



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**Διαταραχές του μεταβολισμού των αμινοξέων διακλαδισμένης  
αλυσίδας στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και τα αυτοάνοσα νοσήματα  
του ήπατος**

**ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΔΗΜΟΥ**

Χημικός, MSc

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2023**





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**Διαταραχές του μεταβολισμού των αμινοξέων διακλαδισμένης  
αλυσίδας στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και τα αυτοάνοσα νοσήματα  
του ήπατος**

**ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΔΗΜΟΥ**

Χημικός, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2023

*«Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (2<sup>ος</sup> κύκλος - MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)»*



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

Επιχειρησιακό Πρόγραμμα  
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,  
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

«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. Δήμου Αικατερίνης: 30-11-2017

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. αριθμ. 838<sup>α</sup>/13-02-2018

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπουσα:

Μπαϊρακτάρη Ελένη, Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας

Μέλη:

Τσιμιχόδημος Βασίλειος, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας

Νταλέκος Γεώργιος, Καθηγητής Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 15-04-2018

«Διαταραχές του μεταβολισμού των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας στο Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2 και τα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος»

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 970<sup>α</sup>/29-06-2021**

1. Μπαϊρακτάρη Ελένη, Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Μηλιώνης Χαράλαμπος, Καθηγητής Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Τσελέπης Αλέξανδρος, Καθηγητής Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Νταλέκος Γεώργιος, Καθηγητής Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
5. Τσιμιχόδημος Βασίλειος, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Ζάχου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
7. Γατσέλης Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 03-07-2023

Ιωάννινα 03-11-2023

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Σπυρίδων Κοντσιώτης**

**Καθηγητής Νευρολογίας**





**Στους αγαπημένους μου γονείς,**

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Κλινικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Κλινικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κας Μπαϊρακτάρη Ελένη. Η διδακτορική διατριβή συγχρηματοδοτήθηκε από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (2<sup>ος</sup> κύκλος - MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την καθηγήτριά μου κα. Ε. Μπαϊρακτάρη για την ανάθεση του θέματος, τη συνεχή καθοδήγηση, μετάδοση γνώσεων, συμπαράσταση και υπομονή σε αυτό το μεγάλο ερευνητικό ταξίδι.

Επιπλέον θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον κ. Νταλέκο Γεώργιο Καθηγητή Παθολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και στον κ. Τσιμιχόδημο Βασίλειο Καθηγητή Παθολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τις χρήσιμες υποδείξεις τους και την καθοδήγησή τους στη συλλογή των δειγμάτων της παρούσας διατριβής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην κα. Ζάχου Καλλιόπη Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την πολύτιμη βοήθειά της στο πεδίο των αυτοάνοσων νοσημάτων του ήπατος.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μηλιώνη Χαράλαμπο Καθηγητή Παθολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, τον κ. Τσελέπη Αλέξανδρο Καθηγητή Βιοχημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και τον κ. Γατσέλη Νικόλαο Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας που δέχτηκαν να αποτελέσουν μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής της παρούσας διατριβής.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στην Δρ. Κωσταρά Χριστίνα, πανεπιστημιακή υπότροφο του εργαστηρίου Κλινικής Χημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη γενικότερη συμβολή ιδιαίτερα στη λήψη των φασμάτων, την πολύτιμη βοήθεια και υπομονή κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής, σε επιστημονικό, συναδελφικό και προσωπικό επίπεδο. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες κ. Νταφόπουλο Παναγιώτη και κα. Καρακίτσου Κυριακή καθώς και όλα τα μέλη του

εργαστηρίου Κλινικής Χημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την άψογη και εποικοδομητική συνεργασία.

Ακολούθως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συνεργάτες του Διαβητολογικού Ιατρείου του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, του Ηπατολογικού Ιατρείου της Παθολογικής Κλινικής & Ομώνυμου Ερευνητικού Εργαστηρίου της Ιατρικής Σχολής Λάρισας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και τον κ. Παρασκευά Γεώργιο, ιατρό Παθολόγο για τη συλλογή των δειγμάτων.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον κ. Τσιαφούλη Κων/νο επιστημονικό υπεύθυνο του κέντρου NMR του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, τον κ. Σπυρούλια Γεώργιο καθηγητή του τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών και την κα. Χασάπη Στυλιανή υποψήφια διδάκτορα του τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών για την υποδειγματική φιλοξενία και τις πολύτιμες συμβουλές κατά τη διάρκεια λήψης των  $^1\text{H}$ NMR φασμάτων.

Τέλος, ευχαριστώ ολόψυχα τους γονείς μου που με έμαθαν να αγωνίζομαι για τους στόχους μου με αξιοπρέπεια και επιμονή, τον αδερφό μου που ήταν πάντα δίπλα μου και τους φίλους μου για τη συμπαράστασή τους κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής.

**ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ**

<b>BCAAs</b>	Branched-Chain Amino Acids
<b>BCKAs</b>	Branched-Chain $\alpha$ -keto Acids
<b>BCAT</b>	Branched-Chain Aminotransferase
<b>BCKD</b>	Branched-Chain $\alpha$ -ketoacid Dehydrogenase
<b>BCKDK</b>	BCKD Kinase
<b>PP2Cm</b>	Protein Phosphatase 2Cm
<b>mTOR</b>	mechanistic Target Of Rapamycin
<b>TCA</b>	Tricarboxylic Acid
<b>MSUD</b>	Maple Syrup Urine Disease
<b>SGLT2</b>	Sodium-Glucose cotransporter 2
<b>3-HIVA</b>	3-Hydroxyisovalerate
<b>3-HIB</b>	3-Hydroxyisobutyrate
<b>NMR</b>	Nuclear Magnetic Resonance
<b>AIH</b>	Autoimmune Hepatitis
<b>PBC</b>	Primary Biliary Cholangitis
<b>PSC</b>	Primary Sclerosing Cholangitis
<b>CVH</b>	Χρόνιες Ιογενείς Ηπατίτιδες B & C
<b>UDCA</b>	Ουρσοδεοξυχολικό οξύ
<b>ΣΔΤ2</b>	Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2
<b>ΣΔΚ</b>	Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης
<b>ΔΝ</b>	Διαβητική Νεφροπάθεια
<b>ΑΝΗ</b>	Αυτοάνοσα Νοσήματα του Ήπατος
<b>ΑΗ</b>	Αυτοάνοση Ηπατίτιδα
<b>ΠΧΧ</b>	Πρωτοπαθής Χολική Χολαγγειίτιδα
<b>ΠΣΧ</b>	Πρωτοπαθής Σκληρυντική Χολαγγειίτιδα

## Περιεχόμενα

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	7
<b>1.1 Αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας (Branched-Chain Amino Acids, BCAAs)</b> .....	7
<b>1.2 Μεταβολισμός των BCAAs</b> .....	8
1.2.1 Βιοσύνθεση των BCAAs .....	8
1.2.2 Καταβολισμός των BCAAs.....	9
<b>1.3 Μεταβολικές πορείες των BCAAs</b> .....	13
1.3.1 Δομικοί λίθοι πρωτεϊνών και δότες αζώτου στη σύνθεση αμινοξέων .....	15
1.3.2 Τρανσαμίνωση και Οξειδωση των BCAAs .....	15
1.3.3 Ενδοκυτταρική σηματοδότηση των BCAAs .....	20
1.3.3.1 Ενεργοποίηση του μονοπατιού μεταγωγής σήματος mTOR .....	20
1.3.3.2 BCAAs και μυϊκή πρωτεϊνοσύνθεση .....	22
1.3.3.3 BCAAs και γήρανση.....	24
1.3.4 Λευκίνη και έκκριση ινσουλίνης.....	26
1.3.5 BCAAs και σύνθεση νευροδιαβιβαστών.....	27
<b>1.4 Διαταραχή του μεταβολισμού των BCAAs σε παθολογικές καταστάσεις</b> .....	28
1.4.1 Εγγενείς διαταραχές του μεταβολισμού των BCAAs .....	28
1.4.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (ΣΔΤ1) .....	31
1.4.3 Παχυσαρκία - αντίσταση στην ινσουλίνη - Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 (ΣΔΤ2) .....	32
1.4.4 Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης (ΣΔΚ) .....	38
1.4.5 Αντιδιαβητικά φάρμακα .....	39
1.4.6 Καρδιαγγειακή νόσος .....	42
1.4.7 Νόσος Alzheimer (Αλτσχάιμερ) .....	44
1.4.8 Καρκίνος.....	45
1.4.9 Ηπατική νόσος .....	49
1.4.10 Χρόνια Νεφρική νόσος – Διαβητική Νεφροπάθεια (ΔΝ) .....	53
<b>1.5 Μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού των BCAAs</b> .....	55
1.5.1 Κλασικές μέθοδοι .....	55
1.5.2 Χρωματογραφικές - Φασματοσκοπικές μέθοδοι.....	56

<b>1.6 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)</b> .....	61
1.6.1 Βασικές αρχές .....	61
1.6.2 Φασματόμετρο NMR – λήψη φάσματος.....	64
1.6.3 Χαρακτηριστικά του φάσματος NMR.....	65
<i>Αριθμός των σημάτων</i> .....	65
<i>Εμβαδά κορυφών πρωτονίων</i> .....	66
<i>Χημική μετατόπιση, η παράμετρος δ</i> .....	66
<i>Σύζευξη spin-spin (spin-spin coupling)</i> .....	67
1.6.4 Πρότυπα φάσματα <sup>1</sup> HNMR των BCAAs.....	68
1.6.5 Φάσμα <sup>1</sup> HNMR ορού του αίματος υγιούς ατόμου .....	69
<b>1.7 Σκοπός της διδακτορικής διατριβής</b> .....	71
<b>2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>72</b>
2.1 Πληθυσμός της μελέτης και συλλογή των δειγμάτων αίματος /ούρων.....	72
2.2 Διήθηση υπό φυγοκέντρηση (υπερδιήθηση) ορού/πλάσματος του αίματος.....	74
2.3 Προετοιμασία των βιολογικών δειγμάτων για τη λήψη των φασμάτων <sup>1</sup> HNMR... 76	
2.4 Λήψη και επεξεργασία των φασμάτων <sup>1</sup> HNMR.....	77
2.5 Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών από τα φάσματα <sup>1</sup> HNMR ... 79	
2.6 Στατιστική ανάλυση δεδομένων.....	79
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>81</b>
3.1 Δημογραφικά & κλινικά χαρακτηριστικά, βιοχημικές & αιματολογικές παράμετροι των πληθυσμών της μελέτης.....	81
3.2 Το <sup>1</sup> HNMR φάσμα ορού και ούρων .....	88
3.3 Ταυτοποίηση των BCAAs και των προϊόντων του καταβολισμού τους στο <sup>1</sup> HNMR φάσμα ορού/ούρων .....	93
3.3.1 Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά.....	95
3.4 Ποσοτικοποίηση των BCAAs και των καταβολικών τους προϊόντων.....	98
3.4.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (ΣΔΤ2) - διερεύνηση της επίδρασης της δαπαγλιφλοζίνης στον καταβολισμό των BCAAs.....	101
3.4.1.1 Ορός αίματος.....	101
3.4.1.2 Ούρα .....	103

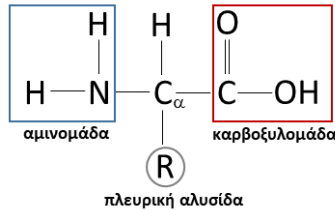
3.4.2 Διαβητική Νεφροπάθεια (ΔΝ) .....	104
3.4.2.1 Ορός αίματος .....	105
3.4.2.2 Ούρα .....	106
3.4.3 Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης (ΣΔΚ) .....	112
3.4.3.1 Ορός αίματος .....	113
3.4.4 Αυτοάνοσα Νοσήματα του Ήπατος (ΑΝΗ) & Χρόνιες Ιογενείς Ηπατίτιδες Β + C (CVH) .....	114
3.4.4.1 ΑΝΗ : ΑΗ, ΠΧΧ, ΠΣΧ χωρίς θεραπεία vs υγιείς (πλάσμα) .....	114
3.4.4.2 Χρόνιες Ιογενείς Ηπατίτιδες Β + C (CVH) vs υγιείς (πλάσμα) .....	115
3.4.4.3 ΠΧΧ, ΠΣΧ & CVH χωρίς θεραπεία vs ΑΙΗ χωρίς θεραπεία (πλάσμα) .....	115
3.4.4.4 ΑΝΗ χωρίς θεραπεία vs ΑΝΗ με θεραπεία (πλάσμα) .....	116
3.4.4.5 ΑΝΗ με θεραπεία vs υγιείς (πλάσμα) .....	117
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>120</b>
4.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (ΣΔΤ2) .....	120
4.2 Διερεύνηση της επίδρασης της δαπαγλιφλοζίνης σε ασθενείς με ΣΔΤ2 .....	126
4.3 Διαβητική Νεφροπάθεια (ΔΝ) vs ΣΔΤ2 .....	129
4.4 Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης (ΣΔΚ) vs Φυσιολογική Κύηση .....	133
4.5 Αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος (ΑΗ, ΠΧΧ, ΠΣΧ) vs Υγιείς .....	136
4.6 Χρόνιες Ιογενείς Ηπατίτιδες Β + C (CVH) vs Υγιείς .....	141
4.7 ΠΧΧ, ΠΣΧ & CVH χωρίς θεραπεία vs ΑΗ χωρίς θεραπεία .....	142
4.8 ΑΝΗ με θεραπεία vs ΑΝΗ χωρίς θεραπεία & υγιείς .....	144
<b>5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>146</b>
<b>6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ .....</b>	<b>149</b>
<b>7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ .....</b>	<b>153</b>
<b>8. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ .....</b>	<b>156</b>
<b>9. ΥΠΟΜΝΗΜΑ .....</b>	<b>157</b>
<b>10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>167</b>



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

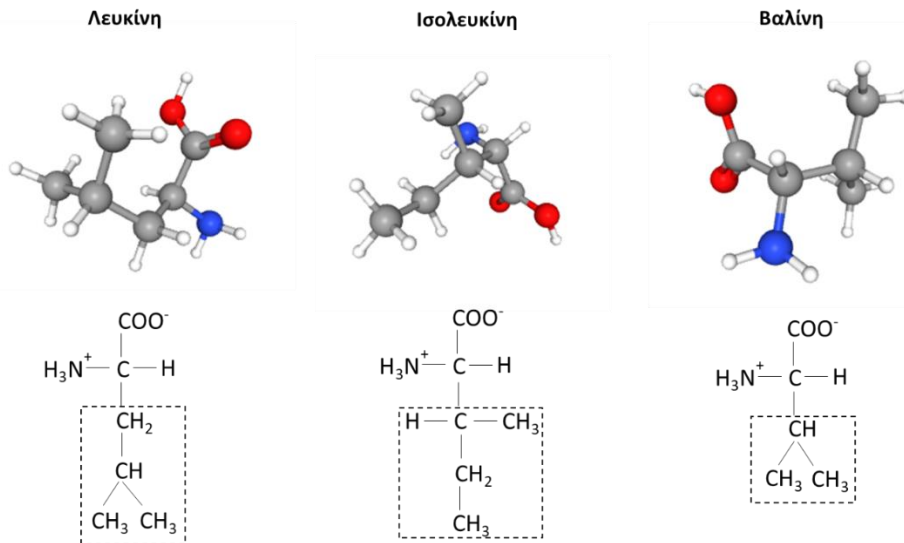
### 1.1 Αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας (Branched-Chain Amino Acids, BCAAs)

Τα αμινοξέα, όπως υποδηλώνει και η ονομασία τους, περιέχουν δύο λειτουργικές ομάδες, τη βασική αμινομάδα και την όξινη καρβοξυλομάδα. Στις πρωτεΐνες απαντούν κυρίως τα α-αμινοξέα, που σημαίνει ότι η αμινομάδα αποτελεί υποκαταστάτη στο άτομο άνθρακα που βρίσκεται σε θέση α ως προς το καρβονύλιο [1] (**εικ.1**).



**Εικόνα 1:** Γενικός συντακτικός τύπος δομής των α-αμινοξέων

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



**Εικόνα 2:** Χημική δομή των BCAAs

Ανήκουν στα απαραίτητα αμινοξέα, δηλαδή δεν μπορεί να τα βιοσυνθέσει ο ανθρώπινος οργανισμός από άλλα συστατικά, γι' αυτό πρέπει να λαμβάνονται από τη διατροφή. Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι τα βακτήρια της μικροχλωρίδας του εντέρου μπορούν να συνθέσουν BCAAs, ωστόσο η τελική διαθεσιμότητα των προερχόμενων από αυτή τη μικροβιακή σύνθεση αμινοξέων στον ξενιστή εξαρτάται τόσο από το είδος των μακροθρεπτικών συστατικών της δίαιτας όσο και από τη λειτουργική ικανότητα του εντερικού μικροβιώματος [3, 4].

Τα BCAAs, λόγω της υδρόφοβης φύσης τους κατέχουν σημαντικό ρόλο ως δομικά συστατικά και απαντώνται σε υψηλή αναλογία στις περισσότερες πρωτεΐνες, με τις διατροφικές πρωτεΐνες να τα περιέχουν σε ποσοστό περίπου 20-25% και αναλογούν στο 35% των ημερήσιων αναγκών σε απαραίτητα αμινοξέα στα θηλαστικά [5]. Επιπλέον, συμβάλλουν στη ρύθμιση της μυϊκής πρωτεϊνοσύνθεσης και του ενεργειακού μεταβολισμού καθώς και στην ομοίωση της γλυκόζης και στη φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και του εγκεφάλου.

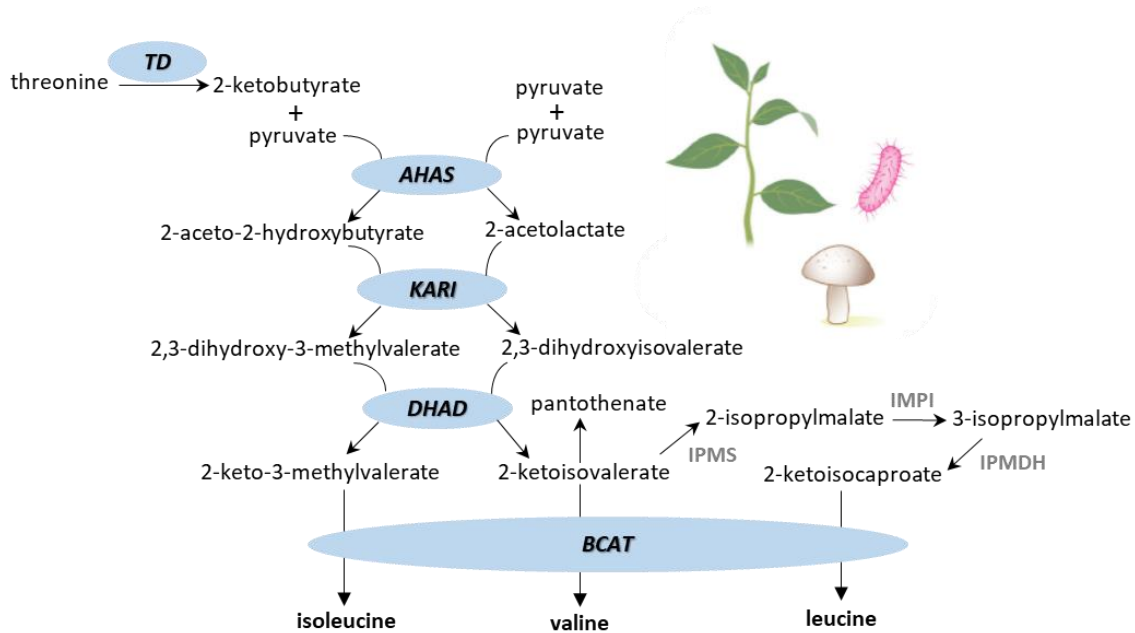
## **1.2 Μεταβολισμός των BCAAs**

### **1.2.1 Βιοσύνθεση των BCAAs**

Τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας συντίθενται σε φυτά, μύκητες και βακτήρια αλλά όχι στα θηλαστικά. Οι άνθρακες της βαλίνης και της λευκίνης προέρχονται από το πυροσταφυλικό οξύ ενώ της ισολευκίνης από τη θρεονίνη. Οκτώ ένζυμα καταλύουν τη βιοσύνθεση των BCAAs, εκ των οποίων τέσσερα (aceto-hydroxyacid synthase AHAS, ketol-acid reductoisomerase KARI, dihydroxyacid dehydratase DHAD, branched-chain aminotransferase BCAT) είναι κοινά και για τα τρία BCAAs, τρία (isopropylmalate synthase IPMS, isopropylmalate isomerase IMPI, isopropylmalate dehydrogenase IPMDH) συμμετέχουν μόνο στη σύνθεση της λευκίνης και ένα (threonine deaminase TD) εμπλέκεται μόνο στη βιοσύνθεση της ισολευκίνης [6]. Η βιοσυνθετική πορεία της λευκίνης διαφοροποιείται από τα άλλα δύο BCAAs καθώς εξαρτάται από την παραγωγή του 2-κετοϊσοβαλερικού οξέος το οποίο συντίθεται από δύο μόρια πυροσταφυλικού σε μια οδό που περιλαμβάνει τρεις αντιδράσεις. Στη συνέχεια, το 2-κετοϊσοβαλερικό οξύ μετατρέπεται σε βαλίνη από το ένζυμο BCAT ή μεταβολίζεται περαιτέρω σε λευκίνη ή σε παντοθενικό οξύ [7].

Η αναστολή της δράσης των παραπάνω οκτώ ενζύμων επηρεάζει τη σύνθεση και/ή την ανακύκλωση βασικών αμινοξέων και μεταβολιτών για τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση του

μικροοργανισμού με αποτέλεσμα τα ένζυμα αυτά να αποτελούν πιθανούς στόχους για την ανάπτυξη ζιζανιοκτόνων, μυκητοκτόνων και αντιμικροβιακών ενώσεων [8, 9] (εικ.3).

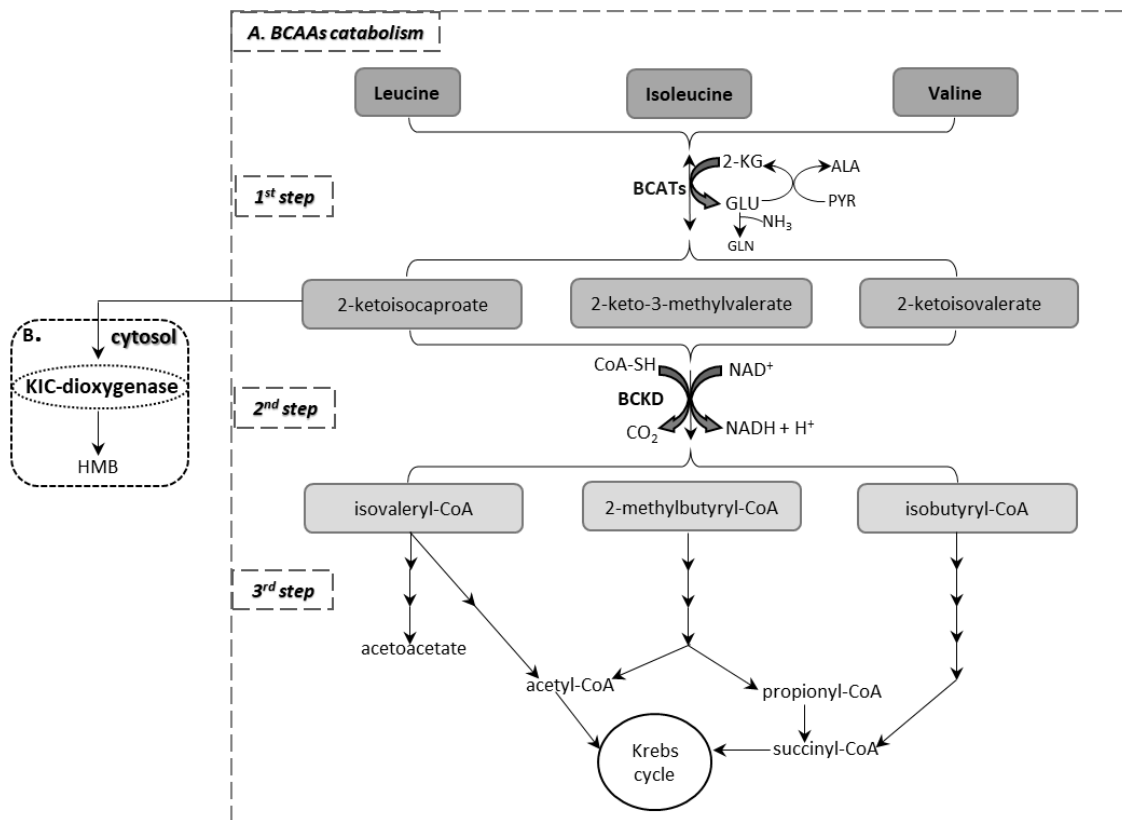


**Εικόνα 3:** Βιοσυνθετικό μονοπάτι των BCAAs (threonine deaminase; *TD*, aceto-hydroxyacid synthase; *AHAS*, ketol-acid reductoisomerase; *KARI*, dihydroxyacid dehydratase; *DHAD*, branched-chain aminotransferase; *BCAT*, isopropylmalate synthase; *IPMS*, isopropylmalate isomerase; *IMPI*, isopropylmalate dehydrogenase; *IPMDH*) (Ref [9]: Neinast M. et al., 2019).

### 1.2.2 Καταβολισμός των BCAAs

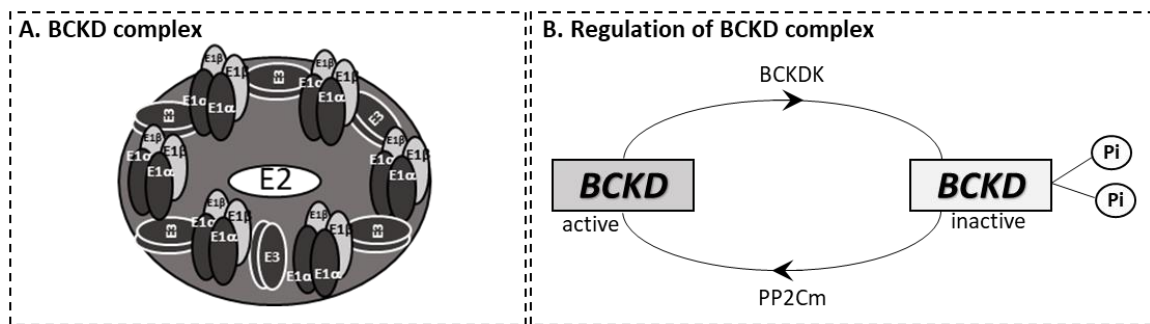
Για τη διατήρηση της ομοιόστασης των επιπέδων των BCAAs στο αίμα και στους ιστούς, ο καταβολισμός της περίσσειας των BCAAs λαμβάνει χώρα στα κύτταρα των θηλαστικών διαμέσου μιας οδού που περιλαμβάνει τρία κύρια βήματα. Το **πρώτο** βήμα είναι μια αντιστρεπτή αντίδραση τρανσαμίνωσης κατά την οποία τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας μετατρέπονται στα αντίστοιχα α-κετοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας (Branched-chain α-keto acids, BCKAs): 2-κετοϊσοκαπροϊκό (2-ketoisocaproate, KIC), 2-κετο-3-μεθυλοβαλερικό (2-keto-3-methylvalerate, KMV), 2-κετοϊσοβαλερικό (2-ketoisovalerate, KIV), από λευκίνη ισολευκίνη και βαλίνη αντίστοιχα (εικ.4A & εικ.1Y) [10]. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο αμινοτρανσφεράση διακλαδισμένης αλυσίδας (branched-chain aminotransferase, BCAT) το οποίο απαντάται σε δύο κύριες ισομορφές (BCATs): α) κυτοσολική (BCATc or BCAT1) η οποία εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο και σε ανοσοκύτταρα (ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα και μακροφάγα), β)

μιτοχονδριακή (BCATm or BCAT2) η οποία εκφράζεται στους περισσότερους ιστούς, κυρίως στους σκελετικούς μύες, στα νεφρά, στο πάγκρεας, στο στομάχι, στο παχύ έντερο καθώς και σε ανοσοκύτταρα (μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα) [11-13]. Σε αντίθεση με τα περισσότερα αμινοξέα τα οποία καταβολίζονται κυρίως στο ήπαρ, η αποικοδόμηση των BCAAs ξεκινά στους σκελετικούς μύες λόγω της απουσίας ή χαμηλής δραστηριότητας του ενζύμου BCAT στο ήπαρ. Ο κύριος αποδέκτης της αμινομάδας των BCAAs στην αρχική αντίδραση καταβολισμού τους είναι το 2-κετογλουταρικό (2-ketoglutarate, 2-KG), το οποίο μετατρέπεται σε γλουταμινικό (glutamate, GLU) (εικ.4A & εικ.1Y). Ακολούθως, η αμινομάδα του γλουταμινικού μπορεί να μεταφερθεί στο πυροσταφυλικό (pyruvate, PYR) για το σχηματισμό αλανίνης (alanine, ALA) ή εναλλακτικά η προσθήκη μιας επιπλέον αμινομάδας στο γλουταμινικό οδηγεί στο σχηματισμό γλουταμίνης (glutamine, GLN), μια σημαντική αντίδραση στη διαδικασία αποτοξίνωσης από αμμωνία. Η αλανίνη, η γλουταμίνη και μια ποσότητα των  $\alpha$ -κετοξέων απελευθερώνονται από τους μύες στην κυκλοφορία του αίματος.



**Εικόνα 4:** Α. Καταβολισμός των BCAAs Β. Εναλλακτική οδός καταβολισμού της λευκίνης. 3-hydroxy-3-methylbutyrate; HMB, 2-ketoisocaproate dioxygenase; KIC-dioxygenase (Ref [10]: Dimou A. et al., 2022).

Το **δεύτερο** βήμα περιλαμβάνει την μη αντιστρεπτή αντίδραση οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης των  $\alpha$ -κετοξέων με προϊόντα: α) ακυλο-CoA εστέρες διακλαδισμένης αλυσίδας, β)  $\text{CO}_2$  και γ) NADH. Συγκεκριμένα, στην παραπάνω αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο αφυδρογονάση των  $\alpha$ -κετοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase, BCKD) οι ανθρακικοί σκελετοί των 2-κετοϊσοκαπροϊκού, 2-κετο-3-μεθυλοβαλερικού και 2-κετοϊσοβαλερικού μετατρέπονται σε ισοβαλερυλο-CoA, 2-μεθυλοβουτυρυλο-CoA και ισοβουτυρυλο-CoA, αντίστοιχα (**εικ.4A & εικ.1Y**). Η αφυδρογονάση των  $\alpha$ -κετοξέων είναι ένα πολυενζυμικό σύμπλεγμα που βρίσκεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και αποτελείται από τρία είδη ενζύμων συνενωμένα σε ενιαίο σύνολο (**εικ.5A**): 1) το ετεροτετραμερές ( $\alpha_2\beta_2$ ) της αποκαρβοξυλάσης E1 (E1 $\alpha_2$ E1 $\beta_2$ ), με προσθετική ομάδα τη θειαμίνη που καταλύει την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση των BCKAs, 2) τη διυδρολιπούλο-τρανσακυλάση (E2) για τη μεταφορά της ακυλο-ομάδας στο CoA, 3) τη διυδρολιπούλο-αφυδρογονάση (E3) με προσθετική ομάδα FAD που καταλύει τη μεταφορά των παραγόμενων  $e^-$  στο FAD και ακολούθως στο  $\text{NAD}^+$  [11]. Η δραστηριότητα του συμπλόκου της BCKD ρυθμίζεται από ένα κύκλο φωσφορυλίωσης – αποφωσφορυλίωσης της E1 $\alpha$  υπομονάδα της: η φωσφορυλίωση από μια ειδική κινάση (BCKD kinase, BCKDK) οδηγεί στην απενεργοποίηση του συμπλόκου ενώ η αποφωσφορυλίωση από μια ειδική φωσφατάση (protein phosphatase 2Cm, PP2Cm) οδηγεί στην ενεργοποίησή του (**εικ.5B**).



**Εικόνα 5:** **A.** Δομή του συμπλόκου της BCKD **B.** Ενεργοποίηση/Απενεργοποίηση του συμπλόκου της BCKD. branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase; BCKD, BCKD kinase; BCKDK, protein phosphatase 2Cm; PP2Cm (Ref [10]; Dimou A et al, 2022).

Η κινάση και η φωσφατάση συνδέουν τη δραστηριότητα του συμπλόκου της αφυδρογονάσης με τη σίτιση, καθώς η φωσφατάση εμφανίζει μεγαλύτερη ενζυμική δραστηριότητα στη σίτιση η οποία μειώνεται με τη νηστεία ενώ το αντίστροφο συμβαίνει με την κινάση [14].

Επιπλέον, η δραστηριότητα της κινάσης ρυθμίζεται αλλοστερικά με πρόσδεση των υποστρωμάτων της αντίδρασης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Μέσω αυτής της πρόσδεσης, τα α-κετοξέα και ιδιαίτερα το 2-κετοϊσοκαπροϊκό καταστέλλουν την ενζυμική δραστηριότητα της κινάσης [15]. Τέλος, αναστολή του συμπλόκου της αφυδρογονάσης μπορεί να επιτευχθεί σε αυξημένες αναλογίες NADH/NAD<sup>+</sup>, acyl-CoA/CoA-SH καθώς και υψηλής συγκέντρωσης ATP. Υψηλότερη δραστηριότητα της αφυδρογονάσης BCKD καταγράφεται στο ήπαρ, ενδιάμεση στους νεφρούς και στην καρδιά και σχετικά χαμηλή στους μύες, το λιπώδη ιστό και τον εγκέφαλο [16].

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, στα ηπατοκύτταρα το ένζυμο BCAT δεν εκφράζεται ή παρουσιάζει χαμηλή ενζυμική δραστηριότητα σε αντίθεση με τους σκελετικούς μύες όπου εκφράζονται και τα δύο κύρια ένζυμα του καταβολισμού των BCAAs. Σαν συνέπεια, ο καταβολισμός των BCAAs λαμβάνει χώρα κυρίως στους σκελετικούς μύες και ακολούθως στο ήπαρ και τους υπόλοιπους περιφερικούς ιστούς (λιπώδης ιστός, νεφροί, καρδιά, εγκέφαλος κ.ά.) (εικ.6).



**Εικόνα 6:** Καταβολισμός των BCAAs στους ιστούς.

Το **τρίτο** βήμα αποικοδόμησης των BCAAs καταλήγει στην παραγωγή ATP μέσω μιας σειράς περαιτέρω ενζυματικών αντιδράσεων και ξεχωριστών μεταβολικών οδών για το κάθε αμινοξύ. Συγκεκριμένα, το μονοπάτι καταβολισμού της λευκίνης οδηγεί στο σχηματισμό ακετυλο-CoA και ακετοξικού οξέος πρόδρομα μόρια κετογένεσης, καθιστώντας τη λευκίνη αμιγώς κετογενετικό αμινοξύ ενώ η οξείδωση της βαλίνης οδηγεί στην παραγωγή του ηλεκτρυλο-CoA μια δυνητικά πρόδρομη ένωση γλυκονογένεσης, κατατάσσοντας τη βαλίνη στα γλυκογενετικά αμινοξέα. Η ισολευκίνη ανήκει και στις δύο παραπάνω κατηγορίες αμινοξέων (γλυκογενετικό και κετογενετικό) καθώς σχηματίζονται και ηλεκτρυλο-CoA και ακετυλο-CoA ως προϊόντα του καταβολισμού της.

Επιπλέον, έχει περιγραφεί μια εναλλακτική οδός καταβολισμού της λευκίνης η οποία λαμβάνει χώρα στο κυτοσόλιο του ήπατος σε ένα ποσοστό 5-10% και περιλαμβάνει την οξειδωση του 2-κετοϊσοκαπροϊκού σε 3-υδροξυ-3-μεθυλοβουτυρικό οξύ (3-hydroxy-3-methylbutyrate, HMB) με τη δράση του ενζύμου διοξυγενάση του 2-κετοϊσοκαπροϊκού (2-ketoisocaproate dioxygenase) [17] (εικ.4B).

### 1.3 Μεταβολικές πορείες των BCAAs

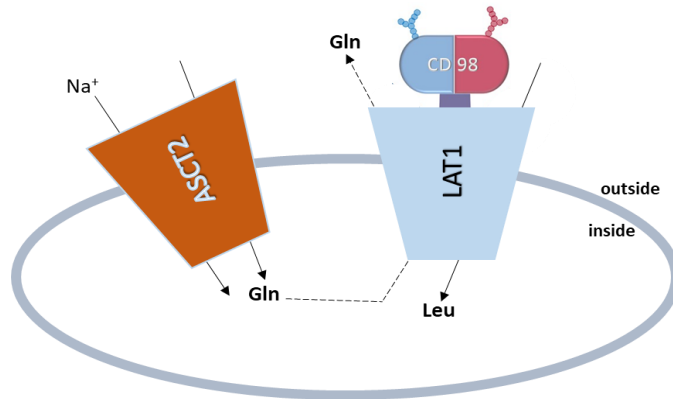
Τα BCAAs που προέρχονται από τη δίαιτα ή από τη διάσπαση των πρωτεϊνών μεταφέρονται από τη συστηματική κυκλοφορία στους ιστούς όπου μπορούν να οξειδωθούν ή να ενσωματωθούν σε νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες.

Το σύστημα των μη εξαρτώμενων από ιόντα νατρίου μεταφορέων τύπου L (L-type amino acid transporters, LATs) είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά των ουδέτερων, όπως τα BCAAs, αμινοξέων από και προς το εσωτερικό του κυττάρου. Η διαμεμβρανική μεταφορά των BCAAs στα κύτταρα των διαφόρων ιστών γίνεται από τέσσερις υποομάδες της οικογένειας των LAT μεταφορέων (LAT1, LAT2, LAT3, LAT4) [18]. Οι μεταφορείς LAT1 και LAT2 εντοπίζονται στους περισσότερους ιστούς κυρίως στον εγκέφαλο, τους νεφρούς, τον σπλήνα, το ήπαρ, τους σκελετικούς μύες, την καρδιά, το έντερο, τους πνεύμονες, τον πλακούντα, καθώς και τα ενεργοποιημένα T κύτταρα [19, 20]. Ο μεταφορέας LAT3 εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ, τους σκελετικούς μύες και το πάγκρεας ενώ ο μεταφορέας LAT4 στους νεφρούς, τον πλακούντα καθώς επίσης και στα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος [21, 22].

Η μεταφορά των αμινοξέων δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης μέσω των LAT1 και LAT2 μεταφορέων εξαρτάται από τη σύνδεση των συγκεκριμένων μεταφορέων με την τύπου II διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη CD98 (type II transmembrane glycoprotein CD98, 4F2hc), σχηματίζοντας έτσι ένα ετεροδιμερές υψηλής συγγένειας [23]. Αντιθέτως οι μεταφορείς LAT3 και LAT4 είναι διευκολυντές της διάχυσης των αμινοξέων χωρίς ειδική πρόσδεση σε επιφανειακά μόρια της μεμβράνης [21, 22].

Αναφέρεται ότι η μεταφορά της λευκίνης στα κύτταρα μέσω των LAT1 μεταφορέων συνδέεται με την επάρκεια γλουταμίνης. Ειδικότερα, η γλουταμίνη μεταφέρεται στο εσωτερικό των κυττάρων από το νατριοεξαρτώμενο μεταφορέα (alanine-serine-cysteine-preferring transporter 2, ASCT2) και εκρέει από τα κύτταρα μέσω του μεταφορέα LAT1. Ο LAT1 χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα εκροής την ενδοκυτταρική γλουταμίνη για την εισροή λευκίνης, ρυθμίζοντας έτσι τη συγκέντρωση της λευκίνης στο κύτταρο [24] (εικ.7). Τέλος, η προσθήκη λευκίνης στο θρεπτικό

υλικό καλλιέργειας επιθηλιακών εντερικών κυττάρων οδήγησε στην αύξηση της γονιδιακής έκφρασης των μεταφορέων ASCT2 και 4F2hc (heavy chain of the cell surface antigen 4F2) γεγονός που υποδηλώνει ότι η λευκίνη συμβάλλει στη ρύθμιση της διαμεμβρανικής μεταφοράς ουδέτερων και κατιονικών αμινοξέων στο λεπτό έντερο, μια σημαντική διαδικασία για τη διατήρηση της ομοιόστασης των επιπέδων των αμινοξέων στο πλάσμα. [25].



**Εικόνα 7:** Ανταλλαγή λευκίνης - γλουταμίνης διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης. *alanine–serine–cysteine–preferring transporter 2; ASCT2, L-type amino acid transporter-1; LAT1, type II transmembrane glycoprotein CD98, Leu; Leucine, Gln; Glutamine.*

Στο κύτταρο, τα BCAAs χρησιμοποιούνται ως:

- 1) δομικοί λίθοι πρωτεϊνών και δότες αζώτου στη σύνθεση άλλων αμινοξέων
- 2) υποστρώματα ενέργειας/αναπλήρωσης καθώς καταβολίζονται στα πρόδρομα μόρια γλυκονογένεσης (ηλεκτρουλο-CoA) και κετογένεσης (ακετυλο-CoA και ακετοξικό)
- 3) σηματοδοτικά μόρια μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού μεταγωγής σήματος mTOR
- 4) διέγερση της έκκρισης ινσουλίνης στα παγκρεατικά β-κύτταρα (λευκίνη)
- 5) πρόδρομα μόρια στη σύνθεση νευροδιαβιβαστών στα κύτταρα του εγκεφάλου



### 1.3.1 Δομικοί λίθοι πρωτεϊνών και δότες αζώτου στη σύνθεση αμινοξέων

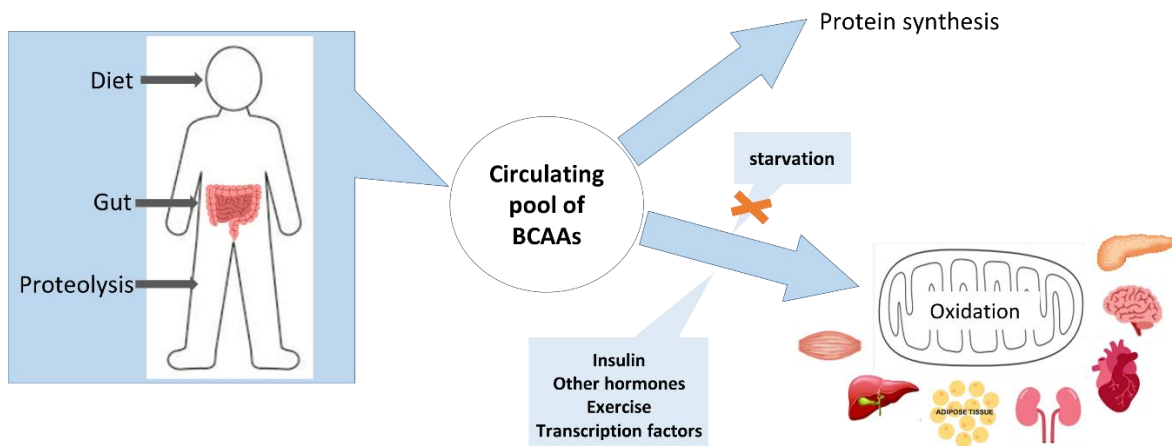
Τα BCAAs είναι τα πιο υδρόφοβα συγκριτικά με τα υπόλοιπα αμινοξέα και κατέχουν πρωταρχικό ρόλο στη διαμόρφωση της δομής των σφαιρικών πρωτεϊνών καθώς επίσης και στην αλληλεπίδραση των μεμβρανικών πρωτεϊνών με τη διπλοστοιβάδα των φωσφολιπιδίων. Ωστόσο και τα τρία BCAAs δεν συμβάλλουν με τον ίδιο τρόπο στη διαμόρφωση της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών, καθώς η λευκίνη έχει την τάση να βρίσκεται σε α-έλικες, ενώ η βαλίνη και η ισολευκίνη σε β-πτυχώσεις [5]. Οι διακλαδώσεις των ατόμων β-άνθρακα της βαλίνης και ισολευκίνης αποσταθεροποιούν τις α-έλικες διότι δεν μπορούν να διευθετηθούν στη συγκεκριμένη γεωμετρική διάταξη με αποτέλεσμα να προσαρμόζονται στις β-πτυχώσεις όπου οι πλευρικές αλυσίδες τους προβάλλουν έξω από το επίπεδο που περιέχει την κύρια αλυσίδα. Αν και η αντικατάσταση ενός BCAA σε άλλο θεωρείται συντηρητική, αναφέρονται περιπτώσεις τέτοιων αντικαταστάσεων με σημαντική επίδραση στη λειτουργία των πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα η αντικατάσταση της ισολευκίνης από τη βαλίνη στην πρωτεΐνη τρανσθυρετίνη οδηγεί στην αμυλοειδική μυοκαρδιοπάθεια που χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση ινιδίων αμυλοειδούς στην καρδιά [5]. Τέλος τα BCAAs, ως δότες αζώτου συμβάλλουν στην σύνθεση άλλων αμινοξέων όπως η αλανίνη, το γλουταμινικό και η γλουταμίνη.

### 1.3.2 Τρανσαμίνωση και Οξειδωση των BCAAs

Καθώς τα BCAAs ανήκουν στα απαραίτητα αμινοξέα πρέπει να διασφαλίζεται η ισορροπία ανάμεσα στην πρόσληψη και τον καταβολισμό τους ώστε να διατηρηθεί η ομοιόσταση των επιπέδων τους. Έτσι, η διαθεσιμότητα των BCAAs στο πλάσμα καθορίζεται από μια ισορροπία μεταξύ εισροής (κυρίως από διατροφή, πρωτεόλυση και σε μικρότερο βαθμό από την εντερική μικροχλωρίδα) και εκροής (πρωτεϊνοσύνθεση και καταβολισμός) (**εικ.8**). Μετά τη σίτιση, τα BCAAs μεταφέρονται στους ιστούς όπου χρησιμοποιούνται στην πρωτεϊνοσύνθεση ή καταβολίζονται με αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων τους στο πλάσμα ενώ σε περιόδους νηστείας η αυξημένη πρωτεόλυση οδηγεί στην απελευθέρωση των BCAAs από τους ιστούς στην κυκλοφορία με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων τους [26].

Σε φυσιολογικές συνθήκες ο καταβολισμός των BCAAs αυξάνεται μεταγευματικά. Εκτός από τη διαθεσιμότητά τους, ο ρυθμός καταβολισμού τους στους ιστούς ρυθμίζεται και από άλλους παράγοντες. Ορμόνες όπως η ινσουλίνη, τα γλυκοκορτικοειδή καθώς και ορμόνες του θυρεοειδούς αδένου αυξάνουν τον καταβολισμό των BCAAs [26, 27]. Η άσκηση αυξάνει τον

καταβολισμό των BCAAs και όχι των υπόλοιπων πρωτεϊνικών αμινοξέων, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια μιας έντονης προπόνησης αντοχής [28, 29]. Μελέτες σε ζωικά μοντέλα υποδεικνύουν ότι η προπόνηση αντοχής οδηγεί στον αυξημένο καταβολισμό των BCAAs στους σκελετικούς μύες μέσω της υπερέκφρασης του μεταγραφικού συν-ενεργοποιητή PGC-1α (Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\alpha$  coactivator 1 $\alpha$ ), ο οποίος επάγει την αυξημένη έκφραση των καταβολικών ενζύμων των BCAAs [30, 31]. Έτσι θεωρείται ότι τα BCAAs στην προπόνηση χρησιμοποιούνται από τον οργανισμό κυρίως ως ενεργειακά καύσιμα, συμβάλλοντας στην αύξηση της αντοχής και λιγότερο στην αύξηση της μυϊκής μάζας [32]. Ωστόσο, τα αποτελέσματα από μελέτες σε ανθρώπους σχετικά με την υπόθεση ότι η προπόνηση αντοχής αυξάνει τον καταβολισμό των BCAAs κατά τη διάρκεια της άσκησης είναι αμφιλεγόμενα [33]. Επιπλέον, οι γυναίκες καταβολίζουν λιγότερη λευκίνη από τους άντρες κατά τη διάρκεια της άσκησης και αυτό οφείλεται εν μέρει στα οιστρογόνα [34]. Τέλος, εκτός του PGC-1 $\alpha$  και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες όπως ο ChREBP- $\beta$  (Carbohydrate-response element-binding protein- $\beta$ ) που ρυθμίζει την ενζυμική δραστηριότητα της BCKD στο ήπαρ και ο KLF15 (Krüppel-like factor 15) που αυξάνει τη μεταγραφή του γονιδίου της BCAT στην καρδιά, επηρεάζουν επίσης τους ρυθμούς τρανσαμίνωσης των BCAAs [26] (εικ.8).



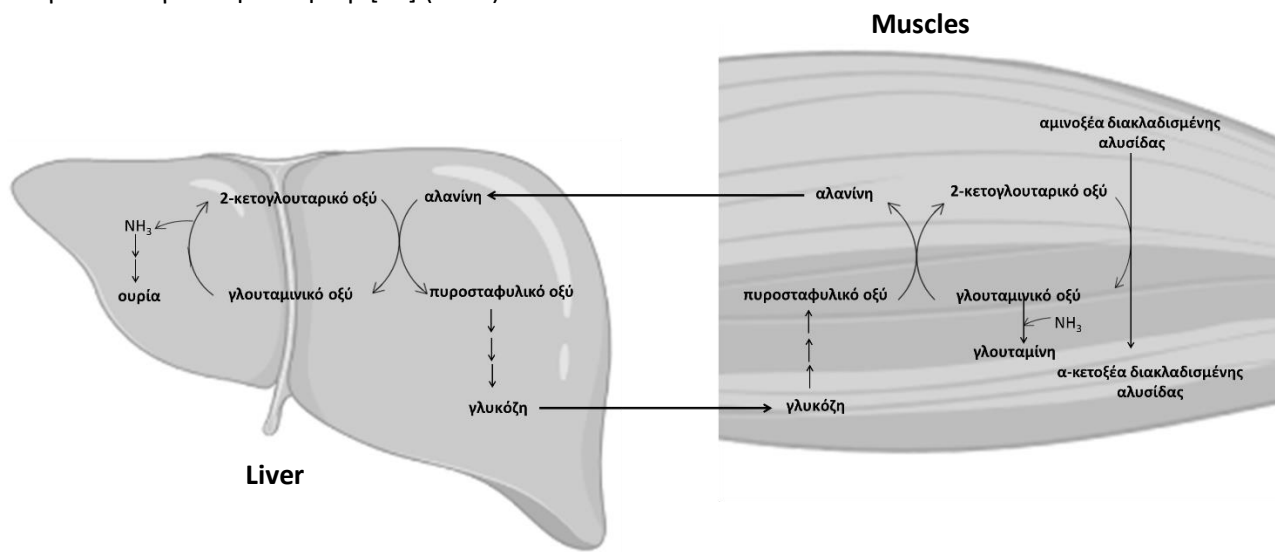
**Εικόνα 8:** Φυσιολογία των BCAAs στον ανθρώπινο οργανισμό

Για την εκτίμηση της ροής καταβολισμού των BCAAs έχουν πραγματοποιηθεί *ex vivo* αναλύσεις της δραστηριότητας των BCAT και BCKD σε κυτταρικά εκχυλίσματα διαφορετικών ιστών ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι αυτές οι μελέτες δεν λαμβάνουν υπόψη τους πολυάριθμους *in vivo* ρυθμιστικούς παράγοντες καταβολισμού [5]. Οι άμεσες (*in vivo*) μετρήσεις του

καταβολισμού των BCAAs μπορούν να πραγματοποιηθούν με τη χρήση ισοτοπικού ιχνηθέτη και παρακολούθησης σε κάθε ιστό, μελέτες μη πρακτικές στον άνθρωπο. Σε πειραματόζωα, in vivo μελέτες έγχυσης επισημασμένων BCAAs υποδεικνύουν ότι ο καταβολισμός τους πραγματοποιείται ενεργά σε όλους τους ιστούς [35].

Τα BCAAs μαζί με άλλα θρεπτικά συστατικά προσλαμβάνονται από το έντερο, αλλά σε αντίθεση με άλλα αμινοξέα, η πλειονότητα τους παρακάμπτει τον ηπατικό μεταβολισμό, λόγω της χαμηλής ενζυμικής δραστηριότητας του ενζύμου BCAT στα ηπατοκύτταρα. Ωστόσο, κάποιου βαθμού τρανσαμίνωση θεωρείται ότι γίνεται στο ήπαρ, καθώς έχει αναφερθεί ότι τα μη παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος εκφράζουν το ένζυμο BCAT, χωρίς να έχει καταστεί σαφές σε τι ποσοστό [36, 37]. Συνεπώς, οι εξωηπατικοί ιστοί απαμινώνουν το μεγαλύτερο ποσοστό των BCAAs και τα παραγόμενα α-κετοξέα μπορούν να «επιστρέψουν» στο ήπαρ για οξείδωση καθώς παρουσιάζει υψηλή δραστηριότητα BCKD, συμμετέχοντας έτσι στη διαδικασία αποκαρβοξυλίωσης τους.

Οι σκελετικοί μύες αποτελούν την κύρια θέση καταβολισμού των BCAAs καθώς η τρανσαμίνωσή τους λαμβάνει χώρα σε μεγάλο ποσοστό (65%) στους σκελετικούς μύες και μέσω αυτής της διαδικασίας συμμετέχουν στην ανταλλαγή αζώτου μεταξύ μυών και ήπατος [38]. Τόσο η αλανίνη όσο και η γλουταμίνη που παράγονται μέσω της τρανσαμίνωσης των BCAAs συμβάλλουν στη μεταφορά της τοξικής αμμωνίας από τους μύες στο ήπαρ και τα νεφρά για να μεταβολιστεί και να αποβληθεί αντίστοιχα, εμποδίζοντας τη τοξική συσσώρευσή της [39]. Επιπλέον, η αλανίνη που απελευθερώνεται από τους σκελετικούς μύες αποτελεί σημαντικό υπόστρωμα για τη γλυκονεογένεση στο ήπαρ [40] (εικ.9).

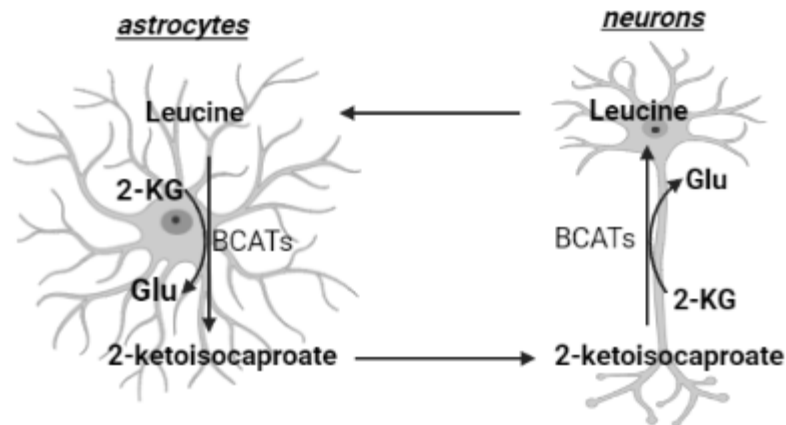


Εικόνα 9: Κύκλος αλανίνης

Στους σκελετικούς μύες τα BCAAs συμμετέχουν στον ενεργειακό μηχανισμό είτε μέσω της πλήρους οξειδωσής τους σε CO<sub>2</sub> και της παραγωγής ATP είτε μόνο μέσω της τρανσαμίνωσή τους με την παραγωγή NADH και 2-κετογλουταρικού, το οποίο τροφοδοτεί τον κύκλο του κιτρικού [41]. Σύμφωνα με μελέτες, η άσκηση αυξάνει τον καταβολισμό των BCAAs στους σκελετικούς μύες λόγω 1) της αύξησης της ενζυμικής δραστηριότητας της BCKD, η οποία ρυθμίζεται από τη συγκέντρωση των BCAAs και BCKAs στις μυϊκές ίνες, 2) την εξάντληση του μυϊκού γλυκογόνου κατά τη διάρκεια και μετά την άσκηση, 3) τη μείωση του pH και 4) τις μεταβολές στο λόγο ATP/ADP [12]. Κατά τη διάρκεια της παρατεταμένης άσκησης, οι σκελετικοί μύες προσλαμβάνουν τα BCAAs από την κυκλοφορία για να τα χρησιμοποιήσουν ως ενεργειακά υποστρώματα [42]. Προς αυτή την κατεύθυνση, η λήψη συμπληρωμάτων λευκίνης επάγει τον καταβολισμό των BCAAs και τη μείωση στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου τόσο στους μύες όσο και στο ήπαρ [43-45]. Η μείωση της αποικοδόμησης του γλυκογόνου συμβάλλει στην καλύτερη απόδοση κατά τη διάρκεια της άσκησης [43].

Αν και οι περισσότεροι ιστοί χρησιμοποιούν σε μικρό ποσοστό τα BCAAs στην τροφοδότηση του κύκλου του κιτρικού (1-6%), στο πάγκρεας τα BCAAs αποτελούν κύρια πηγή οξειδωτικού καυσίμου, αντιπροσωπεύοντας ένα ποσοστό μεγαλύτερο του 20% των ανθράκων που ενσωματώνονται στον κύκλο TCA [9].

Ο εγκέφαλος συμμετέχει στον καταβολισμό των BCAAs λόγω της υψηλής δραστηριότητας των ενζύμων BCAT και BCKD, ωστόσο ο ρυθμός τρανσαμίνωσης υπερβαίνει σημαντικά τον ρυθμό οξείδωσης [46]. Η τρανσαμίνωση των BCAAs στον εγκέφαλο ρυθμίζει τη σύνθεση του γλουταμινικού μέσω της τρανσαμίνωσης και της επαναμίνωσης των BCKAs, εμποδίζοντας τις υψηλές συγκεντρώσεις αυτού του νευροδιαβιβαστή να γίνουν τοξικές στο κεντρικό νευρικό σύστημα [47, 48] (**εικ. 4**). Έτσι, σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό του εγκεφάλου κατέχει ο κύκλος «λευκίνης-γλουταμινικού» που συμβάλλει στη μεταφορά αζώτου μεταξύ αστροκυττάρων και νευρώνων. Μετά την τρανσαμίνωση της λευκίνης, το 2-κετοϊσοκαπροϊκό απελευθερώνεται από τα αστροκύτταρα στο εξωκυττάριο υγρό και μεταφέρεται στους νευρώνες όπου μέσω επαναμίνωσης μετατρέπεται ξανά σε λευκίνη. Στη συνέχεια, η λευκίνη απελευθερώνεται στο εξωκυττάριο υγρό και μεταφέρεται πίσω στα αστροκύτταρα, ολοκληρώνοντας τον κύκλο και συμβάλλοντας έτσι στην ομοιόσταση των επιπέδων του γλουταμινικού [48] (**εικ.10**).



**Εικόνα 10:** Κύκλος λευκίνης- γλουταμινικού

Μελέτες *ex vivo* δείχνουν ότι ο λιπώδης ιστός καταβολίζει τα BCAAs και παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση των επιπέδων τους [49]. Στα μιτοχόνδρια των λιποκυττάρων, τα BCAAs καταβολίζονται σε ακετυλο-CoA και ηλεκτρυλο-CoA τα οποία μέσω του κύκλου του Krebs συμμετέχουν στη σύνθεση του κιτρικού και στη συνέχεια στη διαδικασία λιπογένεσης [50]. Σε αντίθεση με τα αδιαφοροποίητα λιποκύτταρα τα οποία καταναλώνουν γλυκόζη και γλουταμίνη για το σχηματισμό του ακετυλο-CoA ως υπόστρωμα λιπογένεσης, τα διαφοροποιημένα λιποκύτταρα χρησιμοποιούν BCAAs κυρίως λευκίνη και ισολευκίνη η οξείδωση των οποίων παρέχει περίπου το 30% του ακετυλο-CoA [51].

Μελέτες *in vitro* έχουν δείξει ότι τα ανοσοκύτταρα εμφανίζουν υψηλή δραστικότητα των καταβολικών ενζύμων BCAT και BCKD και κυρίως η φάση S του κυτταρικού κύκλου ακολουθείται από αυξημένη πρόσληψη των BCAAs και κυρίως λευκίνης [52]. Επιπλέον σε απόκριση στα μιτογόνα, η δέσμευση και ο καταβολισμός των BCAAs στα T κύτταρα ενισχύεται, με αναφερόμενη αύξηση 270% στη μεταφορά τους, 195% στην τρانشαμίνωση τους και 122% στην οξείδωση της λευκίνης [53].

Τέλος, και άλλοι ιστοί έχουν την ικανότητα να καταβολίσουν BCAAs όπως η καρδιά που τα χρησιμοποιεί ως ενεργειακά υποστρώματα και οι νεφροί που εμφανίζουν υψηλότερη δραστικότητα του ενζύμου BCAT συγκριτικά με το ένζυμο BCKD γεγονός που υποδηλώνει υψηλότερη τρانشαμίνωση συμβάλλοντας στη ρύθμιση του νεφρικού μεταβολισμού του αζώτου [54, 55].

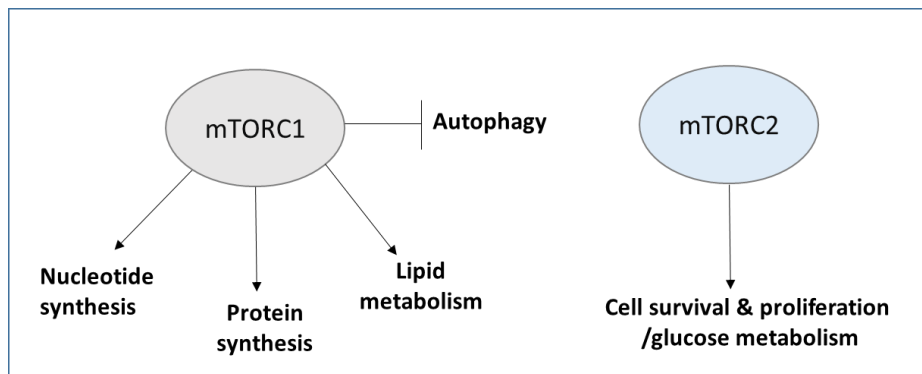
### 1.3.3 Ενδοκυτταρική σηματοδότηση των BCAAs

Μέσα στα κύτταρα, τα BCAAs και ιδιαίτερα η λευκίνη, επάγουν μια σειρά από σηματοδοτικές διεργασίες κυρίως μέσω της ενεργοποίησης του mTOR (μηχανιστικός στόχος της ραπαμυκίνης, *mechanistic target of rapamycin*) καθώς και μεταβολικές (μεταβολισμός πρωτεϊνών).

#### 1.3.3.1 Ενεργοποίηση του μονοπατιού μεταγωγής σήματος mTOR

Ο mTOR, είναι μια εξελικτικά συντηρημένη πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης. Αλληλεπιδρώντας με διαφορετικές πρωτεΐνες σχηματίζει δύο διακριτά δομικά και λειτουργικά σύμπλοκα, τον mTORC1 και τον mTORC2. Ο mTOR κατέχει πρωταρχικό ρόλο στον έλεγχο σημαντικών κυτταρικών διεργασιών, όπως η πρωτεϊνοσύνθεση και η αυτοφαγία, ενώ διαταραχές στο σηματοδοτικό του μονοπάτι εμπλέκονται στην εξέλιξη ασθενειών όπως ο διαβήτης και ο καρκίνος καθώς επίσης και στη διαδικασία της γήρανσης [56].

Όπως είναι γνωστό, απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αποτελεί η ενεργοποίηση μηχανισμών σύνθεσης πρωτεϊνών, λιπιδίων και νουκλεοτιδίων με ταυτόχρονη καταστολή καταβολικών διεργασιών όπως η αυτοφαγία. Το σύμπλοκο mTORC1 διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση των παραπάνω διαδικασιών και ελέγχει την ισορροπία μεταξύ αναβολισμού και καταβολισμού ως απάντηση στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Το σύμπλοκο mTORC2 ελέγχει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση του κυττάρου κυρίως μέσω της διαδικασίας φωσφορυλίωσης μελών της οικογένειας των πρωτεϊνικών κινασών (εικ.11). Ο πιο σημαντικός δε ρόλος του mTORC2 είναι η φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης B (protein kinase B/Akt) που αποτελεί βασικό παράγοντα στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης (insulin/PI3K signaling pathway) [56].



**Εικόνα 11:** Βασικές λειτουργίες των συμπλόκων mTORC1 και mTORC2.

Τα BCAAs και κυρίως η λευκίνη επάγουν την κυτταρική σηματοδότηση μέσω του mTORC1 σε μεγαλύτερο βαθμό συγκριτικά με άλλα αμινοξέα (αλανίνη, αργινίνη, ασπαραγίνη, γλουταμίνη, ιστιδίνη, μεθειονίνη, σερίνη και θρεονίνη) [57]. Συγκεκριμένα, η εξάντληση των αποθεμάτων λευκίνης στον οργανισμό είναι εξίσου αποτελεσματική με τη συνολική έλλειψη των παραπάνω αμινοξέων στην καταστολή της σηματοδότησης του mTORC1, ενώ αντίστοιχα η λευκίνη από μόνη της μπορεί να διεγείρει τη συγκεκριμένη σηματοδοτική οδό [58].

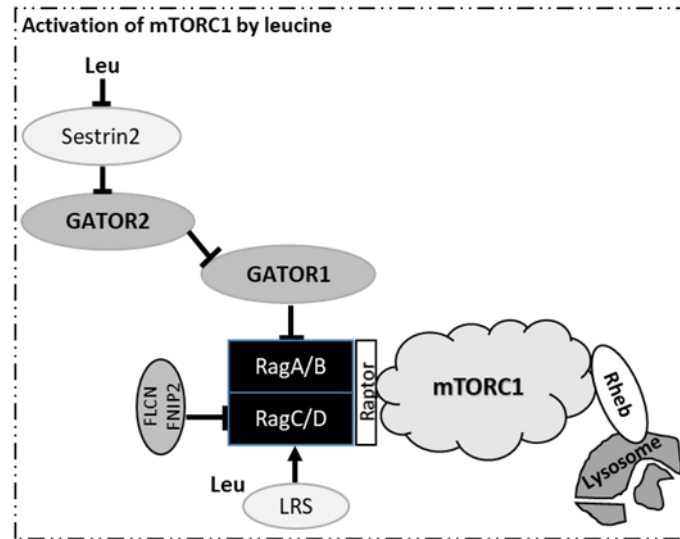
Αυξημένα ενδοκυτταρικά επίπεδα λευκίνης, επάγουν την ενεργοποίηση του συμπλόκου mTORC1 (εικ.12). Στο μηχανισμό αυτό εμπλέκονται οι Rag GTPάσες (Rag τριφωσφατάσες γουανωσίνης, Rag guanosine triphosphatases, Rag GTPases) οι οποίες είναι τα ετεροδιμερή RagA/B και RagC/D [59]. Η ενεργοποίηση των Rags ετεροδιμερών από αμινοξέα παρουσία GTP επιτρέπει τη σύνδεσή τους με τη ρυθμιστική πρωτεΐνη του συμπλόκου mTORC1, Raptor (regulatory associated protein of TOR, Raptor), προωθώντας τη μετακίνησή του στο λυσόσωμα όπου συνδέεται με την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη Rheb (Ras homolog enriched in brain, Rheb) και ενεργοποιείται [60] (εικ.12).

Η αρνητική ρύθμιση των Rag GTPασών συντελείται μέσω δύο συμπλόκων: α) GATOR1 (Gap activity toward Rags 1, GATOR1) για το ετεροδιμερές των Rag A/B και β) FLCN-FNIP2 (Folliculin-folliculin interacting protein 2) για το ετεροδιμερές των Rag C/D. Συγκεκριμένα, το σύμπλοκο GATOR1 δρα ως ρυθμιστική πρωτεΐνη GAP (GTPase-activating protein, GAP) στο ετεροδιμερές των Rag A/B προωθώντας την υδρόλυση του GTP που συνδέεται με το Rag A/B σε GDP καθιστώντας το ετεροδιμερές των Rag ανενεργό και καταστέλλοντας έτσι τη δραστηριότητα του mTORC1. Σε φυσιολογικές συνθήκες, η λειτουργία του GATOR1 ως πρωτεΐνη GAP καταστέλλεται από το σύμπλοκο GATOR2 έπειτα από αλληλεπίδραση των δύο συμπλόκων στην λυσοσωμική μεμβράνη με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του mTORC1 [12] (εικ.12).

Σε συνθήκες έλλειψης των παραπάνω αμινοξέων, η πρωτεΐνη sestrin2 καταστέλλει την ενεργοποίηση του mTORC1 μετά από αλληλεπίδραση με το GATOR2. Επιπλέον, η πρωτεΐνη sestrin2 θεωρείται ότι δρα ως κυτταροπλασματική πρωτεΐνη δέσμησης λευκίνης μέσω της οποίας η λευκίνη ενεργοποιεί τον mTORC1, καθώς με την πρόσδεσή της στη sestrin2 εμποδίζεται ο σχηματισμός του συμπλόκου sestrin2-GATOR2 [61] (εικ.12).

Η συνθετάση λευκυλ-tRNA (leucyl-tRNA synthetase, LRS), αποτελεί έναν επιπλέον κυτταροπλασματικό αισθητήρα λευκίνης για την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού mTORC1. Το ένζυμο LRS δρα στο λυσόσωμα ως πρωτεΐνη GAP και προάγει το σχηματισμό GDP-

RagC/D με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του mTORC1 και τη ρύθμιση της αυτοφαγίας [62] (εικ.12).



**Εικόνα 12:** Ενεργοποίηση του mTORC1 από λευκίνη και συνθετάση λευκυλ-tRNA. Gap activity toward Rags 1; GATOR1, Folliculin-folliculin interacting protein 2; FLCN-FNIP2, Ras-related GTP binding proteins; Rag, leucyl-tRNA synthetase; LRS, regulatory associated protein of TOR; Raptor, Ras homolog enriched in brain; Rheb. (Ref [10]: Dimou A. et al, 2022).

### 1.3.3.2 BCAAs και μυϊκή πρωτεϊνοσύνθεση

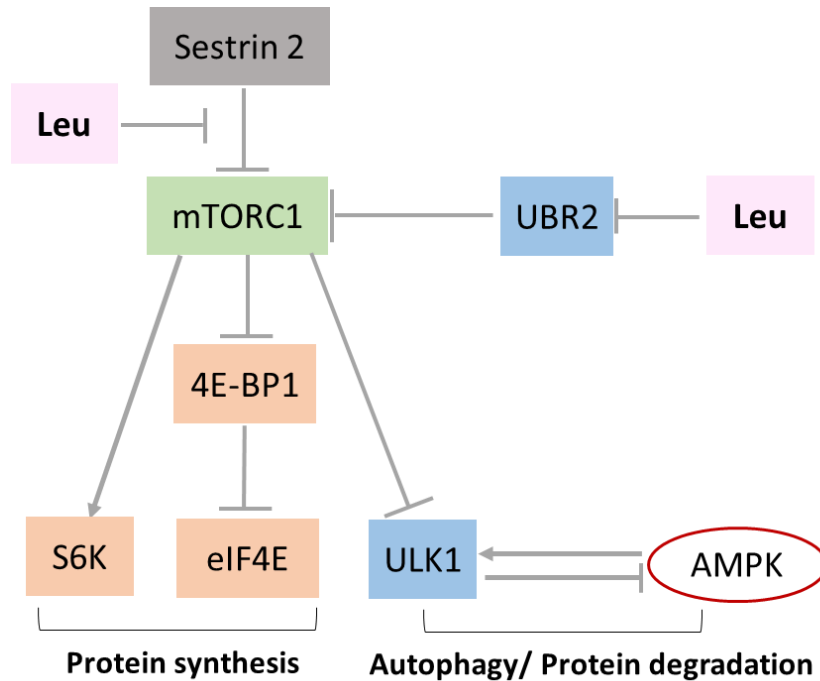
Τα BCAAs είναι απαραίτητα συστατικά της διατροφής. Η λευκίνη αποτελεί κυρίαρχο δομικό λίθο των πρωτεϊνών, η βαλίνη και η ισολευκίνη είναι πρόδρομες ενώσεις στη σύνθεση γλυκόζης και τα καταβολικά προϊόντα και των τριών τροφοδοτούν τον κύκλο του κιτρικού οξέος για την παραγωγή ενέργειας στα κύτταρα.

Τα BCAAs και ιδιαίτερα η λευκίνη είναι ευρέως γνωστά στον αθλητισμό για την αναβολική τους δράση που επιτυγχάνεται κυρίως με την ενεργοποίηση του mTORC1 συμβάλλοντας στην αύξηση 1) της μυϊκής πρωτεϊνοσύνθεσης και 2) στην παρεμπόδιση της πρωτεόλυσης, είτε αμφότερα [63].

1) *μυϊκή πρωτεϊνοσύνθεση.* Η ενεργοποίηση του mTORC1 από τα BCAAs και κυρίως την λευκίνη επάγει την έναρξη της μετάφρασης με δύο μηχανισμούς. Ο πρώτος μηχανισμός περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωση της ριβοσωμικής πρωτεϊνικής κινάσης S6 (S6K) καθοδικά του mTORC1 (εικ.13). Η πρόσληψη ενός μείγματος απαραίτητων αμινοξέων εμπλουτισμένο με λευκίνη φαίνεται να ενισχύει ακόμα περισσότερο την επίδρασή της στην ενεργοποίηση του μονοπατιού mTOR/S6K στους σκελετικούς μύες [64]. Ο δεύτερος μηχανισμός έναρξης της πρωτεϊνοσύνθεσης



περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης 4E-BP1 (4E-binding protein 1) (**εικ.13**). Η πρωτεΐνη 4E-BP1 είναι συνδεδεμένη με τον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4E (eukaryotic initiation factor) καταστέλλοντας την εκκίνηση της πρωτεϊνοσύνθεσης. Η ενεργοποίηση του mTORC1 από τη λευκίνη και το αντίστοιχο  $\alpha$ -κετοξύ της 2-κετοϊσοκαπροϊκό, επάγει τη φωσφορυλίωση της ανασταλτικής πρωτεΐνης 4E-BP1 και τη διέγερση της πρωτεϊνοσύνθεσης [65].



**Εικόνα 13:** Πρωτεϊνοσύνθεση / πρωτεόλυση μέσω του mTORC1. Ribosomal protein S6 kinase; S6K, 4E-binding protein 1; 4E-BP1, eukaryotic initiation factor; eIF4E, AMP-activated protein kinase; AMPK, Unc-51 like autophagy activating kinase 1; ULK1, unbranched-chain amino acid receptor 2; UBR2.

2) παρεμπόδιση της πρωτεόλυσης. Όταν εξαντλούνται τα αποθέματα ενέργειας καθώς και για την αναπλήρωση της ενδοκυττάριας δεξαμενής αμινοξέων, τα κύτταρα χρησιμοποιούν μηχανισμούς για να επάγουν αυτοφαγία, μια καταβολική διαδικασία διάσπασης των αποθεμάτων πρωτεΐνης. Οι μηχανισμοί αυτοφαγίας περιλαμβάνουν την καταστολή του mTORC1 και την ενεργοποίηση της κινάσης ULK1 (Unc-51 like autophagy activating kinase 1) μέσω της αλληλεπίδρασής της με την κινάση AMPK (AMP-activated protein kinase). Η ενεργοποίηση του mTORC1 συμβάλλει στη διατήρηση των κυτταρικών αποθηκών ενέργειας και αμινοξέων καθώς επάγει την άμεση φωσφορυλίωση της ULK1 παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδρασή της με την AMPK και συνεπώς απενεργοποιώντας τα μονοπάτια αυτοφαγίας (**εικ.13**). Σύμφωνα με μελέτες, η λευκίνη καταστέλλει τη διαδικασία αυτοφαγίας είτε άμεσα μέσω της ενεργοποίησης του mTORC1

είτε έμμεσα μέσω της σύνδεσής της με την πρωτεΐνη UBR2 (unbranched-chain amino acid receptor 2) η οποία δρα ως λιγάση ουβικιτίνης και αναστέλλει τη σηματοδότηση του mTORC1 [58].

### 1.3.3.3 BCAAs και γήρανση

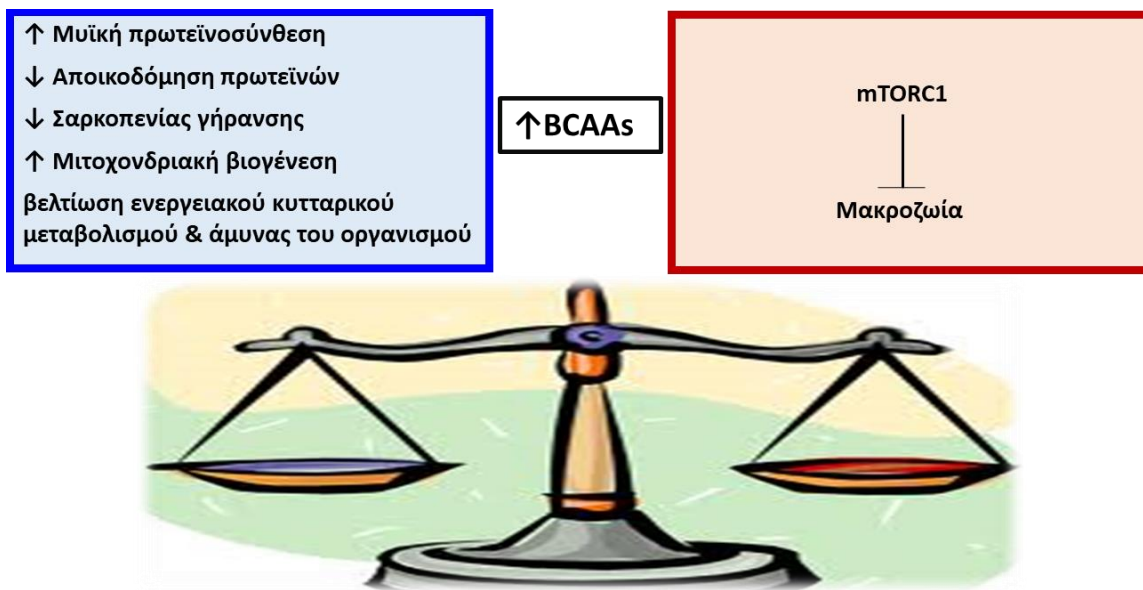
Η γήρανση χαρακτηρίζεται από τη μειωμένη πρόσληψη πρωτεΐνης ως μέρος μιας ευρύτερης κατάστασης υποσιτισμού που αποκαλείται «ανορεξία γήρανσης» καθώς και από τη βαθμιαία ανάπτυξη «αναβολικής αντίστασης» που χαρακτηρίζεται από μειωμένη απόκριση στα αναβολικά ερεθίσματα (π.χ λευκίνη, ινσουλίνη, άσκηση) για τη διέγερση της μυϊκής πρωτεϊνοσύνθεσης και οδηγεί στην σαρκοπενία και την αίσθηση αδυναμίας [66]. Μια από τις πιο γνώριμες υπογραφές της γήρανσης σε ανθρώπινες μελέτες αποτελούν τα επίπεδα των BCAAs πλάσματος τα οποία ανευρίσκονται 15-20% μειωμένα στους ηλικιωμένους [67, 68].

Το σηματοδοτικό μονοπάτι mTOR το οποίο ρυθμίζει μια σειρά κυτταρικών διεργασιών όπως η αυτοφαγία, η κυτταρική ανάπτυξη, η απόπτωση, και η μιτοχονδριακή λειτουργία σχετίζεται με τη γήρανση, ωστόσο τα αποτελέσματα είναι αμφιλεγόμενα [69]. Διατροφικές παρεμβάσεις όπως ο θερμιδικός περιορισμός και διαίτα φτωχή σε πρωτεΐνες, επομένως μειωμένη πρόσληψη BCAAs, φαίνεται να σχετίζονται με αύξηση του προσδόκιμου ζωής σε πειραματικά μοντέλα λόγω μειωμένης δραστηριότητας του mTOR [70, 71]. Επιπλέον, η θεραπεία με ραπαμυκίνη, αναστολέα του mTOR, συνδέθηκε με αύξηση του χρόνου επιβίωσης σε πειραματικά μοντέλα, συμπεριλαμβανομένων των *C. elegans*, *D. melanogaster* και *S. Cerevisiae* [72]. Με βάση τα ευρήματα των παραπάνω μελετών θεωρείται ότι η αναστολή του mTOR συνδέεται με μακροβιότητα ωστόσο ο μηχανισμός μέσω του οποίου συμβαίνει αυτό δεν έχει εξακριβωθεί. Η αναστολή του mTORC1 μπορεί να μην έχει άμεσο αντίκτυπο στη διαδικασία της γήρανσης, πιστεύεται όμως ότι καθυστερεί την εμφάνιση ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία [72].

Σε αντίθεση με τα προαναφερθέντα ευρήματα, άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι τα συμπληρώματα BCAAs μπορεί να έχουν θετική επίδραση στη γήρανση ενεργοποιώντας τον mTOR και επάγοντας την αναβολική μυϊκή απόκριση. Η απώλεια μυϊκής μάζας και λειτουργίας του μυϊκού ιστού μέσω της μείωσης του μεγέθους των μυϊκών ινών τύπου II χαρακτηρίζεται ως σαρκοπενία της γήρανσης και σχετίζεται με αλλαγές στις μυοκίνες, τα μιτοχόνδρια, τη νευρομυϊκή σύναψη και στα επίπεδα μικροθρεπτικών συστατικών συμπεριλαμβανομένων των BCAAs [73, 74]. Προς αυτή την κατεύθυνση τα διατροφικά συμπληρώματα σε BCAAs εκτός από τη διέγερση της πρωτεϊνοσύνθεσης συνέβαλλαν στην αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης σε μέσης ηλικίας

ποντίκια [75]. Συγκεκριμένα, η μακροχρόνια διατροφική προσθήκη των BCAAs συνδέθηκε με την αυξημένη έκφραση του ενζύμου σιρτουίνης 1 (sirtuin 1, SIRT1) και την ενεργοποίηση του μονοπατιού mTOR/eNOS με αποτέλεσμα: 1) την αυξημένη μιτοχονδριακή βιογένεση, 2) τη βελτίωση του ενεργειακού κυτταρικού μεταβολισμού και 3) το ενισχυμένο αμυντικό σύστημα έναντι των ROS οδηγώντας στη μείωση της οξειδωτικής βλάβης τόσο στους καρδιακούς όσο και στους σκελετικούς μύες των ποντικών [76]. Τέλος, τα αυξημένα επίπεδα BCAAs σε πειραματικά μοντέλα όπου είχε γίνει απενεργοποίηση του ενζύμου BCAT συσχετίστηκε επίσης με παράταση της επιβίωσης [77].

Παρόλο που η αναστολή του mTOR με ραπαμυκίνη συνδέθηκε με αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης, η ενεργοποίηση του mTORC1 από τα αυξημένα BCAAs στο μοντέλο με καταστολή του BCAT είχε επίσης θετικό αντίκτυπο στην επιβίωση αποτέλεσμα το οποίο αναστέλλεται από τη ραπαμυκίνη, καθιστώντας έτσι σαφή την περίπλοκη σχέση του mTOR με τη μακροζωία (εικ.14).

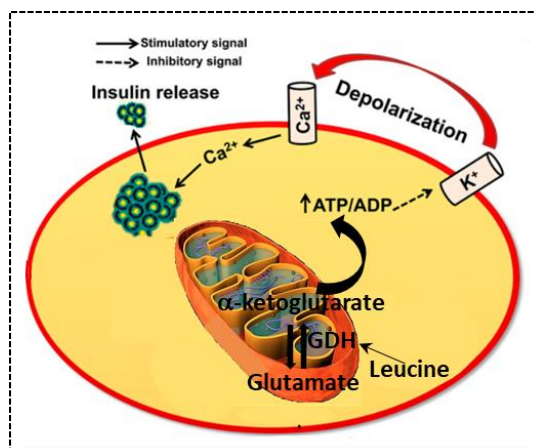


**Εικόνα 14:** BCAAs και γήρανση

### 1.3.4 Λευκίνη και έκκριση ινσουλίνης

Η λευκίνη διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης στα β-κύτταρα του παγκρέατος μέσω της αλλοστερικής ενεργοποίησης του ενζύμου της γλουταμινικής αφυδρογονάσης (glutamate dehydrogenase, GDH) που καταλύει την αντιστρεπτή απαμίνωση του γλουταμινικού σε α-κετογλουταρικό [78]. Ευρήματα μελετών αναδεικνύουν τον εκκριτικό ρόλο της λευκίνης καθώς τόσο η λευκίνη όσο και το μη μεταβολιζόμενο ανάλογό της, 2-αμινο-δικυκλο(2,2,1) επτανο-2-καρβοξυλικό οξύ (2-amino-bicyclo (2,2,1) heptane-2-carboxylic acid, BCH) ενεργοποιούν την GDH και προάγουν την απελευθέρωση ινσουλίνης από τα παγκρεατικά β-κύτταρα. Επιπλέον, αν και η προσθήκη γλουταμίνης η οποία μετατρέπεται σε γλουταμινικό στα παγκρεατικά νησίδια αυξάνει την ενδοκυτταρική συγκέντρωσή του, δεν διεγείρει την απελευθέρωση ινσουλίνης εκτός κι αν προστεθεί σε συνδυασμό με λευκίνη ή BCH. Τέλος, το γεγονός ότι ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί το τμήμα της πρωτεΐνης GDH στο οποίο ο αλλοστερικός αναστολέας τριφωσφορική γουανοσίνη (guanosine triphosphate, GTP) συνδέεται με το ένζυμο, εκδηλώνουν υπερινσουλιναιμία και υπογλυκαιμία υποδεικνύει το ρυθμιστικό ρόλο της GDH στην έκκριση ινσουλίνης [78].

Η λευκίνη διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης με τον ακόλουθο μηχανισμό. Η πρόσδεση της λευκίνης στην αλλοστερική θέση της GDH αυξάνει την ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου με αποτέλεσμα την αυξημένη τροφοδότηση του κύκλου του Krebs σε α-κετογλουταρικό και την παραγωγή ATP (Adenosine triphosphate, ATP). Η αύξηση του λόγου ATP/ADP στα παγκρεατικά β-κύτταρα επάγει το κλείσιμο των καναλιών  $K_{ATP}$  της πλασματικής μεμβράνης οδηγώντας έτσι στην εκπόλωση της μεμβράνης. Ως συνέπεια της αλλαγής δυναμικού στη μεμβράνη είναι το άνοιγμα των ταυσεοεξαρτώμενων καναλιών  $Ca^{2+}$  και επακόλουθα η διέγερση της έκκρισης ινσουλίνης [79] (εικ.15).



**Εικόνα 15:** Διέγερση της έκκρισης ινσουλίνης μέσω της αλλοστερικής ενεργοποίησης του ενζύμου GDH από τη λευκίνη. Adenosine triphosphate; ATP, Adenosine diphosphate; ADP, glutamate dehydrogenase; GDH (Modified by Ref [79]: Jia G. et al, 2014).

Επιπλέον διερευνήθηκε η υπόθεση εάν τα καταβολικά προϊόντα της λευκίνης παρουσιάζουν εκκριτική ικανότητα. Μελέτες υποστηρίζουν ότι τα προϊόντα οξείδωσης της λευκίνης, ακετοξικό οξύ και ακέτυλο-συνένζυμο Α (acetyl-CoA) μπορούν έμμεσα να επάγουν την έκκριση ινσουλίνης, καθώς αποτελούν πρόδρομες ενώσεις στη σύνθεση άκυλο-συνενζύμου Α (acyl-CoA) παραγώγων τα οποία αυξάνουν την ενζυμική δραστηριότητα της GDH [78].

### 1.3.5 BCAAs και σύνθεση νευροδιαβιβαστών

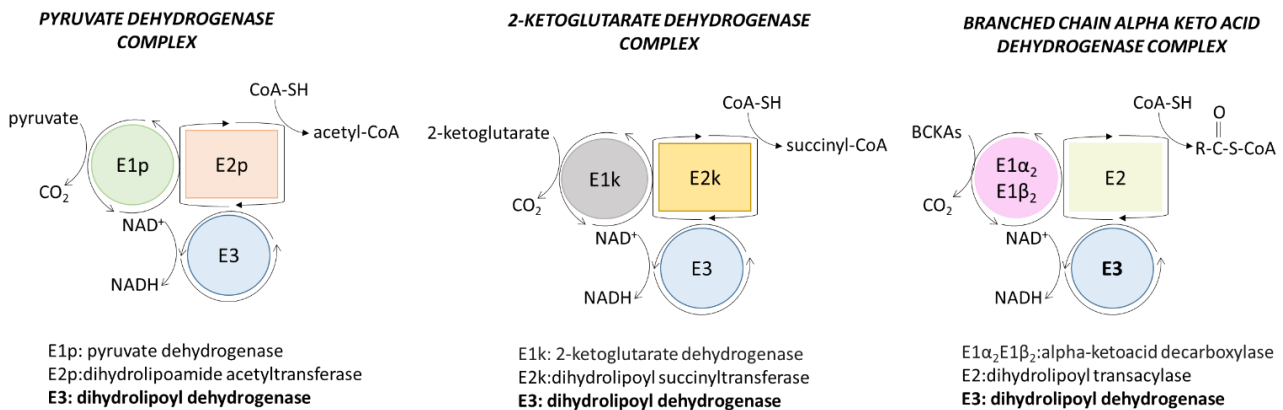
Ο ρόλος των BCAAs στη βιοχημεία του εγκεφάλου περιλαμβάνει τη διέγερση της πρωτεϊνοσύνθεσης, την παραγωγή ενέργειας, τη σύνθεση των νευροδιαβιβαστών και την αποτοξίνωση από αμμωνία των αστροκυττάρων. Τα BCAAs, ως δότες αζώτου, συμμετέχουν στη σύνθεση των δύο σημαντικών νευροδιαβιβαστών: α) του διεγερτικού γλουταμινικού οξέος και β) του ανασταλτικού γ-αμινοβουτυρικού οξέος (gamma-aminobutyric acid, GABA) που συντίθεται από την αποκαρβοξυλίωση του γλουταμινικού (**εικ.4**). Επιπλέον, συμβάλλουν έμμεσα στη διαθεσιμότητα και άλλων σημαντικών νευροδιαβιβαστών καθώς ανταγωνίζονται για τη μεταφορά μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού με μεγάλα, ουδέτερα αμινοξέα όπως η τρυπτοφάνη (πρόδρομη ένωση της σεροτονίνης), η τυροσίνη και η φαινυλαλανίνη (πρόδρομες ενώσεις της ντοπαμίνης) [47, 80]. Προς αυτή την κατεύθυνση διερευνώνται οι επιδράσεις της χορήγησης συμπληρωμάτων BCAAs ως θεραπευτική προσέγγιση σε νευρολογικές διαταραχές [47].

## 1.4 Διαταραχή του μεταβολισμού των BCAAs σε παθολογικές καταστάσεις

### 1.4.1 Εγγενείς διαταραχές του μεταβολισμού των BCAAs

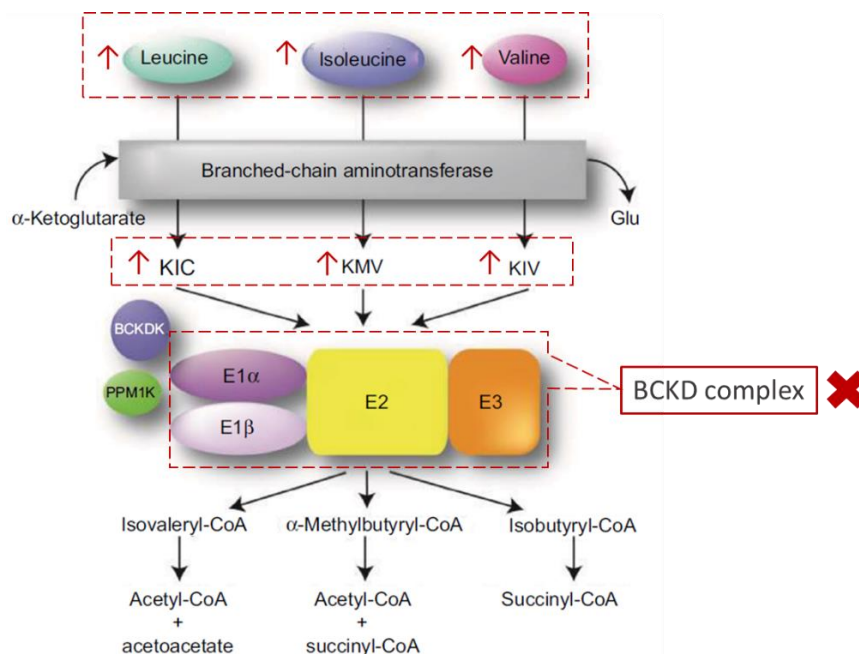
Οι εγγενείς διαταραχές στις μεταβολικές οδούς των BCAAs περιλαμβάνουν κυρίως ανεπάρκεια των ενζύμων που ρυθμίζουν την καταβολική τους πορεία [81]. Οι πιο χαρακτηριστικές εγγενείς διαταραχές είναι η νόσος οσμής ούρων σαν σιρόπι σφενδάμου (Maple syrup urine disease, MSUD) ή κετονουρία διακλαδισμένης αλυσίδας, η ισοβαλική οξυαιμία, η μεθυλμαλονική οξυαιμία, η προπιονική οξυαιμία και η μεθυλοκροτονυλογλυκινουρία (πιν.1Y).

Η MSUD χαρακτηρίζεται από ανεπαρκή ή ελλιπή ενζυμική δραστηριότητα του συμπλόκου της BCKD και είναι η μοναδική διαταραχή της ομάδας των παραπάνω νοσημάτων που σχετίζεται με συσσώρευση των BCAAs και των BCKAs στα βιολογικά υγρά, καθώς προκαλείται από ενζυμική ανεπάρκεια στο δεύτερο μη αντιστρεπτό στάδιο του καταβολισμού των BCAAs. Η νόσος αυτή με επιπολασμό περίπου 1:200.000 γεννήσεις, ακολουθεί έναν αυτοσωματικό υπολειπόμενο χαρακτήρα και οφείλεται σε μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες του συμπλόκου της BCKD (εικ. 5, 16 & 17) [82, 83]. Ο κλασικός τύπος της MSUD προκύπτει από διαλλαλικές μεταλλάξεις στις υπομονάδες E1α, E1β ή E2 της BCKD. Οι μεταλλάξεις στην υπομονάδα E3 σχετίζονται με πιο σοβαρή μορφή της νόσου που χαρακτηρίζεται και από γαλακτική οξέωση και προοδευτική επιδείνωση των νευρολογικών διαταραχών. Η E3 είναι κοινή καταλυτική υπομονάδα και για δύο ακόμη ένζυμα: 1) της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού και 2) της αφυδρογονάσης του 2-κετογλουταρικού, με αποτέλεσμα οι μεταλλάξεις της E3 να επάγουν την καταστολή της δραστηριότητας και των δύο αυτών ενζύμων [84] (εικ.16).



**Εικ.16.** Καταλυτικές υπομονάδες των συμπλόκων της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού, της αφυδρογονάσης του 2-κετογλουταρικού και της αφυδρογονάσης των α-κετοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας.

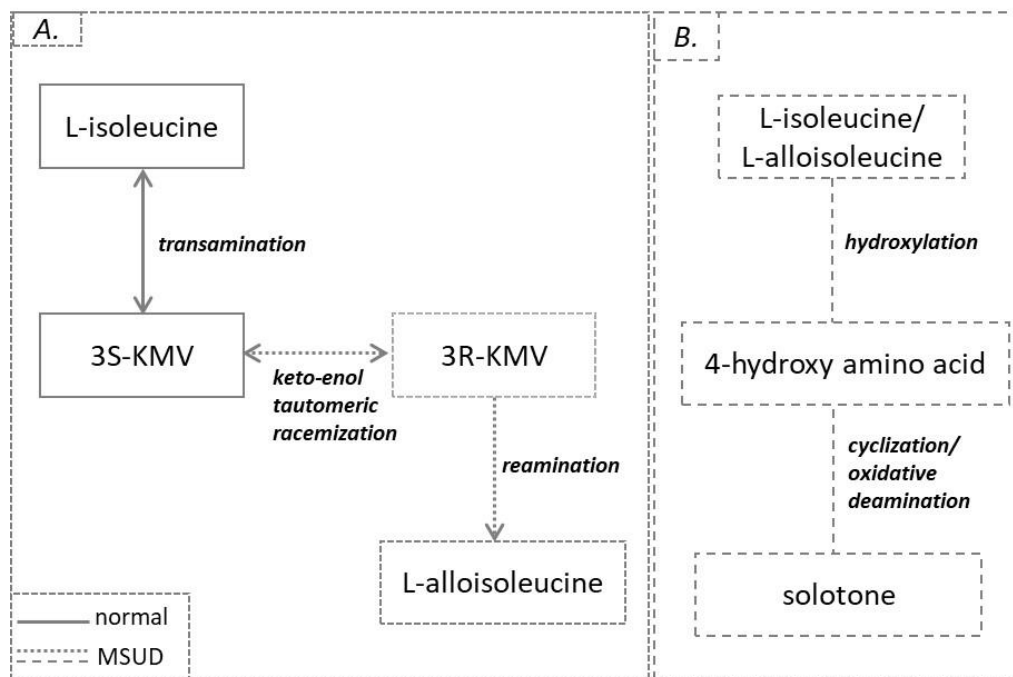
Το βιοχημικό χαρακτηριστικό της νόσου είναι κυρίως τα πολύ αυξημένα επίπεδα των BCAAs στο πλάσμα καθώς και τα αυξημένα επίπεδα των BCKAs στο πλάσμα και τα ούρα των ασθενών (εικ.17).



**Εικ.17.** Βιοχημικά χαρακτηριστικά της νόσου MSUD. (Modified by Ref [85]: Blackburn PR. et al, 2017)

Επιπρόσθετα, ως αποτέλεσμα της ανεπαρκούς ενζυμικής δραστηριότητας της BCKD, στο πλάσμα των ασθενών με MSUD, έχει ανιχνευθεί ρακεμικό μίγμα (3S,3R) του α-κετοξέος της ισολευκίνης 2-κετο-3-μεθυλοβαλερικό (KMV) καθώς και αλλοϊσολευκίνη σε επίπεδα παρόμοια με την ισολευκίνη. Φυσιολογικά, το πρώτο βήμα του καταβολισμού της ισολευκίνης περιλαμβάνει μια αντιστρεπτή αντίδραση τρανσαμίνωσης που οδηγεί στο σχηματισμό του 3S-KMV (§1.2.2). Προτείνεται ότι μέσω μιας αντίδρασης ταυτομερισμού κετόνης-ενόλης, από το 3S-KMV που συσσωρεύεται στους συγκεκριμένους ασθενείς προκύπτει το εναντιομερές 3R-KMV με αποτέλεσμα το σχηματισμό ρακεμικού μίγματος KMV. Το 3R-KMV, με περαιτέρω αντίδραση αμίνωσης δίνει αλλοϊσολευκίνη [86] (εικ.18A). Η αλλοϊσολευκίνη στη συνέχεια δεν μπορεί να υποστεί τρανσαμίνωση πίσω σε 3R-KMV, ή να απεκκριθεί στα ούρα (για αδιευκρίνιστους λόγους) ή να χρησιμοποιηθεί για πρωτεϊνοσύνθεση με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται στο πλάσμα των ασθενών με MSUD και να αποτελεί τον παθογνωμονικό δείκτη της νόσου [87].

Για την χαρακτηριστική οσμή των ούρων ασθενών με MSUD φαίνεται να ευθύνεται η συσσώρευση ενός σπάνιου καταβολικού προϊόντος που ονομάζεται «solotone» (**εικ.18B**). Το προϊόν αυτό πιθανότατα προκύπτει από την περίσσεια ισολευκίνης ή αλλοϊσολευκίνης και σχηματίζεται μέσω μιας σειράς ανταγωνιστικών με την αποκαρβοξυλίωση της ισολευκίνης αντιδράσεων όπως υδροξυλίωση, κυκλοποίηση και οξειδωτική απαμίνωση [88].



**Εικ.18. A.** Σχηματισμός της αλλοϊσολευκίνης **B.** Σχηματισμός του προϊόντος «solotone» στη νόσο MSUD 2-κετο-3-μεθυλοβαλερικό (KMV). (Ref [10]: Dimou A. et al, 2022).

Η διαχείριση των ασθενών με MSUD περιλαμβάνει τροποποίηση των διατροφικών συνηθειών όπως η περιορισμένη κατανάλωση πρωτεΐνης, διατροφικές φόρμουλες χωρίς BCAAs και σε ορισμένες περιπτώσεις μεταμόσχευση ήπατος για την αποκατάσταση της ενζυμικής δραστηριότητας της BCKD και της ομοιόστασης των επιπέδων των BCAAs [82, 85].

Εξαιτίας της εμπλοκής των BCAAs στο μεταβολισμό του εγκεφάλου, διαταραχές στον καταβολισμό τους συμβάλλουν στην εμφάνιση νευρολογικής δυσλειτουργίας σε αυτούς τους ασθενείς. Ένας προτεινόμενος μηχανισμός με τον οποίο η συσσώρευση των BCAAs γίνεται τοξική για τον εγκέφαλο σχετίζεται με τη βιοσύνθεση των νευροδιαβιβαστών. Τα BCAAs και ιδιαίτερα η λευκίνη ανταγωνίζονται τα άλλα μεγάλα ουδέτερα αμινοξέα για μεταφορά μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού [89]. Ορισμένα από αυτά τα αμινοξέα όπως η φαινυλαλανίνη και η τυροσίνη αποτελούν σημαντικές πρόδρομες ενώσεις στη σύνθεση των νευροδιαβιβαστών και



κατά συνέπεια ο ανταγωνισμός για τη μεταφορά τους στον εγκέφαλο λόγω των αυξημένων BCAAs έχει σημαντικό αντίκτυπο στα επίπεδα των νευροδιαβιβαστών. Στον εγκέφαλο, η τρανσαμίνωση των BCAAs παρέχει σημαντική ποσότητα αζώτου για τη σύνθεση του γλουταμινικού που αποτελεί τον κύριο διεγερτικό νευροδιαβιβαστή συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση της ομοιόστασης του αζώτου στα αστροκύτταρα και τους νευρώνες [90]. Επιπλέον η συσσώρευση των BCAAs και BCKAs στον εγκέφαλο μπορεί να συμβάλλει στη νευροτοξικότητα λόγω της αύξησης της υπεροξειδωσής των λιπιδίων και του οξειδωτικού στρες [91]. Προς αυτή την κατεύθυνση, τα συμπληρώματα καρνιτίνης, ενός αποτελεσματικού αντιοξειδωτικού θεωρείται ότι έχουν ευεργετική δράση στις νευρογνωστικές διαταραχές των ασθενών με MSUD [92]. Τέλος, ένας ακόμη μηχανισμός που φαίνεται να σχετίζεται με την τοξικότητα στη συγκεκριμένη νόσο αφορά τη διαταραχή του ενεργειακού μεταβολισμού του εγκεφάλου. Η συσσώρευση της λευκίνης και των α-κετοξέων καταστέλλουν την ενζυμική δραστηριότητα των δύο αφυδρογονασών, του πυροσταφυλικού και του α-κετογλουταρικού καθώς επίσης και τη λειτουργία της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας [82].

Συμπερασματικά η ομοιόσταση των επιπέδων των BCAAs είναι μείζονος σημασίας για τη λειτουργία του εγκεφάλου καθώς η συσσώρευση τόσο των ίδιων των BCAAs όσο και των τοξικών α-κετοξέων σχετίζεται με σοβαρές νευρολογικές παθήσεις. Σαν συνέπεια η εμβάθυνση στους μηχανισμούς που συνδέουν τις εγγενείς διαταραχές του μεταβολισμού των BCAAs με τη λειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος μπορεί να παρέχουν νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις στη νόσο MSUD.

#### 1.4.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (ΣΔΤ1)

Η πρώτη μελέτη της επίδραση της ινσουλίνης στα επίπεδα των BCAAs στο πλάσμα έγινε το 1983 σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 (ΣΔΤ1) και τα ευρήματα έδειξαν ότι η διακοπή της θεραπείας με ινσουλίνη συσχετίζεται με σημαντική αύξηση των επιπέδων τους [93, 94]. Ο μη ρυθμιζόμενος ΣΔΤ1 χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία, υπερφαγία, αυξημένη οξείδωση λιπαρών οξέων ως πηγή ενέργειας, μυϊκή απώλεια και δυσλειτουργία των μυϊκών μιτοχονδρίων [95, 96]. Η αυξημένη μυϊκή πρωτεόλυση που υπερβαίνει την ικανότητα των σκελετικών μυών για οξείδωση των BCAAs έχει ως αποτέλεσμα την ανεπαρκή απαμίνωση και καταβολισμό αυτών των αμινοξέων και αποτελεί τη βασική αιτία αύξησης των επιπέδων τους στο πλάσμα τόσο σε πειραματικά μοντέλα όσο και σε ασθενείς με ΣΔΤ1 [97-99]. Επιπλέον, μεταβολικά χαρακτηριστικά του ΣΔΤ1 αποτελούν η μείωση του ρυθμού γλυκόλυσης και της δραστηριότητας των ενζύμων του κύκλου του

κιτρικού οξέος καθώς και η ενισχυμένη οξείδωση των λιπαρών οξέων που επάγει την αύξηση του λόγου NADH/NAD<sup>+</sup>. Ως συνέπεια, τα μειωμένα επίπεδα αποδεκτών των αμινομάδων (α-KG, πυροσταφυλικό, οξαλοξικό) όσο και η ανασταλτική δράση του NADH και των acyl-CoAs στη δραστηριότητα της BCKD εμποδίζουν την τρανσαμίνωση και οξείδωση των BCAAs [98, 100].

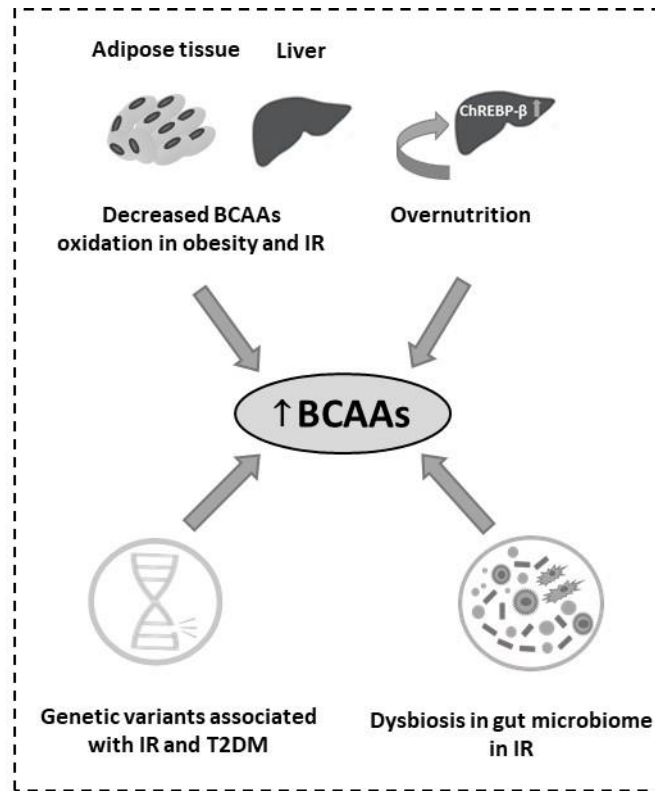
#### 1.4.3 Παχυσαρκία - αντίσταση στην ινσουλίνη - Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 (ΣΔΤ2)

Αυξημένα επίπεδα BCAAs πλάσματος έχουν αναφερθεί για πρώτη φορά στην παχυσαρκία καθώς επίσης και σε ασθενείς με αντίσταση στην ινσουλίνη στη δεκαετία του '60 [101, 102]. Τα ευρήματα αυτά έχουν επίσης επιβεβαιωθεί σε πιο πρόσφατες μελέτες καθώς και σε πειραματικά μοντέλα και σε ασθενείς με ΣΔΤ2 [103-105], αλλά δεν είναι ακόμα σαφές εάν τα αυξημένα BCAAs αποτελούν αιτία ανάπτυξης αντίστασης στην ινσουλίνη (Insulin Resistance, IR) ή εάν είναι βιοδείκτες της μειωμένης ευαισθησίας στην ινσουλίνη. Εκτός από τις σαφείς νευροτοξικές επιπτώσεις της συσσώρευσης των BCAAs σε ασθενείς με MSUD, ο πιθανός παθοφυσιολογικός ρόλος της πιο ήπιας αύξησης των επιπέδων αυτών των αμινοξέων έρχεται αργά στο φως.

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 (ΣΔΤ2) και οι σχετιζόμενες με αυτόν μικροαγγειακές και μακροαγγειακές επιπλοκές αποτελούν αντικείμενο μελετών από την παγκόσμια ερευνητική κοινότητα για την πιο αποτελεσματική κατανόηση των υποκείμενων παθοφυσιολογικών μηχανισμών. Καθώς οι διαταραχές του μεταβολισμού που σχετίζονται με την ανάπτυξη διαβήτη ξεκινούν αρκετά χρόνια πριν από την αύξηση της γλυκόζης στο αίμα, ο εντοπισμός ισχυρών προγνωστικών βιοδεικτών για άτομα που διατρέχουν κίνδυνο να αναπτύξουν διαβήτη, ειδικά απουσία καθορισμένων παραγόντων κινδύνου αποτελεί συνεχή πρόκληση. Αυτοί οι βιοδείκτες μπορεί να είναι αποτελεσματικά εργαλεία για την πρόγνωση, τον προσυμπτωματικό έλεγχο και τη διάγνωση του διαβήτη αναδεικνύοντας τα μεταβολικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του. Σε μεγάλη σειρά κλινικών μελετών, τα αυξημένα BCAAs στο πλάσμα έχουν αναδειχθεί ως βιοδείκτες ΣΔΤ2 καθώς εμφανίζουν θετική συσχέτιση με την αντίσταση στην ινσουλίνη, το δείκτη HOMA-IR (homeostasis model assessment-insulin resistance, HOMA-IR) και τα επίπεδα της γλυκιωμένης αιμοσφαιρίνης HbA1c (Glycated hemoglobin A1c) [68, 106]. Επιπλέον, έχουν αναδειχθεί ως προγνωστικοί δείκτες μελλοντικού ΣΔΤ2 [107, 108] και υποστηρίζεται ότι έχουν τη δυνατότητα να προβλέψουν την εκδήλωση της νόσου έως και 12 χρόνια πριν [109]. Έχουν προταθεί πολλαπλοί μηχανισμοί που συμβάλλουν στην αύξηση των BCAAs καθώς και του παθογενετικού τους ρόλου στην παχυσαρκία και σε καταστάσεις αντίστασης στην ινσουλίνη.

Στο λιπώδη ιστό παχύσαρκων καθώς και με αντίσταση στην ινσουλίνη ανθρώπων και ζώων, η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα δύο βασικά ένζυμα του καταβολισμού των BCAAs, BCAT2 και BCKD, καταστέλλεται σημαντικά από την προκαλούμενη από την παχυσαρκία υποξία, φλεγμονή και στρες του ενδοπλασματικού δικτύου [49, 110-112]. Αναφέρεται ότι στο λιπώδη ιστό πειραματικών μοντέλων παχυσαρκίας, η έκφραση mRNA καθώς και η ενζυματική δραστηριότητα των δύο παραπάνω καταβολικών ενζύμων των BCAAs βρέθηκε μειωμένη και συγκεκριμένα στο σύμπλοκο της αφυδρογονάσης παρατηρήθηκε αυξημένη φωσφορυλίωση της υπομονάδας E1α [113]. Επιπλέον, στα ίδια πειραματικά μοντέλα, η ενζυματική δραστηριότητα της BCKD εντοπίστηκε μειωμένη στο ήπαρ και ανεπηρέαστη στους σκελετικούς μύες [113, 114]. Τα παραπάνω ευρήματα αναδεικνύουν το λιπώδη ιστό ως τον κύριο ρυθμιστή του καταβολισμού των BCAAs και υποδηλώνουν ότι η μειωμένη δραστηριότητα των δύο βασικών καταβολικών ενζύμων στο λιπώδη ιστό πιθανά διαδραματίζει πρωταρχικό ρόλο στα αυξημένα επίπεδα των BCAAs που συνοδεύουν την παχυσαρκία. Επιπλέον σε ανθρώπους μετά από χειρουργική επέμβαση γαστρικής παράκαμψης, τα επίπεδα BCAAs πλάσματος μειώνονται [115], γεγονός το οποίο αποδίδεται κυρίως στην επαναφορά προς το φυσιολογικό της ενζυμικής δραστηριότητας των BCAT2 και της E1α υπομονάδας της αφυδρογονάσης τόσο στον σπλαχνικό όσο και στον υποδόριο λιπώδη ιστό [115].

Πρόσφατες μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος για την εύρεση γενετικών παραλλαγών που συνδέονται με ασθένειες, αποκαλύπτουν συσχέτιση των επιπέδων των αμινοξέων στο αίμα με συγκεκριμένες γενετικές παραλλαγές. Αναφέρεται ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο PPM1K (mitochondrial isoform of protein phosphatase 1K, PPM1K) σε ανθρώπους και πειραματικά μοντέλα οδηγούν στη μειωμένη παραγωγή της ειδικής φωσφατάσης PP2Cm του συμπλόκου της αφυδρογονάσης και επακόλουθα στη μη αποτελεσματική ενεργοποίησή του [116]. Ως αποτέλεσμα τα επίπεδα τόσο των BCAAs όσο και των  $\alpha$ -κετοξέων είναι παρόμοια με εκείνα που συναντώνται στην ήπια μορφή της νόσου MSUD [116]. Επιπρόσθετα μια ακόμα γενετική παραλλαγή, οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί rs1440581 του γονιδίου PPM1K, βρέθηκε ότι σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα BCAAs στο πλάσμα, μικρότερη απώλεια βάρους ως απόκριση σε διατροφικές αλλαγές, μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη καθώς επίσης και με εμφάνιση ΣΔΤ2 [117-119] **(εικ.19)**.



**Εικ.19.** Αίτια της αύξησης των BCAAs στην παχυσαρκία, στην αντίσταση στην ινσουλίνη και στο ΣΔΤ2. IR; insulin resistance, ChREBP-β; Carbohydrate-response element-binding protein-β) (Ref [10]: Dimou A. et al, 2022).

Τέλος, ο υπερσιτισμός και κυρίως διατροφή πλούσια σε φρουκτόζη οδηγεί στην αυξημένη έκφραση του ηπατικού μεταγραφικού παράγοντα ChREBP-β (Carbohydrate-response element-binding protein-β) [120] με επακόλουθη αύξηση των επιπέδων της κινάσης BCKDK και την αντίστοιχη μείωση των επιπέδων της φωσφατάσης PP2Cm. Ο λόγος BCKDK:PP2Cm αυξάνεται και οδηγεί στην απενεργοποίηση του συμπλόκου της BCKD, αποτελώντας μια ακόμη αιτία αύξησης των επιπέδων τόσο των BCAAs όσο και των αντίστοιχων α-κετοξέων τους στην παχυσαρκία [120] (εικ.19).

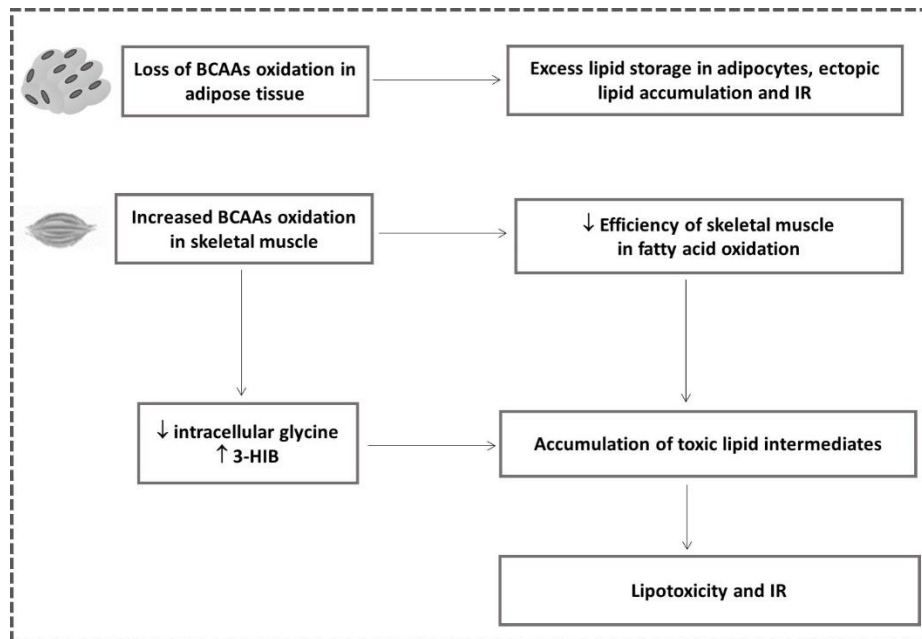
Στην θεώρηση στην την οποία τα αυξημένα επίπεδα των BCAAs στη συστηματική κυκλοφορία επάγουν αντίσταση στην ινσουλίνη ο μηχανισμός παραμένει ασαφής. Στην πραγματικότητα δεν είναι πλήρως κατανοητό αν τα αυξημένα BCAAs από μόνα τους ή διαταραχή του καταβολισμού τους στους διάφορους ιστούς προάγουν την αντίσταση στην ινσουλίνη.

Σε καταστάσεις αντίστασης στην ινσουλίνη, η δυσβίωση του εντερικού μικροβιώματος του ανθρώπου π.χ. έντερο εμπλουτισμένο στα είδη *Prevotella copri* και *Bacteroides vulgatus* που έχουν

την ικανότητα βιοσύνθεσης των BCAAs καθώς και η στέρση γονιδίων που κωδικοποιούν το σύστημα μεταφοράς αυτών των αμινοξέων μέσα στα βακτηριακά κύτταρα για οξείδωση φαίνεται να συμβάλλουν στα αυξημένα επίπεδα BCAAs στο πλάσμα [121] **(εικ.19)**.

Ο αυξημένος ηπατικός λόγος BCKDK:PP2Cm που όπως προαναφέρθηκε οδηγεί στην αδρανοποίηση του συμπλόκου της αφυδρογονάσης BCKD, επάγει επίσης τη φωσφορυλίωση και επακόλουθη αυξημένη δραστηριότητα της εξαρτώμενης από ATP κιτρικής λυάσης (ATP citrate lyase, ACL), ενός σημαντικού ρυθμιστή της de novo λιπογένεσης. Έτσι, η αυξημένη σύνθεση των πρόδρομων μορίων λιπογένεσης, acetyl-CoA και malonyl-CoA μέσω της ATP-κιτρικής λυάσης, συντελεί στην αυξημένη σύνθεση λιπαρών οξέων και την επακόλουθη δυσλιπιδαιμία συμβάλλοντας έτσι στην αντίσταση στην ινσουλίνη [120].

Σύμφωνα με μελέτες, αυξημένη δραστηριότητα των καταβολικών ενζύμων των BCAAs παρατηρείται κατά τη διαφοροποίηση των προλιποκυττάρων σε λιποκύτταρα [122]. Στη διαδικασία της αδιπογένεσης, τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας συμμετέχουν στη σύνθεση λιπιδίων καθώς μέσω του καταβολισμού τους συντίθενται τα λιπογενετικά υποστρώματα: acetyl-CoA και propionyl-CoA. Η διαταραχή της οξείδωσης των BCAAs στο λιπώδη ιστό έχει αρνητικό αντίκτυπο στη φυσιολογική διαφοροποίηση των λιποκυττάρων και συμβάλλει στην υπερβολική αποθήκευση λιπιδίων στα λιποκύτταρα, στην έκτοπη εναπόθεση λιπιδίων και επακόλουθα στην αντίσταση στην ινσουλίνη [122, 123] **(εικ.20)**.



**Εικ.20:** Συσχέτιση της διαταραχής του καταβολισμού των BCAAs στο λιπώδη ιστό και τους σκελετικούς μύες με την αντίσταση στην ινσουλίνη. 3-υδροξυϊσοβουτυρικό οξύ (3-HIB) (Ref [10]: Dimou A et al., 2022).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η διαταραχή του καταβολισμού των BCAAs στο λιπώδη ιστό και το ήπαρ φαίνεται ότι προάγει τη μετατόπιση της ροής τους στους σκελετικούς μύες, μετατρέποντας το συγκεκριμένο ιστό ως την κύρια θέση οξείδωσης των BCAAs [35].

Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί που συνδέουν τον αυξημένο ρυθμό οξείδωσης των BCAAs στους σκελετικούς μύες με την ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη περιλαμβάνουν: 1) τον «ανταγωνισμό» της οξείδωσης των BCAAs και των λιπαρών οξέων, 2) τη συσσώρευση των τοξικών ακυλο-CoA παραγώγων των λιπαρών οξέων, 3) την αυξημένη παραγωγή του καταβολικού ενδιάμεσου της βαλίνης, 3-υδροξυϊσοβουτυρικού οξέος και 4) τη μείωση της σηματοδότησης της ινσουλίνης μέσω της ενεργοποίησης του mTORC1.

Παρά το γεγονός ότι η συνεισφορά των BCAAs στο συνολικό ενεργειακό καύσιμο των μυών είναι πολύ μικρότερη συγκριτικά με τα λιπαρά οξέα [35], σύμφωνα με ένα προτεινόμενο μοντέλο, η επαγόμενη από την παχυσαρκία αύξηση της ροής οξείδωσης των BCAAs στους σκελετικούς μύες είναι αυτό που οδηγεί στο αυξημένο φορτίο υποστρώματος για οξείδωση στα μιτοχόνδρια. Σαν συνέπεια η οξείδωση των BCAAs «ανταγωνίζεται» την οξείδωση των λιπαρών οξέων συμβάλλοντας στην επακόλουθη μείωση της ικανότητας των σκελετικών μυών να οξειδώσουν τα λιπαρά οξέα με αποτέλεσμα τη συσσώρευση τοξικών ενδιάμεσων των λιπιδίων [124] **(εικ.20)** .

Επιπλέον, η αυξημένη απαμίνωση των BCAAs στους σκελετικούς μύες συμβάλλει στην εξάντληση της ενδοκυττάριας γλυκίνης η οποία καταναλώνεται στον κύκλο πυροσταφυλικού-αλανίνης στο μηχανισμό αποτοξίνωσης από την  $\text{NH}_3$  [125]. Η εξάντληση της γλυκίνης οδηγεί στη μειωμένη εξαγωγή των προϊόντων οξείδωσης των λιπαρών οξέων από τα μιτοχόνδρια ως ακυλο-παραγωγα γλυκίνης για να απεκκριθούν στα ούρα. Ως συνέπεια, η συσσώρευση των τοξικών ακυλο-CoA παραγώγων των λιπαρών οξέων αποτελεί πιθανά συνδετικό κρίκο του αυξημένου καταβολισμού των BCAAs στους σκελετικούς μύες με την επαγόμενη από την παχυσαρκία αντίσταση στην ινσουλίνη [124] **(εικ.20)**.

Επιπρόσθετα, η αυξημένη οξείδωση των BCAAs στους σκελετικούς μύες οδηγεί στην αυξημένη παραγωγή του 3-υδροξυϊσοβουτυρικού οξέος, του καταβολικού ενδιάμεσου της βαλίνης. Το 3-υδροξυϊσοβουτυρικό οξύ δρα ως παρακρινικός παράγοντας οδηγώντας στην

αυξημένη εναπόθεση λιπαρών οξέων στο ενδοθήλιο, στη συσσώρευση των ατελώς εστεροποιημένων λιπιδίων στους σκελετικούς μύες και συνεπώς στη λιποτοξικότητα και στη μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη [126]. Αυξημένα επίπεδα 3-υδροξυϊσοβουτυρικού οξέος έχουν βρεθεί στο πλάσμα ατόμων με αντίσταση στην ινσουλίνη καθιστώντας το συγκεκριμένο μεταβολίτη ως προγνωστικό δείκτη της εμφάνισης μελλοντικού διαβήτη καθώς επίσης και ως σημαντικό ρυθμιστή της μεταβολικής ευελιξίας (ενεργειακής ομοιόστασης) [127] **(εικ.20)**.

Η περίσσεια θρεπτικών συστατικών και ιδιαίτερα των BCAAs μπορεί επίσης να επάγει αντίσταση στην ινσουλίνη μέσω της ενεργοποίησης του mTORC1, του γνωστού ρυθμιστή του σηματοδοτικού μονοπατιού της ινσουλίνης και του μεταβολισμού στους σκελετικούς μύες [128, 129] (§1.3.3.1). Σύμφωνα με τις πιο διαδεδομένες θεωρίες για το ΣΔΤ2, τα αυξημένα BCAAs και ιδιαίτερα η λευκίνη οδηγούν στην υπερέκφραση του mTORC1 και την επακόλουθη ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης S6K1 που οδηγεί στη φωσφορυλίωση του υποστρώματος του υποδοχέα της ινσουλίνης IRS-1 εμποδίζοντας έτσι τη σηματοδότηση της ινσουλίνης [128, 129]. Σε καταστάσεις αντίστασης στην ινσουλίνη, η αυξημένη ζήτηση για ινσουλίνη σε συνδυασμό με τη φλεγμονή και τη λιποτοξικότητα επάγουν υπερινσουλιναϊμία και πρώιμη εξάντληση των β-κυττάρων, χαρακτηριστικά του ΣΔΤ2 [128]. Ωστόσο, δεν έχει καταστεί ακόμα σαφές εάν η ενεργοποίηση του mTORC1 από τα BCAAs είναι απαραίτητος και επαρκής μηχανισμός εκδήλωσης αντίστασης στην ινσουλίνη [128, 130].

Συμπερασματικά, οι επικρατέστερες θεωρίες για τη μετάβαση από την παχυσαρκία στο ΣΔΤ2 είναι οι ακόλουθες: 1) ο συνεργιστικός ρόλος της περίσσειας των BCAAs και των λιπιδίων, καθώς η χρόνια αύξηση στα επίπεδα των BCAAs και των λιπαρών οξέων στη συστηματική κυκλοφορία, ενισχύουν τη χρόνια υπερινσουλιναϊμία και τη διαρκή εκκριτική πίεση στα β-κύτταρα οδηγώντας στη δυσλειτουργία τους [131]. 2) Όχι τα BCAAs *per se* αλλά η διαταραχή του καταβολισμού τους λόγω της μειωμένης έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν τα δύο βασικά καταβολικά τους ένζυμα, έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση τοξικών μεταβολικών ενδιάμεσων που συμβάλλουν στη δυσλειτουργία των παγκρεατικών β-κυττάρων, το οξειδωτικό στρες και την απόπτωση [128].

#### 1.4.4 Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης (ΣΔΚ)

Η ινσουλινοαντίσταση και η δυσλειτουργία των β-κυττάρων αποτελούν κοινά παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά τόσο του Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης (ΣΔΚ) όσο και του ΣΔΤ2. Μολονότι, η παθογένεση του ΣΔΚ είναι παρόμοια με αυτή του ΣΔΤ2, ο ρόλος των BCAAs στη διαταραχή του μεταβολισμού των υδατανθράκων που διαγιγνώσκεται κατά την έναρξη ή κατά τη διάρκεια της κύησης παραμένει αμφιλεγόμενος. Στη διάρκεια της φυσιολογικής κύησης το σύνολο των BCAAs πλάσματος καθώς και των αντίστοιχων α-κετοξέων (2-κετο-3-μεθυλοβαλερικό, 2-κετοϊσοβαλερικό και 2-κετοϊσοκαπροϊκό) μειώνεται. Η μείωση αυτή πιθανά οφείλεται στην αυξημένη δραστηριότητα της αμινοτρανσφεράσης BCAT στον πλακούντα, υποδεικνύοντας τη χρησιμοποίηση αυτών των αμινοξέων ως δότες αζώτου στη σύνθεση γλουταμινικού καθώς και στην κάλυψη των αυξημένων μεταβολικών αναγκών του πλακούντα για τη φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρύου [132].

Μολονότι, τα αυξημένα BCAAs είναι άρρηκτα συνδεδεμένα με καταστάσεις αντίστασης στην ινσουλίνη καθώς και με το ΣΔΤ2, μελέτες στο πλάσμα εγκύων με ΣΔΚ σε σύγκριση με τη φυσιολογική κύηση αναφέρουν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Σε μία μελέτη, υψηλότερα BCAAs βρέθηκαν στον ορό εγκύων με αυξημένη γλυκόζη νηστείας σε σύγκριση με τις εγκυμονούσες με φυσιολογική γλυκόζη νηστείας, υποδεικνύοντας τη συσχέτιση των αυξημένων επιπέδων αυτών των αμινοξέων με την υπεργλυκαιμία και την αντίσταση στην ινσουλίνη [133]. Άλλες μελέτες που δεν εντοπίζουν αυξημένα επίπεδα BCAAs σε έγκυες γυναίκες με ΣΔΚ, υποστηρίζουν ότι η αυξημένη κετογένεση που χαρακτηρίζει το ΣΔΚ επάγει το μειωμένο καταβολισμό των BCAAs στους σκελετικούς μύες με αντίστοιχη αύξηση της οξειδωσής τους στο ήπαρ προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως κετογενετικά, γλυκογενετικά υποστρώματα και σε μικρότερο βαθμό ως καύσιμα στον κύκλο του κιτρικού οξέος [134].

Στο ΣΔΚ τα μη διαταραγμένα επίπεδα των BCAAs σε σύγκριση με τη φυσιολογική κύηση πιθανά υποδεικνύουν ένα διαφορετικό παθοφυσιολογικό μηχανισμό από εκείνον στον ΣΔΤ2. Ωστόσο απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση σχετικά με το ρόλο των BCAAs στην παθογένεση του ΣΔΚ.



#### 1.4.5 Αντιδιαβητικά φάρμακα

Η επίδραση των αντιδιαβητικών φαρμάκων στον καταβολισμό των BCAAs έχει διερευνηθεί σε πειραματικά μοντέλα και σε ασθενείς με ΣΔΤ2. Οι θειαζολιδινεδιόνες οι οποίες ανήκουν στην κατηγορία των συνδεδών στους ενεργοποιημένους υποδοχείς των πολλαπλασιαστών των υπεροξυσωμάτων (peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ , PPAR- $\gamma$ ) βελτιώνουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη μειώνοντας την ηπατική γλυκονεογένεση και αυξάνουν την πρόσληψη γλυκόζης από τους μύες και το λιπώδη ιστό. Μοντέλα παχυσαρκίας με αντίσταση στην ινσουλίνη (Zucker rats) που έλαβαν θεραπεία με θειαζολιδινεδιόνες παρουσίασαν βελτίωση τόσο ως προς την ευαισθησία στην ινσουλίνη όσο και στα μονοπάτια καταβολισμού των BCAAs στο λιπώδη ιστό [135]. Σαν συνέπεια η συγκεκριμένη κατηγορία αντιδιαβητικών φαρμάκων ενισχύει τον καταβολισμό των BCAAs στο λιπώδη ιστό αποκαθιστώντας τη φυσιολογική λειτουργία των γονιδίων που κωδικοποιούν τα καταβολικά τους ένζυμα [135].

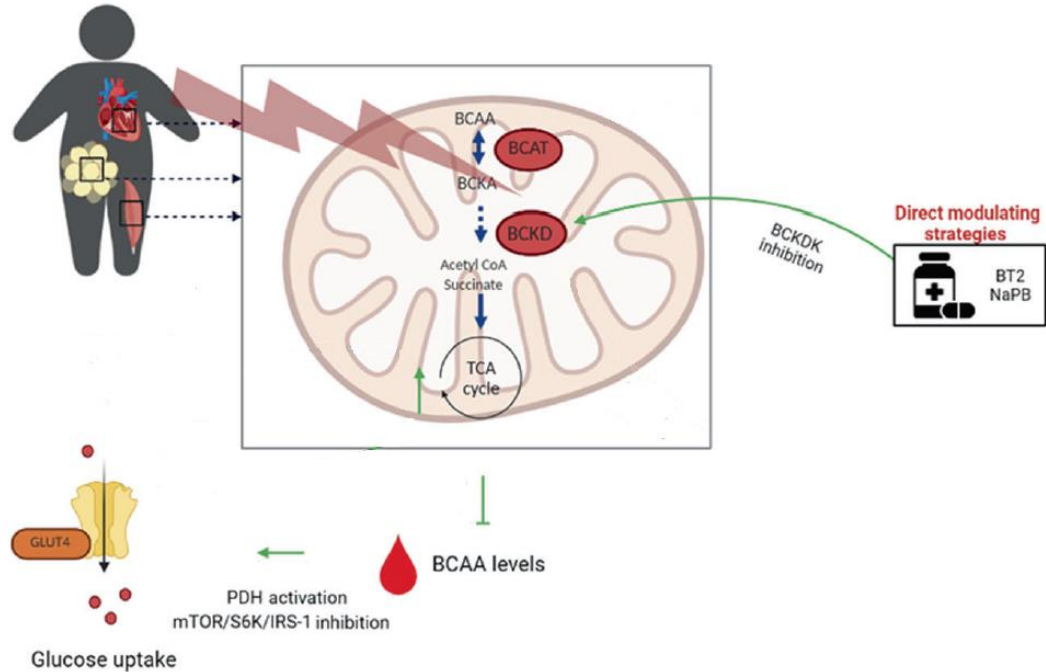
Η μετφορμίνη, ένα διαδεδομένο αντιδιαβητικό φάρμακο, παρουσιάζει διαφορετική επίδραση στον καταβολισμό των BCAAs συγκριτικά με τις θειαζολιδινεδιόνες, καθώς σε καλλιέργειες μυϊκών κυττάρων επάγει τη μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας της BCAT2 (και όχι της BCAT1) καθώς και της BCKD στους σκελετικούς μύες [136, 137]. Ο εξασθενημένος καταβολισμός των BCAAs στους σκελετικούς μύες οδηγεί στην μείωση των γλυκονεογενετικών προδρόμων και της ηπατικής γλυκονεογένεσης συμβάλλοντας έτσι στη ρύθμιση της ομοιόστασης της γλυκόζης [137].

Τέλος, η εμπαγλιφλοζίνη ανήκει στην κατηγορία των αναστολέων του συμμεταφορέα νατρίου-γλυκόζης 2, SGLT2 (sodium-glucose cotransporter 2), για τη θεραπεία του ΣΔΤ2. Η συγκεκριμένη ομάδα αντιδιαβητικών φαρμάκων ρυθμίζει τα επίπεδα γλυκόζης στο πλάσμα καθώς μειώνει την επαναρρόφηση της γλυκόζης στα νεφρά και αυξάνει την απέκκρισή της στα ούρα. Επιπλέον της αντιδιαβητικής δράσης, η εμπαγλιφλοζίνη σχετίζεται με μειωμένη θνησιμότητα από καρδιακή ανεπάρκεια σε ασθενείς με ΣΔΤ2 και καρδιαγγειακή νόσο καθώς προάγει την αποτελεσματική χρήση των κετονοσωμάτων που προέρχονται και από τα κετογενετικά αμινοξέα (λευκίνη, ισολευκίνη) ως ενεργειακά καύσιμα για την καλύτερη λειτουργία του μυοκαρδίου [138]. Καθώς όπως αναφέρθηκε, στην καρδιακή ανεπάρκεια ο καταβολισμός των BCAAs μειώνεται, η ευεργετική δράση της εμπαγλιφλοζίνης εντοπίζεται στην αποκατάσταση του μονοπατιού οξείδωσης των BCAAs και επομένως στη χρήση αυτών των αμινοξέων ως εναλλακτικά υποστρώματα κετογένεσης [138].

Εκτός από τις καθιερωμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις στους ασθενείς με ΣΔΤ2, έχουν διεξαχθεί κλινικές μελέτες με φάρμακα που δεν ανήκουν στην κατηγορία των αντιδιαβητικών αλλά στοχεύουν στην «αποκατάσταση» του καταβολισμού των BCAAs. Όπως αναφέρθηκε, η αντίσταση στην ινσουλίνη και ο ΣΔΤ2 συνοδεύονται από τη μειωμένη οξειδωση των BCAAs και την επακόλουθη αύξηση των επιπέδων τους στο πλάσμα. Σε συμφωνία με αυτή την υπόθεση, σε ασθενείς με ΣΔΤ2 έχουν αναφερθεί χαμηλότεροι ρυθμοί οξειδωσης της λευκίνης σε όλους τους ιστούς συγκριτικά με τους υγιείς και μελέτες σε πειραματικά μοντέλα υποδεικνύουν ότι η αποκατάσταση της οξειδωσης των BCAAs βελτιώνει το μεταβολισμό της γλυκόζης και την ευαισθησία των ιστών στη δράση της ινσουλίνης. Σε πειραματικά μοντέλα, η χορήγηση του 3,6-διχλωροβενζοθειοφαινιο-2-καρβοξυλικού οξέος (BT2, 3,6-dichlorobenzothiothiophene-2-carboxylic acid), ενός ισχυρού και ειδικού αναστολέα της κινάσης BCKDK, οδήγησε σε αυξημένη οξειδωση των BCAAs με επακόλουθη μείωση των επιπέδων τους στο πλάσμα. Ως αποτέλεσμα η ηπατική στεάτωση μειώθηκε και ο μεταβολισμός της γλυκόζης στους περιφερειακούς ιστούς βελτιώθηκε. Επιπλέον, σε παχύσαρκα πειραματόζωα από δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, η χορήγηση αυτού του αναστολέα της BCKDK βελτίωσε την αντίσταση στην ινσουλίνη [139].

Αντίστοιχα με το BT2, το φαινυλοβουτυρικό νάτριο (NaPB) δρα επίσης ως αναστολέας της BCKDK και είναι ένα φαρμακευτικό σκεύασμα το οποίο χορηγείται σε ασθενείς με διαταραχές του κύκλου της ουρίας για την αποτοξίνωση από αμμωνία [140]. Στην κλινική μελέτη των Froukje Vanweert et al. [141], η αποκατάσταση του καταβολισμού των BCAAs μετά τη χορήγηση NaPB σε ασθενείς με ΣΔΤ2 συνέβαλε 1) στη βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη στους σκελετικούς μύες, 2) στην αυξημένη μυϊκή πρόσληψη γλυκόζης και 3) στη μείωση των επιπέδων γλυκόζης πλάσματος νηστείας. Τη μυϊκή πρόσληψη γλυκόζης που διεγείρεται από τη δράση της ινσουλίνης ακολούθησε η ενισχυμένη οξειδωση της γλυκόζης καθώς και η σύνθεση γλυκογόνου. Επιπλέον, μετά τη θεραπεία με NaPB παρατηρήθηκε μείωση στα επίπεδα του 3-HIB) στο πλάσμα το οποίο σχηματίζεται από τον καταβολισμό της βαλίνης, υδρολύεται και στη συνέχεια απεκκρίνεται από τα μιτοχόνδρια στο πλάσμα. Όπως αναφέρθηκε τα αυξημένα επίπεδα 3-HIB συνδέονται με την αντίσταση στην ινσουλίνη και τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΔΤ2. Καθώς το NaPB ενισχύει τον καταβολισμό των BCAAs, η μείωση των επιπέδων του 3-HIB θα μπορούσε να αντικατοπτρίζει, ως δείκτης, την αποκατάσταση του καταβολισμού των BCAAs και τη βελτίωση της λειτουργίας του κύκλου του Krebs. Σαν συμπέρασμα, η μείωση των BCAAs και των προϊόντων του καταβολισμού τους, συνδέεται με τη βελτίωση της σηματοδότησης της ινσουλίνης που θα μπορούσε να αποδοθεί στη μειωμένη ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού mTOR. Τέλος, μελέτες σε

ζωικό ιστό καρδιάς έδειξαν ότι η συσσώρευση των BCAAs και των καταβολικών προϊόντων τους καταστέλλουν τη δραστηριότητα της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης, παρεμποδίζοντας έτσι την οξείδωση της γλυκόζης με επακόλουθη μείωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη. Επομένως, η αύξηση της οξείδωσης της γλυκόζης που επάγεται από το NaPB θα μπορούσε επίσης να αποδοθεί και στην υψηλότερη δραστηριότητα της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (**εικ.21**).



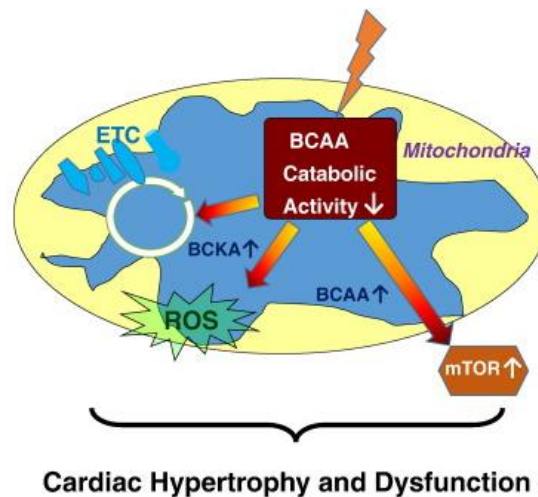
**Εικ.21:** Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού δράσης των αναστολέων της κινάσης BCKDK, *mTOR mammalian target of rapamycin complex*, *S6K ribosomal S6 kinase*, *IRS-1 insulin receptor substrate-1*, *PDH pyruvate dehydrogenase complex*, *GLUT4 glucose transporter type 4*, *BT2 3,6-dichlorobenzo(b)thiophene-2-carboxylic acid*, *NaPB sodium phenylbutyrate*. (Ref [141]: Vanweert F. et al, 2022).

Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν ότι η αποκατάσταση του καταβολισμού των BCAAs μέσω αντιδιαβητικών θεραπευτικών προσεγγίσεων μπορεί να έχει ευεργετικό ρόλο στην πιο αποτελεσματική πρόληψη των επιπλοκών του διαβήτη.

#### 1.4.6 Καρδιαγγειακή νόσος

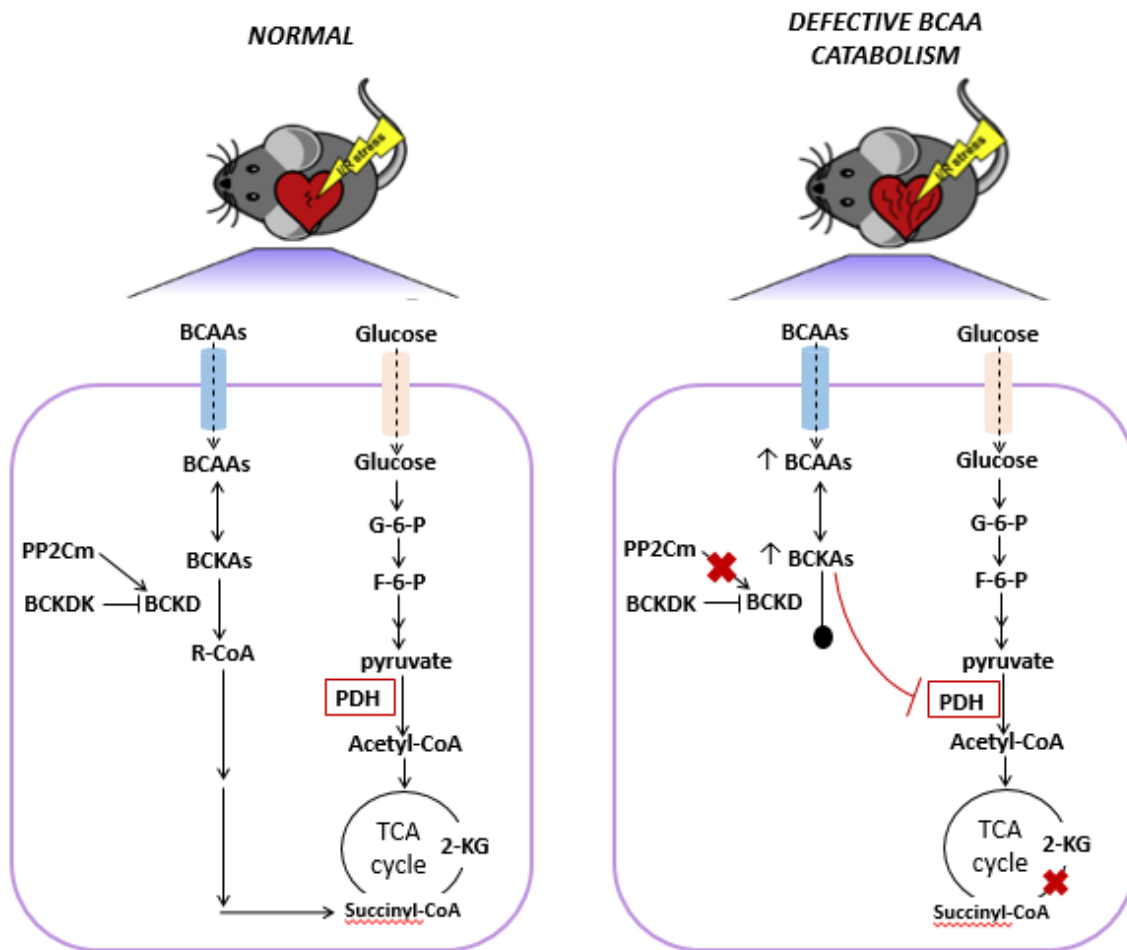
Οι διαταραχές του καταβολισμού των BCAAs έχουν διερευνηθεί και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις όπως στα καρδιαγγειακά νοσήματα και στην καρδιακή ανεπάρκεια. Σύμφωνα με μελέτες αυξημένα BCAAs πλάσματος καθώς και των ενδιάμεσων προϊόντων του καταβολισμού τους έχουν συσχετιστεί με κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου [142, 143].

Τα αυξημένα επίπεδα πλάσματος των BCAAs και των BCKAs στην καρδιακή ανεπάρκεια δρουν ως αρνητικά σηματοδοτικά μόρια στον ενεργειακό μεταβολισμό της καρδιάς καθώς σχετίζονται με την καρδιακή αντίσταση στην ινσουλίνη και τη δυσλειτουργία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης [144, 145]. Στην καρδιακή ανεπάρκεια, η υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Krüppel-like factor 15 συνδέεται με την καταστολή της έκφρασης των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τον καταβολισμό των BCAAs με αποτέλεσμα την ενδομυοκαρδιακή συσσώρευση των BCAAs και των BCKAs. Τα αυξημένα BCAAs και ιδιαίτερα η λευκίνη, επάγουν την υπερέκφραση του mTOR με επακόλουθη καρδιακή αντίσταση στην ινσουλίνη και υπερτροφία, ενώ η καταστολή του mTOR σχετίζεται με τη βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας [147]. Τέλος, η συσσώρευση των α-κετοξέων αναστέλλει την οξειδωτική φωσφορυλίωση και επάγει την αυξημένη απελευθέρωση των ROS (reactive oxygen species), συμβάλλοντας στην επιδείνωση της καρδιακής λειτουργίας [145, 146](**εικ.22**).



**Εικ.22** Ρόλος των BCAAs και BCKAs στην παθογένεση της καρδιακής υπερτροφίας και δυσλειτουργίας. ROS reactive oxygen species; ETC, electron-transfer chain (Ref [146]: Sun H et al, 2016).

Σε πειραματικά μοντέλα, η καταστολή της έκφρασης του γονιδίου της φωσφατάσης PP2Cm, που οδηγεί στη μείωση του καταβολισμού των BCAAs και στη συσσώρευσή τους τόσο στο πλάσμα όσο και στους καρδιακούς μύες σχετίζεται με τη μειωμένη απόκριση της καρδιάς στη βλάβη κατά την ισχαιμία και επαναιμάτωση (**εικ.23**) [148]. Επιπρόσθετα, όπως αναφέρθηκε, καθώς τα αυξημένα BCAAs αναστέλλουν την ενζυμική δραστικότητα των αφυδρογονασών του πυροσταφυλικού και του 2-κετογλουταρικού, συμβάλλουν στη μειωμένη παραγωγή ATP στα μιτοχόνδρια και στην εξασθενημένη συσταλτική ικανότητα του καρδιακού μυ [148, 149] (**εικ.23**). Προς αυτή την κατεύθυνση αυξημένη διατροφική πρόσληψη των BCAAs φαίνεται να επιδεινώνει την καρδιακή λειτουργία μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου [147].



**Εικ.23.** Διαταραχή του καταβολισμού των BCAAs και του μεταβολισμού της γλυκόζης στον καρδιακό μυ. (Modified by Ref [148]: Li T et al, 2017).

Συμπερασματικά η αποκατάσταση του καταβολισμού των BCAAs που θα οδηγούσε στην μείωση των επιπέδων τους τόσο στο πλάσμα όσο και στην καρδιά, σύμφωνα με μελέτες, θα

μπορούσε «να προστατέψει» την καρδιακή λειτουργία αναδεικνύοντας τη σημασία της αποτελεσματικής οξειδωσης αυτών των αμινοξέων στην καρδιακή ανεπάρκεια.

#### 1.4.7 Νόσος Alzheimer (Αλτσχάιμερ)

Η νόσος Alzheimer χαρακτηρίζεται ως ένα χρόνιο νευροεκφυλιστικό νόσημα με προοδευτική επιδείνωση. Τα βασικά χαρακτηριστικά της νόσου είναι η σταδιακή εναπόθεση συσσωματωμάτων πρωτεϊνών όπως οι πλάκες β-αμυλοειδούς ανάμεσα στα νευρικά κύτταρα και οι ενδοκυττάρεις εναποθέσεις νευροϊνιδιακών δεματίων που αποτελούνται από υπερφωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Tau [150].

Πρόσφατες μελέτες προτείνουν πιθανό ρόλο των BCAAs στην παθογένεση της νόσου ωστόσο τα ευρήματα των μελετών είναι αντικρουόμενα σχετικά με τα επίπεδα των συγκεκριμένων αμινοξέων στους ασθενείς και τους εμπλεκόμενους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς [151, 152].

Σε πειραματικά μοντέλα της νόσου Alzheimer έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα BCAAs πλάσματος τα οποία πιθανά αποδίδονται στη μειωμένη έκφραση της κυτοσολικής ισομορφής του ενζύμου της αμινοτρανσφοράς BCAT1 στους ιστούς του εγκεφάλου [151]. Αντίθετα, μελέτες σε ασθενείς με Alzheimer συνδέουν τα αυξημένα επίπεδα της BCAT και του γλουταμινικού οξέος με τη σοβαρότητα της νόσου [153]. Συγκεκριμένα η αυξημένη παραγωγή του γλουταμινικού από την αύξηση της BCAT συμβάλλει στην παθογένεση της νόσου καθώς συνδέεται με την επιδείνωση των εγκεφαλικών λειτουργιών λόγω της «διεγερτοξικότητας του γλουταμινικού οξέος». Επιπλέον, σε μια μελέτη με μεγάλο αριθμό ασθενών τα μειωμένα επίπεδα βαλίνης πλάσματος σχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου, μειωμένη γνωστική λειτουργία καθώς και ταχύτερη γνωστική έκπτωση [154]. Επιπρόσθετα, προτείνεται ότι τα άτομα με αυξημένα επίπεδα BCAAs εμφανίζουν μεγαλύτερη γενετική προδιάθεση στη νόσο [155]. Η γενετική προδιάθεση αποτυπώνεται στην ταυτοποίηση πολυμορφισμών νουκλεοτιδίων στο μονοπάτι καταβολισμού της ισολευκίνης σημαντικότερες εκ των οποίων θεωρείται η μειωμένη γονιδιακή έκφραση της ειδικής φωσφατάσης του συμπλόκου της BCKD. Τέλος τα αυξημένα επίπεδα BCAAs σχετίζονται με μειωμένη σύνθεση νευροδιαβιβαστών, με οξειδωτικό στρες στο νευρικό σύστημα καθώς επίσης και την αυξημένη ενεργοποίηση του mTOR με την επακόλουθη ινσουλινοαντίσταση στον εγκέφαλο [156].

Συμπερασματικά, η αυξημένη διαιτητική πρόσληψη των BCAAs φαίνεται να σχετίζεται με την παθογένεση της νόσου κυρίως λόγω της αυξημένης ενεργοποίησης του mTOR που συνδέεται όχι μόνο με την αντίσταση στην ινσουλίνη αλλά και την αυξημένη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης

Ταυ [151]. Αντίθετα, σε πειραματικά μοντέλα, η περιορισμένη πρόσληψη των BCAAs από τη διατροφή βελτίωσε τη μνημονική λειτουργία [157, 158].

Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν ότι είτε η συσσώρευση των ίδιων των BCAAs είτε η διαταραχή του καταβολισμού τους φαίνεται να συμβάλλουν στην παθογένεση και εξέλιξη της συγκεκριμένης νευροεκφυλιστικής νόσου. Ωστόσο χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση για θεραπευτικές προσεγγίσεις που στοχεύουν όχι μόνο τις πρωτεΐνες β-αμυλοειδούς ή Ταυ αλλά και εγκεφαλικές και συστημικές μεταβολικές διαταραχές.

#### 1.4.8 Καρκίνος

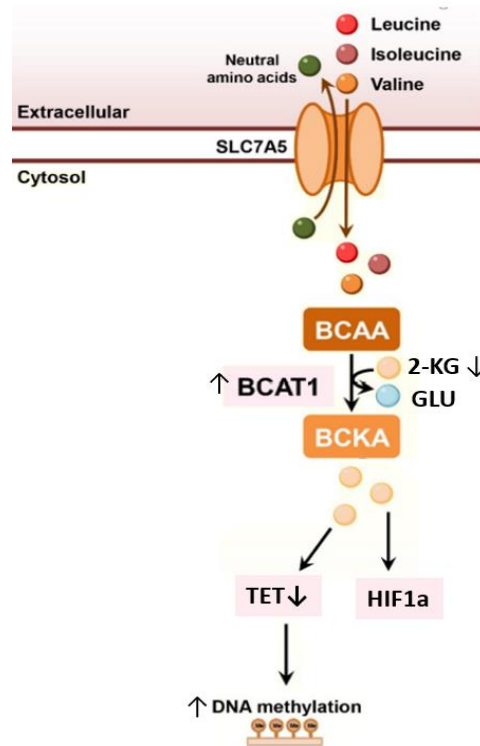
Τα επίπεδα των BCAAs καθώς και η δραστικότητα των καταβολικών τους ενζύμων έχουν μελετηθεί και στον καρκίνο [159]. Συγκεκριμένα, αυξημένα BCAAs βρέθηκαν στο πλάσμα ασθενών 2 έως 5 χρόνια πριν από τη διάγνωση του αδενοκαρκινώματος του παγκρέατος (PDAC, Pancreatic Ductal Adenocarcinoma) και η πρώιμη αύξηση των επιπέδων των συγκεκριμένων αμινοξέων συσχετίστηκε με έως και διπλάσιο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του παγκρέατος [160]. Κατά την ογκογένεση, η αυξημένη πρωτεόλυση για την κάλυψη των αναγκών του αναπτυσσόμενου όγκου σε BCAAs, αποτελεί την αιτία αύξησης των επιπέδων τους στο πλάσμα [160]. Αυξημένα BCAAs, εντοπίστηκαν επίσης σε πειραματικά μοντέλα με παγκρεατικούς όγκους σχετιζόμενους με μεταλλάξεις στο γονίδιο KRAS, πριν την υποκλινική εκδήλωση της νόσου [161]. Ωστόσο δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στα επίπεδα της γλυκόζης γεγονός που υποδηλώνει ότι τα αυξημένα BCAAs δεν αποδίδονται σε μη επαρκή γλυκαιμικό έλεγχο ή αντίσταση στην ινσουλίνη αλλά πιθανά αποτελούν μια πρώιμη ένδειξη της εμφάνισης αδενοκαρκινώματος του παγκρέατος [161]. Επιπρόσθετα, αναφέρεται ότι ο ρόλος των BCAAs στην κάλυψη των μεταβολικών αναγκών δεν είναι ίδιος για όλους τους όγκους ακόμη και αν προκαλούνται από τις ίδιες μεταλλάξεις. Σε αντίθεση με τους όγκους PDAC, στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα παρατηρείται κατά την ογκογένεση αυξημένη πρόσληψη BCAAs για την κάλυψη των αναγκών πρωτεϊνοσύνθεσης του αυξανόμενου όγκου με αποτέλεσμα τη μείωση των BCAAs στο πλάσμα των ασθενών [161].

Ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι αλλαγές της δραστικότητας του καταβολικού ενζύμου BCAT1, καθώς διαφοροποιημένη έκφραση του γονιδίου του παρατηρείται μεταξύ των διαφόρων τύπου καρκίνου και σχετίζεται με την επιθετικότητα του όγκου [162, 163]. Σύμφωνα με μελέτες, σε όγκους γλοιοβλαστώματος που είχαν ταξινομηθεί με βάση τη μετάλλαξη της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης (Isocitrate Dehydrogenase, IDH) σε «αγρίου τύπου» IDH<sub>wt</sub> και

IDH<sub>mut</sub>, έκφραση του γονιδίου BCAT1 ανιχνεύθηκε στα γλοιώματα IDH<sub>wt</sub> ενώ στα γλοιώματα IDH<sub>mut</sub>, το συγκεκριμένο γονίδιο είχε κατασταλλεί [162]. Η καταστολή αυτή φαίνεται να επάγεται από το 2-υδροξυγλουταρικό οξύ (2-hydroxyglutarate, 2-HG) το οποίο προέρχεται από το 2-κετογλουταρικό (2-KG) σε μια αντίδραση που καταλύεται από τα μεταλλαγμένα ένζυμα στους όγκους IDH<sub>mut</sub>. Ο ογκομεταβολίτης, 2-HG, επάγει τη μειωμένη δραστηριότητα των εξαρτώμενων από 2-KG ενζύμων όπως οι απομεθυλάσες των ιστονών, οδηγώντας σε υπερμεθυλίωση της περιοχής πρόσδεσης των εκκινητών και κατά συνέπεια στην καταστολή του BCAT1 [162, 163]. Η απενεργοποίηση του BCAT1 συμβάλλει στη μειωμένη παραγωγή γλουταμινικού και ως εκ τούτου αυξάνει την εξάρτηση για την κάλυψη των αναγκών σε γλουταμινικό από τη γλουταμινάση, που καταλύει την εναλλακτική συνθετική πορεία του γλουταμινικού και κατ' επέκταση του αντιοξειδωτικού γλουταθειόνης. Έχει αναφερθεί ότι η αναστολή της γλουταμινάσης ευαισθητοποιεί τα κύτταρα γλοιώματος IDH<sub>mut</sub> στο οξειδωτικό στρες in vitro καθώς και στην ακτινοβολία είτε in vitro είτε in vivo, υποδηλώνοντας έτσι έναν πιθανά αποτελεσματικό ρόλο αυτής της αναστολής έναντι των γλοιωμάτων IDH<sub>mut</sub> [164].

Σε λευχαιμικά κύτταρα, η υπερέκφραση του BCAT1 οδηγεί στη μείωση των ενδοκυτταρικών συγκεντρώσεων του 2-KG και συμβάλλει και πάλι στη υπερμεθυλίωση του DNA μέσω της απενεργοποίησης των DNA απομεθυλασών TET (Ten-Eleven Translocation family) [165]. Στην IDH<sub>wt</sub> οξεία μυελογενή λευχαιμία (OMΛ), τα αυξημένα επίπεδα BCAT1 έχουν συσχετιστεί με χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης καθώς και με αυξημένη μεθυλίωση του DNA [165]. Τα συγκεκριμένα ευρήματα συνδέουν την αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα της BCAT1 με τη σταθερότητα της πρωτεΐνης HIF1α (hypoxia-inducible factor 1α) που απαιτείται για την επιβίωση των βλαστοκυττάρων λευχαιμίας και κατ' επέκταση τη ρύθμιση του επιγενετικού τοπίου [165] **(εικ.24)**. Στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία (ΧΜΛ), το ένζυμο BCAT1 προάγει την κλωνογονική ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων με την επαναμίνωση των BCKAs σε BCAAs και την ενεργοποίηση του mTOR. Η καταστολή του BCAT1 συνδέθηκε με τη φυσιολογική κυτταρική διαφοροποίηση και την αποτροπή της βλαστικής φάσης ΧΜΛ [166].





**Εικ.24.** Αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα της αμινομεταφοράσης *BCAT1* στην οξεία μυελογενή λευχαιμία. *Ten-Eleven Translocation family*; *TET*, *hypoxia-inducible factor 1α*; *HIF1α* (Modified by the Ref [159]: Yoo HC et al, 2022).

Σε καρκινικούς ιστούς ασθενών με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (hepatocellular carcinoma, HCC), ανιχνεύθηκαν αυξημένα BCAAs και μειωμένα ενδιάμεσα προϊόντα του καταβολισμού τους σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς, υποδηλώνοντας διαταραχή του ηπατικού καταβολισμού των BCAAs [167]. Επιπλέον στους καρκινικούς όγκους αυτών των ασθενών εντοπίστηκε ασυνήθιστα υψηλή γονιδιακή έκφραση της *BCAT1* αλλά μειωμένη έκφραση της *BCKD* καθώς και των άλλων καταβολικών ενζύμων των BCAAs [167]. Τα αυξημένα BCAAs στο συγκεκριμένο καρκινικό τύπο φαίνεται ότι επάγουν την υπερενεργοποίηση του mTOR για την ανάπτυξη του όγκου και δεν οξειδώνονται για την κάλυψη των ενεργειακών απαιτήσεων. Παρεμβάσεις στο μέσο καλλιέργειας των ηπατοκαρκινικών κυττάρων όπως η μείωση των BCAAs ή ο εμπλουτισμός με τον αναστολέα του mTOR ραπαμυκίνη ή η αναστολή της κινάσης *BCKDK* συμβάλλουν στη μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων [167].

Στον καρκίνο του μαστού παρατηρείται αυξημένη γονιδιακή έκφραση όλων των καταβολικών ενζύμων των BCAAs όπως *BCAT1*, *BCKD* με αποτέλεσμα τον αυξημένο καταβολισμό

αυτών των αμινοξέων [168]. Έτσι στο συγκεκριμένο καρκινικό τύπο η καταστολή του BCAT1 μειώνει το ρυθμό ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων του μαστού καταστέλλοντας τη μιτοχονδριακή βιογένεση που επάγεται από το σηματοδοτικό μονοπάτι mTOR [168].

Καθώς τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν το σημαντικό ρόλο του BCAT1 στην ικανότητα πολλαπλασιασμού του καρκινικού όγκου, η έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου στους διάφορους τύπους καρκίνου θα μπορούσε να αποτελέσει πιθανό θεραπευτικό στόχο.

#### 1.4.9 Ηπατική νόσος

Ο ρόλος των BCAAs στα ηπατικά νοσήματα έχει μελετηθεί σε μικρό βαθμό. Σε μια από τις πρώτες μελέτες, το 1976, τα μειωμένα BCAAs και τα αυξημένα αρωματικά αμινοξέα αντιπροσώπευαν χαρακτηριστικές αλλαγές στα επίπεδα των αμινοξέων πλάσματος ασθενών με κίρρωση [169]. Τα ευρήματα αυτά σχετίζονται με τον αυξημένο κίνδυνο ηπατικής εγκεφαλοπάθειας καθώς και απώλειας μυϊκής μάζας [170].

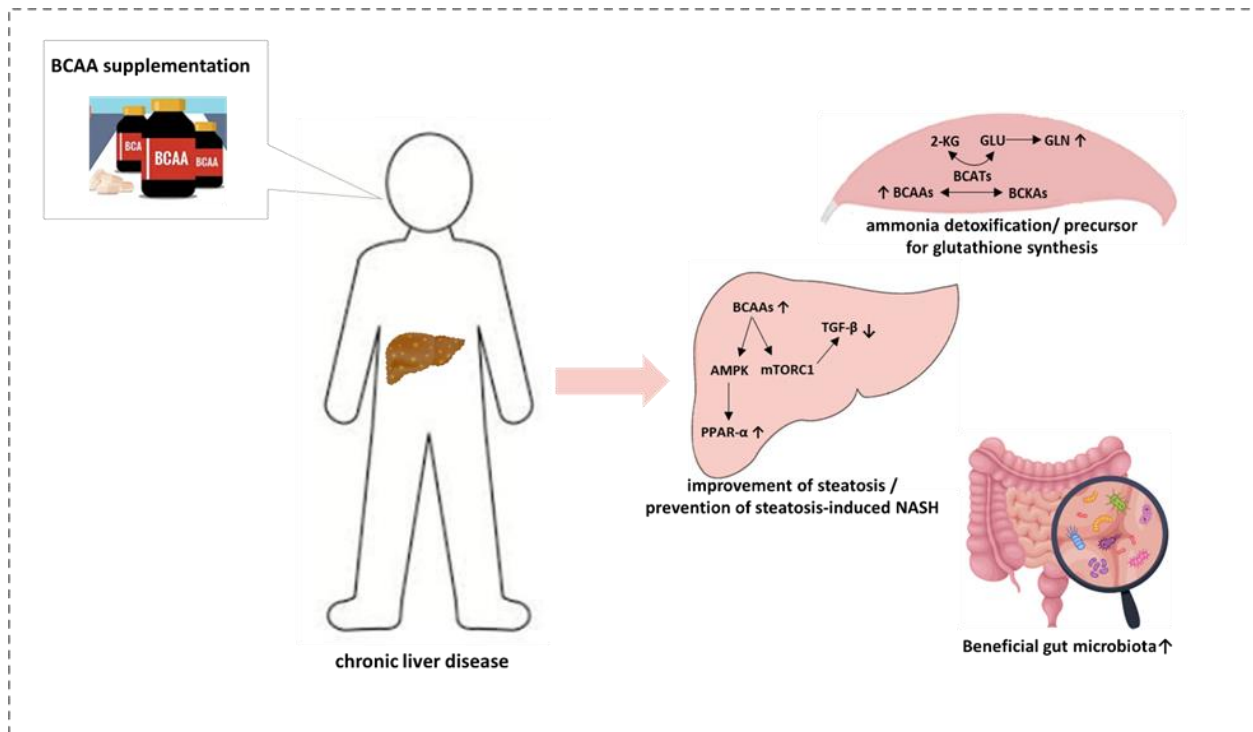
Οι κυριότερες αιτίες που φαίνεται να συμβάλλουν στη μείωση των BCAAs στο πλάσμα στα ηπατικά νοσήματα είναι οι ακόλουθες: 1) ο αυξημένος καταβολισμός των BCAAs που οδηγεί στην παραγωγή γλουταμινικού ως εναλλακτικός τρόπος αποτοξίνωσης από αμμωνία σε καταστάσεις υπεραμμωναιμίας [171], 2) η αυξημένη μυϊκή πρόσληψη των BCAAs σε καταστάσεις υποσιτισμού και 3) σε μικρότερο βαθμό η αυξημένη οξειδωσή τους προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτικά υποστρώματα γλυκονογένεσης [169].

Στην ηπατίτιδα Β, η διαταραχή του μεταβολισμού των αμινοξέων που αντικατοπτρίζεται κυρίως στα αυξημένα επίπεδα τυροσίνης και στα μειωμένα BCAAs οδηγεί στη σημαντική μείωση του λόγου BCAAs/τυροσίνη (BCAAs to tyrosine ratio, BTR) ο οποίος έχει συσχετιστεί με τον τύπο και το στάδιο της λοίμωξης από τον ιο ΗΒV [172]. Ο λόγος BTR χρησιμοποιείται επίσης στην εκτίμηση του βαθμού ηπατικής ίνωσης σε ασθενείς με λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας C και βελτίωση προς τα φυσιολογικά επίπεδα του λόγου αυτού καθώς και της ηπατικής ίνωσης φαίνεται να επέρχεται μετά τη θεραπεία με ιντερφερόνη-α [173].

Αυξημένα BCAAs πλάσματος έχουν καταγραφεί σε ασθενείς με μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος (Nonalcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD). Ωστόσο, δεν έχει καταστεί ακόμα σαφές εάν αυτό οφείλεται σε αυξημένη μυϊκή πρωτεόλυση, παχυσαρκία και/ή αντίσταση στην ινσουλίνη ή στη μειωμένη οξείδωση αυτών των αμινοξέων στο ήπαρ και το λιπώδη ιστό [174]. Επιπλέον, η διαταραχή του καταβολισμού των BCAAs στη NAFLD πιθανά αποτελεί προδιάθεση για ΣΔΤ2 [175].

Σε ασθενείς με χρόνιες παθήσεις του ήπατος τα συμπληρώματα BCAAs έχουν ευεργετικά αποτελέσματα. Προκλινικές μελέτες για την ηπατική ίνωση, που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των χρόνιων παθήσεων του ήπατος, συμπεραίνουν ότι τα συμπληρώματα BCAAs βελτιώνουν την ίνωση καθώς ενεργοποιούν τον mTORC1 με επακόλουθη μείωση της έκκρισης των προ-ινωτικών κυτοκινών και κυρίως του παράγοντα TGF-β (transforming growth factor β) [176]. Επιπλέον, τα συμπληρώματα BCAAs φαίνεται να εμποδίζουν την περαιτέρω επιδείνωση των χρόνιων ηπατικών παθήσεων καθώς ενεργοποιούν την πρωτεϊνική κινάση AMPK με επακόλουθη αύξηση της έκφρασης του παράγοντα PPAR-α ο οποίος συμβάλλει στην πρόληψη της

στεατοηπατίτιδας (NASH) [177]. Όπως προαναφέρθηκε, οι χρόνιες παθήσεις του ήπατος συνοδεύονται συχνά από απώλεια μυϊκής μάζας και καθώς οι μύες αποτελούν τον βασικό ιστό καταβολισμού των BCAAs, η αποκατάσταση της μυϊκής μάζας θα συμβάλλει και στην αποκατάσταση του καταβολισμού τους και την επακόλουθη σύνθεση γλουταμίνης. Προς αυτή την κατεύθυνση τα συμπληρώματα συνδέθηκαν με την αύξηση της γλουταμίνης του πλάσματος η οποία συμβάλλει στην αποτοξίνωση από αμμωνία και στη σύνθεση γλουταθειόνης, του σημαντικού για την υγεία του ήπατος φυσικού αντιοξειδωτικού. Τέλος, η χορήγηση συμπληρωμάτων BCAAs σε πειραματόζωα που ακολουθούν δίαιτα πλούσια σε λιπαρά συνδέθηκε με την αύξηση της ευεργετικής μικροχλωρίδας του εντέρου και τη βελτίωση παραμέτρων που σχετίζονται με την ηπατική υγεία, συμπεριλαμβανομένων των επιπέδων AST, ALT στον ορό καθώς και με τη μείωση της στεάτωσης (**εικ.25**).



**Εικ.25.** Δυνητικοί μηχανισμοί του ευεργετικού ρόλου των συμπληρωμάτων BCAAs στην εξέλιξη των χρόνιων ηπατικών νοσημάτων.

Στην κίρρωση, τα συμπληρώματα BCAAs συμβάλλουν στη βελτίωση της διατροφικής κατάστασης των ασθενών, μειώνουν την αίσθηση αδυναμίας και κόπωσης καθώς επίσης και τον κίνδυνο για εμφάνιση ηπατικής εγκεφαλοπάθειας [178]. Επιπλέον παίζουν σημαντικό ρόλο στην

καλύτερη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, στην ομοιόσταση της γλυκόζης και στην αύξηση της λευκωματίνης του ορού [178].

Στη χρόνια ηπατίτιδα C, τα συμπληρώματα BCAAs ενισχύουν τη σηματοδότηση της ιντερφερόνης, ενός ισχυρού αντιϊκού παράγοντα, μέσω της ενεργοποίησης του mTOR [179]. Επιπλέον, επάγουν την έκκριση της εντερικής ανοσοσφαιρίνης A, η οποία βελτιώνει τη λειτουργία του εντερικού βλεννογόνου [180].

Τα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος (ΑΝΗ) εκδηλώνονται όταν το ανοσοποιητικό σύστημα επιτίθεται στο ήπαρ, προκαλώντας φλεγμονή. Εάν αφεθεί χωρίς θεραπεία, η φλεγμονή του ήπατος μπορεί να οδηγήσει σε κίρρωση του ήπατος με τελική πιθανή εξέλιξη το ηπατοκαρκίνωμα και την ηπατική ανεπάρκεια. Στα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος περιλαμβάνονται η αυτοάνοση ηπατίτιδα (ΑΗ), η πρωτοπαθής χολική χολαγγειίτιδα (ΠΧΧ) και η πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα (ΠΣΧ). Ενώ η ΑΗ προσβάλλει τα ηπατοκύτταρα, στις χολαγγειίτιδες οι στόχοι της αυτοάνοσης προσβολής είναι τα επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων. Καθένα από τα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος σχετίζεται με διακριτά επιδημιολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά ωστόσο τα σύνδρομα επικάλυψης που χαρακτηρίζονται από τη συνύπαρξη χαρακτηριστικών περισσότερων του ενός ΑΝΗ κάνει επιτακτική την ανάγκη για τη διαφορική διάγνωση με στόχο την πιο αποτελεσματική θεραπεία και την καλύτερη έκβαση των ασθενών [181].

Μικρός αριθμός μελετών έχει διερευνήσει το ρόλο των BCAAs στην παθογένεση των ηπατικών αυτοάνοσων νοσημάτων. Σε μία από τις πρώτες μελέτες, οι Wang et al. [182] διερεύνησαν το μεταβολικό προφίλ της αυτοάνοσης ηπατίτιδας και εντόπισαν μειωμένα BCAAs πλάσματος στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς γεγονός που αποδόθηκε στην εξέλιξη της ΑΗ σε κίρρωση. Τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζει ο μεταβολισμός της εντερικής μικροχλωρίδας όπου αλλαγές στις συγκεντρώσεις εντερικών μεταβολιτών, συμπεριλαμβανομένου των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας αναγνωρίζονται ως σημαντικοί παράγοντες που συμβάλλουν στη διάσπαση της ακεραιότητας του εντερικού φραγμού, στη διαταραχή της ομοιόστασης του ανοσοποιητικού συστήματος και στην επιδείνωση της φλεγμονώδους βλάβης, προάγοντας έτσι την εξέλιξη της ΑΗ [183]. Διαταραχή του μεταβολισμού των BCAAs εντοπίστηκε και στη μελέτη των Hao et al. που διερεύνησαν το μεταβολικό προφίλ του ορού του αίματος ασθενών με ΠΧΧ [184]. Στη συγκεκριμένη μελέτη τα αυξημένα επίπεδα ισολευκίνης, 3-υδροξυ-ισοβαλερικού και 3-υδροξυ-ισοβουτυρικού οξέος και τα μειωμένα επίπεδα βαλίνης συνέβαλαν στο διαχωρισμό των ασθενών με ΠΧΧ από τους υγιείς ενώ τα αυξημένα

επίπεδα 3-υδροξυ-ισοβαλερικού που αποδόθηκαν στην αυξημένη κετογένεση συνέβαλαν στη διαφορική διάγνωση της ΠΧΧ από την ΑΗ και την ιογενή ηπατίτιδα Β. Τέλος στη μελέτη των Kummen et al. [185] τα μειωμένα BCAAs στο πλάσμα ασθενών με ΠΣΧ συγκριτικά με τους υγιείς συσχετίστηκαν με τη μειωμένη επιβίωση των ασθενών χωρίς μεταμόσχευση ήπατος. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για τη διερεύνηση του ρόλου των BCAAs στην παθογένεση των αυτοάνοσων νοσημάτων του ήπατος.

#### 1.4.10 Χρόνια Νεφρική νόσος – Διαβητική Νεφροπάθεια (ΔΝ)

Η χρόνια νεφρική νόσος παρουσιάζει διαταραχές του μεταβολισμού των αμινοξέων και ιδιαίτερα των BCAAs, όπου η συγκέντρωσή τους όσο και των αντίστοιχων α-κετοξέων τους στο πλάσμα καθώς και τα ενδομυϊκά επίπεδα βαλίνης ανευρίσκονται στατιστικά σημαντικά μειωμένα σε σχέση με τους υγιείς [186, 187]. Επιπλέον, σε μια μελέτη ασθενών με χρόνια νεφρική νόσο σταδίου I & II, τα επίπεδα βαλίνης και λευκίνης πλάσματος βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα αλλά τα επίπεδα ισολευκίνης δεν παρουσίασαν κάποια μεταβολή συγκριτικά με τους υγιείς, υποδεικνύοντας τα δύο παραπάνω αμινοξέα ως πιθανούς βιοδείκτες του αρχικού σταδίου της νόσου [188].

Πιθανές αιτίες των μειωμένων BCAAs στη χρόνια νεφρική νόσο έχουν αναφερθεί εκτός από τον υποσιτισμό, η μεταβολική οξέωση και η συστηματική φλεγμονή [189] οι οποίες συμβάλλουν στην αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου BCKD έτσι ώστε να χρησιμοποιηθούν τα BCAAs ως υποστρώματα για τη σύνθεση πρωτεϊνών οξείας φάσης καθώς και πρωτεϊνών του ανοσοποιητικού συστήματος [190, 191]. Σε ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο χορηγούνται συμπληρώματα BCAAs σε συνδυασμό με άλλα απαραίτητα αμινοξέα έτσι ώστε να διατηρείται το πρωτεϊνικό ισοζύγιο [54].

Η Διαβητική Νεφροπάθεια (ΔΝ) η οποία χαρακτηρίζεται ως η χρόνια έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη, αποτελεί την κύρια αιτία χρόνιας νεφρικής νόσου και νεφρικής ανεπάρκειας παγκοσμίως [192]. Σε καταστάσεις αντίστασης στην ινσουλίνη, τα αυξημένα BCAAs όπως προαναφέρθηκε θεωρείται ότι επάγουν αυξημένη ενεργοποίηση του mTORC1 στα κύτταρα του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου και συμβάλλει στο πρώιμο στάδιο σωληναριακής υπερτροφίας και διαταραχής της νεφρικής λειτουργίας [193].

Κατά την επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας, με μικρο- και μακρο-αλβουμινουρία, τα επίπεδα των BCAAs στο πλάσμα ανιχνεύονται μειωμένα συγκριτικά με τους ασθενείς με ΣΔΤ2 χωρίς επιπλοκές [192]. Παράγοντες όπως η μεταβολική οξέωση και η υπερινσουλιναμία συμβάλλουν στην αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας του συμπλόκου της αφυδρογονάσης στα κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων και στο ήπαρ με αποτέλεσμα την αυξημένη οξείδωση των BCAAs [194, 195].

Σύμφωνα με μια οπτική γωνία, διατροφή πλούσια σε BCAAs ή συμπληρώματα μπορεί να είναι ευεργετική στη μεταβολική υγεία κυρίως λόγω της αναβολικής τους δράσης, ωστόσο απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση για τη συσχέτιση των αυξημένων επιπέδων BCAAs με ένα ευρύ φάσμα παθολογικών καταστάσεων.

Η καλύτερη κατανόηση του ρόλου των BCAAs στην παθοφυσιολογία νοσημάτων όπως ο διαβήτης, η καρδιαγγειακή νόσος, ο καρκίνος καθώς και οι νευροεκφυλιστικές νόσοι μπορεί να οδηγήσει στην πιο έγκαιρη διάγνωση και αποτελεσματικότερη θεραπευτική προσέγγιση ενδεχομένως και διαμέσου της «αποκατάστασης» του μεταβολισμού των BCAAs.

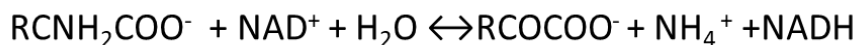


## 1.5 Μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού των BCAAs

### 1.5.1 Κλασικές μέθοδοι

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των BCAAs στην κλινική πράξη άρχισε να εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό του λόγου BCAAs/τυροσίνη στον ορό του αίματος ασθενών με διάφορες ηπατικές παθήσεις καθώς ο συγκεκριμένος λόγος χρησιμοποιήθηκε κλινικά ως ένας καλός δείκτης της σοβαρότητας της παρεγχυματικής βλάβης του ήπατος [196]. Επιπλέον τα επίπεδα των BCAAs καθώς και της αλλοϊσολευκίνης στο πλάσμα που αποτελεί τον παθογνωμονικό δείκτη της MSUD αποτέλεσαν σημαντικό εργαλείο στη διάγνωση και παρακολούθηση της συγκεκριμένης εκ γενετής διαταραχής του μεταβολισμού των BCAAs [197]. Άλλες κλινικές καταστάσεις καταγραφής των επιπέδων αυτών των αμινοξέων ήταν η παρακολούθηση της θεραπείας στη διαβητική κετοξέωση ή στην ολική παρεντερική σίτιση [198].

Για τον προσδιορισμό των αμινοξέων χρησιμοποιούνται κυρίως χρωματογραφικές τεχνικές όπως η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC, ή η αέρια χρωματογραφία καθώς και η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση [197, 199]. Εναλλακτικά λόγω της πολυπλοκότητας των παραπάνω χρωματογραφικών τεχνικών, έχουν εφαρμοστεί φασματοφωτομετρικές και φθορισμομετρικές μέθοδοι που επιτρέπουν τον ποσοτικό προσδιορισμό τόσο του κάθε αμινοξέος ξεχωριστά όσο και του συνόλου των BCAAs. Οι συγκεκριμένες μέθοδοι βασίζονται στο σχηματισμό του NADH μέσω της ενζυμικής δράσης της αφυδρογονάσης της λευκίνης (Leucine Dehydrogenase, LeuDH) [198]. Το ένζυμο αυτό έχει απομονωθεί από το είδος *Bacillus stearotherophilus* και καταλύει την παρακάτω αντιστρεπτή αντίδραση οξειδωτικής απαμίνωσης των BCAAs:



όπου *R* η πλευρική αλυσίδα του κάθε αμινοξέος

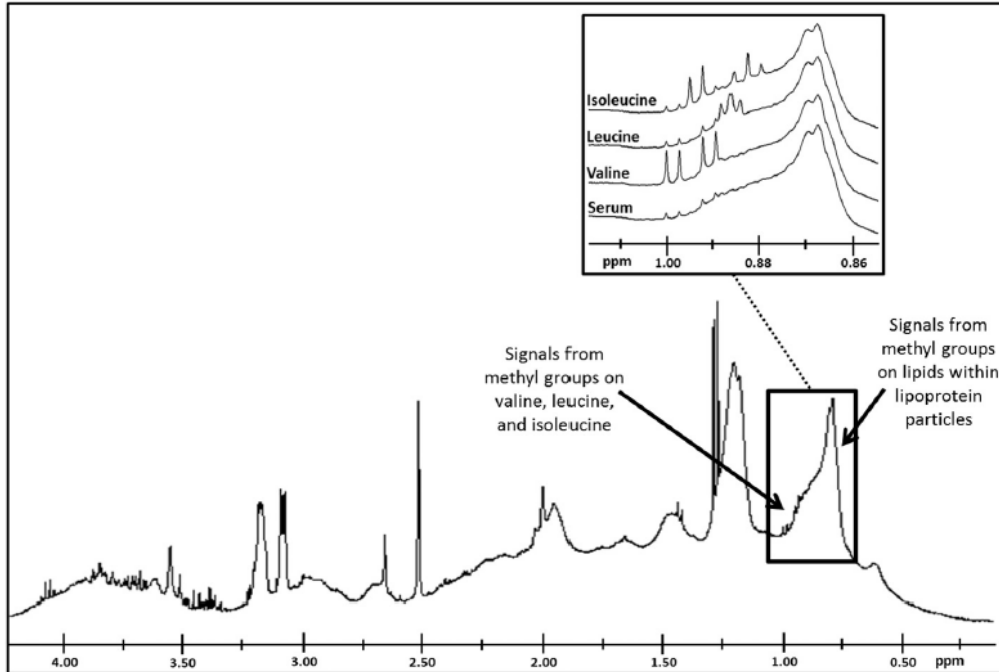
Η σύνθεση του NADH ακολουθεί τη στοιχειομετρία της παραπάνω αντίδρασης και μπορεί να προσδιοριστεί με μέτρηση της απορρόφησης στα 340nm.

Οι παραπάνω μέθοδοι παρουσιάζουν υψηλό κόστος, απαιτούν προεργασία του δείγματος, μεγάλους χρόνους ανάλυσης και πιθανά δεν παρέχουν τη δυνατότητα της συστηματικής παρακολούθησης των διάφορων νοσολογικών καταστάσεων καθώς βασίζονται στον προσδιορισμό συγκεκριμένων μεταβολιτών.

### 1.5.2 Χρωματογραφικές - Φασματοσκοπικές μέθοδοι

Ξεκινώντας από την επιτακτική ανάγκη διάγνωσης στα νεογνά αλλά και παρακολούθησης των ασθενών με MSUD στην καθ' ημέρα κλινική πράξη εφαρμόζονται βελτιωμένες αναλυτικές τεχνικές υψηλής απόδοσης. Τέτοιες τεχνικές αποτελούν ο συνδυασμός υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (LC-MS/MS, UPLC-MS/MS) για τον ακριβή, γρήγορο και αξιόπιστο ποσοτικό προσδιορισμό των BCAAs και της αλλοϊσολευκίνης τόσο στο πλάσμα όσο και σε δείγματα αποξηραμένων σταγόνων αίματος [200].

Επιπλέον με βάση τα ευρήματα μελετών που αναδεικνύουν τα αυξημένα BCAAs ως πρώιμους δείκτες αντίστασης στην ινσουλίνη και εμφάνισης διαβήτη τύπου 2, την απόκρισή τους σε θεραπευτικές παρεμβάσεις καθώς και το ρόλο τους ως βιοδείκτες διαταραχής μεταβολικών οδών επιτρέποντας την εξατομικευμένη θεραπεία έχουν αναπτυχθεί κάποια μοντέλα προσδιορισμού των επιπέδων των BCAAs που βασίζονται στο NMR και μπορούν να εφαρμοστούν στην κλινική ρουτίνα. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων των BCAAs από τα φάσματα NMR που χρησιμοποιούνται στην ποσοτικοποίηση ρουτίνας των λιποπρωτεϊνών (**εικ.26**). Για αυτήν την προσέγγιση αναπτύχθηκε ένα αλγοριθμικό μοντέλο αποσύζευξης των σημάτων πρωτεϊνών και λιποπρωτεϊνών που επικαλύπτουν τα σήματα από βαλίνη, λευκίνη και ισολευκίνη στο φάσμα NMR με στόχο τη διερεύνηση των επιπέδων των BCAAs στον ΣΔΤ2, στο μεταβολικό σύνδρομο καθώς και τη συσχέτισή τους με το πάχος του έσω-μέσου χιτώνα των καρωτίδων αρτηριών (cIMT), έναν δείκτη υποκλινικής αθηροσκλήρωσης και έναν τεκμηριωμένο προγνωστικό παράγοντα στεφανιαίας νόσου [201].



**Εικ. 26.** NMR signal peaks for the BCAAs in the NMR LipoProfile test spectrum of serum. The signals from the methyl groups on the BCAA overlap the signals that arise from the methyl groups on the lipid molecules contained within lipoprotein particles. Inset: Larger view of NMR spectra from serum spiked with the individual BCAA illustrating the relative positions of the various signature peaks of isoleucine (doublet and a triplet), leucine (multiplet), and valine (two doublets) compared to serum alone. (Ref [201]: J.Wolak-Dinsmore et al, 2018).

Η φασματοσκοπία  $^1\text{H}$ NMR είναι μια ποσοτική, μη επεμβατική τεχνική, που απαιτεί ελάχιστη ή καθόλου προεργασία του δείγματος για τη λήψη του φάσματος η οποία διεκπεραιώνεται συνήθως μέσα σε λίγα λεπτά. Τα παραπάνω πλεονεκτήματα σε συνδυασμό με τη δυνατότητα της άμεσης καταγραφής οποιασδήποτε αλλαγής του μεταβολικού αποτυπώματος του οργανισμού και παράλληλα της ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μεταβολιτών που σχετίζονται με νοσολογικές καταστάσεις και θα μπορούσαν να αποτελέσουν πιθανούς βιοδείκτες, καθιστούν την τεχνική αυτή ως την πλέον κατάλληλη για την ανάλυση του μεταβολικού προφίλ των βιολογικών υγρών [202].

Από τις πρώτες εφαρμογές της φασματοσκοπίας  $^1\text{H}$ NMR στη διάγνωση αποτέλεσαν τα εγγενή μεταβολικά νοσήματα. Ερευνητικές ομάδες κατέγραψαν το μεταβολικό προφίλ των ούρων ασθενών με εγγενή μεταβολικά νοσήματα όπως η νόσος MSUD που χαρακτηριζόταν από τα αυξημένα επίπεδα BCAAs και BCKAs. Καθώς ο επιπολασμός του διαβήτη τύπου 2 φτάνει στα ύψη παγκοσμίως και πλέον αναγνωρίζεται ως μία από τις κύριες απειλές για την ανθρώπινη υγεία, παρατηρείται ένα ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον στην εύρεση πρώιμων βιοδεικτών με τη

διερεύνηση του μεταβολικού προφίλ των ασθενών, στην πιο αποτελεσματική παρακολούθηση της θεραπευτικής αγωγής καθώς και στη διερεύνηση των εμπλεκόμενων με μακρο- και μικροαγγειακών επιπλοκών του διαβήτη βιοχημικούς δρόμους. Ακολουθώντας την εξέλιξη του πεδίου των -omics προσεγγίσεων στις οποίες ανήκει και η μεταβολομική άρχισε να διερευνάται το μεταβολικό προφίλ και σε άλλα νοσήματα όπως νευροεκφυλιστικές παθήσεις καθώς και διάφοροι τύποι καρκίνου. Τέλος όσον αφορά τα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος στα οποία παρατηρούνται μικρές και σποραδικές μελέτες και δεν υπάρχουν αξιόπιστοι διαγνωστικοί δείκτες, αποτελεί επιτακτική ανάγκη η εύρεση βιοδεικτών που θα συμβάλλουν στην πρόληψη, στη διαφορική διάγνωση καθώς και στην αξιόπιστη παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας των θεραπευτικών σχημάτων **(πιν. 1)**.

Authors	Biological fluid	Methodology	Disease	Metabolites
Pontoni et al. 1996	urine	NMR spectroscopy	MSUD	↑BCAAs & BCKAs
Holmes et al. 1997	urine	NMR spectroscopy	2-hydroxyglutaric aciduria	↑2-hydroxyglutaric acid ↓BCAAs, tyrosine, phenylalanine, arginine
			MSUD	↑BCAAs & BCKAs
Pan et al. 2007	urine	NMR spectroscopy	MSUD	↑BCAAs, 2-hydroxy-3-methylvalerate and 2-hydroxyisovalerate
Pulido et al. 2021	urine	NMR spectroscopy	MSUD	3-Hydroxybutyric Acid, 3-Methyl-2-oxovaleric Acid, 2-Hydroxyisovaleric Acid, Alloisoleucine, Isoleucine, 2-Oxoisocaproic Acid (Ketoleucine)
Wurtz et al. 2012	serum	NMR spectroscopy	Insulin Resistance (IR)	Branched-chain and aromatic amino acids, gluconeogenesis intermediates, ketone bodies and fatty acid composition and saturation were associated with HOMA-IR
Margery et al. 2015	serum	NMR spectroscopy	risk of developing diabetes before the prediabetic state	Lipoprotein subclasses, valine, GlycA
Mullner et al. 2021	plasma	NMR spectroscopy	body mass index (lean vs. obese) insulin responses (normal insulin (NI) vs. high insulin (HI)) glucose responses (normal glucose tolerance (NGT) vs. IGT)	<b>Metabolites associated with insulin response level:</b> adolescents with HI ↑ BCAAs and tyrosine, ↓serine, glycine, myo-inositol and dimethylsulfone. <b>Metabolites associated with obesity status:</b> obese adolescents ↑acetylcarnitine, alanine, pyruvate and glutamate, ↓acetate
Bragg et al. 2022	plasma	NMR spectroscopy	T2D risk prediction	↑BCAAs, tyrosine, phenylalanine, alanine, ↓ glutamate and glycine several years prior to T2D diagnosis
Pinto et al. 2015	plasma	NMR spectroscopy	pre- and postdiagnosis gestational diabetes mellitus (GDM)	<b>prediagnosis vs control</b> ↑ valine, pyruvate, ↓proline, urea and 1,5-anhydroglucitol
White et al. 2017	serum	NMR spectroscopy	obese GDM vs obese no-GDM women	↑ BCAAs, phenylalanine, tyrosine, alanine, pyruvate, citrate, acetoacetate
Coco et al. 2019	serum	NMR spectroscopy	non-diabetic subjects treatment-naïve non-complicated T2DM patients T2DM patients with complications in insulin monotherapy	<b>T2DM patients vs non-diabetic:</b> ↓alanine, glutamine, glutamate, leucine, lysine, methionine, tyr and phe BCAAs, lysine, tyrosine levels <b>distinguished complicated patients from patients without complications</b>
Doorn et al. 2006	plasma/urine	NMR spectroscopy	pharmacological effects of thiazolidinediones in T2DM patients	<b>plasma:</b> ↑BCAAs, alanine, Gln, Glu <b>urine:</b> ↑ AAAs ↓ hippurate

Tofte et al. 2020	plasma	NMR spectroscopy	<b>kidney function in people with type 2 diabetes (T2D)</b>	Inverse associations with eGFR were demonstrated for BCAAs & AAAs
Tynkkynen et al. 2018	serum	NMR spectroscopy	<b>risk of incident dementia and Alzheimer's disease</b>	BCAAs were associated with decreased Alzheimer's disease risk
Hao et al. 2017	serum	NMR spectroscopy	<b>Primary biliary cholangitis (PBC)</b>	<b>PBC vs healthy:</b> ↑ 2-oxoisoleucine, glucose, 3-hydroxyisovalerate, glycerol, glutamate, tyrosine, alanine, 3-hydroxyisobutyrate, isoleucine, inosine and ↓ valine, phenylalanine, histidine, citrate, ornithine, taurine, carnitine, TMAO
Embade et al. 2016	serum	NMR spectroscopy	<b>chronic hepatitis C virus (HCV)</b>	<b>cirrhotic vs non fibrotic patients:</b> ↓ BCAAs, choline, glutamine, acetoacetate, histidine ↑ glucose, citrate
Wang et al. 2014	plasma	NMR spectroscopy	<b>Autoimmune hepatitis (AIH)</b>	<b>AIH vs healthy control:</b> ↑ lactate, pyruvate, citrate, ketone bodies, AAAs, glucose ↓ BCAAs, alanine
Barba et al. 2008	serum	NMR spectroscopy	<b>exercise-induced myocardial ischemia in patients with suspected coronary artery disease</b>	↑ glucose, lactate, valine, leucine, isoleucine and methyl and methylene signals from lipids in exercise induced ischaemia
Zhang et al. 2021	plasma	NMR spectroscopy	<b>coronary heart disease patients with and without T2DM</b>	<b>CHD patients with diabetes vs CHD patients without T2D</b> ↑ leucine, valine, fumarate, tyrosine, and phenylalanine
Gao et al. 2009	serum	NMR spectroscopy	<b>Hepatocellular carcinoma</b>	↑ acetate, N-acetylglycoproteins, Gln, glycerol, 2-ketoglutarate, 1-methylhistidine, Phe, pyruvate, Tyr ↓ acetoacetate, Cho, Val
Rocha et al. 2011	plasma	NMR spectroscopy	<b>Lung cancer</b>	↑ lactate, pyruvate ↓ acetate, alanine, citrate, formate, Gln, His, methanol, Tyr, Val
Ouyang et al. 2011	serum	NMR spectroscopy	<b>Pancreatic cancer</b>	↑ isoleucine, leucine, creatinine ↓ 3-hydroxybutyrate, 3-hydroxyisovalerate, lactate, TMAO

**Πιν.1.** Μεταβολομικές μελέτες με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR, όπου μελετάται η διαταραχή του καταβολισμού των BCAAs σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. (↑ αυξημένα επίπεδα, ↓ μειωμένα επίπεδα)

## 1.6 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

### 1.6.1 Βασικές αρχές

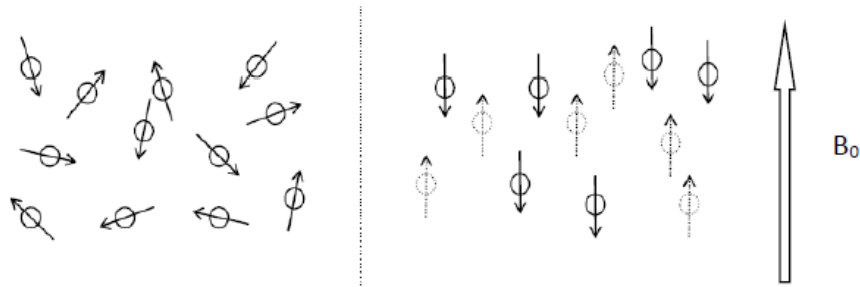
Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear magnetic resonance, NMR) βασίζεται στη διέγερση μαγνητικών πυρήνων που βρίσκονται σε ισχυρό και ομογενές μαγνητικό πεδίο.

Ο πυρήνας των ατόμων χαρακτηρίζεται από το πυρηνικό spin που είναι η συνιστώσα των spin των πρωτονίων και των νετρονίων του και τη στροφορμή που είναι το αποτέλεσμα της περιστροφής γύρω από τον άξονά του. Το πυρηνικό spin δίνεται σε πολλαπλάσια του  $h/2\pi$  (όπου  $h$  η σταθερά του Planck) και χαρακτηρίζεται από τον κβαντικό αριθμό πυρηνικού spin  $I$  ( $I=0,1/2,1,3/2\dots$ ). Επειδή ο πυρήνας είναι φορτισμένος, η περιστροφή γύρω από τον άξονά του δημιουργεί ένα μαγνητικό δίπολο, του οποίου το μέγεθος εκφράζεται από την πυρηνική μαγνητική ροπή  $\mu$  [203] :

$$\mu = \frac{\gamma h [I(I+1)]^{1/2}}{2\pi}$$

όπου η σταθερά  $\gamma$  καλείται γυρομαγνητικός λόγος και εξαρτάται από τη φύση του πυρήνα.

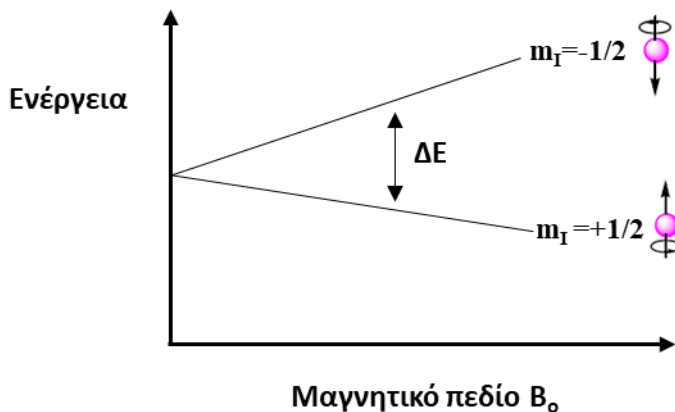
Τα διανύσματα των μαγνητικών ροπών προσανατολίζονται, απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, κατά τυχαίο τρόπο. Ένα όμως ομογενές εξωτερικό μαγνητικό πεδίο  $B_0$ , εξαναγκάζει τις πυρηνικές μαγνητικές ροπές να διαταχθούν είτε παράλληλα είτε αντιπαράλληλα προς το εξωτερικό πεδίο [203, 204] (εικ.27).



**Εικ. 27** Προσανατολισμός των διανυσμάτων των πυρηνικών μαγνητικών διπολικών ροπών  $\mu$   
α) απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, β) παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου  $B_0$

Οι κατευθύνσεις του ανύσματος της μαγνητικής ροπής,  $\mu$ , καθορίζονται από τον μαγνητικό κβαντικό αριθμό του spin,  $m_I$ . Για  $I = 1/2$  (π.χ. πρωτόνιο), ο  $m_I$  παίρνει δύο τιμές  $+1/2$  (η μαγνητική ροπή έχει την ίδια κατεύθυνση με το πεδίο  $B_0$ ) και  $-1/2$  (η μαγνητική ροπή έχει την

αντίθετη κατεύθυνση με το πεδίο  $B_0$ ). Οι δύο προσανατολισμοί του ανύσματος της μαγνητικής ροπής ορίζουν δύο ενεργειακές στάθμες με διαφορετική ενέργεια (εικ.28).



Εικ. 28 Στάθμες ενέργειας πυρήνα  $^1\text{H}$  ( $I=1/2$ ) σε μαγνητικό πεδίο  $B_0$

Η μετάβαση από την χαμηλότερη προς την υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση πραγματοποιείται με την απορρόφηση ενέργειας γνωστή ως ενέργεια διέγερσης, η οποία είναι ίση με την ενεργειακή διαφορά των δυο καταστάσεων. Η διαφορά ενέργειας  $\Delta E$  δίνεται από τη σχέση:

$$\Delta E = h\nu_0 \quad (1)$$

όπου  $\nu_0$  = συχνότητα μεταπτωτικής κίνησης ή συχνότητα Larmor που είναι μοναδική για κάθε πυρήνα και δίνεται από τη σχέση:

$$\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (2)$$

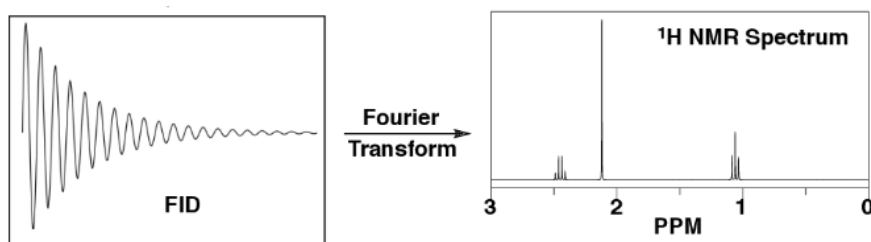
Όταν ο πυρήνας εισέλθει στο μαγνητικό πεδίο  $B_0$ , το πεδίο αλληλεπιδρά με τη μαγνητική ροπή  $\mu$  και αναπτύσσεται μια ροπή στρέψης, η οποία τείνει να ευθυγραμμίσει τη  $\mu$  με το πεδίο  $B_0$ . Τελικά η  $\mu$ , υφιστάμενη τα αποτελέσματα δύο δυνάμεων που η μία τείνει να την ευθυγραμμίσει με το  $B_0$  και η άλλη λόγω της στροφορμής θέλει τον πυρήνα να αυτοπεριστρέφεται, εκτελεί γυροσκοπική (μεταπτωτική) κίνηση γύρω από το  $B_0$  με κυκλική συχνότητα  $\nu_0$  (συχνότητα Larmor). Επομένως η σχέση 1 παίρνει τη μορφή:

$$\Delta E = h\nu_0 = h \frac{\gamma B_0}{2\pi}$$



Στη φασματοσκοπία NMR, η αποδιέγερση του πυρήνα και η επιστροφή στη θεμελιώδη ενεργειακή κατάσταση δεν είναι αυθόρμητη, αλλά εξαναγκασμένη και γίνεται με δύο διεργασίες. Κατά την πρώτη διεργασία, την αποδιέγερση spin-πλέγμα, η αποβολή της ενέργειας πραγματοποιείται με την αλληλεπίδραση των διεγερμένων πυρήνων με γειτονικά μαγνητικά πεδία και χαρακτηρίζεται από τον spin-lattice χρόνο αποκατάστασης  $T_1$  (spin-lattice relaxation  $T_1$ ). Κατά τη δεύτερη διεργασία, η οποία ονομάζεται αποδιέγερση spin-spin γίνεται ανταλλαγή ενέργειας μεταξύ διεγερμένων πυρήνων και πυρήνων που βρίσκονται στη θεμελιώδη κατάσταση και χαρακτηρίζεται από το spin-spin χρόνο αποκατάστασης  $T_2$  (spin-spin relaxation  $T_2$ ) [203, 204].

Για να διεγερθούν οι πυρήνες πρέπει να απορροφήσουν ενέργεια από κάποια πηγή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Η διέγερση των πυρήνων γίνεται με την εφαρμογή ενός δεύτερου μαγνητικού πεδίου  $B_1$ . Ο ραδιοπομπός τοποθετείται κατά μήκος του άξονα  $x$ , έτσι ώστε το πεδίο  $B_1$  να εφαρμόζεται κάθετα προς το  $B_0$ . Με τη διακοπή του παλμού τα spin αποδιεγείρονται και το σήμα ελαττώνεται εκθετικά σε συνάρτηση με το χρόνο αποδίδοντας την ελεύθερη επαγωγική απόσβεση (Free Induction Decay-FID) και γίνεται καταγραφή του χρονικού σήματος στον Η/Υ. Η διεργασία παλμός-καταγραφή του χρονικού σήματος επαναλαμβάνεται μέχρι να ληφθεί φάσμα ικανοποιητικού λόγου σήματος προς θόρυβο (signal/noise S/N). Το συνολικό χρονικό σήμα μετασχηματίζεται με τη μαθηματική συνάρτηση Fourier σε σήμα συχνοτήτων, το φάσμα NMR [203, 204] (εικ.29).

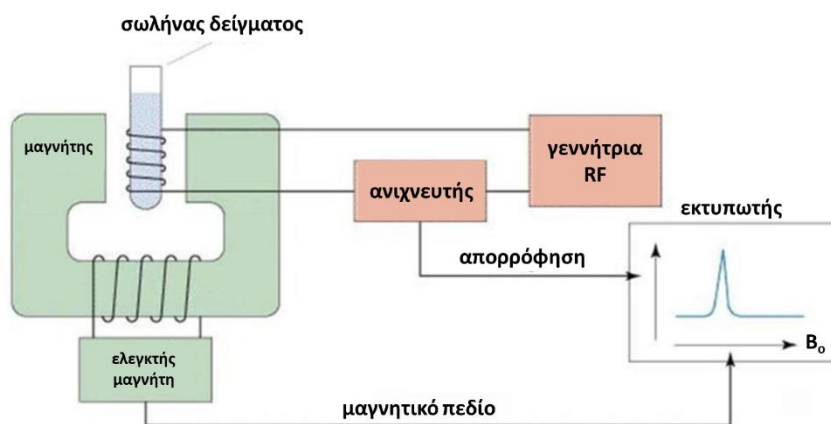


**Εικ. 29** Μετασχηματισμός *Fourier* του χρονικού σήματος

### 1.6.2 Φασματοόμετρο NMR – λήψη φάσματος

Ο απλούστερος τύπος φασματομέτρου NMR αποτελείται από τα εξής μέρη:

- Ένα σταθερό μαγνήτη με ευαίσθητο ελεγκτή για την παραγωγή μαγνητικού πεδίου ακριβείας.
- Έναν πομπό ραδιοσυχνοτήτων για την παραγωγή των παλμών RF.
- Το πηνίο που είναι περιτυλιγμένο γύρω από το δείγμα, τροφοδοτείται με ισχύ ραδιοσυχνοτήτων (RF) και χρησιμοποιείται για τη μετάπτωση του διανύσματος της μαγνήτισης και την ανίχνευση του σήματος μετάπτωσης.
- Έναν ανιχνευτή για τη μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος.
- Έναν καταγραφέα για τη σχεδίαση του γραφήματος των ευρημάτων του ανιχνευτή συναρτήσει του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου [205] (εικ.30).



**Εικ. 30** Απλοποιημένο σχηματικό διάγραμμα φασματογράφου NMR

Για τη λήψη του φάσματος το δείγμα υπό μορφή διαλύματος σε δευτεριωμένο διαλύτη φέρεται σε ειδικό γυάλινο σωληνάριο με ομοιογενή τοιχώματα και τοποθετείται σε ένα μεταλλικό κάθετο σωλήνα που βρίσκεται μεταξύ των πόλων του μαγνήτη. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι χημικά αδρανείς, μαγνητικά ισότροποι και να στερούνται υδρογόνων. Γι' αυτό συνήθως επιλέγονται οι δευτεριωμένοι διαλύτες για να μην επέρχεται επικάλυψη των σημάτων συντονισμού από αυτά των πρωτονίων του διαλύτη.

Ως πρότυπες ενώσεις αναφοράς χρησιμοποιούνται το τετραμεθυλοπυρίτιο,  $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$  (TMS) ή το άλας  $(\text{C}_6\text{H}_9\text{D}_4\text{NaO}_2\text{Si})$  (TSP). Είναι ενώσεις χημικά αδρανείς, αναμειγνύονται εύκολα

με τους περισσότερους οργανικούς διαλύτες και συντονίζονται σε μικρότερες συχνότητες σε σχέση με τις περισσότερες οργανικές ενώσεις.

Η ακτινοβολία με παλμούς ραδιοσυχνοτήτων (συνήθως παλμός  $90^\circ$ ) εκπέμπεται για ένα μικρό χρονικό διάστημα της τάξεως των  $\mu\text{sec}$ , από ένα πηνίο που είναι περιτυλιγμένο γύρω από το δείγμα και απορροφάται από όλους τους παρόντες πυρήνες. Όλα τα πρωτόνια διεγείρονται ταυτόχρονα και μετά τον παλμό, το δείγμα εκπέμπει σήματα για κάποιο χρονικό διάστημα ενώ οι διάφορες μεταβατικές καταστάσεις επανέρχονται στην κατάσταση ισορροπίας. Το προκύπτον σήμα που καταγράφεται στο πηνίο λήψης με τη μορφή συνάρτησης χρόνου αποτελείται από την εναπόθεση όλων των σημάτων συντονισμού του δείγματος που όπως προαναφέρθηκε μέσω του μετασχηματισμού Fourier λαμβάνει τη μορφή του γνωστού φάσματος.

Από τα φάσματα NMR διαφόρων πυρήνων ξεχωρίζουν τα φάσματα πυρήνων υδρογόνου ( $^1\text{H}$ NMR) και πυρήνων άνθρακα-13 ( $^{13}\text{C}$ NMR) για την ταυτοποίηση οργανικών δομών καθώς το υδρογόνο και ο άνθρακας αποτελούν τα κύρια συστατικά των οργανικών ενώσεων. Και οι δύο πυρήνες έχουν  $spin = \pm 1/2$  με τη φυσική αφθονία του  $^1\text{H}$  να είναι 99% και ο  $^{13}\text{C}$  είναι το μοναδικό ισότοπο του άνθρακα με πυρηνικό σπιν.

### 1.6.3 Χαρακτηριστικά του φάσματος NMR

Μελετώντας το φάσμα NMR μπορούμε να διευκρινίσουμε τον αριθμό, το είδος και τις σχετικές θέσεις ορισμένων ατόμων σε ένα μόριο [205, 206]:

- ✓ Ο αριθμός των διαφορετικών απορροφήσεων (σήματα ή κορυφές) δείχνει πόσα διαφορετικά είδη πρωτονίων υπάρχουν.
- ✓ Ο βαθμός προστασίας που φαίνεται από τις απορροφήσεις αυτές φανερώνει την ηλεκτρονική δομή του μορίου γύρω από κάθε είδος πρωτονίου.
- ✓ Οι εντάσεις των σημάτων φανερώνουν τον αριθμό των πρωτονίων κάθε τύπου.
- ✓ Η σχάση των σημάτων δίνει πληροφορίες σχετικά με άλλα γειτονικά πρωτόνια.

#### *Αριθμός των σημάτων*

Ο αριθμός των σημάτων NMR αντιστοιχεί στον αριθμό των διαφορετικών ειδών πρωτονίων που υπάρχουν σε ένα μόριο. Τα πρωτόνια που βρίσκονται σε παρόμοιο χημικό περιβάλλον και υφίστανται την ίδια προστασία, εμφανίζουν την ίδια χημική μετατόπιση και θεωρούνται ότι είναι χημικά ισοδύναμα. Αντίθετα, μόρια τα οποία περιέχουν ομάδες

πρωτονίων τα οποία είναι χημικά διακριτά μπορεί να οδηγήσουν σε μια κορυφή απορρόφησης για κάθε ομάδα.

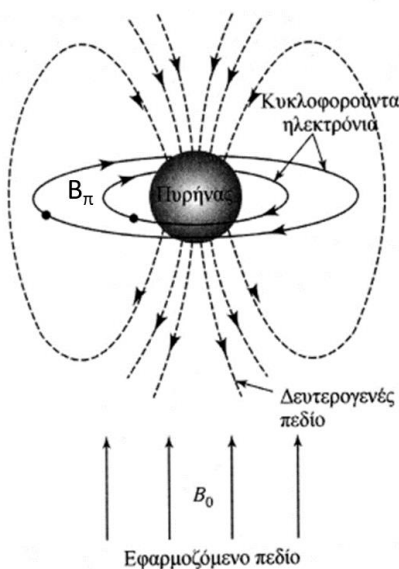
### *Εμβαδά κορυφών πρωτονίων*

Το εμβαδό κάτω από μια κορυφή στο φάσμα NMR είναι ανάλογο προς τον αριθμό των πρωτονίων που προκαλούν το σήμα. Επομένως για την ποσοτική σύγκριση των κορυφών διαφόρων πρωτονίων ισχύει ότι όσα περισσότερα πρωτόνια διεγείρονται τόσο μεγαλύτερο είναι το ποσό της ενέργειας που απορροφάται και συνεπώς είναι μεγαλύτερη η περιοχή κάτω από την κορυφή απορρόφησης.

### *Χημική μετατόπιση, η παράμετρος $\delta$*

Τη χημική μετατόπιση προκαλούν μικρά μαγνητικά πεδία, τα οποία δημιουργούνται από τα ηλεκτρόνια καθώς αυτά κινούνται γύρω από τους πυρήνες. Έτσι ο πυρήνας υφίσταται τη λεγόμενη ηλεκτρονική προστασία, που είναι τόσο μεγαλύτερη, όσο μεγαλύτερη είναι η ηλεκτρονική πυκνότητα γύρω από τον πυρήνα υδρογόνου. Για το λόγο αυτό οι συχνότητες Larmor διαφόρων πυρήνων διαφοροποιούνται ανάλογα με το χημικό τους περιβάλλον. Αυτή η διαφοροποίηση στην συχνότητα συντονισμού των πυρήνων, ονομάζεται χημική μετατόπιση  $\delta$ .

Η ένταση του πεδίου  $B_{\pi}$  που πραγματικά εφαρμόζεται στον πυρήνα δίνεται από την εξίσωση:  $B_{\pi} = B_0 (1 - \sigma)$ , όπου  $B_0$  είναι η ένταση του πεδίου που εφαρμόζεται στον ελεύθερο πυρήνα και  $\sigma$  είναι ο παράγοντας χημικής μετατόπισης ή η σταθερά πυρηνικής προστασίας (nuclear shielding constant) (**εικ.31**).



**Εικ. 31** Ηλεκτρονική προστασία του πυρήνα

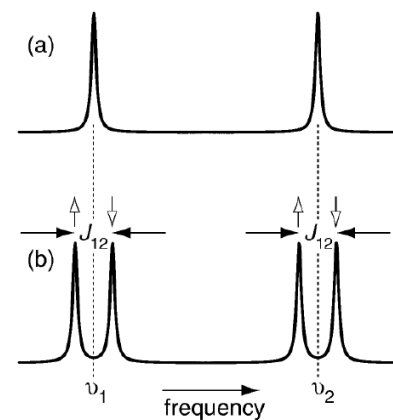
Για τη δημιουργία κλίμακας που είναι ανεξάρτητη από την ένταση του εφαρμοζόμενου πεδίου καθορίστηκε η παράμετρος  $\delta$  (ppm, parts per million) :

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

όπου  $\Delta_0$  είναι η βασική συχνότητα λειτουργίας του οργάνου NMR και  $\Delta$  η διαφορά συχνότητας συντονισμού σε Hz μεταξύ του πυρήνα που μελετάται και των πρωτονίων μιας πρότυπης ένωσης.

### Σύζευξη spin-spin (*spin-spin coupling*)

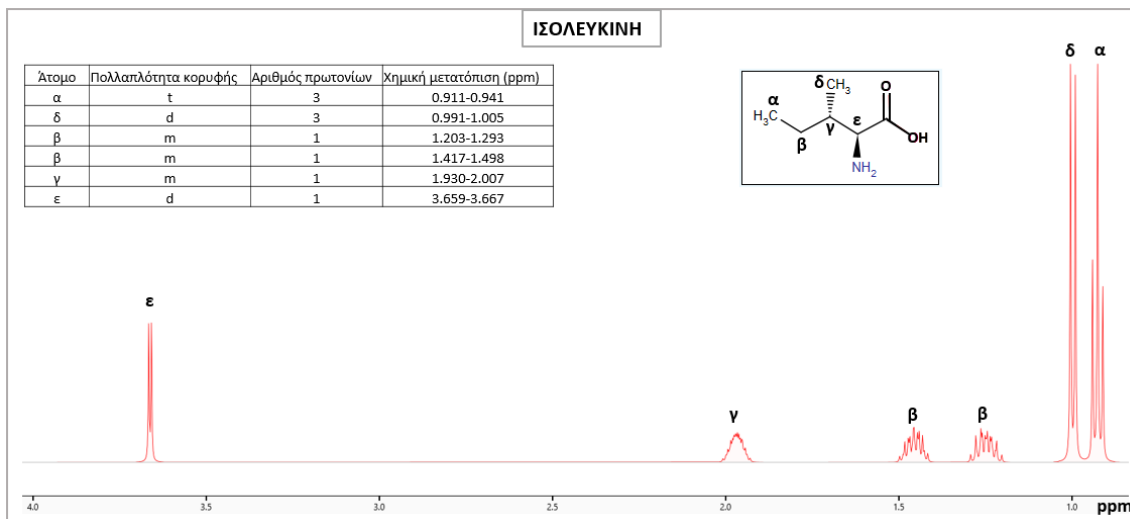
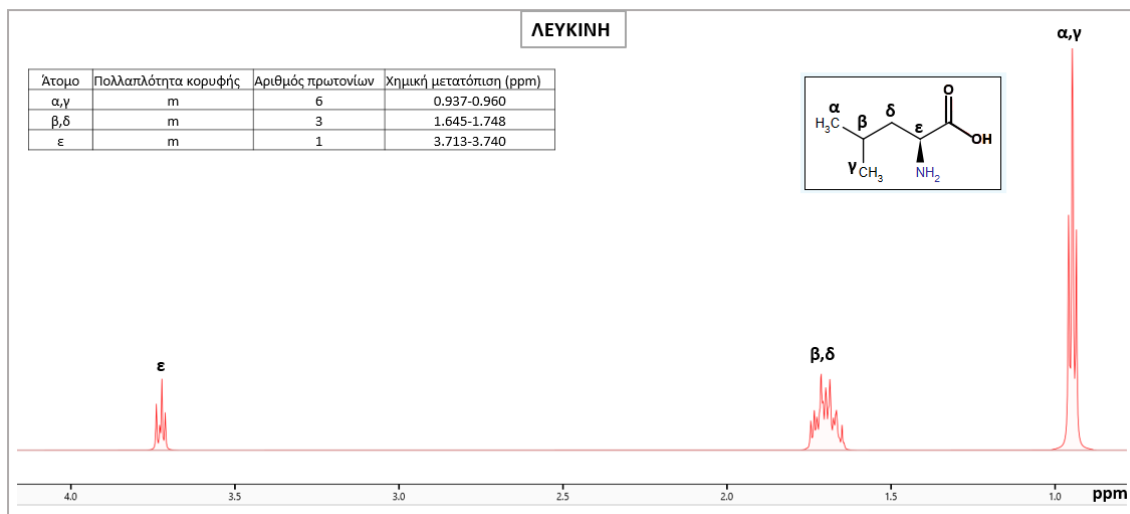
Τα σήματα συντονισμού πρωτονίων που γειτνιάζουν με άλλα πρωτόνια ή άλλους μαγνητικούς πυρήνες εμφανίζονται με τη μορφή πολλαπλών κορυφών που έχουν ορισμένη κανονικότητα και συμμετρία. Η πολλαπλότητα αυτή των σημάτων συντονισμού καλείται σύζευξη spin-spin (*spin-spin coupling*) και οφείλεται στη μέσω των δεσμών αλληλεπίδραση με τα spin των γειτονικών μαγνητικών πυρήνων. Η απόσταση σε Hz μεταξύ των επιμέρους κορυφών που συνιστούν μία πολλαπλή κορυφή ονομάζεται σταθερά σύζευξης  $J$  και είναι ανεξάρτητη από την ένταση του πεδίου  $B_0$  (εικ.32).

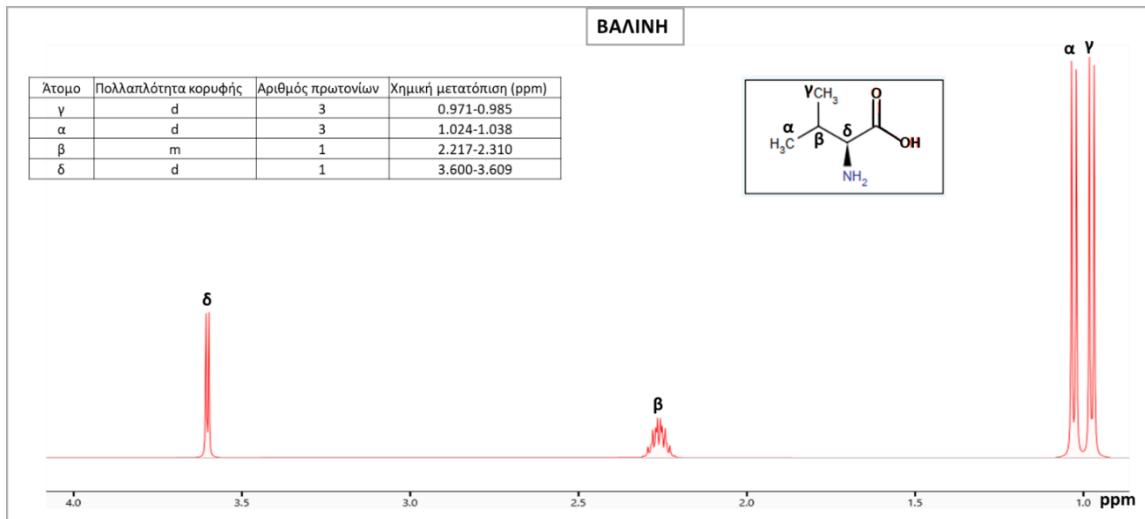


**Εικ.32** Φάσμα (a) από ασύζευκτα και (b) συζευγμένα πρωτόνια.

1.6.4 Πρότυπα φάσματα  $^1\text{H}$ NMR των BCAAs

Τα πρότυπα  $^1\text{H}$ NMR φάσματα των τριών αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας προέρχονται από τη βιβλιοθήκη του προγράμματος Chenomx, η λήψη των οποίων έγινε σε φασματογράφο 500 MHz, με την ακολουθία noesy (εικ.33).

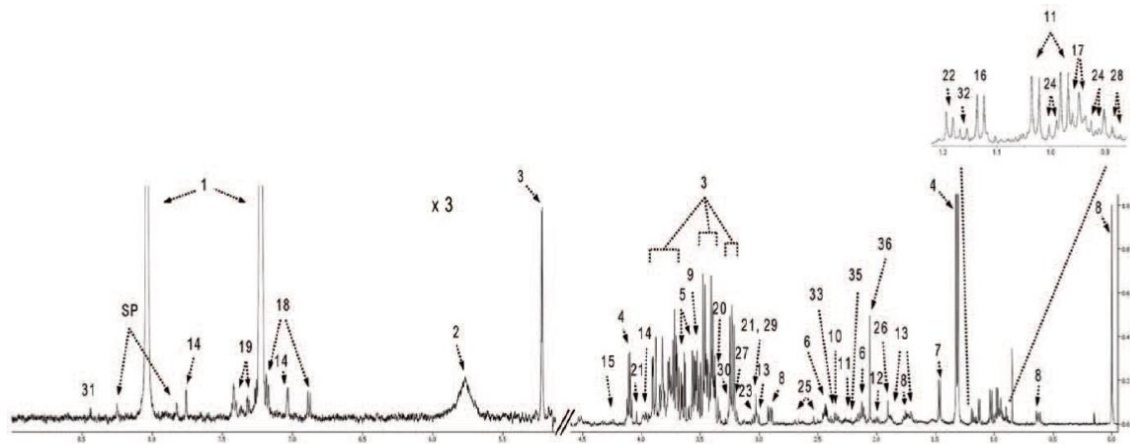




**Εικ.33:** Πρότυπα  $^1\text{H-NMR}$  φάσματα των BCAAs

### 1.6.5 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ ορού του αίματος υγιούς ατόμου

Με τη χρήση φασματογράφου NMR 500MHz, σε φιλτραρισμένο ορό υγιών ατόμων λαμβάνουμε το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα [207] με τους κύριους μεταβολίτες μικρού μοριακού βάρους (**εικ.34**):

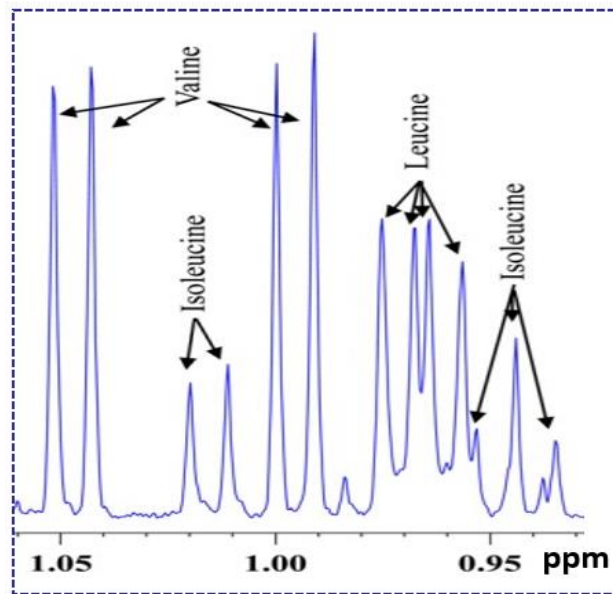


**Εικ.34:** Typical 500 MHz  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of healthy human serum.

Numbers indicate the following metabolites: 1,imidazole; 2,urea; 3, D-glucose; 4, L-lactic acid; 5, glycerol; 6, L-glutamine; 7, L-alanine; 8, DSS; 9, glycine; 10, L-glutamic acid; 11, L-valine; 12, L-proline; 13, L-lysine; 14, L-histidine; 15, L-threonine; 16, propylene glycol; 17, L-leucine; 18, L-tyrosine; 19, L-phenylalanine; 20, methanol; 21,creatinine; 22, 3-hydroxybutyric acid; 23, ornithine; 24, L-isoleucine; 25, citric acid; 26, acetic acid 27, carnitine; 28, 2-hydroxybutyric acid; 29, creatine; 30, betaine; 31, formic acid; 32, isopropyl alcohol; 33, pyruvic acid; 34, choline; 35, acetone; 36, glycerol (**Ref [207]:** Psychogios N et al, 2011).

Οι κορυφές από λευκίνη, ισολευκίνη και βαλίνη εντοπίζονται στην περιοχή του φάσματος από 0.93-1.04 ppm. Μετά από ποσοτικοποίηση των BCAAs σε μια ομάδα υγίων ατόμων, η συγκέντρωση της λευκίνης βρέθηκε  $98.7 \pm 11.5 \mu\text{M}$  (βιβλιογραφική τιμή  $123 \mu\text{M}$  με εύρος (98-144)), της ισολευκίνης  $60.7 \pm 18.6 \mu\text{M}$  (βιβλιογραφική τιμή  $62 \mu\text{M}$  με εύρος (48-76)) και της βαλίνης  $212.3 \pm 61.3 \mu\text{M}$  (βιβλιογραφική τιμή  $233 \mu\text{M}$  με εύρος (190-276)) [207].

Στην **εικόνα 35** απεικονίζονται οι χημικές μετατοπίσεις των BCAAs σε φάσμα ορού  $^1\text{H}$  NMR 800 MHz, υγιούς ατόμου. Τα σήματα συντονισμού των συγκεκριμένων αμινοξέων εντοπίζονται στην περιοχή του φάσματος από 0.93-1.04 ppm [208].



**Εικ.35:** Χημική μετατόπιση των BCAAs σε φάσμα ορού  $^1\text{H}$ NMR 800 MHz υγιούς ατόμου εστιασμένο στην περιοχή 0.93-1.05 ppm (Ref [208]: Nagana Gowda GA et al, 2014)

Οι κύριες κορυφές που χρησιμοποιούνται στην ποσοτικοποίηση των BCAAs είναι για τη λευκίνη η πολλαπλή κορυφή στα 0.937-0.960 ppm, για την ισολευκίνη η τριπλή και η διπλή κορυφή στα 0.911-0.941 ppm και 0.991-1.005 ppm αντίστοιχα και για τη βαλίνη οι διπλές κορυφές στα 0.971-0.985 ppm και στα 1.024-1.038 ppm.



## 1.7 Σκοπός της διδακτορικής διατριβής

Προκειμένου να μελετηθεί ο παθοφυσιολογικός/παθογενετικός ρόλος των BCAAs, η πιθανή προγνωστική και/ή διαγνωστική τους αξία καθώς και η συσχέτισή τους με την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπευτική αγωγή, στην παρούσα μελέτη θα πραγματοποιηθούν:

1. Καταγραφή του μεταβολικού προφίλ των βιολογικών υγρών (ορός/πλάσμα αίματος, ούρα) ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2, Σακχαρώδη Διαβήτη κύησης, Διαβητική Νεφροπάθεια, Αυτοάνοσα Νοσήματα του Ήπατος, Χρόνιες Ιογενείς Ηπατίτιδες B & C καθώς και υγιών ατόμων με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου ( $^1\text{H}$ NMR).
2. Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση από το φάσμα NMR των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας και μεταβολιτών που συσχετίζονται με τον καταβολισμό τους.
3. Συσχέτιση των επιπέδων των BCAAs και των ενδιάμεσων του καταβολισμού τους με τις ανωτέρω νοσολογικές οντότητες και αξιολόγηση του ρόλου τους ως πιθανοί βιοδείκτες.

## 2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Πληθυσμός της μελέτης και συλλογή των δειγμάτων αίματος /ούρων

Για τη συγκεκριμένη μελέτη επιλέχτηκαν δείγματα ορού και πλάσματος του αίματος /ούρων που ανήκαν στις παρακάτω ομάδες ασθενών (πιν. 2):

Νοσολογικές καταστάσεις/υγιείς	Αριθμός ασθενών/υγιών	Βιολογικό υγρό
Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2	50/50	Ορός αίματος / Ούρα
Διαβητική Νεφροπάθεια	22/22	Ορός αίματος / Ούρα
Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης	62	Ορός αίματος
Αυτοάνοση Ηπατίτιδα	129	Πλάσμα
Πρωτοπαθή Χολική Χολαγγειίτιδα	167	Πλάσμα
Πρωτοπαθή Σκληρυντική Χολαγγειίτιδα	45	Πλάσμα
Χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες B & C	101	Πλάσμα
Υγιή άτομα	53	Ορός αίματος/ Πλάσμα / Ούρα
Φυσιολογική κύηση	77	Ορός αίματος

**Πιν. 2:** Πληθυσμός της μελέτης

Οι ομάδες καθώς και τα βασικά κριτήρια επιλογής του πληθυσμού της μελέτης ήταν τα ακόλουθα:

1. 50 ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2 (ΣΔΤ2) (HbA1c >7%), που παρακολουθούνται στο Διαβητολογικό Ιατρείο της Β' Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (ΠΓΝΙ) και βρίσκονται υπό θεραπευτική αγωγή με μετφορμίνη, στους οποίους χορηγήθηκε δαπαγλιφλοζίνη (10 mg ημερησίως για 3 μήνες) (ορός & ούρα).
2. 25 ασθενείς με ΣΔΤ2 χωρίς επιπλοκές και 22 ασθενείς που εμφάνισαν Διαβητική Νεφροπάθεια (ΔΝ) (Αλβουμίνη ούρων =  $273.7 \pm 65.1$  mg/g κρεατινίνης) 3 χρόνια μετά τη συλλογή του δείγματος (ορός & ούρα).
3. 77 έγκυες γυναίκες με φυσιολογική κύηση στην 26-28<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης και 62 γυναίκες με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης (ΣΔΚ) σύμφωνα με τα εξής κριτήρια: επίπεδα γλυκόζης ορού: νηστείας  $\geq 92$  mg/dL,  $\geq 180$  mg/dl 1 ώρα μετά και  $\geq 153$  mg/dl 2 ώρες μετά τη χορήγηση 75 g γλυκόζης.
4. 341 ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος και 101 ασθενείς με χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες που παρακολουθούνται στο Ηπατολογικό Ιατρείο της

Παθολογικής Κλινικής & Ομώνυμου Ερευνητικού Εργαστηρίου της Ιατρικής Σχολής  
Λάρισας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας:

- I. 50 ασθενείς με Αυτοάνοση Ηπατίτιδα ΑΗ (Autoimmune hepatitis, AIH) πριν οποιαδήποτε θεραπεία και 79 ασθενείς με AIH κατά τη διάρκεια ανοσοκατασταλτικής αγωγής.
  - II. 72 ασθενείς με Πρωτοπαθή Χολική Χολαγγειίτιδα ΠΧΧ (Primary Biliary Cholangitis, PBC), κατά τη διάγνωση (αυξημένα χολοστατικά ένζυμα, παρουσία αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων AMA τίτλος  $\geq 1:40$ , ή/και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά συμβατά με ΠΧΧ) και 95 ασθενείς με ΠΧΧ μετά την έναρξη θεραπείας με ουρσοδεοξυχολικό οξύ, UDCA.
  - III. 9 ασθενείς με Πρωτοπαθή Σκληρυντική Χολαγγειίτιδα ΠΣΧ (Primary Sclerosing Cholangitis, ΠΣΧ) πριν και 36 ασθενείς με ΠΣΧ μετά τη χορήγηση UDCA.
  - IV. 101 ασθενείς με χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες (55 ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β (chronic hepatitis B virus, HBV) και 46 ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C (chronic hepatitis C virus, HCV).
5. 53 υγιή άτομα:
- ✓ ηλικία πάνω από 21 έτη
  - ✓ δείκτη μάζας σώματος (Body Mass Index) μεταξύ 18 και 30
  - ✓ χωρίς συστηματική φαρμακευτική αγωγή
  - ✓ τα επίπεδα τιμών στα πλαίσια ενός βιοχημικού (γλυκόζη, ουρία, κρεατινίνη, τριγλυκερίδια, ολική-, HDL-, LDL-χοληστερόλη, αλβουμίνη, ηπατικά ένζυμα, θυρεοειδοτρόπος ορμόνη TSH, φερριτίνη, ηλεκτρολύτες, ειδικό προστατικό αντιγόνο PSA για τους άντρες), αιματολογικού ελέγχου (αιματοκρίτης, αιμοσφαιρίνη, αριθμός αιμοπεταλίων, λευκών και ερυθρών κυττάρων), τα επίπεδα της HbA1c καθώς και η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) ήταν εντός του εύρους των τιμών αναφοράς.

Τα κριτήρια αποκλεισμού ήταν η υπέρταση, ο σακχαρώδης διαβήτης, η εμφάνιση κάποιας οξείας νόσου σε διάστημα 1 εβδομάδας πριν από τη συλλογή των δειγμάτων, η ηπατική ή νεφρική νόσος, νεοπλασία, θυρεοειδής και η εφαρμογή θεραπευτικού σχήματος κατά τη διάρκεια των προηγούμενων 2-3 μηνών με πιθανές ηπατοτοξικές ή νεφροτοξικές παρενέργειες. Από τα άτομα αυτά ζητήθηκε να ακολουθήσουν 12ωρη νηστεία, να αποφύγουν

τη λήψη οποιονδήποτε φαρμάκων (συμπεριλαμβανομένων και μη συνταγογραφούμενων ευρείας χρήσεως) καθώς και την κατανάλωση οινοπνεύματος 24 ώρες πριν τη δειγματοληψία.

Σε όλες τις ομάδες διεξήχθη βιοχημικός και αιματολογικός έλεγχος. Τα επίπεδα γλυκόζης, λιπιδίων, οι υπόλοιπες εξετάσεις του βιοχημικού ελέγχου στον ορό καθώς και η κρεατινίνη ούρων προσδιορίστηκαν με τα καθιερωμένα πρωτόκολλα στους αναλυτές του Βιοχημικού (Κλινικής Χημείας) Εργαστηρίου του Π.Γ.Ν.Ι, τον βιοχημικό αναλυτή Beckman AU5810 (Beckman Coulter, Brea, California) και τον ανοσοενζυμικό αναλυτή Beckman Dxi800 (Beckman Coulter, Brea, California). Η LDL-χοληστερόλη υπολογίστηκε με τον τύπο Friedewald σε δείγματα με τριγλυκερίδια < 400 mg/dl. Η HbA1c μετρήθηκε με χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με στήλη ιοντοανταλλαγής (Variant II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Τα δείγματα ολικού αίματος αφού συλλέχθηκαν μετά από 12ωρη νηστεία σε ειδικά σωληνάρια αιμοληψίας (BD Vacutainer με GEL SST II Advance 5.0mL & BD Vacutainer Plus 3.6mg EDTA K2E 2.0mL Tubes, Plymouth, UK) παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για χρονικό διάστημα 15-30 λεπτών για να ολοκληρωθεί η διαδικασία της πήξης. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στις 3000 στροφές ανά λεπτό. Αντίστοιχα τα δείγματα ούρων φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 2000 στροφές ανά λεπτό για την απομάκρυνση του ιζήματος. Συλλέχθηκε το διαυγές υπερκείμενο των παραπάνω βιολογικών δειγμάτων, μεταφέρθηκε σε πλαστικά σωληνάκια τύπου Cryovials (CryoPure 1.0 & 2.0mL, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany) και καταψύχθηκε σε θερμοκρασία -80°C μέχρι το επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας.

## 2.2 Διήθηση υπό φυγοκέντρηση (υπερδιήθηση) ορού/πλάσματος του αίματος

Καθώς τα δείγματα ορού/πλάσματος είναι πλούσια σε μακρομόρια (πρωτεΐνες, λιποπρωτεΐνες) τα οποία παρεμποδίζουν τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των μεταβολιτών μικρού μοριακού βάρους στη φασματοσκοπία NMR, πριν τη λήψη των φασμάτων πραγματοποιήθηκε διήθηση υπό φυγοκέντρηση (υπερδιήθηση) του ορού/πλάσματος. Για την απομάκρυνση των μακρομορίων με υπερδιήθηση του ορού/πλάσματος, χρησιμοποιήθηκαν τα φίλτρα Amicon® Ultra-2 Centrifugal Filter Devices (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) (εικ. 36). Με τα συγκεκριμένα φίλτρα επιτυγχάνεται ταχεία υπερδιήθηση διαλυμάτων, καθώς επιτρέπουν τη διήθηση συστατικών μεγέθους έως 3kDa. Με βάση το μοριακό βάρος των μεταβολιτών ο χρόνος φυγοκέντρησης του δείγματος καθορίστηκε στα 60 min. Η φυγοκέντρηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε φυγόκεντρο υψηλής ταχύτητας με

ελεγχόμενη θερμοκρασία θαλάμου (Centrifuge 5804 R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) και με κεφαλή ταλαντευόμενων υποδοχέων (swinging bucket rotor).



**Εικ. 36:** Φίλτρα Amicon Ultra-2 Centrifugal Filter Devices (for volumes up to 2 mL)

### Υλικά-Αντιδραστήρια

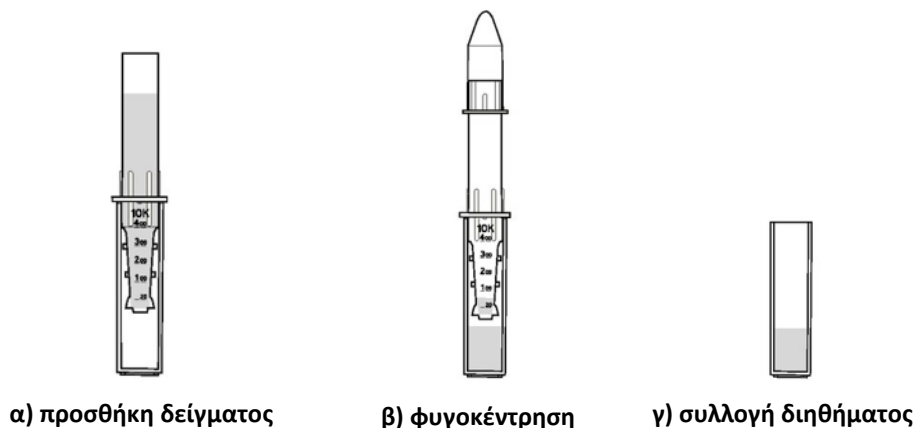
- ✓ Φίλτρα χωρητικότητας 2mL (Amicon Ultra-2 Centrifugal Filter Devices for volumes up to 2 mL, για διήθηση συστατικών έως 3kDa)
- ✓ Πιπέτες: 200-1000 µL, 10-100 µL (Transferpette<sup>®</sup>S Pipette, adjustable volume Single Channel, BrandTech Scientific INC, Germany)
- ✓ Απεσταγμένο Ύδωρ
- ✓ Πλαστικά σωληνάκια Cryovials (CryoPure 1.0 mL, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany)

### Όργανα

- Φυγόκεντρος (Centrifuge 5804 R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany)

Το πειραματικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιελάμβανε τα παρακάτω βήματα (**εικ. 37**):

- Έκπλυση των φίλτρων (3x500µL απεσταγμένο ύδωρ 40°C) για να απομακρυνθούν τα ίχνη γλυκερόλης που χρησιμοποιείται ως συντηρητικό των φίλτρων.
- Φυγοκέντρηση μετά την εκάστοτε έκπλυση στα 4000g για 30min σε θερμοκρασία δωματίου (25°C).
- Προσθήκη 800µL ορού/πλάσματος αίματος σε κάθε φίλτρο.
- Φυγοκέντρηση στα 4000g για 1h σε θερμοκρασία δωματίου (25°C).
- Συλλογή της ποσότητας του διηθήματος, περίπου 400µL, σε σωληνάκια Cryovials (CryoPure 1.0 mL, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany).
- Αποθήκευση στους -80°C.



**Εικ. 37:** Βήματα διαδικασίας φιλτραρίσματος δείγματος ορού/πλάσματος

### 2.3 Προετοιμασία των βιολογικών δειγμάτων για τη λήψη των φασμάτων $^1\text{H}$ NMR

#### Υλικά- Αντιδραστήρια

- Γυάλινα σωληνάκια NMR διαμέτρου 5 mm (Wilmad 535-PP, Sigma-Aldrich, NJ, USA)
- Φυαλίδια κωνικού σχήματος Eppendorf 1,5 mL
- Πιπέτες : 50μL, 200-1000μL (Transferpette<sup>®</sup>S Pipette, adjustable volume Single Channel, BrandTech Scientific INC, Germany)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ / 0.2 M pH 7.4,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , MB=141.96 g/mol, Riedel-de Haen,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , MB=156.02 g/mol, Merck)
- Διάλυμα  $\text{D}_2\text{O}$ /TSP (Δευτεριωμένο Ύδωρ,  $\text{D}_2\text{O}$ , MB=20.03 g/mol, Sigma-Aldrich, βαθμού δευτερίωσης 99.9%, περιεκτικότητας 0.75 w.t % σε δευτεριωμένο άλας νατρίου 3-(trimethylsilyl)- propionic-2,2,3,3-d<sub>4</sub> (TSP, MB =172.27 g/mol, Sigma-Aldrich))

#### Όργανα

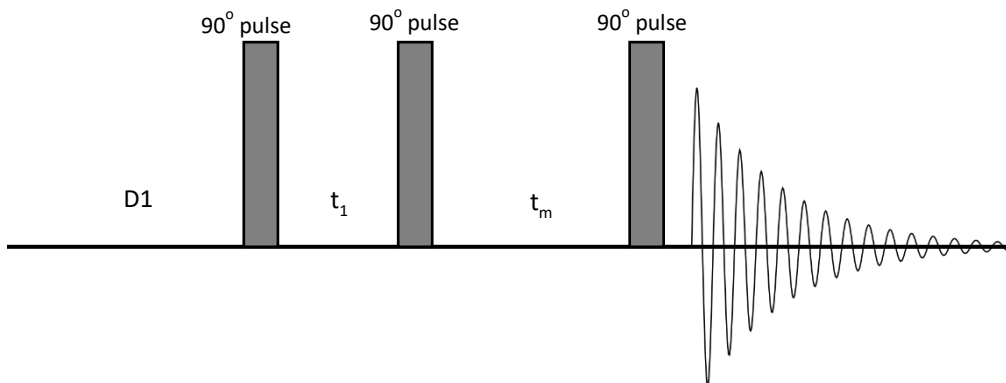
- Vortex (VELP Scientifica, Usmate Velate, Italy)
- Φυγόκεντρος Centrifuge 5415 D, Eppendorf AG, Hamburg, Germany
- Φασματογράφος Bruker Avance DRX 500MHz (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Germany)

Τα βιολογικά δείγματα τα οποία ήταν αποθηκευμένα στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου ( $25^{\circ}\text{C}$ ) για περίπου 30 λεπτά για την απόκτηση θερμικής ισορροπίας και ακολούθησε ανάδευση σε συσκευή Vortex (VELP Scientifica, Usmate Velate, Italy) για ομογενοποίηση των δειγμάτων. Σε 400μL διηθήματος ορού/πλάσματος ή ούρων προστίθενται 200μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών για την ρύθμιση του pH στην περιοχή  $7.4 \pm 0.5$  και ελαχιστοποίηση των μεταβολών του. Ακολουθεί ήπια ανάδευση στο μίγμα των 600μL και αναμονή 10min για πλήρη ανάμειξη των βιολογικών δειγμάτων με το ρυθμιστικό διάλυμα. Για τα δείγματα ούρων έγινε φυγοκέντρηση (Centrifuge 5415 D, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) σε 8000 στροφές ανά λεπτό για 5 λεπτά για την απομάκρυνση τυχόν ιζημάτων. Στη συνέχεια, 500μL από το διαυγές υπερκείμενο και 50μL διαλύματος  $\text{D}_2\text{O}$ /TSP μεταφέρθηκαν σε γυάλινο σωληνάριο NMR διαμέτρου 5mm. Το  $\text{D}_2\text{O}$  προστέθηκε ως διαλύτης για το κλείδωμα (lock) της συχνότητας πεδίου (field frequency lock solvent) του φασματογράφου NMR ενώ το TSP με τελική συγκέντρωση 0.456 mM αποτέλεσε την εσωτερική ουσία αναφοράς ( $\delta^1\text{H}$  0.0) για τη βαθμονόμηση των χημικών μετατοπίσεων.

#### 2.4 Λήψη και επεξεργασία των φασμάτων $^1\text{H}$ NMR

Η λήψη των φασμάτων  $^1\text{H}$  NMR έγινε στους 300K, στο φασματογράφο 500 MHz Avance Bruker DRX, εντάσεως μαγνητικού πεδίου 11.7 Tesla, στο Κέντρο NMR του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στο φασματογράφο Avance III 700 MHz, εφοδιασμένο με κρυογονικά ψυχόμενη probe του Πανεπιστημίου Πατρών. Για την καταστολή του σήματος του νερού χρησιμοποιήθηκε η 1D παλμική ακολουθία NOESYPRESAT (RD- $90^{\circ}$ -t1- $90^{\circ}$ -tm- $90^{\circ}$ -FID) (εικ.38). Ο χρόνος αποδιέγερσης (RD relaxation delay), στη διάρκεια του οποίου έγινε καταστολή του σήματος συντονισμού του νερού ήταν 4s ώστε να εξασφαλιστεί πλήρη αποδιέγερση των πυρήνων μεταξύ των διαδοχικών παλμών, ο χρόνος ανάμειξης  $t_m$  στη διάρκεια του οποίου έγινε επιλεκτική ακτινοβολή της κορυφής συντονισμού του νερού ήταν 0.1s για τον ορό/πλάσμα και 0.015s για τα ούρα και ο χρόνος συλλογής της FID ήταν 3.28s και 3.12s αντίστοιχα. Σε κάθε φάσμα έγινε συλλογή 128 σαρώσεων (scans) για τον ορό/πλάσμα 64 για τα ούρα, 64K δεδομένων (data points) με φασματικό εύρος 10.000 Hz και εφαρμογή παλμού  $90^{\circ}$ .

## NOESYPR1D



**Εικ. 38:** Παλμική ακολουθία NOESYPR1D,  $D_1$ : Relaxation delay time,  $t_1$ : phase switching time,  $t_m$ : mixing time.

Τα φάσματα επεξεργάστηκαν με το λογισμικό πρόγραμμα Bruker Topspin 4.0.5 (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany). Πρώτο βήμα, για την αύξηση της ευαισθησίας ήταν ο πολλαπλασιασμός των FIDs με κατάλληλη εκθετική συνάρτηση ( $LB=0.3$ ) (exponential weighting function) που αντιστοιχούσε σε διεύρυνση γραμμών (line broadening) πλάτους 0.3 Hz. Στη συνέχεια μετά το μετασχηματισμό Fourier σε φάσμα συνάρτησης συχνότητας, έγινε βαθμονόμηση (Calibration) με βάση το σήμα συντονισμού του TSP στα 0.000 ppm. Ακολούθησε διόρθωση φάσης (Phase Correction) μηδενικής και πρώτης τάξης για τη βελτίωση της συμμετρίας των κορυφών του φάσματος. Τέλος, έγινε διόρθωση της γραμμής βάσης (Baseline Correction) με τη χρήση μιας απλής πολυωνμικής συνάρτησης 5<sup>ου</sup> βαθμού (Automatic Using Polynomial of Degree ABSG).

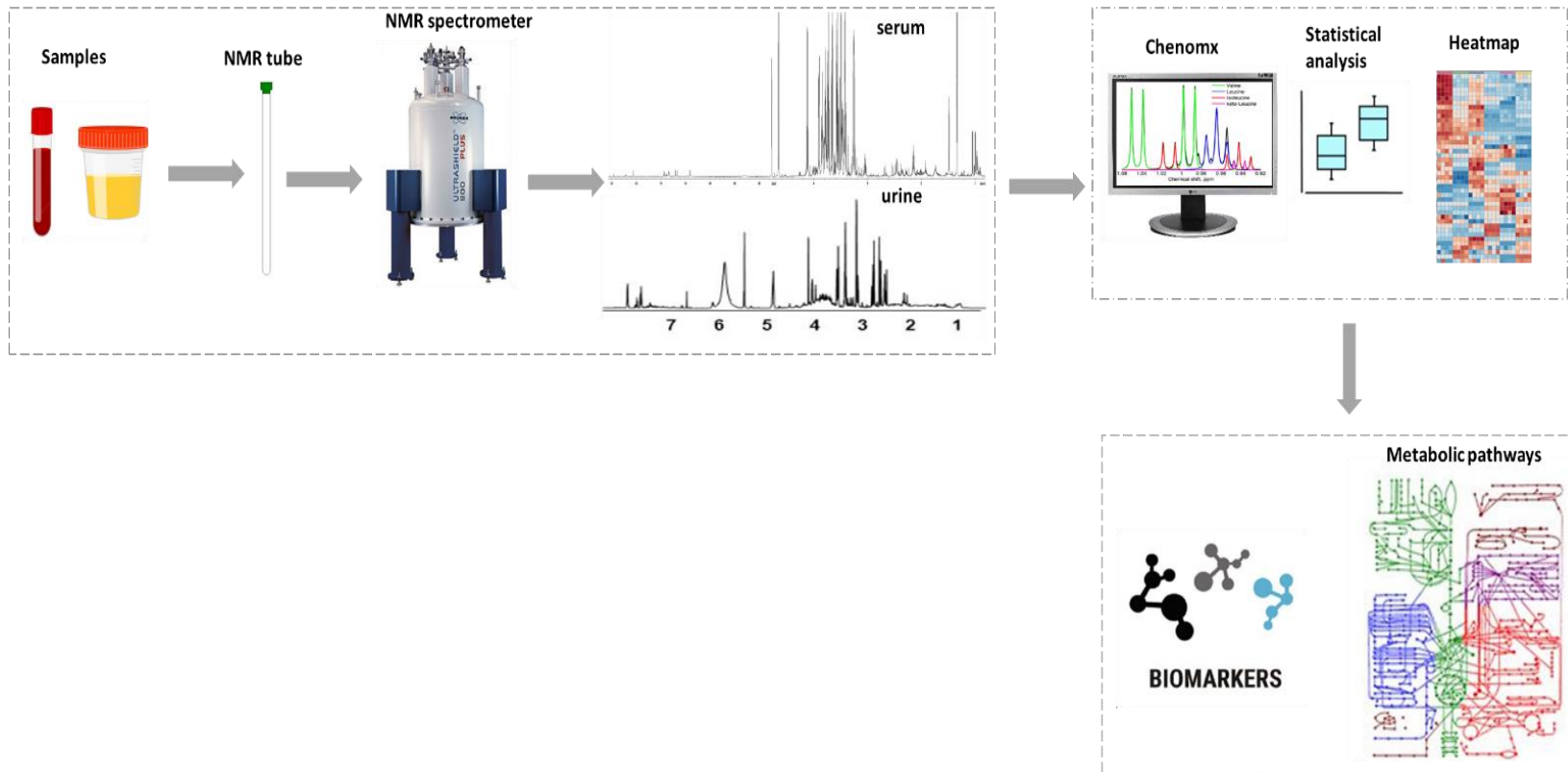


## 2.5 Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών από τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$

Η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Chenomx NMR Suite v.8.4 (Edmonton, AB, Canada), τις διαθέσιμες βάσεις δεδομένων όπως, Human Metabolome Database (HMDB; <http://www.hmdb.ca>), Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB, <http://www.bmrwisc.edu>), τις βιβλιοθήκες με τα πρότυπα φάσματα μεταβολιτών στα 500 MHz και 700 MHz του Chenomx και την 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/πλάσματος οι συγκεντρώσεις των οποίων εκφράστηκαν σε  $\mu\text{M}$  ενώ στα ούρα η κρεατινίνη ούρων χρησιμοποιήθηκε ως ουσία αναφοράς και οι τιμές των μεταβολιτών εκφράστηκαν ως μmoles του μεταβολίτη ανά mmol κρεατινίνης ( $\mu\text{M}/\text{mM}$ ).

## 2.6 Στατιστική ανάλυση δεδομένων

Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων 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 (independent or paired) για σύγκριση μεταξύ δύο ανεξάρτητων ομάδων ή κατά ζεύγη. Το επίπεδο εμπιστοσύνης ορίστηκε σε  $p < 0.05$  και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση (Mean  $\pm$  SD). Η απεικόνιση της μέσης τιμής  $\pm$  τυπική απόκλιση έγινε με τη χρήση ραβδογραμμάτων και διαγραμμάτων heatmap. Για τον έλεγχο του σφάλματος τύπου I (εσφαλμένη απόρριψη μιας πραγματικής μηδενικής υπόθεσης) λόγω των πολλαπλών συγκρίσεων χρησιμοποιήθηκε η διόρθωση κατά Bonferroni σύμφωνα με την οποία το επίπεδο σημαντικότητας είναι  $0.05/k$  ( $k$ =αριθμός των συγκρίσεων).



Σχηματική απεικόνιση των βημάτων της μελέτης

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Δημογραφικά & κλινικά χαρακτηριστικά, βιοχημικές & αιματολογικές παράμετροι των πληθυσμών της μελέτης

#### Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (ΣΔΤ2)

Στον **πίνακα 3** αναγράφονται τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά καθώς και οι βιοχημικές παράμετροι ορού αίματος των 53 υγιών ατόμων και των 50 ασθενών με ΣΔΤ2 πριν και 3 μήνες μετά τη χορήγηση δαπαγλιφλοζίνης. Η πλειονότητα των ασθενών ήταν άντρες με μέση ηλικία τα 60 έτη και σχετικά πρόσφατα διεγνωσμένοι με ΣΔΤ2. Επιπλέον κάποιοι από τους διαβητικούς ασθενείς ήταν υπέρβαροι ή παχύσαρκοι και εμφάνισαν αρτηριακή πίεση που συνάδει με 1<sup>ου</sup> βαθμού υπέρταση.

Η χορήγηση της δαπαγλιφλοζίνης συσχετίστηκε με στατιστικά σημαντική μείωση του δείκτη μάζας σώματος, των τιμών της αρτηριακής πίεσης και των γλυκαιμικών δεικτών ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια εμφανή επίδραση στα λιπίδια του ορού (**πίνακας 3**). Επιπλέον, στους ασθενείς μετά τη χορήγηση δαπαγλιφλοζίνης η κρεατινίνη και ο φώσφορος του ορού παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση ( $P=0.005$ ) ενώ τα επίπεδα του ουρικού οξέος μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά ( $P=0.001$ ).

	Υγιή άτομα	Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2	
Αριθμός	53	50	50
Άντρες/Γυναίκες (%)	60/40	60/40	60/40
Ηλικία (έτη)	59 ± 6	60 ± 8.5	60 ± 8.5
Διάστημα από τη διάγνωση της νόσου (έτη)	-	4.2 ± 1.4	4.2 ± 1.4
Θεραπευτική αγωγή	-	Μετφορμίνη	Μετφορμίνη & Δαπαγλιφλοζίνη
Βάρος (kg)	72.2 ± 9.1	92.8 ± 14.8**	91.1 ± 12.2**†††
Δείκτης μάζας σώματος (kg/m <sup>2</sup> )	24.8 ± 3.2	32.1 ± 5.2**	31.8 ± 5.6** †††
Συστολική πίεση αίματος (mmHg)	120 ± 12	150 ± 18**	138 ± 15* †††
Διαστολική πίεση αίματος (mmHg)	78 ± 10	93 ± 13*	87 ± 15* †††
<b>Βιοχημικές παράμετροι ορού αίματος</b>			
Γλυκόζη νηστείας (mg/dL)	89 ± 14	168 ± 55**	142 ± 36** †††
Γλυκωμένη Αιμοσφαιρίνη HbA <sub>1c</sub> (%)	5.1 ± 0.7	8.1 ± 0.9**	7.4 ± 0.9** †††
Ουρία (mg/dL)	36.1 ± 7.3	36.1 ± 9.7	37.6 ± 11.9
Κρεατινίνη (mg/dL)	0.98 ± 0.16	0.84 ± 0.17*	0.87 ± 0.17* ††
Ρυθμός σπειραματικής διήθησης eGFR (ml·min <sup>-1</sup> ·1.73m <sup>-2</sup> )	80.2 ± 12.4	89.3 ± 14.9*	85.7 ± 16.1*††
Ολική χοληστερόλη (mg/dL)	224 ± 40	188 ± 50	182 ± 37
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	118 ± 58	163 ± 85	153 ± 59
HDL χοληστερόλη (mg/dL)	58 ± 13	44 ± 9	45 ± 10
LDL χοληστερόλη (mg/dL)	143 ± 36	110 ± 41	105 ± 34
Ουρικό οξύ (mg/dL)	5.3 ± 1.1	5.4 ± 1.5	4.7 ± 1.1†††
Νάτριο (mEq/L)	140 ± 2	138 ± 2	139 ± 2
Κάλιο (mEq/L)	4.5 ± 0.3	4.5 ± 0.4	4.5 ± 0.4
Ασβέστιο (mg/dL)	9.5 ± 1.4	9.5 ± 0.4	9.6 ± 0.4
Μαγνήσιο (mEq/L)	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.2	1.8 ± 0.3
Φωσφορικά (mg/dL)	4.0 ± 0.6	3.5 ± 0.6	3.8 ± 0.5††
Χλωριούχα (mEq/L)	100.9 ± 2.3	101.9 ± 1.9	101.9 ± 2.5

**Πιν.3:** Δημογραφικά, κλινικά χαρακτηριστικά και βιοχημικές παράμετροι του ορού αίματος υγιών ατόμων και διαβητικών ασθενών πριν και 3 μήνες μετά τη χορήγηση δαπαγλιφλοζίνης, \*\*P<0.001, \*P<0.01 για σύγκριση των παραμέτρων των διαβητικών ασθενών ως προς τους υγιείς, †††P=0.001, ††P=0.005 για σύγκριση των παραμέτρων των διαβητικών ασθενών πριν και 3 μήνες μετά τη χορήγηση δαπαγλιφλοζίνης. (Bonferroni correction)

Οι μεταβολές των συγκεντρώσεων του φωσφόρου και του ουρικού οξέος στον ορό των ασθενών συνοδεύτηκαν από αντίστοιχες μεταβολές των τιμών κλασματικής απέκκρισης στα ούρα (πίνακας 4). Η κλασματική απέκκριση (Fractional Excretion, FE) του ουρικού οξέος και των ηλεκτρολυτών υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\% FE_{\chi} = (U_{\chi} \times Scr / S_{\chi} \times U_{cr}) \times 100\%$$

όπου  $S_{\chi}$  και  $U_{\chi}$  οι συγκεντρώσεις του ηλεκτρολύτη  $\chi$  στον ορό και στα ούρα αντίστοιχα,  $Scr$  και  $U_{cr}$  οι συγκεντρώσεις της κρεατινίνης στον ορό και στα ούρα αντίστοιχα.

Τέλος αν και οι ασθενείς παρουσίασαν μικρού βαθμού αλβουμινουρία πριν τη χορήγηση δαπαγλιφλοζίνης, μετά το πέρας των τριών μηνών τα επίπεδα της μικροαλβουμίνης ούρων μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά ( $p=0.005$ ) (πίνακας 4).

Βιοχημικές παράμετροι ούρων	Υγιή άτομα	Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2		Τιμές αναφοράς
		Μετοφορμίνη	Μετοφορμίνη & Δαπαγλιφλοζίνη	
Θεραπευτική αγωγή	-	Μετοφορμίνη	Μετοφορμίνη & Δαπαγλιφλοζίνη	
Μικροαλβουμίνη (mg/g κρεατινίνης)	-	17.7 ± 16.6	14.4 ± 11.6 <sup>††</sup>	<30
Κλασματική απέκκριση ουρικού οξέος (%)	-	7.2 ± 2.4	7.8 ± 3.4 <sup>††</sup>	<10
Κλασματική απέκκριση νατρίου (%)	-	0.62 ± 0.43	0.56 ± 0.31	<1
Κλασματική απέκκριση καλίου (%)	-	9.3 ± 4.2	12.5 ± 8.5	4-16
Κλασματική απέκκριση ασβεστίου (%)	-	0.9 ± 0.7	1.1 ± 0.9	0.1-1.3
Κλασματική απέκκριση μαγνησίου (%)	-	2.2 ± 1.2	2.3 ± 1.2	0.5-4
Κλασματική απέκκριση φωσφορικών (%)	-	11.7 ± 4.4	10.9 ± 5.3 <sup>††</sup>	<20
Κλασματική απέκκριση χλωριούχων (%)	-	1.1 ± 0.6	1.1 ± 0.5	<1

**Πιν.4:** Βιοχημικές παράμετροι των ούρων διαβητικών ασθενών πριν και 3 μήνες μετά τη χορήγηση δαπαγλιφλοζίνης, <sup>††</sup> $p=0.005$  (Bonferroni correction)

#### **Διαβητική Νεφροπάθεια (ΔΝ)**

Στον πίνακα 5 αναφέρονται τα δημογραφικά χαρακτηριστικά και οι βιοχημικές παράμετροι των 22 διαβητικών ασθενών 3 χρόνια πριν και αφότου διαγνώστηκαν με Διαβητική Νεφροπάθεια. Από τις βιοχημικές παραμέτρους, η μικροαλβουμίνη ούρων αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά ( $p<0.001$ ) στους ασθενείς που ανέπτυξαν ΔΝ.

	3 χρόνια πριν την εμφάνιση Διαβητικής Νεφροπάθειας	Διαβητική Νεφροπάθεια
Αριθμός	22	22
Φύλο (Αντρες/Γυναίκες)	17/5	17/5
Γλυκόζη νηστείας (mg/dL)	156 ± 60	155 ± 48
Γλυκωμένη Αιμοσφαιρίνη HbA <sub>1c</sub> (%)	7.3 ± 1.5	7.4 ± 1.6
Ουρία (mg/dL)	47.5 ± 27.8	45.4 ± 22.5
Κρεατινίνη (mg/dL)	1.10 ± 0.34	1.12 ± 0.45
Μικροαλβουμίνη ούρων (mg/g κρεατινίνης)	12.7 ± 8.8	273.7 ± 65.1 <sup>###</sup>

**Πιν.5:** Δημογραφικά χαρακτηριστικά και βιοχημικές παράμετροι των διαβητικών ασθενών 3 χρόνια πριν και αφότου διεγνώστηκαν με Διαβητική Νεφροπάθεια, <sup>###</sup>p<0.001

Στον **πίνακα 6** παρουσιάζονται τα δημογραφικά χαρακτηριστικά και οι βιοχημικές παράμετροι των 22 διαβητικών ασθενών 3 χρόνια πριν τη διάγνωση της Νεφροπάθειας σε σύγκριση με 25 διαβητικούς ασθενείς χωρίς επιπλοκές. Με εξαίρεση την κρεατινίνη ορού που ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένη (p<0.05) στους διαβητικούς ασθενείς 3 χρόνια πριν τη διάγνωση της ΔΝ, τα δημογραφικά στοιχεία και οι υπόλοιπες βιοχημικές παράμετροι δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές μεταξύ των ομάδων προς σύγκριση.

	Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2 (χωρίς επιπλοκές)	3 χρόνια πριν τη διάγνωση Διαβητικής Νεφροπάθειας
Αριθμός	25	22
Φύλο (Αντρες/Γυναίκες)	19/6	17/5
Ηλικία (έτη)	64 ± 5	67 ± 12
Δείκτης μάζας σώματος BMI (kg/m <sup>2</sup> )	32.0 ± 5.7	29.1 ± 5.2
Γλυκόζη νηστείας (mg/dL)	171 ± 53	156 ± 60
Γλυκωμένη Αιμοσφαιρίνη HbA <sub>1c</sub> (%)	8.1 ± 1.2	7.3 ± 1.5
Ουρία (mg/dL)	36.0 ± 8.3	47.5 ± 27.8
Κρεατινίνη (mg/dL)	0.88 ± 0.19	1.10 ± 0.34*
Μικροαλβουμίνη ούρων (mg/g κρεατινίνης)	16.9 ± 7.3	12.7 ± 8.8

**Πιν.6:** Δημογραφικά χαρακτηριστικά και βιοχημικές παράμετροι ασθενών με ΣΔΤ2 χωρίς επιπλοκές και των διαβητικών ασθενών 3 χρόνια πριν τη διάγνωση Διαβητικής Νεφροπάθειας, \*p<0.05

**Σακχαρώδης διαβήτης κύησης (ΣΔΚ)**

Στον **πίνακα 7** παρουσιάζονται τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά και οι βιοχημικές παράμετροι του ορού του αίματος των εγκύων γυναικών με φυσιολογική κύηση και των εγκύων γυναικών που έχουν διαγνωστεί με Σακχαρώδη διαβήτη κύησης (ΣΔΚ).

	Φυσιολογική Κύηση	Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης
Αριθμός	77	62
Ηλικία (έτη)	33 ± 5	34 ± 5
Εβδομάδα κύησης	28 ± 1	28 ± 1
Δείκτης μάζας σώματος BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.6 ± 5.0	26.0 ± 5.0
Συστολική πίεση αίματος (mmHg)	109 ± 13	111 ± 12
Διαστολική πίεση αίματος (mmHg)	60 ± 8	60 ± 12
Ολική χοληστερόλη (mg/dL)	251 ± 35	254 ± 48
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	191 ± 67	191 ± 76
HDL χοληστερόλη (mg/dL)	64 ± 12	64 ± 12
LDL χοληστερόλη (mg/dL)	149 ± 32	154 ± 37
Καμπύλη σακχάρου 0' (mg/dl)	83 ± 6	93 ± 9***
Καμπύλη σακχάρου 60' (mg/dl)	130 ± 26	177 ± 30***
Καμπύλη σακχάρου 120' (mg/dl)	104 ± 24	129 ± 35***
Γλυκωμένη Αιμοσφαιρίνη HbA <sub>1c</sub> (%)	5.0 ± 0.3	5.1 ± 0.3**

**Πιν.7:** Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά και βιοχημικές παράμετροι του ορού αίματος των εγκύων γυναικών με φυσιολογική κύηση και των εγκύων γυναικών που έχουν διαγνωστεί με Σακχαρώδη διαβήτη κύησης, \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$

Την ομάδα μελέτης αποτέλεσαν 62 Καυκάσιες γυναίκες με ΣΔΚ, ενώ 77 υγιείς Καυκάσιες έγκυες γυναίκες με φυσιολογική ανοχή γλυκόζης, ίδιας εβδομάδας κύησης (28±1) και χωρίς διαφορές στο δείκτη μάζας σώματος, στην αρτηριακή πίεση και στα επίπεδα λιπιδίων ορού αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Όπως ήταν αναμενόμενο, οι γυναίκες με ΣΔΚ σύμφωνα με τα κριτήρια IADPSG (International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups) είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης σε κάθε χρονική στιγμή της καμπύλης σακχάρου καθώς και γλυκωμένης αιμοσφαιρίνης σε σχέση με τις γυναίκες με φυσιολογική κύηση. Επιπλέον, τα επίπεδα χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων, HDL- και LDL-χοληστερόλης δεν διέφεραν μεταξύ των ομάδων μελέτης.

### Αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος

Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά καθώς και οι βιοχημικές και αιματολογικές παράμετροι των ασθενών με Αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος (Αυτοάνοση Ηπατίτιδα (ΑΗ), Πρωτοπαθής Χολική Χολαγγειίτιδα (ΠΧΧ), Πρωτοπαθής Σκληρυντική Χολαγγειίτιδα (ΠΣΧ) και των ομάδων ελέγχου (Χρόνιες Ιογενείς Ηπατίτιδες Β & C (CVH), υγιείς) παρουσιάζονται στον **πίνακα 8**. Η ηπατική ίνωση αξιολογήθηκε είτε με βιοψία ήπατος (σε ασθενείς με ΑΗ και σε 36 ασθενείς με ΠΧΧ) είτε με ελαστογραφία (Fibroscan) (σε ασθενείς με ιογενείς ηπατίτιδες και στους υπόλοιπους ασθενείς με ΠΧΧ). Μετά τη χορήγηση θεραπευτικής αγωγής στους ασθενείς με ΑΗ παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική μείωση τόσο των ηπατικών ενζύμων (AST, ALT, γ-γλουταμινοτρανσφεράση,  $p < 0.001$ ) όσο και της ανοσοσφαιρίνης G ( $p < 0.001$ ). Στους ασθενείς με ΠΧΧ παρατηρήθηκε επίσης μια πιο μικρή αλλά στατιστικά σημαντική μείωση των ηπατικών ενζύμων ( $p < 0.05$ ).



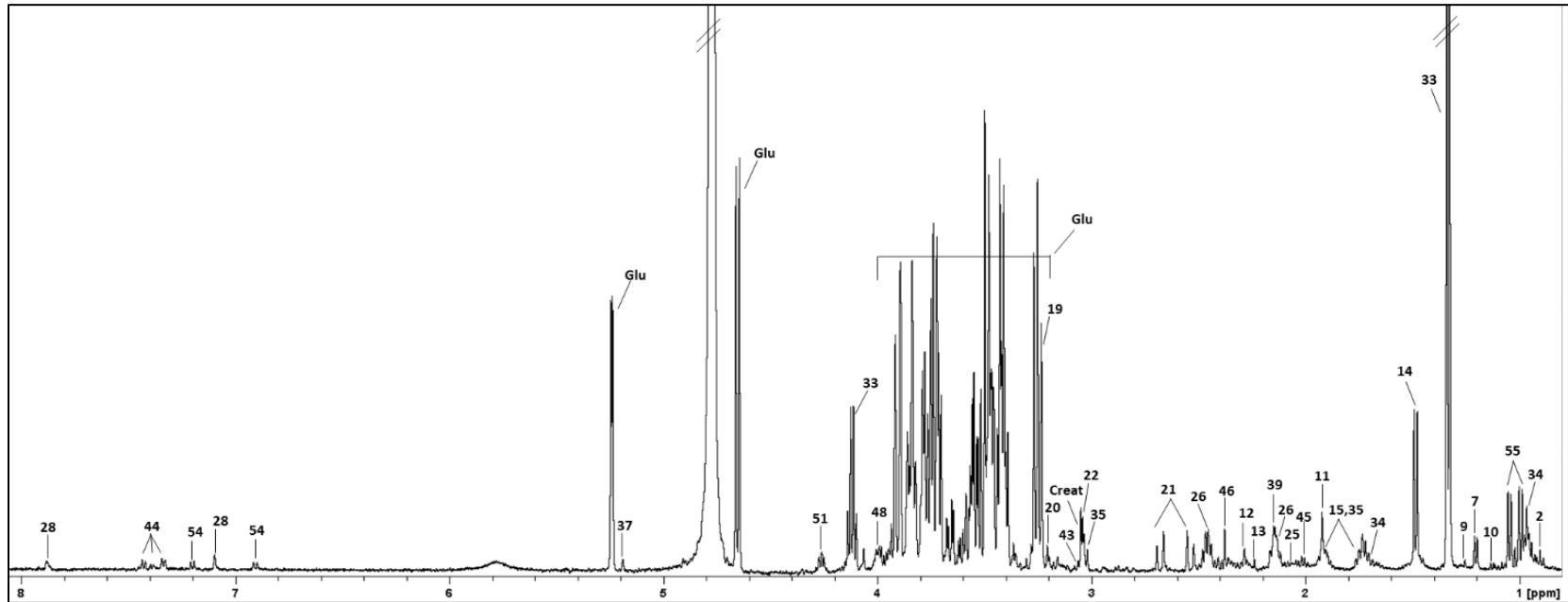
	Αυτοάνοσα Νοσήματα Ήπατος (ANH) - Ομάδες μελέτης						Ομάδες ελέγχου		
	Αυτοάνοση Ηπατίτιδα (AH)		Πρωτοπαθής Χολική Χολαγγεΐτιδα (ΠΧΧ)		Πρωτοπαθής Σκληρυντική Χολαγγεΐτιδα (ΠΣΧ)		Χρόνιες ιογενείς Ηπατίτιδες (CVH)		Υγιή άτομα
							Χρόνια ιογενής Ηπατίτιδα Β	Χρόνια ιογενής Ηπατίτιδα C	
Αριθμός	50	79	72	95	9	36	55	46	43
Ηλικία (έτη)	53 (14-81)	52 (19-78)	53 (19-81)	58 (20 -78)	43 (21-58)	43 (22-66)	54 (20-77)	45 (23-81)	51 (32-73)
Φύλο (Αντρες/Γυναίκες)	13/37	22/57	5/67	10/85	4/5	21/15	16/39	12/34	11/32
Θεραπευτική αγωγή	-	Ανοσοκαταστολή	-	UDCA	-	UDCA	-	-	-
Ασπαρτική αμινοτρανσφεράση, AST (IU/ml)	307 ± 498	30 ± 42***	41 ± 39###	29 ± 16†	33 ± 18###	25 ± 12	30 ± 15***	33 ± 26***	22 ± 5
Αμινοτρανσφεράση της αλανίνης, ALT (IU/ml)	421 ± 652	31 ± 51***	50 ± 74###	31 ± 23†	42 ± 23###	33 ± 18	38 ± 36***	39 ± 38***	19 ± 7
γ- Γλουταμινοτρανσφεράση (IU/ml)	99 ± 106	33 ± 33***	107 ± 256	47 ± 61†	34 ± 29##	39 ± 22	34 ± 46***	25 ± 16***	18 ± 6
Αλκαλική φωσφατάση ALP (IU/ml), (ULN= 120 IU/ml)	106 ± 57	68 ± 32***	152 ± 204	115 ± 60	85 ± 51	105 ± 59	79 ± 38**	67 ± 23***	63 ± 15
Ολική χολερυθρίνη (mg/dl)	3.0 ± 5.0	0.7 ± 0.4**	0.7 ± 0.5##	0.7 ± 0.4	1.3 ± 0.9	-	0.9 ± 0.6**	0.6 ± 0.3***	0.5 ± 0.2
Αλβουμίνη (g/dl)	3.9 ± 0.6	4.2 ± 0.5*	4.1 ± 0.8	4.3 ± 0.6	4.1 ± 0.6†	4.4 ± 0.5	4.2 ± 0.5	4.4 ± 0.4	4.3 ± 0.3
PLT Αιμοπετάλια (x10 <sup>3</sup> )	205(110-434)	213(35-398)	262(120-398)###	243(62-393)	191(100-259)###	245(58-405) <sup>§</sup>	193(50-312)***	233(87- 483)***	236 (140-330)
Ανοσοσφαιρίνη G, IgG (mg/dl)	1892 ± 780	1274 ± 391***	-	-	-	-	-	-	-
Κίρρωση κατά τη διάγνωση (Ναι/Όχι)	5/45	10/69	9/63	6/89	1/8	2/34	11/44	8/38	-
Γλυκόζη νηστείας (mg/dl)	100 ± 25 <sup>xxx</sup>	97 ± 18 <sup>xxx</sup>	93 ± 13 <sup>#x</sup>	93 ± 17 <sup>xx</sup>	88 ± 8 <sup>##</sup>	93 ± 12 <sup>x</sup>	98 ± 22 <sup>xx</sup>	100 ± 19 <sup>xxx</sup>	87 ± 9
Κρεατινίνη (mg/dl)	0.85 ± 0.19	0.81 ± 0.19 <sup>xx</sup>	0.87 ± 0.20	0.80 ± 0.22 <sup>xx</sup>	0.94 ± 0.27	0.88 ± 0.16	0.86 ± 0.20	0.85 ± 0.23	0.92 ± 0.15
Ουρία (mg/dl)	37 ± 20	35 ± 13	34 ± 25	35 ± 12	31 ± 12	29 ± 8 <sup>xx</sup>	34 ± 9	33 ± 9	34 ± 7

**Πιν.8:** Δημογραφικά, κλινικά χαρακτηριστικά, βιοχημικές και αιματολογικές παράμετροι των ασθενών με Αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος (Αυτοάνοση Ηπατίτιδα, Πρωτοπαθής Χολική Χολαγγεΐτιδα, Πρωτοπαθής Σκληρυντική Χολαγγεΐτιδα) και των ομάδων ελέγχου (Χρόνιες Ιογενείς Ηπατίτιδες Β & C, υγιείς), \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  για σύγκριση των παραμέτρων ασθενών με Αυτοάνοση Ηπατίτιδα πριν και μετά την ανοσοκαταστολή, † $p < 0.05$  για σύγκριση των παραμέτρων ασθενών με Πρωτοπαθή Χολική Χολαγγεΐτιδα πριν και μετά τη χορήγηση UDCA, § $p < 0.05$  για σύγκριση των παραμέτρων ασθενών με Πρωτοπαθή Σκληρυντική Χολαγγεΐτιδα πριν και μετά τη χορήγηση UDCA, ### $p < 0.001$ , ## $p < 0.01$ , # $p < 0.05$  για ΠΧΧ προ θεραπείας vs AH προ θεραπείας, ### $p < 0.001$ , ## $p < 0.01$ , # $p < 0.05$  για ΠΣΧ προ θεραπείας vs AH προ θεραπείας, \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  για CVH vs AH προ θεραπείας, xxx $p < 0.001$ , xx $p < 0.01$ , x $p < 0.05$  ως προς τους υγιείς.

### 3.2 Το $^1\text{H}$ NMR φάσμα ορού και ούρων

Στις **εικόνες 39 & 40** παρουσιάζονται 2 φάσματα  $^1\text{H}$ NMR 500 MHz φιλτραρισμένου «απαλλαγμένου από μακρομόρια» ορού και ούρων διαβητικού ασθενούς της παρούσας διατριβής με τους κύριους μεταβολίτες μικρού μοριακού βάρους.

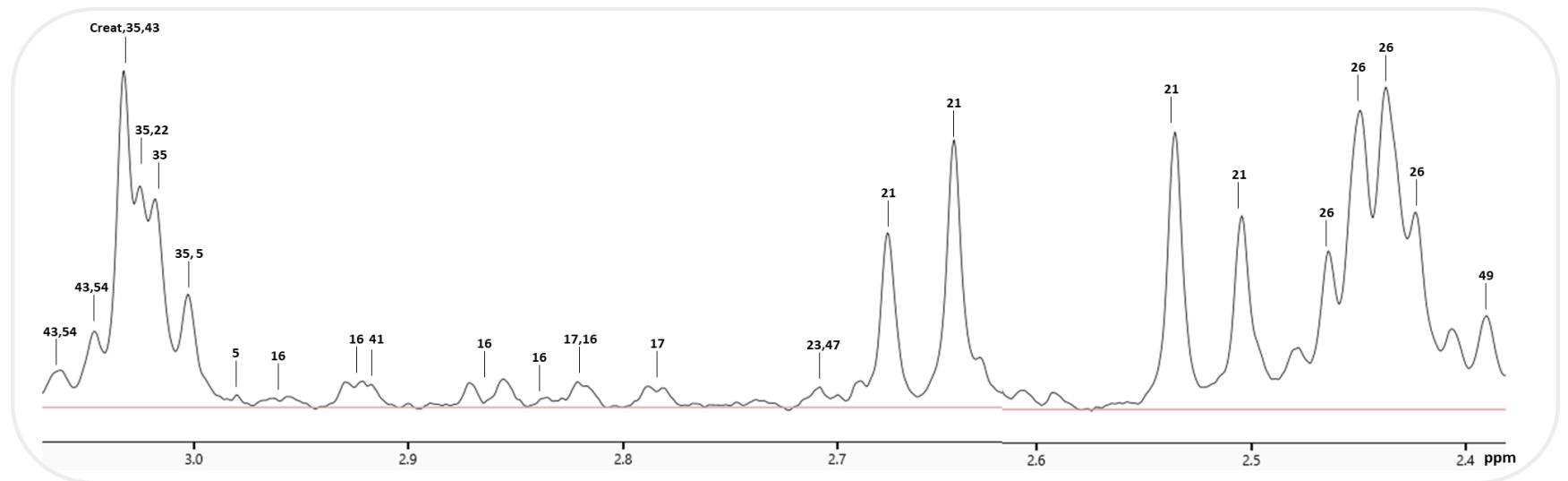
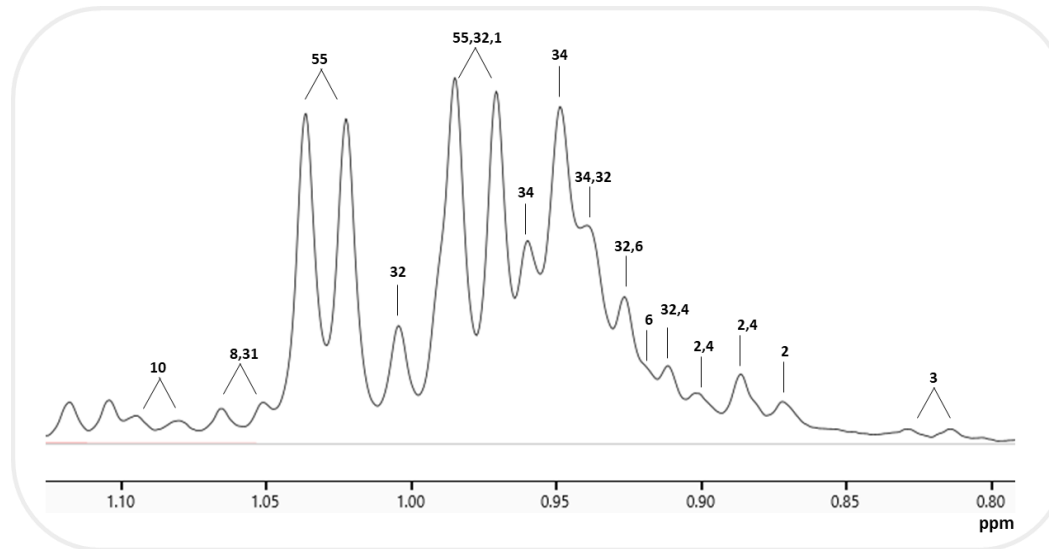
Με διήθηση υπό φυγοκέντρηση του ορού/πλάσματος του αίματος και τη χρήση φασματοσκοπίας NMR επιτυγχάνεται μια λεπτομερής καταγραφή του μεταβολικού προφίλ. Στο φάσμα φιλτραρισμένου ορού (**εικόνα 39**) διακρίνονται οι κορυφές 57 μεταβολιτών μικρού μοριακού βάρους συμπεριλαμβανομένου των παρακάτω ομάδων: σακχάρων (γλυκόζη, μαννόζη κ.ά.), μεταβολιτών που εμπλέκονται στο μηχανισμό παραγωγής ενέργειας (γαλακτικό και πυροσταφυλικό), ενδιάμεσων του κύκλου του Krebs (κιτρικό, ηλεκτρικό, 2-οξογλουταρικό), κετονοσωμάτων (ακετοξικό, 3-υδροξυ-βουτυρικό, ακετόνη), BCAAs και των καταβολικών τους ενδιάμεσων (2-οξο-ισοκαπροϊκό οξύ, 3-υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ, 3-μεθυλο-2-οξοβαλερικό οξύ κ.ά), γλυκογενετικών (αλανίνη, γλυκίνη, γλουταμίνη, κ.ά), κετογενετικών (λυσίνη), αρωματικών (τυροσίνη, φαινυλαλανίνη, ιστιδίνη, τρυπτοφάνη) αμινοξέων, οσμολυτών (μυο-ινοσιτόλη, ταυρίνη), μεταβολιτών που συμμετέχουν στο μεταβολισμό 1C -one carbon (μεθειονίνη, χολίνη, βεταΐνη, διμεθυλογλυκίνη, σαρκοσίνη) καθώς και των πουρινών (υποξανθίνη), ενδιάμεσων του κύκλου της ουρίας (ορνιθίνη, αργινίνη), μεταβολιτών που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων (μαλονικό οξύ, καρνιτίνη, ακετυλο-καρνιτίνη κ.ά), οργανικών οξέων (2-αμινοβουτυρικό, 2-υδροξυ-βουτυρικό οξύ κ.ά.) καθώς και μεταβολιτών προερχόμενων από την εντερική μικροχλωρίδα (διμεθυλαμίνη, κρεατίνη, κ.ά)



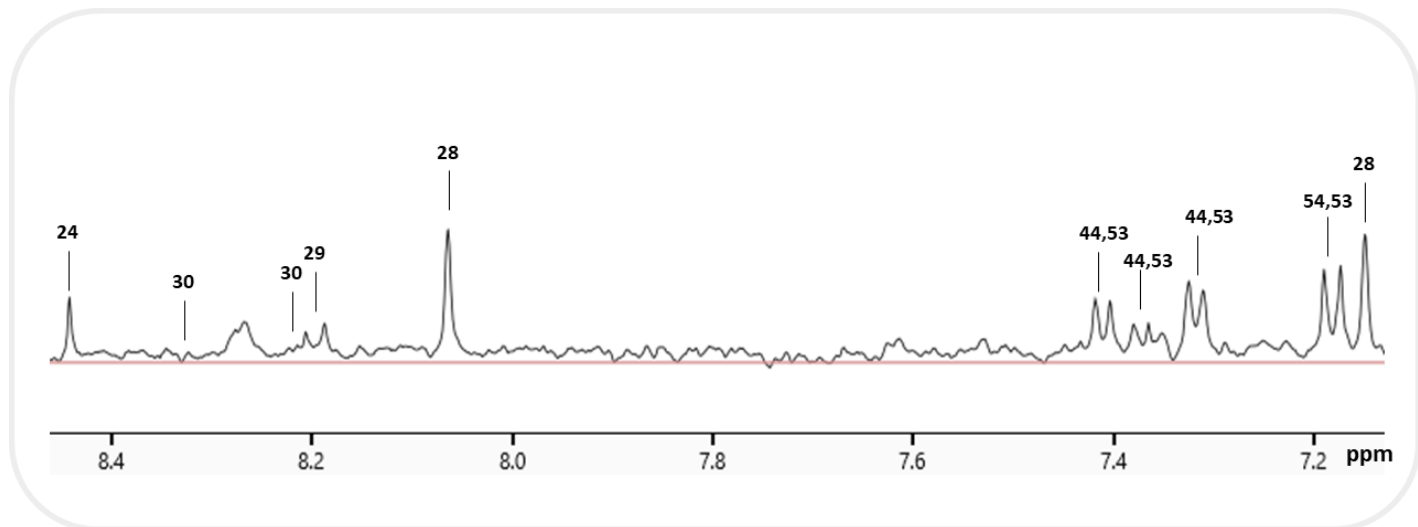
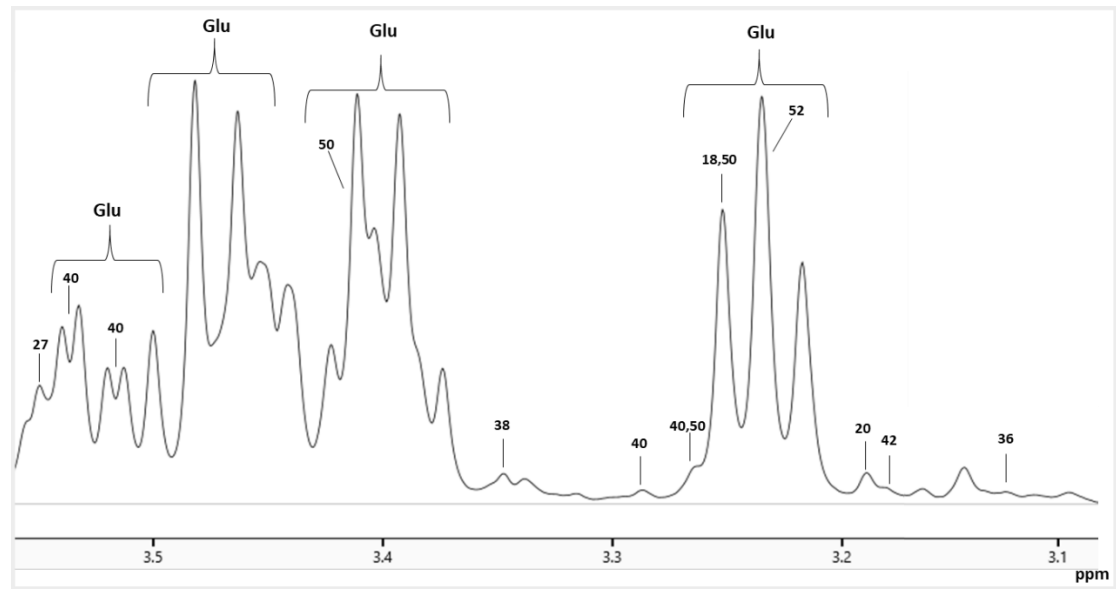
**Εικ.39:** Φάσμα  $^1\text{H}$ NMR 500 MHz φιλτραρισμένου ορού αίματος,

1, 2-Aminobutyrate; 2, 2-Hydroxybutyrate; 3, 2-Hydroxyisovalerate; 4, 2-Oxocaproate; 5, 2-Oxoglutarate; 6, 2-Oxoisocaproate; 7, 3-Hydroxybutyrate; 8, 3-Hydroxyisobutyrate; 9, 3-Hydroxyisovalerate; 10, 3-Methyl-2-oxovalerate; 11, Acetate; 12, Acetoacetate; 13, Acetone; 14, Alanine; 15, Arginine; 16, Asparagine; 17, Aspartate; 18, Betaine; 19, Carnitine; 20, Choline; 21, Citrate; 22, Creatine; 23, Dimethylamine; 24, Formate; 25, Glutamate; 26, Glutamine; 27, Glycine; 28, Histidine; 29, Hypoxanthine; 30, Inosine; 31, Isobutyrate; 32, Isoleucine; 33, Lactate; 34, Leucine; 35, Lysine; 36, Malonate; 37, Mannose; 38, Methanol; 39, Methionine; 40, Myo-inositol; 41, N,N-Dimethylglycine; 42, O-Acetylcarnitine; 43, Ornithine; 44, Phenylalanine; 45, Proline; 46, Pyruvate; 47, Sarcosine; 48, Serine; 49, Succinate; 50, Taurine; 51, Threonine; 52, Trimethylamine N-oxide; 53, Tryptophan; 54, Tyrosine; 55, Valine; Glu, Glucose; Creat, Creatinine.

Σε συνέχεια της **εικόνας 39** παρουσιάζονται σε μεγέθυνση περιοχές του φάσματος  $^1\text{H NMR}$  500 MHz φιλτραρισμένου ορού αίματος.

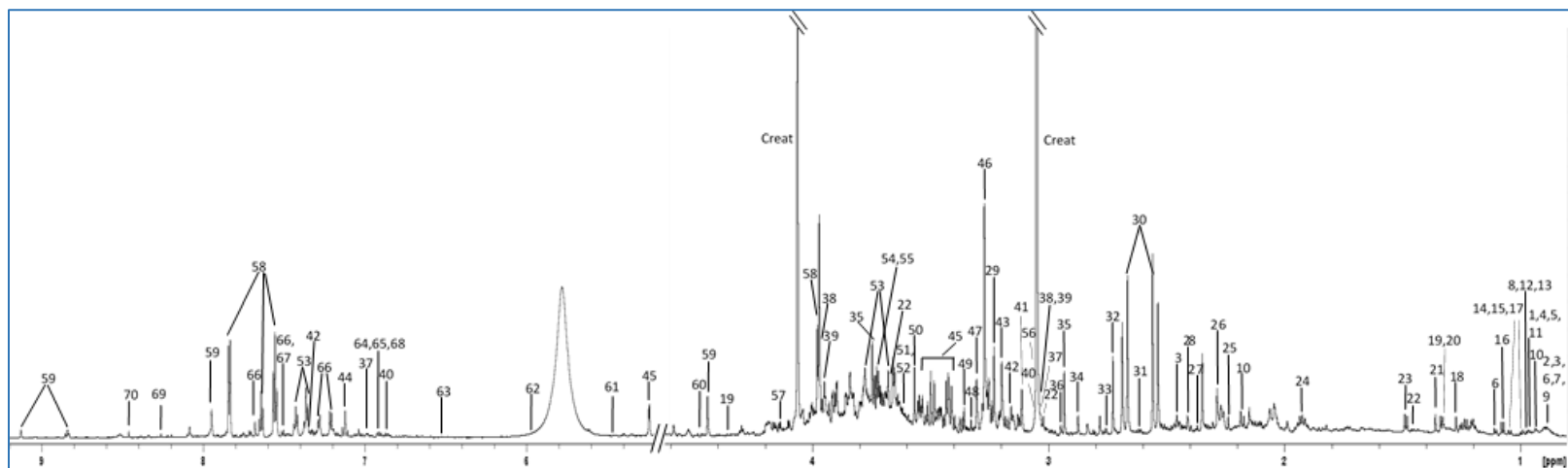


**Εικ.39:** Φάσμα  $^1\text{H NMR}$  500 MHz φιλτραρισμένου ορού αίματος (συνέχεια)



Εικ.39: Φάσμα  $^1\text{H}$ NMR 500 MHz φιλτραρισμένου ορού αίματος (συνέχεια)

Αντίστοιχα, στην **εικόνα 40** παρουσιάζεται το μεταβολικό προφίλ των ούρων με τις κορυφές 72 απεκκρινόμενων μεταβολιτών. Οι κύριοι μεταβολίτες ενός φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  ούρων είναι η κρεατινίνη, που εμφανίζεται με δυο κορυφές συντονισμού στα 3.05 και στα 4.06 ppm, το ιππουρικό οξύ, το κιτρικό οξύ, το τριμεθυλο-*N*-αμινοξείδιο (TMAO), η βεταΐνη, η διμεθυλαμίνη, θρεονίνη/γαλακτικό, τα κετονοσώματα (3-υδροξυ-βουτυρικό οξύ) καθώς και αμινοξέων όπως αλανίνη, βαλίνη, αρωματικών αμινοξέων κ.ά. Στο φάσμα διακρίνονται επίσης μικρές κορυφές από μεταβολίτες, οι οποίοι φυσιολογικά βρίσκονται σε μικροποσότητες, ωστόσο σε παθολογικές καταστάσεις τα επίπεδά τους μπορεί να αυξηθούν σημαντικά.

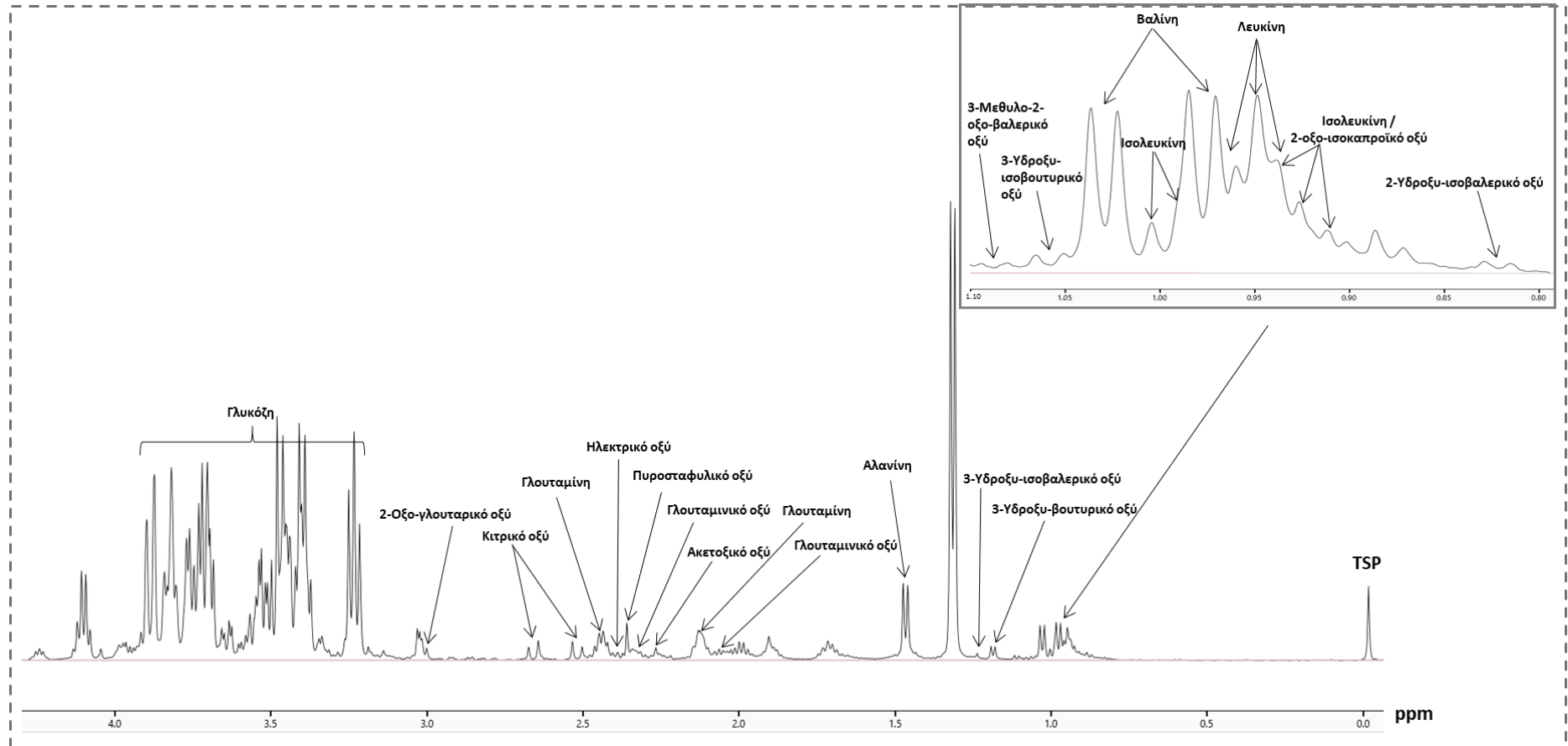


**Εικ.40:** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  500 MHz ούρων

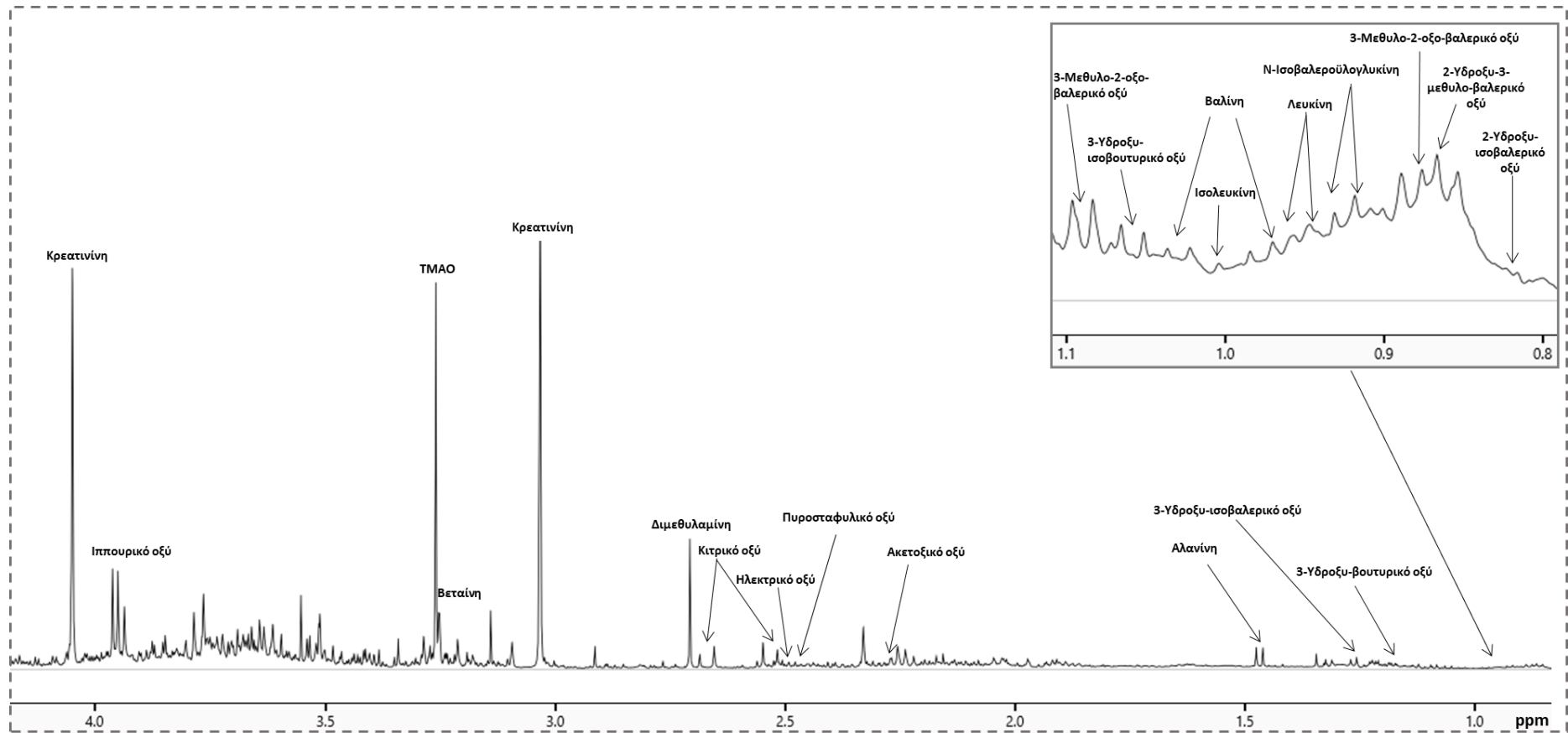
1, 2-Hydroxyisovalerate; 2, Butyrate; 3, Ethylmalonate; 4, 2-Hydroxy-3-methylvalerate; 5, Valerate; 6, 3-Methyl-2-oxovalerate; 7, 2-Oxocaproate; 8, 2-Hydroxybutyrate; 9, 2-Hydroxyvalerate; 10, N-Isovaleroylglycine; 11, 3-Methyladipate; 12, Isoleucine; 13, Leucine; 14, 2-Aminobutyrate; 15, Valine; 16, 3-Hydroxyisobutyrate; 17, 3-Hydroxybutyrate; 18, 3-Hydroxyisovalerate; 19, Threonine; 20, Lactate; 21, 2-Hydroxyisobutyrate; 22, Lysine; 23, Alanine; 24, Acetate; 25, Acetone; 26, Acetoacetate; 27, Pyruvate; 28, Succinate; 29, Carnitine; 30, Citrate; 31, Methylamine; 32, Dimethylamine; 33, Sarcosine; 34, Trimethylamine; 35, N,N-Dimethylglycine; 36, N-Methylhydantoin; 37, 3-Chlorotyrosine; 38, Creatine phosphate; 39, Creatine; 40, Tyrosine; 41, cis-Aconitate; 42, Phenylalanine; 43, Choline; 44, 1-Methylhistidine; 45, Glucose; 46, Trimethylamine N-oxide; 47, Betaine; 48, myo-Inositol; 49, Methanol; 50, Glycine; 51, Mannitol; 52, Indole-3-acetate; 53, N-Phenylacetylglycine; 54, 3-Methylhistidine; 55, trans-Aconitate; 56, Anserine; 57, Gluconate; 58, Hippurate; 59, Trigonelline; 60, 1-Methylnicotinamide; 61, Allantoin; 62, Cytosine; 63, Fumarate; 64, Xanthurenate; 65, Kynurenate; 66, 3-Indoxylsulfate; 67, Indole-3-lactate; 68, 4-Hydroxybenzoate; 69, Hypoxanthine; 70, Formate; Creat, creatinine.

### 3.3 Ταυτοποίηση των BCAAs και των προϊόντων του καταβολισμού τους στο $^1\text{H}$ NMR φάσμα ορού/ούρων

Στις **εικόνες 41 & 42** παρουσιάζονται τα φάσματα  $^1\text{H}$ NMR 500 MHz φιλτραρισμένου ορού και ούρων εστιασμένα στην περιοχή 0.0-4.3 ppm όπου εντοπίζονται οι κύριες κορυφές των μεταβολιτών της παρούσας διατριβής. Συγκεκριμένα οι χαρακτηριστικές κορυφές των BCAAs και των ενδιάμεσων προϊόντων του καταβολισμού τους εντοπίζονται στην περιοχή του φάσματος κοντά στα 1 ppm.



**Εικ.41:** Φάσμα  $^1\text{H}$ NMR 500 MHz φιλτραρισμένου ορού εστιασμένο στην περιοχή 0.0 – 4.4 ppm



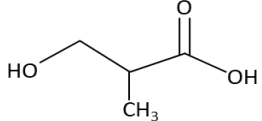
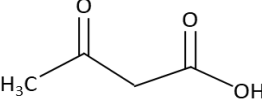
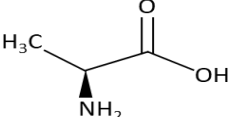
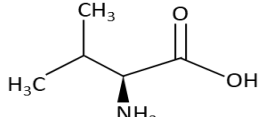
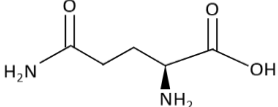
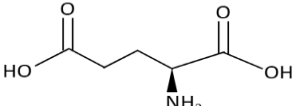
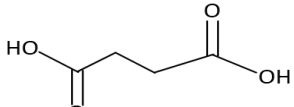
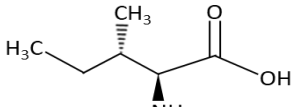
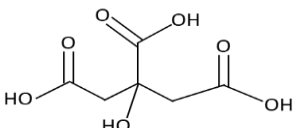
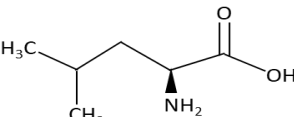
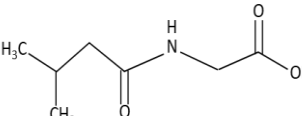
Εικ.42: Φάσμα  $^1\text{H}$ NMR 500 MHz ούρων εστιασμένο στην περιοχή 0.0 – 4.2 ppm

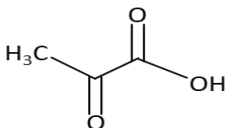
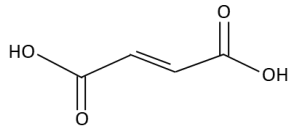


## 3.3.1 Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά

Στον **πίνακα 9** παρουσιάζονται η χημική δομή των BCAAs και των μεταβολιτών που σχετίζονται με τον καταβολισμό τους καθώς και τα φασματοσκοπικά τους χαρακτηριστικά στο  $^1\text{H}$ NMR φάσμα ορού και ούρων (αριθμός πρωτονίων, πολλαπλότητα και χημική μετατόπιση των κορυφών τους σε ppm ως προς την ουσία αναφοράς, TSP). Τέλος αναγράφεται ο κωδικός των παραπάνω μεταβολιτών στη βάση δεδομένων Human Metabolome Database (HMDB ID) και επισημαίνεται η χημική μετατόπιση των κύριων κορυφών που χρησιμοποιούνται στην ποσοτικοποίηση.

Μεταβολίτες	Χημική δομή	$\delta$ ( $^1\text{H}$ ) ppm (ως προς TSP)	Πολλαπλότητα κορυφών	HMDB ID
2-οξο-γλουταρικό οξύ (2-oxoglutarate)		2.428, <b>3.007</b>	t(CH <sub>2</sub> ), t(CH <sub>2</sub> )	HMDB0000208
2-οξο-ισοκαπροϊκό οξύ (2-oxoisocaproate)		<b>0.941</b> , 2.099, <b>2.617</b>	d(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , m(CH), d(CH <sub>2</sub> )	HMDB0000695
2-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ (2-hydroxyisovalerate)		<b>0.838</b> , 0.961, 2.021, 3.854	d(CH <sub>3</sub> ), d(CH <sub>3</sub> ), m(CH), d(CH)	HMDB0000407
2-υδροξυ-3-μεθυλο-βαλερικό οξύ (2-hydroxy-3-methylvalerate)		<b>0.881</b> , <b>0.947</b> , <b>1.165</b> , 1.367, 1.764, 3.888	t(CH <sub>3</sub> ), d(CH <sub>3</sub> ), m(CH <sub>2</sub> ), m(CH <sub>2</sub> ), m(CH), d(CH)	HMDB0000317
3-μεθυλο-2-οξο-βαλερικό οξύ (3-methyl-2-oxovalerate)		0.899, <b>1.104</b> , 1.461, 1.704, 2.937	t(CH <sub>3</sub> ), d(CH <sub>3</sub> ), m(CH <sub>2</sub> ), m(CH <sub>2</sub> ), m(CH)	HMDB0000491
3-υδροξυ-βουτυρικό οξύ (3-hydroxybutyrate)		<b>1.204</b> , 2.313, 2.413, 4.157	d(CH <sub>3</sub> ), m(CH <sub>2</sub> ), m(CH <sub>2</sub> ), m(CH)	HMDB0000357
3-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ (3-hydroxyisovalerate)		<b>1.255</b> , 2.362	s(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , s(CH <sub>2</sub> )	HMDB0000754

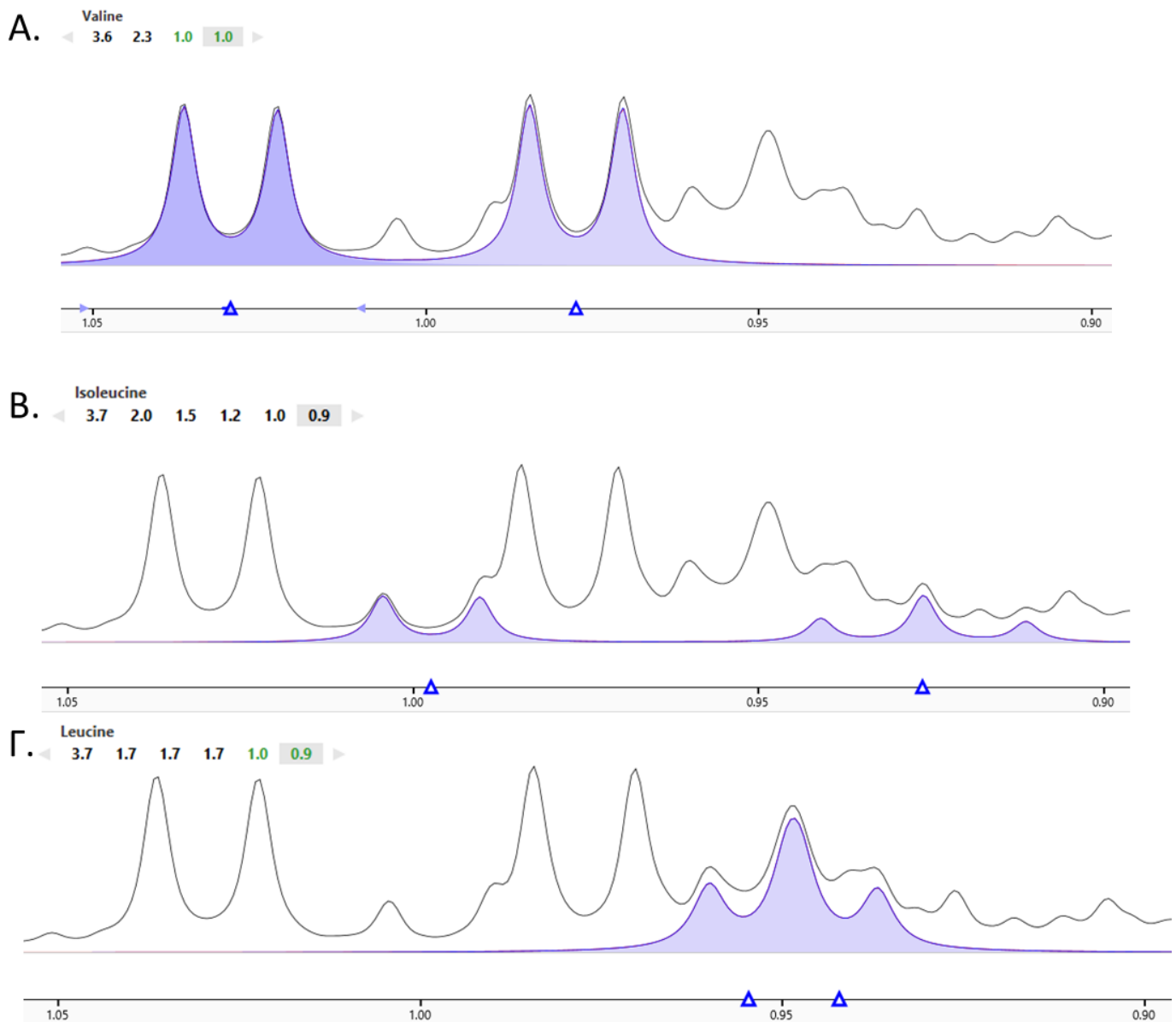
3-υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ (3-hydroxyisobutyrate)		<b>1.073</b> , 2.491, 3.546, 3.709	d(CH <sub>3</sub> ), m(CH), dd(CH <sub>2</sub> ), dd(CH <sub>2</sub> )	HMDB0000023
ακετοξικό οξύ (acetoacetate)		<b>2.285</b> , 3.454	s(CH <sub>3</sub> ), s(CH <sub>2</sub> )	HMDB0000060
αλανίνη (alanine)		<b>1.485</b> , 3.794	d(CH <sub>3</sub> ), q(CH)	HMDB0000161
βαλίνη (valine)		<b>0.995</b> , <b>1.046</b> , 2.278, 3.619	d(CH <sub>3</sub> ), d(CH <sub>3</sub> ), m(CH), d(CH)	HMDB0000883
γλουταμίνη (glutamine)		<b>2.146</b> , <b>2.455</b> , 3.779	m(CH <sub>2</sub> ), m(CH <sub>2</sub> ), t(CH)	HMDB0000641
γλουταμικό οξύ (glutamate)		<b>2.059</b> , <b>2.134</b> , <b>2.355</b> , 3.765	m(CH <sub>2</sub> ), m(CH <sub>2</sub> ), m(CH <sub>2</sub> ), dd(CH)	HMDB0000148
ηλεκτρικό οξύ (succinate)		<b>2.411</b>	s(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	HMDB0000254
ισολευκίνη (isoleucine)		<b>0.943</b> , <b>1.014</b> , 1.263, 1.472, 1.985, 3.679	t(CH <sub>3</sub> ), d(CH <sub>3</sub> ), m(CH <sub>2</sub> ), m(CH <sub>2</sub> ), m(CH), d(CH)	HMDB0000172
κιτρικό οξύ (citrate)		<b>2.539</b> , <b>2.674</b>	d(CH <sub>2</sub> ), d(CH <sub>2</sub> )	HMDB0000094
λευκίνη (leucine)		<b>0.959</b> , <b>0.971</b> , 1.718, 3.744	d(CH <sub>3</sub> ), d(CH <sub>3</sub> ), m(CH <sub>3</sub> ), m(CH)	HMDB0000687
N-ισοβαλεροϋλογλυκίνη (N-isovalerylglycine)		<b>0.925</b> , 2.162, 3.747	d(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , d(CH <sub>2</sub> ), d(CH <sub>2</sub> )	HMDB0000678

πυροσταφυλικό οξύ (pyruvate)		<b>2.377</b>	s(CH <sub>3</sub> )	HMDB0000243
φουμαρικό οξύ (fumarate)		<b>6.511</b>	s(CH <sub>2</sub> )	HMDB0000134

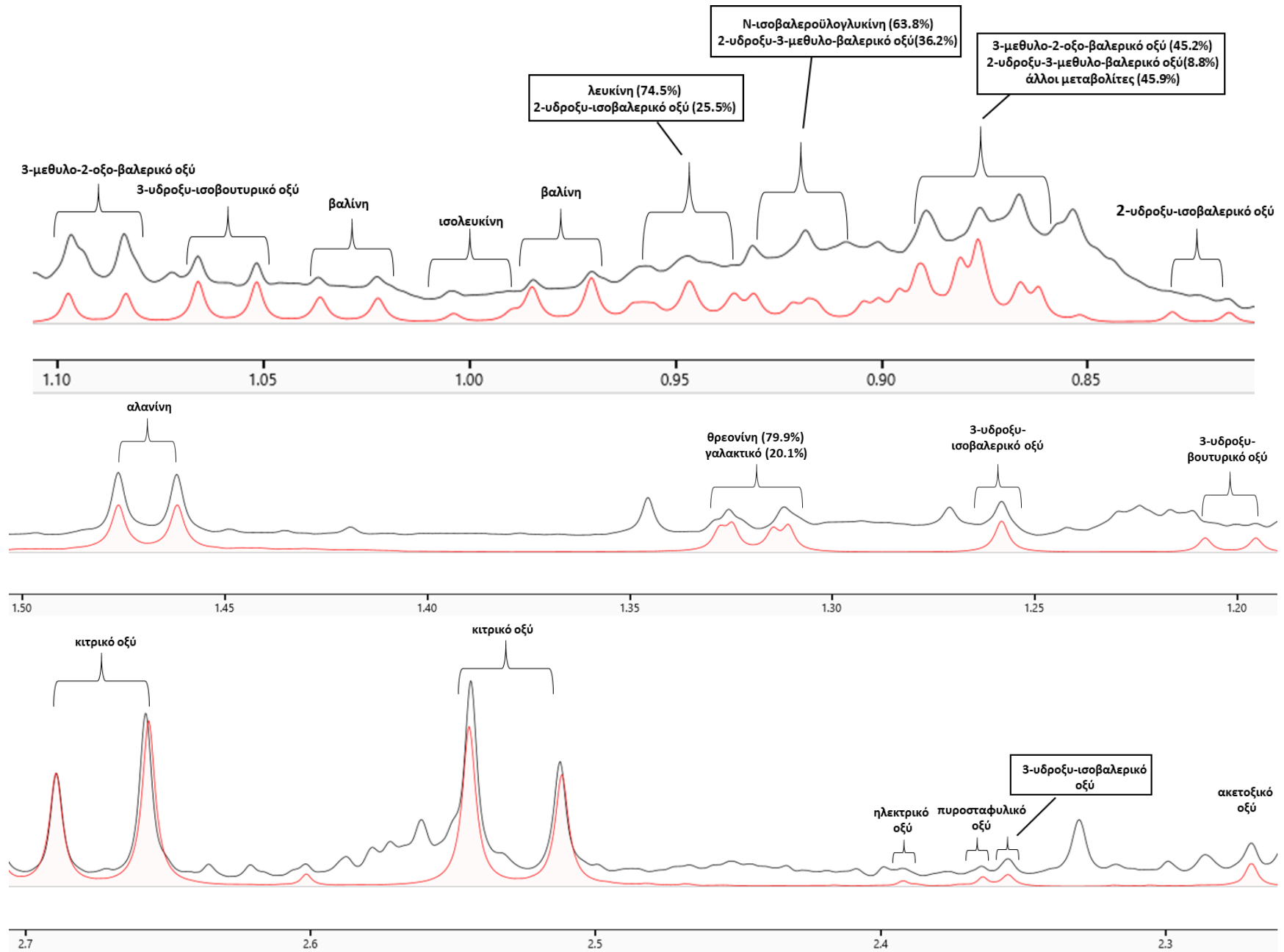
**Πιν. 9:** Χημική δομή των BCAAs και των μεταβολιτών που σχετίζονται με τον καταβολισμό τους καθώς και τα φασματοσκοπικά τους χαρακτηριστικά στο <sup>1</sup>HNMR φάσμα ορού και ούρων (αριθμός πρωτονίων, πολλαπλότητα και χημική μετατόπιση των κορυφών τους σε ppm ως προς την ουσία αναφοράς TSP), HMDB ID, s:singlet, d:doublet, t: triplet, m:multiple.

### 3.4 Ποσοτικοποίηση των BCAAs και των καταβολικών τους προϊόντων

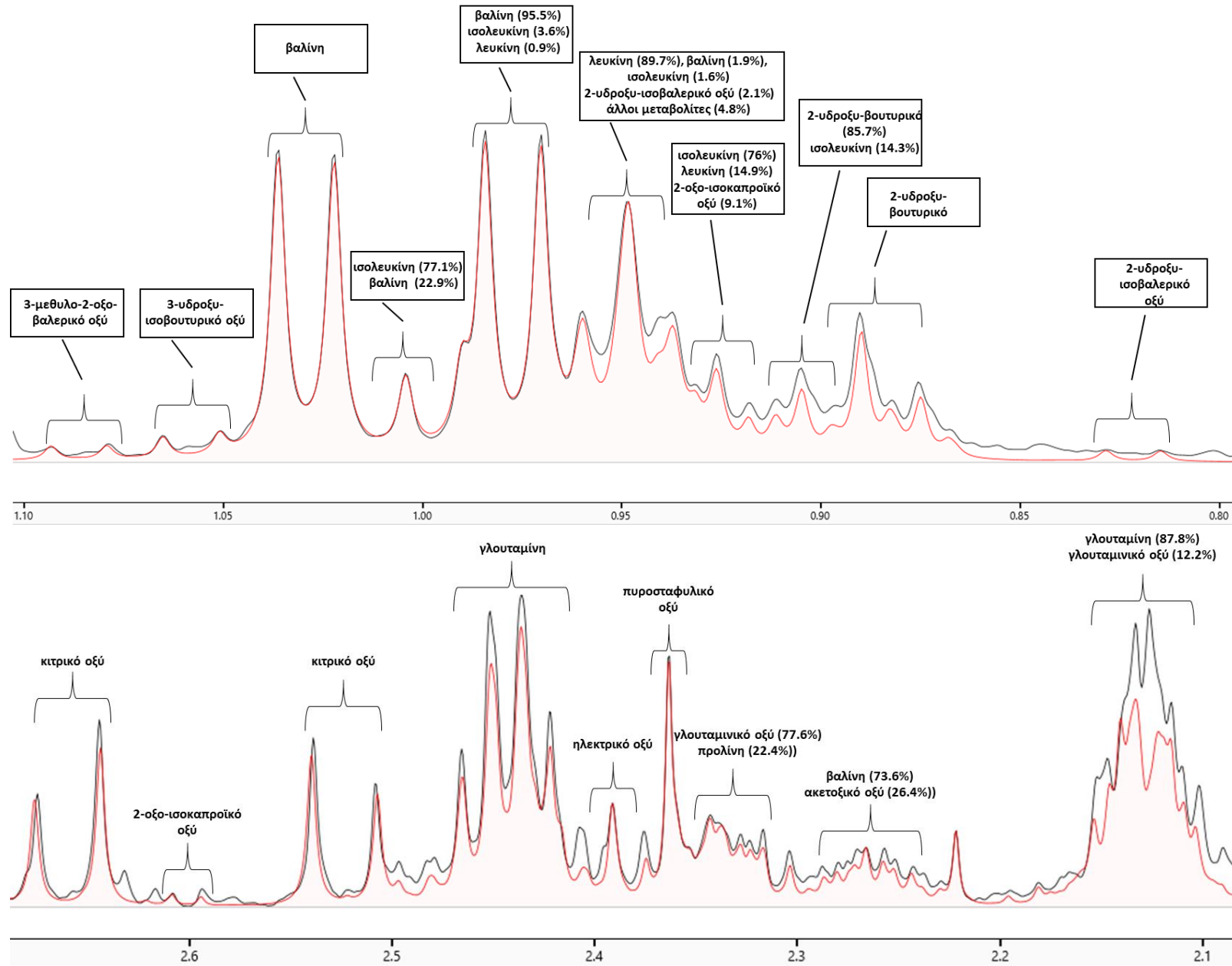
Με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος Chenomx όπως προαναφέρθηκε πραγματοποιήθηκε από τα φάσματα  $^1\text{H}$ NMR φιλτραρισμένου ορού αίματος και ούρων ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση 17 και 16 μεταβολιτών αντίστοιχα στα δύο βιολογικά υγρά. Στην **εικόνα 43** παρουσιάζεται η ποσοτικοποίηση των τριών αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας και στις **εικόνες 44 & 45** η ποσοτικοποίηση των BCAAs και των μεταβολιτών που σχετίζονται με τον καταβολισμό τους στα ούρα και στον ορό αντίστοιχα από το πρόγραμμα Chenomx NMR Suite.



**Εικ.43:** Ποσοτικοποίηση Α. βαλίνης Β. ισολευκίνης Γ. λευκίνης από το πρόγραμμα Chenomx NMR Suite.



**Εικ.44:** Ποσοτικοποίηση των BCAAs και των μεταβολιτών που σχετίζονται με τον καταβολισμό τους στα ούρα με το πρόγραμμα Chenomx NMR Suite.



Εικ.45: Ποσοτικοποίηση των BCAAs και των μεταβολιτών που σχετίζονται με τον καταβολισμό τους στον ορό με το πρόγραμμα Chenomx NMR Suite

### 3.4.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (ΣΔΤ2) - διερεύνηση της επίδρασης της δαπαγλιφλοζίνης στον καταβολισμό των BCAAs

Για τη διερεύνηση της διαταραχής του καταβολισμού των BCAAs και της επίδρασης των αναστολέων συμμεταφορέα νατρίου – γλυκόζης (δαπαγλιφλοζίνη) σε ασθενείς με ΣΔΤ2, συλλέχτηκαν δείγματα ορού και ούρων υγιών ατόμων και ασθενών με ΣΔΤ2.

#### 3.4.1.1 Ορός αίματος

Στον **πιν.10** παρουσιάζεται η συγκέντρωση των BCAAs καθώς και των μεταβολιτών που σχετίζονται με τον καταβολισμό τους στον «απαλλαγμένο από μακρομόρια» ορό υγιών και διαβητικών ασθενών πριν και μετά τη χορήγηση αναστολέων συμμεταφορέα νατρίου – γλυκόζης (SGLT2, δαπαγλιφλοζίνη).

Πριν τη χορήγηση δαπαγλιφλοζίνης, συγκριτικά με τους υγιείς, στους διαβητικούς ασθενείς ανευρέθηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα των τριών BCAAs (βαλίνη, λευκίνη ισολευκίνη), 3-μεθυλο-2-οξο-βαλερικού οξέος (α-κετοξύ ισολευκίνης), 3-υδροξυ-ισοβουτυρικού οξέος (ενδιάμεσο του καταβολισμού της βαλίνης), 3-υδροξυ-βουτυρικού οξέος (κετονόσωμα), των αμινοξέων αλανίνη και γλουταμινικό, πυροσταφυλικού οξέος καθώς και των ενδιάμεσων του κύκλου του κιτρικού οξέος 2-οξο-γλουταρικό και κιτρικό οξύ και στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα των προϊόντων του καταβολισμού της λευκίνης 2-οξο-ισοκαπροϊκού οξέος (α-κετοξύ λευκίνης) και 3-υδροξυ-ισοβαλερικού οξέος και γλουταμίνης .

Με το πέρας των τριών μηνών χορήγησης της δαπαγλιφλοζίνης καταγράφηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των κετονοσωμάτων (3-υδροξυ-βουτυρικό οξύ & ακετοξικό οξύ) καθώς και του κιτρικού οξέος στον ορό των διαβητικών ασθενών.

Μεταβολίτες ορού αίματος ( $\mu\text{M}$ )	Υγιή άτομα	Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2		Τιμή p
		Μεφορμίνη	Μεφορμίνη & Δαπαγλιφλοζίνη	
2-Οξο-γλουταρικό οξύ	12.81 $\pm$ 4.45	16.47 $\pm$ 7.94**	17.75 $\pm$ 10.08	NS
2-Οξο-ισοκαπροϊκό οξύ	19.00 $\pm$ 5.87	15.43 $\pm$ 3.82**	16.20 $\pm$ 4.13	NS
2-Υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ	9.59 $\pm$ 4.26	11.21 $\pm$ 4.57	11.18 $\pm$ 4.30	NS
3-Μεθυλο-2-οξο-βαλερικό οξύ	10.23 $\pm$ 2.36	14.23 $\pm$ 4.27***	14.35 $\pm$ 4.18	NS
3-Υδροξυ-βουτυρικό οξύ	58.78 $\pm$ 24.34	78.83 $\pm$ 44.03*	101.81 $\pm$ 62.63	<0.01
3-Υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ	10.33 $\pm$ 5.41	5.92 $\pm$ 3.45***	6.50 $\pm$ 3.63	NS
3-Υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ	6.71 $\pm$ 2.41	10.38 $\pm$ 3.62***	10.11 $\pm$ 2.88	NS
Ακετοξικό οξύ	26.08 $\pm$ 17.34	23.86 $\pm$ 18.32	30.23 $\pm$ 24.77	<0.05
Αλανίνη	490.58 $\pm$ 100.93	576.85 $\pm$ 120.98***	585.56 $\pm$ 125.75	NS
Βαλίνη	247.37 $\pm$ 37.21	356.23 $\pm$ 64.10***	358.71 $\pm$ 76.73	NS
Γλουταμίνη	526.24 $\pm$ 89.80	470.85 $\pm$ 68.07**	460.55 $\pm$ 83.97	NS
Γλουταμινικό οξύ	105.19 $\pm$ 53.86	153.05 $\pm$ 42.17***	161.64 $\pm$ 51.23	NS
Ηλεκτρικό οξύ	12.82 $\pm$ 5.29	11.16 $\pm$ 4.56	12.10 $\pm$ 6.77	NS
Ισολευκίνη	67.50 $\pm$ 13.22	103.34 $\pm$ 19.67***	106.06 $\pm$ 25.27	NS
Κιτρικό οξύ	151.40 $\pm$ 32.95	182.57 $\pm$ 44.95***	195.04 $\pm$ 41.81	<0.05
Λευκίνη	152.85 $\pm$ 31.44	193.00 $\pm$ 37.87***	200.41 $\pm$ 44.62	NS
Πυροσταφυλικό οξύ	52.35 $\pm$ 21.50	104.78 $\pm$ 50.45***	101.42 $\pm$ 47.71	NS

**Πιν.10:** Συγκέντρωση ( $\mu\text{M}$ ) των BCAAs καθώς και των μεταβολιτών που σχετίζονται με τον καταβολισμό τους σε φιλτραρισμένο ορό υγιών και διαβητικών ασθενών πριν και μετά τη χορήγηση αναστολέων συμμεταφορέα νατρίου – γλυκόζης (δαπαγλιφλοζίνη), \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  και \* $p < 0.05$  ως προς τους υγιείς, τιμή p για τη σύγκριση ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2 πριν και μετά τη χορήγηση δαπαγλιφλοζίνης



### 3.4.1.2 Ούρα

Στον **πιν.11** παρουσιάζεται η συγκέντρωση των BCAAs καθώς και των μεταβολιτών που σχετίζονται με τον καταβολισμό τους στα ούρα των υγιών και διαβητικών ασθενών πριν και μετά τη χορήγηση αναστολέων συμμεταφορέα νατρίου – γλυκόζης (δαπαγλιφλοζίνη).

Πριν τη χορήγηση δαπαγλιφλοζίνης, συγκριτικά με τους υγιείς, στους διαβητικούς ασθενείς ανευρέθηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα των τριών BCAAs (βαλίνη, λευκίνη ισολευκίνη), των προϊόντων καταβολισμού της ισολευκίνης 3-μεθυλο-2-οξο-βαλερικό οξύ (α-κετοξύ ισολευκίνης) και 2-υδροξυ-3-μεθυλο-βαλερικό οξύ, του καταβολικού ενδιάμεσου της βαλίνης (2-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ) του παραπροϊόντος του καταβολισμού της λευκίνης (N-ισοβαλεροϋλογλυκίνη) των κετονοσωμάτων (3-υδροξυ-βουτυρικό οξύ, ακετοξικό οξύ) και της αλανίνης.

Η χορήγηση δαπαγλιφλοζίνης συνδέθηκε με στατιστικά σημαντική αύξηση της απέκκρισης των δύο εκ των BCAAs (βαλίνη και λευκίνη). Επίσης, στα ούρα των ασθενών βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα των καταβολικών προϊόντων της βαλίνης 2-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ, της ισολευκίνης 2-υδροξυ-3-μεθυλο-βαλερικό οξύ και της λευκίνης 3-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ, των κετονοσωμάτων (3-υδροξυ-βουτυρικό οξύ & ακετοξικό οξύ), της αλανίνης καθώς και του κιτρικού οξέος. Αντίθετα τα επίπεδα της N-ισοβαλεροϋλογλυκίνης, παραπροϊόν του καταβολισμού της λευκίνης βρέθηκαν στατιστικά μειωμένα.

Μεταβολίτες ούρων ( $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ κρεατινίνης)	Υγιή άτομα	Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2		Τιμή p
		Μετοφορμίνη	Μετοφορμίνη & Δαπαγλιφλοζίνη	
2-Υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ	1.43 ± 0.59	4.72 ± 1.62**	5.20 ± 1.76	<0.0005
2-Υδροξυ-3-μεθυλο-βαλερικό οξύ	3.87 ± 1.67	11.46 ± 6.34**	13.45 ± 7.58	<0.0005
3-Μεθυλο-2-οξο-βαλερικό οξύ	3.98 ± 2.05	12.23 ± 7.54**	11.11 ± 7.42	NS
3-Υδροξυ-βουτυρικό οξύ	12.93 ± 13.10	46.00 ± 41.78**	55.88 ± 44.57	<0.0005
3-Υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ	5.16 ± 1.73	4.78 ± 2.83	5.64 ± 3.59	<0.0005
3-Υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ	11.12 ± 10.21	12.34 ± 10.96	13.10 ± 8.58	NS
Ακετοξικό οξύ	14.08 ± 13.53	43.68 ± 16.68**	51.73 ± 19.39	<0.0005
Αλανίνη	21.25 ± 9.36	44.63 ± 30.47**	56.45 ± 25.80	<0.0001
Βαλίνη	3.63 ± 1.28	8.56 ± 4.10**	11.58 ± 6.43	<0.0001
Ηλεκτρικό οξύ	5.29 ± 3.39	12.49 ± 5.89	13.20 ± 9.98	NS
Ισολευκίνη	2.25 ± 1.01	6.46 ± 3.62*	7.32 ± 4.96	NS
Κιτρικό οξύ	347.10 ± 181.68	357.30 ± 233.27	405.12 ± 228.75	<0.0005
Λευκίνη	2.50 ± 1.28	11.27 ± 4.31**	13.81 ± 7.40	<0.0005
N-Ισοβαλεροϋλογλυκίνη	1.37 ± 0.66	3.39 ± 1.91**	2.83 ± 1.19	<0.0005
Πυροσταφυλικό οξύ	4.40 ± 2.52	5.56 ± 3.17	5.50 ± 2.98	NS
Φουμαρικό οξύ	0.80 ± 0.56	1.00 ± 0.72	0.98 ± 0.74	NS

**Πιν.11:** Συγκέντρωση ( $\mu\text{mol}/\text{mmol}$  κρεατινίνη) των BCAAs καθώς και των μεταβολιτών που σχετίζονται με τον καταβολισμό τους στα ούρα υγιών και διαβητικών ασθενών πριν και μετά τη χορήγηση αναστολέων συμμεταφορέα νατρίου – γλυκόζης (δαπαγλιφλοζίνη), \*\* $p < 0.0001$  και \* $p < 0.0005$  ως προς τους υγιείς, τιμή p για τη σύγκριση ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2 πριν και μετά τη χορήγηση δαπαγλιφλοζίνης (Bonferroni correction)

### 3.4.2 Διαβητική Νεφροπάθεια (ΔΝ)

Για την εύρεση πιθανών βιοδεικτών που θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην πρόωπη διάγνωση της Διαβητικής Νεφροπάθειας, έγινε ποσοτικοποίηση των BCAAs και των μεταβολιτών που σχετίζονται με τον καταβολισμό τους στον ορό του αίματος και στα ούρα διαβητικών ασθενών που εμφάνισαν νεφροπάθεια 3 χρόνια μετά τη συλλογή του δείγματος και σύγκριση με ασθενείς με ΣΔΤ2 χωρίς επιπλοκές.

## 3.4.2.1 Ορός αίματος

Σύμφωνα με τον **πιν.12**, στον ορό του αίματος των ασθενών 3 χρόνια πριν τη διάγνωση ΔΝ συγκριτικά με τους ασθενείς με ΣΔΤ2 χωρίς επιπλοκές, βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα των προϊόντων καταβολισμού της λευκίνης και της βαλίνης (2-οξο-ισοκαπροϊκό οξύ και 3-υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ) και της γλουταμίνης ενώ τα επίπεδα των τριών BCAAs (βαλίνη, λευκίνη, ισολευκίνη), του α-κετοξέος της ισολευκίνης 3-μεθυλο-2-οξο-βαλερικό οξύ καθώς και του γλουταμινικού οξέος βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα.

Μεταβολίτες ορού αίματος (μM)	Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2 (χωρίς επιπλοκές) N = 25	3 χρόνια πριν τη διάγνωση Διαβητικής Νεφροπάθειας N = 22	Τιμή p
2-Οξο-γλουταρικό οξύ	17.11 ± 9.03	18.88 ± 7.50	NS
2-Οξο-ισοκαπροϊκό οξύ	15.62 ± 3.72	19.88 ± 8.61	<0.05
2-Υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ	11.85 ± 4.83	14.65 ± 7.57	NS
3-Μεθυλο-2-οξο-βαλερικό οξύ	14.08 ± 3.91	11.73 ± 3.60	<0.05
3-Υδροξυ-βουτυρικό οξύ	93.07 ± 88.87	103.37 ± 83.72	NS
3-Υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ	6.30 ± 2.82	6.87 ± 2.68	NS
3-Υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ	9.96 ± 3.77	13.49 ± 3.67	<0.01
Ακετοξικό οξύ	25.71 ± 16.13	35.59 ± 23.77	NS
Αλανίνη	574.52 ± 105.78	608.61 ± 154.43	NS
Βαλίνη	346.64 ± 48.11	282.60 ± 63.57	<0.001
Γλουταμίνη	483.47 ± 71.39	582.21 ± 120.03	<0.01
Γλουταμινικό οξύ	154.85 ± 47.34	101.47 ± 30.16	<0.001
Ηλεκτρικό οξύ	11.52 ± 5.35	13.99 ± 6.85	NS
Ισολευκίνη	101.97 ± 17.12	69.28 ± 22.69	<0.001
Κιτρικό οξύ	183.35 ± 44.24	176.82 ± 41.54	NS
Λευκίνη	190.18 ± 32.90	156.83 ± 43.13	<0.01
Πυροσταφυλικό οξύ	92.01 ± 37.94	82.96 ± 38.20	NS

**Πιν.12:** Συγκέντρωση (μM) των BCAAs και των μεταβολιτών που σχετίζονται με τον καταβολισμό τους σε φιλτραρισμένο ορό διαβητικών ασθενών χωρίς επιπλοκές και ασθενών 3 χρόνια πριν τη διάγνωση διαβητικής νεφροπάθειας, τιμές  $p < 0.05$  στατιστικά σημαντικές.

## 3.4.2.2 Ούρα

Στα ούρα των διαβητικών ασθενών 3 χρόνια πριν τη διάγνωση ΔΝ συγκριτικά με τους ασθενείς με ΣΔΤ2 χωρίς επιπλοκές, βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα των τριών BCAAs, των προϊόντων καταβολισμού της ισολευκίνης 3-μεθυλο-2-οξο-βαλερικό οξύ και 2-υδροξυ-3-μεθυλο-βαλερικό οξύ, του καταβολικού ενδιάμεσου της βαλίνης (2-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ), του παραπροϊόντος του καταβολισμού της λευκίνης (N-ισοβαλεροϋλογλυκίνη) των κετονοσωμάτων (3-υδροξυ-βουτυρικό οξύ & ακετοξικό οξύ), των ενδιάμεσων του κύκλου του κιτρικού οξέος (κιτρικό οξύ, ηλεκτρικό οξύ) και της αλανίνης (πιν. 13).

Μεταβολίτες ούρων ( $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ κρεατινίνης)	Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2 (χωρίς επιπλοκές) N=25	3 χρόνια πριν τη διάγνωση Διαβητικής Νεφροπάθειας N = 22	Τιμή p
2-Υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ	4.75 ± 1.41	1.51 ± 0.58	<0.001
2-Υδροξυ-3-μεθυλο-βαλερικό οξύ	10.37 ± 7.18	4.70 ± 2.77	<0.01
3-Μεθυλο-2-οξο-βαλερικό οξύ	10.57 ± 6.79	4.41 ± 2.47	<0.001
3-Υδροξυ-βουτυρικό οξύ	53.52 ± 46.26	4.75 ± 2.30	<0.01
3-Υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ	4.27 ± 2.19	3.84 ± 2.52	NS
3-Υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ	9.68 ± 5.63	7.13 ± 4.77	NS
Ακετοξικό οξύ	50.56 ± 20.10	8.19 ± 3.03	<0.001
Αλανίνη	41.39 ± 26.30	21.15 ± 19.53	<0.01
Βαλίνη	8.11 ± 3.73	4.08 ± 2.82	<0.001
Ηλεκτρικό οξύ	13.09 ± 5.62	3.11 ± 1.80	<0.001
Ισολευκίνη	6.32 ± 3.70	2.41 ± 2.40	<0.001
Κιτρικό οξύ	336.45 ± 225.22	174.96 ± 144.84	<0.01
Λευκίνη	11.52 ± 3.68	3.46 ± 2.67	<0.001
N-Ισοβαλεροϋλογλυκίνη	3.38 ± 2.04	1.48 ± 0.51	<0.01
Πυροσταφυλικό οξύ	5.18 ± 3.21	4.17 ± 2.42	NS
Φουμαρικό οξύ	0.95 ± 0.75	0.92 ± 1.01	NS

**Πιν.13:** Συγκέντρωση ( $\mu\text{mol}/\text{mmol}$  κρεατινίνης) των BCAAs και των μεταβολιτών που σχετίζονται με τον καταβολισμό τους στα ούρα διαβητικών ασθενών χωρίς επιπλοκές και ασθενών 3 χρόνια πριν τη διάγνωση διαβητικής νεφροπάθειας, τιμές  $p < 0.05$  στατιστικά σημαντικές.

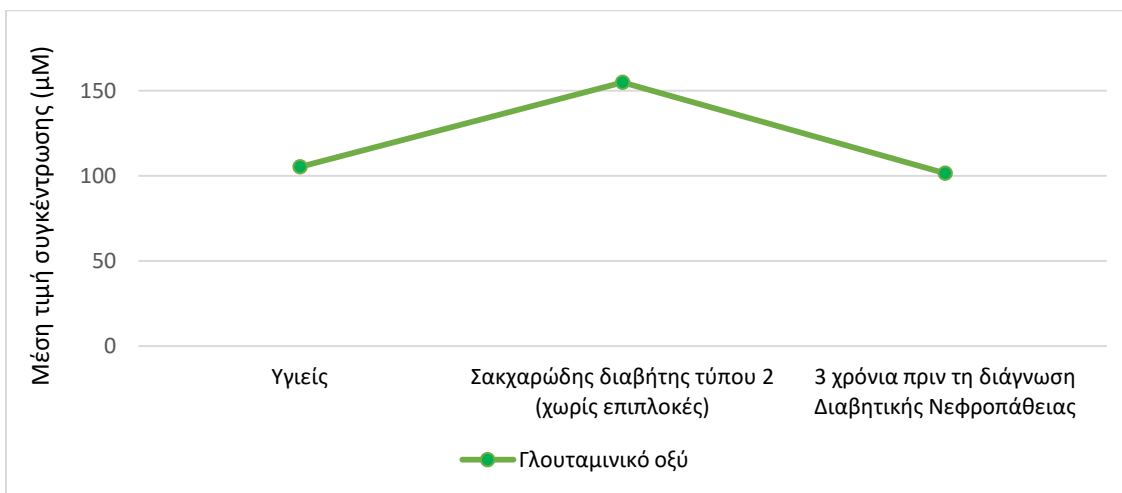
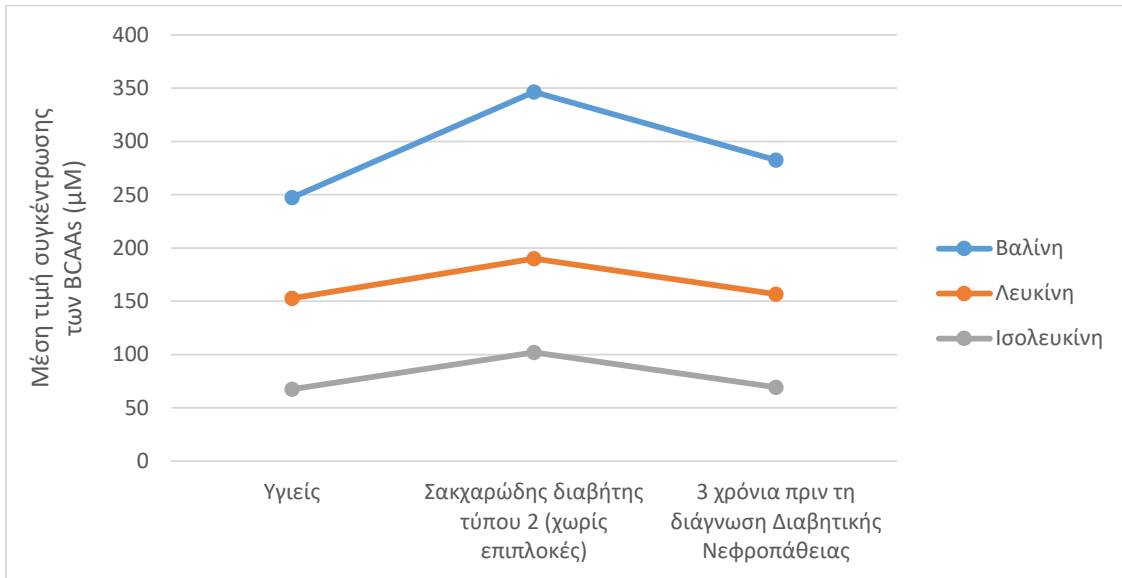
Στον **πίνακα 14**, έγινε σύγκριση των συγκεντρώσεων των BCAAs στον ορό του αίματος διαβητικών ασθενών που εμφάνισαν νεφροπάθεια 3 χρόνια μετά τη συλλογή του δείγματος με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις υγιών ατόμων. Στον ορό των διαβητικών ασθενών 3 χρόνια πριν τη διάγνωση Νεφροπάθειας βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα των ενδιάμεσων του κύκλου του κιτρικού (2-οξογλουταμικό ( $p < 0.01$ ) και κιτρικό ( $p < 0.05$ )), των καταβολικών ενδιάμεσων της βαλίνης (2-υδροξυ-ισοβαλερικό ( $p < 0.01$ ) και 3-υδροξυ-ισοβουτυρικό ( $p < 0.001$ )), των αμινοξέων (γλουταμίνη ( $p < 0.001$ ), βαλίνη ( $p < 0.001$ ) και αλανίνη ( $p < 0.01$ )), 3-υδροξυβουτυρικού ( $p < 0.05$ ) και πυροσταφυλικού ( $p < 0.01$ ), ενώ τα επίπεδα του καταβολικού ενδιάμεσου της λευκίνης (3-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ ( $p < 0.01$ )) βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα (**πίνακας 14**).

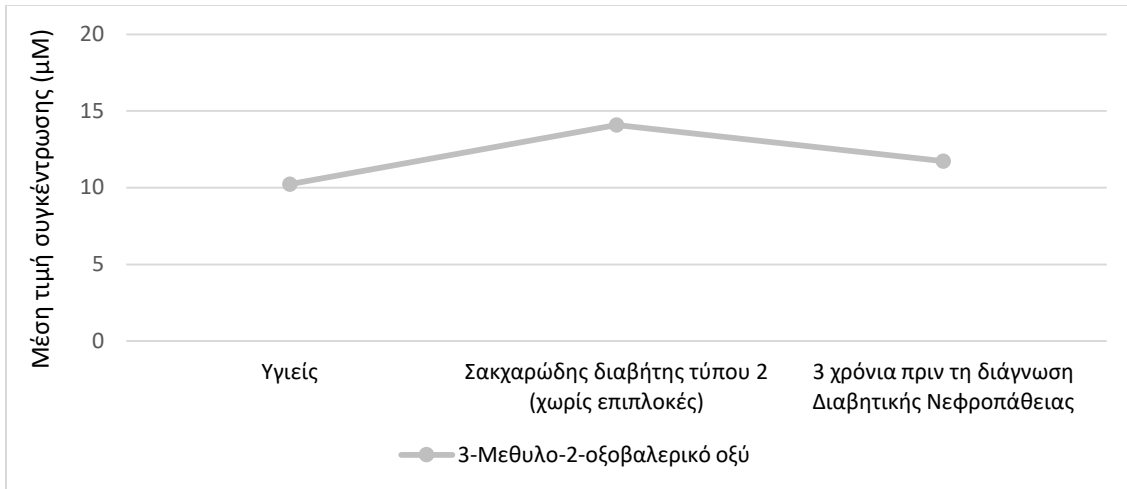
Μεταβολίτες ορού αίματος (μM)	Υγιείς N = 53	Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2 (χωρίς επιπλοκές) N = 25	3 χρόνια πριν τη διάγνωση Διαβητικής Νεφροπάθειας N = 22	Τιμή p
2-Οξο-γλουταμικό οξύ	12.81 ± 4.45	17.11 ± 9.03*	18.88 ± 7.50**	NS
2-Οξο-ισοκαπροϊκό οξύ	19.00 ± 5.87	15.62 ± 3.72**	19.88 ± 8.61	<0.05
2-Υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ	9.59 ± 4.26	11.85 ± 4.83	14.65 ± 7.57**	NS
3-Μεθυλο-2-οξο-βαλερικό οξύ	10.23 ± 2.36	14.08 ± 3.91***	11.73 ± 3.60	<0.05
3-Υδροξυ-βουτυρικό οξύ	58.78 ± 24.34	93.07 ± 88.87	103.37 ± 83.72*	NS
3-Υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ	10.33 ± 5.41	6.30 ± 2.82***	6.87 ± 2.68**	NS
3-Υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ	6.71 ± 2.41	9.96 ± 3.77***	13.49 ± 3.67***	<0.01
Ακετοξικό οξύ	26.08 ± 17.34	25.71 ± 16.13	35.59 ± 23.77	NS
Αλανίνη	490.58 ± 100.93	574.52 ± 105.78**	608.61 ± 154.43**	NS
Βαλίνη	247.37 ± 37.21	346.64 ± 48.11***	282.60 ± 63.57*	<0.001
Γλουταμίνη	526.24 ± 89.80	483.47 ± 71.39*	582.21 ± 120.03*	<0.01
Γλουταμινικό οξύ	105.19 ± 53.86	154.85 ± 47.34***	101.47 ± 30.16	<0.001
Ηλεκτρικό οξύ	12.82 ± 5.29	11.52 ± 5.35	13.99 ± 6.85	NS
Ισολευκίνη	67.50 ± 13.22	101.97 ± 17.12***	69.28 ± 22.69	<0.001
Κιτρικό οξύ	151.40 ± 32.95	183.35 ± 44.24**	176.82 ± 41.54*	NS
Λευκίνη	152.85 ± 31.44	190.18 ± 32.90***	156.83 ± 43.13	<0.01
Πυροσταφυλικό οξύ	52.35 ± 21.50	92.01 ± 37.94***	82.96 ± 38.20**	NS

*Πιν.14: Σύγκριση των BCAAs και των μεταβολιτών που σχετίζονται με τον καταβολισμό τους στον ορό υγιών ατόμων, διαβητικών ασθενών χωρίς επιπλοκές και διαβητικών ασθενών 3*

χρόνια πριν τη διάγνωση νεφροπάθειας,  $***p<0.001$ ,  $**p<0.01$  και  $*p<0.05$  ως προς τους υγιείς, τιμή  $p$  για τη σύγκριση ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2 χωρίς επιπλοκές με διαβητικούς ασθενείς 3 χρόνια πριν τη διάγνωση Νεφροπάθειας.

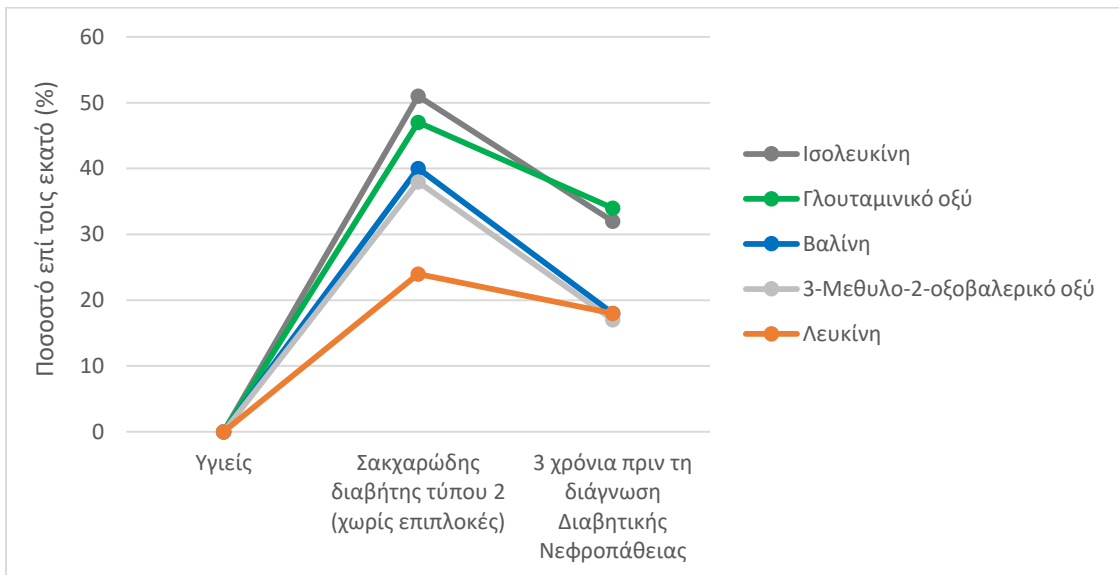
Στο **σχήμα 1** παρουσιάζεται η μέση συγκέντρωση των BCAAs και των μεταβολιτών που σχετίζονται με τον καταβολισμό τους στον ορό, των οποίων ο μέσος όρος συγκέντρωσης αυξάνεται στο ΣΔΤ2 και μειώνεται 3 χρόνια πριν τη διάγνωση Διαβητικής Νεφροπάθειας.





**Σχήμα 1:** Μέση συγκέντρωση των BCAAs και των μεταβολιτών που σχετίζονται με τον καταβολισμό τους των οποίων ο μέσος όρος συγκέντρωσης αυξάνεται στο ΣΔΤ2 και μειώνεται στη ΔΝ.

Στο **σχήμα 2** και στον **πίνακα 15** παρουσιάζονται τα ποσοστά διακύμανσης της μέσης συγκέντρωσης των παραπάνω μεταβολιτών.



Μεταβολίτες ορού αίματος (μM)	Υγιείς N = 53	Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2 (χωρίς επιπλοκές) N = 25	3 χρόνια πριν τη διάγνωση Διαβητικής Νεφροπάθειας N = 22
3-Μεθυλο-2-οξο-βαλερικό οξύ	10.23 ± 2.36	(↑38%) 14.08 ± 3.91	(↓17%) 11.73 ± 3.60
Βαλίνη	247.37 ± 37.21	(↑40%) 346.64 ± 48.11	(↓18%) 282.60 ± 63.57
Γλουταμινικό οξύ	105.19 ± 53.86	(↑47%) 154.85 ± 47.34	(↓34%) 101.47 ± 30.16
Ισολευκίνη	67.50 ± 13.22	(↑51%) 101.97 ± 17.12	(↓32%) 69.28 ± 22.69
Λευκίνη	152.85 ± 31.44	(↑24%) 190.18 ± 32.90	(↓18%) 156.83 ± 43.13

**Σχ.2 και Πιν.15:** Ποσοστά διακύμανσης της μέσης συγκέντρωσης των BCAAs και των μεταβολιτών που σχετίζονται με τον καταβολισμό τους των οποίων ο μέσος όρος συγκέντρωσης αυξάνεται στο ΣΔΤ2 και μειώνεται 3 χρόνια πριν τη διάγνωση Διαβητικής Νεφροπάθειας.

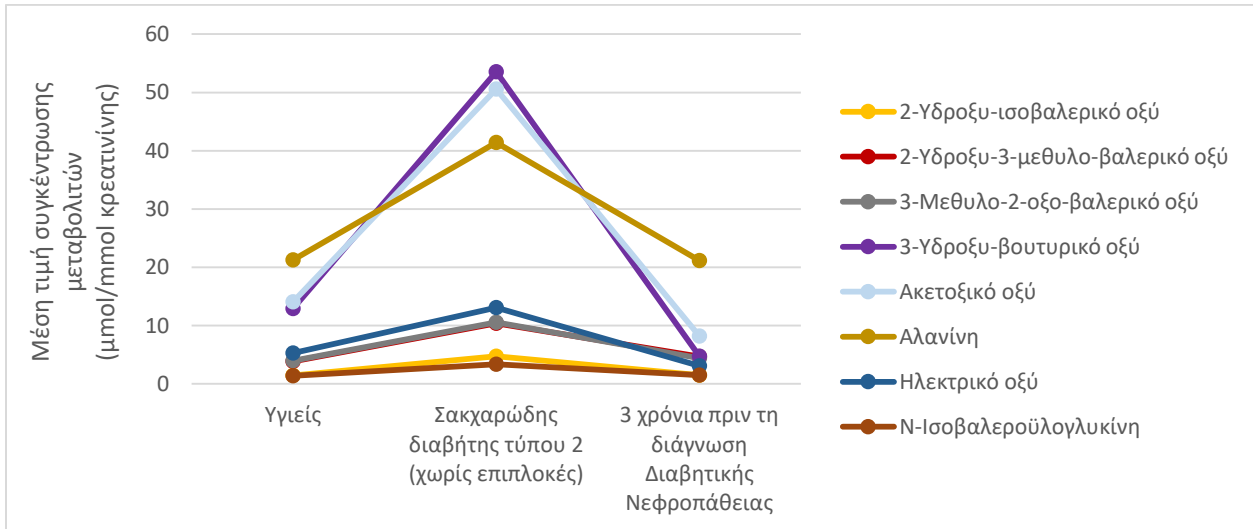
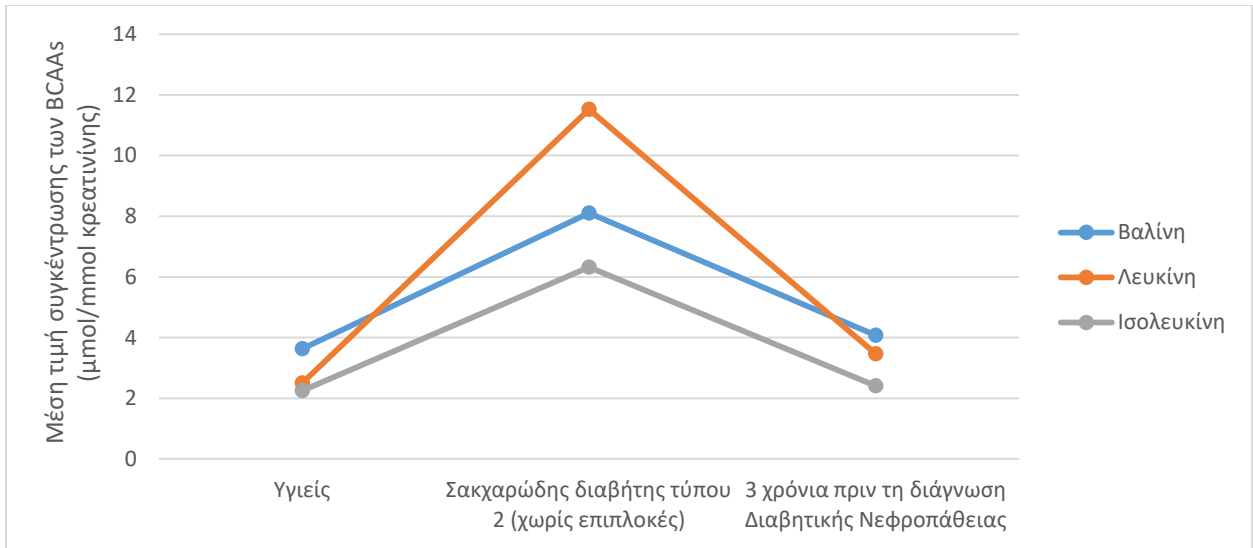
Στον **πίνακα 16**, έγινε σύγκριση των συγκεντρώσεων των BCAAs στα ούρα διαβητικών ασθενών που εμφάνισαν νεφροπάθεια 3 χρόνια μετά τη συλλογή του δείγματος με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις υγιών ατόμων. Στα ούρα των διαβητικών ασθενών 3 χρόνια πριν τη διάγνωση Νεφροπάθειας βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα των ενδιάμεσων του κύκλου του κιτρικού (ηλεκτρικό ( $p < 0.01$ ) και κιτρικό ( $p < 0.001$ )) των κετονοσωμάτων (ακετοξικό ( $p < 0.01$ ) και 3-υδροξυβουτυρικό ( $p < 0.001$ )), του καταβολικού ενδιάμεσου της λευκίνης (3-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ ( $p < 0.05$ )) ενώ η συγκέντρωση της λευκίνης βρέθηκε στατιστικά σημαντικά αυξημένη ( $p < 0.05$ ) (**πίνακας 16**).

Μεταβολίτες ούρων (μmol/mmol κρεατινίνη)	Υγιείς N=53	Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2 (χωρίς επιπλοκές) N=25	3 χρόνια πριν τη διάγνωση Διαβητικής Νεφροπάθειας N = 22	Τιμή p
2-Υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ	1.43 ± 0.59	4.75 ± 1.41***	1.51 ± 0.58	<0.001
2-Υδροξυ-3-μεθυλο-βαλερικό οξύ	3.87 ± 1.67	10.37 ± 7.18***	4.70 ± 2.77	<0.01
3-Μεθυλο-2-οξο-βαλερικό οξύ	3.98 ± 2.05	10.57 ± 6.79***	4.41 ± 2.47	<0.001
3-Υδροξυ-βουτυρικό οξύ	12.93 ± 13.10	53.52 ± 46.26**	4.75 ± 2.30***	<0.01
3-Υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ	5.16 ± 1.73	4.27 ± 2.19	3.84 ± 2.52*	NS
3-Υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ	11.12 ± 10.21	9.68 ± 5.63	7.13 ± 4.77	NS
Ακετοξικό οξύ	14.08 ± 13.53	50.56 ± 20.10***	8.19 ± 3.03**	<0.001
Αλανίνη	21.25 ± 9.36	41.39 ± 26.30**	21.15 ± 19.53	<0.01
Βαλίνη	3.63 ± 1.28	8.11 ± 3.73***	4.08 ± 2.82	<0.001
Ηλεκτρικό οξύ	5.29 ± 3.39	13.09 ± 5.62***	3.11 ± 1.80**	<0.001
Ισολευκίνη	2.25 ± 1.01	6.32 ± 3.70***	2.41 ± 2.40	<0.001
Κιτρικό οξύ	347.10 ± 181.68	336.45 ± 225.22	174.96 ± 144.84***	<0.01
Λευκίνη	2.50 ± 1.28	11.52 ± 3.68***	3.46 ± 2.67*	<0.001
N-Ισοβαλεροϋλογλυκίνη	1.37 ± 0.66	3.38 ± 2.04***	1.48 ± 0.51	<0.01
Πυροσταφυλικό οξύ	4.40 ± 2.52	5.18 ± 3.21	4.17 ± 2.42	NS
Φουμαρικό οξύ	0.80 ± 0.56	0.95 ± 0.75	0.92 ± 1.01	NS



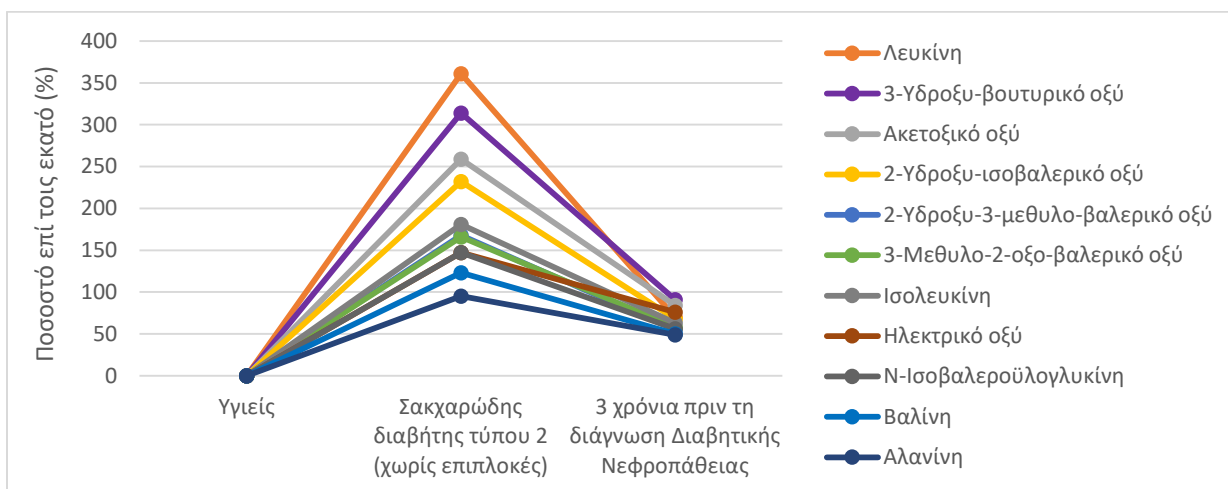
**Πιν.16:** Συγκέντρωση των BCAAs και των μεταβολιτών που σχετίζονται με τον καταβολισμό τους στα ούρα υγιών ατόμων, διαβητικών ασθενών χωρίς επιπλοκές και διαβητικών ασθενών 3 χρόνια πριν τη διάγνωση νεφροπάθειας, \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  και \* $p < 0.05$  ως προς τους υγιείς, τιμή  $p$  για τη σύγκριση ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2 χωρίς επιπλοκές με διαβητικούς ασθενείς 3 χρόνια πριν τη διάγνωση Νεφροπάθειας.

Στο **σχήμα 3** παρουσιάζεται η μέση συγκέντρωση των BCAAs και των μεταβολιτών που σχετίζονται με τον καταβολισμό τους στα ούρα, των οποίων ο μέσος όρος συγκέντρωσης αυξάνεται στο ΣΔΤ2 και μειώνεται 3 χρόνια πριν τη διάγνωση Διαβητικής Νεφροπάθειας.



**Σχήμα 3:** Μέση συγκέντρωση των BCAAs και των μεταβολιτών που σχετίζονται με τον καταβολισμό τους των οποίων ο μέσος όρος συγκέντρωσης αυξάνεται στο ΣΔΤ2 και μειώνεται 3 χρόνια πριν τη διάγνωση Διαβητικής Νεφροπάθειας.

Στο **σχήμα 4** και στον **πίνακα 17** παρουσιάζονται τα ποσοστά διακύμανσης της μέσης συγκέντρωσης των παραπάνω μεταβολιτών.



Μεταβολίτες ούρων (μmol/mmol κρεατινίνη)	Υγιείς N=53	Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2 (χωρίς επιπλοκές) N=25	3 χρόνια πριν τη διάγνωση Διαβητικής Νεφροπάθειας N=22
2-Υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ	1.43 ± 0.59	(↑232%) 4.75 ± 1.41	(↓68%) 1.51 ± 0.58
2-Υδροξυ-3-μεθυλο-βαλερικό οξύ	3.87 ± 1.67	(↑168%) 10.37 ± 7.18	(↓55%) 4.70 ± 2.77
3-Μεθυλο-2-οξο-βαλερικό οξύ	3.98 ± 2.05	(↑166%) 10.57 ± 6.79	(↓58%) 4.41 ± 2.47
3-Υδροξυ-βουτυρικό οξύ	12.93 ± 13.10	(↑314%) 53.52 ± 46.26	(↓91%) 4.75 ± 2.30
Ακετοξικό οξύ	14.08 ± 13.53	(↑259%) 50.56 ± 20.10	(↓84%) 8.19 ± 3.03
Αλανίνη	21.25 ± 9.36	(↑95%) 41.39 ± 26.30	(↓49%) 21.15 ± 19.53
Βαλίνη	3.63 ± 1.28	(↑123%) 8.11 ± 3.73	(↓50%) 4.08 ± 2.82
Ηλεκτρικό οξύ	5.29 ± 3.39	(↑147%) 13.09 ± 5.62	(↓76%) 3.11 ± 1.80
Ισολευκίνη	2.25 ± 1.01	(↑181%) 6.32 ± 3.70	(↓63%) 2.41 ± 2.40
Λευκίνη	2.50 ± 1.28	(↑361%) 11.52 ± 3.68	(↓70%) 3.46 ± 2.67
N-Ισοβαλεροϋλογλυκίνη	1.37 ± 0.66	(↑147%) 3.38 ± 2.04	(↓56%) 1.48 ± 0.51

**Σχ. 4 και Πιν. 17:** Ποσοστά διακύμανσης της μέσης συγκέντρωσης των BCAAs και των μεταβολιτών που σχετίζονται με τον καταβολισμό τους των οποίων ο μέσος όρος συγκέντρωσης αυξάνεται στο ΣΔΤ2 και μειώνεται 3 χρόνια πριν τη διάγνωση Διαβητικής Νεφροπάθειας.

### 3.4.3 Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης (ΣΔΚ)

Για τη διερεύνηση της διαταραχής του καταβολισμού των BCAAs στο Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης έγινε ποσοτικοποίηση των BCAAs και των μεταβολιτών που σχετίζονται με τον καταβολισμό τους στον ορό του αίματος εγκύων γυναικών με διαβήτη κύησης και σύγκριση με γυναίκες με φυσιολογική κύηση.

## 3.4.3.1 Ορός αίματος

Συγκριτικά με τη φυσιολογική εγκυμοσύνη, στον ορό του αίματος γυναικών που διαγνώστηκαν με διαβήτη κύησης καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα των καταβολιτών της λευκίνης και βαλίνης (3-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ και 3-υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ), των κετονοσωμάτων (3-υδροξυ-βουτυρικό οξύ & ακετοξικό οξύ) και στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα του α-κετοξέος της ισολευκίνης 3-μεθυλο-2-οξο-βαλερικό οξύ, του γλουταμινικού οξέος και του πυροσταφυλικού οξέος (**πιν.18**).

Μεταβολίτες ορού αίματος ( $\mu\text{M}$ )	Φυσιολογική κύηση	Σακχαρώδης Διαβήτης κύησης
2-Οξο-γλουταρικό οξύ	13.44 $\pm$ 4.28	12.74 $\pm$ 3.85
2-Οξο-ισοκαπροϊκό οξύ	20.62 $\pm$ 5.12	20.87 $\pm$ 6.56
2-Υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ	8.08 $\pm$ 2.31	8.80 $\pm$ 2.94
3-Μεθυλο-2-οξο-βαλερικό οξύ	11.79 $\pm$ 2.73	10.43 $\pm$ 2.96**
3-Υδροξυ-βουτυρικό οξύ	96.93 $\pm$ 83.45	145.15 $\pm$ 124.75*
3-Υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ	4.04 $\pm$ 1.08	4.66 $\pm$ 1.60*
3-Υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ	5.54 $\pm$ 1.85	6.40 $\pm$ 2.33*
Ακετοξικό οξύ	36.00 $\pm$ 29.43	56.79 $\pm$ 44.91**
Αλανίνη	462.08 $\pm$ 84.31	442.12 $\pm$ 108.42
Βαλίνη	193.94 $\pm$ 27.28	198.05 $\pm$ 37.34
Γλουταμίνη	440.13 $\pm$ 56.78	437.82 $\pm$ 69.07
Γλουταμινικό οξύ	98.30 $\pm$ 21.07	88.56 $\pm$ 24.95*
Ηλεκτρικό οξύ	7.04 $\pm$ 1.80	7.48 $\pm$ 2.36
Ισολευκίνη	57.26 $\pm$ 8.90	55.45 $\pm$ 10.87
Κιτρικό οξύ	162.35 $\pm$ 35.27	172.10 $\pm$ 37.03
Λευκίνη	120.97 $\pm$ 16.21	115.68 $\pm$ 22.86
Πυροσταφυλικό οξύ	119.01 $\pm$ 39.60	105.13 $\pm$ 32.50*

**Πιν.18:** Συγκέντρωση ( $\mu\text{M}$ ) των BCAAs και των μεταβολιτών που σχετίζονται με τον καταβολισμό τους σε φιλτραρισμένο ορό γυναικών με φυσιολογική κύηση και με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης, \*\* $p < 0.01$  και \* $p < 0.05$  ως προς τη φυσιολογική κύηση.

Τέλος για τη διερεύνηση των ομοιοτήτων των διαταραχών μεταβολικών οδών που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία του ΣΔΚ με το ΣΔΤ2, έγινε σύγκριση των επιπέδων των BCAAs στον ορό του αίματος εγκύων γυναικών με ΣΔΚ με ασθενείς με ΣΔΤ2 (**πίνακας 19**). Στο ΣΔΚ τα επίπεδα και των τριών BCAAs ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένα ( $p < 0.001$ ) συγκριτικά με τους ασθενείς με ΣΔΤ2.

BCAAs ορού αίματος (μM)	Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2 N=50	Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης N=62	Τμή p
<b>Βαλίνη</b>	356.23 ± 64.10	198.05 ± 37.34	<0.001
<b>Ισολευκίνη</b>	103.34 ± 19.67	55.45 ± 10.87	<0.001
<b>Λευκίνη</b>	193.00 ± 37.87	115.68 ± 22.86	<0.001

**Πιν.19:** Συγκέντρωση των BCAAs στον ορό ασθενών με ΣΔΤ2 και έγκυων γυναικών με ΣΔΚ.

#### 3.4.4 Αυτοάνοσα Νοσήματα του Ήπατος (ANH) & Χρόνιες Ιογενείς Ηπατίτιδες B + C (CVH)

##### 3.4.4.1 ANH : ΑΗ, ΠΧΧ, ΠΣΧ χωρίς θεραπεία vs υγιείς (πλάσμα)

Στο πλάσμα των ασθενών με Αυτοάνοση Ηπατίτιδα (ΑΗ) συγκριτικά με τους υγιείς, εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα των ενδιάμεσων του καταβολικού μονοπατιού της βαλίνης (2-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ ( $p < 0.001$ ) & 3-υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ ( $p < 0.001$ )) και της λευκίνης (3-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ ( $p < 0.05$ )), των κετονοσωμάτων (3-υδροξυ-βουτυρικό οξύ ( $p < 0.001$ ) & ακετοξικό οξύ ( $p < 0.001$ )), των μεταβολιτών που συμμετέχουν στον κύκλο του κιτρικού (2-οξο-γλουταρικό οξύ ( $p < 0.01$ ), ηλεκτρικό οξύ ( $p < 0.05$ ), κιτρικό οξύ ( $p < 0.001$ )) καθώς και του γλουταμινικού οξέος ( $p < 0.001$ ). Αντίθετα, τα επίπεδα των δύο εκ των BCAAs (βαλίνη ( $p < 0.001$ ) & λευκίνη ( $p < 0.05$ )) καθώς και των αμινοξέων αλανίνης ( $p < 0.01$ ) και γλουταμίνης ( $p < 0.001$ ) βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα (**πιν.20**).

Στο πλάσμα των ασθενών με ΠΧΧ σε σχέση με τους υγιείς, καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα του καταβολικού ενδιάμεσου της βαλίνης (3-υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ ( $p < 0.001$ )), των κετονοσωμάτων (3-υδροξυ-βουτυρικό οξύ ( $p < 0.01$ ) & ακετοξικό οξύ ( $p < 0.001$ )), των ενδιάμεσων στον κύκλο του κιτρικού ( $p < 0.001$ ) (ηλεκτρικό οξύ, κιτρικό οξύ) και του γλουταμινικού οξέος ( $p < 0.001$ ). Αντίθετα, τα επίπεδα των BCAAs ( $p < 0.001$ ) (βαλίνη, λευκίνη, ισολευκίνη), του α-κετοξέος της λευκίνης (2-οξο-ισοκαπροϊκό οξύ ( $p < 0.001$ )),

του 2-οξο-γλουταρικού οξέος ( $p < 0.05$ ), του πυροσταφυλικού οξέος ( $p < 0.05$ ) καθώς και των αμινοξέων αλανίνης ( $p < 0.001$ ) και γλουταμίνης ( $p < 0.001$ ) βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα (**πιν.20**).

Τέλος, οι ασθενείς με ΠΣΧ σε σχέση με τους υγιείς, παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα πλάσματος του καταβολικού ενδιάμεσου της βαλίνης (3-υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ ( $p < 0.01$ )), του ακετοξικού οξέος ( $p < 0.001$ ), του γλουταμινικού ( $p < 0.01$ ) καθώς και των ενδιάμεσων του κύκλου του κιτρικού (ηλεκτρικό οξύ ( $p < 0.05$ ) & κιτρικό οξύ ( $p < 0.01$ )) και στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα των τριών BCAAs (βαλίνη ( $p < 0.001$ ), λευκίνη ( $p < 0.001$ ) & ισολευκίνη ( $p < 0.01$ )), του 2-οξο-ισοκαπροϊκού οξέος ( $p < 0.05$ ), της αλανίνης ( $p < 0.05$ ) και της γλουταμίνης ( $p < 0.001$ ) (**πιν.20**).

#### 3.4.4.2 Χρόνιες Ιογενείς Ηπατίτιδες B + C (CVH) vs υγιείς (πλάσμα)

Στο πλάσμα των ασθενών με χρόνιες Ιογενείς Ηπατίτιδες B + C (CVH) συγκριτικά με τους υγιείς, βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα του καταβολικού ενδιάμεσου της βαλίνης (3-υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ ( $p < 0.001$ )), των κετονοσωμάτων ( $p < 0.001$ ) (3-υδροξυ-βουτυρικό οξύ & ακετοξικό οξύ), του γλουταμινικού οξέος ( $p < 0.001$ ) καθώς και των ενδιάμεσων του κύκλου του Krebs ( $p < 0.001$ ) (ηλεκτρικό οξύ & κιτρικό οξύ). Αντίθετα τα επίπεδα των τριών BCAAs ( $p < 0.001$ ), της αλανίνης ( $p < 0.001$ ), της γλουταμίνης ( $p < 0.001$ ) και του 2-οξο-ισοκαπροϊκού οξέος ( $p < 0.001$ ) βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα (**πιν.21**).

#### 3.4.4.3 ΠΧΧ, ΠΣΧ & CVH χωρίς θεραπεία vs ΑΙΗ χωρίς θεραπεία (πλάσμα)

Στο πλάσμα των ασθενών με ΑΙΗ συγκριτικά με τους ασθενείς με Πρωτοπαθή Χολική Χολαγγεΐτιδα (ΠΧΧ) βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα των καταβολικών ενδιάμεσων των BCAAs (2-οξο-ισοκαπροϊκό οξύ ( $p < 0.001$ ), 2-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ ( $p < 0.001$ ), 3-μεθυλο-2-οξο-βαλερικό οξύ ( $p < 0.01$ ), 3-υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ ( $p < 0.001$ )), των αμινοξέων (αλανίνη ( $p < 0.001$ ), γλουταμίνη ( $p < 0.05$ ), γλουταμινικό ( $p < 0.01$ ) και των τριών BCAAs ( $p < 0.001$ )), των ενδιάμεσων του κύκλου του Krebs ( $p < 0.001$ ) (2-οξο-γλουταρικό οξύ & κιτρικό), του πυροσταφυλικού ( $p < 0.01$ ) και του 3-υδροξυ-βουτυρικού οξέος ( $p < 0.01$ ) (**πιν.20**).

Οι ασθενείς με ΑΗ συγκριτικά με τους ασθενείς με Πρωτοπαθή Σκληρυντική Χολαγγεΐτιδα (PSC) εμφάνισαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα 2-υδροξυ-ισοβαλερικού οξέος ( $p < 0.05$ ) (καταβολικό προϊόν της βαλίνης) και 3-μεθυλο-2-οξο-βαλερικού

οξέος ( $p < 0.05$ ) (α-κετοξύ ισολευκίνης), των δύο BCAAs ( $p < 0.01$ ) (λευκίνη & ισολευκίνη), των οξέων 3-υδροξυ-βουτυρικό ( $p < 0.001$ ) και πυροσταφυλικό ( $p < 0.05$ ) και στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα ακετοξικού ( $p < 0.001$ ) (**πιν.20**).

Οι ασθενείς με ΑΗ συγκριτικά με τους ασθενείς με χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες, παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα των καταβολικών ενδιάμεσων της λευκίνης (2-οξο-ισοκαπροϊκό οξύ ( $p < 0.01$ ) & 3-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ ( $p < 0.01$ )) και της βαλίνης (2-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ ( $p < 0.01$ )), ισολευκίνης ( $p < 0.001$ ), λευκίνης ( $p < 0.05$ ), αλανίνης ( $p < 0.05$ ) και των ενδιάμεσων του κύκλου του κιτρικού (2-οξο-γλουταρικό ( $p < 0.01$ ) και κιτρικό ( $p < 0.05$ )) ενώ το ηλεκτρικό ( $p < 0.01$ ) και το ακετοξικό οξύ ( $p < 0.001$ ) ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένα (**πιν.21**).

Συγκριτικά με το σύνολο των ομάδων ελέγχου (ΠΧΧ, ΠΣΧ & CVH), οι ασθενείς με ΑΙΗ είχαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα του α-κετοξέος της λευκίνης 2-οξο-ισοκαπροϊκό οξύ ( $p < 0.01$ ), του καταβολικού προϊόντος της βαλίνης 2-υδροξυ-ισοβαλερικού οξέος ( $p < 0.001$ ) και της λευκίνης 3-υδροξυ-ισοβαλερικού οξέος ( $p < 0.05$ ), των τριών BCAAs (βαλίνη ( $p < 0.05$ ), λευκίνη ( $p < 0.01$ ), ισολευκίνη ( $p < 0.001$ )), 3-υδροξυ-βουτυρικού οξέος ( $p < 0.05$ ), των δύο ενδιάμεσων του κύκλου του κιτρικού (2-οξο-γλουταρικό ( $p < 0.001$ ) και κιτρικό ( $p < 0.05$ )) και αλανίνης ( $p < 0.01$ ) ενώ οι συγκεντρώσεις των δύο οξέων (ηλεκτρικού ( $p < 0.05$ ) και ακετοξικού ( $p < 0.001$ )) ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένες (**πιν.21**).

#### 3.4.4.4 ANH χωρίς θεραπεία vs ANH με θεραπεία (πλάσμα)

Μετά τη χορήγηση ανοσοκατασταλτικής αγωγής οι ασθενείς με ΑΙΗ παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα ακετοξικού ( $p < 0.001$ ) και ηλεκτρικού οξέος ( $p < 0.01$ ) ενώ οι συγκεντρώσεις των τριών BCAAs (βαλίνη ( $p < 0.05$ ), λευκίνη ( $p < 0.001$ ), ισολευκίνη ( $p < 0.001$ )), των δύο καταβολικών προϊόντων της βαλίνης και της λευκίνης (2-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ ( $p < 0.001$ ) & 3-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ ( $p < 0.001$ )), του 3-υδροξυ-βουτυρικού ( $p < 0.01$ ) και του κιτρικού οξέος ( $p < 0.001$ ) μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά. Η χορήγηση UDCA σε ασθενείς με ΠΧΧ συνδέθηκε με τη στατιστικά σημαντική αύξηση του καταβολικού ενδιάμεσου της λευκίνης 3-υδροξυ-ισοβαλερικού ( $p < 0.05$ ) και ακετοξικού οξέος ( $p < 0.05$ ) και τη στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων της ισολευκίνης ( $p < 0.05$ ) και του γλουταμινικού ( $p < 0.05$ ). Αντίστοιχα, η χορήγηση UDCA σε ασθενείς με ΠΣΧ συσχετίστηκε με τη στατιστικά σημαντική αύξηση του 3-υδροξυ-βουτυρικού οξέος ( $p < 0.05$ ), της λευκίνης ( $p < 0.05$ ) και του

ηλεκτρικού οξέος ( $p < 0.05$ ) ενώ το 3-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ (καταβολικό ενδιάμεσο της λευκίνης) ( $p < 0.05$ ) μειώθηκε στατιστικά σημαντικά (**πιν.20**).

#### 3.4.4.5 ANH με θεραπεία vs υγιείς (πλάσμα)

Στο πλάσμα των ασθενών με AH μετά την ανοσοκατασταλτική αγωγή συγκριτικά με τους υγιείς, τα επίπεδα των τριών BCAAs ( $p < 0.001$ ), των καταβολικών προϊόντων της λευκίνης (2-οξο-ισοκαπροϊκό οξύ ( $p < 0.01$ ) & 3-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ ( $p < 0.05$ )) και των αμινοξέων (αλανίνης ( $p < 0.001$ ) και γλουταμίνης ( $p < 0.001$ )) ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένα ενώ τα κετονοσώματα (3-υδροξυ-βουτυρικό οξύ ( $p < 0.05$ ) και ακετοξικό οξύ ( $p < 0.001$ )), το καταβολικό προϊόν της βαλίνης 3-υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ ( $p < 0.001$ ), το αμινοξύ γλουταμινικό ( $p < 0.001$ ) και τα ενδιάμεσα του κύκλου του κιτρικού ( $p < 0.001$ ) (ηλεκτρικό και κιτρικό) παρέμειναν στατιστικά σημαντικά αυξημένα (**πιν.20**).

Μετά τη χορήγηση του UDCA στους ασθενείς με ΠΧΧ συγκριτικά με τους υγιείς, τα επίπεδα των τριών BCAAs ( $p < 0.001$ ), των καταβολικών τους ενδιάμεσων (2-οξο-ισοκαπροϊκό οξύ ( $p < 0.001$ ), 2-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ ( $p < 0.05$ ) και 3-μεθυλο-2-οξο-βαλερικό οξύ ( $p < 0.01$ )), των αμινοξέων αλανίνη ( $p < 0.001$ ) και γλουταμίνη ( $p < 0.001$ ), των οξέων 2-οξο-γλουταρικό ( $p < 0.001$ ) και πυροσταφυλικό ( $p < 0.001$ ) παρέμειναν στατιστικά σημαντικά μειωμένα ενώ τα επίπεδα των κετονοσωμάτων (3-υδροξυ-βουτυρικό ( $p < 0.05$ ) και ακετοξικό ( $p < 0.001$ )), των καταβολικών ενδιάμεσων της βαλίνης και της λευκίνης (3-υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ ( $p < 0.001$ ) και 3-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ ( $p < 0.001$ )), του γλουταμινικού ( $p < 0.001$ ), ηλεκτρικού ( $p < 0.001$ ) και κιτρικού ( $p < 0.001$ ) παρέμειναν στατιστικά σημαντικά αυξημένα (**πιν.20**).

Στους ασθενείς με ΠΣΧ μετά τη χορήγηση UDCA, οι συγκεντρώσεις των τριών BCAAs (βαλίνη ( $p < 0.001$ ), λευκίνη ( $p < 0.01$ ), ισολευκίνη ( $p < 0.001$ )), των δύο καταβολικών παραγώγων της λευκίνης ( $p < 0.001$ ) (2-οξο-ισοκαπροϊκό οξύ και 3-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ) και των αμινοξέων αλανίνης ( $p < 0.001$ ) και γλουταμίνης ( $p < 0.001$ ) μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά ενώ τα επίπεδα των κετονοσωμάτων (3-υδροξυ-βουτυρικό ( $p < 0.05$ ) και ακετοξικό ( $p < 0.001$ )) του καταβολικού ενδιάμεσου της βαλίνης 3-υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ ( $p < 0.001$ ), του γλουταμινικού ( $p < 0.001$ ), και των ενδιάμεσων του κύκλου του κιτρικού ( $p < 0.001$ ) (ηλεκτρικό και κιτρικό) αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά ως προς την ομάδα των υγιών (**πιν.20**).

Μεταβολίτες πλάσματος αίματος (μM)	Υγιή άτομα	Αυτοάνοση Ηπατίτιδα (ΑΗ)			Πρωτοπαθής Χολική Χολαγγειίτιδα (ΠΧΧ)			Πρωτοπαθής Σκληρυντική Χολαγγειίτιδα (ΠΣΧ)		
		Χωρίς θεραπεία	Ανοσοκαταστολή	Τιμή p	Χωρίς θεραπεία	UDCA	Τιμή p	Χωρίς θεραπεία	UDCA	Τιμή p
2-Οξο-γλουταμικό οξύ	12.56 ± 4.50	15.85 ± 7.90**	13.38 ± 6.10	NS	10.42 ± 5.03####	9.62 ± 3.93***	NS	11.74 ± 7.40	11.36 ± 4.12	NS
2-Οξο-ισοκαπροϊκό οξύ	18.89 ± 5.83	16.42 ± 10.18	14.74 ± 8.66**	NS	10.36 ± 4.76####	9.91 ± 4.41***	NS	13.21 ± 6.79*	13.70 ± 5.35***	NS
2-Υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ	9.55 ± 4.16	14.17 ± 5.88***	9.69 ± 5.18	<0.001	8.41 ± 4.59###	7.58 ± 4.23*	NS	9.75 ± 3.82‡	8.54 ± 3.87	NS
3-Μεθυλο-2-οξο-βαλερικό οξύ	10.10 ± 2.38	11.01 ± 3.91	10.48 ± 4.55	NS	8.87 ± 3.48###	8.59 ± 4.13**	NS	8.53 ± 1.87‡	9.40 ± 3.33	NS
3-Υδροξυ-βουτυρικό οξύ	57.99 ± 24.04	146.86 ± 142.04***	78.71 ± 66.90*	<0.01	93.48 ± 95.56####	75.07 ± 73.64*	NS	57.20 ± 23.05+++	82.18 ± 56.01*	<0.05
3-Υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ	10.66 ± 5.48	14.22 ± 8.30*	8.31 ± 3.93*	<0.001	13.07 ± 8.41	15.54 ± 7.05***	<0.05	11.02 ± 5.50	6.51 ± 3.36***	<0.05
3-Υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ	6.87 ± 2.56	14.14 ± 7.71***	13.84 ± 7.83***	NS	9.58 ± 5.09####	10.29 ± 5.07***	NS	12.27 ± 4.37**	10.90 ± 4.42***	NS
Ακετοξικό οξύ	25.70 ± 16.99	74.40 ± 43.09***	108.86 ± 39.23***	<0.001	86.20 ± 16.29***	91.46 ± 17.05***	<0.05	109.66 ± 17.29####	111.94 ± 31.73***	NS
Αλανίνη	488.77 ± 99.62	405.95 ± 145.80**	356.45 ± 135.74***	NS	293.52 ± 111.05####	306.61 ± 99.48***	NS	382.34 ± 104.08*	387.09 ± 108.25***	NS
Βαλίνη	246.33 ± 36.65	199.47 ± 66.13***	170.45 ± 61.37***	<0.05	157.97 ± 57.91####	151.83 ± 50.09***	NS	177.37 ± 35.38***	185.81 ± 49.59***	NS
Γλουταμίνη	530.44 ± 89.86	249.42 ± 153.86***	257.58 ± 130.31***	NS	203.29 ± 120.24####	233.32 ± 110.85***	NS	260.90 ± 99.12***	300.47 ± 135.77***	NS
Γλουταμινικό οξύ	102.92 ± 53.59	276.69 ± 140.99***	239.35 ± 100.95***	NS	224.51 ± 102.67####	193.53 ± 89.17***	<0.05	237.22 ± 81.61**	269.34 ± 93.82***	NS
Ηλεκτρικό οξύ	12.66 ± 5.22	17.63 ± 9.84*	23.87 ± 12.98***	<0.01	19.31 ± 10.59***	22.28 ± 11.66***	NS	17.70 ± 5.29*	24.26 ± 10.21***	<0.05
Ισολευκίνη	67.56 ± 13.01	69.95 ± 21.78	45.40 ± 19.00***	<0.001	48.22 ± 12.64####	43.80 ± 14.61***	<0.05	48.77 ± 16.12**‡	54.65 ± 16.53***	NS
Κιτρικό οξύ	150.16 ± 32.67	470.67 ± 249.29***	328.73 ± 189.80***	<0.01	337.28 ± 140.15####	304.40 ± 196.39***	NS	414.42 ± 147.52**	405.08 ± 165.18***	NS
Λευκίνη	152.38 ± 30.90	133.40 ± 47.08*	102.35 ± 38.18***	<0.001	101.02 ± 29.52####	93.50 ± 30.95***	NS	107.22 ± 17.17***‡	124.52 ± 36.73**	<0.05
Πυροσταφυλικό οξύ	51.63 ± 21.24	60.27 ± 47.19	57.67 ± 34.92	NS	41.02 ± 26.22###	37.36 ± 19.51***	NS	40.43 ± 13.94‡	48.73 ± 26.72	NS

**Πιν.20:** Συγκέντρωση (μM) των BCAAs και των μεταβολιτών που σχετίζονται με τον καταβολισμό τους στο πλάσμα υγιών και ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος (ΑΗ, ΠΧΧ, ΠΣΧ) πριν και μετά τη χορήγηση θεραπευτικής αγωγής, \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01 και \*p<0.05 ως προς τους υγιείς, ####p<0.001, ###p<0.01 και #p<0.05 για τη σύγκριση ΠΧΧ με ΑΗ χωρίς θεραπεία, +++p<0.001, ++p<0.01 και †p<0.05 για τη σύγκριση ΠΣΧ με ΑΗ χωρίς θεραπεία, τιμή p για τη σύγκριση προ μετά θεραπείας.



Μεταβολίτες πλάσματος αίματος ( $\mu\text{M}$ )	Υγιή άτομα	Αυτοάνοση Ηπατίτιδα (ΑΗ)	Χρόνιες Ιογενείς Ηπατίτιδες Β + C (CVH)	ΠΧΧ + ΠΣΧ + CVH
		Χωρίς θεραπεία	Χωρίς θεραπεία	Χωρίς θεραπεία
2-Οξο-γλουταρικό οξύ	12.56 $\pm$ 4.50	15.85 $\pm$ 7.90	11.56 $\pm$ 5.13 <sup>††</sup>	11.11 $\pm$ 5.20 <sup>\$\$\$</sup>
2-Οξο-ισοκαπροϊκό οξύ	18.89 $\pm$ 5.83	16.42 $\pm$ 10.18	11.19 $\pm$ 6.22 <sup>***††</sup>	10.96 $\pm$ 5.72 <sup>\$\$</sup>
2-Υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ	9.55 $\pm$ 4.16	14.17 $\pm$ 5.88	10.77 $\pm$ 6.73 <sup>††</sup>	9.79 $\pm$ 5.93 <sup>\$\$\$</sup>
3-Μεθυλο-2-οξο-βαλερικό οξύ	10.10 $\pm$ 2.38	11.01 $\pm$ 3.91	10.57 $\pm$ 3.71	9.81 $\pm$ 3.65
3-Υδροξυ-βουτυρικό οξύ	57.99 $\pm$ 24.04	146.86 $\pm$ 142.04	101.57 $\pm$ 86.78 <sup>***</sup>	96.15 $\pm$ 88.67 <sup>\$</sup>
3-Υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ	10.66 $\pm$ 5.48	14.22 $\pm$ 8.30	9.63 $\pm$ 6.07 <sup>††</sup>	11.06 $\pm$ 7.22 <sup>\$</sup>
3-Υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ	6.87 $\pm$ 2.56	14.14 $\pm$ 7.71	13.41 $\pm$ 6.71 <sup>***</sup>	11.84 $\pm$ 6.27
Ακετοξικό οξύ	25.70 $\pm$ 16.99	74.40 $\pm$ 43.09	131.79 $\pm$ 41.13 <sup>***†††</sup>	112.66 $\pm$ 39.18 <sup>\$\$\$</sup>
Αλανίνη	488.77 $\pm$ 99.62	405.95 $\pm$ 145.80	354.41 $\pm$ 101.96 <sup>***†</sup>	331.79 $\pm$ 109.78 <sup>\$\$</sup>
Βαλίνη	246.33 $\pm$ 36.65	199.47 $\pm$ 66.13	185.14 $\pm$ 52.24 <sup>***</sup>	174.01 $\pm$ 55.23 <sup>\$</sup>
Γλουταμίνη	530.44 $\pm$ 89.86	249.42 $\pm$ 153.86	268.90 $\pm$ 130.64 <sup>***</sup>	242.55 $\pm$ 128.65
Γλουταμινικό οξύ	102.92 $\pm$ 53.59	276.69 $\pm$ 140.99	273.53 $\pm$ 105.92 <sup>***</sup>	252.35 $\pm$ 105.82
Ηλεκτρικό οξύ	12.66 $\pm$ 5.22	17.63 $\pm$ 9.84	23.01 $\pm$ 10.93 <sup>***††</sup>	21.29 $\pm$ 10.73 <sup>\$</sup>
Ισολευκίνη	67.56 $\pm$ 13.01	69.95 $\pm$ 21.78	53.95 $\pm$ 15.74 <sup>***†††</sup>	51.43 $\pm$ 14.80 <sup>\$\$\$</sup>
Κιτρικό οξύ	150.16 $\pm$ 32.67	470.67 $\pm$ 249.29	388.02 $\pm$ 165.46 <sup>***†</sup>	368.90 $\pm$ 156.29 <sup>\$</sup>
Λευκίνη	152.38 $\pm$ 30.90	133.40 $\pm$ 47.08	114.75 $\pm$ 33.26 <sup>***†</sup>	108.94 $\pm$ 31.78 <sup>\$\$</sup>
Πυροσταφυλικό οξύ	51.63 $\pm$ 21.24	60.27 $\pm$ 47.19	58.01 $\pm$ 32.83	50.42 $\pm$ 30.76

**Πιν.21:** Συγκέντρωση ( $\mu\text{M}$ ) των BCAAs καθώς και των μεταβολιτών που σχετίζονται με τον καταβολισμό τους στο πλάσμα υγιών και ασθενών με ΑΗ, χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες Β & C (CVH) και του συνόλου των ομάδων ελέγχου (ΠΧΧ, ΠΣΧ & CVH) πριν τη χορήγηση θεραπευτικής αγωγής, \*\*\* $p < 0.001$ , για τη σύγκριση ασθενών με CVH ως προς τους υγιείς, ††† $p < 0.001$ , †† $p < 0.01$  και † $p < 0.05$  για τη σύγκριση CVH με ΑΗ χωρίς θεραπεία, \$\$\$ $p < 0.001$ , \$\$ $p < 0.01$  και \$ $p < 0.05$  για τη σύγκριση ΠΧΧ+ΠΣΧ+CVH με ΑΗ χωρίς θεραπεία.

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 4.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (ΣΔΤ2)

Για τη διερεύνηση της διαταραχής του καταβολισμού των BCAAs στο ΣΔΤ2, έγινε ποσοτικοποίηση των BCAAs και των μεταβολιτών που σχετίζονται με τον καταβολισμό τους στον ορό και στα ούρα διαβητικών ασθενών συγκριτικά με τους υγιείς. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση της δαπαγλιφλοζίνης στην πιθανή «αποκατάσταση» του καταβολισμού των BCAAs.

Στην παρούσα μελέτη, εντοπίσαμε στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα και των τριών BCAAs στον ορό ασθενών με ΣΔΤ2 σε σχέση με τους υγιείς, εύρημα το οποίο βρίσκεται σε συμφωνία με παρατηρήσεις παρόμοιων μελετών στην παχυσαρκία, στην αντίσταση στην ινσουλίνη και στο ΣΔΤ2 [209]. Η επικρατέστερη θεωρία εμπλέκει τη μειωμένη έκφραση όλων ή μερικών ενζύμων κλειδιών του καταβολισμού των BCAAs κυρίως στο λιπώδη ιστό και λιγότερο στο ήπαρ [94, 114]. Η παρούσα μελέτη είναι σε συμφωνία με αυτή την υπόθεση, καθώς στον ορό των διαβητικών ασθενών βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα του α-κετοξέος της λευκίνης, 2-οξο-ισοκαπροϊκό οξύ καθώς και του καταβολικού της ενδιάμεσου, 3-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ (**εικ.46**). Τα μειωμένα επίπεδα του 2-οξο-ισοκαπροϊκού οξέος πιθανά οφείλονται στη μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου BCAT, όπως έχει αναφερθεί σε καταστάσεις αντίστασης στην ινσουλίνη, συμβάλλοντας έτσι στη μειωμένη απαμίνωση των BCAAs και τα αυξημένα επίπεδά τους στον ορό.

Αντίθετα, το α-κετοξύ της ισολευκίνης, 3-μεθυλο-2-οξο-βαλερικό οξύ καθώς και το καταβολικό προϊόν της βαλίνης 3-υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα στους διαβητικούς ασθενείς (**εικ.46**). Αυξημένα επίπεδα 3-μεθυλο-2-οξο-βαλερικού οξέος έχουν συνδεθεί με γενετικούς πολυμορφισμούς στο καταβολικό μονοπάτι της ισολευκίνης και συγκεκριμένα στο γονίδιο της φωσφατάσης που ενεργοποιεί το σύμπλοκο της BCKD, οδηγώντας έτσι στη μειωμένη δραστηριότητά του και στη συσσώρευση του α-κετοξέος [118]. Η συσσώρευση των α-κετοξέων σχετίζεται με αυξημένο οξειδωτικό στρες που συμβάλλει στη δυσλειτουργία των β-κυττάρων, χαρακτηριστικό γνώρισμα του διαβήτη τύπου 2. Αυξημένα επίπεδα του καταβολικού ενδιάμεσου της βαλίνης, 3-υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ, έχουν συνδεθεί με αυξημένο ρυθμό οξείδωσης των BCAAs στους σκελετικούς μύες στην προσπάθεια αντιστάθμισης της διαταραχής του καταβολισμού τους στο λιπώδη ιστό. Το 3-υδροξυ-

ισοβουτυρικό οξύ προάγει τη συσσώρευση λιπιδίων στους σκελετικούς μύες και συμβάλλει στη λιποτοξικότητα και την αντίσταση στην ινσουλίνη [126].

Στον ορό των διαβητικών ασθενών εντοπίσαμε στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα γλουταμινικού οξέος, πυροσταφυλικού και αλανίνης ενώ τα επίπεδα της γλουταμίνης ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένα (**εικ.46**). Όπως αναφέρθηκε, σε καταστάσεις αντίστασης στην ινσουλίνη πιθανά παρατηρείται μια αυξημένη καταβολική ροή των BCAAs στους σκελετικούς μύες και η απαμίνωσή τους οδηγεί στην αυξημένη σύνθεση γλουταμινικού. Στη συνέχεια το γλουταμινικό για την αποσυμφόρηση των μυών από άζωτο, μετατρέπεται σε υποστρώματα που εξέρχονται από τους σκελετικούς μύες όπως η γλουταμίνη και αλανίνη και χρησιμοποιούνται στη γλυκονεογένεση ή στον κύκλο της ουρίας [210]. Μειωμένα επίπεδα γλουταμίνης έχουν συσχετιστεί με αυξημένο BMI και δείκτη HOMA-IR. Ωστόσο στους σκελετικούς μύες ασθενών με διαβήτη τύπου 2 δεν έχουν αναφερθεί αλλαγές στη δραστηριότητα των ενζύμων που συμμετέχουν στη σύνθεση (συνθετάση της γλουταμίνης) και στην υδρόλυση της γλουταμίνης (γλουταμινάση) [211]. Μειωμένη δραστηριότητα της συνθετάσης της γλουταμίνης έχει βρεθεί στο λιπώδη ιστό παχύσαρκων ατόμων και συσχετίστηκε με την ενεργοποίηση μονοπατιών που επάγουν φλεγμονή [212].

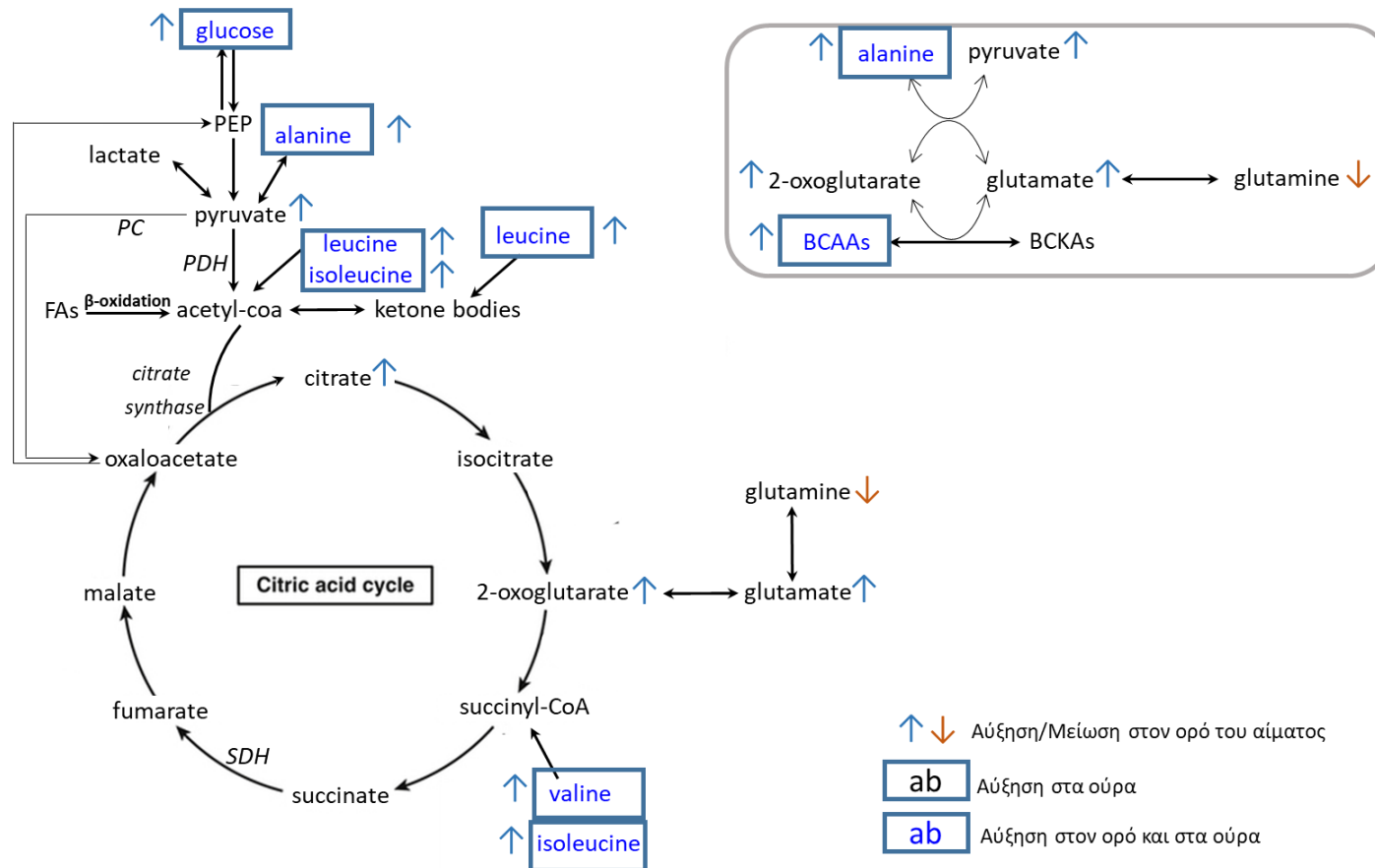
Τα αυξημένα επίπεδα πυροσταφυλικού και αλανίνης πιθανά υποδηλώνουν την ενισχυμένη αλληλομετατροπή αλανίνης και πυροσταφυλικού καθώς τα ένζυμα αμινομεταφοράσες της αλανίνης που καταλύουν τις παραπάνω αντιδράσεις (ALT1 & ALT2) έχουν βρεθεί αυξημένα στην παχυσαρκία και στο διαβήτη [213]. Η αυξημένη γλυκονεογένεση που χαρακτηρίζει το διαβήτη τύπου 2, σύμφωνα με την επικρατέστερη θεωρία συμβάλλει στη μείωση των γλυκογενετικών υποστρωμάτων στα οποία ανήκει η αλανίνη και η γλουταμίνη με αποτέλεσμα τα επίπεδα αλανίνης και γλουταμίνης να βρίσκονται μειωμένα στους διαβητικούς ασθενείς [214]. Ωστόσο στην παρούσα μελέτη τα επίπεδα αλανίνης βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα στους διαβητικούς ασθενείς καθώς η χορήγηση μετφορμίνης συνδέεται με αύξηση των επιπέδων αλανίνης καθώς ο κύριος μηχανισμός δράσης του αντιδιαβητικού φαρμάκου είναι η μείωση της ηπατικής γλυκονεογένεσης [215].

Στην παρούσα μελέτη στον ορό των διαβητικών ασθενών εντοπίσαμε στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα 3-υδροξυβουτυρικού οξέος που δεν συνοδεύονται από μειωμένα επίπεδα κετογενετικών αμινοξέων όπως η λευκίνη (**εικ.46**). Σαν συνέπεια το αυξημένο 3-υδροξυ-βουτυρικό οξύ στους διαβητικούς ασθενείς πιθανά σχετίζεται με την επιδείνωση της υπεργλυκαιμίας κυρίως λόγω της διαταραχής της έκκρισης ινσουλίνης, σε αλλαγές στη

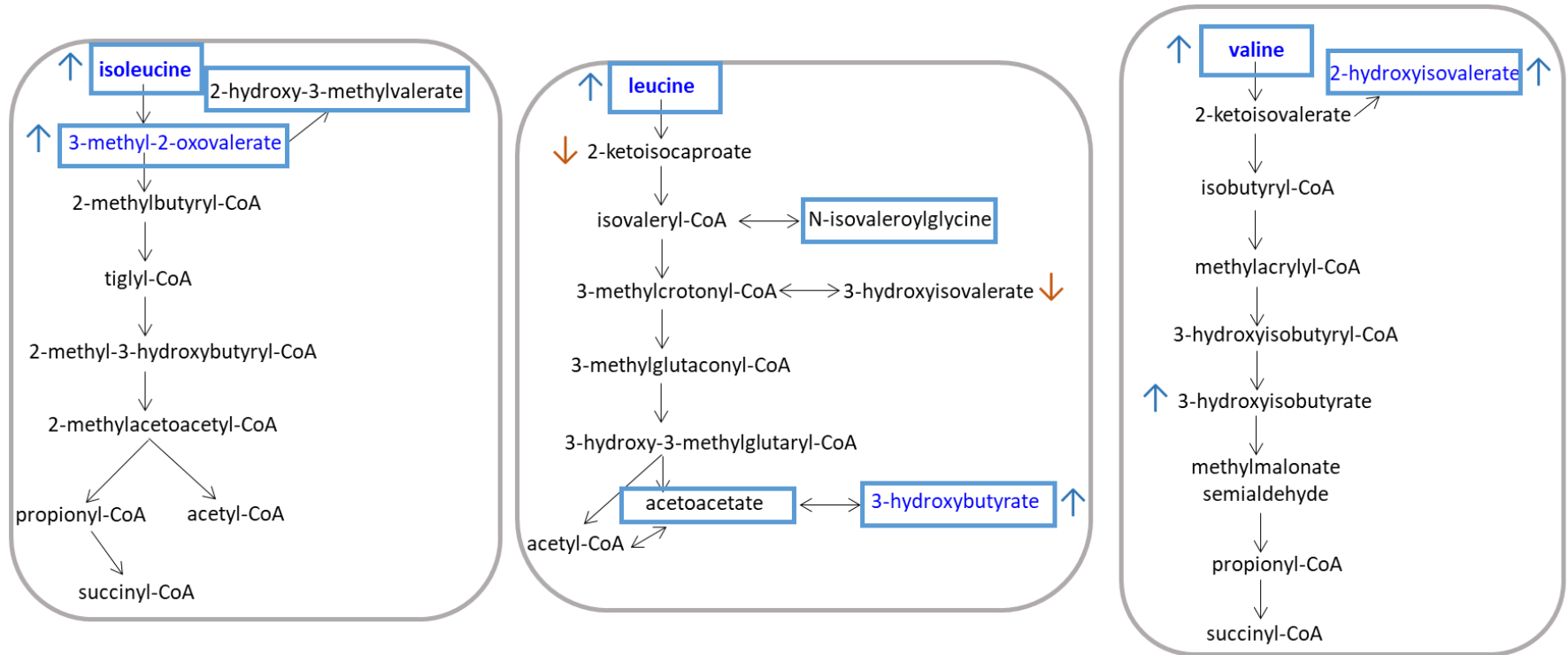
δραστικότητα ενζύμων που εμπλέκονται στις οδούς κετόλυσης στον λιπώδη ιστό καθώς και με παραλλαγή του γονιδίου GCKR (encoding glucokinase regulatory protein) που σχετίζεται με την υπεργλυκαιμία [216]. Επιπλέον, λόγω υπεργλυκαιμίας, τόσο τα ένζυμα που παίζουν κύριο ρόλο στον κύκλο του κιτρικού οξέος όπως η κιτρική συνθάση που καταλύει το σχηματισμό του κιτρικού από ακετυλο-συνένζυμο Α και οξαλοξικό, όσο και στην οξειδωτική φωσφορυλίωση παρουσιάζουν μειωμένη δραστικότητα στους διαβητικούς ασθενείς [217]. Σαν συνέπεια, το ακετυλο-συνένζυμο Α που προέρχεται από την αυξημένη οξείδωση λιπαρών οξέων [218], πιθανά καταναλώνεται κυρίως στο σχηματισμό κετονοσωμάτων παρά στον κύκλο του κιτρικού λόγω της μειωμένης δραστικότητας της κιτρικής συνθάσης [217]. Ωστόσο στους διαβητικούς ασθενείς εντοπίσαμε στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα των ενδιάμεσων του κύκλου του κιτρικού οξέος (2-οξο-γλουταρικό οξύ και κιτρικό οξύ). Τα αυξημένα επίπεδα του 2-οξο-γλουταρικού πιθανά σχετίζονται με την απενεργοποίηση του ενζύμου αφυδρογονάση του 2-οξο-γλουταρικού που καταλύει τη μετατροπή του σε ηλεκτρικό οξύ, λόγω της ανασταλτικής δράσης των συσσωρευμένων BCKAs [219]. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω ο ΣΔΤ2 σχετίζεται με μειωμένη δραστικότητα της πλειονότητας των ενζύμων του κύκλου του κιτρικού οξέος, ωστόσο η χορήγηση μετφορμίνης έχει συσχετιστεί με την αύξηση της δραστικότητας της κιτρικής συνθάσης, του ενζύμου κλειδιού που καταλύει τη μετατροπή του ακετυλο-συνενζύμου Α σε κιτρικό [220]. Έτσι τα αυξημένα επίπεδα κιτρικού πιθανά συνδέονται με την επίδραση της μετφορμίνης στο μεταβολισμό και την οξείδωση του ακετυλο-συνενζύμου Α στον κύκλο του κιτρικού για την παραγωγή ενέργειας αντί της καταναλωσής του στη σύνθεση κετονοσωμάτων.

Στα ούρα των διαβητικών ασθενών εντοπίσαμε στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα των τριών BCAAs και των ενδιάμεσων του καταβολισμού της βαλίνης και ισολευκίνης (2-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ, 3-μεθυλο-2-οξο-βαλερικό οξύ και 2-υδροξυ-3-μεθυλο-βαλερικό οξύ) καθώς και του παραπροϊόντος του καταβολισμού της λευκίνης, N-ισοβαλεροϋλογλυκίνη σε σχέση με τους υγιείς **(εικ.46)**. Τα αυξημένα επίπεδα των παραπάνω μεταβολιτών πιθανά αντανakλούν την επίδραση της υπεργλυκαιμίας στην αύξηση των επιπέδων των BCAAs και των καταβολικών προϊόντων τους είτε στους νεφρούς είτε σε εξωνεφρικούς ιστούς με επακόλουθη διήθηση αυτών από το αίμα στα ούρα [221]. Σε συμφωνία με τα ευρήματα παρόμοιων μελετών, τα επίπεδα των κετονοσωμάτων στα ούρα των διαβητικών ασθενών ανευρίσκονται αυξημένα κυρίως λόγω της αυξημένης β-οξείδωσης που χαρακτηρίζει το ΣΔΤ2 [222]. Τέλος και στα ούρα των διαβητικών ασθενών τα επίπεδα της αλανίνης βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα σε σχέση με τους υγιείς. Το γεγονός αυτό πιθανά συνάδει με την υπόθεση ότι η

περίσσεια γλυκογενετικών αμινοξέων στο πλάσμα κυρίως λόγω της αυξημένης πρωτεόλυσης σε ασθενείς με ΣΔΤ2, εκτός από το ότι χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα γλυκονογένεσης η οποία μειώνεται με τη χορήγηση μετφορμίνης, απομακρύνονται από την κυκλοφορία μέσω των νεφρών και έτσι ανευρίσκονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στα ούρα [223].



**Εικ.46:** Μεταβολές στα επίπεδα των BCAAs και των προϊόντων του καταβολισμού τους στον ορό και στα ούρα διαβητικών ασθενών συγκριτικά με τους υγιείς, *PEP: Phosphoenolpyruvate, FAs: Fatty acids, PC: Pyruvate Carboxylase, PDH: Pyruvate Dehydrogenase.*



**Εικ.46 (συνέχεια):** Μεταβολές στα επίπεδα των BCAAs και των προϊόντων του καταβολισμού τους στον ορό και στα ούρα διαβητικών ασθενών συγκριτικά με τους υγιείς.

#### 4.2 Διερεύνηση της επίδρασης της δαπαγλιφλοζίνης σε ασθενείς με ΣΔΤ2

Η δαπαγλιφλοζίνη ανήκει στην κατηγορία των αναστολέων του συμμεταφορέα νατρίου-γλυκόζης SGLT2. Η συγκεκριμένη κατηγορία αντιδιαβητικών φαρμάκων στην οποία ανήκει και η εμπαγλιφλοζίνη, έχει συσχετιστεί με ήπια αύξηση των κετονοσωμάτων ως αποτέλεσμα της αυξημένης λιπόλυσης [224]. Τα κετονοσώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτικά ενεργειακά υποστρώματα στο μυοκάρδιο συμβάλλοντας έτσι στη βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας και την πρόληψη καρδιαγγειακών συμβαμάτων [138].

Στην παρούσα μελέτη η χορήγηση δαπαγλιφλοζίνης στους ασθενείς με ΣΔΤ2 συσχετίστηκε με τη στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων των κετονοσωμάτων και του κιτρικού οξέος στον ορό. Τα ευρήματα αυτά σε συμφωνία με παρόμοιες μελέτες, πιθανά υποδεικνύουν την ευεργετική δράση της δαπαγλιφλοζίνης στην αύξηση της λιπόλυσης (αύξηση κετονοσωμάτων) και τη βελτίωση του ενεργειακού μεταβολισμού με την αποκατάσταση του κύκλου του κιτρικού οξέος και την παραγωγή ATP [138, 224]. Δεν εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα των BCAAs και των καταβολικών τους ενδιάμεσων που να υποδηλώνουν την πιθανή χρήση τους ως εναλλακτικά υποστρώματα κετογένεσης.

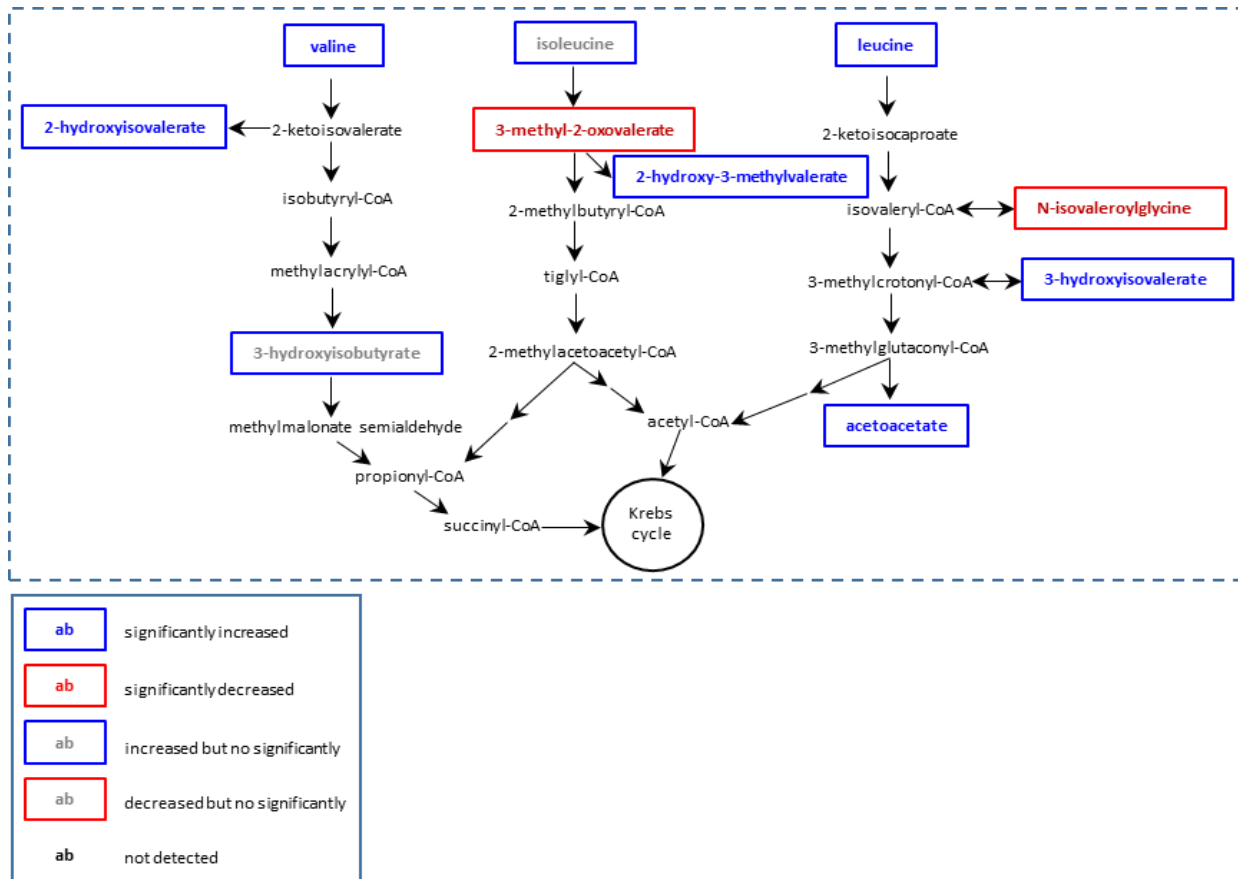
Σε αντίθεση με τον ορό στα ούρα των διαβητικών ασθενών, μετά τη χορήγηση δαπαγλιφλοζίνης παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα των κετονοσωμάτων, της αλανίνης, των BCAAs, ορισμένων ενδιάμεσων του καταβολισμού τους καθώς και του κιτρικού οξέος. Τα αυξημένα επίπεδα των παραπάνω μεταβολιτών αντανακλούν τροποποιήσεις στη πειραματική διήθησή τους ή σχετίζονται με αλλαγές στον ενεργειακό μεταβολισμό των νεφρικών κυττάρων είτε είναι αποτέλεσμα της αύξησης των επιπέδων τους στη συστηματική κυκλοφορία [225].

Τα αυξημένα επίπεδα λευκίνης και βαλίνης πιθανά αποτελούν ένδειξη της μειωμένης επαναρρόφησής τους στο εγγύς εσπειραμένο νεφρικό σωληνάριο καθώς δεν παρατηρείται αύξηση των επιπέδων τους στον ορό. Ωστόσο σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες η πρόσληψη της λευκίνης από κύτταρα του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου είναι μεγαλύτερη όταν η επώαση της καλλιέργειας αυτών των κυττάρων γίνεται σε θρεπτικά μέσα με υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης ή νατρίου [226]. Στην πρόσληψη γλυκόζης και νατρίου από τα κύτταρα του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου σημαντικό ρόλο παίζουν οι συμμεταφορείς  $\text{Na}^+$ /γλυκόζης (SGLTs) και η ισομορφή του αντιμεταφορέα ιόντων  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , NHE3 [227]. Κατά συνέπεια, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η αναστολή της λειτουργίας των μεταφορέων SGLT-2 και NHE3 από τη δαπαγλιφλοζίνη πιθανά σχετίζεται με μειωμένη πρόσληψη των BCAAs και ακολούθως με την αυξημένη απέκκρισή τους. Το



γεγονός αυτό αντικατοπτρίζεται και στις ποσοστιαίες αλλαγές στους ρυθμούς απέκκρισης αυτών των αμινοξέων καθώς αυξάνονται μαζί με τη γλυκοζουρία. Δεδομένου ότι η συσσώρευση των αμινοξέων συμβάλλει στην υπερτροφία του εγγύς εσπειραμένου σωληνάριου (μια πρώιμη εκδήλωση της διαβητικής νεφροπάθειας) μπορούμε να υποθέσουμε ότι η μειωμένη επαναρρόφηση των BCAAs αποτρέπει την υπερτροφία [228].

Μετά τη χορήγηση δαπαγλιφλοζίνης, τα καταβολικά ενδιάμεσα των τριών BCAAs (2-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ, 2-υδροξυ-3-μεθυλο-βαλερικό οξύ και 3-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ) αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά στα ούρα των διαβητικών ασθενών ενώ τα επίπεδα του τοξικού μεταβολίτη N-ισοβαλεροϋλογλυκίνη που προέρχεται από τον ατελή καταβολισμό της λευκίνης μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά. Τα ευρήματα αυτά πιθανά αντικατοπτρίζουν τη μερική αποκατάσταση του διαταραγμένου καταβολισμού των BCAAs στο ΣΔΤ2 και είναι σε συμφωνία με παρόμοια ευρήματα μετά τη χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης [138] (Εικ.47).



**Εικ. 47:** Μεταβολές στα επίπεδα των BCAAs και των προϊόντων του καταβολισμού τους στα ούρα διαβητικών ασθενών μετά τη χορήγηση δαπαγλιφλοζίνης.

Τα εγγύς σωληνάκια παρουσιάζουν υψηλή περιεκτικότητα σε μιτοχόνδρια και εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Προηγούμενες μελέτες σε διαβητικά και μη διαβητικά μοντέλα χρόνιας νεφρικής νόσου αποκάλυψαν σημαντική διαταραχή της μιτοχονδριακής λειτουργίας που συσχετίζεται με την εξέλιξη της νόσου και αντικατοπτρίζεται στη μη φυσιολογική απέκκριση των ενδιάμεσων του κύκλου του κιτρικού οξέος [225, 229]. Στην παρούσα μελέτη, παρατηρήσαμε σημαντική αύξηση τόσο στον ορό όσο και στην απέκκριση του κιτρικού μετά τη χορήγηση δαπαγλιφλοζίνης, εύρημα που μπορεί να υποδεικνύει αποκατάσταση της μιτοχονδριακής λειτουργίας και βελτίωση του ενεργειακού μεταβολισμού στα σωληναριακά κύτταρα. Άλλες καταστάσεις που μπορεί να αυξήσουν την απέκκριση κιτρικού όπως η έλλειψη καλίου, οι διαταραχές της οξεοβασικής ισοροπίας, ο υπερπαραθυρεοειδισμός ή η πλούσια σε πρωτεΐνες διατροφή δεν φαίνεται να συνάδουν με τα δεδομένα του πληθυσμού της μελέτης.

Τέλος, στη μελέτη μας, η συγκέντρωση αλανίνης στα ούρα βρέθηκε στατιστικά σημαντικά αυξημένη μετά τη χορήγηση δαπαγλιφλοζίνης. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στις αυξημένες συγκεντρώσεις αυτού του αμινοξέος στη συστηματική κυκλοφορία (δεν παρατηρείται στην παρούσα μελέτη), είτε στη μειωμένη σωληναριακή επαναρρόφησή του. Στα σωληναριακά κύτταρα η αλανίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε για αμμωνιογένεση, γλυκονεογένεση ή για την παραγωγή ενέργειας [230]. Η δαπαγλιφλοζίνη αναστέλλοντας τον αντιμεταφορέα ιόντων  $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$  ( $\text{NHE3}$ ) στα εγγύς σωληναριακά κύτταρα, όπως αναφέρθηκε, μπορεί να μειώνει την απέκκριση οξέων και επομένως μειώνει την κατανάλωση αλανίνης για παραγωγή αμμωνίας οδηγώντας έτσι στην αυξημένη συγκέντρωσή της στα σωληναριακά κύτταρα και την αυξημένη απέκκρισή της. Επιπλέον, η χρήση της αλανίνης ως υπόστρωμα γλυκονεογένεσης στα νεφρικά κύτταρα μετά από θεραπεία με δαπαγλιφλοζίνη δεν έχει αποσαφηνιστεί καθώς τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών για τον ρόλο των αναστολέων SGLT-2 στην ενδογενή παραγωγή γλυκόζης είναι αντικρουόμενα. Αν και η κλινική σημασία της αυξημένης απέκκρισης αλανίνης μετά από χορήγηση δαπαγλιφλοζίνης παραμένει αδιευκρίνιστη, πειραματικές μελέτες υποδεικνύουν ότι η αλανίνη προστατεύει τα σωληναριακά κύτταρα από βλάβη λόγω υποξίας [231].

#### 4.3 Διαβητική Νεφροπάθεια (ΔΝ) vs ΣΔΤ2

Η Διαβητική Νεφροπάθεια (ΔΝ) ανήκει στις μικροαγγειακές επιπλοκές του ΣΔΤ2 και αποτελεί κύρια αιτία χρόνιας νεφρικής νόσου και νεφρικής νόσου τελικού σταδίου. Αν και η αλβουμινουρία και ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης (eGFR) αποτελούν καθιερωμένους δείκτες της ΔΝ στην κλινική πράξη χαρακτηρίζονται ως μη ειδικοί καθώς οι αλλαγές των επιπέδων τους παρατηρούνται στις περισσότερες χρόνιες σπειραματοπάθειες. Προς αυτή την κατεύθυνση κρίνεται επιτακτική η ανάγκη ταυτοποίησης μεταβολιτών που αντανακλούν παθοφυσιολογικές διαταραχές και θα μπορούσαν να αποτελέσουν πιθανούς βιοδείκτες για την πρώιμη διάγνωση της Διαβητικής Νεφροπάθειας [232].

Στην προσπάθεια εύρεσης βιοδεικτών που θα μπορούσαν να προβλέψουν την εμφάνιση ΔΝ σε διαβητικούς ασθενείς, συγκρίναμε τον ορό και τα ούρα ασθενών 3 χρόνια πριν τη διάγνωση ΔΝ με τους ασθενείς με ΣΔΤ2 χωρίς επιπλοκές. Στον ορό των διαβητικών ασθενών 3 χρόνια πριν τη διάγνωση ΔΝ, βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα των τριών BCAAs, του α-κετοξέος της ισολευκίνης 3-μεθυλο-2-οξο-βαλερικό οξύ καθώς και του γλουταμινικού οξέος ενώ τα επίπεδα της γλουταμίνης, του α-κετοξέος της λευκίνης 2-οξο-ισοκαπροϊκό οξύ καθώς και του καταβολικού ενδιάμεσου της βαλίνης 3-υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα. Στα ούρα των διαβητικών ασθενών 3 χρόνια πριν τη διάγνωση ΔΝ εντοπίσαμε στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα των τριών BCAAs, των καταβολικών ενδιάμεσων της ισολευκίνης (3-μεθυλο-2-οξοβαλερικό και 2-υδροξυ-3-μεθυλοβαλερικό), του καταβολικού ενδιάμεσου της βαλίνης 2-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ, του τοξικού καταβολικού παραπροϊόντος της λευκίνης Ν-ισοβαλεροϋλογλυκίνη, των δύο κετονοσωμάτων, των ενδιάμεσων του κύκλου του κιτρικού (κιτρικό και ηλεκτρικό) και της αλανίνης **(εικ.48)**.

Στα βιολογικά υγρά των διαβητικών ασθενών 3 χρόνια πριν τη διάγνωση νεφροπάθειας εντοπίσαμε στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα και των τριών BCAAs. Κατά την επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας, με μικρο- και μακρο-αλβουμινουρία, τα επίπεδα των BCAAs στο πλάσμα ανιχνεύονται μειωμένα συγκριτικά με τους διαβητικούς ασθενείς χωρίς επιπλοκές [192]. Παράγοντες όπως η μεταβολική οξέωση και η υπερινσουλιαιμία συμβάλλουν στην αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας του συμπλόκου της αφυδρογονάσης στα κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων και στο ήπαρ με αποτέλεσμα την αυξημένη οξείδωση των BCAAs [194, 195]. Η αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα της αφυδρογονάσης πιθανά αντικατοπτρίζεται και στα μειωμένα επίπεδα του α-κετοξέος της ισολευκίνης στον ορό και στα ούρα των ασθενών της παρούσας μελέτης που ανέπτυξαν ΔΝ.

Τα αυξημένα επίπεδα του καταβολικού ενδιάμεσου της βαλίνης 3-υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ έχουν συσχετιστεί με την υπέρμετρη αγγειογένεση που θεωρείται παράγοντας που συμβάλλει στην προοδευτική εξέλιξη της ΔΝ και σε ορισμένες περιπτώσεις με την έναρξη αιμοκάθαρσης ή την ανάγκη μεταμόσχευσης [233]. Στο ΣΔΤ2, όπως αναφέρθηκε, τα επίπεδα του 2-οξο-ισοκαπροϊκού οξέος (α-κετοξύ της λευκίνης) βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα πιθανά λόγω της μειωμένης δραστηριότητας του ενζύμου BCAT. Στους ασθενείς που εμφάνισαν ΔΝ τα επίπεδα του 2-οξο-ισοκαπροϊκού οξέος βρέθηκαν αυξημένα σε σχέση με τους διαβητικούς ασθενείς χωρίς επιπλοκές και τείνουν στα φυσιολογικά.

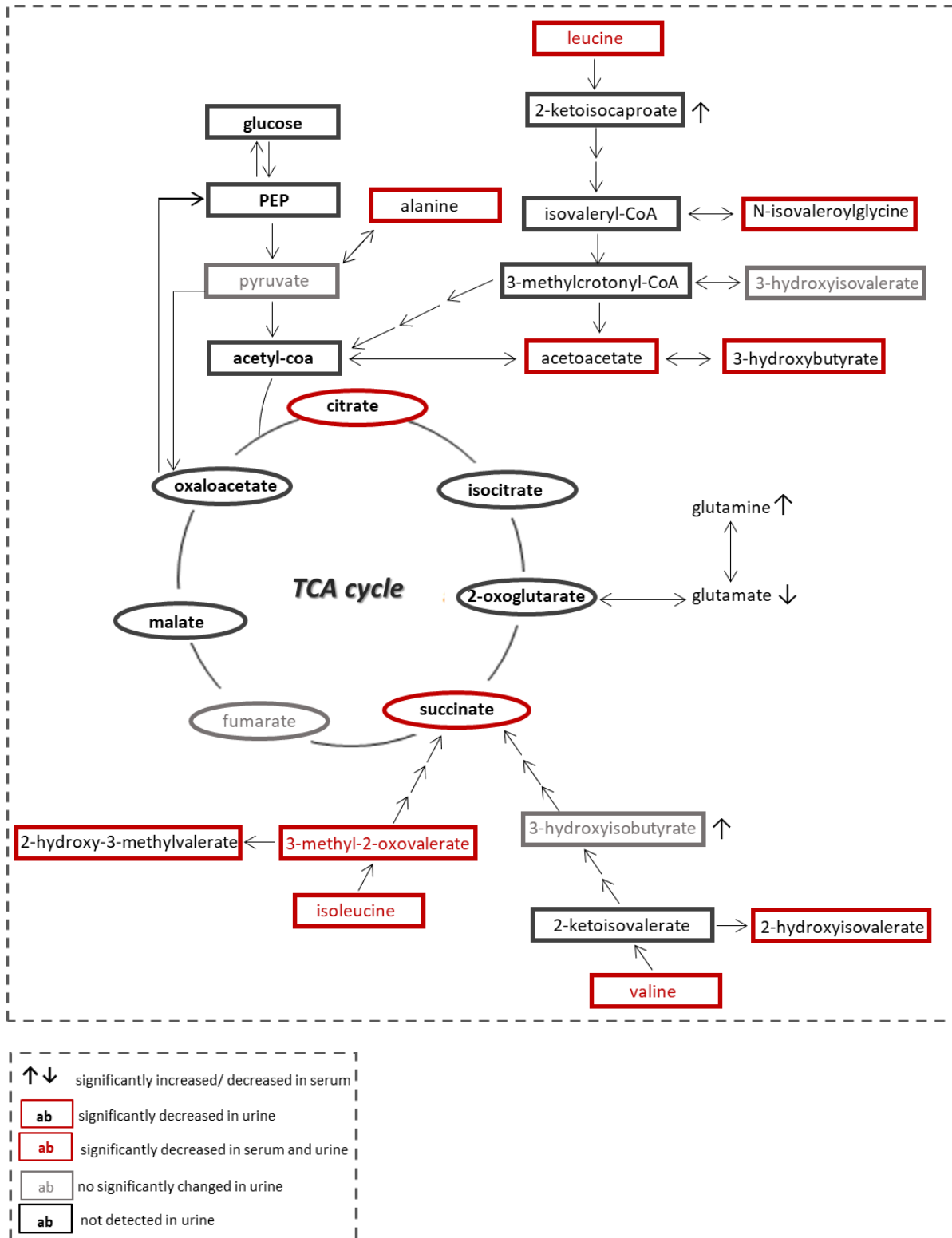
Τα μειωμένα επίπεδα γλουταμινικού οξέος και τα αυξημένα επίπεδα γλουταμίνης στους ασθενείς με ΔΝ πιθανά σχετίζονται με την κατανάλωσή του στην παραγωγή γλουταμίνης ή ως υπόστρωμα νεφρικής γλυκονεογένεσης. Η γλουταμίνη κατέχει σημαντικό ρόλο στην αμμωνιογένεση και την παραγωγή διττανθρακικών στους νεφρούς. Στη μεταβολική οξέωση, αυτές οι διεργασίες παράγουν ιόντα αμμωνίου που απεκκρίνονται στα ούρα συμβάλλοντας στην απομάκρυνση των οξέων καθώς και διττανθρακικών ιόντων που μεταφέρονται στο αίμα για να αντισταθμίσουν εν μέρει την οξέωση [234, 235]. Ο μεταβολισμός της γλουταμίνης δεν επαρκεί για την παραγωγή αμμωνίας από τους νεφρούς και συνεπώς η παραγωγή της από άλλα αμινοξέα αυξάνεται κατά τη διάρκεια της οξέωσης. Προς αυτή την κατεύθυνση, η μεταβολική οξέωση διεγείρει την οξειδωση των BCAAs στα κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων αυξάνοντας τη δραστηριότητα της BCKD μέσω της μείωσης της ειδικής κινάσης BCKDK. Ως εκ τούτου ο καταβολισμός των BCAAs εμφανίζεται ως στοιχείο ενός ολοκληρωμένου ρυθμιστικού μηχανισμού για την αντισταθμισμό της μεταβολικής οξέωσης [54]. Τα επίπεδα των BCAAs στα ούρα σχετίζονται κυρίως με την αντίσταση στην ινσουλίνη, το μεταβολισμό των πρωτεϊνών και τη γλυκονεογένεση. Επομένως, η μείωση των BCAAs πιθανόν να οφείλεται και στην αυξημένη κατανάλωσή τους ως υποστρώματα γλυκονεογένεσης είτε στη νεφρική πρωτεϊνοσύνθεση [236]. Η αυξημένη οξειδωση των BCAAs πιθανά αντανακλάται και στα μειωμένα επίπεδα τεσσάρων ενδιάμεσων του καταβολισμού τους (2-υδροξυ-3-μεθυλοβαλερικό οξύ, 2-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ, 3-μεθυλο-2-οξοβαλερικό οξύ και N-ισοβαλεροϋλογλυκίνη) στα ούρα των ασθενών 3 χρόνια πριν την εμφάνιση ΔΝ.

Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες στα ούρα των ασθενών με ΔΝ παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντική μείωση στα κετονοσώματα. Οι μεταβολές αυτές πιθανά αντανακλούν μειωμένη κετογένεση και διαταραχή στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια, αλλαγές στον ενεργειακό μεταβολισμό των νεφρικών κυττάρων και συνολικά αναδεικνύουν τη

μιτοχονδριακή δυσλειτουργία ως σημαντικό παράγοντα στην παθογένεση της ΔΝ [237]. Λόγω της μειωμένης οξειδωσης των λιπαρών οξέων παρατηρείται συσσώρευσή τους, γεγονός το οποίο οδηγεί μεταγενέστερα σε αποκόλληση των ποδοκυττάρων από τη σπειραματική μεμβράνη με αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία του σπειραματικού διηθητικού φραγμού και τη διαρροή αλβουμίνης στα ούρα [234].

Σε μηχανισμό βλάβης των μιτοχονδρίων πιθανόν να αποδίδονται και τα μειωμένα επίπεδα των ενδιάμεσων προϊόντων του κύκλου του κιτρικού οξέος (κιτρικό, ηλεκτρικό οξύ) που εντοπίστηκαν στα ούρα των ασθενών που διεγνώστηκαν με ΔΝ. Τα εγγύς εσπειραμένα σωληνάκια εμφανίζουν υψηλή περιεκτικότητα σε μιτοχόνδρια και εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η μείωση των ενδιάμεσων του κύκλου του κιτρικού είναι ενδεικτική της διαταραχής του ενεργειακού μεταβολισμού και της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας και έχει συνδεθεί με την εξέλιξη της διαβητικής νεφροπάθειας και τη χρόνια νεφρική νόσο σε διαβητικά μοντέλα [238]. Σύμφωνα με μελέτες, η χορήγηση κιτρικού νατρίου συνδέεται με νεφροπροστασία, καθώς φαίνεται να βελτιώνει τη σωληναριακή βλάβη και καθυστερεί την μείωση του GFR [239].

Τέλος τα μειωμένα επίπεδα του γλυκογενετικού αμινοξέος αλανίνη, πιθανά αντικατοπτρίζουν την αυξημένη κατανάλωσή του ως υπόστρωμα για την παραγωγή αμμωνίας και γλυκονογένεσης, των οποίων οι απαιτήσεις αυξάνονται με την εξέλιξη του διαβήτη [240].



**Εικ. 48:** Μεταβολές στα επίπεδα των BCAAs και των προϊόντων του καταβολισμού τους στον ορό και στα ούρα ασθενών 3 χρόνια πριν τη διάγνωση της Διαβητικής Νεφροπάθειας συγκριτικά με τους ασθενείς με ΣΔΤ2 χωρίς επιπλοκές.

#### 4.4 Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης (ΣΔΚ) vs Φυσιολογική Κύηση

Στην παρούσα μελέτη έγινε διερεύνηση των μεταβολικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία του ΣΔΚ και δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στις μεταβολικές οδούς που πιθανά διαφοροποιούν το ΣΔΚ από το ΣΔΤ2. Όπως έχει αναφερθεί, τα αυξημένα BCAAs σχετίζονται με την αντίσταση στην ινσουλίνη και αποτελούν παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση ΣΔΤ2 [241, 242]. Αν και σε αρκετές μελέτες τα BCAAs έχουν βρεθεί αυξημένα στις γυναίκες με ΣΔΚ σε σύγκριση με τη φυσιολογική κύηση [243, 244], αυτά τα ευρήματα δεν έχουν επιβεβαιωθεί στην πλειονότητα των μελετών [245, 246]. Και στην παρούσα μελέτη, τα επίπεδα των BCAAs στο ΣΔΚ δεν διαφέρουν συγκριτικά με τη φυσιολογική κύηση, ωστόσο παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα μεταβολιτών που σχετίζονται με διαταραχή του καταβολισμού αυτών των αμινοξέων. Συγκεκριμένα στον ορό των εγκύων γυναικών με ΣΔΚ εντοπίσαμε στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα του καταβολικού ενδιάμεσου της λευκίνης 3-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ και του καταβολικού ενδιάμεσου της βαλίνης 3-υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ ενώ τα επίπεδα του α-κετοξέος της ισολευκίνης 3-μεθυλο-2-οξο-βαλερικό οξύ βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επιπλέον, στο ΣΔΚ ανευρέθηκαν αυξημένα επίπεδα κετονοσωμάτων και μειωμένα επίπεδα γλουταμινικού και πυροσταφυλικού οξέος.

Το 3-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ (3-HIVA) είναι ένα παραπροϊόν της οδού αποικοδόμησης της λευκίνης που παράγεται από το 3-μεθυλοκροτονυλ-CoA μέσω του ενζύμου καρβοξυλάση του μεθυλοκροτονυλου-CoA. Τα αυξημένα επίπεδα 3-υδροξυ-ισοβαλερικού οξέος συνδέονται με αυξημένη κετογένεση, ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα του ΣΔΚ, καθώς και με τη μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου μεθυλοκροτονυλο-CoA καρβοξυλάση πιθανώς λόγω έλλειψης βιοτίνης [247]. Η συσσώρευση 3-HIVA είναι τοξική για τα μιτοχόνδρια και σε αυτές τις περιπτώσεις για την απομάκρυνσή του, η καρνιτίνη καταναλώνεται στη μετεστεροποίηση στην ακυλοκαρνιτίνη, 3-υδροξυ-ισοβαλερυλοκαρνιτίνη, διαφεύγει από τα μιτοχόνδρια και στη συνέχεια απεκκρίνεται από τα νεφρά, συμβάλλοντας έτσι και στα χαμηλά επίπεδα ελεύθερης καρνιτίνης στο αίμα [248].

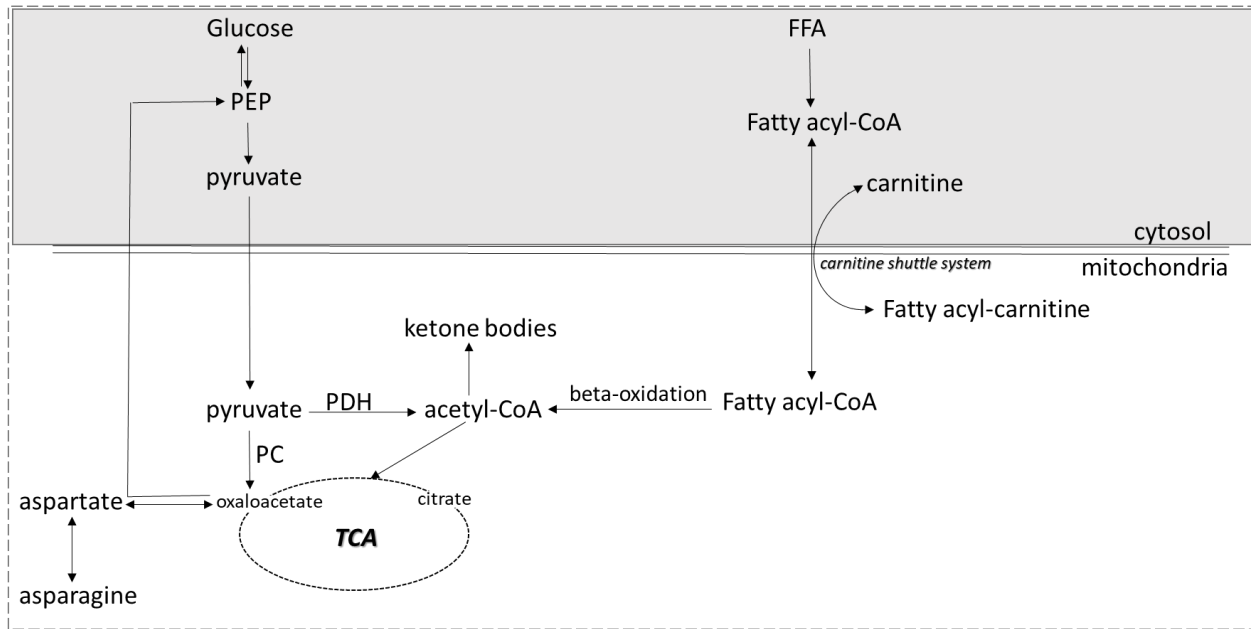
Το καταβολικό προϊόν της βαλίνης, 3-υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ, (3-HIB) εμφανίζει θετική συσχέτιση με την αντίσταση στην ινσουλίνη και αυξημένα επίπεδα αυτού του οξέος έχουν βρεθεί σε καταστάσεις υπεργλυκαιμίας καθώς και στο ΣΔΤ2 [249]. Τα αυξημένα επίπεδα του 3-HIB στην κυκλοφορία και στους σκελετικούς μύες των διαβητικών μπορεί να συμβάλλουν στην υπέρμετρη μυική πρόσληψη ελεύθερων λιπαρών οξέων και ακολούθως στην ατελή αποικοδόμησή τους, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση τοξικών ενδιάμεσων των λιπιδίων και ως συνέπεια εμφάνιση αντίστασης στην ινσουλίνη. Σύμφωνα με τα ευρήματα μελετών τα επίπεδα του 3-HIB συσχετίζονται

με τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων, της γλυκερόλης, των ελεύθερων λιπαρών οξέων καθώς και με την ινσουλινοαντίσταση στο λιπώδη ιστό [250]. Τέλος τα μειωμένα επίπεδα του α-κετοξέος της ισολευκίνης, 3-μεθυλο-2-οξοβαλερικό οξύ, πιθανά συνδέονται με τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στο ΣΔΚ και τη μειωμένη ικανότητα αυτών των οργανιδίων να διασπούν τα BCAAs [251]. Συμπερασματικά, οι μεταβολές στα επίπεδα των καταβολικών ενδιάμεσων των BCAAs που υποδεικνύουν διαταραχές του καταβολισμού τους φαίνεται να συσχετίζονται με το διαβήτη κύησης και όχι τα αυξημένα BCAAs *per se*. Στη διάρκεια της φυσιολογικής κύησης, η συγκέντρωση των BCKAs εμφανίζει είτε ελάχιστη αλλαγή όπως το 2-οξο-ισοβαλερικό οξύ και το 3-μεθυλο-2-οξο-βαλερικό οξύ, ή μείωση όπως το 2-οξο-ισοκαπροϊκό οξύ [132]. Σε άτομα με διαταραγμένη γλυκόζη νηστείας όσο και σε ασθενείς με ΣΔΤ2, τόσο τα BCAAs όσο και τα BCKAs ανευρίσκονται στατιστικά σημαντικά αυξημένα σε σχέση με τους υγιείς [252], με το 3-μεθυλο-2-οξοβαλερικό οξύ να αναδεικνύεται ως ο πιο ισχυρός προγνωστικός δείκτης διαταραγμένης ανοχής στη γλυκόζη [251]. Συμπερασματικά, στο ΣΔΚ, ο καταβολισμός των BCAAs φαίνεται να επηρεάζεται με διαφορετικό τρόπο απ' ότι στο ΣΔΤ2.

Στα μιτοχόνδρια των ηπατικών κυττάρων, το ακετυλο-CoA που προέρχεται είτε από τη β-οξειδωση των λιπαρών οξέων είτε από την οξειδωση του πυροσταφυλικού με τη δράση του ενζύμου αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού (pyruvate dehydrogenase, PDH), οξειδώνεται μέσω του κύκλου του κιτρικού ή χρησιμοποιείται στη σύνθεση κετονοσωμάτων (**εικ.49**). Το οξαλοξικό, που αποτελεί βασικό μόριο για την είσοδο του ακετυλου-CoA στον κύκλο του κιτρικού καθώς ενώνεται μαζί του για το σχηματισμό κιτρικού, προέρχεται από την καρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού μέσω της πυροσταφυλικής καρβοξυλάσης (pyruvate carboxylase, PC) ή από την τρανσαμίνωση του ασπαρτικού. Η έλλειψη οξαλοξικού πιθανά οφείλεται στην κατανάλωσή του στην αυξημένη γλυκονεογένεση που αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα του ΣΔΚ [253, 254]. Έτσι, η μεγαλύτερη ποσότητα οξαλοξικού μετατρέπεται σε γλυκόζη, αφήνοντας μια μικρή ποσότητα αυτού να συνενωθεί με το ακετυλο-CoA και να εισέλθουν στον κύκλο του κιτρικού. Σαν συνέπεια, η μειωμένη διαθεσιμότητα του οξαλοξικού συμβάλλει στη μειωμένη ικανότητα του ακετυλου-CoA να εισέλθει στον κύκλο του κιτρικού οδηγώντας στην αυξημένη παραγωγή κετονοσωμάτων. Η επικράτηση του μεταβολικού δρόμου 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. Σαν συνέπεια, η χαμηλή διαθεσιμότητα οξαλοξικού μπορεί να συνδέεται με τα στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα κετονοσωμάτων



(3-υδροξυβουτυρικό οξύ και ακετοξικό) που βρέθηκαν σε γυναίκες με ΣΔΚ στην παρούσα μελέτη και σε άλλες αντίστοιχες μεταβολομικές μελέτες σε διαφορετικά στάδια κύησης [133, 134, 246, 254, 255]. Στο ΣΔΤ2, η συσχέτιση των κετονοσωμάτων με την ευαισθησία στη δράση της ινσουλίνης έχει αποδοθεί για παράδειγμα στην παρουσία ή απουσία του αλληλόμορφου C του γονιδίου GCKR, που κωδικοποιεί τη ρυθμιστική πρωτεΐνη της γλυκοκινάσης και σχετίζεται σημαντικά με αυξημένα επίπεδα τόσο γλυκόζης νηστείας όσο και του 3-υδροξυβουτυρικού οξέος [216].



**Εικ. 49:** Διαταραχή μεταβολικών οδών στο ΣΔΚ (μεταβολισμός του πυροσταφυλικού, β-οξειδωση λιπαρών οξέων, μεταβολισμός κετονοσωμάτων).

Τέλος, ο ΣΔΚ σχετίζεται με αυξημένο οξειδωτικό στρες και κατά συνέπεια στον πλακούντα παρατηρείται αύξηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών για τη μείωση της οξειδωτικής βλάβης με αποτέλεσμα την αυξημένη σύνθεση γλουταθειόνης. Αυτή η υπόθεση μπορεί να υποστηριχθεί και από τα μειωμένα επίπεδα γλυκίνης και γλουταμικού οξέος στη μελέτη μας, τα οποία είναι πρόδρομα μόρια στη σύνθεση γλουταθειόνης.

#### 4.5 Αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος (ΑΗ, ΠΧΧ, ΠΣΧ) vs Υγιείς

Η αυτοάνοση ηπατίτιδα (ΑΗ) είναι μια χρόνια ηπατική νόσος, που χαρακτηρίζεται από υπεργαμμασφαιριναιμία, κυκλοφορούντα αυτοαντισώματα, περιπυλαία ηπατίτιδα στη βιοψία ήπατος και πολύ καλή απόκριση των ασθενών στην ανοσοκαταστολή [256]. Ο επιπολασμός της ΑΗ βαίνει αυξανόμενος και είναι συχνότερη στις γυναίκες προσβάλλοντας όλες τις ηλικίες [257]. Η παθογένεια της νόσου είναι άγνωστη και πιθανά η έναρξή της σχετίζεται με την έκθεση γενετικά προδιατεθειμένων ατόμων σε εκλυτικούς παράγοντες (ιοί, μικρόβια, ξеноβιοτικά) [258]. Καθώς δεν υπάρχει ειδικός δείκτης, η διάγνωση της ΑΗ βασίζεται σε συνδυασμό κλινικών, ανοσολογικών και ιστολογικών ευρημάτων και αποκλεισμού άλλων αιτιών ηπατικής νόσου, τα οποία έχουν ενσωματωθεί σε διεθνώς αποδεκτά διαγνωστικά βαθμοποιημένα συστήματα [259]. Ωστόσο, τα κριτήρια διάγνωσης έχουν ορισμένους περιορισμούς και ειδικά στην περίπτωση οξείας νόσου [260]. Ως εκ τούτου, υπάρχει μια επιτακτική ανάγκη να βρεθούν αξιόπιστοι και ειδικοί διαγνωστικοί δείκτες που αντικατοπτρίζουν την ξεχωριστή παθογένεια της νόσου.

Η πρωτοπαθής χολική χολαγγειίτιδα (ΠΧΧ) χαρακτηρίζεται από ανοσολογικά επαγόμενη καταστροφή μικρών ενδοηπατικών χοληφόρων [261]. Προσβάλλει κυρίως γυναίκες μέσης ηλικίας και ο επιπολασμός της συνεχώς αυξάνεται. Στους περισσότερους ασθενείς ανιχνεύονται αντιμιτοχονδριακά αντισώματα [262]. Η αιτιοπαθογένεια της νόσου είναι άγνωστη και θεωρείται ότι σχετίζεται με συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων όταν η ανοσοανοχή για τα μιτοχονδριακά ένζυμα χαθεί [263].

Η πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα (ΠΣΧ) χαρακτηρίζεται από φλεγμονή των ενδοηπατικών και εξωηπατικών χοληφόρων που οδηγεί σε ίνωση ή/και εξάλειψή τους, χολόσταση και κίρρωση [264]. Είναι συχνότερη στους άντρες και η σοβαρότητα της κλινικής πορείας της νόσου ποικίλλει σημαντικά, ενώ 20-80% των ασθενών μπορεί να πάσχει από φλεγμονώδη νόσο του εντέρου [265]. Η παθογένειά της έχει πολλά αδιευκρίνιστα σημεία και πιθανολογείται ότι σχετίζεται με απάντηση σε μοριακά πρότυπα παθογόνων που μεταφέρονται από το έντερο μέσω της πυλαίας στο ήπαρ.

Στο πλάσμα ασθενών με τα τρία αυτοάνοσα ηπατικά νοσήματα συγκριτικά με τους υγιείς, βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα των γλυκογενετικών αμινοξέων βαλίνης, αλανίνης και γλουταμίνης (**πίνακας 17**). Επιπρόσθετα, οι ασθενείς με ΑΗ και ΠΧΧ παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα γλυκόζης (**πίνακας 8**), τα οποία πιθανά οφείλονται στην υπερενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και στη χρήση εναλλακτικών ενεργειακών μηχανισμών. Είναι γνωστό ότι, στα λεμφοκύτταρα, ο μεταβολισμός της γλυκόζης είναι απαραίτητος

για την ενεργοποίηση, τη λειτουργία και τον πολλαπλασιασμό τους [182]. Η αύξηση της γλυκόζης συνοδεύτηκε από μείωση των γλυκογενετικών αμινοξέων, στα οποία ανήκει η αλανίνη, η βαλίνη και η γλουταμίνη, που πιθανά θα μπορούσε να αποδοθεί στη χρήση τους ως εναλλακτικά υποστρώματα γλυκονογένεσης. Καθώς έχει αναφερθεί ότι στα ηπατικά νοσήματα, παρατηρείται αυξημένος ρυθμός γλυκονογένεσης ως αντισταθμιστικός μηχανισμός στην περιορισμένη παραγωγή γλυκόζης από τη διάσπαση του γλυκογόνου, η μείωση των γλυκογενετικών αμινοξέων θα μπορούσε να υποδηλώνει την κατανάλωση τους στην ηπατική γλυκονογένεση και στα μονοπάτια παραγωγής ενέργειας [266].

Ένα κοινό εύρημα των τριών αυτοάνοσων νοσημάτων αποτελούν τα αυξημένα επίπεδα του 3-υδροξυ-ισοβουτυρικού οξέος (καταβολικό ενδιάμεσο της βαλίνης) (**πίνακας 17**). Η αύξηση της συγκέντρωσης του 3-υδροξυ-ισοβουτυρικού οξέος αποδίδεται στον αυξημένο καταβολισμό της βαλίνης και έχει αναφερθεί ότι η συσσώρευσή του αναστέλλει τη φυσιολογική λειτουργία των συμπλόκων I-III της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας [267] και πιθανά συμβάλλει στη γαλακτική οξέωση.

Στα τρία αυτοάνοσα νοσήματα τα επίπεδα των δύο ενδιάμεσων του κύκλου του κιτρικού (κιτρικό και ηλεκτρικό) βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα. Η συγκέντρωση του 2-οξο-γλουταρικού οξέος εντοπίστηκε στατιστικά σημαντικά αυξημένη στο πλάσμα των ασθενών με ΑΙΗ, στατιστικά σημαντικά μειωμένη στους ασθενείς με ΠΧΧ ενώ στην ΠΣΧ ανευρέθηκε σε φυσιολογικά επίπεδα. Στην αυτοάνοση ηπατίτιδα, η αυξημένη ενεργοποίηση του κύκλου του κιτρικού συμβάλλει επίσης στη διαταραχή της λειτουργίας της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας και στην εκδήλωση ηπατικού οξειδωτικού στρες και φλεγμονής [268]. Και στα τρία αυτοάνοσα νοσήματα βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα γλουταμινικού τα οποία πιθανά αποδίδονται στον αυξημένο καταβολισμό των BCAAs και σε συνδυασμό με τα μειωμένα επίπεδα γλουταμίνης πιθανά αντανακλούν διαταραχή στον κύκλο γλουταμίνης-γλουταμινικού και στο μηχανισμό αποτοξίνωσης από αμμωνία [269].

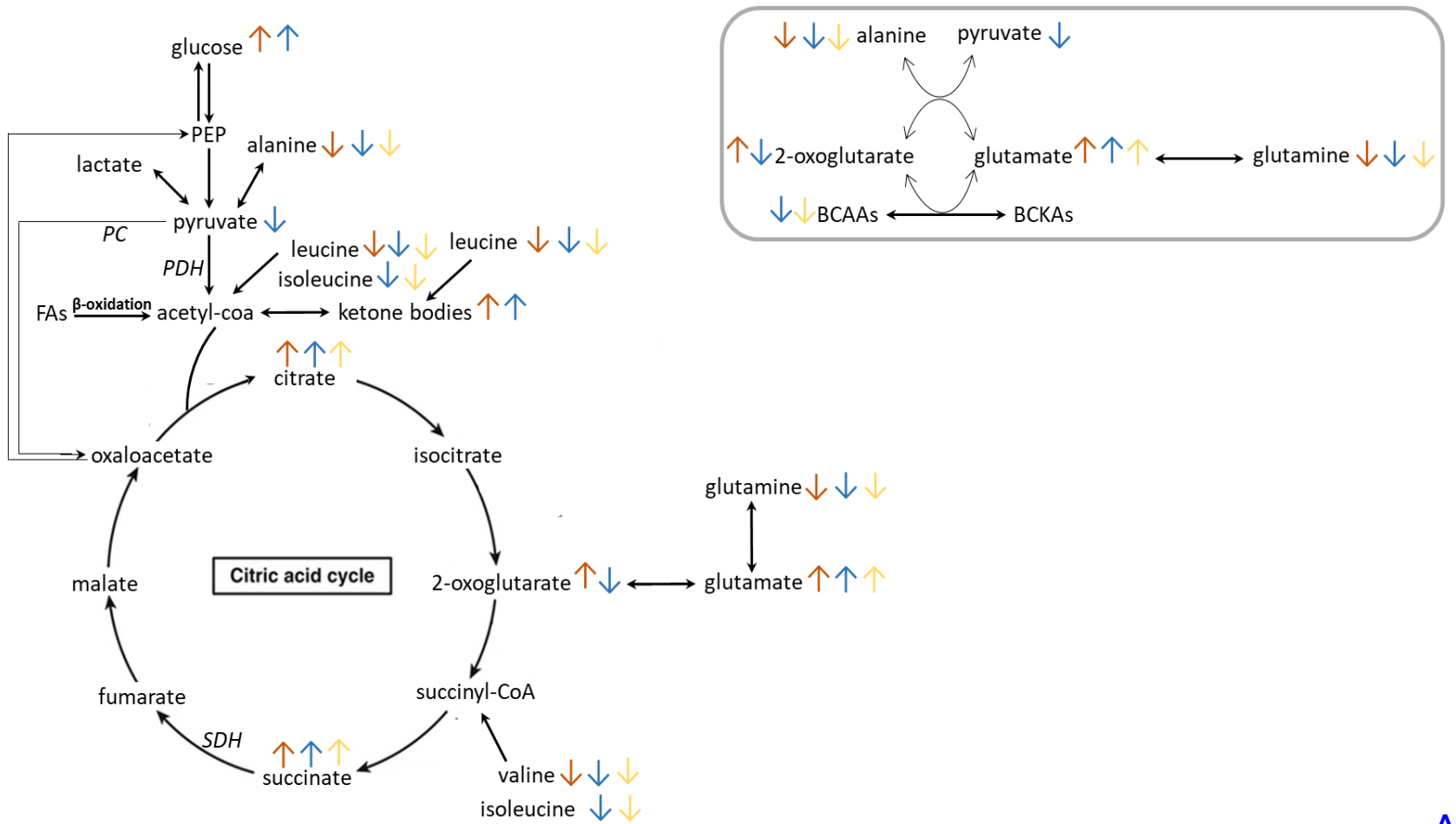
Στο πλάσμα των ασθενών με Πρωτοπαθή Χολική Χολαγγειίτιδα τα επίπεδα του πυροσταφυλικού οξέος βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα ενώ στα άλλα δύο αυτοάνοσα νοσήματα δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μεταβολή ως προς τα φυσιολογικά. Στη χολόσταση, η υποξία και η διαταραχή του ενεργειακού μεταβολισμού των μιτοχονδρίων συμβάλλουν στην αυξημένη ενεργοποίηση της αναερόβιας γλυκόλυσης και στην κατανάλωση του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό [270]. Καθώς τα αντιμιτοχονδριακά αντισώματα που ανιχνεύονται στους περισσότερους ασθενείς με ΠΧΧ αναστέλλουν την ενζυμική δραστηριότητα της

αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού, το ένζυμο που καταλύει τη μετατροπή του πυροσταφυλικού σε ακετυλο-συνένζυμο Α, σε συνδυασμό με τα μειωμένα επίπεδα της αλανίνης πιθανά υποδεικνύουν την αυξημένη παραγωγή γαλακτικού ως την κύρια μεταβολική τύχη του πυροσταφυλικού [271, 272].

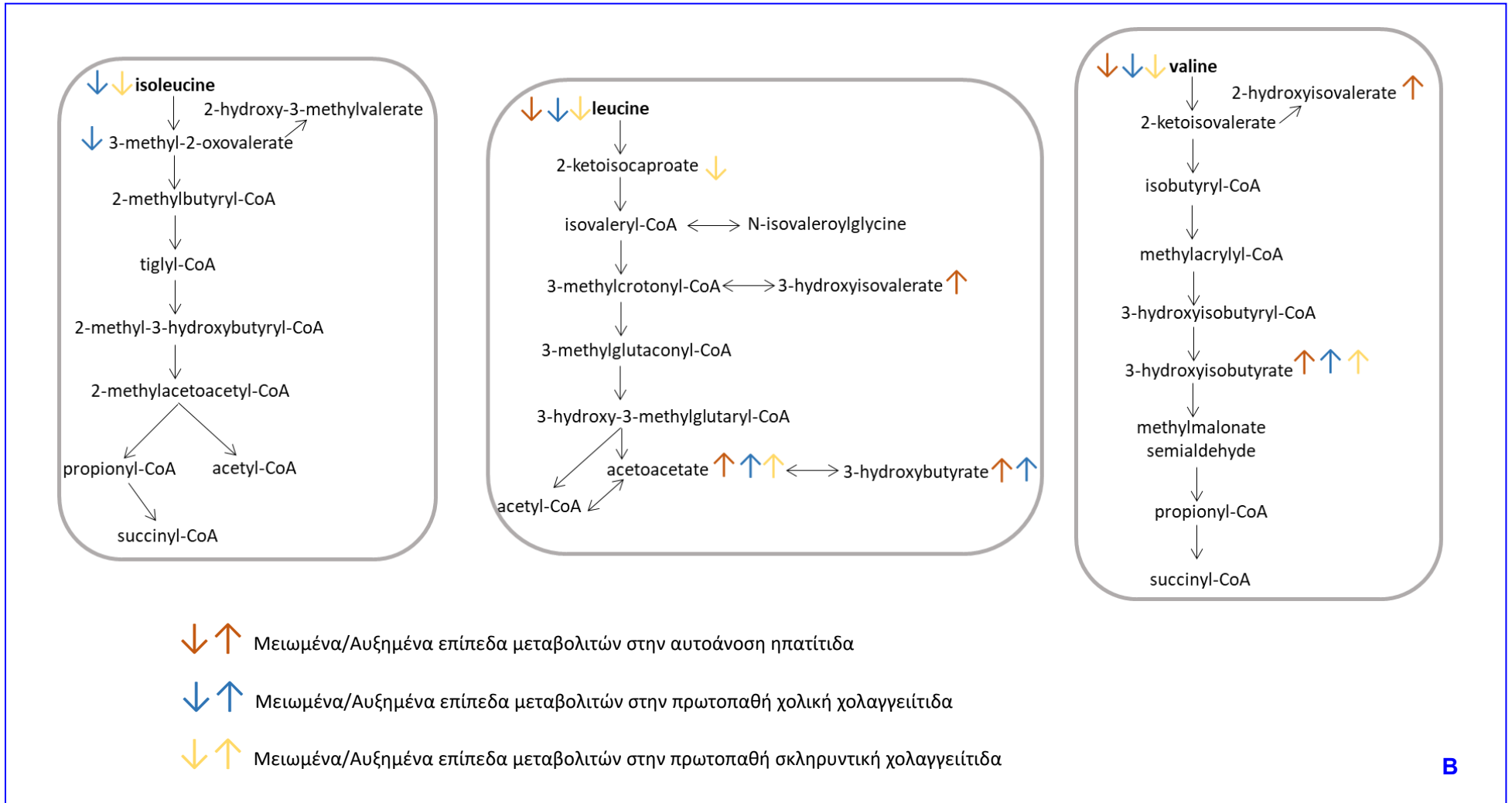
Στα τρία αυτοάνοσα νοσήματα βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα λευκίνης και στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα του κετονοσώματος ακετοξικό. Το 3-υδροξυ-βουτυρικό οξύ ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένο στους ασθενείς με ΑΗ και ΠΧΧ, ενώ στην ΠΣΧ ανευρέθηκε σε φυσιολογικά επίπεδα. Τα μειωμένα επίπεδα λευκίνης σε συνδυασμό με τα αυξημένα κατονοσώματα στην ΑΗ και ΠΧΧ και σε μικρότερο βαθμό στην ΠΣΧ πιθανά αντανακλούν διαφοροποιήσεις στο μεταβολισμό των κετονοσωμάτων καθώς εκτός από το σχηματισμό τους από το ακετυλο-CoA πιθανά ενισχύεται και ο εναλλακτικός δρόμος σύνθεσης κετονοσωμάτων μέσω του καταβολισμού των κετογενετικών αμινοξέων [273]. Στην ΑΗ, η αυξημένη κετογένεση και η γαλακτική οξέωση αντικατοπτρίζεται και στα στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα των δύο ενδιάμεσων του καταβολισμού της βαλίνης και λευκίνης, 2- και 3-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ [184, 274].

Ο αυξημένος ρυθμός οξειδωσης της λευκίνης στα δύο αυτοάνοσα χολοστατικά νοσήματα ΠΧΧ και ΠΣΧ πιθανά αντικατοπτρίζεται στα στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα του α-κετοξέος της λευκίνης 2-οξο-ισοκαπροϊκό οξύ. Στην ΠΧΧ, τα στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα του α-κετοξέος της ισολευκίνης 3-μεθυλο-2-οξο-βαλερικό οξύ πιθανά οφείλονται στον αυξημένο ρυθμό οξειδωσης της ισολευκίνης. Επιπλέον στις δύο χολαγγειίτιδες παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα ισολευκίνης τα οποία σύμφωνα με μελέτες, έχουν συνδεθεί με την προοδευτική εξέλιξη σε κίρρωση [275].

Συμπερασματικά, στα δύο χολοστατικά αυτοάνοσα νοσήματα ΠΧΧ και ΠΣΧ παρατηρείται διαταραχή του καταβολισμού και των τριών BCAAs, ενώ στην αυτοάνοση ηπατίτιδα τόσο τα επίπεδα όσο και ο καταβολισμός της ισολευκίνης δεν εμφανίζει κάποια μεταβολή ως προς τους υγιείς **(εικ.50)**.



A



**Εικ. 50 (A & B):** Μεταβολές στα επίπεδα των BCAAs και των προϊόντων του καταβολισμού τους στα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος συγκριτικά με τους υγιείς, PEP: Phosphoenolpyruvate, FAs: Fatty acids, PC: Pyruvate Carboxylase, PDH: Pyruvate Dehydrogenase.

#### 4.6 Χρόνιες Ιογενείς Ηπατίτιδες B + C (CVH) vs Υγιείς

Στις χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες, εντοπίστηκαν διαταραχές στο μεταβολισμό των κετονοσωμάτων καθώς στο πλάσμα των ασθενών βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα λευκίνης καθώς και του αντίστοιχου α-κετοξέος της 2-οξο-ισοκαπροϊκού οξύ και στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα κετονοσωμάτων (3-υδροξυ-βουτυρικό οξύ και ακετοξικό οξύ), ευρήματα τα οποία πιθανά υποδηλώνουν την αυξημένη κετογένεση και από εναλλακτικά υποστρώματα όπως τα κετογενετικά αμινοξέα. Επιπλέον, όπως στα περισσότερα ηπατικά νοσήματα έτσι και στις χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες παρατηρείται αύξηση της γλυκόζης και μείωση των γλυκογενετικών αμινοξέων όπως η αλανίνη, η γλουταμίνη και η βαλίνη προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτικά υποστρώματα γλυκονογένεσης. Η αυξημένη οξείδωση της βαλίνης πιθανά αντανακλάται και στα αυξημένα επίπεδα του καταβολικού της προϊόντος 3-υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ.

Όπως και στα αυτοάνοσα νοσήματα, στις χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες εντοπίσαμε στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα των δύο ενδιάμεσων του κύκλου του κιτρικού, κιτρικό και ηλεκτρικό οξύ, που πιθανά υποδηλώνουν τη διαταραχή της φυσιολογικής λειτουργίας του ως συνέπεια της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας.

Τέλος, η μη φυσιολογική λειτουργία του κύκλου γλουταμίνης-γλουταμινικού φαίνεται να συνοδεύει και τις χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες υποδεικνύοντας την πιθανή παρεμπόδιση του μεταβολικού δρόμου που οδηγεί στην αποτοξίνωση από αμμωνία.

#### 4.7 ΠΧΧ, ΠΣΧ & CVH χωρίς θεραπεία vs ΑΗ χωρίς θεραπεία

Εκτός από τη διερεύνηση των μεταβολικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην παθογένεια των αυτοάνοσων νοσημάτων, ιδιαίτερο κλινικό ενδιαφέρον παρουσιάζει και η διαφορική διάγνωση αυτών. Προς αυτή την κατεύθυνση διερευνήθηκαν ομοιότητες και διαφορές της αυτοάνοσης ηπατίτιδας με τα δύο αυτοάνοσα νοσήματα των χοληφόρων και ιδιαίτερα με την ΠΧΧ καθώς επίσης και της αυτοάνοσης ηπατίτιδας με το σύνολο των ομάδων ελέγχου της παρούσας μελέτης (ΠΧΧ, ΠΣΧ, CVH).

Στα τρία αυτοάνοσα ηπατικά νοσήματα παρατηρείται μείωση των γλυκογενετικών αμινοξέων (αλανίνη, γλουταμίνη, βαλίνη) η οποία πιθανά αποτελεί ένδειξη αυξημένης ηπατικής γλυκονεογένεσης. Επιπλέον τα μειωμένα επίπεδα της λευκίνης σε συνδυασμό με τα αυξημένα κετονοσώματα πιθανά υποδεικνύουν την κατανάλωσή της ως εναλλακτικό υπόστρωμα κετογένεσης. Τα ευρήματα αυτά σε συνδυασμό με τα αυξημένα επίπεδα των καταβολικών ενδιάμεσων βαλίνης και λευκίνης, 2-υδροξυ-ισοβαλερικού και 3-υδροξυ-ισοβαλερικού οξέος στην ΑΗ πιθανά αποτελούν ενδείξεις ενισχυμένου καταβολισμού των δύο BCAAs.

Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία καθώς και η διαταραχή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και η συστηματική γαλακτική οξέωση αντανακλάται και στα τρία αυτοάνοσα νοσήματα τόσο στα αυξημένα επίπεδα γαλακτικού και 3-υδροξυ-ισοβουτυρικού οξέος όσο και στα αυξημένα ενδιάμεσα του κύκλου του κιτρικού (κιτρικό και ηλεκτρικό). Τέλος, διαταραχές στον κύκλο γλουταμίνης-γλουταμινικού με αντίκτυπο στη μη αποτελεσματική οδό αποτοξίνωσης της αμμωνίας χαρακτηρίζει και τα τρία αυτοάνοσα νοσήματα.

Συγκριτικά με την αυτοάνοση ηπατίτιδα, στην ΠΧΧ τα μειωμένα επίπεδα του πυροσταφυλικού και η μετατροπή του σχεδόν εξ' ολοκλήρου σε γαλακτικό πιθανά συνδέονται με την αναστολή του ενζυμικού συμπλόκου της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού από τα αντιμιτοχονδριακά αντισώματα. Αντίστοιχα τα μειωμένα επίπεδα του 2-οξο-γλουταρικού οξέος στην ΠΧΧ και τα αυξημένα επίπεδα γλουταμινικού πιθανά υποδεικνύουν την κατανάλωσή του στη σύνθεση γλουταμινικού.

Στα δύο χολοστατικά αυτοάνοσα νοσήματα (ΠΧΧ, ΠΣΧ) εντοπίσαμε στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα και των τριών BCAAs καθώς και του α-κετοξέος της λευκίνης στην ΠΣΧ και της ισολευκίνης στην ΠΧΧ (2-οξο-ισοκαπρικό οξύ και 3-μεθυλο-2-οξοβαλερικό οξύ), ενώ στην αυτοάνοση ηπατίτιδα τα επίπεδα της ισολευκίνης και του αντίστοιχου α-κετοξέος της ανευρέθηκαν φυσιολογικά. Τα μειωμένα επίπεδα ισολευκίνης έχουν συσχετιστεί με την εξέλιξη



ηπατικών νοσημάτων στην κίρρωση [275]. Τα BCAAs απαιτούνται για τη διατήρηση της ενισχυμένης μεταβολικής κατάστασης των ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων. Σε σύγκριση με τα ηωσινόφιλα και τα ουδετερόφιλα, τα λεμφοκύτταρα παρουσιάζουν την υψηλότερη ενσωμάτωση ισολευκίνης. Τα ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα (regulatory T (Treg) cells) που ρυθμίζουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις εμφανίζουν υψηλούς ρυθμούς πολλαπλασιασμού *in vivo*. Τα BCAAs και ιδιαίτερα η ισολευκίνη απαιτούνται για τον παρατεταμένο πολλαπλασιασμό και τη διατήρηση των κυττάρων Treg μέσω της ενεργοποίησης του mTOR. Αυτά τα ευρήματα υπογραμμίζουν τον ρόλο της ισολευκίνης στα αυτοάνοσα νοσήματα [276].

Καθώς η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού και οι ανοσολογικές αποκρίσεις είναι ενεργειακά εξαρτώμενες διαδικασίες αλληλένδετες με την παραγωγή ATP και στα αυτοάνοσα ηπατικά νοσήματα και ιδιαίτερα στην αυτοάνοση ηπατίτιδα παρατηρείται μια αυξημένη λειτουργία του κύκλου του Krebs. Ωστόσο, στην AH συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, τα επίπεδα του ηλεκτρικού οξέος βρέθηκαν μειωμένα. Το ένζυμο ηλεκτρική αφυδρογονάση (Succinate Dehydrogenase, SDH) καταλύει την οξείδωση του ηλεκτρικού σε φουμαρικό στα μιτοχόνδρια υπό αερόβιες συνθήκες. Η ενζυμική δραστηριότητα της SDH ρυθμίζεται από τη σιρτουίνη 3 (sirtuin 3, SIRT3) την εξαρτώμενη από NAD<sup>+</sup> μιτοχονδριακή αποακετυλάση [277]. Σε αυτοάνοσα νοσήματα, η αυξημένη ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB που αποτελεί και ρυθμιστή της μεταγραφής του γονιδίου της SIRT3 πιθανά μέσω της σύνδεσής του με τον υποκινητή του γονιδίου οδηγεί στην αύξηση της έκφρασης και δραστηριότητας της SIRT3 [278]. Η SIRT3 μέσω της αποακετυλίωσης της ενεργής υπομονάδας του ενζύμου ηλεκτρική αφυδρογονάση επάγει την αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου, οδηγώντας πιθανώς σε μειωμένα επίπεδα ηλεκτρικού που παρατηρήθηκαν σε ασθενείς με AH στη μελέτη μας.

#### 4.8 ANH με θεραπεία vs ANH χωρίς θεραπεία & υγιείς

Μετά τη χορήγηση θεραπευτικής αγωγής στους ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα, τα επίπεδα και των τριών BCAAs βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα. Ωστόσο τα καταβολικά ενδιάμεσα βαλίνης και λευκίνης, 2-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ και 3-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα και τείνουν στα φυσιολογικά επίπεδα. Το γεγονός αυτό πιθανά υποδηλώνει μια πιθανή βελτίωση του διαταραγμένου καταβολισμού της βαλίνης και της λευκίνης, της ηπατικής ίνωσης και των επιπέδων βιοτίνης [279].

Τα επίπεδα του ακετοξικού οξέος αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά, κάτι το οποίο δεν παρατηρήθηκε για το 3-υδροξυ-βουτυρικό οξύ πιθανά λόγω του μεγάλου SD, γεγονός που υποδηλώνει την αυξημένη κετογένεση, με τα BCAAs να συμμετέχουν ως εναλλακτικά κετογενετικά υποστρώματα.

Τέλος μια βελτίωση του ενεργειακού μεταβολισμού θα μπορούσε να συνδεθεί με τα μειωμένα επίπεδα κιτρικού οξέος ωστόσο η παρατήρηση αυτή δεν ισχύει για τα υπόλοιπα ενδιάμεσα του κύκλου με το ηλεκτρικό να ανευρίσκεται στατιστικά σημαντικά αυξημένο.

Μετά τη χορήγηση ουρσοδεοξυχολικού οξέος σε ασθενείς με ΠΧΧ, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα των BCAAs εκτός της ισολευκίνης που μειώθηκε στατιστικά σημαντικά γεγονός το οποίο πιθανά σχετίζεται με ένα μεταβολικό προφίλ με πιο πιθανή εξέλιξη στην κίρρωση [275]. Τα αυξημένα επίπεδα του καταβολικού ενδιάμεσου της λευκίνης, 3-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ καθώς και του ακετοξικού οξέος πιθανά συνδέονται με έλλειψη βιοτίνης και με εναλλακτικούς μηχανισμούς κετογένεσης καθώς δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα λευκίνης. Έχει αναφερθεί ότι η χορήγηση UDCA συμβάλλει στη βελτίωση του μεταβολισμού των λιπιδίων, επομένως τα αυξημένα επίπεδα ακετοξικού οξέος μπορεί να προέρχονται και από την αύξηση της β-οξειδωσης [280]. Τέλος τα μειωμένα επίπεδα του γλουταμινικού οξέος πιθανά υποδεικνύουν την κατανάλωσή του στη σύνθεση του αντιοξειδωτικού γλουταθειόνης καθώς η χορήγηση UDCA έχει συνδεθεί με μείωση του ηπατικού οξειδωτικού στρες [281].

Στους ασθενείς με ΠΣΧ, η θεραπεία με ουρσοδεοξυχολικό οξύ συνδέθηκε με τη στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της λευκίνης προς τα φυσιολογικά επίπεδα. Επιπλέον η μείωση του καταβολικού της προϊόντος 3-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ υποδεικνύει τη μειωμένη οξείδωση της λευκίνης ως εναλλακτικό υπόστρωμα κετογένεσης και πιθανά

συνδέεται με αύξηση των επιπέδων βιοτίνης. Επιπλέον τα αυξημένα επίπεδα 3-υδροξυβουτυρικού οξέος αντανακλούν τη βελτίωση του ηπατικού μεταβολισμού των λιπιδίων.

Τέλος μελέτες υποστηρίζουν ότι τα λιπόφιλα χολικά οξέα συμβάλλουν στη δυσλειτουργία των ενζυμικών συμπλεγμάτων της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στα οποία ανήκει και η αφυδρογονάση του ηλεκτρικού [282]. Το γεγονός αυτό πιθανά αντικατοπτρίζεται και στην παρούσα μελέτη στα αυξημένα επίπεδα ηλεκτρικού οξέος και η μιτοχονδριακή τοξικότητα που επάγουν τα λιπόφιλα χολικά οξέα μπορεί να σχετίζεται με την ανάπτυξη ηπατικής ανεπάρκειας στη χολόσταση.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή διερευνήθηκε η διαταραχή του καταβολισμού των BCAAs στις παθολογικές καταστάσεις: Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2, σακχαρώδης διαβήτης κύησης, διαβητική νεφροπάθεια και αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος καθώς και η επίδραση της θεραπευτικής αγωγής στην αποκατάστασή του στο ΣΔΤ2 και τα ANH. Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσης διατριβής μπορούμε να συμπεράνουμε τα ακόλουθα:

- Ο ΣΔΤ2 χαρακτηρίζεται από διαταραχή του καταβολισμού των BCAAs με κύρια χαρακτηριστικά στα βιολογικά υγρά: 1) τα αυξημένα επίπεδα των BCAAs και του α-κετοξέος της ισολευκίνης 3-μεθυλο-2-οξο-βαλερικό οξύ [**ορός και ούρα**] 2) τη συσσώρευση του καταβολικού ενδιάμεσου της βαλίνης 3-υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ και τη μείωση των καταβολικών προϊόντων της λευκίνης 2-οξο-ισοκαπροϊκό οξύ και 3-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ [**ορός**] καθώς και 3) την αυξημένη απέκκριση των καταβολικών ενδιάμεσων της ισολευκίνης 2-υδροξυ-3-μεθυλο-βαλερικό οξύ, της λευκίνης N-ισοβαλεροϋλογλυκίνη και της βαλίνης 2-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ [**ούρα**]. Οι μεταβολές στα επίπεδα των παραπάνω μεταβολιτών σχετίζονται με τη μειωμένη δραστηριότητα των δύο βασικών ενζύμων των καταβολικών μονοπατιών των BCAAs και θα μπορούσαν να αποτελέσουν πρώιμους δείκτες μειωμένης ευαισθησίας στην ινσουλίνη και εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη.
- Η χορήγηση του αναστολέα του συμμεταφορέα νατρίου-γλυκόζης (δαπαγλιφλοζίνη) σε διαβητικούς ασθενείς συνδέθηκε 1) με την αυξημένη απέκκριση των τριών BCAAs γεγονός που υποδεικνύει ότι η επαγόμενη από τη δαπαγλιφλοζίνη μειωμένη επαναρρόφησή τους μπορεί να συμβάλλει στη μείωση της υπερτροφίας των εγγύς σωληναριακών νεφρικών κυττάρων, 2) με την αυξημένη συγκέντρωση στα ούρα των καταβολικών προϊόντων 2-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ, 2-υδροξυ-3-μεθυλο-βαλερικό οξύ και 3-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ καθώς και με τα μειωμένα επίπεδα των δύο τοξικών καταβολικών ενδιάμεσων των BCAAs, 3-μεθυλο-2-οξο-βαλερικό οξύ και N-ισοβαλεροϋλογλυκίνης. Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν τη μερική αποκατάσταση της διαταραχής της οξειδωσης των BCAAs και σχετίζονται με τη νεφροπροστατευτική δράση του φαρμάκου.
- Στους ασθενείς 3 χρόνια πριν τη διάγνωση διαβητικής νεφροπάθειας εντοπίσαμε 1) μειωμένα επίπεδα των τριών BCAAs και του 3-μεθυλο-2-οξο-βαλερικού οξέος στον ορό και στα ούρα τα οποία υποδεικνύουν αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας της

αφυδρογονάσης BCKD 2) μειωμένα επίπεδα γλουταμινικού στον ορό και 3) μειωμένη απέκκριση των καταβολικών προϊόντων 2-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ, 2-υδροξυ-3-μεθυλο-βαλερικό οξύ, N-ισοβαλεροϋλογλυκίνης, του ενδιάμεσου του κύκλου του κιτρικού ηλεκτρικό οξύ, της αλανίνης καθώς και των κετονοσωμάτων. Οι παραπάνω μεταβολίτες, οι οποίοι είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένοι στο ΣΔΤ2, μειώνονται στατιστικά σημαντικά 3 χρόνια πριν τη διάγνωση νεφροπάθειας και θα μπορούσαν να αποτελέσουν προγνωστικούς δείκτες ΔΝ.

- Στο ΣΔΚ, συγκριτικά με τη φυσιολογική κύηση δεν εντοπίσαμε μεταβολές στα επίπεδα των BCAAs *per se* αλλά των καταβολικών τους ενδιάμεσων: 1) αυξημένες συγκεντρώσεις 3-υδροξυ-ισοβαλερικού οξέος (καταβολισμός λευκίνης) που συνδέονται με αυξημένη κετογένεση καθώς και με τη μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου μεθυλοκροτονυλ-CoA καρβοξυλάση πιθανώς λόγω έλλειψης βιοτίνης 2) αυξημένα επίπεδα 3-υδροξυ-ισοβουτυρικού οξέος (καταβολισμός βαλίνης) που οδηγούν στη συσσώρευση τοξικών καταβολικών ενδιάμεσων των λιπιδίων στους μύες και την εμφάνιση αντίστασης στην ινσουλίνη και 2) μειωμένη συγκέντρωση 3-μεθυλο-2-οξοβαλερικού οξέος (α-κετοξύ ισολευκίνης). Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν διαταραχή του καταβολισμού των BCAAs αλλά με διαφορετικό μηχανισμό συγκριτικά με το ΣΔΤ2.

- Στα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος, τα BCAAs ανευρίσκονται κυρίως μειωμένα καθώς συμμετέχουν ως εναλλακτικά υποστρώματα στα μονοπάτια γλυκονογένεσης, κετογένεσης (αυξημένα επίπεδα κετονοσωμάτων), στους μηχανισμούς παραγωγής ενέργειας (αυξημένα ενδιάμεσα του κύκλου του κιτρικού οξέος) καθώς και στην αποτοξίνωση από αμμωνία (αυξημένα επίπεδα γλουταμινικού).

Συγκριτικά με τα δύο χολοστατικά αυτοάνοσα νοσήματα, στην αυτοάνοση ηπατίτιδα τα επίπεδα της ισολευκίνης και του αντίστοιχου α-κετοξέος της ήταν φυσιολογικά αναδεικνύοντας τους σε υποψήφιους δείκτες διαφορικής διάγνωσης των αυτοάνοσων νοσημάτων του ήπατος. Η χορήγηση ανοσοκαταστολής στην ΑΗ σχετίστηκε με την μερική αποκατάσταση της διαταραχής του καταβολισμού των άλλων δύο BCAAs, βαλίνης και λευκίνης (μείωση των επιπέδων του 2-υδροξυ-ισοβαλερικού οξέος και 3-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ προς τα φυσιολογικά), της ηπατικής ίνωσης και των επιπέδων βιοτίνης.

Η χορήγηση ουρσοδεοξυχολικού οξέος σε ασθενείς με ΠΧΧ δεν αποκατέστησε τα μειωμένα επίπεδα ισολευκίνης αλλά μειώθηκαν περαιτέρω, υποδεικνύοντας ένα μεταβολικό προφίλ με πιθανή εξέλιξη την κίρρωση. Τέλος στους ασθενείς με ΠΣΧ, η θεραπεία με ουρσοδεοξυχολικό οξύ συνδέθηκε με τη στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της λευκίνης προς τα φυσιολογικά και τη βελτίωση του ηπατικού μεταβολισμού των λιπιδίων.

## 6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας (Branched Chain Amino Acids, BCAAs) λευκίνη, ισολευκίνη και βαλίνη ανήκουν στα απαραίτητα αμινοξέα και έχουν μελετηθεί εκτενώς για τον κρίσιμο ρόλο τους στη ρύθμιση της μυϊκής πρωτεϊνοσύνθεσης (σηματοδοτικό μονοπάτι mTOR - mechanistic target of rapamycin), του ενεργειακού μεταβολισμού, της ομοιόστασης της γλυκόζης καθώς και της φυσιολογικής λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος και του εγκεφάλου. Τα συμπληρώματα BCAAs χρησιμοποιούνται κυρίως ως μια ευεργετική διατροφική παρέμβαση στη χρόνια ηπατική και νεφρική νόσο καθώς και σε διαταραχές με απώλεια μυϊκής μάζας (σαρκοπενία). Ωστόσο, η μεταβολή των επιπέδων των BCAAs στα βιολογικά υγρά και η διαταραχή των καταβολικών οδών τους στους ιστούς, κυρίως λόγω των αλλαγών της δραστηριότητας των δύο βασικών ενζύμων του καταβολισμού τους, της αμινοτρανσφεράσης διακλαδισμένης αλυσίδας (Branched-Chain Aminotransferase, BCAT) και της αφυδρογονάσης των α-κετοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (Branched-Chain  $\alpha$ -Ketoacid Dehydrogenase, BCKD) έχουν συσχετιστεί με νοσολογικές καταστάσεις. Οι υποκείμενοι μηχανισμοί της διαταραχής του καταβολισμού των BCAAs διερευνώνται στα εγγενή μεταβολικά νοσήματα, στην παχυσαρκία και στους διαφορετικούς τύπους διαβήτη, στη καρδιαγγειακή νόσο, σε νευροεκφυλιστικές παθήσεις (Αλτσχάιμερ), στον καρκίνο και στη νεφρική και ηπατική νόσο. Η «αποκατάσταση» του καταβολισμού των BCAAs μπορεί να σχετίζεται με την καλύτερη έκβαση και την πρόληψη επιπλοκών της εκάστοτε νοσολογικής κατάστασης.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση του παθοφυσιολογικού/παθογενετικού ρόλου των BCAAs και των καταβολικών τους ενδιάμεσων και η πιθανή προγνωστική και/ή διαγνωστική τους αξία στο Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2 (ΣΔΤ2), στο Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης (ΣΔΚ), στη Διαβητική Νεφροπάθεια (ΔΝ) και στα Αυτοάνοσα Νοσήματα του Ήπατος (ΑΝΗ), καθώς και η συσχέτισή τους με την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπευτική αγωγή.

Μελετήθηκαν 53 υγιή άτομα, 50 ασθενείς με ΣΔΤ2 πριν και 3 μήνες μετά τη χορήγηση δαπαγλιφλοζίνης, 22 ασθενείς που εμφάνισαν ΔΝ 3 χρόνια μετά τη συλλογή του δείγματος, 62 γυναίκες με ΣΔΚ συγκριτικά με 77 με φυσιολογική κύηση, 341 ασθενείς με ΑΝΗ πριν και μετά τη χορήγηση θεραπευτικής αγωγής και 101 ασθενείς με Χρόνιες Ιογενείς Ηπατίτιδες Β και C. Στις ομάδες μελέτης έγινε καταγραφή του μεταβολικού προφίλ των βιολογικών υγρών με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου ( $^1\text{H}$ NMR) στο φασματογράφο 500 MHz Avance Bruker DRX στο κέντρο NMR του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στο

φασματογράφο Avance III 700 MHz του Πανεπιστημίου Πατρών. Για την καλύτερη διακριτική ικανότητα της φασματοσκοπίας NMR στα δείγματα ορού/πλάσματος απομακρύνθηκαν τα μακρομόρια (πρωτεΐνες, λιποπρωτεΐνες) με διήθηση υπό φυγοκέντρηση (υπερδιήθηση). Ακολούθησε ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση από το φάσμα NMR των BCAAs και των μεταβολιτών που σχετίζονται με τον καταβολισμό τους.

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσης διατριβής μπορούμε να συμπεράνουμε τα ακόλουθα: Ο ΣΔΤ2 χαρακτηρίζεται από διαταραχή του καταβολισμού των BCAAs με κύρια χαρακτηριστικά: 1) τα αυξημένα επίπεδα των τριών BCAAs και του α-κετοξέος της ισολευκίνης 3-μεθυλο-2-οξο-βαλερικό οξύ στον ορό και στα ούρα 2) τη συσσώρευση του καταβολικού ενδιάμεσου της βαλίνης 3-υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ και τη μείωση των καταβολικών προϊόντων της λευκίνης 2-οξο-ισοκαπροϊκό οξύ και 3-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ στον ορό καθώς και 3) την αυξημένη απέκκριση των καταβολικών ενδιάμεσων της ισολευκίνης 2-υδροξυ-3-μεθυλο-βαλερικό οξύ, της λευκίνης N-ισοβαλεροϋλογλυκίνη και της βαλίνης 2-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ. Οι μεταβολές των συγκεντρώσεων των παραπάνω μεταβολιτών σχετίζονται με τη μειωμένη δραστηριότητα των δύο βασικών ενζύμων των καταβολικών οδών των BCAAs και θα μπορούσαν να αποτελέσουν πρώιμους δείκτες μειωμένης ευαισθησίας στην ινσουλίνη και εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη.

Η χορήγηση του αναστολέα του συμμεταφορέα νατρίου-γλυκόζης (δαπαγλιφλοζίνη) σε διαβητικούς ασθενείς συνδέθηκε 1) με την αυξημένη απέκκριση των τριών BCAAs γεγονός που υποδεικνύει ότι η επαγόμενη από τη δαπαγλιφλοζίνη μειωμένη επαναρρόφησή τους μπορεί να συμβάλλει στη μείωση της υπερτροφίας των εγγύς σωληναριακών νεφρικών κυττάρων, 2) με την αυξημένη συγκέντρωση στα ούρα των καταβολικών προϊόντων 2-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ, 2-υδροξυ-3-μεθυλο-βαλερικό οξύ και 3-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ καθώς και με τη μειωμένη απέκκριση των δύο τοξικών καταβολικών ενδιάμεσων, 3-μεθυλο-2-οξο-βαλερικό οξύ και N-ισοβαλεροϋλογλυκίνης. Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν τη μερική αποκατάσταση της διαταραχής του καταβολισμού των BCAAs και σχετίζονται με τη νεφροπροστατευτική δράση του φαρμάκου.

Στους ασθενείς 3 χρόνια πριν τη διάγνωση διαβητικής νεφροπάθειας ανιχνεύτηκαν 1) μειωμένα επίπεδα των τριών BCAAs και του 3-μεθυλο-2-οξο-βαλερικού οξέος στον ορό και στα ούρα τα οποία υποδεικνύουν αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας της αφυδρογονάσης BCKD 2) μειωμένα επίπεδα γλουταμινικού στον ορό και 3) μειωμένη απέκκριση των καταβολικών προϊόντων 2-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ, 2-υδροξυ-3-μεθυλο-βαλερικό οξύ, N-



ισοβαλεροϋλογλυκίνης, του ηλεκτρικού οξέος (ενδιάμεσο του κύκλου του κιτρικού), της αλανίνης καθώς και των κετονοσωμάτων. Οι παραπάνω μεταβολίτες, οι οποίοι είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένοι στο ΣΔΤ2, μειώνονται στατιστικά σημαντικά 3 χρόνια πριν τη διάγνωση νεφροπάθειας και θα μπορούσαν να αποτελέσουν προγνωστικούς δείκτες ΔΝ.

Στο ΣΔΚ, συγκριτικά με τη φυσιολογική κύηση δεν εντοπίσαμε μεταβολές στα επίπεδα των τριών BCAAs αλλά των καταβολικών τους ενδιάμεσων και συγκεκριμένα: 1) αυξημένες συγκεντρώσεις 3-υδροξυ-ισοβαλερικού οξέος (καταβολισμός λευκίνης) που συνδέονται με αυξημένη κετογένεση καθώς και με τη μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου μεθυλοκροτονυλ-CoA καρβοξυλάση πιθανώς λόγω έλλειψης βιοτίνης 2) αυξημένα επίπεδα 3-υδροξυ-ισοβουτυρικού οξέος (καταβολισμός βαλίνης) που συμβάλλουν στη συσσώρευση τοξικών καταβολικών ενδιάμεσων των λιπιδίων στους μύες και την εμφάνιση αντίστασης στην ινσουλίνη και 2) μειωμένη συγκέντρωση 3-μεθυλο-2-οξοβαλερικού οξέος (α-κετοξύ ισολευκίνης). Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν διαταραχή του καταβολισμού των BCAAs αλλά με διαφορετικό μηχανισμό συγκριτικά με το ΣΔΤ2.

Στα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος, τα BCAAs ανευρίσκονται κυρίως μειωμένα καθώς συμμετέχουν ως εναλλακτικά υποστρώματα στα μονοπάτια γλυκονογένεσης, κετογένεσης (αυξημένα επίπεδα κετονοσωμάτων), στους μηχανισμούς παραγωγής ενέργειας (αυξημένα ενδιάμεσα του κύκλου του κιτρικού οξέος) καθώς και στην αποτοξίνωση από αμμωνία (αυξημένα επίπεδα γλουταμινικού). Συγκριτικά με τα δύο χολοστατικά αυτοάνοσα νοσήματα, στην αυτοάνοση ηπατίτιδα τα επίπεδα της ισολευκίνης και του αντίστοιχου α-κετοξέος της ήταν φυσιολογικά αναδεικνύοντας τους σε υποψήφιους δείκτες διαφορικής διάγνωσης των αυτοάνοσων νοσημάτων του ήπατος. Η χορήγηση ανοσοκαταστολής στην ΑΗ σχετίστηκε με την μερική αποκατάσταση της διαταραχής του καταβολισμού των άλλων δύο BCAAs, βαλίνης και λευκίνης (μείωση των επιπέδων του 2-υδροξυ-ισοβαλερικού οξέος και 3-υδροξυ-ισοβαλερικού οξέος προς τα φυσιολογικά), της ηπατικής ίνωσης και των επιπέδων βιοτίνης.

Η χορήγηση ουρσοδεοξυχολικού οξέος σε ασθενείς με ΠΧΧ δεν αποκατέστησε τα μειωμένα επίπεδα ισολευκίνης αλλά μειώθηκαν περαιτέρω, υποδεικνύοντας ένα μεταβολικό προφίλ με πιθανή εξέλιξη την κίρρωση. Τέλος στους ασθενείς με ΠΣΧ, η θεραπεία με ουρσοδεοξυχολικό οξύ συνδέθηκε με τη στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της λευκίνης προς τα φυσιολογικά και τη βελτίωση του ηπατικού μεταβολισμού των λιπιδίων. Συμπερασματικά, τα επίπεδα των BCAAs και των μεταβολιτών που σχετίζονται με τον

καταβολισμό τους θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ειδικοί βιοδείκτες νοσολογικών καταστάσεων στην καθ' ημέρα κλινική πράξη.

## 7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ

Branched chain amino acids (BCAAs), leucine, isoleucine and valine, are essential amino acids widely studied for their critical role in the regulation of protein synthesis (mTOR - mechanistic target of rapamycin - signaling pathway) and their emerging recognition as players in the regulation of energy metabolism, glucose homeostasis as well as normal function of immune system and brain. BCAA supplementation is primarily used as a beneficial nutritional intervention in chronic liver and kidney disease as well as muscle wasting disorders. However, the downregulated/upregulated levels of BCAAs in biological fluids and their defective catabolism in various tissues, mainly due to altered enzymatic activity of the first two enzymes in their catabolic pathway, BCAA aminotransferase (BCAT) and branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase (BCKD), have been associated with many nutritional and disease states. The underlying mechanisms of impaired BCAA catabolism have been investigated in the pathogenesis of numerous pathological conditions such as inborn errors of metabolism, obesity and different types of diabetes, cardiovascular diseases, neurodegenerative disorders (Alzheimer's disease), cancer, kidney and liver disease. The recovery of the dysregulated BCAA catabolism may be associated with improved outcome and prevention of severe complications of the related disease.

The aim of the present thesis was to investigate the pathophysiological/pathogenetic role of BCAAs and their catabolic intermediates, their possible prognostic and/or diagnostic value in Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM), Gestational Diabetes Mellitus (GDM), Diabetic Nephropathy (DN) and Autoimmune Liver Diseases and treatment response.

The study included 53 healthy controls, 50 patients with T2DM before and after treatment with dapagliflozin for 3 months, 22 patients with type 2 diabetes collected 3 years before the onset of DN, 62 women with GDM compared with 77 healthy pregnant women, 341 patients with Autoimmune Liver Diseases at diagnosis and after treatment and 101 patients with chronic viral hepatitis B and C. The metabolic profile of the biological fluids from the study groups was detected by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy on a Bruker Avance DRX NMR 500MHz spectrometer (NMR Center, University of Ioannina) and on an Avance III 700 MHz spectrometer (University of Patra). In order to improved detection and quantification of low abundant metabolites in NMR spectroscopy, macromolecules (proteins and lipoproteins) were eliminated from serum/plasma samples by ultrafiltration. BCAAs and metabolites related to their catabolism were then identified and quantified from the analysis of  $^1\text{H}$ NMR spectrum.

Based on the results of this thesis we conclude that, T2DM is characterized by a disturbed BCAA catabolism with main features: 1) the elevated levels of the three BCAAs and the  $\alpha$ -keto acid of isoleucine, 3-methyl-2-oxovalerate in serum and urine 2) the accumulation of the valine catabolic intermediate 3-hydroxyisobutyrate and the reduction of the leucine catabolic products 2-oxoisocaproate and 3-hydroxyisovalerate in serum and 3) the increased urine concentration of the catabolic intermediates of isoleucine, 2-hydroxy-3-methylvalerate, of leucine, N-isovaleroylglycine and valine, 2-hydroxyisovalerate. Alterations in the levels of the above metabolites indicate reduced activity of the two main enzymes of the catabolic pathways of BCAAs and could be used as early biomarkers of impaired insulin sensitivity and onset of diabetes mellitus.

Treatment of diabetic patients with the sodium glucose co-transporters-2 (SGLT-2) inhibitor dapagliflozin was followed by: 1) the decreased renal reabsorption of the three BCAAs may contribute to the regression of proximal tubular hypertrophy and 2) the elevated excretion of the catabolic products 2-hydroxyisovalerate, 2-hydroxy-3-methylvalerate and 3-hydroxyisovalerate as well as the decreased excretion of the two toxic catabolic intermediates, 3-methyl-2-oxovalerate and N-isovaleroylglycine. These changes possibly reflect an improvement in BCAA metabolism and may contribute to the renoprotective properties of dapagliflozin.

The main alterations observed in patients 3 years before the diagnosis of DN were 1) the downregulated levels of the three BCAAs and 3-methyl-2-oxovalerate in the serum and urine which indicate an increase in BCKD dehydrogenase enzyme activity 2) the decreased serum levels of glutamate and 3) the reduced renal excretion of the catabolic intermediates, 2-hydroxyisovalerate, 2-hydroxy-3-methylvalerate, N-isovaleroylglycine, succinate, alanine and ketone bodies. The above metabolites, which are statistically significantly increased in T2DM and then decline statistically significantly 3 years before the diagnosis of nephropathy and could be prognostic biomarkers of DN.

In GDM, compared to normal pregnancy, no changes in the levels of the three BCAAs per se were detected but of their catabolic intermediates. More specifically: 1) increased concentration of the leucine catabolic product 3-hydroxyisovalerate which is associated with increased ketogenesis and may be due to impaired function of the enzyme methylcrotonyl-CoA carboxylase possibly due to biotin deficiency, 2) elevated levels of the intermediate of valine degradation pathway 3-hydroxyisobutyrate, which may contribute to the accumulation of toxic

lipid intermediates in muscles and lead to insulin resistance and 3) decreased levels of the isoleucine  $\alpha$ -keto acid, 3-methyl-2-oxovalerate. These findings provide evidence that BCAA catabolism was affected in GDM but otherwise than in T2DM.

In Autoimmune Liver Diseases, BCAAs were found to be mainly reduced. The lead causes are the increased catabolic rate because they are used 1) as precursors in the gluconeogenesis pathway, 2) as alternative ketogenic substrates in ketone bodies production (upregulated levels of ketone bodies), 3) in energy production (increased intermediates of the citric acid cycle) as well as 4) in ammonia detoxification pathways (increased levels of glutamate). In Autoimmune Hepatitis (AIH), the levels of isoleucine and the corresponding  $\alpha$ -keto acid were found to be at normal levels, compared to the other two cholestatic autoimmune liver diseases (PBC & PSC), indicating these metabolites as candidate markers for the differential diagnosis of autoimmune liver diseases. Administration of immunosuppressive therapy in AIH patients was associated with improvement in the impaired catabolism of valine and leucine (reduction of 2-hydroxyisovalerate and 3-hydroxyisovalerate levels towards normal) following the improvement of liver fibrosis and biotin levels.

Administration of ursodeoxycholic acid (UDCA) to PBC patients did not restore the reduced isoleucine levels but they were further decreased, indicating a metabolic profile closer to cirrhosis. Finally, in patients with PSC, treatment with ursodeoxycholic acid was associated with a statistically significant increase in leucine levels toward normal and an improvement in hepatic lipid metabolism. In conclusion, the levels of BCAAs and of their catabolic intermediates could be used as biomarkers of health and disease in clinical routine.

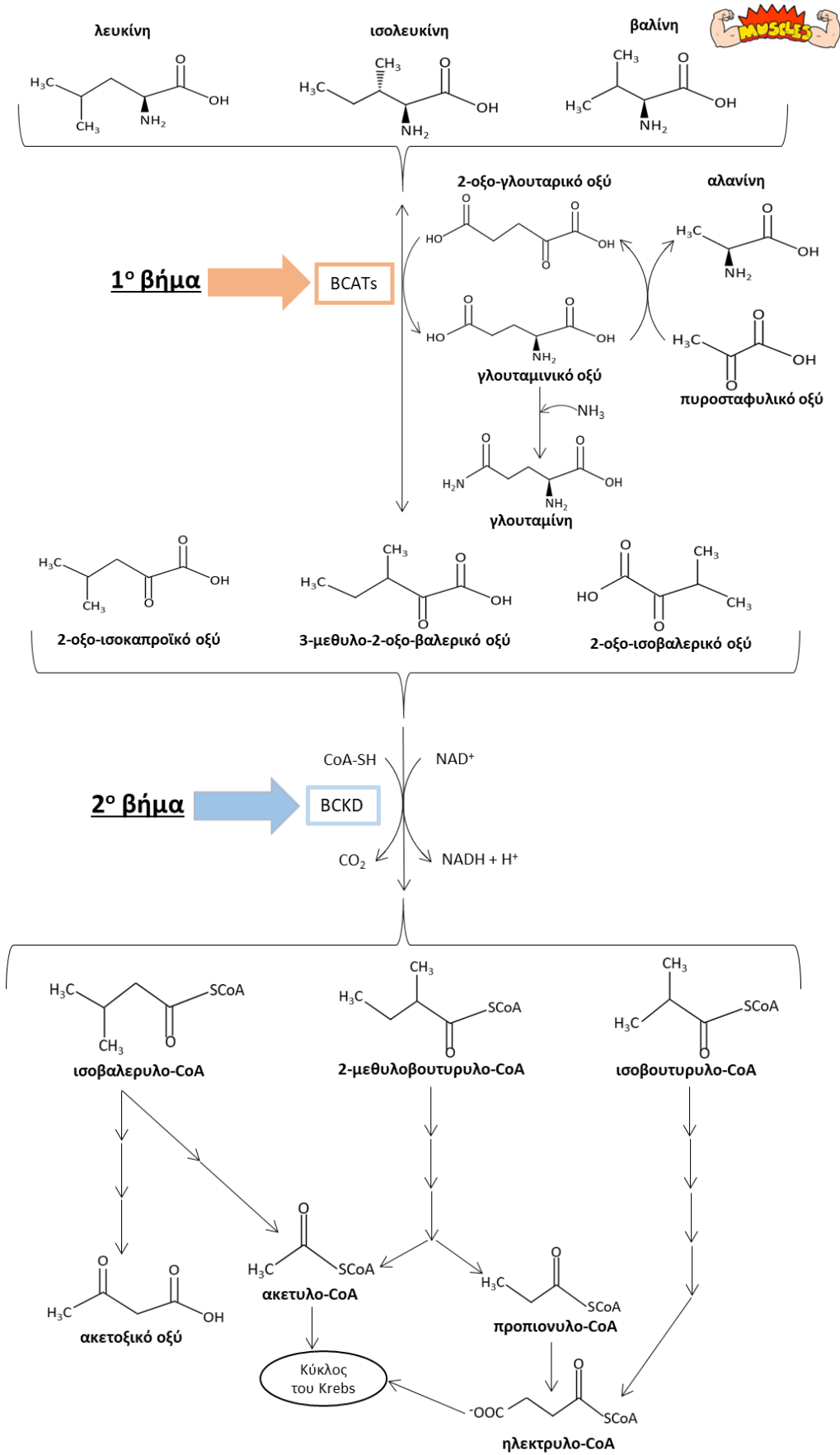
## 8. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Από τη διδακτορική διατριβή προέκυψαν οι παρακάτω δημοσιεύσεις:

1. **Dimou A**, Tsimihodimos V, Bairaktari E. The Critical Role of the Branched Chain Amino Acids (BCAAs) Catabolism-Regulating Enzymes, Branched-Chain Aminotransferase (BCAT) and Branched-Chain  $\alpha$ -Keto Acid Dehydrogenase (BCKD), in Human Pathophysiology. *Int J Mol Sci.* 2022 Apr 5;23(7):4022. doi: 10.3390/ijms23074022.
2. Bletsa E, Filippas-Dekouan S, Kostara C, Dafopoulos P, **Dimou A**, Pappa E, Chasapi S, Spyroulias G, Koutsovasilis A, Bairaktari E, Ferrannini E, Tsimihodimos V. Effect of Dapagliflozin on Urine Metabolome in Patients with Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2021 Apr 23;106(5):1269-1283. doi: 10.1210/clinem/dgab086.
3. Spanou L, **Dimou A**, Kostara CE, Bairaktari E, Anastasiou E, Tsimihodimos V. A Study of the Metabolic Pathways Affected by Gestational Diabetes Mellitus: Comparison with Type 2 Diabetes. *Diagnostics (Basel).* 2022 Nov 21;12(11):2881. doi: 10.3390/diagnostics12112881.
4. **Aikaterini Dimou**, Kalliopi Zachou, Christina Kostara, Kalliopi Azariadis, George Giannoulis, Aggeliki Lyberopoulou, Eleni Bairaktari, George N. Dalekos. NMR-based metabolic signature: An important tool for the diagnosis and to study pathogenesis of autoimmune hepatitis (υποβληθέν).

## 9.ΥΠΟΜΝΗΜΑ

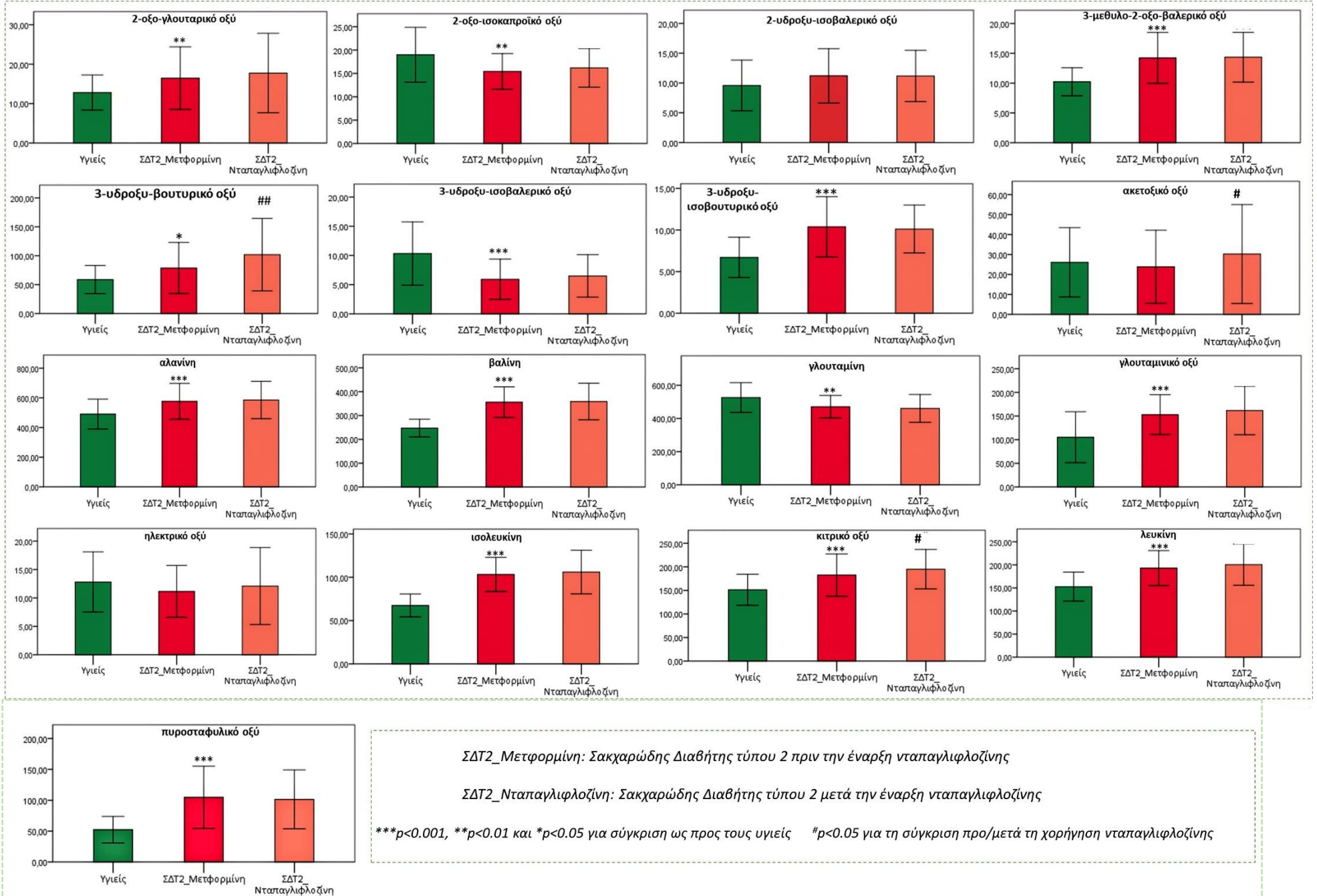
Εικόνα 1Y Καταβολισμός των BCAAs





Πίνακας 1Υ Εγγενείς διαταραχές του μεταβολισμού των BCAAs

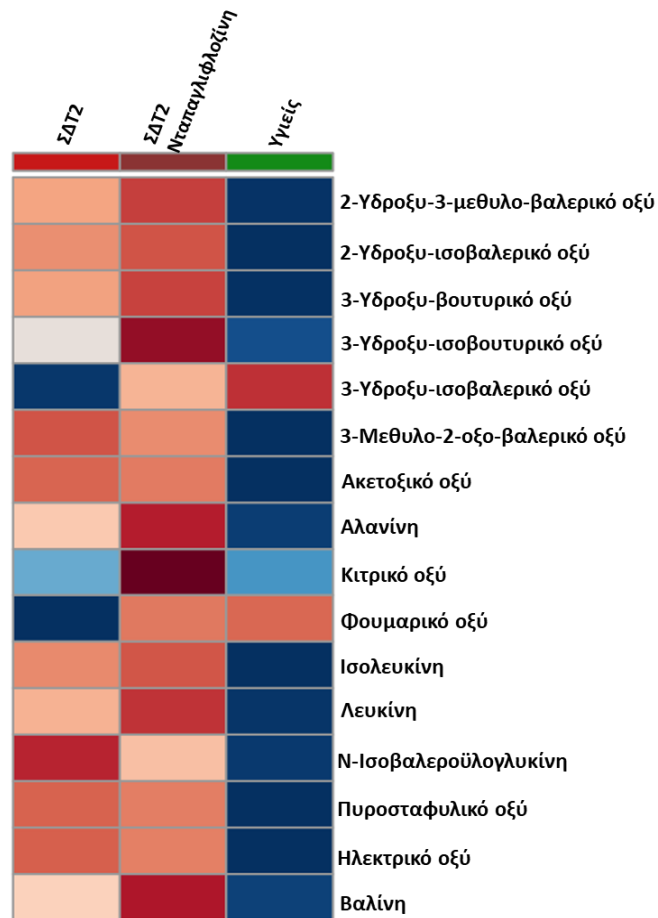
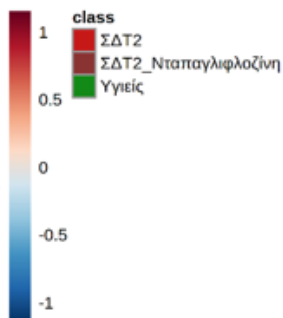
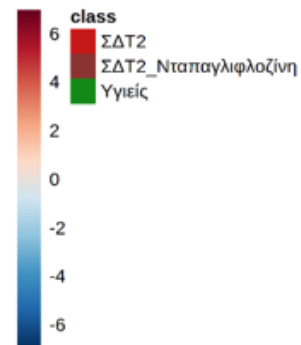
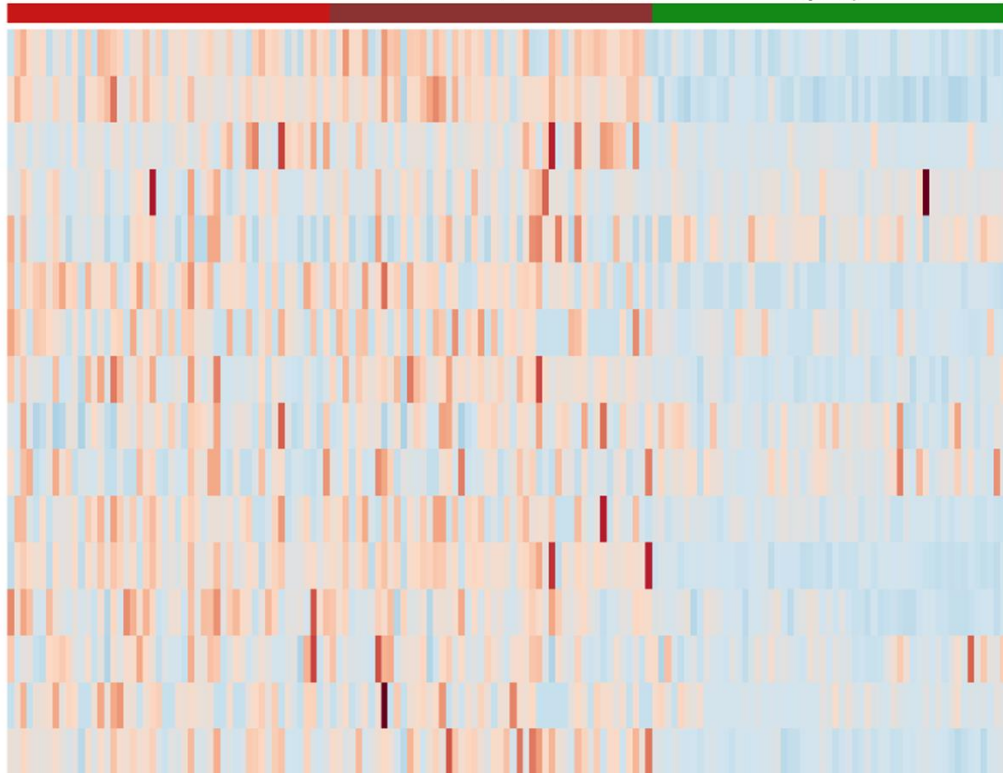
Εγγενείς διαταραχές του μεταβολισμού των BCAAs	Ανεπάρκεια /Ελλειπής δραστικότητα ενζύμου	Αντίδραση που καταλύει το ένζυμο	Συσσώρευση μεταβολιτών
MSUD ή κετονουρία διακλαδισμένης αλυσίδας	αφυδρογονάση των α-κετοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (BCKD)	οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση των α-κετοξέων σε ακυλο-CoA εστέρες διακλαδισμένης αλυσίδας (καταβολισμός των BCAAs)	βαλίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, α-κετοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας, 2-, 3-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ, 3-υδροξυβουτυρικό οξύ, αλλοϊσολευκίνη
Ισοβαλερική οξυαιμία	αφυδρογονάση του ισοβαλερυλο-CoA	οξείδωση του ισοβαλερυλο-CoA σε 3-μεθυλο-κροτονυλο-CoA (καταβολισμός λευκίνης)	ισοβαλερυλο-CoA, ισοβαλερικό οξύ, 3-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ, ισοβαλεροϋλογλυκίνη, ισοβαλερυλο-καρνιτίνη (C5)
Προπιονική οξυαιμία	καρβοξυλάση του προπιονυλο-CoA	μετατροπή του προπιονυλο-CoA σε μεθυλμαλονικό-CoA (καταβολισμός ισολευκίνης & βαλίνης)	3-υδροξυ-προπανικό οξύ, προπιονυλο-καρνιτίνη (C3), 2-μεθυλο-κιτρικό οξύ, 2-μεθυλο-1-οξο-2-βουτεν-1-υλο-γλυκίνη, προπιονυλο-γλυκίνη
Μεθυλμαλονική οξυαιμία	μουτάση του μεθυλμαλονικού-CoA/ Βιταμίνη B12	μετατροπή του μεθυλμαλονικού-CoA σε ηλεκτρυλο-CoA (καταβολισμός ισολευκίνης & βαλίνης)	μεθυλμαλονικό-CoA, μεθυλμαλονικό οξύ, 3-υδροξυ-προπανικό οξύ, 2-μεθυλο-κιτρικό οξύ, προπιονυλο-γλυκίνη
Μεθυλοκροτονολογλουκινουρία	καρβοξυλάση του 3-μεθυλο-κροτονυλο-CoA /Βιοτίνη	μετατροπή του 3-μεθυλο-κροτονυλο-CoA σε ακυλο-CoA παράγωγο του 3-μεθυλο-2-πεντενοϊκού οξέος (καταβολισμός λευκίνης)	3-μεθυλο-κροτονικό οξύ, 3-μεθυλο-κροτονυλο-γλυκίνη, 3-υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ

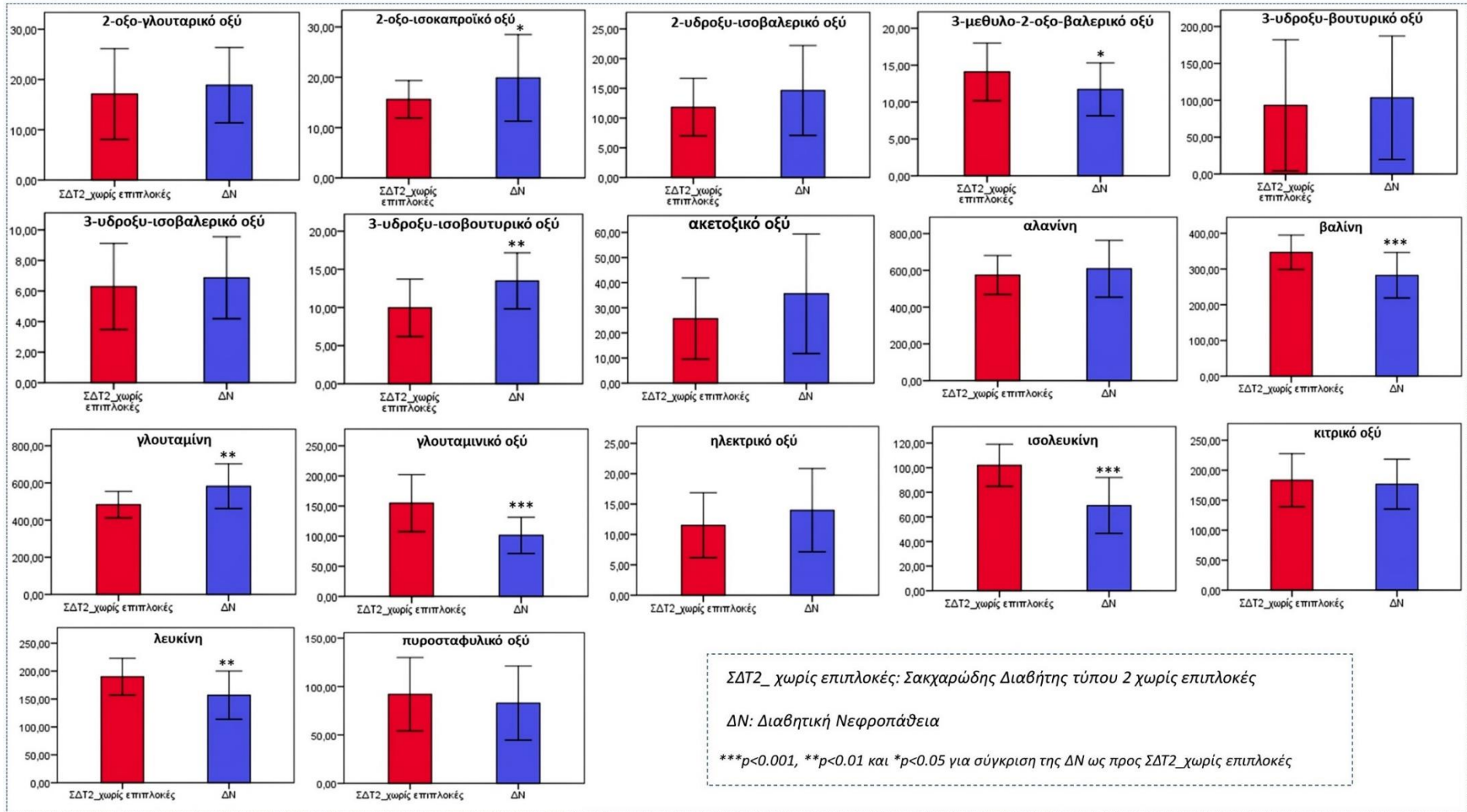


ΣΔΤ2

ΣΔΤ2\_Νταπαγλιφλοζίνη

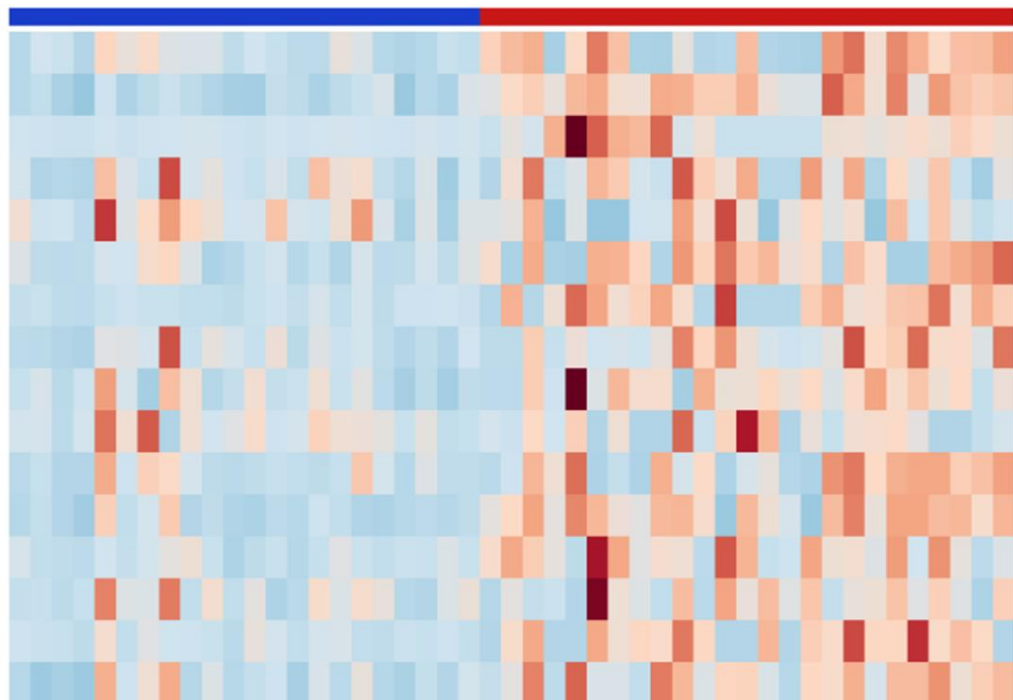
Υγιείς



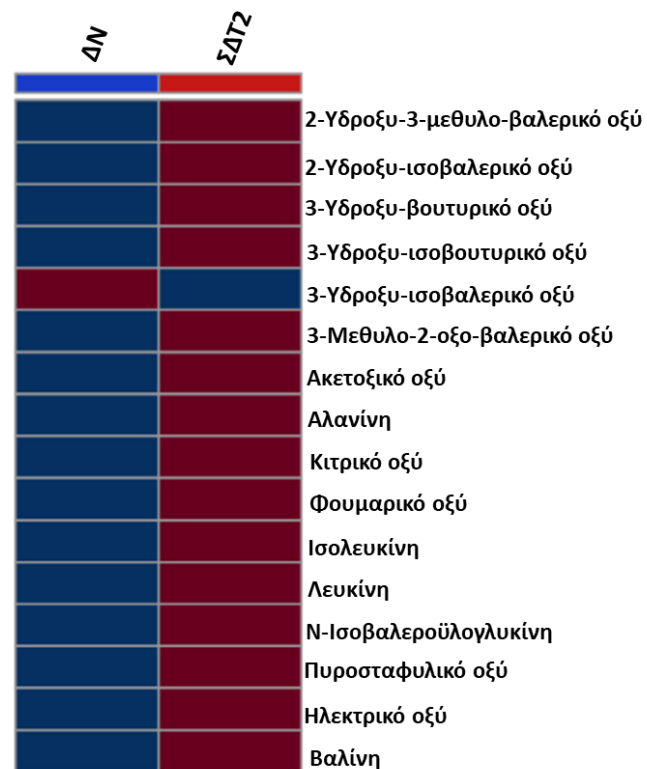
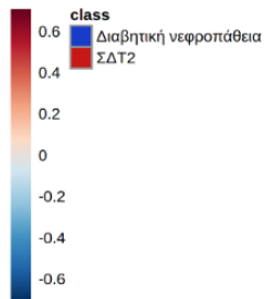
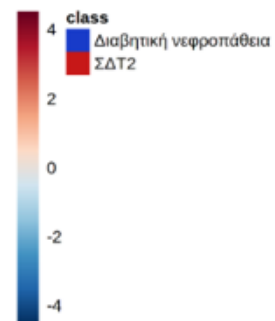


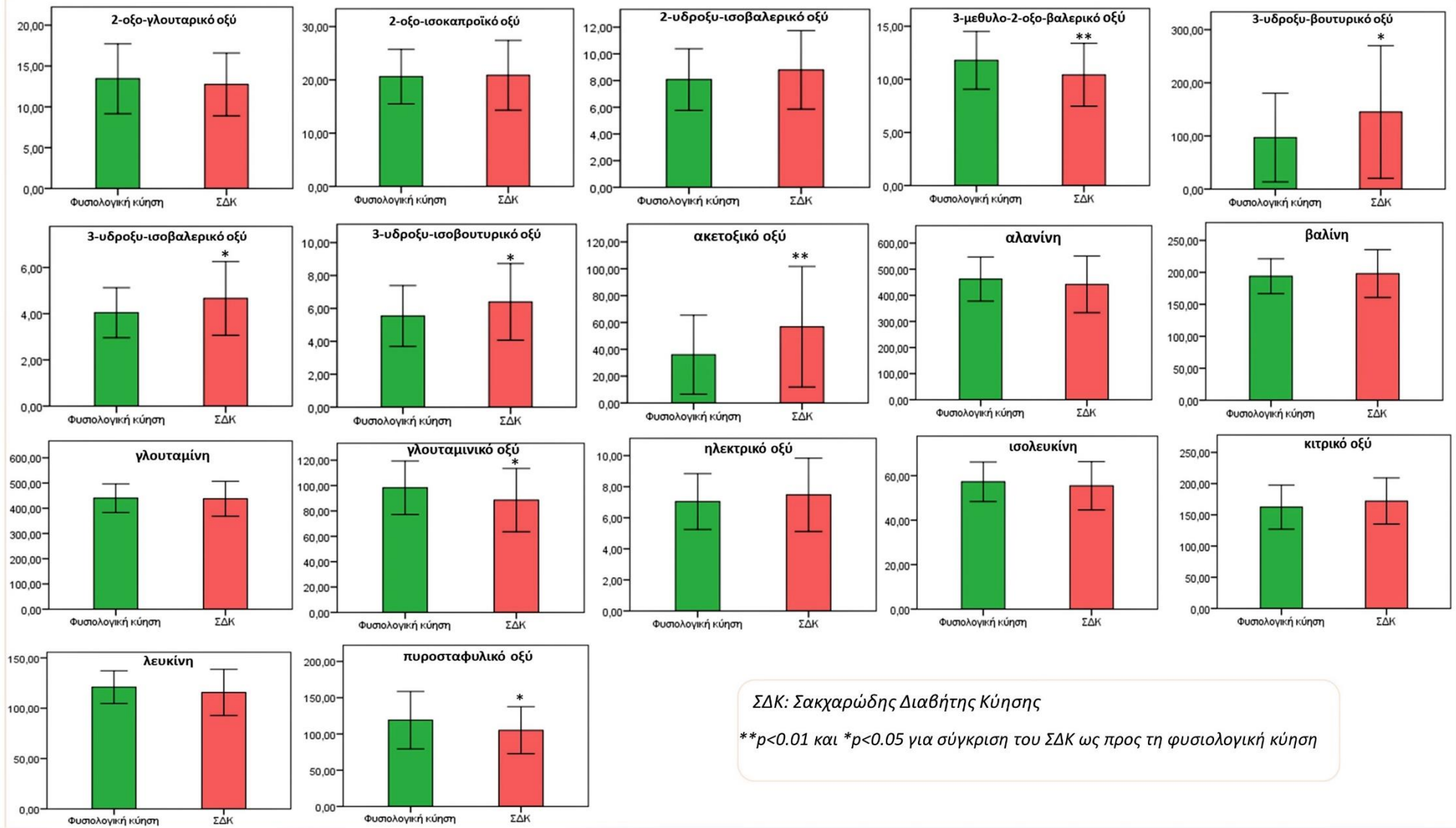
Διαβητική νεφροπάθεια

ΣΔΤ2

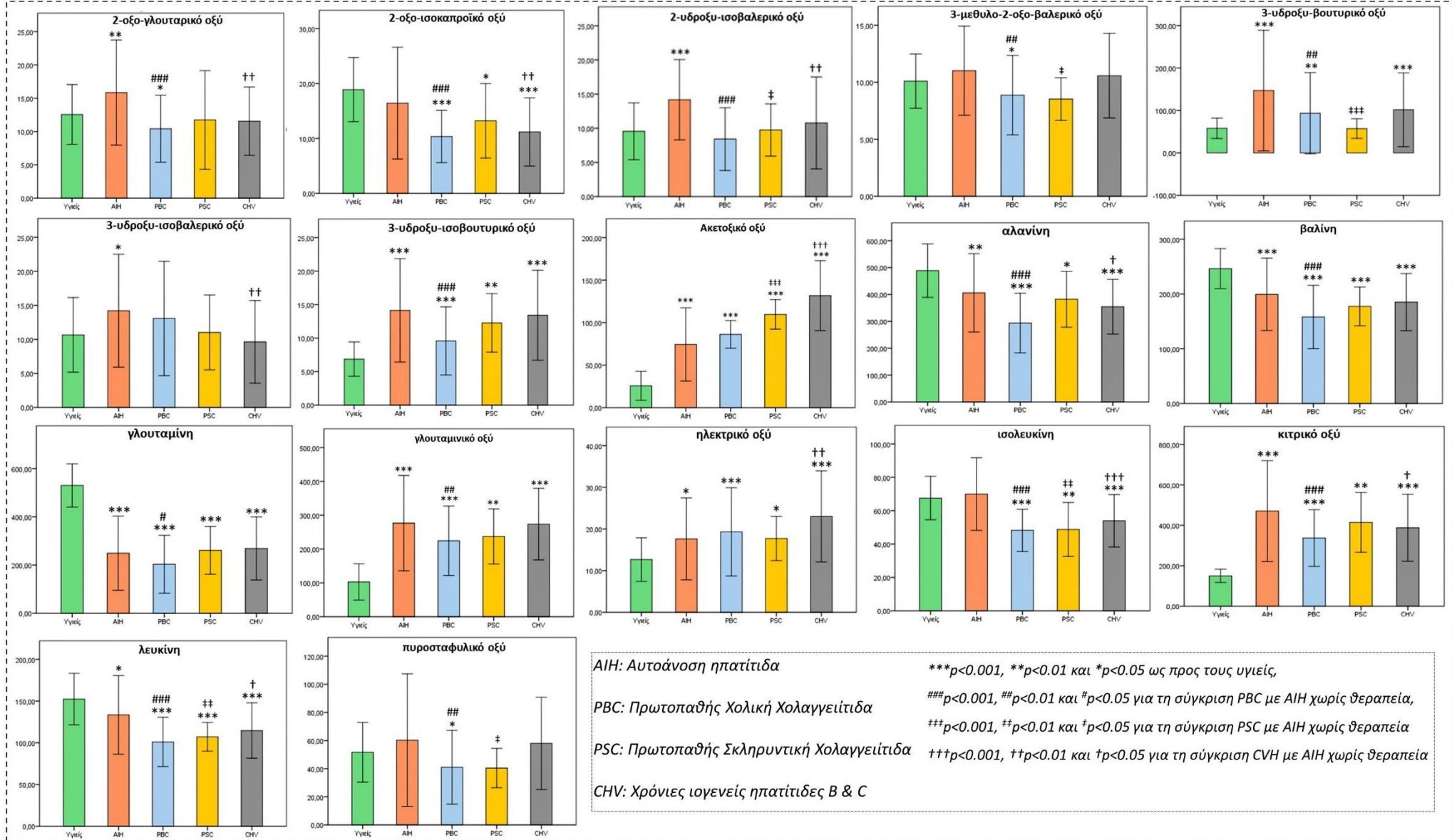


- 2-Υδροξυ-3-μεθυλο-βαλερικό οξύ
- 2-Υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ
- 3-Υδροξυ-βουτυρικό οξύ
- 3-Υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ
- 3-Υδροξυ-ισοβαλερικό οξύ
- 3-Μεθυλο-2-οξο-βαλερικό οξύ
- Ακετοξικό οξύ
- Αλανίνη
- Κιτρικό οξύ
- Φουμαρικό οξύ
- Ισολευκίνη
- Λευκίνη
- N-Ισοβαλεροϋλογλυκίνη
- Πυροσταφυλικό οξύ
- Ηλεκτρικό οξύ
- Βαλίνη



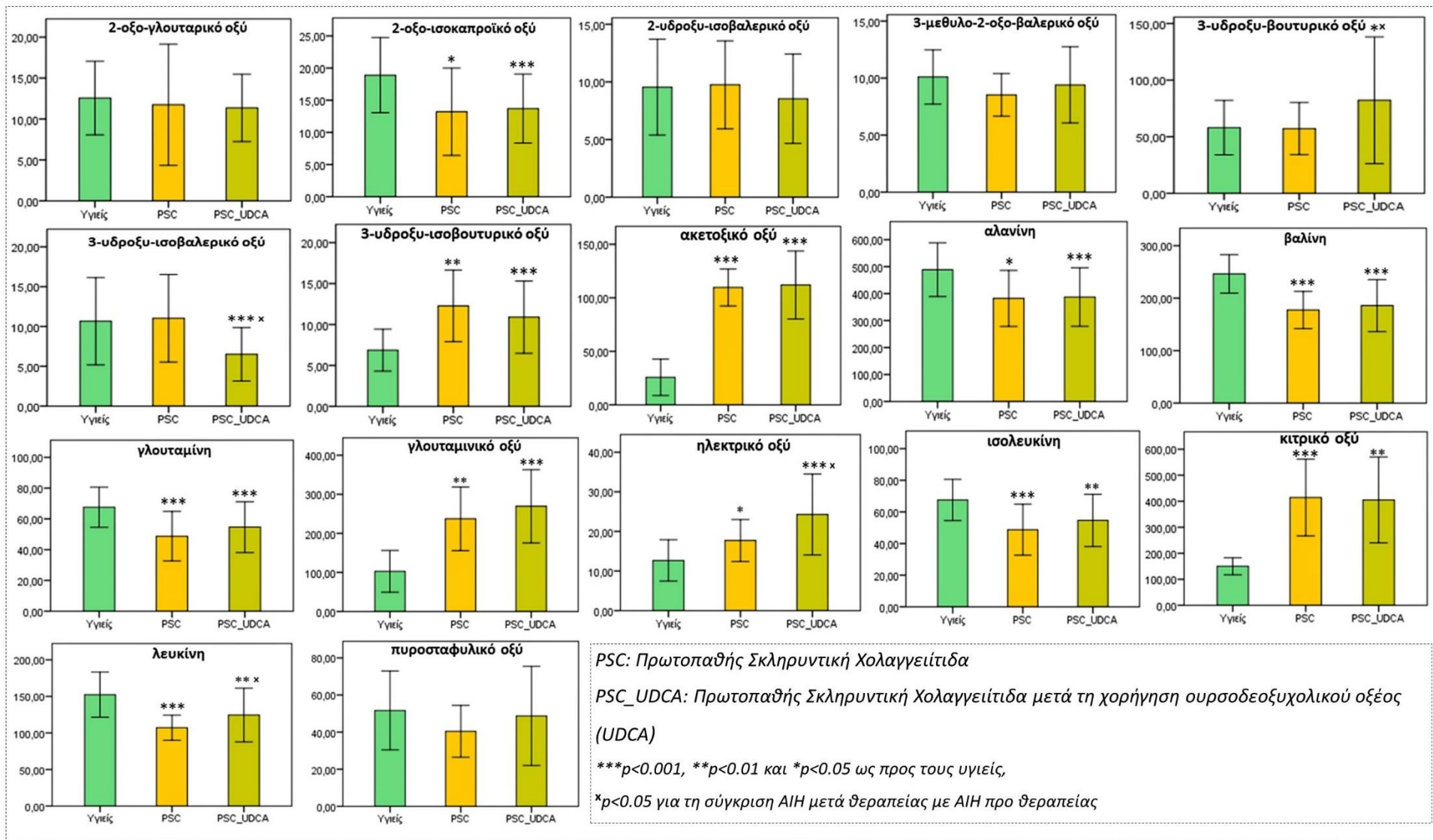






AIH: Αυτοάνοση ηπατίτιδα  
 PBC: Πρωτοπαθής Χολική Χολαγγειίτιδα  
 PSC: Πρωτοπαθής Σκληρυντική Χολαγγειίτιδα  
 CHV: Χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες B & C

\*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01 και \*p<0.05 ως προς τους υγιείς,  
 ###p<0.001, ##p<0.01 και #p<0.05 για τη σύγκριση PBC με AIH χωρίς θεραπεία,  
 †††p<0.001, ††p<0.01 και †p<0.05 για τη σύγκριση PSC με AIH χωρίς θεραπεία  
 †††p<0.001, ††p<0.01 και †p<0.05 για τη σύγκριση CHV με AIH χωρίς θεραπεία





## 10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. McMurry, J., *Οργανική Χημεία Τόμος II*. 2008: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
2. Adeva, M.M., et al., *Insulin resistance and the metabolism of branched-chain amino acids in humans*. *Amino Acids*, 2012. **43**(1): p. 171-81.
3. Cuomo, P., et al., *Role of Branched-Chain Amino Acid Metabolism in Type 2 Diabetes, Obesity, Cardiovascular Disease and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*. *Int J Mol Sci*, 2022. **23**(8).
4. Gojda, J. and M. Cahova, *Gut Microbiota as the Link between Elevated BCAA Serum Levels and Insulin Resistance*. *Biomolecules*, 2021. **11**(10).
5. Brosnan, J.T. and M.E. Brosnan, *Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation*. *J Nutr*, 2006. **136**(1 Suppl): p. 207S-11S.
6. McCourt, J.A. and R.G. Duggleby, *Acetohydroxyacid synthase and its role in the biosynthetic pathway for branched-chain amino acids*. *Amino Acids*, 2006. **31**(2): p. 173-210.
7. Krause, F.S., B. Blombach, and B.J. Eikmanns, *Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for 2-ketoisovalerate production*. *Appl Environ Microbiol*, 2010. **76**(24): p. 8053-61.
8. Amorim Franco, T.M. and J.S. Blanchard, *Bacterial Branched-Chain Amino Acid Biosynthesis: Structures, Mechanisms, and Drugability*. *Biochemistry*, 2017. **56**(44): p. 5849-5865.
9. Neinast, M., D. Murashige, and Z. Arany, *Branched Chain Amino Acids*. *Annu Rev Physiol*, 2019. **81**: p. 139-164.
10. Dimou, A., V. Tsimihodimos, and E. Bairaktari, *The Critical Role of the Branched Chain Amino Acids (BCAAs) Catabolism-Regulating Enzymes, Branched-Chain Aminotransferase (BCAT) and Branched-Chain alpha-Keto Acid Dehydrogenase (BCKD), in Human Pathophysiology*. *Int J Mol Sci*, 2022. **23**(7).
11. Adeva-Andany, M.M., et al., *Enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism in humans*. *Amino Acids*, 2017. **49**(6): p. 1005-1028.
12. Bonvini, A., et al., *Immunomodulatory role of branched-chain amino acids*. *Nutr Rev*, 2018. **76**(11): p. 840-856.
13. Papathanassiou, A.E., et al., *BCAT1 controls metabolic reprogramming in activated human macrophages and is associated with inflammatory diseases*. *Nat Commun*, 2017. **8**: p. 16040.
14. Trautman, M.E., N.E. Richardson, and D.W. Lamming, *Protein restriction and branched-chain amino acid restriction promote geroprotective shifts in metabolism*. *Aging Cell*, 2022. **21**(6): p. e13626.
15. Paxton, R. and R.A. Harris, *Regulation of branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase kinase*. *Arch Biochem Biophys*, 1984. **231**(1): p. 48-57.
16. Harper, A.E., R.H. Miller, and K.P. Block, *Branched-chain amino acid metabolism*. *Annu Rev Nutr*, 1984. **4**: p. 409-54.
17. Van Koevering, M. and S. Nissen, *Oxidation of leucine and alpha-ketoisocaproate to beta-hydroxy-beta-methylbutyrate in vivo*. *Am J Physiol*, 1992. **262**(1 Pt 1): p. E27-31.
18. Kandasamy, P., et al., *Amino acid transporters revisited: New views in health and disease*. *Trends Biochem Sci*, 2018. **43**(10): p. 752-789.
19. Pineda, M., et al., *Identification of a membrane protein, LAT-2, that Co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad*

- specificity for small and large zwitterionic amino acids.* J Biol Chem, 1999. **274**(28): p. 19738-44.
20. Prasad, P.D., et al., *Human LAT1, a subunit of system L amino acid transporter: molecular cloning and transport function.* Biochem Biophys Res Commun, 1999. **255**(2): p. 283-8.
  21. Babu, E., et al., *Identification of a novel system L amino acid transporter structurally distinct from heterodimeric amino acid transporters.* J Biol Chem, 2003. **278**(44): p. 43838-45.
  22. Bodoy, S., et al., *Identification of LAT4, a novel amino acid transporter with system L activity.* J Biol Chem, 2005. **280**(12): p. 12002-11.
  23. Napolitano, L., et al., *LAT1 is the transport competent unit of the LAT1/CD98 heterodimeric amino acid transporter.* Int J Biochem Cell Biol, 2015. **67**: p. 25-33.
  24. Nicklin, P., et al., *Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy.* Cell, 2009. **136**(3): p. 521-34.
  25. Zhang, S., et al., *Leucine stimulates ASCT2 amino acid transporter expression in porcine jejunal epithelial cell line (IPEC-J2) through PI3K/Akt/mTOR and ERK signaling pathways.* Amino Acids, 2014. **46**(12): p. 2633-42.
  26. Blair, M.C., M.D. Neinast, and Z. Arany, *Whole-body metabolic fate of branched-chain amino acids.* Biochem J, 2021. **478**(4): p. 765-776.
  27. Castellino, P., et al., *Effect of insulin and plasma amino acid concentrations on leucine metabolism in man. Role of substrate availability on estimates of whole body protein synthesis.* J Clin Invest, 1987. **80**(6): p. 1784-93.
  28. el-Khoury, A.E., et al., *Moderate exercise at energy balance does not affect 24-h leucine oxidation or nitrogen retention in healthy men.* Am J Physiol, 1997. **273**(2 Pt 1): p. E394-407.
  29. Wagenmakers, A.J., et al., *Exercise-induced activation of the branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase in human muscle.* Eur J Appl Physiol Occup Physiol, 1989. **59**(3): p. 159-67.
  30. Hatazawa, Y., et al., *Metabolomic Analysis of the Skeletal Muscle of Mice Overexpressing PGC-1alpha.* PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0129084.
  31. Hatazawa, Y., et al., *PGC-1alpha-mediated branched-chain amino acid metabolism in the skeletal muscle.* PLoS One, 2014. **9**(3): p. e91006.
  32. Overmyer, K.A., et al., *Maximal oxidative capacity during exercise is associated with skeletal muscle fuel selection and dynamic changes in mitochondrial protein acetylation.* Cell Metab, 2015. **21**(3): p. 468-78.
  33. McKenzie, S., et al., *Endurance exercise training attenuates leucine oxidation and BCOAD activation during exercise in humans.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **278**(4): p. E580-7.
  34. Hamadeh, M.J., M.C. Devries, and M.A. Tarnopolsky, *Estrogen supplementation reduces whole body leucine and carbohydrate oxidation and increases lipid oxidation in men during endurance exercise.* J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(6): p. 3592-9.
  35. Neinast, M.D., et al., *Quantitative Analysis of the Whole-Body Metabolic Fate of Branched-Chain Amino Acids.* Cell Metab, 2019. **29**(2): p. 417-429 e4.
  36. Ding, C., et al., *A Cell-type-resolved Liver Proteome.* Mol Cell Proteomics, 2016. **15**(10): p. 3190-3202.
  37. Hutson, S.M., R. Wallin, and T.R. Hall, *Identification of mitochondrial branched chain aminotransferase and its isoforms in rat tissues.* J Biol Chem, 1992. **267**(22): p. 15681-6.

38. Harper, A.E., *Thoughts on the role of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex in nitrogen metabolism*. Ann N Y Acad Sci, 1989. **573**: p. 267-73.
39. Hakvoort, T.B., et al., *Pivotal role of glutamine synthetase in ammonia detoxification*. Hepatology, 2017. **65**(1): p. 281-293.
40. Shah, A.M. and F.E. Wondisford, *Tracking the carbons supplying gluconeogenesis*. J Biol Chem, 2020. **295**(42): p. 14419-14429.
41. Mann, G., et al., *Branched-chain Amino Acids: Catabolism in Skeletal Muscle and Implications for Muscle and Whole-body Metabolism*. Front Physiol, 2021. **12**: p. 702826.
42. Clarkson, P.M., *Nutrition for improved sports performance. Current issues on ergogenic aids*. Sports Med, 1996. **21**(6): p. 393-401.
43. de Araujo, J.A., Jr., et al., *Effect of chronic supplementation with branched-chain amino acids on the performance and hepatic and muscle glycogen content in trained rats*. Life Sci, 2006. **79**(14): p. 1343-8.
44. Gualano, A.B., et al., *Branched-chain amino acids supplementation enhances exercise capacity and lipid oxidation during endurance exercise after muscle glycogen depletion*. J Sports Med Phys Fitness, 2011. **51**(1): p. 82-8.
45. Kim, D.H., et al., *Effect of BCAA intake during endurance exercises on fatigue substances, muscle damage substances, and energy metabolism substances*. J Exerc Nutrition Biochem, 2013. **17**(4): p. 169-80.
46. Yudkoff, M., et al., *Brain amino acid requirements and toxicity: the example of leucine*. J Nutr, 2005. **135**(6 Suppl): p. 1531S-8S.
47. Fernstrom, J.D., *Branched-chain amino acids and brain function*. J Nutr, 2005. **135**(6 Suppl): p. 1539S-46S.
48. Yudkoff, M., *Brain metabolism of branched-chain amino acids*. Glia, 1997. **21**(1): p. 92-8.
49. Herman, M.A., et al., *Adipose tissue branched chain amino acid (BCAA) metabolism modulates circulating BCAA levels*. J Biol Chem, 2010. **285**(15): p. 11348-56.
50. Kainulainen, H., J.J. Hulmi, and U.M. Kujala, *Potential role of branched-chain amino acid catabolism in regulating fat oxidation*. Exerc Sport Sci Rev, 2013. **41**(4): p. 194-200.
51. Estrada-Alcalde, I., et al., *Metabolic Fate of Branched-Chain Amino Acids During Adipogenesis, in Adipocytes From Obese Mice and C2C12 Myotubes*. J Cell Biochem, 2017. **118**(4): p. 808-818.
52. Li, P., et al., *Amino acids and immune function*. Br J Nutr, 2007. **98**(2): p. 237-52.
53. Calder, P.C., *Branched-chain amino acids and immunity*. J Nutr, 2006. **136**(1 Suppl): p. 288S-93S.
54. Cano, N.J., D. Fouque, and X.M. Leveille, *Application of branched-chain amino acids in human pathological states: renal failure*. J Nutr, 2006. **136**(1 Suppl): p. 299S-307S.
55. McNulty, P.H., et al., *Effect of hyperinsulinemia on myocardial amino acid uptake in patients with coronary artery disease*. Metabolism, 2000. **49**(10): p. 1365-9.
56. Saxton, R.A. and D.M. Sabatini, *mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease*. Cell, 2017. **169**(2): p. 361-371.
57. Takahara, T., et al., *Amino acid-dependent control of mTORC1 signaling: a variety of regulatory modes*. J Biomed Sci, 2020. **27**(1): p. 87.
58. Dodd, K.M. and A.R. Tee, *Leucine and mTORC1: a complex relationship*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012. **302**(11): p. E1329-42.

59. Martina, J.A. and R. Puertollano, *Rag GTPases mediate amino acid-dependent recruitment of TFEB and MITF to lysosomes*. J Cell Biol, 2013. **200**(4): p. 475-91.
60. Zoncu, R., et al., *mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase*. Science, 2011. **334**(6056): p. 678-83.
61. Wolfson, R.L., et al., *Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway*. Science, 2016. **351**(6268): p. 43-8.
62. Han, J.M., et al., *Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway*. Cell, 2012. **149**(2): p. 410-24.
63. Taylor Morse, D.S.W., *Efficacy of BCAA supplementation for exercise performance and recovery: a narrative review*. J Nutr Health Food Eng., 2019. **9**(3): p. 128–133.
64. Apro, W., et al., *Leucine does not affect mechanistic target of rapamycin complex 1 assembly but is required for maximal ribosomal protein s6 kinase 1 activity in human skeletal muscle following resistance exercise*. FASEB J, 2015. **29**(10): p. 4358-73.
65. Escobar, J., et al., *Leucine and alpha-ketoisocaproic acid, but not norleucine, stimulate skeletal muscle protein synthesis in neonatal pigs*. J Nutr, 2010. **140**(8): p. 1418-24.
66. Le Couteur, D.G., et al., *Branched chain amino acids, aging and age-related health*. Ageing Res Rev, 2020. **64**: p. 101198.
67. Chevalier, S., et al., *Frailty amplifies the effects of aging on protein metabolism: role of protein intake*. Am J Clin Nutr, 2003. **78**(3): p. 422-9.
68. Le Couteur, D.G., et al., *Branched Chain Amino Acids, Cardiometabolic Risk Factors and Outcomes in Older Men: The Concord Health and Ageing in Men Project*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2020. **75**(10): p. 1805-1810.
69. Liu, G.Y. and D.M. Sabatini, *mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020. **21**(4): p. 183-203.
70. Derous, D., et al., *The effects of graded levels of calorie restriction: XI. Evaluation of the main hypotheses underpinning the life extension effects of CR using the hepatic transcriptome*. Aging (Albany NY), 2017. **9**(7): p. 1770-1824.
71. Green, C.L., et al., *The Effects of Graded Levels of Calorie Restriction: XIII. Global Metabolomics Screen Reveals Graded Changes in Circulating Amino Acids, Vitamins, and Bile Acids in the Plasma of C57BL/6 Mice*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2019. **74**(1): p. 16-26.
72. Weichhart, T., *mTOR as Regulator of Lifespan, Aging, and Cellular Senescence: A Mini-Review*. Gerontology, 2018. **64**(2): p. 127-134.
73. Larsson, L., et al., *Sarcopenia: Aging-Related Loss of Muscle Mass and Function*. Physiol Rev, 2019. **99**(1): p. 427-511.
74. Nilwik, R., et al., *The decline in skeletal muscle mass with aging is mainly attributed to a reduction in type II muscle fiber size*. Exp Gerontol, 2013. **48**(5): p. 492-8.
75. Valerio, A., G. D'Antona, and E. Nisoli, *Branched-chain amino acids, mitochondrial biogenesis, and healthspan: an evolutionary perspective*. Aging (Albany NY), 2011. **3**(5): p. 464-78.
76. D'Antona, G., et al., *Branched-chain amino acid supplementation promotes survival and supports cardiac and skeletal muscle mitochondrial biogenesis in middle-aged mice*. Cell Metab, 2010. **12**(4): p. 362-372.
77. Mansfeld, J., et al., *Branched-chain amino acid catabolism is a conserved regulator of physiological ageing*. Nature Communications, 2015. **6**(1): p. 10043.

78. Fahien, L.A. and M.J. Macdonald, *The complex mechanism of glutamate dehydrogenase in insulin secretion*. Diabetes, 2011. **60**(10): p. 2450-4.
79. Jia, G. and J.R. Sowers, *Interaction of islet alpha-cell and beta-cell in the regulation of glucose homeostasis in HI/HA syndrome patients with the GDH(H454Y) mutation*. Diabetes, 2014. **63**(12): p. 4008-10.
80. Holecek, M., *Branched-chain amino acids in health and disease: metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements*. Nutr Metab (Lond), 2018. **15**: p. 33.
81. Manoli, I. and C.P. Venditti, *Disorders of branched chain amino acid metabolism*. Transl Sci Rare Dis, 2016. **1**(2): p. 91-110.
82. Burrage, L.C., et al., *Branched-chain amino acid metabolism: from rare Mendelian diseases to more common disorders*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(R1): p. R1-8.
83. Dancis, J., et al., *Maple syrup urine disease*. Br Med J, 1959. **1**(5114): p. 91-3.
84. Robinson, B.H., J. Taylor, and W.G. Sherwood, *Deficiency of dihydrolipoyl dehydrogenase (a component of the pyruvate and alpha-ketoglutarate dehydrogenase complexes): a cause of congenital chronic lactic acidosis in infancy*. Pediatr Res, 1977. **11**(12): p. 1198-202.
85. Blackburn, P.R., et al., *Maple syrup urine disease: mechanisms and management*. Appl Clin Genet, 2017. **10**: p. 57-66.
86. Mamer, O.A. and M.L. Reimer, *On the mechanisms of the formation of L-alloisoleucine and the 2-hydroxy-3-methylvaleric acid stereoisomers from L-isoleucine in maple syrup urine disease patients and in normal humans*. J Biol Chem, 1992. **267**(31): p. 22141-7.
87. Schadewaldt, P., et al., *Significance of L-alloisoleucine in plasma for diagnosis of maple syrup urine disease*. Clin Chem, 1999. **45**(10): p. 1734-40.
88. Podebrad, F., et al., *4,5-dimethyl-3-hydroxy-2[5H]-furanone (sotolone)--the odour of maple syrup urine disease*. J Inherit Metab Dis, 1999. **22**(2): p. 107-14.
89. Oldendorf, W.H. and J. Szabo, *Amino acid assignment to one of three blood-brain barrier amino acid carriers*. Am J Physiol, 1976. **230**(1): p. 94-8.
90. Yudkoff, M., et al., *[15N] leucine as a source of [15N] glutamate in organotypic cerebellar explants*. Biochem Biophys Res Commun, 1983. **115**(1): p. 174-9.
91. Funchal, C., et al., *Morphological alterations and induction of oxidative stress in glial cells caused by the branched-chain alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease*. Neurochem Int, 2006. **49**(7): p. 640-50.
92. Mescka, C., et al., *In vivo neuroprotective effect of L-carnitine against oxidative stress in maple syrup urine disease*. Metab Brain Dis, 2011. **26**(1): p. 21-8.
93. Nair, K.S., et al., *Effect of poor diabetic control and obesity on whole body protein metabolism in man*. Diabetologia, 1983. **25**(5): p. 400-3.
94. Vanweert, F., P. Schrauwen, and E. Phielix, *Role of branched-chain amino acid metabolism in the pathogenesis of obesity and type 2 diabetes-related metabolic disturbances BCAA metabolism in type 2 diabetes*. Nutrition & Diabetes, 2022. **12**(1): p. 35.
95. Karakelides, H., et al., *Effect of insulin deprivation on muscle mitochondrial ATP production and gene transcript levels in type 1 diabetic subjects*. Diabetes, 2007. **56**(11): p. 2683-9.
96. Krause, M.P., M.C. Riddell, and T.J. Hawke, *Effects of type 1 diabetes mellitus on skeletal muscle: clinical observations and physiological mechanisms*. Pediatr Diabetes, 2011. **12**(4 Pt 1): p. 345-64.
97. Borghi, L., et al., *Plasma and skeletal muscle free amino acids in type I, insulin-treated diabetic subjects*. Diabetes, 1985. **34**(8): p. 812-5.

98. Holecek, M., *Why Are Branched-Chain Amino Acids Increased in Starvation and Diabetes?* *Nutrients*, 2020. **12**(10).
99. Rodriguez, T., et al., *The increased skeletal muscle protein turnover of the streptozotocin diabetic rat is associated with high concentrations of branched-chain amino acids.* *Biochem Mol Med*, 1997. **61**(1): p. 87-94.
100. Holecek, M., M. Vodenicarovova, and R. Fingrova, *Dual Effects of Beta-Hydroxy-Beta-Methylbutyrate (HMB) on Amino Acid, Energy, and Protein Metabolism in the Liver and Muscles of Rats with Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetes.* *Biomolecules*, 2020. **10**(11).
101. Adibi, S.A., *Influence of dietary deprivations on plasma concentration of free amino acids of man.* *J Appl Physiol*, 1968. **25**(1): p. 52-7.
102. Felig, P., E. Marliss, and G.F. Cahill, Jr., *Plasma amino acid levels and insulin secretion in obesity.* *N Engl J Med*, 1969. **281**(15): p. 811-6.
103. Fiehn, O., et al., *Plasma metabolomic profiles reflective of glucose homeostasis in non-diabetic and type 2 diabetic obese African-American women.* *PLoS One*, 2010. **5**(12): p. e15234.
104. Lee, C.C., et al., *Branched-Chain Amino Acids and Insulin Metabolism: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS).* *Diabetes Care*, 2016. **39**(4): p. 582-8.
105. Wijekoon, E.P., et al., *Amino acid metabolism in the Zucker diabetic fatty rat: effects of insulin resistance and of type 2 diabetes.* *Can J Physiol Pharmacol*, 2004. **82**(7): p. 506-14.
106. Yamaguchi, N., et al., *Plasma free amino acid profiles evaluate risk of metabolic syndrome, diabetes, dyslipidemia, and hypertension in a large Asian population.* *Environ Health Prev Med*, 2017. **22**(1): p. 35.
107. Wurtz, P., et al., *Branched-chain and aromatic amino acids are predictors of insulin resistance in young adults.* *Diabetes Care*, 2013. **36**(3): p. 648-55.
108. Yamakado, M., et al., *Plasma Free Amino Acid Profiles Predict Four-Year Risk of Developing Diabetes, Metabolic Syndrome, Dyslipidemia, and Hypertension in Japanese Population.* *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 11918.
109. Wang, T.J., et al., *Metabolite profiles and the risk of developing diabetes.* *Nat Med*, 2011. **17**(4): p. 448-53.
110. Burrill, J.S., et al., *Inflammation and ER stress regulate branched-chain amino acid uptake and metabolism in adipocytes.* *Mol Endocrinol*, 2015. **29**(3): p. 411-20.
111. Lo, K.A., et al., *Analysis of in vitro insulin-resistance models and their physiological relevance to in vivo diet-induced adipose insulin resistance.* *Cell Rep*, 2013. **5**(1): p. 259-70.
112. Pietilainen, K.H., et al., *Global transcript profiles of fat in monozygotic twins discordant for BMI: pathways behind acquired obesity.* *PLoS Med*, 2008. **5**(3): p. e51.
113. Nadler, S.T., et al., *The expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes mellitus.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(21): p. 11371-6.
114. She, P., et al., *Obesity-related elevations in plasma leucine are associated with alterations in enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism.* *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007. **293**(6): p. E1552-63.
115. Laferrere, B., et al., *Differential metabolic impact of gastric bypass surgery versus dietary intervention in obese diabetic subjects despite identical weight loss.* *Sci Transl Med*, 2011. **3**(80): p. 80re2.
116. Oyarzabal, A., et al., *A novel regulatory defect in the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex due to a mutation in the PPM1K gene causes a*

- mild variant phenotype of maple syrup urine disease*. Hum Mutat, 2013. **34**(2): p. 355-62.
117. Goni, L., et al., *Effect of the interaction between diet composition and the PPM1K genetic variant on insulin resistance and beta cell function markers during weight loss: results from the Nutrient Gene Interactions in Human Obesity: implications for dietary guidelines (NUGENOB) randomized trial*. Am J Clin Nutr, 2017. **106**(3): p. 902-908.
  118. Lotta, L.A., et al., *Genetic Predisposition to an Impaired Metabolism of the Branched-Chain Amino Acids and Risk of Type 2 Diabetes: A Mendelian Randomisation Analysis*. PLoS Med, 2016. **13**(11): p. e1002179.
  119. Xu, M., et al., *Genetic determinant for amino acid metabolites and changes in body weight and insulin resistance in response to weight-loss diets: the Preventing Overweight Using Novel Dietary Strategies (POUNDS LOST) trial*. Circulation, 2013. **127**(12): p. 1283-9.
  120. White, P.J., et al., *The BCKDH Kinase and Phosphatase Integrate BCAA and Lipid Metabolism via Regulation of ATP-Citrate Lyase*. Cell Metab, 2018. **27**(6): p. 1281-1293 e7.
  121. Pedersen, H.K., et al., *Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity*. Nature, 2016. **535**(7612): p. 376-81.
  122. Green, C.R., et al., *Branched-chain amino acid catabolism fuels adipocyte differentiation and lipogenesis*. Nat Chem Biol, 2016. **12**(1): p. 15-21.
  123. Crown, S.B., N. Marze, and M.R. Antoniewicz, *Catabolism of Branched Chain Amino Acids Contributes Significantly to Synthesis of Odd-Chain and Even-Chain Fatty Acids in 3T3-L1 Adipocytes*. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0145850.
  124. White, P.J., et al., *Branched-chain amino acid restriction in Zucker-fatty rats improves muscle insulin sensitivity by enhancing efficiency of fatty acid oxidation and acyl-glycine export*. Mol Metab, 2016. **5**(7): p. 538-551.
  125. White, P.J., et al., *Muscle-Liver Trafficking of BCAA-Derived Nitrogen Underlies Obesity-Related Glycine Depletion*. Cell Rep, 2020. **33**(6): p. 108375.
  126. Jang, C., et al., *A branched-chain amino acid metabolite drives vascular fatty acid transport and causes insulin resistance*. Nat Med, 2016. **22**(4): p. 421-6.
  127. Mardinoglu, A., et al., *Elevated Plasma Levels of 3-Hydroxyisobutyric Acid Are Associated With Incident Type 2 Diabetes*. EBioMedicine, 2018. **27**: p. 151-155.
  128. Lynch, C.J. and S.H. Adams, *Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance*. Nat Rev Endocrinol, 2014. **10**(12): p. 723-36.
  129. Rivas, D.A., S.J. Lessard, and V.G. Coffey, *mTOR function in skeletal muscle: a focal point for overnutrition and exercise*. Appl Physiol Nutr Metab, 2009. **34**(5): p. 807-16.
  130. Yoon, M.S., *The Emerging Role of Branched-Chain Amino Acids in Insulin Resistance and Metabolism*. Nutrients, 2016. **8**(7).
  131. Newgard, C.B., *Interplay between lipids and branched-chain amino acids in development of insulin resistance*. Cell Metab, 2012. **15**(5): p. 606-14.
  132. Lindsay, K.L., et al., *Longitudinal Metabolomic Profiling of Amino Acids and Lipids across Healthy Pregnancy*. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0145794.
  133. Scholtens, D.M., et al., *Metabolomics reveals broad-scale metabolic perturbations in hyperglycemic mothers during pregnancy*. Diabetes Care, 2014. **37**(1): p. 158-66.
  134. Pappa, K.I., et al., *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): p. 65 e1-5.

135. Hsiao, G., et al., *Multi-tissue, selective PPAR $\gamma$  modulation of insulin sensitivity and metabolic pathways in obese rats*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011. **300**(1): p. E164-74.
136. D, S.S., et al., *Metformin inhibits Branched Chain Amino Acid (BCAA) derived ketoacidosis and promotes metabolic homeostasis in MSUD*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 28775.
137. Rivera, M.E., E.S. Lyon, and R.A. Vaughan, *Effect of metformin on myotube BCAA catabolism*. J Cell Biochem, 2020. **121**(1): p. 816-827.
138. Kappel, B.A., et al., *Effect of Empagliflozin on the Metabolic Signature of Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease*. Circulation, 2017. **136**(10): p. 969-972.
139. Zhou, M., et al., *Targeting BCAA Catabolism to Treat Obesity-Associated Insulin Resistance*. Diabetes, 2019. **68**(9): p. 1730-1746.
140. Burrage, L.C., et al., *Sodium phenylbutyrate decreases plasma branched-chain amino acids in patients with urea cycle disorders*. Mol Genet Metab, 2014. **113**(1-2): p. 131-5.
141. Vanweert, F., et al., *A randomized placebo-controlled clinical trial for pharmacological activation of BCAA catabolism in patients with type 2 diabetes*. Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 3508.
142. McGarrah, R.W., et al., *Cardiovascular Metabolomics*. Circ Res, 2018. **122**(9): p. 1238-1258.
143. Ruiz-Canela, M., et al., *Plasma Branched-Chain Amino Acids and Incident Cardiovascular Disease in the PREDIMED Trial*. Clin Chem, 2016. **62**(4): p. 582-92.
144. Karwi, Q.G. and G.D. Lopaschuk, *Branched-Chain Amino Acid Metabolism in the Failing Heart*. Cardiovasc Drugs Ther, 2023. **37**(2): p. 413-420.
145. Sun, H., et al., *Catabolic Defect of Branched-Chain Amino Acids Promotes Heart Failure*. Circulation, 2016. **133**(21): p. 2038-49.
146. Sun, H. and Y. Wang, *Branched chain amino acid metabolic reprogramming in heart failure*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1862**(12): p. 2270-2275.
147. Wang, W., et al., *Defective branched chain amino acid catabolism contributes to cardiac dysfunction and remodeling following myocardial infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2016. **311**(5): p. H1160-H1169.
148. Li, T., et al., *Defective Branched-Chain Amino Acid Catabolism Disrupts Glucose Metabolism and Sensitizes the Heart to Ischemia-Reperfusion Injury*. Cell Metab, 2017. **25**(2): p. 374-385.
149. Jackson, R.H. and T.P. Singer, *Inactivation of the 2-ketoglutarate and pyruvate dehydrogenase complexes of beef heart by branched chain keto acids*. J Biol Chem, 1983. **258**(3): p. 1857-65.
150. Polis, B. and A.O. Samson, *Role of the metabolism of branched-chain amino acids in the development of Alzheimer's disease and other metabolic disorders*. Neural Regen Res, 2020. **15**(8): p. 1460-1470.
151. Li, H., et al., *Defect of branched-chain amino acid metabolism promotes the development of Alzheimer's disease by targeting the mTOR signaling*. Biosci Rep, 2018. **38**(4).
152. Ruiz, H.H., et al., *Increased susceptibility to metabolic dysregulation in a mouse model of Alzheimer's disease is associated with impaired hypothalamic insulin signaling and elevated BCAA levels*. Alzheimers Dement, 2016. **12**(8): p. 851-61.
153. Hudd, F., et al., *Novel Blood Biomarkers that Correlate with Cognitive Performance and Hippocampal Volumetry: Potential for Early Diagnosis of Alzheimer's Disease*. J Alzheimers Dis, 2019. **67**(3): p. 931-947.



154. Toledo, J.B., et al., *Metabolic network failures in Alzheimer's disease: A biochemical road map*. *Alzheimers Dement*, 2017. **13**(9): p. 965-984.
155. Larsson, S.C. and H.S. Markus, *Branched-chain amino acids and Alzheimer's disease: a Mendelian randomization analysis*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 13604.
156. Siddik, M.A.B. and A.C. Shin, *Recent Progress on Branched-Chain Amino Acids in Obesity, Diabetes, and Beyond*. *Endocrinol Metab (Seoul)*, 2019. **34**(3): p. 234-246.
157. Tournissac, M., et al., *Dietary intake of branched-chain amino acids in a mouse model of Alzheimer's disease: Effects on survival, behavior, and neuropathology*. *Alzheimers Dement (N Y)*, 2018. **4**: p. 677-687.
158. Xu, J., Y. Jakher, and R.C. Ahrens-Nicklas, *Brain Branched-Chain Amino Acids in Maple Syrup Urine Disease: Implications for Neurological Disorders*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(20).
159. Yoo, H.C. and J.M. Han, *Amino Acid Metabolism in Cancer Drug Resistance*. *Cells*, 2022. **11**(1).
160. Mayers, J.R., et al., *Elevation of circulating branched-chain amino acids is an early event in human pancreatic adenocarcinoma development*. *Nat Med*, 2014. **20**(10): p. 1193-1198.
161. Mayers, J.R., et al., *Tissue of origin dictates branched-chain amino acid metabolism in mutant Kras-driven cancers*. *Science*, 2016. **353**(6304): p. 1161-5.
162. Tonjes, M., et al., *BCAT1 promotes cell proliferation through amino acid catabolism in gliomas carrying wild-type IDH1*. *Nat Med*, 2013. **19**(7): p. 901-908.
163. Xu, W., et al., *Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases*. *Cancer Cell*, 2011. **19**(1): p. 17-30.
164. McBrayer, S.K., et al., *Transaminase Inhibition by 2-Hydroxyglutarate Impairs Glutamate Biosynthesis and Redox Homeostasis in Glioma*. *Cell*, 2018. **175**(1): p. 101-116 e25.
165. Raffel, S., et al., *BCAT1 restricts alphaKG levels in AML stem cells leading to IDHmut-like DNA hypermethylation*. *Nature*, 2017. **551**(7680): p. 384-388.
166. Hattori, A., et al., *Cancer progression by reprogrammed BCAA metabolism in myeloid leukaemia*. *Nature*, 2017. **545**(7655): p. 500-504.
167. Ericksen, R.E., et al., *Loss of BCAA Catabolism during Carcinogenesis Enhances mTORC1 Activity and Promotes Tumor Development and Progression*. *Cell Metab*, 2019. **29**(5): p. 1151-1165 e6.
168. Zhang, L. and J. Han, *Branched-chain amino acid transaminase 1 (BCAT1) promotes the growth of breast cancer cells through improving mTOR-mediated mitochondrial biogenesis and function*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017. **486**(2): p. 224-231.
169. Soeters, P.B. and J.E. Fischer, *Insulin, glucagon, aminoacid imbalance, and hepatic encephalopathy*. *Lancet*, 1976. **2**(7991): p. 880-2.
170. Plauth, M., et al., *Characteristic pattern of free amino acids in plasma and skeletal muscle in stable hepatic cirrhosis*. *Hepatogastroenterology*, 1990. **37**(1): p. 135-9.
171. Holecek, M., *Ammonia and amino acid profiles in liver cirrhosis: effects of variables leading to hepatic encephalopathy*. *Nutrition*, 2015. **31**(1): p. 14-20.
172. Yang, J., et al., *Correlation between plasma amino acid profiles and the various stages of hepatitis B infection*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012. **31**(8): p. 2045-52.
173. Ninomiya, T., et al., *Improvement of molar ratio of branched-chain amino acids to tyrosine (BTR) associated with liver fibrosis in chronic hepatitis C patients treated with interferon-alpha*. *Dig Dis Sci*, 1999. **44**(5): p. 1027-33.

174. Gaggini, M., et al., *Altered amino acid concentrations in NAFLD: Impact of obesity and insulin resistance*. Hepatology, 2018. **67**(1): p. 145-158.
175. van den Berg, E.H., et al., *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Risk of Incident Type 2 Diabetes: Role of Circulating Branched-Chain Amino Acids*. Nutrients, 2019. **11**(3).
176. Wu, T., et al., *Emerging role for branched-chain amino acids metabolism in fibrosis*. Pharmacol Res, 2023. **187**: p. 106604.
177. Lo, E.K.K., et al., *The Emerging Role of Branched-Chain Amino Acids in Liver Diseases*. Biomedicines, 2022. **10**(6).
178. Tajiri, K. and Y. Shimizu, *Branched-chain amino acids in liver diseases*. World J Gastroenterol, 2013. **19**(43): p. 7620-9.
179. Honda, M., et al., *Malnutrition impairs interferon signaling through mTOR and FoxO pathways in patients with chronic hepatitis C*. Gastroenterology, 2011. **141**(1): p. 128-40, 140 e1-2.
180. Ma, N., et al., *Nutrients Mediate Intestinal Bacteria-Mucosal Immune Crosstalk*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 5.
181. Liberal, R. and C.R. Grant, *Cirrhosis and autoimmune liver disease: Current understanding*. World J Hepatol, 2016. **8**(28): p. 1157-1168.
182. Wang, J.B., et al., *Metabolomic Profiling of Autoimmune Hepatitis: The Diagnostic Utility of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. J Proteome Res, 2014. **13**(8): p. 3792-3801.
183. Cheng, Z., L. Yang, and H. Chu, *The Gut Microbiota: A Novel Player in Autoimmune Hepatitis*. Front Cell Infect Microbiol, 2022. **12**: p. 947382.
184. Hao, J., et al., *Serum Metabolomics Analysis Reveals a Distinct Metabolic Profile of Patients with Primary Biliary Cholangitis*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 784.
185. Kummen, M., et al., *Altered Gut Microbial Metabolism of Essential Nutrients in Primary Sclerosing Cholangitis*. Gastroenterology, 2021. **160**(5): p. 1784-1798 e0.
186. Alvestrand, A., P. Furst, and J. Bergstrom, *Plasma and muscle free amino acids in uremia: influence of nutrition with amino acids*. Clin Nephrol, 1982. **18**(6): p. 297-305.
187. Schauder, P., et al., *Blood levels of branched-chain amino acids and alpha-ketoacids in uremic patients given keto analogues of essential amino acids*. Am J Clin Nutr, 1980. **33**(7): p. 1660-6.
188. Kumar, M.A., et al., *Branched chain amino acid profile in early chronic kidney disease*. Saudi J Kidney Dis Transpl, 2012. **23**(6): p. 1202-7.
189. Suliman, M.E., et al., *Inflammation contributes to low plasma amino acid concentrations in patients with chronic kidney disease*. Am J Clin Nutr, 2005. **82**(2): p. 342-9.
190. Grimble, R.F., *Nutritional modulation of immune function*. Proc Nutr Soc, 2001. **60**(3): p. 389-97.
191. Hara, Y., et al., *Acidosis, not azotemia, stimulates branched-chain, amino acid catabolism in uremic rats*. Kidney Int, 1987. **32**(6): p. 808-14.
192. Del Coco, L., et al., *NMR-Based Metabolomic Approach Tracks Potential Serum Biomarkers of Disease Progression in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus*. J Clin Med, 2019. **8**(5).
193. Hinden, L., et al., *Pathogenesis of diabetes-induced kidney disease: role of kidney nutrient sensing*. FEBS J, 2022. **289**(4): p. 901-921.
194. Saleem, T., et al., *The Profile of Plasma Free Amino Acids in Type 2 Diabetes Mellitus with Insulin Resistance: Association with Microalbuminuria and Macroalbuminuria*. Appl Biochem Biotechnol, 2019. **188**(3): p. 854-867.

195. Shin, A.C., et al., *Brain insulin lowers circulating BCAA levels by inducing hepatic BCAA catabolism*. Cell Metab, 2014. **20**(5): p. 898-909.
196. Azuma, Y., et al., *Determination of branched-chain amino acids and tyrosine in serum of patients with various hepatic diseases, and its clinical usefulness*. Clin Chem, 1989. **35**(7): p. 1399-403.
197. Gleeson, M. and R.J. Maughan, *A simple enzymatic fluorimetric method for the determination of branched-chain L-amino acids in microlitre volumes of plasma*. Clin Chim Acta, 1987. **166**(2-3): p. 163-9.
198. Beckett, P.R., *Spectrophotometric assay for measuring branched-chain amino acids*. Methods Enzymol, 2000. **324**: p. 40-7.
199. Tuma, P. and J. Gojda, *Rapid determination of branched chain amino acids in human blood plasma by pressure-assisted capillary electrophoresis with contactless conductivity detection*. Electrophoresis, 2015. **36**(16): p. 1969-75.
200. Alodaib, A., et al., *An improved ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of alloisoleucine and branched chain amino acids in dried blood samples*. Ann Clin Biochem, 2011. **48**(Pt 5): p. 468-70.
201. Wolak-Dinsmore, J., et al., *A novel NMR-based assay to measure circulating concentrations of branched-chain amino acids: Elevation in subjects with type 2 diabetes mellitus and association with carotid intima media thickness*. Clin Biochem, 2018. **54**: p. 92-99.
202. Beckonert, O., et al., *Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts*. Nat Protoc, 2007. **2**(11): p. 2692-703.
203. Γεροθανάσης, Ι.Π., *Φασματοσκοπία οργανικών ενώσεων. Τόμος Γ*. 2000, Πάτρα: ΦΥΕ30 Εκδόσεις ΕΑΠ.
204. Μαυρομούστακος Θ., Μ.Ι., *NMR. Βασικές Αρχές και Εφαρμογές Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού στην Ιατρική, Φαρμακευτική Χημεία, Βιοχημεία, Χημείας Τροφίμων και Ποτών*. . 2006, Αθήνα: Εκδ. Γ.Β.Παρισιάνος.
205. L.G.Wade, *Οργανική Χημεία, 7η έκδοση*,. 2012, Θεσσαλονίκη: εκδόσεις Τζιόλα.
206. D.Klein, *Οργανική Χημεία, Τόμος 2*, . 2015, Αθήνα: εκδόσεις Utopia.
207. Psychogios, N., et al., *The human serum metabolome*. PLoS One, 2011. **6**(2): p. e16957.
208. Nagana Gowda, G.A. and D. Raftery, *Quantitating metabolites in protein precipitated serum using NMR spectroscopy*. Anal Chem, 2014. **86**(11): p. 5433-40.
209. Vanweert, F., et al., *Elevated Plasma Branched-Chain Amino Acid Levels Correlate With Type 2 Diabetes–Related Metabolic Disturbances*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2020. **106**(4): p. e1827-e1836.
210. White, P.J., et al., *Insulin action, type 2 diabetes, and branched-chain amino acids: A two-way street*. Mol Metab, 2021. **52**: p. 101261.
211. Dollet, L., et al., *Glutamine Regulates Skeletal Muscle Immunometabolism in Type 2 Diabetes*. Diabetes, 2022. **71**(4): p. 624-636.
212. Petrus, P., et al., *Glutamine Links Obesity to Inflammation in Human White Adipose Tissue*. Cell Metab, 2020. **31**(2): p. 375-390 e11.
213. Martino, M.R., et al., *Silencing alanine transaminase 2 in diabetic liver attenuates hyperglycemia by reducing gluconeogenesis from amino acids*. Cell Reports, 2022. **39**(4): p. 110733.
214. Alqudah, A., et al., *Plasma Amino Acids Metabolomics' Important in Glucose Management in Type 2 Diabetes*. Front Pharmacol, 2021. **12**: p. 695418.

215. Preiss, D., et al., *Effect of metformin therapy on circulating amino acids in a randomized trial: the CAMERA study*. *Diabet Med*, 2016. **33**(11): p. 1569-1574.
216. Mahendran, Y., et al., *Association of ketone body levels with hyperglycemia and type 2 diabetes in 9,398 Finnish men*. *Diabetes*, 2013. **62**(10): p. 3618-26.
217. Haythorne, E., et al., *Diabetes causes marked inhibition of mitochondrial metabolism in pancreatic  $\beta$ -cells*. *Nature Communications*, 2019. **10**(1): p. 2474.
218. Mihalik, S.J., et al., *Metabolomic profiling of fatty acid and amino acid metabolism in youth with obesity and type 2 diabetes: evidence for enhanced mitochondrial oxidation*. *Diabetes Care*, 2012. **35**(3): p. 605-11.
219. Hernández-Alvarez, M.I., et al., *Early-onset and classical forms of type 2 diabetes show impaired expression of genes involved in muscle branched-chain amino acids metabolism*. *Scientific Reports*, 2017. **7**(1): p. 13850.
220. Suwa, M., et al., *Metformin increases the PGC-1 $\alpha$  protein and oxidative enzyme activities possibly via AMPK phosphorylation in skeletal muscle in vivo*. *J Appl Physiol* (1985), 2006. **101**(6): p. 1685-92.
221. Temmerman L, D.L.A., Bowne JB, Sheedy JR, Callahan DL, et al., *Cross-Platform Urine Metabolomics of Experimental Hyperglycemia in Type 2 Diabetes*. *J Diabetes Metab*, 2012. **S6:002**.
222. Salek, R.M., et al., *A metabolomic comparison of urinary changes in type 2 diabetes in mouse, rat, and human*. *Physiol Genomics*, 2007. **29**(2): p. 99-108.
223. van Doorn, M., et al., *Evaluation of metabolite profiles as biomarkers for the pharmacological effects of thiazolidinediones in Type 2 diabetes mellitus patients and healthy volunteers*. *Br J Clin Pharmacol*, 2007. **63**(5): p. 562-74.
224. Yurista, S.R., et al., *Therapeutic Potential of Ketone Bodies for Patients With Cardiovascular Disease: JACC State-of-the-Art Review*. *J Am Coll Cardiol*, 2021. **77**(13): p. 1660-1669.
225. Bletsa, E., et al., *Effect of Dapagliflozin on Urine Metabolome in Patients with Type 2 Diabetes*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2021. **106**(5): p. 1269-1283.
226. Park, S.H., et al., *High glucose inhibits renal proximal tubule cell proliferation and involves PKC, oxidative stress, and TGF- $\beta$  1*. *Kidney Int*, 2001. **59**(5): p. 1695-705.
227. Onishi, A., et al., *Effect of renal tubule-specific knockdown of the Na(+)/H(+) exchanger NHE3 in Akita diabetic mice*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2019. **317**(2): p. F419-F434.
228. Vallon, V., et al., *SGLT2 inhibitor empagliflozin reduces renal growth and albuminuria in proportion to hyperglycemia and prevents glomerular hyperfiltration in diabetic Akita mice*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2014. **306**(2): p. F194-204.
229. Liu, J.J., et al., *Urine Tricarboxylic Acid Cycle Metabolites Predict Progressive Chronic Kidney Disease in Type 2 Diabetes*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2018. **103**(12): p. 4357-4364.
230. Tizianello, A., et al., *Renal metabolism of amino acids and ammonia in subjects with normal renal function and in patients with chronic renal insufficiency*. *J Clin Invest*, 1980. **65**(5): p. 1162-73.
231. Paller, M.S. and M. Patten, *Protective effects of glutathione, glycine, or alanine in an in vitro model of renal anoxia*. *J Am Soc Nephrol*, 1992. **2**(8): p. 1338-44.
232. Barutta, F., et al., *Novel biomarkers of diabetic kidney disease: current status and potential clinical application*. *Acta Diabetol*, 2021. **58**(7): p. 819-830.
233. Kwan, B., et al., *Metabolomic Markers of Kidney Function Decline in Patients With Diabetes: Evidence From the Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study*. *Am J Kidney Dis*, 2020. **76**(4): p. 511-520.

234. Forbes, J.M. and D.R. Thorburn, *Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease*. Nature Reviews Nephrology, 2018. **14**(5): p. 291-312.
235. Taylor, L. and N.P. Curthoys, *Glutamine metabolism: Role in acid-base balance\**. Biochem Mol Biol Educ, 2004. **32**(5): p. 291-304.
236. Kim, N.H., et al., *Metabolic changes in urine and serum during progression of diabetic kidney disease in a mouse model*. Arch Biochem Biophys, 2018. **646**: p. 90-97.
237. Wei, T., et al., *Metabonomic analysis of potential biomarkers and drug targets involved in diabetic nephropathy mice*. Scientific Reports, 2015. **5**(1): p. 11998.
238. Mutter, S., et al., *Urinary metabolite profiling and risk of progression of diabetic nephropathy in 2670 individuals with type 1 diabetes*. Diabetologia, 2022. **65**(1): p. 140-149.
239. Phisitkul, S., et al., *Amelioration of metabolic acidosis in patients with low GFR reduced kidney endothelin production and kidney injury, and better preserved GFR*. Kidney Int, 2010. **77**(7): p. 617-23.
240. Zhao, L., et al., *(1)H-NMR-based metabonomic analysis of metabolic profiling in diabetic nephropathy rats induced by streptozotocin*. Am J Physiol Renal Physiol, 2011. **300**(4): p. F947-56.
241. Guasch-Ferre, M., et al., *Metabolomics in Prediabetes and Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis*. Diabetes Care, 2016. **39**(5): p. 833-46.
242. Newgard, C.B., 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): p. 311-26.
243. Butte, N.F., et al., *Protein metabolism in insulin-treated gestational diabetes*. Diabetes Care, 1999. **22**(5): p. 806-11.
244. Metzger, B.E., et al., *Effects of gestational diabetes on diurnal profiles of plasma glucose, lipids, and individual amino acids*. Diabetes Care, 1980. **3**(3): p. 402-9.
245. Cetin, I., 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): p. 610-7.
246. Dudzik, D., 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**: p. 90-98.
247. Mock, D.M., 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): p. 1925-30.
248. van Hove, J.L., et al., *3-Hydroxyisovalerylcarnitine in 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency*. J Inherit Metab Dis, 1995. **18**(5): p. 592-601.
249. Nilsen, M.S., 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): p. 1903-1916.
250. Andersson-Hall, U., et al., *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**: p. 4207067.
251. Menni, C., et al., *Biomarkers for type 2 diabetes and impaired fasting glucose using a nontargeted metabolomics approach*. Diabetes, 2013. **62**(12): p. 4270-6.
252. Hernandez-Alvarez, M.I., 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): p. 13850.

253. Butte, N.F., *Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus*. Am J Clin Nutr, 2000. **71**(5 Suppl): p. 1256S-61S.
254. Dudzik, D., et al., *Metabolic fingerprint of Gestational Diabetes Mellitus*. J Proteomics, 2014. **103**: p. 57-71.
255. Montelongo, A., et al., *Longitudinal study of plasma lipoproteins and hormones during pregnancy in normal and diabetic women*. Diabetes, 1992. **41**(12): p. 1651-9.
256. Zachou, K., et al., *Review article: autoimmune hepatitis -- current management and challenges*. Aliment Pharmacol Ther, 2013. **38**(8): p. 887-913.
257. Manns, M.P., et al., *Diagnosis and management of autoimmune hepatitis*. Hepatology, 2010. **51**(6): p. 2193-213.
258. Muratori, L. and M.S. Longhi, *The interplay between regulatory and effector T cells in autoimmune hepatitis: Implications for innovative treatment strategies*. J Autoimmun, 2013. **46**: p. 74-80.
259. Hennes, E.M., et al., *Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis*. Hepatology, 2008. **48**(1): p. 169-76.
260. Gatselis, N.K., et al., *Comparison of simplified score with the revised original score for the diagnosis of autoimmune hepatitis: a new or a complementary diagnostic score?* Dig Liver Dis, 2010. **42**(11): p. 807-12.
261. Tanaka, N., et al., *Disruption of phospholipid and bile acid homeostasis in mice with nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology, 2012. **56**(1): p. 118-29.
262. Nguyen, D.L., B.D. Juran, and K.N. Lazaridis, *Primary biliary cirrhosis*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2010. **24**(5): p. 647-54.
263. Selmi, C., I.R. Mackay, and M.E. Gershwin, *The autoimmunity of primary biliary cirrhosis and the clonal selection theory*. Immunol Cell Biol, 2011. **89**(1): p. 70-80.
264. Karlsen, T.H., E. Schrumpf, and K.M. Boberg, *Primary sclerosing cholangitis*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2010. **24**(5): p. 655-66.
265. Boonstra, K., et al., *Primary sclerosing cholangitis is associated with a distinct phenotype of inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2012. **18**(12): p. 2270-6.
266. Changani, K.K., et al., *Evidence for altered hepatic gluconeogenesis in patients with cirrhosis using in vivo 31-phosphorus magnetic resonance spectroscopy*. Gut, 2001. **49**(4): p. 557-64.
267. Viegas, C.M., et al., *Evidence that 3-hydroxyisobutyric acid inhibits key enzymes of energy metabolism in cerebral cortex of young rats*. Int J Dev Neurosci, 2008. **26**(3-4): p. 293-9.
268. Satapati, S., et al., *Elevated TCA cycle function in the pathology of diet-induced hepatic insulin resistance and fatty liver*. J Lipid Res, 2012. **53**(6): p. 1080-92.
269. Limon, I.D., et al., *Disturbance of the Glutamate-Glutamine Cycle, Secondary to Hepatic Damage, Compromises Memory Function*. Front Neurosci, 2021. **15**: p. 578922.
270. Long, Y., et al., *Metabolomics changes in a rat model of obstructive jaundice: mapping to metabolism of amino acids, carbohydrates and lipids as well as oxidative stress*. J Clin Biochem Nutr, 2015. **57**(1): p. 50-9.
271. Fregeau, D.R., et al., *Inhibition of alpha-ketoglutarate dehydrogenase activity by a distinct population of autoantibodies recognizing dihydrolipoamide succinyltransferase in primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 1990. **11**(6): p. 975-81.

272. Fregeau, D.R., et al., *Primary biliary cirrhosis. Inhibition of pyruvate dehydrogenase complex activity by autoantibodies specific for E1 alpha, a non-lipoic acid containing mitochondrial enzyme*. J Immunol, 1990. **144**(5): p. 1671-6.
273. Noguchi, Y., et al., *Ketogenic essential amino acids modulate lipid synthetic pathways and prevent hepatic steatosis in mice*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12057.
274. Landaas, S. and C. Jakobs, *The occurrence of 2-hydroxyisovaleric acid in patients with lactic acidosis and ketoacidosis*. Clin Chim Acta, 1977. **78**(3): p. 489-93.
275. Beyoglu, D. and J.R. Idle, *The metabolomic window into hepatobiliary disease*. J Hepatol, 2013. **59**(4): p. 842-58.
276. Ikeda, K., et al., *Slc3a2 Mediates Branched-Chain Amino-Acid-Dependent Maintenance of Regulatory T Cells*. Cell Rep, 2017. **21**(7): p. 1824-1838.
277. Cimen, H., et al., *Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria*. Biochemistry, 2010. **49**(2): p. 304-11.
278. Zhang, J., et al., *Mitochondrial Sirtuin 3: New emerging biological function and therapeutic target*. Theranostics, 2020. **10**(18): p. 8315-8342.
279. Sarfaraz, M.O., et al., *A quantitative metabolomics profiling approach for the noninvasive assessment of liver histology in patients with chronic hepatitis C*. Clin Transl Med, 2016. **5**(1): p. 33.
280. Hu, J., et al., *Ursodeoxycholic acid ameliorates hepatic lipid metabolism in LO2 cells by regulating the AKT/mTOR/SREBP-1 signaling pathway*. World J Gastroenterol, 2019. **25**(12): p. 1492-1501.
281. Pemberton, P.W., et al., *Ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis improves glutathione status but fails to reduce lipid peroxidation*. Redox Report, 2006. **11**(3): p. 117-123.
282. Krahenbuhl, S., et al., *Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria*. Hepatology, 1994. **19**(2): p. 471-9.