



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
Β΄ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΝΑ
ΠΡΟΒΛΕΠΟΥΝ ΤΗΝ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΣΑΚΧΑΡΩΔΟΥΣ ΔΙΑΒΗΤΗ ΤΥΠΟΥ 2 ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ
ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ ΚΥΗΣΗΣ

Επιβλέπων Τσιμιχόδημος Βασίλης, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Λουκία Σπανού, Ενδοκρινολόγος, MD

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2023



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ,
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ,
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

**ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΝΑ
ΠΡΟΒΛΕΠΟΥΝ ΤΗΝ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΣΑΚΧΑΡΩΔΟΥΣ ΔΙΑΒΗΤΗ ΤΥΠΟΥ 2 ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ
ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ ΚΥΗΣΗΣ**

Επιβλέπων Τσιμιχόδημος Βασίλης, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

της Λουκίας Σπανού, Ενδοκρινολόγος, MD

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2023

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Ημερομηνία αίτησης της κ. Σπανού Λουκίας: 02-06-2014

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. αριθμ. 766α/10-07-2014

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Τσιμιχόδημος Βασίλειος, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας

Μέλη:

Ελισάφ Μωυσής, Καθηγητής Παθολογίας

Μπαϊρακτάρη Ελένη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 25-07-2014

«Εκτίμηση της ικανότητας κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων να προβλέπουν την εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη κύησης»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 970^α/29-06-2021

1. Ελισάφ Μωυσής, Ομότιμος Καθηγητής Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Μπαϊρακτάρη Ελένη, Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Πασχόπουλος Μηνάς, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Χρήστου Λεωνίδα, Καθηγητής Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Τσιάρα Σταυρούλα, Καθηγήτρια Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Τσιμιχόδημος Βασίλειος, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Τίγκας Στυλιανός, Αναπληρωτής Καθηγητής Ενδοκρινολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 23-01-2023

Ιωάννινα 06-06-2023

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Σπυρίδων Κονιτσιώτης

Καθηγητής Νευρολογίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε με τη συνεργασία του Εξωτερικού Ιατρείου Διαβήτη της Β Παθολογικής κλινικής του ΠΓΝΙ, Εργαστηρίου Κλινικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και της Μονάδας Σακχαρώδους Διαβήτη Κύησης του Γ.Ν. Αθηνών «Αλεξάνδρα», προσφέροντας στη συγγραφέα σημαντική εμπειρία και γνώση, η οποία αποτυπώθηκε σε εργασίες που παρουσιάστηκαν στα πλαίσια Διεθνών και Εθνικών συνεδρίων καθώς και σε μια εργασία που προσφάτως δημοσιεύθηκε σε διεθνές περιοδικό.

Η έναρξη και η ολοκλήρωση της συγκεκριμένης εργασίας θα ήταν αδύνατη χωρίς την υποστήριξη και βοήθεια του επιβλέποντος και Βασιλείου Τσιμιχόδημου, Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογίας, του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στον οποίο θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου.

Επίσης, η ολοκλήρωση της παρούσης εργασίας θα ήταν αδύνατη χωρίς την ενεργό συμμετοχή της κας Ελένης Μπαϊρακτάρη, Καθηγήτριας Κλινικής Χημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, την οποία θέλω να ευχαριστήσω θερμά για την αμέριστη βοήθειά της, την πολύτιμη καθοδήγησή της, το χρόνο που αφιέρωσε και την υπομονή της ώστε να φτάσει αυτή η εργασία στην ολοκλήρωσή της.

Οφείλω θερμές ευχαριστίες στην κα Ελένη Αναστασίου, Διευθύντρια του Ενδοκρινολογικού τμήματος και Διευθύντρια του Ενδοκρινολογικού εργαστηρίου του Γ.Ν.Αθηνών «Αλεξάνδρα», για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα που άπτεται άμεσα της ειδικότητάς μου.

Στην ολοκλήρωση της διατριβής συνέβαλαν αρκετοί άνθρωποι των οποίων τα ονόματα θα ήταν παράλειψη να μην αναφέρω.

Ευχαριστώ θερμά την κα Χριστίνα Κωσταρά, Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια στο Εργαστήριο Κλινικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για τη συνδρομή της στην εκπόνηση αυτής της εργασίας καθώς και για την άψογη συνεργασία και υποστήριξή της, σε πολλά επίπεδα, κατά τη διάρκεια της μελέτης. Επιπλέον, οφείλω θερμές ευχαριστίες στην κα Κατερίνα Δήμου, Υποψήφια Διδάκτορα στο Εργαστήριο Κλινικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για τη συνεργασία της και την πολύτιμη συμβολή της στη δημοσίευση της παρούσας εργασίας.

Θα ήμουν αγνώμον αν δεν ευχαριστούσα το προσωπικό του Ενδοκρινολογικού εργαστηρίου του Γ.Ν.Αθηνών «Αλεξάνδρα» και ιδιαιτέρως την κα Θάνου Βούλα, Τεχνολόγο Ιατρικών Εργαστηρίων, της οποίας η υποστήριξη και βοήθεια κατά τη συλλογή των δειγμάτων υπήρξε πολύτιμη.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, που ξέροντας τόσο λίγα από επιστήμη, με υποστήριξαν και με στηρίζουν όλα αυτά τα χρόνια καθώς και το σύζυγό μου και τις δύο κόρες μου, για τη συμπαράστασή τους, την υπομονή τους και την κατανόησή τους στην ανάγκη μου να εξελίσομαι επιστημονικά.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης της κήσης (ΣΔΚ) είναι μια διαταραχή του μεταβολισμού, που εμφανίζεται ή για πρώτη φορά ανακαλύπτεται στη διάρκεια της κήσης, απαντάται με αυξημένη συχνότητα τα τελευταία χρόνια και οι αιτίες της εμφάνισής του δεν είναι ακόμα απολύτως σαφείς, όμως είναι απολύτως απαραίτητη η αποτελεσματική και έγκαιρη αντιμετώπισή του. Η Μεταβολομική επιδιώκει μια αναλυτική περιγραφή σύνθετων βιολογικών δειγμάτων και στοχεύει στο χαρακτηρισμό, την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση όλων των μικρών μορίων μέσα σε ένα τέτοιο δείγμα· παρέχει ουσιαστικά στοιχεία για την αιτιολογία και την παθογένεια νόσων και συμβάλλει στην ανακάλυψη βιοδεικτών για έγκαιρη και ακριβή ανίχνευση αυτών. Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance -NMR) είναι μια βασική αναλυτική μέθοδο που χρησιμοποιείται στη μεταβολομική, σε βιολογικά υγρά, και παρέχει το συνολικό αποτύπωμα των συστατικών του υλικού, τα οποία εμφανίζονται με χαρακτηριστικό ως προς τη δομή τους σήμα και ένταση ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση του μεταβολικού αποτυπώματος του αίματος εγκύων γυναικών με και χωρίς ΣΔΚ, με στόχο την μελέτη των διαταραχών του μεταβολισμού και την ανεύρεση βιοδεικτών πρόωμης διάγνωσης του διαβήτη κήσης. Εφαρμόσαμε μεταβολική ανάλυση βασισμένη σε NMR ορού γυναικών με και χωρίς ΣΔΚ, απαλλαγμένου από μακρομόρια, για να αυξήσουμε τον αριθμό των ποσοτικοποιημένων μεταβολιτών, ώστε να μπορέσουμε να χαρακτηρίσουμε με μεγαλύτερη ακρίβεια τις μεταβολικές οδούς που οδηγούν στο ΣΔΚ και για να εξετάσουμε την πιθανή ομοιότητά τους με αυτές που σχετίζονται με το Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2).

Στην παρούσα εργασία συλλέχθηκαν δείγματα αίματος από εξήντα δύο (62) Καυκάσιες γυναίκες με ΣΔΚ και από εβδομήντα επτά (77) υγιείς Καυκάσιες έγκυες γυναίκες με φυσιολογική ανοχή γλυκόζης, που αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου. Δεν υπήρχε διαφορά στην ηλικία, στην εβδομάδα κήσης, στον δείκτη μάζας σώματος (ΔΜΣ), την αρτηριακή πίεση και τα επίπεδα λιπιδίων στον ορό μεταξύ των γυναικών στις δύο ομάδες.

Η συλλογή των δειγμάτων αίματος έγινε μεταξύ της 26^{ης} και 30^{ης} εβδομάδας της κήσης, πριν την πραγματοποίηση της δοκιμασίας ανοχής γλυκόζης (OGTT) και πριν από οποιαδήποτε θεραπευτική παρέμβαση. Τα φάσματα H^1NMR των δειγμάτων ορού αποκτήθηκαν σε φασματόμετρο 11,7 T Bruker Avance DRX NMR. Το λογισμικό Chenomx NMR Suite χρησιμοποιήθηκε για την αναγνώριση και ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών και το Metaboanalyst v.4.0 για πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση.

Η ανάλυση με φασματοσκοπία H^1NMR έδειξε σημαντική διάκριση μεταξύ του μεταβολικού προφίλ των εγκύων γυναικών. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι 25 από τους 55 μετρούμενους μεταβολίτες, μεταβλήθηκαν στατιστικά σημαντικά από την παρουσία ΣΔΚ. Σε σύγκριση με τη φυσιολογική κήση, οι γυναίκες που διαγνώστηκαν με ΣΔΚ εμφάνισαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα: κετονικών σωμάτων (3-υδροξυβουτυρικό και ακετοξικό οξύ), του οργανικού οξέος 2-υδροξυβουτυρικό και των μεταβολικών ενδιάμεσων προϊόντων των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (BCAA), 3-υδροξυισοβουτυρικό και 3-υδροξυισοβαλερικό. Σημαντικά χαμηλότερα, στις ασθενείς με ΣΔΚ, ήταν τα επίπεδα των μεταβολιτών που εμπλέκονται στον κύκλο ενεργοποιημένου μεθυλίου (One-carbon

metabolism-1C) (μεθειονίνη, γλυκίνη, σερίνη, χολίνη, σαρκοζίνη), στην παραγωγή ενέργειας (καρνιτίνη και πυροσταφυλικό), στο μεταβολισμό των πουρινών (υποξανθίνη), των αμινοξέων αργινίνη, ασπαραγίνη, ασπαρτικό, ιστιδίνη, γλουταμινικό, φαινυλαλανίνη και τρυπτοφάνη, το προϊόν καταβολισμού των BCAAs, 3-μεθυλ-2-οξοβαλινικό, το ενδιάμεσο του κύκλου της ουρίας, ορνιθίνη, το 2-αμινοβουτυρικό και τα οσμόλια ταυρίνη και το N-οξείδιο της τριμεθυλαμίνης.

Το μεταβολικό προφίλ στο ΣΔΚ αντικατοπτρίζει διαταραχές μεταβολικών οδών, οι οποίες θα μπορούσαν να αποτελέσουν πιθανούς βιοδείκτες για την πρόιμη διάγνωση της νόσου με στόχο τη μείωση των επιπλοκών και του κινδύνου μεταγενέστερης εμφάνισης σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2.

Λέξεις κλειδιά: «Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης, μεταβολομική, φασματοσκοπία NMR»

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

Αγγλικά

AACE: American Association of Clinical Endocrinologist

ACOG: American College of Obstetrics and Gynecology

ADA: American Diabetes Association

AFABP: Adipocyte Fatty acid-binding protein

BCAAs: Branched Chain Amino Acids

CRP: C-Reactive Protein

HAPO: Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome

GIP: Glucose- dependent Insulinotrophic Peptide

GLP-1: Glucagon-like Peptide-1

FFA: Free Fatty Acids

FID: Free Induction Decay

FT-NMR: Fourier Transform – Nuclear Magnetic Resonance

GC-MS: Gas Chromatography – Mass Spectrometry

HbA1c: Hemoglobin A1c

HDL: High – Density Lipoprotein

hPL: human Placental Lactogen

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography

IADPSG: International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups

IDF: International Diabetes Federation

IRS-1: Insulin Receptor Substrate – 1

LC-MS: Liquid Chromatography – Mass Spectrometry

MS: Mass Spectrometry

mTORC1: mammalian Target of Rapamycin Complex 1

MW: Molecular Weight

NIH: National Institutes of Health

NMR: Nuclear Magnetic Resonance

OGTT: Oral Glucose Tolerance Test

OPLS-DA: Orthogonal Projections to Latent Structures – Discriminant Analysis

PCA: Principal Component Analysis

PLS-DA: Partial Least Squares – Discriminant Analysis

TMAO: Trimethylamine N – Oxide

TNF-a: Tumor Necrosis Factor – alpha

TRGs: Triglycerides

UF: Ultrafiltration

WHO: World Health Organization

Ελληνικά

ΑΠ: Αρτηριακή Πίεση

ΔΜΣ: Δείκτης Μάζας Σώματος

ΣΔ: Σακχαρώδης Διαβήτης

ΣΔ1: Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1

ΣΔ2: Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2

ΣΔΚ: Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης
ΕΔΕ: Ελληνική Διαβητολογική Εταιρεία

Πίνακας περιεχομένων

1.	Εισαγωγή – Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης	13
	Εισαγωγή	14
	Σύνθεση και έκκριση της ινσουλίνης και της γλυκαγόνης	14
	Ρύθμιση της απελευθέρωσης της ινσουλίνης και της γλυκαγόνης	17
	Ρύθμιση της γλυκόζης του αίματος	22
	Είσοδος της γλυκόζης στα κύτταρα	25
	Ορμονική ρύθμιση του μεταβολισμού των υδατανθράκων, των λιπαρών οξέων και των πρωτεϊνών	27
	Μεταβολισμός του γλυκογόνου	27
1.1	Σακχαρώδης Διαβήτης – Ορισμός	22
1.2	Ταξινόμηση	28
1.3	Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης	29
1.4	Κριτήρια Διάγνωσης Σακχαρώδους Διαβήτη Κύησης	36
1.5	Η σημασία της διάγνωσης και της θεραπευτικής αντιμετώπισης γυναικών με ΣΔΚ	39
2.	Μεταβονομική (Metabonomics)- Μεταβολομική (Metabolomics)	40
2.1	Μεταβονομική (Metabonomics)	41
2.2	Μεταβονομική και Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης	47
3.	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR)	49
3.1	Θεωρία του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού	51
3.2	Χημική Μετατόπιση, Σύζευξη spin-spin (spin-spin coupling), Αποδιέγερση	54
3.3	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR)	56

4.	Σκοπός της μελέτης	59
5.	Πειραματικό Μέρος. Υλικό και Μέθοδοι	61
5.1	Πληθυσμός της μελέτης και συλλογή των δειγμάτων αίματος	62
5.2	Διήθηση υπό φυγοκέντρηση (υπερδιήθηση) του ορού του αίματος	63
5.3	Καταγραφή του Μεταβολικού Προφίλ του Ορού του Αίματος με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$	65
5.3.1	Προετοιμασία των δειγμάτων για τη λήψη των φασμάτων $^1\text{HNMR}$	65
5.4	Λήψη και επεξεργασία των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$	66
5.5	Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών	67
5.6	Στατιστική ανάλυση δεδομένων	67
6.	Αποτελέσματα	69
6.1	Αποτελέσματα	70
6.2	Στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση (Targeted analysis)	71
6.3	Μη Στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση (Untargeted analysis)	76
7.	Συζήτηση	79
8.	Συμπεράσματα	94
9.	Βιβλιογραφία	98

1. Εισαγωγή

Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης

Εισαγωγή

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) αποτελεί τη συχνότερη ενδοκρινοπάθεια. Η νόσος πρωτοπεριγράφηκε από τον Αρεταίο, το δεύτερο αιώνα μ.Χ. ως η «τήξη της σάρκας και των άκρων των ασθενών και η παροχέτευσή τους στα ούρα». Η περιγραφή αυτή αναφέρεται στην πολουρία και την απώλεια βάρους που χαρακτηρίζουν τον μη ελεγχόμενο σακχαρώδη διαβήτη. Ο ασθενής λόγω της πολουρίας καταλαμβάνεται από συνεχές αίσθημα δίψας αλλά το νερό «διαβαίνει» το σώμα του και εμφανίζεται στα ούρα, γι' αυτό ο Αρεταίος ονόμασε τη νόσο «διαβήτη». Αργότερα βρέθηκε ότι τα ούρα των ασθενών με ΣΔ είχαν γλυκιά γεύση και η ονομασία της νόσου τροποποιήθηκε σε diabetes mellitus (mellitus = γλυκός στα λατινικά).

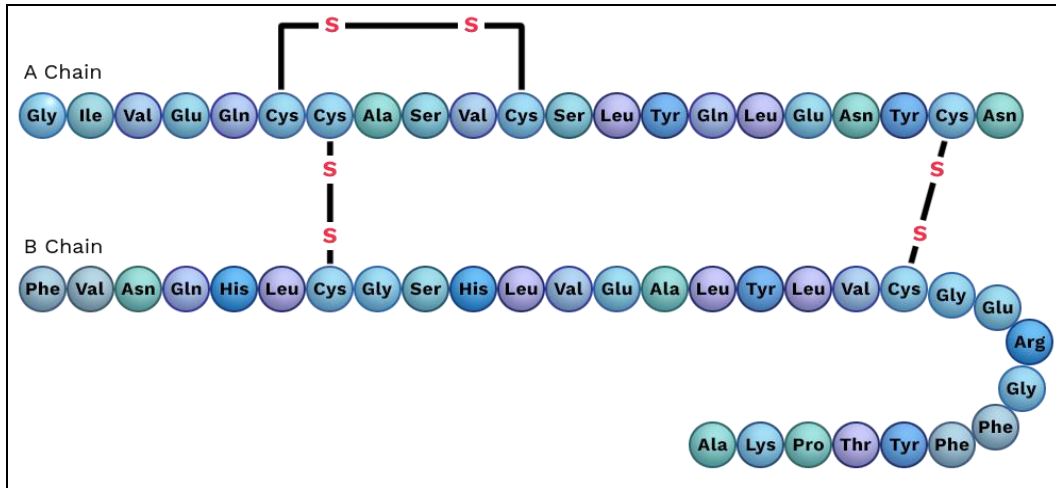
Το 1889 ο Minkowski παρατήρησε ότι η ολική παγκρεατεκτομή προκαλούσε σε σκύλους μία νόσο που έμοιαζε με το σακχαρώδη διαβήτη. Στις αρχές του 20ου αιώνα αποδείχθηκε ότι η νόσος οφείλεται σε διαταραχή της λειτουργίας των νησιδίων του παγκρέατος.

Το 1921 ο Banting και ο Best βρήκαν ότι το εκχύλισμα των νησιδίων του παγκρέατος του σκύλου μειώνει το σάκχαρο του αίματος. Έκτοτε η χορήγηση ινσουλίνης έφερε επανάσταση στην αντιμετώπιση του διαβήτη.

Η επιτυχία αυτή οδήγησε σε μία παγκόσμια ερευνητική προσπάθεια για την καλύτερη κατανόηση της βιοχημείας, της δομής και της λειτουργίας της ινσουλίνης, η οποία κορυφώθηκε το 1955 με την ανακοίνωση της πρωτοταγούς δομής της ινσουλίνης από τον Sanger. Η ινσουλίνη είναι η πρώτη πολυπεπτιδική ορμόνη στην οποία έγινε ταυτοποίηση της αλληλουχίας των αμινοξέων της. Το 1969 ο Hodgkin εξήγαγε την τρισδιάστατη δομή της ινσουλίνης από κρυσταλλογραφικές μελέτες και λίγο αργότερα χάρη στις προόδους της γενετικής μηχανικής παρήχθησαν οι πρώτες ποσότητες ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ινσουλίνης.(1)

Σύνθεση και έκκριση της ινσουλίνης και της γλυκαγόνης

Η **ινσουλίνη** είναι μία πολυπεπτιδική ορμόνη μοριακού βάρους 6 kDa που αποτελείται από 51 αμινοξέα τα οποία σχηματίζουν δύο αλυσίδες, την Α (21 αμινοξέα) και τη Β (30 αμινοξέα). Οι αλυσίδες αυτές συνδέονται μεταξύ τους με δύο δισουλφιδικούς δεσμούς. Η δομή της Α αλυσίδας σταθεροποιείται από έναν επιπλέον δισουλφιδικό δεσμό. **(Εικ.1.1)** Το γονίδιο της ινσουλίνης εδράζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 11.

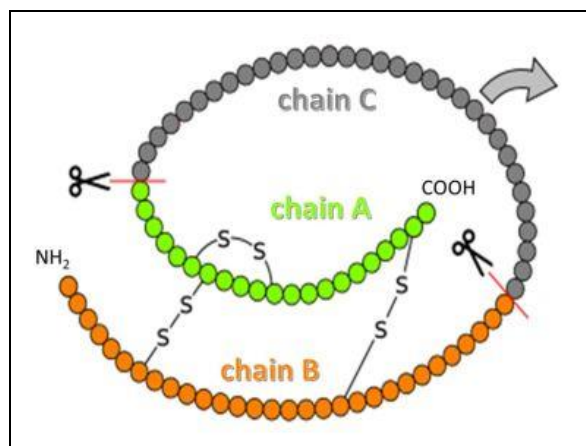


Εικ 1.1 Δομή ινσουλίνης

Η σύνθεση και αποθήκευση της ινσουλίνης γίνονται στα β-κύτταρα των νησιδίων του παγκρέατος (νησίδια του Langerhans) ως εξής:

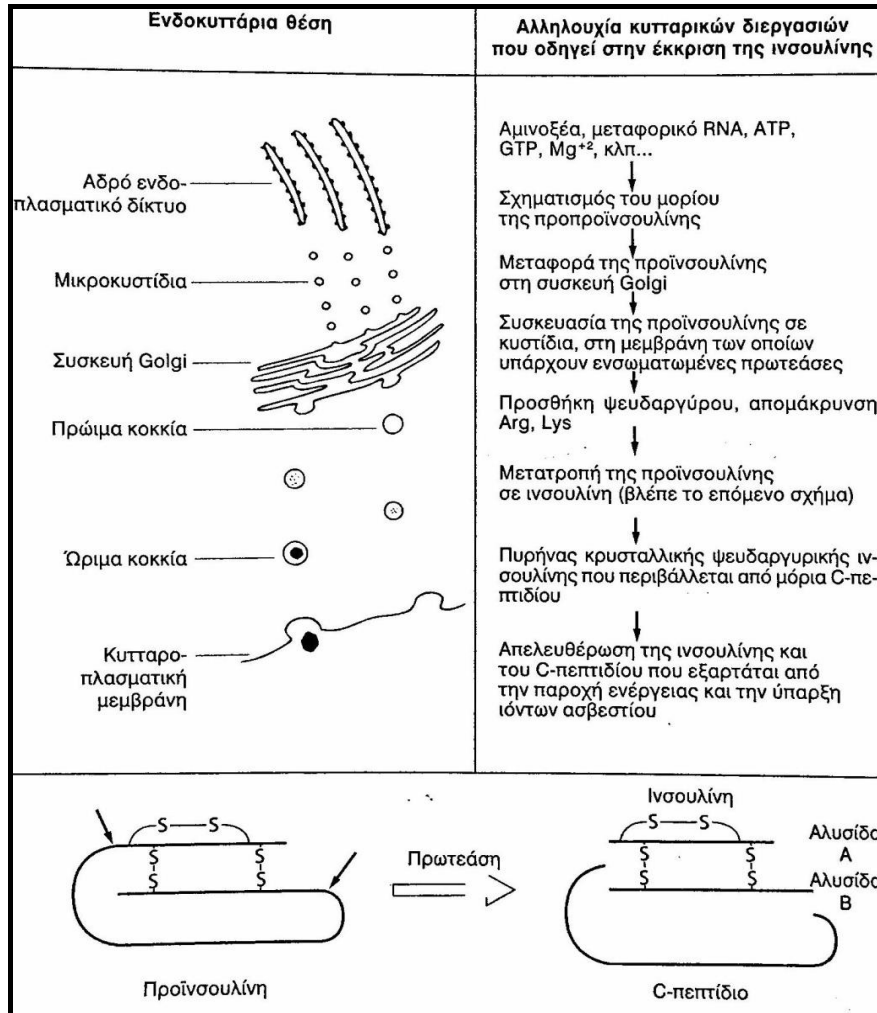
Πρώτα συντίθεται το πρόδρομο μόριο της προ-προϊνσουλίνης. Στο αμινοτελικό άκρο του πρωτεϊνικού μορίου της προ-προϊνσουλίνης βρίσκεται μια σηματοδοτική αλληλουχία την οποία ακολουθούν τα τριάντα αμινοξέα της Β αλυσίδας ενώ τα τελευταία 21 αμινοξέα που βρίσκονται στο καρβοξυτελικό άκρο σχηματίζουν την αλληλουχία της Α αλυσίδας. Ανάμεσα στις δύο αλυσίδες παρεμβάλλονται 26-31(ανάλογα με το είδος) αμινοξέα που αποτελούν το C πεπτίδιο (connecting peptide: συνδετικό πεπτίδιο).

Το μόριο της προ-προϊνσουλίνης σχηματίζεται στα ριβοσώματα και με τη βοήθεια της σηματοδοτικής αλληλουχίας οδηγείται στο ενδοπλασματικό δίκτυο όπου πρωτεολυτικά ένζυμα αποκόπτουν τη σηματοδοτική αλληλουχία οδηγώντας στο σχηματισμό του μορίου της προϊνσουλίνης. **(Εικ.1.2)** Η προϊνσουλίνη εμφανίζει μικρού βαθμού ινσουλινοειδή δράση. Η προϊνσουλίνης περνά από το ενδοπλασματικό δίκτυο στη συσκευή Golgi και από εκεί στα χαρακτηριστικά εκκριτικά κοκκία των β-κυττάρων, τα οποία καλούνται β-κοκκία.



Εικ.1.2. Προϊνσουλίνη

Τα κοκκία αυτά εκτός από την αδρανή προορμόνη περιέχουν και ένζυμα που θα «κόψουν» την προορμόνη σε δραστική ινσουλίνη και C πεπτίδιο. (Εικ.1.3) Μελέτες έχουν δείξει ότι κάθε μεμονωμένο β-κύτταρο περιέχει περισσότερα από 1000 εκκριτικά κοκκία.



Εικ.1.3. Σύνθεση και έκκριση ινσουλίνης από τα β- κύτταρα των νησιδίων του Langerhans

Το πάγκρεας του ανθρώπου περιέχει περίπου 5 mg (~ 300 IU) ινσουλίνης.

Η **γλυκαγόνη** είναι μία πολυπεπτιδική ορμόνη μοριακού βάρους 3.5 kDa, η δομή της οποίας ελάχιστα διαφέρει στα διάφορα ζωικά είδη. Όπως και η ινσουλίνη, η γλυκαγόνη προέρχεται από ένα μεγαλύτερο πρόδρομο μόριο, την προ-προγλυκαγόνη. Το μόριο αυτό διασπάται από πρωτεολυτικά ένζυμα των α-κυττάρων και δίνει την τελική ορμόνη, η οποία αποτελείται από 29 αμινοξέα, διατεταγμένα σε μονή αλυσίδα. Η γλυκαγόνη επίσης αποθηκεύεται σε εκκριτικά κοκκία. Είναι γνωστό ότι η γλυκαγόνη παίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης διεγείροντας την ηπατική παραγωγή της, φαίνεται όμως ότι ασκεί και απ ευθείας δράση στην έκκριση ινσουλίνης. Υποδοχείς γλυκαγόνης εκφράζονται στα β-κύτταρα. Σύνδεση της γλυκαγόνης με τον υποδοχέα της στο β-κύτταρο διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης. Παρά την ανωτέρω δράση της γλυκαγόνης στην έκκριση ινσουλίνης, η

υπεργλυκαιμία οδηγεί τελικά σε υπεργλυκαιμία (λόγω των περιφερικών -εκτός παγκρέατος- δράσεων της γλυκαγόνης).(1)

Ρύθμιση της απελευθέρωσης της ινσουλίνης και της γλυκαγόνης

Η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα είναι ο βασικός παράγοντας που καθορίζει την απελευθέρωση ινσουλίνης και γλυκαγόνης από το πάγκρεας. Όμως η έκκριση των παγκρεατικών ορμονών ελέγχεται και από νευρογενείς παράγοντες καθώς και από ορμόνες του γαστρεντερικού συστήματος (Πίνακας 1.1).

Πίνακας 1.1 Παράγοντες που ελέγχουν την έκκριση ινσουλίνης από τα β-κύτταρα

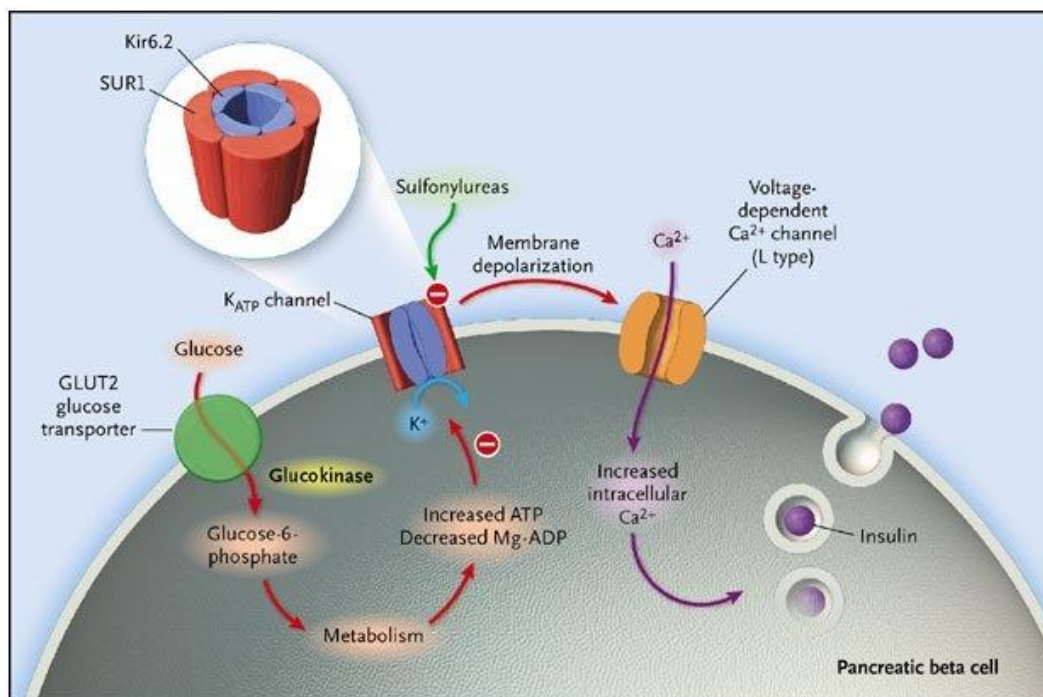
Διέγερση της έκκρισης ινσουλίνης	Αναστολή της έκκρισης ινσουλίνης
Υπεργλυκαιμία	Υπογλυκαιμία
Αμινοξέα	Σωματοστατίνη
Γλυκαγόνη	Λεπτίνη
Γαστρίνη, σεκρετίνη	Διέγερση του συμπαθητικού (β-υποδοχείς)
Χολοκυστοκίνη	Στρες (π.χ. σωματική άσκηση, υποξία, υποθερμία, χειρουργική επέμβαση, βαριά εγκαύματα)
GLP-1	
GIP	
Διέγερση του συμπαθητικού (α-υποδοχείς)	
Διέγερση του παρασυμπαθητικού (χολινεργικοί υποδοχείς υποδοχείς)	

GIP: Glucose- dependent Insulinotrophic Peptide, GLP-1: Glucagon-like Peptide-1

Η έκκριση της ινσουλίνης γίνεται μέσω εξωκύττωσης των β-κοκκίων με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της ινσουλίνης μαζί με ισομοριακές ποσότητες C πεπτιδίου. Η ινσουλίνη είναι η μόνη ορμόνη που μειώνει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα είναι ο βασικός παράγοντας που καθορίζει την απελευθέρωση της ινσουλίνης από το πάγκρεας. Κατά συνέπεια κύρια λειτουργία των β-κυττάρων είναι η επιτυχής σύζευξη των αλλαγών στην εξωκυττάρια συγκέντρωση γλυκόζης και της απελευθέρωσης ινσουλίνης. Η έκκριση της ινσουλίνης γίνεται με αποπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης του β-κυττάρου. Το δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης του β-κυττάρου είναι -60 mV και διατηρείται με τη βοήθεια διαύλων K^+ μέσω των οποίων αποβάλλονται ιόντα K^+ στον εξωκυττάριο χώρο. Ο κύριος τύπος διαύλων K^+ είναι ο Kir6.2 ο οποίος είναι συζευγμένος με μια ρυθμιστική πρωτεΐνη, γνωστή σαν SUR1 (πρωτεΐνη που αποτελεί υποδοχέα με τον οποίο συνδέονται οι σουλφονουλourίες). Το σύμπλεγμα Kir6.2-SUR1 είναι γνωστό σαν K_{ATP} διάυλος (διάυλοι K_{ATP} -ελεγχόμενοι). Πρόκειται ουσιαστικά για ένα οκταμερές σύμπλεγμα αποτελούμενο από τέσσερις υπομονάδες Kir6.2 περιβαλλόμενες από τέσσερις μονάδες SUR1. **(Εικ.1.4)** Το σύμπλεγμα SUR1 συνδεόμενο με ATP αλλά και με σουλφονουλourίες δρα σαν ρυθμιστής των διαύλων K^+ . Τόσο το ATP όσο και οι

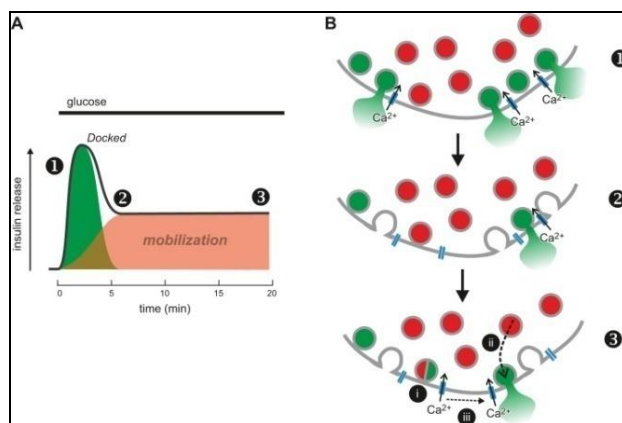
σουλφονουλουρίες δρουν «κλείνοντας» του διαύλους K^+ εμποδίζοντας την εκροή K^+ εκτός του κυττάρου. Αυτό οδηγεί σε αποπόλωση (αύξηση του διαμεμβρικού δυναμικού) της κυτταρικής μεμβράνης. Μόλις το δυναμικό ανέβει άνω του -40 mV τότε «ανοίγουν» οι διάυλοι Ca^{++} , με αποτέλεσμα εισροή Ca^{++} στον ενδοκυττάριο χώρο, αύξηση της συγκέντρωσης Ca^{++} και εξωκύτωση των κοκκίων ινσουλίνης. Αντίθετα, η διαζοξίδη συνδεόμενη με τους K_{ATP} -ελεγχόμενοι διαύλους τους «ανοίγει» εμποδίζοντας την εξωκύτωση των β -κοκκίων.

Όταν τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα αυξηθούν πάνω από 90 mg/dL τότε η γλυκόζη μέσω γλυκομεταφορέων-2 (Glut-2) εισέρχεται στο β -κύτταρο, φωσφορυλιώνεται με τη δράση του ενζύμου γλυκοκινάση και οδηγείται σε αερόβια γλυκόλυση με αποτέλεσμα, αύξηση της συγκέντρωσης του ATP και ταυτόχρονη μείωση του ADP. Η αύξηση του λόγου ATP/ADP προκαλεί κλείσιμο των K_{ATP} -ελεγχόμενοι διαύλων και όλη η αλληλουχία των γεγονότων που προαναφέρθηκε καταλήγει στην εξωκύτωση της ινσουλίνης. **(Εικ.1.4)**



Εικ.1.4. Η γλυκόζη εισερχόμενη στο β -κύτταρο και μέσω του μεταβολισμού της διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης. Προσαρμοσμένο από (2)

Η ενδοφλέβια χορήγηση γλυκόζης ακολουθείται, ως γνωστό, από διφασική έκκριση ινσουλίνης. Μια πολύ ταχεία και απότομη αύξηση στην έκκριση ινσουλίνης παρατηρείται μέσα στα πρώτα δύο λεπτά από τη χορήγηση γλυκόζης. Ακολουθεί μια απότομη μείωση, και στη συνέχεια διατήρηση της έκκρισης σε χαμηλότερα επίπεδα, που διαρκεί όμως περισσότερο. **(Εικ.1.5A)**



Εικ.1. 5. Διφασική έκκριση ινσουλίνης από το β-κύτταρο σαν απάντηση στο ερέθισμα της γλυκόζης

Η πρώτη φάση προκύπτει από την εξωκύττωση β-κοκκίων που αποτελούν την «έτοιμη προς απελευθέρωση δεξαμενή» που αποτελεί το 5-10% της αποθηκευμένης στα β-κύτταρα ινσουλίνης. Πρόκειται για κοκκία που είναι σε ετοιμότητα στην κυτταρική μεμβράνη και ενεργοποιημένα για άμεση εξωκύττωση. Η έκκριση της 2^{ης} φάσης προκύπτει από την εξωκύττωση κοκκίων που αποτελούν την «αποθηκευμένη δεξαμενή». πρόκειται για κοκκία που βρίσκονται στο εσωτερικό του κυττάρου και τα οποία μεταπίπτουν σε ενεργοποιημένα (με κατανάλωση ATP) σταδιακά στην «έτοιμη προς απελευθέρωση δεξαμενή». **(Εικ.1.5B)**

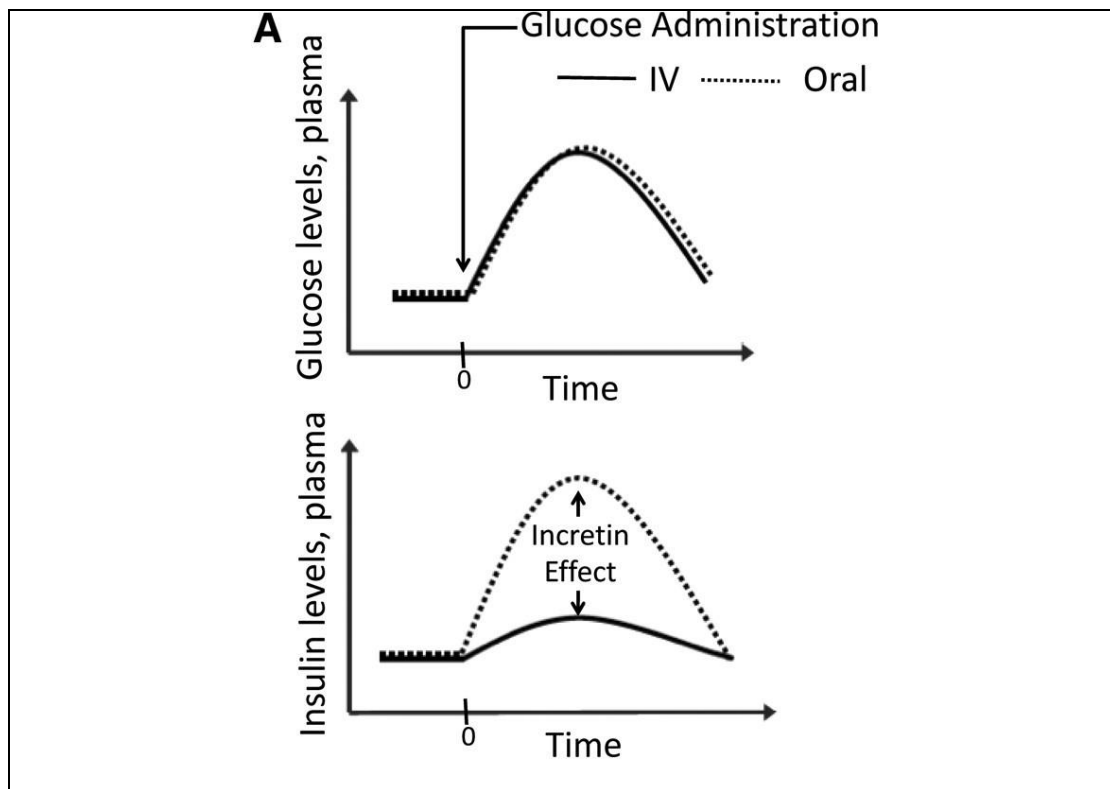
Εκτός από τη γλυκόζη, τρία αμινοξέα μπορούν επίσης να διεγείρουν την έκκριση ινσουλίνης. Αυτό το επιτυγχάνουν αυξάνοντας τα επίπεδα του ενδοκυττάρου Ca^{++} χωρίς όμως να εμπλέκονται οι K_{ATP} -ελεγχόμενοι διάυλοι. Η αλανίνη και η γλυκίνη μοιράζονται έναν μεταφορέα που συμεταφέρει Na^{+} μέσα στο β-κύτταρο. Η εισροή του Na^{+} προκαλεί αποπόλωση της μεμβράνης και ανοίγει τους διαύλους Ca^{++} . Η αργινίνη διαθέτει δικό της μεταφορέα ο οποίος βρίσκεται στη μεμβράνη του β-κυττάρου. Η αργινίνη είναι ένα κατιόν που εισερχόμενο στο β-κύτταρο μπορεί να προκαλέσει αποπόλωση της μεμβράνης και άνοιγμα των διαύλων ασβεστίου.(3)

Η γλυκόζη εκτός από την απ' ευθείας δράση της στο β-κύτταρο, όσον αφορά την έκκριση ινσουλίνης, φαίνεται να επιδρά και έμμεσα. Τα νησίδια του παγκρέατος διαθέτουν πλούσια νεύρωση από συμπαθητικές, παρασυμπαθητικές και αισθητικές νευρικές ίνες, με ποικιλία νευροδιαβιβαστών και νευροπεπτιδίων αποθηκευμένων στις απολήξεις τους. Η γλυκόζη μέσα στη στοματική κοιλότητα, μέσω υποδοχέων γεύσης και των προσαγωγών ιών τους διεγείρει νευρικά αντανακλαστικά που άγονται μέσω του πνευμονογαστρικού νεύρου (παρασυμπαθητικό). Η διέγερση του παρασυμπαθητικού προκαλεί απελευθέρωση ινσουλίνης και αυτή η διέγερση είναι πολύ σημαντική για τη λεγόμενη κεφαλική φάση έκκρισης της ινσουλίνης, που συμβαίνει πριν ακόμα αυξηθούν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα.(3)

Τα β-κύτταρα δέχονται συμπαθητική νεύρωση και διαθέτουν α- και β-υποδοχείς. Η νορεπινεφρίνη σε μικρή συγκέντρωση αυξάνει την έκκριση ινσουλίνης δρώντας στους α-υποδοχείς, ενώ αντιθέτως σε υψηλές συγκεντρώσεις αναστέλλει την έκκριση ινσουλίνης (όπως και η επινεφρίνη), δρώντας στους β-υποδοχείς. Η διέγερση του συμπαθητικού in vivo τελικά αναστέλλει την απελευθέρωση ινσουλίνης. Φαίνεται

ότι η συμπαθητική νεύρωση βοηθά κυρίως στη ρύθμιση της ευαισθησίας των παγκρεατικών κυττάρων σε άλλους διεγέρτες. Η επινεφρίνη αναστέλλει την έκκριση της ινσουλίνης αλλά διεγείρει την έκκριση της γλυκαγόνης. Έτσι αυξάνει έμμεσα τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα, ανεξάρτητα από την άμεση επίδρασή της στην κινητοποίηση του ηπατικού γλυκογόνου. Αρκετές ορμόνες του γαστρεντερικού διεγείρουν την έκκριση της ινσουλίνης: η σεκρετίνη (ή εκκριματίνη), η γαστρίνη, η χολοκυστοκινίνη και το γλυκοζο-εξαρτώμενο ινσουλινοτρόπο πεπτίδιο (γνωστό και ως gastric inhibitory peptide - GIP). Οι ορμόνες αυτές απελευθερώνονται μετά από πρόσληψη τροφής, δηλαδή η έκκριση ινσουλίνης είναι μεγαλύτερη με την από του στόματος πρόσληψη γλυκόζης παρά με την παρεντερική χορήγησή της (φαινόμενο ινκρετίνης).(1)

Είναι γνωστό ότι η μεταγευματική γλυκοζο-εξαρτώμενη έκκριση ινσουλίνης είναι μεγαλύτερη από την παρατηρούμενη μετά από ενδοφλέβια χορήγηση γλυκόζης που οδηγεί σε ίδια επίπεδα γλυκόζης ορού. (Εικ.1.6) Το φαινόμενο αυτό περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1964 και ονομάστηκε «φαινόμενο ινκρετίνης». Δύο μόρια είναι υπεύθυνα για αυτό το φαινόμενο. Το Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1) και το Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP). Το GLP-1 αποσχίζεται από το μόριο της προγλυκαγόνης με τη δράση ειδικών μετατροπικών ενζύμων που βρίσκονται στο γαστρεντερικό σύστημα. Πρόκειται για πεπτίδιο που συντίθεται και εκκρίνεται από τα L-κύτταρα του εντέρου (ειλεός και παχύ έντερο). Το GIP εκκρίνεται από τα K κύτταρα του εντέρου (δωδεκαδάκτυλο, εγγύς τμήμα του λεπτού εντέρου).



Εικ.1. 6. Φαινόμενο ινκρετίνης

Το κύριο ερέθισμα για την έκκριση των ινκρετινών (GLP-1 και GIP) αποτελούν οι τροφές που έρχονται σε άμεση επαφή με τα L και K κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου, αντίστοιχα. Τροφές πλούσιες σε υδατάνθρακες και λίπη επάγουν περισσότερο την έκκριση του GLP-1 (6-8 φορές) σε σχέση με τροφές πλούσιες σε πρωτεΐνες. Η έκκριση των ινκρετινών μπορεί να ρυθμιστεί όχι μόνο άμεσα αλλά και έμμεσα, μέσω νευροενδοκρινικών παραγόντων που εκκρίνονται με την είσοδο της τροφής στο πεπτικό, με αποτέλεσμα η πρώτη φάση έκκρισης του GLP-1 να αρχίζει αμέσως μετά την πρόσληψη τροφής. Επιπλέον το GIP που εκκρίνεται από το εγγύς τμήμα του λεπτού εντέρου διεγείρει την έκκριση GLP-1. Αξίζει να σημειωθεί ότι το GLP-1 εκτός από ορμόνη του πεπτικού συστήματος, αποτελεί και νευροπεπτίδιο που εκκρίνεται από το κεντρικό νευρικό σύστημα και επάγει επίσης την έκκριση ινσουλίνης από τα β-κύτταρα. Έχει δειχθεί ότι τόσο το GLP-1 όσο και το GIP αυξάνουν τη γλυκοζο-εξαρτώμενη έκκριση ινσουλίνης μέσω σύνδεσής τους με Gs-coupled υποδοχείς, ενεργοποίησης της αδενυλκυκλάσης και αύξηση του cAMP.

Επιπλέον, *in vitro* πειράματα έδειξαν, 1) ότι επάγουν την έκφραση του γονιδίου της προ-προϊνσουλίνης, αυξάνοντας τη βιοσύνθεση της ινσουλίνης 2) αυξάνουν την έκφραση του γονιδίου της εξοκίνησης με το GLP-1 να ασκεί πιο ισχυρή δράση από το GIP και 3) αυξάνουν την έκφραση του γονιδίου GLUT2. Θα πρέπει να προστεθεί ότι το GLP-1 ελέγχει τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων που ευθύνονται για τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των β-κυττάρων του παγκρέατος, ενώ εμποδίζουν την απόπτωσή τους.

Η γκρελίνη είναι μια πεπτιδική ορμόνη που παράγεται κυρίως από τα κύτταρα του στομάχου. Τόσο η γκρελίνη όσο και ο υποδοχέας της απομονώθηκαν στα παγκρεατικά νησίδια. Τα επίπεδα της γκρελίνης στο πλάσμα αντανακλούν την κατάσταση του ενεργειακού ισοζυγίου. Έτσι, αυξάνονται όταν υπάρχει αρνητικό ισοζύγιο (νηστεία, ανορεξία) και ελαττώνονται όταν υπάρχει θετικό ισοζύγιο (παχυσαρκία). Φαίνεται ότι η έκκρισή της βρίσκεται υπό τον έλεγχο του παρασυμπαθητικού με κύριο ρυθμιστή την ακετυλοχολίνη. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι η γλυκαγόνη ρυθμίζει απ' ευθείας την έκκριση γκρελίνης. Αυτό σημαίνει ότι κατά τη νηστεία, τα υψηλά επίπεδα γλυκαγόνης, επάγουν την έκκριση γκρελίνης, η οποία με τη σειρά της αναστέλλει την έκκριση ινσουλίνης. Αντιστρόφως, χαμηλά επίπεδα γκρελίνης συνοδεύονται από υψηλά επίπεδα ινσουλίνης νηστείας και ινσουλινοαντίσταση στον άνθρωπο.

Η σωματοστατίνη εκκρίνεται από τα δ-κύτταρα του παγκρέατος και προκαλεί αναστολή της έκκρισης ινσουλίνης.

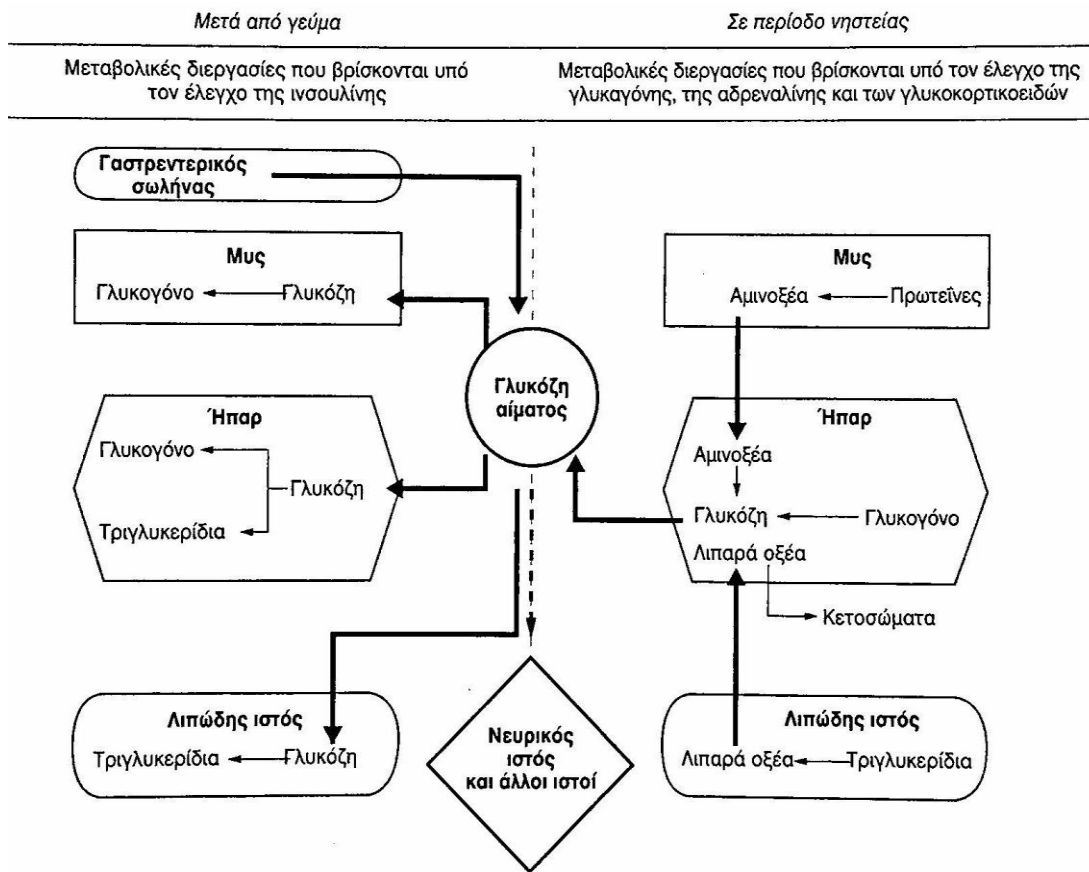
Πολύ ενδιαφέρουσες μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει μια συνομιλία μεταξύ β-κυττάρου και λιπώδους ιστού. Η λεπτίνη, μια κυττοκίνη που εκκρίνεται από τα λιπώδη κύτταρα, ασκεί μέσω του υποδοχέα της απ' ευθείας δράση στο β-κύτταρο του παγκρέατος, ρυθμίζοντας την έκκριση ινσουλίνης. Η λεπτίνη αναστέλλει τόσο την έκφραση του γονιδίου της ινσουλίνης όσο και την έκκριση ινσουλίνης. Από μελέτες

(4,5) φαίνεται ότι η λεπτίνη αναστέλλει την έκκριση της ινσουλίνης και μέσω μείωσης της δραστηριότητας της οστεοκαλσίνης. Η οστεοκαλσίνη, πρωτεΐνη που παράγεται και εκκρίνεται από τους οστεοβλάστες, πιθανώς να αποτελεί και για τον άνθρωπο ένα επιπλέον εκκριταγωγό της ινσουλίνης, αποδεικνύοντας τη συμμετοχή – εκτός του λιπώδους ιστού- και του σκελετού στη ρύθμιση της ομοιοστασίας της γλυκόζης.

Η αδιπονεκτίνη, μια άλλη κυττοκίνη που εκκρίνεται από το λιπώδη ιστό, όπως φαίνεται από *in vitro* και *in vivo* πειράματα σε επίμυες, επάγει την έκκριση ινσουλίνης.(3)

Ρύθμιση της γλυκόζης του αίματος

Η συγκέντρωση της γλυκόζης στην κυκλοφορία εξαρτάται από την απορρόφησή της στο έντερο, το ρυθμό πρόσληψης και απελευθέρωσης της γλυκόζης από το ήπαρ και την πρόσληψή της από τους περιφερικούς ιστούς. **(Εικ.1.7)** Υπό φυσιολογικές συνθήκες η γλυκόζη δεν εμφανίζεται στα ούρα γιατί όλη η διηθούμενη ποσότητά της επαναρροφάται στα εγγύς σωληνάκια. Σε κατάσταση νηστείας η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα κυμαίνεται μεταξύ 55 και 90 mg/dl. Μετά από γεύμα μπορεί να φτάσει τα 126 mg/dl, ενώ γλυκοζουρία παρατηρείται σε συγκεντρώσεις άνω των 180 mg/dl. Μετά από γεύμα ή *per os* χορήγηση γλυκόζης, η γλυκόζη απορροφάται ταχέως από το γαστρεντερικό και η συγκέντρωσή της στην κυκλοφορία φτάνει στη μέγιστη τιμή της μέσα σε μία περίπου ώρα. Όπως φαίνεται στις **Εικ.1.7** και **1.8**, η γλυκόζη μετατρέπεται σε γλυκογόνο (στο ήπαρ και τους μύες) και λιπαρά οξέα (στο ήπαρ και το λιπώδη ιστό). Η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη είναι υπεύθυνες για την προμήθεια των απαραίτητων μεταβολιτών στους περιφερικούς ιστούς και για την ομοίωση της γλυκόζης.

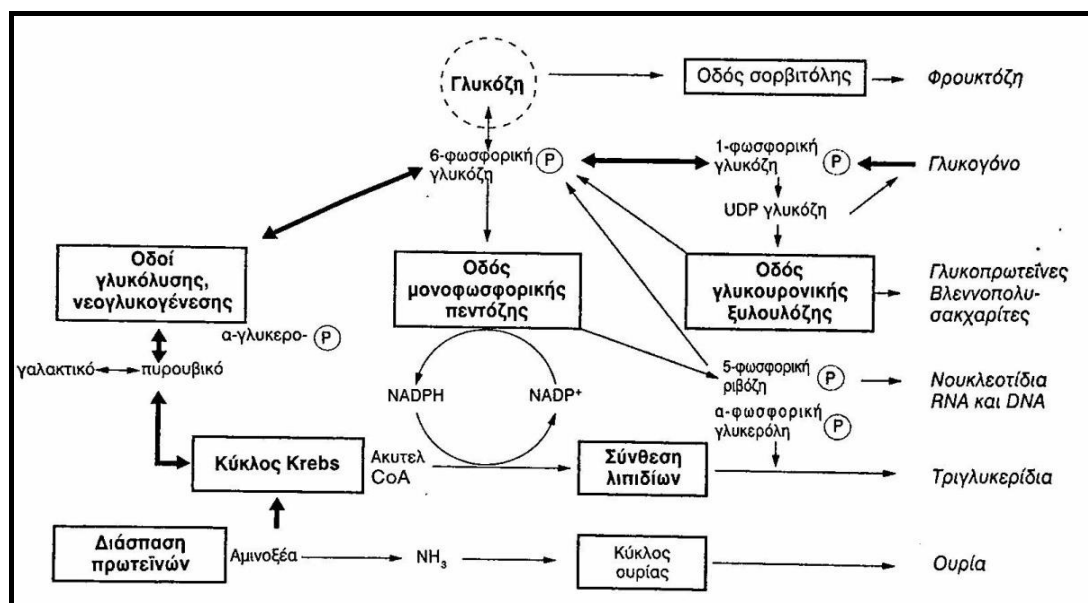


Εικ. 1.7. Ρύθμιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης του αίματος

Η ινσουλίνη θεωρείται αναβολική ορμόνη γιατί προάγει τη σύνθεση πρωτεϊνών, λιπιδίων και γλυκογόνου ενώ συγχρόνως αναστέλλει τον καταβολισμό τους, προάγει την αύξηση των κυττάρων και είναι άκρως απαραίτητη σε όλα τα είδη ζώων για τη φυσιολογική ανάπτυξη των ανήλικων ατόμων. Οι κύριοι ιστοί-στόχοι της ινσουλίνης είναι το ήπαρ, οι μύες και ο λιπώδης ιστός. (Εικ.1.7)

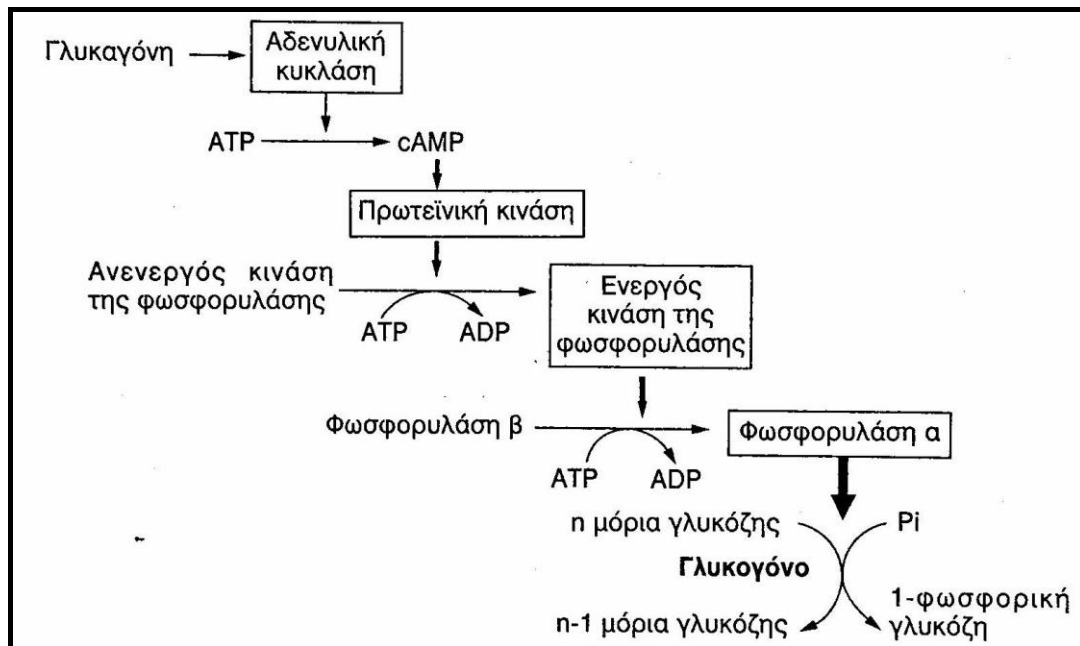
Η γλυκαγόνη είναι καταβολική ορμόνη και δρα κυρίως στο ήπαρ. (Εικ.1.7) Μεταξύ των γευμάτων και κατά τη διάρκεια περιόδων νηστείας η απελευθέρωση γλυκόζης από το ήπαρ έχει μεγάλη σημασία και ελέγχεται στενά από τον οργανισμό. Η απελευθέρωση γλυκόζης από το ήπαρ είναι σημαντική για τη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στην κυκλοφορία, από την οποία εξαρτώνται ιστοί όπως οι μύες και ο εγκέφαλος που δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν ικανοποιητικά άλλες πηγές ενέργειας (παρά μόνο κατά την εμβρυϊκή περίοδο και λίγο μετά τον τοκετό).

Οι μεταβολικές οδοί που συμμετέχουν στην προσπάθεια αυτή συνοψίζονται στην **Εικ.1.8**



Εικ.1. 8. Σχέσεις μεταξύ των διαφόρων οδών μεταβολισμού της γλυκόζης. Φαίνεται ο κεντρικός ρόλος της γλυκόζης στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών. Τα πλαίσια παριστάνουν τις κύριες μεταβολικές οδούς (για λόγους απλοποίησης του σχήματος). Στην εικόνα περιλαμβάνονται επίσης ορισμένα βασικά ενδιάμεσα μόρια και προϊόντα των μεταβολικών οδών. Τα αμφίδρομα βέλη παριστάνουν τη δυνατότητα αλληλομετατροπής των δύο μεταβολιτών, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι οι δύο αντιδράσεις καταλύονται από την ίδια σειρά ενζύμων. Οι κύριες μεταβολικές οδοί που κινητοποιούνται σε περιόδους νηστείας συμβολίζονται με παχύτερα βέλη.

Σε περιόδους νηστείας τα μυϊκά κύτταρα απελευθερώνουν αμινοξέα, τα οποία στο ήπαρ αρχικά μετατρέπονται σε πυροσταφυλικό οξύ και στη συνέχεια σε γλυκόζη μέσω των ενζύμων της νεογλυκογενετικής οδού. Συγχρόνως ενεργοποιείται η φωσφορυλάση και αυξάνεται η διάσπαση του γλυκογόνου σε γλυκόζη. **(Εικ.1.9)**



Εικ.1.9. Η αλληλουχία αντιδράσεων που κινητοποιείται από τη γλυκαγόνη και καταλήγει στη διάσπαση του γλυκογόνου. Η κινητοποίηση του ηπατικού γλυκογόνου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη γλυκαγόνη, η οποία διεγείρει την αδενυλική κυκλάση, με αποτέλεσμα την παραγωγή cAMP (κυκλικής 5'-μονοφωσφορικής αδενοσίνης) από το ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη). Το cAMP με τη σειρά του διεγείρει μία πρωτεϊνική κινάση, η οποία μετατρέπει την ανενεργό φωσφορυλάση β στην ενεργό φωσφορυλιωμένη μορφή, τη φωσφορυλάση α. Η κινητοποίηση τριών διαδοχικών ενζύμων επιτρέπει την ενίσχυση της απάντησης με αποτέλεσμα η γλυκαγόνη να επιταχύνει κατά 1000 φορές περίπου την παραγωγή 1-φωσφορικής γλυκόζης από το γλυκογόνο.

Τα κύτταρα του λιπώδους ιστού απελευθερώνουν λιπαρά οξέα, τα οποία στο ήπαρ μετατρέπονται σε κετόνες. **(Εικ.1.7)** Τα λιπαρά οξέα και οι κετόνες χρησιμοποιούνται ως πηγή ενέργειας από διάφορους ιστούς, και ειδικά το μυϊκό ιστό, προκειμένου να μειωθούν κάπως οι ανάγκες σε γλυκόζη και η νεογλυκογένεση με πρώτη ύλη τα αμινοξέα. Πρέπει να σημειωθεί ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες ο ρυθμός παραγωγής κετονών είναι μικρότερος από το ρυθμό χρησιμοποίησής τους από τα κύτταρα.

Η γλυκόζη αποτελεί βασική πηγή ενέργειας για πολλούς ιστούς. Για την πρόσληψη της γλυκόζης από τα κύτταρα των περιφερικών ιστών απαιτείται μία μικρού βαθμού αλλά συνεχής έκκριση ινσουλίνης. Χάρη στη συνδυασμένη και ισορροπημένη δράση της γλυκαγόνης και της ινσουλίνης ο οργανισμός αποτρέπει την εμφάνιση υπογλυκαιμίας, ακόμα και σε καταστάσεις νηστείας ή άσκησης, στις οποίες παρατηρείται κινητοποίηση και χρησιμοποίηση αρκετών γραμμαρίων γλυκόζης.

Είσοδος της γλυκόζης στα κύτταρα

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη χρησιμοποίηση της γλυκόζης από ένα κύτταρο είναι η είσοδος της γλυκόζης στο εσωτερικό του. Ακολουθεί η φωσφορυλίωση της γλυκόζης από ένα μόριο 5'-τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) που καταλύεται από την εξοκινάση και παράγεται η 6-φωσφορική γλυκόζη. **(Εικ.1.8)** Η 6-

φωσφορική γλυκόζη δεν μπορεί να διαφύγει από το κύτταρο γιατί η κυτταρική μεμβράνη είναι αδιαπέραστη στους όξινους φωσφορικούς εστέρες. Σε ορισμένους ιστούς, όπως ο μυϊκός, ο λιπώδης, το μυοκάρδιο και τα περιφερικά νεύρα, η μεταφορά της γλυκόζης διά της κυτταρικής μεμβράνης ρυθμίζεται από την ινσουλίνη και η όλη διαδικασία περιλαμβάνει φωσφορυλίωση του μορίου στο εσωτερικό της μεμβράνης. Το σύμπλεγμα ινσουλίνης-υποδοχέα διεγείρει την κυτταρική πρόσληψη γλυκόζης, με αποτέλεσμα την κινητοποίηση της ινσουλινοεξαρτώμενης πρωτεΐνης για τη μεταφορά γλυκόζης, GLUT4. Στο εσωτερικό των κυττάρων έχουν βρεθεί τέσσερις ισοενζυμικές μορφές της εξοκινάσης: οι τρεις από αυτές (τύποι I-III) έχουν μικρό συντελεστή συγγένειας (K) για τη γλυκόζη και αναστέλλονται σε σημαντικό βαθμό από την 6-φωσφορική γλυκόζη. Η άμεση αυτή αρνητική ανατροφοδότηση από το ίδιο το προϊόν της αντίδρασης εξασφαλίζει ότι ο ρυθμός φωσφορυλίωσης της γλυκόζης θα αυξομειώνεται ανάλογα με τη χρησιμοποίηση της 6-φωσφορικής γλυκόζης από τις διάφορες μεταβολικές οδούς που εξαρτώνται από αυτό το μεταβολίτη. Ένα χαρακτηριστικό των ινσουλινοεξαρτώμενων ιστών είναι η υψηλή τους περιεκτικότητα σε εξοκινάση τύπου II, η οποία είναι σημαντικά μειωμένη σε διαβητικά ζώα. Τα περισσότερα μόρια αυτού του ενζύμου συνδέονται με τη μεμβράνη των μιτοχονδρίων, γεγονός που τους επιτρέπει να χρησιμοποιούν το μιτοχονδριακό ATP. Η 6-φωσφορική γλυκόζη αποσυνδέει το ένζυμο από τα μιτοχόνδρια, γεγονός που συμφωνεί με την ανασταλτική δράση της 6-φωσφορικής γλυκόζης επί της εξοκινάσης. Σε πειραματόζωα που έχουν καταστεί διαβητικά με τεχνητές μεθόδους, παρατηρείται μειωμένη σύνδεση της εξοκινάσης με τα μιτοχόνδρια, ειδικά στα κύτταρα του λιπώδους ιστού. Η εξοκινάση τύπου IV, η οποία λέγεται και γλυκοκινάση, βρίσκεται (σχεδόν) αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα των ηπατικών κυττάρων και διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του σακχάρου του αίματος. Το ισοένζυμο αυτό είναι υπεύθυνο για το 80% των φωσφορυλίωσεων γλυκόζης που λαμβάνουν χώρα στο ήπαρ. Οι ιδιότητες της γλυκοκινάσης είναι σημαντικές για την ομοιοστάση της γλυκόζης: η K_m της γλυκοκινάσης για τη γλυκόζη είναι περίπου 180 mg/dl, δηλαδή διπλάσια από τη φυσιολογική συγκέντρωση της γλυκόζης του αίματος. Το ένζυμο δραστηριοποιείται όταν η προσφορά γλυκόζης στο ήπαρ διά της πυλαίας κυκλοφορίας αυξάνεται, π.χ. μετά από ένα γεύμα πλούσιο σε υδατάνθρακες. Η μεγάλη τιμή της K_m , εξασφαλίζει ότι η δραστηριότητα του ενζύμου είναι μέγιστη μόνο όταν τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα είναι υψηλά. Αντιθέτως σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις γλυκόζης αίματος η δραστηριότητα του ενζύμου είναι περιορισμένη. Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό της γλυκοκινάσης είναι ότι, σε αντίθεση με τις υπόλοιπες εξοκινάσες, δεν αναστέλλεται από το προϊόν της καταλυόμενης αντίδρασης, την 6-φωσφορική γλυκόζη. Χάρη στις παραπάνω ιδιότητές της, η γλυκοκινάση παίζει βασικό ρόλο στην αποθήκευση του γλυκογόνου στο ήπαρ και την ομοιοστάση της γλυκόζης του αίματος.

Ορμονική ρύθμιση του μεταβολισμού των υδατανθράκων, των λιπαρών οξέων και των πρωτεϊνών

Η προσφορά γλυκόζης στο ήπαρ και η επιστροφή της στην κυκλοφορία ελέγχονται από μία σειρά ενδοκρινικών παραγόντων που συνεργαζόμενοι ρυθμίζουν τη δραστηριότητα σημαντικών ενδοκυττάρων ενζύμων. Η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη, ως πεπτιδικές ορμόνες δρουν κυρίως σε υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης. Η ινσουλίνη διεγείρει μία κινάση τυροσίνης που αποτελεί τμήμα των υποδοχέων ινσουλίνης. Η γλυκαγόνη διεγείρει υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης που συνδέονται με πρωτεΐνες G, με αποτέλεσμα την κινητοποίηση μορίων αδενυλικής κυκλάσης. Πράγματι ο ρόλος της 5' μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) ως δεύτερου αγγελιαφόρου πρωτοανακαλύφθηκε σε μελέτες που αφορούσαν τη δράση της γλυκαγόνης στη γλυκογονόλυση. Αρκετά ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των υδατανθράκων και των λιπών *in vivo* έχουν δύο μορφές: την ενεργό και την αδρανή. Το ένζυμο μεταπίπτει από τη μία μορφή στην άλλη μέσα από διαδικασίες φωσφορυλίωσης/αποφωσφορυλίωσης. Οι διαδικασίες αυτές οδηγούν σε χημική τροποποίηση του ενζυμικού μορίου με σχηματισμό ή διάσπαση ομοιοπολικών δεσμών, π.χ. με φωσφορικές ρίζες. Η φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση καταλύονται από πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφοπρωτεϊνικές φωσφατάσες αντιστοίχως. Με αυτό το μηχανισμό η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη ελέγχουν το μεταβολισμό των λιπών και των υδατανθράκων, αν και ορισμένες πτυχές της δράσης των ορμονών αυτών δεν έχουν ακόμη ερμηνευτεί. Πολλά ένζυμα που συμμετέχουν σε καταβολικές διεργασίες είναι ενεργά στη φωσφορυλιωμένη μορφή τους, ενώ άλλα (που συνήθως συμμετέχουν σε βιοσυνθετικές οδούς) είναι ενεργά στην αποφωσφορυλιωμένη μορφή τους. Η φωσφορυλίωση καταλύεται από μία σειρά ενζύμων, τις πρωτεϊνικές κινάσες.

Μεταβολισμός του γλυκογόνου

Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου ελέγχεται από τη φωσφορυλίωση και την αποφωσφορυλίωση των υπεύθυνων ενζύμων. Το καθοριστικό, για τη συνολική ταχύτητα, βήμα της καταβολικής οδού του γλυκογόνου καταλύεται από τη φωσφορυλάση (η οποία είναι ενεργός στη φωσφορυλιωμένη μορφή), ενώ το καθοριστικό, για τη συνολική ταχύτητα, βήμα της αναβολικής οδού εξαρτάται από τη συνθετάση γλυκογόνου (η οποία είναι ενεργός στην αποφωσφορυλιωμένη μορφή). Η φωσφορυλίωση/αποφωσφορυλίωση των δύο αυτών ενζύμων συχνά ρυθμίζεται με κοινό μηχανισμό. Έτσι, η γλυκαγόνη και η επινεφρίνη διεγείρουν τη γλυκογονόλυση και αναστέλλουν τη σύνθεση γλυκογόνου μέσω μιας cAMP-εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης. Η αντίθετη διεργασία - δηλαδή η σύνθεση γλυκογόνου και η αναστολή της γλυκογονόλυσης - μπορεί να πυροδοτείται είτε από τη μείωση της συγκέντρωσης του cAMP είτε από την αύξηση της γλυκόζης του αίματος. Η μείωση του cAMP μπορεί να οφείλεται στην επικράτηση της ινσουλίνης έναντι της γλυκαγόνης. Επιπλέον η ίδια η αύξηση της γλυκόζης του αίματος μπορεί να εμποδίζει τη γλυκογονόλυση, δεδομένου ότι η σύνδεση του σχετικού ενζύμου (φωσφορυλάση α) με γλυκόζη προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωση του ενζύμου. **(Εικ.1.9)** Οι αλλαγές

αυτές ευνοούν την αποφωσφορυλίωση του ενζύμου και τη μετατροπή του στην ανενεργό μορφή, τη φωσφορυλάση β. Η μείωση της φωσφορυλάσης α αναστέλλει τη γλυκογονόλυση. Επιπλέον η φωσφορυλάση α είναι ισχυρός αναστολέας της φωσφατάσης της συνθετάσης γλυκογόνου. Άρα η μειωμένη συγκέντρωση γλυκαγόνης οδηγεί σε μείωση της φωσφορυλάσης α και συνεπώς σε ενεργοποίηση της φωσφατάσης της συνθετάσης γλυκογόνου. Η φωσφατάση στη συνέχεια ενεργοποιεί τη συνθετάση γλυκογόνου.(1)

1.1 Σακχαρώδης Διαβήτης- Ορισμός

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης (ΣΔ) είναι ένα σύνδρομο με ετερογενές και πολυπαραγοντικό υπόστρωμα. Χαρακτηρίζεται από διαταραχή του μεταβολισμού των υδατανθράκων, λιπών και πρωτεϊνών, η οποία οφείλεται σε έλλειψη ινσουλίνης. Η έλλειψη μπορεί να είναι πλήρης, μερική ή σχετική. Ως σχετική χαρακτηρίζεται η έλλειψη ινσουλίνης, όταν, παρά τα αυξημένα επίπεδα της στο αίμα, δεν επαρκεί για την κάλυψη των αναγκών του μεταβολισμού, λόγω παρεμπόδισης της δράσης της στους περιφερικούς ιστούς (αντίσταση στην ινσουλίνη).

Η κύρια έκφραση της διαταραχής του μεταβολισμού στον ΣΔ είναι η αύξηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα.

1.2 Ταξινόμηση

Η ταξινόμηση γίνεται με βάση τις μέχρι τώρα γνωστές αιτίες που προκαλούν τον ΣΔ (αιτιολογική ταξινόμηση) και τον κατατάσσει σε τέσσερις κατηγορίες:

1. **ΣΔ ΤΥΠΟΥ 1 (ΣΔ1)** (λόγω αυτοάνοσης καταστροφής των β-κυττάρων, που συνήθως οδηγεί σε απόλυτη έλλειψη ινσουλίνης, συμπεριλαμβανομένου του λανθάνοντος αυτοάνοσου διαβήτη των ενηλίκων)
2. **ΣΔ ΤΥΠΟΥ 2 (ΣΔ2)** (λόγω προοδευτικής απώλειας επαρκούς έκκρισης ινσουλίνης από τα β-κύτταρα συχνά στα πλαίσια της αντίστασης στην ινσουλίνη)
3. **ΑΛΛΟΙ ΕΙΔΙΚΟΙ ΤΥΠΟΙ ΔΙΑΒΗΤΗ**

α) Σακχαρώδης Διαβήτης προκαλούμενος από γενετικές διαταραχές της λειτουργίας των β-κυττάρων (έκκριση ινσουλίνης).

Εδώ περιλαμβάνονται τα σύνδρομα μονογονιδιακού διαβήτη, όπως ο νεογνικός ΣΔ και ο διαβήτης τύπου MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young).

β) ΣΔ προκαλούμενος από γενετικές διαταραχές που αφορούν στη δράση της ινσουλίνης.

γ) ΣΔ προκαλούμενος από ενδοκρινοπάθειες, λοιμώξεις, νόσους του εξωκρινούς παγκρέατος (όπως η κυστική ίνωση) ή άλλες νόσους.

δ) ΣΔ προκαλούμενος από φάρμακα ή χημικές ουσίες.

ε) Γενετικά σύνδρομα που συνδυάζονται με ΣΔ.

4. **ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ (ΣΔΚ)(6)**

1.3 Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης

Η πρώτη περιγραφή στη βιβλιογραφία περίπτωσης διαβήτη κατά την διάρκεια της κύησης ανάγεται στο 1824, πριν ακόμη ο ιατρικός κόσμος διαχωριστεί σε ειδικούς κάθε κατηγορίας. Ανήκει στον Dr. Bennowitz, οικογενειακό γιατρό και κατά την άποψή του, η εγκυμοσύνη ήταν η αιτία της μεταβολικής διαταραχής. Πολύ αργότερα το 1967, ο Dr. Jorgen Petersen από την Κοπεγχάγη, έγραψε το πρώτο βιβλίο με τίτλο «Έγκυος διαβητική και το νεογνό της» και είναι ο πρώτος που χρησιμοποίησε το όρο «Gestational Diabetes», δηλαδή «διαβήτης της κύησης». Αναφέρει και περιγράφει διάγνωση σακχαρώδη διαβήτη, για πρώτη φορά, σε έγκυο γυναίκα με φυσιολογική γλυκόζη νηστείας, η οποία εμφάνισε διαβήτη κατά τις πρώτες ημέρες της λοχείας. Θεώρησε λοιπόν, ότι η τελική διάγνωση μπορεί να γίνει μόνο μετά τον τοκετό.(7)

Ως σακχαρώδης διαβήτης κύησης (ΣΔΚ) ορίζεται η διαταραχή του μεταβολισμού των υδατανθράκων που διαγιγνώσκεται κατά την έναρξη ή κατά τη διάρκεια της κύησης, η οποία όμως δεν πληροί τα κριτήρια διάγνωσης ΣΔ2.(8)

Η αλλαγή αυτή του ορισμού προτάθηκε από τη Διεθνή Ένωση Μελέτης του ΣΔΚ (International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups -IADPSG) και στη συνέχεια υιοθετήθηκε μεταξύ άλλων από την American Diabetes Association (ADA), την Αμερικανική Ενδοκρινολογική Εταιρεία, την Ελληνική Διαβητολογική Εταιρεία (ΕΔΕ) και την Ελληνική Ενδοκρινολογική Εταιρεία.

Ο νέος ορισμός στοχεύει στην αναζήτηση αδιάγνωστου ΣΔ2 στην αρχή της κύησης, χρησιμοποιώντας τα ίδια κριτήρια με αυτά που έχουν υιοθετηθεί και εκτός κύησης, και στις διαχωρισμό του από το ΣΔΚ. Και αυτό, γιατί η παρουσία έκδηλου ΣΔ2 συνδυάζεται με αυξημένο κίνδυνο συγγενών ανωμαλιών των νεογνών, καθώς και με πιθανή παρουσία διαβητικών επιπλοκών στη μητέρα. Ως εκ τούτου απαιτείται η άμεση θεραπευτική αντιμετώπιση, όπως στον προϋπάρχοντα γνωστό ΣΔ2.

Η Diabetes Federation (IDF) εκτιμά ο ΣΔΚ επηρεάζει περίπου το 14% των κυήσεων παγκοσμίως, που αντιπροσωπεύουν περίπου 18 εκατομμύρια γεννήσεις ετησίως. Η επίπτωση του ΣΔΚ αντανακλά και συμβαδίζει με την επίπτωση του ΣΔ2 στον πληθυσμό που μελετάται και έτσι παρατηρείται συνεχής αύξηση τις τελευταίες δεκαετίες, κυρίως λόγω της επιδημικής αύξησης της παχυσαρκίας. (9)

Η συχνότητα του ΣΔΚ ποικίλει διεθνώς και εξαρτάται από τον υπό μελέτη πληθυσμό αλλά και από τα διαγνωστικά κριτήρια που χρησιμοποιούνται. Με βάση τα νέα κριτήρια (μελέτη HAPO) η συχνότητα είναι περίπου 18%.(10)

Στην Ευρώπη, το 2016, ο επιπολασμός του ΣΔΚ υπολογίστηκε σε 5,4% (3,8–7.8%).(11)

Οι δυνητικές επιπλοκές του ΣΔΚ περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, αυτόματες αποβολές, αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου της μητέρας και εμφάνιση ΣΔ2 στο μέλλον, προεκλαμψία, ανατομικές ανωμαλίες του εμβρύου, μακροσωμία εμβρύου, επιπλοκές κατά τον τοκετό, νεογνική υπογλυκαιμία, υπερχολερυθριναιμία,

σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας των νεογνών. Υπάρχει επίσης αυξημένος μελλοντικός κίνδυνος εμφάνισης παχυσαρκίας, ΣΔ2 και καρδιαγγειακών παθήσεων στα παιδιά που θα γεννηθούν από διαβητικές μητέρες.(9)

Οι γυναίκες που θα αναπτύξουν ΣΔΚ αποτελούν μια ετερογενή ομάδα. Η πλειοψηφία θα αναπτύξει ήπια διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης στο δεύτερο ήμισυ της εγκυμοσύνης, όταν δηλαδή εμφανιστεί η φυσιολογική ινσουλινοαντίσταση της κύησης και η οποία θα παρέλθει μετά τον τοκετό. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η υπεργλυκαιμία είναι αποτέλεσμα μειωμένης ανοχής στη γλυκόζη λόγω δυσλειτουργίας του παγκρεατικού β-κυττάρου, στα πλαίσια χρόνιας αντίστασης στην ινσουλίνη, όπως συμβαίνει και με το ΣΔ2.

Οι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση του ΣΔΚ (**Πίνακας 1.2**), σχετίζονται είτε άμεσα είτε έμμεσα με ελαττωμένη λειτουργικότητα των β-κυττάρων και /ή αντίσταση των περιφερικών ιστών στην δράση της ινσουλίνης.

Ο ΣΔΚ μπορεί να «ξεσκεπάσει» παροδικά, προϋπάρχουσες, λανθάνουσες μεταβολικές διαταραχές. Γενετική προδιάθεση της μητέρας σε συνδυασμό με περιβαλλοντικούς και εμβρυοπλακουντιακούς παράγοντες ξεκινούν μια αλυσίδα γεγονότων που επηρεάζει τη μητέρα και το έμβρυο τόσο άμεσα όσο και μακροπρόθεσμα.

Πίνακας 1.2. Παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση ΣΔΚ

Ηλικία της μητέρας (>35 έτη)

Αυξημένο σωματικό βάρος ($\Delta\text{Μ}\Sigma \geq 25 \text{ Kg/m}^2$)

Φυλή (Αφροαμερικανοί, ιθαγενείς Αμερικανοί, Ασιάτες)

1^ο βαθμού συγγενής με ΣΔ2 ή ΣΔΚ

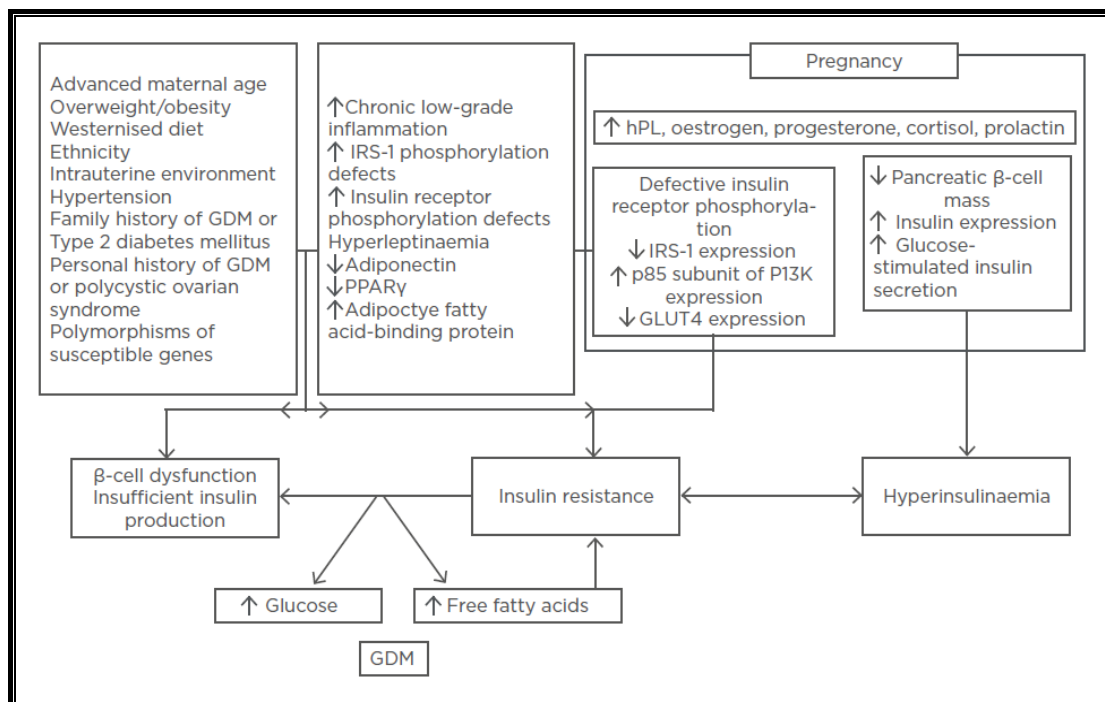
Ατομικό ιστορικό γέννησης νεογνού > 4000 gr ή ΣΔΚ

Υπέρταση (αρτηριακή πίεση $\geq 140/90 \text{ mmHg}$ ή σε αντιυπερτασική αγωγή)

Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών

Η κατανόηση της παθοφυσιολογίας του νοσήματος θα ενισχύσει τη δυνατότητα αποτελεσματικού ελέγχου, έγκαιρης παρέμβασης, ακόμη και πρόληψης. Η ινσουλινοαντίσταση και η δυσλειτουργία των β-κυττάρων είναι κοινά παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά τόσο του ΣΔΚ όσο και του ΣΔ2. Αυτές οι διαταραχές υπάρχουν πριν την κύηση και μπορεί να είναι προοδευτικά εξελισσόμενες, εκθέτοντας τη γυναίκα σε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔ2, μετά την κύηση, σε ποσοστό που κυμαίνεται μεταξύ 17% και 63% εντός 15ετίας.

Η ανάπτυξη και των δύο νόσων διέπεται από μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων με πολλαπλά γονίδια. Πολυμορφισμοί των ύποπτων γονιδίων που σχετίζονται με το ΣΔ2 έχει φανεί να σχετίζονται με την ανάπτυξη ΣΔΚ. Κατά τη διάρκεια της κύησης, ο συνδυασμός ορμονικών αλλαγών, η έναρξη της ενδοκρινικής λειτουργίας του πλακούντα και η διαταραγμένη ενδοκρινική λειτουργία του λιπώδους ιστού, προστίθενται στη γενετική προδιάθεση και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες. **(Εικ.1.10) (12)**



Εικ.1.10. [Προσαρμοσμένο από (12)] Μηχανισμοί στους οποίους βασίζεται η αντίσταση στην ινσουλίνη στην φυσιολογική κύηση και στο ΣΔΚ. Μείωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη εμφανίζεται καθώς εξελίσσετε η κύηση. Αυτή η μείωση διαμεσολαβεί από έναν αριθμό παραγόντων όπως η αύξηση των επιπέδων hPL, οιστρογόνων, προγεστερόνης, κορτιζόλης και προλακτίνη, μεταξύ άλλων παραγόντων. Εκτός από την τροποποίηση των στοιχείων ενεργοποίησης του καταρράκτη της ινσουλίνης, επίσης ενεργοποιούνται διάφοροι μηχανισμοί που ενισχύουν τη λειτουργία των β-κυττάρων. Οι μεταβολικές/ενδοκρινικές αλλαγές συνοδεύουν κυρίως το δεύτερο 3μηνο της κύησης και η παρουσία φυσιολογικής αντίστασης στην ινσουλίνη αποκαλύπτει και επιδεινώνει υποκείμενες διαταραχές του μεταβολισμού, που οδηγούν στην κλινική εικόνα του ΣΔΚ.

Κατά τη διάρκεια της κύησης, η ευαισθησία στην ινσουλίνη μεταβάλλεται ανάλογα με τις απαιτήσεις της κύησης. Κατά την πρώιμη κύηση, η ευαισθησία στην ινσουλίνη αυξάνεται, προάγοντας την πρόσληψη της γλυκόζης στο λιπώδη ιστό ως

προετοιμασία για τις ενεργειακές απαιτήσεις της μετέπειτα εγκυμοσύνης.(13) Ωστόσο, καθώς η εγκυμοσύνη εξελίσσεται, η αύξηση των περιφερικών και πλακουντιακών ορμονών, συμπεριλαμβανομένων των οιστρογόνων, της προγεστερόνης, της λεπτίνης, της κορτιζόλης, του πλακουντιακού λακτογόνου και της αυξητικής ορμόνης του πλακούντα, προάγουν από κοινού μια κατάσταση αντίστασης στην ινσουλίνη.(14) Ως αποτέλεσμα, η γλυκόζη του αίματος είναι ελαφρώς αυξημένη και αυτή η γλυκόζη μεταφέρεται εύκολα μέσω του πλακούντα για να τροφοδοτήσει την ανάπτυξη του εμβρύου. Αυτή η ήπια κατάσταση αντίστασης στην ινσουλίνη προάγει επίσης την ενδογενή παραγωγή γλυκόζης και τη διάσπαση των αποθεμάτων λίπους, με αποτέλεσμα την περαιτέρω αύξηση των συγκεντρώσεων γλυκόζης και των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA) στο αίμα. (15) Στοιχεία μελετών σε ζωικά μοντέλα υποδηλώνουν ότι, προκειμένου να διατηρηθεί η ομοιόσταση της γλυκόζης, οι έγκυες γυναίκες αντισταθμίζουν αυτές τις αλλαγές μέσω υπερτροφίας και υπερπλασίας των β-κυττάρων του παγκρέατος, καθώς και μέσω αύξησης της ευαισθησίας έκκρισης της ινσουλίνης από τη γλυκόζη.(16) Η σημασία των ορμονών του πλακούντα σε αυτή τη διαδικασία αποδεικνύεται από το γεγονός ότι η ευαισθησία της μητέρας στην ινσουλίνη επιστρέφει στα προ της κύησης επίπεδα εντός λίγων ημερών μετά τον τοκετό.(17)

Οι φυσιολογικές μεταβολικές προσαρμογές στην κύηση δεν συμβαίνουν επαρκώς σε όλες τις κυήσεις, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ΣΔΚ. Ο ΣΔΚ είναι συνήθως το αποτέλεσμα της δυσλειτουργίας των β-κυττάρων σε ένα υπόβαθρο χρόνιας αντίστασης στην ινσουλίνη πριν από την κύηση, στην οποία επιπροστίθεται η φυσιολογική ινσουλινοαντίσταση της κύησης. Αυτές οι διαταραχές μπορεί να προσλάβουν προοδευτικό χαρακτήρα αυξάνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΔ2 μετά την εγκυμοσύνη.(18)

Η κύρια λειτουργία των β-κυττάρων είναι να αποθηκεύουν και να εκκρίνουν ινσουλίνη ως απάντηση στη γλυκόζη. Ως δυσλειτουργία των β-κυττάρων θεωρείται η μειωμένη τους ικανότητα να ανιχνεύουν επαρκώς τη συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα ή να απελευθερώνουν επαρκή ποσότητα ινσουλίνης ως απάντηση. Η δυσλειτουργία των β-κυττάρων πιστεύεται ότι είναι το αποτέλεσμα παρατεταμένης, υπερβολικής παραγωγής ινσουλίνης ως απάντηση στη χρόνια περίσσεια γλυκόζης.(19) Ωστόσο, οι ακριβείς μηχανισμοί που οδηγούν στη δυσλειτουργία των β-κυττάρων μπορεί να είναι ποικίλοι και πολύπλοκοι. Διαταραχές μπορεί να εμφανιστούν σε οποιοδήποτε στάδιο έκκρισης της ινσουλίνης: στη σύνθεση προ-ινσουλίνης, στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, στην αποθήκευση των κοκκίων ινσουλίνης, στην ανίχνευση των συγκεντρώσεων γλυκόζης στο αίμα από τους υποδοχείς ή στον πολύπλοκο μηχανισμό της εξωκυττάρωσης των κοκκίων.(20, 21)

Με την πρόοδο κύησης παρατηρείται μείωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη κατά 50-60%, , τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε γυναίκες με ΣΔΚ. Ωστόσο η μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη στο ΣΔΚ, εμφανίζεται σε υπόβαθρο χρόνιας ινσουλινοαντίστασης πριν από την κύηση, στην οποία η φυσιολογική ινσουλινοαντίσταση της κύησης είναι επιπρόσθετη.(22) Έτσι, οι μεταβολικές και ενδοκρινικές αλλαγές που χαρακτηρίζουν το δεύτερο ήμισυ της κύησης, προάγοντας

τη φυσιολογική ινσουλινοαντίσταση, αποκαλύπτουν και επιδεινώνουν τις υποκείμενες προϋπάρχουσες μεταβολικές διαταραχές οδηγώντας έτσι στην πλήρη κλινική εικόνα του ΣΔΚ. Η φυσιολογική ινσουλινοαντίσταση της κήσης μειώνεται γρήγορα μετά τον τοκετό, αλλά οι γυναίκες με ΣΔΚ καταλήγουν με πολύ μεγαλύτερη ινσουλινοαντίσταση από τις φυσιολογικές γυναίκες.

Οι παθοφυσιολογικές αλλαγές που ευθύνονται για την ινσουλινοαντίσταση στο ΣΔΚ δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως. Οι πιθανοί παθογενετικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην εμφάνιση ΣΔΚ, φαίνονται στον **Πίνακα 1.3**.

Ο αριθμός των υποδοχέων ινσουλίνης συνήθως δεν επηρεάζεται.(23) Ωστόσο, γενετικοί πολυμορφισμοί που σχετίζονται με ινσουλινοαντίσταση και μη φυσιολογική χρήση γλυκόζης (PPARG, TCF7L2, GCK, GCKR) εμφανίζουν συσχέτιση με τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΔΚ.(24)

Πίνακας 1.3. Πιθανοί μηχανισμοί πίσω από τον ΣΔΚ. [Προσαρμοσμένο από (12)]

Physiological area	Mechanisms
Brain	↑ Appetite ↓ Energy expenditure
Adipose tissue	Insulin resistance ↑ Leptin ↓ Adiponectin, IL-10 ↑ Lipolysis, ↑ free fatty acids ↑ M1 macrophages, T helper 1, and T cytotoxic lymphocytes ↑ Proinflammatory cytokines (TNF-α, IFN-γ, IL-1, IL-6) ↓ Expandability ↑ Adipocyte hypertrophy and death ↑ Lipotoxicity
Muscle	Insulin resistance Ectopic fat deposition ↓ Mitochondrial function ↑ ROS
Liver	Insulin resistance ↑ Gluconeogenesis Ectopic fat deposition ↑ ROS
Gut	Altered gut microbiome
Placenta	Insulin resistance ↑ Proinflammatory cytokines ↑ Placental leptin ↑ Placental transport ↑ Fetal growth ↑ T helper 17
Pancreas	β-cell dysfunction

Τροποποιημένη έκφραση και/ή φωσφορυλίωση παραγόντων που εμπλέκονται στην ενδοκυττάρια μεταγωγή του σήματος που προκύπτει από τη σύνδεση της ινσουλίνης στον υποδοχέα της - συμπεριλαμβανομένου του IRS-1, της φωσφατιδυλινοσιτόλη 3-κινάσης (PI3K), του μεταφορέα της γλυκόζης-4 (GLUT-4)- μειωμένη έκφραση του

πυρηνικού υποδοχέα PPAR- γ , και αυξημένη έκφραση της μεμβρανικής γλυκοπρωτεΐνης PC-1, έχουν περιγραφεί σε ασθενείς με ΣΔΚ κατά τη διάρκεια κύησης ή και μετά από αυτή.(23, 25) Η ινσουλινοαντίσταση αυξάνει τη δυσλειτουργία των β -κυττάρων.(26)

Κατά την έναρξη της κύησης, η αλληλεπίδραση της μητρικής ινσουλίνης με τη συγκυτιοτροφοβλάστη μπορεί να τροποποιήσει τη σύνθεση και έκκριση κυτοκινών που, με τη σειρά τους, θα δράσουν στη μητέρα και θα συμβάλλουν στη συστηματική ήπια φλεγμονή που παρατηρείται κατά το τρίτο 3μηνο της φυσιολογικής κύησης. Αυτή η κατάσταση επιδεινώνεται σε παχύσαρκες εγκυμονούσες και σε αυτές με ΣΔΚ.(27)

Η προγεστερόνη συμβάλλει σημαντικά στην αντίσταση στην ινσουλίνη ενώ τα οιστρογόνα δρουν προστατευτικά.(28) Ο υποδοχέας οιστρογόνων- α , φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στον λιπώδη ιστό και η μειωμένη έκφρασή του στο υποδόριο λίπος ασθενών με ΣΔΚ, μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη ινσουλινοαντίστασης.(29) Επιπλέον, η προγεστερόνη μπορεί να διαταράσσει τη φυσιολογική προσαρμογή των β -κυττάρων κατά τη διάρκεια της κύησης και να επηρεάζει την προδιάθεση σε διαβήτη.(30)

Σε μια μελέτη παρατήρησης βρέθηκαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα κορτιζόλης στον ορό γυναικών με ΣΔΚ.(31) Στους σκελετικούς μύες, τα γλυκοκορτικοειδή προκαλούν ινσουλινοαντίσταση μειώνοντας τη μεταγραφή του IRS-1, ενώ ταυτόχρονα αυξάνουν τη μεταγραφή της πρωτεϊνικής τυροσινικής φωσφατάσης τύπου-1B και της p38 (MAPK) που εξουδετερώνουν τη δράση της ινσουλίνης.(32)

Το ανθρώπινο πλακουντιακό γαλακτογόνο (hPL) εμφανίζει και ινσουλινική και αντι-ινσουλινική δράση. Δρα μέσω του υποδοχέα προλακτίνης (PRLR) στα μητρικά β -κύτταρα και προκαλεί αύξηση στη μάζα και τη λειτουργία τους, για την αντιμετώπιση των αυξημένων μεταβολικών απαιτήσεων της κύησης. Αντιθέτως, προκαλεί ινσουλινοαντίσταση μειώνοντας τη φωσφορυλίωση του IRS-1.(33) Επιπλέον, η σχετιζόμενη με το hPL αύξηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων παρεμποδίζει άμεσα την είσοδο γλυκόζης στα κύτταρα. Τα επίπεδα του hPL-messenger RNA βρέθηκαν να είναι υψηλότερα σε ασθενείς με ΣΔΚ, ως εκ τούτου, το hPL θεωρείται ως ένας σημαντικός, φυσιολογικός ανταγωνιστής της δράσης της ινσουλίνης κατά τη διάρκεια της κύησης.(34)

Η προλακτίνη ρυθμίζει σε μεγάλο βαθμό τις λειτουργίες των β -κυττάρων και πολυμορφισμοί στον υποκινητή του γονιδίου PRLR έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για ΣΔΚ.(35) Αντίθετα, μια άλλη μελέτη δεν βρήκε καμία διαφορά στις συγκεντρώσεις προλακτίνης πριν και κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας ανοχής γλυκόζης (OGTT) μεταξύ φυσιολογικών και γυναικών με ΣΔΚ, ούτε κατά την κύηση, ούτε μετά τον τοκετό.(36) Δεν υπήρχε συσχέτιση μεταξύ της διαταραχής της ανοχής στη γλυκόζη και των συγκεντρώσεων προλακτίνης και στις δύο ομάδες.

Ο πλακούντας μπορεί να διαδραματίζει ενεργό ρόλο, σαν διαμεσολαβητής της φλεγμονής σε γυναίκες με παχυσαρκία και ΣΔΚ. Γυναίκες με ΣΔΚ στο τρίτο 3μηνο της κύησης είχαν υψηλότερο ποσοστό των T-βοηθητικών κυττάρων 17 (προφλεγμονώδης απόκριση) που αντιροπούνταν από υψηλότερο ποσοστό T-

βοηθητικών κυττάρων 2 και ρυθμιστικών T κυττάρων (αντιφλεγμονώδης απόκριση).(37) Η αλληλεπίδραση μεταξύ διαφορετικών τύπων μητρικών και εμβρυϊκών κυττάρων μπορεί να συντηρεί έναν φαύλο κύκλο για την παραγωγή κυτοκινών. Αυτή η κατάσταση μπορεί να αλλάζει τις μεταβολικές και ενδοκρινικές λειτουργίες του πλακούντα, και τελικά να επηρεάζει τη δράση της ινσουλίνης στην εμβρυοπλακουντιακή μονάδα που οδηγεί στο ΣΔΚ.(38)

Ιδιαίτερο ρόλο στη συμμετοχή του πλακούντα στην παθογένεση του ΣΔΚ διαδραματίζει το σηματοδοτικό μονοπάτι του TNF-α (είναι ένα από αυτά που σχετίζονται περισσότερο με την ανάπτυξη του πλακούντα),(39) συνδέοντας την ήπια φλεγμονή που παρατηρείται στην κύηση, με την ελαττωματική δράση της ινσουλίνης και την επίταση της ινσουλινοαντίστασης. Η αυξημένη μεταγραφή TNF-α στον πλακούντα έχει συσχετιστεί με σημαντικά μειωμένη δράση της ινσουλίνης στο ΣΔΚ.(38)

Η νευρο-ορμονική ρύθμιση καθορίζει την όρεξη, τις ενεργειακές δαπάνες και το βασικό μεταβολικό ρυθμό. Συμβάλλει στην παθογένεση του ΣΔΚ επηρεάζοντας την εναπόθεση λιπώδους ιστού και τη χρήση γλυκόζης. Η νευρο-ορμονική ρύθμιση ακολουθεί κερκάρδιους ρυθμούς και αυτό μπορεί να αποτελεί εξήγηση στη συσχέτιση μεταξύ ανάπτυξης ΣΔΚ σε άτομα με παθολογικές διαταραχές ύπνου ή με εργασία σε βάρδιες.(40)

Μελέτες έδειξαν πως η αδιπνεκτίνη, η λεπτίνη, ο TNF-α και η AFABP (adipocyte fatty acid-binding protein), φαίνεται να συμμετέχουν στην παθοφυσιολογία του ΣΔΚ.

Η λεπτίνη αυξάνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη επηρεάζοντας την έκκριση ινσουλίνης, τη χρήση γλυκόζης, τη σύνθεση γλυκογόνου και το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων. Στο σκελετικό μυ, διεγείρει τη βασική, αλλά όχι την ινσουλινοεξαρτώμενη, πρόσληψη γλυκόζης.(41) Η λεπτίνη μπορεί να καταστέλλει την έκκριση ινσουλίνης μέσω αρκετών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της μείωσης των επίπεδων messenger RNA της προϊνσουλίνης στα β-κύτταρα, υπό την επίδραση υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης, αναστολή της μεταφοράς γλυκόζης στα β-κύτταρα, κ.α.(42) Τόσο η παχυσαρκία όσο και η κύηση χαρακτηρίζονται από αντίσταση στη λεπτίνη που σχετίζεται με μειωμένη σηματοδότηση στον υποθάλαμο. Τα επίπεδα της μητρικής λεπτίνης αυξάνονται από τα πρώτα στάδια της εγκυμοσύνης, υποδηλώνοντας ότι οι αυξήσεις αυτές δεν οφείλονται αποκλειστικά στην αύξηση του βάρους της μητέρας. Η λεπτίνη μπορεί να συμβάλει στην παθοφυσιολογία του ΣΔΚ επιδρώντας στον έλεγχο της όρεξης, στο σωματικό βάρος και τη σύνθεση του σώματος, στην κατανάλωση ενέργειας και στη λειτουργία του παγκρέατος.(43) Μια μελέτη, έδειξε ότι η υπερλεπτιναμία σε κύηση <16 εβδομάδων, ήταν προγνωστική για αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔΚ αργότερα στην κύηση και ότι αύξηση της συγκέντρωσης λεπτίνης κατά 10 ng/mL αύξανε κατά 20% τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΔΚ, ανεξάρτητα από τα επίπεδα λίπους της μητέρας πριν από την κύηση και από άλλους παράγοντες.(44)

Η αδιπνεκτίνη φαίνεται να μπορεί να βελτιώσει το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης μέσω αύξησης της φωσφορυλίωσης των υποδοχέων ινσουλίνης στο σκελετικό μυ και της καταστολή του TNF-α ενώ μπορεί να ενισχύσει την έκκριση

ινσουλίνης διεγείροντας τόσο την έκφραση του γονιδίου της ινσουλίνης όσο και την εξωκυττάρωση των κοκκίων ινσουλίνης.(45) Επιπλέον, λειτουργεί μειώνοντας την ηπατική παραγωγή γλυκόζης μέσω της AMPK.(46) Η αδιπονεκτίνη μπορεί να ενεργοποιήσει τους υποδοχείς PPAR- α , οδηγώντας σε αυξημένη οξείδωση λιπαρών οξέων, και μείωση της έκτοπης αποθήκευσης λίπους μέσω αναστολής της λιπόλυσης στον λιπώδη ιστό, αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία στην ινσουλίνη.(47) Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι τα επίπεδα αδιπονεκτίνης είναι μειωμένα στην κύηση και στο ΣΔΚ.(48) Η μειωμένη έκκριση αδιπονεκτίνης ίσως να μπορεί να προβλέψει το ΣΔΚ αρκετούς μήνες πριν από τη διάγνωση, ανεξάρτητα από τον ΔΜΣ και την ευαισθησία στην ινσουλίνη.(49) Η μείωση των επιπέδων της αδιπονεκτίνης στο ΣΔΚ παραμένει και μετά τον τοκετό και μπορεί να συμβάλλει στην εξέλιξη σε ΣΔ2.(48) Πιθανολογείται ότι ο TNF- α και άλλοι προφλεγμονώδεις διαμεσολαβητές που εκκρίνονται στο ΣΔΚ, καταστέλλουν τη μεταγραφή της αδιπονεκτίνης, επιδεινώνοντας περαιτέρω τη χαμηλού βαθμού χρόνια φλεγμονή.(43)

Τα στοιχεία για τη βισφατίνη, τη RBP-4 (Retinol-binding Protein-4), τη ρεισιστίνη, τη λιποκαλίνη κ.α. είναι αντιφατικά και / ή λείπουν.

Η μάζα του μητρικού λίπους αυξάνεται καθ' όλη τη διάρκεια κύησης, με κύρια τη συσσώρευση λίπους στον κορμό.(50) Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, η αύξηση του λιπώδους ιστού είναι ζωτικής σημασίας για την υποστήριξη και παροχή θρεπτικών ουσιών στο έμβρυο. Ωστόσο, η αύξηση του λιπώδους ιστού σχετίζεται με αύξηση της φλεγμονής.(23) Η υπερτροφική ανάπτυξη λιπώδους ιστού και η συνακόλουθη φλεγμονή προκαλεί ινσουλινοαντίσταση στο λιπώδη ιστό στο τρίτο 3μηνο. Αυτή η κατάσταση επιδεινώνεται σε παχύσαρκες εγκυμονούσες και σε άτομα με ΣΔΚ. Η υπερτροφία των λιποκυττάρων στο ΣΔΚ συνοδεύεται από μειωμένη γονιδιακή έκφραση των ρυθμιστικών σηματοδοτών της ινσουλίνης, των μεταφορέων των λιπαρών οξέων και βασικών παραγόντων μεταγραφής, όπως οι PPAR.(51)

1.4 Κριτήρια Διάγνωσης Σακχαρώδους Διαβήτη Κύησης

Έχουν προταθεί διάφορα κριτήρια διάγνωσης του ΣΔΚ.(52-54) **(Πίνακας 1.4)** Τα κριτήρια που έχουν υιοθετηθεί, μεταξύ άλλων, από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), από την Αμερικανική Διαβητολογική Εταιρεία (ADA), από την Αμερικανική Ένωση Κλινικής Ενδοκρινολογίας (AACE) από την Ελληνική Διαβητολογική Εταιρεία (ΕΔΕ) και από την Ελληνική Ενδοκρινολογική Εταιρεία είναι τα μόνα που στηρίζονται στο περιγεννητικό αποτέλεσμα. Προέρχονται από την πολυκεντρική μελέτη παρατήρησης Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes (HAPO)(10), στην οποία συμμετείχαν 25.306 έγκυες γυναίκες, μεταξύ 24^{ης}-32^{ης} εβδομάδας κύησης, οι οποίες υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ανοχής γλυκόζης (OGTT) με 75gr γλυκόζης. Συμπεριλήφθησαν όσες έγκυες παρουσίαζαν γλυκόζη νηστείας < 105 mg/dl και γλυκόζη 2ώρου < 200 mg/dl. Η μελέτη έδειξε ότι υπάρχει μία συνεχής, γραμμική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων μητρικής γλυκόζης κάτω από τα διαγνωστικά όρια του ΣΔΚ και του δυσμενούς περιγεννητικού αποτελέσματος (π.χ αύξηση σωματικού βάρους νεογνού > 90η ΕΘ, αύξηση επιπέδων c-πεπτιδίου στον

ομφάλιο λώρο, αύξηση ποσοστών καισαρικής τομής, νεογνικής υπογλυκαιμίας και μητρικής προεκλαμψίας).

Πίνακας 1.4. Κριτήρια διάγνωσης ΣΔΚ

ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΣΔΚ		
2 ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΣΔΚ		
WHO, ADA, AACE	1 βήμα: Δοκιμασία ανοχής γλυκόζης 2 ωρών με 75 γρ γλυκόζης	
ACOG	2 βήματα: Δοκιμασία ανοχής γλυκόζης 1 ωρών με 50 γρ γλυκόζης. Αν (+) ακολουθεί δοκιμασία ανοχής γλυκόζης 3 ωρών με 100 γρ γλυκόζης	
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΣΔΚ ΣΤΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΟΧΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ		
Δοκιμασία ανοχής γλυκόζης	2 ωρών με 75 γρ γλυκόζης*	3 ωρών με 100 γρ γλυκόζης+
Γλυκόζη πλάσματος νηστείας	≥ 92 mg/dL	≥ 95 mg/dL
Γλυκόζη πλάσματος 1 ώρα μετά τη λήψη γλυκόζης per os	≥ 180 mg/dL	≥ 180 mg/dL
Γλυκόζη πλάσματος 2 ώρες μετά τη λήψη γλυκόζης per os	≥ 153 mg/dL	≥ 155 mg/dL
Γλυκόζη πλάσματος 3 ώρες μετά τη λήψη γλυκόζης per os		≥ 140 mg/dL
*Αν ≥ 1 τιμή γλυκόζης είναι ίση ή μεγαλύτερη από τα αναφερόμενα όρια, διαγιγνώσκεται ΣΔΚ Αν ≥ 2 ή 1 τιμές γλυκόζης είναι ίσες ή μεγαλύτερες από τα αναφερόμενα όρια, διαγιγνώσκεται ΣΔΚ		

ADA: American Diabetes Association, AACE: American Association of Clinical Endocrinologist, ACOG: American College of Obstetrics and Gynecology

Τα νέα κριτήρια διάγνωσης του ΣΔΚ, που βασίστηκαν στα αποτελέσματα της μελέτης HAPO, προήρθαν από διαδικασία συναίνεσης κατόπιν υπολογισμού ενός σχετικού κινδύνου, τουλάχιστον 1.75, για τα διάφορα νεογνικά και μητρικά δυσμενή καταληκτικά σημεία, σε σχέση με τα μέσα επίπεδα γλυκόζης που εμφάνισαν οι έγκυες της μελέτης. Τα νέα κριτήρια φαίνονται αναλυτικά στον **Πίνακα 1.5**.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.5. Δοκιμασία ανοχής γλυκόζης μεταξύ 24^{ης}-28^{ης} εβδομάδας κύησης και διαγνωστικά κριτήρια ΣΔΚ

α) Λήψη 75 γρ. γλυκόζης από του στόματος

β) Μέτρηση γλυκόζης πλάσματος σε χρόνους 0, 60 και 120 λεπτά μετά τη λήψη γλυκόζης

γ) Όταν έστω και μία τιμή είναι ίση ή μεγαλύτερη από τα κατωτέρω αναφερόμενα όρια, διαγιγνώσκεται ΣΔΚ

Γλυκόζη νηστείας (0')	92 mg/dl
Γλυκόζη 60'	180 mg/dl
Γλυκόζη 120'	153 mg/dl

δ) Η δοκιμασία πρέπει να γίνεται το πρωί, μετά από τουλάχιστον 8ωρη νηστεία

ε) Η εξεταζόμενη πρέπει τουλάχιστον κατά τις 3 προηγούμενες ημέρες να μην υποβάλλεται σε διαιτητικό περιορισμό, σε ότι αφορά στους υδατάνθρακες (λήψη > 150gr/ ημέρα), και να μην περιορίζει τη φυσική της δραστηριότητα

Πρέπει να σημειωθεί ότι η ADA, στις συστάσεις του 2021(6), αποδέχεται εκτός από τα IADPSG κριτήρια, που χαρακτηρίζονται ως «στρατηγική ενός βήματος» (one-step strategy), και τα παλαιότερα, προ της HAPO, εφαρμοζόμενα κριτήρια ως «στρατηγική δύο βημάτων» (two-step strategy), που συνεχίζουν να προτείνονται από την Αμερικανική Μαιευτική Εταιρεία, American College of Obstetricians and Gynecologists(ACOG) και από το National Institutes of Health (NIH). Παρ' όλα αυτά η ADA επισημαίνει ότι, όπως έδειξαν πρόσφατες μελέτες, η «διεθνής υιοθέτηση των νέων IADPSG κριτηρίων (Κίνα, Ισπανία) συσχετίστηκαν με καλύτερο περιγεννητικό αποτέλεσμα, που με τη σειρά του οδήγησε σε μείωση του οικονομικού κόστους, παρά την υπερτριπλάσια αύξηση της επίπτωσης του ΣΔΚ, αύξηση την οποία επέφερε η υιοθέτηση των IADPSG κριτηρίων.

Προτεινόμενη στρατηγική για τη διάγνωση της υπεργλυκαιμίας στην κύηση (IADPSG)

Κατά την πρώτη επίσκεψη κάθε εγκύου πρέπει να γίνεται μέτρηση γλυκόζης νηστείας και γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c). Αν διαπιστωθεί επίσημος διαβήτης, δηλαδή γλυκόζη > 126 mg/dl ή HbA1c > 6.4%, πρέπει να αντιμετωπίζεται όπως επί προϋπάρχοντος ΣΔ. Μεταξύ 24^{ης}-28^{ης} (και μέχρι και 32^{ης}) εβδομάδας κύησης πρέπει να πραγματοποιείται δοκιμασία ανοχής γλυκόζης. (Πίνακας 1.5)

1.5 Η σημασία της διάγνωσης και της θεραπευτικής αντιμετώπισης γυναικών με ΣΔΚ

Στη διεθνή βιβλιογραφία αλλά και στις οδηγίες των διεθνών οργανισμών υπήρξε σημαντική διχογνωμία σχετικά με την ανάγκη διάγνωσης του ΣΔΚ, και κυρίως με την αξία των αποτελεσμάτων της θεραπευτικής παρέμβασης.

Ένας από τους σημαντικότερους λόγους ήταν η απουσία μεγάλων, προοπτικών, τυχαιοποιημένων κλινικών μελετών που να δείχνουν, με στοιχεία, τα οφέλη της θεραπευτικής παρέμβασης. Η έλλειψη αυτή καλύφθηκε από δύο μεγάλες, πολυκεντρικές μελέτες. Στην πρώτη (55), από την Αυστραλία, 1000 έγκυες γυναίκες, μεταξύ 24-32 εβδομάδων κύησης, τυχαιοποιήθηκαν σε δύο ομάδες. Στη μία ομάδα έγινε συστηματική θεραπευτική αντιμετώπιση του ΣΔΚ (καθημερινές μετρήσεις γλυκόζης αίματος, διαιτητικές οδηγίες και χρήση ινσουλίνης, όταν οι γλυκαιμικοί στόχοι δεν επιτυγχάνονταν μόνο με τη διαιτητική αγωγή), ενώ στην άλλη ομάδα δε γνωστοποιήθηκε η διάγνωση του ΣΔΚ και ακολουθήθηκε η συνήθης μαιευτική παρακολούθηση. Τα νεογνά της ομάδας παρέμβασης παρουσίασαν σημαντικά μικρότερα ποσοστά σοβαρών, νεογνικών επιπλοκών (συνδυασμός νεογνικών θανάτων, δυστοκίας των ώμων, καταγμάτων οστών και μαιευτικής παράλυσης) σε σύγκριση με την ομάδα που έλαβε τη συνήθη μαιευτική φροντίδα (1% έναντι 4% αντίστοιχα). Επίσης τα ποσοστά μακροσωμίας στην ομάδα παρέμβασης ήταν σημαντικά μικρότερα (10% έναντι 21%). Τα ποσοστά καισαρικής τομής ήταν τα ίδια και στις δύο ομάδες. Τρεις μήνες μετά τον τοκετό οι γυναίκες της ομάδας παρέμβασης παρουσίασαν σημαντικά μικρότερο βαθμό κατάθλιψης και καλύτερη ποιότητα ζωής σε σύγκριση με την ομάδα της μη παρέμβασης.

Στη δεύτερη μελέτη (56), από τις ΗΠΑ, έγινε παρόμοια τυχαιοποίηση σε δυο ομάδες, ομάδα παρέμβασης και ομάδα ελέγχου. Η σημαντική διαφορά από την προηγούμενη μελέτη ήταν ότι όλες οι 958 συμμετέχουσες έγκυες παρουσίαζαν ήπιο ΣΔΚ. Η διάγνωση στηρίχτηκε στα κριτήρια της ADA, αλλά η γλυκόζη νηστείας ήταν μικρότερη του 95 mg/dl. Παρότι δεν υπήρξε διαφορά στο πρωτογενές καταληκτικό αποτέλεσμα (συνδυασμός νεογνικών θανάτων και επιπλοκών, όπως η υπογλυκαιμία, η υπερχολερυθριναιμία, ο νεογνικός τραυματισμός), προφανώς λόγω της ηπιότητας του ΣΔΚ, παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση σε προκαθορισμένα δευτερογενή καταληκτικά σημεία στην ομάδα παρέμβασης. Συγκεκριμένα σημειώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα ποσοστά της μακροσωμίας (5.9% vs 14.3%), της καισαρικής τομής (26,9% και 33.8%), της δυστοκίας των ώμων (1.5% vs 5.4%), της μέσης τιμής του νεογνικού σωματικού λίπους (427gr vs 464 gr), καθώς και στα ποσοστά μητρικής προεκλαμψίας και υπέρτασης (8.6% vs 13.6%) έναντι της ομάδας μη παρέμβασης, αντίστοιχα.

Η US Preventive Services Task Force τροποποίησε τις προηγούμενες συστάσεις της (2008) και προτείνει πλέον, «την αναγκαιότητα ανίχνευσης του ΣΔΚ, επειδή η θεραπευτική του αντιμετώπιση μειώνει σημαντικά τα ποσοστά προεκλαμψίας, εμβρυϊκής μακροσωμίας και της δυστοκίας των ώμων».(57)

2. Μεταβονομική (Metabonomics)

2.1 METABONOMΙΚΗ (METABONOMICS)

Η μεταβονομική είναι η μελέτη των πολυπαραμετρικών μεταβολικών αποκρίσεων ενός συγκεκριμένου ζωντανού οργανισμού σε παθογόνα ερεθίσματα ή σε γενετική τροποποίηση. Η λέξη προέρχεται από την ελληνική «μεταβολή» και «νόμος», δηλαδή το σύνολο των κανόνων.(58)

Η Βιολογία Συστημάτων, με την αποκωδικοποίηση του ανθρώπινου γονιδιώματος, εισήλθε στην εποχή των -omics. Η γενομική (genomics), η μεταγραφική (transcriptomics), η πρωτεομική (proteomics) και η μεταβονομική (metabonomics) παρέχουν σημαντικές πληροφορίες, τόσο για τις φυσιολογικές λειτουργίες των οργανισμών όσο και για παθολογικές καταστάσεις.

Οι οργανισμοί αντιδρούν συχνά με πολύπλοκους και απρόβλεπτους τρόπους σε ερεθίσματα που προκαλούν ασθένεια ή τραύμα. Η μεταβονομική χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει «την ποσοτική μέτρηση της δυναμικής πολυπαραμετρικής μεταβολικής απόκρισης ενός κυττάρου ή οργανισμού σε παθοφυσιολογικά ερεθίσματα ή γενετικές τροποποιήσεις»(59, 60)

Η ιδέα ότι αλλαγές σε ιστούς και βιολογικά υγρά είναι ενδεικτικά της ασθένειας πηγαίνει πολύ πίσω χρονικά, τουλάχιστον στην αρχαία Ελλάδα. Διαγνωστικά «διαγράμματα ούρων» χρησιμοποιήθηκαν ευρέως από το μεσαίωνα και μετά. Αυτά τα «διαγράμματα» συσχέτιζαν το χρώμα, την οσμή και τις γεύσεις των ούρων με διάφορες ιατρικές καταστάσεις. Αυτά τα χαρακτηριστικά είναι, μεταβολικής προέλευσης. Στα νεότερα χρόνια, η ιδέα ότι οι οργανισμοί μπορεί να έχουν ένα μεταβολικό φαινότυπο, που αντικατοπτρίζεται στη σύνθεση των βιολογικών τους υγρών, εκφράστηκε από τον Roger Williams στα τέλη της δεκαετίας του 1940, ο οποίος χρησιμοποίησε χρωματογραφία χάρτου και πρότεινε χαρακτηριστικά μεταβολικά μοτίβα στα ούρα και στο σάλιο.(61) Την ίδια δεκαετία (1940) ανακαλύφθηκε η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), η

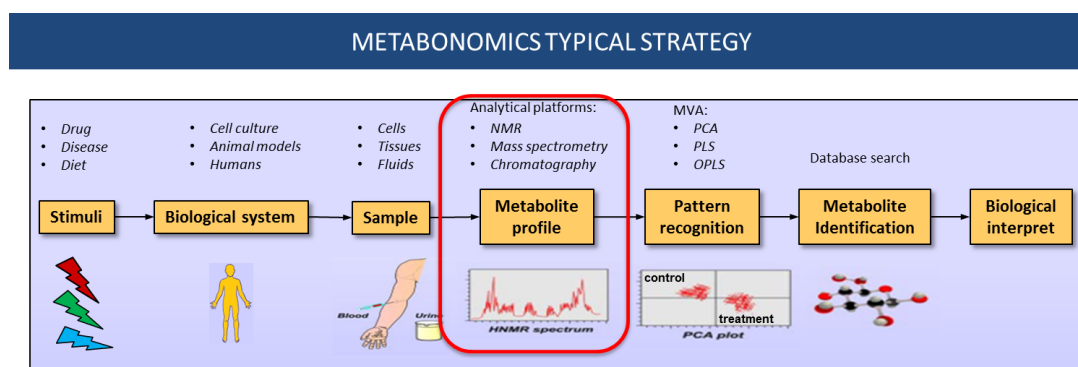
οποία εξελίχθηκε ταχέως. Ο όρος «μεταβολικό προφίλ» εισήχθη από τους Horning, et al. το 1971 οι οποίοι, χρησιμοποιώντας την αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (GC-MS), ταυτοποίησαν και μέτρησαν ενώσεις που υπάρχουν σε ανθρώπινα ούρα και εκχυλίσματα ιστών.(62) Η ομάδα Horning, μαζί με αυτή των Linus Pauling και Arthur B. Robinson οδήγησαν στην ανάπτυξη μεθόδων GC-MS για την παρακολούθηση των μεταβολιτών που υπήρχαν στα ούρα μέχρι τη δεκαετία του 1970.(63) Το 1974, οι Seeley et al. έδειξαν τη χρησιμότητα της NMR για την ανίχνευση μεταβολιτών σε δείγματα άθικτων ιστών.(64) Το 1984, ο Nicholson έδειξε ότι η φασματοσκοπία ^1H NMR του πλάσματος θα μπορούσε ενδεχομένως να χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση του σακχαρώδη διαβήτη και αργότερα πρωτοστάτησε στην εφαρμογή μεθόδων αναγνώρισης προτύπων σε φασματοσκοπικά δεδομένα NMR.(65, 66) Καθώς η ευαισθησία της έχει βελτιωθεί, η φασματοσκοπία NMR συνεχίζει να είναι ένα κορυφαίο αναλυτικό εργαλείο για τη διερεύνηση του μεταβολισμού.(67)

Με τη μέτρηση των προϊόντων του μεταβολισμού που βρίσκονται στα βιολογικά υγρά και τους ιστούς και με τη χρήση μαθηματικών μοντέλων που εντοπίζουν τις αλλαγές, η μεταβονομική (metabonomics) προσφέρει νέες πληροφορίες των επιπτώσεων της διατροφής, των φαρμακευτικών ουσιών και των ασθενειών στον οργανισμό.

Το γονιδίωμα (genomics) υποδεικνύει τι μπορεί να συμβεί, η μεταγραφική (transcriptomics) μπορεί να δώσει πληροφορίες για το τι φαίνεται να συμβαίνει, η πρωτεομική (proteomics) για το τι το κάνει να συμβεί και η μεταβονομική (metabonomics) μπορεί να πει τι έχει συμβεί και τι συμβαίνει.

Η Μεταβονομική (Metabonomics), και το σχετικό πεδίο της μεταβολομικής (Metabolomics), χρησιμοποιώντας σύγχρονες τεχνικές για την ανάλυση δειγμάτων, μπορούν να εξετάσουν τις αλλαγές σε εκατοντάδες ή χιλιάδες μεταβολίτες σε έναν άθικτο ιστό ή βιολογικό υγρό.(68)

Ο σκοπός της Μεταβονομικής ανάλυσης είναι η κατανόηση των συστηματικών αλλαγών, στη διάρκεια του χρόνου, σε σύνθετα πολυκυτταρικά συστήματα. (Εικ. 2.1)



Εικ. 2.1. Τυπική στρατηγική της Μεταβονομικής

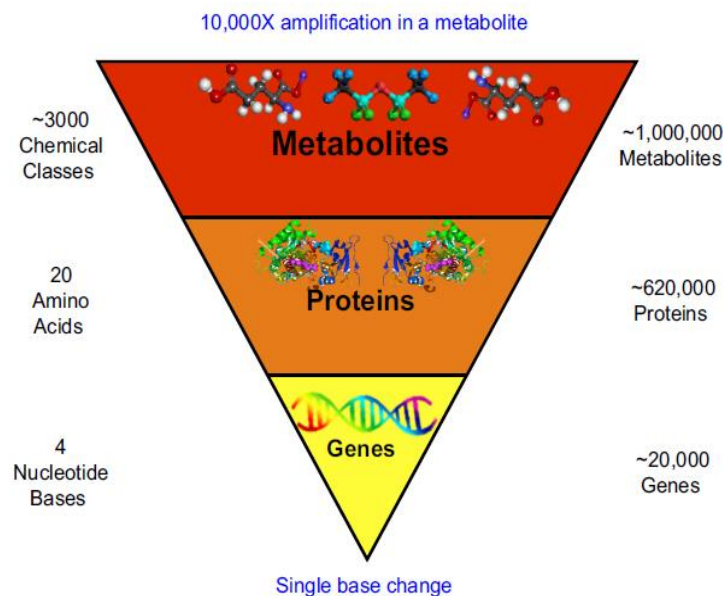
Η Μεταβολομική επιδιώκει μια αναλυτική περιγραφή σύνθετων βιολογικών δειγμάτων, και στοχεύει στο χαρακτηρισμό, την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση όλων των μικρών μορίων μέσα σε ένα τέτοιο δείγμα. Στην πράξη, οι δύο όροι χρησιμοποιούνται συχνά εναλλακτικά, και οι αναλυτικές διαδικασίες και τα μαθηματικά μοντέλα που ακολουθούν είναι ίδια.

Ως μεταβολικό προφίλ (metabolomics) ορίζεται το σύνολο των μεταβολιτών ή χημικών ουσιών μικρού μοριακού βάρους, που βρίσκονται σε ένα οργανίδιο, κύτταρο, όργανο, βιολογικό υλικό ή οργανισμό. Μεταβολίτης είναι οποιοδήποτε μικρό μόριο (με μοριακή μάζα <1.5 kDa) που μπορεί να ανιχνευθεί σε οποιονδήποτε οργανισμό.(69)

Οι μεταβολίτες μπορεί να είναι ενδογενείς ουσίες όπως λιπίδια, αμινοξέα, ολιγοπεπτίδια, νουκλεϊκά οξέα, σάκχαρα ή οργανικά οξέα που παράγονται συνήθως από διεργασίες ενδογενούς καταβολισμού ή αναβολισμού. Οι μεταβολίτες επίσης, μπορεί να είναι εξωγενείς ουσίες όπως φάρμακα, τοξίνες, στοιχεία διατροφής, κ.α. και είναι δυνατόν να προκαλέσουν διαταραχές στις συγκεντρώσεις ενδογενών μεταβολιτών, οι οποίοι συμμετέχουν σε διάφορες κυτταρικές μεταβολικές οδούς. Τα κύτταρα αποκρίνονται σε αυτές τις αλλαγές ρυθμίζοντας το εξωκυτταρικό τους περιβάλλον για να διατηρήσουν την ομοιόσταση.(59)

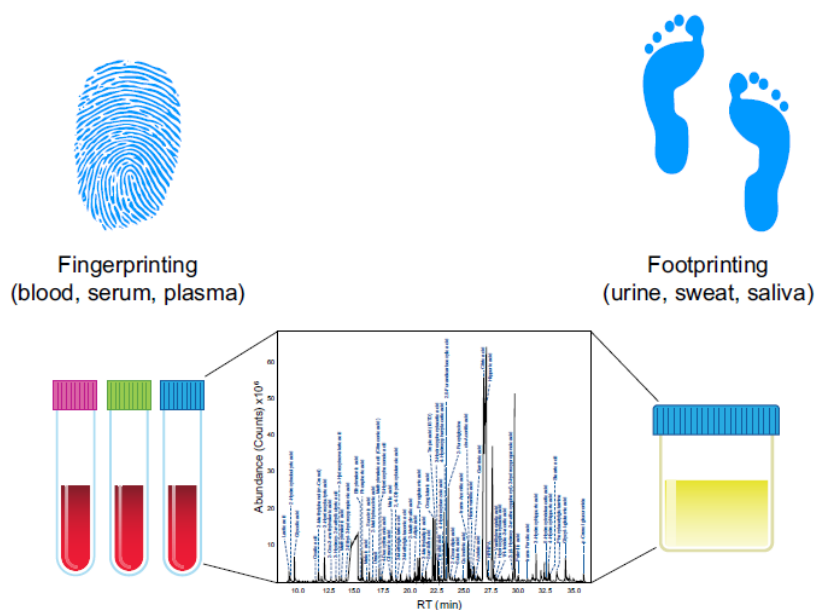
Σημαντικό στοιχείο είναι ότι ο μεταβολισμός ενός ατόμου δεν είναι αμετάβλητος αλλά είναι εξαιρετικά ευαίσθητος σε πολλές εσωτερικές και εξωτερικές μεταβλητές, όπως η ηλικία, το φύλο, η διατροφή, η γεωγραφική θέση διαμονής, το περιβάλλον, η ώρα της ημέρας, ακόμη και η γενετική του ατόμου.

Η στενή σύνδεση μεταξύ μεταβολιτών και γονιδίων έχει οδηγήσει ορισμένους να αποκαλούν τους μεταβολίτες «τα καναρίνια του γονιδιώματος». Αυτό συμβαίνει επειδή μια αλλαγή βάσης DNA σε ένα δεδομένο γονίδιο μπορεί να οδηγήσει σε 10.000πλάσια αλλαγή στα επίπεδα ενδογενών μεταβολιτών. (Εικ. 2.2) (70)



Εικ. 2.2. Σχηματική απεικόνιση του τρόπου με τον οποίο τα γονίδια, οι πρωτεΐνες και οι μεταβολίτες συνδέονται μεταξύ τους

Η μεταβολομική έχει εφαρμογή σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών υλικών, συμπεριλαμβανομένων κυττάρων, ιστών, οργάνων, βιολογικών υγρών ή ακόμη και ολόκληρων οργανισμών. Όταν η μεταβολομική εφαρμόζεται στα κύτταρα ή σε κυτταρικές καλλιέργειες, είναι ιδανική για τη διερεύνηση της φυσιολογίας και των κυτταρικών διεργασιών.(71) Όταν αναλύονται κύτταρα ή αίμα, η μέθοδος ονομάζεται συχνά μεταβολικό «δακτυλικό αποτύπωμα» (fingerprinting).(72) Όταν αναλύονται κυτταρικά υλικά ή βιολογικά εκκρίματα (όπως ούρα, ιδρώτας, σάλιο), η μέθοδος ονομάζεται μεταβολικό «αποτύπωμα» (footprinting). (**Εικ.2.3**) (73)

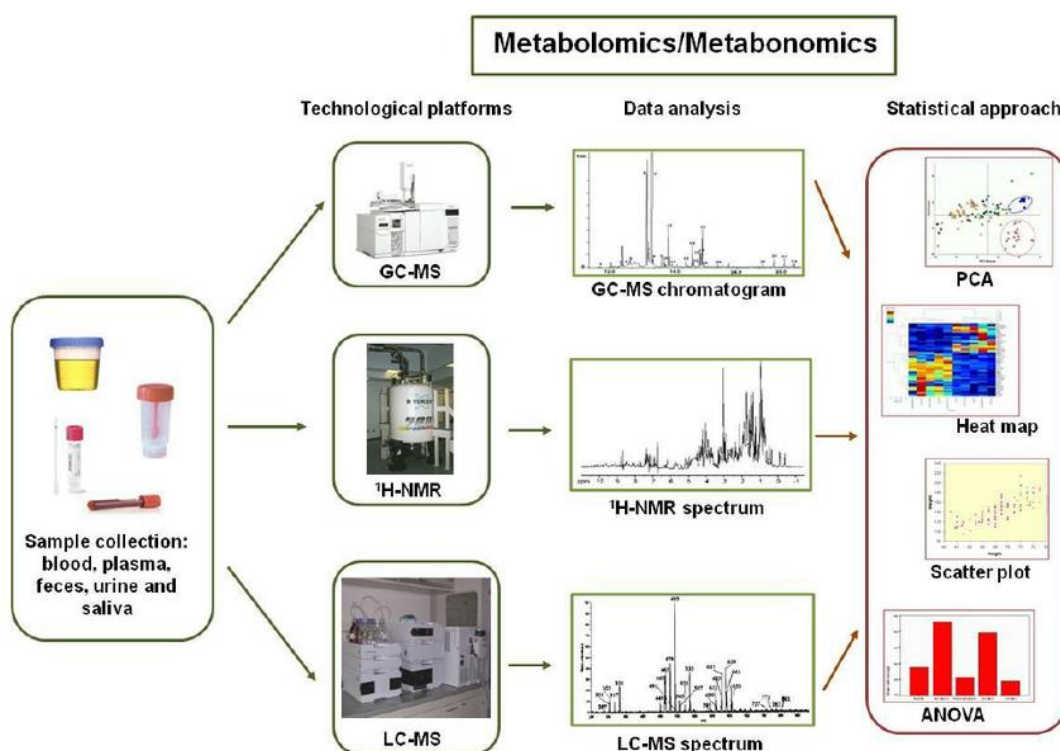


Εικ.2.3 Μεταβολικό «δακτυλικό αποτύπωμα» (fingerprinting) και μεταβολικό «αποτύπωμα» (footprinting) [Προσαρμοσμένο από (70)]

Μια μεταβολομική μελέτη αποτελείται από πολλά στάδια. Το πρώτο στάδιο ξεκινά με τη διατύπωση της υπόθεσης (βιολογική και/ή κλινική) και οδηγεί στον πειραματικό σχεδιασμό, την επιλογή των μοντέλων και των δειγμάτων που θα συλλεχθούν και θα αναλυθούν (βιολογικά υγρά, βιοψίες, κύτταρα). Το δεύτερο σημαντικό στάδιο είναι η ανάλυση των δειγμάτων και η μέτρηση των μεταβολιτών που επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας τεχνολογικές πλατφόρμες υψηλής απόδοσης. Μετά τη μέτρηση και την πρώτη επεξεργασία των δεδομένων, απαιτούνται στατιστικές αναλύσεις για τη συλλογή των πιο σχετικών πληροφοριών ως προς τη βιολογική ερμηνεία των αποτελεσμάτων και τον εντοπισμό μεταβολιτών ή προτύπων που θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως βιοδείκτες της φυσιολογικής ή παθολογικής κατάστασης που μας ενδιαφέρει. Ανάλογα με τη δομή των δεδομένων, συνήθως απαιτείται μείωση του μεγέθους των δεδομένων, κυρίως μέσω πολυπαραγοντικής στατιστικής ανάλυσης, για να αποφευχθούν (όσο είναι δυνατόν) οι συγχυτικοί παράγοντες και να μεγιστοποιηθεί η απόκριση. Τέλος, τα χαρακτηριστικά

μεταβολικά προφίλ που έχουν εντοπιστεί μπορούν να συσχετιστούν με βιοχημικές οδούς και να ερμηνευθούν υπό το φως της αρχικής υπόθεσης.(74)

Οι ερευνητές της μεταβιομικής χρησιμοποιούν έναν συνδυασμό αναλυτικών μεθόδων και τεχνικών, για διαχωρισμό και ανίχνευση των διαφόρων κατηγοριών χημικών ουσιών που βρίσκονται στο μεταβολικό προφίλ, όπως: φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και φασματομετρία μάζας (MS) σε συνδυασμό με αέρια χρωματογραφία (GC), υγρή χρωματογραφία (LC) ή ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς (CE) (LC-MS, CE-MS, GC-MS) ή συστήματα LC-MS/NMR. (Εικ.2.4)(75)



Εικ.2.4. Αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται στη Μεταβιομική. Δείγματα, όπως κόπρανα, ούρα, αίμα, πλάσμα και σάλιο, μπορούν να μελετηθούν με τη χρήση μεταβολομικών μεθόδων για την ανίχνευση μεταβολιτών. Τα προφίλ ¹H-NMR και MS διερευνώνται από πολυπαραγοντικές στατιστικές αναλύσεις (π.χ. PCA, Heat map, γραφικές παραστάσεις και ANOVA) για να περιγράψουν τις οδούς του μεταβολισμού και να συσχετίσουν μεταβολές σε αυτά τα μονοπάτια με φαινοτύπους που σχετίζονται με ασθένειες. (76)

Και οι δύο μέθοδοι (NMR και MS) δίνουν πληροφορίες για ένα ευρύ φάσμα μεταβολιτών, σε μία μόνο μέτρηση, χωρίς να χρειάζεται προεπιλογή των μεταβολιτών που θα ανιχνευθούν. Επειδή η φασματοσκοπία NMR δεν καταστρέφει και δεν τροποποιεί το δείγμα, είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τη μελέτη των μεταβολιτών σε άθικτους ιστούς, όπως σε δείγματα βιοψίας, τα οποία μπορούν στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν σε περαιτέρω αναλύσεις.

Τα φάσματα των δειγμάτων από τους υπό μελέτη οργανισμούς (όπως εκείνοι με συγκεκριμένη ασθένεια) συγκρίνονται με δείγματα αναφοράς (controls), έτσι ώστε

να μπορούν να προσδιοριστούν τα φασματικά χαρακτηριστικά που είναι αποτέλεσμα της νόσου.

Οι μελέτες του μεταβολικού προφίλ μπορούν να γίνουν με στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση και μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση. Η επιλογή της ανάλυσης βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στις ερωτήσεις που τίθενται για τη διενέργεια των μετρήσεων και στις δυνατότητες, σε όργανα μέτρησης, του εργαστηρίου που κάνει τη μελέτη.

Η στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση (Targeted Metabolite Profiling) επικεντρώνεται στην εντόπιση και τον ποσοτικό προσδιορισμό μιας μικρής υποομάδας ενώσεων εντός του συνόλου των μεταβολιτών.(77,78) Η στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση είναι ιδανική για τον έλεγχο υποθέσεων και ανίχνευση βιοδεικτών και χρησιμοποιείται ευρέως σε κλινικές και ιατρικές εφαρμογές.

Η μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση (Untargeted Metabolite Profiling) επικεντρώνεται στο χαρακτηρισμό της συνολικής εικόνας του υπό μελέτη μεταβολικού προφίλ. Κατά γενικό κανόνα, δεν είναι ιδιαίτερα ποσοτική, ωστόσο είναι ιδανική για την ανακάλυψη μεταβολιτών και τη δημιουργία υποθέσεων.(79,80) Στη μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση το σύνολο των δεδομένων που λαμβάνεται από τις διάφορες αναλυτικές διαδικασίες επεξεργάζεται με τεχνικές πολυπαραγοντικής ανάλυσης δεδομένων (Multivariate Data Analysis, MDA) και κυρίως χρησιμοποιούνται 1) η μη εποπτευόμενη τεχνική ανάλυσης κυρίων συνιστωσών (PCA- Principal Component Analysis) και 2) η εποπτευόμενη διαχωριστική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA- Partial Least Squares Discriminant Analysis). Αυτές οι μέθοδοι στοχεύουν στη διάκριση των υπό μελέτη ομάδων και στον εντοπισμό των μεταβολιτών που συμβάλουν στη διάκριση αυτή.

Στη μεταβολομική υπάρχει ένα ισοδύναμο του Προγράμματος Ανθρώπινου Γονιδιώματος, το Human Metabolome Project, στον Καναδά. Προσπαθεί να παρέχει μία βάση δεδομένων όλων των ανθρώπινων μεταβολιτών. Μέχρι στιγμής, έχει συλλέξει μερικές χιλιάδες από αυτές τις ενώσεις και έχει δημιουργήσει μια συνοδευτική βάση με φασματοσκοπικά δεδομένα. Αυτή η βάση δεδομένων είναι δημόσια διαθέσιμη για μεταβολομική έρευνα. Ομοίως, η LIPID Metabolites And Pathways Strategy (LIPID MAPS), στις Ηνωμένες Πολιτείες προσπαθεί να χαρακτηρίσει όλα τα λιπίδια και επί του παρόντος διαθέτει μια βάση δεδομένων με περισσότερες από 10.000 χαρακτηρισμένες ουσίες.

Πολλοί μεταβολίτες έχουν συσχετισθεί με παθολογικές καταστάσεις όπως νεφρική νόσος, σακχαρώδης διαβήτης, στεφανιαία νόσος, ηπατική νόσος κ.α. καθώς και ως παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση νόσου ή ως δείκτες ανάρρωσης από μια ασθένεια.(67)

2.2 Μεταβολομική και Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης

Η πλέον ευρέως μετρούμενη ουσία για τη διάγνωση του σακχαρώδους διαβήτη είναι η γλυκόζη αίματος, αν και η αυξημένη γλυκόζη στο αίμα είναι περισσότερο σύμπτωμα παρά αιτία. Η θεραπεία του διαβήτη, από τη στιγμή που θα τεθεί η διάγνωσή του, απαιτεί συνήθως δια βίου φαρμακευτική αγωγή και συνεχή παρακολούθηση. Η πρόβλεψη της εμφάνισης διαβήτη πριν την επίσημη ανάπτυξή του και η κατανόηση των αιτιών και των παθοφυσιολογικών διεργασιών που τον προκαλούν παρέχει τη δυνατότητα είτε να αποτρέψουμε την εμφάνισή του είτε να τον αντιμετωπίσουμε με απλές αλλαγές στη διατροφή ή στον τρόπο ζωής. Το ίδιο ισχύει και για τον ΣΔΚ του οποίου η αιτιολογία και η παθογένεση δεν είναι πλήρως κατανοητή και παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με το ΣΔ2. Η πλειονότητα των γυναικών με ΣΔΚ φαίνεται να έχουν δυσλειτουργία β-κυττάρων που συμβαίνει στο πλαίσιο της χρόνιας αντίστασης στην ινσουλίνη. Μέχρι σήμερα, έχουν ερευνηθεί μόνο μερικοί πιθανοί βιοχημικοί διαμεσολαβητές χρόνιας αντίστασης στην ινσουλίνη που σχετίζονται με το ΣΔΚ. Η ανίχνευση και μέτρηση ενός ή περισσότερων μορίων, με τις παραδοσιακές βιοχημικές μεθόδους, δεν κατάφερε να εντοπίσει τις σχετικές υποκείμενες μοριακές αλλαγές που οδηγούν στην εμφάνιση ΣΔΚ.

Η Μεταβολομική έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση των μεταβολικών προφίλ και τον εντοπισμό νέων βιοδεικτών που σχετίζονται με την αντίσταση στην ινσουλίνη και την εμφάνιση ΣΔ2. Οι μεταβολικές ομάδες που έχουν μελετηθεί περιλαμβάνουν μεταβολίτες υδατανθράκων (π.χ. γλυκόζη και φρουκτόζη), μεταβολίτες λιπιδίων (π.χ. φωσφολιπίδια, σφινγομυελίνες και τριγλυκερίδια) και μεταβολίτες αμινοξέων (αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας, αρωματικά αμινοξέα, γλυκίνη και γλουταμίνη).(81-84) Οι παθοφυσιολογικές αλλαγές που συμβαίνουν στο ΣΔ2 και το ΣΔΚ είναι, όπως αναφέρθηκε, παρόμοιες και η χρήση αυτής της νέας τεχνολογίας μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση της αιτιολογίας και της παθογένεσης του ΣΔΚ. Επιπλέον, η μεταβολομική μπορεί να αυξήσει την ικανότητά μας να αναγνωρίζουμε πρώιμους μεταβολικούς προγνωστικούς παράγοντες του ΣΔΚ, με σκοπό την έγκαιρη τροποποίησή τους προς αποφυγή εμφάνισης της νόσου.

Τα τελευταία χρόνια γίνεται μια μεγάλη προσπάθεια για την κατανόηση των μεταβολικών δρόμων που τελικά οδηγούν σε ΣΔΚ και μεγάλος αριθμός μελετών εστιάζουν σε αυτό χρησιμοποιώντας τη μεταβολομική.(85)

Στις μεταβολομικές αναλύσεις με NMR, τόσο σε εγκυμονούσες με ΣΔΚ όσο και σε φυσιολογικές γυναίκες, χρησιμοποιούνται βιολογικά υγρά της μητέρας (ορός, πλάσμα, ούρα), καθώς και βιολογικά υγρά που «μοιράζεται» η μητέρα με το έμβρυο (αμνιακό υγρό, αίμα ομφαλίου λώρου). Σε αυτά έχουν ανιχνευθεί διάφοροι μεταβολικοί βιοδείκτες, οι οποίοι έχουν σχετισθεί με την ανάπτυξη ΣΔΚ, όπως αμινοξέα (διακλαδισμένης αλυσίδας και αρωματικά), ακυλοκαρνιτίνες και φωσφολιπίδια που περιέχουν χολίνη, δηλαδή μεταβολίτες που είναι γνωστό ότι έχουν επίδραση στην έκκριση της ινσουλίνης και της γλυκαγόνης και που σχετίζονται με ινσουλινοαντίσταση.

Αρχικά η φασματοσκοπία NMR εφαρμόστηκε σε δείγματα αμνιακού υγρού στα οποία σε γυναίκες με ΣΔΚ, βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα γλυκόζης και μειωμένα επίπεδα αμινοξέων (γλουταμικό, γλυκίνη, προλίνη, σερίνη ,ταυρίνη), οργανικών

οξέων (μυρμηκικό), κρεατινίνης, γλυκεροφωσφοχολίνης. Σε δείγματα πλάσματος εγκύων με ΣΔΚ βρέθηκαν χαμηλά επίπεδα βεταΐνης και N-οξειδίου της τριμεθυλαμίνης (TMAO), ενώ σε δείγματα ούρων βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα κιτρικού, γλυκόζης, N-μεθυλονικοταμιδίου.(85)

Οι μεταβολομικές μελέτες που αφορούν στο ΣΔΚ, αναλύουν δείγματα γυναικών τόσο στα πρώιμα στάδια της κύησης, όσο και στα προχωρημένα στάδια αυτής καθώς και μετά τον τοκετό, προς διερεύνηση και πιθανή αποσαφήνιση των μεταβολικών οδών και διεργασιών που οδηγούν στο ΣΔΚ και ίσως στην πορεία του χρόνου στο ΣΔ2.

Καμία από τις κλασικές μεθόδους βιοχημείας βιολογικών υλικών δεν μπορεί να μελετήσει με ακρίβεια τις μεταβολικές αλλαγές, τόσο της φυσιολογικής κύησης όσο και της κύησης που επιπλέκεται με διαβήτη, καθώς η μονάδα μητέρας-εμβρύου υπόκειται καθημερινά σε μοναδικές μεταβολικές αλλαγές με την πρόοδο της ηλικίας της κύησης. Σε αυτό το αλληλένδετο και εξελισσόμενο σύστημα, οι νέες μέθοδοι και τεχνικές της μεταβολομικής φαίνεται να μπορούν να προσφέρουν πολλά, καθώς ο όγκος των δεδομένων αυξάνεται συνεχώς με την ελπίδα στο μέλλον να βρεθεί ένα σύνολο βιοδεικτών που θα αποτελούν το πρώιμο «δακτυλικό αποτύπωμα» της νόσου.

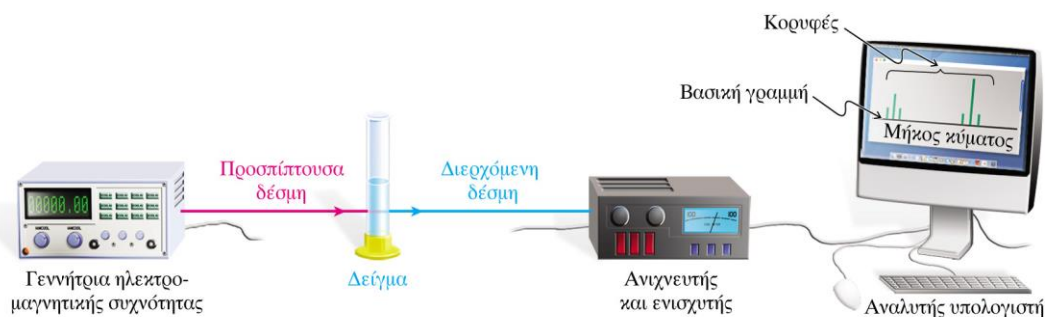
3. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)

Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR)

Φασματοσκοπία είναι το σύνολο των αναλυτικών τεχνικών με τις οποίες μελετάται η αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολία με την ύλη και οι οποίες παρέχουν πληροφορίες για τη δομή και τη συγκέντρωση των χημικών ενώσεων. (Εικ. 3.1)

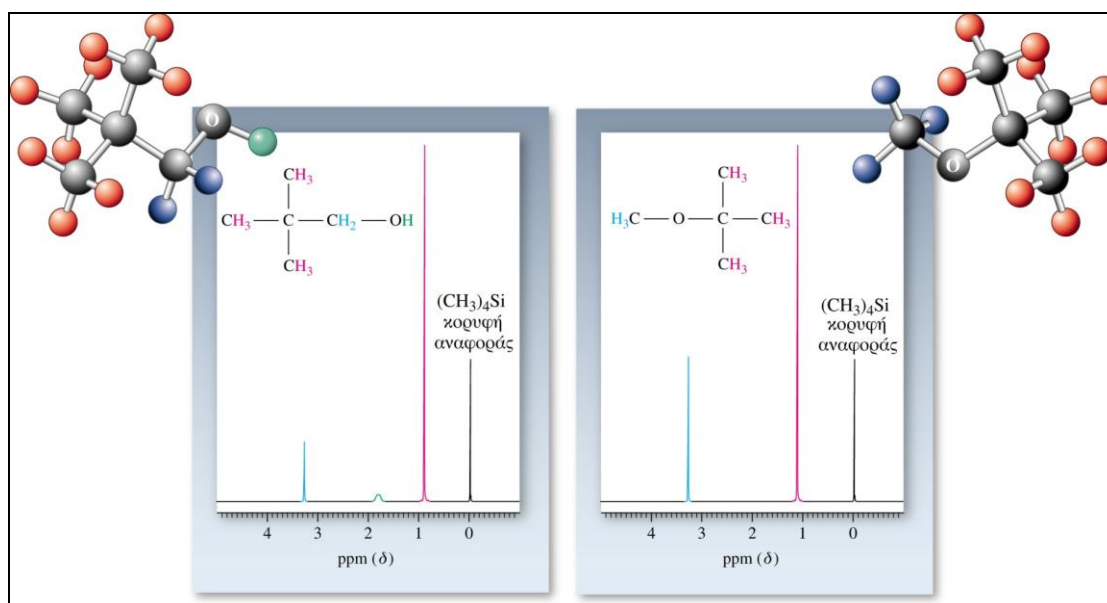
Αν και υπάρχουν πολλοί τύποι φασματοσκοπίας, στην Οργανική Χημεία και τη Χημεία των Βιομορίων χρησιμοποιούνται περισσότερο τέσσερις:

- (1) η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)
- (2) φασματομετρία μάζας (MS).
- (3) η φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (Vis-UV)
- (4) η φασματοσκοπία υπερύθρου (IR)



Εικ. 3.1. Γενικό διάγραμμα ενός φασματοφωτομέτρου. Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία περνά διαμέσου και αλληλεπιδρά με ένα δείγμα με απορρόφηση σε ορισμένες συχνότητες. Η προσπίπτουσα δέσμη μεταβάλλεται σε διερχόμενη και οι διαφορές ανιχνεύονται, ενισχύονται και επεξεργάζονται από υπολογιστή ώστε να προκύψει ένα φάσμα.

Ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) αποτελεί μία ευρέως χρησιμοποιούμενη φασματοσκοπική τεχνική των Metabonomics που βασίζεται στις μαγνητικές ιδιότητες του πυρήνα του ατόμου (π.χ. ^1H , ^{13}C ή ^{31}P). Είναι ένα φαινόμενο που παρατηρείται όταν πυρήνες ορισμένων ατόμων τοποθετούνται εντός ενός ομογενούς, στατικού μαγνητικού πεδίου και διεγείρονται από ένα δεύτερο ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο. Η συμπεριφορά ενός πυρήνα, που εμφανίζει το φαινόμενο NMR, σε ένα ισχυρό μαγνητικό πεδίο παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη δομή και τις χημικές ιδιότητες ενός μορίου. Λόγω της μεγάλης αφθονίας των πυρήνων πρωτονίου (^1H) στα βιομόρια, η φασματοσκοπία πρωτονίου (^1H -NMR) χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό για την ανάλυση βιολογικών υγρών, όπως πλάσμα αίματος, ούρα και εκχυλίσματα ιστών. Κάθε ξεχωριστό σήμα σε ένα ^1H -NMR φάσμα αντιστοιχεί σε μία συγκεκριμένη ένωση. (Εικ. 3.2)(86, 87)



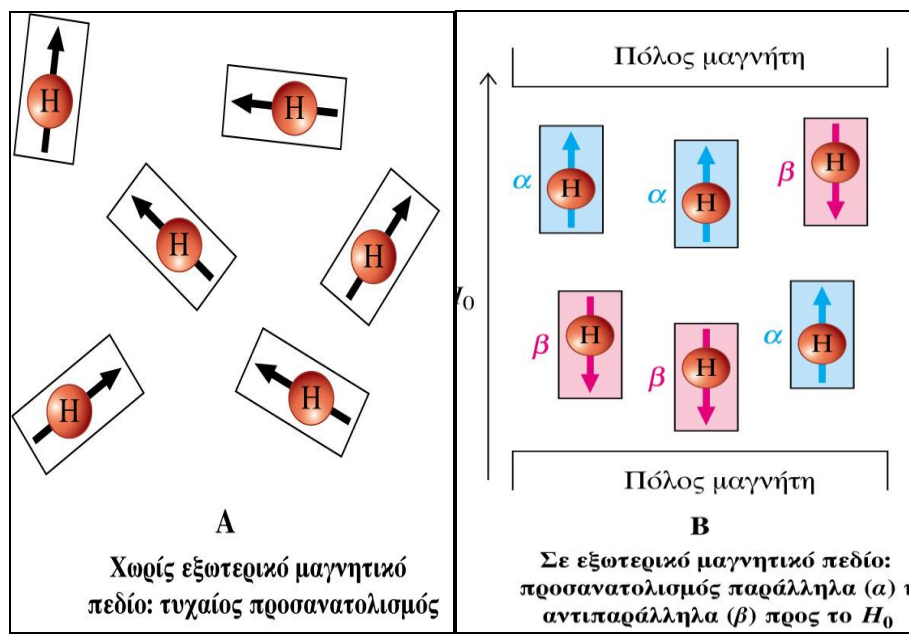
Εικ. 3.2. Δύο ισομερή, η 2,2-διμεθυλο-1-προπανόλη (στα αριστερά) και το 2-μεθοξυ-2-μεθυλοπροπάνιο (στα δεξιά). Ποιο είναι ποιο; Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού δίνει την απάντηση: Το πρώτο ισομερές έχει τρεις τύπους υδρογόνων (και δίνει τρία σήματα), το δεύτερο μόνο δύο

Οι σύγχρονες εξελίξεις στη φασματοσκοπία NMR, όπως η ανάπτυξη δισδιάστατων (2D) και πολυδιάστατων (multidimensional) τεχνικών, συνέβαλαν σημαντικά στην αποσαφήνιση της σύστασης των βιολογικών υγρών και της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών.(86)

3.1 Θεωρία του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

Οι πυρήνες όλων των στοιχείων είναι θετικά φορτισμένα σωματίδια και εξαιτίας της περιστροφής τους γύρω από τον εαυτό τους (ιδιοπεριστροφή, spin), συμπεριφέρονται ως μαγνητικά δίπολα και επάγουν μαγνητικά πεδία κάθετα στο επίπεδο περιστροφής. Εκτός μαγνητικού πεδίου οι πυρήνες, ως μαγνητικά δίπολα, προσανατολίζονται τυχαία στο χώρο (Εικ. 3.3A), όταν όμως βρεθούν μέσα σε ένα μαγνητικό πεδίο αποκτούν συγκεκριμένους προσανατολισμούς (Εικ. 3.3B).

Για πυρήνες με κβαντικό αριθμό spin $I=1/2$ (όπως πυρήνες H ή C) μόνο δύο προσανατολισμοί με διαφορετική ενέργεια είναι πιθανοί: *παράλληλος* (μικρότερη ενέργεια) και *αντιπαράλληλος* (μεγαλύτερη ενέργεια) προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο H_0 .(88-91)

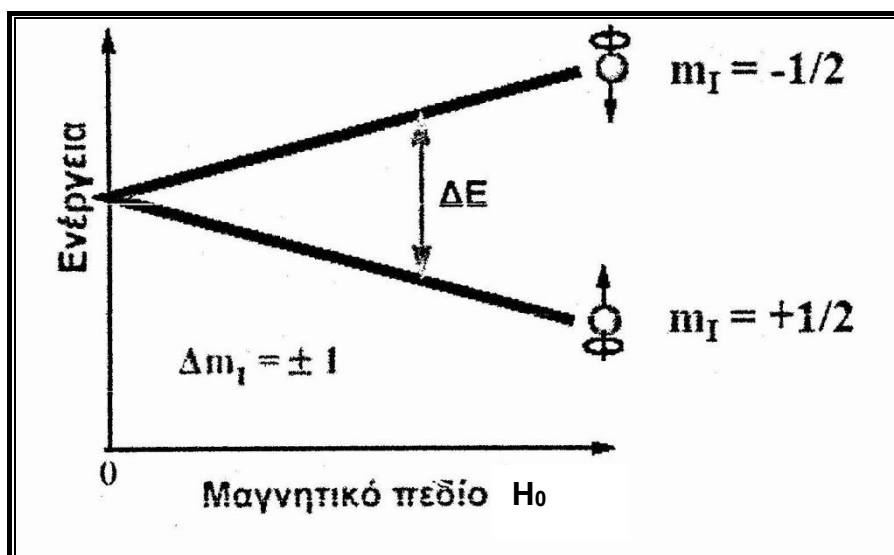


Εικ. 3.3. (A) Μεμονωμένα πρωτόνια (H) δρουν ως μικροσκοπικοί μαγνήτες. (B) Σε μαγνητικό πεδίο, H_0 , τα πυρηνικά spin προσανατολίζονται σχεδόν στον ίδιο βαθμό παράλληλα (α) ή αντιπαράλληλα (β) προς στο πεδίο

Αν οι προσανατολισμένοι πυρήνες ακτινοβοληθούν με ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία κατάλληλης συχνότητας, απορροφάται ενέργεια από τους πυρήνες που βρίσκονται σε κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας (παράλληλο spin προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο), οι οποίοι μεταβαίνουν σε κατάσταση υψηλότερης ενέργειας με αναστροφή του spin. Αφού έχει γίνει η αναστροφή του spin των πυρήνων, τότε οι πυρήνες έχουν «συντονιστεί» με την εφαρμοζόμενη ακτινοβολία (Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός). **(Εικ.3.4)**

Η συχνότητα που απαιτείται για το συντονισμό εξαρτάται:

- α) από την ισχύ του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου H_0
- β) από το είδος του πυρήνα.



Εικ. 3.4. Ενεργειακές στάθμες πυρήνα $^1\text{H}(I=1/2)$ σε μαγνητικό πεδίο H_0

Η διαφορά ενέργειας ΔE δίνεται από τη σχέση:

$$\Delta E = h\nu_0 = \mu H_0/I = \gamma h H_0 / 2\pi$$

όπου ισχύει για τη συχνότητα συντονισμού ν_0 :

$$\nu_0 = \gamma h H_0 / 2\pi \text{ (εξίσωση Larmor)} = \kappa H_0$$

Όπου ν_0 είναι η συχνότητα της μεταπρωτικής κινήσεως του πυρήνα (συχνότητα Larmor), H_0 η ισχύς του μαγνητικού πεδίου, μ η πυρηνική μαγνητική ροπή, γ ο γυρομαγνητικός λόγος του πυρήνα, ίσος με $\mu_2\pi/Ih$ και κ σταθερά ($\kappa = \gamma/2\pi$).

Επομένως, όταν το H_0 διατηρείται σταθερό, απαιτείται μία συγκεκριμένη συχνότητα για το συντονισμό ενός πυρήνα. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του γ , τόσο πιο μεγάλη είναι η συχνότητα συντονισμού και επομένως, τόσο πιο εύκολη είναι η παρατήρηση του συγκεκριμένου πυρήνα. (88-91)

Η πορεία αποδιέγερσης της μαγνήτισης, δηλαδή η επαναφορά στην αρχική κατάσταση ισορροπίας, η οποία ονομάζεται Free Induction Decay, FID (ελεύθερη επαγωγική απόσβεση), καταγράφεται και αποτελεί την πηγή πληροφορίας που περιέχει το φάσμα NMR.

Υπάρχουν 2 βασικές ομάδες πυρήνων:

α) Πυρήνες που έχουν άρτιο ατομικό (Z) και μαζικό (A) αριθμό (π.χ. ^{12}C , ^{16}O και ^{32}S), δεν παρουσιάζουν γωνιακή στροφορμή ($I=0$), δεν εκδηλώνουν μαγνητικές ιδιότητες και δε δίνουν φάσματα NMR.

β) Πυρήνες που έχουν περιττό μαζικό αριθμό (A) και περιττό ή άρτιο ατομικό αριθμό (Z) (π.χ. ^1H , ^{13}C , ^{19}F και ^{31}P), παρουσιάζουν αριθμούς spin που είναι περιττά ακέραια

πολλαπλάσια του $\frac{1}{2}$, δηλαδή $I = n(1/2)$, όπου $n = 1, 3, 5, 7, 9$. Οι πυρήνες με $I = 1/2$ εμφανίζουν συμμετρική σφαιρική κατανομή του φορτίου τους και παρουσιάζουν ενδιαφέρον στην φασματοσκοπία NMR (το 95% της φασματοσκοπίας NMR αφορά το ^1H και το ^{13}C) εκδηλώνοντας μαγνητικές ιδιότητες.

Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών και η ποσοτικοποίηση τους είναι δυνατή με βάση τις μετρήσεις από τα ακόλουθα:

α) Χημική μετατόπιση (δ scale σε ppm), που συνίσταται στην εξάρτηση της συχνότητας συντονισμού των μαγνητικών πυρήνων από το χημικό τους περιβάλλον.

β) Σύζευξη spin-spin, δηλαδή του διαχωρισμού μιας κορυφής συντονισμού σε ομάδα πολλαπλών συμμετρικών κορυφών, που οφείλεται στην αλληλεπίδραση των spin γειτονικών πυρήνων.

γ) Αποδιέγερση ή Επαναφορά, αναφέρεται σε πυρήνες που επιστρέφουν στη θερμοδυναμική κατάσταση στο μαγνήτη. Αυτή η διεργασία λέγεται επίσης χρόνος επαναφοράς spin-πλέγματος (Spin-lattice relaxation time ή T_1), ή διαμήκης μαγνητική επαναφορά (longitudinal magnetic relaxation), όπου T_1 αναφέρεται στο μέσο χρόνο για έναν μεμονωμένο πυρήνα να επιστρέψει στην κατάσταση θερμικής ισορροπίας του για τα spin. Επίσης, ο χρόνος που απαιτείται για να σταματήσει η παραγωγή σήματος λέγεται χρόνος επαναφοράς spin-spin (Spin-spin relaxation time ή T_2) ή εγκάρσια επαναφορά (transverse relaxation). (88-91)

3.2 Χημική Μετατόπιση, Σύζευξη spin-spin (spin-spin coupling), Αποδιέγερση

Τα πρωτόνια συντονίζονται σε διαφορετικές συχνότητες, ανάλογα με το χημικό τους περιβάλλον, δηλαδή από την ηλεκτρονική πυκνότητα που τα περιβάλλει και το είδος των ατόμων με τα οποία συνδέονται. Το φαινόμενο αυτό τροποποιεί το μαγνητικό πεδίο που αισθάνονται οι πυρήνες. Αν H_p είναι η ένταση πεδίου που εφαρμόζεται στον πυρήνα μέσα στο άτομο, ισχύει η σχέση:

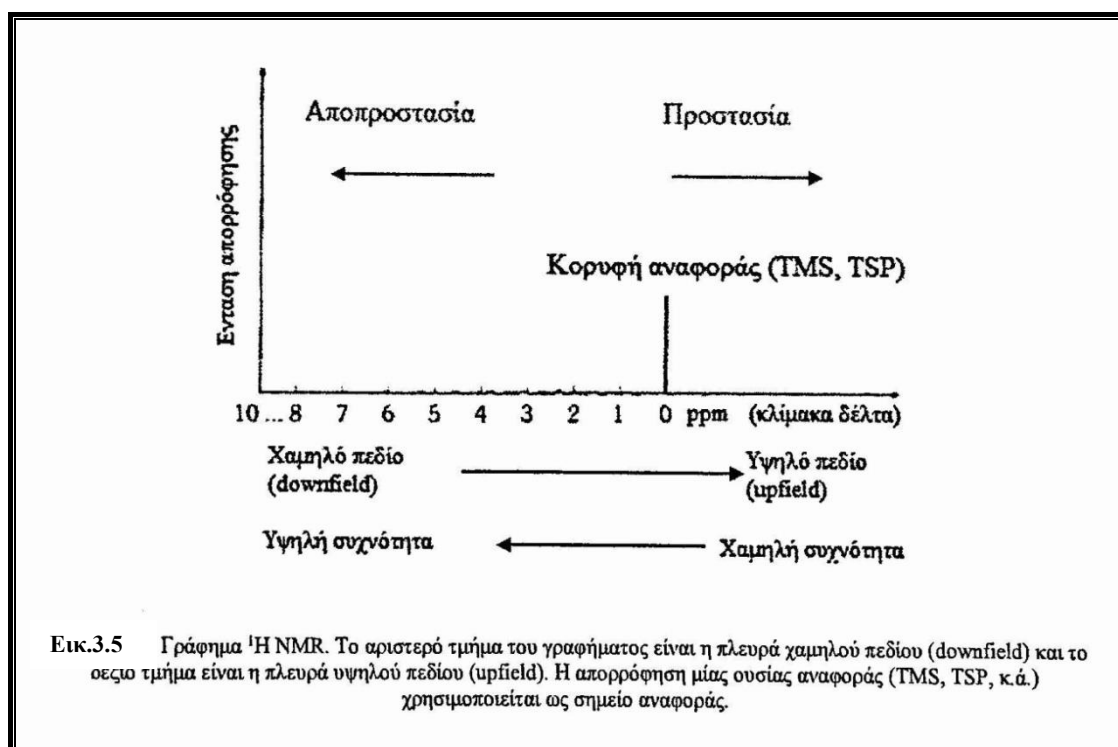
$$H_p = H_0(1 - \sigma)$$

Όπου σ είναι η σταθερά θωράκισης, που είναι καθαρός αριθμός και εξαρτάται από την ηλεκτρονική πυκνότητα γύρω από το πρωτόνιο, η οποία είναι συνάρτηση της δομής της ένωσης. Ως αποτέλεσμα αυτού, η συχνότητα συντονισμού μετατοπίζεται σε διαφορετική τιμή πεδίου και δίνεται από τη σχέση:

$$N = \gamma H_0(1 - \sigma) / 2\pi$$

Η μετατόπιση της συχνότητας συντονισμού σε μεγαλύτερες τιμές πεδίου (σ θετικό) καλείται *διαμαγνητική προστασία* (diamagnetic shielding), ενώ μετατόπιση σε μικρότερες τιμές πεδίου καλείται *παραμαγνητική αποπροστασία* (paramagnetic deshielding) (σ αρνητικό). Οι όροι διαμαγνητική και παραμαγνητική μετατόπιση είναι σχετικοί και αναφέρονται σε μετατόπιση με βάση μια ορισμένη συχνότητα συντονισμού. **(Εικ. 3.5)**

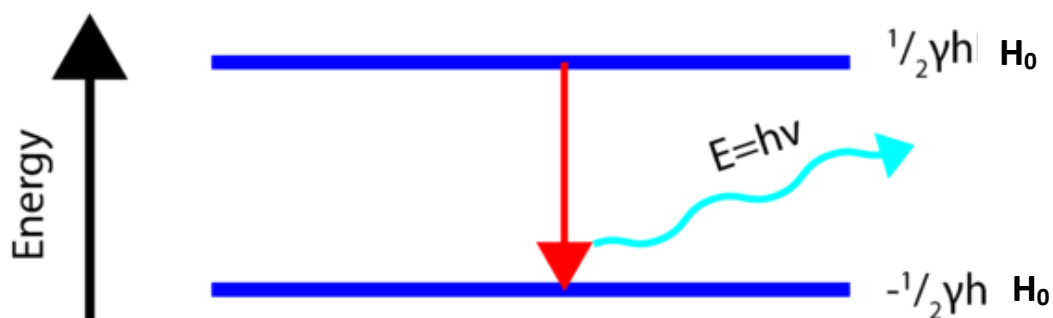
Η θέση συντονισμού ενός πρωτονίου εκφράζεται σε σχέση με μια πρότυπη ένωση, το τετραμεθυλο-σιλάνιο, $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ (TMS). Το TMS είναι ένα ιδανικό εσωτερικό πρότυπο για τη βαθμονόμηση του φάσματος NMR, επειδή είναι χημικά αδρανές, μαγνητικά ισότροπο, δίνει μόνο μια απλή και οξεία κορυφή σε υψηλότερες τιμές πεδίου από όλα σχεδόν τα πρωτόνια (που αναγνωρίζεται εύκολα), είναι διαλυτό σε πολλούς διαλύτες και είναι πτητικό, ώστε να είναι δυνατή η απομάκρυνσή του. Το TMS είναι αδιάλυτο σε νερό και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε υδατικά διαλύματα. Σε αυτά χρησιμοποιείται το 2,2-διμεθυλο-2-σιλανοπέντανο-5-σουλφονικό νάτριο (DSS) ή 3-τριμεθυλο-σιλλυλο-(2,2,3,3-d4)-1-προπιονικό νάτριο (TSP). (Εικ. 3.5)



Σε πολλά φάσματα ^1H -NMR, οι κορυφές συντονισμού διαχωρίζονται σε συμμετρικές πολλαπλές ομάδες κορυφών (διπλές, τριπλές ή τετραπλές κ.λπ.) λόγω της αλληλεπίδρασης των spin γειτονικών πρωτονίων. Η πολλαπλότητα αυτή των σημάτων συντονισμού καλείται *spin-spin σύζευξη* (coupling) και οφείλεται στην αλληλεπίδραση των spin γειτονικών μαγνητικών πυρήνων. Η σύζευξη μεταξύ δύο πυρήνων χαρακτηρίζεται από τη σταθερά σύζευξης J , που είναι η απόσταση σε Hz, των επιμέρους κορυφών των πολλαπλών κορυφών των δύο ομάδων. Η σταθερά σύζευξης εξαρτάται μόνο από την ηλεκτρονική και στερεοσκοπική σχέση μεταξύ των αλληλεπιδρώντων πρωτονίων και, ως εκ τούτου, είναι ίδια στις δύο ομάδες και, σε αντίθεση με τη σταθερά θωράκισης σ , ανεξάρτητη από την ένταση του μαγνητικού πεδίου, γι' αυτό και δίνεται πάντα σε Hz. Έτσι παίρνοντας το φάσμα NMR μιας ένωσης, σε δύο συχνότητες, μπορούμε να διακρίνουμε τις πολλαπλές κορυφές που οφείλονται σε πρωτόνια με διαφορετική χημική μετατόπιση από εκείνες που οφείλονται σε spin-spin σύζευξη.

Για να είναι δυνατή η εμφάνιση απορρόφησης στο φάσμα NMR, πρέπει να εξασφαλίζεται μια μικρή περίσσεια πυρήνων στη χαμηλή στάθμη ενέργειας, γιατί αν οι πληθυσμοί των πυρήνων στις δύο στάθμες είναι ακριβώς οι ίδιοι, η απορρόφηση ακτινοβολίας από πυρήνες της χαμηλότερης στάθμης εξισορροπείται από την εκπομπή από πυρήνες υψηλότερης στάθμης. Η περίσσεια αυτή εξασφαλίζεται με διάφορους μηχανισμούς επαναφοράς ή αποδιέγερσης των πυρήνων, που χαρακτηρίζεται από το χρόνο επαναφοράς T (relaxation time), ο οποίος είναι ίσος με το ήμισυ του χρόνου, που απαιτείται για την αποκατάσταση της ισορροπίας, δηλ. την εξίσωση των πληθυσμών στις δύο στάθμες.

Κατά την επαναφορά, οι διεγερμένοι πυρήνες αποδιεγείρονται με μεταφορά ενέργεια, σε άλλους πυρήνες του μοριακού πλέγματος που τους περιβάλλει, η οποία μετατρέπεται σε κινητική ή περιστροφική ενέργεια. Ο μηχανισμός αυτός χαρακτηρίζεται από ένα χρόνο επαναφοράς T_1 . Κατά την επαναφορά spin-spin, η ενέργεια από το διεγερμένο πυρήνα μεταφέρεται σε ένα γειτονικό πυρήνα με ανταλλαγή του spin. Ο μηχανισμός αυτός, που συμβαίνει κυρίως σε στερεά και υγρά υψηλού ιξώδους, χαρακτηρίζεται από ένα χρόνο επαναφοράς T_2 και επηρεάζει το εύρος των κορυφών απορρόφησης. Σε κάθε φασματοσκοπική τεχνική το εύρος μιας φασματικής κορυφής (γραμμής) είναι αντιστρόφως ανάλογο του χρόνου, που παραμένει στην υψηλότερη ενεργειακή στάθμη. Ως εκ τούτου, μεγάλες τιμές T_2 , που χαρακτηρίζουν τα αέρια και τα υγρά οδηγούν σε στενές κορυφές, σε αντίθεση με μικρές τιμές T_2 . (Εικ.3.6)



Εικ.3.6. Αποδιέγερση πυρήνων

3.3 Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR)

ΠΥΡΗΝΙΚΟΣ: Η μέθοδος αρχίζει με τη λέξη Πυρηνικός γιατί βασίζεται στην ανίχνευση πυρήνων με spin.

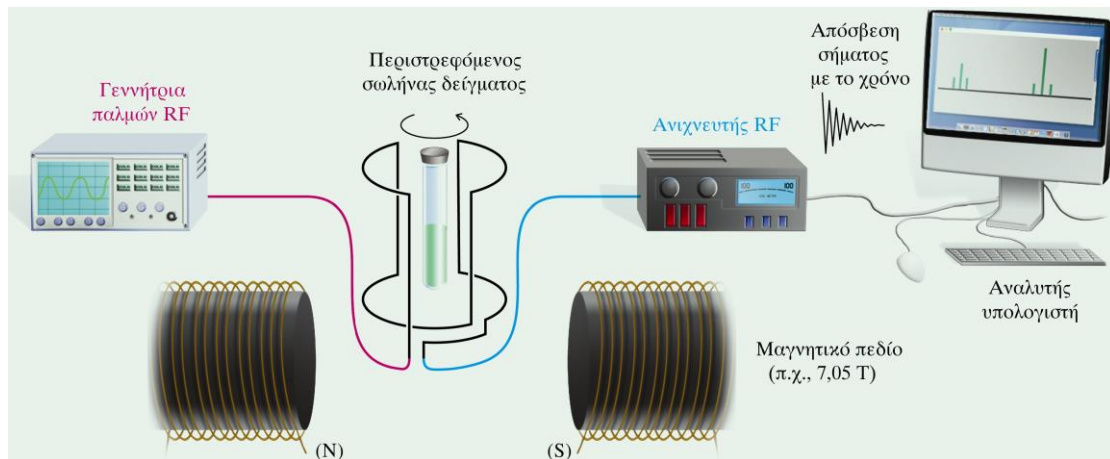
ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΣ: Η λήψη των φασμάτων γίνεται με το δείγμα να βρίσκεται εντός μαγνητικού πεδίου. Η ένταση του πεδίου προσδιορίζει το πόσο αναλυτικά είναι τα φάσματα τα οποία λαμβάνονται. Όσο μεγαλύτερη είναι η ένταση του μαγνητικού

πεδίου, τόσο αυξάνεται η διακριτικότητα (η διάκριση πυρήνων ανάμεσα στις δύο καταστάσεις spin).

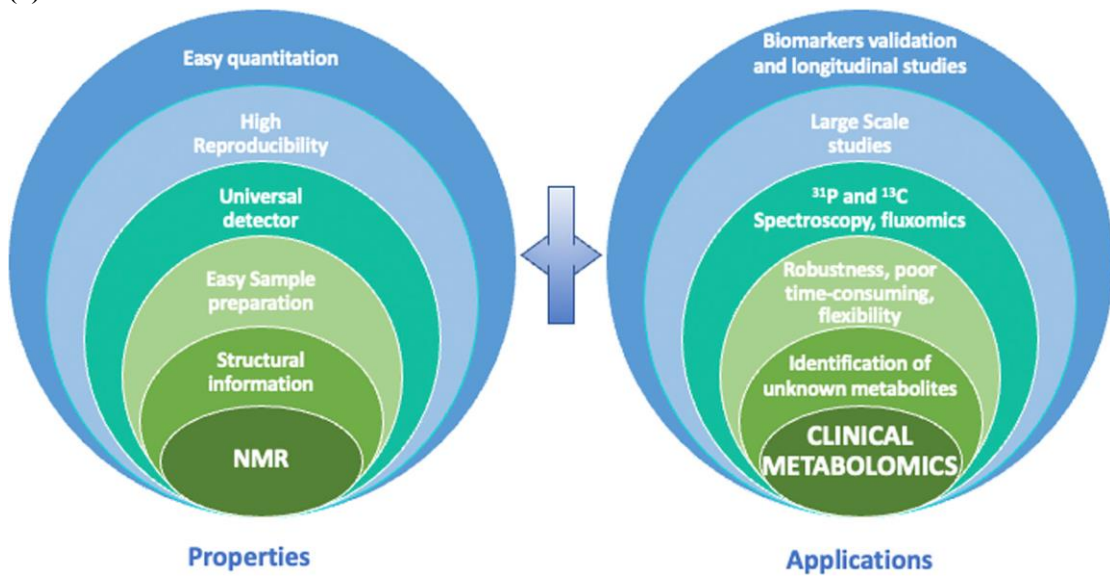
Ο φασματογράφος NMR αποτελείται από ένα σωληνοειδή μαγνήτη από υπεραγώγιμο υλικό. Η μαγνήτιση του υπεραγώγιμου υλικού είναι μόνιμη και επιτυγχάνεται με τη διατήρησή του σε περιβάλλον υγρού ηλίου. Ένα εξωτερικό δοχείο υγρού αζώτου λειτουργεί ως μόνωση του δοχείου του υγρού ηλίου και ανάμεσά τους παρεμβάλλεται «μανδύας» (δοχείο) με κενό. Πηνία τα οποία υπάρχουν μέσα στο μαγνήτη έχουν ως σκοπό να διατηρήσουν την ομοιογένεια του μαγνητικού πεδίου. Η ομοιογένεια και η σταθερότητα του πεδίου αποτελούν βασικούς παράγοντες για την επιτυχή λήψη φασμάτων. Αυτή εξετάζεται με την εκπομπή και λήψη μιας δεδομένης συχνότητας αναφοράς (δευτερίου).

ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ: Στο κέντρο του συστήματος, που περιγράφηκε, τοποθετείται ο αισθητήρας (probe). Αυτός περιλαμβάνει συντονιζόμενα κυκλώματα για την εκπομπή υψίσυχων παλμών προς το δείγμα, ώστε να διεγερθούν οι προς μελέτη πυρήνες και να γίνει λήψη της κυματομορφής αποδιέγερσης. Περιλαμβάνει το πιθανό εύρος συχνοτήτων, το οποίο απαιτείται για τη διέγερση όλων των πυρήνων της παρατηρούμενης χημικής ουσίας. Η ενέργεια που απαιτείται για τη διέγερση των πυρήνων αντιστοιχεί σε συγκεκριμένη τιμή συχνότητας (συχνότητα συντονισμού) η οποία εξαρτάται από την ισχύ του μαγνητικού πεδίου και τις μαγνητικές ιδιότητες των ισοτόπων των μελετώμενων πυρήνων. Αυτός ο συντονισμός όλων των πυρήνων εξηγεί και την τελευταία λέξη της ονομασίας της μεθόδου.

Η αποδιέγερση των πυρήνων (που εξαρτάται από τους χρόνους αποκατάστασης T_1 και T_2) επάγει στο πηνίο παρατήρησης ένα ρεύμα, το οποίο ενισχύεται και καταλήγει στον δέκτη, όπου και αποδιαμορφώνεται. Στη συνέχεια, αφού καταγραφεί και ψηφιοποιηθεί, υπόκεινται σε μετασχηματισμό κατά Fourier. Με τη μαθηματική αυτή επεξεργασία λαμβάνεται στο πεδίο συχνοτήτων το φασματικό περιεχόμενο της ουσίας ή των ουσιών που μελετώνται. Τέλος γίνεται βελτίωση του ληφθέντος φάσματος (διόρθωση φάσης, διόρθωση της βασικής γραμμής του φάσματος κλπ). Η ολοκλήρωση των κορυφών δίνει πληροφορίες για τον αριθμό των πρωτονίων της εξεταζόμενης ουσίας σε φάσματα πρωτονίων. **(Εικ.3.7)** (92)



(α)



(β)

Εικ.3.7 (α) Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR), (β) Ιδιότητες της φασματοσκοπίας NMR που αποτελούν σημαντικά πλεονεκτήματα της μεθόδου για την κλινική μεταβολομική.

4. Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της μελέτης

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάλυση του μεταβολικού προφίλ του ορού του αίματος εγκύων με ΣΔΚ με βάση τη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ και η διερεύνηση της συσχέτισης κύριων μεταβολιτών του ορού με τη νόσο. Στα πλαίσια αυτής της μελέτης έγινε μεταβολομική ανάλυση ορού, εγκύων γυναικών με και χωρίς ΣΔΚ, απαλλαγμένου από μακρομόρια, για να αυξηθεί ο αριθμός των ποσοτικοποιημένων μεταβολιτών, με σκοπό έναν ακριβέστερο χαρακτηρισμό των διαταραγμένων μεταβολικών οδών που οδηγούν στο ΣΔΚ και για να εξετάσουμε την ενδεχόμενη ομοιότητά τους με αυτές που σχετίζονται με το ΣΔ2. Στο πρώτο μέρος της μελέτης γίνεται ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση επιλεγμένων μεταβολιτών στον ορό του αίματος εγκύων με και χωρίς ΣΔΚ. Στο δεύτερο μέρος της εργασίας συγκρίνεται το συνολικό μεταβολικό προφίλ του ορού των δύο ομάδων της μελέτης με τεχνικές αναγνώρισης προτύπων (Μεταβολομική ανάλυση).

5. Πειραματικό Μέρος

Υλικό και Μέθοδοι

5.1 Πληθυσμός της μελέτης και συλλογή των δειγμάτων αίματος

Η συλλογή των δειγμάτων της μελέτης πραγματοποιήθηκε στη Μονάδα Σακχαρώδους Διαβήτη Κύησης του Νοσοκομείου «Αλεξάνδρα» στην Αθήνα. Το πρωτόκολλο της μελέτης εγκρίθηκε από την Επιστημονική Επιτροπή του Νοσοκομείου.

Σε κάθε έγκυο γυναίκα, Καυκάσιας φυλής, που προσήλθε στη μονάδα Σακχαρώδους Διαβήτη Κύησης, προκειμένου να υποβληθεί σε δοκιμασία φόρτισης γλυκόζης (OGTT), λήφθηκε ένα πλήρες ιατρικό ιστορικό που περιελάμβανε: ηλικία της εγκύου, ηλικία κύησης, αριθμό κυήσεων και αριθμό τοκετών, ιστορικό προηγούμενης κύησης με ΣΔΚ, οικογενειακό ιστορικό σακχαρώδους διαβήτη, χρήση φαρμάκων, συνήθειες καπνίσματος και καταγράφηκαν οι εξής κλινικές παράμετροι: αρτηριακή πίεση, βάρος, ύψος, ΔΜΣ, ΔΜΣ πριν την κύηση.

Από τη μελέτη αποκλείστηκαν γυναίκες με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1, Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2, άλλες συστηματικές ασθένειες και γυναίκες στις οποίες είχε επιτευχθεί κύηση με εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF).

Ο έλεγχος για την παρουσία ΣΔΚ έγινε στην 26^η -30^η εβδομάδα κύησης, με 75 g -OGTT, μετά από ολονύχτια νηστεία (περίπου 12 ωρών). Όλες οι γυναίκες έλαβαν οδηγίες να ακολουθούν δίαιτα με τουλάχιστον 150 g υδατάνθρακες την ημέρα, για 3 ημέρες πριν τη διενέργεια της OGTT και να μην λάβουν φάρμακα ή βιταμίνες το πρωί της OGTT.

Κατά τη δοκιμασία φόρτισης με 75g γλυκόζης (OGTT) έγινε συλλογή δειγμάτων ορού και ολικού αίματος με αντιπηκτικό σε χρόνο 0' (πριν από τη λήψη γλυκόζης).

α) Δείγμα Ορού Αίματος

Τα δείγματα ολικού αίματος (10ml) ελήφθησαν σε ειδικά σωληνάρια αιμοληψίας (BD Vacutainer, 6 ml). Αφού παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για χρονικό διάστημα 15-30 λεπτών, για να ολοκληρωθεί η διαδικασία της πήξης, φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στις 3000 στροφές (rpm) ανά λεπτό εντός 1 ώρας από την ώρα αιμοληψίας. Συλλέχθηκε ο ορός, και διαμοιράστηκε σε επιμέρους δείγματα των 500 μl σε πλαστικό φιαλίδιο τύπου Cryovials (Cryo Tube™ Vials, NUNC). Ένα δείγμα χρησιμοποιήθηκε άμεσα για τις βιοχημικές εξετάσεις ρουτίνας και τα υπόλοιπα καταψύχθηκαν σε θερμοκρασία -80°C μέχρι το επόμενο στάδιο των εργαστηριακών μετρήσεων.

β) Δείγμα Ολικού Αίματος

Δείγματα ολικού αίματος (συνολικά περίπου 9 ml) ελήφθησαν σε 3 ειδικά σωληνάρια αιμοληψίας γενικής αίματος (BD Vacutainer Plus 3.6mg EDTA K2 Tubes, 3ml) και αναδεύθηκαν δια χειρός. Το ένα σωληνάριο χρησιμοποιήθηκε άμεσα για τις αιματολογικές εξετάσεις ρουτίνας (HbA1c) και τα άλλα 2 αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι το επόμενο στάδιο των εργαστηριακών μετρήσεων.

Στο δείγμα ορού μετρήθηκαν τα επίπεδα της γλυκόζης (Μέθοδος Εξοκινάσης, Integra 400, Roche) και λιπιδίων και στο δείγμα ολικού αίματος τα επίπεδα της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HPLC, HA 8160, Menarini). Τα δείγματα αίματος ελήφθησαν πριν την έναρξη οποιασδήποτε θεραπευτικής αγωγής.

Έγινε καταγραφή των αποτελεσμάτων της καμπύλης σακχάρου και διαχωρισμός του πληθυσμού σε γυναίκες με ΣΔΚ και σε φυσιολογικές.

Σύμφωνα με τα κριτήρια του IADPSG-2010, ως ΣΔΚ ορίστηκε η παρουσία τουλάχιστον μίας τιμής γλυκόζης πλάσματος ≥ 92 mg/dL σε κατάσταση νηστείας, ≥ 180 mg/dl, 1-ώρα μετά και ≥ 153 mg/dl, 2-ώρες μετά από τη λήψη των 75 g γλυκόζης.

Τελικά, επιλέχθηκαν να συμμετάσχουν στη μελέτη 62 γυναίκες με ΣΔΚ και 77 έγκυες γυναίκες με φυσιολογική ανοχή στη γλυκόζη. Οι γυναίκες της 2^{ης} ομάδας επελέγησαν ώστε να προσομοιάζουν με τις γυναίκες με ΣΔΚ στα παρακάτω χαρακτηριστικά: εβδομάδα κύησης, ΔΜΣ, αρτηριακή πίεση και επίπεδα λιπιδίων στον ορό.

5.2 Διήθηση υπό φυγοκέντρωση (υπερδιήθηση) του ορού του αίματος

Για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών μικρού μοριακού βάρους, με φασματοσκοπία NMR, κρίνεται απαραίτητη η απομάκρυνση των μακρομορίων (λιπιδίων, πρωτεϊνών) με διήθηση του ορού του αίματος. Τα σήματα αυτών των

μακρομορίων στο φάσμα NMR επικαλύπτουν το σήμα των προσδιοριζόμενων μεταβολιτών παρεμποδίζοντας την ανίχνευση και ποσοτικοποίησή τους.

Για την απομάκρυνση των μακρομορίων με **υπερδιήθηση** του ορού, χρησιμοποιήθηκαν τα φίλτρα Amicon® Ultra-2 Centrifugal Filter Devices (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). **(Εικ.5.1)** Με τα συγκεκριμένα φίλτρα επιτυγχάνεται ταχεία διήθηση διαλυμάτων, καθώς επιτρέπουν τη διήθηση συστατικών μεγέθους έως 3 kDa. Με βάση το μοριακό βάρος των μεταβολιτών ο χρόνος φυγοκέντρησης του δείγματος καθορίστηκε στα 60 min.

Η διήθηση πραγματοποιήθηκε σε φυγόκεντρο υψηλής ταχύτητας με ελεγχόμενη θερμοκρασία θαλάμου (Thermo Scientific™ SL16R, Karlsruhe, Germany) και η κεφαλή που εφαρμόστηκε ήταν κεφαλή ταλαντευόμενων υποδοχέων (swinging bucket rotor). Η μέγιστη ταχύτητα που προτείνεται από τον κατασκευαστή των φίλτρων σε κεφαλή ταλαντευόμενων υποδοχέων είναι 4000 g και αυτή η ταχύτητα εφαρμόστηκε στο παρόν πρωτόκολλο.



Εικ.5.1. Φίλτρα Amicon Ultra-2 Centrifugal Filter Devices

Υλικά-Αντιδραστήρια

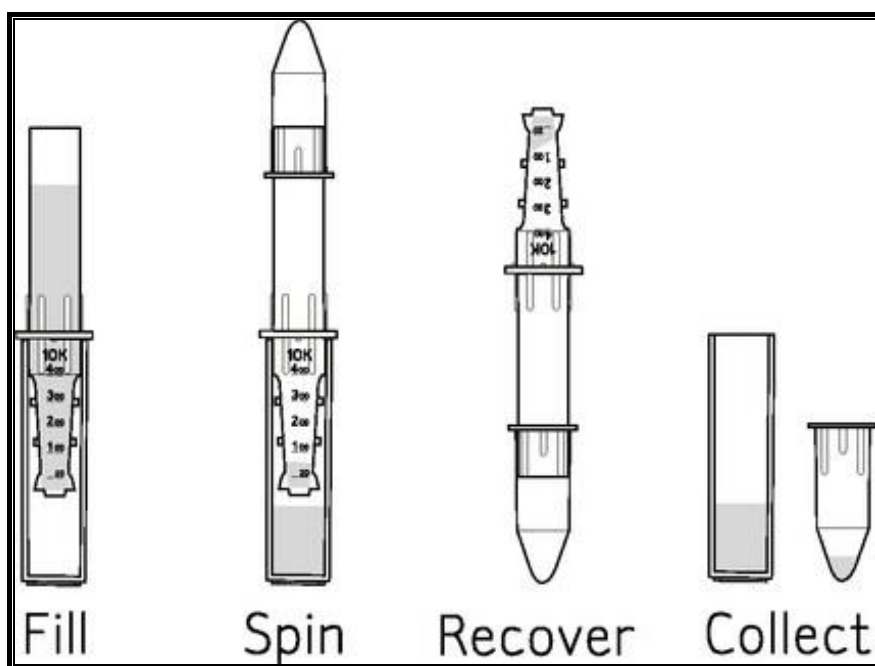
1. Φίλτρα χωρητικότητας 2mL (Amicon Ultra-2 Centrifugal Filter Devices for volumes up to 2 mL, για διήθηση συστατικών έως 3 kDa)
2. Πιπέτες: 200-1000 μ L, 10-100 μ L (Finnipipette Thermo LabSystems)
3. Απεσταγμένο Ύδωρ
4. Πλαστικά σωληνάρια Cryovials (Cryo Tube™ Vials, NUNC)

Όργανα

Φυγόκεντρος (Thermo Scientific SL16R)

Το πειραματικό πρωτόκολλο(93, 94) που ακολουθήθηκε περιελάμβανε τα παρακάτω βήματα (Εικ.5.2):

- Έκπλυση των φίλτρων με 3 X 500 μL απεσταγμένου ύδατος για να απομακρυνθούν τα ίχνη γλυκερόλης που βρίσκονται στα φίλτρα ως συντηρητικό.
- Φυγοκέντρηση μετά την εκάστοτε έκπλυση στα 4000g για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (25°C).
- Προσθήκη 800 μL ορού αίματος σε κάθε φίλτρο.
- Φυγοκέντρηση στα 4000g για 1h σε θερμοκρασία δωματίου (25°C).
- Συλλογή της ποσότητας διηθήματος (περίπου 400 μL) σε πλαστικά σωληνάρια Cryovials (Cryo TubeTM Vials, NUNC).
- Αποθήκευση στους -80°C .



Εικ.5.2. Βήματα χρήσης συσκευής φιλτραρίσματος δείγματος ορού. (Fill) Προσθέτουμε το δείγμα στο φίλτρο. (Spin) Καλύπτουμε το φίλτρο και φυγοκεντρούμε για 60 λεπτά στα 4000 g. (Recover) Ανακτούμε με εκ νέου φυγοκέντρηση μέρος του δείγματος που δεν διηθείται. (Collect) Συλλέγουμε το διήθημα καθώς και το ίζημα στα αντίστοιχα σωληνάρια.

5.3 Καταγραφή του Μεταβολικού Προφίλ του Ορού του Αίματος με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$

5.3.1 Προετοιμασία των δειγμάτων για τη λήψη των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$

Υλικά- Αντιδραστήρια

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

Όργανα

1. Φασματογράφος Bruker Avance DRX 500MHz
2. Φυγόκεντρος Centrifuge 5415 D, Eppendorf

Τα αποθηκευμένα στους -80°C διηθήματα ορού παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) για την απόκτηση θερμικής ισορροπίας. Σε 400μL διηθήματος ορού προστέθηκαν 200μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών για την ρύθμιση του pH σε τιμή 7.4 ± 0.5 .(95) Το μίγμα των 600μL αναδεύτηκε ήπια, παρέμεινε για 10 λεπτά σε ηρεμία για την πλήρη ανάμειξη του ορού με το ρυθμιστικό διάλυμα και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε (Centrifuge 5415 D, Eppendorf) στις 8000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά για την καταβύθιση και απομάκρυνση τυχόν ίζημάτων.(96) Μεταφορά 500μL από το διαυγές υπερκείμενο σε γυάλινο σωληνάριο NMR διαμέτρου 5mm και προσθήκη 50μL διαλύματος D₂O/TSP. Το D₂O χρησιμοποιείται για το "κλείδωμα" (lock) στη συχνότητα του δευτερίου του φασματογράφου NMR ενώ το TSP αποτέλεσε την εσωτερική ουσία αναφοράς ($\delta^1\text{H}$ 0.0) για τη βαθμονόμηση των χημικών μετατοπίσεων.

5.4 Λήψη και επεξεργασία των φασμάτων ¹H-NMR

Η λήψη των φασμάτων ¹H-NMR έγινε στους 300K, στο φασματογράφο 500 MHz Avance Bruker DRX, εντάσεως μαγνητικού πεδίου 11,74 Tesla, στο Κέντρο NMR του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Για την καταστολή του σήματος του νερού χρησιμοποιήθηκε η 1D παλμική ακολουθία NOESYPRESAT (RD-90°-t1-90°-tm-90°-FID λήψη).(97) Για κάθε φάσμα έγινε συλλογή 256 σαρώσεων (scans), 64K δεδομένων (data points) με εύρος φάσματος 6009.6 Hz το οποίο αντιστοιχεί σε 12.02 ppm.

Τα φάσματα επεξεργάστηκαν με το λογισμικό πρόγραμμα Bruker Topspin 3.5pl6 (Bruker-Franzen Analytik GmbH).

Για την αύξηση της ευαισθησίας οι FIDs πολλαπλασιάστηκαν με εκθετική συνάρτηση (LB=0.3) (exponential weighting function) που αντιστοιχούσε σε διεύρυνση γραμμών (line broadening) πλάτους 0.3 Hz. Μετά το μετασχηματισμό Fourier σε φάσμα συνάρτησης συχνότητας, έγινε βαθμονόμηση (Calibration) με βάση το σήμα συντονισμού του TSP στα 0.000 ppm. Ακολούθησε διόρθωση φάσης (Phase Correction), μηδενικής και πρώτης τάξης για τη βελτίωση της συμμετρίας των κορυφών του φάσματος. Η διόρθωση της γραμμής βάσης (Baseline Correction) έγινε με τη χρήση μιας πολωνυμικής συνάρτησης 5^{ου} βαθμού (Automatic Using Polynomial of Degree ABSG).

5.5 Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών

Για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Chenomx NMR Suite v.8.4 (Edmonton, AB, Canada) το οποίο διαθέτει βιβλιοθήκη με τα πρότυπα φάσματα μεταβολιτών στα 500 MHz, οι βάσεις δεδομένων Human Metabolome Database (HMDB; <http://www.hmdb.ca>) και Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB, <http://www.bmrwisc.edu>) και η υπάρχουσα βιβλιογραφία μεταβολομικής ανάλυσης των βιολογικών υγρών με φασματοσκοπία NMR. Το TSP γνωστής συγκέντρωσης (0.456 mM) χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο για την ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών του ορού οι συγκεντρώσεις των οποίων εκφράστηκαν σε μM ($\mu\text{mol/L}$).

5.6. Στατιστική ανάλυση δεδομένων

α) Μονομεταβλητή ανάλυση (univariate analysis): Για την ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS (version 23.0; IBM Corp., Armonk, NY). Η σύγκριση των μέσων τιμών των παραμέτρων έγινε με τη δοκιμασία Students' t-test για σύγκριση μεταξύ δύο ανεξάρτητων ομάδων. Το επίπεδο εμπιστοσύνης ορίστηκε σε $p < 0.05$ και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως Μέση Τιμή \pm Τυπική Απόκλιση (Mean \pm SD).

β) Πολυπαραγοντική ανάλυση (multivariate analysis): Αρχικά πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών του ορού με το λογισμικό πρόγραμμα Chenomx NMR Suite 8.4 Profiler (Chenomx Edmonton, Canada). Το λογισμικό αυτό πρόγραμμα διαθέτει πρότυπη βιβλιοθήκη σε φασματογράφο 500 MHz, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση αλλά και την ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών. Το δευτεριωμένο άλας sodium 3-trimethylsilyl-(2,2,3,3-²H₄)-1-propionate ή TSP (Mr=172.28 g/mol, Sigma-Aldrich), γνωστής συγκέντρωσης, χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο αναφοράς. Οι τιμές των μεταβολιτών εκφράστηκαν ως $\mu\text{moles/L}$ (μM).

Η πολυπαραγοντική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το online λογισμικό MetaboAnalyst (v.4.0). Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση των κυρίων συνιστωσών, PCA (Principal component analysis) για μια γενική επισκόπηση του συνόλου των δεδομένων, τον εντοπισμό δειγμάτων με ακραία συμπεριφορά (outliers), καθώς και την ανίχνευση οποιασδήποτε τάσης ομαδοποίησης ή

διαχωρισμού. Στη συνέχεια, ακολούθησε η ανάλυση PLS-DA (Partial Least Squares-Discriminant Analysis ή διαχωριστική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετράγωνων) για τη βελτίωση του διαχωρισμού μεταξύ των υπό μελέτη ομάδων με βάση το μεταβολικό προφίλ του ορού.

Η αξιολόγηση των στατιστικών μοντέλων που προέκυψαν με την ανάλυση PLS-DA έγινε με βάση τις παραμέτρους R^2 (εκτίμηση της εξηγούμενης παραλλαγής και του βαθμού προσαρμογής του στατιστικού μοντέλου στα δεδομένα) και Q^2 (εκτίμηση της ικανότητας πρόβλεψης των στατιστικών μοντέλων, θεωρείται «καλή» για $Q^2 > 0.5$ και «άριστη» για $Q^2 > 0.9$). Επιπρόσθετα, για την επικύρωση των στατιστικών μοντέλων χρησιμοποιήθηκαν οι δοκιμές μετάθεσης (permutation tests), μία διαδικασία κατά την οποία τα δεδομένα μετατίθενται επανειλημμένως με τυχαίο τρόπο, και το μοντέλο επανυπολογίζεται. Τέλος, η καταγραφή των μεταβολιτών που συνέβαλαν σημαντικά στον διαχωρισμό των υπό μελέτη ομάδων πραγματοποιήθηκε με το γράφημα VIP (Variable Important Projection). Οι μεταβολίτες με τιμή $VIP > 1$ θεωρούμε πως έχουν στατιστικά σημαντική συνεισφορά στον διαχωρισμό των ομάδων.

6. Αποτελέσματα

6.1 Αποτελέσματα

Στον **Πίνακα 6.1** παρουσιάζονται τα ανθρωπομετρικά και μεταβολικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης. Δεν υπήρχε διαφορά στην ηλικία, στην εβδομάδα κύησης, στον ΔΜΣ ή την αρτηριακή πίεση μεταξύ των γυναικών στις δύο ομάδες. Όπως ήταν αναμενόμενο, οι γυναίκες που ταξινομήθηκαν ως ΣΔΚ, σύμφωνα με τα IADPSG κριτήρια, είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης σε όλους τους χρόνους της OGTT και υψηλότερη HbA1c από ό, τι οι γυναίκες χωρίς ΣΔΚ. Τα επίπεδα χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων, HDL και LDL-χοληστερόλης δεν διέφεραν μεταξύ των δύο ομάδων.

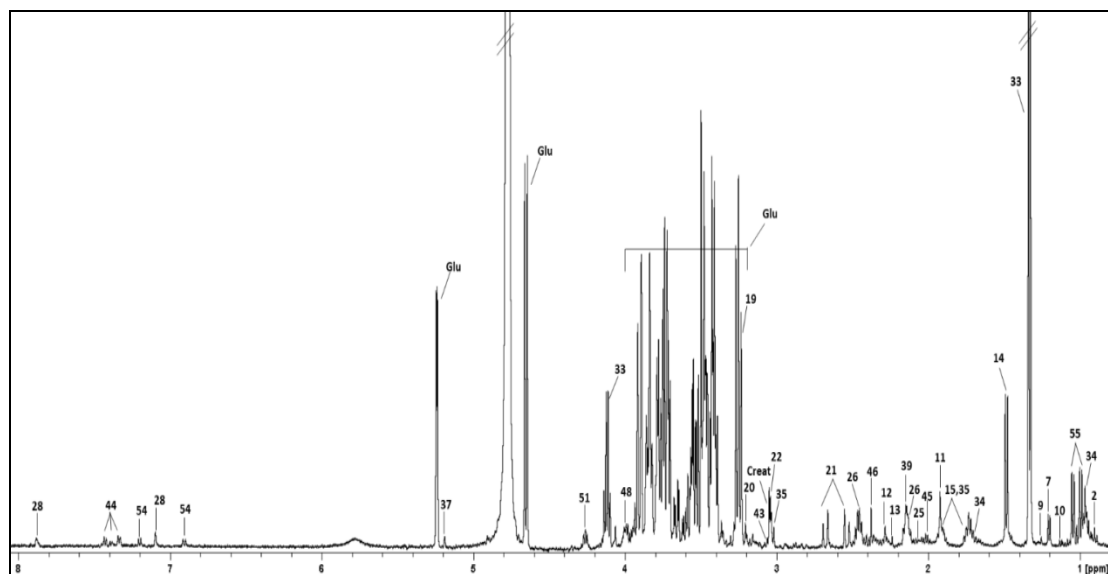
Πίνακας 6.1. Ανθρωπομετρικά και μεταβολικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

Παράμετροι	Ομάδα χωρίς ΣΔΚ (Control Group)	Ομάδα με ΣΔΚ	p value
N	77	62	
Ηλικία (σε έτη)	32.69 ± 4.72	34.27±5.07	NS
Εβδομάδα κήσης	28.06 ± 1.29	27.91 ± 1.22	NS
ΔΜΣ (kg/m ²)	25.61 ±5.01	26 ± 4.98	NS
Συστολική Αρτηριακή Πίεση (mm Hg)	109.21 ± 13.15	111.05 ± 11.74	NS
Διαστολική Αρτηριακή Πίεση (mm Hg)	59.74 ±7.72	59.74 ±12.07	NS
Μεταβολικές Παράμετροι			
Ολική χοληστερόλη (mg/dL)	251.08 ± 34.78	254 ± 48.45	NS
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	190.96 ± 66.85	191.15 ± 76.13	NS
HDL- χοληστερόλη (mg/dL)	63.54 ± 12.02	64.40± 12.22	NS
LDL- χοληστερόλη (mg/dL)	149± 32	154± 37.32	NS
Γλυκόζη νηστείας (mg/dL)	83.04±5.60	93.19±9.08	<0.001
Γλυκόζη στα 60' (mg/dL)	130.27 ± 26.39	177.48 ± 29.90	<0.001
Γλυκόζη στα 120' (mg/dL)	103.77 ± 24.31	129.26 ± 34.74	<0.001
HbA1c (%)	4.98± 0.29	5.13± 0.34	<0.01

6.2 Στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση (Targeted analysis)

Στα δείγματα ορού από την ομάδα ελέγχου και την ομάδα του ΣΔΚ, ταυτοποιήθηκαν 55 (πενήντα πέντε) μεταβολίτες στα φάσματα ¹H NMR, αντίστοιχα και ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Chenomx NMR Suite 8.4. Ένα αντιπροσωπευτικό φάσμα ¹HNMR με τους κύριους μεταβολίτες στον αποπρωτεϊνωμένο ορό εγκύου με ΣΔΚ, φαίνεται στο **Σχήμα 6.1**.

Σχ.6.1. Αντιπροσωπευτικό φάσμα ^1H NMR με τους κύριους μεταβολίτες του αποπρωτεϊνωμένου ορού από γυναίκα με ΣΔΚ



1.2-Αμινοβουτυρικό, 2.2-Υδροξυβουτυρικό, 3.2-Υδροξυϊσοβαλερικό, 4.2-Οξοκαπροϊκό, 5.2-Οξογλουταρικό, 6.2-Οξοϊσοκαπροϊκό, 7.3-Υδροξυβουτυρικό, 8.3-Υδροξυισοβουτυρικό, 9.3-Υδροξυϊσοβαλερικό, 10.3-Μεθυλ-2-οξοβαλερικό, 11.Οξικό, 12.Ακετοξικό, 13.Ακετόνη, 14.Αλανίνη, 15.Αργινίνη, 16.Ασπαραγίνη, 17.Ασπαρτικό, 18.Βεταΐνη, 19.Καρνιτίνη, 20.Χολίνη, 21.Κιτρικό, 22.Κρεατίνη, 23.Διμεθυλαμίνη, 24.Μυρμηκικό, 25.Γλουταμικό, 26.Γλουταμίνη, 27.Γλυκίνη, 28.Ιστιδίνη, 29.Υποξανθίνη, 30.Ινοσίνη, 31.Ισοβουτυρικό, 32.Ισολευκίνη, 33.Γαλακτικό, 34.Λευκίνη, 35.Λυσίνη, 36.Μηλονικό, 37.Μαννόζη, 38.Μεθανόλη, 39.Μεθειονίνη, 40.Μυο-ινοσιτόλη, 41.N,N-Διμεθυλογλυκίνη, 42.Ο-ακετυλοκαρνιτίνη, 43.Ορνιθίνη, 44.Φαινυλαλανίνη, 45.Προλίνη, 46.Πυροσταφυλικό, 47.Σαρκοζίνη, 48.Σερίνη, 49.Ηλεκτρικό, 50.Ταυρίνη, 51.Θρεονίνη, 52.N-οξείδιο τριμεθυλαμίνης, 53.Τρυπτοφάνη, 54.Τυροσίνη, 55.Βαλίνη, Glu. Γλυκόζη, Creat. Κρεατινίνη

Στον **Πίνακα 6.2** παρουσιάζονται οι χημικές μετατοπίσεις και η πολλαπλότητα των κορυφών των μεταβολιτών που ποσοτικοποιήθηκαν στο ^1H NMR φάσμα του ορού, καθώς και ο κωδικός τους στην Human Metabolome Database (*HMDB*).

Πίνακας 6.2. Χημικές μετατοπίσεις, πολλαπλότητα των κορυφών των μεταβολιτών που ποσοτικοποιήθηκαν στο ¹HNMR φάσμα του ορού και ο κωδικός τους στην Human Metabolome Database (HMDB)

Metabolites	δ (H1 shift) ppm	Multiplicity	HMDB ID
2-Aminobutyrate	0,984 ; 1,904 ; 3,723	t(CH3) ; m(CH2) ; dd(CH)	(HMDB0000452)
2-Hydroxybutyrate	0,903 ; 1,641 ; 1,734 ; 4,001	t(CH3) ; m(CH2) ; m(CH2) ; dd(CH)	(HMDB0000008)
2-Hydroxyisovalerate	0,838 ; 0,961 ; 2,021 ; 3,854	d(CH3) ; d(CH3) ; m(CH) ; d(CH)	(HMDB0000407)
2-Oxocaproate	0,897 ; 1,336 ; 1,578 ; 2,733	t(CH3) ; m(CH2) ; m(CH2) ; t(CH2)	(HMDB0001864)
2-Oxoglutarate	2,428 ; 3,007	t(CH2) ; t(CH2)	(HMDB0000208)
2-Oxoisocaproate	0,941 ; 2,099 ; 2,617	d(CH3)2 ; m(CH) ; d(CH2)	(HMDB0000695)
3-Hydroxybutyrate	1,204 ; 2,313 ; 2,413 ; 4,157	d(CH3) ; m(CH2) ; m(CH2) ; m(CH)	(HMDB0000357)
3-Hydroxyisobutyrate	1,073 ; 2,491 ; 3,709	d(CH3) ; m(CH) ; m(CH2)	(HMDB0000023)
3-Hydroxyisovalerate	1,288 ; 2,366	s(CH3)2 ; s(CH2)	(HMDB0000754)
3-Methyl-2-oxovalerate	0,897 ; 1,103 ; 1,462 ; 1,704 ; 2,937	t(CH3) ; d(CH3) ; m(CH2) ; m(CH2) ; m(CH)	(HMDB0000491)
Acetate	1,924	s(CH3)	(HMDB0000042)
Acetoacetate	2,285 ; 3,454	s(CH3) ; s(CH2)	(HMDB0000060)
Acetone	2,238	s(CH3)2	(HMDB0001659)
Alanine	1,485 ; 3,794	d(CH3) ; q(CH)	(HMDB0000161)
Arginine	1,656 ; 1,916 ; 3,252 ; 3,775	m(CH2) ; m(CH2) ; t(CH2) ; t(CH)	(HMDB0000517)
Asparagine	2,863 ; 2,949 ; 4,006	m(CH2) ; m(CH2) ; dd(CH)	(HMDB0000168)
Aspartate	2,664 ; 2,805 ; 3,907	dd(CH2) ; dd(CH2) ; dd(CH)	(HMDB0000191)
Betaine	3,267 ; 3,909	s(CH3)3 ; s(CH2)	(HMDB0000043)
Carnitine	2,444 ; 3,229 ; 3,428 ; 4,576	m(CH2) ; s(CH3)3 ; m(CH2) ; m(CH)	(HMDB0000062)
Choline	3,206 ; 3,524 ; 4,073	s(CH3)3 ; dd(CH2) ; ddd(CH2)	(HMDB0000097)
Citrate	2,539 and 2,674	d(CH2) and d(CH2)	(HMDB0000094)
Creatine	3,041 ; 3,935	s(CH3) ; s(CH2)	(HMDB0000064)
Creatinine	3,052 ; 4,068	s(CH3) ; s(CH2)	(HMDB0000562)
Dimethylamine	2,715	s(CH3)2	(HMDB0000087)
Formate	8,459	s(CH)	(HMDB0000142)
Glucose	3,255 ; 3,413 ; 3,469 ; 3,545 ; 3,733 ; 3,836 ; 3,905 ; 4,655 ; 5,243	dd(CH) ; m(CH) ; m(CH) ; dd(CH) ; m(CH3) ; m(CH3) ; dd(CH)	(HMDB0000122)
Glutamate	2,059 ; 2,134 ; 2,355 ; 3,765	m(CH2) ; m(CH2) ; m(CH2) ; dd(CH)	(HMDB0000148)
Glutamine	2,146 ; 2,455 ; 3,779	m(CH2) ; m(CH2) ; t(CH)	(HMDB0000641)
Glycine	3,565	s(CH2)	(HMDB0000123)
Histidine	3,133 ; 3,239 ; 3,992 ; 7,162 ; 8,066	dd(CH2) ; dd(CH2) ; dd(CH) ; s(CH) ; s(CH)	(HMDB0000177)
Hypoxanthine	8,204 ; 8,224	s(CH) ; s(CH)	(HMDB0000157)
Inosine	3,845 ; 3,921 ; 4,273 ; 4,436 ; 6,071 ; 8,203 ; 8,321	dd(CH2) ; dd(CH2) ; dd(CH) ; dd(CH) ; d(CH) ; s(CH) ; s(CH)	(HMDB0000195)
Isobutyrate	1,074 ; 2,392	d(CH3)2 ; m(CH)	(HMDB0001873)
Isoleucine	0,943 ; 1,014 ; 1,263 ; 1,472 ; 1,985 ; 3,679	t(CH3) ; d(CH3) ; m(CH2) ; m(CH2) ; m(CH) ; d(CH)	(HMDB0000172)
Lactate	1,333 ; 4,119	d(CH3) ; q(CH)	(HMDB0000190)
Leucine	0,965 ; 1,718 ; 3,744	t(CH3)2 ; m(CH3) ; m(CH)	(HMDB0000687)
Lysine	1,443 ; 1,728 ; 1,893 ; 3,036 ; 3,764	m(CH2) ; m(CH2) ; m(CH2) ; t(CH2) ; t(CH)	(HMDB0000182)
Malonate	3,121	s(CH2)	(HMDB0000691)
Mannose	3,389 ; 3,582 ; 3,668 ; 3,758 ; 3,797 ; 3,823 ; 3,884 ; 3,916 ; 5,192	ddd(CH) ; t(CH) ; m(CH2) ; m(CH2) ; m(CH) ; m(CH) ; dd(CH)	(HMDB0000169)
Methanol	3,364	s(CH3)	(HMDB0001875)
Methionine	2,143 ; 2,649 ; 3,869	s(CH3)m(CH2) ; t(CH2) ; dd(CH)	(HMDB0000696)
Myo-inositol	3,289 ; 3,543 ; 3,631 ; 4,066	t(CH) ; dd(CH2) ; t(CH2) ; t(CH)	(HMDB0000211)
N,N-Dimethylglycine	2,933 ; 3,729	s(CH3)2 ; s(CH2)	(HMDB0000092)
O-Acetylcarnitine	2,149 ; 2,515 ; 2,648 ; 3,197 ; 3,611 ; 3,856 ; 5,607	s(CH3) ; dd(CH2) ; dd(CH2) ; s(CH3)3 ; dd(CH2) ; q(CH)	(HMDB0000201)
Ornithine	1,752 ; 1,841 ; 1,946 ; 3,066 ; 3,789	m(CH2) ; m(CH2) ; m(CH2) ; t(CH2) ; t(CH)	(HMDB0000214)
Phenylalanine	3,137 ; 4,002 ; 7,336 ; 7,384 ; 7,435	m(CH2) ; dd(CH) ; d(CH2) ; t(CH) ; t(CH2)	(HMDB0000159)
Proline	2,009 ; 2,069 ; 2,355 ; 3,346 ; 3,428 ; 4,139	m(CH2) ; m(CH2) ; m(CH2) ; dt(CH2) ; dt(CH2) ; dd(CH)	(HMDB0000162)
Pyruvate	2,379	s(CH3)	(HMDB0000243)
Sarcosine	2,745 ; 3,619	s(CH3) ; s(CH2)	(HMDB0000271)
Serine	3,849 ; 3,948 ; 3,965 ; 3,992 ; 4,009	dd(CH) ; d(CH2) ; d(CH2) ; d(CH2) ; d(CH2)	(HMDB0000187)
Succinate	2,411	s(CH2)2	(HMDB0000254)
Taurine	3,273 ; 3,431	t(CH2) ; t(CH2)	(HMDB0000251)
Threonine	1,333 ; 3,601 ; 4,263	d(CH3) ; d(CH) ; m(CH)	(HMDB0000167)
Trimethylamine N-oxide	3,252	s(CH3)3	(HMDB0000925)
Tryptophan	3,312 ; 3,489 ; 4,066 ; 7,218 ; 7,289 ; 7,327 ; 7,552 ; 7,741	dd(CH2) ; dd(CH2) ; dd(CH) ; t(CH) ; t(CH) ; s(CH) ; d(CH)	(HMDB0000929)
Tyrosine	3,064 ; 3,204 ; 3,951 ; 6,909 ; 7,201	dd(CH2) ; dd(CH2) ; dd(CH) ; d(CH2) ; d(CH2)	(HMDB0000158)
Valine	0,995 ; 1,046 ; 2,278 ; 3,619	d(CH3) ; d(CH3) ; m(CH) ; d(CH)	(HMDB0000883)

Οι τιμές συγκέντρωσης (μέση \pm τυπική απόκλιση) των μεταβολιτών του ορού για κάθε ομάδα συνοψίζονται στον **Πίνακα 6.3**.

Πίνακας 6.3. Συγκεντρώσεις μεταβολιτών στον ορό

	Μεταβολίτες(μM)	Ομάδα ελέγχου	ΣΔΚ	p value
1	2- Αμινοβουτυρικό	14.54 \pm 2.55	13.28 \pm 3.51	<0.05
2	2- Υδροξυβουτυρικό	39.05 \pm 14.07	49.29 \pm 17.78	<0.001
3	2- Υδροξυϊσοβαλερικό	8.08 \pm 2.31	8.80 \pm 2.94	NS
4	2- Οξοκαπροϊκό	8.68 \pm 2.69	8.59 \pm 3.33	NS
5	2- Οξογλουταρικό	13.44 \pm 4.28	12.74 \pm 3.85	NS
6	2- Οξοϊσοκαπροϊκό	20.62 \pm 5.12	20.87 \pm 6.56	NS
7	3- Υδροξυβουτυρικό	96.93 \pm 83.45	145.15 \pm 124.75	<0.05
8	3- Υδροξυισοβουτυρικό	5.54 \pm 1.85	6.40 \pm 2.33	<0.05
9	3- Υδροξυϊσοβαλερικό	4.04 \pm 1.08	4.66 \pm 1.60	<0.05
10	3- Μεθυλ-2-οξοβαλερικό	11.79 \pm 2.73	10.43 \pm 2.96	<0.01
11	Οξικό	46.86 \pm 16.58	48.53 \pm 18.55	NS
12	Ακετοξικό	36.00 \pm 29.43	56.79 \pm 44.91	<0.01
13	Ακετόνη	16.91 \pm 9.13	18.39 \pm 11.77	NS
14	Αλανίνη	462.08 \pm 84.31	442.12 \pm 108.42	NS
15	Αργινίνη	125.55 \pm 13.57	109.37 \pm 6.13	<0.001
16	Ασπαραγίνη	58.36 \pm 7.51	53.56 \pm 6.70	<0.01
17	Ασπαρτικό	36.04 \pm 6.27	31.40 \pm 7.38	<0.001
18	Βεταΐνη	38.85 \pm 9.45	37.76 \pm 12.72	NS
19	Καρνιτίνη	32.14 \pm 6.39	26.60 \pm 6.92	<0.001
20	Χολίνη	18.40 \pm 4.29	13.07 \pm 3.16	<0.001
21	Κιτρικό	162.35 \pm 35.27	172.10 \pm 37.03	NS
22	Κρεατίνη	42.47 \pm 12.49	40.83 \pm 12.88	NS
23	Διμεθυλαμίνη	4.29 \pm 1.91	3.67 \pm 1.96	NS
24	Μυρμηκικό	19.86 \pm 8.80	18.43 \pm 10.37	NS
25	Γλουταμικό	98.30 \pm 21.07	88.56 \pm 24.95	<0.05
26	Γλουταμίνη	440.13 \pm 56.78	437.82 \pm 69.07	NS
27	Γλυκίνη	292.86 \pm 53.47	232.30 \pm 54.93	<0.001
28	Ιστιδίνη	100.90 \pm 24.27	86.83 \pm 19.93	<0.001
29	Υποξανθίνη	19.32 \pm 5.98	14.17 \pm 7.06	<0.001
30	Ινοσίνη	6.02 \pm 0.82	5.79 \pm 0.95	NS
31	Ισοβουτυρικό	9.19 \pm 3.13	10.12 \pm 3.28	NS
32	Ισολευκίνη	57.26 \pm 8.90	55.45 \pm 10.87	NS
33	Γαλακτικό	2388.66 \pm 727.39	2326.54 \pm 819.48	NS
34	Λευκίνη	120.97 \pm 16.21	115.68 \pm 22.86	NS
35	Λυσίνη	170.45 \pm 28.42	163.33 \pm 32.25	NS
36	Μηλονικό	14.31 \pm 3.39	13.80 \pm 4.43	NS
37	Μαννόζη	120.14 \pm 41.99	114.69 \pm 40.03	NS
38	Μεθανόλη	52.10 \pm 18.46	46.92 \pm 19.88	NS
39	Μεθειονίνη	28.38 \pm 5.51	25.36 \pm 5.61	<0.01
40	Μυο-ινοσιτόλη	30.01 \pm 8.66	30.36 \pm 9.14	NS

41	N,N-Διμεθυλογλυκίνη	2.29±0.94	2.06±0.98	NS
42	O-ακετυλοκαρνιτίνη	4.52±1.41	4.70±1.57	NS
43	Ορνιθίνη	31.79±10.39	26.60±9.46	<0.01
44	Φαινυλαλανίνη	81.21±16.06	64.13±14.29	<0.001
45	Προλίνη	173.11±41.93	170.37±48.63	NS
46	Πυροσταφυλικό	119.01±39.60	105.13±32.50	<0.05
47	Σαρκοζίνη	4.89±1.52	3.79±1.82	<0.001
48	Σερίνη	208.51±33.88	189.89±34.96	<0.01
49	Ηλεκτρικό	7.04±1.80	7.48±2.36	NS
50	Ταυρίνη	141.41±39.58	123.81±43.30	<0.05
51	Θρεονίνη	291.61±59.23	310.07±79.27	NS
52	N-οξείδιο τριμεθυλαμίνης	35.45±9.49	31.61±9.90	<0.05
53	Τρυπτοφάνη	51.31±16.18	38.72±16.55	<0.001
54	Τυροσίνη	50.85±8.26	47.39±12.06	NS
55	Βαλίνη	193.94±27.28	198.05±37.34	NS

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι 25 από τους 55 μετρούμενους μεταβολίτες, μεταβλήθηκαν στατιστικά σημαντικά από την παρουσία ΣΔΚ.

Σε σύγκριση με τη φυσιολογική κύηση, οι γυναίκες που διαγνώστηκαν με ΣΔΚ εμφάνισαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα:

- κετονικών σωμάτων (3-υδροξυβουτυρικό και ακετοξικό οξύ),
- του οργανικού οξέος 2-υδροξυβουτυρικό και
- των μεταβολικών ενδιάμεσων προϊόντων των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (BCAAs), 3-υδροξυισοβουτυρικό και 3-υδροξυισοβαλερικό.

Σημαντικά χαμηλότερα, στις ασθενείς με ΣΔΚ, ήταν τα επίπεδα των μεταβολιτών:

- που εμπλέκονται στον κύκλο του ενεργοποιημένου μεθυλίου (One-carbon metabolism-1C) (μεθειονίνη, γλυκίνη, σερίνη, χολίνη, σαρκοζίνη),
- στην παραγωγή ενέργειας (καρνιτίνη και πυροσταφυλικό),
- στο μεταβολισμό των πουρινών (υποξανθίνη),
- των αμινοξέων αργινίνη, ασπαραγίνη, ασπαρτικό, ιστιδίνη, γλουταμινικό, φαινυλαλανίνη και τρυπτοφάνη,
- το προϊόν καταβολισμού των BCAAs, 3-μεθυλ-2-οξοβαλερικό,
- το ενδιάμεσο του κύκλου της ουρίας, ορνιθίνη,
- το 2-αμινοβουτυρικό και
- οι ωσμωτικές ουσίες ταυρίνη και το N-οξείδιο της τριμεθυλαμίνης.

Ένα μοντέλο που περιλαμβάνει τους κλασικούς παράγοντες κινδύνου για ΣΔΚ (ΔΜΣ προ της κήσης, αριθμός προηγούμενων κήσεων, ατομικό ιστορικό ΣΔΚ, κληρονομικό ιστορικό ΣΔ2) είχε μέτρια ικανότητα να προβλέψει την παρουσία ΣΔΚ στον πληθυσμό της παρούσας μελέτης (AUC 0,659, $p < 0,001$). Η προσθήκη στο μοντέλο μεταβολικών δεικτών αντιπροσωπευτικών διαταραχών, σε διάφορες μεταβολικές οδούς (3-υδροξυβουτυρικό, 2-υδροξυβουτυρικό και καρνιτίνη), αύξησε σημαντικά την ικανότητα πρόβλεψης ΣΔΚ του μοντέλου (AUC 0,803, $p < 0,001$).

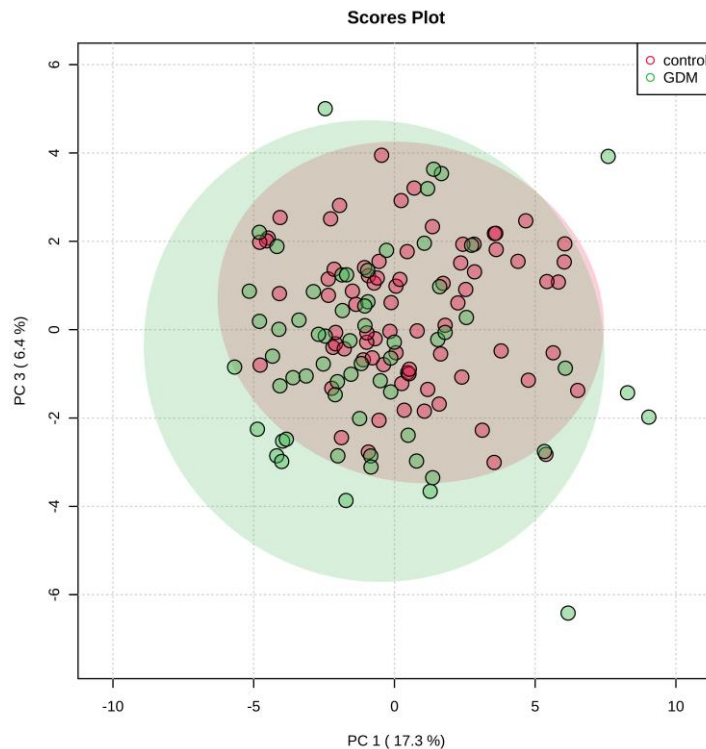
6.3 Μη Στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση (Untargeted analysis)

Πολυπαραγοντική ανάλυση δεδομένων

Για τη μη στοχευμένη ανάλυση, το σύνολο των δεδομένων αποτελούνταν από τις συγκεντρώσεις των μεταβολιτών του ορού που προέρχονταν από όλα τα φάσματα των εγκύων γυναικών (62 με ΣΔΚ και 77 χωρίς ΣΔΚ).

Πριν την πολυπαραγοντική ανάλυση, τα δεδομένα των συγκεντρώσεων των μεταβολιτών ομαλοποιήθηκαν με τη χρήση του Metaboanalyst v.4.0, προκειμένου να βελτιωθεί η συνολική συνοχή των πειραματικών δεδομένων. Αρχικά εφαρμόστηκε μια μη εποπτευόμενη ανάλυση βασικών συστατικών (Principal Component Analysis - PCA) στα δεδομένα για την ανίχνευση οποιασδήποτε τάσης σε κάποια από τις ομάδες του πληθυσμού της μελέτης ή πιθανών ακραίων τιμών (που βρίσκονται εκτός του διαστήματος εμπιστοσύνης 95% του μοντέλου).

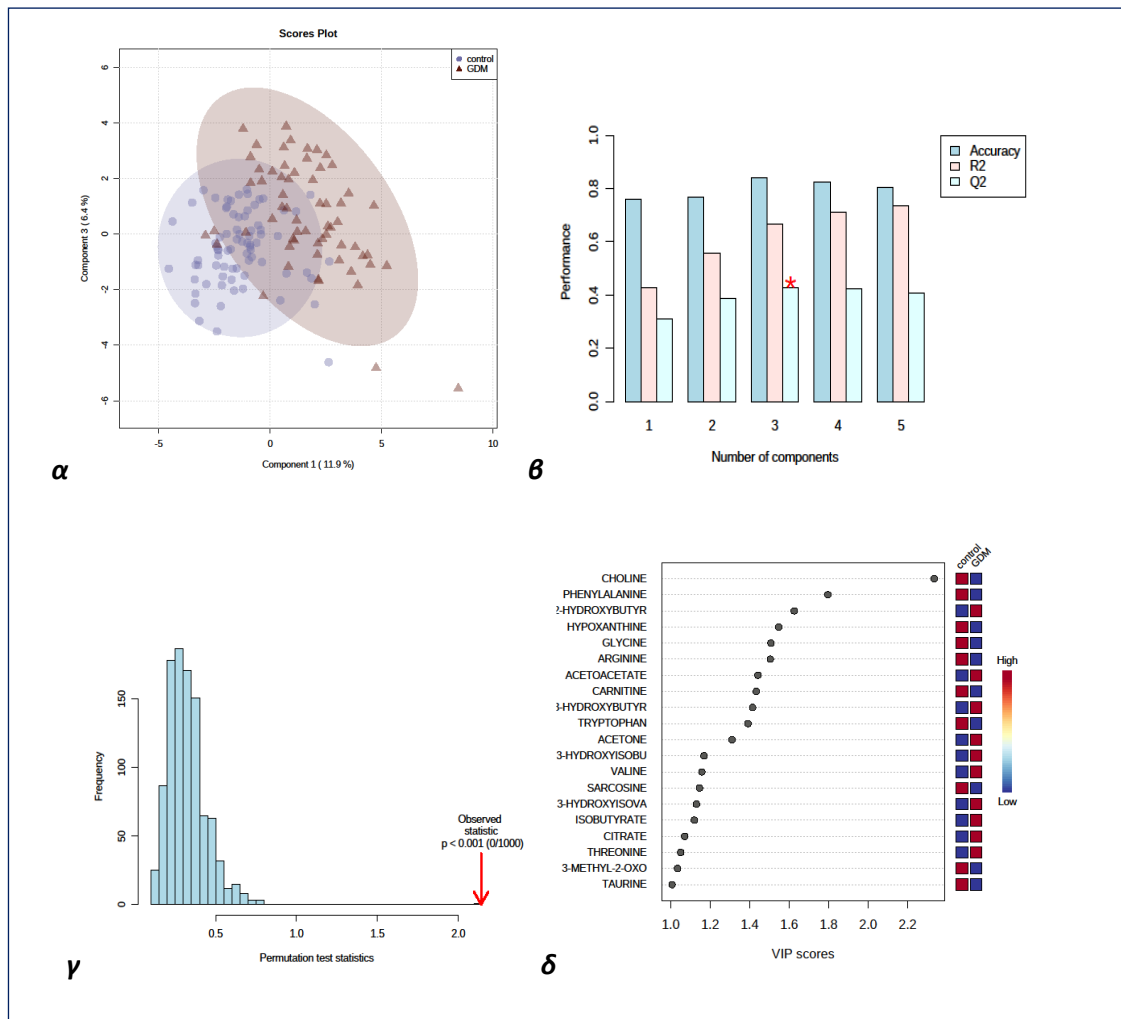
Το αρχικό διάγραμμα PCA που ελήφθη δεν έδειξε τάση διαχωρισμού μεταξύ των δύο ομάδων που μελετήθηκαν (Σχ. 6.2) και επισήμανε 5 ακραίες τιμές στην ομάδα του ΣΔΚ, με σχετικά υψηλά αλλά όχι ασυνήθιστα επίπεδα αλανίνης, ταυρίνης, 2-οξοϊσοκαπροϊκού, 2-οξοκαπροϊκού και σερίνης. Επομένως τα δείγματα αυτά δεν αποκλείστηκαν από τη μελέτη.



Σχ. 6.2. Ανάλυση PCA που λήφθηκε για τις 62 γυναίκες με ΣΔΚ και τις 77 υγιείς έγκυες γυναίκες

Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε εποπτευόμενη πολυπαραγοντική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων, PLS-DA, και παρατηρήθηκε καλός διαχωρισμός, με έναν βαθμό επικάλυψης, μεταξύ των γυναικών με ΣΔΚ και της ομάδας ελέγχου στις γραφικές παραστάσεις μοντέλου PLS-DA (Σχ.6.2α). Αυτός ο διαχωρισμός εκτιμάται με βάση τις δύο παραμέτρους ποιότητας, $R^2=0,667$, για την εξηγούμενη παραλλαγή και $Q^2=0,429$, προγνωστική ικανότητα του μοντέλου (Σχ.6.2β). Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές μετάθεσης ($n=1000$ επαναλήψεις) και η παρατηρούμενη τιμή p ($p < 0,01$) επιβεβαίωσε επίσης την εγκυρότητα του μοντέλου (Σχ.6.2γ). Επίσης, οι βαθμολογίες VIP (Μεταβλητή σημασία στην προβολή) χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό των μεταβολιτών που κυρίως συμβάλλουν στο διαχωρισμό που παρατηρείται στις γραφικές παραστάσεις του μοντέλου PLS-DA (Σχ.6.2δ). Μεταξύ των δεκαπέντε κορυφαίων μεταβολιτών, με την υψηλότερη σημασία στην ομαδική διάκριση, σύμφωνα με τις βαθμολογίες VIP ($VIP \geq 1,0$), η χολίνη, η φαινυλαλανίνη, η γλυκίνη, η αργινίνη, η καρνιτίνη, η τρυπτοφάνη, η σαρκοζίνη, το 3-μεθυλο-2-οξοβαλερικό και η ταυρίνη παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα στα δείγματα γυναικών με ΣΔΚ, ενώ το 2-υδροξυβουτυρικό, το ακετοξικό οξύ, το 3-υδροξυβουτυρικό, η ακετόνη, το 3-υδροξυισοβουτυρικό, η βαλίνη, το 3-υδροξυισοβαλερικό, το ισοβουτυρικό, το κιτρικό και η θρεονίνη παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα στην ίδια ομάδα ΣΔΚ σε σύγκριση με τους μάρτυρες.

Σχ.6.2. Ανάλυση πολλαπλών μεταβλητών PLS-DA που λήφθηκε για τις 62 γυναίκες με ΣΔΚ και τις 77 υγιείς έγκυες γυναίκες



Οι διαφορές που παρατηρούνται στα αποτελέσματα της μελέτης, μεταξύ των τυπικών ποσοτικών προσδιορισμών και της μεταβολομικής ανάλυσης, οφείλονται κυρίως στο ότι η τεχνική αναγνώριση των προτύπων λαμβάνει υπόψη τον προσδιορισμό των μεταβολιτών και όλων των πιθανών παραγόντων σύγχυσης, όπως η ενδοατομική διακύμανση, το συστηματικό σφάλμα κ.λπ.

7. Συζήτηση

Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήσαμε στοχευμένη και μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση βασισμένη σε φασματοσκοπία NMR, για να προσδιορίσουμε το μεταβολικό προφίλ ορού εγκύων με ΣΔΚ και να το συγκρίνουμε με αυτό των εγκύων χωρίς ΣΔΚ. Πραγματοποιήσαμε ποσοτική ανάλυση επιλεγμένων μεταβολιτών, καθώς και μη στοχευμένη ανάλυση του συνολικού μεταβολικού προφίλ, με σκοπό να αποκτηθούν πιθανές νέες γνώσεις σχετικά με τις μεταβολικές οδούς που τροποποιούνται ειδικά στο ΣΔΚ και να ανιχνεύσουμε πιθανούς βιοδείκτες που σχετίζονται με τη μητρική δυσανεξία στη γλυκόζη.

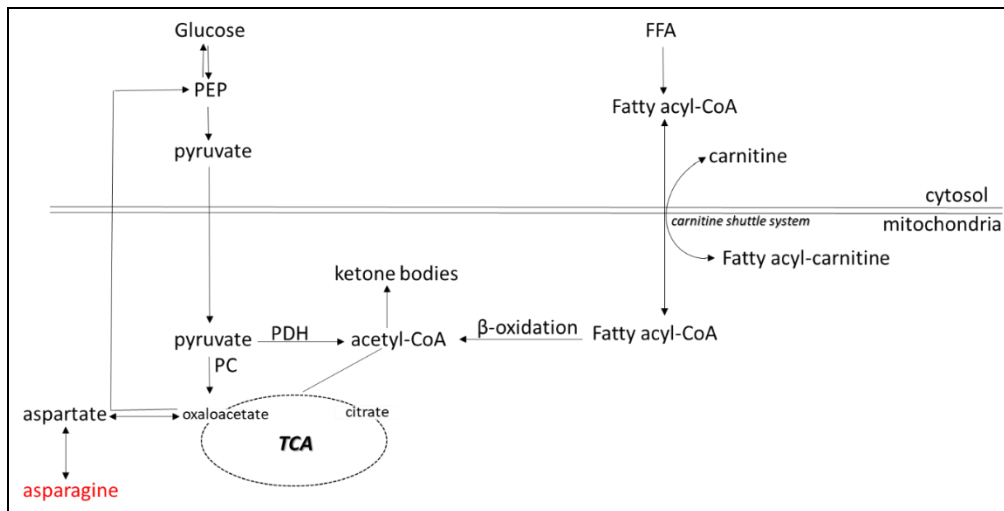
Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίων (^1H NMR) είναι ένα από τα προτιμώμενα εργαλεία για τη μεταβολομική ανάλυση βιολογικών υγρών. Είναι μια γρήγορη τεχνική με υψηλή επαναληψιμότητα που απαιτεί ελάχιστη προεργασία του δείγματος. Παρέχει ένα συνολικό ποιοτικό και ποσοτικό μεταβολικό προφίλ των συστατικών που περιέχονται στο δείγμα, των οποίων το σήμα που παράγεται είναι ανάλογο με τη δομή τους και η έντασή του ανάλογη με τη συγκέντρωσή τους.

Στον ορό ή το πλάσμα, οι ευρείες κορυφές που παράγονται από μακρομόρια (π.χ. πρωτεΐνες και λιπίδια) υπερέχουν στο φάσμα NMR, αποκρύπτοντας τα συστατικά χαμηλού μοριακού βάρους και επομένως μειώνοντας την ακρίβεια του ποσοτικού προσδιορισμού για συγκεκριμένους μεταβολίτες. Για να ξεπεράσουμε αυτόν τον περιορισμό, στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήσαμε μια μέθοδο υπερδιήθησης, με την οποία η απομάκρυνση των μακρομορίων οδήγησε σε ένα πιο πλούσιο και καλά διακριτό μεταβολικό προφίλ, μέσω του οποίου μπορέσαμε να αναγνωρίσουμε και να ποσοτικοποιήσουμε 55 μεταβολίτες. Αυτές οι εμπλουτισμένες πληροφορίες επέτρεψαν μια πιο αξιόπιστη πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση και, το πιο σημαντικό, έναν ακριβέστερο χαρακτηρισμό των μεταβολικών οδών που διαταράσσονται στο ΣΔΚ. Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε επίσης πιθανές ομοιότητες και διαφορές του μεταβολικού προφίλ μεταξύ ΣΔΚ και ΣΔ2. Τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν ότι οι μεταβολικές οδοί που επηρεάζονται στο ΣΔΚ με τρόπο παρόμοιο με αυτόν που επηρεάζονται στο ΣΔ2 είναι η β-οξειδωση, ο μεταβολισμός των κετονοσωμάτων, ο κύκλος ενεργοποιημένου μεθυλίου, ο μεταβολισμός της αργινίνης και της ορνιθίνης. Αντίθετα, ο καταβολισμός των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσού (BCAA), ο μεταβολισμός των αρωματικών αμινοξέων και η μικροχλωρίδα του εντέρου φαίνεται να επηρεάζονται αλλά με διαφορετικό τρόπο από ότι στο ΣΔ2.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, το μεταβολικό προφίλ του ορού του αίματος των γυναικών με ΣΔΚ εμφανίζει διακριτές διαφορές σε σύγκριση με το μεταβολικό προφίλ των γυναικών με φυσιολογική κύηση, με ελάχιστη επικάλυψη.

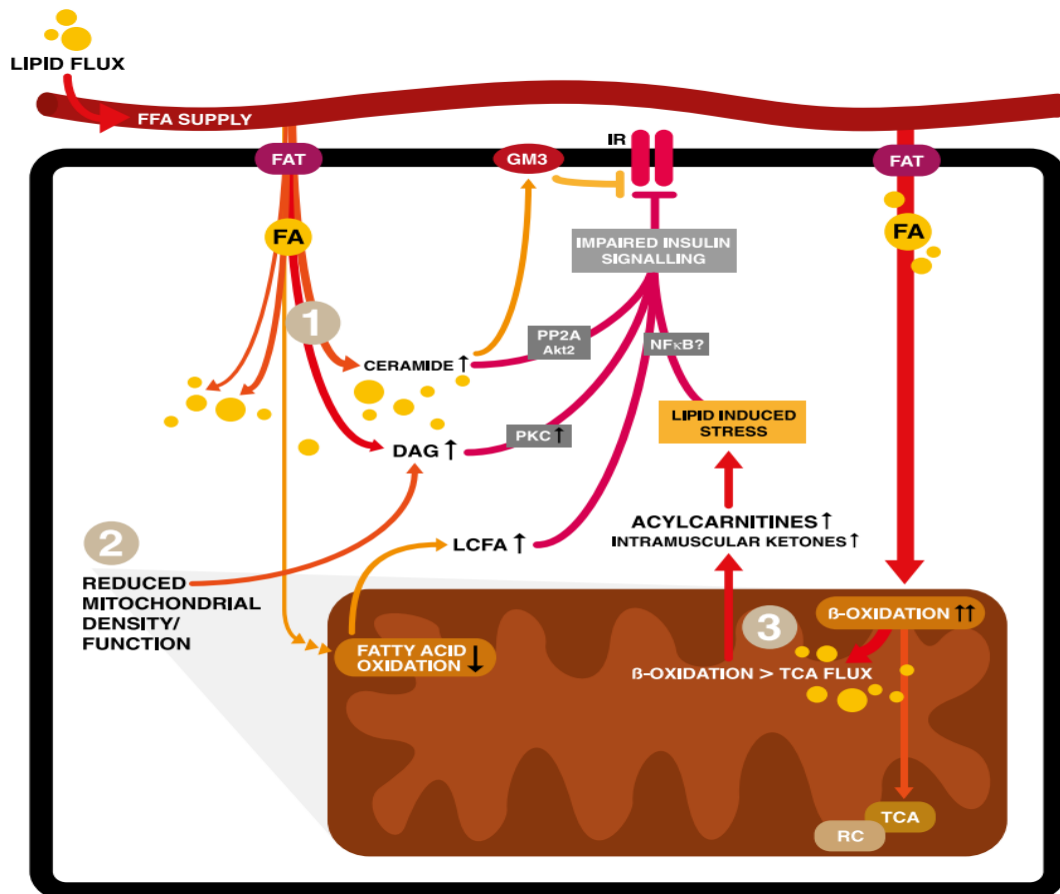
Στη μελέτη μας τα επίπεδα καρνιτίνης στον ορό βρέθηκαν σημαντικά μειωμένα σε γυναίκες με ΣΔΚ, μια παρατήρηση που συνάδει με τα ευρήματα παρόμοιων μελετών.(98, 99)

Η καρνιτίνη είναι ένας βασικός μεταβολίτης που προσλαμβάνεται με τη διατροφή και μπορεί επίσης να συντίθεται από τα αμινοξέα λυσίνη και μεθειονίνη. Παίζει καθοριστικό ρόλο στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων και στην παραγωγή ενέργειας, ενώ η ανεπάρκεια καρνιτίνης οδηγεί σε διαταραχή του μεταβολισμού των λιπιδίων.(100-102) Η πιο σημαντική λειτουργία της καρνιτίνης, στα θηλαστικά, είναι η μεταφορά λιπαρών οξέων μακράς αλυσού στα μιτοχόνδρια, ως παράγωγα ακυλο-καρνιτίνης, για την παραγωγή ATP μέσω του κύκλου του Krebs (β-οξειδωση) ή για τη σύνθεση κετονικών σωμάτων. **(Εικ. 7.1)** (103)



Εικ.7.1. Μεταβολικές οδοί που επηρεάζονται στο ΣΔΚ (μεταβολισμός πυροσταφυλικού οξέος, βήτα-οξείδωση, μεταβολισμός κετονών)

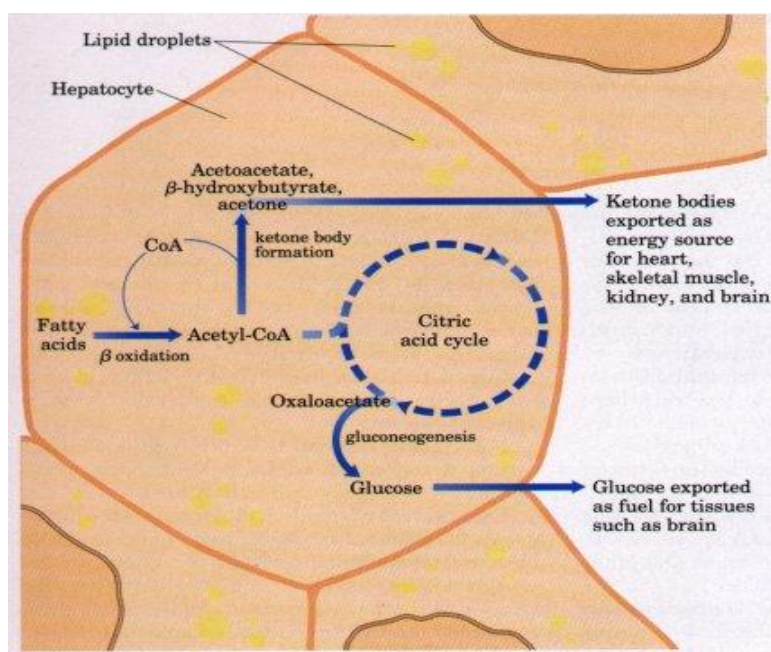
Επομένως, η κατανάλωση καρνιτίνης κατά τη μεταφορά ακυλο-ομάδων και στη συνέχεια ως αποδέκτης περίσσειας ακετυλο-ομάδων από αυτή τη διαδικασία μπορεί να οδηγήσει στη μείωση της συγκέντρωσής της στη συστηματική κυκλοφορία. Αναφέρεται ότι κατά τη διάρκεια της κύησης τα επίπεδα καρνιτίνης στο πλάσμα μειώνονται.(104,105) Αυτό μπορεί να αντανακλά αυξημένη απομάκρυνση από τη μητρική κυκλοφορία μέσω του πλακούντα, για να τροφοδοτήσει τη β-οξείδωση για τη φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρύου.(106,107) Επιπλέον, στην προχωρημένη κύηση, η ικανότητα της ινσουλίνης να καταστέλλει τη λιπόλυση στον λιπώδη ιστό μειώνεται, με αποτέλεσμα την αυξημένη απελευθέρωση μη εστεροποιημένων λιπαρών οξέων (NEFAs) στη μητρική κυκλοφορία και κατά συνέπεια υψηλότερη κατανάλωση καρνιτίνης(108), ένα φαινόμενο που ενισχύεται στο ΣΔΚ πιθανώς λόγω μειωμένων επιπέδων του υποστρώματος του υποδοχέα ινσουλίνης 1 (IRS-1).(109,110) Ως αποτέλεσμα, ο ρυθμιστικός ρόλος της καρνιτίνης στην αυξημένη β-οξείδωση, που συνοδεύει το ΣΔΚ, μπορεί να είναι η κύρια αιτία των μειωμένων επιπέδων καρνιτίνης στις γυναίκες με ΣΔΚ της μελέτη μας. Αρκετές μελέτες αποκάλυψαν ότι η «υπερπροσφορά λιπιδίων» προκαλεί ή επιδεινώνει την αντίσταση στην ινσουλίνη μέσω πολλαπλών μηχανισμών, όπως η συσσώρευση ενδοκυτταρικών λιπιδίων σε πολλούς ιστούς.(111) Πιο συγκεκριμένα, η συσσώρευση ατελώς μεταβολισμένων λιπαρών οξέων στους μύς που προκαλούν «μιτοχονδριακό στρες» αναστέλλει τόσο τη σηματοδότηση της ινσουλίνης όσο και την οξείδωση της γλυκόζης. **(Εικ.7.2)**



Εικ.7.2. Μετά τη μεταφορά στο κύτταρο, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (FA) μπορούν να αποθηκευτούν, να οξειδωθούν ή να χρησιμοποιηθούν ως δομικά στοιχεία και σηματοδοτικά μόρια. Η αυξημένη παροχή λιπιδίων και η επακόλουθη συσσώρευσή τους σε ινσουλινοευσίθητους ιστούς, όπως οι σκελετικοί μύες, φαίνεται να επιδρούν σε διαφορετικές μεταβολικές οδούς που ανταποκρίνονται στην ινσουλίνη μέσω διαφόρων μηχανισμών. Πρώτον (1), η αυξημένη ενδοκυτταρική περιεκτικότητα λιπιδίων αναστέλλει τη σηματοδότηση της ινσουλίνης μέσω ενδιάμεσων λιπιδίων όπως κεραμίδια, διακυλ-γλυκερόλη (DAG) ή γαγγλιωσίδες (GM3) μέσω επιδράσεων στην πρωτεΐνη φωσφατάση A2 (PPA2), στην πρωτεϊνική κινάση B (Akt) και την πρωτεϊνική κινάση C (PKC), ή επιδράσεις στον υποδοχέα ινσουλίνης στην κυτταρική μεμβράνη. Ο δεύτερος μηχανισμός (2) είναι ο μειωμένος αριθμός λειτουργικών μιτοχονδρίων με αποτέλεσμα χαμηλότερους ρυθμούς οξείδωσης των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FAO) και αυξημένη συσσώρευση κυτταροπλασματικών λιπιδίων, παρεμβαίνοντας και πάλι στην ευαισθησία στην ινσουλίνη. Τέλος (3), η μεταβολική υπερφόρτωση των μιτοχονδρίων οδηγεί σε ατελή β-οξείδωση. Σε αυτό το σχήμα, η οξείδωση των λιπαρών οξέων ξεπερνά τον TCA και την αναπνευστική αλυσίδα (RC), με αποτέλεσμα την ενδο μιτοχονδριακή συσσώρευση των ενδιάμεσων FAO όπως οι ακυλκαρνιτίνες. Αυτά στη συνέχεια επηρεάζουν τη σηματοδότηση της έκκρισης ινσουλίνης. [Προσαρμοσμένο από (112)]

Με αυτόν τον τρόπο, παράγοντες που μειώνουν αυτή τη συσσώρευση, όπως τα συμπληρώματα καρνιτίνης, θα μπορούσαν να είναι ωφέλιμοι στη θεραπεία ή/και στην πρόληψη της αντίστασης στην ινσουλίνη και του ΣΔ2. Αυτή η συσχέτιση μεταξύ των μειωμένων επιπέδων ελεύθερης καρνιτίνης και της διαταραγμένης ομοιόστασης της γλυκόζης είναι επίσης ένα κοινό εύρημα σε ασθενείς με ΣΔ2.(113)

Στα μιτοχόνδρια των ηπατικών κυττάρων, το ακετυλο-CoA που προέρχεται από τη β-οξείδωση των NEFAs (**Εικ.7.3**) ή από οξείδωση του πυροσταφυλικού, μέσω της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDH), (**Εικ.7.1**) οξειδώνεται μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος (tricarboxylic acid cycle, TCA) ή χρησιμοποιείται για τη σύνθεση κετονοσωμάτων. Το οξαλοξικό, ένα μόριο ζωτικής σημασίας για την είσοδο του ακετυλο-CoA στον κύκλο του Krebs, μπορεί να προκύψει από καρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος (με την πυροσταφυλική καρβοξυλάση, PC) ή από τρανσαμίνωση του ασπαρτικού οξέος. (**Εικ.7.1**) Η χαμηλή διαθεσιμότητα του οξαλοξικού μειώνει την ικανότητα του ακετυλο-CoA να εισέλθει στον κύκλο του TCA οδηγώντας σε αυξημένη παραγωγή κετονοσωμάτων. Αυτή η εξάντληση του οξαλοξικού μπορεί να οφείλεται σε αυξημένη γλυκονεογένεση, ένα πολύ γνωστό χαρακτηριστικό του ΣΔΚ.(98,114) Έτσι, μια μεγάλη ποσότητα οξαλοξικού μετασχηματίζεται σε γλυκόζη, αφήνοντας μικρές ποσότητες αυτού να συνδεθούν με το ακετυλο-CoA και να εισέλθουν στον κύκλο του TCA. Αυτή η παρέκκλιση πορείας, προς την παραγωγή κετονοσωμάτων, ενισχύεται περαιτέρω σε περιπτώσεις ταχείας και πλεονάζουσας παραγωγής ακετυλο-CoA από λιπαρά οξέα που προκύπτουν από μειωμένη πρόσληψη υδατανθράκων, παρατεταμένη και υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ και/ή ανεπάρκεια και αντίσταση στην ινσουλίνη.



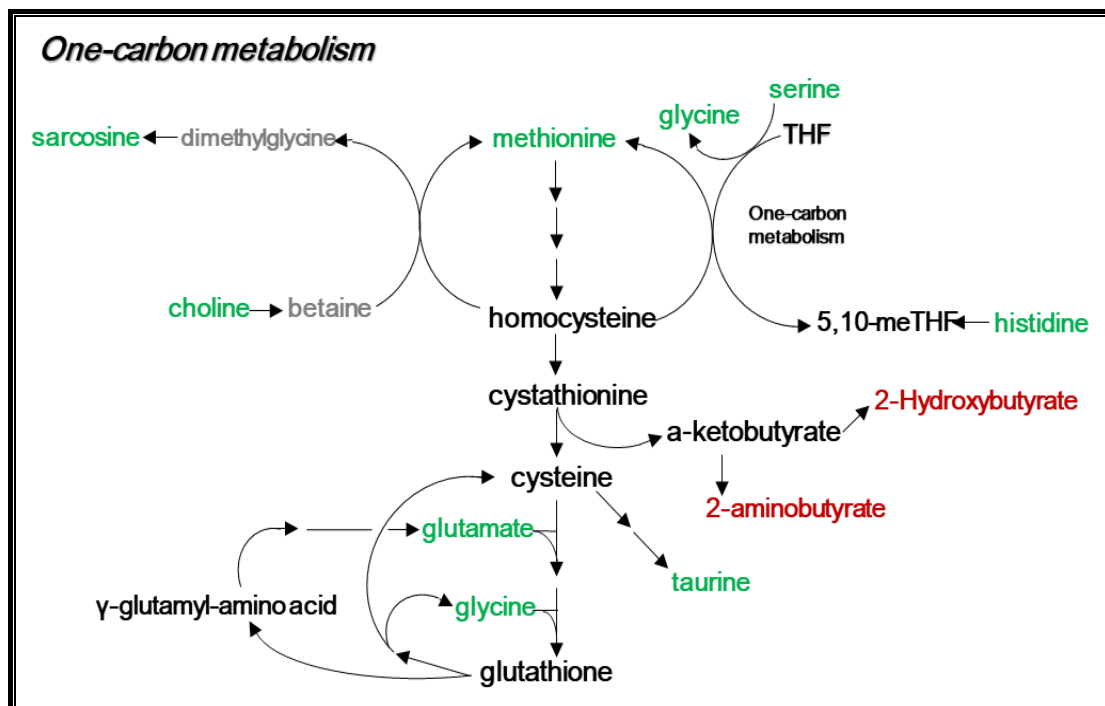
Εικ.7.3. Σχηματισμός κετονών και έξοδος από το ήπαρ. Συνθήκες που αυξάνουν τη γλυκονεογένεση (διαβήτης, νηστεία) επιβραδύνουν τον κύκλο του TCA (μειώνοντας το οξαλοξικό) και ενισχύουν τη μετατροπή του acetyl-CoA σε ακετοξικό. Το απελευθερούμενο συνένζυμο A επιτρέπει τη συνεχιζόμενη β οξείδωση των λιπαρών οξέων. [Προσαρμοσμένο από (115)]

Έτσι, η χαμηλή διαθεσιμότητα οξαλοξικού μπορεί να συμβάλει στα στατιστικά αυξημένα επίπεδα κετονικών σωμάτων (3-υδροξυβουτυρικό, ακετοξικό) που βρέθηκαν στις γυναίκες με ΣΔΚ στην παρούσα μελέτη. Αυτό αποτελεί κοινό εύρημα μεταβολομικών μελετών σε γυναίκες με ΣΔΚ, σε διαφορετικά στάδια

κύησης.[(98),116-119]] Στο ΣΔ2, η συσχέτιση των κετονικών σωμάτων με την ευαισθησία στην ινσουλίνη δεν είναι ξεκάθαρη. Οι Mahendran et al.(120) αποδίδουν αυτή τη διαφορά στην παρουσία ή απουσία του αλληλόμορφου C του γονιδίου GCKR, που κωδικοποιεί τη ρυθμιστική πρωτεΐνη της γλυκοκινάσης και η παρουσία του σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα τόσο της γλυκόζης νηστείας, όσο και του 3-υδροξυβουτυρικού.

Στη μελέτη μας βρέθηκαν, για πρώτη φορά, σημαντικά μειωμένα επίπεδα ασπαρτικού οξέος στην ομάδα του ΣΔΚ, υποδηλώνοντας μια προσπάθεια για παραγωγή οξαλοξικού οξέος. (Εικ.7.1) Επιπλέον, παρατηρήθηκαν, για πρώτη φορά, σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα ασπαραγίνης, ενός μη απαραίτητου αμινοξέος, που μπορεί να οφείλονται στη χαμηλή διαθεσιμότητα των προδρόμων ουσιών, ασπαρτικού και οξαλοξικού οξέος. Στη μελέτη Malmo Preventive Project, οι Ottosson et al.(121) διαπίστωσαν ότι τα χαμηλά επίπεδα ασπαραγίνης στην κυκλοφορία σχετίζονται με τη συχνότητα εμφάνισης ΣΔ2 και στεφανιαίας νόσου. Επιπρόσθετα, το ασπαρτικό βρέθηκε μεταξύ των αμινοξέων που σχετίζονται σημαντικά με μειωμένη έκκριση ινσουλίνης στη μελέτη METSIM.(122)

Ο κύκλος ενεργοποιημένου μεθυλίου (One carbon metabolism-1C) αποτελεί μια σειρά αλληλένδετων μεταβολικών οδών που μεταφέρουν μεθυλομάδες και περιλαμβάνει τον κύκλο του φυλλικού οξέος, τον κύκλο της μεθειονίνης και τις διεργασίες μεταφοράς θείου από την ομοκυστεΐνη στην κυστεΐνη, μέσω κυσταθειονίνης (η μόνη οδός για τη βιοσύνθεση της κυστεΐνης). (Εικ.7.4) (123)



Εικ.7.4. Ο κύκλος του ενεργοποιημένου μεθυλίου (One carbon metabolism-1C). Πράσινο: σημαντική μείωση στο ΣΔΚ, κόκκινο: σημαντική αύξηση στο ΣΔΚ

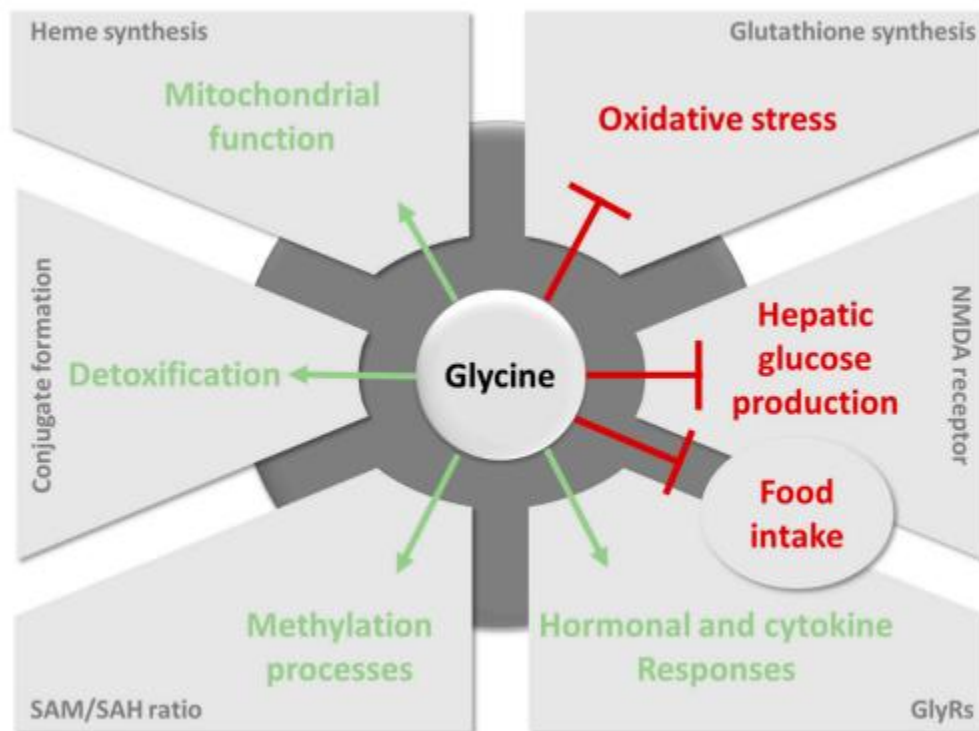
Ο κύκλος του ενεργοποιημένου μεθυλίου κατέχει κεντρική θέση στην κυτταρική λειτουργία. Είναι απαραίτητος για πολλές κυτταρικές διεργασίες όπως αντιδράσεις μεθυλίωσης, αντιγραφή DNA, ομοιοστάση αμινοξέων (γλυκίνη, σερίνη, μεθειονίνη και ιστιδίνη) και στη ρύθμιση της οξειδωτικού στρες.(124)

Οι μεταβολικές αντιδράσεις του 1C διαμερισματοποιούνται διότι το φυλλικό οξύ δεν διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες, έτσι στοιχεία του πρέπει να παράγονται τόσο στα μιτοχόνδρια όσο και στο κυτταρόπλασμα.

Η κυτταροπλασματική δεξαμενή του 1C μπορεί να τροφοδοτηθεί απευθείας με την αντιστρεπτή μετατροπή της σερίνης σε γλυκίνη ή μέσω της οδού αποδόμησης της ιστιδίνης, στην οποία σχηματίζεται 5,10-μεθυλενο-τετραϋδροφυλλικό (THF), ένα ενδιάμεσο του κύκλου του φυλλικού οξέος.(125) Στα μιτοχόνδρια, οι μονάδες του 1C μπορούν να παρέχονται επίσης από τη μετατροπή της σερίνης σε γλυκίνη.(126) Η μεθειονίνη είναι επίσης πηγή μεθυλ-ομάδων μέσω της μετατροπής της σε S-αδενοσυλομεθειονίνη (SAM), τον δραστικό μεθυλο-φορέα που εμπλέκεται σε πολλές κυτταρικές αντιδράσεις, η οποία κατά συνέπεια μετατρέπεται σε S-αδενοσυλοομοκυστεΐνη (SAH).(127,128) Αναφέρεται ότι τα επίπεδα μεθειονίνης ρυθμίζουν την αναλογία SAM προς SAH η οποία επηρεάζει πολλές αντιδράσεις μεθυλίωσης, όπως η μεθυλίωση των ιστονών.(129)

Στη φυσιολογική κύηση, η ανεπάρκεια του 1C είναι πιο έκδηλη κατά την ενδομήτρια ανάπτυξη και η ανεπάρκεια του φυλλικού οξέος έχει συνδεθεί με επιπλοκές της κύησης, όπως πρόωρος τοκετός και διαταραχές σύγκλισης του νευρικού σωλήνα.(130,131) Επιπλέον, προτείνεται ότι η κινητική του φυλλικού οξέος είναι μη γραμμική και παρουσιάζει διακυμάνσεις με την ηλικία κύησης, αλλά η ασυμφωνία αυτών των ευρημάτων με άλλες μελέτες αφήνει ανοιχτά ερωτήματα σχετικά με την επίδραση της κύησης στον μεταβολισμό του 1C.(132-135) Στη μελέτη μας, τα συστατικά του 1C (σερίνη, γλυκίνη, μεθειονίνη, ιστιδίνη) βρέθηκαν σημαντικά μειωμένα στις γυναίκες με ΣΔΚ σε σύγκριση με τις υγιείς, εύρημα που υποδηλώνει ότι ο 1C μπορεί να επηρεαστεί ακόμη περισσότερο στην κύηση που επιπλέκεται με διαβήτη, σε σχέση με τη φυσιολογική. Ο διαταραγμένος μεταβολισμός 1C παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο ΣΔ2. Κρίσιμος φαίνεται να είναι και ο ρόλος του στην αύξηση του κίνδυνου ανάπτυξης διαβήτη και παχυσαρκίας στην ενήλικη ζωή, μέσω του εμβρυϊκού αναπτυξιακού προγραμματισμού.(136,137)

Ο ΣΔΚ είναι μια κατάσταση που σχετίζεται με αυξημένο οξειδωτικό στρες. Οπλακώντας γυναικών με ΣΔΚ έχει τη δυνατότητα να αυξήσει τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του για να μειώσει την οξειδωτική βλάβη (138), μια διαδικασία που οδηγεί σε αυξημένη βιοσύνθεση γλουταθειόνης. **(Εικ.7.5)**



Εικ.7.5. Τα μεταβολικά οφέλη που προκαλούνται από τη γλυκίνη περιλαμβάνουν την αναστολή του οξειδωτικού στρες μέσω της αυξημένης βιοσύνθεσης γλουταθειόνης, την αναστολή της γλυκονογένεσης και της πρόσληψη τροφής μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα NMDA. Η γλυκίνη ασκεί επίσης θετικά αποτελέσματα στη μιτοχονδριακή δραστηριότητα μέσω της βιοσύνθεσης της αίμης, των διεργασιών αποτοξίνωσης μέσω της απέκκρισης των συζυγών γλυκίνης στα ούρα, της ορμονικής ρύθμισης (ενισχυμένη έκκριση βασικών ορμονών στην ομοιόσταση της γλυκόζης) και της μειωμένης παραγωγής προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Τέλος, η γλυκίνη επηρεάζει τη βιοσυνθετική διαδικασία SAM, μειώνοντας τη διαθεσιμότητα μεθυλ-δοτών, και άρα ρυθμίζοντας τη μεθυλίωση. Τα ευνοϊκά μονοπάτια που προκαλούνται από τη γλυκίνη είναι πράσινα. Οι επιβλαβείς οδοί που αναστέλλονται από τη γλυκίνη είναι κόκκινες. Σημείωση: NMDA = N-methyl-D-aspartate SAM = S-αδενοσυλομεθειονίνη; SAH = S-αδενοσυλοομοκυστεΐνη. [Προσαρμοσμένο από (139)]

Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται από τα μειωμένα επίπεδα γλυκίνης και γλουταμικού στη μελέτη μας, τα οποία είναι πρόδρομες ουσίες για τη σύνθεση γλουταθειόνης. Επιπλέον, η γλυκίνη αποτελεί ένα γλυκονογενετικό υπόστρωμα και τα μειωμένα επίπεδά της στο ΣΔΚ, μπορεί να αντικατοπτρίζουν την αυξημένη γλυκονογένεση.(98) Σε αρκετές μελέτες βρέθηκαν μειωμένα επίπεδα γλυκίνης σε ασθενείς με μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη, ΣΔ2 καθώς και σε κήσεις με ΣΔΚ.(98,139) Η σύνθεση της γλυκίνης από τη σερίνη διαμερισματοποιείται και καταλύεται από την υδροξυ-μεθυλο-τρανσφεράση της σερίνης (SHMT). Η SHMT, στον ανθρώπινο πλακούντα, φαίνεται να είναι σημαντικό ένζυμο για την κάλυψη των αναγκών σε γλυκίνη για την ανάπτυξη του εμβρύου.

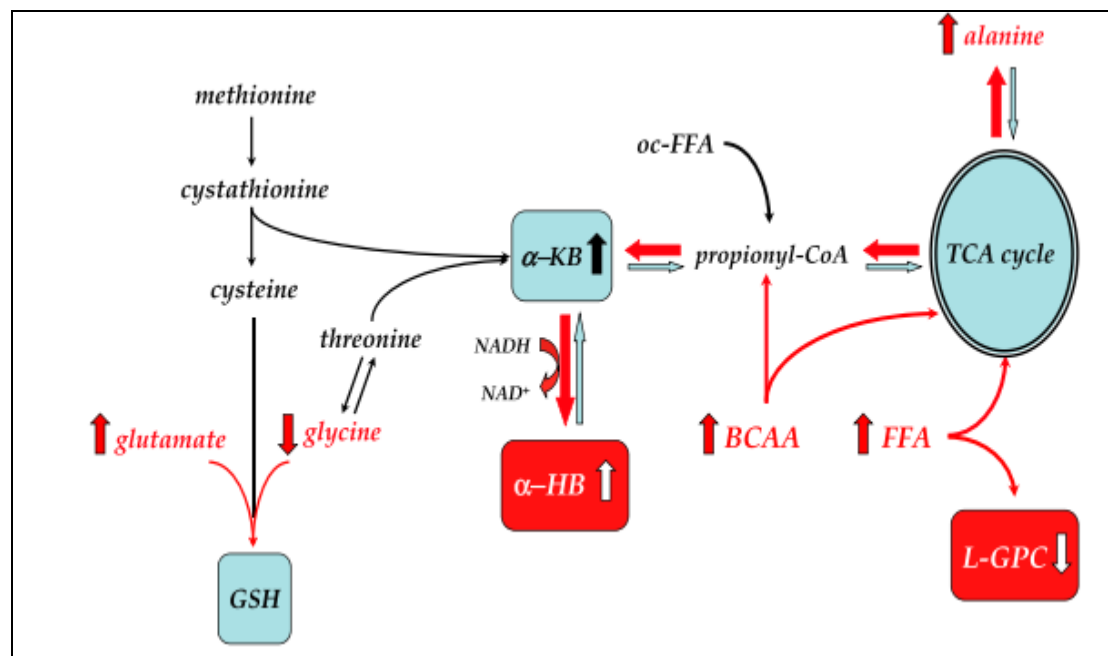
Ωστόσο, δεν έχουν αναφερθεί αλλαγές στον ρυθμό μετατροπής της σερίνης σε γλυκίνη στην παχυσαρκία και τις σχετιζόμενες μεταβολικές διαταραχές. Η μείωση των επιπέδων της σερίνης στο πλάσμα, που αναφέρεται σε αυτές τις καταστάσεις, μπορεί να υποδηλώνει πιθανή μείωση της δραστηριότητας αυτής της οδού.(139) Τα

σημαντικά μειωμένα επίπεδα υποξανθίνης στις γυναίκες με ΣΔΚ, μπορεί να αντικατοπτρίζουν διαταραχές στην de novo σύνθεση των πουρινών, λόγω της έλλειψης συστατικών του 1C.(140)

Ο καταβολισμός της θρεονίνης, της μεθειονίνης καθώς και της κυσταθειονίνης παράγει 2-κετοβουτυρικό (2-KB ή α -KB) που μπορεί περαιτέρω να καταβolicτεί σε προπιονυλ-CoA, ή 2-αμινοβουτυρικό ή 2-υδροξυβουτυρικό (2-HB ή α -HB).(141,142) Το οργανικό οξύ α -HB είναι ένα σημαντικό συστατικό του ενδιάμεσου μεταβολισμού που μπορεί να αυξηθεί παρουσία υψηλής αναλογίας NADH/NAD⁺ και ζήτησης για σύνθεση γλουταθειόνης.(141) (Εικ.7.6)

Πρόσφατες μελέτες έχουν επισημάνει ότι το α -HB μπορεί να είναι ένας πρώιμος δείκτης αντίστασης στην ινσουλίνη και διαταραχών του μεταβολισμού της γλυκόζης, καθώς και ότι τα αυξημένα επίπεδά του στο ΣΔΚ μπορεί να υποδηλώνουν υψηλότερο κίνδυνο για μελλοντική ανάπτυξη ΣΔ2.(116,143,144)

Στη μελέτη μας, σε συμφωνία με τα ευρήματα προηγούμενων μελετών, βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα α -HB στην ομάδα του ΣΔΚ. Επιπλέον, για πρώτη φορά αναφέρουμε μειωμένα επίπεδα 2-αμινοβουτυρικού, σε αυτή την ομάδα ασθενών. Αυτά τα ευρήματα, που υποδεικνύουν μια προτίμηση στο σχηματισμό α -HB αντί του 2-αμινοβουτυρικού από το 2-κετοβουτυρικό, μπορεί να προκύπτουν από: 1) υψηλότερο λόγο NADH/NAD⁺, λόγω αυξημένης οξειδωσης λιπιδίων και 2) αυξημένο οξειδωτικό στρες από αυξημένες ελεύθερες ρίζες και/ή μια διαταραχή στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς που συνοδεύουν την κύηση με ΣΔΚ.(145)



Εικ.7.6. Η μεταβολική οδός που χαρακτηρίζει τα α -HB και L-GPC. Οι μη μετρημένοι μεταβολίτες είναι με πλάγια γραφή και οι στατιστικά σημαντικές υποδεικνύονται με κόκκινο. α -KB: α -κετοβουτυρικό, L-GPC: λινολεοϋλ-γλυκεροφωσφοχολίνη, GSH: γλουταθειόνη. Τα αυξημένα επίπεδα α -HB και τα μειωμένα επίπεδα L-GPC αποτελούν ενδείξεις μεταβολικής υπερφόρτωσης (αυξημένη αναλογία NADH/NAD⁺) και μειωμένου μεταβολισμού γλυκόζης τόσο στην ινσουλinoαντίσταση όσο και στις πρώτες φάσεις της δυσγλυκαιμίας. [Προσαρμοσμένο από (144)]

Στην παρούσα μελέτη, βρέθηκαν σημαντικά μειωμένα επίπεδα ταυρίνης στις γυναίκες με ΣΔΚ. Η ταυρίνη είναι ένα θειούχο, ενδοκυττάριο αμινοξύ που δεν ενσωματώνεται σε καμία πρωτεΐνη, αλλά είναι ευρέως κατανεμημένο σε όλους τους ζωικούς ιστούς ως ελεύθερο αμινοξύ, που εμπλέκεται σε πολλές σημαντικές φυσιολογικές λειτουργίες.(146) Τα επίπεδα της ταυρίνης ρυθμίζονται τόσο από την πρόσληψη, μέσω του μεταφορέα ταυρίνης, όσο και από την ενδογενή σύνθεση από μεθειονίνη και κυστεΐνη. Εκτός από κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της οσμωτικότητας των κυττάρων, η ταυρίνη παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκκρισης ινσουλίνης, δρώντας μέσω, άγνωστων εν μέρει μηχανισμών.(147) Θεωρείται ότι η ταυρίνη είναι ένα απαραίτητο αμινοξύ για την ανάπτυξη των εμβρυϊκών νησιδίων του παγκρέατος, τα οποία περιέχουν πολύ υψηλά επίπεδα ταυρίνης, που εντοπίζονται κυρίως στα μη β-κύτταρα και ότι η έλλειψη ταυρίνης κατά την ανάπτυξη του εμβρύου θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη ΣΔ2, στην ενήλικη ζωή.(148) Η ταυρίνη προστατεύει τα β-κύτταρα από την απόπτωση και ενισχύει την αναγέννησή τους μέσω της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης της.(149)

Στο σακχαρώδη διαβήτη, τα αυξημένα εξωκυτάρια επίπεδα γλυκόζης αποτελούν ωσμωτικό στρες για τα κύτταρα που μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρική δυσλειτουργία.(150) Μεταξύ των πιο σημαντικών ωσμολυτών, η γλυκεροφωσφορυλοχολίνη (GPC) και η σορβιτόλη συντίθενται και αποικοδομούνται μόνο ενδοκυτάρια, ενώ υπάρχουν ειδικά συστήματα μεταφορέων για την ταυρίνη, τη βεταΐνη και τη μυοϊνοσιτόλη, που μπορούν να θεωρηθούν κινητοί ωσμολίτες.(151) Κατά την έκθεση σε υψηλά εξωκυτάρια επίπεδα γλυκόζης, η σορβιτόλη σχηματίζεται ενδοκυτταρικά μέσω της οδού της πολυόλης, η οποία ενοχοποιείται σαν μία από τις κύριες διαδικασίες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη διαβητικών επιπλοκών. Αυτή η ενδοκυτάρια συσσώρευση σορβιτόλης είναι πιθανό να προκαλεί εξάντληση άλλων οσμολυτών όπως η μυοϊνοσιτόλη.(152) Δεδομένου ότι η ταυρίνη μπορεί να δρα ως «καθαριστής» γλυκίωσης, αποτρέποντας τον ενδοκυττάριο σχηματισμό δραστικών καρβονυλικών ενώσεων και τελικών προϊόντων προηγμένης γλυκίωσης (AGEs)(153), αυτή η κυτταρική δυσλειτουργία τελικά θα οδηγήσει σε μακροπρόθεσμες επιπλοκές του διαβήτη (αμφιβληστροειδοπάθεια, νευροπάθεια και νεφροπάθεια).

Οι Park et al.(154), ανέφεραν ότι οι γυναίκες με ΣΔΚ, φυσιολογικού σωματικού βάρους, είχαν χαμηλότερη πρόσληψη ταυρίνης και ότι τα επίπεδα πρόσληψης αυτής συσχετίστηκαν αρνητικά με τη γέννηση μεγάλων για την ηλικία κύησης (LGA) νεογνών. Συμπεραίνουν ότι η χαμηλή πρόσληψη ταυρίνης μπορεί να εμποδίσει την αύξηση των β-κυττάρων του παγκρέατος της εγκύου, κατά τη διάρκεια της κύησης, συμβάλλοντας στην εμφάνιση ΣΔΚ και μπορεί να σχετίζεται με την ανάπτυξη LGA νεογνών, επειδή η αύξηση της μάζας των β-κυττάρων είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης στην κύηση. Σε πειραματικά μοντέλα, η κύηση μειώνει τα επίπεδα ταυρίνης, τόσο των επιμέρους οργάνων όσο και του πλάσματος, και αυτό το έλλειμμα φαίνεται να διαταράσσει την ανάπτυξη του εμβρυϊκού παγκρέατος. Είναι ενδιαφέρον ότι τα κουτάβια που γεννιούνται από μητέρες που βρίσκονται σε δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες ή ταυρίνη, παρουσιάζουν δυσανεξία στη γλυκόζη και όταν εγκυμονούν

αναπτύσσουν διαβήτη κύησης. Επιπλέον, αλλαγές στην ομοιόσταση της ταυρίνης έχουν περιγραφεί τόσο σε ασθενείς με ΣΔ1 και ΣΔ2, όσο και σε πειραματικά μοντέλα σακχαρώδους διαβήτη.(155) Η εξάντληση της μεθειονίνης, του προδρόμου μορίου της ταυρίνης, που βρέθηκε επίσης στις γυναίκες με ΣΔΚ της μελέτης μας, συμβάλλει περαιτέρω στα μειωμένα επίπεδα αυτού του αντιοξειδωτικού μορίου.

Αναφέρεται ότι, τα αυξημένα επίπεδα αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (BCAAs), βαλίνης, λευκίνης και ισολευκίνης, σχετίζονται με την εμφάνιση αντίστασης στην ινσουλίνη και μπορεί να αποτελούν παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη ΣΔ2 (81,82). Αν και σε μερικές μελέτες τα επίπεδα των BCAAs έχουν βρεθεί αυξημένα σε γυναίκες με ΣΔΚ σε σύγκριση με τις φυσιολογικές (156,157), αυτά τα ευρήματα δεν έχουν επιβεβαιωθεί σε όλες τις περιπτώσεις.(116,158) Στη μελέτη μας, τα επίπεδα των BCAA δεν διαφέρουν μεταξύ των δύο ομάδων *per se*, αλλά παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε ορισμένους μεταβολίτες, που σχετίζονται με διαταραγμένο καταβολισμό των BCAA. Το 3-υδροξυισοβαλερικό οξύ (3-HIVA) είναι ένα υποπροϊόν της οδού αποικοδόμησης της λευκίνης που παράγεται από το 3-μεθυλκροτονυλ-CoA. Τα αυξημένα επίπεδα αυτού του μεταβολίτη συνδέονται με αυξημένη κετογένεση, η οποία είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα του ΣΔΚ. Επιπλέον, αναφέρεται ότι τα αυξημένα επίπεδα του 3-HIVA μπορεί να προκύψουν από μειωμένη λειτουργία του ενζύμου μεθυλκροτονυλ-CoA καρβοξυλάση, πιθανώς λόγω ανεπάρκειας βιοτίνης.(159) Η συσσώρευση του 3-HIVA είναι τοξική για τα μιτοχόνδρια, και σε αυτές τις περιπτώσεις, η καρνιτίνη καταναλώνεται για τη μετεστεροποίησή του σε ακυλοκαρνιτίνη για να απομακρυνθεί από τα μιτοχόνδρια και στη συνέχεια, να απεκκριθεί μέσω των νεφρών, με αποτέλεσμα τα χαμηλά επίπεδα ελεύθερης καρνιτίνης στην κυκλοφορία.(160)

Το 3-υδροξυισοβουτυρικό οξύ (3-HIB) είναι ένα ενδιάμεσο προϊόν της οδού αποικοδόμησης της βαλίνης. Αναφέρεται ότι το 3-HIB συσχετίζεται θετικά με την παρουσία αντίστασης στην ινσουλίνη και τα αυξημένα επίπεδά του σχετίζονται με υπεργλυκαιμία και ΣΔ2.(161) Τα αυξημένα επίπεδα του 3-HIB, στην κυκλοφορία και στους σκελετικούς μύες των ατόμων με ΣΔ2, μπορεί να οδηγήσουν σε αυξημένη πρόσληψη ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA) από τους μύες και σε ατελή καταβολισμό των λιπιδίων, συμβάλλοντας έτσι σε μειωμένη οξειδωση των λιπών και τη συσσώρευση τοξικών ενδιάμεσων λιπιδίων και σαν αποτέλεσμα την αντίσταση στην ινσουλίνη. Σε προηγούμενες μελέτες βρέθηκε ισχυρή συσχέτιση του 3-HIB με τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων, της γλυκερόλης των FFA και την αντίσταση στην ινσουλίνη στο λιπώδη ιστό.(162)

Το 3-μεθυλο-2-οξοβαλερικό είναι ένα κετοξύ διακλαδισμένης αλυσίδας που προέρχεται από τον καταβολισμό της ισολευκίνης. Μειωμένα επίπεδα αυτού του μεταβολίτη μπορεί να προκύψουν από απορρύθμιση της μιτοχονδριακής δραστηριότητας στο ΣΔΚ, που οδηγεί σε μειωμένη ικανότητα αυτών των οργανιδίων να διασπούν τα BCAA.(163) Έτσι, μπορεί να είναι τα καταβολικά ενδιάμεσα προϊόντα των BCAA που σχετίζονται με τον διαβήτη και όχι αυτά καθ' αυτά τα αυξημένα επίπεδα των BCAA. Ωστόσο, αναφέρεται ότι, κατά τη διάρκεια της

κύησης, τα κετοξέα διακλαδισμένης αλύσου (BCKA) που παράγονται από το πρώτο στάδιο της οδού οξειδωσης των BCAA, παρουσιάζουν είτε ελάχιστη αλλαγή, όπως το 3-μεθυλ-2-οξοβουτανικό οξύ και το 3-μεθυλ-2-οξοβαλερικό οξύ ή μείωση της συγκέντρωσής τους όπως το 4-μεθυλ-2-οξοβαλερικό οξύ.(164) Η βαλίνη, η ισολευκίνη, η λευκίνη και τα BCKA είναι σημαντικά αυξημένα τόσο σε άτομα με διαταραχή γλυκόζης νηστείας όσο και σε άτομα με ΣΔ2.(165) Επίσης, σε μια μελέτη για τα καταβολικά μονοπάτια των BCAAs, μεταξύ των ενδιάμεσων μεταβολιτών που εντοπίστηκαν, το 3-μεθυλο-2-οξοβαλερικό ήταν ο ισχυρότερος προγνωστικός παράγοντας της εμφάνισης διαταραγμένης γλυκόζης νηστείας.(163)

Αναφέρεται ότι τα αρωματικά αμινοξέα σχετίζονται με την αντίσταση στην ινσουλίνη και το ΣΔ2.(163,166,167) Αν και σε αρκετές μελέτες υψηλότερα επίπεδα αρωματικών αμινοξέων, ιδιαίτερα φαινυλαλανίνης και τυροσίνης, συσχετίστηκαν με ΣΔΚ (119,168), άλλες μελέτες δεν βρήκαν εμφανή σχέση. (168,169) Στη μελέτη μας, τα επίπεδα φαινυλαλανίνης, ιστιδίνης και τρυπτοφάνης βρέθηκαν σημαντικά μειωμένα στις γυναίκες με ΣΔΚ σε σύγκριση με τις φυσιολογικές, ενώ τα επίπεδα τυροσίνης δεν διέφεραν μεταξύ των δύο ομάδων. Αναφέρεται ότι κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής κύησης η φαινυλαλανίνη μειώνεται, πιθανώς λόγω της κατανάλωσής της για να καλύψει τις αυξημένες απαιτήσεις αζώτου για τη σύνθεση των ιστών.(164) Επιπλέον, αναφέρεται ότι οι βιοχημικές και μεταβολικές αλλαγές στο ΣΔΚ αντανακλούν αλλαγές στη μεταβολική οδό της τρυπτοφάνης, κυρίως στην παραγωγή σεροτονίνης. (170)

Η αργινίνη ταξινομείται στα ημι-απαραίτητα ή κάτω από ορισμένες συνθήκες στα απαραίτητα αμινοξέα. Δηλαδή, το αν είναι απαραίτητη ή όχι εξαρτάται από το στάδιο ανάπτυξης του οργανισμού και την κατάσταση της υγείας του ατόμου, όπως η ανάπτυξη κατά τη βρεφική ηλικία, η κύηση και τα εγκαύματα.(171) Εκτός από το ότι είναι πρωτεϊνογόνο αμινοξύ, η αργινίνη εμπλέκεται και στη ρύθμιση πολλών άλλων βιολογικών διεργασιών, όπως η αγγειοδιαστολή, η ρύθμιση του ασβεστίου, η αναγέννηση του ATP, η νευροδιαβίβαση, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και η ανοσία (172,173) καθώς και η διέγερση της έκκρισης ορμονών, όπως η ινσουλίνη, η αυξητική ορμόνη, η γλυκαγόνη και η προλακτίνη.(171) Η αργινίνη αποτελεί το μοναδικό υπόστρωμα των συνθασών μονοξειδίου του αζώτου (NOS) για τη βιοσύνθεση του μονοξειδίου του αζώτου (NO), αγγειοδιασταλτικού παράγοντα που προέρχεται από το ενδοθήλιο, ο οποίος παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην καλή λειτουργία του ενδοθηλίου και την αγγειακή ομοιόσταση.(174) Στην κύηση, οι απαιτήσεις για L-αργινίνη είναι αυξημένες λόγω της ανάπτυξης του εμβρύου και του πλακούντα, του αυξημένου καταβολισμού στην έγκυο γυναίκα και της αυξημένης παραγωγής NO για τη λειτουργία των αγγείων. Οι δίαιτες με ανεπάρκεια L-αργινίνης έχουν συνδεθεί με κακή έκβαση των κυήσεων, συμπεριλαμβανομένης της απώλειας του εμβρύου, της ενδομήτριας καθυστέρησης ανάπτυξης και της προεκλαμψίας. (175)

Στο ΣΔΚ, η μειωμένη πρόσληψη αδενοσίνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την εξωκυττάρια συσσώρευση αδενοσίνης, που οδηγεί σε αυξημένη μεταφορά L-αργινίνης μέσω των μεταφορέων κατιονικών αμινοξέων (hCATs),

αυξημένη δραστηριότητα της ενδοθηλιακής συνθάσης το NO (eNOS) και κατά συνέπεια ενισχυμένη σύνθεση NO. Αυτή η διαδικασία είναι η λεγόμενη οδός σηματοδότησης αδενοσίνης/L-αργινίνης/νιτρικού οξειδίου (ALANO) που οδηγεί σε δυσλειτουργία του ενδοθηλίου της εμβρυοπλακουντιακής μονάδας.(176) Κατά συνέπεια, τα κυκλοφορούντα επίπεδα αργινίνης στο ΣΔΚ αναμένεται να μειωθούν, κάτι που είναι σε συμφωνία με τα ευρήματα της μελέτης μας. Επίσης, στο ΣΔ2 η διαταραχή στη βιοδιαθεσιμότητα του NO εμφανίζεται νωρίς και συμβάλλει στην εξέλιξη και την πρόγνωση των καρδιαγγειακών επιπλοκών.(177)

Επιπλέον, τα μειωμένα επίπεδα αργινίνης και γλουταμινικού, που είναι πρόδρομα μόρια για τη σύνθεση ορνιθίνης, μπορεί να συμβάλλουν στα χαμηλότερα επίπεδα ορού αυτού του μεταβολίτη και μπορεί να αντικατοπτρίζουν την απορρύθμιση στον κύκλο ουρίας σε γυναίκες με ΣΔΚ.

Η χολίνη είναι ένα απαραίτητο θρεπτικό συστατικό, το οποίο χρησιμεύει ως πρόδρομος για τη σύνθεση φωσφολιπιδίων όπως η φωσφατιδυλοχολίνη και του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη.(178) Κατά την ανάπτυξη του εμβρύου, αυτά τα προερχόμενα από τη χολίνη προϊόντα, είναι απαραίτητα για τη σύνθεση των κυτταρικών μεμβρανών, την κυτταρική διαίρεση, τη μεταφορά λιπιδίων και για την μείωση της επίπτωσης βλαβών του νευρικού σωλήνα.(179) Επιπλέον, η βεταΐνη, η οποία είναι το οξειδωμένο προϊόν της χολίνης, χρησιμεύει ως δότης μεθυλίου για το σχηματισμό του SAM, μιας κρίσιμης ένωσης για τη διατήρηση του εμβρυϊκού επιγονιδιώματος. Στη μελέτη μας, τα επίπεδα χολίνης ήταν χαμηλότερα στο ΣΔΚ, ένα εύρημα που συμφωνεί με πειραματικές μελέτες, όπου η χορήγηση στη μητέρα συμπληρωμάτων χολίνης και βεταΐνης σε ποντίκια με ΣΔΚ μετριάζει την εμβρυϊκή υπερανάπτυξη και την υπερβολική εναπόθεση λιπώδους ιστού.(180) Σε πειραματικές μελέτες σε μοντέλα τρωκτικών, η χολίνη αυξάνει τη γλυκονογένεση, με τη μεσολάβηση γλυκαγόνης και μειώνει την εστεροποίηση των λιπαρών οξέων οδηγώντας σε υψηλότερη ηπατική παραγωγή FFAs, που είναι γνωστός παράγοντας αντίστασης στην ινσουλίνη.(181,182)

Στη μελέτη μας, βρήκαμε μειωμένα επίπεδα N-οξειδίου της τριμεθυλαμίνης (TMAO), το οποίο είναι ένας οξειδωτικός μεταβολίτης της χολίνης που προέρχεται από το μικροβίωμα του εντέρου. Αυτός ο μεταβολίτης έχει μεγάλη διακύμανση μεταξύ των ατόμων, κυρίως λόγω της διατροφής καθώς και των επιμέρους διαφορών στη σύνθεση της μικροχλωρίδας του παχέος εντέρου. Σε αντίθεση με τα αποτελέσματά μας, σε ζώα και ανθρώπους, αυξημένα επίπεδα TMAO έχουν προταθεί ως ισχυρός παράγοντας που μεσολαβεί προς την ανάπτυξη ΣΔ2.(183-185) Επιπλέον, η συμβολή της μικροχλωρίδας του εντέρου στην ανάπτυξη χαμηλού βαθμού φλεγμονής έχει αναφερθεί σαν αιτιολογία εμφάνισης ΣΔ2.(186)

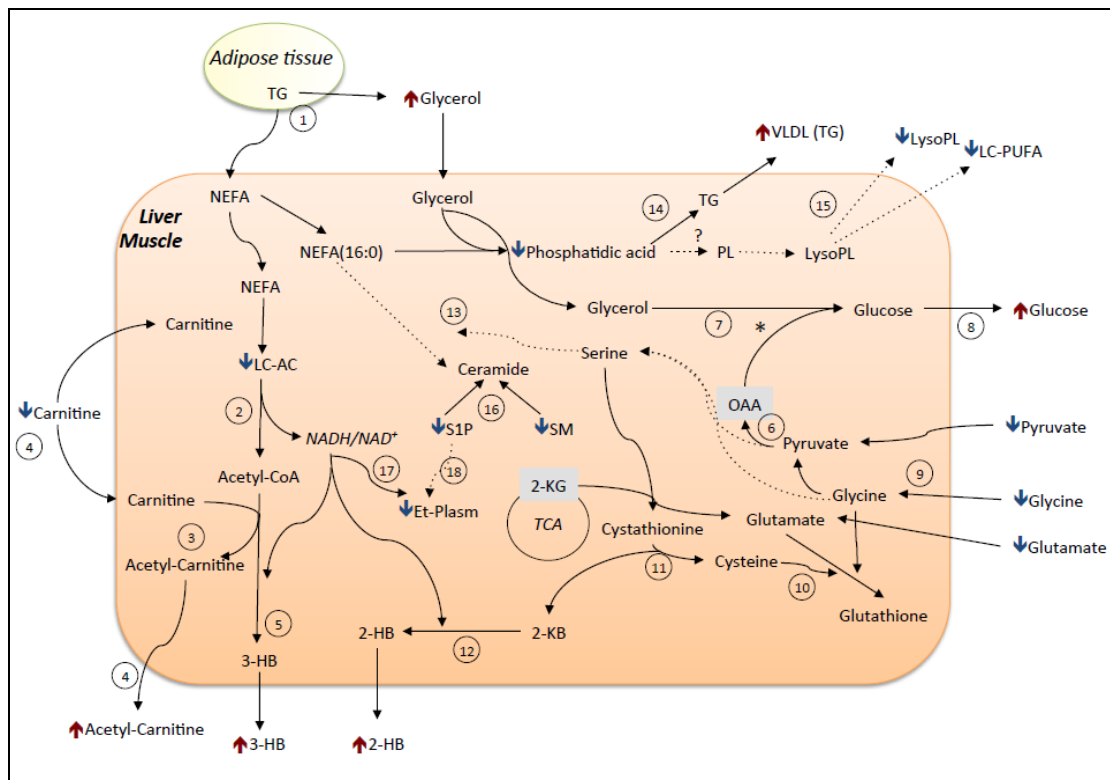
Σημαντικό περιορισμό της μελέτης μας αποτελεί ο cross-sectional σχεδιασμός της που δεν επιτρέπει την αξιολόγηση των μεταβολικών διαταραχών που

παρατηρούνται στις ασθενείς μας με ΣΔΚ στην πορεία του χρόνου. Επομένως, δεν είμαστε σε θέση να προτείνουμε ποιος μεταβολίτης (ή σύνολο μεταβολιτών) θα μπορούσε να βοηθήσει στην έγκαιρη διάγνωση (και πιθανώς στη θεραπεία του ΣΔΚ). Ομοίως, η ικανότητα των παρατηρούμενων μεταβολικών διαταραχών να προβλέπουν ανεπιθύμητες κλινικές εκβάσεις ή τη μελλοντική ανάπτυξη ΣΔ2 πρέπει να μελετηθεί σε μελλοντικές δοκιμές.

8. Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη, η δισδιάστατη γραφική παράσταση PLS-DA αποκάλυψε έναν διακριτό διαχωρισμό του μεταβολικού προφίλ εγκύων γυναικών με και χωρίς ΣΔΚ, με ελάχιστη επικάλυψη. Ο μεταβολικός φαινότυπος ορού, εγκύων γυναικών με ΣΔΚ, χαρακτηρίστηκε από υψηλότερα επίπεδα κετονικών σωμάτων (3-υδροξυβουτυρικό, ακετοξικό), 2-υδροξυβουτυρικού, μεταβολικών ενδιάμεσων προϊόντων των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (3-υδροξυισοβουτυρικό, 3-υδροξυ-ισοβαλερικό) και χαμηλότερα επίπεδα μεταβολιτών που εμπλέκονται στον κύκλο του ενεργοποιημένου μεθυλίου (χολίνη, γλυκίνη, μεθειονίνη, σερίνη, σαρκοζίνη), καρνιτίνης, αμινοξέων (αργινίνη, ασπαρτικό, ιστιδίνη, φαινυλαλανίνη), ταυρίνης, και N-οξειδίου της τριμεθυλαμίνης.

Εκτός από την υπεργλυκαιμία, ο ΣΔΚ σχετίζεται με ένα χαρακτηριστικό μεταβολικό προφίλ που πιθανώς αντανάκλα τις διαταραχές σε διάφορες μεταβολικές οδούς. (Εικ.7.7 και 7.8)



Εικ.7.7. Προτεινόμενο μοντέλο μεταβολικών αλλαγών στο δεύτερο τρίμηνο του ΣΔΚ, με ιδιαίτερη έμφαση στον μεταβολισμό των λιπιδίων. OAA: οξαλοξικό; 2-KG: 2-κετογλουταρικό. Τα βέλη δείχνουν εάν το επίπεδο ενός δεδομένου μεταβολίτη αυξήθηκε (κόκκινο) ή μειώθηκε (μπλε) σύμφωνα με την μεταβολομική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη. Τα ασυνεχή βέλη αντιπροσωπεύουν μειωμένη χρήση της αντίστοιχης μεταβολικής οδού. * η γλυκονογένεση λαμβάνει χώρα μόνο στο ήπαρ. [Προσαρμοσμένο από (98)]

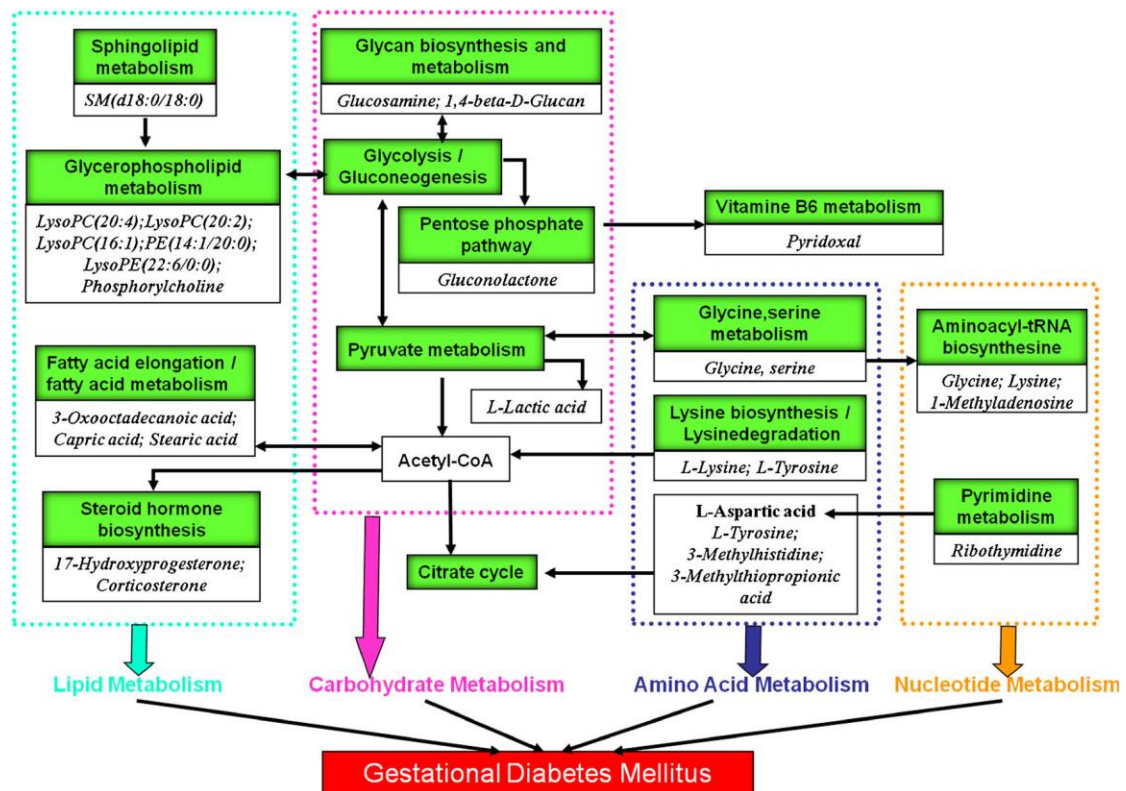
Υποθέτουμε ότι, στην αρχή της κύησης, ο ΣΔΚ χαρακτηρίζεται από αυξημένη ανταπόκριση στη νηστεία. Κατά τη διάρκεια αυτής της απόκρισης, τα λιπαρά οξέα (NEFA) μετατρέπονται στο κύριο υπόστρωμα για παραγωγή ενέργειας, ευνοώντας το οξειδωτικό στρες και μια ήπια φλεγμονώδη αντίδραση. Σε αυτό το σενάριο, η αυξημένη λιπόλυση (1) στον λιπώδη ιστό (υποστηρίζεται από την αυξημένη

γλυκερόλη και το λινελαϊκό οξύ (C18: 2)) ευνοεί τη διαθεσιμότητα NEFA του ήπατος και των μυών. Και στους δύο ιστούς, η υπερφόρτωση λιπιδίων οδηγεί σε ενδομιτοχονδριακή ροή ακυλο-CoA για οξείδωση NEFA, η οποία έχει ως αποτέλεσμα μειωμένες ακυλοκαρνιτίνες μακράς αλυσίδας (LC-AC) και συσσώρευση ακετυλο-CoA (2). Αυτός ο μεταβολίτης μετατρέπεται σε ακετυλο-καρνιτίνη (3), επιτρέποντας τη μιτοχονδριακή του εκροή που διαφορετικά θα ανέστειλε την πυροσταφυλική αφυδρογονάση. Αυτή η κατάσταση προκαλεί εξάντληση της καρνιτίνης και, κατά συνέπεια, μειωμένη απέκκριση αυτού του μεταβολίτη στην κυκλοφορία, καθώς και αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούσας ακετυλο-καρνιτίνης (4).

Στους ανθρώπους, στο ήπαρ γίνεται το μεγαλύτερο μέρος της οξείδωσης NEFA κατά τη διάρκεια της νηστείας. Σε αυτήν την κατάσταση, το acetyl-CoA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για σύνθεση 3-υδροξυβουτυρικού οξέος (3-HB), συμβάλλοντας στην κετοναιμία που παρατηρείται σε γυναίκες με ΣΔΚ (5), ή μπορεί να ενεργοποιήσει η πυρουβική καρβοξυλάση, ευνοώντας τη γλυκονεογένεση (6). Έτσι, το πυρουβικό και η γλυκερόλη (7) χρησιμοποιούνται κατά προτίμηση για γλυκονεογένεση, ευνοώντας τη δυσανεξία στη γλυκόζη (8). Η μειωμένη γλυκίνη στο ΣΔΚ μπορεί επίσης να αντικατοπτρίζει την ενισχυμένη γλυκονεογένεση, καθώς η γλυκίνη μπορεί να μετατραπεί σε γλυκόζη μέσω παραγωγής πυρουβικού ή / και σε γλουταθειόνη (GSH) (9). Η αυξημένη μιτοχονδριακή δραστηριότητα αυξάνει επίσης την αναλογία $\text{NADH} + \text{H}^+ / \text{NAD}^+$ και την παραγωγή ριζών οξυγόνου (2). Για την αντιμετώπιση του προκύπτοντος οξειδωτικού στρες, ενεργοποιείται η βιοσύνθεση της γλουταθειόνης (10), η οποία υποστηρίζεται από την παρατηρούμενη μείωση της γλυκίνης και του γλουταμινικού και την ταυτόχρονη αύξηση του 2-υδροξυβουτυρικού (α -HB). Το 2-κετοβουτυρικό (2-KB) παράγεται μέσω της μετατροπής της κυστεθεινίνης σε κυστεΐνη για βιοσύνθεση γλουταθειόνης (11). Στη συνέχεια, το 2-KB μειώνεται σε α -HB (12), το οποίο ευνοείται από την παρατηρούμενη αύξηση του λόγου $\text{NADH} / \text{NAD}^+$ (2). Έτσι, το α -HB σχετίζεται με αυξημένη ζήτηση για βιοσύνθεση γλουταθειόνης και διαταραγμένο μεταβολισμό ενέργειας των μιτοχονδρίων. Η μειωμένη σύνθεση de novo σφιγγολιπιδίων που βρέθηκε στο ΣΔΚ, πιθανώς ως συνέπεια της διαθεσιμότητας σερίνης (13), ευνοεί τη ροή του παλμιτικού (16:0) προς τριγλυκερίδια, οδηγώντας στην υπερτριγλυκεριδαίμια που παρατηρείται σε γυναίκες με ΣΔΚ (14). Σε αυτήν την κατάσταση, η αυξημένη βιοσύνθεση τριγλυκεριδίων προκαλεί μείωση της χρήσης του φωσφατιδικού οξέος για τη σύνθεση γλυκεροφωσφολιπιδίων (PL) (15), ευνοώντας την παρατηρούμενη μείωση των λυσοφωσφολιπιδίων (LysoPL). Το γεγονός ότι ο μεταβολισμός της κυστεΐνης ευνοεί τη βιοσύνθεση της γλουταθειόνης μπορεί να σχετίζεται με μείωση της SAM (S-Adenosylmethionine), ενός βασικού μορίου για τον μετασχηματισμό της PC (φωσφατιδυλοχολίνης) σε PE (φωσφατιδυλαιθανολαμίνη) στο ήπαρ. Τέλος, η σύνθεση de novo σφιγγολιπιδίων μειώνεται (13), πιθανώς τα κεραμίδια συντίθενται μέσω υδρόλυσης της σφιγγομυελίνης ή μέσω της οδού διάσωσης από την 1-φωσφορική σφιγγοσίνη (S1P) (16), η οποία εξηγεί την παρατηρούμενη μείωση αυτών των λιπιδίων. Τα μειωμένα επίπεδα αιθανολαμίνης-

πλασμινογόνου (Et-Plasm) μπορεί να είναι συνέπεια της αυξημένης χρήσης τους ως αντιοξειδωτικών (17) ή μειωμένης σύνθεσης από το S1P (18).

Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες προκειμένου να διευκρινιστεί το κατά πόσο δείκτες των μεταβολικών διαταραχών που αναφέρθηκαν παραπάνω μπορούν να χρησιμεύσουν στην πρωιμότερη διάγνωση του ΣΔΚ, στην ακριβέστερη πρόγνωση των επιπλοκών της νόσου (συμπεριλαμβανομένου και του κινδύνου εμφάνισης ΣΔ2 μεταγενέστερα στη μητέρα) αλλά και στην παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας διαφόρων θεραπευτικών παρεμβάσεων.



Εικ.7.8. Οι οδοί των πιθανών βιοδεικτών για το ΣΔΚ, συμπεριλαμβανομένου του μεταβολισμού των λιπιδίων, των υδατανθράκων, των αμινοξέων, των νουκλεοτιδίων και του μεταβολισμού των βιταμινών [Προσαρμοσμένο από (187)]

9. Βιβλιογραφία

1. BROOKS C, MARSHALL N. ΒΑΣΙΚΗ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΑ. 4^η ΕΚΔΟΣΗ, ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ, 2004. σελ. 143-50.
2. Gloyn AL, Pearson ER, Antcliff JF, Proks P, Bruining GJ, Slingerland AS, et al. Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. *N Engl J Med.* 2004;350(18):1838-49.
3. Ελληνική Ενδοκρινολογική Εταιρεία, ΕΝΤΑΤΙΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΣΤΗΝ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΑ, 12^{ος} ΚΥΚΛΟΣ: ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ, Τυπογραφικό Εργαστήρι "ΓΡΑΜΜΑ", 2009. σελ. 57-71 .
4. Hinoi E, Gao N, Jung DY, Yadav V, Yoshizawa T, Myers MG, Jr., et al. The sympathetic tone mediates leptin's inhibition of insulin secretion by modulating osteocalcin bioactivity. *J Cell Biol.* 2008;183(7):1235-42.
5. Kassi E, Papavassiliou AG. A possible role of osteocalcin in the regulation of insulin secretion: human in vivo evidence? *J Endocrinol.* 2008;199(2):151-3.
6. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. *Diabetes Care.* 2021;44(Suppl 1):S15-S33.
7. Τούντας Χ, Δ. ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ, Θεωρία-Πράξη, Τόμος Β, Αφου Τσαλδάρη ο.ε., 2003. σελ.1201.
8. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care.* 2020;43(Suppl 1):S14-S31.
9. American Diabetes Association. 14. Management of Diabetes in Pregnancy: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. *Diabetes Care.* 2021;44(Suppl 1):S200-S10.
10. Lowe LP, Metzger BE, Dyer AR, Lowe J, McCance DR, Lappin TR, et al. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study: associations of maternal A1C and glucose with pregnancy outcomes. *Diabetes Care.* 2012;35(3):574-80.
11. Eades CE, Cameron DM, Evans JMM. Prevalence of gestational diabetes mellitus in Europe: A meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017;129:173-81.
12. Berberoğlu Z. Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *EMJ Diabetes.* 2019.
13. Di Cianni G, Miccoli R, Volpe L, Lencioni C, Del Prato S. Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2003;19(4):259-70.
14. Catalano PM, Tyzbit ED, Roman NM, Amini SB, Sims EA. Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;165(6 Pt 1):1667-72.

15. Phelps RL, Metzger BE, Freinkel N. Carbohydrate metabolism in pregnancy. XVII. Diurnal profiles of plasma glucose, insulin, free fatty acids, triglycerides, cholesterol, and individual amino acids in late normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1981;140(7):730-6.
16. Parsons JA, Brelje TC, Sorenson RL. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology.* 1992;130(3):1459-66.
17. Ryan EA, O'Sullivan MJ, Skyler JS. Insulin action during pregnancy. Studies with the euglycemic clamp technique. *Diabetes.* 1985;34(4):380-9.
18. Homko C, Sivan E, Chen X, Reece EA, Boden G. Insulin secretion during and after pregnancy in patients with gestational diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(2):568-73.
19. Weir GC, Laybutt DR, Kaneto H, Bonner-Weir S, Sharma A. Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes.* 2001;50 Suppl 1:S154-9.
20. DeFronzo RA. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes.* 2009;58(4):773-95.
21. Zraika S, Hull RL, Verchere CB, Clark A, Potter KJ, Fraser PE, et al. Toxic oligomers and islet beta cell death: guilty by association or convicted by circumstantial evidence? *Diabetologia.* 2010;53(6):1046-56.
22. Xiang AH, Takayanagi M, Black MH, Trigo E, Lawrence JM, Watanabe RM, et al. Longitudinal changes in insulin sensitivity and beta cell function between women with and without a history of gestational diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2013;56(12):2753-60.
23. Barbour LA, McCurdy CE, Hernandez TL, Kirwan JP, Catalano PM, Friedman JE. Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. *Diabetes Care.* 2007;30 Suppl 2:S112-9.
24. Guo F, Long W, Zhou W, Zhang B, Liu J, Yu B. FTO, GCKR, CDKAL1 and CDKN2A/B gene polymorphisms and the risk of gestational diabetes mellitus: a meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet.* 2018;298(4):705-15.
25. Catalano PM. Trying to understand gestational diabetes. *Diabet Med.* 2014;31(3):273-81.
26. Plows JF, Stanley JL, Baker PN, Reynolds CM, Vickers MH. The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11).
27. de Castro J, Sevillano J, Marciniak J, Rodriguez R, González-Martín C, Viana M, et al. Implication of low level inflammation in the insulin resistance of adipose tissue at late pregnancy. *Endocrinology.* 2011;152(11):4094-105.
28. Ryan EA, Enns L. Role of gestational hormones in the induction of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988;67(2):341-7.
29. Kleiblova P, Dostalova I, Bartlova M, Lacinova Z, Ticha I, Krejci V, et al. Expression of adipokines and estrogen receptors in adipose tissue and placenta of patients with gestational diabetes mellitus. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;314(1):150-6.

30. Picard F, Wanatabe M, Schoonjans K, Lydon J, O'Malley BW, Auwerx J. Progesterone receptor knockout mice have an improved glucose homeostasis secondary to beta -cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15644-8.
31. Ahmed SA, Shalayel MH. Role of cortisol in the deterioration of glucose tolerance in Sudanese pregnant women. *East Afr Med J*. 1999;76(8):465-7.
32. Almon RR, Dubois DC, Jin JY, Jusko WJ. Temporal profiling of the transcriptional basis for the development of corticosteroid-induced insulin resistance in rat muscle. *J Endocrinol*. 2005;184(1):219-32.
33. Sorenson RL, Brelje TC, Roth C. Effects of steroid and lactogenic hormones on islets of Langerhans: a new hypothesis for the role of pregnancy steroids in the adaptation of islets to pregnancy. *Endocrinology*. 1993;133(5):2227-34.
34. Mills NC, Gyves MT, Ilan J. Comparisons of human placental lactogen mRNA levels from placentas of diabetics and normal term. *Mol Cell Endocrinol*. 1985;39(1):61-9.
35. Le TN, Elsea SH, Romero R, Chaiworapongsa T, Francis GL. Prolactin receptor gene polymorphisms are associated with gestational diabetes. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2013;17(7):567-71.
36. Skouby SO, Kuhl C, Hornnes PJ, Andersen AN. Prolactin and glucose tolerance in normal and gestational diabetic pregnancy. *Obstet Gynecol*. 1986;67(1):17-20.
37. Sifnaios E, Mastorakos G, Psarra K, Panagopoulos ND, Panoulis K, Vitoratos N, et al. Gestational Diabetes and T-cell (Th1/Th2/Th17/Treg) Immune Profile. *In Vivo*. 2019;33(1):31-40.
38. Desoye G, Hauguel-de Mouzon S. The human placenta in gestational diabetes mellitus. The insulin and cytokine network. *Diabetes Care*. 2007;30 Suppl 2:S120-6.
39. Magee TR, Ross MG, Wedekind L, Desai M, Kjos S, Belkacemi L. Gestational diabetes mellitus alters apoptotic and inflammatory gene expression of trophoblasts from human term placenta. *J Diabetes Complications*. 2014;28(4):448-59.
40. Cai S, Tan S, Gluckman PD, Godfrey KM, Saw SM, Teoh OH, et al. Sleep Quality and Nocturnal Sleep Duration in Pregnancy and Risk of Gestational Diabetes Mellitus. *Sleep*. 2017;40(2).
41. Minokoshi Y, Kahn BB. Role of AMP-activated protein kinase in leptin-induced fatty acid oxidation in muscle. *Biochem Soc Trans*. 2003;31(Pt 1):196-201.
42. Marroquí L, Gonzalez A, Neco P, Caballero-Garrido E, Vieira E, Ripoll C, et al. Role of leptin in the pancreatic β -cell: effects and signaling pathways. *J Mol Endocrinol*. 2012;49(1):R9-17.
43. Fasshauer M, Bluher M, Stumvoll M. Adipokines in gestational diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2(6):488-99.
44. Qiu C, Williams MA, Vadachkoria S, Frederick IO, Luthy DA. Increased maternal plasma leptin in early pregnancy and risk of gestational diabetes mellitus. *Obstet Gynecol*. 2004;103(3):519-25.

45. Stefan N, Vozarova B, Funahashi T, Matsuzawa Y, Weyer C, Lindsay RS, et al. Plasma adiponectin concentration is associated with skeletal muscle insulin receptor tyrosine phosphorylation, and low plasma concentration precedes a decrease in whole-body insulin sensitivity in humans. *Diabetes*. 2002;51(6):1884-8.
46. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*. 2002;8(11):1288-95.
47. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*. 2005;26(3):439-51.
48. Retnakaran R, Qi Y, Connelly PW, Sermer M, Hanley AJ, Zinman B. Low adiponectin concentration during pregnancy predicts postpartum insulin resistance, beta cell dysfunction and fasting glycaemia. *Diabetologia*. 2010;53(2):268-76.
49. Williams MA, Qiu C, Muy-Rivera M, Vadachkoria S, Song T, Luthy DA. Plasma adiponectin concentrations in early pregnancy and subsequent risk of gestational diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(5):2306-11.
50. Denison FC, Roberts KA, Barr SM, Norman JE. Obesity, pregnancy, inflammation, and vascular function. *Reproduction*. 2010;140(3):373-85.
51. Lappas M. Effect of pre-existing maternal obesity, gestational diabetes and adipokines on the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue. *Metabolism*. 2014;63(2):250-62.
52. Handelsman Y, Bloomgarden ZT, Grunberger G, Umpierrez G, Zimmerman RS, Bailey TS, et al. American association of clinical endocrinologists and american college of endocrinology - clinical practice guidelines for developing a diabetes mellitus comprehensive care plan - 2015. *Endocr Pract*. 2015;21 Suppl 1(Suppl 1):1-87.
53. 13. Management of Diabetes in Pregnancy: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care*. 2018;41(Suppl 1):S137-s43.
54. Committee opinion no. 504: Screening and diagnosis of gestational diabetes mellitus. *Obstet Gynecol*. 2011;118(3):751-3.
55. Crowther CA, Hiller JE, Moss JR, McPhee AJ, Jeffries WS, Robinson JS, et al. Effect of treatment of gestational diabetes mellitus on pregnancy outcomes. *N Engl J Med*. 2005;352(24):2477-86.
56. Landon MB, Spong CY, Thom E, Carpenter MW, Ramin SM, Casey B, et al. A multicenter, randomized trial of treatment for mild gestational diabetes. *N Engl J Med*. 2009;361(14):1339-48.
57. Moyer VA, Force USPST. Screening for gestational diabetes mellitus: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med*. 2014;160(6):414-20.
58. Nicholson JK. Global systems biology, personalized medicine and molecular epidemiology. *Mol Syst Biol*. 2006;2:52.

59. Lindon JC, Holmes E, Bollard ME, Stanley EG, Nicholson JK. Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis. *Biomarkers*. 2004;9(1):1-31.
60. Knapp JS, Cabrera WL. *Metabolomics: Metabolites, metabonomics, and analytical technologies* 2011. 1-263 p.
61. Gates SC, Sweeley CC. Quantitative metabolic profiling based on gas chromatography. *Clin Chem*. 1978;24(10):1663-73.
62. van der Greef J, Smilde AK. Symbiosis of chemometrics and metabolomics: past, present, and future. *Journal of Chemometrics*. 2005;19(5-7):376-86.
63. Griffiths WJ, Wang Y. Mass spectrometry: from proteomics to metabolomics and lipidomics. *Chem Soc Rev*. 2009;38(7):1882-96.
64. Hoult DI, Busby SJ, Gadian DG, Radda GK, Richards RE, Seeley PJ. Observation of tissue metabolites using ³¹P nuclear magnetic resonance. *Nature*. 1974;252(5481):285-7.
65. Holmes E, Antti H. Chemometric contributions to the evolution of metabonomics: mathematical solutions to characterising and interpreting complex biological NMR spectra. *Analyst*. 2002;127(12):1549-57.
66. Lenz EM, Wilson ID. Analytical strategies in metabonomics. *J Proteome Res*. 2007;6(2):443-58.
67. Nicholson JK, Lindon JC. Systems biology: Metabonomics. *Nature*. 2008;455(7216):1054-6.
68. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev*. 2007;26(1):51-78.
69. Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, et al. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(Database issue):D521-6.
70. Wishart DS. Metabolomics for Investigating Physiological and Pathophysiological Processes. *Physiol Rev*. 2019;99(4):1819-75.
71. Kargul J, Irminger-Finger I, Laurent GJ. Metabolomics: Taking snapshots of cellular physiology in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2017;93:86.
72. Ellis DI, Dunn WB, Griffin JL, Allwood JW, Goodacre R. Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. *Pharmacogenomics*. 2007;8(9):1243-66.
73. Kell DB, Brown M, Davey HM, Dunn WB, Spasic I, Oliver SG. Metabolic footprinting and systems biology: the medium is the message. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(7):557-65.
74. Letertre MPM, Giraudeau P, de Tullio P. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Clinical Metabolomics and Personalized Medicine: Current Challenges and Perspectives. *Front Mol Biosci*. 2021;8:698337.
75. Dunn WB, Bailey NJ, Johnson HE. Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst*. 2005;130(5):606-25.

76. Del Chierico F, Gnani D, Vernocchi P, Petrucca A, Alisi A, Dallapiccola B, et al. Meta-omic platforms to assist in the understanding of NAFLD gut microbiota alterations: tools and applications. *Int J Mol Sci.* 2014;15(1):684-711.
77. Roberts LD, Souza AL, Gerszten RE, Clish CB. Targeted metabolomics. *Curr Protoc Mol Biol.* 2012;Chapter 30:Unit 30.2.1-24.
78. Wishart DS. Quantitative metabolomics using NMR. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2008;27(3):228-37.
79. Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(4):263-9.
80. Schrimpe-Rutledge AC, Codreanu SG, Sherrod SD, McLean JA. Untargeted Metabolomics Strategies-Challenges and Emerging Directions. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2016;27(12):1897-905.
81. Guasch-Ferré M, Hruby A, Toledo E, Clish CB, Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, et al. Metabolomics in Prediabetes and Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. *Diabetes Care.* 2016;39(5):833-46.
82. Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, et al. A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab.* 2009;9(4):311-26.
83. Roberts LD, Koulman A, Griffin JL. Towards metabolic biomarkers of insulin resistance and type 2 diabetes: progress from the metabolome. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014;2(1):65-75.
84. Angueira AR, Ludvik AE, Reddy TE, Wicksteed B, Lowe WL, Jr., Layden BT. New insights into gestational glucose metabolism: lessons learned from 21st century approaches. *Diabetes.* 2015;64(2):327-34.
85. Chen Q, Francis E, Hu G, Chen L. Metabolomic profiling of women with gestational diabetes mellitus and their offspring: Review of metabolomics studies. *J Diabetes Complications.* 2018;32(5):512-23.
86. Serkova NJ, Standiford TJ, Stringer KA. The emerging field of quantitative blood metabolomics for biomarker discovery in critical illnesses. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184(6):647-55.
87. Friedrich N. Metabolomics in diabetes research. *J Endocrinol.* 2012;215(1):29-42.
88. Mc Murry J. ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ (ΤΟΜΟΣ Ι). ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ, 2010. 559-76 p.
89. Saude EJ, Slupsky CM, Sykes BD. Optimization of NMR analysis of biological fluids for quantitative accuracy. *Metabolomics.* 2006;2(3):113-23.
90. Gerothanassis IP, Troganis A, Exarchou V, Barbarossou K. NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE (NMR) SPECTROSCOPY: BASIC PRINCIPLES AND PHENOMENA, AND THEIR APPLICATIONS TO CHEMISTRY, BIOLOGY AND MEDICINE. *Chemistry Education Research and Practice.* 2002;3(2):229-52.
91. Wade LG. ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ. 7η Έκδοση. Εκδόσεις Τζιόλα; 2012.

92. Μαυρομούστακος Θ, Τζάκος, Ανδρέας., Σπυρούλιας, Γεώργιος., Μικρός, Εμμανουήλ., Κολοκούρης, Αντώνιος., Παπακωνσταντίνου, Κωνσταντίνος., Γεροθανάσης, Ιωάννης., Ματσούκας, Ιωάννης ΠΥΡΗΝΙΚΟΣ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ: Εκδόσεις Συμμετρία; 2018. σελ. 2-6.
93. Wevers RA, Engelke U, Heerschap A. High-resolution ¹H-NMR spectroscopy of blood plasma for metabolic studies. *Clin Chem*. 1994;40(7 Pt 1):1245-50.
94. Bahado-Singh RO, Akolekar R, Mandal R, Dong E, Xia J, Kruger M, et al. Metabolomics and first-trimester prediction of early-onset preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012;25(10):1840-7.
95. Dumas ME, Maibaum EC, Teague C, Ueshima H, Zhou B, Lindon JC, et al. Assessment of analytical reproducibility of ¹H NMR spectroscopy based metabolomics for large-scale epidemiological research: the INTERMAP Study. *Anal Chem*. 2006;78(7):2199-208.
96. Solanky KS, Bailey NJ, Beckwith-Hall BM, Bingham S, Davis A, Holmes E, et al. Biofluid ¹H NMR-based metabolomic techniques in nutrition research - metabolic effects of dietary isoflavones in humans. *J Nutr Biochem*. 2005;16(4):236-44.
97. Nicholson JK, Foxall PJ, Spraul M, Farrant RD, Lindon JC. 750 MHz ¹H and ¹H-¹³C NMR spectroscopy of human blood plasma. *Anal Chem*. 1995;67(5):793-811.
98. Dudzik D, Zorawski M, Skotnicki M, Zarzycki W, Kozłowska G, Bibik-Malinowska K, et al. Metabolic fingerprint of Gestational Diabetes Mellitus. *J Proteomics*. 2014;103:57-71.
99. Huo X, Li J, Cao YF, Li SN, Shao P, Leng J, et al. Trimethylamine N-Oxide Metabolites in Early Pregnancy and Risk of Gestational Diabetes: A Nested Case-Control Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(11):5529-39.
100. Flanagan JL, Simmons PA, Vehige J, Willcox MD, Garrett Q. Role of carnitine in disease. *Nutr Metab (Lond)*. 2010;7:30.
101. Hoppel C. The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism. *Am J Kidney Dis*. 2003;41(4 Suppl 4):S4-12.
102. Lopaschuk G. Regulation of carbohydrate metabolism in ischemia and reperfusion. *Am Heart J*. 2000;139(2 Pt 3):S115-9.
103. Li P, Liu Y, Zhang Y, Long M, Guo Y, Wang Z, et al. Effect of non-esterified fatty acids on fatty acid metabolism-related genes in calf hepatocytes cultured in vitro. *Cell Physiol Biochem*. 2013;32(5):1509-16.
104. Ringseis R, Hanisch N, Seliger G, Eder K. Low availability of carnitine precursors as a possible reason for the diminished plasma carnitine concentrations in pregnant women. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2010;10:17.
105. Talián GC, Komlósi K, Decsi T, Koletzko B, Melegh B. Determination of carnitine ester patterns during the second half of pregnancy, at delivery, and in neonatal cord blood by tandem mass spectrometry: complex and dynamic involvement of carnitine in the intermediary metabolism. *Pediatr Res*. 2007;62(1):88-92.

106. Arenas J, Rubio JC, Martín MA, Campos Y. Biological roles of L-carnitine in perinatal metabolism. *Early Hum Dev.* 1998;53 Suppl:S43-50.
107. Grube M, Meyer Zu Schwabedissen H, Draber K, Präger D, Möritz KU, Linnemann K, et al. Expression, localization, and function of the carnitine transporter octn2 (slc22a5) in human placenta. *Drug Metab Dispos.* 2005;33(1):31-7.
108. Herrera E, Ortega-Senovilla H. Maternal lipid metabolism during normal pregnancy and its implications to fetal development. *Clinical Lipidology.* 2010;5(6):899-911.
109. Catalano PM, Nizielski SE, Shao J, Preston L, Qiao L, Friedman JE. Downregulated IRS-1 and PPARgamma in obese women with gestational diabetes: relationship to FFA during pregnancy. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282(3):E522-33.
110. Villafan-Bernal JR, Acevedo-Alba M, Reyes-Pavon R, Diaz-Parra GA, Lip-Sosa DL, Vazquez-Delfin HI, et al. Plasma Levels of Free Fatty Acids in Women with Gestational Diabetes and Its Intrinsic and Extrinsic Determinants: Systematic Review and Meta-Analysis. *J Diabetes Res.* 2019;2019:7098470.
111. Mynatt RL. Carnitine and type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2009;25 Suppl 1(Suppl 1):S45-9.
112. Schooneman MG, Vaz FM, Houten SM, Soeters MR. Acylcarnitines: reflecting or inflicting insulin resistance? *Diabetes.* 2013;62(1):1-8.
113. Ringseis R, Keller J, Eder K. Role of carnitine in the regulation of glucose homeostasis and insulin sensitivity: evidence from in vivo and in vitro studies with carnitine supplementation and carnitine deficiency. *Eur J Nutr.* 2012;51(1):1-18.
114. Butte NF. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr.* 2000;71(5 Suppl):1256s-61s.
115. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry: 6th Edition: Macmillan Learning; 2012.*
116. Dudzik D, Zorawski M, Skotnicki M, Zarzycki W, García A, Angulo S, et al. GC-MS based Gestational Diabetes Mellitus longitudinal study: Identification of 2-and 3-hydroxybutyrate as potential prognostic biomarkers. *J Pharm Biomed Anal.* 2017;144:90-8.
117. Montelongo A, Lasunción MA, Pallardo LF, Herrera E. Longitudinal study of plasma lipoproteins and hormones during pregnancy in normal and diabetic women. *Diabetes.* 1992;41(12):1651-9.
118. Pappa KI, Vlachos G, Theodora M, Roubelaki M, Angelidou K, Antsaklis A. Intermediate metabolism in association with the amino acid profile during the third trimester of normal pregnancy and diet-controlled gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;196(1):65.e1-5.
119. Scholtens DM, Muehlbauer MJ, Daya NR, Stevens RD, Dyer AR, Lowe LP, et al. Metabolomics reveals broad-scale metabolic perturbations in hyperglycemic mothers during pregnancy. *Diabetes Care.* 2014;37(1):158-66.
120. Mahendran Y, Vangipurapu J, Cederberg H, Stancáková A, Pihlajamäki J, Soininen P, et al. Association of ketone body levels with hyperglycemia and type 2 diabetes in 9,398 Finnish men. *Diabetes.* 2013;62(10):3618-26.

121. Ottosson F, Smith E, Melander O, Fernandez C. Altered Asparagine and Glutamate Homeostasis Precede Coronary Artery Disease and Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(8):3060-9.
122. Vangipurapu J, Stancáková A, Smith U, Kuusisto J, Laakso M. Nine Amino Acids Are Associated With Decreased Insulin Secretion and Elevated Glucose Levels in a 7.4-Year Follow-up Study of 5,181 Finnish Men. *Diabetes.* 2019;68(6):1353-8.
123. Xu J, Sinclair KD. One-carbon metabolism and epigenetic regulation of embryo development. *Reprod Fertil Dev.* 2015;27(4):667-76.
124. Ducker GS, Rabinowitz JD. One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metab.* 2017;25(1):27-42.
125. Solans A, Estivill X, de la Luna S. Cloning and characterization of human FTCD on 21q22.3, a candidate gene for glutamate formiminotransferase deficiency. *Cytogenet Cell Genet.* 2000;88(1-2):43-9.
126. Kikuchi G, Motokawa Y, Yoshida T, Hiraga K. Glycine cleavage system: reaction mechanism, physiological significance, and hyperglycinemia. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2008;84(7):246-63.
127. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem.* 1990;1(5):228-37.
128. Su X, Wellen KE, Rabinowitz JD. Metabolic control of methylation and acetylation. *Curr Opin Chem Biol.* 2016;30:52-60.
129. Mentch SJ, Mehrmohamadi M, Huang L, Liu X, Gupta D, Mattocks D, et al. Histone Methylation Dynamics and Gene Regulation Occur through the Sensing of One-Carbon Metabolism. *Cell Metab.* 2015;22(5):861-73.
130. Kalhan SC. One-carbon metabolism, fetal growth and long-term consequences. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser.* 2013;74:127-38.
131. Kalhan SC. One carbon metabolism in pregnancy: Impact on maternal, fetal and neonatal health. *Mol Cell Endocrinol.* 2016;435:48-60.
132. Shere M, Nguyen P, Tam C, Stern S, Kapur B, O'Connor DL, et al. Pregnancy-induced changes in the long-term pharmacokinetics of 1.1 mg vs. 5 mg folic acid: a randomized clinical trial. *J Clin Pharmacol.* 2015;55(2):159-67.
133. Higgins JR, Quinlivan EP, McPartlin J, Scott JM, Weir DG, Darling MR. The relationship between increased folate catabolism and the increased requirement for folate in pregnancy. *Bjog.* 2000;107(9):1149-54.
134. McPartlin J, Halligan A, Scott JM, Darling M, Weir DG. Accelerated folate breakdown in pregnancy. *Lancet.* 1993;341(8838):148-9.
135. Knight AK, Park HJ, Hausman DB, Fleming JM, Bland VL, Rosa G, et al. Association between one-carbon metabolism indices and DNA methylation status in maternal and cord blood. *Sci Rep.* 2018;8(1):16873.
136. Finer S, Saravanan P, Hitman G, Yajnik C. The role of the one-carbon cycle in the developmental origins of Type 2 diabetes and obesity. *Diabet Med.* 2014;31(3):263-72.

137. Hayden MR, Tyagi SC. Impaired Folate-Mediated One-Carbon Metabolism in Type 2 Diabetes, Late-Onset Alzheimer's Disease and Long COVID. *Medicina (Kaunas)*. 2021;58(1).
138. Ramírez-Emiliano J, Fajardo-Araujo ME, Zúñiga-Trujillo I, Pérez-Vázquez V, Sandoval-Salazar C, Órnelas-Vázquez JK. Mitochondrial content, oxidative, and nitrosative stress in human full-term placentas with gestational diabetes mellitus. *Reprod Biol Endocrinol*. 2017;15(1):26.
139. Alves A, Bassot A, Bulteau AL, Pirola L, Morio B. Glycine Metabolism and Its Alterations in Obesity and Metabolic Diseases. *Nutrients*. 2019;11(6).
140. Bao XR, Ong SE, Goldberger O, Peng J, Sharma R, Thompson DA, et al. Mitochondrial dysfunction remodels one-carbon metabolism in human cells. *Elife*. 2016;5.
141. Gall WE, Beebe K, Lawton KA, Adam KP, Mitchell MW, Nakhle PJ, et al. alpha-hydroxybutyrate is an early biomarker of insulin resistance and glucose intolerance in a nondiabetic population. *PLoS One*. 2010;5(5):e10883.
142. Irino Y, Toh R, Nagao M, Mori T, Honjo T, Shinohara M, et al. 2-Aminobutyric acid modulates glutathione homeostasis in the myocardium. *Sci Rep*. 2016;6:36749.
143. Bletsas E, Filippas-Dekouan S, Kostara C, Dafopoulos P, Dimou A, Pappa E, et al. Effect of Dapagliflozin on Urine Metabolome in Patients with Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2021;106(5):1269-83.
144. Ferrannini E, Natali A, Camastra S, Nannipieri M, Mari A, Adam KP, et al. Early metabolic markers of the development of dysglycemia and type 2 diabetes and their physiological significance. *Diabetes*. 2013;62(5):1730-7.
145. Alesi S, Ghelani D, Rassie K, Mousa A. Metabolomic Biomarkers in Gestational Diabetes Mellitus: A Review of the Evidence. *Int J Mol Sci*. 2021;22(11).
146. Huxtable RJ. Physiological actions of taurine. *Physiol Rev*. 1992;72(1):101-63.
147. Nisoli E, Aquilani R, D'Antona G. Chapter 9 - Amino Acid Supplements and Diabetes. In: Watson RR, Preedy VR, editors. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes*. San Diego: Academic Press; 2013. p. 83-95.
148. Bustamante J, Alonso FJ, Lobo MV, Giné E, Tamarit-Rodríguez J, Solís JM, et al. Taurine levels and localization in pancreatic islets. *Adv Exp Med Biol*. 1998;442:65-9.
149. Song Y, Manson JE, Tinker L, Howard BV, Kuller LH, Nathan L, et al. Insulin sensitivity and insulin secretion determined by homeostasis model assessment and risk of diabetes in a multiethnic cohort of women: the Women's Health Initiative Observational Study. *Diabetes Care*. 2007;30(7):1747-52.
150. McManus ML, Churchwell KB, Strange K. Regulation of cell volume in health and disease. *N Engl J Med*. 1995;333(19):1260-6.
151. Handler JS, Kwon HM. Kidney cell survival in high tonicity. *Comp Biochem Physiol A Physiol*. 1997;117(3):301-6.
152. Hansen SH. The role of taurine in diabetes and the development of diabetic complications. *Diabetes Metab Res Rev*. 2001;17(5):330-46.

153. Devamanoharan PS, Ali AH, Varma SD. Prevention of lens protein glycation by taurine. *Mol Cell Biochem.* 1997;177(1-2):245-50.
154. Park S, Kim MY, Baik SH, Woo JT, Kwon YJ, Daily JW, et al. Gestational diabetes is associated with high energy and saturated fat intakes and with low plasma visfatin and adiponectin levels independent of prepregnancy BMI. *Eur J Clin Nutr.* 2013;67(2):196-201.
155. Seghieri G, Tesi F, Bianchi L, Loizzo A, Saccomanni G, Ghirlanda G, et al. Taurine in women with a history of gestational diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;76(2):187-92.
156. Butte NF, Hsu HW, Thotathuchery M, Wong WW, Khoury J, Reeds P. Protein metabolism in insulin-treated gestational diabetes. *Diabetes Care.* 1999;22(5):806-11.
157. Metzger BE, Phelps RL, Freinkel N, Navickas IA. Effects of gestational diabetes on diurnal profiles of plasma glucose, lipids, and individual amino acids. *Diabetes Care.* 1980;3(3):402-9.
158. Cetin I, de Santis MS, Taricco E, Radaelli T, Teng C, Ronzoni S, et al. Maternal and fetal amino acid concentrations in normal pregnancies and in pregnancies with gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;192(2):610-7.
159. Mock DM, Stratton SL, Horvath TD, Bogusiewicz A, Matthews NI, Henrich CL, et al. Urinary excretion of 3-hydroxyisovaleric acid and 3-hydroxyisovaleryl carnitine increases in response to a leucine challenge in marginally biotin-deficient humans. *J Nutr.* 2011;141(11):1925-30.
160. van Hove JL, Rutledge SL, Nada MA, Kahler SG, Millington DS. 3-Hydroxyisovalerylcarnitine in 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 1995;18(5):592-601.
161. Nilsen MS, Jersin R, Ulvik A, Madsen A, McCann A, Svensson PA, et al. 3-Hydroxyisobutyrate, A Strong Marker of Insulin Resistance in Type 2 Diabetes and Obesity That Modulates White and Brown Adipocyte Metabolism. *Diabetes.* 2020;69(9):1903-16.
162. Andersson-Hall U, Gustavsson C, Pedersen A, Malmödin D, Joelsson L, Holmäng A. Higher Concentrations of BCAAs and 3-HIB Are Associated with Insulin Resistance in the Transition from Gestational Diabetes to Type 2 Diabetes. *J Diabetes Res.* 2018;2018:4207067.
163. Menni C, Fauman E, Erte I, Perry JR, Kastenmüller G, Shin SY, et al. Biomarkers for type 2 diabetes and impaired fasting glucose using a nontargeted metabolomics approach. *Diabetes.* 2013;62(12):4270-6.
164. Lindsay KL, Hellmuth C, Uhl O, Buss C, Wadhwa PD, Koletzko B, et al. Longitudinal Metabolomic Profiling of Amino Acids and Lipids across Healthy Pregnancy. *PLoS One.* 2015;10(12):e0145794.
165. Hernández-Alvarez MI, Díaz-Ramos A, Berdasco M, Cobb J, Planet E, Cooper D, et al. Early-onset and classical forms of type 2 diabetes show impaired expression of genes involved in muscle branched-chain amino acids metabolism. *Sci Rep.* 2017;7(1):13850.
166. Floegel A, Stefan N, Yu Z, Mühlenbruch K, Drogan D, Joost HG, et al. Identification of serum metabolites associated with risk of type 2 diabetes using a targeted metabolomic approach. *Diabetes.* 2013;62(2):639-48.

167. Wang TJ, Larson MG, Vasan RS, Cheng S, Rhee EP, McCabe E, et al. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med.* 2011;17(4):448-53.
168. Huynh J, Xiong G, Bentley-Lewis R. A systematic review of metabolite profiling in gestational diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2014;57(12):2453-64.
169. Wang Q, Würtz P, Auro K, Mäkinen VP, Kangas AJ, Soininen P, et al. Metabolic profiling of pregnancy: cross-sectional and longitudinal evidence. *BMC Med.* 2016;14(1):205.
170. Leitner M, Fragner L, Danner S, Holeschovsky N, Leitner K, Tischler S, et al. Combined Metabolomic Analysis of Plasma and Urine Reveals AHBA, Tryptophan and Serotonin Metabolism as Potential Risk Factors in Gestational Diabetes Mellitus (GDM). *Front Mol Biosci.* 2017;4:84.
171. Wu G, Morris SM, Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J.* 1998;336 (Pt 1)(Pt 1):1-17.
172. Burzynska-Pedziwiatr I, Jankowski A, Kowalski K, Sendys P, Zieleniak A, Cypryk K, et al. Associations of Arginine with Gestational Diabetes Mellitus in a Follow-Up Study. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21).
173. Martí ILAA, Reith W. Arginine-dependent immune responses. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78(13):5303-24.
174. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(24):9265-9.
175. Castillo-Castrejon M, Migoya-Graue A, Meraz-Cruz N, Vadillo-Ortega F. The role of L-arginine in human pregnancy. *Agro Food Industry Hi-Tech.* 2011;22:26-8.
176. Enrique G-G, Pablo A, Fabián P, Andrea L, Luis S. The Adenosine–Insulin Signaling Axis in the Fetoplacental Endothelial Dysfunction in Gestational Diabetes. In: Luis S, editor. *Gestational Diabetes.* Rijeka: IntechOpen; 2013. p. Ch. 4.
177. Zhou Z, Mahdi A, Tratsiakovich Y, Zahorán S, Kövamees O, Nordin F, et al. Erythrocytes From Patients With Type 2 Diabetes Induce Endothelial Dysfunction Via Arginase I. *J Am Coll Cardiol.* 2018;72(7):769-80.
178. Ueland PM. Choline and betaine in health and disease. *J Inherit Metab Dis.* 2011;34(1):3-15.
179. Yan J, Jiang X, West AA, Perry CA, Malysheva OV, Devapatla S, et al. Maternal choline intake modulates maternal and fetal biomarkers of choline metabolism in humans. *Am J Clin Nutr.* 2012;95(5):1060-71.
180. Nanobashvili K, Jack-Roberts C, Bretter R, Jones N, Axen K, Saxena A, et al. Maternal Choline and Betaine Supplementation Modifies the Placental Response to Hyperglycemia in Mice and Human Trophoblasts. *Nutrients.* 2018;10(10).
181. Raubenheimer PJ, Nyirenda MJ, Walker BR. A choline-deficient diet exacerbates fatty liver but attenuates insulin resistance and glucose intolerance in mice fed a high-fat diet. *Diabetes.* 2006;55(7):2015-20.

182. Teng YW, Ellis JM, Coleman RA, Zeisel SH. Mouse betaine-homocysteine S-methyltransferase deficiency reduces body fat via increasing energy expenditure and impairing lipid synthesis and enhancing glucose oxidation in white adipose tissue. *J Biol Chem.* 2012;287(20):16187-98.
183. Velasquez MT, Ramezani A, Manal A, Raj DS. Trimethylamine N-Oxide: The Good, the Bad and the Unknown. *Toxins (Basel).* 2016;8(11).
184. Li P, Zhong C, Li S, Sun T, Huang H, Chen X, et al. Plasma concentration of trimethylamine-N-oxide and risk of gestational diabetes mellitus. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 2018;108(3):603-10.
185. Kalagi NA, Thota RN, Stojanovski E, Alburikan KA, Garg ML. Association between Plasma Trimethylamine N-Oxide Levels and Type 2 Diabetes: A Case Control Study. *Nutrients.* 2022;14(10).
186. Pinto J, Almeida LM, Martins AS, Duarte D, Barros AS, Galhano E, et al. Prediction of Gestational Diabetes through NMR Metabolomics of Maternal Blood. *J Proteome Res.* 2015;14(6):2696-706.
187. Liu T, Li J, Xu F, Wang M, Ding S, Xu H, et al. Comprehensive analysis of serum metabolites in gestational diabetes mellitus by UPLC/Q-TOF-MS. *Anal Bioanal Chem.* 2016;408(4):1125-35.