



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ «ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΗΣ ΣΤΗΝ ΠΡΩΙΜΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΒΗΤΙΚΗΣ
ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑΣ**

ΓΑΡΟΥΦΗΣ ΜΙΧΑΗΛ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΜΠΑΪΡΑΚΤΑΡΗ ΕΛΕΝΗ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΚΛΙΝΙΚΗΣ
ΧΗΜΕΙΑΣ

ΙΟΥΛΙΟΣ 2025

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ «ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ»
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΗΣ ΣΤΗΝ ΠΡΩΙΜΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΒΗΤΙΚΗΣ
ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑΣ**

ΓΑΡΟΥΦΗΣ ΜΙΧΑΗΛ
ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΜΠΑΪΡΑΚΤΑΡΗ ΕΛΕΝΗ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΚΛΙΝΙΚΗΣ
ΧΗΜΕΙΑΣ

ΙΟΥΛΙΟΣ 2025

«Η έγκριση της Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν αποτελεί αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

ΓΑΡΟΥΦΗΣ ΜΙΧΑΗΛ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΗΣ ΣΤΗΝ ΠΡΩΙΜΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΒΗΤΙΚΗΣ
ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑΣ**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**ΜΠΑΪΡΑΚΤΑΡΗ ΕΛΕΝΗ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ
ΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ (ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ)**

**ΤΣΙΜΙΧΟΔΗΜΟΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ,
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΤΙΓΚΑΣ ΣΤΥΛΙΑΝΟΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΑΣ,
ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ, ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ,
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο «Ο ρόλος της μεταβολομικής στην πρόωμη διάγνωση της Διαβητικής Νεφροπάθειας» εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κλινικής Χημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες».

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την επιβλέπουσα Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας, κυρία Μπαϊρακτάρη Ελένη για την εμπιστοσύνη, τη στήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας. Από τα φοιτητικά μου χρόνια αποτέλεσε πηγή έμπνευσης καθώς μέσα από τον ενθουσιασμό της και τη διδασκαλία της μου γνώρισε τον κόσμο της μεταβολομικής, αλλάζοντας την οπτική μου πάνω στην ιατρική και καθορίζοντας σημαντικά την ερευνητική μου κατεύθυνση. Ευχαριστώ επίσης τα μέλη της τριμελούς επιτροπής κύριο Τσιμιχόδημο Βασίλειο, Καθηγητή Παθολογίας και κύριο Τίγκα Στυλιανό, Αναπληρωτή Καθηγητή Ενδοκρινολογίας για την παρουσία και τις παρατηρήσεις τους στη διαδικασία αξιολόγησης της εργασίας.

Ένα μεγάλο «ευχαριστώ» στην κυρία Γκούβα Χαρίκλεια, Διευθύντρια της Μονάδας Τεχνητού Νεφρού του Γενικού Νοσοκομείου Άρτας, χωρίς την υπομονή και τη συγκαταβατικότητα της οποίας η φοίτησή μου στο παρόν Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών θα ήταν αδύνατη. Την ευχαριστώ επίσης για τις πολύτιμες συμβουλές της στο θέμα της Χρόνιας Νεφρικής Νόσου όπως επίσης και για την αγάπη της σε καθετί νέο.

Τέλος, οφείλω να εκφράσω την απέραντη ευγνωμοσύνη στους γονείς μου, Γεώργιο και Αφροδίτη για την υπομονή τους, τη συνεχή υποστήριξη και συμπαράστασή τους σε όλες τις δυσκολίες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ	ΣΕΛΙΔΑ
I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	2
1.Εισαγωγή	
2. Σακχαρώδης Διαβήτης	5
2.1 Ορισμός και ταξινόμηση	
2.2 Επιπλοκές ΣΔ	6
3. Διαβητική Νεφροπάθεια	7
3.1 Ορισμός	7
3.2 Επιδημιολογία	8
3.3 Διάγνωση	10
3.4 Φαινότυποι ΔΝ	11
3.5 Περιορισμοί υπαρχόντων βιοδεικτών	13
3.5.1 Εκτιμώμενος ρυθμός σπειραματικής διήθησης	13
3.5.2 Αλβουμινουρία	18
3.6 Ιστολογία	19
3.7 Παθολογική Ανατομική	24
3.8 Παθοφυσιολογία	26
3.8.1 Υπεργλυκαιμία	26
3.8.2 Αρτηριακή Υπέρταση	28
3.8.3 Λιποτοξικότητα	29
3.8.4 Υποξία	30
3.8.5 Σύνθεση ATP	31
3.8.6 Ποδοκυτταρική βλάβη	32
3.8.7 Αλβουμινουρία	35
3.8.8 Φλεγμονή	35
3.8.9 Ίνωση	37
3.8.10 Οξειδωτικό στρες	39
3.8.11 Αυτοφαγία	53
3.8.12 Κυτταρική γήρανση	54
4. Βιοδείκτες	56
5. Μεταβολομική	57
5.1 Αναλυτικές τεχνικές στη μεταβολομική	62

5.2 Στατιστική ανάλυση	64
5.2.1 Ανάλυση κύριων συνιστωσών	64
5.2.2 Προβολή μερικών ελαχίστων τετραγώνων σε λανθάνουσες τιμές	66
5.3 Αξιολόγηση εγκυρότητας πολυπαραγοντικής ανάλυσης	67
5.3.1 Διασταυρούμενη επικύρωση	67
5.3.2 Ανάλυση μετάθεσης	68
5.4 Ανάλυση μεταβολικών οδών	68
II.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	69
6. Υλικά/Μέθοδος	69
7. Μελέτες μεταβιομικής στη ΔNN	69
8. Συζήτηση	94
9. Συμπεράσματα	99
10. Περίληψη στην ελληνική	99
11. Περίληψη στην αγγλική	100
III. ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	101
IV. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	106

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η διαβητική νεφροπάθεια (ΔΝ) αποτελεί μια από τις κύριες μικροαγγειακές επιπλοκές του σακχαρώδους διαβήτη (ΣΔ) και ένα κρίσιμης σημασίας ζήτημα δημόσιας υγείας. Είναι το κύριο αίτιο νεφρικής νόσου τελικού σταδίου παγκοσμίως, με τον επιπολασμό της να παρουσιάζει σταθερή αύξηση τα τελευταία χρόνια παρά τις νέες θεραπευτικές επιλογές, οφειλόμενη στην αύξηση του επιπολασμού του σακχαρώδους διαβήτη, τόσο στις αναπτυγμένες, όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες (Podgorski, et al, 2019; Tofte, et al, 2020; Lash, et al, 2022). Στις τελευταίες, λόγω των ελάχιστων παροχών αντιμετώπισης των ασθενών αυτών κυρίως όσον αφορά τη θεραπεία νεφρικής υποκατάστασης και τη μεταμόσχευση, μεγιστοποιείται το ζήτημα, καθιστώντας επιτακτική την ανάπτυξη οικονομικά αποδοτικών στρατηγικών που θα επιτρέπουν την πρόωπη διάγνωση της ΔΝ (Satirapoj, et al, 2014). Αρχικά, περιεγράφηκε από τον Mogensen πριν 40 χρόνια ως η προοδευτική νεφρική νόσος που εμφανίζεται σε ασθενείς που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη, η έναρξη της οποίας σηματοδοτείται από την απώλεια μικρών ποσοτήτων αλβουμίνης στα ούρα (Mogesen, et al, 1983). Η ΔΝ προσβάλλει το 35% των ασθενών με ΣΔ τύπου 1 (ΣΔΤ1) περίπου 10 έτη μετά τη διάγνωσή του, ενώ σε αυτούς που πάσχουν από ΣΔ τύπου 2 (ΣΔΤ2) μπορεί να είναι ήδη παρούσα κατά τη διάγνωσή του (Lovrencic, et al, 2023). Ο όρος «διαβητική νεφροπάθεια» έχει πλέον αντικατασταθεί από τον όρο «Διαβητική Νεφρική Νόσος» (ΔΝΝ), ενώ η διαβητική σπειραματοπάθεια αποτελεί έναν παθολογοανατομικό ορισμό ο οποίος περιλαμβάνει τις ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις που λαμβάνουν χώρα στο νεφρό, ως αποτέλεσμα του σακχαρώδους διαβήτη. (Forbes, et al, 2018; Oshima, et al, 2021). Στην κλινική πράξη, η ΔΝΝ ορίζεται ως η παρουσία αλβουμινουρίας σε τουλάχιστον 2 από 3 δείγματα ούρων που συλλέχθηκαν σε διάστημα 3 έως 6 μηνών, και/ή μειωμένο ρυθμό σπειραματικής διήθησης (Glomerular Filtration Rate- GFR) σε ασθενείς που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη, εν τη απουσία άλλων αιτιών νεφρικής νόσου (Lovrencic, et al, 2023). Αν και οι μικροαγγειακές επιπλοκές του σακχαρώδους διαβήτη αποτελούν το κύριο αίτιο θνητότητας των διαβητικών ασθενών, οι μικροαγγειακές επιπλοκές, όπως η διαβητική νεφροπάθεια συνεισφέρουν σημαντικά στη νοσηρότητα ενώ συγκριτικά με τις υπόλοιπες μικροαγγειακές επιπλοκές, αποτελεί αυτή που

παρουσιάζει την ισχυρότερη συσχέτιση με τη θνητότητα καθώς συνοδεύεται από αθροιστικό 10ετή κίνδυνο θνητότητας 31,1 %, έχοντας τα υψηλότερα ποσοστά θανάτου (Filla, et al, 2016; Forbes, et al, 2018; Yao, et al, 2022). Σύμφωνα με τα δεδομένα νεκροτομικών μελετών, οι ιστοπαθολογικές βλάβες της ΔΝ αρχίζουν στο νεφρό πριν την εμφάνιση αλβουμινουρίας ή μείωσης του GFR ενώ το γεγονός ότι η χρόνια νεφρική νόσος (XNN) αποτελεί μια κλινικά σιωπηρή οντότητα, παραμένοντας ασυμπτωματική μέχρι τα προχωρημένα στάδιά της, δυσχεραίνει την πρόωπη διάγνωσή της. Σύμφωνα με τον υπάρχοντα ορισμό της ΔΝΝ, κατά τη διάγνωση της νόσου, οι ασθενείς βρίσκονται ήδη στο στάδιο III βάσει της ταξινόμησης της XNN από τον Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) καθιστώντας τον εκτιμώμενο ρυθμό σπειραματικής διήθησης (estimated GFR- e GFR) αναξιόπιστο βιοδείκτη της νεφρικής λειτουργίας, ειδικά στα αρχικά στάδια της νόσου (Oshima, et al, 2021; Mizdrak, et al, 2022; Lucio-Gutierrez, et al, 2022). Επιπλέον, η διαστρωμάτωση κινδύνου εξέλιξης της ΔΝΝ με βάση την αλβουμινουρία και τον eGFR, αποδεικνύεται προβληματική με την εξέλιξη της νόσου να παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια. Η ανταπόκριση των ασθενών στις υπάρχουσες, χορηγούμενες νεφροπροστατευτικές θεραπείες ποικίλει ενώ ακόμα και η βέλτιστη κλινική διαχείριση αυτών με βάση τις υπάρχουσες κατευθυντήριες οδηγίες, στην καλύτερη περίπτωση σταθεροποιεί χωρίς να βελτιώνει τη νεφρική λειτουργία, διατηρώντας τον καρδιονεφρικό κίνδυνο σε μη αποδεκτά, υψηλά επίπεδα. Οι παρατηρήσεις αυτές, καταδεικνύουν ένα θεραπευτικό κενό, το οποίο εν μέρη οφείλεται στην ελλιπή κατανόηση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών της νόσου, αλλά και την ετερογένειά της τόσο όσον αφορά τις κλινικές της εκδηλώσεις, όσο και τις ιστοπαθολογικές βλάβες και το ρυθμό εξέλιξής της (Forbes, et al, 2018; Sugahara, et al, 2021; Provenzano, et al, 2022). Στα αίτια της ανωτέρω ανεπάρκειας που εμφανίζουν οι θεραπευτικές παρεμβάσεις, έρχεται να προστεθεί και η διαφορά στην ανταπόκριση που παρουσιάζουν οι ασθενείς σε αυτές. (Provenzano, et al, 2022). Τα δεδομένα των μελετών συγκλίνουν στο ότι η πρόωπη διάγνωση και η κατάλληλη θεραπευτική παρέμβαση αποτελούν τα δύο αποτελεσματικότερα μέτρα παρεμπόδισης της επιδείνωσης της νεφρικής λειτουργίας και καθυστέρησης της εμφάνισης ανεπιθύμητων συμβαμάτων (Mizdrak, et al, 2022). Η πρόωπη διάγνωση της ΔΝΝ θα επιτρέψει την εφαρμογή θεραπευτικών μέσων που επιβραδύνουν την εξέλιξή της και την προστασία από την εμφάνιση των θανατηφόρων καρδιαγγειακών συμβαμάτων που τη συνοδεύουν, γεγονός μείζονος σημασίας καθώς οι ασθενείς αυτοί είναι εκτεθειμένοι σε αυξημένο κίνδυνο θνητότητας λόγω αυτών (οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου, αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, καρδιακή ανεπάρκεια,

περιφερική αγγειακή νόσος, αρρυθμίες) (Podgorski, et al, 2019; Provenzano, et al, 2022). Όπως γίνεται κατανοητό, μολονότι η πρόωμη διάγνωση και παρέμβαση είναι καίριας σημασίας στην βελτίωση της έκβασης και της αύξησης του προσδόκιμου ζωής των ασθενών που πάσχουν από ΔΝΝ, μειώνοντας έτσι το ανθρωπιστικό και οικονομικό φορτίο της νόσου, αυτή δεν επιτυγχάνεται με τους υπάρχοντες διαγνωστικούς βιοδείκτες, κάνοντας την ανακάλυψη νέων, ειδικών, ευαίσθητων, μη επεμβατικών, οικονομικά αποδοτικών βιοδεικτών ένα ενδιαφέρον πεδίο έρευνας που αποσκοπεί τόσο στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας της νόσου, όσο και στη βελτίωση της πρόγνωσης της (Podgorski, et al, 2019; Tofte, et al, 2020; Hussain, et al, 2021; Pan, et al, 2022; Mizdrak, et al, 2022).

Η μεταβολομική, δηλαδή η μελέτη των μεταβολιτών ενός οργανισμού σε ένα βιολογικό δείγμα, αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη ερευνητική μέθοδο για την ανακάλυψη βιοδεικτών που θα επιτρέψουν την πρόωμη και ακριβή διάγνωση της ΔΝΝ και κατά συνέπεια την έγκαιρη θεραπευτική παρέμβαση (Liu, et al, 2021). Τα μεταβολικά νοσήματα, όπως ο ΣΔ, μπορεί να προϋπάρχουν στον οργανισμό πολλά χρόνια πριν την κλινική τους εκδήλωση, με τη φαινοτυπική τους έκφραση, καθώς και την έκφραση των επιπλοκών τους, να περικλείει την περίπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ γενετικών, περιβαλλοντικών και άλλων, ειδικών για τον κάθε ιστό παραγόντων. Το γεγονός αυτό καθιστά τους μεταβολίτες τα πλέον αντιπροσωπευτικά μόρια επειδή ενσωματώνουν όλη την πληροφορία που προκύπτει από την αλληλεπίδραση των προαναφερθέντων παραγόντων (Sas, et al, 2015). Τα δεδομένα που προκύπτουν από τις μελέτες μεταβολομικής, αλλά και από λοιπές μελέτες που χρησιμοποιούν άλλες omics τεχνολογίες (genomics, proteomics) παρέχουν περισσότερες πληροφορίες πάνω στα μοριακά μονοπάτια της ΔΝΝ και αποτελούν δυνητική πηγή νέων προγνωστικών βιοδεικτών που θα επιτρέπουν την πρόωμη διάγνωση της ακόμα και σε ασθενείς που δεν έχουν εμφανίσει αλβουμινουρία ή έκπτωση του e GFR. Επίσης, αναμένεται να προβλέπουν κλινικά σημαντικά στοιχεία όπως είναι η εξέλιξη της νόσου από ήπια σε σοβαρή και η διαστρωμάτωση του καρδιαγγειακού κινδύνου (Satiropoj, et al, 2018; Podgorski, et al, 2019; Lash, et al, 2022; Provenzano, et al, 2022). Τέλος, ένας ιδανικός βιοδείκτης, πέραν της έγκαιρης διάγνωσης, θα επέτρεπε και την παρακολούθηση της απόκρισης των ασθενών στη θεραπεία μέσω της μεταβολής των τιμών του κατά την εξέλιξή της. Η ενσωμάτωση νέων βιοδεικτών, αντιπροσωπευτικών της πολυπλοκότητας της ΔΝΝ, θα παράσχει την δυνατότητα καλύτερου σχεδιασμού κλινικών μελετών, διακρίνοντας με μεγαλύτερη επιτυχία ασθενείς υψηλού κινδύνου και αξιολογώντας αποτελεσματικότερα την απόκρισή τους στη

χορηγούμενη θεραπεία, προσφέροντας κατά αυτό τον τρόπο τη δυνατότητα εξατομίκευσης της αγωγής και κάνοντας σημαντικά βήματα προς την εξατομικευμένη ιατρική ακριβείας (Perco, et al, 2018; Tofte, et al, 2020).

2. ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί ένα σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από την διαταραχή στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και των λιπών λόγω έλλειψης ινσουλίνης. Η έλλειψη της ινσουλίνης μπορεί να είναι πλήρης, μερική ή σχετική. Ως σχετική, χαρακτηρίζεται το φαινόμενο κατά το οποίο παρά τα αυξημένα επίπεδα ινσουλίνης στο αίμα, αυτή αδυνατεί να καλύψει τις μεταβολικές ανάγκες λόγω παρεμπόδισης της δράσης της στους περιφερικούς ιστούς (αντίσταση στην ινσουλίνη). Το υπόστρωμα του ΣΔ είναι ετερογενές και πολυπαραγοντικό με κοινό χαρακτηριστικό γνώρισμα να είναι η υπεργλυκαιμία, που αποτελεί την κύρια έκφραση της διαταραχής του μεταβολισμού στο ΣΔ (Κατευθυντήριες Οδηγίες ΕΔΕ, 2024). Η κατανόηση της ετερογένειας αυτής, θα συμβάλει στην εξατομικευμένη προσέγγιση και την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών μέσων (Malandrino, et al, 2011). Αιτιοπαθογενετικά, ο ΣΔ ταξινομείται σε:

- ΣΔ τύπου 1: οφείλεται συνήθως σε αυτοάνοση καταστροφή των β κυττάρων του παγκρέατος και στην πλειονότητα των περιπτώσεων οδηγεί σε πλήρη έλλειψη ινσουλίνης. Είναι συχνότερος στην παιδική και την εφηβική ηλικία αλλά μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία και αφορά το 5-10% των ασθενών με ΣΔ. Η υπάρχουσα γενετική προδιάθεση για τη νόσο, η οποία κληρονομείται ως επιρρέπεια προς την εμφάνισή της, σε συνδυασμό με κάποιο ερέθισμα, το οποίο δεν έχει ταυτοποιηθεί ακόμα, πυροδοτεί την έναρξη της αυτοανοσίας και κατά συνέπεια της νόσου.
- ΣΔ τύπου 2: οφείλεται σε προοδευτική μείωση της επαρκούς ποσότητας έκκρισης της ινσουλίνης από τα β κύτταρα του παγκρέατος και περιλαμβάνει όλο το φάσμα, από τη σχετικά μικρή έλλειψη ινσουλίνης σε συνδυασμό με αντίσταση στην ινσουλίνη, έως τη σημαντική μείωση της έκκρισης της ινσουλίνης, με μικρότερη αντίσταση. Η παθογένεσή του είναι ετερογενής και σε αυτή συμμετέχουν πολλαπλά συστήματα του οργανισμού,

όπως το γαστρεντερικό μέσω της ανεπαρκούς δράσης των ινκρετινών, του νεφρού μέσω της αύξησης της επαναρρόφησης της γλυκόζης από τα νεφρικά σπειράματα, ο εγκέφαλος μέσω νευροδιαβιβαστών που οδηγούν σε αύξηση της όρεξης και μείωσης του αισθήματος κορεσμού, τα κύτταρα του παγκρέατος μέσω αύξησης της έκκρισης και της δράσης της γλυκαγόνης και οι διαταραχές στο μικροβίωμα του εντέρου.

- Διαβήτη της κύησης
- Ειδικοί τύποι ΣΔ: προκαλούμενος από γενετικές διαταραχές της λειτουργίας των β κυττάρων του παγκρέατος, από γενετικές διαταραχές που αφορούν τη δράση της ινσουλίνης, από ενδοκρινοπάθειες, λοιμώξεις, νόσους του εξωκρινούς παγκρέατος, από φάρμακα ή χημικές ουσίες και γενετικά σύνδρομα που συνδυάζονται με ΣΔ (Κατευθυντήριες Οδηγίες ΕΔΕ, 2024).

Αν και η ταξινόμηση του ΣΔ είναι σημαντική για τον καθορισμό της θεραπευτικής αντιμετώπισης, κάποιοι ασθενείς δεν μπορούν να ταξινομηθούν με σιγουριά ως ΣΔΤ1 ή ΣΔΤ2 τη στιγμή της διάγνωσης, καθώς η κλασική θεώρηση ότι ο ΣΔΤ2 εμφανίζεται μόνο στους ενήλικες και ο ΣΔΤ1 μόνο στα παιδιά, δεν είναι πλέον ακριβής μιας και τα δύο νοσήματα μπορούν να εμφανιστούν σε οποιαδήποτε ηλικία. Είναι σαφές ότι οι επαγγελματίες υγείας που εμπλέκονται στην αντιμετώπιση της νόσου, οφείλουν να συνειδητοποιήσουν ότι η ταξινόμηση του ΣΔ κατά τη διάγνωση δεν είναι πάντοτε σαφής και μια εσφαλμένη ταξινόμηση μπορεί να συμβεί (Standards of Care in Diabetes, American Diabetes Association, 2023).

2.2 ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ

Οι επιπλοκές του ΣΔ διακρίνονται στις οξείες, στις οποίες περιλαμβάνονται η διαβητική κετοξέωση και η υπεργλυκαιμική υπερωσμωτική μη κετοξεωτική κατάσταση και στις χρόνιες (Κατευθυντήριες Οδηγίες ΕΔΕ, 2024). Η εγκατάσταση της υπεργλυκαιμίας, συνοδεύεται από αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης χρόνιων επιπλοκών, ανεξάρτητα από τον τύπο του ΣΔ, με το ρυθμό εξέλιξης ωστόσο να παρουσιάζει διαφορές (Standards of Care in Diabetes, American Diabetes Association, 2023). Οι χρόνιες επιπλοκές του ΣΔ διακρίνονται περαιτέρω σε μικροαγγειοπαθητικές, στις οποίες περιλαμβάνονται η νεφροπάθεια, η αμφιβληστροειδοπάθεια και η νευροπάθεια και στις μακροαγγειοπαθητικές, οι οποίες περιλαμβάνουν τη στεφανιαία νόσο, το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, την περιφερική αγγειακή νόσο και αναφέρονται με το γενικό όρο

Καρδιαγγειακή Νόσος (ΚΑΝ). Βάση αποτελεσμάτων επιδημιολογικών μελετών, η συχνότητα εμφάνισης των χρόνιων επιπλοκών του ΣΔ συσχετίζεται με τα επίπεδα της γλυκαιμίας, όπως αυτά εκφράζονται με τις τιμές της HbA1c. Όσον αφορά τις μικροαγγειοπαθητικές επιπλοκές του ΣΔ, η συσχέτιση φαίνεται να εμφανίζεται ως καμπύλη με μορφή υπερβολής, με περιπτώσεις μικροαγγειοπάθειας να εμφανίζονται ακόμα και σε μικρές αυξήσεις της HbA1c άνω του φυσιολογικού, ενώ παρουσιάζει εκθετική αύξηση σε τιμές HbA1c άνω του 7%. (Κατευθυντήριες Οδηγίες ΕΔΕ,2024)

3. ΔΙΑΒΗΤΙΚΗ ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑ

3.1 ΟΡΙΣΜΟΣ

Το 2007, οι κατευθυντήριες οδηγίες που δημοσιεύτηκαν από το Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI) όρισαν ως Διαβητική Νεφρική Νόσο (ΔΝΝ) την διάγνωση νεφρικής νόσου σε ασθενείς που πάσχουν από ΣΔ, εν τη απουσία ενδείξεων παρουσίας άλλης νεφρικής νόσου. Ως όρος, περιγράφει την παρουσία χρόνιας νεφρικής νόσου που χαρακτηρίζεται από την παρουσία αλβουμινουρίας ή/και την παρουσία eGFR <60 ml/min/1.73 m², για χρονικό διάστημα 3 τουλάχιστον μηνών, σε ασθενείς που πάσχουν από ΣΔ και έρχεται να αντικαταστήσει τον όρο διαβητική νεφροπάθεια, χρησιμοποιώντας τον όρο διαβητική σπειραματοπάθεια για την αποδεδειγμένη με νεφρική βιοψία παρουσία νεφρικής νόσου που οφείλεται σε ΣΔ (Tofte, et al, 2020; Sugahara, et al, 2021). Ο όρος Διαβητική Νεφρική Νόσος μπορεί να θεωρηθεί ως ορισμός «ομπρέλα» καθώς δεδομένα από μελέτες όπου αναλύθηκαν δείγματα βιοψιών νεφρού ασθενών με ΣΔ και ΧΝΝ, αποδεικνύουν ότι συχνά οι ασθενείς αυτοί δεν πάσχουν από διαβητική σπειραματοπάθεια, αλλά είτε από άλλα νεφρικά νοσήματα είτε από μεικτές μορφές, κατά τις οποίες συνυπάρχουν η διαβητική σπειραματοπάθεια με άλλες μορφές νεφρικής νόσου. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι τα δεδομένα των μελετών αυτών, πιθανώς να υπερεκτιμούν σε σημαντικό βαθμό την παρουσία νεφρικής νόσου άλλης αιτιολογίας καθώς η διενέργεια νεφρικής βιοψίας σε ασθενείς με ΣΔ και ΧΝΝ δεν είναι κοινή πρακτική και ενδείκνυται σε περιπτώσεις όπου η υποψία της παρουσίας νεφρικής νόσου άλλης αιτιολογίας, πέραν του ΣΔ, είναι υψηλή (Barutta, et al, 2021).

3.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Ο ΣΔ αποτελεί ένα μείζον υγειονομικό ζήτημα και μια σύγχρονη πανδημία, με τον αριθμό των ατόμων που έπασχαν από τη νόσο το 2021 να καταγράφεται στα 537 εκατομμύρια, αριθμός που αναμένεται να εκτοξευθεί στα 783 εκατομμύρια το 2045, ενώ προβλέπεται ότι πάνω από 1 στους 3 ανθρώπους θα εμφανίσει ΣΔ . Η προβλεπόμενη αυτή αύξηση, οφείλεται στην έκρηξη που παρουσιάζει η παχυσαρκία λόγω του δυτικού τρόπου ζωής αλλά και στην αύξηση του προσδόκιμου ζωής των διαβητικών ασθενών μετά την εμφάνιση νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Παγκοσμίως, η επιδημιολογία του ΣΔΤ2 παρουσιάζει αλλαγές, μετατρέποντάς τον από μια χρόνια νόσο μέσης και μεγαλύτερης ηλικίας, σε μια ασθένεια που όλο και συχνότερα προσβάλλει νέους ενήλικες, εφήβους και παιδιά. Η θνητότητα των ασθενών που πάσχουν από ΣΔΤ2 είναι 2 φορές μεγαλύτερη συγκριτικά με αυτή του υγιούς πληθυσμού, ενώ το προσδόκιμό τους είναι 6-7 έτη μικρότερο από αυτό του υγιούς πληθυσμού (Chen, et al, 2020; Hoogeveen, et al, 2022). Από τους ασθενείς που πάσχουν από ΣΔΤ2, το 20-50% αναπτύσσει ΔΝΝ, ενώ στο ΣΔΤ1 εμφανίζεται στο 1/3 των ασθενών. Το γεγονός αυτό πιθανώς να οφείλεται στη μικρότερη ηλικία των ασθενών που πάσχουν από ΣΔΤ1 και τις λιγότερες συννοσηρότητες που εμφανίζουν (Perkins, et al, 2019). Η ΔΝΝ, αποτελεί τη συχνότερη μικροαγγειοπαθητική επιπλοκή του ΣΔ, ενώ ασθενείς με ΣΔ έχουν διπλάσιο κίνδυνο εμφάνισης ΧΝΝ συγκριτικά με μη διαβητικούς (Hoogeveen, et al, 2022). Το εύρος αυτό της συχνότητας, οφείλεται αφ' ενός σε εθνικές διαφορές με τη ΧΝΝ να είναι λιγότερο συχνή στον Καυκάσιο πληθυσμό συγκριτικά με τους Ασιάτες, αφ' ετέρου στις διαφορές της αποτελεσματικότητας των συστημάτων υγείας. Στις αναπτυσσόμενες χώρες η επίγνωση της ΧΝΝ είναι χαμηλότερη λόγω των προβληματικών παροχών και του ελλιπούς screening, ενώ και η επιβίωση των ασθενών με ΧΝΝ είναι επίσης χαμηλότερη λόγω της μη διαθεσιμότητας θεραπειών υποκατάστασης νεφρικής λειτουργίας ή μεταμόσχευσης. Άλλοι παράγοντες που συμβάλουν στο αυξημένο εύρος της συχνότητας είναι οι διαφορετικές εξισώσεις που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό του eGFR και η συχνότητα μέτρησης του, η μέθοδος προσδιορισμού της αλβουμινουρίας και η συχνότητα μέτρησης της όπως επίσης και ο σχεδιασμός της εκάστοτε μελέτης (Koye, et al, 2018; Κατευθυντήριες Οδηγίες ΕΔΕ, 2024). Στην Ελλάδα, σύμφωνα με τη μελέτη REDIT-2-DIAG της Ελληνικής Διαβητολογικής Εταιρείας, η συχνότητα

της ΔΝΝ στο ΣΔΤ2 υπολογίζεται στο 45%. Στο ΣΔΤ1, η συχνότητα είναι σχετικά μικρότερη και υπολογίζεται στο 31% (Κατευθυντήριες Οδηγίες ΕΔΕ, 2024). Ο επιπολασμός της ΧΝΝ εμφανίζει παγκοσμίως αύξηση, παρά την εισαγωγή νεφροπροστατευτικών θεραπειών στην αντιμετώπιση του ΣΔ, πιθανώς λόγω της αύξησης της επίπτωσης τόσο του ΣΔΤ1 όσο και του ΣΔΤ2 παγκόσμια αλλά και λόγω της αύξησης του προσδόκιμου ζωής των διαβητικών ασθενών (Hoogeveen, et al, 2022; Huang, et al, 2022). Αν και η συνεισφορά του ΣΔ στην εμφάνιση της ΧΝΝ δε μπορεί να υπολογιστεί με ακρίβεια, λόγω συνυπαρχόντων παραγόντων όπως η αρτηριακή υπέρταση, η παχυσαρκία και η σπειραματική αθηροσκλήρυνση που συνεισφέρουν στην εμφάνιση της ΧΝΝ, ο επιπολασμός της ΧΝΝ στην Ευρώπη είναι 2-5 φορές μεγαλύτερος σε ασθενείς που πάσχουν από ΣΔ συγκριτικά με μη διαβητικούς ασθενείς. Παγκοσμίως, το ποσοστό επίγνωσης της παρουσίας ΧΝΝ στο γενικό πληθυσμό που πάσχει είναι πολύ χαμηλό και υπολογίζεται σε μικρότερο του 10%, υποδεικνύοντας ένα σημαντικό κενό στην έγκαιρη διάγνωσή της, δυσχεραίνοντας ακόμα περισσότερο την αντιμετώπισή της (Koye, et al, 2018; Lovrencic, et al, 2023). Οι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση ΔΝΝ διακρίνονται σε τροποποιήσιμους και μη τροποποιήσιμους. Στους μη τροποποιήσιμους ανήκουν οι γενετικοί προδιαθεσικοί παράγοντες, το ανδρικό φύλο, η μεγαλύτερη ηλικία, η εθνικότητα, η μεγαλύτερη διάρκεια ΣΔ (5-15 έτη) και το οικογενειακό ιστορικό ΣΔ ή ΔΝΝ. Στους τροποποιήσιμους παράγοντες κινδύνου ανήκουν η παχυσαρκία, το μεταβολικό σύνδρομο, η κακή γλυκαιμική ρύθμιση, η υπέρταση, η δυσλιπιδαιμία, η υψηλή πρόσληψη αλάτος, το κάπνισμα, η οξεία νεφρική βλάβη και ο καθιστικός τρόπος ζωής. Η ΔΝΝ αποτελεί το κύριο αίτιο ΧΝΝ και τελικού σταδίου νεφρικής νόσου καθώς σε αυτή αποδίδεται περίπου το 50% των περιπτώσεων, με κάποιες μελέτες να δείχνουν πως το 30-50% των ασθενών με τελικού σταδίου νεφρική νόσο πάσχει από ΔΝΝ (Hoogeveen, et al, 2022; Huang, et al, 2022). Οι ασθενείς με ΣΔ έχουν δεκαπλάσιο κίνδυνο μετάβασης σε τελικού σταδίου νεφρική νόσο συγκριτικά με μη διαβητικούς, από αυτούς τους ασθενείς όμως, περιορισμένος αριθμός θα μπει σε θεραπεία νεφρικής υποκατάστασης καθώς το 78% των ασθενών ζει σε χώρες χαμηλού και μέσου εισοδήματος, όπου οι παροχές και η πρόσβαση σε θεραπεία νεφρικής υποκατάστασης είναι περιορισμένες. Επιπλέον, οι ασθενείς που πάσχουν από ΔΝΝ εμφανίζουν 20-40 φορές υψηλότερη καρδιαγγειακή θνησιμότητα και νοσηρότητα συγκριτικά με τους διαβητικούς που δεν εμφανίζουν νεφρική νόσο. Ως εκ τούτου, η πλειονότητα των ασθενών αυτών πεθαίνει από καρδιαγγειακή νόσο πριν φτάσει στην ανάγκη θεραπείας υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας. (Koye, et al, 2018; Gembillo, et al, 2021; Ricciardi, et al, 2021). Πιο συγκεκριμένα, οι ασθενείς που πάσχουν από

XNN εμφανίζουν 5 έως 10 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο πρόωρου θανάτου συγκριτικά με τον κίνδυνο μετάβασης τους σε τελικού σταδίου νεφρική νόσο (Banimfreg, et al, 2022). Σύμφωνα με το United States Renal Data System, οι σχετιζόμενοι με τη ΔNN θάνατοι αυξάνουν, ενώ αυτοί που σχετίζονται με άλλα αίτια XNN παραμένουν σταθεροί. Η παρουσία XNN στο ΣΔ αυξάνει τον 10ετή κίνδυνο θνητότητας ανεξαρτήτως αιτίου στο 31,1% από το 11,5% που διατρέχουν οι διαβητικοί ασθενείς χωρίς νεφρική νόσο (Koye, et al, 2018). Τέλος, η ΔNN συνοδεύεται από αύξηση της 10ετούς καρδιαγγειακής θνητότητας ,με τον κίνδυνο να υπολογίζεται στο 6,1% συγκριτικά με το 3% των διαβητικών ασθενών με φυσιολογική νεφρική λειτουργία. Παραδόξως, οι πρόσφατες βελτιώσεις της καρδιαγγειακής επιβίωσης ύστερα από την χρήση καρδιοπροστατευτικών θεραπευτικών παραγόντων στην κλινική πράξη, θα οδηγήσουν περισσότερους ασθενείς στην ανάπτυξη νεφρικής νόσου (**Πίνακας 1**) (Perco, et al, 2018).

Πληθυσμός υπό μελέτη	10ετής κίνδυνος θνητότητας ανεξάρτητος αιτίου	10ετής κίνδυνος καρδιαγγειακής θνητότητας
Μη Διαβητικοί	7.7%	<2%
ΣΔ	11.5%	3%
ΔNN	31.1%	6.1%

Πίνακας 1: Σύγκριση του 10ετούς κινδύνου θνητότητας ανεξαρτήτως αιτίου και λόγω καρδιαγγειακών συμβαμάτων σε μη διαβητικούς, διαβητικούς και ασθενείς που πάσχουν από ΔNN.

3.3 ΔΙΑΓΝΩΣΗ

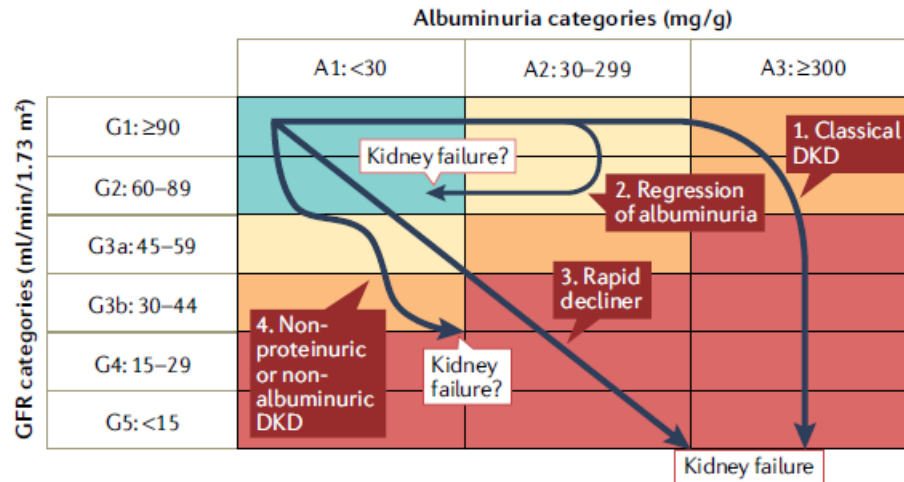
Η ΔNN αποτελεί μια κατεξοχήν κλινικοεργαστηριακή, μη επεμβατική διάγνωση η οποία βασίζεται στη μέτρηση της αλβουμίνης στα ούρα και της κρεατινίνης στον ορό των ασθενών . Η παρουσία αλβουμίνης στα ούρα, ορίζεται ως παθολογική όταν είναι ίση ή ξεπερνά τα 30 mg/g υπολογιζόμενη σε τυχαίο δείγμα ούρων (συνήθως προτιμάται το πρώτο πρωινό δείγμα ούρων) ή όταν είναι ίση ή ξεπερνά τα 30 mg/24ώρο κατά την 24ώρη συλλογή ούρων. Για να επιβεβαιωθεί η παρουσία αλβουμινουρίας, απαιτείται η παρουσία της σε τουλάχιστον 2 από 3 δείγματα που έχουν συλλεχθεί σε διάστημα 3 έως 6 μηνών . Η τιμή της κρεατινίνης ορού των ασθενών, χρησιμοποιείται σε εξισώσεις όπως η Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) για τον υπολογισμό του εκτιμώμενου ρυθμού σπειραματικής διήθησης (e GFR) (Lovrencic, et al, 2023; Κατευθυντήριες Οδηγίες ΕΔΕ, 2024; Standards of Care in Diabetes,

American Diabetes Association 2023). Τόσο η αλβουμινουρία, όσο και ο eGFR παρουσιάζουν διακυμάνσεις στο χρόνο, γι' αυτό απαιτείται η αξιολόγηση των αλλαγών στις τιμές των βιοδεικτών αυτών σε τακτά χρονικά διαστήματα, που ορίζονται ανάλογα με το στάδιο της νεφρικής νόσου (Oshima, et al, 2021; Κατευθυντήριες Οδηγίες ΕΔΕ, 2024). Η νεφρική βιοψία, αποτελεί το «gold standard» για τη διάγνωση της ΔΝΝ, ωστόσο η διενέργειά της είναι σπάνια για λόγους αποφυγής επεμβατικών πράξεων, ενώ δεν υπάρχει καθολική συμφωνία ούτε για τις ενδείξεις ούτε για το χρονικό σημείο διενέργειάς της (Fiorentino, et al, 2017; Tong, et al, 2020; Κατευθυντήριες Οδηγίες ΕΔΕ, 2024). Η απόφαση για τη διενέργεια νεφρικής βιοψίας πρέπει να εξατομικεύεται και οι ισχύουσες ενδείξεις περιλαμβάνουν την ταχεία επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας (οριζόμενη ως μείωση του $e\text{GFR} > 3 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ το χρόνο), την εμφάνιση σημαντικής αύξησης της αποβαλλόμενης αλβουμίνης σε ασθενείς με μικρή διάρκεια ΣΔ, την παρουσία νεφρωσικού συνδρόμου, την παρουσία ενεργού ιζήματος ούρων (οριζόμενο ως η παρουσία ερυθρών ή λευκών αιμοσφαιρίων ή η παρουσία κυτταρικού εκμαγείου) ή την απουσία διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας (ΔΑ), ειδικά σε ασθενείς με ΣΔΤ1 (Fiorentino, et al, 2017; Standards of Care in Diabetes, American Diabetes Association 2023).

3.4 ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΙ ΔΙΑΒΗΤΙΚΗΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ

Ο κλασικός φαινότυπος της ΔΝΝ, όπως έχει περιγραφεί κυρίως στο ΣΔΤ1, περιλαμβάνει 5 στάδια. Κατά το 1^ο στάδιο παρατηρείται υπερδιήθηση και φυσιολογική απέκκριση αλβουμίνης στα ούρα, στο 2^ο στάδιο διαλείπουσα αλβουμινουρία και φυσιολογική αρτηριακή πίεση, στο 3^ο στάδιο εμμένουσα μετρίως αυξημένη αλβουμινουρία, ήπια αρτηριακή υπέρταση και φυσιολογικό ή μετρίως ελαττωμένο eGFR, στο 4^ο στάδιο σημαντικά αυξημένη αλβουμινουρία, αρτηριακή υπέρταση και ακόμα μεγαλύτερη μείωση του eGFR, ενώ το 5^ο στάδιο είναι ταυτόσημο της νεφρικής νόσου τελικού σταδίου (Lovrencic, et al, 2023). Τα τελευταία χρόνια ωστόσο, οι αλλαγές στον επιπολασμό των συννοσηροτήτων του ΣΔ, όπως η αρτηριακή υπέρταση και η παχυσαρκία, η αύξηση του προσδόκιμου ζωής των ασθενών αυτών που έχει ως αποτέλεσμα έναν όλο και περισσότερο γηρασμένο πληθυσμό και η χρήση πολυπαραγοντικών θεραπευτικών προσεγγίσεων που στοχεύουν τόσο την υπεργλυκαιμία όσο και την αρτηριακή υπέρταση, έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση νέων φαινότυπων ΔΝΝ (**Εικόνα 1**) (Oshima, et al, 2021). Έτσι, πέραν του κλασικού αλβουμινουρικού μονοπατιού, εμφανίζεται πλέον ένα μη αλβουμινουρικό μονοπάτι, το οποίο

χαρακτηρίζεται από μείωση του e GFR δίχως να προηγείται, ή σε μερικές περιπτώσεις δίχως να εμφανίζεται ποτέ αλβουμινουρία, ή από μείωση του e GFR που είναι ανεξάρτητη από την παρουσία, τη βαρύτητα και την επακόλουθη πορεία της αλβουμινουρίας. Κατά συνέπεια, εμφανίζονται πλέον μη κλασσικοί φαινότυποι της ΔNN, στους οποίους ανήκουν η σοβαρή μείωση του e GFR δίχως ή με μέτρια αλβουμινουρία, η ταχεία επιδείνωση του e GFR και η υποχώρηση της αλβουμινουρίας, με τους νέους αυτούς φαινότυπους να υποδηλώνουν πιθανώς διαφορετικούς παθογενετικούς μηχανισμούς, με τις βλάβες να εντοπίζονται κυρίως στα σωληνάρια, το διάμεσο ιστό και το αγγειακό δίκτυο (Sugahara, et al, 2021; Lovrencic, et al, 2023). Η διάκριση των φαινότυπων της ΔNN είναι σημαντική καθώς φαίνεται πως η πρόγνωση, η εξέλιξη, η νεφρική και η καρδιαγγειακή έκβαση των ασθενών παρουσιάζει διαφορές ανάλογα με το φαινότυπο. Διάφοροι κλινικοί παράγοντες όπως η ηλικία, η διάρκεια του ΣΔ, η HbA1c, η συστολική αρτηριακή πίεση και η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια έχουν συσχετισθεί με τον εκάστοτε φαινότυπο, ωστόσο η προσθήκη τους σε μοντέλα που περιλαμβάνουν την αλβουμινουρία και τον e GFR, προσφέρουν μόνο μικρή βελτίωση στην προγνωστική ικανότητα ως προς την εξέλιξη της ΔNN, υπογραμμίζοντας την ανάγκη ανακάλυψης βιοδεικτών που θα επιτρέπουν την πρόιμη διαφοροποίηση μεταξύ των φαινοτύπων και κατά συνέπεια την καθοδήγηση εξατομικευμένων θεραπευτικών παρεμβάσεων. Όσον αφορά το μη αλβουμινουρικό φαινότυπο, το γυναικείο φύλο, το κάπνισμα, η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και η χρήση αναστολέων του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης (RAAS) εμφανίζουν συσχέτιση με αυτό, ενώ συνοδεύεται από μικρότερο κίνδυνο απώλειας νεφρικής λειτουργίας. Από την άλλη πλευρά, η ταχεία μείωση του e GFR σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ανεπιθύμητων νεφρικών και καρδιαγγειακών καταληκτικών σημείων, ενώ παράγοντες που η παρουσία τους συσχετίζεται με το φαινότυπο αυτό είναι το υψηλότερο αρχικά e GFR, ο μεγαλύτερος βαθμός αλβουμινουρίας και η αρτηριακή υπέρταση (Oshima, et al, 2021; Lovrencic, et al, 2023).



Εικόνα 1: Φαινότυποι ΔΝΝ. Ο κλασσικός φαινότυπος της ΔΝΝ συσχετίζεται με ανεπαρκή γλυκαιμική ρύθμιση και χαρακτηρίζεται από την εμμένουσα αλβουμινουρία και την προοδευτική ελάττωση του e GFR που καταλήγει στη νεφρική ανεπάρκεια (οδός 1). Η υποχώρηση της αλβουμινουρίας οφείλεται συνήθως στην χορηγούμενη θεραπευτική αντιμετώπιση (αναστολείς RAAS, αναστολείς SGLT2) δίχως ωστόσο να είναι γνωστό εάν οι ασθενείς αυτοί καταλήγουν σε νεφρική ανεπάρκεια (οδός 2). Κάποιοι ασθενείς παρουσιάζουν ταχεία ελάττωση του e GFR καταλήγοντας σε συντομότερο χρονικό διάστημα σε νεφρική ανεπάρκεια, απουσία σοβαρά αυξημένης (A3) αλβουμινουρίας (οδός 3). Ασθενείς οι οποίοι δεν εμφανίζουν μετρίως (A2) ή σοβαρά αυξημένη (A3) αλβουμινουρία ανήκουν στο μη αλβουμινουρικό μονοπάτι και εμφανίζουν βραδύτερο ρυθμό ελάττωσης του e GFR (οδός 4). (Oshima, et al, 2021)

3.5 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΥΠΑΡΧΟΝΤΩΝ ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΩΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

3.5.1 Εκτιμώμενος ρυθμός σπειραματικής διήθησης (Estimated Glomerular Filtration Rate – e GFR)

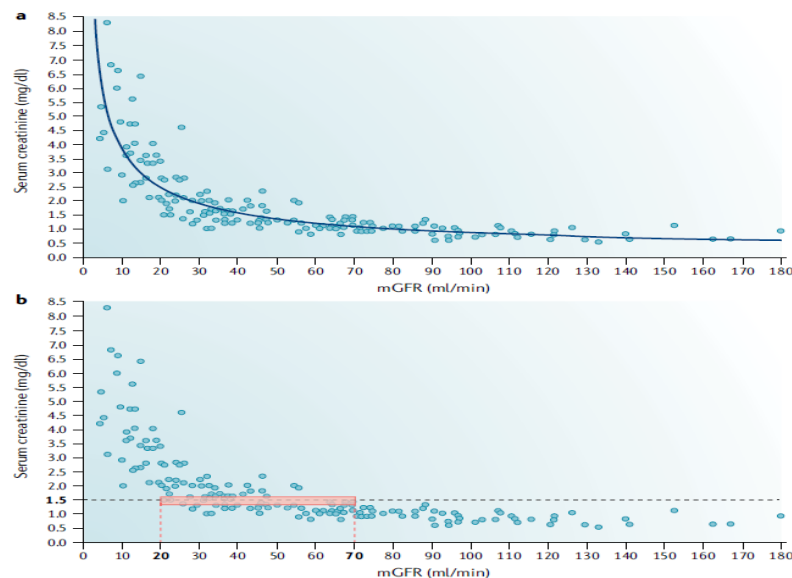
Η εκτίμηση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης (e GFR) πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας ενδογενείς βιοδείκτες διήθησης και συνηθέστερα την κρεατινίνη (Waikar, et al, 2018; Delanye et al 2022). Η κρεατινίνη ορού αποτελεί έναν βιοδείκτη που χρησιμοποιείται ευρέως στη διάγνωση των νεφρικών νόσων, συμπεριλαμβανόμενης της ΔΝΝ, μέσω της χρήσης του σε εξισώσεις υπολογισμού του εκτιμώμενου ρυθμού σπειραματικής διήθησης (e GFR), ο οποίος αποτελεί τον

πιο κοινό βιοδείκτη που χρησιμοποιείται τόσο διαγνωστικά όσο και προγνωστικά, για τη διάγνωση, την ταξινόμηση και την πρόβλεψη της εξέλιξης της ΧΝΝ σε τελικού σταδίου νεφρική νόσο, στην κλινική πρακτική και στις κλινικές μελέτες (Colhoun, et al, 2018; Ali, et al, 2022; Jung, et al, 2022). Κατά την παρακολούθηση της ΔΝΝ, ως προγνωστικός παράγοντας αξιολογούνται οι μεταβολές των τιμών του e GFR κατά ένα δεδομένο χρονικό διάστημα, όπως αυτό ορίζεται από το στάδιο της ΧΝΝ (Fontalvo, et al, 2023). Οι εξισώσεις που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό του e GFR υπολογίζονται σε αριθμό άνω των 70 και ήρθαν ως μια προσπάθεια να ξεπεραστούν οι περιορισμοί της χρήσης της 24ωρης κάθαρσης κρεατινίνης, η οποία θεωρείται ότι αντικατοπτρίζει αξιόπιστα τον ρυθμό σπειραματικής διήθησης. Οι περιορισμοί αυτοί έχουν να κάνουν κυρίως με τον τρόπο συλλογής των ούρων 24ώρου και τα ανεπαρκή δεδομένα για τον όγκο τους (Porrini, et al, 2019). Οι εξισώσεις που χρησιμοποιούνται συνηθέστερα για τον υπολογισμό του e GFR είναι η CKD-EPI και η Modification of Diet in Renal Disease (MDRD), με τις διαφορές στη διαγνωστική τους ικανότητα να είναι ελάχιστες και την ακρίβειά τους να υπολογίζεται στο 69% και στο 65% αντίστοιχα, για ένα δεδομένο στάδιο ΧΝΝ (Colhoun, et al, 2018; Jung, et al, 2022; Fontalvo, et al, 2023). Παρά την αυξανόμενη μαθηματική πολυπλοκότητα των πιο πρόσφατα αναπτυχθέντων εξισώσεων υπολογισμού του e GFR, η αξιοπιστία τους παραμένει πεδίο αντιπαράθεσης, ενώ το γεγονός ότι νέες εξισώσεις συνεχίζουν να δημοσιεύονται καταδεικνύει ότι μια οριστική, αξιόπιστη εξίσωση υπολογισμού του e GFR δεν έχει ακόμα αναπτυχθεί. Η επίμονη παρουσία σφαλμάτων σε όλες τις εξισώσεις που έχουν δημοσιευτεί έως σήμερα, υποδηλώνει ότι πιθανότερα το πρόβλημα έγκειται στη χρήση της κρεατινίνης ως βιοδείκτη νεφρικής λειτουργίας, παρά στη μαθηματική προσέγγιση ανάπτυξης αυτών. Ένας ιδανικός βιοδείκτης του GFR, δε θα πρέπει να δεσμεύεται από πρωτεΐνες, να επανααρροφάται, να εκκρίνεται ή να μεταβολίζεται από τα νεφρικά κύτταρα, ενώ θα πρέπει να είναι αδρανής, να παράγεται συνεχώς, να διηθείται ελεύθερα από το σπείραμα και να απομακρύνεται από τον οργανισμό με τα ούρα. Ο ρυθμός της κάθαρσής του από το πλάσμα θα πρέπει να ισούται με την κάθαρσή του στα ούρα, ενώ η σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεών του στον ορό και τον πραγματικό GFR (Measured GFR- m GFR) να είναι αμοιβαία. Η κρεατινίνη αποτελεί το προϊόν του καταβολισμού της κρεατίνης και της φωσφοκρεατίνης με τον σκελετικό μυ να αποτελεί την κύρια πηγή ενδογενούς προέλευσής της. Η παραγωγή της ωστόσο δεν είναι συνεχής καθώς εξαρτάται από την καθημερινή πρόσληψη πρωτεΐνης και το μυϊκό turnover. Το κρέας αποτελεί την κύρια διατροφική πηγή κρεατινίνης, συνεπώς αλλαγές που οδηγούν σε μειωμένη πρωτεϊνική πρόσληψη

με τη διατροφή ή μειωμένη μυϊκή μάζα (π.χ. κίρρωση, σαρκοπενία) μειώνουν τα επίπεδα κρεατινίνης και οδηγούν σε υπερεκτίμηση του GFR. Αντίθετα, καταστάσεις που σχετίζονται με αυξημένη πρόσληψη πρωτεϊνών και αυξημένη μυϊκή μάζα (π.χ. έντονη σωματική άσκηση, χρόνια λήψη γλυκοκορτικοειδών, υπερθυρεοειδισμός) αυξάνουν τα επίπεδα κρεατινίνης και υποεκτιμούν τον GFR (Porrini, et al, 2019; Delany, et al, 2022). Παρόλο που η κρεατινίνη δεν δεσμεύεται από πρωτεΐνες και διηθείται ελεύθερα από το σπείραμα, δεν αποτελεί έναν ειδικό δείκτη σπειραματικής διήθησης λόγω της μερικής έκκρισης και επαναρρόφησης της από τα νεφρικά σωληνάκια. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η σωληναριακή έκκριση της κρεατινίνης συμμετέχει σε ποσοστό περίπου 10% στη συνολική απέκκρισή της στα ούρα. Ωστόσο, το ποσοστό αυτό αυξάνεται όσο μειώνεται ο m GFR και φτάνει έως και 80% σε προχωρημένα στάδια της ΧΝΝ, περιορίζοντας έτσι την αύξηση της συγκέντρωσής της στον ορό, καλύπτοντας έτσι την ελάττωση του m GFR. Τα δεδομένα που αφορούν την επίδραση της σωληναριακής επαναρρόφησης της κρεατινίνης στα επίπεδά της στον ορό είναι περιορισμένα και απαιτείται περαιτέρω μελέτη. Η κρεατινίνη, πέρα της απομάκρυνσής της από τα ούρα, παρουσιάζει επιπλέον εξωνεφρική κάθαρση. Η εξωνεφρική κάθαρση της κρεατινίνης περιλαμβάνει την ανακύκλωσή της σε κρεατίνη και την αποικοδόμηση της τελευταίας σε προϊόντα άλλα, πέραν της κρεατινίνης. Η εξωνεφρική κάθαρση αυξάνει με τη μείωση της νεφρικής λειτουργίας, συνεισφέροντας επιπλέον στην υπερεκτίμηση του m GFR σε ασθενείς με προχωρημένη ΧΝΝ. Συμπερασματικά, οι τιμές της κρεατινίνης επηρεάζονται από παράγοντες όπως η διαίτα, η μυϊκή μάζα, η ηλικία, το φύλο, η εθνικότητα, η εγκυμοσύνη και η λήψη κορτικοστεροειδών, με αποτέλεσμα να παρουσιάζει μεγάλη βιολογική μεταβλητότητα (Hoher, et al, 2017; Myrou, et al, 2018; Porrini, et al, 2019; Lovrencic, et al, 2023). Η προέλευση της κρεατινίνης εξηγεί μερικώς τις διαφορές στα επίπεδά της μεταξύ ανδρών και γυναικών, παιδιών και ενηλίκων. Συνεπώς, το φύλο και η ηλικία εμπεριέχονται ως μεταβλητές στις προαναφερθείσες εξισώσεις, προκαλώντας σύγχυση στη διεμφυλική και τη γηριατρική κοινότητα. Εκτός του φύλου, η φυλή αποτελεί έναν παράγοντα που επηρεάζει τα επίπεδα της κρεατινίνης στον ορό, με τη μαύρη φυλή να παρουσιάζει αύξηση αυτών. Η χρήση της αναθεωρημένης εξίσωσης CKD-EPI που αντικατέστησε τις προερχόμενες κυρίως από αμερικάνικες μελέτες κοόρτης MDRD και τη CKD-EPI που χρησιμοποιούσαν τη φυλή ως μεταβλητή, αποσκοπούσε στην εξισορρόπηση του σφάλματος μεταξύ των φυλών. Ωστόσο, η χρήση της οδηγεί στην υπερεκτίμηση του e-GFR κατά 3,9 ml/min/1,73 m² στη λευκή φυλή (υπερεκτίμηση του e-GFR κατά 0,5 ml/min/1.73 m² με τη χρήση της παλαιότερης) και

υποεκτίμηση του e-GFR κατά 3,7 ml/min/1,73 m² στη μαύρη φυλή (υπερεκτίμηση κατά 3,6 ml/min/1.73 m² με τη χρήση της παλαιότερης). Επιπρόσθετα, η απόδοση της νέας αυτής εξίσωσης δεν έχει εξετασθεί ενδελεχώς πέρα της Αμερικής, συνεχίζοντας τον «αμερικανοκεντρισμό» που διακατέχει τις εξισώσεις εκτίμησης του GFR (Delanaye, et al, 2022). Η χρήση ευρέως χρησιμοποιούμενων εξισώσεων όπως η Cockcroft-Gault και η συντετμημένη MDRD (abbreviated MDRD- a MDRD) έχει τεθεί υπό αμφισβήτηση ειδικά σε ασθενείς με φυσιολογικό ή αυξημένο ρυθμό πειραματικής διήθησης. Η χρήση της εξίσωσης CKD-EPI, η οποία αναπτύχθηκε ώστε να ξεπεραστεί ο περιορισμός αυτός, φαίνεται να υποεκτιμά το GFR σε ασθενείς με ΣΔ και αποτυγχάνει να εντοπίσει αξιόπιστα ασθενείς που εμφανίζουν υπερδιήθηση, γεγονός με σημαντικές κλινικές συνέπειες μιας και η υπερδιήθηση αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την έναρξη και την εξέλιξη της ΔΝΝ. Η υποεκτίμηση αυτή αφορά τόσο τις βραχυπρόθεσμες αλλαγές του GFR που παρατηρούνται κατά την έναρξη αντιδιαβητικής (π.χ. SGLT2 αναστολείς) ή αντιυπερτασικής αγωγής (π.χ. RAAS αναστολείς) όσο και τις μακροπρόθεσμες κατά την εξέλιξη της νεφρικής νόσου (Gaspari, et al, 2013). Επιπλέον, η μέθοδος Jaffé που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της συγκέντρωσης της κρεατινίνης στον ορό των ασθενών, πάσχει από την παρουσία συγχυτικών αναλυτικών παραγόντων, όπως η παρεμβολή μη ειδικών χρωμογόνων (γλυκόζη, πρωτεΐνη) που επηρεάζουν την ακρίβεια της μέτρησης του e GFR σε ασθενείς με σοβαρή υπεργλυκαιμία. Από την άλλη πλευρά, η χρήση ενζυμικών μεθόδων υπολογισμού της κρεατινίνης, αν και υπερτερεί σε ακρίβεια και ειδικότητα, παρουσιάζοντας μικρότερο σφάλμα, έχει πολύ υψηλότερο κόστος και επηρεάζεται από παράγοντες όπως η αιμόλυση, η υπερχολερυθριναιμία, η παρουσία μονοκλωνικών πρωτεϊνών και η χορήγηση φαρμάκων (Porrini, et al, 2019; Lovrencic, et al, 2023). Οι παράγοντες αυτοί, εξηγούν το γεγονός ότι η σχέση μεταξύ της κρεατινίνης και του m GFR είναι καμπυλόγραμμη και όχι γραμμική όπως επίσης και το λόγο που μια δεδομένη τιμή κρεατινίνης συσχετίζεται με ένα ευρύ πεδίο τιμών m GFR (**Εικόνα 2**). Η συμφωνία μεταξύ του e GFR και του m GFR αξιολογείται από ποικίλες στατιστικές μεθόδους, με όλες τις προσεγγίσεις να έχουν περιορισμούς στη μεθοδολογία τους. Για την εκτίμηση του κατά πόσο μια εξίσωση εκτιμά αποδεκτά τον GFR, είναι απαραίτητο να καθοριστούν εκ των προτέρων περιθώρια σφάλματος με κλινική σημασία έτσι ώστε να καθοριστεί η αναλογία των εκτιμήσεων που εμπίπτουν εντός των περιθωρίων αυτών και να ποσοτικοποιηθεί η αποδεκτή ασυμφωνία. Η παράμετρος που χρησιμοποιείται συχνότερα στην αξιολόγηση της απόδοσης των εξισώσεων εκτίμησης του GFR είναι η P30 που ορίζεται ως το ποσοστό των εκτιμήσεων GFR που βρίσκονται

εντός του $\pm 30\%$ των τιμών του m GFR. Παρόλα αυτά, η P30 ορίστηκε απουσία οποιουδήποτε κλινικού ή στατιστικού σκεπτικού ώστε να θεωρηθεί αποδεκτό περιθώριο σφάλματος. Τα όρια τιμών $\pm 30\%$ είναι υπερβολικά ευρέα ενώ για τις περισσότερες εξισώσεις e GFR η αναλογία των μετρήσεων που ανήκουν στο θεωρητικά αποδεκτό όριο που θέτει η παράμετρος P30 ποικίλει σε ποσοστό από 50% έως 90%. Συνεπώς, σε ποσοστό 10-50% των μετρήσεων, το σφάλμα των τιμών του e GFR είναι άνω του 30%. Εν κατακλείδι, καθίσταται σαφές ότι το περιθώριο σφάλματος για τις εξισώσεις e GFR είναι απροσδόκητα και μη αποδεκτά ευρύ σε όλο το φάσμα της νεφρικής λειτουργίας, από το στάδιο της υπερδιήθησης και της φυσιολογικής νεφρικής λειτουργίας έως τα μέτρια και προχωρημένα στάδια της ΧΝΝ. Η απόδοσή τους δεν έχει βελτιωθεί στο πέρασμα των τελευταίων 60 ετών, ούτε με τη χρήση εναλλακτικών της κρεατινίνης βιοδεικτών (κυστατίνη C). Συμπερασματικά, ο e GFR είναι ένα αναξιόπιστο εργαλείο εκτίμησης της νεφρικής λειτουργίας τόσο σε υγιή πληθυσμό όσο και σε ασθενείς, στην κλινική πράξη και την έρευνα. Στην εποχή της ιατρικής ακριβείας, η συνεχιζόμενη χρήση του αποτελεί ένα παράδοξο και υπογραμμίζει όλο και πιο έντονα την επιτακτική ανεύρεση πιο αξιόπιστων βιοδεικτών εκτίμησης της νεφρικής λειτουργίας. (Porrini, et al, 2019)



Εικόνα 2: Η συσχέτιση μεταξύ κρεατινίνης και m GFR είναι καμπυλόγραμμη. (α) Απεικόνιση της καμπυλόγραμμης συσχέτισης μεταξύ της κρεατινίνης και του m GFR, όπως αυτός εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας σημασμένο με ^{99}Tc πεντινικό οξύ (DTPA) σε 171 ασθενείς με νεφρική

νόσο. (b) Στους ασθενείς αυτούς, τιμές κρεατινίνης 1.5 mg/dl αντιστοιχούν σε m GFR 20-70 ml/min. (Porrini, et al, 2019)

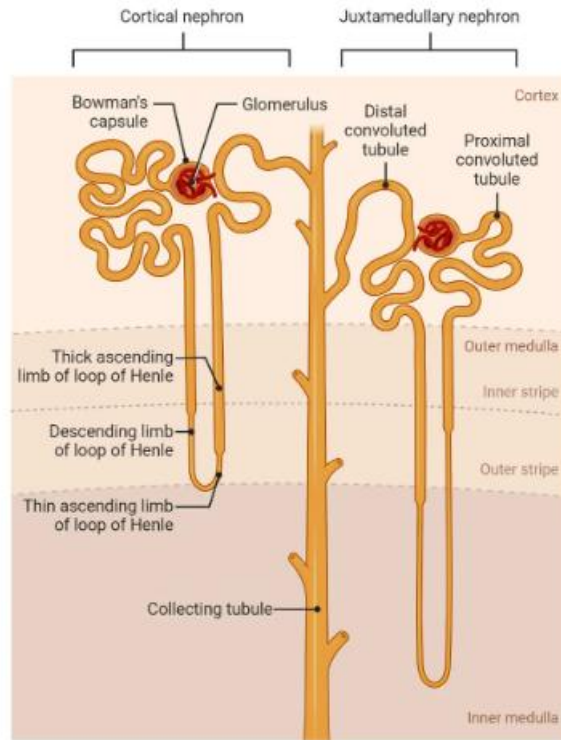
3.5.2 Αλβουμινουρία

Η αλβουμινουρία αποτελεί τον δεύτερο βιοδείκτη που χρησιμοποιείται τόσο για τη διάγνωση, όσο και για την ταξινόμηση της ΧΝΝ στο ΣΔ. Η εκτίμηση της αλβουμινουρίας πραγματοποιείται με μέτρηση της συγκέντρωσής της είτε σε τυχαίο δείγμα ούρων, είτε σε συλλογή ούρων 24ώρου, με το αποτέλεσμα να εκφράζεται ως λόγος αλβουμίνης προς κρεατινίνη ούρων (mg/g κρεατινίνης ούρων) ή ως ρυθμός απέκκρισης αλβουμίνης στα ούρα (mg/24ώρο) αντίστοιχα. Φυσιολογικά, η απέκκριση της αλβουμίνης στα ούρα είναι μικρότερη των 30 mg/g κρεατινίνης ούρων ή μικρότερη των 30 mg/24ώρο (Waikar, et al, 2018; Lovrencic, et al, 2023). Η αλβουμινουρία, μπορεί να είναι παροδική και αναστρέψιμη, για αυτό το λόγο απαιτείται επιβεβαίωση της παρουσίας της σε τουλάχιστον 2 μετρήσεις, εντός διαστήματος 3-6 μηνών (Marketou, et al, 2017). Ως βιοδείκτης, συσχετίζεται με την δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και αποτελεί κλινική εκδήλωση της ΔΝΝ, ισχυρό προγνωστικό παράγοντα εξέλιξης της νόσου σε τελικού σταδίου νεφρική νόσο και ανεξάρτητο παράγοντα καρδιαγγειακής νοσηρότητας και θνητότητας (Barutta, et al, 2021; Jung, et al, 2022; Lovrencic, et al, 2023). Παρόλα αυτά, ο ρόλος της αλβουμινουρίας ως προγνωστικός βιοδείκτης της εξέλιξης της ΧΝΝ έχει αμφισβητηθεί τα τελευταία χρόνια καθώς ασθενείς που πάσχουν από μετρίως αυξημένη αλβουμινουρία μπορεί να υποστρέψουν σε φυσιολογικά επίπεδα ενώ επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας μπορεί να παρατηρηθεί και σε απουσία αλβουμινουρίας (Tofte, et al, 2020). Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τις μελέτες NHANES 1988-1994 και NEFRON, ο επιπολασμός της μη αλβουμινουρικής ΔΝΝ φτάνει το 30% στους ασθενείς με ΣΔΤ2 άνω των 40 ετών, ενώ το 55% των ασθενών με ΣΔΤ2 στην Πρωτοβάθμια Φροντίδα Υγείας δεν εμφανίζει αλβουμινουρία κατά την πορεία της νόσου (Koye, et al, 2018). Επιπρόσθετα, ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με ΣΔΤ1 ή ΣΔΤ2 καταλήγει σε τελικού σταδίου νεφρική νόσο δίχως να εμφανίσει αλβουμινουρία συμπεριλαμβανομένων ασθενών που λαμβάνουν νεφροπροστατευτικούς παράγοντες και επιτυγχάνουν απέκκριση αλβουμίνης στα ούρα μικρότερη των 30 mg/g κρεατινίνης (Jung, et al, 2022). Η αλβουμινουρία

παρουσιάζει σημαντική ημερήσια διακύμανση και επηρεάζεται από παράγοντες όπως η σωματική άσκηση, η διατροφή, η παρουσία λοίμωξης, η αρτηριακή υπέρταση, η καρδιακή ανεπάρκεια, η έμμηνος ρύση και η υπεργλυκαιμία, με την βιολογική της διακύμανση να κυμαίνεται σε ποσοστά άνω του 20% (Marketou, et al, 2017; Barutta, et al, 2021; Ali, et al, 2022; Lovrencic, et al, 2023). Εν κατακλείδι, γίνεται σαφές ότι η αλβουμινουρία δεν αποτελεί ισχυρό προγνωστικό βιοδείκτη καθώς μόνο το 1/3 των ασθενών με αλβουμινουρία εμφανίζει προοδευτική ελάττωση της νεφρικής του λειτουργίας, ενώ τόσο η ειδικότητα όσο και η ευαισθησία της για τη ΔΝΝ είναι χαμηλή αφού μόνο το 50% των ασθενών με προοδευτική ελάττωση της νεφρικής λειτουργίας παρουσιάζει αλβουμινουρία (Colhoun, et al, 2018).

3.6 ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ

Ο νεφρώνας (**Εικόνα 3**) αποτελεί τη λειτουργική μονάδα του νεφρικού παρεγχύματος και αποτελείται από δύο κύρια τμήματα, το σπείραμα και τα μυελικά σωληνάρια. Το σπείραμα είναι υπεύθυνο για την αρχική διήθηση του αίματος ενώ τα σωληνάρια ρυθμίζουν τη συγκέντρωση και το χημικό περιεχόμενο του αίματος που επιστρέφει στη συστηματική κυκλοφορία και συνεπώς τη συγκέντρωση και το περιεχόμενο των ούρων που απεκκρίνονται. Το σπείραμα αποτελείται από τέσσερα είδη κυττάρων: τα τοιχωματικά επιθηλιακά κύτταρα, τα ποδοκύτταρα, τα σπειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα και τα μεσαγγειακά κύτταρα (Lassen, et al, 2020).

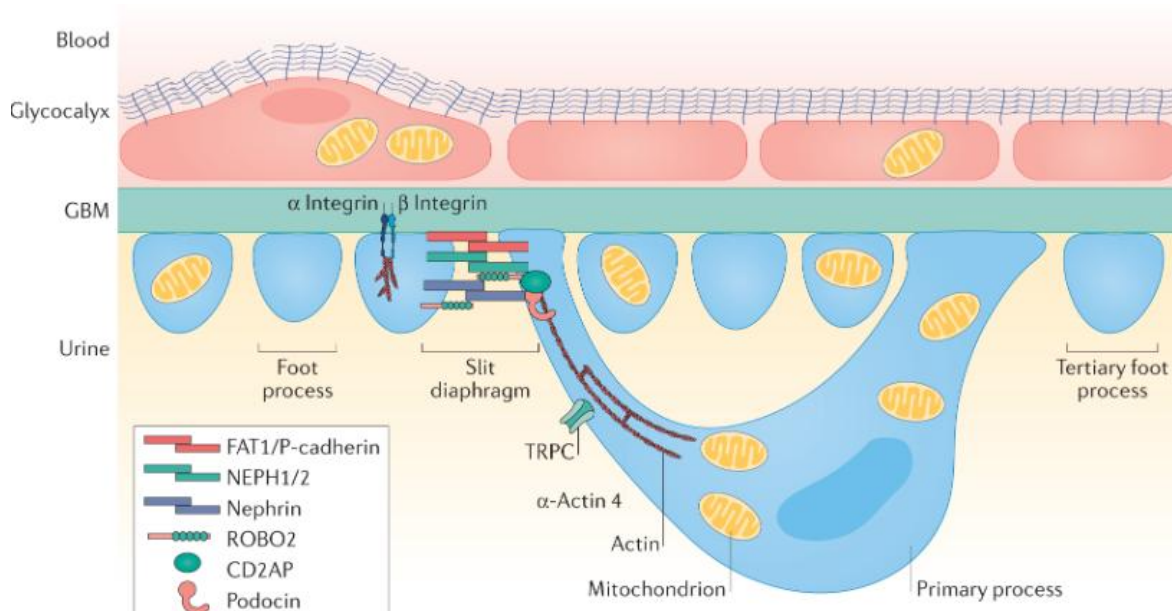


Εικόνα 3: Ο νεφρώνας. Η λειτουργική μονάδα του νεφρού αποτελείται από το σπείραμα και τα μυελικά σωληνάκια (εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, αγκύλη του Henle, αθροιστικό σωληνάριο και άπω εσπειραμένο σωληνάριο).

Το σπείραμα αποτελεί ένα σφαιρικό τριχοειδικό δίκτυο που σχηματίζεται με την είσοδο του προσαγωγού αρτηριδίου και τη διαίρεσή του σε πέντε περίπου κλάδους, καθένας από τους οποίους διαιρείται στο δικό του τριχοειδικό δίκτυο. Τα τριχοειδή αυτά συγκλίνουν και σχηματίζουν ένα μονήρες, απαγωγό αρτηρίδιο το οποίο εξέρχεται από το σπείραμα από το ίδιο σημείο που εισέρχεται το προσαγωγό. Το αγγειώδες σπείραμα εισέρχεται σε μια κοίλη σφαίρα επιθηλιακών κυττάρων που ονομάζεται κάψα του Bowman και αποτελεί το τυφλό άκρο ενός κοίλου σωληναριακού συστήματος.

Το αίμα, εισέρχεται στο σπείραμα μέσω του προσαγωγού αρτηριδίου όπου λαμβάνει χώρα η υπερδιήθηση του αίματος. Στη συνέχεια, το διήθημα περνά στην ουροφόρο κοιλότητα, το χώρο δηλαδή μεταξύ της εξωτερικής επικάλυψης του σπειράματος και του τοιχωματικού πετάλου της κάψας του Bowman. Τελικά, εισέρχεται στο σωληναριακό σύστημα και εγκαταλείπει το σπείραμα μέσω του απαγωγού αρτηριδίου.

Μεταξύ του αίματος και της ουροφόρου κοιλότητας βρίσκεται ο σπειραματικός φραγμός διήθησης (ΣΦΔ), μια εξειδικευμένη δομή που επιτρέπει μια άκρως εκλεκτική διήθηση του πλάσματος και αποτελείται από το ενδοθήλιο των τριχοειδών του σπειράματος, τη βασική μεμβράνη των τριχοειδών του σπειράματος (ΣΒΜ) και τη στιβάδα των ποδοκυττάρων που καλύπτουν εξωτερικά το σπείραμα (**Εικόνα 4**). Η διατήρηση του σπειραματικού φραγμού διήθησης απαιτεί επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων που τον απαρτίζουν και συγκεκριμένα μεταξύ των ποδοκυττάρων και των σπειραματικών ενδοθηλιακών κυττάρων. Ο καλύτερα μελετημένος μηχανισμός της επικοινωνίας αυτής είναι ο παραγόμενος από τα ποδοκύτταρα VEGFA, ο οποίος ασκώντας παρακρινή δράση, συνδέεται με τους υποδοχείς του VEGFR1, VEGFR2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα του σπειράματος. Σε πειραματικά μοντέλα, η εξάλειψη του VEGFA από τα ποδοκύτταρα συνδέεται με απώλεια των θυρίδων στα ενδοθηλιακά κύτταρα, με πρωτεϊνουρία, μικροαγγειοπάθεια, σπειραματοσκλήρυνση και απόπτωση των σπειραματικών ενδοθηλιακών κυττάρων (Podgorski, et al, 2019; Lassen, et al, 2020).



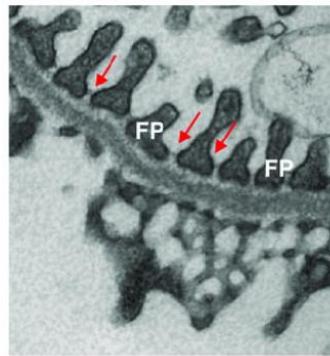
Εικόνα 4: Σπειραματικός φραγμός διήθησης. Η εξειδικευμένη αυτή δομή επιτρέπει την εκλεκτική διήθηση του πλάσματος και αποτελείται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα του σπειράματος (ροζ), τη σπειραματική βασική μεμβράνη (Glomerular Basement Membrane, GBM) και τα ποδοκύτταρα (γαλάζιο). (Daehn, et al, 2021)

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι θυριδωτά, με τη διάμετρο των πόρων αυτών που ουσιαστικά αποτελούν διακυτταρικές οπές, να υπολογίζεται στα 70 nm καλύπτοντας το 30-40% της

κυτταρικής επιφάνειας. Επιτρέπουν τη διέλευση του ύδατος, απαιτούμενη προϋπόθεση για τους μεγάλους όγκους διήθησης που διαχειρίζεται το σπείραμα. Η κορυφαία επιφάνειά τους καλύπτεται από τον αρνητικά φορτισμένο γλυκοκάλυκα, ο ρόλος του οποίου είναι σπουδαίος καθώς παρέχει υψηλή εκλεκτικότητα ως προς το φορτίο, αποτρέποντας τη διέλευση αρνητικά φορτισμένων μορίων όπως η αλβουμίνη. Επιπλέον, ρυθμίζει την εκροή ύδατος μέσω ελέγχου της διαπερατότητας των αγγείων, σχηματίζοντας ένα χώρο μεταξύ της κυκλοφορίας και του ενδοθηλίου ενώ περιορίζει την προσκόλληση λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο, ρυθμίζοντας τη διαδικασία της φλεγμονής και της αιμόστασης. Αποτελείται από πρωτεογλυκάνες και γλυκοπρωτεΐνες που συνδέονται ομοιοπολικά με γλυκοζαμινογλυκάνες όπως η θειϊκή χονδροϊτίνη, η θειϊκή ηπαράνη και το υαλουρονικό οξύ. Η βασική μεμβράνη, εντοπίζεται μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων και των ποδοκυττάρων, είναι πιο παχιά συγκριτικά με τις άλλες τριχοειδικές μεμβράνες και εμφανίζει τρεις στιβάδες. Η κεντρική, πυκνή στιβάδα αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο τύπου IV το οποίο σχηματίζει ένα δίκτυο ινιδίων που δρα ως φυσικός φραγμός στην είσοδο μεγάλων μορίων από το αίμα στην ουροφόρο κοιλότητα. Οι δύο αραιές στιβάδες, η εσωτερική, εντοπιζόμενη προς το ενδοθήλιο και η εξωτερική, εντοπιζόμενη προς τα ποδοκύτταρα, περιέχουν αρνητικά φορτισμένες περιοχές που αποτελούνται από γλυκοζαμινογλυκάνες όπως η θειϊκή ηπαράνη και η ποδοκοκαλκίνη. Οι περιοχές αυτές δρουν ως φραγμός φορτίου εμποδίζοντας τη διόδο αρνητικά φορτισμένων μορίων. Κατά συνέπεια, ο σπειραματικός φραγμός διήθησης λειτουργεί ως φυσικός και ως ηλεκτρικός φραγμός στη διέλευση μεγάλων μορίων >70000 daltons αλλά και αρνητικά φορτισμένων μορίων ποικίλου μεγέθους (Daehn, et al, 2018; Lassen, et al 2020).

Τα ποδοκύτταρα (**Εικόνα 5**) αποτελούν δομικά και λειτουργικά εξειδικευμένα επιθηλιακά κύτταρα που καλύπτουν την εξωτερική επιφάνεια του σπειράματος. Προέρχονται από το σπλαχνικό πέταλο της κάψας του Bowman, είναι τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα και η προέλευσή τους είναι μεσεγχυματική. Τα ποδοκύτταρα παρουσιάζουν κυτταροπλασματικές προεκβολές που εφάπτονται με τη βασική μεμβράνη και ονομάζονται ποδοειδείς προεκβολές. Μεταξύ γειτονικών ποδοειδών προεκβολών εντοπίζεται ένα χάσμα, μεγέθους 30-60 μm που ονομάζεται σχισμή διήθησης και αποτελεί μια δυναμική δομή, απαραίτητη για τη λειτουργία του σπειραματικού φραγμού διήθησης. Το κενό μεταξύ των ποδοειδών προεκβολών γεφυρώνεται από μια λεπτή μεμβράνη, τη μεμβράνη της σχισμής διήθησης. Η κυτταρική τους δομή, αποτελούμενη κυρίως από έναν κυτταροσκελετό ακτίνης είναι περίπλοκη και απαραίτητη για τη

διατήρηση της λειτουργίας τους. Οποιοδήποτε ερέθισμα που προκαλεί στρες ή τραυματισμό στα ποδοκύτταρα, ανεξαρτήτου της αιτιολογίας αυτού, έχει ως αποτέλεσμα την εξάλειψη των ποδοειδών προσεκβολών και την απώλεια των σχισμών διήθησης με τελικό αποτέλεσμα την πρωτεϊνουρία (Chitra, et al, 2015; Daehn, et al, 2018; Podgorski, et al, 2019; Lassen, et al 2020).



Εικόνα 5: Απεικόνιση ποδοκυττάρων στο ηλεκτρικό μικροσκόπιο. Τα ποδοκύτταρα αποτελούνται από τις ποδοειδείς προσεκβολές (FP), μεταξύ των οποίων σχηματίζεται η σχισμή διήθησης (κόκκινα βέλη). (Blaine, et al, 2020)

Η στήριξη στα πειραματικά τριχοειδή παρέχεται από το μεσάγγειο που αποτελείται από τα μεσαγγειακά κύτταρα τα οποία αποτελούν το 30-40% των κυττάρων του σπειράματος και την εξωκυττάρια μεσαγγειακή θεμέλια ουσία. Τα μεσαγγειακά κύτταρα φαίνεται να είναι υπεύθυνα για την απομάκρυνση ανοσοσυμπλεγμάτων και πρωτεϊνικών συγκριμάτων που παγιδεύονται στη βασική μεμβράνη, περιβάλλονται από τη μεσαγγειακή θεμέλια ουσία, η οποία διασχίζεται από τις κυτταροπλασματικές προσεκβολές αυτών.

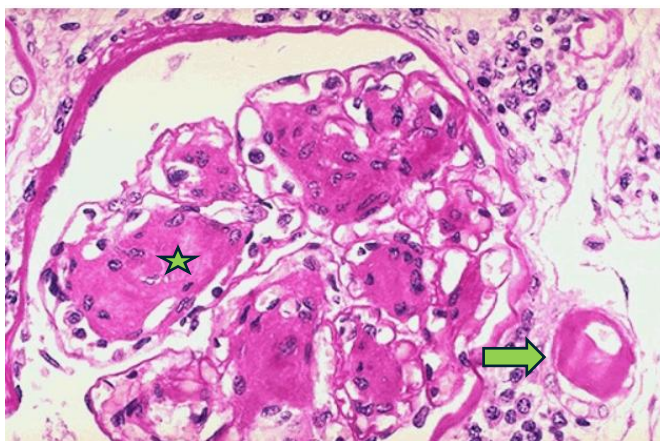
Το πρώτο τμήμα του σωληναριακού συστήματος είναι το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο που αποτελεί συνέχεια της κάψας του Bowman και ακολουθεί ελικοειδή πορεία παραμένοντας κοντά στο σπείραμα από το οποίο προέρχεται. Στο σημείο αυτό, παρατηρείται εκτεταμένη επαναρρόφηση των συστατικών του πειραματικού διηθήματος. Στη συνέχεια, το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο ευθείάζεται και κατέρχεται στη μυελώδη μοίρα σχηματίζοντας το παχύ ανιόν σκέλος της αγκύλης του Henle, η οποία μεταπίπτει στο λεπτό σκέλος της αγκύλης του Henle. Το λεπτό σκέλος της αγκύλης αναδιπλώνεται και επιστρέφει στο φλοιό. Στη θέση αυτή

μετατρέπεται στο παχύ ανιόν σκέλος της αγκύλης ενώ κοντά στο σπείραμα γίνεται ελικοειδές και σχηματίζει το άπω εσπειραμένο σωληνάριο. Το άπω εσπειραμένο σωληνάριο μεταπίπτει στο αθροιστικό σωληνάριο το οποίο καταλήγει στον αθροιστικό πόρο. Οι αθροιστικοί πόροι κατέρχονται στη μυελώδη μοίρα και σχηματίζουν πόρους μεγάλης διαμέτρου (πόροι του Bellini) που εισβάλλουν στους κάλυκες (Lassen, et al, 2020).

3.7 ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΤΗΣ ΔΙΑΒΗΤΙΚΗΣ ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΟΠΑΘΕΙΑΣ

Η παθολογοανατομική ταξινόμηση της διαβητικής σπειραματοπάθειας, σύμφωνα με τη Renal Pathology Society όπως αυτή προτάθηκε το 2010, λαμβάνει υπόψιν βλάβες οι οποίες εντοπίζονται στο σπείραμα, στο σωληναριοδιάμεσο χώρο και στο αγγειακό δίκτυο του νεφρού. Στο αγγειακό δίκτυο, οι παρατηρούμενες βλάβες περιγράφονται ως υαλοειδής αρτηριδιοσκλήρυνση που αποτελεί εξιδρωματική βλάβη κατά την οποία πρωτεΐνες του πλάσματος αντικαθιστούν τα λεία μυϊκά κύτταρα . Οι σπειραματικές βλάβες ταξινομούνται περαιτέρω σε τέσσερα στάδια . Στο στάδιο I παρατηρείται πάχυνση της βασικής μεμβράνης (BM), στο στάδιο II επέκταση του μεσαγγειώδους χώρου, στο στάδιο III οζώδης σκλήρυνση, δηλαδή σφαιροειδείς εναποθέσεις πεταλιώδους θεμέλιας ουσίας περιφερικά του σπειράματος που συχνά περιέχουν παγιδευμένα μεσαγγειακά κύτταρα και σχηματίζουν τους όζους Kimmestiel-Wilson, οι οποίοι αποτελούν ευρήματα παθογνωμικά του ΣΔ (**Εικόνα 6**). Τέλος, στο στάδιο IV οι βλάβες αντικατοπτρίζουν προχωρημένη διαβητική σπειραματοσκλήρυνση (Fioretto, et al, 2007; Oshima, et al, 2021; Huang, et al, 2022). Το στάδιο των αλλοιώσεων που εμφανίζονται στη διαβητική σπειραματοπάθεια παρουσιάζει συσχέτιση με τους διαγνωστικούς και προγνωστικούς βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται στη ΔΝΝ. Πιο συγκεκριμένα, η αλβουμινουρία εμφανίζει θετική συσχέτιση με τα πιο προχωρημένα στάδια της διαβητικής σπειραματοπάθειας, ενώ ο e GFR αρνητική. Επιπλέον, θετική συσχέτιση με πιο προχωρημένα στάδια εμφανίζει και η διάρκεια του ΣΔ. Οι προαναφερθείσες συσχετίσεις είναι ισχυρότερες στο ΣΔΤ1 συγκριτικά με το ΣΔΤ2, λόγω των διάφορων φαινοτύπων της ΔΝΝ στο ΣΔΤ2 καθώς και της πιθανότερης ύπαρξης επιπρόσθετων αιτιών ΧΝΝ, όπως η αρτηριακή υπέρταση και η παχυσαρκία. Η οζώδης σπειραματοσκλήρυνση, η διάμεση ίνωση και η σωληναριακή ατροφία συσχετίζονται με χειρότερη έκβαση όσον αφορά τα νεφρικά καταληκτικά σημεία. Η διάμεση ίνωση και η σωληναριακή ατροφία εμφανίζουν επίσης σημαντική συσχέτιση με τη θνητότητα ανεξαρτήτου αιτίας ενώ η παρουσία αρτηριδιοσκλήρυνσης

με χειρότερη καρδιαγγειακή έκβαση (Oshima, et al, 2021). Η πρώτη, μετρήσιμη αλλαγή που παρατηρείται 1,5 με 2,5 έτη μετά την έναρξη του ΣΔΤ1 είναι η πάχυνση της BM. Η πάχυνση της σπειραματικής BM, της σωληναριακής BM και η επέκταση του μεσαγγειώδους χώρου οφείλονται στην αυξημένη εναπόθεση πρωτεϊνών που φυσιολογικά εντοπίζονται στο εξωκυττάριο στρώμα, όπως το κολλαγόνο IV, VI, η λαμινίνη και η ινονεκτίνη. Η συσσώρευση των πρωτεϊνών αυτών οφείλεται σε αυξημένη παραγωγή τους, σε μείωση της αποδόμησής τους ή σε συνδυασμό των δύο. Αντίθετα, η επέκταση του διάμεσου ιστού οφείλεται στην αύξηση των κυτταρικών στοιχείων αυτού (Fioretto, et al, 2007). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι σε μελέτες φάνηκε πως η επίτευξη νορμογλυκαιμίας, διάρκειας 10 ετών, ύστερα από μεταμόσχευση παγκρέατος, εκτός από το ότι συσχετίζεται με ελάττωση της αλβουμινουρίας, συσχετίζεται επιπλέον με μείωση του πάχους της BM, της επέκτασης του μεσαγγειακού χώρου και εξάλειψη των οζωδών βλαβών, αποδεικνύοντας ότι οι βλάβες της διαβητικής σπειραματοπάθειας είναι αναστρέψιμες γεγονός που καθιστά κρίσιμη τόσο την έγκαιρη διάγνωση της όσο και την επίτευξη των θεραπευτικών στόχων (Oshima, et al, 2021).



Εικόνα 6: Ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις ΔΝΝ. Δείγμα βιοψίας ασθενούς με ΔΝΝ ύστερα από χρώση PAS. Παρατηρούνται οζίδια Kimmelstiel-Wilson (αστέρι) τα οποία σχηματίζονται λόγω επέκτασης μεσαγγειώδους ουσίας, αποτέλεσμα της βλάβης που προκαλείται από μη ενζυμική γλυκίωση πρωτεϊνών. Παρατηρείται επίσης αρτηρίδιο με σημαντικά παχυσμένο τοίχωμα (βέλος), τυπικό υαλοειδούς αρτηριοσκλήρυνσης. (Santoro, et al, 2021)

3.8 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Η παθογένεση της ΔΝΝ είναι μια περίπλοκη διεργασία κατά την οποία εμπλέκονται και αλληλεπιδρούν γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Ενώ το γενετικό υπόβαθρο της νόσου είναι ασαφές, με τα αποτελέσματα των μελετών να μην είναι αναπαράξιμα, είναι σαφές ότι η υπεργλυκαιμία και η αρτηριακή υπέρταση (ΑΥ) είναι οι κύριοι υπεύθυνοι παράγοντες που συνεισφέρουν στην εμφάνιση της ΔΝΝ (DeFronzo, et al, 2021; Lovrencic, et al, 2023). Η παθογένεση της ΔΝΝ στηρίζεται σε τρεις άξονες: το μεταβολικό, τον αιμοδυναμικό και τον φλεγμονώδη, με την υπεργλυκαιμία να συνεισφέρει και στους τρεις, οδηγώντας σε αιμοδυναμικές και μεταβολικές αλλαγές με αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, τη σπειραματική υπερδιήθηση και τη φλεγμονή. Αν και η μεταβολική απορρύθμιση αποτελεί το κύριο γεγονός που οδηγεί στις πρώιμες βλάβες της ΔΝΝ, η ΑΥ που είναι συχνή συννοσηρότητα στους ασθενείς με ΣΔ, συμβάλλει επίσης στις παρατηρούμενες βλάβες του σπειράματος και ειδικά στα ποδοκύτταρα και τον σωληναριοδιάμεσο ιστό (Lassen, et al, 2020; Oshima, et al, 2021; Fontalvo, et al, 2023). Η σπουδαιότητα της υπεργλυκαιμίας και της ΑΥ στην παθοφυσιολογία της ΔΝΝ γίνεται ακόμα πιο φανερή από την παρατήρηση του γεγονότος ότι μετά την εγκατάσταση της νόσου, ακόμα και ο αυστηρός γλυκαιμικός έλεγχος με την επίτευξη τιμών αρτηριακής πίεσης εντός των θεραπευτικών στόχων που θέτουν οι υπάρχουσες κατευθυντήριες οδηγίες, μπορεί να μην είναι ικανές συνθήκες για να σταματήσουν ή να επιβραδύνουν την εξέλιξη της νόσου (DeFronzo, et al, 2021). Τα τελευταία χρόνια, πέραν του περίπλοκου δικτύου των μεταβολικών αλλαγών, το ενδιαφέρον της έρευνας στρέφεται στο ρόλο των επιγενετικών μηχανισμών και της μετά-μεταφραστικής ρύθμισης στην παθογένεση της νόσου (Hung, et al, 2021). Η κατάσταση υπεργλυκαιμίας στο ΣΔ τροποποιεί τα αμινοξέα των ιστονών, τα οποία υφίστανται μεθυλίωση ή ακετυλίωση, τροποποιώντας τη δομή της χρωματίνης ευνοώντας κατά αυτό τον τρόπο την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων. Τελικό αποτέλεσμα είναι η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη φλεγμονή, την ίνωση αλλά και την ελαττωματική έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό, προδιαθέτοντας σε μεταβολικές διαταραχές και βράχυνση του προσδόκιμου ζωής των ασθενών αυτών (Huang, et al, 2022).

3.8.1 Υπεργλυκαιμία

Η υπεργλυκαιμία αποτελεί τον κύριο παθογενετικό παράγοντα της ΔΝΝ και απουσία αυτής, η νόσος δεν εμφανίζεται. Δεδομένα μελετών αποδεικνύουν πως ασθενείς με τιμές HbA1c εντός

φυσιολογικών ορίων δεν αναπτύσσουν μετρίως αυξημένη αλβουμινουρία (ο όρος «μικροαλβουμινουρία» έχει αντικατασταθεί από τον «μετρίως αυξημένη αλβουμινουρία και αναφέρεται σε τιμές ACR 30-300 mg/g). Αντίθετα, τιμές HbA1c εντός του διαστήματος τιμών του προδιαβήτη, συνοδεύονται από εμφάνιση μετρίως αυξημένης αλβουμινουρίας στο 15-20% των ασθενών αυτών, ενώ στις μελέτες UKPDS και DCCT φάνηκε πως ο αυστηρός γλυκαιμικός έλεγχος μειώνει κατά 50% την αλβουμινουρία, με κάθε μείωση της τιμής της HbA1c κατά 1% να ελαττώνει την εμφάνιση μετρίως αυξημένης αλβουμινουρίας κατά 33%. Στα νεφρικά κύτταρα, η πρόσληψη της γλυκόζης είναι ανεξάρτητη της ινσουλίνης και εξαρτάται μόνο από τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα. Στα πλαίσια του ΣΔ, η υπεργλυκαιμία, οδηγεί σε ανεξέλεγκτη πρόσληψη γλυκόζης από τα σπειραματικά και τα σωληναριακά κύτταρα, προκαλώντας αλλαγές τόσο στη συστατικότητα του μικροαγγειακού τριχοειδικού συστήματος και κατά συνέπεια στην αιματική ροή, όσο και στα μεταβολικά ενδοκυττάρια μονοπάτια. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται εκτροπή της γλυκόζης σε μη γλυκολυτικά μονοπάτια όπως αυτό της εξοζαμίνης και της αναγωγής της αλδόξης. Επιπλέον, σημειώνεται γλυκίωση πρωτεϊνών, παραγωγή τελικών προϊόντων προηγμένης γλυκίωσης (AGEs) και κατά συνέπεια δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, οξειδωτικό στρες και φλεγμονή (Filla, et al, 2016; DeFronzo, et al, 2021). Οι μεταβολικές αυτές διαταραχές, έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση των τριών κρίσιμων σημείων της ΔNN που είναι η σπειραματική υπερτροφία με την επακόλουθη υπερδιήθηση, η φλεγμονή στο σπείραμα και το σωληναριοδιάμεσο ιστό ως αποτέλεσμα ενεργοποίησης χυμοκινών, κυτταροκινών και προϊνωτικών παραγόντων, που οδηγεί σε σπειραματοσκλήρυνση και σωληναριοδιάμεση φλεγμονή και οι αλλαγές στη σύνθεση του εξωκυττάριου στρώματος σε συνδυασμό με την απορρύθμιση της κυτταρικής απόπτωσης που οδηγούν στην εμφάνιση ίνωσης. Το συνολικό αποτέλεσμα των γεγονότων αυτών είναι η πάχυνση της σπειραματικής βασικής μεμβράνης, η εξάλειψη των ποδοκυττάρων, η επέκταση του μεσαγγειακού χώρου και η καταστροφή των σωληναρίων (Gembillo, et al, 2021; Hung, et al, 2021; Lovrencic, et al, 2023). Επιπρόσθετα, η υπεργλυκαιμία επηρεάζει τον αυτορυθμιστικό μηχανισμό που διαθέτουν τα σπειραματικά τριχοειδή ο οποίος υπό φυσιολογικές συνθήκες τους επιτρέπει να προσαρμόζουν τον τόνο τους βάση των αλλαγών της συστηματικής πίεσης. Η υπεργλυκαιμία, προκαλεί μείωση του αγγειακού τόνου κυρίως στο προσαγωγό και σε μικρότερο βαθμό στο απαγωγό αρτηρίδιο, οδηγώντας σε αύξηση τόσο του SN-GFR όσο και του συνολικού GFR. Οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί είναι περίπλοκοι με τα δεδομένα μελετών σε πειραματικά μοντέλα να υποστηρίζουν τη συμμετοχή της

αύξησης του NO και της επαγόμενης από τον TGFβ-1 αύξησης των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS). Στην περαιτέρω αύξηση της ενδοσπειραματικής πίεσης συνεισφέρει η τοπική ενεργοποίηση του συστήματος ρενίνης – αγγειοτενσίνης - αλδοστερόνης (RAAS) λόγω υπεργλυκαιμίας. Η ενεργοποίηση του RAAS έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της αγγειοτενσίνης II και την αγγειοσύσπαση του απαγωγού αρτηριδίου το οποίο είναι 10-100 φορές πιο ευαίσθητο στην αγγειοσυσπαστική της δράση συγκριτικά με το προσαγωγό (Ricciardi, et al, 2022).

3.8.2 Αρτηριακή Υπέρταση

Ο σημαντικότερος παράγοντας που συνεισφέρει στην εξέλιξη της ΔNN, πέραν της υπεργλυκαιμίας, είναι η αρτηριακή υπέρταση. Πράγματι, ασθενείς με φυσιολογικές τιμές αρτηριακής πίεσης παρουσιάζουν βραδύτερη εξέλιξη ενώ η πλημμελής ρύθμισή της επιταχύνει την εξέλιξη της νόσου (DeFronzo, et al, 2021; Jung, et al, 2022). Η σχέση μεταξύ της αρτηριακής υπέρτασης και της εξέλιξης της νεφρικής νόσου είναι αδιαμφισβήτητη και ανεξάρτητη από άλλους συγχυτικούς παράγοντες, με τη σχέση αυτή μάλιστα να είναι εκθετική και όχι γραμμική (Giunti, et al, 2006). Παρόλη τη σημασία της αρτηριακής πίεσης στην εξέλιξη της ΔNN, η επιστημονική κοινότητα δεν έχει καταφέρει να έρθει σε συμφωνία όσον αφορά τα βέλτιστα επίπεδά της, με την τιμή στόχο να αποτελεί αντικείμενο αντιπαράθεσης. Στη μελέτη ADVANCE όπου συμμετείχαν 11140 ασθενείς με ΣΔΤ2, η μείωση της αρτηριακής πίεσης οδήγησε σε ελάττωση κατά 9% τον κίνδυνο επιπλοκών του ΣΔ. Ωστόσο, στις μελέτες ACCORD και INVEST, η ελάττωση της αρτηριακής πίεσης σε τιμές μικρότερες του 130/80 mmHg απέτυχε να ελαττώσει σημαντικά τα κλινικά καταληκτικά σημεία. Οι κατευθυντήριες οδηγίες της American Heart Association και του American College of Cardiology προτείνουν ως στόχο την επίτευξη τιμών αρτηριακής πίεσης μικρότερων του 130/80 mmHg ενώ η American Diabetes Association μικρότερες του 140/80 mmHg (Jung, et al, 2022). Η Ελληνική Διαβητολογική Εταιρεία προτείνει την επίτευξη τιμών συστολικής αρτηριακής πίεσης μεταξύ 130-139 mmHg σε άτομα άνω των 65 ετών και μικρότερες του 130 mmHg αλλά όχι μικρότερες του 120 mmHg σε άτομα μικρότερα των 65 ετών, με την προϋπόθεση ότι επιτυγχάνεται χωρίς ιδιαίτερη επιβάρυνση. Ο στόχος της διαστολικής αρτηριακής πίεσης είναι μεταξύ 70 και 80 mmHg (Κατευθυντήριες Οδηγίες ΕΔΕ, 2024). Στο ΣΔΤ1, το κύριο αίτιο της αρτηριακής υπέρτασης είναι η παρεγχυματική νόσος, με την υπέρταση να εμφανίζεται

κατά τη μετάβαση από το στάδιο της μετρίως σε αυτό της σοβαρά αυξημένης αλβουμινουρίας. Στο ΣΔΤ2, αποτελεί μέρος του μεταβολικού συνδρόμου και είναι ήδη παρούσα σε 1 στους 3 ασθενείς κατά τη διάγνωση της νόσου (Jung, et al, 2022). Σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της ΔΝΝ διαδραματίζει η ενεργοποίηση του RAAS με την αγγειοτενσίνη II να είναι μεταξύ των κύριων ρυθμιστών της νεφρικής βλάβης (Giunti, et al, 2006; DeFronzo, et al, 2021). Η αγγειοτενσίνη II, πέραν της ισχυρής αγγειοσυσπαστικής της δράσης που συνεισφέρει στην αύξηση της ενδοσπειραματικής πίεσης, επάγει την υπερτροφία και την υπερπλασία των μεσαγγειακών κυττάρων, τη συσσώρευση εξωκυττάριου στρώματος, την παραγωγή κυτταροκινών, χυμοκινών και αυξητικών παραγόντων ενώ δρα και ως προφλεγμονώδες μόριο συμμετέχοντας στην παραγωγή υπεροξειδίου μέσω ενεργοποίησης της NADPH οξειδάσης (Cooper, et al, 2004; Giunti, et al, 2006). Οι πολλές και διάφορες δράσεις της αγγειοτενσίνης II εξηγούν το γεγονός ότι τα οφέλη της χορήγησης αναστολέων του RAAS ξεπερνούν την αντιϋπερτασική τους δράση και επεκτείνονται στην ελάττωση της ενδοσπειραματικής πίεσης και της αλβουμινουρίας στη ΔΝΝ (DeFronzo, et al, 2021).

3.8.3 Λιποτοξικότητα

Η δυσλιπιδαιμία που συχνά παρατηρείται στη ΔΝΝ εμπλέκεται στην παθογένεση της νόσου μέσω της λιποτοξικότητας (Marti Perez, et al, 2022). Τα εγγύς εσπειραμένα σωληνάκια, αποτελούν πάνω από το μισό της μάζας του νεφρού και ασκούν πολύ σημαντική δράση μέσω της επαναρρόφησης των περισσότερων διαλυμένων ουσιών και των πρωτεϊνών που διέρχονται από το σπείραμα. Η επαναρρόφηση των διαλυμένων ουσιών αξιοποιεί την κλίση ιόντων που δημιουργείται από τη Na/K ATPάση ενώ η πρόσληψη των πρωτεϊνών γίνεται μέσω ενδοκύττωσης, με την απαιτούμενη ενέργεια να παρέχεται από τη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια των σωληναριακών κυττάρων. Τα λιπαρά οξέα φτάνουν στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο είτε μέσω της κυκλοφορίας, ως ελεύθερα λιπαρά οξέα, είτε από την αλβουμίνη που κατά ένα μικρό ποσοστό διέρχεται του σπειραματικού φραγμού διήθησης και έτσι από την αυλική επιφάνεια των κυττάρων του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου προσλαμβάνονται τα συνδεδεμένα με αλβουμίνη λιπαρά οξέα. Στη ΔΝΝ, η παροχή λιπαρών οξέων στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο είναι ιδιαίτερα αυξημένη τόσο λόγω της δυσλιπιδαιμίας όσο και λόγω της αλβουμινουρίας με αποτέλεσμα να σημειώνεται περίσσεια λιπαρών οξέων. Στο ενδοπλασματικό δίκτυο, η προσθήκη τριών λιπαρών οξέων μέσω εστεροποίησης σε ένα σκελετό γλυκερόλης οδηγεί στη σύνθεση των

τρίακυλογλυκερολών. Στα πλαίσια της ΔΝΝ, λόγω της περίσσειας λιπαρών οξέων, παρατηρείται αύξηση της σύνθεσης των τρίακυλογλυκερολών με αρκετές από αυτές να τοποθετούνται μεταξύ των λιπιδιακών φύλλων του ενδοπλασματικού δικτύου, δημιουργώντας λιπιδιακά σταγονίδια. Τα τελευταία, καλυμμένα από μια στιβάδα φωσφολιπιδίων εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα, οδηγώντας σε λιποτοξικότητα και στρες ενδοπλασματικού δικτύου. Τα λιπαρά οξέα, ιδιαίτερα τα κορεσμένα, συνεισφέρουν στην παθογένεση της ΔΝΝ μέσω ενεργοποίησης προφλεγμονωδών μονοπατιών και δημιουργούν ROS μέσω της β-οξειδωσής τους. Η συμμετοχή της λιποτοξικότητας στην εμφάνιση της ΔΝΝ υπογραμμίζει το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν οι βλάβες στα σωληνάρια και το διάμεσο ιστό στην ανάπτυξη και εξέλιξη της νόσου, με τη δυσλειτουργία του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου να θεωρείται πλέον πρώιμο χαρακτηριστικό στην παθογένεση της ΔΝΝ, παρατήρηση που συχνά παραβλέπεται (Sas, et al, 2016; Marti Perez, et al, 2022).

3.8.4 Υποξία

Ο νεφρός είναι το δεύτερο όργανο μετά την καρδιά σε κατανάλωση οξυγόνου, με την ποσότητα που απαιτείται να υπολογίζεται στα 2,7 mmol/kg/min. Η ποσότητα αυτή του οξυγόνου καταναλώνεται για την παραγωγή ATP, το οποίο με τη σειρά του καταναλώνεται κυρίως στην επαναρρόφηση των διαλυμένων ουσιών από τους μεταφορείς στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο. Για την ικανοποίηση των υψηλών αναγκών σε οξυγόνο, οι νεφροί γίνονται αποδέκτες του 25% της καρδιακής παροχής ενώ και η ανατομική τους εγγύτητα στην κοιλιακή αορτή, επιτρέπει στο αίμα να εισέρχεται με μεγάλη πίεση στο νεφρικό αγγειακό δίκτυο όντας πλούσια οξυγονωμένο (Forbes, et al, 2018; DeFronzo, et al, 2021). Στο υπεργλυκαιμικό περιβάλλον του ΣΔ, η αυξημένη επαναρρόφηση γλυκόζης και νατρίου απαιτεί μεγαλύτερη κατανάλωση ATP και συνεπώς οξυγόνου, λόγω της παραγωγής ενέργειας κυρίως από τον αερόβιο μεταβολισμό. Στη ΔΝΝ, ιδιαίτερα στα αρχικά της στάδια, η κατανάλωση οξυγόνου είναι αυξημένη. Η διαταραχή της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και το οξειδωτικό στρες συνεισφέρουν στην εμφάνιση υποξίας στο νεφρό. Η σχέση μεταξύ του οξειδωτικού στρες και της νεφρικής υποξίας είναι μια αμφίδρομη σχέση κατά την οποία το αυξημένο οξειδωτικό στρες οδηγεί σε μεγαλύτερη κατανάλωση οξυγόνου ενώ η προοδευτική αύξηση της υποξίας αυξάνει περαιτέρω το οξειδωτικό στρες, με τα μιτοχόνδρια να δρουν ως αισθητήρες υποξίας και να ευνοούν την παραγωγή ROS. Στο υποξαιμικό περιβάλλον, πέραν των αυξημένων αναγκών σε οξυγόνο, συνεισφέρει και η αδυναμία του νεφρού να αυξήσει την αιματική του παροχή. Η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και η ίνωση που

παρατηρούνται στη ΔΝΝ οδηγούν σε απώλεια των περισωληναριακών τριχοειδών αγγείων και περαιτέρω ισχαιμική βλάβη. Σε πιο προχωρημένα στάδια της νόσου, η εμφάνιση αναιμίας λόγω ΧΝΝ συμμετέχει στην επιδείνωση της υποξίας (Forbes, et al, 2018; DeFronzo, et al, 2021; Sakashita, et al, 2021). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο παράγοντας HIF1α, η έκφραση του οποίου είναι αυξημένη σε ζωικά μοντέλα ΔΝΝ, με τα επίπεδά του μάλιστα να σχετίζονται με το βαθμό σπειραματοσκλήρυνσης. Ενώ υπό φυσιολογικές συνθήκες ο HIF1α οδηγεί στην μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση της ερυθροποιητίνης, την παραγωγή ενέργειας και την άμυνα έναντι του οξειδωτικού στρες, στη ΔΝΝ για άγνωστους έως σήμερα λόγους οι δράσεις αυτές δεν παρατηρούνται. Σε μια προσπάθεια ελάττωσης της κατανάλωσης οξυγόνου, η ενεργοποίηση του HIF1α προκαλεί μεταβολικό επαναπρογραμματισμό στα νεφρικά κύτταρα με στροφή από τον κύκλο του κιτρικού οξέος σε γλυκολυτικά μονοπάτια (Forbes, et al, 2018; Hasegawa, et al, 2021; DeFronzo, et al, 2021). Η προκύπτουσα υποξία συμμετέχει στην παθογένεση της ΔΝΝ μέσω της παραγωγής φλεγμονωδών και ινωτικών μορίων όπως ο TGF-β και ο TNF προκαλώντας συσσώρευση στοιχείων του εξωκυττάριου στρώματος και ίνωση (DeFronzo, et al, 2021).

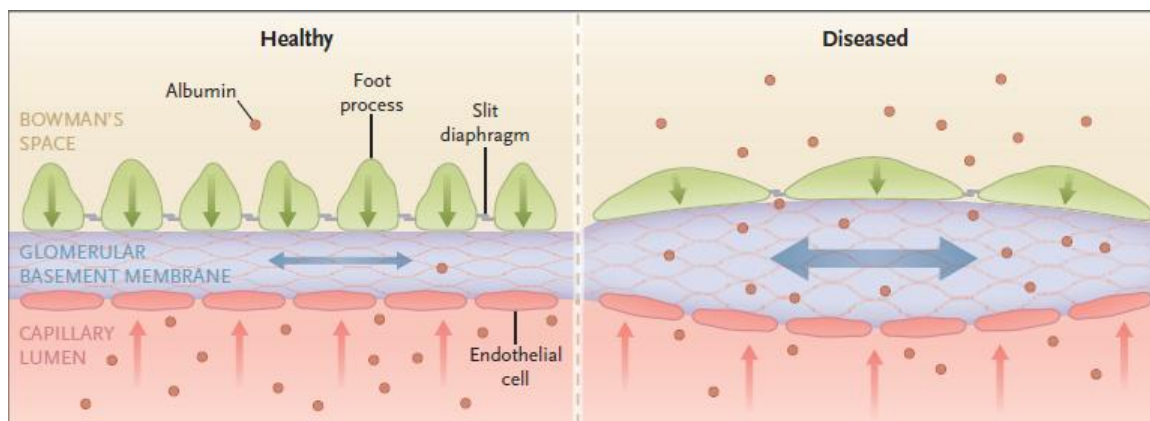
3.8.5 Σύνθεση ATP

Παρόμοια πορεία με αυτή της κατανάλωσης οξυγόνου ακολουθεί και η σύνθεση ATP, ούσα αυξημένη στα αρχικά στάδια της ΔΝΝ ακολουθούμενη από ελάττωσή της στη συνέχεια. Η αρχική αυτή αύξηση αποσκοπεί στην παραγωγή ενέργειας ικανής να καλύψει τις μεταβολικές ανάγκες. Ωστόσο, το ATP που απελευθερώνεται στον εξωκυττάριο χώρο από τα κύτταρα των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων, παίζει το ρόλο του «αισθητήρα» της ροής του σωληναριακού υγρού και της συγκέντρωσης του νατρίου από την πυκνή κηλίδα. Αύξηση των δύο αυτών παραγόντων οδηγεί σε τροποποίηση της σωληναριακής μεταφοράς, αύξηση του GFR και υπερδιήθηση. Η δράση αυτή επιτελείται μέσω της πρόσδεσης του εξωκυττάριου ATP στους P2 πουρινεργικούς υποδοχείς που εκφράζονται ευρέως στα σπειραματικά και στα αγγειακά κύτταρα του νεφρού. Εκτός της προαναφερθείσας δράσης, στο διαβητικό νεφρό, οι αλλαγές στη σηματοδότηση του ATP μέσω των P2 υποδοχέων έχουν παρατηρηθεί πρώιμα κατά τη φυσική εξέλιξη της νόσου και θεωρούνται ικανές να εκκινήσει η διαδικασία της ίνωσης στο σωληναριοδιάμεσο χώρο. Τέλος, η ενεργοποίηση των υποδοχέων αυτών στα σπειραματικά κύτταρα από μόρια που έχουν ως βάση

την αδενίνη συνεισφέρει στην εμφάνιση της αλβουμινουρίας στη ΔΝΝ διαταράσσοντας τη σπειραματική διαπερατότητα (Forbes, et al, 2018).

3.8.6 Ποδοκυτταρική βλάβη

Τα ποδοκύτταρα αποτελούν τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα που παρέχουν μηχανική υποστήριξη στον τριχοειδικό θύσανο του σπειράματος έναντι της ενδοσπειραματικής υδροστατικής πίεσης και συμμετέχουν σε πολλαπλές λειτουργίες (Chitra, et al, 2015; Podgorski, et al, 2019; Butt, et al, 2020). Από τα ποδοκύτταρα εκφύονται οι πρωτογενείς και οι δευτερογενείς αποφυάδες, γνωστές και ως ποδοειδείς εκβλαστήσεις, που περιβάλλουν τον τριχοειδικό θύσανο. Οι αποφυάδες συνδέονται άμεσα με τη σπειραματική βασική μεμβράνη και διαπλέκονται με αυτές γειτονικών ποδοκυττάρων δημιουργώντας μια εξειδικευμένη διακυτταρική επαφή, τη σχισμή διήθησης από την οποία διέρχονται το ύδωρ και διαλυτά μόρια (Butt, et al, 2020). Οι ποδοειδείς εκβλαστήσεις συνδέονται σταθερά με τη ΣΒΜ μέσω πρωτεϊνών, δημιουργώντας μια σύνδεση μεταξύ του ποδοκυττάρου και του εξωκυττάριου στρώματος. Η κύρια πρωτεΐνη που γεφυρώνει την απόσταση μεταξύ δύο ποδοειδών εκβλαστήσεων είναι η νεφρίνη, η οποία ανάλογα με τα μηχανικά ερεθίσματα που δέχεται, εμπλέκεται σε κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια που τροποποιούν τον κυτταροσκελετό των ποδοκυττάρων. Επιπλέον, αλληλεπιδρά με την ποδοκίνη και οργανώνει το λιπιδιακό περιβάλλον του διαφράγματος λειτουργώντας ως ανιχνευτής μηχανικών τάσεων (Benzing, et al, 2021). Τα ποδοκύτταρα, ως βασικό συστατικό του ΣΦΔ διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στο να αποτρέπουν την είσοδο της αλβουμίνης στο διήθημα με τον αριθμό τους και ειδικά την πυκνότητά τους, να συσχετίζεται ισχυρά με την εμφάνιση αλβουμινουρίας και την έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας (Anders, et al, 2018; Podgorski, et al, 2019; DeFronzo, et al, 2021). Στη ΔΝΝ, αποσπώνται από τη ΣΒΜ και ανευρίσκονται στα ούρα, ενώ απώλεια μεγαλύτερη του 20% του αριθμού τους οδηγούν σε απογύμνωση της ΣΒΜ, αλβουμινουρία και ίνωση (Podgorski, et al, 2019; Ricciardi, et al, 2021). Η χρόνια υπεργλυκαιμία έχει ως αποτέλεσμα την υπερτροφία των ποδοκυττάρων, την απώλεια αυτών και την εξάλειψη των αποφυάδων τους (**Εικόνα 7**) (Anders, et al, 2018).



Εικόνα 7: Μορφολογικές αλλαγές ποδοκυττάρων στη ΔΝΝ. Στο διαβητικό περιβάλλον, η υπεργλυκαιμία οδηγεί σε ελάττωση του αριθμού των ποδοκυττάρων, υπερτροφία των εναπομεινάντων και εξάλειψη των ποδοειδών προσεκβολών του (Anders, et al, 2018)

Υπεύθυνοι για την απώλεια των ποδοκυττάρων είναι κυρίως δύο μηχανισμοί: 1) η αυξημένη μηχανική διάταση και οι δυνάμεις διάτμησης που ασκούνται, και 2) η διαταραχή της προσκόλλησης των ποδοκυττάρων στη ΣΒΜ. Η σπειραματική υπέρταση, η υπερδιήθηση και η νεφρική υπερτροφία αυξάνουν το μηχανικό στρες ενώ η φλεγμονή διαταράσσει την προσκόλληση των ποδοκυττάρων λόγω απώλειας της έκφρασης της α3β1 ιντεγκρίνης στον κυτταροσκελετό των ποδοκυττάρων (Kriz, et al, 2015; Anders, et al, 2018). Επιπλέον, τα ποδοκύτταρα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στη λιποτοξικότητα (DeFronzo, et al, 2021). Τα κύτταρα αυτά, εκτός των βοηθητικών μεταφορέων GLUT1 και GLUT4 εκφράζουν και τον υποδοχέα ινσουλίνης, με το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης να είναι σημαντικό για την επιβίωσή τους. Πράγματι, η εξάλειψη του υποδοχέα της ινσουλίνης στα ποδοκύτταρα ζωικών μοντέλων οδηγεί σε εμφάνιση αλβουμινουρίας και χαρακτηριστικών όμοιων με αυτά της ΔΝΝ (Ricciardi, et al, 2021; DeFronzo, et al, 2021). Ένας ακόμη πιθανός μηχανισμός απώλειας των ποδοκυττάρων στη ΔΝΝ είναι η μετάβασή τους από επιθηλιακό σε μεσεγχυματικό φαινότυπο (EMT), μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών όπως το TGF- β /Smad, Wnt/ β -κατενίνης, NF- κ B και MAPKs. Η EMT διαταράσσει τόσο τις διακυτταρικές όσο και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων και εξωκυττάριου χώρου, απελευθερώνοντας τα ποδοκύτταρα από τη ΣΒΜ. Η διαδικασία αυτή προσδίδει στα ποδοκύτταρα χαρακτηριστικά μυοϊνοβλαστών και τη δυνατότητα παραγωγής εξωκυττάριας ουσίας. Ο κυτταροσκελετός τους αναδιοργανώνεται επιτρέποντας τη μετανάστευσή τους με το μεταγραφικό τους πρόγραμμα να αλλάζει επιτρέποντας τους να διατηρούνται σε μεσεγχυματικό φαινότυπο και ταυτόχρονη απώλεια

των επιθηλιακών τους χαρακτηριστικών. Η αλλαγή αυτή αντικατοπτρίζεται από φαινοτυπικούς δείκτες, με αντικατάσταση των επιθηλιακών (νεφρίνη) από μεσεγγυματικούς (δεσμίνη) με την έκφραση των τελευταίων να σχετίζεται με την βαρύτητα της κλινικής και ιστοπαθολογικής εικόνας της νόσου (Daehn, et al, 2018; Podgorski, et al, 2019). Η έκθεση των ποδοκυττάρων σε συνθήκες υπεργλυκαιμίας οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή ROS μέσω της NADPH οξειδάσης, ενεργοποιώντας την MAPK και τον καταρράκτη της κασπάσης 3 καταλήγοντας στην απόπτωση των ποδοκυττάρων (Daehn, et al, 2018). Ως απάντηση στην απώλεια των ποδοκυττάρων, παρατηρείται αντιρροπιστικά υπερτροφία αυτών (Anders, et al, 2018). Σημαντικό ρόλο στην παρατηρούμενη υπερτροφία διαδραματίζει η αυξητική ορμόνη (GH), υποδοχείς της οποίας εκφράζονται στα ποδοκύτταρα. Στα πλαίσια του ΣΔ, τα επίπεδα της GH αυξάνουν καθώς η ανεπάρκεια σε ινσουλίνη διαταράσσει την ηπατική παραγωγή του IGF-1, με τα επίπεδα της GH να αυξάνουν ως αποτέλεσμα αρνητικής ανατροφοδότησης (Reddy, et al, 2007; Chitra, et al, 2015; Podgorski, et al, 2019). Η υπερτροφία των ποδοκυττάρων προκαλεί τη σταδιακή αποκόλλησή τους από τη ΣΒΜ. Η GH συμμετέχει περαιτέρω στην ποδοκυτταρική βλάβη μέσω της παραγωγής ROS και την επαγωγή της EMT. Στην υπερτροφία συμμετέχει και η συσσώρευση σφιγγομυελιδίων στα ποδοκύτταρα, με τη συσσώρευση κεραμιδίων να σχετίζεται με την ποδοκυτταροπενία (Chitra, et al, 2015; Podgorski, et al, 2019). Η ποδοκυτταρική βλάβη, οι αλλαγές στον κυτταροσκελετό τους και η διαταραχή των συνδέσεών τους με το εξωκυττάριο στρώμα οδηγεί στην αποπλάτυνση των αποφυάδων τους (Benzing, et al, 2021). Ο αριθμός και η πυκνότητα των ποδοκυττάρων, η αποκόλληση των ποδοκυττάρων προσεκβολών τους από τη ΣΒΜ και η απώλεια της θεϊκής ηπαράνης, δηλαδή του συστατικού του γλυκοκάλυκα που παρέχει στο πειραματικό φραγμό εκλεκτικότητα ως προς το φορτίο, σχετίζονται με την αλβουμινουρία στο ΣΔ (DeFronzo, et al, 2021). Το γεγονός ότι οι αλλαγές αυτές είναι μη αναστρέψιμες σε συνδυασμό με το ότι τα ποδοκύτταρα αποτελούν τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα με περιορισμένη ικανότητα αναγέννησης, καθιστά την αποφυγή της ποδοκυτταρικής βλάβης επιτακτική (Benzing, et al, 2021). Η ποδοκυτταρική βλάβη προκαλεί βλάβες και στα λοιπά τμήματα του νεφρώνα, καθώς η προκαλούμενη διαταραχή του ΣΦΔ επιτρέπει τη διέλευση ΛΟ συνδεδεμένων με την αλβουμίνη προκαλώντας, όπως προαναφέρθηκε, διαταραχές στο σπείραμα και το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, λόγω οξείδωσης των ΛΟ στα μιτοχόνδρια δημιουργώντας ROS, επιδεινώνοντας τη σωληναριοδιάμεση ίνωση και το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (DeFronzo, et al, 2021).

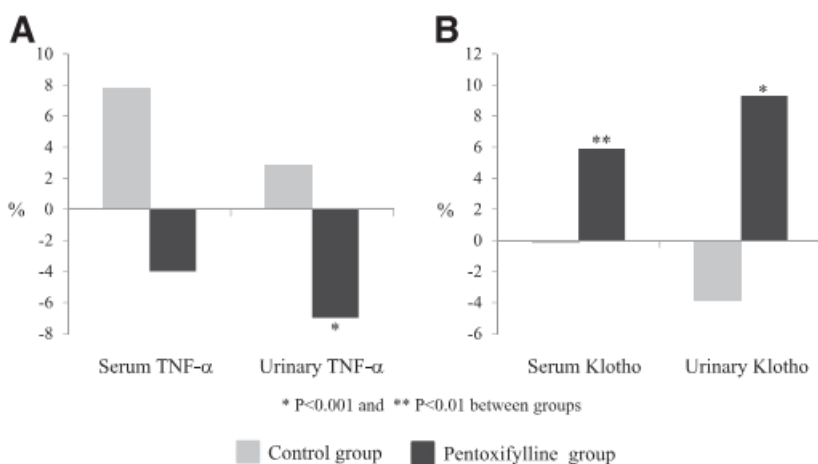
3.8.7 Αλβουμινουρία

Εκτός από κλινική εκδήλωση της ΔΝΝ, η αλβουμινουρία αποτελεί και μηχανισμό που συνεισφέρει στην παθογένεση της νόσου καθώς η παρουσία της αλβουμίνης στο πειραματικό διήθημα οδηγεί σε έκπτυξη του μεσαγγειακού χώρου, πειραματοσκλήρυνση και σωληναριοδιάμεση βλάβη. Η τελευταία συνεισφέρει και στην επιδείνωση της αλβουμινουρίας λόγω της μείωσης της επαναρρόφησης της διηθούμενης ποσότητας αλβουμίνης από τα σωληνάρια καθώς επίσης και λόγω της μείωσης της αποδόμησής της στα σωληναριακά κύτταρα (DeFronzo, et al, 2021).

3.8.8 Φλεγμονή

Η φλεγμονή αποτελεί ένα σχετικά νέο παθογενετικό μηχανισμό της επιδείνωσης της νεφρικής λειτουργίας στη ΧΝΝ, με σημαντική συμμετοχή στην εμφάνιση των επιπλοκών της (Debnath, et al, 2017). Στη ΔΝΝ, οι διαταραχές του ενδοκυττάριου μεταβολισμού προάγουν την παραγωγή προφλεγμονωδών μορίων και ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια (NF- κ B, JAK-STAT) που οδηγούν στη διήθηση του σπειράματος από μακροφάγα και την αυξημένη προσκόλληση μονοκυττάρων (DeFronzo, et al, 2021; Shi, et al, 2023). Τα μακροφάγα αυτά απελευθερώνουν λυσοσωμιακά ένζυμα, ROS, VEGF, TGF-β και κυτταροκίνες (TNF, IL-1, IFN-γ) που εμπλέκονται στην εμφάνιση και την εξέλιξη της ΔΝΝ (DeFronzo, et al, 2021). Η συμμετοχή των μορίων αυτών στηρίζεται περαιτέρω από τα δεδομένα μελετών πειραματικών μοντέλων ΣΔΤ1 και ΣΔΤ2 όπου η αποσιώπηση των γονιδίων που μεταφράζονται στα μόρια ICAM-1 και CCL2 και επάγουν τη διήθηση του νεφρού από μακροφάγα, μειώνει τα επίπεδα της φλεγμονής και της αλβουμινουρίας. Από τις κυτταροκίνες που συμμετέχουν στη φλεγμονή καλύτερα μελετημένος είναι ο TNF-α. Στους ασθενείς με ΔΝΝ, έχουν παρατηρηθεί υψηλότερα επίπεδα TNF-α συγκριτικά με τον υγιή πληθυσμό, με τα επίπεδά του να είναι ακόμα πιο αυξημένα σε ασθενείς που εμφανίζουν αλβουμινουρία. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το συμπέρασμα μιας μελέτης (μελέτη PREDIAN) 61 ασθενών με ΔΝΝ και αλβουμινουρία όπου η προσθήκη πεντοξυφυλλίνης στη χορήγηση αναστολέων του RAAS είχε ως αποτέλεσμα την περαιτέρω ελάττωση της

αλβουμινουρίας και των επιπέδων του TNF- α . Στην *post hoc* ανάλυση της μελέτης αυτής παρατηρήθηκε ταυτόχρονη αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης Klotho, μιας πρωτεΐνης με αντιγηραντικές ιδιότητες, στα ούρα και τον ορό των ασθενών, υποδεικνύοντας ότι η πεντοξυφυλλίνη ασκεί την αντιπρωτεϊνουρική της δράση μέσω ελάττωσης της φλεγμονής και αντιμετώπισης της επιταχυνόμενης κυτταρικής γήρανσης (**Εικόνα 8**) (Jung, et al, 2022).



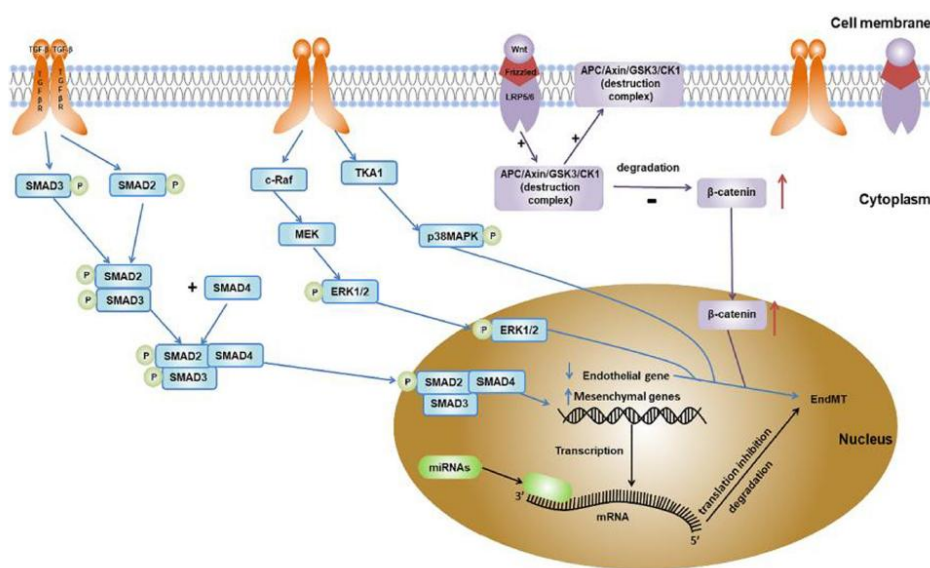
Εικόνα 8: Η χορήγηση πεντοξυφυλλίνης σε ασθενείς με ΔΝΝ υπό αναστολείς του RAAS ελαττώνει τα επίπεδα του TNF- α και αυξάνει τα επίπεδα της Klotho. Μέση ποσοστιαία μεταβολή των επιπέδων του TNF- α (A) και της διαλυτής Klotho (B) συγκριτικά με τα επίπεδα αναφοράς σε ασθενείς με ΔΝΝ που βρισκόταν υπό αγωγή με αναστολείς του RAAS ύστερα από τη χορήγηση πεντοξυφυλλίνης. (Jung, et al, 2022)

Όσον αφορά τα σηματοδοτικά μονοπάτια, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει το μονοπάτι του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B, ενός μεταγραφικού παράγοντα που αποτελεί ισχυρό ρυθμιστή της φλεγμονής και αυξάνει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν κυτταροκίνες, ιντερλευκίνες και μόρια προσκόλλησης που εμπλέκονται στη ΔΝΝ. Τέλος, ένα ακόμα σημαντικό μονοπάτι που συμμετέχει στη διαδικασία της φλεγμονής, όντας ενεργοποιημένο σε πολλούς κυτταρικούς τύπους (ποδοκύτταρα, μεσαγγειακά κύτταρα, σωληναριακά κύτταρα) είναι το JAK-STAT. Το μονοπάτι αυτό εμφανίζει αυξημένη έκφραση σε δείγματα βιοψιών ασθενών με διαβητική σπειραματοπάθεια, με την έκφρασή του μάλιστα να συσχετίζεται με τη βαρύτητα της νόσου (DeFronzo, et al, 2021; Shi, et al, 2023).

3.8.9 Ίνωση

Η νεφρική ίνωση ιστοπαθολογικά εκδηλώνεται ως ίνωση του σωληναροδιάμεσου ιστού, ατροφία των σωληναρίων, σπειραματοσκλήρυνση και γενικότερη διαταραχή της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής του νεφρικού παρεγχύματος και αποτελεί συνέπεια της μακροχρόνιας επίδρασης παραγόντων όπως η υπεργλυκαιμία, το οξειδωτικό στρες και η φλεγμονή (DeFronzo, et al, 2021; Chen, et al, 2022). Αν και οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί δεν είναι πλήρως κατανοητοί, το χαρακτηριστικό είναι η παθολογική ενεργοποίηση των μυοϊνοβλαστών που αποτελούν τον κύριο κυτταρικό τύπο που ενεργοποιείται στην ίνωση (Hung, et al, 2021). Οι μυοϊνοβλάστες είναι μια ετερογενής ομάδα κυττάρων που προέρχονται από μεσεγχυματικά κύτταρα, τα κύτταρα των σωληναρίων, τα σπειραματικά ενδοθηλιακά κύτταρα και τα μακροφάγα . Οι ενεργοποιημένοι μυοϊνοβλάστες παράγουν κολλαγόνο και συνεισφέρουν στη συσσώρευση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Koszegi, et al, 2019; Chen, et al, 2022). Κατά την ίνωση, ο λειτουργικός ιστός αντικαθίσταται από πρωτεΐνες όπως το κολλαγόνο τύπου I, III, λαμινίνη και ινονεκτίνη (DeFronzo, et al, 2021; Braga, et al, 2022). Η ινονεκτίνη αποτελεί την πρώτη πρωτεΐνη που εναποτίθεται κατά τη διαδικασία της ίνωσης, ενεργοποιεί ιντεγκρίνες και λειτουργεί χημειοτακτικά ως προς τους ινοβλάστες παράγοντας ακόμα περισσότερες πρωτεΐνες του εξωκυττάριου στρώματος (Genovese, et al, 2014). Η υπεργλυκαιμία επιβραδύνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αυξάνει την έκφραση του m RNA, την πρωτεϊνοσύνθεση και τη συσσώρευση πρωτεϊνών του εξωκυττάριου στρώματος. Στη συσσώρευσή τους συμμετέχει και η μη ενζυμική γλυκίωσή τους, επιβραδύνοντας την αποδόμησή τους (Abrass, et al, 1995). Εκτός των μεταβολικών παραγόντων όπως η υπεργλυκαιμία, αιμοδυναμικές μεταβολές όπως η τοπική ενεργοποίηση του RAAS διαδραματίζουν καίριο ρόλο (Ricciardi, et al, 2021). Η τελευταία, οδηγεί στην κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση των μυοϊνοβλαστών με την αγγειοτασίνη II να αυξάνει τη μεταγραφή και την έκφραση του κολλαγόνου I και των αυξητικών παραγόντων IGF-1 και TGF-β αλλάζοντας συνεχώς τη σύνθεση και το ποσό των πρωτεϊνών (Abrass, et al, 1995; Koszegi, et al, 2019). Η υπεργλυκαιμία και η τοπική ενεργοποίηση του RAAS αποτελούν τα κύρια ερεθίσματα της θετικής ρύθμισης του σηματοδοτικού μονοπατιού TGF β-RhoA/Rho οδηγώντας σε ενεργοποίηση των μυοϊνοβλαστών, σύνθεση του εξωκυττάριου στρώματος και την EMT των σωληναριακών κυττάρων (Ricciardi, et al, 2021; Hung, et al, 2021). Η υπερέκφραση του TGF β στη ΔΝΝ καταλήγει στην EMT μέσω δύο μονοπατιών που αλληλεπιδρούν και ρυθμίζουν τη διαδικασία. Στο πρώτο μονοπάτι, ο TGF β ενεργοποιεί ειδικούς υποδοχείς με ενδογενή δράση

κινάσης στην κυτταρική επιφάνεια, οι οποίοι στη συνέχεια φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν Smad 2/3 ετεροδιμερή επάγοντας την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων στόχων εκκινώντας την EMT. Στο δεύτερο μονοπάτι, ο TGF β ενεργοποιεί τον p38 MAPK και AKT, ρυθμίζοντας τη μεταγραφή γονιδίων που εκκινούν την EMT. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης αποτελεί ένα ακόμα σημαντικό σηματοδοτικό μονοπάτι στη διαδικασία της ίνωσης και ρυθμίζει τον TGF β, ενεργοποιεί τη σηματοδότηση GSK-3β και επάγει την απόπτωση των μεσαγγειακών κυττάρων. Επιπρόσθετα, η ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt/β-κατενίνης έχει ως αποτέλεσμα την πρόσδεση του Wnt στο σύμπλοκο υποδοχέα του, οδηγώντας στο σύμπλοκο καταστροφής της β κατενίνης στην κυτταρική μεμβράνη παρεμποδίζοντας τη φωσφορυλίωση και την αποδόμησή της. Η συσσώρευση β κατενίνης στο κυτταρόπλασμα, την μετατοπίζει στον πυρήνα όπου ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων στόχων του Wnt, με τελικό αποτέλεσμα την μυοϊνοβλαστογένεση και EMT (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη διαδικασία της ίνωσης στη ΔΝΝ.
(Chen, et al, 2022)

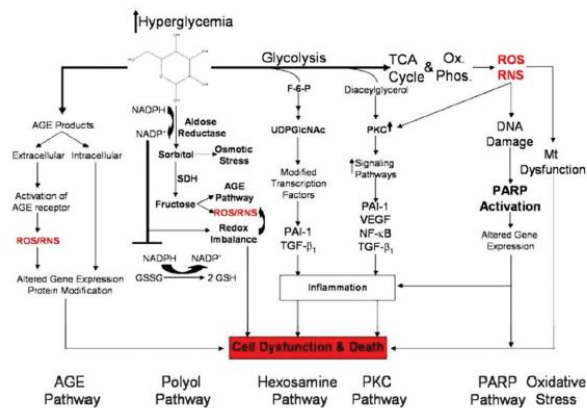
Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών που εντοπίζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα παρουσιάζει ενδιαφέρον ως αντι-ινωτικό μόριο με την εξάλειψή του να προάγει την ίνωση αυξάνοντας τη θετική ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt/β-κατενίνης. Τέλος, η φλεγμονή συμμετέχει στη διαδικασία της ίνωσης καθώς οι παραγόμενες από τα κύτταρα της φλεγμονής κυτταροκίνες και τα μακροφάγα στρατολογούν μυοϊνοβλάστες, οδηγούν σε πολλαπλασιασμό και ενεργοποίηση

αυτών αλλά και τα ίδια μετατρέπονται σε μυοϊνοβλάστες (Hung, et al, 2021; Chen, et al, 2022). Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η συσσώρευση συνδετικού ιστού συνεχίζει ακόμα και μετά τη λύση της πρωτοπαθούς διεργασίας καθιστώντας την ίνωση την ισχυρότερη ένδειξη εξέλιξης της XNN (Genovese, et al, 2014, Hung, et al, 2021).

3.8.10 Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες δημιουργείται λόγω αδυναμίας διατήρησης της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας υπό συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις με αποτέλεσμα τη συσσώρευση δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS). Τα ROS είναι παραπροϊόντα του μεταβολισμού του οξυγόνου με κύρια πηγή στα κύτταρα των θηλαστικών να είναι η διαφυγή ηλεκτρονίων από την αναπνευστική αλυσίδα στα μιτοχόνδρια και η επακόλουθη μεταφορά τους στο μοριακό οξυγόνο (Singh, et al, 2011; Nowotny, et al, 2015). Σε αυτά τα μόρια περιλαμβάνονται ελεύθερες ρίζες όπως το ανιόν του υπεροξειδίου (O_2^-) και το υδροξύλιο αλλά και μόρια που δεν αποτελούν ρίζες όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Σε συνθήκες οξειδοαναγωγικής ισορροπίας, τα ROS διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση λειτουργώντας ως δεύτεροι αγγελιοφόροι και ρυθμίζοντας τις ενδοκυτταρικές οδούς μεταγωγής σήματος διατηρώντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική επιβίωση υπό αυστηρή ρύθμιση (Lassen ,et al, 2020; Braga, et al, 2022). Η διαταραχή της ισορροπίας αυτής, είτε λόγω αυξημένης παραγωγής των ROS είτε λόγω μειωμένης ικανότητας του αντιοξειδωτικού συστήματος, οδηγεί σε οξειδωτικό στρες και επακόλουθες κυτταρικές αλλαγές, βλάβη στις κυτταρικές μεμβράνες και σε ζωτικά βιομόρια (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια) με τελικό αποτέλεσμα την οργανική δυσλειτουργία και τη συσχέτιση αυτού με την κυτταρική γήρανση και την εμφάνιση εκφυλιστικών νόσων (Singh, et al, 2011; Ighodaro, et al, 2018; Lassen, et al, 2020). Η οξειδοαναγωγική αυτή ισορροπία είναι ευάλωτη και επηρεάζεται από μεταβολικές διαταραχές, με το διαβητικό περιβάλλον να ευνοεί τις συνθήκες οξειδωτικού στρες σε όλους τους κυτταρικούς τύπους του νεφρώνα. Στα πλαίσια του ΣΔ, οι αυξημένες ενεργειακές ανάγκες που παρουσιάζουν οι νεφροί, όργανα που ακόμα και υπό φυσιολογικές συνθήκες έχουν υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις, καθιστούν τα όργανα αυτά ευάλωτα στο οξειδωτικό στρες. Στο νεφρό, η δημιουργία των ROS επιτελείται μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων, του κυτοχρώματος P450, της συνθάσης του NO, των οξειδασών της NADPH (NOX) και της οξειδάσης της ξανθίνης, με τα μιτοχόνδρια και τις NOX να αποτελούν τις κυριότερες πηγές (Daehn, et al, 2018; Lassen, et al, 2020; Sakashita, et al, 2021;

Braga, et al, 2022). Ακόμη και σε συνθήκες νορμογλυκαιμίας, ένα μικρό ποσοστό ηλεκτρονίων που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία κλίσης ηλεκτρονίων και κατ' επέκταση τη σύνθεση ATP, απορροφάται από το οξυγόνο και σχηματίζεται υπεροξείδιο. Η επιβλαβής δράση αυτού, αντιμετωπίζεται από τη δράση της γλουταθειόνης και τα ένζυμα δισμουτάση και καταλάση του υπεροξειδίου που μετατρέπουν το τελευταίο σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και στη συνέχεια σε νερό αντίστοιχα. Σε συνθήκες υπεργλυκαιμίας ωστόσο, τα ηλεκτρόνια που διαφεύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων αυξάνονται με αποτέλεσμα να σχηματίζονται περισσότερα ROS που προκαλούν κορεσμό στην ενδογενή αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού, με αποτέλεσμα μιτοχονδριακή και κυτταροπλασματική βλάβη (Filla, et al, 2016). Στην αύξηση της παραγωγής των ROS συνεισφέρει το γεγονός ότι η υπεργλυκαιμία οδηγεί σε κορεσμό της γλυκόλυσης και στροφή των ενδοθηλιακών κυττάρων σε άλλα μονοπάτια όπως της εξοξαμίνης, της πολυόλης, των AGEs και της PKC (Εικόνα 10) (Lassen, et al, 2020).



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση της επίδρασης της υπεργλυκαιμίας στα μεταβολικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη ΔΝΝ. Η αύξηση του μεταβολισμού της γλυκόζης οδηγεί σε περίσσεια NADH και υπερφόρτωση της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, με αποτέλεσμα οξειδωτικό στρες, μιτοχονδριακή βλάβη και ενεργοποίηση της PARP. Ο συνδυασμός υπεργλυκαιμίας και οξειδωτικού στρες ενεργοποιεί επιβλαβή μονοπάτια όπως αυτά των AGEs, της πολυόλης, της εξοξαμίνης, της PKC οδηγώντας σε διαταραχή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας και περαιτέρω οξειδωτικό στρες (Filla, et al, 2016).

Πέραν της συμμετοχής του στη φλεγμονή και την ίνωση, το οξειδωτικό στρες προηγείται και της εμφάνισης της δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου, σήμα κατατεθέν του ΣΔΤ2 και της ΔΝΝ. Το ενδοθήλιο, πέραν του να αποτελεί το βιολογικό φραγμό μεταξύ του αίματος και των λείων μυϊκών

κυττάρων, ρυθμίζει τον αγγειακό τόνο, την αιμόσταση, την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων και τη φλεγμονή. Η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου χαρακτηρίζεται από μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα του NO με αποτέλεσμα την επαγόμενη από το NO αγγειοδιαστολή αλλά περιλαμβάνει επίσης την αδυναμία εξασφάλισης της ισορροπίας μεταξύ προπηκτικών και αντιπηκτικών μεσολαβητών όπως επίσης και μεταξύ ουσιών που ευνοούν ή αναστέλλουν την αγγειακή ανάπτυξη. Η μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του NO προκύπτει λόγω της απενεργοποίησης της συνθάσης του NO, του ενζύμου που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του από την αργινίνη αλλά και λόγω αύξησης των ROS (Singh, et al, 2011; Daehn, et al, 2018; DeFronzo, et al, 2021). Η μειωμένη βιοδιαθεσιμότητας NO οδηγεί σε αποσύζευξη της συνθάσης του NO και το σχηματισμό υπεροξειδίου και υπεροξυνιτρίτη. Στη συνέχεια της αντίδρασης, η οξείδωση της τετραϋδροβιοπτερίνης, συμπαράγοντα της συνθάσης του NO, οδηγεί σε περαιτέρω μείωση αυτού και αποσύζευξη της συνθάσης του NO, συνθέτοντας έναν φαύλο κύκλο περαιτέρω παραγωγής οξειδωτικού στρες (Lassen, et al, 2020). Η βλάβη του ενδοθηλίου είναι σημαντικός παράγοντας στην παθογένεση και την εξέλιξη της ΔNN, με παράγοντες που εκκρίνονται από δυσλειτουργικά ενδοθηλιακά κύτταρα όπως οι VWF, VCAM-1, ICAM-1 να παρουσιάζουν θετική συσχέτιση με την εξέλιξη της νόσου. Από πειραματικά μοντέλα ποντικών με ΣΔ διάρκειας 3 εβδομάδων προκύπτει ότι πιθανόν η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου είναι πρόιμη βλάβη και προηγείται της βλάβης των ποδοκυττάρων καθώς φάνηκε πως τα ενδοθηλιακά κύτταρα παρουσιάζουν μείωση του αριθμού των θυρίδων τους και εμφάνιση κυτταροπλασματικών προεξοχών ενώ κατά το ίδιο χρονικό διάστημα τα ποδοκύτταρα διατηρούν τη μορφολογία τους και δεν παρατηρείται εξάλειψη των αποφυάδων τους (Daehn, et al, 2018). Στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες στη ΔNN συνεισφέρουν τα εξής μονοπάτια:

- *Γλυκόλυση*

Η γλυκόλυση αρχίζει με τη φωσφορυλίωση της γλυκόζης από την εξοκίνηση προς σχηματισμό 6 φωσφορικής γλυκόζης, η οποία δύναται να ακολουθήσει δύο μονοπάτια, είτε να παραγάγει NADPH από NADP^+ μέσω του μονοπατιού της φωσφορικής πεντόζης, είτε να συνεχίσει στο μονοπάτι της γλυκόλυσης και υπό τη δράση του ενζύμου GAPDH να παραγάγει 3 φωσφορική γλυκεραλδεΐδη και εν τέλει πυροσταφυλικό, που αποτελεί το τελικό προϊόν της γλυκόλυσης. Το πυροσταφυλικό αποτελεί το μόριο εκείνο που συνδέει τη γλυκόλυση με τον κύκλο του Krebs (TCA) και την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Συγκεκριμένα, αποκαρβοξυλιώνεται και

συνδέεται με το ακετύλο-CoA σημαίνοντας την έναρξη του TCA στο μιτοχονδριακό στρώμα. Χρησιμοποιώντας τα ενδιάμεσα προϊόντα του TCA, δηλαδή το NADH και FADH₂ τα οποία οξειδώνονται, δημιουργείται κλίση πρωτονίων την οποία εκμεταλλεύεται η έσω μιτοχονδριακή μεμβράνη ώστε να παραγάγει ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Όπως προαναφέρθηκε, οι συνθήκες υπεργλυκαιμίας οδηγούν στη συσσώρευση ROS και σε οξειδωτική βλάβη σημαντικών βιομορίων, μεταξύ άλλων στο πυρηνικό DNA. Η βλάβη του πυρηνικού DNA έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση επιδιορθωτικών μηχανισμών ενζύμων αυτού, όπως το PARP-1. Το PARP-1 αναστέλλει τη δράση του GAPDH με αποτέλεσμα τη συσσώρευση ενδιάμεσων προϊόντων της γλυκόλυσης όπως η 3 φωσφορική γλυκεραλδεΐδη, η 6 φωσφορική φρουκτόζη, η 6 φωσφορική γλυκόζη και η γλυκόζη, ευνοώντας την ενεργοποίηση προ-οξειδωτικών μονοπατιών που συνεισφέρουν στην επιδείνωση της οξειδωτικής βλάβης. Πιο συγκεκριμένα, η 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη ενεργοποιεί τα μονοπάτια των AGEs και της PKC, ενώ το ίδιο μόριο αυτό-οξειδώνεται προς παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου. Η 3 φωσφορική φρουκτόζη ενεργοποιεί το μονοπάτι της εξοζαμίνης ενώ η γλυκόζη αυτό της πολυόλης. Η συσσώρευση της γλυκόζης έχει ως αποτέλεσμα την ενδοκυττάρια αυτό-οξείδωσή της και το σχηματισμό γλυκοζικού που αποτελεί πρόδρομο μόριο των AGEs (Igdoharo, et al, 2018).

- *Προϊόντα προχωρημένης γλυκίωσης (Advanced Glycation End Products-AGEs)*

Τα AGEs αποτελούν ένα σύνολο διάφορων ετερογενών μορίων που σχηματίζονται ως αποτέλεσμα του μη ενζυμικού, ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ καταλοίπων γλυκόζης με την ελεύθερη αμινομάδα πρωτεϊνών, λιπιδίων και νουκλεϊκών οξέων κατά τη λεγόμενη αντίδραση Maillard (Singh, et al, 2011; Filla, et al, 2016; Igdoharo, et al, 2018). Ο σχηματισμός των μορίων αυτών συμβαίνει είτε ενδοκυττάρια είτε εξωκυττάρια με την υπεργλυκαιμία να διαδραματίζει τον κύριο ρόλο. Η υπεργλυκαιμία οδηγεί στη δημιουργία πρόδρομων μορφών AGEs όπως το γλυκοζικό από τη συσσώρευση γλυκόζης, το μεθυλγλυκοζικό που παράγεται από τη μη ενζυμική αποφωσφορυλίωση των φωσφορικών τριοζών και τη δεοξυγλυκοζόνη που προκύπτει από τη διάσπαση του προερχόμενου από τη γλυκόζη, παραγώγου Amadori (Igdoharo, et al, 2018). Στη συνέχεια, τα πρόδρομα αυτά μόρια αντιδρούν με τις αμινομάδες των βιομορίων και παράγονται τα AGEs. Τα AGEs αποτελούν επιβλαβή μόρια, με τη συσσώρευσή τους στο ΣΔ να συσχετίζεται με την εμφάνιση επιπλοκών της νόσου όπως η ΔΝΝ. Η παρουσία τους στους ιστούς συνεχίζεται για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την επίτευξη του γλυκαιμικού στόχου, παρατήρηση

που καθιστά επιτακτική την πρόωπη διάγνωση της ΔΝΝ αλλά και την ταχεία επίτευξη των θεραπευτικών στόχων. Τα AGEs ασκούν τη δράση τους είτε άμεσα είτε μέσω της σύνδεσής τους με υποδοχείς αυτών (RAGEs) (Nowotny, et al, 2015; Filla, et al, 2016; Hung, et al, 2021). Η δράση τους συνοψίζεται στη διαταραχή της ενδοκυττάριας σηματοδότησης, στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη φλεγμονή, την απελευθέρωση προφλεγμονωδών μορίων και την παραγωγή ROS (Aghadavod, et al, 2016). Επιπλέον, τροποποιούν τις πρωτεΐνες του εξωκυττάριου στρώματος, τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις αλλά και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών και των κυττάρων με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο, τη διαταραχή της κυτταρικής διαφοροποίησης αλλά και τη διαταραχή της προσκόλλησης και της μετανάστευσης των κυττάρων. Επιπρόσθετα, η σύνδεσή τους στους RAGEs καταλήγει στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ και την έκφραση προφλεγμονωδών γονιδίων όπως αυτά των IL-6, TNF-α και MCP-1 (Nowotny, et al, 2015; Hung, et al, 2021). Η προκύπτουσα φλεγμονή επιμένει στον ιστό για αρκετό διάστημα μετά την επίτευξη νορμογλυκαιμίας, τονίζοντας τη σπουδαιότητα της μεταβολικής μνήμης (Filla, et al, 2016). Ένα άλλο αποτέλεσμα της πρόσδεσης των AGEs στους υποδοχείς τους, είναι η ενεργοποίηση των NADPH οξειδασών, αυξάνοντας τον ενδοκυττάριο σχηματισμό ROS, με τις προκύπτουσες οξειδωτικές συνθήκες να συνεισφέρουν στην περαιτέρω αύξηση των AGEs. Τέλος, οδηγούν στην έκφραση του TGFβ μέσω της PKC συνεισφέροντας στην ίνωση και αυξάνουν την έκφραση του VEGF στα μεσαγγειακά κύτταρα επάγοντας την απόπτωσή τους, συνεισφέροντας στην αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα και κατά συνέπεια στην υπερδιήθηση και την πρωτεϊνουρία (Nowotny, et al, 2015; Aghadavod, et al, 2016).

- *Protein kinase C (PKC)*

Η PKC αποτελεί μια κινάση θρεονίνης/σερίνης και ανήκει σε μια οικογένεια πρωτεϊνών που τροποποιεί τη λειτουργία άλλων πρωτεϊνών μέσω φωσφορυλίωσης. Αποτελεί σημαντικό στοιχείο των μονοπατιών της διακυλογλυκερόλης, της φωσφατιδυλοσερίνης και του ασβεστίου ενώ ενεργοποιείται από αυξημένα επίπεδα διακυλογλυκερόλης. Στο ΣΔ, παρατηρείται αύξηση της διακυλογλυκερόλης καθώς λόγω οξειδωτικού στρες σημειώνεται συσσώρευση 3 φωσφορικής γλυκερόλης και της ισομορφής αυτής, της 3 φωσφορικής διϋδροξυακετόνης. Η ισομορφή αυτή οξειδώνεται σε 3 φωσφορική γλυκεραλδεϋδη και παρουσία λιπαρών οξέων, σχηματίζεται διακυλογλυκερόλη. Στην αύξηση της διακυλογλυκερόλης συμμετέχουν επίσης η υδρόλυση της φωσφατιδυλοχολίνης και της φωσφατιδυλοσερίνης. Τα αυξημένα επίπεδα της PKC στο νεφρό

διεγείρουν την ενεργοποίηση της NADPH οξειδασών και λιποξυγενασών που παράγουν ROS, τη μείωση της παραγωγής του NO, την αύξηση της έκφρασης προφλεγμονωδών γονιδίων και της έκφρασης των στοιχείων του εξωκυττάριου χώρου, τόσο άμεσα όσο και μέσω του TGFβ αλλά και την ρύθμιση του VEGF επηρεάζοντας τη συστολή των λείων μυϊκών ινών, την αιμοδυναμική, την διαπερατότητα και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων (Filla, et al, 2016; Aghadavod, et al, 2016; Igdoharo, et al, 2018).

- *Μονοπάτι της εξοζαμίνης*

Το μονοπάτι της εξοζαμίνης αποτελεί ένα μεταβολικό μονοπάτι το οποίο είναι ενεργό ακόμα και υπό φυσιολογικές συνθήκες καθώς ένα μικρό ποσοστό της γλυκόζης, υπολογιζόμενο στο 2-5%, μεταβολίζεται από το μονοπάτι αυτό (Schleicher, et al, 2000; Igdoharo, et al, 2018). Αποτελεί παρακλάδι της γλυκόλυσης καθώς συμμετέχει στο μεταβολισμό της 6-φωσφορικής φρουκτόζης. Το μονοπάτι της εξοζαμίνης εμπλέκεται στην εμφάνιση τόσο του ΣΔ όσο και των επιπλοκών αυτού, καθώς σε συνθήκες υπεργλυκαιμίας, η συσσώρευση 6-φωσφορικής φρουκτόζης έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση του ενδιάμεσου προϊόντος UDP-GlcNAc και αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου Ο-γλυκοζάμινο-N-ακετυλοτρανσφεράσης, τροποποιώντας τη γονιδιακή έκφραση και αυξάνοντας την έκφραση παραγόντων όπως ο TGFα και TGFβ αναστέλλοντας τη μιτογένεση των μεσαγγειακών κυττάρων, ενεργοποιώντας τη συσσώρευση κολλαγόνου στο εξωκυττάριο στρώμα και συνεισφέροντας στην πάχυνση της ΣΒΜ (Igdoharo, et al, 2018). Επιπρόσθετα, η UDP-GlcNAc συμμετέχει σε μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις επηρεάζοντας τη φωσφορυλίωση των μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν τη φλεγμονή μέσω του TGF β (Filla, et al, 2016). Τέλος, σε πειραματικά μοντέλα φαίνεται ότι η υπερέκφραση του ενζύμου GFAT, κρίσιμου ενζύμου του μονοπατιού της εξοζαμίνης, αυξάνει τα επίπεδα του TGF β, το mRNA αυτού, καθώς και του εκκινητή του σε συνδυασμό με την Ang II (Schleicher, et al, 2000, Aghadavod, et al, 2016).

- *Μονοπάτι της πολυόλης*

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το μονοπάτι της πολυόλης εμπλέκεται σε πολύ μικρό ποσοστό στο μεταβολισμό της γλυκόζης λόγω της μικρής συγγένειας που παρουσιάζει η αναγωγή της αλδόζης, ενός πολύ σημαντικού ενζύμου του μονοπατιού αυτού που μετατρέπει τη γλυκόζη σε σορβιτόλη. Σε συνθήκες υπεργλυκαιμίας ωστόσο, η μη χρησιμοποιούμενη γλυκόζη στο κυττόςόλιο στρέφεται στο μονοπάτι της πολυόλης αντί να οξειδωθεί και να απομακρυνθεί ως CO₂ (Singh, et

al, 2011; Filla, et al, 2016; Igdoharo, et al, 2018). Το μονοπάτι αυτό περιλαμβάνει δύο ένζυμα, την αναγωγή της αλδόζης που ανάγει τη γλυκόζη σε σορβιτόλη χρησιμοποιώντας ως συμπαράγοντα το NADPH και την αφυδρογονάση της σορβιτόλης που υπό τη δράση του συμπαράγοντα NAD^+ μετατρέπει την σορβιτόλη σε φρουκτόζη (Chung, et al, 2003). Η υπεργλυκαιμία αυξάνει τη δραστηριότητα των ενζύμων αυτών, αυξάνοντας τα επίπεδα της σορβιτόλης και της φρουκτόζης (Igdoharo, et al, 2018). Η σορβιτόλη διαχέεται εύκολα μέσω των κυτταρικών μεμβρανών προκαλώντας βλάβη στα κύτταρα λόγω οσμωτικού στρες (Filla, et al, 2016; Aghadavod, et al, 2016). Επιπρόσθετα, η αύξηση της ροής της γλυκόζης μέσω του μονοπατιού της πολυόλης συνεισφέρει στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες. Συγκεκριμένα, η ελάττωση των επιπέδων του NADPH λόγω κατανάλωσής του κατά τη μετατροπή της γλυκόζης σε σορβιτόλη, οδηγεί στη μείωση των αποθεμάτων γλουταθειόνης, καθώς το NADPH δρα ως συμπαράγοντας για την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, ένζυμο που είναι υπεύθυνο για τη μετατροπή του δισουλφιδίου της γλουταθειόνης σε γλουταθειόνη (Chung, et al, 2003; Filla, et al, 2016; Igdoharo, et al, 2018). Η μετατροπή του NAD^+ σε NADPH κατά τη σύνθεση της φρουκτόζης από σορβιτόλη συνεισφέρει στην εμφάνιση του οξειδωτικού στρες καθώς το NADPH αποτελεί υπόστρωμα των NOX, αυξάνοντας την παραγωγή υπεροξειδίου (Chung, et al, 2003; Singh, et al, 2011). Τέλος, η παρουσία της φρουκτόζης και των μεταβολιτών της σχηματίζουν μεθυλγλυοξικό, αυξάνοντας την παραγωγή AGEs και ROS μετά την πρόσδεση των τελευταίων στον υποδοχέα τους (Chung, et al, 2003; Igdoharo, et al, 2018).

- *NADPH οξειδάση*

Η NADPH οξειδάση (NOX) αποτελεί ένα ενζυμικό σύμπλοκο που εντοπίζεται στη λυσοσωμιακή μεμβράνη φαγοκυτταρικών κυττάρων (π.χ. ουδετερόφιλα) και στη πλασματική μεμβράνη ποικίλων νεφρικών κυττάρων, με το βιολογικό τους ρόλο να συνοψίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων στις βιολογικές μεμβράνες. Υπάρχουν 7 ισομορφές ενώ στο νεφρό εκφράζονται κυρίως οι ισομορφές NOX1, NOX2, NOX4 και NOX5, με τη NOX4 να παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον όσον αφορά το ρόλο της στη ΔΝΝ (Singh, et al, 2011; Wan, et al, 2016; Lassen, et al, 2020). Αποτελούν το κυριότερο μονοπάτι παραγωγής ROS στο ΣΔ και καταλύουν την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε υπεροξείδιο, χρησιμοποιώντας ως δότη ηλεκτρονίων το NADPH, εκτός της NOX4 που φαίνεται να παράγει υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η δραστηριότητα και η έκφραση των NOX αυξάνεται ως απάντηση σε ερεθίσματα και αυξητικούς παράγοντες όπως η

υπεργλυκαιμία, η Ang II, η αλδοστερόνη, η οξειδωμένη LDL, ο TGF β , ο IGF-1, ο VEGF και τα AGEs (Singh, et al, 2011; You, et al, 2016; Wan, et al, 2016; Lassen, et al, 2020). Η σημασία των NOX και ιδιαίτερα της NOX4 στη ΔNN υποστηρίζεται ακόμη περισσότερο από τα δεδομένα πειραματικών μελετών όπου η αύξηση της έκφραση της NOX4 στα ποδοκύτταρα αναπαράγει πολλές από τις βλάβες που παρατηρούνται στη ΔNN. Η αυξημένη έκφραση της NOX4 οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης της ινονεκτίνης, με αποτέλεσμα την υπερτροφία και την απόπτωση των ποδοκυττάρων. Επιπλέον, η έκφραση της NOX4 αυξάνει μέσω του μονοπατιού Smad2/3 οδηγώντας σε αύξηση της παραγωγής ROS, δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και απόπτωση των ποδοκυττάρων (Wan, et al, 2016). Η διπλή αναστολή των NOX4/NOX1 είχε ως αποτέλεσμα την εξάλειψη των ιστοπαθολογικών διαταραχών στο σπείραμα, ελάττωση της αλβουμινουρίας και καταστολή των σηματοδοτικών μονοπατιών που οδηγούν σε ίνωση. Παρά τα ελπιδοφόρα αποτελέσματα της θεραπευτικής στόχευσης των NOX από πειραματικές μελέτες, μια κλινική μελέτη φάσης II δε φάνηκε να αναπαράγει τα συμπεράσματα αυτά καθώς η αναστολή των NOX4/NOX1 δε φάνηκε να υπερτερεί του placebo στην ελάττωση της αλβουμινουρίας (Lassen, et al, 2020).

- *Οξειδοαναγωγή της ξανθίνης (XOR)*

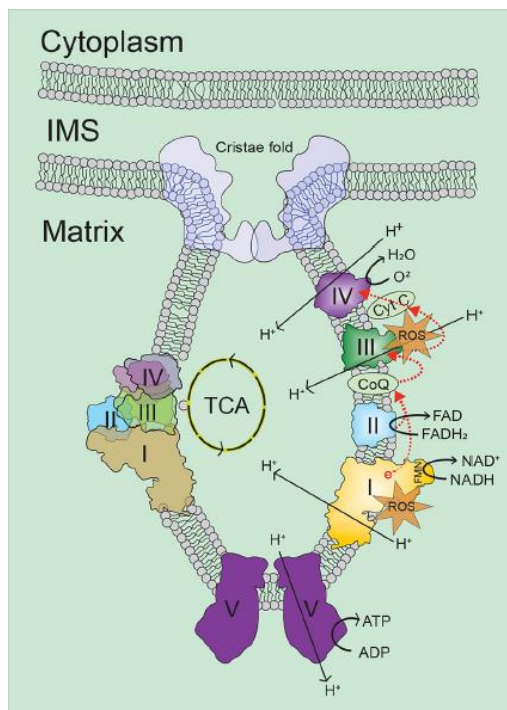
Η XOR είναι το ένζυμο που καταλύει την οξείδωση των υποστρωμάτων των πουρινών, ξανθίνη και υποξανθίνη, χρησιμοποιώντας ως δέκτη ηλεκτρονίων το NAD^+ . Στους ανθρώπους, η οξείδωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη και μετέπειτα σε ουρικό οξύ, χρησιμοποιεί το μοριακό οξυγόνο ως δέκτη ηλεκτρονίων και παράγει υπεροξειδίο και υπεροξειδίο του υδρογόνου. Η υψηλή δραστηριότητα της XOR συνδέεται με υψηλά επίπεδα ουρικού οξέος και συσχετίζεται με την αντίσταση στην ινσουλίνη, την φλεγμονή και αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα εμφάνισης επιπλοκών του ΣΔΤ2, συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης νεφρικής νόσου τελικού σταδίου και παράγοντα κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών συμβαμάτων (Lassen, et al, 2020).

- *Μιτοχόνδρια*

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν περίπλοκα οργανίδια που εντοπίζονται στο κυτοσόλιο όλων των κυτταρικών τύπων εκτός των ερυθροκυττάρων, με κύρια λειτουργία την παραγωγή ATP, αποτελώντας το εργοστάσιο παραγωγής ενέργειας των κυττάρων (Forbes, et al, 2018; Jiang, et al, 2019; Ahmad, et al, 2021). Η παραγωγή ενέργειας που επιτελείται μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης δεν αποτελεί τη μοναδική κυτταρική λειτουργία των μιτοχονδρίων,

καθώς τα οργανίδια αυτά συμμετέχουν σε μια πληθώρα δράσεων όπως ο μεταβολισμός του σιδήρου και του ασβεστίου, η βιοσύνθεση της αίμης, των πυριμιδινών, των στεροειδών, η ρύθμιση της κλίσης οξυγόνου, η σηματοδότηση και η τροποποίηση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Daehn, et al, 2018; Lassen, et al, 2020). Τα μιτοχόνδρια διαθέτουν δύο συστήματα μεμβρανών: μια εξωτερική μεμβράνη και μια μεγάλη, πτυχωτή, εσωτερική μεμβράνη, οι πτυχώσεις της οποίας ονομάζονται ακρολοφίες. Συνεπώς, δημιουργούνται δυο διαμερίσματα, ο διαμεμβρανικός χώρος μεταξύ εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης και η μήτρα, η οποία περιβάλλεται από την εσωτερική μεμβράνη (Yao, et al, 2022). Οι νεφροί αποτελούν μεταβολικά απαιτητικά όργανα με τις ανάγκες σε ATP και οξυγόνο να είναι υψηλές. Μιας και τα κύτταρα των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη κατανάλωση οξυγόνου και ATP, τα μιτοχόνδρια αφθονούν στα κύτταρα αυτά καλύπτοντας τις υψηλές ενεργειακές τους απαιτήσεις. (Flemming, et al, 2018; Jiang, et al, 2019; Hasegawa, et al, 2021). Οι υψηλές αυτές ενεργειακές ανάγκες του νεφρού (για ενεργητική επαναρρόφηση, διήθηση, σύνθεση και αποδόμηση πρωτεϊνών) εξηγούν το γεγονός ότι αποτελούν το δεύτερο όργανο σε περιεκτικότητα μιτοχονδρίων και κατανάλωση οξυγόνου σε συνθήκες ηρεμίας μετά την καρδιά (Forbes, et al, 2018; Jiang, et al, 2019; Yao, et al, 2022). Στον υγιή νεφρό, το 90% περίπου του παραγόμενου ATP παρέχεται μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Τα μιτοχόνδρια, πέραν των φυσιολογικών καταστάσεων, αποτελούν το κύριο οργανίδιο παραγωγής ενέργειας και στα πλαίσια της ΔNN. Κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση, χρησιμοποιούνται τα NADPH και FADH₂ ως δότες ηλεκτρονίων. Τα μόρια αυτά παράγονται από καύσιμα όπως η γλυκόζη, τα λιπαρά οξέα και τα αμινοξέα, μέσω των διαδικασιών της γλυκόλυσης, του TCA και της β-οξείδωσης των λιπαρών οξέων (Forbes, et al, 2018; Hasegawa, et al, 2021; Yao, et al, 2022). Τα διάφορα τμήματα του νεφρώνα χρησιμοποιούν διαφορετικά ενεργειακά υποστρώματα με το φλοιό που περιέχει κυρίως εγγύς και άπω εσπειραμένα σωληνάρια πλούσια σε μιτοχόνδρια να χρησιμοποιεί κυρίως τη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων και τη γλυκονεογένεση για παροχή ενέργειας ενώ ο μυελός, που περιέχει κυρίως τα αθροιστικά σωληνάρια και την αγκύλη του Henle με συγκριτικά μικρότερη περιεκτικότητα σε μιτοχόνδρια, παρουσιάζει προτίμηση στη γλυκόλυση. Τα ποδοκύτταρα παρουσιάζουν ένα πιο ευέλικτο προφίλ για την κάλυψη των ενεργειακών τους αναγκών με την περιεκτικότητά τους να είναι μέτρια. Η γλυκόζη εισέρχεται στα νεφρικά κύτταρα μέσω των μεταφορέων γλυκόζης (GLUTs) με το τελικό προϊόν της γλυκόλυσης, το πυροσταφυλικό, να μετατρέπεται σε γαλακτικό ή να μεταφέρεται από το κυτταρόπλασμα εντός των μιτοχονδρίων.

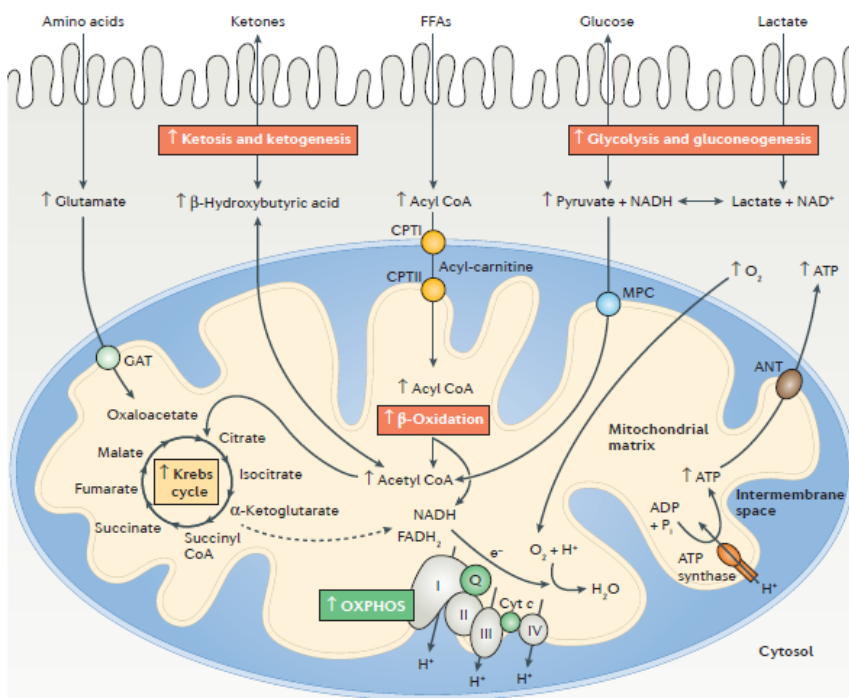
Εκεί, υπό τη δράση της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού μετατρέπεται σε ακέτυλο- CoA και εισέρχεται στον TCA. Από την άλλη πλευρά, τα λιπαρά οξέα σχηματίζουν προϊόντα με το ακέτυλο- CoA και εισέρχονται στα μιτοχόνδρια μέσω των παλμιτοϋλοτρανσφερασών καρνιτίνης (CTP1,2) όπου οξειδώνονται μέσω β-οξείδωσης (Yao, et al, 2022). Όλα τα καύσιμα οργανικά μόρια οξειδώνονται σε μια τελική κοινή πορεία, τον TCA, στον οποίο εισέρχονται ως ακέτυλο- CoA και παράγονται NADPH και FADH_2 (Galvan, et al, 2021; Braga, et al, 2022). Τα δύο αυτά μόρια περιέχουν ένα ζεύγος ηλεκτρονίων με υψηλό δυναμικό μεταφοράς, το οποίο δια μέσου μιας σειράς πρωτεϊνικών συμπλόκων (σύμπλοκο I-V) που εντοπίζεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, μεταφέρεται στο οξυγόνο με αποτέλεσμα την άντληση H^+ από τη μήτρα και τη δημιουργία κλίσης H^+ μεταξύ των δύο πλευρών της εσωτερικής μεμβράνης και συνεπώς τη δημιουργία διαφοράς δυναμικού. Η ηλεκτροχημική κλίση χρησιμοποιείται από τη συνθάση του ATP (σύμπλοκο V) με αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση ADP και την παραγωγή ATP. Στη συνέχεια, το ATP μεταφέρεται εκτός της μιτοχονδριακής μήτρας, σε άλλα κυτταρικά σημεία τα ANTs και τα AACs (**Εικόνα 11**) (Forbes, et al, 2018; Hasegawa, et al, 2021).



Εικόνα 11: Οξειδωτική Φωσφορυλίωση. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση αποτελεί τη διαδικασία παραγωγής ATP μέσω της διέλευσης ηλεκτρονίων από μια σειρά συμπλόκων (I-V) στην έσω μιτοχονδριακή μεμβράνη, με μια σειρά οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων. Η ενέργεια που

απελευθερώνεται από τις αντιδράσεις αυτές είναι συζευγμένη με τη δημιουργία ATP. Η ενδοκυττάρια αύξηση του NADH και του $FADH_2$ οδηγεί σε αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου και παραγωγή ATP. (Galvan, et al, 2021)

Στο ΣΔ, η προσφορά των καυσίμων αυτών είναι μεγάλη με αποτέλεσμα την αύξηση της επαναρρόφησής τους από τα κύτταρα του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου. Η λειτουργία αυτή απαιτεί την κατανάλωση ενέργειας, με την οξειδωτική φωσφορυλίωση να ακολουθεί μια διτροπική πορεία. Κατά τα πρώιμα στάδια του ΣΔ (Εικόνα 12), ο ρυθμός κατανάλωσης ATP και οξυγόνου είναι αυξημένος στο φλοιό του νεφρού και στα μιτοχόνδρια των κυττάρων του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου, ενώ στη συνέχεια ακολουθεί μια ελάττωση αυτού με την εξέλιξη της αλβουμινουρίας. Προτείνεται ότι η αύξηση του ρυθμού κατανάλωσης οξυγόνου στα αρχικά στάδια αντιπροσωπεύει έναν μεταβολικό επαναπρογραμματισμό ως απόκριση στην περίσσεια των μεταβολικών υποστρωμάτων και παρατηρείται κυρίως στα κύτταρα των σωληναρίων. Ωστόσο, η αύξηση της κατανάλωσής του έρχεται σε αναντιστοιχία με την παροχή αυτού καταλήγοντας σε διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής ATP και αναγκών σε οξυγόνο. Αποτέλεσμα αυτού είναι η εμφάνιση οξειδωτικού στρες, η βλάβη των μιτοχονδρίων και τελικά, η σωληναριοπάθεια. (Ahmad, et al, 2021; Yao, et al, 2022).



Εικόνα 12: Παραγωγή ενέργειας στα μιτοχόνδρια κατά τα πρώιμα στάδια ΔΝΝ. Κατά τα πρώιμα στάδια της ΔΝΝ ευνοείται η πρόσληψη ελεύθερων λιπαρών οξέων, κετονών, γλυκόζης και γλουταμίνης, διευκολύνοντας τη γλυκόλυση και τη β-οξείδωση και αυξάνοντας τη ροή των προκύπτοντων υποστρωμάτων, με αποτέλεσμα την αύξηση της εισόδου αυτών στον TCA. Η αύξηση των επιπέδων NADH και FADH₂ λόγω αυξημένης δραστηριότητας του TCA και της β-οξείδωσης, καθοδηγεί την οξειδωτική φωσφορυλίωση, αυξάνει την κατανάλωση οξυγόνου και την παραγωγή ATP, από τη συνθάση του ATP η οποία συζευγνύει την παραγωγή αυτού με την ηλεκτροχημική κλίση υδρογονοκατιόντων που δημιουργείται κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Στην πρώιμη ΔΝΝ, η γλυκονεογένεση που λαμβάνει χώρα μόνο στα κύτταρα των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων και η πρόσληψη γαλακτικού στο παχύ ανιόν σκέλος της αγκύλης του Henle και στα κύτταρα του σπειράματος είναι επίσης αυξημένες. (Forbes, et al, 2018)

Υπάρχουν δύο θεωρίες που εξηγούν τη συμμετοχή των μιτοχονδρίων στην παθογένεση της ΔΝΝ: η αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου στα μιτοχόνδρια και η παραγωγή ανιόντος του υπεροξειδίου που οδηγεί σε οξειδωτικό στρες και η δεύτερη, η οποία συμπεριλαμβάνει τη γενικότερη διαταραχή της λειτουργίας των μιτοχονδρίων με αλλαγές στη βιογένεση και τη μορφολογία τους. Οι αλλαγές αυτές μειώνουν την αποτελεσματικότητά τους και την παραγωγή ATP (Flemming, et al, 2018; Galvan, et al, 2021). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι αλλαγές στη λειτουργία και τη μορφολογία των μιτοχονδρίων είναι σημαντικές στη σωληναριοπάθεια στη ΔΝΝ ειδικά κατά τα πρώιμα στάδια, ενώ προηγούνται τόσο των παθολογοανατομικών όσο και των βιοχημικών αλλοιώσεων που παρατηρούνται στη ΔΝΝ και μάλιστα εξελίσσονται με την πρόοδο της νόσου (Galvan, et al, 2021; Yao, et al, 2022). Αν και η σημασία των μιτοχονδρίων επισημαίνεται τόσο από μελέτες μεταβολομικής όπου η συγκέντρωση μεταβολιτών που είτε παράγονται, είτε μεταφέρονται στα μιτοχόνδρια παρουσιάζεται ελαττωμένη στα ούρα ασθενών με ΔΝΝ, όσο και από μελέτες όπου η έκφραση μορίων καθοριστικών για τη μιτοχονδριακή λειτουργία (π.χ. PGC1α, Cyt C) είναι ελαττωμένη στο νεφρικό ιστό αυτών των ασθενών όπως και το μιτοχονδριακό DNA σε εξωσώματα από δείγματα ούρων ασθενών με ΔΝΝ, τα αποτελέσματα των μελετών αυτών ως προς το είδος της μιτοχονδριακής βλάβης που λαμβάνει χώρα είναι αντικρουόμενα (Hasegawa, et al, 2021; Galvan, et al, 2021). Οι διαφορές αυτές πιθανόν να οφείλονται στο διαφορετικό τρόπο επαγωγής του ΣΔ στα ζωικά μοντέλα, τον υπό εξέταση κυτταρικό τύπο, τις διαφορές μεταξύ των ειδών ή το χρονικό σημείο της νόσου τη στιγμή της παρατήρησης (Galvan, et al, 2021). Η μιτοχονδριακή βλάβη οδηγεί σε περαιτέρω οξειδωτικό

στρες με τα κύτταρα των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων και τα ποδοκύτταρα να είναι ιδιαίτερα ευάλωτα σε αυτή (Hasegawa, et al, 2021; Ricciardi, et al, 2021). Η μειωμένη παραγωγή ATP λόγω μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας προκαλεί διαταραχές στη λειτουργία και άλλων κυτταρικών οργανιδίων, όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ στο σπείραμα αξιοσημείωτη είναι η βιοενεργειακή αλληλεπίδραση που παρατηρείται μεταξύ των κυτταρικών τύπων (Inoue, et al, 2019; Ahmad, et al, 2021). Συγκεκριμένα, βλάβη εντοπιζόμενη στα ποδοκύτταρα είναι ικανή να προκαλέσει μιτοχονδριακή βλάβη και οξειδωτικό στρες στα ενδοθηλιακά κύτταρα αλλά και αντίστροφα, μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στα ποδοκύτταρα είναι ικανή να προκαλέσει απώλεια των ποδοκυττάρων, ενδοθηλιακή βλάβη, αλβουμινουρία και σπειραματοσκλήρυνση (Ahmad, et al, 2021). Η χρόνια υπεργλυκαιμία αυξάνει την κυτταρική πρόσληψη γλυκόζης και την οξείδωση αυτής με αποτέλεσμα να παρουσιάζεται μια απότομη αύξηση των δοτών ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια. Αποτέλεσμα αυτού είναι η δυσανάλογη αύξηση της κλίσης του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης και η διαταραχή της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Στη ΔNN, φαίνεται ότι τα κύρια σημεία παραγωγής υπεροξειδίου και ROS μιτοχονδριακής προέλευσης είναι το σύμπλοκο I που δέχεται ηλεκτρόνια από το NADH και το σύμπλοκο III το οποίο σε συνεργασία με το κυτόχρωμα C δέχεται ηλεκτρόνια από το σύμπλοκο I και τα μεταφέρει στο σύμπλοκο IV (Ricciardi, et al, 2021; Galvan, et al, 2021). Αποτέλεσμα της αύξησης αυτής των ελευθέρων ριζών είναι η αναστολή της αφυδρογονάσης της 3 φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης, κρίσιμο ένζυμο της γλυκόλυσης και στροφή της γλυκόζης σε εναλλακτικά μονοπάτια (εξοζαμίνης, σορβιτόλης, AGEs) και η ενεργοποίηση της PKC, με αποτέλεσμα περαιτέρω οξειδωτικό στρες. Επιπλέον, η διαταραχή της μιτοχονδριακής λειτουργίας ελαττώνει τη δραστηριότητα της AMPK με αποτέλεσμα τη μείωση της αναστολής της NOX2 και αύξηση της παραγωγής των ROS. Κατά συνέπεια, η αύξηση της δραστηριότητας της AMPK ίσως δρα ευεργετικά στη ΔNN διατηρώντας τη μιτοχονδριακή λειτουργία και αποκαθιστώντας την οξειδοαναγωγική ισορροπία, αποτελώντας ελκυστικό θεραπευτικό στόχο. Η παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια προκαλεί βλάβες σε βιομόρια εντός των μιτοχονδρίων (λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA) διαταράσσοντας τη σύνθεση στοιχείων της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και την ικανότητα παραγωγής ATP με περαιτέρω αύξηση των ROS, οξειδωτικό στρες και το σχηματισμό ενός φαύλου κύκλου (Daehn, et al, 2018; Hung, et al, 2021). Η περίσσεια των προερχόμενων από τα μιτοχόνδρια ROS επηρεάζει τόσο τα σωληναριακά όσο και τα σπειραματικά κύτταρα (Lassen, et al, 2020). Η βιογένεση των μιτοχονδρίων όπως και η αποδόμησή τους είναι δύο διαδικασίες οι οποίες ρυθμίζονται αυστηρά και αποσκοπούν στην

παροχή μιας πηγής υγιών μιτοχονδρίων στα κύτταρα. Ωστόσο στη ΔΝΝ, οι δύο αυτές διαδικασίες είναι απορρυθμισμένες. Κύριος ρυθμιστής της βιογένεσης των μιτοχονδρίων είναι ο μεταγραφικός παράγοντας PGC1α . Ο PGC1α δεν προσδένεται άμεσα στον εκκινητή του αλλά ενεργοποιεί και διμερίζεται με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες όπως οι NRF1, NRF2, ERRα και ο PPARα οι οποίοι ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων απαραίτητων για τη βιογένεση των μιτοχονδρίων. Ο ίδιος ο PGC1α λειτουργεί ως μεταβολικός ροοστάτης ρυθμίζοντας τη μεταβολική κυτταρική λειτουργία ανάλογα με τις φυσιολογικές ενεργειακές ανάγκες. Επιπλέον, ασκεί νεφροπροστατευτική δράση ρυθμίζοντας τη σύνθεση NAD^+ μιας και η οξειδοαναγωγική ισορροπία NADH/NAD^+ είναι αυξημένη στο διαβητικό νεφρό (Ahmad, et al, 2021; DeFronzo, et al, 2021; Galvan, et al, 2021). Επιπλέον, αυξάνει τα επίπεδα της σιρτουίνης SIRT3 που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια. Οι σιρτουίνες είναι ένζυμα τα οποία ρυθμίζουν την επιδιόρθωση του DNA, τον ανασυνδυασμό αυτού, παρέχουν σταθερότητα τα χρωμοσώματα και ρυθμίζουν τον τρόπο με τον οποίο ο θερμιδικός περιορισμός προστατεύει από την κυτταρική γήρανση . Πιο συγκεκριμένα, η SIRT3 ρυθμίζει τη λειτουργία των μιτοχονδρίων, παρέχει προστασία διατηρώντας την οξειδοαναγωγική ισορροπία ούσα η κύρια μιτοχονδριακή αποακετυλάση που ρυθμίζει τα ROS και επιπλέον ρυθμίζει τον TCA. Μέσω των ανωτέρω δράσεων, η σιρτουίνη αυτή φαίνεται να προστατεύει τον οργανισμό από την εμφάνιση ασθενειών επιταχυνόμενης γήρανσης, όπως η ΔΝΝ, ενώ ταυτόχρονα προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση που επάγεται από την υπεργλυκαιμία (Wei, et al, 2019; Galvan, et al, 2021). Στη ΔΝΝ, η έκφραση του PGC1α και κατά συνέπεια η βιογένεση των μιτοχονδρίων είναι ελαττωμένες, ενώ σε πειραματικά μοντέλα, η υπερέκφρασή του οδηγεί σε αποκατάσταση της μιτοχονδριακής και της κυτταρικής λειτουργίας μετά από νεφρική βλάβη . Η διαταραχή στο δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης σηματοδοτεί επιπλέον την έναρξη της μιτοφαγίας, μιας φυσιολογικής διαδικασίας απομάκρυνσης των κατεστραμμένων μιτοχονδρίων από τα κύτταρα (Forbes, et al, 2018; DeFronzo, et al, 2021; Galvan, et al, 2021). Πραγματοποιείται μέσω δύο μονοπατιών, ενός εξαρτώμενου από την ουβικουΐτίνη που ρυθμίζεται από τους παράγοντες PINK1 και PRKN και ενός ανεξάρτητου. Το μονοπάτι PINK1/PRKN φαίνεται να ενεργοποιείται από το οξειδωτικό στρες (Galvan, et al, 2021). Τα μιτοχόνδρια είναι δυναμικά οργανίδια που αλλάζουν συνεχώς τη μορφολογία τους ως απάντηση σε διάφορα ερεθίσματα (Hasegawa, et al, 2021). Η ισορροπία μεταξύ των δύο καταστάσεων, δηλαδή της μιτοχονδριακής σύντηξης κατά την οποία οι εξωτερικές και εσωτερικές μεμβράνες μικρότερων μιτοχονδρίων συντήκονται με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός μεγαλύτερου, και της

μιτοχονδριακής σχάσης κατά την οποία ένα θυγατρικό μιτοχόνδριο συστέλλεται και διαχωρίζεται σε μικρότερα, θυγατρικά μιτοχόνδρια, καθορίζει το σχήμα και το μέγεθος των μιτοχονδρίων με ένα τρόπο εξαρτώμενο από τον ιστό (Galvan, et al, 2021). Οι διαδικασίες αυτές ελέγχονται από συγκεκριμένες πρωτεΐνες, με τη σχάση να ελέγχεται από την Drp1 και τη συγχώνευση από της OPA1, Mfn1 και Mfn2 (Yao, et al, 2022). Αν και τα μεγάλα, υπερτροφικά μιτοχόνδρια πιθανώς εμπλέκονται στην παθογένεση της ΔΝΝ καθώς συσχετίζονται με τη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης, την απώλεια του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης και την παραγωγή ROS, η σχάση των μιτοχονδρίων φέρεται να είναι ο κύριος μορφολογικός δείκτης νεφρικής βλάβης στη ΔΝΝ (Galvan, et al, 2021). Συγκεκριμένα, η υπεργλυκαιμία επάγει τη σχάση των μιτοχονδρίων μέσω μιας διαδικασίας εξαρτώμενης από την Drp1. Η Drp1 μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια χρησιμοποιώντας τη φωσφορυλίωση και τη στρατολόγηση της ROCK1. Η Drp1 αγκυροβολείται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη μέσω των μιτοχονδριακών υποδοχέων της FIS1 και MFF. Εκεί ολιγομερίζεται, υδρολύει το GTP, με την παραγόμενη ενέργεια να αξιοποιείται από τη μιτοχονδριακή μεμβράνη ώστε να πραγματοποιηθεί η σχάση του μιτοχονδρίου στον δακτύλιο ο οποίος είχε σχηματιστεί στον αύλακα σχάσης. Πράγματι, στα πλαίσια της ΔΝΝ η έκφραση της Drp1 είναι αυξημένη, όπως επίσης και αυτή των FIS1 και MFF. Επιπλέον, η διέγερση της έκφρασης της ROCK1 σε διαβητικούς ποντικούς οδηγεί στην απόπτωση τα κύτταρα και σε αυξημένη παραγωγή ROS (Hung, et al, 2021; Galvan, et al, 2021).

3.8.11 Αυτοφαγία

Η αυτοφαγία αποτελεί μια φυσιολογική διαδικασία ανακύκλωσης στα κύτταρα κατά την οποία ενδοκυτταροπλασματικά στοιχεία (κατεστραμμένα και γηρασμένα οργανίδια, πρωτεΐνες) μεταφέρονται στα λυσοσώματα όπου αποδομούνται από πρωτεολυτικά ένζυμα. Ο κυτταρικός αυτός μηχανισμός επιτελεί δύο βασικούς ρόλους: την απομάκρυνση των κατεστραμμένων πρωτεϊνών και οργανιδίων σε συνθήκες στρες, αλλά και την εξασφάλιση της ενεργειακής επάρκειας μέσω της ανακύκλωσης των ενδοκυττάρων πόρων (Sugahara, et al, 2021; DeFronzo, et al, 2021; Gonzalez, et al, 2021). Στους νεφρούς, η αυτοφαγία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, προστατεύοντας από την εμφάνιση ίνωσης και φλεγμονής. Στα πλαίσια της ΔΝΝ παρατηρείται διαταραχή στη διαδικασία αυτή σε πολλούς κυτταρικούς τύπους με αποτέλεσμα τη συσσώρευση κατεστραμμένων πρωτεϊνών και οργανιδίων. Κρίσιμο ρόλο διαδραματίζει η φωσφορυλίωση της κινάσης ULK1, η οποία πυροδοτεί την έναρξη της διαδικασίας της αυτοφαγίας. Η αντίδραση αυτή

επάγεται είτε από την ενεργοποίηση της AMPK, είτε από την αναστολή του μεταγραφικού παράγοντα m TOR. Σε ζωικά μοντέλα ΣΔ, η δραστικότητα του τελευταίου παρουσιάζεται αυξημένη, γεγονός που συσχετίζεται πέρα από τη διαταραχή στην αυτοφαγία, με αύξηση του οξειδωτικού στρες μέσω θετικής ρύθμισης των NOX1 και NOX4. Αναστολή του παράγοντα αυτού εκτός από την ενεργοποίηση της αυτοφαγίας, μειώνει την απώλεια των ποδοκυττάρων, την πρωτεϊνουρία και τη σπειραματοσκλήρυνση (DeFronzo, et al, 2021; Gonzalez, et al, 2021; Ricciardi, et al, 2021).

3.8.12 Κυτταρική Γήρανση

Η κυτταρική γήρανση αποτελεί μια διαδικασία κατά την οποία το κύτταρο, ως απάντηση σε ενδογενείς και εξωγενείς στρεσογόνους παράγοντες υιοθετεί μια μόνιμη αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση της μίτωσης. Η διαδικασία αυτή ρυθμίζεται από τους αναστολείς των επαγόμενων από την κυκλίνη κινασών, p21^{WAF1}, p16^{INK4a}, p15^{INK4b} οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την αναστολή του κυτταρικού κύκλου και κρίσιμοι παράγοντες για την εμφάνιση της κυτταρικής γήρανσης (Kitada, et al, 2014; Wiley, et al, 2020). Τα γηρασμένα κύτταρα εκκρίνουν ένα συνδυασμό κυτταροκινών, χυμοκινών, αυξητικών παραγόντων, πρωτεασών και άλλων μορίων που αποτελούν το σχετιζόμενο με την κυτταρική γήρανση εκκριτικό φαινότυπο (Senescence-Associated Secretory Phenotype, SASP). Ο SASP αποτελεί τον παράγοντα που εξηγεί πως ακόμα και ένας μικρός αριθμός γηρασμένων κυττάρων οδηγεί στην εμφάνιση εκφυλιστικών αλλοιώσεων σε πολλαπλούς ιστούς (Wiley, et al, 2020). Τα τελευταία χρόνια, ένας αυξανόμενος όγκος δεδομένων συσχετίζει την εμφάνιση της κυτταρικής γήρανσης και τη συσσώρευση γηρασμένων κυττάρων με την απώλεια της νεφρικής λειτουργίας στο ΣΔ και συσχετίζουν τη ΔΝΝ με την εμφάνιση της κυτταρικής γήρανσης σε διάφορους κυτταρικούς τύπους στο νεφρό, όπως τα επιθηλιακά κύτταρα των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων και τα ποδοκύτταρα. Μελέτες δείχνουν ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της σπειραματικής έκφρασης της p16^{INK4a} και της πρωτεϊνουρίας ενώ και η αυξημένη δραστικότητα της β-γαλακτοσιδάσης των γηρασμένων κυττάρων, (senescence-associated-beta-galactosidase, SA-β-gal) και της p16^{INK4a} στα σωληνάρια εμφανίζει θετική συσχέτιση με τη διάμεση ίνωση και ατροφικές βλάβες στα σωληναριακά κύτταρα. Στα κύτταρα αυτά, η κυτταρική γήρανση συσχετίζεται επίσης ισχυρά με το BMI και τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν την βράχυνση των τελομερών, τη βλάβη του DNA, επιγενετικές αλλαγές, μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, ενεργοποίηση του μονοπατιού

Wnt/κατενίνης, φλεγμονή, συσσώρευση ουραιμικών τοξινών και την απώλεια της Klotho, ενός αντιγηραντικού μορίου που αποτελεί πλέον ενδιαφέρον θεραπευτικό στόχο (Kitada, et al, 2014). Μεγάλης σημασίας για τη χρησιμότητα της στόχευσης της διαδικασίας της κυτταρικής γήρανσης είναι το γεγονός ότι η υιοθέτηση του γηρασμένου φαινότυπου προηγείται της εμφάνισης των λειτουργικών αλλαγών που χαρακτηρίζουν τη ΔΝΝ σε μοντέλα ποντικών. Η παρατήρηση αυτή προτείνει ότι η παρέμβαση στη διαδικασία αυτή, είτε μέσω της απομάκρυνσης των γηρασμένων κυττάρων (senolytics) είτε μέσω της παρεμπόδισης της δράσης των μορίων του SASP (senomorphics) αποτελεί μια έγκαιρη παρέμβαση. Αν και οι μηχανισμοί που οδηγούν στην εμφάνιση της κυτταρικής γήρανσης μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, τα αυξημένα επίπεδα της γλυκόζης φαίνεται να οδηγούν στη συσσώρευση γηρασμένων κυττάρων σε πολλά μοντέλα ιστικών καλλιιεργειών και καθοδηγούν τη διαδικασία στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, με την εμφάνιση σε αυτό να είναι πρώιμη μετά την επαγωγή ΣΔ σε ζωικά μοντέλα. Η διαδικασία αυτή παρουσιάζεται εξαρτώμενη από τον συμεταφορέα SGLT2 με το μηχανισμό να είναι ακόμα ασαφής. Αν και χρήζει περαιτέρω μελέτης, φαίνεται να εξαρτάται από τον p53 και τον p21, με την εξάλειψη των παραγόντων αυτών να παρεμποδίζει την κυτταρική γήρανση (Wiley, et al, 2020). Οι παράγοντες του SASP, είτε ανεξάρτητα είτε σε συνεργασία, οδηγούν σε διάφορα παθογενετικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη ΔΝΝ. Στους παράγοντες αυτούς, ανήκουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1, TNF-α που απελευθερώνονται από τα γηρασμένα κύτταρα και προάγουν την άσηπτη φλεγμονή. Η εμφάνιση του στρεσογόνου παράγοντα που επάγει την κυτταρική γήρανση, έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση της High mobility group box 1 (HMGB1) πρωτεΐνης από τον πυρήνα στον εξωκυττάριο χώρο όπου δρα ως damage-associated molecular pattern (DAMP). Εκεί προσδένεται και ενεργοποιεί τους υποδοχείς TLR4 και RAGE οδηγώντας πολλούς κυτταρικούς τύπους νεφρικών κυττάρων σε άσηπτη φλεγμονή. Πολλά από τα μόρια που ανήκουν στο SASP, εμφανίζονται στα ούρα και τον ορό των ασθενών με ΔΝΝ, με αυξημένα επίπεδα IL-8 και MCP-1 στα ούρα να σχετίζονται με μειωμένο eGFR και την εμφάνιση αλβουμινουρίας. Τα επίπεδα του TNF-α σε αίμα και ούρα συσχετίζονται με τη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, συσχετίζονται επίσης θετικά με μειωμένο eGFR και την αλβουμινουρία. Επιπλέον, προϋνωτικοί παράγοντες όπως ο TGF-β, εκκρίνονται από τα γηρασμένα κύτταρα με αποτέλεσμα τη σωληναριοδιάμεση ίνωση, την απόπτωση και την υπερτροφία των ποδοκυττάρων. Τέλος, εικοσανοειδή που συντίθενται από τα γηρασμένα κύτταρα εμπλέκονται στη νεφρική βλάβη, με την προσταγλανδίνη D2 να προάγει την αγγειοσύσπαση, την αποπλάτυνση των

δευτερογενών αποφυάδων των ποδοκυττάρων, τον πολλαπλασιασμό των μεσαγγειακών κυττάρων και τη σωληναριοδιάμεση ίνωση. Η θρομβοξάνη προάγει την αγγειοσύσπαση ενώ το παράγωγό της TBX2 εμφανίζει συσχέτιση με την αλβουμινουρία στη ΔΝΝ (Wiley, et al, 2020). Τα γηρασμένα κύτταρα, παραμένουν μεταβολικά ενεργά, με το μεταβολισμό τους ωστόσο να επαναπρογραμματίζεται με σκοπό την εξασφάλιση της επιβίωσής τους και την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών του προγράμματος γήρανσης. Στα κύτταρα αυτά, παρατηρείται μετάβαση από οξειδωτικό μεταβολισμό σε γλυκολυτικό λόγω μειωμένης δραστηριότητας του PEPK-C και αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου PK, οδηγώντας σε μείωση του συνολικού ποσού και της αποτελεσματικότητας της παραγόμενης ενέργειας, αυξημένη σύνθεση και εναπόθεση λιπιδίων, διαταραχή της ομοιοστασίας της γλυκόζης και των αμινοξέων και μείωση των επιπέδων του NAD^+ . Συνολικά, θετική ρύθμιση παρουσιάζει ο TCA, το μονοπάτι της φωσφορικής πεντόζης και αρνητική η οξείδωση των ΛΟ, ενώ ήδη από τα αρχικά στάδια η οξειδωτική φωσφορυλίωση παρουσιάζει διαταραχές (Kwon, et al, 2019; Sabbatinelli, et al, 2019).

4. ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ

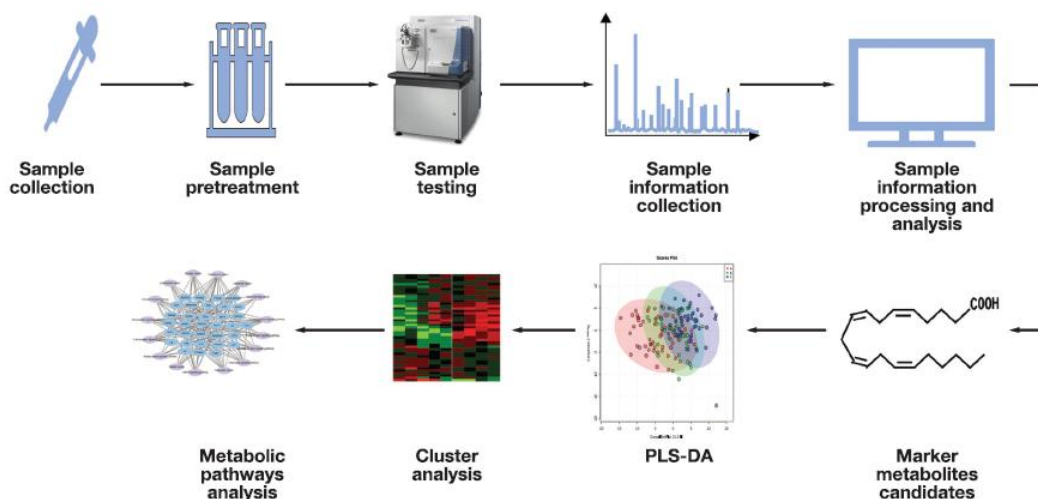
Οι βιοδείκτες αποτελούν μετρήσιμες και ποσοτικοποιήσιμες βιολογικές παραμέτρους που τυπικά αντικατοπτρίζουν μια συγκεκριμένη πτυχή της παθοφυσιολογίας μιας νόσου. Δεδομένης της πολυπλοκότητας της παθοφυσιολογίας της ΔΝΝ γίνεται κατανοητό πως η χρήση ενός και μόνο βιοδείκτη είναι αδύνατο να συνεισφέρει στην πρόωμη διάγνωση της νόσου όπως και να προβλέψει με ασφάλεια την εξέλιξη της νόσου. Η χρήση ενός βιοδείκτη παρουσιάζει προβλήματα όσον αφορά την ειδικότητα καθώς και τη βιολογική και την αναλυτική διακύμανση. Απαιτείται ένα σύνολο βιοδεικτών που θα καλύπτει όλες τις πτυχές της παθογένεσης της ΔΝΝ παρέχοντας καλύτερα αποτελέσματα από άποψη ευαισθησίας και ειδικότητας. Η εφαρμογή νέων, πιο ευαίσθητων τεχνολογιών έχει διευρύνει σημαντικά το πεδίο ανακάλυψης νέων, δυνητικών βιοδεικτών και η χρήση τους αποσκοπεί στην απόκτηση δεδομένων συγκρίσιμων και αναπαραγωγίμων (Jung, et al, 2022; Lash, et al, 2022). Η μετάβαση των υποψήφιων βιοδεικτών από το ερευνητικό πεδίο στην κλινική πράξη απαιτεί την απόδειξη τόσο της κλινικής χρησιμότητας αυτών όσο και την καλύτερη απόδοσή τους συγκριτικά με τους ήδη υπάρχοντες (Barutta, et al, 2021). Για το σκοπό αυτό απαιτούνται κλινικές μελέτες οι οποίες θα αξιολογήσουν

τα προκύπτοντα δεδομένα, και θα τα συσχετίσουν με τις φυσιολογικές, βιοχημικές και μοριακές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στο νεφρό (Lash, et al, 2022). Τέλος, ο σχεδιασμός μελλοντικών κλινικών μελετών θα πρέπει να χρησιμοποιήσει τους βιοδείκτες αυτούς είτε ως κριτήρια εισαγωγής στις μελέτες αυτές είτε ως καταληκτικά σημεία σε μια προσπάθεια αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας τους (Jung, et al, 2022).

5. METABONOMΙΚΗ

Ο ΣΔ αποτελεί ένα χρόνιο μεταβολικό νόσημα με τις επιπλοκές του να μην αποτελούν συνέπεια μόνο της υπεργλυκαιμίας αλλά και της αλληλεπίδρασης διαταραχών σε πολλαπλά μεταβολικά μονοπάτια, με διαφορές να παρουσιάζονται μεταξύ των ιστών και των οργάνων (Izundegui, et al, 2022). Η κατανόηση των βιοχημικών μονοπατιών που στο σύνολό τους αποτελούν τον ανθρώπινο μεταβολισμό, αντιπροσωπεύει ένα από τα κύρια επιτεύγματα της έρευνας στις βιολογικές επιστήμες τα τελευταία χρόνια και σε συνδυασμό με την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών προσφέρει τη δυνατότητα καλύτερης κατανόησης και πιθανώς επίλυσης περίπλοκων και πολυπαραγοντικών στη φύση τους χρονίων, μεταβολικών νοσημάτων όπως ο ΣΔ (German, et al, 2005). Συνέπεια των ανωτέρω, είναι η ανάπτυξη ερευνητικών μεθόδων, όπως η μεταβονομική, η οποία αποτελεί τη συστηματική ανάλυση και ποσοτικοποίηση του μεταβολώματος, δηλαδή του συνόλου των μεταβολιτών που εντοπίζονται σε ένα βιολογικό δείγμα και αντικατοπτρίζουν το φαινότυπο των βιολογικών διεργασιών (Hasegawa, et al, 2021; Maroli, et al, 2023). Οι μεταβολίτες είναι οργανικά ετερογενή στοιχεία χαμηλού μοριακού βάρους, τυπικά <1500 Da, που λειτουργούν ως αντιδρώντα, ενδιάμεσα και τελικά προϊόντα των βιοχημικών αντιδράσεων που απαρτίζουν τον μεταβολισμό, πολλά από τα οποία διηθούνται ελεύθερα από τον νεφρό. Σε αυτά συγκαταλέγονται τα αμινοξέα, οι αλκοόλες, τα οργανικά οξέα, λιπίδια, νουκλεοτίδια καθώς και μικρά πεπτίδια και υδατάνθρακες. Επιπλέον, οι μεταβολίτες εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια και χρησιμοποιούνται για τη ρύθμιση πολλαπλών κυτταρικών διεργασιών. Το μέγεθος και η πολυπλοκότητα του μεταβολώματος εξαρτάται από τη βιολογική του πηγή, με το ανθρώπινο μεταβόλωμα να αποτελείται από περισσότερους από 150000 μεταβολίτες. Η μεταβονομική σκιαγραφεί τη μεταβολική κατάσταση ενός οργανισμού επιτρέποντας τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των μεταβολιτών, φιλοδοξώντας κατά τον τρόπο αυτό να μελετήσει τη δυναμική, τις λειτουργίες και τις αλληλεπιδράσεις όλων των μεταβολιτών εντός ενός βιολογικού συστήματος

τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις (Darshi, et al, 2016; Kalim, et al, 2017 Mu, et al, 2022; Maroli, et al, 2023). Η ροή ενός πειράματος μεταβολομικής περιλαμβάνει αρκετά βήματα (**Εικόνα 13**) το σχεδιασμό του πειράματος, την συλλογή και την προετοιμασία του δείγματος, το διαχωρισμό και την ανίχνευση των μεταβολιτών, την επεξεργασία των δεδομένων και τέλος τη βιοπληροφορική ανάλυση (Sas, et al, 2015; Maroli, et al, 2023).

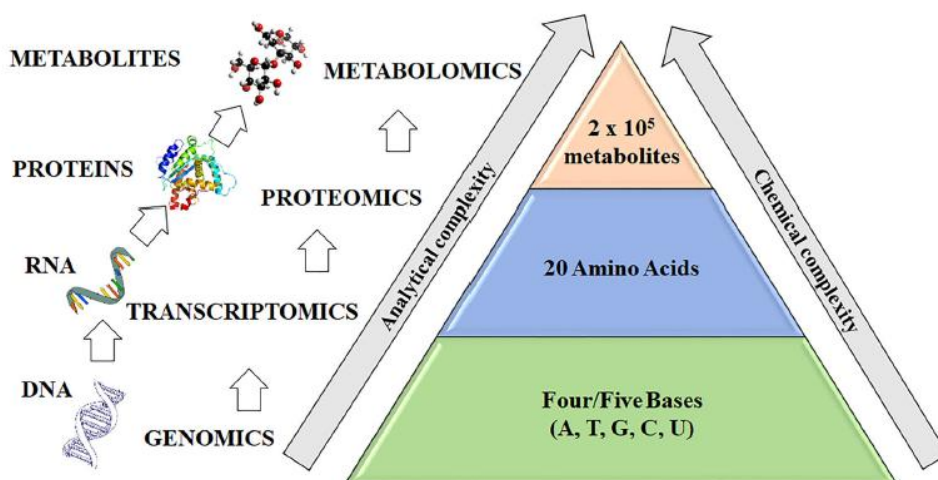


Εικόνα 13: Βασικό διάγραμμα ροής μιας έρευνας μεταβολομικής. Τυπικά, μια έρευνα μεταβολομικής περιλαμβάνει την συλλογή του δείγματος, την προαναλυτική διαχείριση αυτού, την ανάλυσή του, τη συλλογή, επεξεργασία και ανάλυση των δεδομένων, την στατιστική ανάλυση και την ερμηνεία τους. (Huang, et al, 2022)

Κατά το σχεδιασμό του πειράματος αποφασίζονται οι μεταβολίτες ενδιαφέροντος, δηλαδή αν θα μελετηθούν συγκεκριμένες υποομάδες μεταβολιτών (στοχευμένη ανάλυση) ή όλοι όσοι μεταβολίτες δύναται να μετρηθούν (μη στοχευμένη ανάλυση). Η στοχευμένη ανάλυση καθοδηγείται από μια υπόθεση και επιχειρεί να απαντήσει μια συγκεκριμένη ερώτηση. Σε αυτή την προσέγγιση ένας σχετικά μικρός αριθμός μεταβολιτών ταυτοποιείται με σαφήνεια και ποσοτικοποιείται παρέχοντας υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια. Κατά τη μη στοχευμένη ανάλυση ανιχνεύονται όσο το δυνατόν περισσότεροι μεταβολίτες οι οποίοι εν συνεχεία ταυτοποιούνται χρησιμοποιώντας λογισμικό βασιζόμενο σε γνωστά ή προβλεπόμενα μοτίβα φάσματος και αξιοποιώντας πληροφορίες από τη βάση δεδομένων ανθρώπινου μεταβολώματος. Στη μη στοχευμένη ανάλυση, δεν απαιτείται ποσοτικοποίηση και υψηλής ποιότητας ακρίβεια, χρησιμοποιείται για τη δημιουργία υποθέσεων και είναι χρήσιμη στην ανίχνευση δυνητικών

βιοδεικτών με τα πειραματικά αποτελέσματα στη συνέχεια να επιβεβαιώνονται σε μελέτες που χρησιμοποιούν στοχευμένη ανάλυση (Sas, et al, 2015; Tofte, et al, 2020; Balint, et al, 2023). Τα δύο αυτά βήματα στην πορεία της ανακάλυψης νέων βιοδεικτών ακολουθούνται από το τρίτο και τελευταίο βήμα κατά το οποίο οι βιοδείκτες που έχουν εντοπισθεί και αξιολογηθεί στα δύο προηγούμενα βήματα εισέρχονται στην καθημέρα κλινική πράξη. Για την επιτυχία του τελευταίου αυτού βήματος απαιτούνται απλές, αξιόπιστες, γρήγορες και οικονομικές μέθοδοι. Επιπλέον, κατά το σχεδιασμό του πειράματος, αποφασίζεται εάν θα μελετηθεί η συγκέντρωση των μεταβολιτών στιγμιαία ή οι δυναμικές μεταβολές που παρουσιάζει η συγκέντρωσή αυτών σε ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Επίσης, καθορίζεται η ομάδα των ομάδων ελέγχου (controls), των οποίων το μεταβόλωμα θα συγκριθεί με αυτό των ασθενών. Μια διαφορετική προσέγγιση είναι ο υπολογισμός ενός σκορ με δεδομένα που περιλαμβάνουν μέχρι λίγες εκατοντάδες μεταβολιτών και στη συνέχεια η χρήση του σκορ αυτού ως μια συνεχή, μονοδιάστατη μεταβλητή που χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση και τη διαστρωμάτωση κινδύνου της εξέλιξης της υπό μελέτη νόσου. Η προετοιμασία του δείγματος ποικίλει ανάλογα με τους στόχους του πειράματος, το είδος του δείγματος και την αναλυτική μέθοδο που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί. Ανεξάρτητα από αυτά, ο μεταβολισμός θα πρέπει να σταματήσει το συντομότερο δυνατόν από τη συλλογή του δείγματος και τα δείγματα να αποθηκευτούν στους -80°C (Sas, et al, 2015; Tofte, et al, 2020). Ως δείγμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν το πλάσμα, τα ούρα, τα κόπρανα, κυτταροκαλλιέργειες και ιστοί, με το πλάσμα και τα ούρα να αποτελούν ιδιαίτερος ελκυστικά βιολογικά δείγματα για τη μελέτη των νεφρικών νοσημάτων (Dubin, et al, 2020; Mutter, et al, 2021; Duangkumpha, et al, 2022). Οι μεταβολίτες αποτελούν μόρια που παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία ως προς το μέγεθος, τη δομή και την πολικότητά τους, όντας ετερογενή χημικά στοιχεία, με το εύρος των συγκεντρώσεών τους στα βιολογικά συστήματα να κυμαίνεται από nanomolars έως milimolars, ενώ κάποιοι μεταβολίτες εντοπίζονται εκλεκτικά σε συγκεκριμένους ιστούς. Σε κάθε μελέτη μεταβολομικής πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν οι συγχυτικοί παράγοντες καθώς διαφορές στο BMI, η παρουσία ΣΔ, η ηλικία, το φύλο, η διατροφή, η ημερήσια διακύμανση, η κατάσταση νηστείας αλλά και ο ρυθμός πειραματικής διήθησης επηρεάζουν το μεταβόλωμα (Sas, et al, 2015; Dubin, et al, 2020; Jung, et al, 2022). Συνήθως οι μελέτες μεταβολομικής χρησιμοποιούν την ανάλυση «steady-state» κατά την οποία δίνονται πληροφορίες για τη διαφορά στα επίπεδα ενός μεταβολίτη δίχως όμως να παρέχει πληροφορίες ως προς το γιατί συνέβη η αλλαγή αυτή ή μέσω ποιου μεταβολικού μονοπατιού. Οι πληροφορίες αυτές παρέχονται μέσω της ανάλυσης ροής των μεταβολιτών

(metabolic flux analysis-MFA) κατά την οποία ενσωματώνονται βαρέα ισότοπα σε συγκεκριμένους μεταβολίτες επιτρέποντας τον προσδιορισμό του ποσού ή του ποσοστού του παρόντα μεταβολίτη που προήλθε από συγκεκριμένη ουσία ή μεταβολικό μονοπάτι. Συγκριτικά με την ανάλυση «steady-state», η MFA μειονεκτεί ως προς το κόστος (λόγω των ισωτόπων) αλλά και τη χρονοβόρα και περίπλοκη ανάλυση και αυτός είναι ο λόγος που χρησιμοποιείται κυρίως σε στοχευμένες αναλύσεις (Sas, et al, 2015). Για να εξασφαλισθεί η αξιοπιστία των δεδομένων που προκύπτουν από τις μελέτες μεταβολομικής απαιτούνται διάφορα σημεία ελέγχου για να διαβεβαιώσουν ότι τα δεδομένα που αποκτώνται είναι αναπαραγώγιμα, ακριβή και σωστά. Η ακεραιότητα αυτή βασίζεται στην ποιότητα, τη συνέπεια, την εκτέλεση και την αξιοπιστία κάθε διαδικασίας που διεξάγεται (Maroli, et al, 2023). Η ανάλυση των δεδομένων ίσως είναι το πιο κρίσιμο σημείο μιας μεταβολομικής ανάλυσης καθώς προκύπτει μεγάλος όγκος δεδομένων που για την εξαγωγή χρήσιμων πληροφοριών από τα δεδομένα αυτά απαιτούνται πολυπαραγοντικές μέθοδοι στατιστικής ανάλυσης, με την καταλληλότερη μέθοδο να επιλέγεται ανάλογα με το σχεδιασμό του πειράματος και τα πειραματικά αποτελέσματα (Huang, et al, 2022). Έως σήμερα παρατηρείται μερική ανομοιογένεια στα ευρήματα των μελετών μεταβολομικής, η οποία αποδίδεται στον πειραματικό σχεδιασμό, τις μεθόδους ταυτοποίησης και αξιολόγησης καθώς τον μικρό αριθμό συμμετεχόντων και έχει παρεμποδίσει τη μεταφραστική ικανότητα των ευρημάτων στην κλινική πράξη. Για τους λόγους αυτούς απαιτούνται μεγαλύτερες, ανεξάρτητες μελέτες κοόρτης για την αξιολόγηση των υποψήφιων βιοδεικτών (Tofte, et al, 2020; Roointan, et al, 2021; Jung, et al, 2022). Η μεταβολομική, συγκριτικά με τις υπόλοιπες τεχνολογίες omics (genomics, transcriptomics, proteomics) προσφέρει κάποια πλεονεκτήματα (Huang, et al, 2022). Η ροή της πληροφορίας που ακολουθείται στα βιολογικά συστήματα (**Εικόνα 14**) αρχίζει από το DNA (genomics) στο m RNA (transcriptomics), στις πρωτεΐνες (proteomics) και καταλήγει στους μεταβολίτες (metabolomics), δηλαδή ο μεταβολισμός βρίσκεται κατάντη των διαδικασιών της μεταγραφής και της μετάφρασης παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα στα προϊόντα του, δηλαδή στους μεταβολίτες, να αντιπροσωπεύουν τη γονιδιακή, μεταγραφική και πρωτεϊνική λειτουργία προσφέροντας πληροφορίες συμπληρωματικές και σε κάποιες περιπτώσεις αθροιστικές σε αυτές που προσφέρουν οι λοιπές omics προσεγγίσεις (Kalim, et al, 2017; Dubin, et al, 2020).



Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση του κεντρικού δόγματος της βιολογίας συστημάτων.

Η μεταφορά της πληροφορίας από το DNA στη σύνθεση των μεταβολιτών συνοδεύεται από μια συνολική αύξηση της πολυπλοκότητας των εμπλεκόμενων βιολογικών μορίων και των αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση αυτών. (Maroli, et al, 2021)

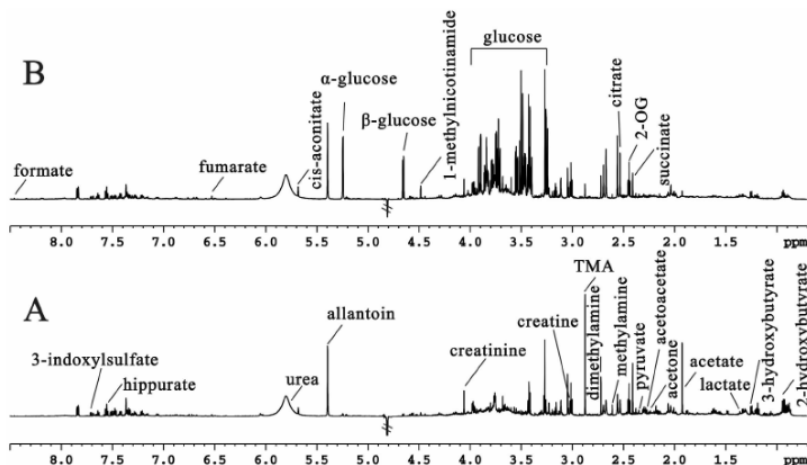
Το γεγονός ότι οι μεταβολίτες επηρεάζονται από την αλληλεπίδραση μεταξύ των γονιδίων, των πρωτεϊνών, ατομικών παραγόντων (διατροφή, φυσική δραστηριότητα, μικροβίωμα εντέρου) και εξωτερικών παραγόντων επιτρέπει στη μεταβονομική να γεφυρώσει το χάσμα μεταξύ του γενώματος και του φαινότυπου της εκάστοτε νόσου (Kalim, et al, 2017; Tofte, et al, 2020; Huang, et al, 2022; Balint, et al, 2023; Maroli, et al, 2023). Συνεπώς, η μεταβονομική παρέχει ένα μοναδικό και συγκρίσιμο με δακτυλικό αποτύπωμα όσον αφορά τη νόσο και τη θεραπευτική απόκριση ενός ατόμου στη φαρμακευτική παρέμβαση συνεισφέροντας στην ιατρική ακριβείας (Duangkumpha, et al, 2022; Balint, et al, 2023). Το γεγονός ότι οι μεταβολίτες ενσωματώνουν όλη αυτή την πληροφορία χωρίς να υπόκεινται σε περαιτέρω αλλαγές όπως τα γονίδια, που υπόκεινται σε επιγενετικές αλλαγές ή οι πρωτεΐνες με τις μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως και το γεγονός ότι ανταποκρίνονται ταχέως σε οποιαδήποτε θεραπευτική παρέμβαση τους καθιστά πιο αντιπροσωπευτικούς δείκτες του φαινότυπου (Patti, et al, 2012; Izundegui, et al, 2022). Όσον αφορά τη ΔΝΝ, τα τελευταία χρόνια διεξάγονται αρκετές μελέτες που επικεντρώνονται στην ανακάλυψη και αξιολόγηση νέων βιοδεικτών οι οποίοι θα υπερτερούν των υπαρχόντων (Tofte, et al, 2020). Στο πεδίο αυτό η μεταβονομική προσέγγιση εμφανίζεται ιδιαίτερα ελπιδοφόρα καθώς δίνει τη δυνατότητα εξερεύνησης μεταβολικών μονοπατιών συνδράμοντας στην κατανόηση της περίπλοκης φύσης της νόσου αλλά επίσης επειδή οι νεφροί διαχειρίζονται μεταβολίτες που

ανήκουν στις κύριες βιοχημικές τάξεις με τη λειτουργία τους να επηρεάζει τα επίπεδα των κυκλοφορούντων μεταβολιτών (Rooiintan, et al, 2021). Η αλληλεπίδραση μεταξύ νεφρικής λειτουργίας και μεταβολισμού είναι περίπλοκη. Ο ΣΔ αποτελεί το κύριο αίτιο ΧΝΝ παγκοσμίως ενώ και η μειωμένη νεφρική λειτουργία επηρεάζει άμεσα το μεταβολισμό προκαλώντας περιφερική αντίσταση στην ινσουλίνη και δαπάνη πρωτεϊνικής ενέργειας. Επίσης, οι νεφροί επηρεάζουν άμεσα τα επίπεδα των κυκλοφορούντων μεταβολιτών μέσω μηχανισμών όπως η σπειραματική διήθηση, η σωληναριακή επαναρρόφηση και έκκριση. Τέλος, ο νεφρός χαρακτηρίζεται από την έντονη και πολύπλοκη εγγενή μεταβολική του δραστηριότητα. Είναι το δεύτερο όργανο σε περιεκτικότητα μιτοχονδρίων, επιτελώντας διάφορες μεταβολικές διεργασίες σε ανομοιογενείς τάσεις οξυγόνου και ωσμωτικά περιβάλλοντα κατά μήκος του νεφρώνα καθιστώντας τις νεφρικές παθήσεις ιδανικές για τη μελέτη τους μέσω μεταβολομικής (Kalim, et al, 2017). Εν κατακλείδι η μεταβολομική χρησιμοποιείται όλο και συχνότερα στην ανακάλυψη μηχανισμών και παραγόντων κινδύνου που ευθύνονται για την εμφάνιση επιπλοκών του ΣΔ και παρόλο που ακόμη δεν έχει αποκτήσει κλινική εφαρμογή, αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο και ισχυρό εργαλείο της ιατρικής ακριβείας, με δυνητική εφαρμογή στο διαγνωστικό έλεγχο, την πρόληψη και την τροποποίηση της θεραπευτικής προσέγγισης αυτών (Izundegui, et al, 2022).

5.1 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΣΤΗ ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΗ

Οι κύριες φασματοσκοπικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται στη μεταβολομική είναι η φασματοσκοπία μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού πρωτονίου (Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy, ^1H -NMR), ο συνδυασμός αέριας χρωματογραφίας/ φασματομετρίας μάζας (Gas chromatography–mass spectrometry, GC-MS) και η υγρή χρωματογραφία/ φασματομετρία μάζας (Liquid chromatography–mass spectrometry, LC-MS).

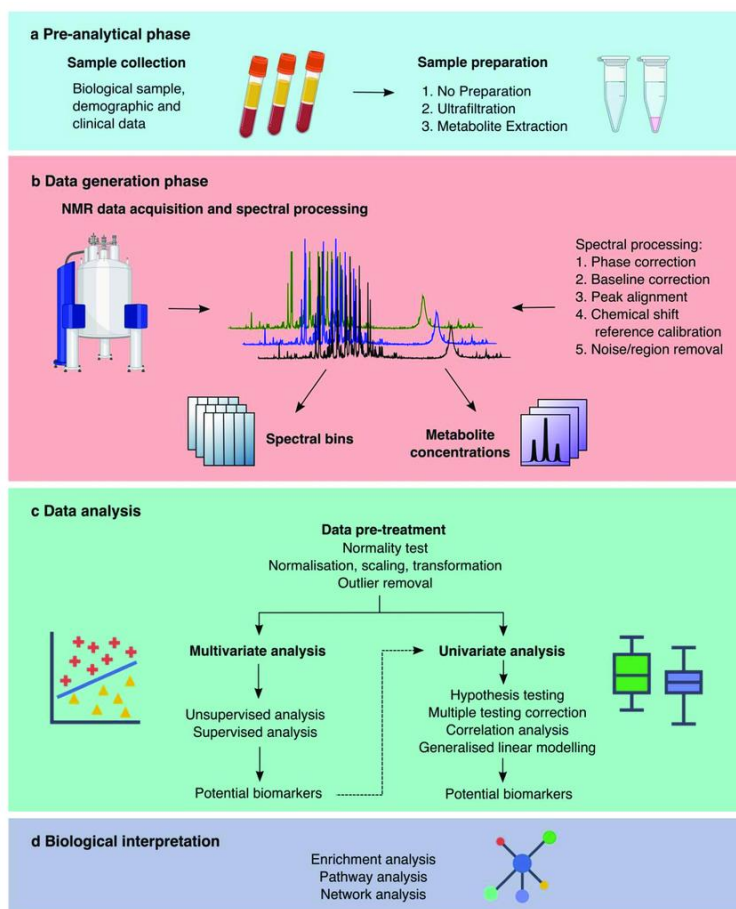
Η φασματοσκοπία NMR (**Εικόνα 15**) αποτελεί μια αναλυτική μέθοδο που χρησιμοποιεί τις μαγνητικές ιδιότητες επιλεγμένων ατομικών πυρήνων (π.χ. ^1H) για να ανιχνεύσει τη δομή και την ποσότητα των μεταβολιτών ενός βιολογικού δείγματος.



Εικόνα 15: Φάσματα NMR δειγμάτων ούρων. Αντιπροσωπευτικά φάσματα $1H$ -NMR δειγμάτων ούρων από ποντικούς αγρίου τύπου (A) και db/db ποντικούς (B). Συγκριτικά με το φάσμα των ούρων από ποντικούς αγρίου τύπου, αυτό των ούρων από db/db ποντικούς παρουσιάζει υψηλότερης έντασης σήμα για τη γλυκόζη, το 3-υδροξυβουτυρικό, το οξικό, την ακετόνη, το ακετοξικό οξύ, το ηλεκτρικό, το κιτρικό, την μεθυλαμίνη, την κρεατίνη, το οξείδιο της τριμεθυλαμίνης (TMAO), τη γλυκίνη, το ιππουρικό, την αλλαντοΐνη, το cis-ακονιτικό, το φουμαρικό και το 3-ινδοξυσουλφικό. (Wei, et al, 2015)

Η βάση της λειτουργίας της είναι ότι ο πυρήνας πολλών ισοτόπων έχει χαρακτηριστική ιδιοπεριστροφή όταν τοποθετηθεί και διεγερθεί σε ένα μαγνητικό πεδίο, απορροφά ακτινοβολία σε συγκεκριμένη συχνότητα. Η φασματοσκοπία NMR παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα καθώς είναι μια τεχνική εξαιρετικά αναπαραγώγιμη, μη καταστροφική, φθηνότερη, απαιτεί μικρή έως καθόλου προετοιμασία του δείγματος και παρέχει γρήγορη και αξιόπιστη ταυτοποίηση γνωστών μεταβολιτών αλλά μπορεί να αναγνωρίσει και τη δομή αγνώστων μορίων (Sas, et al, 2015; Kalim, et al, 2017; Maroli, et al, 2023). Λόγω της μεγάλης αυτοματοποίησης και αναπαραγωγιμότητας μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μεγάλης κλίμακας μελέτες μεταβολομικής (Jin, et al, 2021). Κύριος περιορισμός της είναι η ευαισθησία της καθώς ανιχνεύει μεταβολίτες με συγκεντρώσεις τις τάξεις των micromoles έχοντας περιορισμένη ικανότητα ανίχνευσης μεταβολιτών που εντοπίζονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (Sas, et al, 2015). Τα δεδομένα που λαμβάνονται από την φασματοσκοπία NMR υποβάλλονται σε μια προ-επεξεργασία κατά την οποία πραγματοποιείται διόρθωση της φάσης, της βασικής γραμμής του φάσματος και βαθμονόμηση αυτού (Guan, et al,

2013). Ανεξάρτητα από την τεχνική που επιλέγεται, την επεξεργασία των δεδομένων ακολουθεί η στατιστική ανάλυση και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων (**Εικόνα 16**) (Tofte, et al, 2020).



Εικόνα 16: Τυπική ροή εργασίας χρησιμοποιώντας NMR για μεταβολομική ανάλυση. Περιλαμβάνει τέσσερα στάδια στα οποία ανήκουν η συλλογή και η προετοιμασία του δείγματος (a), η δημιουργία δεδομένων στην οποία περιλαμβάνεται η λήψη του φάσματος, η επεξεργασία του, η δημιουργία φασματικών πεδίων και η συγκέντρωση των μεταβολιτών (b). Ακολουθεί η στατιστική ανάλυση των δεδομένων (c) και η βιολογική τους ερμηνεία (d). (Huang, et al, 2022)

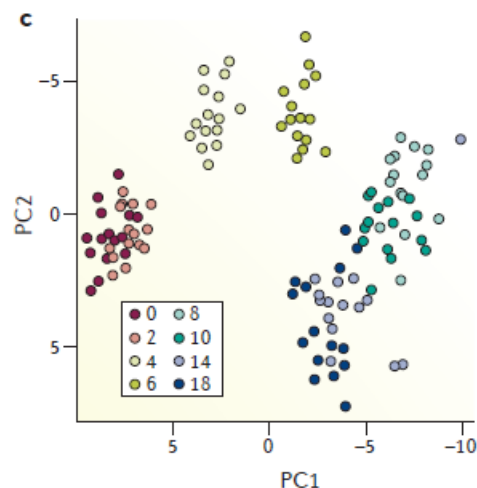
5.2 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα δεδομένα που προκύπτουν από τις μελέτες μεταβολομικής υποβάλλονται στη συνέχεια σε στατιστική ανάλυση με σκοπό την αναγνώριση στατιστικά σημαντικών διαφορών ή ομοιοτήτων

μεταξύ της φυσιολογικής κατάστασης και της παθολογικής οντότητας ενδιαφέροντος. Το σύνολο των δεδομένων που συλλέγονται από τις χρησιμοποιούμενες αναλυτικές μεθόδους υπόκειται σε στατιστική επεξεργασία, συνήθως την πολυπαραγοντική ανάλυση δεδομένων (Multivariate Data Analysis- MDA). Η πολυπαραγοντική ανάλυση προβάλλεται μέσω της μη εποπτευόμενης τεχνικής της ανάλυσης κυρίων συνιστωσών (Principal Component Analysis- PCA) και στη συνέχεια μέσω εποπτευόμενων τεχνικών, όπως η διαχωριστική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis- PLS-DA) και η διαχωριστική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων σε ορθογώνια προβολή (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis- OPLS-DA) (Marshall, et al, 2014; Hocher, et al, 2017). Οι μέθοδοι αυτοί αποσκοπούν στη διάκριση των υπό μελέτη ομάδων και στον προσδιορισμό μεταβολιτών-βιοδεικτών σε περίπλοκα σύνολα δεδομένων. Ο διαχωρισμός και η διαφοροποίηση των μεταβολιτών βασίζεται στη χρήση δύο κυρίων συνιστωσών, της PC1 στον άξονα X και της PC2 στον άξονα Y (scores plot). Η παρουσίαση της συμβολής των μεταβολιτών στη διάκριση των πληθυσμών της υπό μελέτη νόσου, διευκολύνεται από τη χρήση του γραφήματος φορτίων (loadings plot). Οι μέθοδοι αυτοί χρησιμοποιούνται κυρίως για μια συνολική εικόνα του μεταβολικού προφίλ και όχι για την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων μεταβολιτών, αποτελώντας κυρίως μη στοχευμένες προσεγγίσεις (Hocher, et al, 2017).

5.2.1 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA)

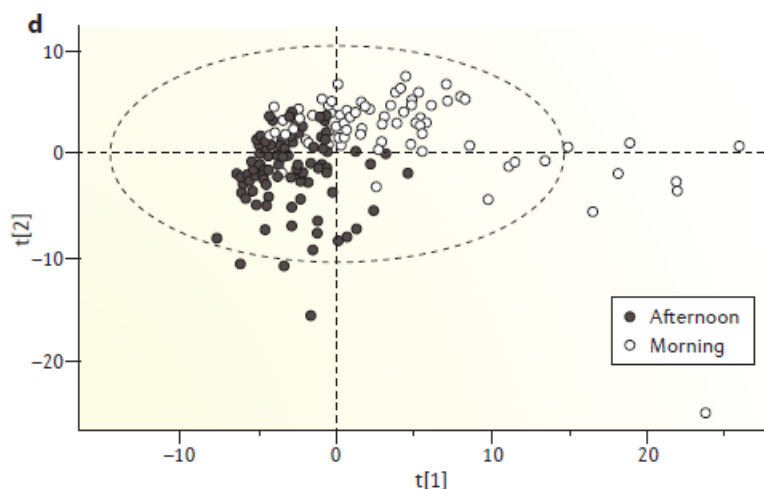
Η PCA (**Εικόνα 17**) αποτελεί μια μη εποπτευόμενη τεχνική και την πιο κοινά χρησιμοποιούμενη μέθοδο MDA. Η τεχνική αυτή αποσκοπεί στην μείωση των αρχικών μεταβλητών με νέες, τις οποίες αποτελούν οι κύριες συνιστώσες, προερχόμενες από το γραμμικό συνδυασμό των αρχικών. Η πρώτη κύρια συνιστώσα (PC1) αφορά τη μεγαλύτερη δυνατή διακύμανση που δημιουργείται μεταξύ των αρχικών μεταβλητών, με την δεύτερη κύρια συνιστώσα (PC2) να έχει την αμέσως επόμενη μεγαλύτερη διακύμανση, και ούτω καθεξής. Συνολικά, η PCA στοχεύει στην ελάττωση του αριθμού των κύριων συνιστωσών και την επίτευξη της καλύτερης δυνατής εξήγησης των δεδομένων και μεταβλητών της ανάλυσης. Στις μελέτες μεταβολομικής, η PCA χρησιμοποιείται κυρίως ως αρχική προσέγγιση με σκοπό τη δημιουργία μιας γενικής εικόνας των υπό μελέτη μεταβολικών προφίλ, προσφέροντας πληροφορίες όσον αφορά τις τάσεις ομαδοποίησης (trends) ή ακραίων συμπεριφορών (outliers) σε αυτά (Marshall, et al, 2014).



Εικόνα 17: Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) (Hochoer, et al, 2017)

5.2.2 Προβολή Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS)

Η PLS αποτελεί μια εποπτευόμενη μέθοδο που στις περισσότερες μελέτες μεταβολομικής λειτουργεί συμπληρωματικά ως προς την PCA αυξάνοντας την ακρίβεια των αποτελεσμάτων. Αποσκοπεί στην μείωση των αρχικών μεταβλητών, με τις νέες μεταβλητές να αποτελούν τις λανθάνουσες. Ο όρος PLS-DA (**Εικόνα 18**) αναφέρεται στην ανάλυση προβολών μερικών ελαχίστων τετραγώνων σε λανθάνουσες τιμές με διαχωρισμό. Χρησιμοποιώντας τη σχέση μεταξύ των μεταβλητών ενδιαφέροντος, στην PLSA-DA διαχωρίζονται τα δείγματα προς σύγκριση βάσει της τάξης στην οποία έχουν κατηγοριοποιηθεί, ενισχύοντας τον διαχωρισμό μεταξύ των συγκεκριμένων ομάδων και παρέχοντας πληροφορίες όσον αφορά τις μεταξύ τους μεταβολικές διαφορές (Marshall, et al, 2014; Hochoer, et al, 2017).



Εικόνα 18: Ανάλυση προβολών μερικών ελαχίστων τετραγώνων σε λανθάνουσες τιμές με διαχωρισμό (PLS-DA) (Hochoer, et al, 2017)

5.3 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑΣ ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

5.3.1 Διασταυρούμενη Επικύρωση (Cross-Validation)

Η διασταυρούμενη επικύρωση αποτελεί μια διαδικασία κατά την οποία χρησιμοποιούνται οι στατιστικές παράμετροι ποιότητας R^2 (δείκτης αξιολόγησης της ικανότητας διαχωρισμού του μοντέλου) και Q^2 (δείκτης εκτίμησης της προσαρμογής του μοντέλου) ώστε να αξιολογήσουν την εγκυρότητα των μοντέλων διαχωρισμού των μεταβολικών προφίλ. Περιλαμβάνει την χρήση 10 υποσυνόλων, με το ένα από αυτά να αποτελεί το σύνολο επικύρωσης (test set) και τα υπόλοιπα 9 να δημιουργούν το σύνολο εκπαίδευσης (training set). Το μοντέλο εκπαιδεύεται χρησιμοποιώντας το σύνολο εκπαίδευσης και δοκιμάζεται έναντι του συνόλου επικύρωσης. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται, χρησιμοποιώντας κάθε φορά ένα διαφορετικό σύνολο ως σύνολο επικύρωσης και τα υπόλοιπα ως σύνολο εκπαίδευσης. Στο τέλος, υπολογίζεται η μέση επίδοση του μοντέλου με τις στατιστικές παραμέτρους R^2 και Q^2 . Όταν η R^2 τείνει στο 0, τότε η ικανότητα του στατιστικού μοντέλου να εκφράσει την πληροφορία που υπάρχει στα δεδομένα είναι μηδενική, ενώ όταν τείνει στο 1 είναι άριστη. Όταν $Q^2 > 0.5$, τότε η ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου θεωρείται καλή, ενώ όταν $Q^2 > 0.9$ θεωρείται άριστη με την προϋπόθεση η διαφορά $R^2 - Q^2$ να μην υπερβαίνει την τιμή 0.3.

5.3.2 Ανάλυση Μετάθεσης (*Permutation Test*)

Η ανάλυση μετάθεσης αποτελεί επίσης μια μέθοδο αξιολόγησης των μοντέλων διαχωρισμού. Αποτελεί ένα μέτρο αξιολόγησης των στατιστικών παραμέτρων ποιότητας Q^2 και R^2 . Για την επικύρωση της στατιστικής σημασίας του μοντέλου, χρησιμοποιείται ένα σύνολο δεδομένων στο οποίο λαμβάνουν χώρα τυχαίες επαναλαμβανόμενες μεταθέσεις. Εάν η στατιστική τιμή p των μετατιθέμενων δεδομένων αυτών είναι μικρότερη του 0.05, τότε το μοντέλο θεωρείται έγκυρο, ενώ με τιμές μεγαλύτερες το μοντέλο δεν μπορεί να θεωρηθεί αξιόπιστο για την εξαγωγή συμπερασμάτων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

5.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΟΔΩΝ

Η πολυπλοκότητα των δεδομένων που προκύπτουν από τις προαναφερθείσες αναλυτικές μεθόδους, καθιστά κρίσιμη την ανάγκη για καλύτερη οπτικοποίηση και ποσοτική ανάλυση αυτών, έτσι ώστε να διευκολυνθεί η ερμηνεία των αλλαγών που παρατηρούνται πειραματικά. Η χαρτογράφηση (mapping) σε μεταβολικές οδούς, αποτελεί μια προσέγγιση που χρησιμοποιείται συχνά στην ερμηνεία των δεδομένων μεταβολομικής και ιδιαιτέρως όταν οι μελέτες αφορούν χρόνια, μεταβολικά νοσήματα όπως ο ΣΔ και οι επιπλοκές του. Οι μεταβολίτες όμως συχνά εμπλέκονται σε πολλαπλά μεταβολικά μονοπάτια, δυσχεραίνοντας την οπτικοποίηση δεδομένων μέσω μεταβολικών οδών. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται προγράμματα να οποία προβάλλουν τα δεδομένα ως ένα δίκτυο μεταβολικών μονοπατιών παρέχοντας ένα εύκολο τρόπο για την διερεύνηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων (Hochoer, et al ,2017).

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

6. ΥΛΙΚΑ/ ΜΕΘΟΔΟΣ

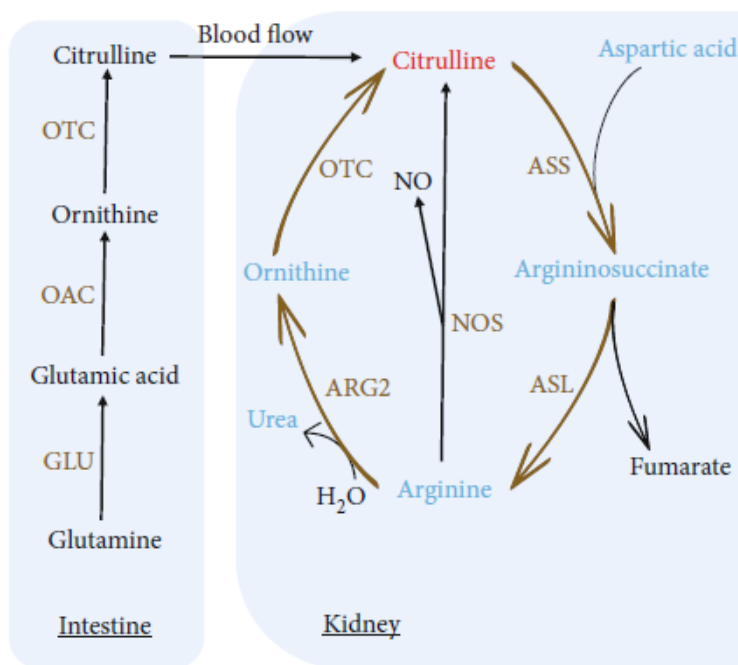
Για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης έγινε προσπέλαση της βάσης δεδομένων «Pubmed» χρησιμοποιώντας όρους Mesh «metabolomics AND diabetic nephropathy», «diabetic nephropathy AND biomarkers», αναζητώντας βιβλιογραφία στην αγγλική γλώσσα.

7. ΜΕΛΕΤΕΣ ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΗΣ ΣΤΗ ΔΝΝ

Ο νεφρός αποτελεί ένα όργανο με έντονη μεταβολική δραστηριότητα με τις λειτουργίες του (σπειραματική διήθηση, σωληναριακή επαναρρόφιση και έκκριση) να αλληλεπιδρούν άμεσα με το μεταβόλωμα επηρεάζοντας τα επίπεδα των μεταβολιτών στα βιολογικά υγρά (Niewczas, et al, 2014; Tofte, et al, 2020). Τα χαρακτηριστικά αυτά του νεφρού, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι ο ΣΔ αποτελεί ένα μεταβολικό νόσημα, καθιστούν τη μεταβονομική ένα πολύ ενδιαφέρον πεδίο έρευνας στη ΔΝΝ. Έως σήμερα, οι μελέτες μεταβονομικής που έχουν πραγματοποιηθεί στη ΔΝΝ, είτε σε ζωικά μοντέλα είτε σε ανθρώπους, ακολουθούν κυρίως τη μη στοχευμένη προσέγγιση μελετώντας τα επίπεδα των διάφορων μεταβολιτών σε δείγματα ορού και ούρων (Tofte, et al, 2020). Η μελέτη δειγμάτων ορού και ούρων μπορεί να συνεισφέρει στην καλύτερη σκιαγράφηση των μεταβολικών αλλά και λειτουργικών διεργασιών του νεφρού (όπως διήθηση, επαναρρόφιση) και να παρέχει επιπρόσθετες πληροφορίες όσον αφορά την απόκριση του νεφρού στο ΣΔ (Izundegui, et al, 2022). Μια γενική παρατήρηση από τις μελέτες μεταβονομικής που έχουν πραγματοποιηθεί έως σήμερα στη μεταβολική διαταραχή ΔΝΝ είναι ότι παρατηρούνται αλλαγές στον TCA, στην οξείδωση των λιπαρών οξέων, στο μεταβολισμό των αμινοξέων και των νουκλεοτιδίων, στο μεταβολισμό της γλυκόζης και της κετογένεσης (Darshi, et al, 2016; Jiang, et al, 2019; Banimfreg, et al, 2022).

Σε μελέτη των Hirayama et al αναλύθηκε το μεταβολικό προφίλ 78 ασθενών που έπασχαν από ΣΔ, χρησιμοποιώντας μη στοχευμένη προσέγγιση και CE-TOFMS σε δείγματα ορού. Οι ασθενείς αυτοί διαχωρίστηκαν σε 3 ομάδες: ασθενείς που δεν έπασχαν από ΔΝΝ, ασθενείς που

παρουσίαζαν μετρίως αυξημένη αλβουμινουρία και ασθενείς με σοβαρά αυξημένη αλβουμινουρία. Από τη μελέτη αυτή προέκυψε ότι τα επίπεδα των αμινοξέων και παραγώγων τους κιτρουλλίνη, ασπαρτικό οξύ, συμμετρική διμεθυλαργινίνη (SDMA) και κινουρενίνη ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς που έπασχαν από ΔΝΝ, ενώ εμφάνισαν θετική συσχέτιση με το UACR και αρνητική με το eGFR. Η κιτρουλλίνη, συμμετέχει στον κύκλο της ουρίας, προσλαμβάνεται από τους νεφρούς και μετατρέπεται σε ουρία μέσω της αργινίνης. Οι νεφροί διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μετατροπή αυτή, ενώ και σε άλλες μελέτες έχει φανεί συσσώρευση ενδιάμεσων προϊόντων του κύκλου της ουρίας σε ασθενείς με τελικού σταδίου νεφρική νόσο (ΤΣΝΝ). Συνεπώς, η αύξηση των επιπέδων της κιτρουλλίνης στον ορό των ασθενών με ΔΝΝ θα μπορούσε να αποδοθεί στην διαταραχή της λειτουργίας αυτής (**Εικόνα 19**).

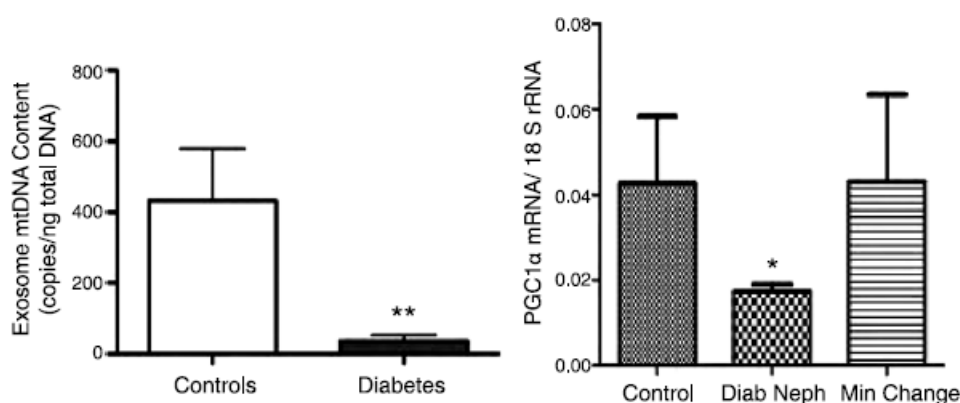


Εικόνα 19:Σχηματική αναπαράσταση του μεταβολισμού της κιτρουλλίνης. Η κιτρουλλίνη εισέρχεται από την κυκλοφορία στα κύτταρα του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου, όπου συμμετέχει στον κύκλο της ουρίας. (GLU: γλουταμινάση, OTC: τρανσκαρβαμυλάση της ορνιθίνης, OAC: αμινοτρανσφεράση της ορνιθίνης, ASS: συνθάση του αργινοηλεκτρικού, ASL: λυάση του αργινοηλεκτρικού, NOS: συνθάση NO, ARG2: αργινάση 2) (Rong, et al, 2022)

Το ασπαρτικό οξύ συμμετέχει επίσης στον κύκλο της ουρίας προσφέροντας ένα από τα άτομα αζώτου στην ουρία. Η SDMA και η ασύμμετρη διμεθυλαργινίνη (ADMA) που αποτελεί δομικό ισομερές της SDMA σχηματίζονται από την ενζυμική μεθυλίωση καταλοίπων αργινίνης στις πρωτεΐνες που αποτελεί έναν κοινό μεταμεταφραστικό μηχανισμό. Οι μεταβολίτες αυτοί έχουν ταυτοποιηθεί ως πιθανοί βιοδείκτες XNN. Η ADMA μεταβολίζεται από το ένζυμο διμεθυλαμινοϋδρολάση της διμεθυλαργινίνης σε κιτρουλλίνη και διμεθυλαμίνη στους νεφρούς ενώ η SDMA απεκκρίνεται στα ούρα δίχως περαιτέρω τροποποίηση. Η κινουρενίνη αποτελεί προϊόν του μεταβολισμού της τρυπτοφάνης μέσω του μονοπατιού τρυπτοφάνης-κινουρενίνης παράγοντας NAD^+ και ακέτυλο-CoA. Κρίσιμο ένζυμο στο νεφρό για το μονοπάτι αυτό αποτελεί η 2,3 διοξυγενάση της ινδολεαμίνης που μεταβολίζει την τρυπτοφάνη σε N-φορμυλοκινουρενίνη, με την τελευταία να καταβολίζεται σε κινουρενίνη. Πειραματικές μελέτες υποστηρίζουν την αυξημένη δραστηριότητα του μονοπατιού αυτού σε XNN με την ταχύτητα της αντίδρασης να συσχετίζεται θετικά με τη βαρύτητα της νόσου. Στη μελέτη αυτή φάνηκε επιπλέον σημαντική αύξηση της γ-βουτυροβεταΐνης (GBB), ενός υδατοδιαλυτού παραγώγου του GABA. Ο μεταβολίτης αυτός δρα ως πρόδρομο μόριο της L-καρνιτίνης η οποία παράγεται από τη δράση της υδροξυλάσης/διοξυγενάσης της GBB. Σε προηγούμενες μελέτες έχει φανεί αρνητική συσχέτιση μεταξύ της GBB και του e GFR στο πλάσμα ασθενών με XNN, συνεπώς η αύξηση των επιπέδων της πιθανώς προκύπτει από την αναστολή του ενζύμου αυτού στο νεφρό. Τέλος, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα αζελαϊκού οξέος, ενός κορεσμένου δικαρβοξυλικού οξέος με 9 άτομα C που προέρχεται από την οξείδωση των ΛΟ και εμποδίζει την παραγωγή ROS στα ουδετερόφιλα, όπως επίσης και μειωμένα επίπεδα γαλακταρικού οξέος που ανήκει στα παράγωγα του γλυκουρονικού οξέος. Ο μεταβολίτης αυτός εντοπίζεται σε φρούτα, λαχανικά και βόειο γάλα και δρα ως θρεπτικό υπόστρωμα για πολλούς οργανισμούς μεταξύ των οποίων και το *E.Coli*. Παρόλο που οι μεταβολίτες αυτοί παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση με το UACR και θετική με το e GFR, οι μηχανισμοί ελάττωσής τους με την έναρξη της ΔΝΝ χρειάζεται να αποσαφηνιστούν ενώ οι ίδιοι μεταβολίτες έχουν ταυτοποιηθεί και σε ασθενείς με XNN χωρίς ιστορικό ΣΔ υποδεικνύοντας πως είναι δείκτες νεφρικής δυσλειτουργίας (Hirayama, et al 2012; Darshi, et al, 2016).

Σε μια στοχευμένη ανάλυση των Sharma et al δειγμάτων ούρων 24ώρου, αναλύθηκαν 94 μεταβολίτες σε μια ομάδα ελέγχου, σε ασθενείς με ΔΝΝ και σε ασθενείς με ΣΔ. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν μείωση των επιπέδων σε 13 μεταβολίτες στους ασθενείς με ΔΝΝ ως προς την ομάδα

ελέγχου, ενώ 12 από αυτούς διέκριναν την ομάδα της ΔΝΝ από αυτή του ΣΔ χωρίς νεφροπάθεια.. Συνολικά 13 μεταβολίτες στα ούρα διέκριναν τα controls από τη ΔΝΝ. Από αυτούς, οι 12 διέκριναν επίσης την ομάδα ΣΔ χωρίς ΔΝΝ από τη ΔΝΝ. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι 12 από τους 13 μεταβολίτες συνδέονται με τη μιτοχονδριακή λειτουργία, υποδεικνύοντας μείωση της δραστηριότητάς τους στη ΔΝΝ. Η παρατήρηση αυτή υποστηρίχθηκε περαιτέρω στη μελέτη αυτή καθώς διαπιστώθηκε μειωμένη ποσότητα μιτοχονδριακού DNA στα εξωσώματα στα ούρα ασθενών με ΔΝΝ, ενώ ο νεφρικός ιστός των ασθενών αυτών παρουσίασε μειωμένη έκφραση του γονιδίου PGC1α (**Εικόνα 20**), κύριου ρυθμιστή της βιογένεσης των μιτοχονδρίων (Sharma, et al, 2013).



Εικόνα 20: Δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων στη ΔΝΝ. Στα πλαίσια της ΔΝΝ παρατηρείται μειωμένο περιεχόμενο αντιγράφων μιτοχονδριακού DNA συγκριτικά με τα υγιή controls, ενώ και η έκφραση του γονιδίου του PGC1α είναι ελαττωμένη συγκριτικά με υγιή controls και ασθενείς που έπασχαν από νόσο ελαχίστων αλλοιώσεων. (Sharma, et al, 2013)

Τον πιθανό ρόλο των ενδιάμεσων προϊόντων του TCA ως πιθανούς βιοδείκτες πρώιμης διάγνωσης της ΔΝΝ διερεύνησε η μελέτη των Li et al, όπου μελετήθηκε το μεταβολικό προφίλ *db/db* και *db/m* ποντικών στον ορό και τα ούρα και οι σχετιζόμενες με το χρόνο αλλαγές αυτού χρησιμοποιώντας GC-TOFMS κατά την 6^η, την 8^η, την 10^η εβδομάδα όταν και εμφανίστηκαν τα αρχικά στάδια της ΔΝΝ και την 12^η εβδομάδα όταν πλέον είχε αναπτυχθεί προχωρημένη ΔΝΝ. Κατά την ανάλυση διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα 5 μεταβολιτών του TCA (φουμαρικό, ηλεκτρικό, κιτρικό, α-κετογλουταρικό και μηλικό) ήταν αυξημένα στους *db/db* ποντικούς την 6^η έως την 8^η εβδομάδα, ακολουθούμενη από μείωση αυτών μετέπειτα. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα των κορεσμένων ελεύθερων ΛΟ, εξαδεκανοϊκού και τετραδεκανοϊκού οξέος

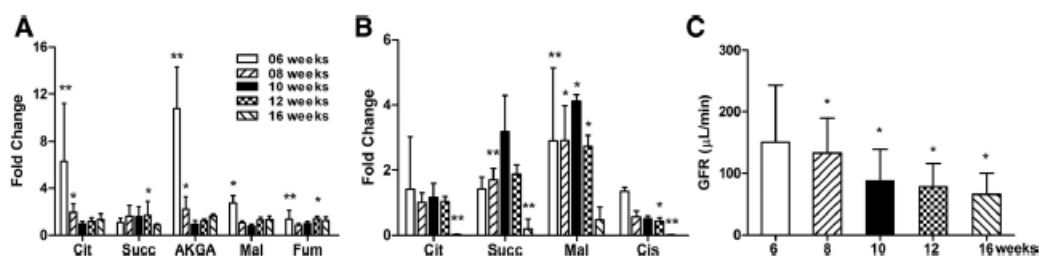
την 8^η και την 10^η εβδομάδα, των ακόρεστων ελεύθερων ΛΟ, 9 οκταδεκανοϊκού και οκταδεκαδιενοϊκού οξέος την 10^η εβδομάδα στους *db/db* ποντικούς, όπως επίσης μειωμένα επίπεδα λυσίνης μετά την 8^η εβδομάδα. Όσον αφορά τις διαφορές στο μεταβολικό προφίλ των ούρων, το κιτρικό και το μηλικό εμφάνισαν σταδιακά αύξηση κατά την 6^η, την 8^η, την 10^η και 12^η εβδομάδα στους *db/db* ποντικούς, ενώ 4 μεταβολίτες του TCA (μηλικό, ηλεκτρικό, κιτρικό και *cis*-ακονιτικό) ήταν σημαντικά μειωμένοι στους ποντικούς αυτούς κατά το τέλος της 16^{ης} εβδομάδας. Επιπλέον, το κετοξύ 3-υδρόξυ-βουτυρικό ήταν αυξημένο στους *db/db* ποντικούς από την 6^η εβδομάδα. Η ανάλυση των μεταβολιτών του TCA σε σχέση με την εξέλιξη της ΔΝΝ ανέδειξε ότι τα αρχικά αυξημένα επίπεδα κιτρικού, μηλικού, α -κετογλουταρικού και φουμαρικού κατά την 6^η εβδομάδα διαδέχεται μια απότομη μείωση αυτών την 8^η εβδομάδα και σταδιακή ελάττωση από την 10^η εβδομάδα (**Πίνακας 2**).

Μεταβολίτης	6 ^η εβδομάδα	8 ^η εβδομάδα	10 ^η εβδομάδα	12 ^η εβδομάδα	16 ^η εβδομάδα
Φουμαρικό	1.38	0.84	0.99	1.42	1.24
Κιτρικό	6.3	1.94	0.97	1.18	1.37
α -κετογλουταρικό	10.69	2.19	0.93	1.22	1.66
Μηλικό	2.74	1.05	0.76	1.31	1.35
Ηλεκτρικό	1.08	1.64	1.59	1.70	0.87

Πίνακας 2: Αναλογία μεταβολής των μεταβολιτών του TCA στον ορό *db/db* ποντικών σε σχέση με *db/m* ποντικών.

Τα αποτελέσματα αυτά θα μπορούσαν να ερμηνευθούν από έναν σημαντικά αυξημένης λειτουργικότητας TCA αρχικά που στη συνέχεια, και ενώ τα επίπεδα γλυκόζης αυξάνονται, είτε ο ίδιος ο TCA γίνεται λιγότερο αποτελεσματικός είτε τροφοδοτείται με λιγότερη γλυκόζη. Η εμφάνιση ΣΔ και αντίστασης στην ινσουλίνη διαταράσσουν τη γλυκόλυση και συνεπώς ρυθμίζουν αρνητικά τον TCA. Διαφορετική πορεία ακολούθησε το ηλεκτρικό καθώς σύμφωνα με τα δεδομένα μελετών, η υπεργλυκαιμία επάγει τη συσσώρευση ηλεκτρικού και την ενεργοποίηση του υποδοχέα του, GPR91 στο νεφρό, μέσω ενός παρακρινούς σηματοδοτικού μονοπατιού που πυροδοτεί την απελευθέρωση ρενίνης. Τα επίπεδα των μεταβολιτών του TCA στα ούρα απεικονίζουν την ισορροπία μεταξύ της απέκκρισης τους από το σπείραμα και της επαναρρόφησής τους από τα νεφρικά σωληνάρια. Κατά την 6^η εβδομάδα και ενώ τα επίπεδα των μεταβολιτών του TCA είναι πολύ υψηλά, μόνο μικρές συγκεντρώσεις αυτών συγκριτικά με την εβδομάδα 8, 10 και 12 ανιχνεύονται στα ούρα υποδεικνύοντας είτε την ελεγχόμενη απέκκρισή τους είτε την

επαναρρόφησή τους από τα σωληνάρια, δηλαδή φυσιολογική νεφρική λειτουργία. Καθώς όμως τα επίπεδα της γλυκόζης αυξάνουν μετά την 6^η εβδομάδα, οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών του TCA δεν παρουσίασαν παράλληλη μείωση με αυτές του ορού υποδεικνύοντας την παρουσία νεφρικής δυσλειτουργίας. Συμπερασματικά, οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών του TCA στα ούρα, συγκριτικά με αυτές στον ορό θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως πρώιμος δείκτης νεφρικής βλάβης στη ΔΝΝ (**Εικόνα 21**) (Li, et al, 2013). Η παρεμπόδιση της συσσώρευσης μεταβολιτών του TCA αλλά και της γλυκόλυσης αποτελεί πιθανό θεραπευτικό στόχο καθώς η χορήγηση SGLT2 αναστολέων και HIF-PH αναστολέων που εμποδίζει τη συσσώρευση αυτών μειώνει το οξειδωτικό στρες και βελτιώνει την παθολογοανατομική εικόνα όπως η υπερτροφία του σπειράματος και η πάχυνση της ΣΒΜ (Hasegawa, et al, 2021).



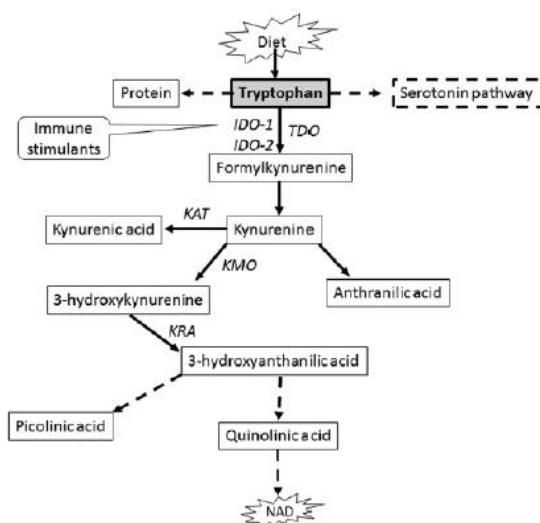
Εικόνα 21: Συσχέτιση των αλλαγών των συγκεντρώσεων προϊόντων του TCA με αυτές του e GFR. (A) Στον ορό μεταξύ των db/db και των db/m ποντικών, (B) Στα ούρα μεταξύ των db/db και των db/m ποντικών, (C) Επίπεδα GFR στους db/db ποντικούς (* $P < 0.05$ vs db/m, ** $P < 0.01$ vs db/m). (Li, et al, 2013)

Σύμφωνα με τη μελέτη των Pena et al, όπου μελετήθηκαν δείγματα πλάσματος και ούρων από 90 ασθενείς με ΣΔ χρησιμοποιώντας LC-MS κανένας μεταβολίτης δεν κατάφερε να παρουσιάσει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τη μετάβαση από το στάδιο της νορμοαλβουμινουρίας σε αυτό της μετρίως αυξημένης αλβουμινουρίας (ούτε στο πλάσμα, ούτε στα ούρα). Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις του αμινοξέος ιστιδίνη και της ακυλοκαρνιτίνης βραχείας αλυσού βουτενυλοκαρνιτίνη στο πλάσμα, καθώς και οι συγκεντρώσεις της εξόξης, της γλουταμίνης και της τυροσίνης στα ούρα εμφάνισαν συσχέτιση με τη μετάβαση από το στάδιο της μετρίως σε αυτό της σοβαρά αυξημένης αλβουμινουρίας. Οι μεταβολίτες των ούρων παρουσίασαν μεγαλύτερη προγνωστική αξία συγκριτικά τόσο με αυτούς του πλάσματος όσο και συγκριτικά με έναν προγνωστικό μοντέλο που χρησιμοποιούσε το e GFR και την αλβουμινουρία (Pena, et al, 2014; Rhee, et al, 2015).

Τον προγνωστικό ρόλο των μεταβολιτών του TCA εξερεύνησαν και οι Sas et al. Αρχικά, αναλύθηκε το μεταβολικό προφίλ σε δείγματα φλοιού από βιοψίες νεφρού *db/db* ποντικών χρησιμοποιώντας MS. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν αύξηση της μεταβολικής δραστηριότητας στα μονοπάτια της γλυκόλυσης, της β-οξειδωσης των ΛΟ και του TCA. Αν και σύμφωνα με την υπόθεση του Randle, η γλυκόζη και τα ΛΟ ανταγωνίζονται ως προς την οξείδωσή τους, με τα κύτταρα των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων να προτιμούν τη χρήση ΛΟ ως καύσιμο, η έκθεσή τους σε αυξημένη γλυκόζη στα πλαίσια του ΣΔ εξηγεί την αύξηση των μεταβολιτών της γλυκόλυσης και του TCA στο νεφρικό φλοιό. Ωστόσο, η ταυτόχρονη αύξηση των μεταβολιτών της β-οξειδωσης των ΛΟ υποδεικνύει ένα μεταβολικό επαναπρογραμματισμό που χαρακτηρίζεται από προοδευτική αύξηση της χρήσης του υποστρώματος και την ταυτόχρονη κατανάλωση γλυκόζης και ΛΟ. Σε περαιτέρω ανάλυση των δειγμάτων αυτών με transcriptomics, οι προαναφερθείσες αλλαγές στο μεταβολισμό συσχετίστηκαν με αυξημένη ακετυλίωση μιτοχονδριακών πρωτεϊνών και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, χωρίς να αποσαφηνίζεται εάν η τελευταία είναι το αίτιο ή το αποτέλεσμα της αύξησης των μεταβολιτών του TCA. Η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, μέσω συσσώρευσης ROS οδηγεί στη βλάβη και την καταστροφή των συμπλόκων της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, αυξάνοντας έτσι τους μεταβολίτες του TCA. Από την άλλη πλευρά, τα ενδιάμεσα προϊόντα του TCA ασκούν μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις σε ένζυμα, προκαλούν διαταραχές στη μιτοφαγία, ενώ πιο συγκεκριμένα το ηλεκτρικό ενεργοποιεί τοπικά το RAAS επιδεινώνοντας το οξειδωτικό στρες μέσω ενεργοποίησης της NOX4 από την Ang II. Το φουμαρικό επάγει τον HIF-1α και τον TGF-β δύο μόρια που εμπλέκονται στην παθογένεση της ΔΝΝ. Η συσσώρευση του φουμαρικού οφείλεται είτε στην αναστολή της αφυδρογονάσης του φουμαρικού, ένζυμο που καταλύει την μετατροπή του φουμαρικού σε μηλικό, είτε σε ενεργοποίηση της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού, με το πρώτο να είναι μειωμένο στη ΔΝΝ και στόχο της NOX4 ενώ αναστολή αυτής να αποκαθιστά τα επίπεδά του (Sas, et al, 2016; Darshi, et al, 2016; You, et al, 2016). Επίσης το φουμαρικό φέρεται να συμμετέχει και μέσω της ρύθμισης της δράσης της NOX4 ενώ σε πειραματικά μοντέλα ποντικών F1 Akita, η αναστολή της NOX4 μειώνει τα επίπεδα φουμαρικού στα ούρα (Darshi, et al, 2016). Το κιτρικό υπό τη δράση της λυάσης του κιτρικού σχηματίζει ακετυλο-CoA οδηγώντας σε ακετυλίωση πρωτεϊνών. Τα πειραματικά αυτά αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν σε μια κοόρτη ασθενών με ΣΔ από την ίδια ερευνητική ομάδα, όπου παρατηρήθηκε αύξηση των μεταβολιτών του TCA στα ούρα των ασθενών με ΔΝΝ διακρίνοντάς τους από υγιή controls αλλά και

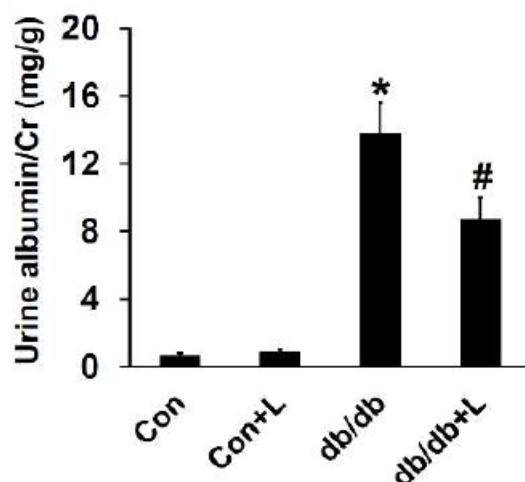
επιτρέποντας την πρόγνωση και πρόωμη διάγνωση της ΔΝΝ καθώς στους ασθενείς με προχωρημένη ΔΝΝ (e GFR $\sim$ 35 ml/min/1,73 m²) τα επίπεδα των ενδιάμεσων προϊόντων του TCA, γεγονός που ίσως οφείλεται στην καταστροφή των σωληναρίων στο στάδιο αυτό (Sas, et al, 2016).

Στην ανάλυση δείγματος ούρων χρησιμοποιώντας GC-MS και LC-MS σε ασθενείς με ΣΔΤ1 από τους Van der Kloet et al διαπιστώθηκε πως ακυλοκαρνιτίνες, ακυλογλυκίνες και ενδιάμεσα προϊόντα του μεταβολισμού της τρυπτοφάνης (**Εικόνα 22**) συσχετίζονται με τη μεταβολή σταδίου αλβουμινουρίας και την εξέλιξη της ΔΝΝ υποδεικνύοντας διαταραχή στη β-οξειδωση των ΛΟ και το μεταβολισμό της τρυπτοφάνης (Van der Kloet, et al, 2012). Κρίσιμο ένζυμο στο μεταβολισμό της τρυπτοφάνης είναι η 3-μονο-οξυγενάση της κινουρενίνης, η οποία καταλύει την υδροξυλίωση της κινουρενίνης σε υδροξυκινουρενίνη. Το ένζυμο αυτό εκφράζεται στα πειραματικά κύτταρα και τα ποδοκύτταρα ενώ στα πλαίσια του ΣΔ η έκφρασή του ελαττώνεται με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της κινουρενίνης, η οποία σε κυτταροκαλλιέργειες έχει φανεί να επάγει τον πολλαπλασιασμό των μεσαγγειακών κυττάρων με τελικό αποτέλεσμα τη σπειραματοσκλήρυνση. Επιπλέον, παρεμποδίζει την παραγωγή NAD⁺ από το μεταβολισμό της τρυπτοφάνης, απαραίτητο για τον κυτταροσκελετό των ποδοκυττάρων συνεισφέροντας έτσι στην απόπτωσή τους και την εμφάνιση αλβουμινουρίας (Korstanje, et al, 2016). Μια μελέτη ακόμη, αυτή των Dabnath et al έδειξε πως τα ελαττωμένα επίπεδα της τρυπτοφάνης συσχετίζονται με προχωρημένα στάδια νεφρικής νόσου και με αυξημένα επίπεδα των προφλεγμονωδών κυτταροκινών TNF-α και IL6 (Dabnath, et al, 2017). Τα επίπεδα της κινουρενίνης σχετίζονται με την αλβουμινουρία σε ασθενείς με ΔΝΝ, ενώ η μείωση της νεφρικής λειτουργίας σε ασθενείς με ΣΔΤ2 συσχετίζεται με αύξηση των επιπέδων κινουρενίνης και ελάττωση αυτών της τρυπτοφάνης (Hasegawa, et al, 2021).



Εικόνα 22: Απλοποιημένο μονοπάτι μεταβολισμού της τρυπτοφάνης στα θηλαστικά.
(Dabnath, et al, 2017)

Σε μελέτη των Chen et al, χρησιμοποιώντας LC-TOFMS, διαπιστώθηκε ότι οι διαταραχές του TCA που εκδηλώθηκαν ως μείωση των επιπέδων του κιτρικού και του ηλεκτρικού στα ούρα *db/db* ποντικών, όπως επίσης και η μείωση της συγκέντρωσης της καρνιτίνης και η αύξηση του θεικού ινδοξυλίου, που αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν του μεταβολισμού της τρυπτοφάνης είναι αντιστρεπτά με τη χορήγηση λευκίνης. Εκτός των παρατηρήσεων αυτών, η λευκίνη πέτυχε να ελαττώσει ταυτόχρονα τα επίπεδα της αλβουμινουρίας (Εικόνα 23), τη νεφρική υπερτροφία και τη σπειραματοσκλήρυνση. Ένας πιθανός μηχανισμός που εξηγεί τα ανωτέρω ευρήματα είναι η ενεργοποίηση της AMPK από τη λευκίνη με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της αυτοφαγίας, της μιτοχondριακής βιογένεσης και την προστασία από το οξειδωτικό στρες, οδηγώντας συμπερασματικά στην αποκατάσταση της ενεργειακής ομοιοστασίας των κυττάρων (Chen, et al, 2018).



Εικόνα 23: Η χορήγηση λευκίνης ελαττώνει τα επίπεδα αλβουμινουρίας σε db/db ποντικούς. (* $P < 0.05$ controls vs db/db, # $P < 0.05$ db/db vs db/db+L) (Chen, et al, 2018)

Στη μελέτη των Saleem et al αναλύθηκε το μεταβολικό προφίλ του πλάσματος 120 συμμετεχόντων, μεταξύ των οποίων υγιή controls, ασθενείς με ΣΔ, ασθενείς με ΔNN και μετρίως αυξημένη αλβουμινουρία και ασθενείς με ΔNN και σοβαρά αυξημένη αλβουμινουρία, χρησιμοποιώντας LC-MS. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν αυξημένα επίπεδα της κιτρουλλίνης, της φαινυλαλανίνης και των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσού (BCAAs) στο πλάσμα των ασθενών με ΣΔΤ2 και νορμοαλβουμινουρία. Ωστόσο στους ασθενείς που εμφάνισαν μετρίως ή σοβαρά αυξημένη αλβουμινουρία, τα επίπεδα των BCAAs ήταν ελαττωμένα. Η μεταβολική οξέωση που παρουσιάζουν οι ασθενείς με ΧNN αυξάνει τη δραστικότητα της αμινοτρανσφεράσης των BCAAs και ενεργοποιεί την αφυδρογονάση των κετοξέων διακλαδισμένης αλυσού (BKAAs), δύο ένζυμα που συμμετέχουν στον καταβολισμό των BCAAs (Saleem, et al, 2019)

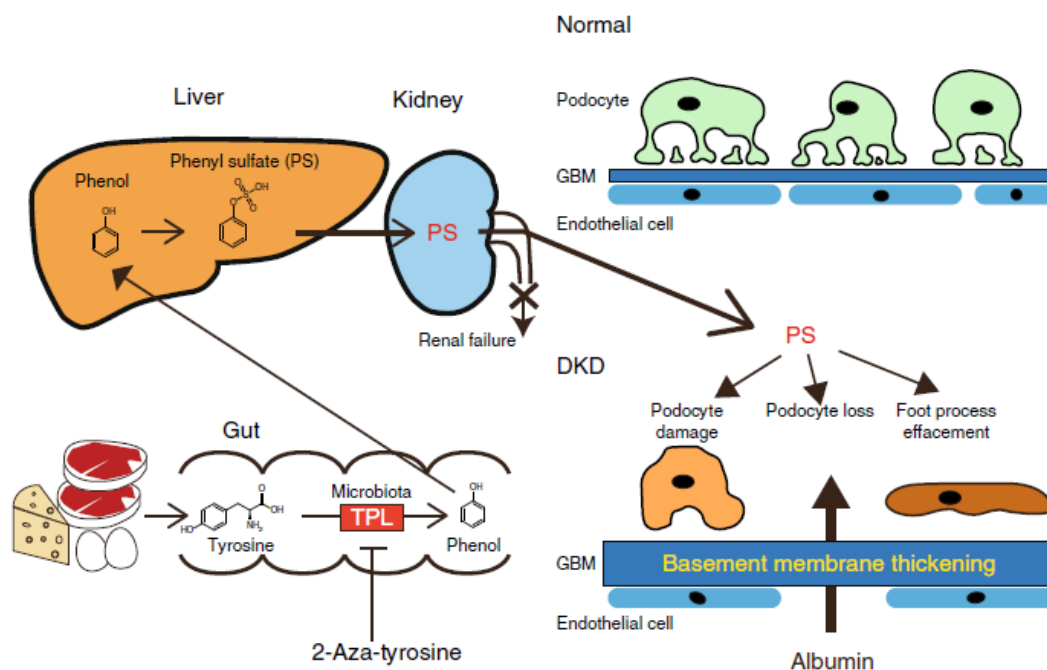
Σε μελέτη των Barrios et al μελετήθηκε το μεταβολικό προφίλ ορού νηστείας, μη στοχευμένα, χρησιμοποιώντας NMR σε ασθενείς με ΣΔΤ2 και σε μη ΣΔ ασθενείς από 4 ανεξάρτητες κοόρτες με σκοπό της συσχέτισης αυτού με τη νεφρική λειτουργία. Διαπιστώθηκε ότι η γλυκίνη, η φαινυλαλανίνη, το κιτρικό και η γλυκερόλη εμφάνισαν θετική συσχέτιση με το e GFR μόνο στους ΣΔΤ2 ασθενείς ενώ το περιεχόμενο φωσφολιπιδίων στην HDL συσχετίστηκε θετικά μόνο σε μη διαβητικούς. Η φαινυλαλανίνη δρα ως πρόδρομο μόριο της τυροσίνης, με τη σύνθεση της τελευταίας να γίνεται στο νεφρό και στο ήπαρ. Αν και η φαινυλαλανίνη έχει συσχετισθεί σε

προηγούμενες μελέτες με την αντίσταση στην ινσουλίνη, αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔΤ2 και με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών συμβαμάτων, στη μελέτη των Barrios et al αυξημένη συγκέντρωσή της συσχετίστηκε με νεφρική δυσλειτουργία τόσο στους διαβητικούς όσο και σε μη διαβητικούς χωρίς παρόλα αυτά να λειτουργεί ως προγνωστικός παράγοντας εξέλιξης της νόσου. Παρουσίασε επίσης στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την εμφάνιση διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας και αλβουμινουρίας. Τα αποτελέσματα αυτά πιθανώς υποδεικνύουν ότι η φαινυλαλανίνη πιθανώς δρα ως αιτιολογικός παράγοντας ενδοθηλιακής μικροαγγειακής βλάβης. Η γλυκίνη στο νεφρό μετατρέπεται σε σερίνη με τη διαταραχή της νεφρικής λειτουργίας να οδηγεί σε συσσώρευση της πρώτης, εμφανίζοντας σταθερά σταθερή συσχέτιση με την επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας τόσο σε ασθενείς με ΣΔΤ2 όσο και σε όσους δεν έπασχαν. Επιπλέον, όπως και η φαινυλαλανίνη, παρουσίασε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την εμφάνιση ΔΑ και αλβουμινουρίας, χωρίς ωστόσο να δύναται να προβλέψει ικανοποιητικά μακροχρόνιες αλλαγές στη νεφρική λειτουργία. Επιπλέον, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, τα επίπεδα του κιτρικού εμφάνισαν αρνητική συσχέτιση με τον e GFR. Το κιτρικό διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο νεφρό συμμετέχοντας κατά ~10% στην παραγωγή ενέργειας και αντιρροπώντας τη μεταβολική οξέωση της ΧΝΝ. Η αλανίνη, μαζί με τη γλουταμίνη και τη γλυκερόλη, αποτελεί κύριο πρόδρομο μόριο της γλυκονεογένεσης. Η μεταβολική οξέωση που παρατηρείται στη ΧΝΝ οδηγεί στην αύξηση των πρόδρομων αυτών μορίων, ενώ ο ΣΔ αυξάνει τη γλυκονεογένεση. Συνεπώς, η μείωση της νεφρικής λειτουργίας έχει διαφορετική επίδραση στους διαβητικούς ασθενείς όπως φαίνεται στη μελέτη αυτή, με τη διαφορετική κατεύθυνση της συσχέτισης της αλανίνης και του πυροσταφυλικού. Όσον αφορά το λιπιδικό προφίλ, οι διαφορές που παρατηρήθηκαν ήταν η αρνητική συσχέτιση των VLDL και LDL σε χοληστερόλη και τριγλυκερίδια σε μη διαβητικούς ασθενείς, ενώ στους διαβητικούς θετική συσχέτιση παρουσίασαν οι IDL και LDL υποκατηγορίες και το περιεχόμενό τους σε χοληστερόλη, εστέρες χοληστερόλης και φωσφολιπίδια (Barrios, et al, 2018).

Οι Bergman et al, ανέλυσαν το νεφρικό ιστό ποντικών με ΣΔΤ1 χρησιμοποιώντας μη στοχευμένη ανάλυση με MS, διαπιστώνοντας συσσώρευση μη κορεσμένων, μη εστεροποιημένων ΛΟ 18 ατόμων C, μονοακυλογλυκερολών και ακυλοκαρνιτινών βραχείας και μακράς αλύσου πριν την εμφάνιση ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων. Η συσσώρευση των λιπιδίων αυτών παρατηρήθηκε κυρίως στο φλοιό, ένα κρίσιμο ανατομικό σημείο για τη λειτουργία του νεφρού. Η συσσώρευση των μη εστεροποιημένων λιπαρών οξέων (NEFAs) εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της PKC η

οποία συμμετέχει στην παθογένεση της ΔΝΝ. Επιπλέον, η συσσώρευση C2 υποδεικνύει δυσλειτουργία της οξείδωσης των λιπαρών οξέων ήδη από τα πρώιμα στάδια της νόσου, ενώ το ίδιο μπορεί να μετεστεροποιηθεί και είτε να αποβληθεί από το νεφρό είτε να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα στον TCA. Συνεπώς η συσσώρευσή του, εκτός της δυσλειτουργίας της οξείδωσης των ΛΟ καταδεικνύει και διαταραχή της λειτουργίας του TCA. Ο καταβολισμός των BCAAs συμμετέχει στη συσσώρευση των C2 και άλλων ακυλοκαρνιτινών βραχείας αλύσου που παρουσιάζονται αυξημένες στο νεφρό είναι εστέρες καρνιτίνης σημαντικών ενδιάμεσων προϊόντων του καταβολισμού της λευκίνης, της ισολευκίνης και της βαλίνης. Τα αποτελέσματα συνολικά δείχνουν ότι και στο ΣΔΤ1, ήδη σε πρώιμο στάδιο και πριν την ανάπτυξη των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων, η οξείδωση των ΛΟ, ο TCA και ο μεταβολισμός των BCAAs είναι απορρυθμισμένος (Bergman, et al, 2019).

Η μελέτη των Kikuchi et al, πραγματοποιώντας μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση του πλάσματος διαβητικών και μη ποντικών, ανέδειξε το θειικό φαινύλιο (phenyl sulfate, PS), μια ουραιμική τοξίνη ως πολλά υποσχόμενο βιοδείκτη πρώιμης διάγνωσης της ΔΝΝ αλλά και ως ένα πιθανό θεραπευτικό στόχο καθώς φάνηκε να αποτελεί τροποποιήσιμο αίτιο ΔΝΝ, στην παθογένεση της οποίας συμμετέχει ασκώντας τοξική δράση στα ποδοκύτταρα και διαταράσσοντας τη μιτοχondριακή λειτουργία. Επιπρόσθετα, οδήγησε σε πάχυνση της ΣΒΜ, σε ανάπτυξη φλεγμονής και ίνωσης, με τελικό αποτέλεσμα την αλβουμινουρία (**Εικόνα 24**). Πράγματι, στη μελέτη αυτή, τα επίπεδα του PS παρουσίασαν συσχέτιση με τα επίπεδα αλβουμινουρίας, ενώ η ελάττωσή τους μείωσε τον κίνδυνο ανάπτυξης ΔΝΝ (Kikuchi, et al, 2019).



Εικόνα 24: Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης και της τοξικής επίδρασης του PS.

Στο εντερικό μικροβίωμα, η φαινολο-λυάση της τυροσίνης (TPL) μετατρέπει την τυροσίνη σε φαινόλη και αμμωνία. PS συντίθεται επίσης στο ήπαρ. Η συσσώρευση του PS ασκεί τοξική δράση στο αγγειακό δίκτυο και στο νεφρό, ενώ στη ΔΝΝ καταστρέφει τα ποδοκύτταρα, επιταχύνει την πάχυνση της ΣΒΜ και την αλβουμινουρία. Η χορήγηση αναστολέων της TPL μειώνει τα επίπεδα του PS στο πλάσμα και εμποδίζει την εξέλιξη της νεφρικής νόσου σε ζωικά μοντέλα. (Kikuchi, et al, 2019)

Σε μια προοπτική μελέτη των Tofte et al, αναλύθηκε το μεταβολικό προφίλ του ορού 637 ασθενών με ΣΔΤ1 με μέση τιμή $e\text{GFR}$ $81 \pm 26 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ και μέση τιμή αλβουμινουρίας 18 mg/24ώρο . Ύστερα από την επεξεργασία και την ανάλυση των δεδομένων διαπιστώθηκε πως τα BCAAs παρουσίασαν θετική συσχέτιση με τις τιμές του $e\text{GFR}$ και με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης του συνδυαστικού νεφρικού καταληκτικού σημείου. Στην ίδια μελέτη, τα παράγωγα σακχάρων ριβονικό οξύ και μυοϊνοσιτόλη εμφάνισαν θετική συσχέτιση με την εμφάνιση σοβαρά αυξημένης αλβουμινουρίας και αρνητική με τον $e\text{GFR}$, όπως επίσης με μεγαλύτερο κίνδυνο μείωσης του $e\text{GFR}$ άνω του 30%. Όσον αφορά τα λιπίδια, οι σφιγγομυελίνες και οι αλκυλοακυλοφωσφατιδυλοχολίνες εμφάνισαν αρνητική συσχέτιση με το $e\text{GFR}$ και την εμφάνιση σοβαρά αυξημένης αλβουμινουρίας. Οι διακυλοφωσφατιδυλοχολίνες παρουσίασαν θετική

συσχέτιση με τον e GFR και καμία με τα επίπεδα της αλβουμινουρίας. Ο μοναδικός μεταβολίτης που παρουσίασε θετική συσχέτιση με τη μετάβαση από το στάδιο της νορμοαλβουμινουρίας σε αυτό της μετρίως και της σοβαρά αυξημένης αλβουμινουρίας όπως επίσης και αρνητική με τον e GFR, ήταν το 3,4-διϋδροξυβουτανικό οξύ με το μεταβολίτη αυτό και τα μονοπάτια που εμπλέκεται να είναι σχετικά άγνωστα (Tofte, et al, 2019).

Στη μελέτη των Kwan et al, αναλύθηκε το μεταβολικό προφίλ των ούρων σε ασθενείς με ΣΔΤ2 και e GFR 20-70 ml/min/1.73 m², μη στοχευμένα χρησιμοποιώντας MS. Από την ανάλυση αυτή προέκυψε ότι ο TCA και ο μεταβολισμός των BCAAs είναι μονοπάτια που εμπλέκονται στην παθογένεση της ΔΝΝ, στηρίζοντας τη θεωρία της συμμετοχής των μιτοχονδρίων στην παθογένεση της νόσου. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα του 3,4-υδροξυ-βουτυρικού, ενός ενδιάμεσου προϊόντος του μεταβολισμού της βαλίνης που αναστέλλει τη λειτουργία των συμπλόκων I-III της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων των μιτοχονδρίων και αυτά της 3-μεθυλ-κροτονυλγλυκίνης, μιας ακυλογλυκίνης που σχετίζεται με τη β-οξείδωση των ΛΟ στα μιτοχόνδρια και παρουσιάζεται αυξημένη σε διαταραχές του καταβολισμού της λευκίνης, ήταν αυξημένα και παρουσίασαν αρνητική συσχέτιση με τον e GFR. Τα επίπεδα του κιτρικού οξέος και του ακονιτικού ήταν μειωμένα και εμφάνισαν θετική συσχέτιση με την ελάττωση του e GFR, δείχνοντας μειωμένη δραστηριότητα του TCA λόγω μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας (Kwan, et al, 2020).

Σε μια μελέτη παρατήρησης των Mutter et al σε ασθενείς με ΣΔΤ1, η ανάλυση δειγμάτων ούρων 24ώρου με NMR, ανέδειξε το 2-υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ, ενός μεταβολίτη προερχόμενου από το εντερικό μικροβίωμα, να συσχετίζεται με τη συνολική εξέλιξη της ΔΝΝ όπως και με τη μετάβαση από το στάδιο της νορμοαλβουμινουρίας αλλά και με την εξέλιξη της σοβαρά αυξημένης αλβουμινουρίας σε τελικού σταδίου νεφρική νόσο. Επιπλέον, τα επίπεδα των μεταβολιτών λευκίνη, ισολευκίνη, βαλίνη, θρεονίνη καθώς και ψευδουριδίνη, και κιτρικό οξύ συσχετίστηκαν με την εξέλιξη της νόσου. Συνολικά, τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής συνδέουν την εξέλιξη της ΔΝΝ με την αντίσταση στην ινσουλίνη (Mutter, et al, 2021).

Η μελέτη των Xu et al εστίασε στην ανάλυση του λιπιδικού προφίλ στον ορό controls, ασθενών με ΣΔΤ2 και ΔΝΝ χρησιμοποιώντας LC-MS. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν το συνδυασμό της λυσοφωσφατιδυλαιθανολαμίνης (LPE) 16:0 και της τριακυλογλυκερόλης (TAG) 54:2-FA18:1 ως ένα πιθανό πάνελ βιοδεικτών πρόβλεψης της ΔΝΝ. Επιπρόσθετα, τους ασθενείς αυτούς η LPE(16:0), η TAG54:2-FA18:1 και φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE) (16:0/20:2) συσχετίζονται με

τα στάδια της ΔΝΝ. Οι φωσφατιδυλοαιθανολαμίνες αποτελούν τη δεύτερη συχνότερη κατηγορία γλυκεροφωσφολιπιδίων στα ευκαρυωτικά κύτταρα και εμπλέκεται στην ανάπτυξη των θηλαστικών και σε κυτταρικές διεργασίες. Η αύξηση του λόγου PE:PC αυξάνει τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης καθιστώντας τα κύτταρα ευάλωτα σε βλάβη. Αντίθετα, η ελάττωση του λόγου συσχετίζεται με την ενεργοποίηση του SREBP1 και την εμφάνιση στρες ενδοπλασματικού δικτύου, με το τελευταίο να συνδέεται με την αντίσταση στην ινσουλίνη και την εμφάνιση ΣΔΤ2. Τέλος, η γλυκίωση της PE λόγω παρουσίας ελεύθερων αμινομάδων έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ROS, φλεγμονή και την εμφάνιση επιπλοκών του ΣΔΤ2. Η LPE αποτελεί ένα λυσοφωσφολιπίδιο παράγωγο της μερικής υδρόλυσης της PE. Φέρεται να ασκεί τοξική δράση στα νεφρικά κύτταρα μέσω του μεταβολίτη του λυσοφωσφατιδικού οξέος (LPA) που οδηγεί στην απελευθέρωση προφλεγμονωδών μορίων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα με αποτέλεσμα την οργανική βλάβη. Όσον αφορά την TAG, συνεισφέρει στην εμφάνιση αντίστασης στην ινσουλίνη με μηχανισμό παρόμοιο με την απόπτωση των β παγκρεατικών κυττάρων από τα ελεύθερα ΛΟ μέσω της JNK (Xu, et al, 2021).

Η μη στοχευμένη ανάλυση, χρησιμοποιώντας GC-MS, του μεταβολικού προφίλ δειγμάτων ορού controls, ασθενών με ΣΔΤ2 και ασθενών με πρώιμη και προχωρημένη ΔΝΝ από τους Liu et al ανέδειξε τα μονοπάτια του μεταβολισμού της γαλακτόζης και των γλυκερολιπιδίων ως μονοπάτια που εμπλέκονται στη ΔΝΝ, με την γλυκερόλη-3-γαλακτοσίδη, το τελικό προϊόν των μονοπατιών αυτών να αποτελεί πρώιμο και ανεξάρτητο παράγοντα εξέλιξης της ΔΝΝ (Liu, et al, 2021).

Από τη μελέτη της παθοφυσιολογίας της ΔΝΝ προκύπτει ότι το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο αποτελεί μια ανατομική περιοχή με ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Έχοντας αυτό ως δεδομένο, οι Valdes et al χρησιμοποιώντας συνδυασμό μεταβολομικών μεθόδων, ανέλυσαν κυτταροκαλλιέργειες controls και HK-2 κυττάρων που προέρχονται από τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου σε συνθήκες υπεργλυκαιμίας και υποξίας, όμοιες με αυτές της ΔΝΝ. Η ανάλυση των δεδομένων ανέδειξε τη συμμετοχή πολλαπλών μεταβολικών μονοπατιών, μεταξύ των οποίων αυτό της γλυκόλυσης, 4 μεταβολίτες του οποίου- το πυροσταφυλικό, το γαλακτικό, η 3-φωσφορική-γλυκεραλδεύδη και η γλυκόζη- ήταν αυξημένοι. Η αύξηση των επιπέδων της σορβιτόλης, της φρουκτόζης, της 1-φωσφορικής-φρουκτόζης και 3-φωσφορικής γλυκεραλδεύδης υποδεικνύουν την ενεργοποίηση του μονοπατιού της πολυόλης,

γεγονός που συσχετίζεται με μειωμένη παραγωγή ATP στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών διαπιστώνεται από την αύξηση της 3-φωσφορικής-γλυκεραλδεΐδης, του 6-φωσφογλυκονικού, της γλυκονο-1,5-λακτόνης, των μεταβολιτών του γλυκερικού και του νικοτινικού οξέος. Το γεγονός αυτό, ίσως ασκεί προστατευτική δράση καθώς αποσκοπεί στην αναπλήρωση των επιπέδων NADPH και NAD^+ που ελαττώνονται λόγω της ενεργοποίησης του μονοπατιού της πολυόλης. Οι μεταβολές στα λιπίδια περιλαμβάνουν την αύξηση των κεραμιδίων (32:1, 38:1), τα οποία προκαλούν βλάβη στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια μέσω του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της πρόκλησης υποξίας, και ελάττωση των εστέρων χοληστερόλης (20:4, 20:5). Μεταβολίτες που σχετίζονται με τη β-οξείδωση των ΛΟ όπως η προπιονυλο-L-καρνιτίνης και το β-αμινοϊσοβουτυρικό οξύ ήταν ελαττωμένοι. Τα επίπεδα των ακυλοκαρνιτινών στα ούρα έχουν συσχετισθεί με την εξέλιξη της ΔΝΝ ενώ το β-αμινοϊσοβουτυρικό οξύ έχει εμφανίσει αντίστροφη συσχέτιση με την εκκριτική ικανότητα ινσουλίνης στους ανθρώπους. Ο μεταβολισμός των πουρινών παρουσιάστηκε επηρεασμένος στη μελέτη αυτή με το IMP, πρόδρομο μόριο των πουρινών, να είναι μειωμένος. Τα επίπεδα της αλλαντοΐνης που αποτελεί τελικό προϊόν της αποδόμησης των πουρινών, ήταν μειωμένα οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι επηρεάζεται κυρίως η σύνθεση και όχι η αποδόμηση των πουρινών. Τέλος, τα μονοπάτια του μεταβολισμού της αργινίνης και της προλίνης παρουσίασαν μεταβολές, με τα επίπεδα της ορνιθίνης και της σπερμιδίνης να είναι ελαττωμένα ενώ αυτά της αγκμαντίνης αυξημένα (Valdes, et al, 2021).

Το ρόλο των ακυλοκαρνιτινών ως πιθανούς βιοδείκτες πρώιμης διάγνωσης της ΔΝΝ ανέδειξε η μελέτη των Abdelsattar et al. Η στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση δειγμάτων αίματος και ούρων χρησιμοποιώντας GC-MS σε υγιή controls και ασθενείς με ΣΔΤ2 με νορμοαλβουμινουρία και μετρίως αυξημένη αλβουμινουρία ανέδειξε τη δωδεκαϋλοκαρνιτίνη C12, την τριγλυκαρνιτίνη C5:1 και την ισβαλερυλκαρνιτίνη C5 ως πιθανούς βιοδείκτες πρώιμης διάγνωσης της ΔΝΝ. Οι ακυλοκαρνιτίνες αποτελούν μόρια που εμπλέκονται σε μεταβολικά μονοπάτια τα οποία παρουσιάζουν διαταραχή στη ΔΝΝ, όπως της β οξείδωσης των ΛΟ και του καταβολισμού των BCAAs. Στην ίδια μελέτη, τα επίπεδα στο αίμα της αργινίνης, της κιτρουλλίνης και της ορνιθίνης ήταν αυξημένα, πιθανόν λόγω αύξησης της BUN, όπως επίσης αυτά της βαλίνης και της λευκίνης λόγω μειωμένης πρόσληψής τους από τους μυς, στα πλαίσια της αντίστασης στην ινσουλίνη. Τέλος, η μελέτη ανέδειξε τα οργανικά οξέα 5-υδροξυ-εξανοϊκό και αζελαϊκό οξύ ως πιθανούς βιοδείκτες. Τα οξέα αυτά αποτελούν ενδιάμεσους μεταβολίτες μεταβολικών μονοπατιών

των υδατανθράκων, των λιπιδίων και των πρωτεϊνών. Τον πιθανό τους ρόλο στην ΔΝΝ υποστηρίζουν περαιτέρω αποτελέσματα μελετών όπου παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση των γονιδίων των μεταφορέων οργανικών οξέων OAT1 και OAT3 σε ιστικά δείγματα ΔΝΝ (Abdelsattar, et al, 2021).

Η μελέτη των Sollini et al έδειξε ότι η προσθήκη 3 μεταβολιτών στον ορό ασθενών με ΣΔΤ2 (c-γλυκοσυλο-τρυπτοφάνη, ψευδοουριδίνη, N-ακετυλοθρεονίνη) προέβλεψε την ελάττωση του e GFR και την αύξηση του UACR , ενώ βελτίωσε την προγνωστική ικανότητα κλινικών παραμέτρων. Επιπλέον, η μελέτη των Afshinnia et al σε ασθενείς με ΣΔΤ2 και e GFR>90 ml/min/1.73 m² απέδειξε το σημαντικό ρόλο της διαταραχής της β οξείδωσης των ΛΟ στα μιτοχόνδρια στην εξέλιξη της ΔΝΝ καθώς φάνηκε πως ένα πάνελ λιπιδίων, μεταξύ των οποίων μη κορεσμένα ΛΟ, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνες, τριακυλογλυκερόλες διπλού δεσμού και ακυλοκαρνιτίνες μακράς αλύσου προέβλεψε τη μείωση του e GFR κατά 40% (Barutta, et al, 2021).

Τα δεδομένα μελετών μεταβολομικής και πρωτεομικής τονίζουν το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν οι διαταραχές της γλυκόλυσης κατά τη ΔΝΝ. Τα αυξημένα επίπεδα ενζύμων που συμμετέχουν στη γλυκόλυση σε ασθενείς με ΣΔ δίχως ΔΝΝ, συγκριτικά με όσους πάσχουν από ΔΝΝ και πιο συγκεκριμένα, της PKM2 που καταλύει το τελευταίο βήμα της γλυκόλυσης, έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα μελετών μεταβολομικής όπου παρατηρήθηκε ότι η συσσώρευση μεταβολιτών της γλυκόλυσης συνεισφέρει στην εξέλιξη της ΔΝΝ. Ο ρόλος της PKM2 διαπιστώθηκε σε πειραματικές μελέτες όπου η εξάλειψη της έκφρασης του γονιδίου της PKM2 στα ποδοκύτταρα ποντικών με ΣΔ οδήγησε σε σοβαρές πειραματικές βλάβες. Αντίθετα, η φαρμακολογική ενεργοποίησή της αντέστρεψε την επαγόμενη από την υπεργλυκαιμία αύξηση των μεταβολιτών της γλυκόλυσης, προλαμβάνοντας τη μιτοχονδριακή βλάβη και τις πειραματικές αλλοιώσεις. Ο μεταβολισμός της τυροσίνης παρουσιάζεται επηρεασμένος στη ΔΝΝ, με το θειϊκό φαινύλιο, παράγωγο της τυροσίνης, να εμφανίζει ισχυρή συσχέτιση με την εξέλιξη της αλβουμινουρίας σε ΣΔ ασθενείς. Η παρατήρηση αυτή σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η φαρμακευτική αναστολή της λυάσης του φαινυλίου, ενός βακτηριακού ενζύμου που είναι υπεύθυνο για τη μετατροπή της τυροσίνης σε θειϊκό φαινύλιο, ελάττωσε την αλβουμινουρία σε πειραματικά μοντέλα, καθιστώντας τη μικροβιακή εντερική χλωρίδα πιθανό θεραπευτικό στόχο (Hasegawa, et al, 2021).

Η μετα-ανάλυση των Roointan et al συμπεριέλαβε 44 μελέτες και ανέδειξε τα μονοπάτια του κύκλου της ουρίας, του TCA, της γλυκόλυσης και του μεταβολισμού των αμινοξέων ως τα κύρια μεταβολικά μονοπάτια που διαταράσσονται στη ΔΝΝ. Τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης αυτής παρουσίασαν το γαλακτικό οξύ, το ιππουρικό οξύ, την αλλαντοΐνη (στα ούρα) και τη γλουταμίνη (στον ορό) ως τους μεταβολίτες με την ισχυρότερη συσχέτιση με την εμφάνιση της ΔΝΝ και πιθανούς βιοδείκτες πρώιμης διάγνωσης αυτής. Σημαντική συσχέτιση με την εμφάνιση ΔΝΝ εμφάνισε η αργινίνη, η οποία στον κύκλο της ουρίας μετατρέπεται σε ορνιθίνη ή κιτρουλλίνη, παράγοντας NO. Η ελάττωση των επιπέδων της αργινίνης στη ΔΝΝ οδηγεί σε οξειδωτική βλάβη στη ΔΝΝ ενώ η χορήγηση συμπληρωμάτων της, ενεργοποιεί τη σύνθεση NO και αντιστρέφει την ελάττωση του e GFR. Οι διαταραχές των ενδιάμεσων προϊόντων του TCA, όπως του φουμαρικού, του μηλικού και του κιτρικού, στο νεφρικό ιστό και στα ούρα, πιθανώς οφείλονται στο συστηματικό στρες. Οι διαταραχές των επιπέδων της γλουταμίνης και του γλουταμικού οξέος συσχετίζονται με τη δυσλειτουργία του TCA. Η γλουταμίνη εμπλέκεται στο μεταβολισμό της γλουταθειόνης που δρα ως αντιοξειδωτικό, ενώ η χορήγηση συμπληρωμάτων της αυξάνει τα επίπεδα του TGF-β. Στην περαιτέρω μείωση αποθεμάτων γλουταθειόνης συνεισφέρουν τα μειωμένα επίπεδα γλυκίνης η οποία δρα ως πρόδρομο μόριο της γλουταθειόνης. Η διαταραχή του μεταβολισμού των αμινοξέων στηρίζεται επιπλέον από τα ελαττωμένα επίπεδα ενδιάμεσων προϊόντων του μεταβολισμού της λευκίνης, όπως η λυσίνη, η μεθειονίνη και το α-κετοϊσοκαπροϊκό οξύ. Τα επίπεδα της αλλαντοΐνης και του ιππουρικού οξέος αυξάνουν στα ούρα ασθενών με ΔΝΝ και συσχετίζονται με την εξέλιξη της νόσου. Τα επίπεδα του 3-υδροξυβουτυρικού οξέος ήταν αυξημένα στο αίμα και τα ούρα ασθενών με ΔΝΝ λόγω αυξημένων επιπέδων ακετυλο-CoA στα πλαίσια της β οξείδωσης των ΛΟ. Οι διαταραχές του μεταβολισμού των ΛΟ, του TCA και της γλυκόλυσης σηματοδοτούν ένα φαινόμενο παρόμοιο με το φαινόμενο Warburg, δηλαδή έναν τροποποιημένο κυτταρικό μεταβολισμό που σε συνδυασμό με τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία συνεισφέρουν στην εκδήλωση και την εξέλιξη της ΔΝΝ (Roointan, et al, 2021).

Η απορρύθμιση της β-οξείδωσης των ΛΟ αποδείχθηκε και στη μελέτη των Collins et al, όπου η ανάλυση του μεταβολικού προφίλ δειγμάτων νεφρικού ιστού από controls και *db/db* ποντικούς, έδειξε αύξηση των ακυλοκαρνιτινών και των ακυλοχολινών στη ΔΝΝ, ενώ αντίθετα μείωση ΛΟ μακράς αλύσου όπως του εικοσανοϊκού. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με τις αλλαγές της έκφρασης του ενζύμου ACADVL, μιας αφυδρογονάσης του ακετυλο-CoA και

κρίσιμου ενζύμου του πρώτου βήματος της β οξείδωσης των ΛΟ στα μιτοχόνδρια. Στην ίδια μελέτη, ο μεταβολισμός των κετονών παρουσιάστηκε επηρεασμένος στη ΔΝΝ, με το 3-υδροξυ-βουτυρικό να εμφανίζει αύξηση και το συνένζυμο Α μείωση (Collins, et al, 2022).

Στην προσπάθεια ανεύρεσης βιοδεικτών πρώιμης διάγνωσης της ΔΝΝ, οι Banimfreg et al ανέλυσαν μη στοχευμένα το μεταβολικό προφίλ αιμοκαθαιρόμενων ασθενών με και δίχως ιστορικό ΣΔ, χρησιμοποιώντας LC-MS. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της μελέτης αυτής ανέδειξε 5 μεταβολίτες οι οποίοι διέκριναν τις δύο ομάδες οι οποίοι δείχνουν διαταραχή του μεταβολισμού των ΛΟ και των γλυκερολιπιδίων, των ανδρογόνων και της νορεπινεφρίνης. Οι μεταβολίτες αυτοί η ισοβαλερυλγλυκίνη, μια ακυλογλυκίνη μεταβολίτης της β-οξείδωσης των ΛΟ, το ελαϊδικό οξύ, ένα ΛΟ μακράς αλύσου, η γλυκερόλη, που εμπλέκεται στο μεταβολισμό των γλυκερολιπιδίων, το 3,4-διυδροξυμανδελικό οξύ, παράγωγο της νορεπινεφρίνης που έχει συσχετισθεί και με άλλες επιπλοκές του ΣΔ όπως η διαβητική καρδιομυοπάθεια και η υδροξυπρογεστερόνη, που δείχνει την επίδραση του οξειδωτικού στρες και της συσσώρευσης λιποκυττάρων στην αδυναμία μεταβολισμού της ανδροστενεδιόνης σε τεστοστερόνη (Banimfreg, et al, 2022).

Το μονοπάτι της πολυόλης και του μεταβολισμού της γαλακτόζης ήταν τα κύρια μεταβολικά μονοπάτια που ανέδειξε η ανάλυση πλάσματος χρησιμοποιώντας GC TOMFS σε υγιείς και σε ασθενείς με ΣΔ και ΧΝΝ από τους Duangkumpha et al. Τα αυξημένα επίπεδα D-γαλακτόζης, σουκρόζης, D-φρουκτόζης, D-σορβιτόλης, D-ντουλσιτόλης και μυοϊνοσιτόλης σχετίζονται με την ενεργοποίηση των μονοπατιών αυτών αλλά και τη μειωμένη νεφρική κάθαρση, τη διατροφή και τη μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου (Duangkumpha, et al, 2022).

Το σημαντικό ρόλο του οξειδωτικού στρες στην παθογένεση της ΔΝΝ υπογράμμισε η μεταβολομική ανάλυση του πλάσματος ασθενών με ΔΝΝ, χρησιμοποιώντας UPLC-TOFMS από τους Wu et al. Τα συμπεράσματα της μελέτης αυτής κατέληξαν στη διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκερόλης, με αύξηση της γλυκερόλης-3-γαλακτοσίδης, της ADMA, του μεταβολισμού των πουρινών και πυραμιδινών, με αύξηση της ψευδοουριδίνης και του μεταβολισμού της τρυπτοφάνης, με αύξηση της κινουρενίνης στη ΔΝΝ, η οποία σχετίζεται με βιολογικές διεργασίες που επηρεάζουν το μεταβολισμό ενέργειας, την προφλεγμονώδη απόκριση, την αθηροσκλήρυνση και το οξειδωτικό στρες (Wu, et al, 2022).

Η προγνωστική αξία των μεταβολιτών ως προς την πρόωμη διάγνωση της ΔΝΝ αυξάνεται με τη συνδυαστική χρήση αυτών σύμφωνα με τους Jung et al. Σε μια μελέτη 78 ασθενών με ΣΔΤ2, συνδυασμός μεταβολιτών στον ορό των ασθενών αυτών σε πολυπαραγοντική ανάλυση διακρίνει τους ασθενείς με ΔΝΝ περιλαμβάνοντας το γ-βουτυροβεταϊνικό οξύ, η SDMA και το αζελαϊκό οξύ. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα της μελέτης SUMMIT όπου φάνηκε πως ο συνδυασμός μεταβολιτών (λόγος SDMA προς ADMA, C16 ακυλοκαρνιτίνη) με τους πρωτεϊνικούς βιοδείκτες σωληναριακής βλάβης KIM-1, β2 μικροσφαιρίνη βελτιώνει την προγνωστική τους ικανότητα ως προς την εξέλιξη της ΔΝΝ (Jung, et al, 2022).

Η ανάλυση του μεταβολικού προφίλ πλάσματος σε controls, *db/db* ποντικών και ποντικών με ΔΝΝ από τους Wang et al έδειξε διαταραχή του μεταβολισμού της τρυπτοφάνης στη ΔΝΝ όπως επίσης αύξηση του ιππουρικού οξέος, μιας ουραιμικής τοξίνης προερχόμενη από τις διατροφικές πολυφαινόλες υπό τη δράση της εντερικής χλωρίδας. Η διαταραχή της εντερικής χλωρίδας προκαλεί νεφρική βλάβη ενεργοποιώντας το RAAS, παράγοντας επιβλαβείς μεταβολίτες και ενεργοποιώντας το ανοσοποιητικό σύστημα. Η αύξηση αυτή του ιππουρικού οξέος, έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που συσχετίζουν το ιππουρικό οξύ με τη διαδικασία της ίνωσης στη ΧΝΝ (Wang, et al, 2022). Σε συμφωνία με τη μελέτη των Wang et al η αύξηση του ιππουρικού οξέος συσχετίστηκε με την εμφάνιση ΔΝΝ στη μεταβολομική ανάλυση δειγμάτων ορού ποντικών από τους Shang et al (Shang et al 2022).

Το σημαντικό ρόλο των BCAAs ανέδειξε η μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση των Zhu et al, χρησιμοποιώντας LC-MS σε δείγματα ορού υγιών controls, διαβητικούς και ασθενείς με ΔΝΝ με παρατηρούμενη αύξηση των επιπέδων N-ασπαρτικού οξέος, L-βαλίνης, ισολευκίνης, ασπαραγίνης, βηταΐνης και L-μεθειονίνης τόσο στους διαβητικούς όσο και στους ασθενείς με ΔΝΝ. Η περαιτέρω μελέτη της ομάδας των διαβητικών ασθενών σε μια προοπτική ανάλυση συμπέρανε ότι τα αυξημένα αρχικά επίπεδα L-βαλίνης και ισολευκίνης εμφανίζουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με ταχεία ελάττωση του e GFR στους ασθενείς αυτούς. Η αλλαγή αυτή στο μεταβολισμό των BCAAs πιθανόν ενεργοποιεί το μονοπάτι του m TORc1 οδηγώντας σε περαιτέρω αντίσταση στην ινσουλίνη και τη συσσώρευση κυτταροτοξικών μεταβολιτών (Zhu, et al, 2022).

Οι Cao et al απέδειξαν ότι τα αυξημένα επίπεδα κιτρουλλίνης στο αίμα συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΔΝΝ. Η κιτρουλλίνη προσλαμβάνεται από τα κύτταρα του εγγύς

εσπειραμένου σωληναρίου και μετατρέπεται σε ουρία μέσω της αργινίνης. Επιπλέον εμπλέκεται στη σύνθεση NO μέσω του κύκλου κιτρουλλίνης-NO, ενός μορίου που αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της νεφρικής λειτουργίας και μορφολογίας (Cao, et al, 2022).

Αυξημένα επίπεδα κιτρουλλίνης στο φλοιό νεφρικών ιστικών τεμαχίων από ζωικά μοντέλα ΣΔΤ1 και ΣΔΤ2 παρατηρήθηκαν στη μελέτη των Rong et al. Η αύξηση των επιπέδων αυτών συνέπεσε χρονικά με το στάδιο της υπερδιήθησης και της νεφρικής υπερτροφίας ενώ ταυτόχρονα σημειώθηκε μείωση της συγκέντρωσης του ασπαρτικού οξέος και αργινίνης, πιθανόν λόγω μείωσης της μετατροπής της κιτρουλλίνης σε αργινίνη, ευνοώντας προφλεγμονώδεις διεργασίες. Στην ίδια μελέτη, παρατηρήθηκε αύξηση των BCAAs και μείωση της γλυκίνης στο νεφρικό φλοιό. Η γλυκίνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο καθώς αποτελεί πρόδρομο μόριο της σερίνης και της γλουταθειόνης ενώ σταθεροποιεί την τριπλή έλικα του κολλαγόνου, συνεισφέροντας έτσι στη διατήρηση της δομής του (Rong, et al, 2022).

Την υψηλότερη διαγνωστική αξία της χρήσης συνδυασμού μεταβολιτών απέδειξαν στη μελέτη τους οι Lucio-Gutierrez et al, οι οποίοι αναλύοντας το μεταβολικό προφίλ ούρων υγιών controls, διαβητικών ασθενών και ασθενών με ΔΝΝ χρησιμοποιώντας NMR, διαπίστωσαν ότι ένα πάνελ μεταβολιτών που περιελάμβανε την τριγονελλίνη, το ιππουρικό οξύ, τη φαινυλαλανίνη, το γλυκολικό, τη διμεθυλαμίνη, την αλανίνη, το 2-υδροξυ-βουτυρικό, το γαλακτικό και το κιτρικό εμφάνιζε υψηλή προγνωστική αξία ως προς την πρόιμη διάγνωση της ΔΝΝ (Lucio-Gutierrez, et al, 2022).

Την διαταραχή της β-οξειδωσης των ΛΟ στα μιτοχόνδρια, του μεταβολισμού των πουρινών και των φωσφολιπιδίων στη ΔΝΝ διαπίστωσε η μελέτη των Lin et al. Ύστερα από την ανάλυση του πλάσματος ασθενών με ΣΔΤ2 και υγιών controls χρησιμοποιώντας LC-MS διαπιστώθηκε ότι ασθενείς με πρόιμη έναρξη ΔΝΝ εμφάνιζαν αύξηση των επιπέδων του ουρικού οξέος και μείωση της φωσφατιδυλοχολίνης 36:4. Η περαιτέρω μελέτη των ασθενών αυτών έπειτα από 4 χρόνια ανέδειξε διαταραχή των επιπέδων του ουρικού οξέος, της L-ακετυλοκαρνιτίνης, της χολερυθρίνης και της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης 38:4 στο πλάσμα αυτών (Lin, et al, 2022).

Οι Izundegui et al στην ανασκόπησή τους για το ρόλο της μεταβολομικής στο ΣΔΤ1 και ΣΔΤ2 διαπίστωσαν ότι τα μεταβολικά μονοπάτια της γλυκόλυσης, του TCA, της τρυπτοφάνης και των λιπιδίων αποτελούν μια πηγή δυνητικών βιοδεικτών πρόιμης διάγνωσης της ΔΝΝ. Έτσι λοιπόν, τα χαμηλότερα επίπεδα του πυροσταφυλικού σε συνδυασμό με αύξηση των μεταβολιτών

της γλυκόλυσης και του TCA έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα νεφρικών βιοψιών που αναφέρουν την αυξημένη γλυκολυτική ροή ως διαμεσολαβητή της ΔΝΝ. Η διαταραχή του μεταβολισμού της τρυπτοφάνης αντικατοπτρίζεται στα αυξημένα επίπεδα τρυπτοφάνης και σεροτονίνης στα πλαίσια της ΔΝΝ, χωρίς να είναι σαφείς οι μηχανισμοί. Επιπρόσθετα, οι διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων εμπλέκονται στην παθογένεια της ΔΝΝ με τα χαμηλότερα επίπεδα διακυλογλυκερόλης, εστέρων χοληστερόλης και φωσφατιδυλοχολινών αλλά και αυξημένα επίπεδα μονοακυλογλυκερολών και φωσφατιδυλαιθανολαμίνης να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο μετάβασης σε ΤΣΝΝ (Izundegui, et al, 2022).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της ΔΝΝ. Ο TCA, αποτελεί έναν μεταβολικό κόμβο, με διαταραχή αυτού να οδηγεί σε αλλαγές σε αμινοξέα, λιπαρά οξέα και πουρίνες. Ο ίδιος ο TCA αποτελεί πηγή βιοδεικτών πρώιμης διάγνωσης της ΔΝΝ με αλλαγές στους μεταβολίτες του, όπως μειωμένα επίπεδα μεθυλμαλονικού, αιθυλμαλονικού στα ούρα αλλά και αυξημένα επίπεδα φουμαρικού (Mu, et al, 2022; Lash, et al, 2022; Provenzano, et al, 2022). Η διαταραχή του μεταβολισμού των λιπιδίων αποδείχθηκε και στη μελέτη των Peng et al, όπου τα επίπεδα της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης, της φωσφατιδυλογλυκερόλης και της φωσφατιδυλοχολίνης ήταν χαμηλότερα στη ΔΝΝ συγκριτικά με τα controls (Huang, et al, 2022).

Τον ρόλο των BCAAs στη ΔΝΝ μελέτησαν οι Ikeda et al, στο πλάσμα ασθενών με ΣΔΤ2 και υγιών controls χρησιμοποιώντας LC-MS όπου φάνηκε ότι στους ασθενείς με ΣΔΤ2 και ήπια νεφρική βλάβη, τα επίπεδα των BCAAs ήταν αυξημένα. Είναι γνωστό ότι η ΧΝΝ συνοδεύεται από μείωση των βασικών αμινοξέων, συμπεριλαμβανομένων των BCAAs, λόγω διαταραχής της αναγέννησής τους στο νεφρό, όπου τα ΒΚΑAs μετατρέπονται εκ νέου σε BCAAs. Στο ΣΔ ωστόσο, η μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα στα μεταβολικά μονοπάτια της βαλίνης, της ισολευκίνης και της λευκίνης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των BCAAs στο πλάσμα (Ikeda, et al, 2022).

Οι ακυλοκαρνιτίνες αποτελούν ενδιάμεσους μεταβολίτες της οξείδωσης λιπαρών οξέων και αμινοξέων, και επιτρέπουν στα λιπαρά οξέα μακράς αλύσου τη διέλευση από τη μιτοχονδριακή μεμβράνη για τη β-οξείδωσή τους στα μιτοχόνδρια. Ο ρόλος τους αυτός, τις καθιστά ενδιαφέροντες βιοδείκτες μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας με αρκετούς ερευνητές να τις χρησιμοποιούν ως βιοδείκτες σε κλινικά, προγνωστικά μοντέλα σε συνδυασμό με παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου, προβλέποντας επιτυχώς την ελάττωση του e GFR σε ασθενείς με ΣΔ.

Αυξημένα επίπεδα τους άλλωστε σε ούρα ασθενών με ΣΔ συσχετίζονται με πρόωμη νεφρική βλάβη και αντικατοπτρίζουν την ελαττωματική β-οξείδωση των λιπαρών οξέων (Mu, et al, 2022).

Η ανάλυση των ούρων ασθενών με ΔΝΝ από τους Shi et al ανέδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση του προπριονικού, του ισοβαλερικού και του ισοβουτυρικού οξέος που αποτελούν λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου. Στην ίδια μελέτη, ο μεταβολισμός των αμινοξέων ήταν επηρεασμένος, μεταξύ των οποίων η λευκίνη και το οξυλιπικό οξύ που προέρχεται από το μεταβολισμό της τρυπτοφάνης και της φαινυλαλανίνης (Shi, et al, 2023).

Ο ρόλος των αμινοξέων στη ΔΝΝ υποστηρίζεται και από τη μελέτη των Kwan et al, όπου οι μεταβολίτες βαλίνη, βηταΐνη και διμεθυλαργινίνη κατηγοριοποίησαν τη βαρύτητα της ΔΝΝ ύστερα από τη μη στοχευμένη ανάλυση δειγμάτων ούρων χρησιμοποιώντας QTOF-MS (Kwan, et al, 2023).

Η ανάλυση του μεταβολομικού προφίλ κοπράνων χρησιμοποιώντας NMR σε υγιή πληθυσμό και σε ασθενείς με ΔΝΝ ανέδειξε διαταραχή στο μεταβολισμό της γλυκόζης, με διαταραχή τόσο στη γλυκόλυση όσο και στον TCA, όπως επίσης αύξηση των επιπέδων μεθειονίνης, βαλίνης, ισολευκίνης, βαλερικού και φαινυλακετοξικού στη ΔΝΝ (Kim, et al, 2023).

Η β-οξείδωση των ΛΟ φάνηκε το κύριο μεταβολικό μονοπάτι που επηρεάζεται στη ΔΝΝ στην ανάλυση δειγμάτων ορού, χρησιμοποιώντας MS, μη στοχευμένα σε ασθενείς με ΣΔ χωρίς επιπλοκές και σε ασθενείς που έπασχαν από ΔΑ και ΔΝΝ. Στη δεύτερη ομάδα, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της κυκλοεξιλαμίνης, της στεαροϋλο-αιθανολαμίδης, της 1,2-διστεαροϋλογλυκερο-3-φωσφοχολίνης, του N-ακετυλνευραμινικού οξέος, το οποίο συμμετέχει στην παθογένεση της ΔΝΝ μέσω της φλεγμονής ενεργοποιώντας το σηματοδοτικό μονοπάτι ROC και της πιπεριδίνης η οποία προκαλεί μικροαγγειακή βλάβη (Tomofuji, et al, 2023).

Μια πολύ ενδιαφέρουσα μελέτη δημοσίευσαν οι Kogot-Levin et al, οι οποίοι ανέλυσαν το μεταβολικό προφίλ και τη ροή του μεταβολισμού σε διαβητικούς και μη ποντικούς, με ή χωρίς τη χορήγηση νταπαγλιφλοζίνης, σε όργανα στόχους του ΣΔ και στο πλάσμα. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι στο ΣΔ η γλυκόλυση και η οξείδωση της γλυκόζης εμφανίζουν διαταραχές, ενώ η χορήγηση νταπαγλιφλοζίνης αυξάνει την οξείδωση της γλυκόζης, παρέχοντας προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες και αποκαθιστώντας την οξειδοαναγωγική ισορροπία. Η χορήγηση αυτού του αναστολέα SGLT2 οδηγεί σε μεταβολικό επαναπρογραμματισμό,

ενεργοποιώντας την AMPK και αναστέλλοντας τον m TORc1, προάγοντας την παραγωγή ενέργειας μέσω οξείδωσης λιπαρών οξέων και της λιπόλυσης. Η επίδραση αυτή στο σηματοδοτικό μονοπάτι AMPK- m TORc1 έχει ευεργετικές επιπτώσεις έναντι της διαδικασίας της κυτταρικής γήρανσης. Ταυτόχρονα, είχε ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση ενδιάμεσων προϊόντων της γλυκόλυσης, της φωσφορικής διϋδροξυακετόνης, της 3 φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης, αύξηση της οξείδωσης της γλυκόζης και του πυροσταφυλικού στον TCA (Kogot-Levin, et al, 2023).

Η ανάλυση των ούρων χρησιμοποιώντας μη στοχευμένα LDI-MS από υγιή controls, διαβητικούς και ασθενείς με ΔΝΝ έδειξε ότι ο μεταβολισμός των αμινοξέων και των πρωτεϊνών επηρεάζονται στη ΔΝΝ. Μεταξύ των μεταβολιτών, ήταν το μαλονικό οξύ, τα ελαττωμένα επίπεδα του οποίου οφείλονται στη διαταραχή της βιοσύνθεσης των ΛΟ, ενώ η ουρακίλη και η κυτοσίνη δείχνουν διαταραχή στη βιοσύνθεση της πυριμιδίνης. Στην ίδια μελέτη επηρεασμένος παρουσιάστηκε ο μεταβολισμός της αργινίνης, της γλυκίνης, της σερίνης και της θρεονίνης (Jiang, et al, 2023).

Η μελέτη των Balint et al έδωσε σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τον πιθανό ρόλο των ουραιμικών τοξινών ως πρώιμοι βιοδείκτες της ΔΝΝ. Δεδομένα προηγούμενων μελετών που δείχνουν μειωμένα επίπεδα ιππουρικού οξέος στον ορό και αυξημένα στα ούρα ασθενών με ΔΝΝ συγκριτικά με υγιή controls επιβεβαιώθηκαν και στη μελέτη των Balint et al. Τα επιθηλιακά κύτταρα του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου και το ήπαρ αποτελούν τα κύρια σημεία παραγωγής του, πιθανόν λόγω της μεγάλης περιεκτικότητάς τους σε μιτοχόνδρια. Συνεπώς, το ιππουρικό οξύ πέρα από την ικανότητά του να διακρίνει τη ΔΝΝ στα αρχικά στάδια της αλβουμινουρίας, αποδεικνύει και τη διαταραχή της λειτουργίας των μιτοχονδρίων στα αρχικά στάδια της νόσου. Στην ίδια μελέτη, τα επίπεδα του θειϊκού ινδοξυλίου στον ορό και τα ούρα ήταν υψηλότερα στους ασθενείς με ΔΝΝ και μάλιστα ακόμα πιο αυξημένα σε όσους εμφάνιζαν μετρίως και σημαντικά αυξημένη αλβουμινουρία. Η ουραιμική αυτή τοξίνη έχει πιθανό ρόλο ως πρώιμος βιοδείκτης της ΔΝΝ ενώ εμπλέκεται και στην παθογένεση της νόσου. Παρουσιάζει προφλεγμονώδη και προοξειδωτική δράση, προάγοντας τη φλεγμονή στο σπείραμα, την ασβεστοποίηση των αγγείων και το σχηματισμό μικροθρόμβων με αποτέλεσμα την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αύξηση της διαπερατότητας του σπειραματικού φραγμού διήθησης. Επιπλέον, στα σωληνάρια δρα στους υποδοχείς του (OATs) πυροδοτώντας προφλεγμονώδεις διαδικασίες, αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο και πυροδοτεί την έναρξη της διαδικασίας της κυτταρικής γήρανσης. Διεγείρει

την έκφραση παραγόντων του SASP ενώ συνεισφέρει στην κυτταρική γήρανση μέσω δημιουργίας ROS και μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού NF-κ B, επάγοντας την έκφραση των παραγόντων ICAM-1 και MCP-1 στα επιθηλιακά νεφρικά κύτταρα. Ένας άλλος μηχανισμός που εμπλέκεται είναι η συμμετοχή του στην εμφάνιση στρες ενδοπλασματικού δικτύου, με τη χορήγηση ανασυνδυασμένης Klotho να εξαλείφει το φαινόμενο αυτό με έναν εξαρτώμενο από την AMPKα1 μηχανισμό (Chen, et al, 2020; Yang, et al, 2023; Balint, et al, 2023). Ένας άλλος μεταβολίτης, η p-θειϊκή κρεσόλη που προέρχεται από το μεταβολισμό της τυροσίνης συσχετίζεται με την εμφάνιση αντίστασης στην ινσουλίνη σε ασθενείς με ΧΝΝ. Μέσω βακτηριακής ζύμωσης παράγεται p-κρεσόλη και φαινόλη. Η p-κρεσόλη μεταβολίζεται στο ήπαρ και παράγεται p-θειϊκή κρεσόλη που απομακρύνεται από τον οργανισμό από τους νεφρούς. Παθογενετικά, ενεργοποιεί φλεγμονώδεις διαδικασίες και οδηγεί στην απόπτωση τα επιθηλιακά κύτταρα των σωληναρίων.

Ο μεταβολισμός της αργινίνης και τα μεθυλιωμένα παράγωγά της, SDMA και ADMA, εμφανίζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην παθογένεση νεφρικών νοσημάτων. Η αργινίνη, είναι ένα εξωγενές μη απαραίτητο αμινοξύ, το οποίο υπό τη δράση της NOS παράγει NO. Η δράση της πρωτεΐνης μεθυλοτρανσφεράση της αργινίνης (PRMT) οδηγεί στην παραγωγή των SMDA και ADMA. Η ADMA, αναστέλλει τη NOS παρεμποδίζοντας τη σύνθεση NO. Λόγω της νεφρικής της απέκκρισης, τα επίπεδα της παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον στη ΔΝΝ και ακολουθούν αυξητική τάση κατά της μετάβαση στα αρχικά στάδια της ΔΝΝ, καθιστώντας τη έναν δυνητικό βιοδείκτη πρώιμης διάγνωσης. Επιπλέον, τα δεδομένα ζωικών μοντέλων ΣΔ δείχνουν ότι η απορρύθμιση του μεταβολισμού της αργινίνης σε συνθήκες υπεργλυκαιμίας οδηγεί σε ίνωση, ενώ τα χαμηλά της επίπεδα στη ΔΝΝ, ήδη από το επίπεδο της νορμοαλβουμινουρίας αποτελούν μια προοξειδωτική κατάσταση (Balint, et al, 2023).

Τα αμινοξέα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο νεφρό, με την ομοιοστασία τους να συνεισφέρει στην αιμοδυναμική απόκριση του νεφρού και στη σπειραματική υπερδιήθηση που παρατηρείται στο ΣΔ. Επιπλέον, δρουν ως σηματοδοτικά μόρια ρυθμίζοντας την ενέργεια και την ομοιοστασία του μεταβολισμού. Η ίδια η νεφρική λειτουργία επηρεάζει την ομοιοστασία των αμινοξέων, με τα επίπεδά τους να αντικατοπτρίζουν τη νεφρική λειτουργία στους ασθενείς με ΣΔ. Διαταραχή στην ομοιοστασία τους προκαλεί συσσώρευση επιβλαβών μεταβολιτών και ενεργοποιεί ένζυμα του μεταβολισμού συμμετέχοντας στην παθογένεση της ΔΝΝ, πυροδοτώντας την κυτταρική σηματοδότηση με αποτέλεσμα την εμφάνιση φλεγμονής, οξειδωτικού στρες και

την κυτταρική απόπτωση. Ο οργανισμός, φαίνεται να αντιλαμβάνεται την περίσσεια ή την έλλειψη αμινοξέων μέσω του mTORc1 και του σηματοδοτικού μονοπατιού του FGF21. Επιπρόσθετα, ο μεταβολισμός των αμινοξέων αποτελεί σημαντική πηγή ουραιμικών τοξινών που συνιστούν δυνητικούς βιοδείκτες πρώιμης διάγνωσης της ΔΝΝ. Σε αυτές ανήκουν το IMP, προϊόν του καταβολισμού της ιστιδίνης που συνεισφέρει στην εξέλιξη της ΔΝΝ μέσω βλάβης στα μεσαγγειακά κύτταρα προκαλώντας χαμηλού βαθμού φλεγμονή και επιδεινώνοντας την αντίσταση στην ινσουλίνη. Το IS, αποτελεί προϊόν του μεταβολισμού της τρυπτοφάνης μέσω του μονοπατιού της κινουρενίνης και η αύξηση των συγκεντρώσεών του συνοδεύεται από κυτταροτοξική δράση. Συμμετέχει επίσης στην ίνωση μέσω θετικής ρύθμισης του TGF-β1 αλλά και στη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης μέσω μετατόπισης του φωσφορυλιωμένου NF- κ B και ενεργοποίησης του μονοπατιού αυτού. Τα επίπεδα του IS αυξάνονται στα πρώιμα στάδια της ΔΝΝ και σχετίζονται με την εξέλιξη της νόσου. Τέλος, το PS προϊόν του μεταβολισμού της τυροσίνης υπό τη δράση της μικροβιακής χλωρίδας του εντέρου που συμμετέχει στην παθογένεση της ΔΝΝ μέσω φλεγμονής και βλάβης των ποδοκυττάρων, αποτελεί προγνωστικό δείκτη εμφάνισης αλβουμινουρίας στη ΔΝΝ. Επίσης, το PS αποτελεί ένα τροποποιήσιμο παράγοντα κινδύνου και δυνητικό θεραπευτικό στόχο (Liu, et al, 2023).

8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μια ανασκόπηση της πρόσφατης βιβλιογραφίας όσον αφορά το ρόλο της μεταβολομικής στην πρώιμη διάγνωση της ΔΝΝ. Όπως κατέστη σαφές, η πρώιμη διάγνωση της νόσου αποτελεί την αποτελεσματικότερη και οικονομικά αποδοτικότερη παρέμβαση έναντι αυτής καθώς η ΔΝΝ αποτελεί το κυριότερο αίτιο χρόνιας νεφρικής νόσου, συνοδευόμενη από σημαντικά ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας, οφειλόμενα ως επί το πλείστον στον αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο που συνοδεύει τους ασθενείς αυτούς. Παρά τη σπουδαιότητα της πρώιμης διάγνωσής της, οι υπάρχοντες βιοδείκτες αδυνατούν να την επιτύχουν καθώς αντιπροσωπεύουν περισσότερο προχωρημένη νεφρική βλάβη παρά πρώιμες παθοφυσιολογικές μεταβολές. Η σημαντική πρόοδος που έχει σημειωθεί τα τελευταία χρόνια στην τεχνολογία, παρέχει στην επιστημονική κοινότητα εργαλεία ώστε να προσεγγίσει με βελτιωμένες προοπτικές την εξατομικευμένη ιατρική ακριβείας. Υπό το πρίσμα των τεχνολογικών αυτών εξελίξεων και λαμβάνοντας υπόψιν ότι ο ΣΔ αποτελεί ένα χρόνιο, μεταβολικό νόσημα, το

ερευνητικό ενδιαφέρον στράφηκε στον πιθανό ρόλο της μεταβολομικής, του κλάδου εκείνου των Omics τεχνολογιών που μελετά τους μεταβολίτες και τα μεταβολικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν, στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας της νόσου και των επιπλοκών της, φιλοδοξώντας να συνδράμει την έγκαιρη διάγνωση αυτών αλλά και την ανακάλυψη νέων, πιθανών θεραπευτικών στόχων.. Από την ανασκόπηση αυτή προκύπτει ότι η ΔΝΝ οφείλει πλέον να λογίζεται ως μια νεφρική νόσος η οποία δεν αποτελεί μόνο μια σπειραματοπάθεια, αλλά επίσης σωληναριοπάθεια καθώς τα μιτοχόνδρια που αφθονούν στα επιθηλιακά κύτταρα των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων διαδραματίζουν καίριο ρόλο στην παθοφυσιολογία της, ιδιαίτερα κατά τα πρώιμα στάδια. Την παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνουν οι μελέτες μεταβολομικής που έχουν πραγματοποιηθεί έως σήμερα σε ανθρώπους αλλά και σε ζωικά μοντέλα, αναδεικνύοντας τα μεταβολικά μονοπάτια του TCA, της β-οξειδωσης των ΛΟ, του μεταβολισμού των BCAAs, των ουραιμικών τοξινών αλλά και της τρυπτοφάνης ως τα κύρια μονοπάτια που εμφανίζουν διαταραχές σε άτομα που βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο εμφάνισης ΔΝΝ αλλά και σε όσους βρίσκονται στα πρώιμα στάδια της νόσου. **(Πίνακας 3)**

Μελέτη	Έτος	Πληθυσμός μελέτης	Μέθοδος	Κύρια ευρήματα	Ερμηνεία
Niewczas et al	2014	158 ασθενείς με ΣΔ και νορμοαλβουμινουρία	Στοχευμένη ανάλυση με MS	Αυξημένα επίπεδα κινουρενίνης και θεικού ινδοξυλίου. Αύξηση δεικτών οξειδωτικού στρες και φλεγμονής συσχετίστηκαν με την εξέλιξη της ΔΝΝ.	Η κινουρενίνη και το θεικό ινδοξύλιο ως δυνητικοί βιοδείκτες πρώιμης διάγνωσης της ΔΝΝ. Επισημάνση του ρόλου της φλεγμονής στα αρχικά στάδια της ΔΝΝ
Van der Kloet	2012	119 controls και ασθενείς με ΔΝΝ	Μη στοχευμένη ανάλυση με	Αύξηση των επιπέδων κορεσμένων ΛΟ, ακυλοκαρνιτινών βραχείας αλύσου και μείωση των	Οι αλλαγές στα επίπεδα των ακυλοκαρνιτινών και των κορεσμένων ΛΟ μπορούν να

			MS και NMR	επιπέδων ακυλοκαρνιτινών μακράς αλύσου συνδέονται με διαταραχή του μεταβολισμού των λιπιδίων στα αρχικά στάδια της ΔΝΝ	λειτουργήσουν ως βιοδείκτες πρώιμης διάγνωσης της ΔΝΝ αποδεικνύοντας ότι οι μεταβολικές διαταραχές προηγούνται της εμφάνισης σημαντικής νεφρικής βλάβης
Barrios et al.	2018	200 ασθενείς με ΣΔ	Μη στοχευμένη ανάλυση με MS	Αύξηση των δικαρβοξυλικών οξέων και των προσταγλανδινών που συνδέονται με την υπεροξειδωση των λιπιδίων	Τα δικαρβοξυλικά οξέα ως πιθανοί πρώιμοι βιοδείκτες οξειδωτικού στρες στη ΔΝΝ
Rhee et al	2013	840 ασθενείς συμπεριλαμβανομένων ασθενών με ΣΔ	Στοχευμένη ανάλυση με MS	Σημαντική συσχέτιση μεταξύ των BCAAs και της πρώιμης έκπτωσης της νεφρικής λειτουργίας	Τα BCAAs προβλέπουν πρώιμα τη διαταραχή της νεφρικής λειτουργίας στο ΣΔ, καθιστώντας τα σημαντικά για την πρώιμη διάγνωση της ΔΝΝ.
Sharma et al	2019	300 ασθενείς με ΣΔΤ2	LC-MS	Σημαντικές αλλαγές στο μεταβολισμό της αργινίνης συσχετίζονται με αρχικά στάδια νεφρικής ανεπάρκειας	Οι πρώιμες διαταραχές στο μεταβολισμό της αργινίνης σηματοδοτούν την έναρξη της ΔΝΝ.
Balint et al	2023	318 ασθενείς με ΣΔΤ2	Στοχευμένη ανάλυση με MS	Οι ουραιμικές τοξίνες θειικό ινδοξύλιο και p-θειικό κρεσόλη συσχετίζονται με βλάβη των ποδοκυττάρων και του ενδοθηλίου	Οι ουραιμικές τοξίνες θειικό ινδοξύλιο και p-θειικό κρεσόλη δρουν ως πρώιμοι βιοδείκτες της ΔΝΝ
Kwan et al	2020	120 ασθενείς μεταξύ των οποίων 40 controls, 40 με ΣΔ και 40 με ΔΝΝ	Στοχευμένη ανάλυση με LC-MS	Απορρύθμιση του TCA με αύξηση των επιπέδων του κιτρικού και του ηλεκτρικού στη ΔΝΝ	Τα αυξημένα επίπεδα κιτρικού και ηλεκτρικού θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες ΔΝΝ πριν την εκδήλωση της νόσου.

Πίνακας 3: Ενδεικτικές μελέτες μεταβολομικής σε ανθρώπους που επισημαίνουν τα κύρια μεταβολικά μονοπάτια που λειτουργούν ως πηγή βιοδεικτών πρόωμης διάγνωσης της ΔΝΝ.

Η ταυτόχρονη χρήση αυτών των βιοδεικτών, σε συνδυασμό με κλινικές παραμέτρους, βελτιώνει την διαγνωστική και προγνωστική τους αξία. Δεδομένης της σημασίας της πρόωμης διάγνωσης της νόσου για την επιτυχή αντιμετώπισή της, ιδιαίτερη έμφαση οφείλει να δοθεί σε προοπτικές μελέτες οι οποίες αξιολογούν την προγνωστική αξία των βιοδεικτών μεταβολομικής στους ασθενείς με ΣΔ. Αν και ο αριθμός τους είναι περιορισμένος, τόσο σε πειραματικό όσο και σε κλινικό στάδιο, τα αποτελέσματά τους δείχνουν ότι μεταβολίτες προερχόμενοι από τον κύκλο του κιτρικού οξέος, το μεταβολισμό των αμινοξέων διακλαδισμένης αλύσου και της β-οξείδωσης των λιπαρών οξέων μπορούν να αποτελέσουν προγνωστικούς βιοδείκτες νεφρικής βλάβης στο ΣΔ (Πίνακας 4).

<i>Μελέτη</i>	<i>Μέθοδος</i>	<i>Πληθυσμός</i>	<i>Κύρια Ευρήματα</i>
Sas, et al, 2016	LC-MS	49 ασθενείς με ΣΔΤ2, μέση τιμή e GFR: 90 ml/min/1.73m ² και ACR: 7.8 mg/g	Στατιστικά σημαντική αύξηση των baseline επιπέδων μεταβολιτών του TCA (κιτρικό, ηλεκτρικό, φουμαρικό, μηλικό) σε όσους εμφάνισαν ΔΝΝ
Tofte, et al, 2019	LC-MS	Ασθενείς με ΣΔΤ1, μέση τιμή e GFR: 81 ml/min/1.73m ² και αλβουμίνη ούρων 18mg/24ώρο	Το 3,4-διϋδροξυβουτανικό οξύ παρουσίασε αρνητική συσχέτιση με το e GFR και θετική με την αλβουμίνη ούρων 24ώρου
Afshinnia, et al, 2019	LC-MS	92 ασθενείς με ΣΔΤ2, e GFR>90 ml/min/1.73m ² και ACR<30 mg/g	Αυξημένα baseline επίπεδα πολυακόρεστων τριακυλογλυκερολών και ελαττωμένα επίπεδα ακυλοκαρνιτινών μακράς αλύσου στον ορό ασθενών που εμφάνισαν μείωση του e GFR>40%
Mutter, et al, 2021	NMR	2670 ασθενείς με ΣΔΤ1 και μέση τιμή e GR>81 ml/min/1.73m ²	Αυξημένα baseline επίπεδα 2-

			υδροξυβουτυρικού στα ούρα συσχετίζονται με τη μετάβαση από το στάδιο της νορμοαλβουμινουρίας σε διάστημα παρακολούθησης 9+/-5 ετών
Zhu, et al, 2022	LC-MS	30 ασθενείς με ΣΔΤ2 δίχως ΔΝΝ	Αυξημένα baseline επίπεδα L-βαλίνης και ισολευκίνης στον ορό ασθενών που εμφάνισαν ελάττωση του e GFR σε διάστημα παρακολούθησης 69 μηνών
Lin, et al, 2022	LC-MS	28 ασθενείς με ΣΔΤ2 δίχως ΔΝΝ	Μειωμένα baseline επίπεδα ουρικού οξέος, φωσφατιδυλογολίνης 36:4 και λυσοφωσφατιδυλογολίνης 18:2 στον ορό όσων εμφάνισαν ΔΝΝ σε διάστημα παρακολούθησης 4 ετών

Πίνακας 4: Κλινικές μελέτες μεταβολομικής που αξιολογούν προγνωστικούς βιοδείκτες νεφρικής λειτουργίας σε ασθενείς με ΣΔ.

Η χρήση των νέων βιοδεικτών μεταβολομικής στην καθημέρα κλινική πράξη αποτελεί τη μεγαλύτερη πρόκληση καθώς απαιτούνται μεγάλες, προοπτικές μελέτες για να επιβεβαιώσουν την αναπαραγωγιμότητα και την ειδικότητά τους. Επιπλέον, η ανάπτυξη πρότυπων πρωτοκόλλων για τη συλλογή, την επεξεργασία των δειγμάτων αλλά και την ανάλυση των δεδομένων είναι ζωτικής σημασίας για τη διασφάλιση της συνέπειας και της ακρίβειας των δεδομένων.

9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Παρόλο το γεγονός ότι τα τελευταία χρόνια η ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών παραγόντων (αναστολείς SGLT2, μη στεροειδείς ανταγωνιστές υποδοχέων αλατοκορτικοειδών) έναντι της ΔΝΝ έχει βελτιώσει σημαντικά την πρόγνωση των ασθενών αυτών, ο υπολειπόμενος κίνδυνος μετάβασης σε τελικού σταδίου νεφρική νόσο παραμένει σε μη αποδεκτά επίπεδα, ενώ και οι ίδιοι οι ασθενείς παρουσιάζουν ποικιλία ως προς την απόκρισή τους στους παράγοντες αυτούς. Οι παρατηρήσεις αυτές υπογραμμίζουν τη σπουδαιότητα της έγκαιρης διάγνωσης και της καλύτερης κατανόησης της παθοφυσιολογίας της ΔΝΝ, ως την αποτελεσματικότερη παρέμβαση έναντι αυτής. Στο πλαίσιο αυτό, αν και περισσότερες μελέτες πρέπει να πραγματοποιηθούν, η μεταβολομική αποτελεί ένα ελπιδοφόρο πεδίο έρευνας προσφέροντας μια λεπτομερή περιγραφή των μεταβολικών αλλαγών που σχετίζονται με την έναρξη της νόσου. Αν και βρίσκεται ακόμα στα αρχικά στάδια, η χρήση μεταβολικών βιοδεικτών θα μπορούσε να προκαλέσει επανάσταση τόσο στην πρόωπη διάγνωση αυτής όσο και στην ανακάλυψη νέων, δυνητικών θεραπευτικών στόχων, προσφέροντας μελλοντικά τη δυνατότητα εξατομικευμένης προσέγγισης και τοποθετώντας την ιατρική ακριβείας σε θέση προτεραιότητας. Οι μελλοντικές έρευνες θα πρέπει να εστιάσουν στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων αυτών σε μεγαλύτερες μελέτες κοόρτης όπως επίσης και στην αντιμετώπιση των πρακτικών ζητημάτων που σχετίζονται με τη μεταβολομική, έτσι ώστε να διαπιστωθεί πλήρως η δυνατότητα κλινικής εφαρμογής της.

10. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Ο ρόλος της μεταβολομικής στην πρόωπη διάγνωση της διαβητικής νεφροπάθειας - Γαρούφης Μιχαήλ

Η ΔΝΝ αποτελεί το κύριο αίτιο χρόνιας νεφρικής νόσου ενώ συνοδεύεται από σημαντικό καρδιαγγειακό κίνδυνο. Παρά την πρόσφατη ανακάλυψη νεφροπροστατευτικών παραγόντων, ο επιπολασμός της συνεχίζει να αυξάνει πιθανώς λόγω της πανδημίας του ΣΔΤ2 και της

παχυσαρκίας. Οι υπάρχοντες βιοδείκτες αποτυγχάνουν στην έγκαιρη διάγνωση της, η οποία αποτελεί την πιο αποτελεσματική παρέμβαση έναντι της νόσου. Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας έχει στραφεί στο ρόλο της μεταβολομικής ως μια προσέγγιση ανακάλυψης βιοδεικτών πρώιμης διάγνωσης της ΔΝΝ, με τους μεταβολίτες να αποτελούν ελπιδοφόρα μόρια καθώς αντιπροσωπεύουν με μεγαλύτερη ακρίβεια το φαινότυπο της νόσου. Οι μελέτες που έχουν διενεργηθεί έως σήμερα υποδεικνύουν τον κύκλο του κιτρικού οξέος, της β-οξειδωσης των λιπαρών οξέων, του μεταβολισμού των αμινοξέων και ιδιαίτερα αυτού των αμινοξέων διακλαδασμένης αλυσού, των πουρινών αλλά και τους προερχόμενους από το εντερικό μικροβίωμα μεταβολίτες ως πηγή βιοδεικτών πρώιμης διάγνωσης της ΔΝΝ. Οι βιοδείκτες αυτοί δεν έχουν βρει ακόμα κλινική εφαρμογή και περισσότερες μελέτες που θα αξιολογούν την αποτελεσματικότητά τους αλλά και την αποδοτικότητα κόστους-αποτελεσματικότητας θα πρέπει να διενεργηθούν έτσι ώστε να προσεγγιστεί η εξατομικευμένη ιατρική ακριβείας στην διάγνωση αλλά και την αντιμετώπιση των ασθενών με ΔΝΝ.

11. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ

The role of metabonomics in the early diagnosis of diabetic nephropathy- Garoufis Michael

Diabetic nephropathy is the main cause of chronic kidney disease, and it is accompanied by a substantial cardiovascular risk. Despite the recent discovery of renoprotective agents, its prevalence continues to rise, probably because of diabetes mellitus and obesity pandemic. Current biomarkers fail to diagnose these patients in time, while timely diagnosis remains the most effective intervention against the disease. Recently, research interest has turned to the role of metabonomics as an approach to the discovery of biomarkers of early diagnosis of diabetic nephropathy, as metabolites represent with greater accuracy the phenotype of the under-study disease. Studies to date, suggest that citric acid cycle, fatty acid beta oxidation, amino acid metabolism, especially the one of branched amino acids, purine metabolism as well as metabolites derived from gut microbiota could be used as a source of potential biomarkers for the early diagnosis of diabetic nephropathy. These biomarkers have no clinical implementation to date, as

more studies that will evaluate their efficacy and their cost-effectiveness are needed to approach personalized, precision medicine in the diagnosis and treatment of diabetic nephropathy.

III. ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΔΝ: Διαβητική Νεφροπάθεια

ΣΔ: Σακχαρώδης Διαβήτης

ΣΔΤ1: Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 1

ΣΔΤ2: Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2

ΔΝΝ: Διαβητική Νεφρική Νόσος

GFR: Glomerular Filtration Rate

XNN: Χρόνια Νεφρική Νόσος

KDIGO: Kidney Disease Improving Global Outcomes

e GFR: estimated Glomerular Filtration Rate

UACR: Urine Albumin Creatinine Ratio

KAN: Καρδιαγγειακή Νόσος

KDOQI: Kidney Disease Outcomes Qualitative Initiative

CKD-EPI: Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration

ΔΑ: Διαβητική Αμφιβληστροειδοπάθεια

MDRD: Modification of Diet in Renal Disease

m GFR: measured Glomerular Filtration Rate

a MDRD: abbreviated Modification of Diet in Renal Disease

SGLT: Sodium Glucose Cotransporter

RAAS: Renin Angiotensin Aldosterone System

ΣΦΔ: Σπειραματικός Φραγμός Διήθησης

ΣΒΜ: Σπειραματική Βασική Μembrάνη

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

GBM: Glomerular Basement Membrane

ΑΥ: Αρτηριακή Υπέρταση

AGE: Advanced Glycation End Product

TGF: Transforming Growth Factor

ROS: Reactive Oxygen Species

HIF: Hypoxia Inducible Factor

TNF: Tumor Necrosis Factor

EMT: Epithelial-to-Mesenchymal Transition

GH: Growth Hormone

IGF-1: Insulin-like Growth Factor 1

ΛΟ: Λιπαρά Οξέα

ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1

CCL2: Chemokine (C-C motif) Ligand 2

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

PKC: Protein Kinase C

PARP: Poly (ADP-Ribose) Polymerase

VWF: Von Willebrand Factor

VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule 1

GADPH: Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase

TCA: Tricarboxylic Acid Cycle

RAGE: Advanced Glycation End Product Receptor

MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein 1

UDP-GlcNAc: Uridine Diphosphate N-Acetylglucosamine

GFAT: Glutamine Fructose-6-phosphate Aminotransferase

XOR: Xanthine Oxidoreductase

CTP: Cytidine Triphosphate

ANT: Adenosine Nucleotide Translocase

AAC: ADP/ATP Carrier

NRF: Nuclear Respiratory Factor

ERR α : Estrogen Related Receptor α

SIRT: Sirtuin

PINK: PTEN Induced Kinase

PRKN: Parkin RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase

Drp1: Dynamin-related protein 1

OPA1: Optic Atrophy 1

Mfn: Mitofusin

FIS1: Mitochondrial Fission Protein 1

MFP: Membrane Fusion Protein

ULK1: Unc-51-like Kinase 1

m TOR: mechanistic Target of Rapamycin

SASP: Senescence Associated Secretory Phenotype

SA- β -GAL: Senescence Associated- β - Galactosidase

HMGB1: High Mobility Group Box 1 protein

DAMP: Damage-Associated Molecular Pattern

TLR4: Toll-like Receptor 4

PEPK-C: Phosphoenolpyruvate Carboxykinase

PK: Pyruvate Kinase

NMR: Nuclear Magnetic Resonance

GC-MS: Gas Chromatography Mass Spectroscopy

LC-MS: Liquid Chromatography Mass Spectroscopy

MDA: Multivariate Data Analysis

PCA: Principal Component Analysis

PLS-DA: Partial Least Square Data Analysis

OPLS-DA: Orthogonal Partial Least Squares Data Analysis

SDMA: Symmetric Dimethyl Arginine

ADMA: Asymmetric Dimethyl Arginine

ΤΕΝΝ: Τελικού Σταδίου Νεφρική Νόσος

GBB: Gamma Butyrobetaine

GABA: Gamma Aminobutyric Acid

HIF-PH: Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitor

BCAA: Branched Chain Amino Acid

BCKA: Branched Chain Keto Acid

NEFA: Non-esterified Fatty Acid

LPE: Lysophosphatidylethanolamine

TAG: Triacylglycerole

PE: Phosphatidylethanolamine

SREBP: Sterol regulatory element-binding protein

LPA: Lysophosphatidic acid

OAT: Organic Anion Transporter

KIM-1: Kidney Injury Molecule 1

NOS: NO Synthase

FGF21: Fibroblast Growth Factor 21

IV. BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Podgórski, P., Konieczny A., Lis Ł., Witkiewicz W., Hruby Z. (2019) Glomerular podocytes in diabetic renal disease. *Adv Clin Exp Med* 2019 Dec;28(12):1711-1715
2. Tofte N., Persson F., Rossing P. (2020) Omics research in diabetic kidney disease: new biomarker dimensions and new understandings? *J Nephrol.* 2020 Oct;33(5):931-948
3. Lash LH. (2022) Cellular and Functional Biomarkers of Renal Injury and Disease. *Curr Opin Toxicol.* 2022 Sep;31:100348.
4. Satirapoj B., Adler SG. (2014) Comprehensive approach to diabetic nephropathy. *Kidney Res Clin Pract.* 2014 Sep;33(3):121-31
5. Mogensen CE, Christensen CK, Vittinghus E. (1983) The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes.* 1983 May;32 Suppl 2:64-78
6. Vučić Lovrenčić M., Božičević S., Smirčić Duvnjak L. (2023) Diagnostic challenges of diabetic kidney disease. *Biochem Med (Zagreb).* 2023 Oct 15;33(3):030501. doi: 10.11613/BM.2023.030501
7. Forbes JM., Thorburn DR. (2018) Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2018 May;14(5):291-312.
8. Oshima M., Shimizu M., Yamanouchi M., Toyama T., Hara A., Furuichi K., Wada T. (2021) Trajectories of kidney function in diabetes: a clinicopathological update. *Nat Rev Nephrol.* 2021 Nov;17(11):740-750
9. Filla LA., Edwards JL. (2016) Metabolomics in diabetic complications. *Mol Biosyst.* 2016 Apr;12(4):1090-105
10. Yao L., Liang X., Qiao Y., Chen B., Wang P., Liu Z. (2022) Mitochondrial dysfunction in diabetic tubulopathy. *Metabolism.* 2022 Jun;131:155195.
11. Lucio-Gutiérrez JR., Cordero-Pérez P., Farías-Navarro IC., Tijerina-Marquez R., Sánchez-Martínez C., Ávila-Velázquez JL., García-Hernández PA., Náñez-Terreros

- H., Coello-Bonilla J., Pérez-Trujillo M., Parella T., Torres-González L., Waksman-Minsky NH., Saucedo AL. (2022) Using nuclear magnetic resonance urine metabolomics to develop a prediction model of early stages of renal disease in subjects with type 2 diabetes. *J Pharm Biomed Anal.* 2022 Sep 20;219:114885
12. Mizdrak M., Kumrić M., Kurir TT., Božić J. (2022) Emerging Biomarkers for Early Detection of Chronic Kidney Disease. *J Pers Med.* 2022 Mar 31;12(4):548.
 13. Provenzano M., Serra R., Garofalo C., Michael A., Crugliano G., Battaglia Y., Ielapi N., Bracale UM., Faga T., Capitoli G., Galimberti S., Andreucci M. (2021) OMICS in Chronic Kidney Disease: Focus on Prognosis and Prediction. *Int J Mol Sci.* 2021 Dec 29;23(1):336
 14. Sugahara M, Pak WLW, Tanaka T, Tang SCW, Nangaku M. (2021) Update on diagnosis, pathophysiology, and management of diabetic kidney disease. *Nephrology (Carlton).* 2021 Jun;26(6):491-500
 15. Hussain S, Jamali MC, Habib A, Hussain S, Akhtar M, Najmi AK, (2021) Diabetic kidney disease: An overview of prevalence, risk factors, and biomarkers, *Clinical Epidemiology and Global Health*, Volume 9, 2021, Pages 2-6, ISSN 2213-3984
 16. Pan Y, Yang H, Chen T, Jin J, Ruan L, Hu L, Chen L (2022). Extracellular vesicles metabolic changes reveals plasma signature in stage-dependent diabetic kidney disease. *Ren Fail.* 2022 Dec;44(1):1840-1849.
 17. Liu S, Gui Y, Wang MS, Zhang L, Xu T, Pan Y, Zhang K, Yu Y, Xiao L, Qiao Y, Bonin C, Hargis G, Huan T, Yu Y, Tao J, Zhang R, Kreutzer DL, Zhou Y, Tian XJ, Wang Y, Fu H, An X, Liu S, Zhou D. (2021) Serum integrative omics reveals the landscape of human diabetic kidney disease. *Mol Metab.* 2021 Dec;54:101367.
 18. Sas KM, Karnovsky A, Michailidis G, Pennathur S. (2015) Metabolomics and diabetes: analytical and computational approaches. *Diabetes.* 2015 Mar;64(3):718-32
 19. Satirapoj B. (2018) Tubulointerstitial Biomarkers for Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Res.* 2018 Feb 8;2018:2852398.
 20. Perco P, Pena M, Heerspink HJL, Mayer G; BEAt-DKD Consortium. (2018) Multimarker Panels in Diabetic Kidney Disease: The Way to Improved Clinical Trial Design and Clinical Practice? *Kidney Int Rep.* 2018 Dec 18;4(2):212-221

21. Malandrino N, Smith RJ. (2011) Personalized medicine in diabetes. Clin Chem. 2011 Feb;57(2):231-40. doi: 10.1373/clinchem.2010.156901.
22. ElSayed NA, Aleppo G, Aroda VR, Bannuru RR, Brown FM, Bruemmer D, Collins BS, Cusi K, Das SR, Gibbons CH, Giurini JM, Hilliard ME, Isaacs D, Johnson EL, Kahan S, Khunti K, Kosiborod M, Leon J, Lyons SK, Murdock L, Perry ML, Prahalad P, Pratley RE, Seley JJ, Stanton RC, Sun JK, Woodward CC, Young-Hyman D, Gabbay RA, on behalf of the American Diabetes Association. (2023) Introduction and Methodology: Standards of Care in Diabetes-2023. Diabetes Care. 2023 Jan 1;46(Suppl 1):S1-S4.
23. Barutta F, Bellini S, Canepa S, Durazzo M, Gruden G. (2021) Novel biomarkers of diabetic kidney disease: current status and potential clinical application. Acta Diabetol. 2021 Jul;58(7):819-830.
24. Chen L, Islam RM, Wang J, Hird TR, Pavkov ME, Gregg EW, Salim A, Tabesh M, Koye DN, Harding JL, Sacre JW, Barr ELM, Magliano DJ, Shaw JE. (2020) A systematic review of trends in all-cause mortality among people with diabetes. Diabetologia. 2020 Sep;63(9):1718-1735
25. Hoogeveen EK. (2022) The Epidemiology of Diabetic Kidney Disease. Kidney and Dialysis. 2022; 2(3):433-442
26. Perkins BA, Bebu I, de Boer IH, Molitch M, Tamborlane W, Lorenzi G, Herman W, White NH, Pop-Busui R, Paterson AD, Orchard T, Cowie C, Lachin JM; Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) Research Group. (2019) Risk Factors for Kidney Disease in Type 1 Diabetes. Diabetes Care. 2019 May;42(5):883-890
27. Koye DN, Magliano DJ, Nelson RG, Pavkov ME. (2018) The Global Epidemiology of Diabetes and Kidney Disease. Adv Chronic Kidney Dis. 2018 Mar;25(2):121-132.
28. Ελληνική Διαβητολογική Εταιρεία (2023) Κατευθυντήριες Οδηγίες για το Σακχαρώδη Διαβήτη
29. Huang G, Li M, Li Y, Mao Y. (2022) Metabolomics: A New Tool to Reveal the Nature of Diabetic Kidney Disease. Lab Med. 2022 Nov 3;53(6):545-551

30. Ricciardi CA, Gnudi L. (2021) Kidney disease in diabetes: From mechanisms to clinical presentation and treatment strategies. *Metabolism*. 2021 Nov;124:154890.
31. Banimfreg BH, Alshraideh H, Shamayleh A, Guella A, Semreen MH, Al Bataineh MT, Soares NC. (2022) Untargeted Metabolomic Plasma Profiling of Emirati Dialysis Patients with Diabetes versus Non-Diabetic: A Pilot Study. *Biomolecules*. 2022 Jul 8;12(7):962.
32. Gembillo G, Ingrassiotta Y, Crisafulli S, Luxi N, Siligato R, Santoro D, Trifirò G. (2021) Kidney Disease in Diabetic Patients: From Pathophysiology to Pharmacological Aspects with a Focus on Therapeutic Inertia. *Int J Mol Sci*. 2021 May 1;22(9):4824.
33. Fiorentino M, Bolignano D, Tesar V, Pisano A, Biesen WV, Tripepi G, D'Arrigo G, Gesualdo L; ERA-EDTA Immunonephrology Working Group. (2017) Renal biopsy in patients with diabetes: a pooled meta-analysis of 48 studies. *Nephrol Dial Transplant*. 2017 Jan 1;32(1):97-110.
34. Tong X, Yu Q, Ankawi G, Pang B, Yang B, Yang H. (2020) Insights into the Role of Renal Biopsy in Patients with T2DM: A Literature Review of Global Renal Biopsy Results. *Diabetes Ther*. 2020 Sep;11(9):1983-1999.
35. Waikar SS, Rebholz CM, Zheng Z, Hurwitz S, Hsu CY, Feldman HI, Xie D, Liu KD, Mifflin TE, Eckfeldt JH, Kimmel PL, Vasan RS, Bonventre JV, Inker LA, Coresh J; Chronic Kidney Disease Biomarkers Consortium Investigators. (2018) Biological Variability of Estimated GFR and Albuminuria in CKD. *Am J Kidney Dis*. 2018 Oct;72(4):538-546.
36. Delanaye P, Pottel H, Glasscock RJ. (2022) Americentrism in estimation of glomerular filtration rate equations. *Kidney Int*. 2022 May;101(5):856-858.
37. Colhoun HM, Marcovecchio ML. (2018) Biomarkers of diabetic kidney disease. *Diabetologia*. 2018 May;61(5):996-1011.
38. Ali H, Abu-Farha M, Alshawaf E, Devarajan S, Bahbahani Y, Al-Khairi I, Cherian P, Alsairafi Z, Vijayan V, Al-Mulla F, Al Attar A, Abubaker J. (2022) Association of significantly elevated plasma levels of NGAL and IGFBP4 in patients with diabetic nephropathy. *BMC Nephrol*. 2022 Feb 11;23(1):64.

39. Jung CY, Yoo TH. (2022) Pathophysiologic Mechanisms and Potential Biomarkers in Diabetic Kidney Disease. *Diabetes Metab J.* 2022 Mar;46(2):181-197
40. Rico-Fontalvo J, Aroca-Martínez G, Daza-Arnedo R, Cabrales J, Rodríguez-Yanez T, Cardona-Blanco M, Montejo-Hernández J, Rodelo Barrios D, Patiño-Patiño J, Osorio Rodríguez E. (2023) Novel Biomarkers of Diabetic Kidney Disease. *Biomolecules.* 2023 Mar 31;13(4):633
41. Porrini E, Ruggerenti P, Luis-Lima S, Carrara F, Jiménez A, de Vries APJ, Torres A, Gaspari F, Remuzzi G. (2019) Estimated GFR: time for a critical appraisal. *Nat Rev Nephrol.* 2019 Mar;15(3):177-190.
42. Hocher B, Adamski J. (2017) Metabolomics for clinical use and research in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2017 May;13(5):269-284.
43. Myrou A, Aslanidis T, Didangelos T, Karamouzis M, Hatzitolios A, Grekas D. (2018) Biomarkers of Diabetic Nephropathy Progression. *European Journal of Medicine*, 2018, 6(2): 97-103
44. Gaspari F, Ruggerenti P, Porrini E, Motterlini N, Cannata A, Carrara F, Jiménez Sosa A, Cella C, Ferrari S, Stucchi N, Parvanova A, Iliev I, Trevisan R, Bossi A, Zaletel J, Remuzzi G; GFR Study Investigators. (2013) The GFR and GFR decline cannot be accurately estimated in type 2 diabetics. *Kidney Int.* 2013 Jul;84(1):164-73.
45. Papadopoulou-Marketou N, Kanaka-Gantenbein C, Marketos N, Chrousos GP, Papassotiriou I. (2017) Biomarkers of diabetic nephropathy: A 2017 update. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2017 Aug;54(5):326-342.
46. Lassén E, Daehn IS. (2020) Molecular Mechanisms in Early Diabetic Kidney Disease: Glomerular Endothelial Cell Dysfunction. *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 11;21(24):9456
47. Daehn IS, Duffield JS. The glomerular filtration barrier: a structural target for novel kidney therapies. (2021) *Nat Rev Drug Discov.* 2021 Oct;20(10):770-788.
48. Daehn IS. (2018) Glomerular Endothelial Cell Stress and Cross-Talk With Podocytes in Early Diabetic Kidney Disease. *Front Med (Lausanne).* 2018 Mar 23;5:76

49. Chitra PS, Swathi T, Sahay R, Reddy GB, Menon RK, Kumar PA. (2015) Growth Hormone Induces Transforming Growth Factor-Beta-Induced Protein in Podocytes: Implications for Podocyte Depletion and Proteinuria. *J Cell Biochem.* 2015 Sep;116(9):1947-56
50. Blaine J, Dylewski J. Regulation of the Actin Cytoskeleton in Podocytes. (2020) *Cells.* 2020 Jul 16;9(7):1700
51. Fioretto P, Mauer M. (2007) Histopathology of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol.* 2007 Mar;27(2):195-207
52. DeFronzo RA, Reeves WB, Awad AS. (2021) Pathophysiology of diabetic kidney disease: impact of SGLT2 inhibitors. *Nat Rev Nephrol.* 2021 May;17(5):319-334.
53. Santoro D, Torreggiani M, Pellicanò V, Cernaro V, Messina RM, Longhitano E, Siligato R, Gembillo G, Esposito C, Piccoli GB. (2021) Kidney Biopsy in Type 2 Diabetic Patients: Critical Reflections on Present Indications and Diagnostic Alternatives. *Int J Mol Sci.* 2021 May 21;22(11):5425
54. Hung PH, Hsu YC, Chen TH, Lin CL. (2021) Recent Advances in Diabetic Kidney Diseases: From Kidney Injury to Kidney Fibrosis. *Int J Mol Sci.* 2021 Nov 1;22(21):11857
55. Giunti S, Barit D, Cooper ME. (2006) Mechanisms of diabetic nephropathy: role of hypertension. *Hypertension.* 2006 Oct;48(4):519-26
56. Cooper ME. (2004) The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in diabetes and its vascular complications. *Am J Hypertens.* 2004 Nov;17(11 Pt 2):16S-20S; quiz A2-4.
57. Pérez-Martí A, Ramakrishnan S, Li J, Dugourd A, Molenaar MR, De La Motte LR, Grand K, Mansouri A, Parisot M, Lienkamp SS, Saez-Rodriguez J, Simons M. (2022) Reducing lipid bilayer stress by monounsaturated fatty acids protects renal proximal tubules in diabetes. *Elife.* 2022 May 12;11:e74391.
58. Sas KM, Kayampilly P, Byun J, Nair V, Hinder LM, Hur J, Zhang H, Lin C, Qi NR, Michailidis G, Groop PH, Nelson RG, Darshi M, Sharma K, Schelling JR, Sedor JR, Pop-Busui R, Weinberg JM, Soleimanpour SA, Abcouwer SF, Gardner TW, Burant CF, Feldman EL, Kretzler M, Brosius FC 3rd, Pennathur S. (2016) Tissue-

- specific metabolic reprogramming drives nutrient flux in diabetic complications. *JCI Insight*. 2016 Sep 22;1(15):e86976.
59. Sakashita M, Tanaka T, Inagi R. (2021) Metabolic Changes and Oxidative Stress in Diabetic Kidney Disease. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Jul 19;10(7):1143.
 60. Hasegawa S, Inagi R. (2021) Harnessing Metabolomics to Describe the Pathophysiology Underlying Progression in Diabetic Kidney Disease. *Curr Diab Rep*. 2021 May 11;21(7):21.
 61. Butt L, Unnersjö-Jess D, Höhne M, Edwards A, Binz-Lotter J, Reilly D, Hahnfeldt R, Ziegler V, Fremter K, Rinschen MM, Helmstädter M, Ebert LK, Castrop H, Hackl MJ, Walz G, Brinkkoetter PT, Liebau MC, Tory K, Hoyer PF, Beck BB, Brismar H, Blom H, Schermer B, Benzing T. (2020) A molecular mechanism explaining albuminuria in kidney disease. *Nat Metab*. 2020 May;2(5):461-474.
 62. Benzing T, Salant D. (2021) Insights into Glomerular Filtration and Albuminuria. *N Engl J Med*. 2021 Apr 15;384(15):1437-1446
 63. Anders HJ, Huber TB, Isermann B, Schiffer M. (2018) CKD in diabetes: diabetic kidney disease versus nondiabetic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2018 Jun;14(6):361-377
 64. Kriz W, Lemley KV. (2015) A potential role for mechanical forces in the detachment of podocytes and the progression of CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2015 Feb;26(2):258-69
 65. Reddy GR, Pushpanathan MJ, Ransom RF, Holzman LB, Brosius FC 3rd, Diakonova M, Mathieson P, Saleem MA, List EO, Kopchick JJ, Frank SJ, Menon RK. (2007) Identification of the glomerular podocyte as a target for growth hormone action. *Endocrinology*. 2007 May;148(5):2045-55.
 66. Debnath S, Velagapudi C, Redus L, Thameem F, Kasinath B, Hura CE, Lorenzo C, Abboud HE, O'Connor JC. (2017) Tryptophan Metabolism in Patients With Chronic Kidney Disease Secondary to Type 2 Diabetes: Relationship to Inflammatory Markers. *Int J Tryptophan Res*. 2017 Mar 10;10:1178646917694600
 67. Shi C, Wan Y, He A, Wu X, Shen X, Zhu X, Yang J, Zhou Y. (2023) Urinary metabolites associate with the presence of diabetic kidney disease in type 2 diabetes

- and mediate the effect of inflammation on kidney complication. *Acta Diabetol.* 2023 Sep;60(9):1199-1207.
68. Chen Y, Zou H, Lu H, Xiang H, Chen S. (2022) Research progress of endothelial-mesenchymal transition in diabetic kidney disease. *J Cell Mol Med.* 2022 Jun;26(12):3313-3322.
 69. Koszegi S, Molnar A, Lenart L, Hodrea J, Balogh DB, Lakat T, Szkibinszkij E, Hosszu A, Sparding N, Genovese F, Wagner L, Vannay A, Szabo AJ, Fekete A. (2019) RAAS inhibitors directly reduce diabetes-induced renal fibrosis via growth factor inhibition. *J Physiol.* 2019 Jan;597(1):193-209.
 70. Braga PC, Alves MG, Rodrigues AS, Oliveira PF. (2022) Mitochondrial Pathophysiology on Chronic Kidney Disease. *Int J Mol Sci.* 2022 Feb 4;23(3):1776
 71. Genovese F, Manresa AA, Leeming DJ, Karsdal MA, Boor P. (2014) The extracellular matrix in the kidney: a source of novel non-invasive biomarkers of kidney fibrosis? *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2014 Mar 28;7(1):4.
 72. Abrass CK. (1995) Diabetic nephropathy. Mechanisms of mesangial matrix expansion. *West J Med.* 1995 Apr;162(4):318-21.
 73. Singh DK, Winocour P, Farrington K. (2011) Oxidative stress in early diabetic nephropathy: fueling the fire. *Nat Rev Endocrinol.* 2011 Mar;7(3):176-84.
 74. Nowotny K, Jung T, Höhn A, Weber D, Grune T. (2015) Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules.* 2015 Mar 16;5(1):194-222.
 75. Ighodaro OM. (2018) Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother.* 2018 Dec;108:656-662
 76. Aghadavod E, Khodadadi S, Baradaran A, Nasri P, Bahmani M, Rafieian-Kopaei M. (2016) Role of Oxidative Stress and Inflammatory Factors in Diabetic Kidney Disease. *Iran J Kidney Dis.* 2016 Nov;10(6):337-343
 77. Schleicher ED, Weigert C. (2000) Role of the hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl.* 2000 Sep;77:S13-8.
 78. Chung SS, Ho EC, Lam KS, Chung SK. (2003) Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Aug;14(8 Suppl 3):S233-6.

79. Wan C, Su H, Zhang C. (2016) Role of NADPH Oxidase in Metabolic Disease-Related Renal Injury: An Update. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:7813072.
80. You YH, Quach T, Saito R, Pham J, Sharma K. (2016) Metabolomics Reveals a Key Role for Fumarate in Mediating the Effects of NADPH Oxidase 4 in Diabetic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2016 Feb;27(2):466-81
81. Jiang H, Shao X, Jia S, Qu L, Weng C, Shen X, Wang Y, Huang H, Wang Y, Wang C, Feng S, Wang M, Feng H, Geekiyanage S, Davidson AJ, Chen J. (2019) The Mitochondria-Targeted Metabolic Tubular Injury in Diabetic Kidney Disease. *Cell Physiol Biochem*. 2019;52(2):156-171.
82. Ahmad AA, Draves SO, Rosca M. (2021) Mitochondria in Diabetic Kidney Disease. *Cells*. 2021 Oct 29;10(11):2945
83. Flemming NB, Gallo LA, Forbes JM. (2018) Mitochondrial Dysfunction and Signaling in Diabetic Kidney Disease: Oxidative Stress and Beyond. *Semin Nephrol*. 2018 Mar;38(2):101-110.
84. Galvan DL, Mise K, Danesh FR. (2021) Mitochondrial Regulation of Diabetic Kidney Disease. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Sep 27;8:745279
85. Inoue T, Maekawa H, Inagi R. (2019) Organelle crosstalk in the kidney. *Kidney Int*. 2019 Jun;95(6):1318-1325
86. Wei PZ, Szeto CC. (2019) Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. *Clin Chim Acta*. 2019 Sep;496:108-116.
87. Gonzalez CD, Carro Negueruela MP, Nicora Santamarina C, Resnik R, Vaccaro MI. (2021) Autophagy Dysregulation in Diabetic Kidney Disease: From Pathophysiology to Pharmacological Interventions. *Cells*. 2021 Sep 21;10(9):2497
88. Kitada K, Nakano D, Ohsaki H, Hitomi H, Minamino T, Yatabe J, Felder RA, Mori H, Masaki T, Kobori H, Nishiyama A. (2014) Hyperglycemia causes cellular senescence via a SGLT2- and p21-dependent pathway in proximal tubules in the early stage of diabetic nephropathy. *J Diabetes Complications*. 2014 Sep-Oct;28(5):604-11
89. Wiley CD. (2020) Role of Senescent Renal Cells in Pathophysiology of Diabetic Kidney Disease. *Curr Diab Rep*. 2020 Jun 16;20(8):33.

90. Kwon SM, Hong SM, Lee YK, Min S, Yoon G. (2019) Metabolic features and regulation in cell senescence. *BMB Rep.* 2019 Jan;52(1):5-12.
91. Kwan B, Fuhrer T, Zhang J, Darshi M, Van Espen B, Montemayor D, de Boer IH, Dobre M, Hsu CY, Kelly TN, Raj DS, Rao PS, Saraf SL, Scialla J, Waikar SS, Sharma K, Natarajan L; CRIC Study Investigators. (2020) Metabolomic Markers of Kidney Function Decline in Patients With Diabetes: Evidence From the Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study. *Am J Kidney Dis.* 2020 Oct;76(4):511-520
92. Sabbatinelli J, Prattichizzo F, Olivieri F, Procopio AD, Rippo MR, Giuliani A. (2019) Where Metabolism Meets Senescence: Focus on Endothelial Cells. *Front Physiol.* 2019 Dec 18;10:1523.
93. Izundegui DG, Naylor M. (2022) Metabolomics of Type 1 and Type 2 Diabetes: Insights into Risk Prediction and Mechanisms. *Curr Diab Rep.* 2022 Feb;22(2):65-76.
94. German JB, Hammock BD, Watkins SM. (2005) Metabolomics: building on a century of biochemistry to guide human health. *Metabolomics.* 2005 Mar;1(1):3-9.
95. Maroli AS, Powers R. (2023) Closing the gap between in vivo and in vitro omics: using QA/QC to strengthen ex vivo NMR metabolomics. *NMR Biomed.* 2023 Apr;36(4):e4594.
96. Darshi M, Van Espen B, Sharma K. (2016) Metabolomics in Diabetic Kidney Disease: Unraveling the Biochemistry of a Silent Killer. *Am J Nephrol.* 2016;44(2):92-103.
97. Kalim S, Rhee EP. (2017) An overview of renal metabolomics. *Kidney Int.* 2017 Jan;91(1):61-69
98. Mu X, Yang M, Ling P, Wu A, Zhou H, Jiang J. (2022) Acylcarnitines: Can They Be Biomarkers of Diabetic Nephropathy? *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2022 Jan 29;15:247-256
99. Balint L, Socaciu C, Socaciu AI, Vlad A, Gadalean F, Bob F, Milas O, Cretu OM, Suteanu-Simulescu A, Glavan M, et al. (2023) Quantitative, Targeted Analysis of Gut Microbiota Derived Metabolites Provides Novel Biomarkers of Early Diabetic

- Kidney Disease in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Biomolecules*. 2023; 13(7):1086
100. Dubin RF, Rhee EP. (2020) Proteomics and Metabolomics in Kidney Disease, including Insights into Etiology, Treatment, and Prevention. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2020 Mar 6;15(3):404-411.
 101. Mutter S, Valo E, Aittomäki V, Nybo K, Raivonen L, Thorn LM, Forsblom C, Sandholm N, Würtz P, Groop PH. (2022) Urinary metabolite profiling and risk of progression of diabetic nephropathy in 2670 individuals with type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2022 Jan;65(1):140-149.
 102. Duangkumpha K, Jariyasopit N, Wanichthanarak K, Dhakal E, Wisanpitayakorn P, Thotsiri S, Sirivatanauksorn Y, Kitiyakara C, Sathirapongsasuti N, Khoomrung S. (2022) GC × GC-TOFMS metabolomics analysis identifies elevated levels of plasma sugars and sugar alcohols in diabetic mellitus patients with kidney failure. *J Biol Chem*. 2022 Oct;298(10):102445
 103. Roointan A, Gheisari Y, Hudkins KL, Gholaminejad A. (2021) Non-invasive metabolic biomarkers for early diagnosis of diabetic nephropathy: Meta-analysis of profiling metabolomics studies. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2021 Jul 22;31(8):2253-2272.
 104. Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. (2012) Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Mar 22;13(4):263-9
 105. Guan M, Xie L, Diao C, Wang N, Hu W, Zheng Y, Jin L, Yan Z, Gao H. (2013) Systemic perturbations of key metabolites in diabetic rats during the evolution of diabetes studied by urine metabonomics. *PLoS One*. 2013;8(4):e60409
 106. Wei T, Zhao L, Jia J, Xia H, Du Y, Lin Q, Lin X, Ye X, Yan Z, Gao H. (2015) Metabonomic analysis of potential biomarkers and drug targets involved in diabetic nephropathy mice. *Sci Rep*. 2015 Jul 7;5:11998
 107. Marshall DD, Lei S, Worley B, et al. (2014) Combining DI-ESI-MS and NMR datasets for metabolic profiling. *Metabolomics*. 2014;11(2):391-402.
 108. Huang K, Thomas N, Gooley PR, Armstrong CW. (2022) Systematic Review of NMR-Based Metabolomics Practices in Human Disease Research. *Metabolites*. 2022 Oct 12;12(10):963.

109. Niewczas MA, Sirich TL, Mathew AV, Skupien J, Mohny RP, Warram JH, Smiles A, Huang X, Walker W, Byun J, Karoly ED, Kensicki EM, Berry GT, Bonventre JV, Pennathur S, Meyer TW, Krolewski AS. (2014) Uremic solutes and risk of end-stage renal disease in type 2 diabetes: metabolomic study. *Kidney Int.* 2014 May;85(5):1214-24
110. Hirayama A, Nakashima E, Sugimoto M, Akiyama S, Sato W, Maruyama S, Matsuo S, Tomita M, Yuzawa Y, Soga T. (2012) Metabolic profiling reveals new serum biomarkers for differentiating diabetic nephropathy. *Anal Bioanal Chem.* 2012 Dec;404(10):3101-9
111. Sharma K, Karl B, Mathew AV, Gangoiti JA, Wassel CL, Saito R, Pu M, Sharma S, You YH, Wang L, Diamond-Stanic M, Lindenmeyer MT, Forsblom C, Wu W, Ix JH, Ideker T, Kopp JB, Nigam SK, Cohen CD, Groop PH, Barshop BA, Natarajan L, Nyhan WL, Naviaux RK. (2013) Metabolomics reveals signature of mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2013 Nov;24(11):1901-12
112. Li M, Wang X, Aa J, Qin W, Zha W, Ge Y, Liu L, Zheng T, Cao B, Shi J, Zhao C, Wang X, Yu X, Wang G, Liu Z. (2013) GC/TOFMS analysis of metabolites in serum and urine reveals metabolic perturbation of TCA cycle in db/db mice involved in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013 Jun 1;304(11):F1317-24.
113. Peng, L., Sun, B., Liu, Y., Huang, J., Chen, G., Zhang, X., Wang, G. (2021). Increased lipoxigenase and decreased cytochrome P450s metabolites correlated with the incidence of diabetic nephropathy: Potential role of eicosanoids from metabolomics in type 2 diabetic patients. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 48(5), 679-685.
114. Rhee EP. (2015) Metabolomics and renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2015 Jul;24(4):371-9
115. Pena MJ, Lambers Heerspink HJ, Hellemons ME, Friedrich T, Dallmann G, Lajer M, Bakker SJ, Gansevoort RT, Rossing P, de Zeeuw D, Roscioni SS. (2014) Urine and plasma metabolites predict the development of diabetic nephropathy in individuals with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2014 Sep;31(9):1138-47.

116. van der Kloet FM, Tempels FW, Ismail N, van der Heijden R, Kasper PT, Rojas-Cherto M, van Doorn R, Spijksma G, Koek M, van der Greef J, Mäkinen VP, Forsblom C, Holthöfer H, Groop PH, Reijmers TH, Hankemeier T. (2012) Discovery of early-stage biomarkers for diabetic kidney disease using ms-based metabolomics (FinnDiane study). *Metabolomics*. 2012 Feb;8(1):109-119
117. Korstanje R, Deutsch K, Bolanos-Palmieri P, Hanke N, Schroder P, Staggs L, Bräsen JH, Roberts IS, Sheehan S, Savage H, Haller H, Schiffer M. (2016) Loss of Kynurenine 3-Mono-oxygenase Causes Proteinuria. *J Am Soc Nephrol*. 2016 Nov;27(11):3271-3277.
118. Chen KH, Chen YL, Tang HY, Hung CC, Yen TH, Cheng ML, Shiao MS, Chen JK. (2018) Dietary Leucine Supplement Ameliorates Hepatic Steatosis and Diabetic Nephropathy in db/db Mice. *Int J Mol Sci*. 2018 Jun 30;19(7):1921.
119. Saleem T, Dahpy M, Ezzat G, Abdelrahman G, Abdel-Aziz E, Farghaly R. (2019) The Profile of Plasma Free Amino Acids in Type 2 Diabetes Mellitus with Insulin Resistance: Association with Microalbuminuria and Macroalbuminuria. *Appl Biochem Biotechnol*. 2019 Jul;188(3):854-867.
120. Barrios C, Zierer J, Würtz P, Haller T, Metspalu A, Gieger C, Thorand B, Meisinger C, Waldenberger M, Raitakari O, Lehtimäki T, Otero S, Rodríguez E, Pedro-Botet J, Kähönen M, Ala-Korpela M, Kastenmüller G, Spector TD, Pascual J, Menni C. (2018) Circulating metabolic biomarkers of renal function in diabetic and non-diabetic populations. *Sci Rep*. 2018 Oct 15;8(1):15249
121. Bergman HM, Lindfors L, Palm F, Kihlberg J, Lanekoff I. (2019) Metabolite aberrations in early diabetes detected in rat kidney using mass spectrometry imaging. *Anal Bioanal Chem*. 2019 May;411(13):2809-2816.
122. Kikuchi K, Saigusa D, Kanemitsu Y, Matsumoto Y, Thanai P, Suzuki N, Mise K, Yamaguchi H, Nakamura T, Asaji K, Mukawa C, Tsukamoto H, Sato T, Oikawa Y, Iwasaki T, Oe Y, Tsukimi T, Fukuda NN, Ho HJ, Nanto-Hara F, Ogura J, Saito R, Nagao S, Ohsaki Y, Shimada S, Suzuki T, Toyohara T, Mishima E, Shima H, Akiyama Y, Akiyama Y, Ichijo M, Matsushashi T, Matsuo A, Ogata Y, Yang CC, Suzuki C, Breeggemann MC, Heymann J, Shimizu M, Ogawa S, Takahashi N, Suzuki T, Owada Y, Kure S, Mano N, Soga T, Wada T, Kopp JB, Fukuda S, Hozawa

- A, Yamamoto M, Ito S, Wada J, Tomioka Y, Abe T. (2019) Gut microbiome-derived phenyl sulfate contributes to albuminuria in diabetic kidney disease. *Nat Commun.* 2019 Apr 23;10(1):1835
123. Xu T, Xu X, Zhang L, Zhang K, Wei Q, Zhu L, Yu Y, Xiao L, Lin L, Qian W, Wang J, Ke M, An X, Liu S. (2021) Lipidomics Reveals Serum Specific Lipid Alterations in Diabetic Nephropathy. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021 Dec 9;12:781417.
 124. Valdés A, Lucio-Cazaña FJ, Castro-Puyana M, García-Pastor C, Fiehn O, Marina ML. (2021) Comprehensive metabolomic study of the response of HK-2 cells to hyperglycemic hypoxic diabetic-like milieu. *Sci Rep.* 2021 Mar 3;11(1):5058
 125. Abdelsattar S, Kasemy ZA, Elsayed M, Elrahem TA, Zewain SK. (2021) Targeted metabolomics as a tool for the diagnosis of kidney disease in Type II diabetes mellitus. *Br J Biomed Sci.* 2021 Oct;78(4):184-190.
 126. Collins KS, Eadon MT, Cheng YH, Barwinska D, Melo Ferreira R, McCarthy TW, Janosevic D, Syed F, Maier B, El-Achkar TM, Kelly KJ, Phillips CL, Hato T, Sutton TA, Dagher PC. (2022) Alterations in Protein Translation and Carboxylic Acid Catabolic Processes in Diabetic Kidney Disease. *Cells.* 2022 Mar 30;11(7):1166.
 127. Wu IW, Tsai TH, Lo CJ, Chou YJ, Yeh CH, Chan YH, Chen JH, Hsu PW, Pan HC, Hsu HJ, Chen CY, Lee CC, Shyu YC, Lin CL, Cheng ML, Lai CC, Sytwu HK, Tsai TF. (2022) Discovering a trans-omics biomarker signature that predisposes high risk diabetic patients to diabetic kidney disease. *NPJ Digit Med.* 2022 Nov 2;5(1):166.
 128. Jung CY, Yoo TH. (2022) Novel biomarkers for diabetic kidney disease. *Kidney Res Clin Pract.* 2022 Sep;41(Suppl 2):S46-S62
 129. Wang P, Guo R, Bai X, Cui W, Zhang Y, Li H, Shang J, Zhao Z. (2022) Sacubitril/Valsartan contributes to improving the diabetic kidney disease and regulating the gut microbiota in mice. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022 Dec 16;13:1034818

130. Shang J, Cui W, Guo R, Zhang Y, Wang P, Yu W, Zheng X, Wang T, Dong Y, Zhao J, Ding S, Xiao J, Ren Z, Zhao Z. (2022) The harmful intestinal microbial community accumulates during DKD exacerbation and microbiome-metabolome combined validation in a mouse model. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Dec 19;13:964389.
131. Zhu H, Bai M, Xie X, Wang J, Weng C, Dai H, Chen J, Han F, Lin W. (2022) Impaired Amino Acid Metabolism and Its Correlation with Diabetic Kidney Disease Progression in Type 2 Diabetes Mellitus. *Nutrients*. 2022 Aug 15;14(16):3345
132. Cao P, Huang B, Hong M, Jiang Y, Cao R, Chi C, Cao Y, Li S. (2022) Association of amino acids related to urea cycle with risk of diabetic nephropathy in two independent cross-sectional studies of Chinese adults. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Sep 8;13:983747
133. Rong G, Weng W, Huang J, Chen Y, Yu X, Yuan R, Gu X, Wu X, Cai Y, Han P, Shao M, Sun H, Ge N. (2022) Artemether Alleviates Diabetic Kidney Disease by Modulating Amino Acid Metabolism. *Biomed Res Int*. 2022 May 11;2022:7339611.
134. Lin HT, Cheng ML, Lo CJ, Lin G, Liu FC. (2022) Metabolomic Signature of Diabetic Kidney Disease in Cerebrospinal Fluid and Plasma of Patients with Type 2 Diabetes Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Diagnostics (Basel)*. 2022 Oct 29;12(11):2626.
135. Jiang X, Liu X, Qu X, Zhu P, Wo F, Xu X, Jin J, He Q, Wu J. (2023) Integration of metabolomics and peptidomics reveals distinct molecular landscape of human diabetic kidney disease. *Theranostics*. 2023 May 21;13(10):3188-3203
136. Jin Q, Ma RCW. (2021) Metabolomics in Diabetes and Diabetic Complications: Insights from Epidemiological Studies. *Cells*. 2021 Oct 21;10(11):2832.
137. Ikeda H. (2022) The Effect of Mild Renal Dysfunction on the Assessment of Plasma Amino Acid Concentration and Insulin Resistance in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res*. 2022 Jun 13;2022:2048300

138. Kwan B, Fuhrer T, Montemayor D, Fink JC, He J, Hsu CY, Messer K, Nelson RG, Pu M, Ricardo AC, Rincon-Choles H, Shah VO, Ye H, Zhang J, Sharma K, Natarajan L. (2023) A generalized covariate-adjusted top-scoring pair algorithm with applications to diabetic kidney disease stage classification in the Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study. *BMC Bioinformatics*. 2023 Feb 20;24(1):57.
139. Kim JE, Nam H, Park JI, Cho H, Lee J, Kim HE, Kim DK, Joo KW, Kim YS, Kim BS, Park S, Lee H. (2023) Gut Microbial Genes and Metabolism for Methionine and Branched-Chain Amino Acids in Diabetic Nephropathy. *Microbiol Spectr*. 2023 Mar 6;11(2):e0234422
140. Tomofuji Y, Suzuki K, Kishikawa T, Shojima N, Hosoe J, Inagaki K, Matsubayashi S, Ishihara H, Watada H, Ishigaki Y; BioBank Japan Project; Inohara H, Murakami Y, Matsuda K, Okada Y, Yamauchi T, Kadowaki T. (2023) Identification of serum metabolome signatures associated with retinal and renal complications of type 2 diabetes. *Commun Med (Lond)*. 2023 Jan 9;3(1):5
141. Kogot-Levin A, Riahi Y, Abramovich I, Mosenzon O, Agranovich B, Kadosh L, Ben-Haroush Schyr R, Kleiman D, Hinden L, Cerasi E, Ben-Zvi D, Bernal-Mizrachi E, Tam J, Gottlieb E, Leibowitz G. (2023) Mapping the metabolic reprogramming induced by sodium-glucose cotransporter 2 inhibition. *JCI Insight*. 2023 Apr 10;8(7):e164296
142. Liu L, Xu J, Zhang Z, Ren D, Wu Y, Wang D, Zhang Y, Zhao S, Chen Q, Wang T. (2022) Metabolic Homeostasis of Amino Acids and Diabetic Kidney Disease. *Nutrients*. 2022 Dec 30;15(1):184.
143. Tofte N, Suvitaival T, Trost K, Mattila IM, Theilade S, Winther SA, Ahluwalia TS, Frimodt-Moller M, Legido-Quigley C, Rossing P (2019) Metabolomic assessment reveals alteration in polyols and branched amino acids associated with present and future renal impairment in a discovery cohort of 637 persons with type 1 diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019 10:818