids in Insulin Resistance and Metabolism"** Nutrients. 2016 Jul; 8(7): 405.
- 54) Xiaoping Chen, Wenying Yang **"Branched-chain amino acids and association with type 2 diabetes"** Journal of Diabetes Investigation. February 2015.
- 55) Noel J. M. Cano **"Branched-Chain Amino-Acid Metabolism in Renal Failure"** J Ren Nutr. 2009 Sep;19(5 Suppl): S22-4.
- 56) Noël J M Cano , Denis Fouque, Xavier M Leverve. **"Application of branched chain amino acids in human pathological states: renal failure"** J Nutr. 2006 Jan;136(1 Suppl):299S-307S.
- 57) Jianxiang XU, Degke Pan **"Metabonomic study of the biochemical profiles"** Frontiers of



Agricultural Science and Engineering, March 2015, Vol 2, Issue 1.

- 58) McMahon GM, Hwang S-J et al **"Urinary metabolites along with common and rare genetic variations are associated with incident chronic kidney disease"**, *Fox CS: Kidney Int.* 91: 1426–1435, **2017**
- 59) Tahia Saleem & Marwa Dahpy et al **"The Profile of Plasma Free Amino Acids in Type 2 Diabetes Mellitus with Insulin Resistance: Association with Microalbuminuria and Macroalbuminuria"** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2019 Jul 188:854–867.
- 60) A. Garcia-Perez, M.B Burg **"Renal medullary organic osmolytes"** - *Physiol Rev.* 1991;71(4):1081-1115.
- 61) Zhao G, He F, Wu C et al **"Betaine in inflammation: mechanistic aspects and applications"** *Front Immunol.* 2018; 9:1070.
- 62) Zhang L, Qi Y, ALuo Z, Liu S, Zhang Z, Zhou L. **"Betaine increases mitochondrial content and improves hepatic lipid metabolism"** *Food Funct.* 2019;10(1):216-223.
- 63) Hasegawa G, Nakano K, Ienaga K. **"Serum accumulation of a creatinine oxidative metabolite (NZ-419: 5-hydroxy-1-methylhydantoin) as an intrinsic antioxidant in diabetic patients with or without chronic kidney disease"** *Clin Nephrol.* 2011;76(4):284-289.
- 64) Ienaga K, Park CH, Yokozawa T. **"Protective effect of an intrinsic antioxidant, HMH (5-hydroxy-1-methylhydantoin; NZ-419), against cellular damage of kidney tubules"**. *Exp Toxicol Pathol.* 2013;65(5):559-566.
- 65) Schalkwijk CG, Stehouwer CDA. **"Methylglyoxal, a highly reactive dicarbonyl compound, in diabetes, its vascular complications, and other age-related diseases."** *Rev.*2020;100(1):407-461.
- 66) Walter E Gall, Kirk Beebe et al **"Alpha-hydroxybutyrate is an early biomarker of insulin resistance and glucose intolerance in a nondiabetic population"** 2010 May 28 ; 5(5):e10883
- 67) S Landaas **"The formation of 2-hydroxybutyric acid in experimental animals."** *Clin Chim Acta.* 1975 Jan 6;58(1):23-32.
- 68) J E Pettersen, S Landaas S, L Eldjarn **"The occurrence of 2-hydroxybutyric acid in urine from patients with lactic acidosis"**. *Clin Chim Acta.* 1973 Oct 12;48(2)213–219.
- 69) Richard S Lord, J Alexander Bralley **"Clinical applications of urinary organic acids. Part I: Detoxification markers."** *Altern Med Rev* 2008 Sep;13(3):205-15.
- 70) Mingmei Shao Hao Lu, Ming Yang et al **"Serum and urine metabolomics reveal potential biomarkers of T2DM patients with nephropathy"** *Ann Transl Med.* 2020 Mar;8(5):199.
- 71) Zhi-Hao Zhang, Feng Wei et al **"Metabolomics insights into chronic kidney disease and modulatory effect of rhubarb against tubulointerstitial fibrosis"** *Sci Rep.* 2015 Sep 28; 5:14472.
- 72) Vaziri, N. D. et al. **"Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora"** *Kidney Int* 83, 308–15 (2013).
- 73) **"3-Hydroxyisovaleric acid (HMDB0000754)"**. The Human Metabolome Database