



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Η Επίδραση της Εμπαγλιφλοζίνης στο Στρες του
Ενδοπλασματικού Δικτύου στη Λιπώδη Διήθηση του
Ήπατος σε Ζωικό Μοντέλο Μυός**

**ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΠΑΠΟΥΤΣΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2020

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Η Επίδραση της Εμπαγλιφλοζίνης στο Στρες του Ενδοπλασματικού Δικτύου σε Ζωικό Μοντέλο Μυός

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΠΑΠΟΥΤΣΗ

A.M.: 71704

- **ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:** Λιανίδου Ευρύκλεια, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Κασσή Ευανθία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής, ΕΚΠΑ
- Λιανίδου Ευρύκλεια, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ
- Σκορίλας Ανδρέας, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ
06/03/2020

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση λιπιδίων στο ήπαρ και εμφανίζεται όλο και περισσότερο στον πληθυσμό λόγω υιοθέτησης κακών διατροφικών συνηθειών. Συνήθως συνυπάρχει σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 ή/και με μεταβολικό σύνδρομο. Οι SGLT2 αναστολείς αποτελούν μια κατηγορία αντιδιαβητικών φαρμάκων που έχει φανεί ότι μπορούν να επιδράσουν θετικά στη λιπώδη διήθηση.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σύγκριση της επίδρασης μεταξύ της μακροχρόνιας και της βραχυχρόνιας χορήγησης SGLT2 αναστολέα σε παραμέτρους που σχετίζονται με τη μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος, χρησιμοποιώντας ζωικό μοντέλο αθηρωμάτωσης που αναπτύσσει σιτιογενή λιπώδη διήθηση. Ειδικότερα, μελετήθηκε η επίδραση της εμπαγλιφλοζίνης στο στρες του ενδοπλασματικού δικτύου που επάγεται από αθηρογόνο δίαιτα στο ήπαρ ApoE (-/-) μυών. Προσδιορίστηκαν βιοχημικοί δείκτες στον ορό των μυών στους οποίους χορηγήθηκε καθημερινά από του στόματος εμπαγλιφλοζίνη για 5 και 10 εβδομάδες σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου όπου χορηγήθηκε μόνο ο διαλύτης του φαρμάκου για τα ίδια χρονικά διαστήματα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας και ολικής χοληστερόλης μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά και στις δύο ομάδες παρέμβασης, όμως δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα LDL χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου. Στη συνέχεια, με ποσοτική PCR μελετήθηκε η έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στα σηματοδοτικά μονοπάτια του ER stress στο ήπαρ των APOE (-/-) μυών και συγκεκριμένα των eIF2α, ATF4, GRP78, CHOP, GRP94, Xbp1 και IRE1. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western, με την οποία μελετήσαμε την πρωτεϊνική έκφραση των eIF2α, p-eIF2α και CHOP. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η βραχυχρόνια χορήγηση της εμπαγλιφλοζίνης μείωσε στατιστικά σημαντικά τη γονιδιακή έκφραση των eIF2α, ATF4, GRP78, CHOP, GRP94, Xbp1 και IRE1 και την πρωτεϊνική έκφραση των CHOP, eIF2α και p-eIF2α ($p \leq 0.05$). Αντίθετα, η μακροχρόνια χορήγησή της αύξησε στατιστικά

σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης mRNA των GRP78, IRE1 και eIF2α ($p \leq 0.05$), ενώ αυξήθηκαν και τα επίπεδα mRNA των Xbp1, GRP94, CHOP και ATF4 αλλά όχι με στατιστική σημαντικότητα. Τα αποτελέσματα της Western Blot έδειξαν αύξηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των eIF2α, p-eIF2α και CHOP αλλά όχι με στατιστική σημαντικότητα. Η ιστομορφομετρία επιβεβαίωσε τα ευρήματά μας, καθώς η χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 10 εβδομάδες προκάλεσε σημαντική συσσώρευση λιπιδίων στο ήπαρ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ η χορήγησή της για 5 εβδομάδες βελτίωσε την ηπατική στεάτωση.

Συμπερασματικά, η μελέτη μας έδειξε ότι η μακροχρόνια χορήγηση της εμπαγλιφλοζίνης σε μοντέλο αθηρωμάτωσης μυός ApoE (-/-) προωθεί την NAFLD και επάγει τη συσσώρευση λιπιδίων στο ήπαρ, τουλάχιστον εν μέρει μέσω επαγωγής της έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στα σηματοδοτικά μονοπάτια του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου. Εν αντιθέσει με τη βραχυπρόθεσμη χορήγηση της εμπαγλιφλοζίνης στο ίδιο ζωικό μοντέλο, η οποία καταστέλλει τη λιπώδη διήθηση και το ER stress.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Βιολογική Χημεία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος, αναστολείς του συµµεταφορέα νατρίου/γλυκόζης 2, εμπαγλιφλοζίνη, λιπώδης διήθηση, στρες του ενδοπλασματικού δικτύου

ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease is characterized by the accumulation of lipids in the liver and it is increasingly occurring in the population due to the adoption of bad eating habits. It is usually present in patients with type 2 diabetes mellitus and/or metabolic syndrome. SGLT2 inhibitors are a class of antidiabetic drugs that have been shown to have a positive effect on fatty infiltration.

In this study, we aimed to compare the effect of long-term and short-term administration of an SGLT2 inhibitor on parameters associated with non-alcoholic fatty liver disease. In particular, we investigated the effect of empagliflozin on diet-induced endoplasmic reticulum stress in the liver of ApoE (-/-) mice. Biochemical markers were measured at the onset and at the end of the interventions. The mRNA levels of genes that are involved in ER stress including eIF2 α , ATF4, GRP78, CHOP, GRP94, Xbp1, IRE1 were measured by qPCR and the protein levels of eIF2 α , p-eIF2 α and CHOP by Western Blot. Liver sections were stained with H&E and histomorphometric analysis was performed. For both interventions (short-term and long-term), the results showed that there was a statistically significant reduction in fasting glucose and total cholesterol levels, but no significant changes were observed in LDL cholesterol and triglyceride levels compared to the control group. Histomorphometry indicated that long-term administration of empagliflozin significantly induced lipid accumulation and inflammation in liver, compared to Control group, while short-term administration reduced the concentration of hepatic lipids. The results from qPCR and Western Blot revealed that short-term administration of empagliflozin reduced gene expression of eIF2 α , ATF4, GRP78, CHOP, GRP94, Xbp1 and IRE1 and protein expression of CHOP, eIF2 α and p-eIF2 α respectively ($p \leq 0.05$). In contrast, long-term administration significantly increased the levels of mRNA expression of GRP78, IRE1 and eIF2 α ($p \leq 0.05$), while mRNA levels of Xbp1, GRP94, CHOP and ATF4 were also increased but not statistically significant. Western Blot results showed an increase in protein expression of eIF2 α , p-eIF2 α and CHOP with no statistical significance.

So, our study revealed that long-term administration of empagliflozin in ApoE (-/-) atherosclerosis mouse model promotes NAFLD and induces lipid accumulation and inflammation in the liver, at least partially via inducing the expression of genes involved in ER stress. In contrast, short-term administration of empagliflozin in the same animal model suppresses fatty infiltration and ER stress.

SUBJECT AREA: Biochemistry

KEYWORDS: non-alcoholic fatty liver disease, sodium/glucose cotransporter 2 inhibitors, empagliflozin, fatty infiltration, endoplasmic reticulum stress

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	20
1. ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΛΙΠΩΔΗΣ ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ (NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE - NAFLD).....	21
1.1 Γενικά – Επιδημιολογία.....	21
1.2 Παράγοντες κινδύνου.....	23
1.3 Παθοφυσιολογία της NAFLD.....	24
1.3.1 Μεταβολισμός λιπιδίων	24
1.3.2 Αντίσταση στην ινσουλίνη	26
1.3.3 Η «υπόθεση πολλαπλών χτυπημάτων»	27
2. ΣΤΡΕΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ (ER STRESS)	30
2.1 Γενικά – Εισαγωγή.....	30
2.2 Σηματοδοτικά μονοπάτια στην απόκριση του στρες του ΕΔ.....	31
2.2.1 Απόκριση σε μη διαμορφωμένες πρωτεΐνες (UPR).....	31
2.2.2 Αποικοδόμηση πρωτεϊνών μέσω του ΕΔ (ERAD)	34
2.2.3 Αυτοφαγία	35
2.2.4 Απόπτωση	36
2.3 Στρες του ΕΔ και NAFLD.....	39
3. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΩΝ SGLT2 ΣΥΜΜΕΤΑΦΟΡΕΩΝ	41
3.1 Λειτουργία των SGLT2 συμμεταφορέων.....	41
3.2 Ανάπτυξη των SGLT2 αναστολέων.....	43
3.3 Μηχανισμός δράσης των SGLT2 αναστολέων στους νεφρούς.....	44
3.4 Κύριοι SGLT2 αναστολείς.....	46
Καναγλιφλοζίνη (Canagliflozin)	46
Νταπαγλιφλοζίνη (Dapagliflozin).....	47
Ιπραγλιφλοζίνη (Ipragliflozin)	48

Εμπαγλιφλοζίνη (Empagliflozin)	49
3.5 Εμπαγλιφλοζίνη και NAFLD.....	50
4. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	51
5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	54
5.1 Δείγματα.....	54
5.1.1 Πειραματόζωα	54
5.1.2 Απομόνωση ορού από ολικό αίμα μυών	55
5.1.3 Μονιμοποίηση ιστού.....	55
5.2 Πειραματική Πορεία.....	56
5.2.1 Απομόνωση ολικού RNA από ιστό.....	56
5.2.2 RT-PCR (Reverse Transcription – PCR).....	58
5.2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time Polymerase Chain Reaction, qPCR).....	60
5.2.4 Απομόνωση πρωτεϊνών από ιστό	66
5.2.5 Χρωματομετρική μέθοδος προσδιορισμού πρωτεϊνών κατά Bradford	66
5.2.6 Διαχωρισμός πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση πηκτής δωδεκυλθειϊκού πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).....	68
5.2.7. Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot)	70
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	74
6.1 Προσδιορισμός βιοχημικών παραμέτρων στον ορό των τεσσάρων ομάδων μυών.....	73
6.2 Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στα σηματοδοτικά μονοπάτια του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου στο ήπαρ.....	81
6.3 Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών που συμμετέχουν στα σηματοδοτικά μονοπάτια του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου στο ήπαρ.....	90

6.4 Επίδραση της χορήγησης εμπαγλιφλοζίνης στη λιπώδη διήθηση του ήπατος- Ιστομορφομετρική ανάλυση και NAS (NAFLD Activity Score).....	95
7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	102
8. ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	110

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 5.1: Πειραματικός σχεδιασμός	55
Σχήμα 5.2: Διαδοχικά βήματα απομόνωσης ολικού RNA από ιστό	58
Σχήμα 5.3: Τα στάδια της αντίδρασης PCR	60
Σχήμα 5.4: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα στον θερμοκυκλοποιητή της BioRad.....	64
Σχήμα 6.1: Επίπεδα γλυκόζης νηστείας στον ορό στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης 10 εβδομάδων με εμπαγλιφλοζίνη και αθηρογόνο δίαιτα στις δύο ομάδες μυών (Control,n=9- Empa,n=9)(* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$)	74
Σχήμα 6.2: Μεταβολή στα επίπεδα γλυκόζης νηστείας στον ορό από την αρχική τιμή στις δύο ομάδες μυών (** $p \leq 0.001$)	75
Σχήμα 6.3: Επίπεδα ολικής χοληστερόλης στον ορό των δύο ομάδων μυών στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης (* $p \leq 0.05$).....	75
Σχήμα 6.4: Επίπεδα γλυκόζης νηστείας στον ορό στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης 5 εβδομάδων με εμπαγλιφλοζίνη και αθηρογόνο δίαιτα στις δύο ομάδες μυών (Control,n=8- Empa,n=8)(** $p \leq 0.01$).....	74
Σχήμα 6.5: Μεταβολή στα επίπεδα γλυκόζης νηστείας στον ορό από την αρχική τιμή στις δύο ομάδες μυών (** $p \leq 0.001$).....	75
Σχήμα 6.6: Επίπεδα ολικής χοληστερόλης στον ορό των δύο ομάδων μυών στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης (** $p \leq 0.01$).....	75
Σχήμα 6.7: Καμπύλη ενίσχυσης για το γονίδιο αναφοράς 18S	78
Σχήμα 6.8: Καμπύλη τήξης για το γονίδιο αναφοράς 18S.....	78
Σχήμα 6.9: Καμπύλη ενίσχυσης για το γονίδιο ATF4	79
Σχήμα 6.10: Καμπύλη τήξης για το γονίδιο ATF4	79
Σχήμα 6.11: Καμπύλη ενίσχυσης για το γονίδιο αναφοράς 18S	80
Σχήμα 6.12: Καμπύλη τήξης για το γονίδιο αναφοράς 18S.....	80
Σχήμα 6.13: Καμπύλη ενίσχυσης για το γονίδιο eIF2α	80
Σχήμα 6.14: Καμπύλη τήξης για το γονίδιο eIF2α.....	80

Σχήμα 6.15: Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) του GRP78 στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 10 εβδομάδες (Empa,n=9) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Control,n=9)	81
Σχήμα 6.16: Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) του IRE1 στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 10 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control).....	82
Σχήμα 6.17: Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) του eIF2α στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 10 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control).....	82
Σχήμα 6.18: Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) του Xbp1 στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 10 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control).....	83
Σχήμα 6.19: Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) του GRP94 στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 10 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control).....	83
Σχήμα 6.20: Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) του CHOP στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 10 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control).....	85
Σχήμα 6.21: Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) του ATF4 στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 10 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control).....	85
Σχήμα 6.22: Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης (mRNA)του eIF2α στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 5 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control).....	86
Σχήμα 6.23: Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) του ATF4 στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 5 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control).....	86
Σχήμα 6.24: Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) του GRP78 στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 5 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control).....	87

Σχήμα 6.25: Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) του CHOP στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 5 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control).....	87
Σχήμα 6.26: Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) του GRP94 στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 5 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control).....	88
Σχήμα 6.27: Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) του IRE1 στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 5 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control).....	88
Σχήμα 6.28: Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) του Xbp1 στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 5 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control).....	89
Σχήμα 6.29: Ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του CHOP στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 10 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control) (p=0.52)	90
Σχήμα 6.30: Ποσοτικοποίηση της αναλογίας p-eIF2α/eIF2α στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 10 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control) (p=0.9)	91
Σχήμα 6.31: Ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του CHOP στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 5 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control).....	93
Σχήμα 6.32: Ποσοτικοποίηση της αναλογίας p-eIF2α/eIF2α στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 5 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control) (p=0.04).....	94
Σχήμα 6.33: Η χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης αύξησε το NA Score στο ήπαρ μετά τις 10 εβδομάδες παρέμβασης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.....	98
Σχήμα 6.34: Η χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης μείωσε το NA Score στο ήπαρ μετά τις 5 εβδομάδες παρέμβασης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.....	100

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1 Το φάσμα της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος.....	23
Εικόνα 1.2 Δημιουργία ηπατικής στεάτωσης μέσω διαταραχής του ομαλού μεταβολισμού λιπιδίων.....	25
Εικόνα 1.3 Η «υπόθεση των δύο χτυπημάτων».....	28
Εικόνα 1.4 Η «υπόθεση πολλαπλών χτυπημάτων» για την ανάπτυξη της NAFLD.....	29
Εικόνα 2.1 Αδρό και λείο ενδοπλασματικό δίκτυο	30
Εικόνα 2.2 Κυτταρική επιβίωση μέσω του UPR	34
Εικόνα 2.3 Αποικοδόμηση των μη ορθά πτυχωμένων πρωτεϊνών μέσω του ERAD	35
Εικόνα 2.4 Τα στάδια της αυτοφαγίας	36
Εικόνα 2.5 Απόπτωση μέσω του UPR.....	38
Εικόνα 2.6 Η σύνδεση του ER stress με την ανάπτυξη και εξέλιξη της NAFLD	40
Εικόνα 3.1 Η λειτουργία των SGLT2 συμμεταφορέων γλυκόζης/νατρίου στους νεφρούς	43
Εικόνα 3.2 Η χημική δομή της φλοριζίνης	44
Εικόνα 3.3 Ο μηχανισμός δράσης των SGLT2 αναστολέων	45
Εικόνα 3.4 Η χημική δομή της καναγλιφλοζίνης.....	47
Εικόνα 3.5 Η χημική δομή της νταπαγλιφοζίνης	48
Εικόνα 3.6 Η χημική δομή της ιπραγλιφλοζίνης	48
Εικόνα 3.7 Η χημική δομή της εμπαγλιφλοζίνης	50
Εικόνα 3.8 Υποθετικό μοντέλο για τη δράση της εμπαγλιφλοζίνης στη λιπώδη διήθηση	50
Εικόνα 5.1 Θερμοκυκλοποιητής της BioRad για qPCR.....	64
Εικόνα 6.1 Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής έκφρασης της ακτίνης στο ήπαρ στην ομάδα που χορηγήθηκε εμπαγλιφλοζίνη για 10 εβδομάδες και στην ομάδα ελέγχου (control).....	89

Εικόνα 6.2 Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής έκφρασης του CHOP στο ήπαρ στην ομάδα που χορηγήθηκε εμπαγλιφλοζίνη για 10 εβδομάδες και στην ομάδα ελέγχου (control).....	89
Εικόνα 6.3 Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής έκφρασης του eIF2α στο ήπαρ στην ομάδα που χορηγήθηκε εμπαγλιφλοζίνη για 10 εβδομάδες και στην ομάδα ελέγχου (control).....	90
Εικόνα 6.4 Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής έκφρασης του p-eIF2α στο ήπαρ στην ομάδα που χορηγήθηκε εμπαγλιφλοζίνη για 10 εβδομάδες και στην ομάδα ελέγχου (control).....	90
Εικόνα 6.5 Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής έκφρασης της ακτίνης στο ήπαρ στην ομάδα που χορηγήθηκε εμπαγλιφλοζίνη για 5 εβδομάδες και στην ομάδα ελέγχου (control).....	92
Εικόνα 6.6 Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής έκφρασης του CHOP στο ήπαρ στην ομάδα που χορηγήθηκε εμπαγλιφλοζίνη για 5 εβδομάδες και στην ομάδα ελέγχου (control).....	92
Εικόνα 6.7 Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής έκφρασης του eIF2α στο ήπαρ στην ομάδα που χορηγήθηκε εμπαγλιφλοζίνη για 5 εβδομάδες και στην ομάδα ελέγχου (control)...	93
Εικόνα 6.8 Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής έκφρασης του p-eIF2α στο ήπαρ στην ομάδα που χορηγήθηκε εμπαγλιφλοζίνη για 5 εβδομάδες και στην ομάδα ελέγχου (control).....	93
Εικόνα 6.9 Τομή ήπατος της ομάδας ελέγχου. Μπλε βέλος: Ηπατοκύτταρο, Πράσινο βέλος: Ηπατικό κολποειδές, Μαύρο βέλος: Ενδοθηλιακό κύτταρο του ηπατικού κολποειδούς με πεπλατυσμένο πυρήνα και λιγότερο κυτταρόπλασμα από τα κύτταρα Kupffer, Κίτρινο βέλος: Κύτταρο Kupffer (Ιστικό μακροφάγο του ήπατος εντός του υπενδοθηλιακού χώρου του Disse). Χρώση εωσίνης-αιματοξυλίνης.....	95
Εικόνα 6.10 Τομή ήπατος της ομάδας Empa μετά την παρέμβαση με εμπαγλιφλοζίνη για 10 εβδομάδες. Κίτρινο: Υπερπλασία των ιστικών κυττάρων Kupffer, Κόκκινο: Μικροφουσαλιδώδης λίπωση, Πορτοκαλί: Ηπατοκυτταρική εκφύλιση με δημιουργία αεροσφαιροειδών κυττάρων (ballooning cells) (Διογκωμένα ηπατοκύτταρα που	

υποδηλώνουν	στεατοηπατίτιδα).	Χρώση	εωσίνης-αιματοξυλίνης.....	96
Εικόνα 6.11 Αριστερά: Τομή ήπατος της ομάδας ελέγχου. Δεξιά: Τομή ήπατος της ομάδας όπου χορηγήθηκε εμπαγλιφλοζίνη με παρουσία μικροφουσαλιδώδους λίπωσης και αεροσφαιροειδών κυττάρων. Χρώση εωσίνης-αιματοξυλίνης.....				
				96
Εικόνα 6.12 Τομή ήπατος της ομάδας ελέγχου. Κίτρινο: Υπερπλασία των ιστικών κυττάρων Kurpfer, Κόκκινο: Μικροφουσαλιδώδης λίπωση, Πορτοκαλί: Ηπατοκυτταρική εκφύλιση με δημιουργία αεροσφαιροειδών κυττάρων (ballooning cells). Χρώση εωσίνης-αιματοξυλίνης.....				
				98
Εικόνα 6.13 Τομή ήπατος της ομάδας Emra μετά τη χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 5 εβδομάδες. Μπλε βέλος: Ηπατοκύτταρο, Πράσινο βέλος: Ηπατικό κολποειδές, Μαύρο βέλος: Ενδοθηλιακό κύτταρο του ηπατικού κολποειδούς με πεπλατυσμένο πυρήνα και λιγότερο κυτταρόπλασμα από τα κύτταρα Kurpfer, Κίτρινο βέλος: Κύτταρο Kurpfer (Ιστικό μακροφάγο του ήπατος εντός του υπενδοθηλιακού χώρου του Disse). Χρώση εωσίνης-αιματοξυλίνης.....				
				99
Εικόνα 6.14 Αριστερά: Τομή ήπατος της ομάδας ελέγχου με παρουσία μικροφουσαλιδώδους λίπωσης και αεροσφαιροειδών κυττάρων. Δεξιά: Τομή ήπατος της ομάδας όπου χορηγήθηκε εμπαγλιφλοζίνη για 5 εβδομάδες. Χρώση εωσίνης-αιματοξυλίνης.....				
				99

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 5.1 Μίγμα αντιδραστηρίων για RT-PCR	58
Πίνακας 5.2: Μίγμα αντιδραστηρίων qPCR.....	63
Πίνακας 5.3: Αλληλουχίες εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την qPCR	64
Πίνακας 5.4: Σύσταση των πηκτών διαχωρισμού και επιστοίβαξης στην SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση.....	70

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Ευανθίας Κασσή.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, πρωτίστως, την επιβλέπουσα Αν. Καθηγήτρια Ευανθία Κασσή τόσο για την ανάθεση ενός τόσο ενδιαφέροντος θέματος όσο και για τη βοήθεια που μου προσέφερε καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής. Επίσης την ευχαριστώ ιδιαίτερα για την εμπιστοσύνη της στο πρόσωπό μου, καθώς και για το συνεχές ενδιαφέρον, την καθοδήγηση και στήριξή της μέχρι το τέλος της διπλωματικής.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την μεταδιδάκτορα Narges Nasiri για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση στην εκπαίδευσή μου στις αναλυτικές τεχνικές του εργαστηρίου και για τη συμπαράστασή της καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής. Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλα τα κορίτσια του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας, για τη στήριξη και τη βοήθειά τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την ενθάρρυνση, την ηθική συμπαράσταση, την υπομονή και την κατανόηση που έδειξαν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

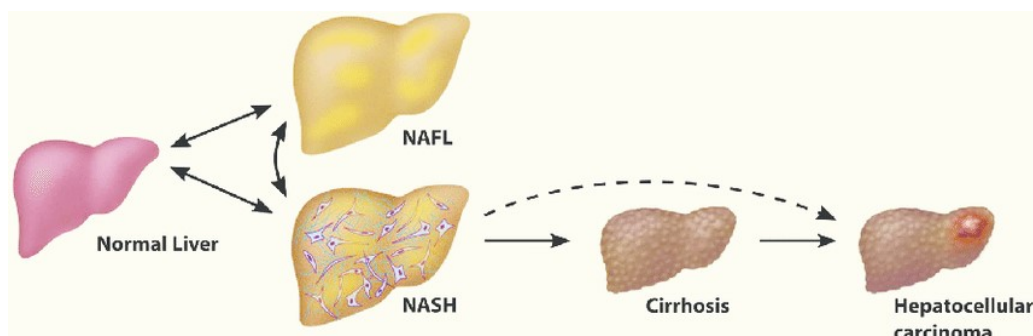
ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΛΙΠΩΔΗΣ ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ (NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE - NAFLD)

1.1 Γενικά – Επιδημιολογία

Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος είναι μία από τις συχνότερες παθήσεις που αφορούν το ήπαρ, παγκοσμίως. Είναι πολύ διαδεδομένη στο γενικό πληθυσμό και η συχνότητα εμφάνισής της είναι περίπου 15-25%. Συγκεκριμένα, στις Δυτικές χώρες και στην Ευρώπη επηρεάζει σχεδόν το 20-30%, ενώ στην Ασία μόνο το 5-18% [1,2]. Συναντάται ιδιαίτερα σε άτομα με υψηλό ποσοστό παχυσαρκίας, διαβήτη τύπου 2 (Type 2 Diabetes Mellitus – T2DM) καθώς και μεταβολικό σύνδρομο [3]. Συνήθως, η διάγνωση των ασθενών αυτών γίνεται από περιστασιακά αυξημένα ηπατικά ένζυμα ή μελέτες απεικόνισης που υποδηλώνουν ηπατική στεάτωση. Τα επίπεδα ηπατικών ενζύμων είναι τις περισσότερες φορές αντιπροσωπευτικά της λειτουργίας του ήπατος. Κάποια από τα πιο σημαντικά ένζυμα είναι η τρανσαμινάση της αλανίνης (ALT, SGPT), η ασπαρτική τρανσαμινάση (AST, SGOT), η αλκαλική φωσφατάση (ALP), η γ-γλουταμυλ τρανσφεράση (GGT) και η γαλακτική αφυδρογονάση (LDH). Σημαντικό για τη διάγνωση, επίσης, είναι να αποκλειστεί ως αίτιο η κατανάλωση αλκοόλ, η χρήση συγκεκριμένων φαρμάκων, όπως η ταμοξιφαίνη ή η μόλυνση από ιούς, όπως ο HIV [4].

Η νόσος αυτή περιλαμβάνει ένα φάσμα καταστροφής του ήπατος, το οποίο κυμαίνεται από απλή στεάτωση (Non-Alcoholic Fatty Liver - NAFL) ως την εμφάνιση μη αλκοολικής στεατοηπατίτιδας (Non-Alcoholic Steatohepatitis - NASH). Ξεκινά με τη συσσώρευση λιπιδίων, και συγκεκριμένα τριγλυκεριδίων, στα ηπατοκύτταρα με επακόλουθο σχηματισμό ενδοκυτταρικών λιποσταγονιδίων, που οδηγούν στη δημιουργία στεάτωσης. Στη συνέχεια, εμφανίζεται ηπατομεγαλία και σε περίπου 20-25% των περιπτώσεων εξελίσσεται σε NASH, μία μη αναστρέψιμη κατάσταση, που χαρακτηρίζεται από φλεγμονή και καταστροφή των ηπατοκυττάρων. Έπειτα, η NASH ενδέχεται να εξελιχθεί σε ίνωση, κίρρωση και τελικά σε ηπατική ανεπάρκεια ή ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα [1,5]. Μια παλαιότερη έρευνα έχει δείξει ότι η

κίρρωση, που προκαλείται από NAFLD, είναι η τρίτη ένδειξη για μεταμόσχευση ήπατος στις Ηνωμένες Πολιτείες και αναμένεται να αποτελέσει την πρώτη ένδειξη τα επόμενα χρόνια [3].



Εικόνα 1.1 Το φάσμα της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος [6]

1.2 Παράγοντες κινδύνου

Από παλαιότερα έχει αναγνωρισθεί ότι από τους πιο σημαντικούς παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της NAFLD είναι η παχυσαρκία, και κυρίως η κεντρικού τύπου. Σε υπέρβαρα άτομα έχει δείχθεί ότι προκαλείται στεάτωση τουλάχιστον 2 φορές πιο συχνά σε σχέση με φυσιολογικού βάρους άτομα. Στην παθολογική παχυσαρκία, σχεδόν όλοι οι ασθενείς παρουσιάζουν στεάτωση, ενώ σε περισσότερο από το ένα τρίτο υπάρχει εξέλιξη σε NASH. Εκτός από την κοιλιακή παχυσαρκία, όμως, η NAFLD συνδέεται και με την παρουσία δυσλιπιδαιμίας, αρτηριακής υπέρτασης, ινσουλινοαντίστασης και διαβήτη τύπου 2 (Type 2 Diabetes Mellitus – T2DM), τα οποία αποτελούν χαρακτηριστικά του μεταβολικού συνδρόμου. Τουλάχιστον το ένα τρίτο των ασθενών με NAFLD έχουν μεταβολικό σύνδρομο, ενώ το 80% τουλάχιστον ένα από τα χαρακτηριστικά του. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο επιπολασμός της NAFLD σχετίζεται θετικά τόσο με τον δείκτη μάζας σώματος (BMI) και την περίμετρο της μέσης όσο και με τον αριθμό των χαρακτηριστικών του μεταβολικού συνδρόμου [3]. Οι πάσχοντες από NAFLD με T2DM έχουν περισσότερο από 80% περιεκτικότητα σε λιπίδια στα ηπατοκύτταρά τους σε σχέση με τους μη διαβητικούς ασθενείς [2]. Έτσι, έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες να αναπτύξουν NASH με διαφορετικούς βαθμούς ηπατικής ίνωσης. Υπάρχουν διάφοροι παθογενετικοί μηχανισμοί που συσχετίζουν την NAFLD με τον T2DM, όπως η ινσουλινοαντίσταση, η υπερινσουλιναίμια, ο

διαταραγμένος μεταβολισμός λιπιδίων, το αυξημένο οξειδωτικό στρες και η φλεγμονή [4]. Από αυτά, η ινσουλινοαντίσταση κατέχει τον πιο σημαντικό ρόλο [7].

Πέρα από το μεταβολικό σύνδρομο, υπάρχουν και πολλοί άλλοι παράγοντες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη της NAFLD και αυτός είναι ένας από τους λόγους που η εμφάνισή της στον πληθυσμό αυξάνεται εκθετικά με τα χρόνια. Πρώτα από όλα, υπάρχει μία διφορούμενη σύνδεση ανάμεσα στο φύλο και την NAFLD. Οι περισσότερες μελέτες, ωστόσο, δείχνουν ότι μεγαλύτερο ποσοστό των αντρών πλήττονται από τη συγκεκριμένη νόσο, ενώ οι γυναίκες επηρεάζονται λιγότερο. Επίσης, σημαντικό παράγοντα αποτελεί και η ηλικία. Έχει δειχθεί ότι η παρουσία όχι μόνο της NAFLD, αλλά και της NASH και της κίρρωσης, είναι πιο συχνή σε μεγαλύτερες ηλικίες (20% σε άτομα <20 ετών, ενώ 40% σε >60 ετών). Η διατροφή θεωρείται γενικά ανεξάρτητος παράγοντας, αλλά μια δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος και υδατάνθρακες είναι πιθανόν να ευνοήσει τη δημιουργία μεταβολικού συνδρόμου και έτσι, αυξάνονται οι πιθανότητες εμφάνισης της NAFLD. Τέλος, σπουδαίο ρόλο κατέχει η καθιστική ζωή και η έλλειψη άσκησης, που συμβάλλουν στην παχυσαρκία. Έχει δειχθεί ότι η σοβαρότητα της NAFLD είναι ανάλογη της σωματικής δραστηριότητας. Έτσι, η σταδιακή μείωση του βάρους μέσω της διατροφής, με ή χωρίς άσκηση, έχει δείξει βελτίωση στα ηπατικά ένζυμα του ορού και μειωμένη λιπώδη διήθηση του ήπατος, ηπατική φλεγμονή και επίπεδα ίνωσης [2].

1.3 Παθοφυσιολογία της NAFLD

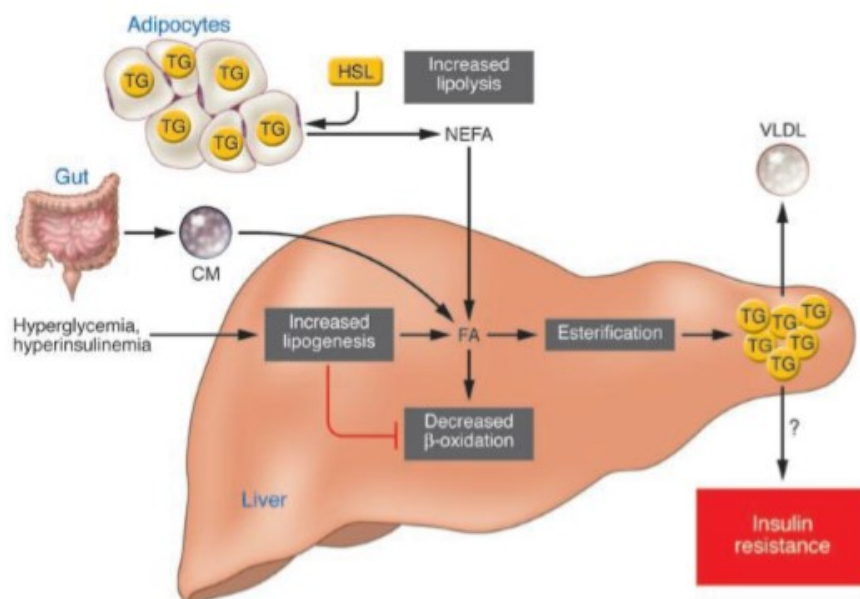
1.3.1 Μεταβολισμός λιπιδίων

Το ήπαρ υπό φυσιολογικές συνθήκες περιέχει μειωμένη συγκέντρωση λιπιδίων. Παρ' όλα αυτά, υπάρχει μεταφορά λιπαρών οξέων από και προς αυτό ως απόκριση στη σίτιση και στη νηστεία, τα οποία προέρχονται είτε από τη διατροφή είτε από τη λιπόλυση του λιπώδους ιστού ή/και την ηπατική de novo λιπογένεση.

Τα τριγλυκερίδια προέρχονται από την εστεροποίηση της γλυκερόλης και των ελεύθερων λιπαρών οξέων. Κατά τη σίτιση, τα λιπαρά οξέα από τη διατροφή απορροφώνται από το λεπτό έντερο, όπου μετατρέπονται σε τριγλυκερίδια και ενσωματώνονται στα χυλομικρά. Τα χυλομικρά είναι λιποπρωτεΐνες, που μεταφέρουν τα τριγλυκερίδια στους ιστούς μέσω του λεμφικού συστήματος και του πλάσματος. Εκεί υφίστανται τη δράση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης και μετατρέπονται ξανά σε λιπαρά οξέα. Τα χυλομικρά μεταφέρουν το 70% των λιπιδίων τους κυρίως στο λιπώδη ιστό, ενώ το υπόλοιπο 30% παραλαμβάνεται από το ήπαρ. Η ηπατική de novo λιπογένεση (DNL) είναι ένας εναλλακτικός τρόπος σύνθεσης λιπαρών οξέων και ενεργοποιείται όταν υπάρχει υπερβολικό φορτίο υδατανθράκων [8,9,10]. Τέλος, κατά τη νηστεία, τίθεται σε λειτουργία η διαδικασία της λιπόλυσης. Σε αυτήν, τα τριγλυκερίδια που είναι αποθηκευμένα στα λιποκύτταρα του λευκού λιπώδους ιστού υδρολύονται σε λιπαρά οξέα και γλυκερόλη. Στη συνέχεια, αυτά τα λιπαρά οξέα απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος, όπου καλούνται μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα (non-esterified fatty acids – NEFAs) και δεσμεύονται με αλβουμίνη ώστε να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα ενέργειας από άλλους ιστούς, όπως το ήπαρ [11]. Με αυτούς τους τρεις τρόπους, λοιπόν, συγκεντρώνονται τα λιπαρά οξέα στα ηπατοκύτταρα, τα οποία μεταγενέστερα διοχετεύονται σε μονοπάτια αποθήκευσης ή έκκρισης. Πιο συγκεκριμένα, είτε υφίστανται β-οξείδωση στα μιτοχόνδρια είτε επανεστεροποιούνται σε τριγλυκερίδια. Τα τριγλυκερίδια με τη σειρά τους μπορούν να αποθηκευτούν σαν λιποσταγονίδια στα ηπατοκύτταρα ή να εκκριθούν στην κυκλοφορία του αίματος σαν VLDL μόρια. Τα VLDL είναι λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας, που μεταφέρουν τα τριγλυκερίδια στους ιστούς μέσω του πλάσματος [12].

Ανισορροπίες μεταξύ αυτών των οδών μπορούν να οδηγήσουν σε αυξημένη εισροή ή σύνθεση, καθώς και σε μειωμένη οξείδωση ή εκροή λιπιδίων από το ήπαρ, με αποτέλεσμα τελικά τη συσσώρευση τους στα ηπατοκύτταρα. Έτσι, επάγεται η αντίσταση στην ινσουλίνη σε διάφορους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του ήπατος, αλλά και η αναστολή της δράσης της σε ολόκληρο τον οργανισμό. Είναι φανερό, λοιπόν, ότι η στεάτωση δημιουργείται από τη διαταραχή του ομαλού μεταβολισμού των λιπιδίων και συνδέεται με

την ινσουλινοαντίσταση, η οποία αποτελεί σημαντικό μηχανισμό στην παθογένεση της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος [13].



Εικόνα 1.2 Δημιουργία ηπατικής στεάτωσης μέσω διαταραχής του ομαλού μεταβολισμού λιπιδίων [12]

1.3.2 Αντίσταση στην ινσουλίνη

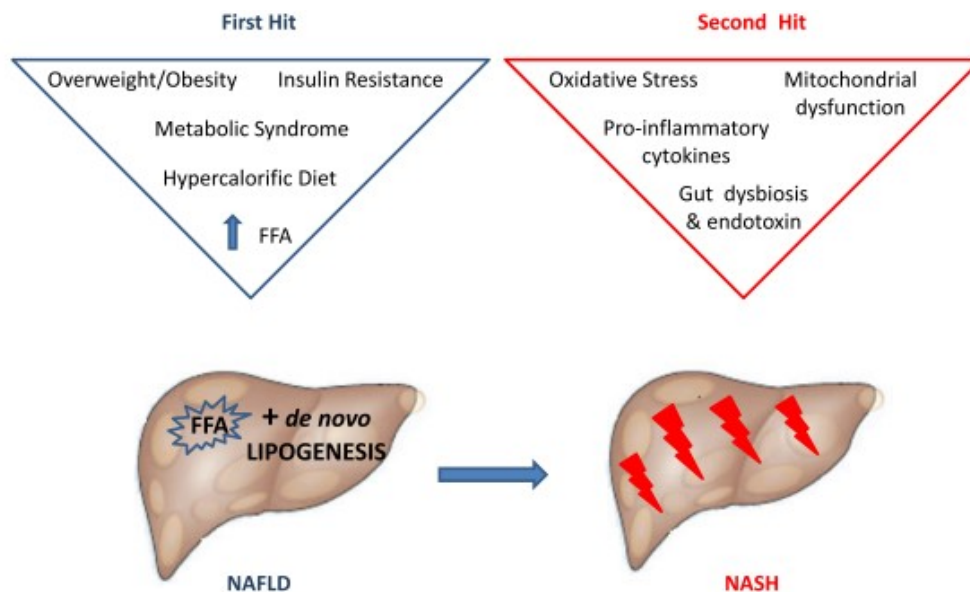
Η ινσουλίνη είναι μια ορμόνη, που εκκρίνεται από τα β -κύτταρα του παγκρέατος ως απόκριση στα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα μετά από ένα γεύμα. Κατέχει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης των λιπιδίων και των υδατανθράκων. Μια μεγάλη ποσότητα γλυκόζης, που απορροφάται από το λεπτό έντερο, παραλαμβάνεται αμέσως από τα ηπατοκύτταρα, τα οποία τη μετατρέπουν στη συνέχεια σε γλυκογόνο. Αυτή η διαδικασία διεγείρεται από την ινσουλίνη. Όμως, όταν το ήπαρ είναι κορεσμένο με γλυκογόνο, η επιπλέον ποσότητα γλυκόζης που παραλαμβάνεται από τα ηπατοκύτταρα, απομακρύνεται με συγκεκριμένα μονοπάτια που οδηγούν στη σύνθεση λιπαρών οξέων. Αυτά τα λιπαρά οξέα είτε θα οξειδωθούν είτε θα μεταβούν στο λιπώδη ιστό σαν VLDL μόρια. Έτσι, κατά τη μετάβαση από την κατάσταση νηστείας στη μεταγευματική κατάσταση, η αυξημένη γλυκόζη στο αίμα διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης, προάγοντας τη σύνθεση γλυκογόνου και τη λιπογένεση και καταστέλλοντας την ηπατική γλυκονεογένεση, με αποτέλεσμα να διατηρείται η γλυκόζη σε

φυσιολογικά επίπεδα. Η ινσουλίνη αναστέλλει, επίσης, τη λιπόλυση του λευκού λιπώδους ιστού με την αναστολή της HSL (hormone-sensitive lipase), ενός ενζύμου που ρυθμίζει την απελευθέρωση λιπαρών οξέων από το λιπώδη ιστό [12,14].

Η αντίσταση στην ινσουλίνη είναι μια κατάσταση, στην οποία η δράση της ινσουλίνης καταστέλλεται κι έτσι δεν μπορεί να μεταφερθεί η γλυκόζη στους ιστούς και παραμένει στην κυκλοφορία του αίματος σε υψηλά επίπεδα. Ταυτόχρονα υπάρχει ανεπαρκής καταστολή της ηπατικής γλυκονεογένεσης, μειωμένη σύνθεση γλυκογόνου, καθώς και αυξημένη λιπόλυση του λιπώδους ιστού [14]. Επίσης, τόσο η υπεργλυκαιμία όσο και η υπερινσουλιναιμία, που προκύπτουν από την αντίσταση στην ινσουλίνη, επάγουν το ChREBP και το SREBP-1c αντίστοιχα στο ήπαρ, δύο μεταγραφικούς παράγοντες που στη συνέχεια ενεργοποιούν γονίδια που απαιτούνται για τη λιπογένεση και τελικά οδηγούν σε αυξημένη ηπατική de novo λιπογένεση. Έτσι, ευνοείται η ηπατική συσσώρευση λιπαρών οξέων. Αυτά τα λιπαρά οξέα ενδέχεται στη συνέχεια να ενεργοποιήσουν το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης στα ηπατοκύτταρα μέσω της Jun N-τελικής κινάσης (JNK), η οποία προάγει την εξέλιξη από απλή στεάτωση σε NASH. Φαίνεται, δηλαδή, ότι η αντίσταση στην ινσουλίνη παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη της NAFLD [14,15].

1.3.3 Η «υπόθεση πολλαπλών χτυπημάτων»

Ο μηχανισμός ανάπτυξης και εξέλιξης της NAFLD εμπλέκεται με το μεταβολισμό των λιπιδίων και είναι πολυπαραγοντικός. Περιγράφηκε πρώτη φορά το 1998 και ονομάστηκε «υπόθεση των δύο χτυπημάτων» [16]. Το πρώτο χτύπημα αφορά στη συσσώρευση λιπαρών οξέων στα ηπατοκύτταρα λόγω δίαιτας με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά, ανάπτυξης ινσουλिनoαντοχής ή/και παχυσαρκίας. Με αυτόν τον τρόπο, δημιουργείται ηπατική στεάτωση. Αυτό το πρώτο χτύπημα αυξάνει την ευπάθεια του ήπατος σε πολλούς παράγοντες, οι οποίοι αποτελούν το δεύτερο χτύπημα και προάγουν την εμφάνιση φλεγμονής, ηπατοκυτταρικής βλάβης και ίνωσης. Κάποιοι από αυτούς τους παράγοντες είναι το οξειδωτικό στρες, η παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών και αδιποκινών, καθώς και η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Έτσι, γίνεται η εξέλιξη σε μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα.

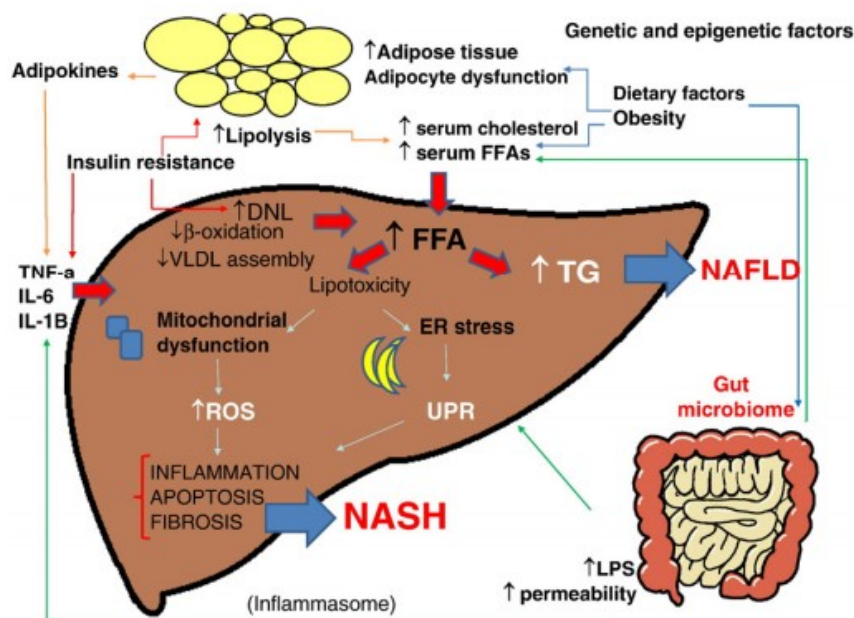


Εικόνα 1.3 Η «υπόθεση των δύο χτυπημάτων» [17]

Παρ' όλα αυτά, ήταν αναγκαίο να εξηγηθεί σε μεγαλύτερο βάθος η πολυπλοκότητα της συγκεκριμένης νόσου κι έτσι, μετά την απόκτηση νέων γνώσεων πάνω στους μηχανισμούς και τα μονοπάτια που ρυθμίζουν την ανάπτυξη και εξέλιξή της, η υπόθεση αυτή αντικαταστάθηκε από μια πιο εξελιγμένη και σύνθετη, που ονομάστηκε «υπόθεση πολλαπλών χτυπημάτων». Σε αυτήν, κυρίαρχο ρόλο παίζουν οι διατροφικές συνήθειες, καθώς και οι γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες, που ευνοούν την ανάπτυξη αντοχής στην ινσουλίνη και παχυσαρκίας με πολλαπλασιασμό των λιποκυττάρων. Η ινσουλινοαντοχή, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οδηγεί σε αυξημένη *de novo* λιπογένεση και μειωμένη αναστολή της λιπόλυσης του λευκού λιπώδους ιστού, γεγονότα που συμβάλλουν στην υπέρμετρη εκροή ελεύθερων λιπαρών οξέων από τον λιπώδη ιστό στο ήπαρ. Επίσης, προκαλεί δυσλειτουργία των λιποκυττάρων του λιπώδους ιστού κι έτσι αυξάνεται η παραγωγή αδιποκινών και προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Η αυξημένη εισροή των ελεύθερων λιπαρών οξέων (free fatty acids – FFAs) στο ήπαρ μπορεί να οδηγήσει σε δύο διαφορετικές καταστάσεις: 1) στη σύνθεση και συσσώρευση τριγλυκεριδίων, όπου προκαλείται απλή στεάτωση και 2) στη δημιουργία λιποτοξικότητας, η οποία συμβάλλει στη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και στο στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, τα οποία οδηγούν τελικά σε ηπατική φλεγμονή και NASH. Πιο συγκεκριμένα, τα μιτοχόνδρια των

ηπατοκυττάρων δεν μπορούν να διαχειριστούν την υπερβολική εισροή των λιπαρών οξέων, οπότε το τελικό αποτέλεσμα είναι η παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species - ROS), η υπεροξειδωση λιπιδίων και το οξειδωτικό στρες. Όλα αυτά ενεργοποιούν προφλεγμονώδη μονοπάτια που θα οδηγήσουν στην απόπτωση των ηπατοκυττάρων και στην NASH.

Τέλος, έχειδειχτεί από μελέτες ότι υπάρχουν και αρκετοί γενετικοί παράγοντες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη της NAFLD. Αυτοί αφορούν γονίδια που σχετίζονται με την αντίσταση στην ινσουλίνη, το μεταβολισμό των λιπιδίων στο ήπαρ, την παχυσαρκία, το οξειδωτικό στρες, καθώς και τη σύνθεση κυτταροκινών [8,18,19].



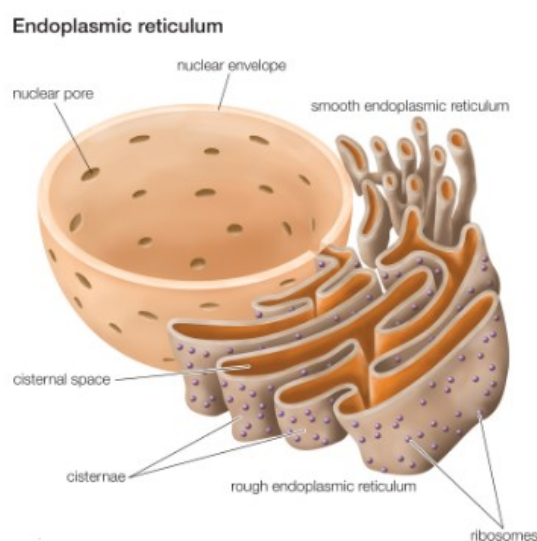
Εικόνα 1.4 Η «υπόθεση πολλαπλών χτυπημάτων» για την ανάπτυξη της NAFLD [8]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΣΤΡΕΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ (ER STRESS)

2.1 Γενικά – Εισαγωγή

Το ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) είναι ένα απαραίτητο οργάνιδιο που βρίσκεται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Διακρίνεται σε δύο τύπους ανάλογα με τη δομή του, σε αδρό και σε λείο. Το πρώτο φέρει ριβοσώματα στην επιφάνειά του και είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση και έκκριση των πρωτεϊνών, ενώ το δεύτερο δε φέρει ριβοσώματα και συμμετέχει στη σύνθεση των λιπιδίων, στο μεταβολισμό των υδατανθράκων και στη ρύθμιση της ομοιόστασης του Ca^{2+} [20].



Εικόνα 2.1 Αδρό και λείο ενδοπλασματικό δίκτυο [21]

Κάποιες από τις πιο σημαντικές λειτουργίες του ενδοπλασματικού δικτύου είναι η σύνθεση, η αναδίπλωση, η τροποποίηση και η μεταφορά των πρωτεϊνών, που ρυθμίζονται από το σύστημα ελέγχου ποιότητας των πρωτεϊνών [22]. Πιο συγκεκριμένα, εκεί συντίθενται οι εκκρινόμενες και οι μεμβρανικές πρωτεΐνες. Μετά τη σύνθεση και τη μεταφορά τους στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου, πρέπει να υποστούν την κατάλληλη

αναδίπλωση και τροποποίηση με τη βοήθεια μοριακών συνοδών (ER chaperones) και ενζύμων αναδίπλωσης. Οι συν-μεταφραστικές και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις αυτές μπορεί να είναι γλυκοζυλίωση, σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών ή ολιγομερισμός και είναι σημαντικές για τη σωστή διαμόρφωση των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, οι σωστά πτυχωμένες πρωτεΐνες εξέρχονται από το ΕΔ και είτε ενσωματώνονται στη μεμβράνη είτε απελευθερώνονται μέσω της εκκριτικής οδού [23,24]. Επίσης, το ΕΔ παίζει σημαντικό ρόλο στην αποθήκευση των ιόντων Ca^{2+} . Το Ca^{2+} αποτελεί ένα μόριο σηματοδότησης, το οποίο μπορεί να επηρεάσει διάφορες διεργασίες, όπως τη λειτουργία και τη σύνδεση πρωτεϊνών με άλλες πρωτεΐνες, οργανίδια και νουκλεϊκά οξέα. Τέλος, εκεί πραγματοποιείται η σύνθεση των λιπιδίων και ο μεταβολισμός των υδατανθράκων [23].

Διαταραχή σε κάποια από αυτές τις λειτουργίες μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση μη πτυχωμένων ή μη ορθά πτυχωμένων πρωτεϊνών στον αυλό του ΕΔ, όπως και στη διαστολή του. Έτσι, το ΕΔ δεν είναι σε θέση να διαχειριστεί αυτό το υπερβολικό πρωτεϊνικό φορτίο και το φαινόμενο αυτό ονομάζεται στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (ER stress) [25]. Αυτή η κατάσταση, βέβαια, μπορεί να προκληθεί και από άλλους παράγοντες, όπως η υποξία, η υπογλυκαιμία, η διατροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά ή υδατάνθρακες, η παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών, κάποιες φυσικές ενώσεις (π.χ. θαψιγαργίνη, τουνικαμυκίνη) και διάφορα φάρμακα [26]. Τα κύτταρα προκειμένου να μπορέσουν να μειώσουν το υπερβολικό φορτίο πρωτεϊνών που έχει δημιουργηθεί, ενεργοποιούν ορισμένα σηματοδοτικά μονοπάτια του συστήματος ελέγχου ποιότητας των πρωτεϊνών, όπως την απόκριση σε μη ορθά διαμορφωμένες πρωτεΐνες (Unfolded Protein Response, UPR), την αποικοδόμηση πρωτεϊνών μέσω του ΕΔ (ER – Associated Degradation, ERAD) και την αυτοφαγία [27]. Αυτά τα μονοπάτια οδηγούν σε αναστολή της μετάφρασης των πρωτεϊνών, αποικοδόμηση των μη πτυχωμένων ή μη ορθά πτυχωμένων πρωτεϊνών και μεταγραφική ενεργοποίηση μοριακών συνοδών και ενζύμων αναδίπλωσης, έτσι ώστε να γίνει επαναφορά της ομοιόστασης του ΕΔ και να αυξηθεί η χωρητικότητά του για αναδίπλωση και αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Ωστόσο, εάν η ισορροπία δε δύναται να αποκατασταθεί, ενεργοποιείται ο κυτταρικός θάνατος ή

απόπτωση, οπότε φαίνεται ότι η αντιμετώπιση του ER stress είναι κρίσιμη για την επιβίωση του κυττάρου [23].

2.2 Σηματοδοτικά μονοπάτια στην απόκριση του στρες του ΕΔ

Όταν για οποιονδήποτε λόγο δημιουργείται στρες στο ΕΔ, τα κύτταρα προσπαθούν να το αντιμετωπίσουν ώστε να επανέλθει η ομαλή λειτουργία τους. Έτσι, διεγείρουν διάφορους μηχανισμούς που θα οδηγήσουν στην επαναφορά της πρωτεϊνικής ομοιόστασης στον αυλό του ΕΔ και τελικά στην επιβίωσή τους. Αυτοί οι μηχανισμοί είναι το UPR, το ERAD και η αυτοφαγία.

2.2.1 Απόκριση σε μη διαμορφωμένες πρωτεΐνες (UPR)

Ως απάντηση στο ER stress, ενεργοποιείται η απόκριση σε μη διαμορφωμένες πρωτεΐνες ή αλλιώς UPR, η οποία έχει ως στόχο την αντιμετώπιση του στρες που έχει δημιουργηθεί. Το UPR είναι ένας προσαρμοστικός κυτταρικός μηχανισμός, που ελέγχεται από τη δράση τριών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, της IRE1α (Inositol-Requiring Enzyme 1α), της ATF6 (Activating Transcription Factor 6) και της PERK (RNA-dependent protein kinase (PKR)-like ER kinase), οι οποίες έχουν ξεχωριστές αλλά και επικαλυπτόμενες λειτουργίες. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, όπου η αναδίπλωση των πρωτεϊνών στον αυλό του ΕΔ γίνεται κανονικά, αυτές οι τρεις πρωτεΐνες είναι συνδεδεμένες με έναν καθοριστικό μοριακό συνοδό του ΕΔ, που ονομάζεται GRP78/BiP κι έτσι, παραμένουν απενεργοποιημένες [27]. Η πρωτεΐνη GRP78 είναι ομόλογη των πρωτεϊνών Hsp70 στο ΕΔ και έχει μια διατηρημένη περιοχή ATPάσης και μια περιοχή πρόσδεσης πεπτιδίων [28]. Στην περίπτωση που δημιουργείται ER stress, η GRP78 απελευθερώνεται από τις τρεις πρωτεΐνες ώστε να συμβάλλει στην αναδίπλωση των μη ορθά πτυχωμένων πρωτεϊνών, οδηγώντας έτσι στην ενεργοποίηση των PERK, IRE1α και ATF6.

IRE1α

Η πρωτεΐνη IRE1α αποτελείται από μια περιοχή στον αυλό του ΕΔ και από μια περιοχή στο κυτταρόπλασμα με δραστικότητα πρωτεϊνικής κινάσης, αλλά και ενδοριβονουκλεάσης. Ως απόκριση στη συσσώρευση μη ορθά

πτυχωμένων ή μη πτυχωμένων πρωτεϊνών, η IRE1α ολιγομερίζεται στο επίπεδο της μεμβράνης και αυτοφωσφορυλιώνεται στην περιοχή του κυτταροπλάσματος με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή της. Στη συνέχεια, κόβει το πρόδρομο μόριο του mRNA του XBP-1 (X box-binding protein-1), οδηγώντας στην απομάκρυνση ενός παρεμβαλλόμενου ιντρονίου και επομένως, στη σύνθεση του μεταγραφικού παράγοντα XBP-1s, ο οποίος συνδέεται στους υποκινητές γονιδίων που συμμετέχουν στο UPR και στο ERAD και διεγείρει την έκφρασή τους με σκοπό την επαναφορά της πρωτεόστασης [1]. Η έλλειψη των γονιδίων IRE1α ή XBP1 έχειδειχθεί ότι προκαλεί εμβρυϊκή θνησιμότητα, υποδεικνύοντας ότι είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη [22].

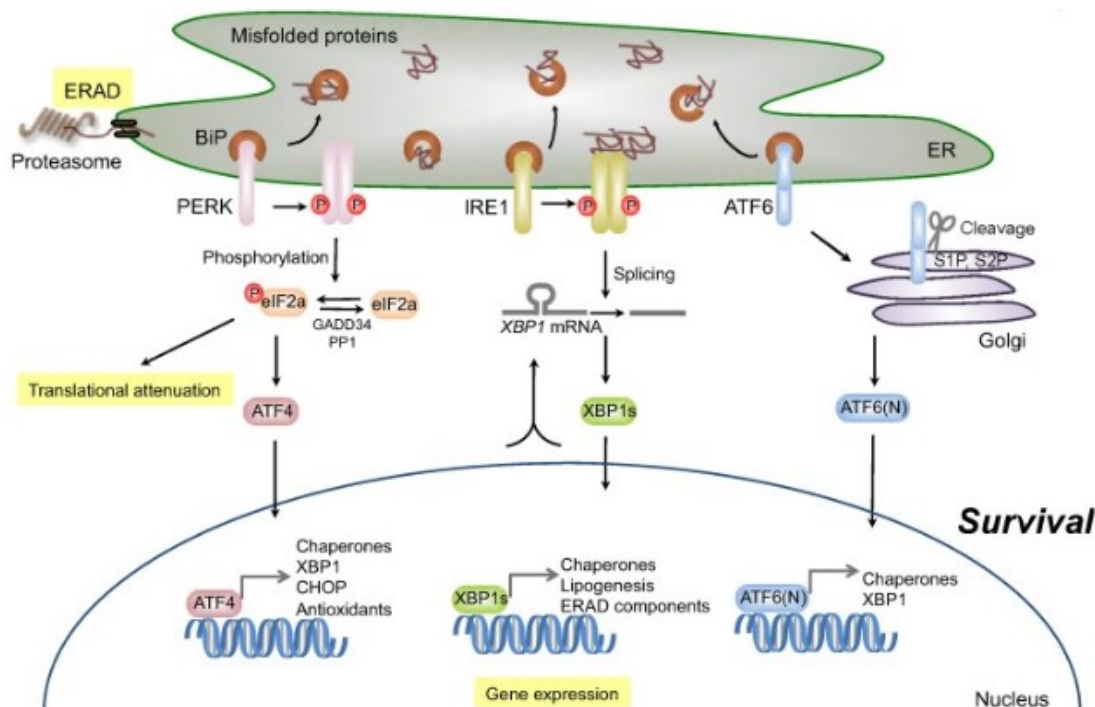
ATF6

Η πρωτεΐνη ATF6 αποτελείται από μια περιοχή στον αυλό του ΕΔ και από μια περιοχή στο κυτταρόπλασμα. Μεταφέρεται στο σύστημα Golgi κάτω από συνθήκες ER stress, όπου υφίσταται πρωτεόλυση από δύο πρωτεάσες, την S1P (Site 1 Protease) και την S2P (Site 2 Protease). Η S1P κόβει την ATF6 στην περιοχή του αυλού του ΕΔ και η S2P στην περιοχή του κυτταροπλάσματος, οπότε προκύπτει ένα θραύσμα της πρωτεΐνης, το ATF6(N). Το θραύσμα αυτό μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου δρα ως μεταγραφικός παράγοντας, ενεργοποιώντας τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων, όπως το GRP78/BiP και το GRP94 [1].

PERK

Η πρωτεΐνη PERK αποτελείται επίσης από μια περιοχή στον αυλό του ΕΔ και μια περιοχή στο κυτταρόπλασμα, η οποία έχει δραστηριότητα πρωτεϊνικής κινάσης. Όταν υπάρχει στρες στο ΕΔ, η PERK ολιγομερίζεται και αυτοφωσφορυλιώνεται στην περιοχή του κυτταροπλάσματος με παρόμοιο τρόπο με την IRE1α, οδηγώντας έτσι στην ενεργοποίησή της. Η διαφορά με την IRE1α είναι ότι η PERK στη συνέχεια, φωσφορυλιώνει στην α υπομονάδα τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης των ευκαρυωτικών κυττάρων, eIF2α (eukaryotic translation initiation factor 2α), στη σερίνη 51 (Ser51). Αυτή η φωσφορυλίωση έχει ως αποτέλεσμα τη γενική αναστολή της μετάφρασης των πρωτεϊνών ώστε να μειωθεί το πρωτεϊνικό φορτίο που εισέρχεται στο ΕΔ και επιτρέπει μόνο τη μετάφραση γονιδίων σχετιζόμενων με το UPR, όπως το

ATF4 (Activation Transcription Factor 4). Το ATF4 ενεργοποιεί τη μεταγραφή πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των αμινοξέων, στην οξειδοαναγωγική ομοιόσταση, καθώς και στην απόπτωση [22].

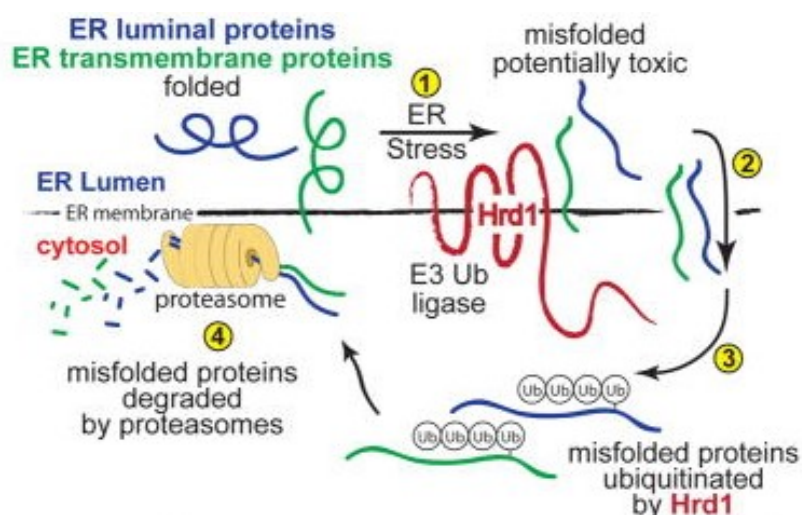


Εικόνα 2.2 Κυτταρική επιβίωση μέσω του UPR [22]

2.2.2 Αποικοδόμηση πρωτεϊνών μέσω του ΕΔ (ERAD)

Το UPR διεγείρει διάφορα μονοπάτια σηματοδότησης με σκοπό την επαναφορά της πρωτεϊνικής ομοιόστασης στον αυλό του ΕΔ, συμπεριλαμβανομένων της βελτιστοποίησης της αναδίπλωσης των μη ορθά πτυχωμένων ή μη πτυχωμένων πρωτεϊνών από τους μοριακούς συνοδούς και της αύξησης της αποικοδόμησής τους μέσω του ERAD. Το ERAD αποτελεί μια διαδικασία του συστήματος ελέγχου ποιότητας, που έχει ως στόχο την απομάκρυνση των τελικώς μη ορθά πτυχωμένων πρωτεϊνών από το ΕΔ μέσω του συστήματος ουβικουΐνη-πρωτεάσωμα. Πιο συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες που δεν αναδιπλώνονται σωστά κατά τη διάρκεια του ER stress και το σύστημα ελέγχου ποιότητας αποτυγχάνει να τις διορθώσει, μεταφέρονται εκτός του ΕΔ, στο κυτταρόπλασμα, όπου συνδέονται με μια αλυσίδα μορίων ουβικουΐνης. Η προσθήκη αυτή καταλύεται από κάποια ένζυμα, που

ονομάζονται λιγάσες ουβικουιτίνης και επιτρέπει στις προς αποδόμηση πολυουβικουιτινικές πρωτεΐνες να αναγνωρισθούν από το πρωτεάσωμα και τελικά να αποικοδομηθούν. Τα τελικά προϊόντα της αποικοδόμησης είναι μικρά πεπτίδια, που καταστρέφονται περαιτέρω από άλλες πρωτεάσες στα δομικά τους αμινοξέα έως ότου αυτά να ανακυκλωθούν. Η διαδικασία αυτή οδηγεί στη μείωση του πρωτεϊνικού φορτίου στον αυλό του ΕΔ κι έτσι, τα κύτταρα επανακτούν την ομαλή λειτουργία τους [29].

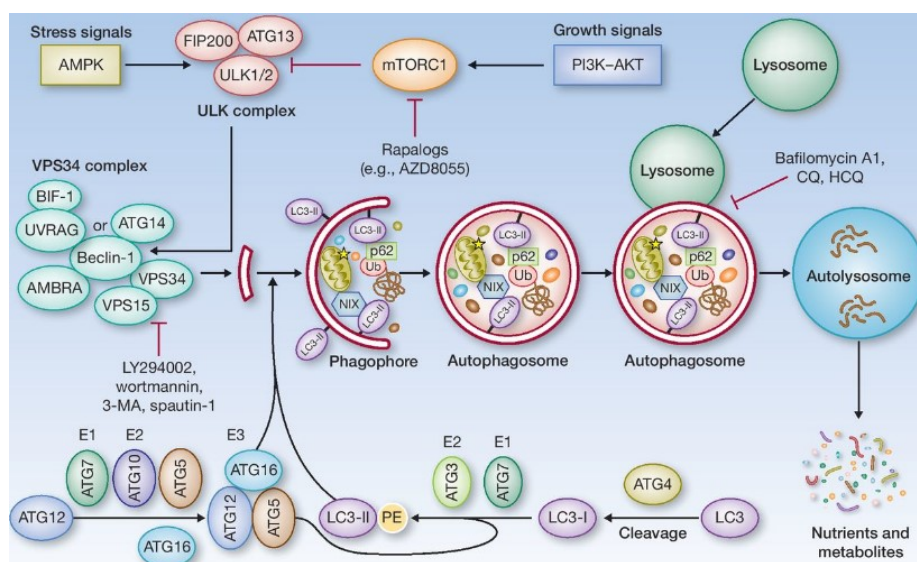


Εικόνα 2.3 Αποικοδόμηση των μη ορθά πτυχωμένων πρωτεϊνών μέσω του ERAD [29]

2.2.3 Αυτοφαγία

Η αυτοφαγία είναι ένας άκρως συντηρημένος μηχανισμός του συστήματος ελέγχου ποιότητας στα ευκαρυωτικά κύτταρα, που ενεργοποιείται κάτω από συνθήκες στρες με σκοπό να προωθήσει την επιβίωση του κυττάρου. Μπορεί να ενεργοποιηθεί, επίσης, κάτω από συνθήκες ασιτίας λόγω έλλειψης θρεπτικών ουσιών, υποξίας, οξειδωτικού stress, καθώς και όταν υπάρχουν βλάβες στο DNA. Στόχος της αυτοφαγίας είναι ο κατακερματισμός και η εξάλειψη των κατεστραμμένων οργανιδίων, των πρωτεϊνών με μεγάλη διάρκεια ζωής και άλλων κατεστραμμένων κυτταρικών συστατικών. Αρχικά, σχηματίζεται το φαγοφόρο, το οποίο στη συνέχεια επιμηκύνεται μέχρι να συγχωνευθούν οι μεμβράνες του, με τη βοήθεια 15 περίπου πρωτεϊνών, που σχετίζονται με την αυτοφαγία (autophagy-related proteins, ATG). Έτσι, δημιουργείται ένα μεμβρανικό κυστίδιο, γνωστό ως αυτοφαγόσωμα. Έπειτα,

το αυτοφαγόσωμα συντήκεται με ένα λυσόσωμα ώστε να παραχθεί το αυτολυσόσωμα, όπου μεταφέρεται το φορτίο που πρόκειται να αποικοδομηθεί. Η πέψη του απομονωμένου κυτταροπλασματικού περιεχομένου ξεκινά με τη δράση ορισμένων ενζύμων, που ονομάζονται λυσοσωμικές υδrolάσεις. Μετά την αποικοδόμηση, τα προκύπτοντα μακρομόρια ανακυκλώνονται [30,31].



Εικόνα 2.4 Τα στάδια της αυτοφαγίας [31]

2.2.4 Απόπτωση

Εάν το πρωτεϊνικό φορτίο στον αυλό του ΕΔ είναι υπερβολικό ή/και το στρες του ΕΔ χρονικά παρατεταμένο, τότε η συσσώρευση των μη ορθά πτυχωμένων πρωτεϊνών μπορεί να επιφέρει τοξικές επιδράσεις. Έτσι, δεν είναι πλέον δυνατή η επιβίωση και τα κύτταρα οδηγούνται στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Έχει δειχθεί ότι η κυτταρική δυσλειτουργία, που προκαλείται από το ER stress, καθώς και ο κυτταρικός θάνατος είναι δύο παράγοντες, που συμβάλλουν στην ανάπτυξη και εξέλιξη διάφορων ασθενειών [32].

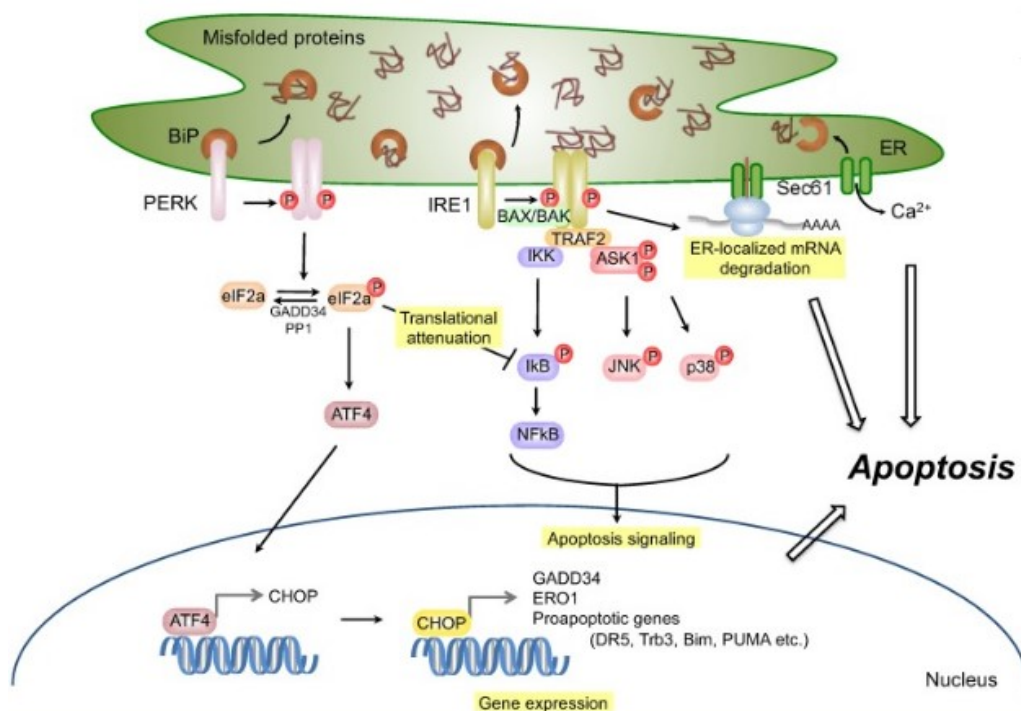
IRE1α

Κατά τη διάρκεια του παρατεταμένου ER stress, η ενεργοποιημένη IRE1α αλληλεπιδρά με τον παράγοντα TRAF2, δημιουργώντας το σύμπλοκο IRE1α-TRAF2. Το σύμπλοκο αυτό εκτός από τη διέγερση του μονοπατιού NF-κΒ,

προκαλεί και τη στρατολόγηση της ASK1 (Apoptotic Signaling Kinase 1), η οποία διεγείρει με τη σειρά της τις ενεργοποιούμενες από στρες πρωτεϊνικές κινάσες, JNK και p38 MAPK, που φωσφορυλιώνονται και οδηγούν τελικά στην απόπτωση. Επιπλέον, η IRE1α κόβει ορισμένα microRNAs που ρυθμίζουν τα επίπεδα των κασπασών (πρωτεάσες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό θάνατο) [1].

PERK

Σε συνθήκες παρατεταμένου ή υψηλής έντασης στρες του ΕΔ, η ενεργοποιημένη PERK διεγείρει το μονοπάτι PERK-eIF2α-ATF4, το οποίο ενεργοποιεί στη συνέχεια, τη μεταγραφή προαποπτωτικών παραγόντων, όπως το CHOP/GADD153 [22]. Η απώλεια του γονιδίου CHOP σε κύτταρα μυών οδηγεί σε μείωση της απόπτωσης κάτω από ER stress [33] και η υπερέκφραση της πρωτεΐνης αυτής επάγει την απόπτωση σε κυτταρικές σειρές [34]. Το CHOP προκαλεί κυτταρικό θάνατο μέσω αναστολής της έκφρασης του αντι-αποπτωτικού παράγοντα Bcl-2, αλλά και ενεργοποίησης ενός αριθμού προαποπτωτικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων της GADD34 (Growth arrest and DNA damage-inducible protein), DR5 (Death Receptor 5), BIM (binding to microtubule) και Ero1α (endoplasmic reticulum oxidoreductase-1). Όταν ενεργοποιηθεί η GADD34, οδηγεί στην αποφωσφορυλίωση της eIF2α και τελικά στην ανάκτηση της μετάφρασης των πρωτεϊνών, οπότε αυξάνεται και πάλι το πρωτεϊνικό φορτίο στον αυλό του ΕΔ και ταυτόχρονα επιτρέπεται η μεταφράση των mRNAs, που κωδικοποιούν προαποπτωτικές πρωτεΐνες.



Εικόνα 2.5 Απόπτωση μέσω του UPR [22]

Ασβέστιο (Ca²⁺)

Ο αυλός του ΕΔ είναι ο κύριος αποθηκευτικός χώρος του ενδοκυτταρικού Ca²⁺ και αρκετοί μοριακοί συνοδοί που δεσμεύουν Ca²⁺, όπως η καλρετικουλίνη, συμβάλλουν στην κατάλληλη αναδίπλωση των πρωτεϊνών, που λαμβάνει χώρα στο ΕΔ. Έτσι, φαίνεται ότι η ποσότητα του Ca²⁺ στο ΕΔ είναι καίριας σημασίας για την επιβίωση του κυττάρου. Είναι αποδεδειγμένο ότι η μεταφορά του Ca²⁺ μέσα και έξω από το ΕΔ αποτελεί μια σημαντική διαδικασία, που ρυθμίζει διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια. Για παράδειγμα, η απελευθέρωση μεγάλης ποσότητας Ca²⁺ από το ΕΔ μπορεί να ενεργοποιήσει μηχανισμούς που προωθούν τον κυτταρικό θάνατο, κυρίως μέσω του ενδογενούς μονοπατιού απόπτωσης. Κάποιες από τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αυτό είναι οι Bax και Bak. Ειδικότερα, η παροδική υπερέκφρασή τους έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση Ca²⁺ από το ΕΔ, με επακόλουθη αύξηση του μιτοχondριακού Ca²⁺ και αυξημένη απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Με αυτόν τον τρόπο, το κύτταρο

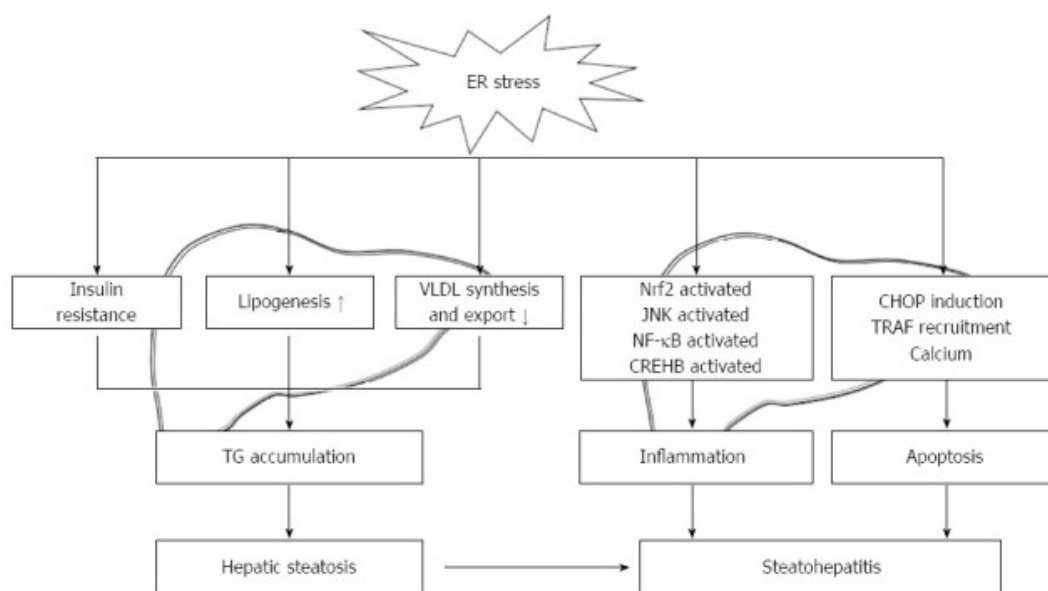
οδηγείται στην απόπτωση. Επίσης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το CHOP ενεργοποιεί την προαποπτωτική πρωτεΐνη, Egr1α, η οποία μπορεί να διεγείρει τον υποδοχέα τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP3R), ο οποίος δρα ομοίως με τις Bax και Bak [32].

2.3 Στρες του ΕΔ και NAFLD

Όπως όλα τα εκκριτικά κύτταρα, έτσι και τα ηπατοκύτταρα περιέχουν αδρό και λείο ΕΔ, το οποίο εξαιτίας της ικανότητάς του για πρωτεϊνική σύνθεση και αναδίπλωση, παίζει σημαντικό ρόλο στην ομαλή λειτουργία τους. Σε περιπτώσεις ER stress, όπου η ικανότητα αυτή διαταράσσεται, υπάρχει το ενδεχόμενο ανάπτυξης διάφορων ασθενειών, που σχετίζονται με το ήπαρ. Πιο συγκεκριμένα, τα σηματοδοτικά μονοπάτια, που ενεργοποιούνται από το στρες του ΕΔ, έχουν συνδεθεί με τη λιπτοτοξικότητα, την ινσουλινοαντοχή, τη φλεγμονή και την απόπτωση, που αποτελούν χαρακτηριστικά τόσο της παχυσαρκίας όσο και της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος. Η ινσουλινοαντοχή οδηγεί αρχικά στη δημιουργία ηπατικής στεάτωσης, ενώ η φλεγμονή και η αποπώση στην εξέλιξη σε μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα. Παλαιότερα, το UPR είχε ταυτοποιηθεί μόνο ως ένας μηχανισμός που διατηρεί την ομοιόσταση του ΕΔ, όμως πολλές μελέτες έδειξαν ότι τελικά συμμετέχει και στη ρύθμιση του μεταβολισμού των ηπατικών λιπιδίων. Έτσι, μεταγενέστερα παρατηρήθηκε η ενεργοποίηση διάφορων στοιχείων του UPR στο ήπαρ ασθενών με NAFL ή NASH [1,5].

Κατ' αρχήν, το μονοπάτι PERK-eIF2α-ATF4 βρέθηκε ότι προωθεί τη λιπογένεση και την ηπατική στεάτωση μέσω της ενεργοποίησης συγκεκριμένων γονιδίων, όπως το PPARγ, SREBP-1c (sterol regulatory element-binding protein-1c), ACC (acetyl-CoA carboxylase), και FAS (fatty acid synthase). Επίσης, επειδή αυτό το μονοπάτι προκαλεί γενική αναστολή της μετάφρασης των πρωτεϊνών, σταματάει και τη μετάφραση της απολιποπρωτεΐνης apoB-100, η οποία είναι απαραίτητη για το σχηματισμό των VLDL μορίων. Έτσι, τα τριγλυκερίδια δεν μπορούν να ενσωματωθούν στα VLDL μόρια και να εκκριθούν από το ήπαρ, οπότε συσσωρεύονται και τελικά, προκαλείται ηπατική στεάτωση [1]. Ακόμα, το μονοπάτι IRE1α-XBP1 έχει

δειχθεί ότι είναι από τους κύριους ρυθμιστές της ομοιόστασης των ηπατικών λιπιδίων κάτω από συνθήκες ER stress. Αναστέλλει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη λιπογένεση, όπως το C/EBPβ, C/EBPδ, PPARγ και ενζύμων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των τριγλυκεριδίων, οπότε μειώνεται και η συσσώρευσή τους στο ήπαρ. Ταυτόχρονα, προωθεί και την έκκριση των λιποπρωτεϊνών VLDL και LDL από τα ηπατοκύτταρα. Αντίθετα, βέβαια, σε μια μελέτη βρέθηκε ότι το XBP1 ρυθμίζει την ηπατική λιπογένεση με την άμεση δέσμευσή του στους υποκινητές γονιδίων που σχετίζονται με αυτή, όπως το SCD1, DGAT2 και ACC2, ενεργοποιώντας έτσι τη μεταγραφή τους. Επομένως, η διαγραφή του γονιδίου XBP1 σε μύες οδήγησε σε μειωμένα επίπεδα τριγλυκεριδίων, χοληστερόλης και λιπαρών οξέων στο πλάσμα με τη μείωση της DNL στο ήπαρ [1,35]. Τέλος, το μονοπάτι του ATF6 παίζει κι αυτό ρόλο στη συσσώρευση των λιπιδίων κάτω από στρες του ΕΔ. Ειδικότερα, μύες που ήταν knockout για το γονίδιο ATF6 παρουσίασαν σοβαρή ηπατική βλάβη και στεάτωση, οι οποίες προκλήθηκαν από την αναστολή της β-οξειδωσης των λιπαρών οξέων και του σχηματισμού VLDL μορίων. Επίσης, στους ίδιους μύες η έκφραση του CHOP ήταν σημαντικά αυξημένη, ενώ η έκφραση των PPARα και apoB-100 ήταν μειωμένη [35].



Εικόνα 2.6 Η σύνδεση του ER stress με την ανάπτυξη και εξέλιξη της NAFLD [5]

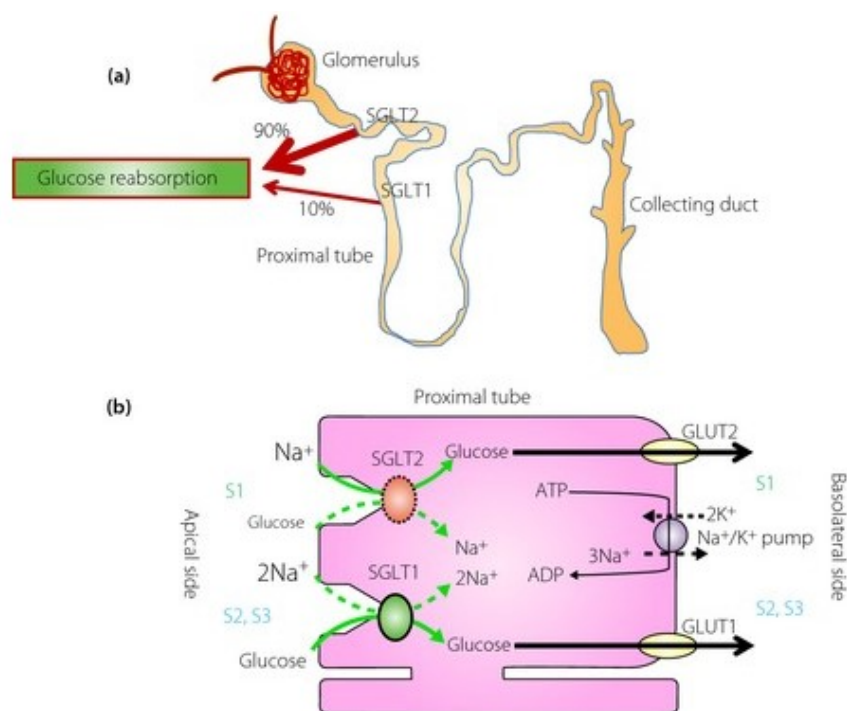
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΩΝ SGLT2 ΣΥΜΜΕΤΑΦΟΡΕΩΝ

3.1 Λειτουργία των SGLT2 συμμεταφορέων

Οι νεφροί διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο ανθρώπινο σώμα γιατί εξασφαλίζουν την απέκκριση τοξικών παραπροϊόντων του μεταβολισμού, ρυθμίζουν τη σύσταση και τον όγκο των υγρών του σώματος, συνθέτουν και εκκρίνουν ορμόνες και ρυθμίζουν την οξεοβασική ισορροπία. Επίσης, συμβάλλουν στην ομοιόσταση της γλυκόζης. Οι νεφροί φυσιολογικά φιλτράρουν περίπου 180g γλυκόζης ημερησίως μέσω των νεφρικών σπειραμάτων, ποσότητα που επαναρροφάται πλήρως στα εγγύς νεφρικά σωληνάκια. Στη συνέχεια, η γλυκόζη που επαναρροφάται, εκκρίνεται στο πλάσμα. Έτσι, υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα ούρα δεν περιέχουν γλυκόζη. Ωστόσο, όταν η συγκέντρωση γλυκόζης στο πλάσμα ξεπεράσει τον νεφρικό ουδό (180mg/dL), προκαλείται γλυκοζουρία.

Η επαναρρόφηση της γλυκόζης στα νεφρικά σωληνάκια διαμεσολαβείται από δύο ομάδες μεταφορέων, τους μεταφορείς γλυκόζης (GLUTs) και τους μεταφορείς νατρίου/γλυκόζης (SGLTs). Οι GLUTs είναι βοηθητικοί μεταφορείς, οι οποίοι μεταφέρουν τη γλυκόζη κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης, ενώ οι SGLTs μεταφέρουν τη γλυκόζη μαζί με νάτριο. Οι δύο κύριες ισομορφές των SGLTs που έχουν ταυτοποιηθεί είναι ο SGLT2, που εκφράζεται στην κορυφαία μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων των εγγύς νεφρικών σωληναρίων (κυρίως στα τμήματα S1 και S2) και ο SGLT1, ο οποίος εκφράζεται κυρίως στο λεπτό έντερο, στο τμήμα S3 του εγγύς σωληναρίου του νεφρού και στο μυοκάρδιο [36,37]. Περίπου το 90% της διηθημένης γλυκόζης επαναρροφάται στο τμήμα S1 του εγγύς σωληναρίου μέσω του μεταφορέα SGLT2, ενώ το υπόλοιπο 10% επαναρροφάται στο τμήμα S3 μέσω του μεταφορέα SGLT1 [38]. Οπότε, οι συμμεταφορείς SGLT2 φαίνεται ότι είναι οι κύριοι ρυθμιστές της ομοιόστασης της γλυκόζης, γεγονός που τους καθιστά αποτελεσματικό στόχο στη θεραπεία διάφορων ασθενειών, όπως ο διαβήτης και η NAFLD [36].

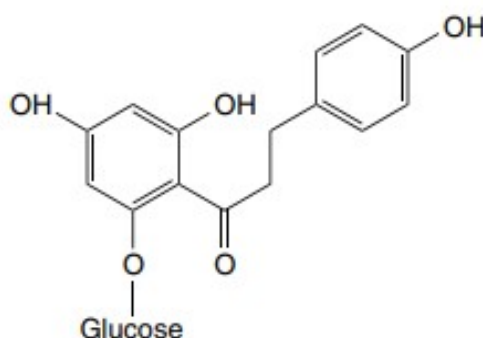


Εικόνα 3.1 Η λειτουργία των SGLT2 συμμεταφορέων γλυκόζης/νατρίου στους νεφρούς [36]

3.2 Ανάπτυξη των SGLT2 αναστολέων

Το ενδιαφέρον για τους αναστολείς των SGLT2 συμμεταφορέων προέκυψε από την εύρεση μιας ουσίας στο φλοιό των μήλων, η οποία ονομάζεται φλοριζίνη και αποτελείται από ένα δακτύλιο γλυκόζης ενωμένο μέσω οξυγόνου με δύο φαινολικούς δακτυλίους ($C_{21}H_{24}O_{10}$) (Εικόνα 3.2) [39]. Έχει βρεθεί ότι η ουσία αυτή αναστέλλει τόσο τον συμμεταφορέα νατρίου/γλυκόζης 1 (SGLT1) όσο και τον συμμεταφορέα νατρίου/γλυκόζης 2 (SGLT2) στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο του νεφρώνα αλλά έχει υψηλότερη συγγένεια για τον SGLT2. Επίσης, έχει δειχθεί ότι μπορεί να επαναφέρει στα φυσιολογικά επίπεδα τη γλυκόζη στο πλάσμα μέσω γλυκοζουρίας και να αναστρέφει την ινσουλινοαντοχή σε ζωικά μοντέλα με διαβήτη. Ωστόσο, η κλινική χρησιμότητα της πλέον δεν υφίσταται λόγω της κακής απορρόφησής της μετά την από του στόματος χορήγηση και της προκαλούμενης από αυτή αναστολής του SGLT1 συμμεταφορέα στο γαστρεντερικό σωλήνα, που οδηγεί σε ορισμένες παρενέργειες, όπως πρόκληση διαρροϊκών κενώσεων [36].

Έτσι, η φλοριζίνη αποτέλεσε το κίνητρο για τη δημιουργία των σύγχρονων SGLT2 αναστολέων, οι οποίοι παρουσιάζουν μεγαλύτερη εξειδίκευση και αποτελούν, πλέον, μια κατηγορία αντιδιαβητικών φαρμάκων, που έχει εγκριθεί για τη θεραπεία ασθενών με T2DM. Λόγω του ότι αυτή η κατηγορία φαρμάκων έχει δειχθεί ότι μπορεί να βελτιώσει τα επιπέδα γλυκόζης στο αίμα, την ηπατική λειτουργία αλλά και να μειώσει το σωματικό βάρος, εξετάζεται ως ένας πιθανός τρόπος διαχείρισης της NAFLD, δεδομένου ότι δεν υπάρχει ακόμα κάποια εγκεκριμένη θεραπεία για τη συγκεκριμένη νόσο [36,40].



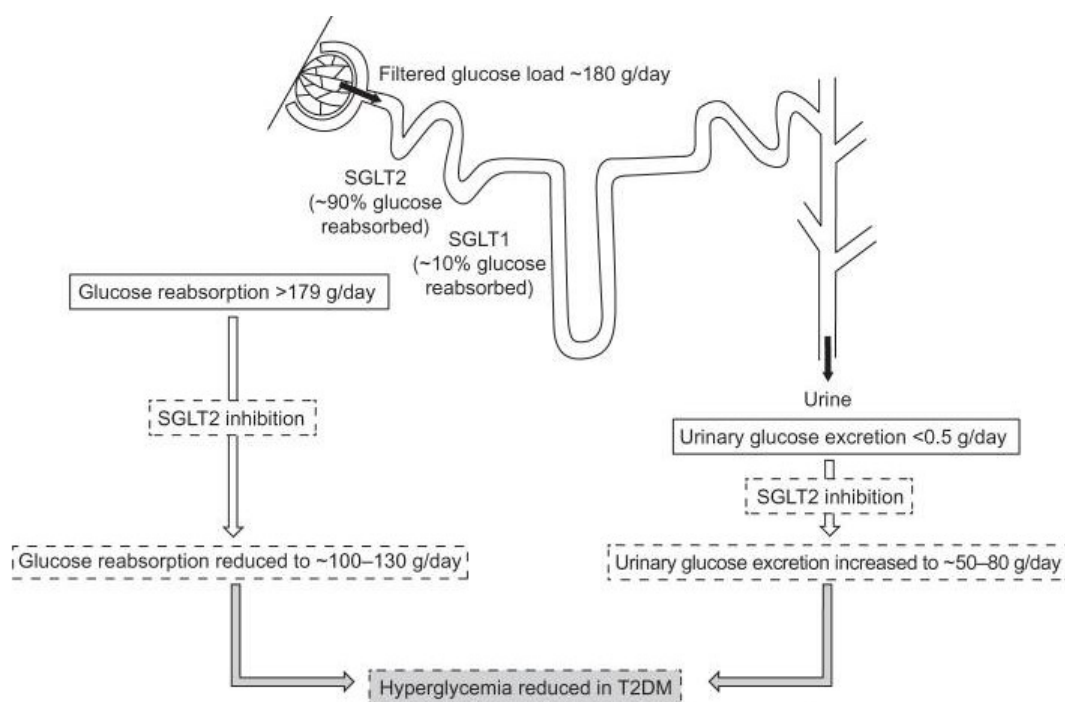
Εικόνα 3.2 Η χημική δομή της φλοριζίνης [39]

3.3 Μηχανισμός δράσης των SGLT2 αναστολέων στους νεφρούς

Οι αναστολείς του συµµεταφορέα νατρίου/γλυκόζης 2 (SGLT2 inhibitors) δρουν αναστέλλοντας την επαναρρόφηση της γλυκόζης στα εγγύς νεφρικά σωληναριακά κύτταρα μέσω των SGLT2 μεταφορέων, µε αποτέλεσµα τα επίπεδα γλυκόζης στο πλάσµα να µειώνονται σηµαντικά λόγω της απώλειας γλυκόζης στα ούρα. Είναι γνωστό ότι η απώλεια 60 έως 100g γλυκόζης την ηµέρα µε τα ούρα ισοδυναµεί µε απώλεια 240 έως 400 kcal και συνεπώς, µε σηµαντική απώλεια σωματικού βάρους. Επίσης, η χορήγηση SGLT2 αναστολέων έχει µια ευνοϊκή επίδραση στη µείωση των επιπέδων των λιπιδίων και των τριγλυκεριδίων στο αίµα, καθώς και στη µείωση του σωματικού λίπους [41]. Τέλος, παρατηρείται µείωση της αρτηριακής πίεσης, πιθανόν λόγω διούρησης, µείωσης σωματικού βάρους και διάφορων άλλων µηχανισµών. Για τους λόγους αυτούς αλλά και για το γεγονός ότι µειώνει τα επίπεδα γλυκόζης ανεξάρτητα από τη δράση της ινσουλίνης, αυτή η κατηγορία φαρµάκων χρησιµοποιείται παγκοσµίως ως θεραπεία για το

σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, αλλά εξετάζεται και η χρήση της για την αντιμετώπιση της NAFLD. Μπορεί, επιπλέον, να συνδυαστεί και με άλλες κατηγορίες φαρμάκων ώστε να αυξηθεί η αποτελεσματικότητά της [38].

Ωστόσο, παρουσία ενός SGLT2 αναστολέα, φαίνεται να αυξάνεται η επαναρρόφηση της γλυκόζης μέσω του SGLT1 συµμεταφορέα λόγω υπάρξης ενός αντισταθμιστικού µηχανισµού. Συνεπώς, µπορεί να επηρεαστεί η δράση του. Βέβαια, ο SGLT1 συµμεταφορέας, παρόλο που έχει µεγαλύτερη συνάφεια µε τη γλυκόζη από τον SGLT2, έχει µικρότερη µεταφορική δυνατότητα [42].



Εικόνα 3.3 Ο µηχανισµός δράσης των SGLT2 αναστολέων [43]

Όσον αφορά στις παρενέργειες που σχετίζονται µε τη χρήση των φαρµάκων αυτών, είναι γνωστό ότι η εμφάνισή τους οφείλεται στην αυξηµένη έκκριση γλυκόζης και νατρίου στα ούρα, γνωστή ως ωσµωτική διούρηση. Αυτή µπορεί να επιφέρει µείωση του ενδαγγειακού όγκου και της αρτηριακής πίεσης. Έχουν αναφερθεί πολλά περιστατικά λοιµώξεων του ουροποιητικού συστήµατος καθώς και των γεννητικών οργάνων που οφείλονται στην παρουσία µυκήτων λόγω της παρουσίας γλυκόζης στα ούρα, κυρίως στελέχη *Candida*. Πρόσφατα, έχει αυξηθεί ο προβληµατισµός για πιθανή πρόκληση

καρκίνου της ουροδόχου κύστης και του μαστού, ωστόσο, δεν υπάρχουν αρκετά στοιχεία ακόμα για την απόδειξή του. Επίσης, μια πολύ σημαντική παρενέργεια που ενδέχεται να εμφανιστεί είναι η διαβητική κετοξέωση (ΔΚΟ). Αυτή είναι μια οξεία μεταβολική διαταραχή, που δημιουργείται σε συνθήκες μεγάλης έλλειψης ινσουλίνης και υπερέκκρισης των ανταγωνιστικών της ορμονών [42]. Χαρακτηρίζεται από αυξημένη κυκλοφορία κετονών στο πλάσμα, που πιθανόν οφείλεται στην αυξημένη έκκριση γλυκογόνου, η οποία οδηγεί σε κετογένεση [38]. Εμφανίζεται κυρίως σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 και 2 [42].

Κάποια από τα κλινικά ευρήματα που παρατηρήθηκαν, στα πλαίσια μιας κλινικής δοκιμής, με τη χορήγηση ενός SGLT2 αναστολέα που ονομάζεται καναγλιφλοζίνη [44], ήταν οι μικρές μεταβολές στους ηλεκτρολύτες. Κάτι αντίστοιχο, βέβαια, δεν παρατηρήθηκε σε μια άλλη κλινική μελέτη, που ονομάζεται EMPA-REG outcome και αφορούσε έναν άλλον SGLT2 αναστολέα, την εμπαγλιφλοζίνη [45]. Επιπλέον, σε μια διαφορετική έρευνα, παρόλο που εμφανίστηκε αύξηση στη συγκέντρωση της HDL χοληστερόλης και μείωση στα τριγλυκερίδια, ταυτόχρονα παρατηρήθηκε ελάχιστη αύξηση και στη συγκέντρωση της LDL χοληστερόλης. Αυτό το γεγονός οδήγησε σε ανησυχία για τυχόν πρόκληση καρδιαγγειακής νόσου, ωστόσο, τα ευρήματα από την EMPA-REG outcome ανέτρεψαν την άποψη αυτή. Τέλος, τα φάρμακα αυτά ασκούν μια μεταβολική επίδραση, τόσο στη βελτίωση της ινσουλινοευαισθησίας όσο και στη μείωση της τοξικότητας της γλυκόζης [42].

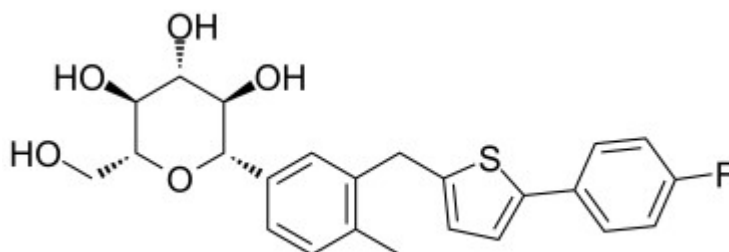
3.4 Κύριοι SGLT2 αναστολείς

Καναγλιφλοζίνη (Canagliflozin)

Τον Δεκέμβριο του 2009 ξεκίνησε μια μελέτη, που ονομάστηκε πρόγραμμα CANVAS (Canagliflozin Cardiovascular Assessment Study) και είχε ως στόχο την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας της καναγλιφλοζίνης σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, οι οποίοι είχαν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου. Στη συνέχεια, αυτή η μελέτη επεκτάθηκε για την αξιολόγηση της επίδρασης του φαρμάκου αυτού στην

αλβουμινουρία, η οποία ονομάστηκε CANVAS–R (CANVAS–Renal). Αυτή η συνολική μελέτη έδειξε ότι αυτοί οι ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με καναγλιφλοζίνη είχαν σημαντικά χαμηλότερο κίνδυνο θανάτου από καρδιαγγειακά αίτια, μη θανατηφόρο έμφραγμα του μυοκαρδίου ή μη θανατηφόρο εγκεφαλικό επεισόδιο σε σχέση με αυτούς που έλαβαν εικονικό φάρμακο. Επίσης, φάνηκε ότι η καναγλιφλοζίνη έχει και νεφροπροστατευτικές ιδιότητες [46].

Έτσι, η καναγλιφλοζίνη είναι ο πρώτος αναστολέας του SGLT2 συμμεταφορέα που εγκρίθηκε από τον παγκόσμιο οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) και είναι διαθέσιμος στην αγορά από το 2013 με το όνομα Invoکان από την εταιρεία Janssen. Η χρήση του ενδείκνυται σε ενήλικες με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 για τη βελτίωση του γλυκαιμικού ελέγχου είτε ως μονοθεραπεία (σε περιπτώσεις όπου η χρήση μετφορμίνης θεωρείται ακατάλληλη) είτε ως επιπρόσθετη θεραπεία με άλλα φάρμακα που έχουν ως στόχο τη μείωση της γλυκόζης. Η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα της σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 δεν έχουν τεκμηριωθεί ακόμα [47].

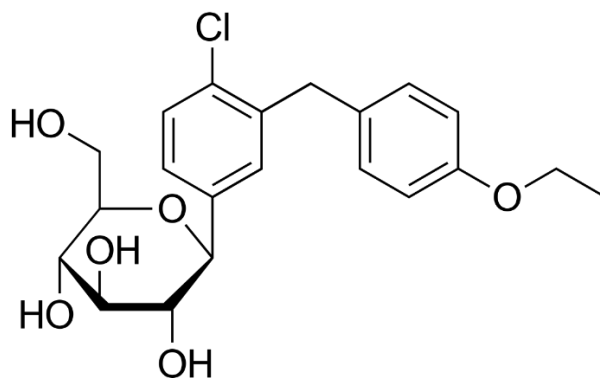


Εικόνα 3.4 Η χημική δομή της καναγλιφλοζίνης [43]

Νταπαγλιφλοζίνη (Dapagliflozin)

Η νταπαγλιφλοζίνη ανήκει στην κατηγορία των SGLT2 αναστολέων, εγκρίθηκε από το FDA το 2014 και είναι διαθέσιμη στην αγορά με το όνομα Forxiga από τις AstraZeneca / Bristol-Myers Squibb. Χρησιμοποιείται ως θεραπεία για τον διαβήτη τύπου 2, αλλά δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία για τον διαβήτη τύπου 1. Μπορεί να χορηγηθεί είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με άλλες κατηγορίες φαρμάκων για να έχει τα βέλτιστα αποτελέσματα στο γλυκαιμικό

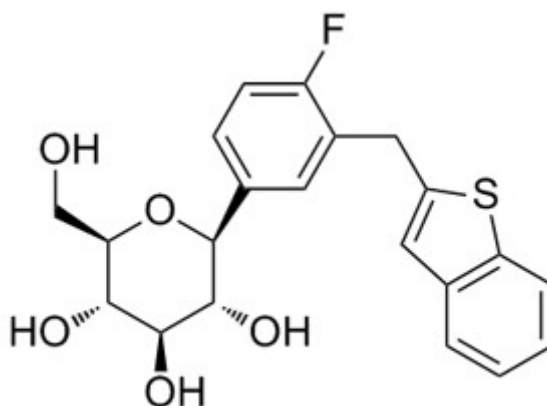
έλεγχο. Σε μια έρευνα που διεξήχθη, φάνηκε ότι η νταπαγλιφλοζίνη βελτίωσε την υπεργλυκαιμία και διευκόλυνε την απώλεια βάρους σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2, προκαλώντας ελεγχόμενη γλυκοζουρία με απώλεια ούρων ~200-300 kcal/ημέρα. Επίσης, δεν είχε καμία επίδραση στη νεφρική λειτουργία [48].



Εικόνα 3.5 Η χημική δομή της νταπαγλιφλοζίνης [43]

Ιπραγλιφλοζίνη (Ipragliflozin)

Η ιπραγλιφλοζίνη ή αλλιώς Suglat (Astellas Pharma Inc.) πήρε την πρώτη της παγκόσμια έγκριση τον Ιανουάριο του 2014 στην Ιαπωνία και κυκλοφορεί ως θεραπεία για το διαβήτη τύπου 2, όπως και οι υπόλοιποι SGLT2 αναστολείς. Μπορεί να χορηγηθεί είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με άλλους υπογλυκαιμικούς παράγοντες (μετφορμίνη, πιογλιταζόνη κ.α.). Πρόσφατα, τον Μάιο του 2019 εγκρίθηκε και στη Ρωσία [49].



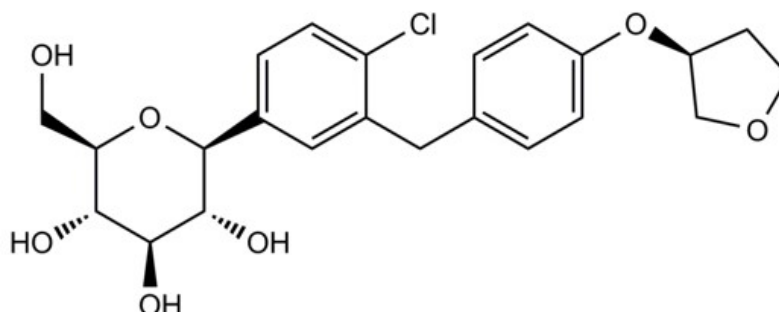
Εικόνα 3.6 Η χημική δομή της ιπραγλιφλοζίνης [49]

Εμπαγλιφλοζίνη (Empagliflozin)

Η εμπαγλιφλοζίνη (Jardiance, Boehringer Ingelheim) είναι ένας ιδιαίτερα ισχυρός, εκλεκτικός, ανταγωνιστικός αναστολέας του SGLT2 συμμεταφορέα γλυκόζης/νατρίου, που εγκρίθηκε τον Αύγουστο του 2014 από τον παγκόσμιο οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA). Σε μια προκλινική μελέτη που διεξήχθη από τους Grempler et al., φάνηκε ότι η εμπαγλιφλοζίνη είχε την υψηλότερη εκλεκτικότητα για τον SGLT2 έναντι του SGLT1 συμμεταφορέα (περισσότερο από 2.500 φορές) σε σύγκριση με τη νταπαγλιφλοζίνη (περισσότερο από 1.200 φορές) και την καναγλιφλοζίνη (περισσότερο από 250 φορές). Χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άσκηση και δίαιτα για τη βελτίωση του γλυκαιμικού ελέγχου σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, οι οποίοι έχουν φυσιολογική νεφρική λειτουργία. Επίσης, χορηγείται είτε ως μονοθεραπεία όταν η μετφορμίνη θεωρείται ακατάλληλη λόγω δυσανεξίας είτε επιπρόσθετα με άλλα φαρμακευτικά προϊόντα. Σε ασθενείς με ΣΔΤ2, η εμπαγλιφλοζίνη βρέθηκε ότι μειώνει τα επίπεδα μεταγευματικής γλυκόζης και γλυκόζης νηστείας με: 1) αύξηση της ολικής έκκρισης γλυκόζης, 2) βελτίωση της λειτουργίας των β-κυττάρων και 3) εναλλαγή από τη χρησιμοποίηση γλυκόζης σε μεταβολική χρήση λιπιδίων, παρά την αντισταθμιστική αύξηση στην ενδογενή παραγωγή γλυκόζης [50].

Η EMPA-REG outcome ήταν μια μεγάλη κλινική μελέτη που ξεκίνησε το 2010 και τελικά δημοσιεύθηκε το 2015. Σκοπός της ήταν η αξιολόγηση της επίδρασης της εμπαγλιφλοζίνης έναντι ενός εικονικού φαρμάκου στην καρδιαγγειακή νόσο. Αφορούσε ασθενείς, οι οποίοι είχαν σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου. Η έρευνα αυτή αποκάλυψε ότι η εμπαγλιφλοζίνη παρουσιάζει μέτρια επίδραση στη μείωση της πίεσης του αίματος, χωρίς να επηρεάζει τον καρδιακό ρυθμό, ενώ προκαλεί απώλεια βάρους, μείωση του ουρικού οξέος και μικρές αυξήσεις στις συγκεντρώσεις της LDL και HDL χοληστερόλης. Η μείωση της αρτηριακής πίεσης προκαλεί βελτίωση της ροής του αίματος, συμβάλλοντας έτσι στη βελτιστοποίηση της καρδιακής απόδοσης και στη μείωση του κινδύνου για εμφάνιση καρδιακής ανεπάρκειας. Ακόμα, φάνηκε ότι η χρήση εμπαγλιφλοζίνης δημιουργεί χαμηλότερο κίνδυνο θανάτου από καρδιαγγειακά αίτια, μη θανατηφόρο έμφραγμα του μυοκαρδίου ή μη θανατηφόρο

εγκεφαλικό επεισόδιο σε σχέση με το εικονικό φάρμακο [45]. Τέλος, η εμφάνιση σοβαρών παρενεργειών στους ασθενείς που έλαβαν εμπαγλιφλοζίνη, ήταν μικρότερη σε σχέση με άλλους αναστολείς του SGLT2 συμμεταφορέα [42].



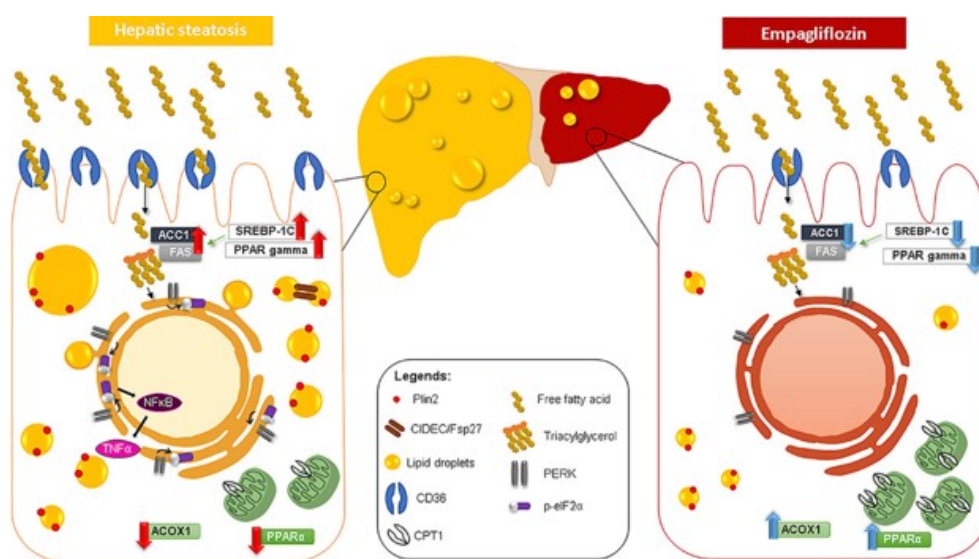
Εικόνα 3.7 Η χημική δομή της εμπαγλιφλοζίνης [43]

3.5 Εμπαγλιφλοζίνη και NAFLD

Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, οι μηχανισμοί παθογένεσης του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 είναι άμεσα συνδεδεμένοι με την ανάπτυξη και εξέλιξη της NAFLD. Σε άτομα με ΣΔΤ2 και παράλληλα αυξημένα επίπεδα ηπατικών ενζύμων ή NAFLD, η βελτίωση του γλυκαιμικού ελέγχου μπορεί να είναι σημαντική για την καθυστέρηση της εξέλιξης της ηπατικής νόσου από απλή στεάτωση σε NASH. Βρέθηκε ότι οι υπογλυκαιμικοί παράγοντες, πιογλιταζόνη και λιραγλουτίδη, μειώνουν τα επίπεδα λιπιδίων στο ήπαρ σε άτομα με NASH με ή χωρίς διαβήτη τύπου 2, αλλά οι επιδράσεις νεότερων παραγόντων στα ηπατικά λιπίδια είναι λιγότερο μελετημένες.

Ένας από αυτούς τους νεότερους παράγοντες είναι οι SGLT2 αναστολείς, οι οποίοι μειώνουν την υπεργλυκαιμία σε άτομα με διαβήτη τύπου 2, καθώς αναστέλλουν την επαναρρόφηση της γλυκόζης στους νεφρούς και αυξάνουν την απέκκρισή της στα ούρα, μειώνοντας έτσι τα επίπεδα της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c). Η εμπαγλιφλοζίνη, ένας εξαιρετικά επιλεκτικός αναστολέας του SGLT2 συμμεταφορέα, ήταν ο πρώτος παράγοντας μείωσης της γλυκόζης, που είχε θετική επίδραση σε άτομα με διαβήτη τύπου 2 και καρδιαγγειακή νόσο. Δεδομένα από τρεις διαφορετικές κλινικές μελέτες σε ασθενείς με ΣΔΤ2 υποδεικνύουν ότι η εμπαγλιφλοζίνη

ασκεί σημαντική μείωση των επιπέδων ηπατικών ενζύμων, όπως της τρανσαμινάσης ALT και λιγότερο της τρανσαμινάσης AST, ενδείξεις που συμβαδίζουν με τη μείωση του ηπατικού λίπους [51]. Επίσης, σε αρκετές μελέτες έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με την απώλεια βάρους, πιθανώς λόγω της οσμωτικής διούρησης, καθώς και με τη βελτίωση της ινσουλινοαντίστασης και της λιποτοξικότητας, μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο την απόπτωση και τη φλεγμονή των ηπατοκυττάρων [52]. Η μείωση της υπεργλυκαιμίας αναστέλλει την πρωτεΐνη ChREBP, που είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας υπεύθυνος για την ενεργοποίηση της σύνθεσης λιπαρών οξέων. Επιπρόσθετα, η βελτίωση της αντίστασης στην ινσουλίνη οδηγεί σε αναστολή του μεταγραφικού παράγοντα SREBP-1c και τελικά σε καταστολή της *de novo* λιπογένεσης στο ήπαρ [53]. Άλλες δράσεις της εμπαγλιφλοζίνης που πιστεύεται ότι συμβάλλουν στην αντιμετώπιση της NAFLD είναι η μείωση των φλεγμονωδών βιοδεικτών, του οξειδωτικού στρες, της λιπογένεσης, του στρες του ΕΔ και η αύξηση της β-οξειδωσης των ελεύθερων λιπαρών οξέων [54].



Εικόνα 3.8 Υποθετικό μοντέλο για τη δράση της εμπαγλιφλοζίνης στη λιπώδη διήθηση [54]

Βάσει των παραπάνω δεδομένων, προκύπτει ότι η εμπαγλιφλοζίνη θα μπορούσε να αποτελέσει ένα πολλά υποσχόμενο φάρμακο για τη βελτίωση της ηπατικής στεάτωσης και της επακόλουθης φλεγμονής και ίνωσης σε ασθενείς με NAFLD, σε συνδυασμό με άλλη αγωγή ή χωρίς.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι αναστολείς του SGLT2 συµµεταφορέα αποτελούν µια από τις κατηγορίες υπογλυκαιµικών παραγόντων, που χρησιµοποιούνται για την αντιµετώπιση του ΣΔΤ2 (µε ή χωρίς την παρουσία NAFLD), καθώς µειώνουν τα επίπεδα της γλυκόζης στην κυκλοφορία του αίµατος µέσω γλυκοζουρίας. Πρόσφατα, αναγνωρίστηκε η δράση τους και στη βελτίωση της ινσουλινοαντίστασης, η οποία αποτελεί τον κύριο µηχανισµό για την ανάπτυξη και εξέλιξη της NAFLD. Ωστόσο, δεν έχει µελετηθεί ακόµα το αν η µακροχρόνια χορήγηση αυτών των αναστολέων έχει θετική ή αρνητική επίδραση σε µηχανισµούς που εµπλέκονται στην NAFLD, όπως το στρες του ΕΔ και η απόπτωση.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η σύγκριση της αποτελεσµατικότητας της µακροχρόνιας και της βραχυχρόνιας χορήγησης ενός SGLT2 αναστολέα στη λιπώδη διήθηση, καθώς και στην εξέλιξη της µη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος σε APOE knockout µοντέλο µυός, που θα λάβει ταυτόχρονα αθηρογόνο δίαιτα. Πιο συγκεκριµένα, θα γίνει ιστοµορφοµετρική µελέτη για έλεγχο συσσώρευσης λιπιδίων και εμφάνισης αεροσφαιροειδών κυττάρων (ballooning cells) στο ήπαρ των µυών αυτών, οι οποίοι θα έχουν λάβει εµπαγλιφλοζίνη για 5 και 10 εβδοµάδες, καθώς και για τις αντίστοιχες οµάδες ελέγχου. Επίσης, θα προσδιοριστούν βιοχηµικοί δείκτες στον ορό όπως τα επίπεδα γλυκόζης, HDL, LDL, ολικής χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων, προκειµένου να εντοπιστούν πιθανές µεταβολές που οφείλονται στη χορήγηση του φαρµάκου αλλά και διαφορές που µπορεί να έχουν προκύψει από την αρχή ως το τέλος της παρέµβασης σε όλες τις οµάδες µυών. Τέλος, θα µελετηθεί η επίδραση της εµπαγλιφλοζίνης για µικρή και µεγάλη χρονική περίοδο σε λειτουργίες που εµπλέκονται στην παθογένεια της NAFLD, όπως το στρες του ΕΔ. Έτσι, θα προσδιοριστεί στο ήπαρ η έκφραση γονιδίων που συµµετέχουν στα σηµατοδοτικά μονοπάτια του ER stress.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

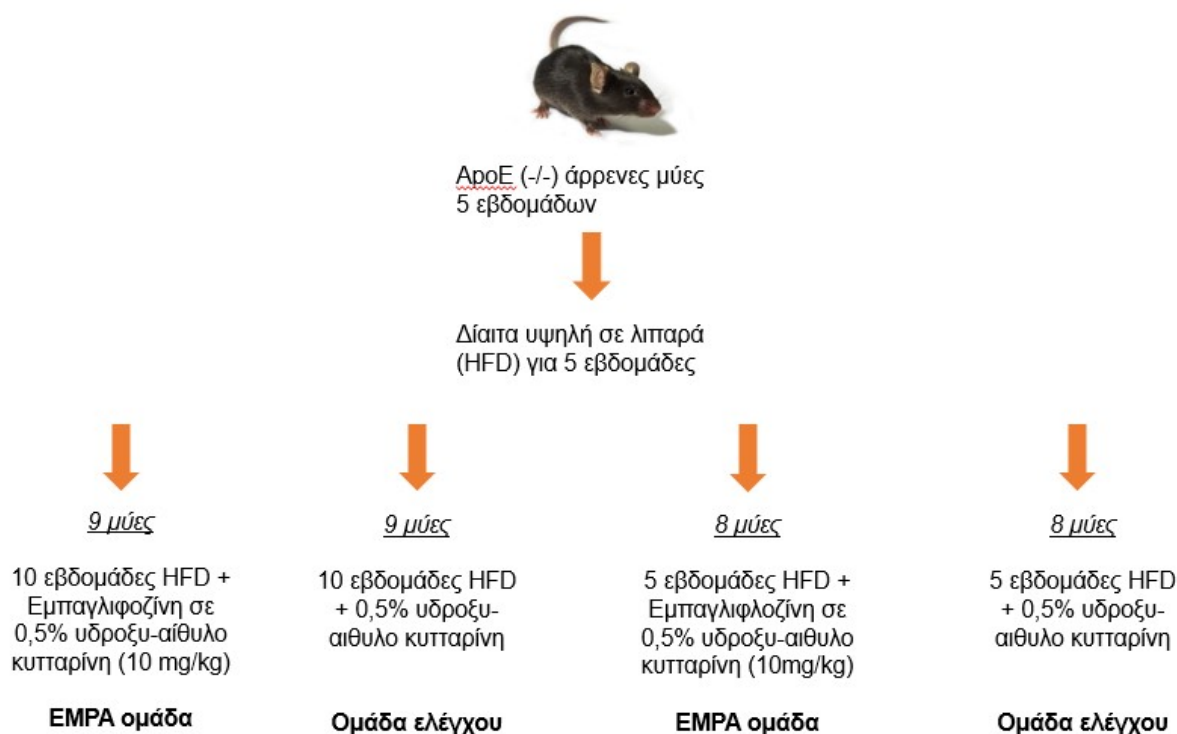
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Δείγματα

5.1.1 Πειραματόζωα

Για τη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν C57BL/6 μύες knockout για το γονίδιο της απολιποπρωτεΐνης E (Apo-E(-/-)), ένα μοντέλο που χρησιμοποιείται κυρίως για τη μελέτη της αθηροσκλήρωσης, αλλά μπορεί να εφαρμοστεί και στη μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος. Όλοι οι μύες στεγάστηκαν στο Εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Έρευνας «Ν.Σ.Χρηστέας», που βρίσκεται στην Ιατρική Σχολή Αθηνών, σε ειδικά κλουβιά - ελεύθερα παθογόνων - και είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και τροφή. Η θερμοκρασία ήταν σταθερή ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), η σχετική υγρασία περίπου $55\pm 5\%$ και διατηρούταν 12ωρος κύκλος φωτός/σκοταδιού. Οι επισκέψεις γίνονταν δύο φορές την εβδομάδα για την παρακολούθηση της υγείας των ζώων.

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν 34 άρρενες μύες ηλικίας 5 εβδομάδων. Αρχικά, έγινε αλλαγή στη διατροφή τους από κανονική σε αθηρογόνο (high fat diet - HFD), η περιεκτικότητα της οποίας ήταν 41.5% kcal λίπους και 1.5% χοληστερόλης (w/w) και διήρκησε 5 εβδομάδες για όλους τους μύες. Στη συνέχεια, χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες ανάλογα με την αγωγή που τους χορηγήθηκε. Οι δύο από αυτές ήταν οι ομάδες ελέγχου, στις οποίες χορηγούταν 0,5% υδροξυαιθυλοκυτταρίνη/ημέρα για 5 και 10 εβδομάδες και οι άλλες δύο ήταν οι ομάδες παρέμβασης, στις οποίες χορηγούταν εμπαγλιφλοζίνη διαλυμένη σε 0.5% υδροξυαιθυλοκυτταρίνη σε δόση των 10mg/kg ανά ημέρα, *per os*, για διάστημα 5 και 10 εβδομάδων αντίστοιχα. Σε όλη τη διάρκεια των παρεμβάσεων, η δίαιτα των μυών παρέμεινε αθηρογόνος. Μετά από 5 και 10 εβδομάδες, τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν και το ήπαρ απομονώθηκε.



Σχήμα 5.1 Πειραματικός σχεδιασμός

5.1.2 Απομόνωση ορού από ολικό αίμα μυών

Η απομόνωση ολικού αίματος από τους μύες επιτεύχθηκε μέσω χορήγησης αναισθησίας με υποδόρια ένεση κεταμίνης (100 mg/kg) και ακολούθησε λήψη αίματος από την καρδιά. Οι οροί διαχωρίστηκαν με φυγοκέντρηση στα 700-800g για 10min και αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

5.1.3 Μονιμοποίηση ιστού

Οι ιστοί, που απομονώθηκαν από τα πειραματόζωα, μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα 10% φορμαλίνης, αφυδατώθηκαν και παραφιντοποιήθηκαν. Τομές 0,4mm από κάθε ιστό εγκλεισμένο σε παραφίνη τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα επικαλυμμένη με πολύ-L-λυσίνη. Επίσης, ένα μέρος από τους ιστούς αποθηκεύτηκε σε υγρό άζωτο για να χρησιμοποιηθεί για ποσοτική PCR (qPCR).

5.2 Πειραματική Πορεία

5.2.1 Απομόνωση ολικού RNA από ιστό

Για την απομόνωση του ολικού RNA από το ήπαρ των μυών χρησιμοποιήθηκε το Monarch Total RNA Miniprep Kit από τη New England Biolabs.

Υλικά

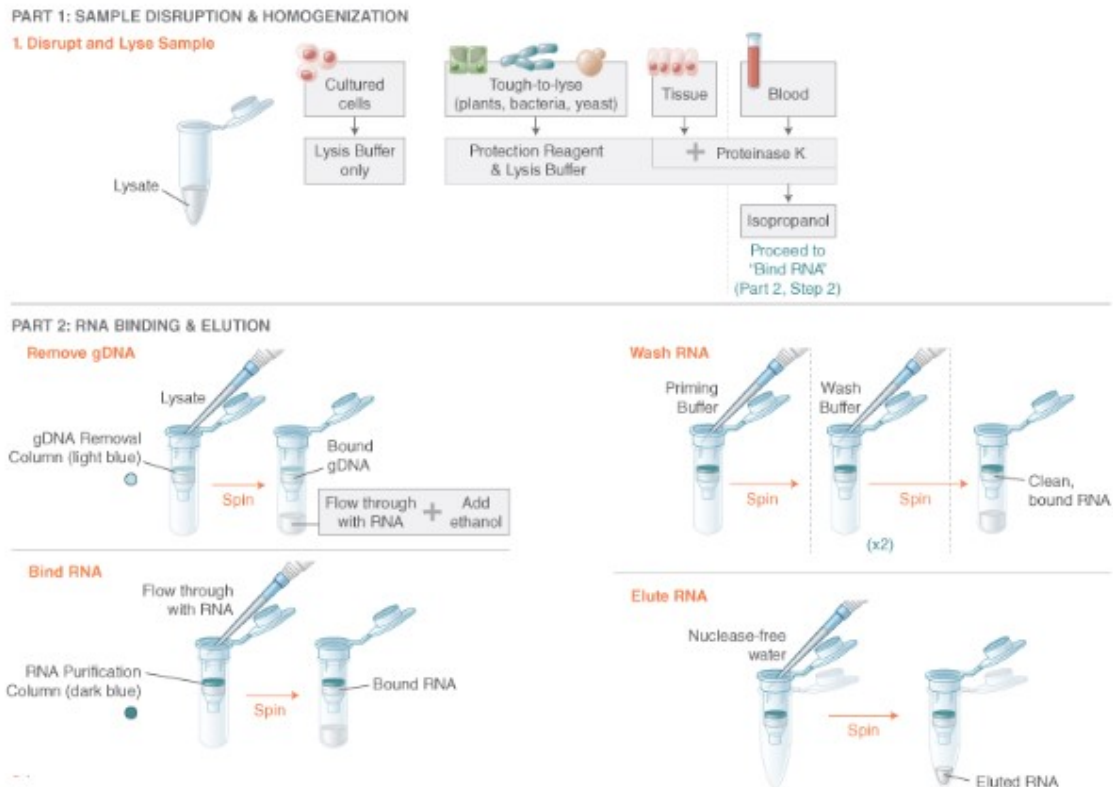
- Monarch DNA/RNA Protection Reagent
- Monarch Proteinase K
- Monarch Proteinase K Resuspension Buffer
- Monarch Proteinase K Reaction Buffer
- Monarch RNA Lysis Buffer
- αιθανόλη ($\geq 95\%$)
- Monarch RNA Priming Buffer
- Monarch RNA Wash Buffer
- Monarch Nuclease-free Water
- Monarch Collection Tubes II (μικροσωλήνες συλλογής)
- Monarch gDNA Removal Columns (στήλες απομόνωσης του γενωμικού DNA)
- Monarch RNA Purification Columns (στήλες καθαρισμού του RNA)
- Monarch DNase I
- Monarch DNase I Reaction Buffer

Περιγραφή της μεθόδου

1. Κόψιμο ενός τμήματος του ήπατος (~50mg) από κάθε δείγμα και προσθήκη 400μL 1X DNA/RNA Protection Reagent σε καθένα (φύλαξη σε μικροσωλήνες τύπου cryovial στους -20°C).
2. Ομογενοποίηση των ιστών και μεταφορά τους σε καινούριους μικροσωλήνες τύπου eppendorf με ταυτόχρονη προσθήκη Proteinase K Reaction Buffer και Proteinase K σε καθένα. Πιο συγκεκριμένα, για κάθε 300μL μίγματος DNA/RNA Protection Reagent/δείγμα,

προσθέτουμε 30μL Proteinase K Reaction Buffer και 15μL Proteinase K.

3. Σύντομη ανάδευση και επώαση στους 55°C για 5min.
4. Σύντομη ανάδευση και φυγοκέντρηση στα 13.000g για 2min.
5. Απομόνωση υπερκείμενου υγρού σε καινούριους μικροσωλήνες τύπου erppendorf για όλα τα δείγματα.
6. Προσθήκη ίσης ποσότητας RNA Lysis Buffer και σύντομη ανάδευση.
7. Μεταφορά μέχρι 800μL από κάθε δείγμα σε στήλες απομόνωσης του γενωμικού DNA, που έχουν τοποθετηθεί σε μικροσωλήνες συλλογής.
8. Φυγοκέντρηση στα 13.000g για 30s. Αποθήκευση εκλούσματος και απόρριψη των στηλών.
9. Προσθήκη ίσης ποσότητας αιθανόλης ($\geq 95\%$) και ανάδευση με πιπέτα.
10. Μεταφορά του μίγματος έκλουσμα/αιθανόλη σε στήλες καθαρισμού του RNA, που έχουν τοποθετηθεί σε μικροσωλήνες συλλογής.
11. Φυγοκέντρηση στα 13.000g για 30s. Απόρριψη του εκλούσματος.
12. Προσθήκη 500μL RNA Priming Buffer και φυγοκέντρηση για 30s. Απόρριψη του εκλούσματος.
13. Προσθήκη 500μL RNA Wash Buffer και φυγοκέντρηση για 30s. Απόρριψη του εκλούσματος.
14. Προσθήκη επιπλέον 500μL RNA Wash Buffer και φυγοκέντρηση για 2min. Μεταφορά των στηλών καθαρισμού του RNA σε καινούριους RNase-free μικροσωλήνες τύπου erppendorf.
15. Προσθήκη 30-100μL nuclease-free νερού στο κέντρο της στήλης και φυγοκέντρηση για 30s.
16. Απόρριψη των στηλών καθαρισμού του RNA και αποθήκευση του εκλούσματος σε πάγο για άμεση χρήση ή στους -20°C για βραχυπρόθεσμη αποθήκευση.



Σχήμα 5.2 Διαδοχικά βήματα απομόνωσης ολικού RNA από ιστό

5.2.2 RT-PCR (Reverse Transcription – PCR)

Αρχή της μεθόδου

Η εκτίμηση της καθαρότητας του RNA γίνεται με τη μέτρηση του λόγου των απορροφήσεων που λαμβάνονται στα 260 nm και στα 280 nm με τη χρήση του φασματοφωτομέτρου NanoDrop. Ο λόγος A_{260}/A_{280} θα πρέπει να έχει τιμή περίπου 2 οπότε το δείγμα γίνεται αποδεκτό. Στη συνέχεια, γίνεται σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (cDNA) έχοντας ως εκμαγείο το μόριο RNA από κάθε δείγμα με τη χρήση της τροποποιημένης αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού Moloney της λευχαιμίας των ποντικών (Moloney Murine Leukemia Virus transcriptase). Το ένζυμο αυτό συνθέτει τον ένα κλώνο cDNA με υπόστρωμα μονόκλωνο RNA, στο οποίο έχουν υβριδοποιηθεί τα τυχαία συνθετικά μόρια εκκινητών. Το νεοσυντιθέμενο cDNA μπορεί έπειτα να πολλαπλασιαστεί με PCR.

Υλικά

- LunaScript RT SuperMix 5X
- Nuclease-free νερό
- Δείγματα ολικού RNA με συγκέντρωση έως 1000ng/μl

Περιγραφή της μεθόδου

1. Για κάθε δείγμα RNA, προστίθενται σε ένα μικροσωλήνα τύπου erppendorf όλα τα αντιδραστήρια, που βρίσκονται στον πίνακα 1. Το LunaScript RT SuperMix 5X περιέχει νουκλεοτίδια (dNTPs) ώστε να γίνει η επιμήκυνση του cDNA, τη θερμοσταθερή αντίστροφη μεταγραφάση, η οποία επιτρέπει τη σύνθεση του cDNA σε υψηλές θερμοκρασίες, έναν RNase αναστολέα μυός που προστατεύει το εκμαγείο RNA από τη διαδικασία αποικοδόμησης, μίγμα τυχαίων εξανουκλεοτιδικών και ολιγο(dT) εκκινητών, επιτρέποντας ομοιόμορφη κάλυψη σε όλο το μήκος των RNA-στόχων και τέλος, μια μπλε χρωστική, που παρέχει οπτική ένδειξη.

Πίνακας 5.1 Μίγμα αντιδραστηρίων για RT-PCR

Μίγμα αντιδραστηρίων	Όγκος ανά αντίδραση,μl
LunaScript RT SuperMix 5X	4μl
Δείγμα RNA	μεταβαλλόμενος
Nuclease-free νερό	ως τα 20μl

2. Τα δείγματα επωάζονται στους 25°C για 2min σε ειδικό θερμοκυκλοποιητή (thermal cycler) ώστε να γίνει υβριδοποίηση των εκκινητών στη συμπληρωματική τους αλληλουχία του RNA.
3. Στη συνέχεια, τα δείγματα θερμαίνονται στους 55°C για 10min ώστε να ξεκινήσει η πρόσδεση των dNTPs στις μονόκλωνες αλυσίδες RNA με τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης και να ξεκινήσει η σύνθεση του cDNA.

4. Τέλος, στους 95°C για 1min γίνεται αποδιάταξη του RNA και αυτό απομακρύνεται μαζί με το ένζυμο, το οποίο έχει απενεργοποιηθεί λόγω της υψηλής θερμοκρασίας. Έτσι, προκύπτει το cDNA, το οποίο στη συνέχεια ενισχύεται μέσω PCR με τη χρήση ειδικών εκκινητών.

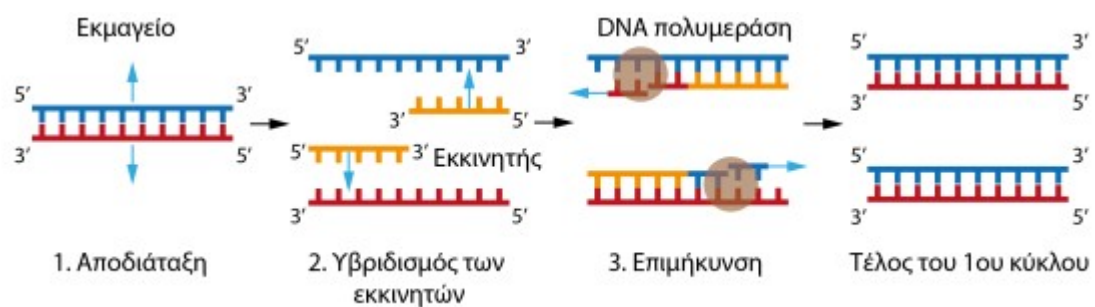
5.2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time Polymerase Chain Reaction, qPCR)

Αρχή της μεθόδου

Η real-time PCR ή αλλιώς ποσοτική PCR αναπτύχθηκε ως μια ακριβής, αποτελεσματική και ταχεία μέθοδος ταυτόχρονης ενίσχυσης και ποσοτικής ανίχνευσης ενός νουκλεϊκού οξέος. Πιο συγκεκριμένα, επιτρέπει την επιλεκτική ενίσχυση ενός τμήματος DNA που βρίσκεται μεταξύ δύο περιοχών γνωστής αλληλουχίας και τη μέτρηση των προϊόντων ενίσχυσης σε πραγματικό χρόνο, δηλαδή κατά τη διάρκεια της εξέλιξής της. Η ενίσχυση του τμήματος DNA πραγματοποιείται με τη χρήση ειδικών συνθετικών ολιγοδεοξυριβονουκλεοτιδίων που ονομάζονται εκκινητές (primers), οι οποίοι είναι απόλυτα συμπληρωματικοί με τις δύο μονόκλωνες αλυσίδες του εκμαγείου DNA. Η ανίχνευση των ενισχυμένων προϊόντων βασίζεται στην ιχνηθέτησή τους με φθορίζουσα χρωστική που ανιχνεύεται από το οπτικό σύστημα ειδικού θερμικού κυκλοποιητή, μια συσκευή που φέρει θερμαινόμενη πλάκα που μπορεί να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια. Ο θερμικός κυκλοποιητής μπορεί να προγραμματιστεί, ρυθμίζοντας την επιθυμητή θερμοκρασία και τη διάρκεια κάθε σταδίου αλλά και τη διαδοχή τους. Η ισχύς της έντασης φθορισμού είναι ανάλογη με τον αριθμό των ενισχυμένων μορίων. Το κύριο προϊόν της αντίδρασης PCR είναι ένα δίκλωνο μόριο DNA, το οποίο αποτελεί την απόσταση μεταξύ των 5' άκρων των εκκινητών που χρησιμοποιούνται. Επιπλέον, προϊόντα λίγο μεγαλύτερου μεγέθους παράγονται αλλά σε αμελητέα ποσότητα, καθώς δεν πολλαπλασιάζονται εκθετικά όπως συμβαίνει με την αλληλουχία-στόχο. Η αντίδραση PCR αποτελείται από επαναλαμβανόμενους θερμικούς κύκλους, καθένας από τους οποίους περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1. Θερμική αποδιάταξη των αλυσίδων του υποστρώματος DNA σε θερμοκρασία 95°C.
2. Υβριδισμός των εκκινητών στους συμπληρωματικούς κλώνους του υποστρώματος DNA, που πραγματοποιείται σε εύρος θερμοκρασιών 52°C - 64°C.
3. Επιμήκυνση των εκκινητών και αντιγραφή του τμήματος DNA που θα ενισχυθεί, που λαμβάνουν χώρα σε θερμοκρασία 72°C.

Τα παραπάνω στάδια θέρμανσης-ψύξης επαναλαμβάνονται πολλές φορές (28-40 κύκλοι) με σκοπό τον εκθετικό πολλαπλασιασμό του επιθυμητού τμήματος DNA. Το ευρέως χρησιμοποιούμενο ένζυμο πολυμερισμού είναι η Taq πολυμεράση, η οποία έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus* και έχει μέγιστη απόδοση στους 72°C, ενώ ο χρόνος ημιζωής της είναι 40min στους 95°C. Η Taq πολυμεράση επιμηκύνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) με κατεύθυνση 5'-3', χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο. Το ένζυμο αυτό αντιγράφει το DNA με ταχύτητα περίπου 1000 βάσεις ανά λεπτό. Οπότε, το διάλυμα της αντίδρασης περιέχει το υπόστρωμα DNA, το ζεύγος ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών, το μίγμα των τεσσάρων dNTPs, το ρυθμιστικό διάλυμα για διατήρηση σταθερού pH, ιόντα Mg^{2+} και την Taq πολυμεράση.



Σχήμα 5.3 Τα στάδια της αντίδρασης PCR

Η επιτυχία της τεχνικής PCR βασίζεται στα ακόλουθα κρίσιμα σημεία:

- Επιλογή της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού των εκκινητών στην αλληλουχία DNA-στόχο, η οποία εξαρτάται από το μέγεθος των

εκκινητών και την περιεκτικότητά τους σε ζεύγη γουανίνης και κυτοσίνης. Είναι σημαντικό να μην είναι πολύ χαμηλότερη της θερμοκρασίας τήξης των εκκινητών διότι σε αυτή την περίπτωση ευνοείται η παραγωγή μη ειδικών προϊόντων πολυμερισμού. Αντίθετα, μια υψηλότερη θερμοκρασία της βέλτιστης είναι πιθανό να μην οδηγήσει σε παραγωγή προϊόντος πολυμερισμού.

- Η επιλογή του χρόνου επιμήκυνσης των εκκινητών κατά το τρίτο στάδιο πρέπει να κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 30-60sec ανάλογα με την απόσταση μεταξύ του ζεύγους εκκινητών και επομένως με το μέγεθος του προϊόντος πολυμερισμού.
- Ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης πρέπει να είναι ο ελάχιστος δυνατός, με σκοπό την αποφυγή λαθών κατά την αντιγραφή και παραγωγής μη ειδικών προϊόντων.
- Η αρχική ποσότητα του DNA πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 10-500ng ανάλογα με την καθαρότητά του και τον αριθμό των αντιγράφων του τμήματος προς ενίσχυση.
- Τα ιόντα Mg^{2+} αποτελούν συμπαραγόντα της DNA πολυμεράσης και είναι σημαντικά για την ειδικότητα της πρόσδεσης των εκκινητών στο υπόστρωμα DNA και την απόδοση του ενζύμου. Περίσσεια Mg^{2+} οδηγεί σε μη ειδική σύνδεση των εκκινητών με το DNA, αυξάνοντας τα μη ειδικά προϊόντα στην αντίδραση. Επίσης, μειώνει την πιστότητα αντιγραφής της Taq πολυμεράσης. Χαμηλές συγκεντρώσεις Mg^{2+} οδηγούν σε μείωση της ποσότητας του παραγόμενου προϊόντος ενίσχυσης. Η βέλτιστη συγκέντρωση $MgCl_2$ για κάθε αντίδραση PCR πρέπει να κυμαίνεται από 1 έως 4mM.
- Οι εκκινητές πρέπει να έχουν μήκος 18-30 νουκλεοτίδια, ώστε να επιτρέπουν τη χρήση μιας λογικά υψηλής θερμοκρασίας αποδιάταξης κατά τη διάρκεια της PCR. Η τελική τους συγκέντρωση πρέπει να κυμαίνεται από 0,1μM έως 1μM. Επίσης, είναι απαραίτητο τα ζεύγη των εκκινητών να έχουν περίπου το ίδιο μήκος, η αλληλουχία τους να περιέχει 40-60% GC, να μην έχουν συμπληρωματικότητα κυρίως στα 3' άκρα τους προς αποφυγή σχηματισμού διμερών εκκινητών και να μην εμφανίζουν δευτεροταγείς δομές.

- Τα dNTPs που χρησιμοποιούνται ως ισομοριακό μίγμα των τεσσάρων νουκλεοτιδίων (ATP, TTP, CTP και GTP) πρέπει να κυμαίνονται σε συγκεντρώσεις 80-800μM.

Η real-time PCR είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική κι αυτό οφείλεται στο ότι διαθέτει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες παρόμοιες τεχνικές. Ορισμένα από αυτά είναι η δυνατότητα ενίσχυσης της αλληλουχίας-στόχου ακόμα και όταν το αρχικό εκμαγείο DNA βρίσκεται σε μικρή ποσότητα ή περιορισμένη καθαρότητα, η αυξημένη ευαισθησία και ακρίβεια, το μικρό κόστος, η ευκολία στα βήματα και η ταχύτητά της.

Ποσοτική PCR με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green

Υλικά

- Luna Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs)
- Ζεύγος εκκινητών (primers) αρχικής συγκέντρωσης 10μM (Integrated DNA Technologies-IDT)
- Αποστειρωμένο ddH₂O
- Δείγματα cDNA με συγκέντρωση έως 1000ng/μl

Περιγραφή της μεθόδου

1. Αραιώνω 20μl από κάθε δείγμα cDNA με 80μl αποστειρωμένο ddH₂O σε μικροσωλήνες τύπου erppendorf και κάνω σύντομη ανάδευση.
2. Κάνω αραίωση 1:10 σε κάθε ζεύγος εκκινητών με αποστειρωμένο ddH₂O.
3. Σε καινούριο μικροσωλήνα τύπου erppendorf προστίθενται το Luna Universal qPCR Mix, οι δύο αραιωμένοι εκκινητές και το ddH₂O. Το Luna Universal qPCR Mix περιέχει όλα τα συστατικά της PCR που απαιτούνται για την ενίσχυση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του DNA εκτός από τους εκκινητές και την αλληλουχία DNA-στόχο.
4. Σε ειδικές πλάκες 96 θέσεων προστίθενται 16μl από το μίγμα του παραπάνω μικροσωλήνα τύπου erppendorf και 4 μl από το δείγμα cDNA σύμφωνα με τον πίνακα 2. Το βήμα αυτό πραγματοποιείται δύο φορές για κάθε δείγμα.

Πίνακας 5.2 Μίγμα αντιδραστηρίων qPCR

ΜΙΓΜΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ	ΟΓΚΟΣ ΑΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ,ML
LUNA UNIVERSAL QPCR MIX	10
FORWARD PRIMER (10MM)	0.3
REVERSE PRIMER (10MM)	0.3
ΔΕΙΓΜΑ CDNA	4
DDH ₂ O	5.4

Στον ειδικό θερμοκυκλοποιητή ρυθμίζεται το παρακάτω πρόγραμμα:

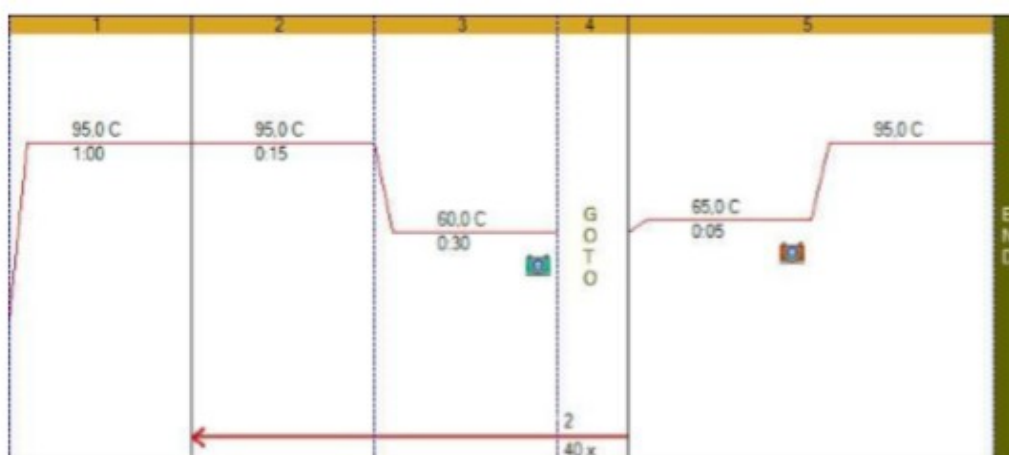
1. 95°C για 60sec
2. 95°C για 15sec
3. 60°C για 30sec

Τα στάδια 2 και 3 επαναλαμβάνονται για 35-40 κύκλους.



Εικόνα 5.1 Θερμοκυκλοποιητής της BioRad για qPCR

Ακολουθεί καμπύλη τήξεως με θέρμανση από 65°C μέχρι 95°C με ρυθμό 0,2°C ανά 5sec.



Σχήμα 5.4 Θερμοκρασιακό πρόγραμμα στον θερμοκυκλοποιητή της BioRad

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Delta Cq (ΔCq method) [2006 Bio-Rad Laboratories, Inc. Real-Time PCR Applications Guide] [55] χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς το 18S και με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Ratio} (\text{γονίδιο αναφοράς}/\text{γονίδιο στόχος}) = 2^{\text{Ct}(\text{γονίδιο αναφοράς}) - \text{Ct}(\text{γονίδιο στόχος})}$$

Πίνακας 5.3 Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την qPCR

Γονίδια	Forward primer	Reverse primer
CHOP	5'-CCACCACACCTGAAAGCAGAA-3'	5'-GGTGCCCCCAATTTTCATCT-3'
GRP78	5'-ACATGGACCTGTTCCGCTCTA-3'	5'-TGGCTCCTTGCCATTGAAGA-3'
Xbp1	5'-ACATCTTCCCATGGACTCTG-3'	5'-TAGGTCCTTCTGGGTAGACC-3'
GRP94	5'-TTGTGTCCAATTCAAGGTAATCA-3'	5'-TTGCTGACCCAAGAGGAAAC-3'
eIF2a	5'-CAACGTGGCAGCCTTACA-3'	5'-TTTCATGTCATAAAGTTGTAGGTTAGG-3'
ATF4	5'-AGCCCCACAACATGAC-3'	5'-CCACCTCCAGATAGTCAT-3'
IRE1	5'-CTGTGGTCAAGATGGACTGG-3'	5'-GAAGCGGGAAGTGAAGTAGC-3'
18S	5'-GTTCCGACCATAAACGATGCC-3'	5'-TGGTGGTGCCTTCCGTCAAT-3'

5.2.4 Απομόνωση πρωτεϊνών από ιστό

Υλικά

- Lysis Buffer 10X
- Αποστειρωμένο ddH₂O
- Φαινυλο-μεθυλο-σουλφονυλο φθορίδιο (PMSF)

Περιγραφή της μεθόδου

1. Κόψιμο ενός τμήματος του ήπατος (~50mg) από κάθε δείγμα και προσθήκη 350μL 2X Lysis Buffer σε καθένα (φύλαξη σε μικροσωλήνες τύπου cryovial στους -20°C). Για τη σύνθεση 1ml 2X Lysis Buffer, γίνεται ανάμιξη 790μl ddH₂O, 10μl PMSF και 200μl 10X Lysis Buffer.
2. Ομογενοποίηση των ιστών και μεταφορά τους σε καινούριους μικροσωλήνες τύπου eppendorf.
3. Κατεργασία με υπερήχους σε κάθε ομογενοποίημα ώστε να γίνει λύση των κυττάρων για απελευθέρωση των πρωτεϊνών.
4. Ψυχρή φυγοκέντρηση στα 14000g για 10min.
5. Λήψη υπερκείμενου υγρού με πιπέτα και μεταφορά σε καινούριους μικροσωλήνες τύπου eppendorf, οι οποίοι έχουν τοποθετηθεί από πριν στον πάγο. Η μέτρηση της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης γίνεται με τη βοήθεια της μεθόδου Bradford.

5.2.5 Χρωματομετρική μέθοδος προσδιορισμού πρωτεϊνών κατά Bradford

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος Bradford χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης σε ένα δείγμα. Η αρχή αυτής της μεθόδου είναι ότι η δέσμευση μορίων πρωτεΐνης στη βαφή Coomassie υπό όξινες συνθήκες έχει ως αποτέλεσμα μια αλλαγή χρώματος από καφέ σε μπλε. Χρησιμοποιώντας ως πρότυπη ουσία αλβουμίνη από ορό βοοειδούς (Bovine Serum Albumin, BSA) κατασκευάζεται γραμμική καμπύλη αναφοράς αυξανόμενων συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης με βάση την απορρόφηση του διαλύματος στα

595nm. Στη συνέχεια, η πρότυπη καμπύλη και η εξίσωση που προκύπτει από αυτή βοηθά στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης του υπό εξέταση δείγματος σύμφωνα με την τιμή της απορρόφησης που δίνει στα 595nm, όταν επωαστεί με το διάλυμα της χρωστικής. Για κάθε δείγμα, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης που υπολογίζεται, πολλαπλασιάζεται με την αρχική αραίωση που έγινε σε αυτό.

Υλικά

- Αντιδραστήριο Bradford: Χρωστική G-250 σε διάλυμα φωσφορικού οξέος και μεθανόλης (PanReac AppliChem)
- Πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης (BSA) σε συγκέντρωση 2mg/ml
- Αποστειρωμένο ddH₂O

Περιγραφή της μεθόδου

1. Τα δείγματα αραιώνονται με ddH₂O ώστε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε καθένα από αυτά να βρίσκεται εντός των ορίων της καμπύλης αναφοράς.
2. Παρασκευάζεται πρότυπο διάλυμα BSA με συγκέντρωση 2mg/ml σε ένα σωλήνα falcon.
3. Σε μικροσωλήνες τύπου erpendorf παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα BSA συγκεντρώσεων 0μg/ml, 125μg/ml, 250μg/ml, 500μg/ml, 750μg/ml, 1000μg/ml, 1500μg/ml και 2000μg/ml.
4. Σε ειδικές πλάκες τοποθετούνται 250μl διαλύματος Bradford και στη συνέχεια σε καθένα από αυτά 5μl από τα πρότυπα διαλύματα BSA που παρασκευάστηκαν. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για τα δείγματα πρωτεΐνης υπό εξέταση.
5. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση για 5min σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Πραγματοποιείται φασματοφωτομέτρηση των δειγμάτων στα 595nm και κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη με βάση τις απορροφήσεις που λήφθηκαν. Έτσι, προκύπτουν οι πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις σε κάθε δείγμα και με βάση αυτές, υπολογίζεται η ποσότητα πρωτεΐνης που θα χρησιμοποιηθεί στην ανοσοαποτύπωση κατά Western.

5.2.6 Διαχωρισμός πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση πηκτής δωδεκυλθειϊκού πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Αρχή μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (Polyacrylamide Gel Electrophoresis-PAGE) χρησιμοποιείται για την εκτίμηση των μοριακών βαρών των πρωτεϊνών. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου στην πηκτή τόσο μικρότερο είναι το μέγεθος των πόρων της. Αυτή αποτελείται από δύο τμήματα, την πηκτή επιστοίβαξης και την πηκτή διαχωρισμού, οι οποίες έχουν διαφορετικό μέγεθος πόρων, pH και ιοντική ισχύ. Ρόλος της πηκτής επιστοίβαξης, η οποία έχει μεγαλύτερο μέγεθος πόρων και μικρότερο pH, είναι η συσσώρευση των πρωτεϊνών σε μια στενή περιοχή, ώστε να εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού ως μια λεπτή ταινία και να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός και σύγκριση της κινητικότητας των πρωτεϊνών.

Με την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE γίνεται διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Το SDS συνδέεται στις πρωτεΐνες μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, με αποτέλεσμα να καταστρέφονται οι μη ομοιοπολικοί δεσμοί τους και αυτές να αποδιατάσσονται. Έτσι, οι πρωτεΐνες φορτίζονται αρνητικά και η κινητικότητά τους στην πηκτή εξαρτάται μόνο από το μοριακό μέγεθός τους. Πρωτεΐνες μικρής μοριακής μάζας κινούνται γρηγορότερα δια μέσου των πόρων της πηκτής σε σχέση με πρωτεΐνες μεγαλύτερης μοριακής μάζας. Συνήθως, γίνεται και περαιτέρω αποδιάταξη των πρωτεϊνών με τη χρήση αντιδραστηρίων που ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς, όπως η 2-μερκαπτοαιθανόλη, για το διαχωρισμό όλων των υπομονάδων. Οπότε, με τη χρήση ενός δείκτη μοριακών βαρών καθίσταται δυνατή η εκτίμηση της μοριακής μάζας μιας πρωτεΐνης.

Υλικά

- Διάλυμα ακρυλαμιδίου-δισακρυλαμιδίου 30%w/v (BioRad)
- Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού Tris-HCl 1.5M pH 8.8
- Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής επιστοίβαξης Tris-HCl 0.5M pH 6.8
- N,N,N',N'-τετραμεθυλ-αιθανο-1,2-διαμίνη (TEMED) (Sigma)
- Υπερθειϊκό αμμώνιο (AmmoniumPerSulfate-APS) 0.1g/ml

- Διάλυμα θειοδωδεκυλικού νατρίου (SDS) 10%w/v
- Αποδιατακτικό διάλυμα SDS 5X (150Mm Tris, 6% SDS, 0.3% μπλε της βρωμοφαινόλης, 30% γλυκερόλη και 15% β-μερκαπτοαιθανόλη)
- Πρωτεϊνικός δείκτης μοριακών βαρών (Prestained Protein Ladder)
- Ρυμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) :
10g SDS, 30.3g Tris-base και 144.1g γλυκίνης προστίθενται σε 1L νερό. Το διάλυμα αυτό έχει συγκέντρωση 10X και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, για την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, αραιώνουμε το 10X διάλυμα με νερό ώστε να έχει τελική συγκέντρωση 1X.

Περιγραφή της μεθόδου

Με βάση τον πίνακα 4 παρασκευάζονται οι πηκτές διαχωρισμού (separating gel, 12% ακρυλαμίδιο) και επιστοίβαξης (stacking gel, 5% ακρυλαμίδιο) και τοποθετούνται μεταξύ των πλακών σε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης πάχους 1.5mm. Αρχικά, προστίθεται η πηκτή διαχωρισμού μέχρι ύψους 0.5cm κάτω από τις εγκοπές της χτένας και αφήνεται να πολυμεριστεί για 30min σε θερμοκρασία δωματίου αφού πρώτα καλυφθεί με 1ml ισοπροπανόλη προκειμένου να αποκλειστεί το οξυγόνο που θα εμποδίσει τον πολυμερισμό και να εξαλειφθούν οι φυσαλίδες. Έπειτα, αφού πολυμεριστεί η πηκτή διαχωρισμού και απομακρυνθεί η ισοπροπανόλη, προστίθεται η πηκτή επιστοίβαξης και τοποθετείται η χτένα που είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό 10 πηγαδιών σε αυτήν. Αφήνεται να πολυμεριστεί και η πηκτή επιστοίβαξης για 30min.

Πίνακας 5.4 Σύσταση των πηκτών διαχωρισμού και επιστοίβαξης στην SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	ΠΗΚΤΗ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ 12%	ΠΗΚΤΗ ΕΠΙΣΤΟΙΒΑΞΗΣ 5%
30% ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟ-ΔΥΣΑΚΡΙΛΑΜΙΔΙΟ	4ml	670μl
1.5 M TRIS PH 8.8	2.5ml	-
0.5M TRIS PH 6.8	-	500μl
DDH ₂ O	3.3ml	2.7ml
10% SDS	100μl	40μl
TEMED	4μl	4μl
APS (0.1G/ML)	100μl	40μl

Στη συνέχεια, τα πρωτεϊνικά δείγματα που έχουν ίση συγκέντρωση, όπως έχει προκύψει από τη μέθοδο Bradford, αναμειγνύονται με αποδιατακτικό διάλυμα SDS 5X, που περιλαμβάνει μερκαπτοαιθανόλη. Η ποσότητα του αποδιατακτικού διαλύματος που θα προστεθεί θα είναι το ¼ της ποσότητας της πρωτεΐνης. Ακολουθεί θέρμανση στους 95°C για 5min και οι πρωτεΐνες αφήνονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για μισή ώρα. Οι πρωτεΐνες καθώς και ο δείκτης μοριακών βαρών φορτώνονται στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου που έχει παρασκευασθεί και ηλεκτροφορούνται στα 110 Volt.

5.2.7. Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot)

Αρχή μεθόδου

Το ανοσοαποτύπωμα των πρωτεϊνών είναι μία αναλυτική μέθοδος που περιλαμβάνει τη μεταφορά των πρωτεϊνών, οι οποίες έχουν διαχωριστεί ηλεκτροφορητικά, από το πήκτωμα σε ένα λεπτό και μεμβρανώδες υλικό στήριξης με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου και την ανίχνευσή τους με μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα. Ειδικότερα, χρησιμοποιείται ένα μη σημασμένο αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη-στόχο και στη συνέχεια, ένα δεύτερο αντίσωμα, ειδικό για το πρώτο, το οποίο είναι συνδεδεμένο χημικά με τον κατάλληλο ιχνηθέτη, συνήθως ένα ένζυμο όπως π.χ. υπεροξειδάση του μαύρου ρεπανιού (Horse-Radish Peroxidase, HRP), ικανό να μετατρέψει το

υπόστρωμα σε ανιχνεύσιμο φωτεινό σήμα με φωτογραφικά/απεικονιστικά μέσα.

Υλικά

- Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer) :
144.1g γλυκίνης και 30.3g Tris-base προστίθενται σε 1L νερού. Το διάλυμα αυτό έχει συγκέντρωση 10X και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, για τη μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη, προστίθενται 100ml από το παραπάνω διάλυμα (10X), 200ml μεθανόλη και 700ml νερό.
- Διάλυμα έκπλυσης TBST (Tris Buffered Saline with Tween) 1X
- Διάλυμα έκπλυσης PBS (Phosphate-buffered saline) 1X
- Πρωτογενή Αντισώματα :
Rabbit anti-eIF2a (#9722, Cell Signaling)
Rabbit anti-pelF2a (Ser51) (#9721, Cell Signaling)
Mouse anti-GADD153 (sc-7351, Santa Cruz)
Mouse anti-actin
- Δευτερογενή Αντισώματα :
Goat anti-mouse IgG-HRP (sc-2005)
Goat anti-rabbit IgG-HRP (sc-2030)
- Διάλυμα χημειοφωταύγειας (ECL, BioRad) :
Παρασκευάζεται με την ανάμιξη ίσων όγκων σταθερού διαλύματος υπεροξειδάσης και διαλύματος ενίσχυσης.
- Διάλυμα εμφάνισης φιλμ (Developer) :
50mL υγρού εμφάνισης αραιώνονται με νερό σε συνολικό όγκο 200mL. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο.
- Διάλυμα μονιμοποίησης φιλμ (Fixer) :
50mL υγρού εμφάνισης αραιώνονται με νερό σε συνολικό όγκο 200mL. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο.
- Διάλυμα γάλακτος (με 0% λιπαρά) 5% σε TBST ρυθμιστικό διάλυμα
- Διάλυμα BSA 5% σε TBST ρυθμιστικό διάλυμα
- Φωτογραφικό φιλμ
- Βαφή Ponceau Red

- Tween-20
- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Περιγραφή της μεθόδου

Μετά την ολοκλήρωση του διαχωρισμού των πρωτεϊνών με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση, τόσο το πήκτωμα όσο και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ξεπλένονται στο transfer buffer. Η μεταφορά των πρωτεϊνών του πηκτώματος στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης γίνεται ως εξής: τοποθετούνται στη συσκευή μεταφοράς με προσανατολισμό από την κάθοδο (μαύρη επιφάνεια) προς την άνοδο με την ακόλουθη σειρά: ένα ακρυλικό σφουγγαράκι, 2 διηθητικά χαρτιά, η πηκτή, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, 2 ακόμα διηθητικά χαρτιά και ένα ακόμη ακρυλικό σφουγγαράκι. Όλα αυτά έχουν εμβαπτιστεί προηγουμένως στο διάλυμα μεταφοράς. Προσοχή θα πρέπει να δοθεί ώστε να μην παγιδευτούν φυσαλίδες αέρα μεταξύ αυτών. Στη συνέχεια, η συσκευή βυθίζεται στο transfer buffer και εφαρμόζεται σταθερή διαφορά δυναμικού για συγκεκριμένο χρόνο σε θερμοκρασία 4°C. Όταν ολοκληρωθεί η μεταφορά, η πηκτή τοποθετείται για λίγο στη βαφή Ponceau Red ώστε να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας. Έπειτα, η μεμβράνη επωάζεται για 70min με διάλυμα 5% γάλακτος σε TBST ή 5% BSA σε TBST (Blocking Buffer) για κορεσμό των περιοχών της μεμβράνης όπου δεν υπάρχουν πρωτεΐνες. Η μεμβράνη εκπλένεται και επωάζεται για όλη τη νύχτα με το κατάλληλο πρωτογενές αντίσωμα σε αναδευτήρα στους 4 °C. Το πρωτογενές αντίσωμα παρασκευάζεται σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας. Ακολουθούν πλύσεις με TBST ή PBS (3 φορές από 10min και 1 φορά από 5min) και επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα για 70min. Το δεύτερο αντίσωμα είναι συζευγμένο με το ένζυμο που προκαλεί χημειοφωταύγεια. Τέλος, η μεμβράνη εκπλένεται ξανά με TBST ή PBS (3 φορές από 10min και 1 φορά από 5min). Για την εμφάνιση των πρωτεϊνών, η μεμβράνη επωάζεται για 5min με το μίγμα (1:1) χημειοφωταύγειας (ECL). Στη συνέχεια τοποθετείται στην ειδική κασετίνα εμφάνισης. Στο σκοτεινό θάλαμο, κόβεται κομμάτι φιλμ, το οποίο τοποθετείται πάνω στη μεμβράνη και η κασετίνα κλείνεται. Το φιλμ παραμένει στην κασετίνα για ορισμένο χρόνο. Στη συνέχεια, το φιλμ τοποθετείται στο διάλυμα εμφάνισης (Developer) για μερικά λεπτά έως ότου

εμφανιστούν οι ζώνες και μετά στο διάλυμα μονιμοποίησης (Fixer). Τέλος, το φιλμ εκπλένεται με νερό και αφήνεται να στεγνώσει. Για την ημιποσοτική ανάλυση του σήματος από τα δείγματα που επεξεργάστηκαν, τα φιλμ σαρώνονται και κατόπιν αναλύονται με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού (Image J). Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται με το αντίσωμα της ακτίνης για να ελεγχθεί η ισοφόρτωση των δειγμάτων.

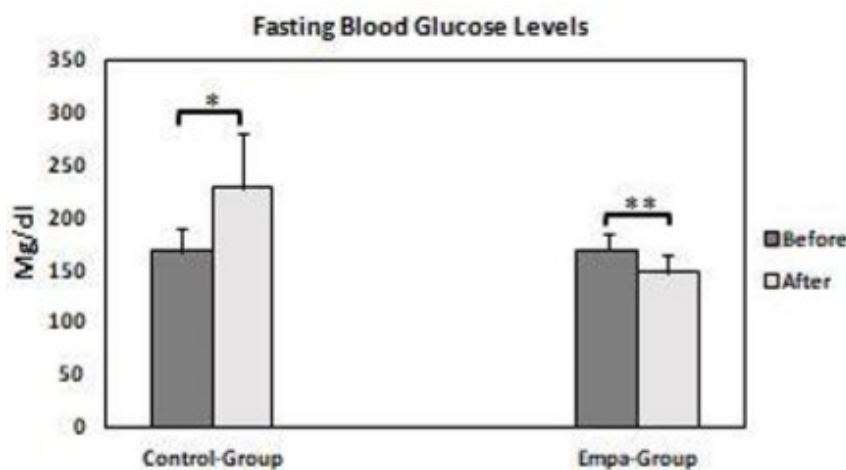
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

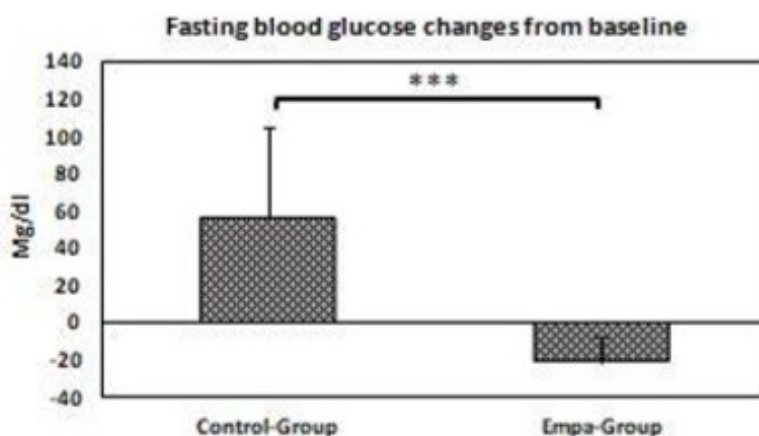
6.1 Προσδιορισμός βιοχημικών παραμέτρων στον ορό των τεσσάρων ομάδων μυών

Προσδιορίστηκαν ορισμένες βιοχημικοί παράμετροι στον ορό πριν και μετά το τέλος της κάθε παρέμβασης (10 εβδομάδες και 5 εβδομάδες) στην κάθε ομάδα πειραματόζωων. Ο αριθμός των μυών ανά ομάδα είναι: για τις 10 εβδομάδες Control 9 μύες και Empa 9 μύες, ενώ για τις 5 εβδομάδες Control 8 μύες και Empa 8 μύες.

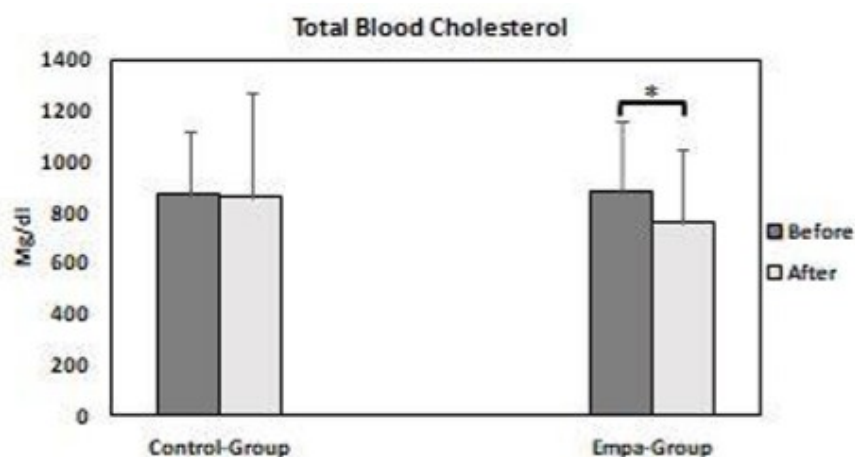
Η χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 10 εβδομάδες μείωσε στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας στον ορό όπως αναμενόταν σε σχέση με τα επίπεδα πριν την έναρξη της παρέμβασης ($p < 0.01$) αλλά και σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Σχήμα 6.1, 6.2). Επιπλέον, μειώθηκαν σημαντικά τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης στον ορό (Σχήμα 6.3). Τέλος, δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα της LDL χοληστερόλης και στα επίπεδα τριγλυκεριδίων στον ορό των δύο ομάδων μυών σε σχέση με τα επίπεδα πριν την έναρξη της παρέμβασης.



Σχήμα 6.1 Επίπεδα γλυκόζης νηστείας στον ορό στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης 10 εβδομάδων με εμπαγλιφλοζίνη και αθηρογόνο δίαιτα στις δύο ομάδες μυών (Control, n=9- Empa, n=9) (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$)

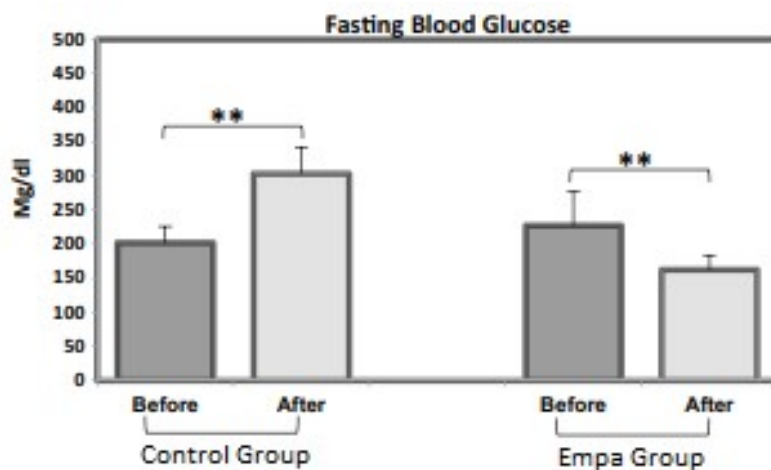


Σχήμα 6.2 Μεταβολή στα επίπεδα γλυκόζης νηστείας στον ορό από την αρχική τιμή στις δύο ομάδες μυών (** $p \leq 0.001$)

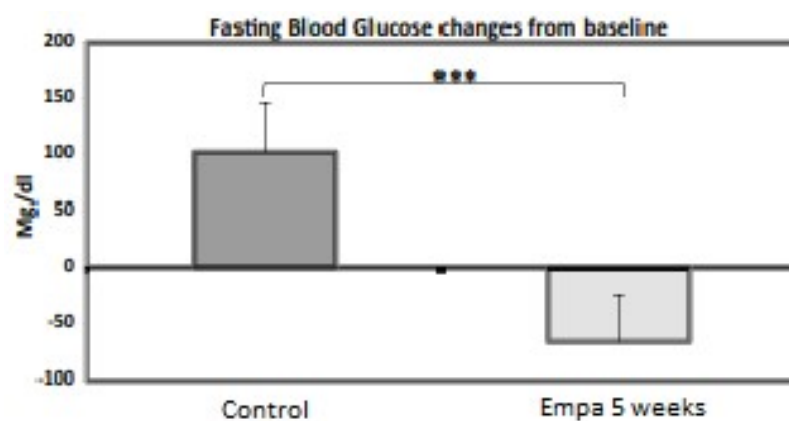


Σχήμα 6.3 Επίπεδα ολικής χοληστερόλης στον ορό των δύο ομάδων μυών στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης (* $p \leq 0.05$)

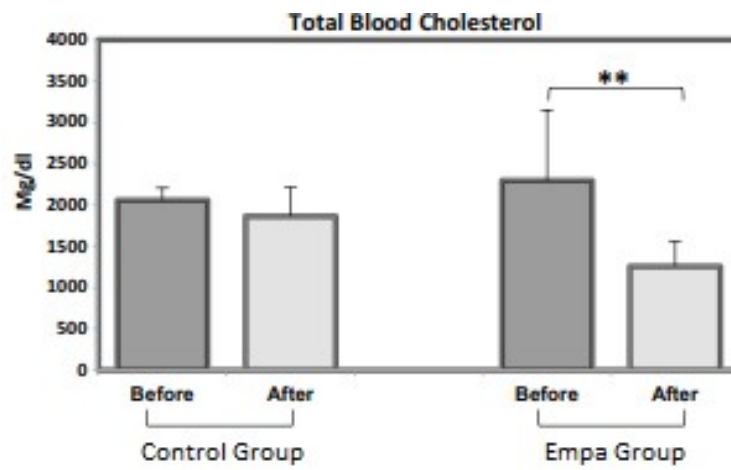
Η χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 5 εβδομάδες μείωσε επίσης στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας στον ορό όπως αναμενόταν σε σχέση με τα επίπεδα πριν την έναρξη της παρέμβασης ($p \leq 0.01$) αλλά και σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Σχήμα 6.4, 6.5). Επιπλέον, μειώθηκαν σημαντικά τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης στον ορό (Σχήμα 6.6). Τέλος, δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα της LDL χοληστερόλης και στα επίπεδα τριγλυκεριδίων στον ορό των δύο ομάδων μυών σε σχέση με τα επίπεδα πριν την έναρξη της παρέμβασης.



Σχήμα 6.4 Επίπεδα γλυκόζης νηστείας στον ορό στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης 5 εβδομάδων με εμπαγλιφλοζίνη και αθηρογόνο δίαιτα στις δύο ομάδες μυών (Control,n=8-Empa,n=8)(**p≤0.01)

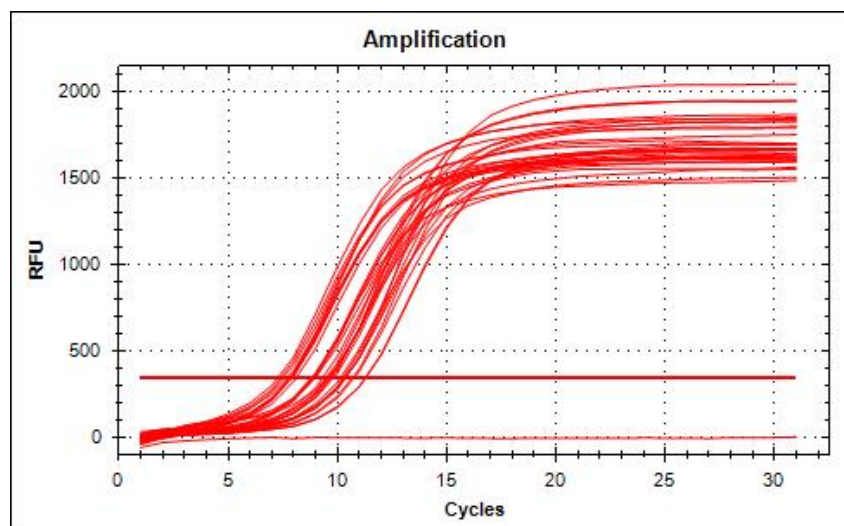


Σχήμα 6.5 Μεταβολή στα επίπεδα γλυκόζης νηστείας στον ορό από την αρχική τιμή στις δύο ομάδες μυών (***p≤0.001)

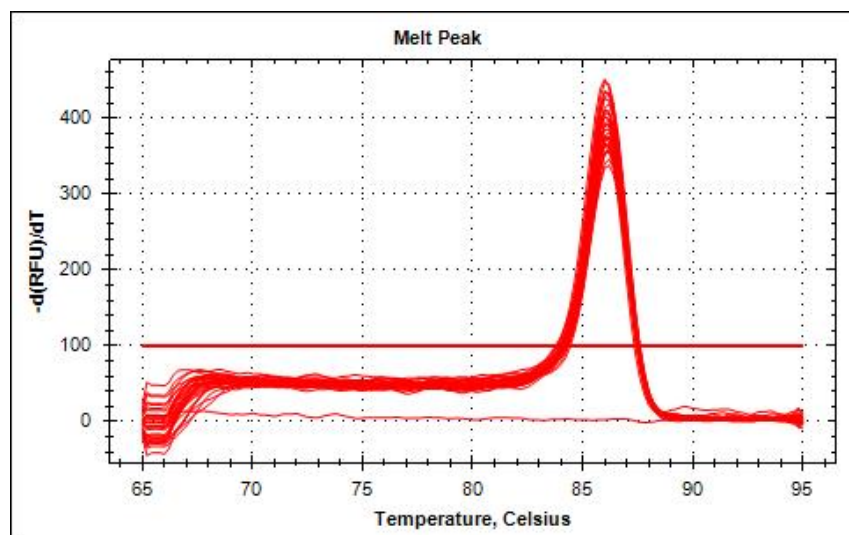


Σχήμα 6.6 Επίπεδα ολικής χοληστερόλης στον ορό των δύο ομάδων μυών στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης(** $p \leq 0.01$)

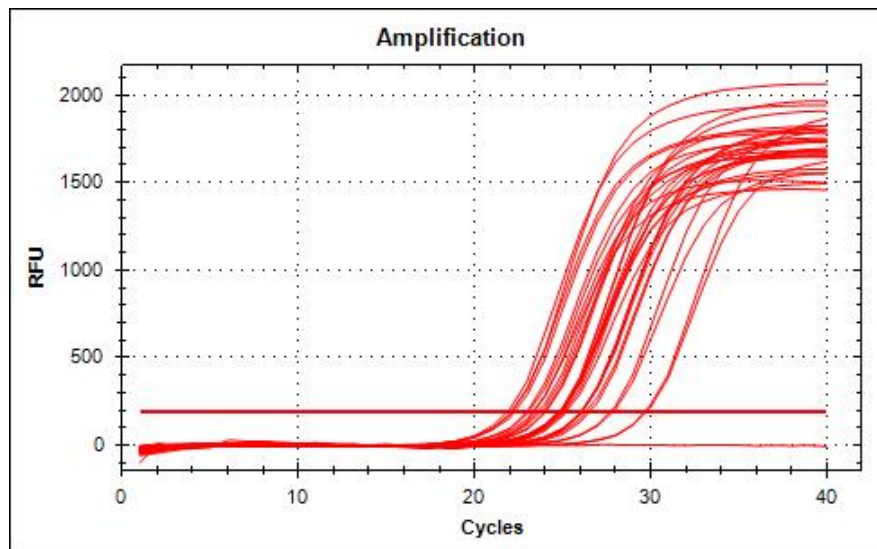
Ενδεικτικές καμπύλες ενίσχυσης και τήξης των τμημάτων DNA στον θερμοκυκλοποιητή για τα γονίδια 18S (Σχήμα 6.7, 6.8) και ATF4 (Σχήμα 6.9, 6.10) για την παρέμβαση με εμπλαγλιφλοζίνη για 10 εβδομάδες



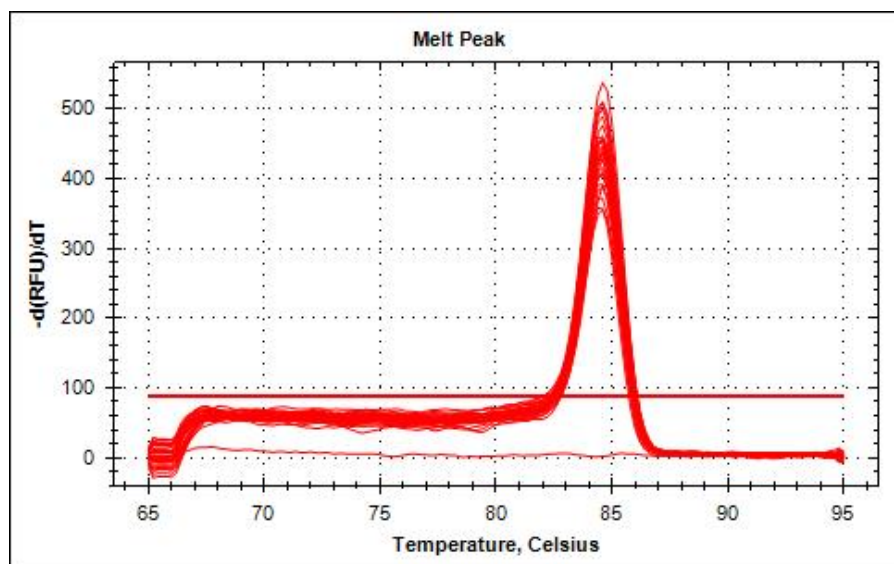
Σχήμα 6.7 Καμπύλη ενίσχυσης για το γονίδιο αναφοράς 18S



Σχήμα 6.8 Καμπύλη τήξης για το γονίδιο αναφοράς 18S

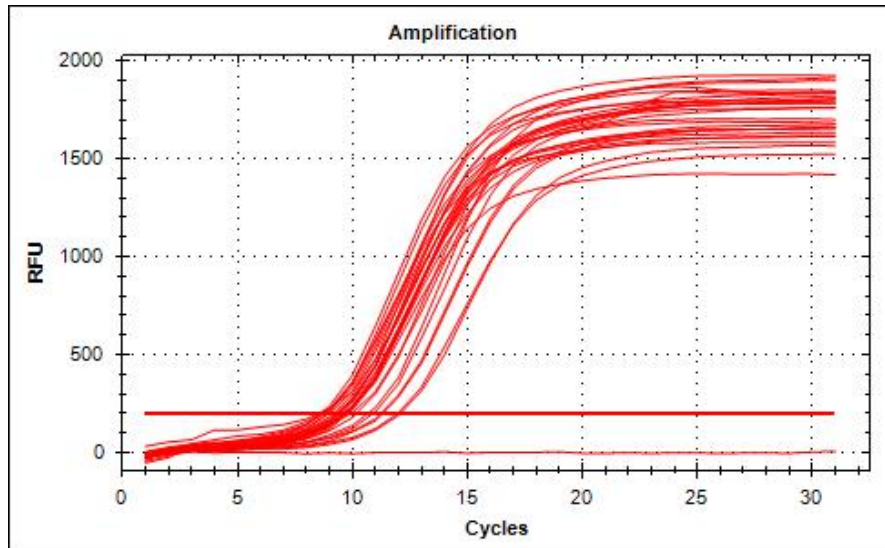


Σχήμα 6.9 Καμπύλη ενίσχυσης για το γονίδιο ATF4

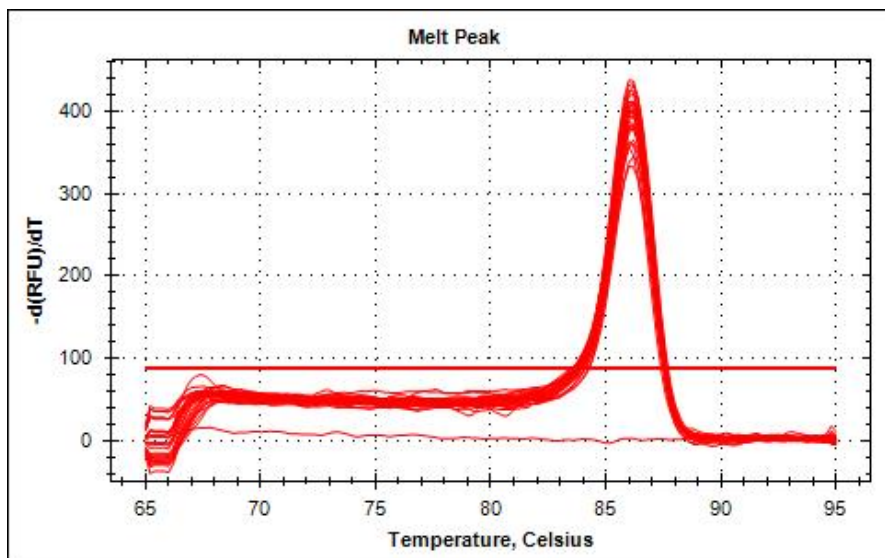


Σχήμα 6.10 Καμπύλη τήξης για το γονίδιο ATF4

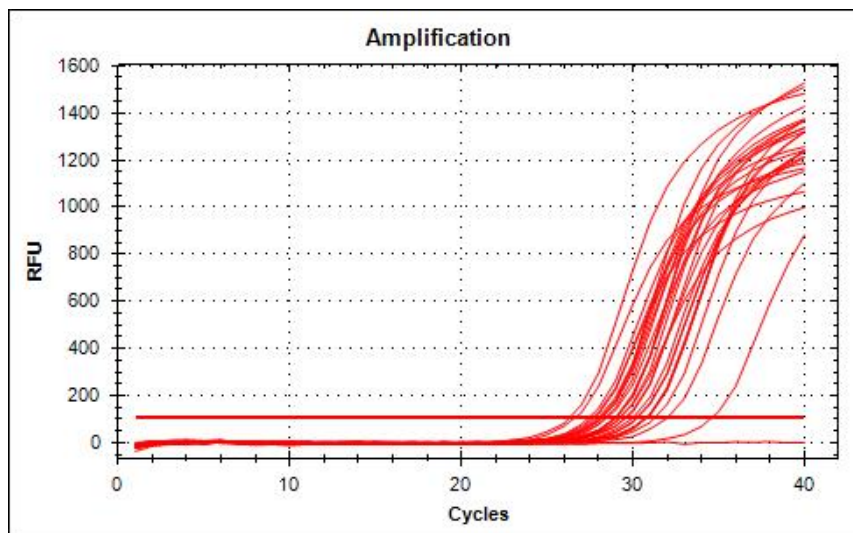
Ενδεικτικές καμπύλες ενίσχυσης και τήξης των τμημάτων DNA στον θερμοκυκλοποιητή για τα γονίδια 18S (Σχήμα 6.11, 6.12) και eIF2α (Σχήμα 6.13, 6.14) για την παρέμβαση με εμπαγλιφλοζίνη για 5 εβδομάδες



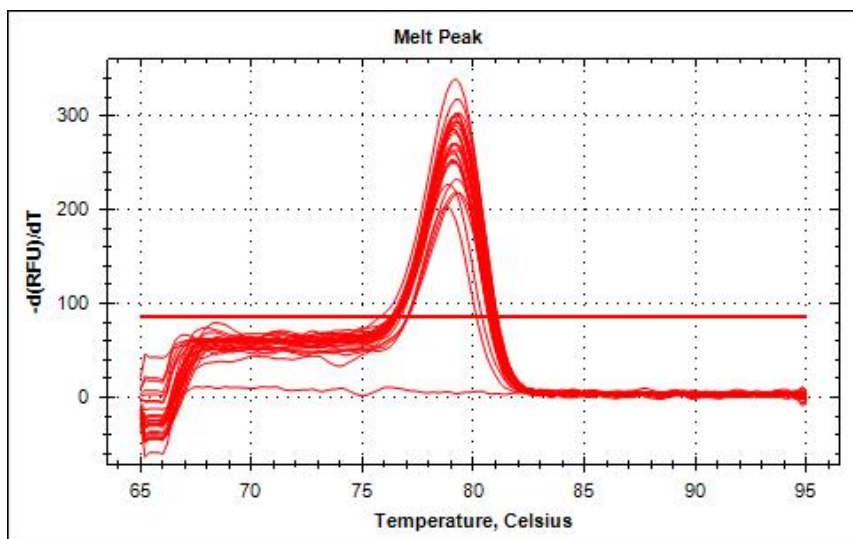
Σχήμα 6.11 Καμπύλη ενίσχυσης για το γονίδιο αναφοράς 18S



Σχήμα 6.12 Καμπύλη τήξης για το γονίδιο αναφοράς 18S



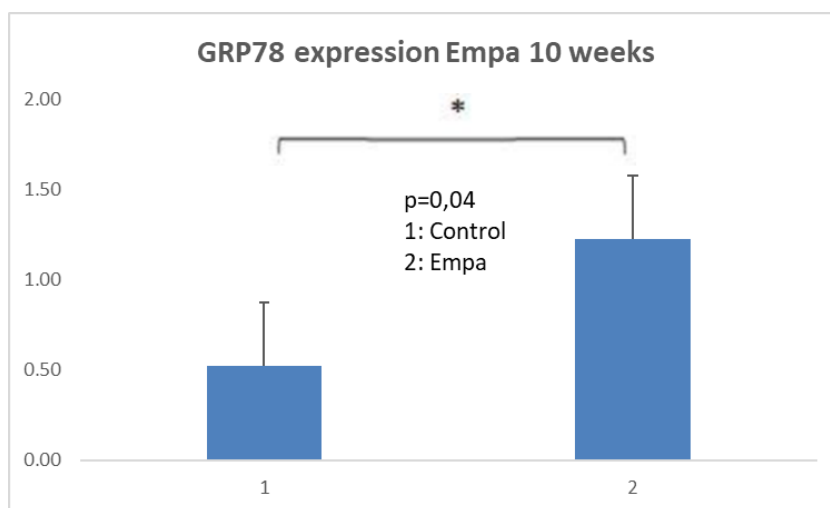
Σχήμα 6.13 Καμπύλη ενίσχυσης για το γονίδιο eIF2α



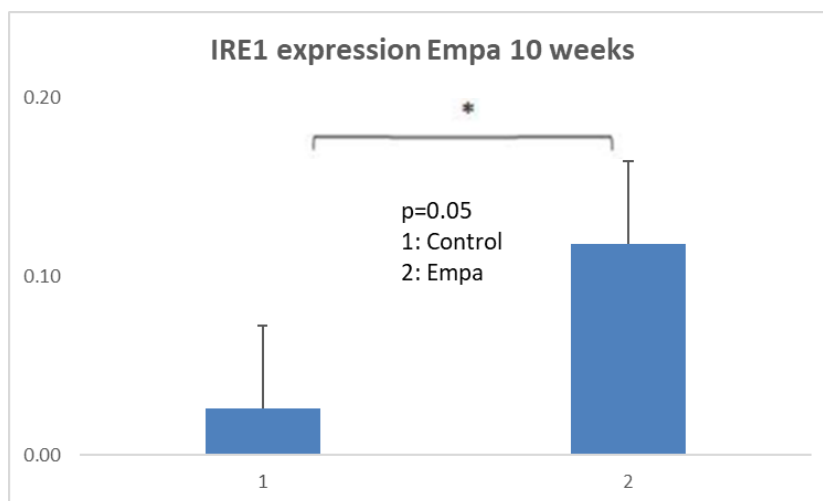
Σχήμα 6.14 Καμπύλη τήξης για το γονίδιο eIF2α

6.2 Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στα σηματοδοτικά μονοπάτια του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου στο ήπαρ

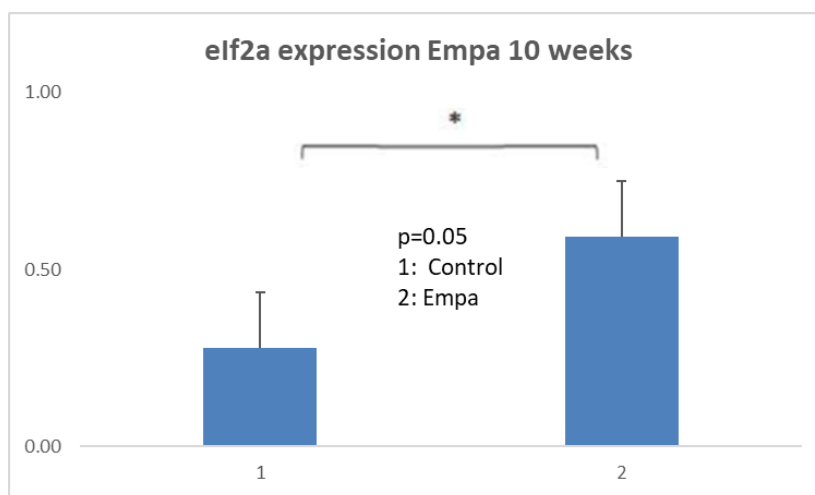
Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που παίζουν κύριο ρόλο στο στρες του ΕΔ και κωδικοποιούν τα eIF2α, ATF4, GRP78, CHOP, GRP94, Xbp1 και IRE1 στο ήπαρ, μέσω real-time PCR. Η χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 10 εβδομάδες αύξησε στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης mRNA των GRP78, IRE1 και eIF2α ($p \leq 0.05$) (Σχήμα 6.15, 6.16 και 6.17), ενώ αυξήθηκαν και τα επίπεδα mRNA των Xbp1, GRP94, CHOP και ATF4 αλλά όχι με στατιστική σημαντικότητα (Σχήμα 6.18, 6.19, 6.20 και 6.21).



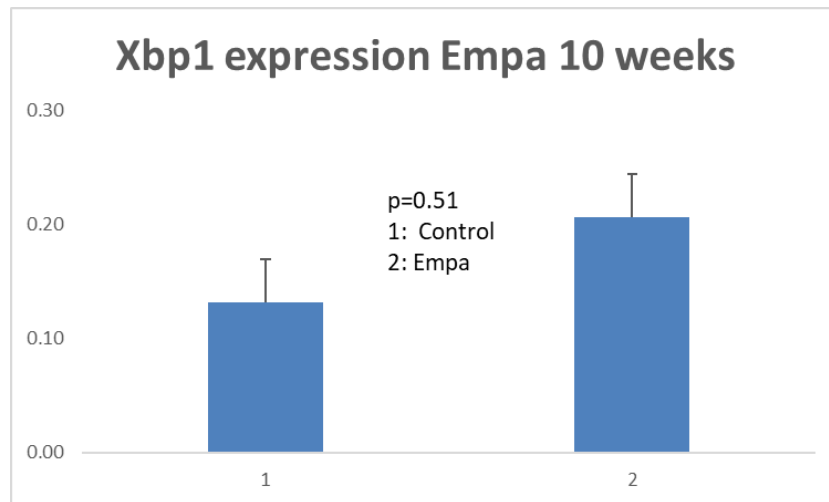
Σχήμα 6.15 Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) του GRP78 στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 10 εβδομάδες (Empa, n=9) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Control, n=9)



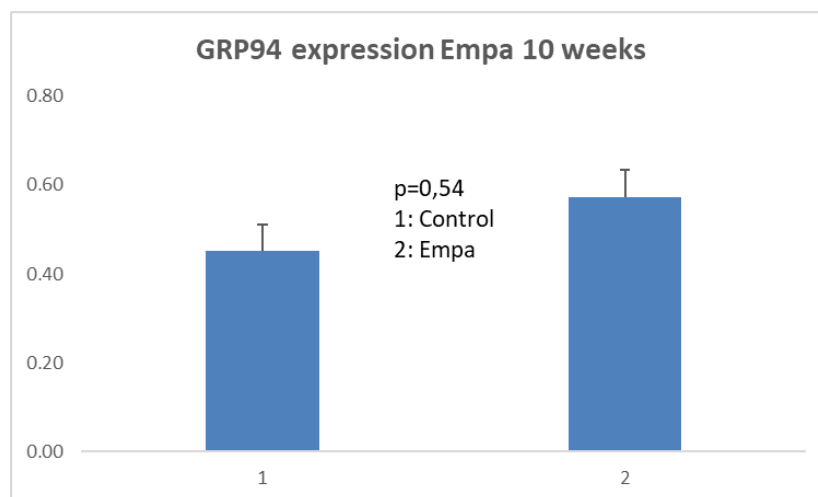
Σχήμα 6.16 Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) του IRE1 στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 10 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control)



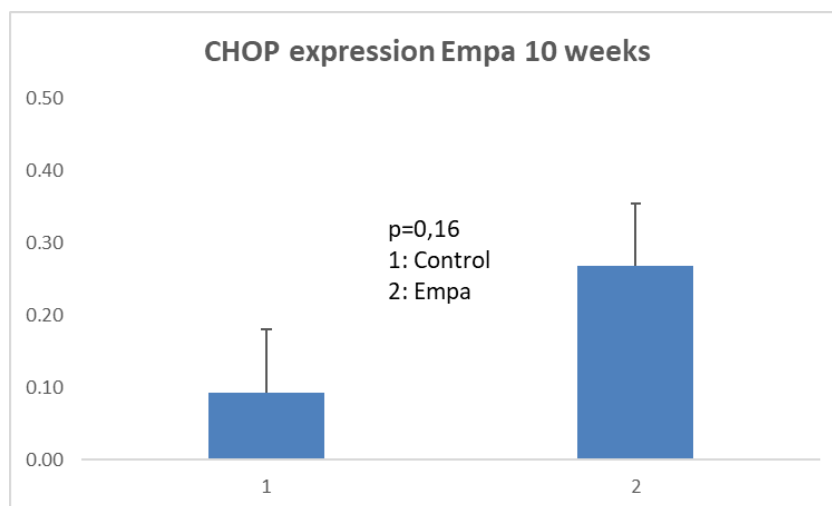
Σχήμα 6.17 Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) του elf2a στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 10 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control)



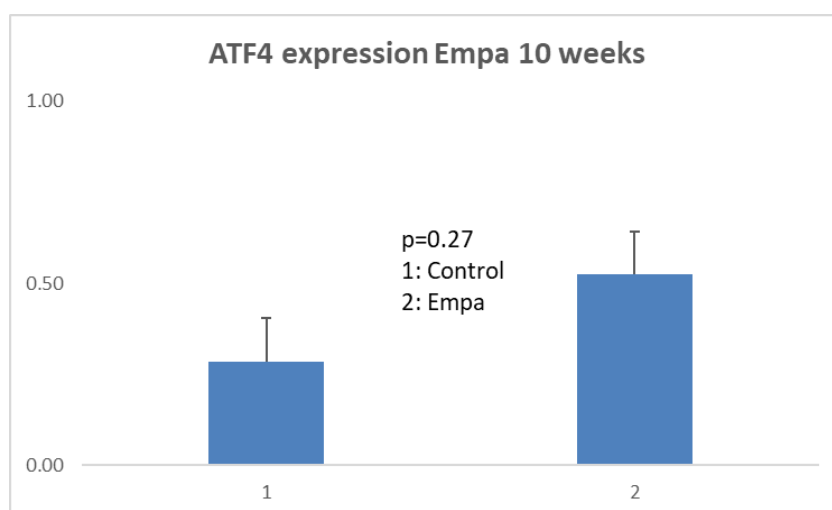
Σχήμα 6.18 Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) του Xbp1 στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 10 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control)



Σχήμα 6.19 Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) του GRP94 στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 10 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control)

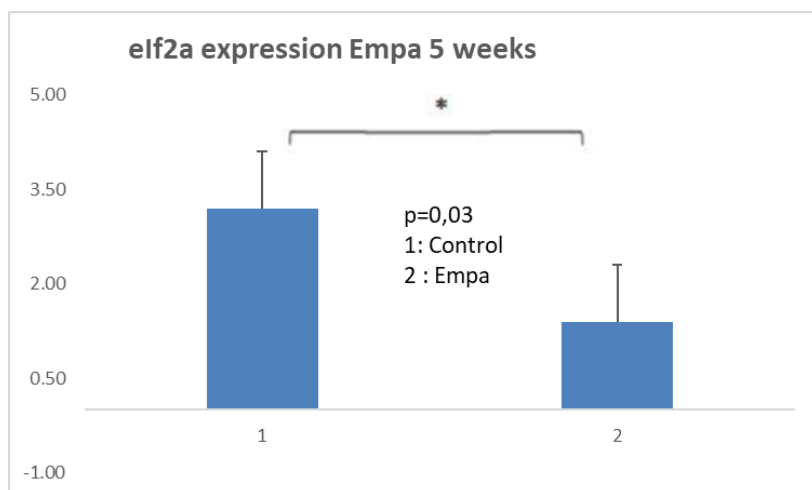


Σχήμα 6.20 Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) του CHOP στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 10 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control)

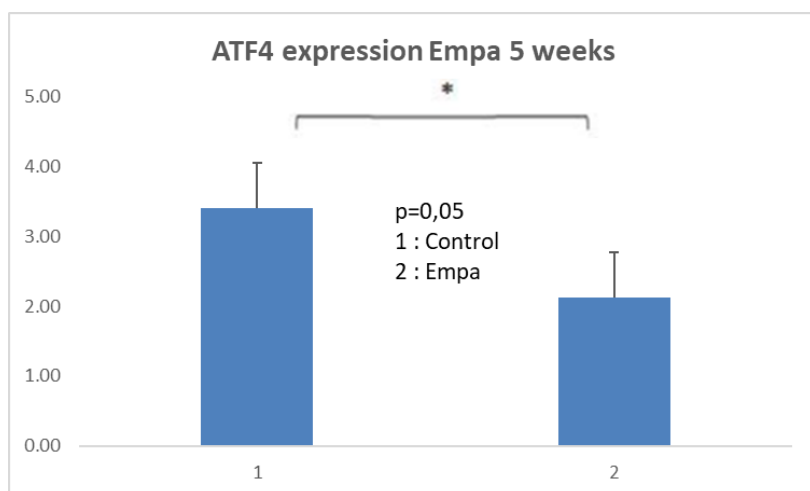


Σχήμα 6.21 Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) του ATF4 στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 10 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control)

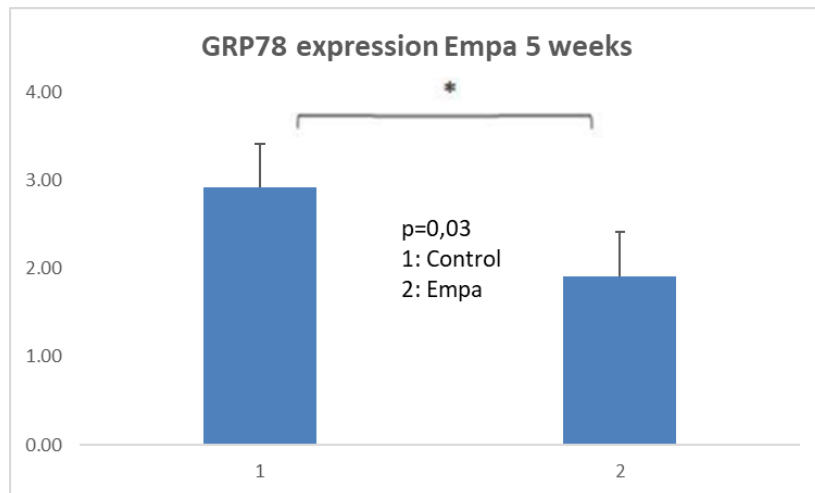
Επίσης, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των ίδιων γονιδίων, δηλαδή eIF2α, ATF4, GRP78, CHOP, GRP94, IRE1 και Xbp1 στο ήπαρ, μέσω real-time PCR μετά τη χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 5 εβδομάδες. Η παρέμβαση αυτή μείωσε στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης mRNA όλων των γονιδίων ($p \leq 0.05$) (Σχήμα 6.22, 6.23, 6.24, 6.25, 6.26, 6.27 και 6.28).



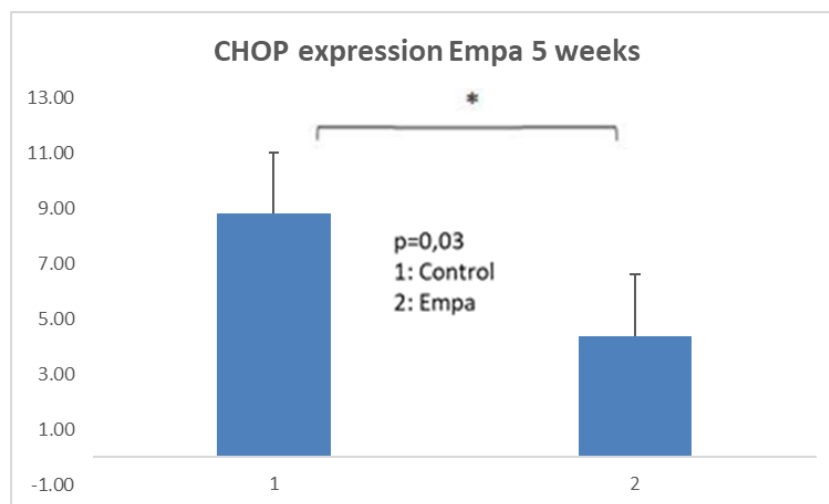
Σχήμα 6.22 Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) του eIF2α στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 5 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control)



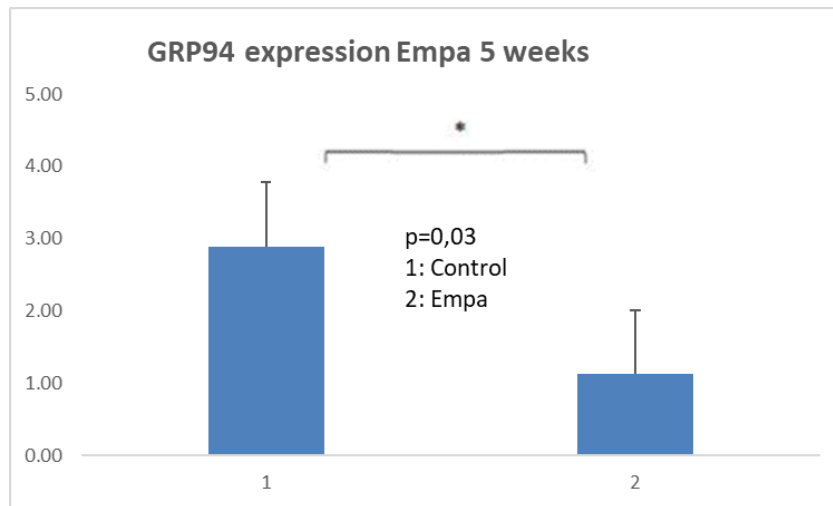
Σχήμα 6.23 Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) του ATF4 στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 5 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control)



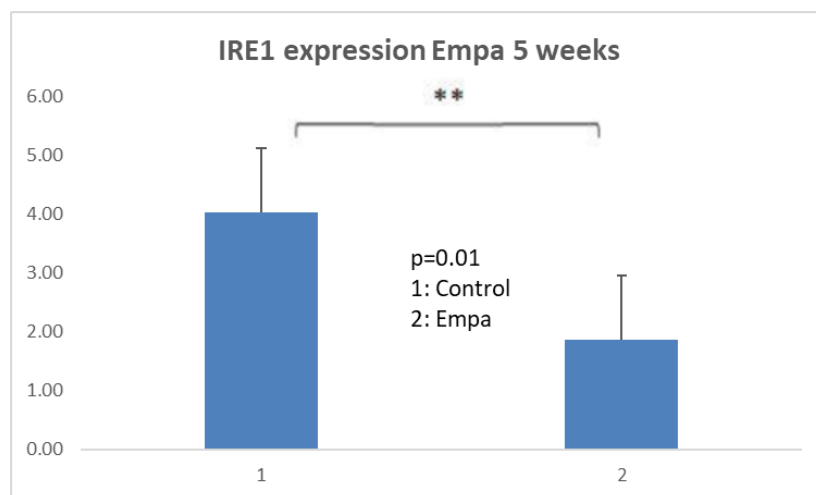
Σχήμα 6.24 Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) του GRP78 στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 5 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control)



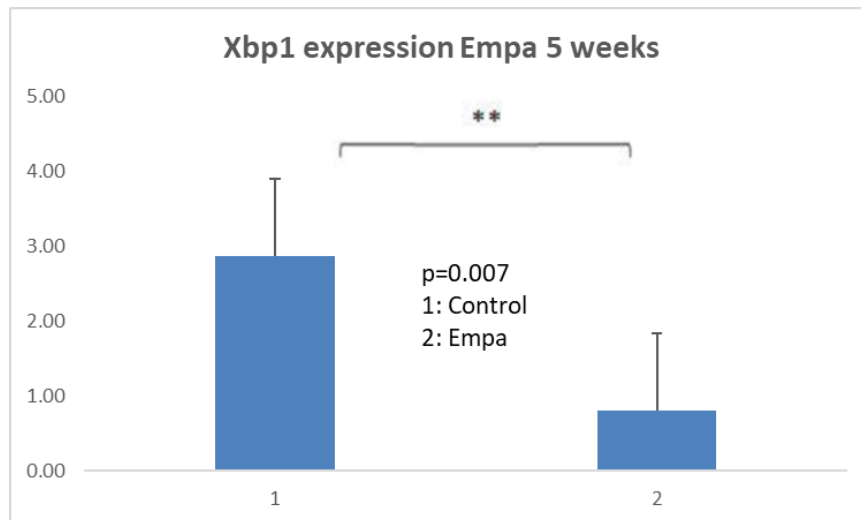
Σχήμα 6.25 Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) του CHOP στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 5 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control)



Σχήμα 6.26 Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) του GRP94 στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 5 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control)



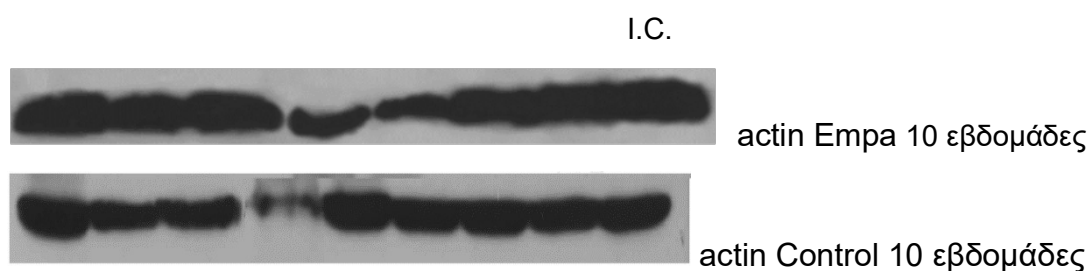
Σχήμα 6.27 Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) του IRE1 στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 5 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control)



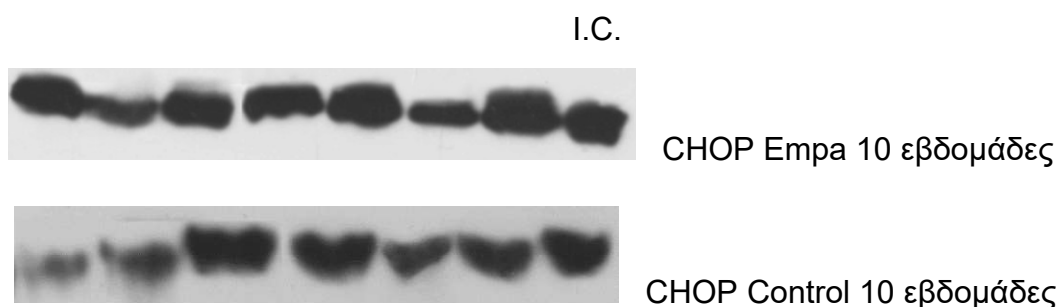
Σχήμα 6.28 Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) του Xbp1 στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 5 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control)

6.3 Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών που συμμετέχουν στα σηματοδοτικά μονοπάτια του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου στο ήπαρ

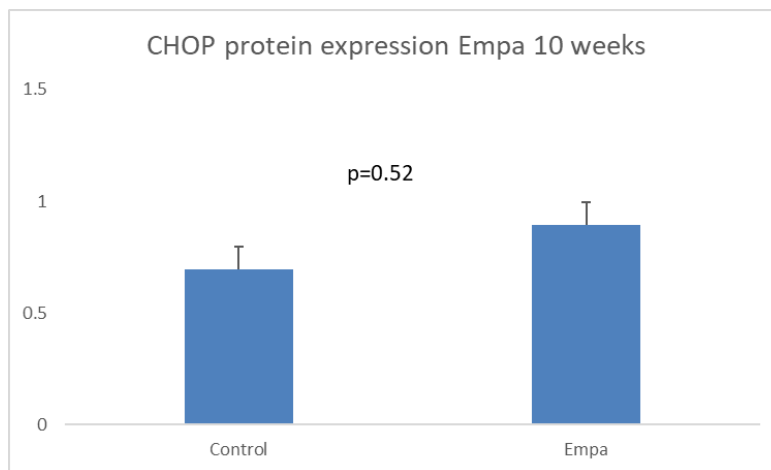
Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών actin, CHOP, eIF2α και p-eIF2α σε εκχυλίσματα ιστού με τη μέθοδο Western blot (Εικόνα 6.1, 6.2, 6.3, 6.4). Η χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 10 εβδομάδες αύξησε την έκφραση της πρωτεΐνης CHOP, καθώς και την αναλογία p-eIF2α/eIF2α όχι όμως, στατιστικά σημαντικά (Σχήμα 6.29, 6.30). Χρησιμοποιήθηκε εσωτερικό δείγμα ελέγχου (Internal Control) ώστε να επιβεβαιωθεί ότι τα αποτελέσματα δεν προέκυψαν λόγω λάθους στη φόρτωση ή στη μεταφορά των πρωτεϊνών. Επίσης, η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο φόρτωσης ίσης ποσότητας πρωτεΐνης σε όλα τα δείγματα.



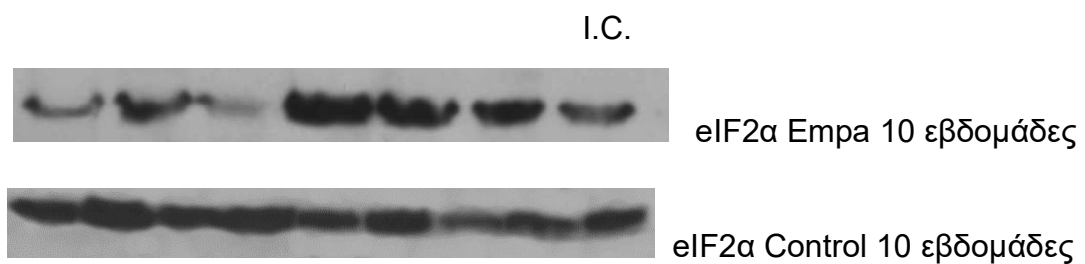
Εικόνα 6.1 Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής έκφρασης της ακτίνης στο ήπαρ στην ομάδα που χορηγήθηκε εμπαγλιφλοζίνη για 10 εβδομάδες και στην ομάδα ελέγχου (control)



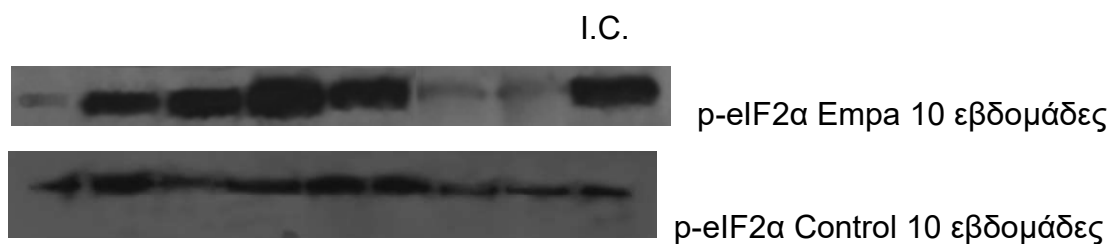
Εικόνα 6.2 Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής έκφρασης του CHOP στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 10 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control)



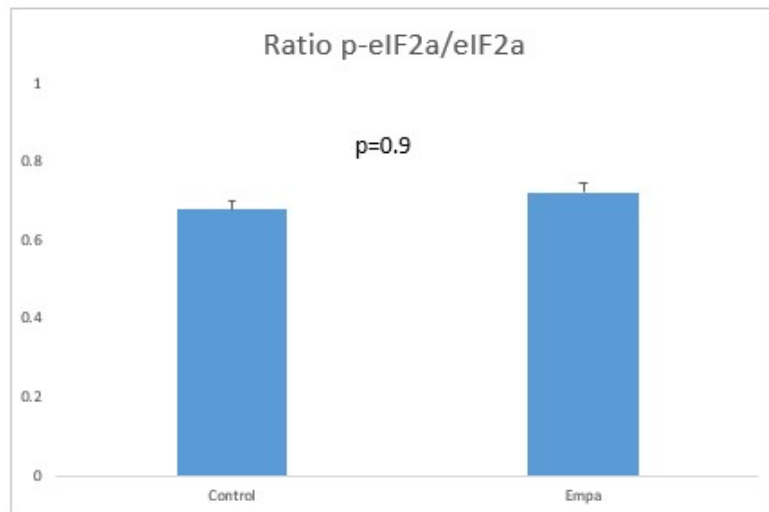
Σχήμα 6.29 Ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του CHOP στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 10 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control) (p=0.52)



Εικόνα 6.3 Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής έκφρασης του eIF2α στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 10 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control)

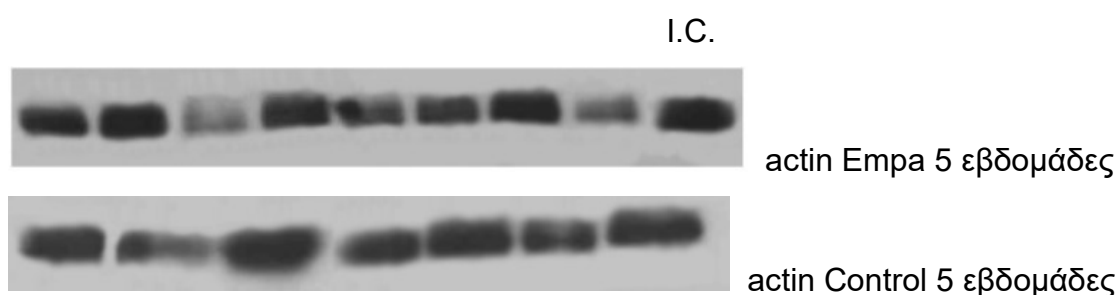


Εικόνα 6.4 Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής έκφρασης του p-eIF2α στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 10 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control)

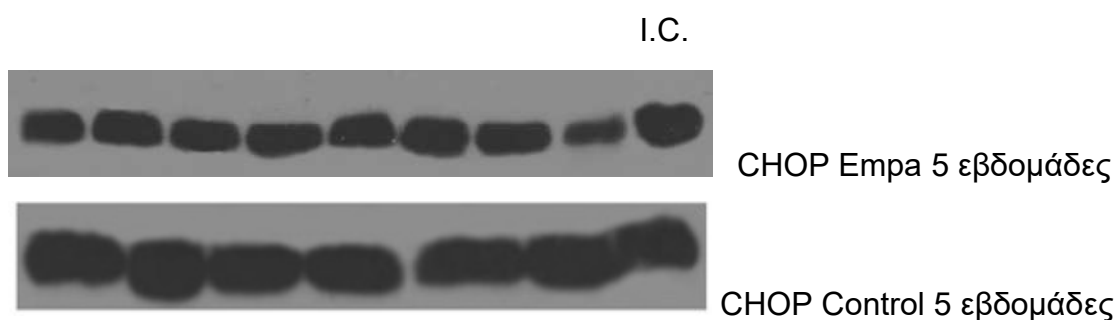


Σχήμα 6.30 Ποσοτικοποίηση της αναλογίας p-eIF2α/eIF2α στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμππαγλιφλοζίνης για 10 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control) (p=0.9)

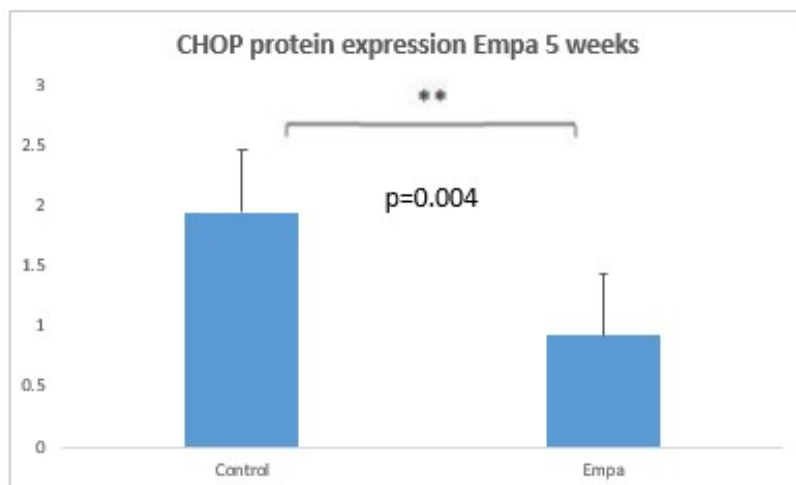
Επίσης, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών actin, CHOP, p-eIF2α και eIF2α μέσω της μεθόδου Western blot στις ομάδες ελέγχου και παρέμβασης για 5 εβδομάδες με εμπαγλιφλοζίνη (Εικόνα 6.5, 6.6, 6.7, 6.8). Η χορήγησή της για 5 εβδομάδες μείωσε τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης CHOP ($p=0.004$), καθώς και την αναλογία p-eIF2α/eIF2α ($p=0.04$) (Σχήμα 6.31, 6.32) με στατιστική σημαντικότητα. Χρησιμοποιήθηκε εσωτερικό δείγμα ελέγχου (Internal Control) ώστε να επιβεβαιωθεί ότι τα αποτελέσματα δεν προέκυψαν λόγω λάθους στη φόρτωση ή στη μεταφορά των πρωτεϊνών. Επίσης, η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο φόρτωσης ίσης ποσότητας πρωτεΐνης σε όλα τα δείγματα.



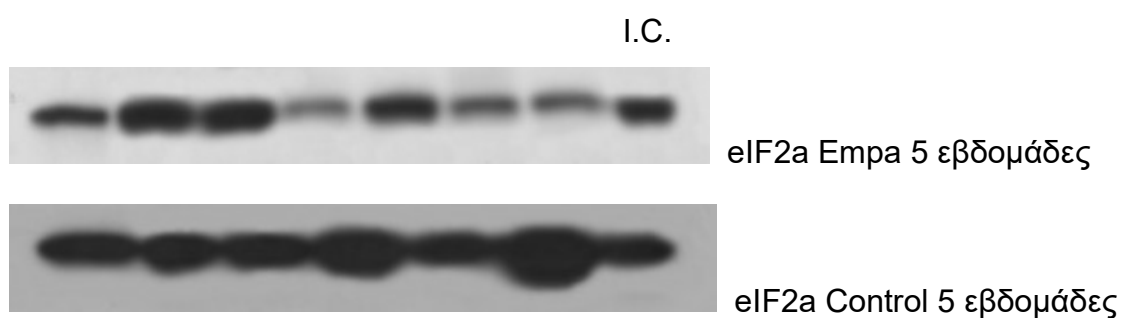
Εικόνα 6.5 Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής έκφρασης της ακτίνης στο ήπαρ στην ομάδα που χορηγήθηκε εμπαγλιφλοζίνη για 5 εβδομάδες και στην ομάδα ελέγχου (control)



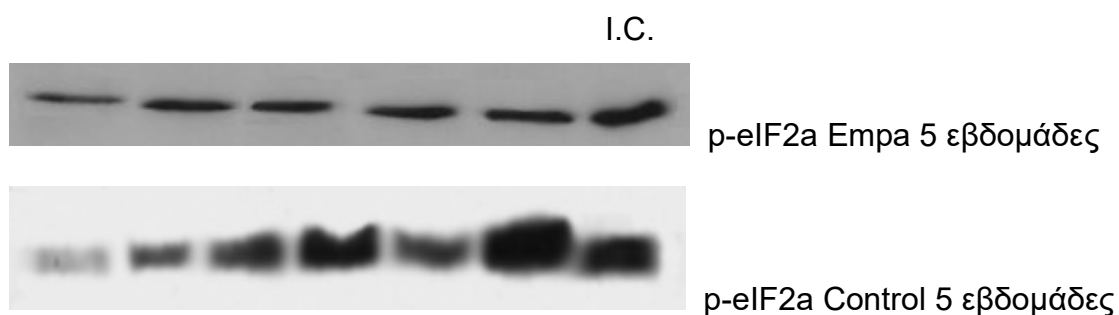
Εικόνα 6.6 Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής έκφρασης του CHOP στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 5 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control)



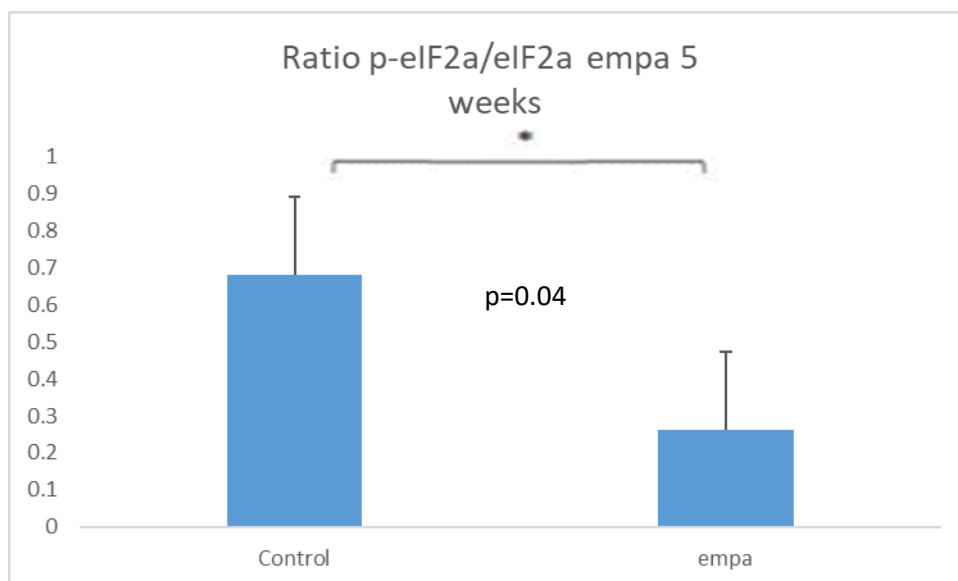
Σχήμα 6.31 Ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του CHOP στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 5 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control)



Εικόνα 6.7 Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής έκφρασης του eIF2α στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 5 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control)



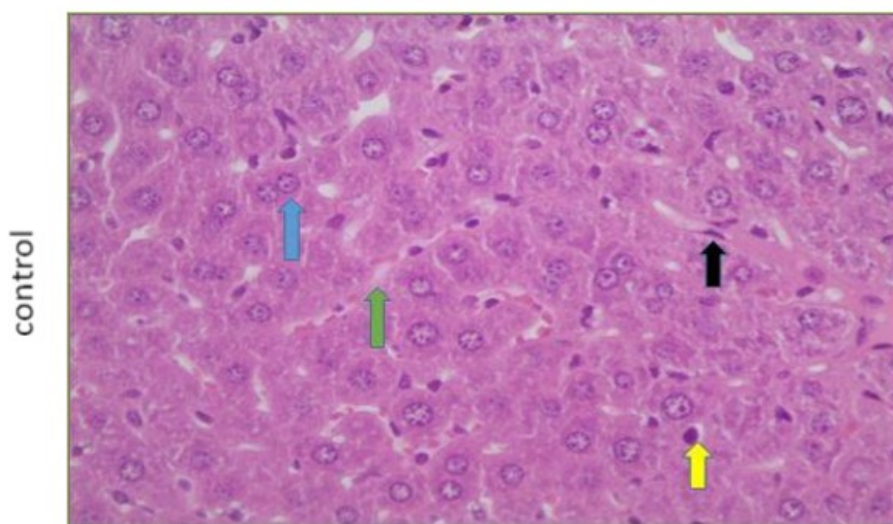
Εικόνα 6.8 Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής έκφρασης του p-eIF2α στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 5 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control)



Σχήμα 6.32 Ποσοτικοποίηση της της αναλογίας p-eIF2α/eIF2α στο ήπαρ μετά από χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 5 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control)

6.4 Επίδραση της χορήγησης εμπαγλιφλοζίνης στη λιπώδη διήθηση του ήπατος- Ιστομορφομετρική ανάλυση και NAS (NAFLD Activity Score)

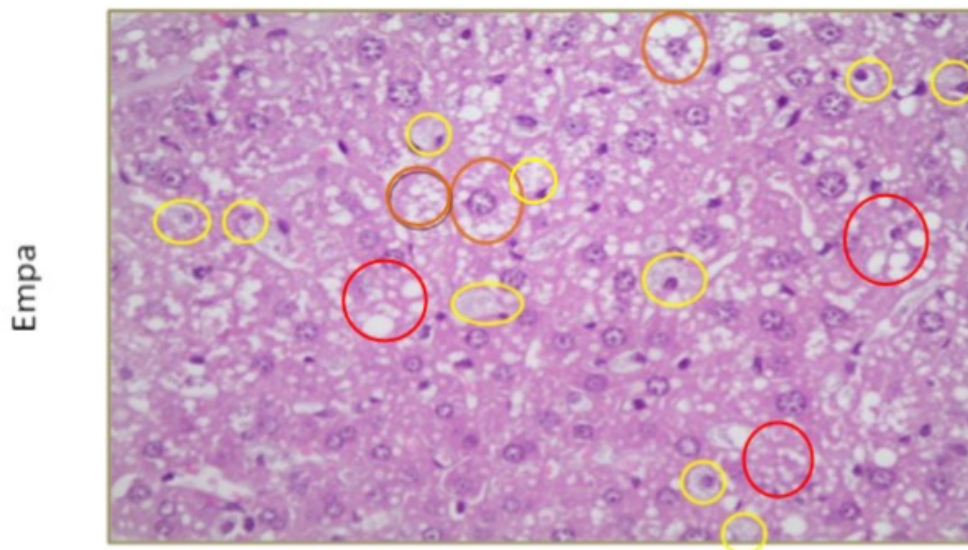
Η ιστομορφομετρική ανάλυση που διενεργήθηκε έδειξε ότι η χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 10 εβδομάδες προκάλεσε σημαντική συσσώρευση λιπιδίων στο ήπαρ σε σύγκριση με την ομάδα Control (Εικόνα 6.9, 6.10, 6.11). Επίσης, γίνεται εμφανής η ηπατοκυτταρική εκφύλιση στην ομάδα Empra με την εμφάνιση αεροσφαιροειδών κυττάρων (ballooning cells) (Εικόνα 6.10, 6.11). Ένα σημαντικό εύρημα είναι η εικόνα υπερπλασίας των ιστικών αφρωδών μακροφάγων, τα οποία προέρχονται από τα κύτταρα Kupffer και εμφανίζονται διογκωμένα πιθανώς λόγω αυξημένης φαγοκυτταρικής δραστηριότητας (Σχήμα 6.10).



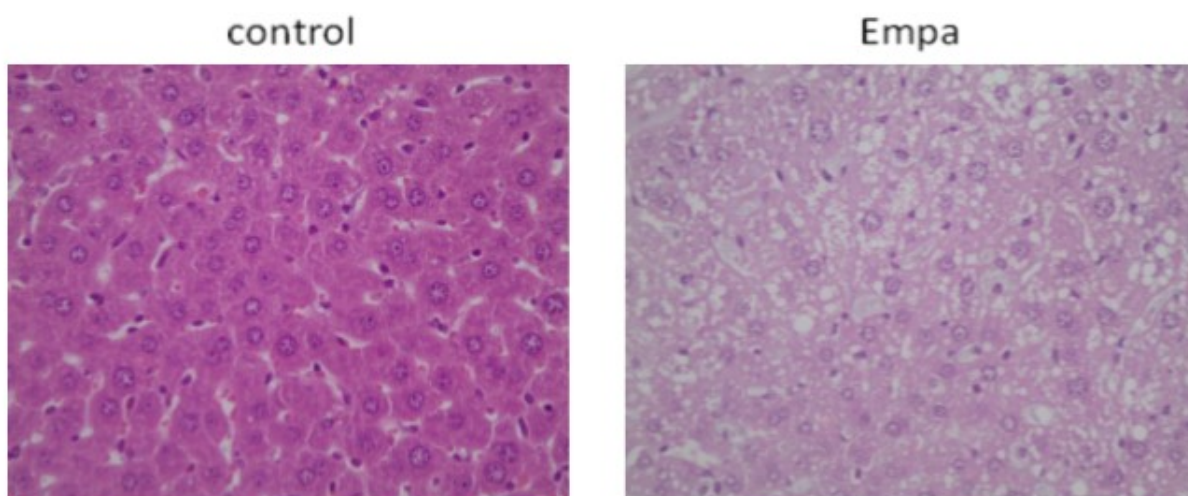
Εικόνα 6.9 Τομή ήπατος της ομάδας ελέγχου. Μπλε βέλος: Ηπατοκύτταρο, Πράσινο βέλος:

Ηπατικό κολποειδές, Μαύρο βέλος: Ενδοθηλιακό κύτταρο του ηπατικού κολποειδούς με πεπλατυσμένο πυρήνα και λιγότερο κυτταρόπλασμα από τα κύτταρα Kupffer, Κίτρινο βέλος: Κύτταρο Kupffer (Ιστικό μακροφάγο του ήπατος εντός του υπενδοθηλιακού χώρου του Disse).

Χρώση εωσίνης-αιματοξυλίνης

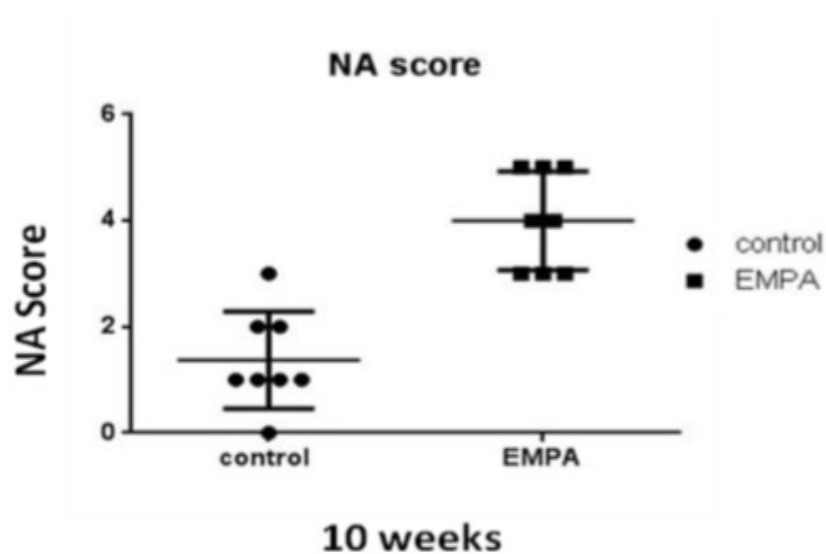


Εικόνα 6.10 Τομή ήπατος της ομάδας Empa μετά την παρέμβαση με εμπαγλιφλοζίνη για 10 εβδομάδες. Κίτρινο: Υπερπλασία των ιστικών κυττάρων Kupffer, Κόκκινο: Μικροφουσαλιδώδης λίπωση, Πορτοκαλί: Ηπατοκυτταρική εκφύλιση με δημιουργία αεροσφαιροειδών κυττάρων (ballooning cells) (Διογκωμένα ηπατοκύτταρα που υποδηλώνουν στεατοηπατίτιδα). Χρώση εωσίνης-αιματοξυλίνης



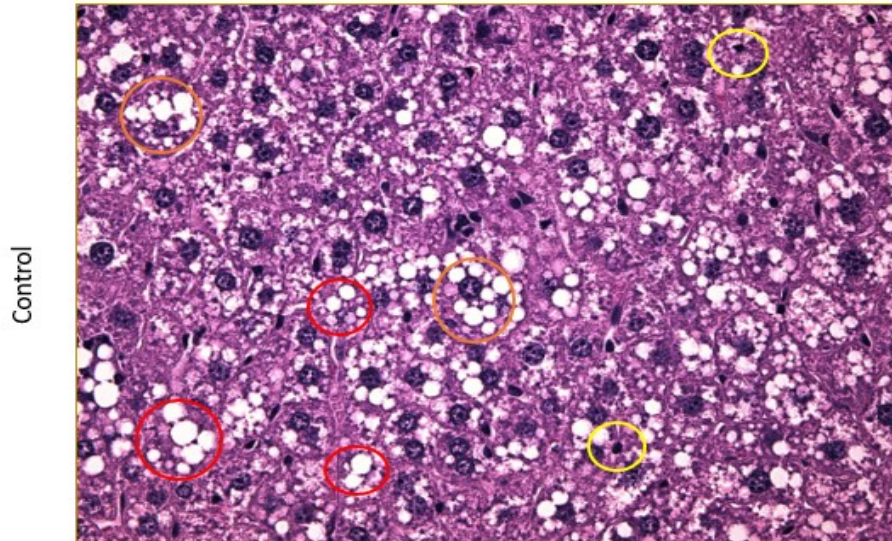
Εικόνα 6.11 Αριστερά: Τομή ήπατος της ομάδας ελέγχου. Δεξιά: Τομή ήπατος της ομάδας όπου χορηγήθηκε εμπαγλιφλοζίνη για 10 εβδομάδες με παρουσία μικροφουσαλιδώδους λίπωσης και αεροσφαιροειδών κυττάρων. Χρώση εωσίνης-αιματοξυλίνης

Έγινε στατιστική ανάλυση για την εκτίμηση του NA Score (NAFLD Activity Score) που υποδηλώνει το βαθμό της λιπώδους διήθησης του ήπατος και περιλαμβάνει παράγοντες όπως 1) εναπόθεση λιπιδίων, 2) φλεγμονή, 3) παρουσία αεροσφαιροειδών κυττάρων και 4) νέκρωση. Η ανάλυση έδειξε σημαντική αύξηση του NA score στην ομάδα Empa σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ωστόσο η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,09$).

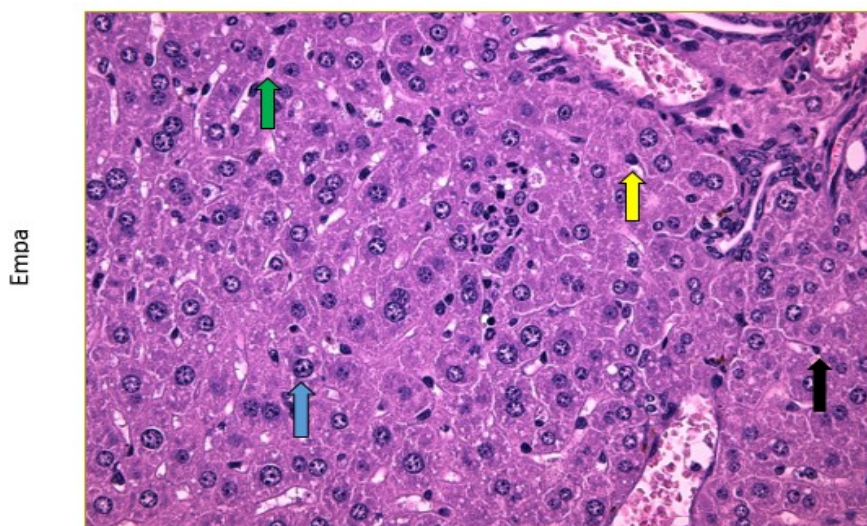


Σχήμα 6.33 Η χορήγηση εμπανγλιφλοζίνης αύξησε το NA Score στο ήπαρ μετά τις 10 εβδομάδες παρέμβασης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου

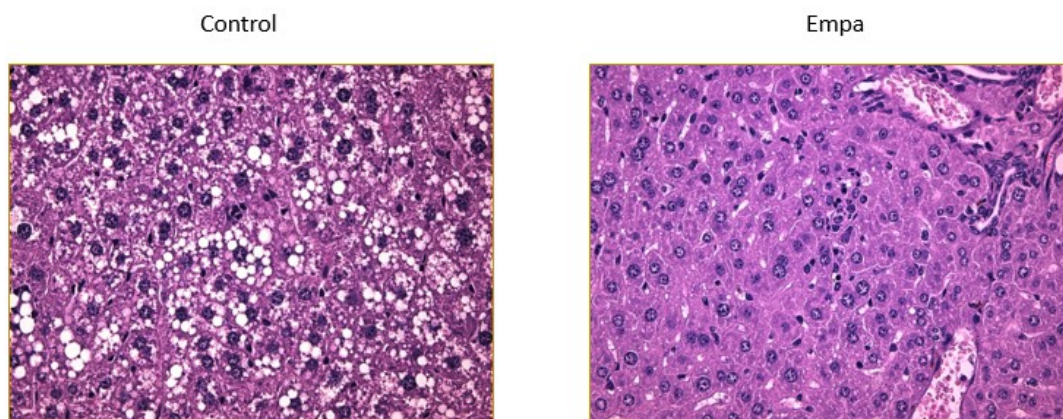
Αντιθέτως, η ιστομορφομετρική ανάλυση που διενεργήθηκε μετά τη χορήγηση εμπλαγλιφλοζίνης για 5 εβδομάδες έδειξε σημαντική μείωση των λιπιδίων στο ήπαρ σε σύγκριση με την ομάδα Control (Εικόνα 6.12, 6.13). Γίνεται εμφανής η ηπατοκυτταρική εκφύλιση στην ομάδα ελέγχου με την εμφάνιση αεροσφαιροειδών κυττάρων (ballooning cells) (Εικόνα 6.12).



Εικόνα 6.12 Τομή ήπατος της ομάδας ελέγχου. Κίτρινο: Παρουσία ιστοκυττάρων Kurpfer, Κόκκινο: Μικρο- και μακροφουσαλιδώδης στεάτωση, Πορτοκαλί: Κενοδοπιώδης (ballooning) εκφύλιση του κυτταροπλάσματος των ηπατοκυττάρων. Χρώση εωσίνης-αιματοξυλίνης

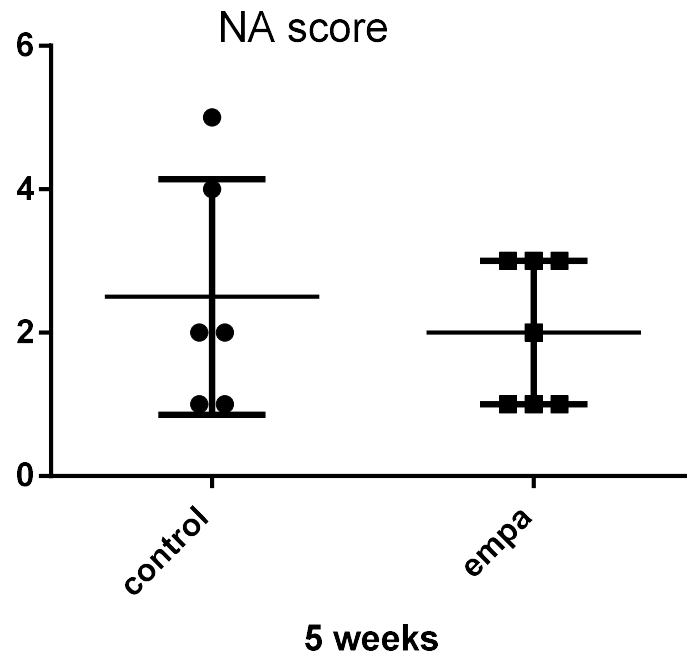


Εικόνα 6.13 Τομή ήπατος της ομάδας Empa μετά τη χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης για 5 εβδομάδες. Μπλε βέλος: Ηπατοκύτταρο, Πράσινο βέλος: Ηπατικό κολποειδές, Μαύρο βέλος: Ενδοθηλιακό κύτταρο του ηπατικού κολποειδούς με πεπλατυσμένο πυρήνα και λιγότερο κυτταρόπλασμα από τα κύτταρα Kupffer, Κίτρινο βέλος: Κύτταρο Kupffer (Ιστικό μακροφάγο του ήπατος εντός του υπενδοθηλιακού χώρου του Disse). Χρώση εωσίνης-αιματοξυλίνης



Εικόνα 6.14 Αριστερά: Τομή ήπατος της ομάδας ελέγχου με παρουσία μικροφουσαλιδώδους λίπωσης και αεροσφαιροειδών κυττάρων. Δεξιά: Τομή ήπατος της ομάδας όπου χορηγήθηκε εμπαγλιφλοζίνη για 5 εβδομάδες. Χρώση εωσίνης-αιματοξυλίνης.

Από τη στατιστική ανάλυση για την εκτίμηση του NA Score (NAFLD Activity Score) φάνηκε μείωση του NA score στην ομάδα Empa μετά τη χορήγηση της εμπαγλιφλοζίνης για 5 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ωστόσο η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0.53$).



Σχήμα 6.34 Η χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης μείωσε το NA Score στο ήπαρ μετά τις 5 εβδομάδες παρέμβασης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα υγείας τον 21^ο αιώνα, καθώς οι ταχύτατοι ρυθμοί της καθημερινότητας και το άγχος έχουν επηρεάσει πολύ τις διατροφικές συνήθειες των ενηλίκων, αλλά και των παιδιών. Κύριο χαρακτηριστικό της είναι η συσσώρευση λίπους, κυρίως τριγλυκεριδίων, στα ηπατοκύτταρα που προέρχεται από τη διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των μηχανισμών εισροής, de novo σύνθεσης και απομάκρυνσης των λιπαρών οξέων στα κύτταρα αυτά. Περιλαμβάνει ένα φάσμα που κυμαίνεται από την απλή στεάτωση έως τη μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (NASH). Παρόλο που η απλή στεάτωση χαρακτηρίζεται από σχετικά ευνοϊκή κλινική πορεία, η NASH εξελίσσεται πολύ πιο συχνά σε κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Η NAFLD εμφανίζεται συνήθως σε ασθενείς με ΣΔΤ2 ή/και με μεταβολικό σύνδρομο κι αυτό οφείλεται στην παρουσία ινσουλινοαντίστασης στους συγκεκριμένους ασθενείς. Η ινσουλινοαντίσταση αποτελεί τον βασικό μηχανισμό για την ανάπτυξη της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία ώστε να προληφθεί ή να καθυστερήσει η εξέλιξη σε στεατοηπατίτιδα. Οι υπάρχουσες φαρμακευτικές προσεγγίσεις αφορούν ευαισθητοποιητές ινσουλίνης και αντιοξειδωτικούς παράγοντες, όπως η μετφορμίνη και η βιταμίνη Ε αντίστοιχα, οι οποίες τροποποιούν την ευαισθησία των ιστών και κυρίως του ήπατος στην ινσουλίνη.

Ωστόσο, μια κατηγορία αντιδιαβητικών φαρμάκων, οι SGLT2 αναστολείς, φαίνεται να έχει ευεργετική επίδραση τόσο στη λιπώδη διήθηση όσο και στην παχυσαρκία πέρα από τη μείωση της γλυκόζης στο αίμα που προκαλεί. Έχουν διεξαχθεί αρκετές μελέτες που αφορούν τους SGLT2 αναστολείς και υπάρχει σχεδόν πλήρης ταύτιση αποτελεσμάτων. Αρχικά, έχει βρεθεί ότι βελτιώνουν τον γλυκαιμικό έλεγχο σε ασθενείς με ΣΔΤ2. Η νταπαγλιφλοζίνη σε δόση 10mg/kg την ημέρα παρείχε κλινικά σημαντικές βελτιώσεις στον γλυκαιμικό έλεγχο σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο, όταν χορηγήθηκε ως

μονοθεραπεία ή ως πρόσθετο φάρμακο σε θεραπεία με μετφορμίνη, σουλφονουλουρία, θειαζολιδινοδιόνες ή ινσουλίνη. Η επίδραση της νταπαγλιφλοζίνης ως συμπληρωματική θεραπεία στη μείωση της γλυκόζης διατηρήθηκε για 48-102 εβδομάδες. Αντίστοιχα αποτελέσματα βρέθηκαν και για την καναγλιφλοζίνη και την εμπαγλιφλοζίνη. Επίσης, βρέθηκε ότι οι SGLT2 αναστολείς μειώνουν το σωματικό βάρος, πιθανόν λόγω της απώλειας θερμίδων μέσω της γλυκοζουρίας, σε σύγκριση με άλλους αντιδιαβητικούς παράγοντες. Μείωση περίπου 2-3 κιλά έχει παρατηρηθεί στις περισσότερες μελέτες φάσης III της νταπαγλιφλοζίνης. Η χρήση καναγλιφλοζίνης σε δόση 300mg/kg την ημέρα παρατηρήθηκε ότι μειώνει αρκετά παραπάνω το σωματικό βάρος σε σχέση με τη δόση των 100mg/kg την ημέρα, ενώ η ίδια επίδραση εμφανίστηκε και στην εμπαγλιφλοζίνη στις δόσεις 25mg/kg την ημέρα και 10mg/kg την ημέρα. Τέλος, σε μια μετα-ανάλυση παρατηρήθηκε ότι οι SGLT2 αναστολείς μειώνουν την αρτηριακή πίεση, πιθανότατα λόγω της ήπιας διουρητικής δράσης τους [43]. Πιο συγκεκριμένα, οι Kamei και συνεργάτες έδειξαν σε μια πρόσφατη κλινική μελέτη ότι η χορήγηση τοφογλιφλοζίνης (SGLT2 αναστολέας που δεν κυκλοφορεί στην Ελλάδα) σε ασθενείς με ΣΔΤ2 οδήγησε σε σημαντική μείωση του σωματικού βάρους, του δείκτη μάζας σώματος (ΔΜΣ), του σωματικού λίπους και του σπλαχνικού λίπους, πέρα από τη βελτίωση του γλυκαιμικού ελέγχου και των επιπέδων ουρικού οξέος στον ορό. Έτσι, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η τοφογλιφλοζίνη φαίνεται να είναι μια λογική θεραπευτική προσέγγιση για παχύσαρκους ασθενείς με πρόσφατα διαγνωσμένο ΣΔΤ2, γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει στην πραγματικότητα τον φαινότυπο των ασθενών που ενδέχεται να επωφεληθούν περισσότερο από τους SGLT2 αναστολείς [56].

Όσον αφορά μελέτες σε ζωικά μοντέλα, οι Komiya και συν. διεξήγαγαν μια πειραματική μελέτη σε παχύσαρκους μύες με αντίσταση στην ινσουλίνη και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ιπραγλιφλοζίνη μειώνει το βάρος του ήπατος, τη συσσώρευση των ηπατικών λιπιδίων και τα επίπεδα ALT στον ορό, ευρήματα που υποστηρίζουν την ευεργετική δράση της στην ηπατική στεάτωση. Όλα αυτά οφείλονται στη μείωση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τη de novo λιπογένεση και γονιδίων που ενεργοποιούν τα

μακροφάγα, με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η λιπώδης διήθηση και η φλεγμονή [57]. Οι Honda και συν. διερεύνησαν, επίσης, την επίδραση της ιπραγλιφλοζίνης σε σιτιογενώς παχύσαρκους μύες, χρησιμοποιώντας ένα ζωικό μοντέλο στεατοηπατίτιδας και βρήκαν βελτίωση στην ινσουλινοαντοχή και στην ηπατική βλάβη. Η ιπραγλιφλοζίνη μείωσε τα επίπεδα των ελεύθερων λιπαρών οξέων στον ορό, τη συγκέντρωση ηπατικών λιπιδίων, τον αριθμό των αποπτωτικών κυττάρων και την ίνωση, ενώ αύξησε επίσης την εκροή λιπιδίων από το ήπαρ [58]. Σε μια μελέτη των Ji και συν. σε σιτιογενώς παχύσαρκους μύες, οι οποίοι δεν εμφάνιζαν ΣΔΤ2, φάνηκε η ωφέλιμη επίδραση της καναγλιφλοζίνης στο σωματικό βάρος, στα επίπεδα ολικής χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στον ορό, αλλά πιο σημαντικά, στην ηπατική στεάτωση, όπου ανέστρεψε τις επιδράσεις της υψηλής σε λιπαρά δίαιτας στο βάρος του ήπατος και στο σωματικό βάρος των μυών. Η αύξηση της έκφρασης του PPAR α 1 και η μείωση της έκφρασης των DGAT2, PPAR γ 1 και PPAR γ 2 μπορούν να επεξηγήσουν αυτά τα αποτελέσματα [59]. Τέλος, σε μια μελέτη των Xu και συν. σε σιτιογενώς παχύσαρκους C57BL/6J μύες φάνηκε ότι η χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης σε δόση 10mg/kg σε συνδυασμό με αθηρογόνο δίαιτα για 16 εβδομάδες μείωσε την ηπατική στεάτωση, καθώς μειώθηκε η συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων, χοληστερόλης και ελεύθερων λιπαρών οξέων στο ήπαρ και η έκφραση ενζύμων που επάγουν τη de novo λιπογένεση (SREBP, FAS). Ακόμα, παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων, όπως το PPAR α και καταστολή της φλεγμονής με μείωση της έκφρασης γονιδίων προφλεγμονωδών μορίων, όπως το TNF- α , στο ήπαρ [60]. Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών αφορούν διαφορετικούς SGLT2 αναστολείς, χορηγούμενους για διαφορετικά χρονικά διαστήματα αλλά και σε διάφορες δοσολογίες π.χ καναγλιφλοζίνη 20-30mg/kg για 8 και 20 εβδομάδες, ιπραγλιφλοζίνη 10mg/kg για 4 εβδομάδες, χωρίς βέβαια να υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα μέχρι σήμερα για τη σύγκριση των επιδράσεων της μακροχρόνιας και της βραχυχρόνιας χορήγησης εμπαγλιφλοζίνης σε συνδυασμό με αθηρογόνο δίαιτα σε ζωικό μοντέλο αθηρωμάτωσης, που μπορεί και αναπτύσσει σιτιογενή λιπώδη διήθηση.

Η παρούσα μελέτη ξεκίνησε με τον προσδιορισμό ορισμένων βιοχημικών παραμέτρων στον ορό μετά από βραχυχρόνια (5 εβδομάδες) και μακροχρόνια χορήγηση (10 εβδομάδες) εμπαγλιφλοζίνης σε ζωικό μοντέλο αθηρωμάτωσης μυός με απαλειφή του γονιδίου ApoE (ApoE(-/-)). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας και ολικής χοληστερόλης μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά και στις δύο ομάδες παρέμβασης, ενώ δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα LDL χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου.

Σε επόμενο στάδιο, θελήσαμε να μελετήσουμε αν και κατά πόσο η βραχυχρόνια και η μακροχρόνια χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης επηρεάζει τα μονοπάτια του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, το οποίο αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς ανάπτυξης και εξέλιξης της NAFLD. Έτσι, μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο, προσδιορίσαμε τη γονιδιακή έκφραση των eIF2α, ATF4, CHOP, Xbp1, IRE1, GRP94, GRP78 και μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western την πρωτεϊνική έκφραση των eIF2α, p-eIF2α και CHOP. Στη βραχυχρόνια παρέμβαση παρατηρήσαμε σημαντική μείωση της έκφρασής τους στο ήπαρ στην ομάδα EMPA σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, γεγονός που υποδηλώνει τη μείωση του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και από μια πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη που αφορά τις επιδράσεις της χορήγησης εμπαγλιφλοζίνης 10 mg/kg καθημερινά για 5 εβδομάδες στην ινσουλινοαντοχή, στη λιπογένεση και στο στρες του ενδοπλασματικού δικτύου σε C57Bl/6 άρρενες μύες άγριου τύπου (wild type), που σιτίστηκαν με αθηρογόνο δίαιτα. Η μελέτη αυτή έδειξε μείωση στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που επάγουν τη λιπογένεση (SREBP1C, FASN, PPARγ, ACC1, SCD1, CD36) και το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου [C/EBP homologous protein (CHOP), Activating Transcription Factor 4 (ATF4), Growth Arrest and DNA Damageinducible 45 (GADD45)]. Παράλληλα, παρατηρήθηκε αύξηση στη γονιδιακή έκφραση δεικτών β-οξειδωσης [(Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha (PPARα), Acyl-CoA Oxidase 1 (ACOX1))]. Στην ίδια μελέτη, τα επίπεδα τριγλυκεριδίων του ήπατος μειώθηκαν μετά τη χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης σε συνδυασμό με αθηρογόνο δίαιτα σε σύγκριση με την ομάδα που χορηγήθηκε μόνο αθηρογόνος δίαιτα, ενώ μειώθηκαν και τα

λιποσταγονίδια του ήπατος [54]. Από τα δεδομένα αυτά προκύπτει ότι η βραχυχρόνια παρέμβαση με εμπαγλιφλοζίνη σε δόση 10 mg/kg την ημέρα ασκεί ευεργετική επίδραση στη λιπώδη διήθηση και το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου σε σιτιογενώς παχύσαρκους μύες ανεξάρτητα αν αυτοί είναι άγριου τύπου ή *aroE* knockout. Εν αντιθέσει, στη μακροχρόνια παρέμβαση διαπιστώσαμε αύξηση της γονιδιακής έκφρασης των *eIF2α*, *ATF4*, *CHOP*, *Xbp1*, *IRE1*, *GRP94*, *GRP78* στο ήπαρ και της πρωτεϊνικής έκφρασης των *eIF2α*, *p-eIF2α* και *CHOP* στην ομάδα EMPA σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, το οποίο δείχνει επιδείνωση του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου στο ήπαρ. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα έρχονται σε αντίθεση με τα έως τώρα δεδομένα από μελέτες χορήγησης SGLT2 αναστολέων σε ζωικά μοντέλα μη αλκοολικής στεατοηπατίτιδας. Δηλαδή, η μακροχρόνια χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης σε δόση 10 mg/kg την ημέρα φαίνεται να έχει αντίθετα αποτελέσματα από τα αναμενόμενα, δηλαδή να χειροτερεύει την ηπατική στεάτωση και το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου σε σιτιογενώς παχύσαρκους *aroE*(-/-) μύες.

Για να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα αυτά, πραγματοποιήσαμε ιστομορφομετρική ανάλυση σε τομές ήπατος, όπου έγινε εμφανής η αυξημένη εναπόθεση λιποσταγονιδίων στην ομάδα που χορηγήθηκε εμπαγλιφλοζίνη για 10 εβδομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ενώ στους ιστούς της ομάδας που χορηγήθηκε εμπαγλιφλοζίνη για 5 εβδομάδες, η εναπόθεση λιποσταγονιδίων βρέθηκε μειωμένη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Ακόμα, μετά από στατιστική ανάλυση, το NA score, το οποίο αποτελεί δείκτη του βαθμού της λιπώδους διήθησης, φλεγμονής και ίνωσης, αυξήθηκε στην ομάδα παρέμβασης 10 εβδομάδων με EMPA σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Στην αντίστοιχη ομάδα χορήγησης EMPA 5 εβδομάδων, το NA score βρέθηκε μειωμένο σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Στην παρούσα μελέτη, λοιπόν, έγινε σύγκριση της βραχυχρόνιας και της μακροχρόνιας χορήγησης εμπαγλιφλοζίνης σε σιτιογενώς παχύσαρκους *aroE* knockout μύες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χορήγησή της για 5 εβδομάδες έχει ευεργετική επίδραση στη λιπώδη διήθηση και το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, ενώ για 10 εβδομάδες έχει αντίθετα αποτελέσματα, δηλαδή επιδείνωση της ηπατικής στεάτωσης και του στρες του

ενδοπλασματικού δικτύου. Έτσι, καταδεικνύεται για πρώτη φορά ότι η μακροχρόνια χορήγηση εμπαγλιφλοζίνης μπορεί να έχει επιβλαβή ρόλο σε ζωϊκό μοντέλο αθηρωμάτωσης μυός με απαλειφή του γονιδίου ApoE. Περαιτέρω μελέτες χρειάζονται προκειμένου να διευκρινιστεί εάν η μη αναμενόμενη αυτή δράση της εμπαγλιφλοζίνης εξαρτάται από το συγκεκριμένο γονότυπο του μυός σε συνδυασμό με τη μεγάλη διάρκεια της παρέμβασης ή/και τη χορηγούμενη αθηρογόνο διαίτα. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας πιθανώς να οφείλονται στο συνδυασμό μακράς διάρκειας χορήγησης αθηρογόνου διαίτας και έλλειψης του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης E στο ζωϊκό μοντέλο μυός που χρησιμοποιήσαμε, ωστόσο χρειάζεται περισσότερη έρευνα για να εξακριβωθεί. Σε επόμενο στάδιο θα μελετηθούν 1) εάν η μακροχρόνια χορήγηση της εμπαγλιφλοζίνης έχει τα ίδια αποτελέσματα σε σπιογενώς παχύσαρκους μύες άγριου τύπου (wild type) και 2) εάν η συγκεκριμένη δράση οφείλεται αποκλειστικά στο συγκεκριμένο φάρμακο που χορηγήθηκε ή εάν η δράση αυτή απαντά στην ευρύτερη κατηγορία των SGLT2 αναστολέων (class-effect ή drug-effect) οπότε θα μελετήσουμε και την επίδραση της καναγλιφλοζίνης.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

NAFLD	Nonalcoholic fatty liver disease
NAFL	Nonalcoholic fatty liver
NASH	Nonalcoholic steatohepatitis
T2DM	Type 2 Diabetes Mellitus
DNL	De novo lipogenesis
NEFAs	Non esterified fatty acids
VLDL	Very low-density lipoproteins
HSL	Hormone-sensitive lipase
ChREBP	Carbohydrate-responsive element-binding protein
SREBP-1c	Sterol regulatory element-binding protein 1
JNK	c-Jun N-terminal kinases
FFAs	Free fatty acids
ROS	Reactive oxygen species
UPR	Unfolded protein response
ERAD	Endoplasmic-reticulum-associated degradation
IRE1 α	Inositol-requiring enzyme 1 α
PERK	PKR-like ER kinase
GRP78	78-kDa glucose regulated protein
ATF6	Activating transcription factor 6
S1P	Site 1 Protease
S2P	Site 2 Protease
Xbp1	X-box binding protein 1
eIF2 α	Eukaryotic translation initiation factor 2 α
ATG	Autophagy related proteins
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
p38 MAPK	P38 mitogen-activated protein kinases
CHOP	C/EBP homologous protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2

GADD34	Growth arrest and DNA damage-inducible protein
DR5	Death receptor 5
Ero1 α	Endoplasmic Reticulum Oxidoreductase 1 α
IP3R	Inositol trisphosphate receptor
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor
ACC	Acetyl-CoA carboxylase
FAS	Fatty acid synthase
LDL	Low density lipoproteins
SCD1	Stearoyl-CoA desaturase-1
DGAT2	Diacylglycerol O-Acyltransferase 2
ACC2	Acetyl-CoA carboxylase 2
GLUTs	Glucose transporters
SGLT2	Sodium-glucose co-transporter 2
SGLT1	Sodium-glucose co-transporter 1
HDL	High density lipoproteins

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Ashraf, N. U. & Sheikh, T. A. *Endoplasmic reticulum stress and Oxidative stress in the pathogenesis of Non-alcoholic fatty liver disease. Free Radical Research* vol. 49 (2015).
2. Benedict, M. & Zhang, X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World J. Hepatol.* **9**, 715–732 (2017).
3. Machado, M. V. & Cortez-Pinto, H. Non-alcoholic fatty liver disease: What the clinician needs to know. *World J. Gastroenterol.* **20**, 12956–12980 (2014).
4. Leite, N. C., Villela-Nogueira, C. A., Cardoso, C. R. L. & Salles, G. F. Non-alcoholic fatty liver disease and diabetes: From physiopathological interplay to diagnosis and treatment. *World J. Gastroenterol.* **20**, 8377–8392 (2014).
5. Zhang, X. Q., Xu, C. F., Yu, C. H., Chen, W. X. & Li, Y. M. Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* **20**, 1768–1776 (2014).
6. Kwanten, W. J., Martinet, W. & Francque, S. M. Autophagy in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). in *Autophagy in Current Trends in Cellular Physiology and Pathology* (InTech, 2016). doi:10.5772/64534.
7. Tilg, H., Moschen, A. R. & Roden, M. NAFLD and diabetes mellitus. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* vol. 14 32–42 (2017).
8. Buzzetti, E., Pinzani, M. & Tsochatzis, E. A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism.* **65**, 1038–1048 (2016).
9. Ameer, F., Scandiuzzi, L., Hasnain, S., Kalbacher, H. & Zaidi, N. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism: Clinical and Experimental* vol. 63 895–902 (2014).

10. Kawano, Y. & Cohen, D. E. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology* vol. 48 434–441 (2013).
11. Bolsoni-Lopes, A. & Alonso-Vale, M. I. C. Lipolysis and lipases in white adipose tissue – An update. *Archives of Endocrinology and Metabolism* vol. 59 335–342 (2015).
12. Postic, C. & Girard, J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: Lessons from genetically engineered mice. *Journal of Clinical Investigation* vol. 118 829–838 (2008).
13. BALENT, B., GOSWAMI, G., GOODLOE, G., ROGATSKY, E., RAUTA, O., NEZAMI, R., MINTS, L., ANGELETTI, R. H. & STEIN, D. T. Acute Elevation of NEFA Causes Hyperinsulinemia without Effect on Insulin Secretion Rate in Healthy Human Subjects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **967**, 535–543 (2006).
14. Mu, W., Xuefang, C., Liu, Y., Qianzhou, L., Gaolin, L., Jigang, Z. & Xiaoyu, L. Potential nexus of non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus: Insulin resistance between hepatic and peripheral tissues. *Frontiers in Pharmacology* vol. 9 (2019).
15. Firneisz, G. Non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus: The liver disease of our age? *World Journal of Gastroenterology* 9072–9089 (2014) doi:10.3748/wjg.v20.i27.9072.
16. Day, C. P. & James, O. F. W. Steatohepatitis: A tale of two ‘Hits’? *Gastroenterology* vol. 114 842–845 (1998).
17. Giorgio, V., Prono, F., Graziano, F. & Nobili, V. Pediatric non alcoholic fatty liver disease: Old and new concepts on development, progression, metabolic insight and potential treatment targets. *BMC Pediatrics* vol. 13 (2013).
18. Guilherme, A., Virbasius, J. V., Puri, V. & Czech, M. P. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 9 367–377 (2008).

19. Cusi, K. Role of Insulin Resistance and Lipotoxicity in Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Clinics in Liver Disease* vol. 13 545–563 (2009).
20. Schönthal, A. H. Endoplasmic Reticulum Stress: Its Role in Disease and Novel Prospects for Therapy. *Scientifica (Cairo)*. **2012**, 1–26 (2012).
21. smooth endoplasmic reticulum | Definition, Structure, & Function | Britannica. <https://www.britannica.com/science/smooth-endoplasmic-reticulum>.
22. Kadowaki, H. & Nishitoh, H. Signaling pathways from the endoplasmic reticulum and their roles in disease. *Genes* (2013) doi:10.3390/genes4030306.
23. Schwarz, D. S. & Blower, M. D. The endoplasmic reticulum: Structure, function and response to cellular signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 79–94 (2016).
24. Ellgaard, L. & Helenius, A. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 4 181–191 (2003).
25. Cybulsky, A. V. Endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response and autophagy in kidney diseases. *Nat. Rev. Nephrol.* **13**, 681–696 (2017).
26. Osowski, C. M. & Urano, F. Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. in *Methods in Enzymology* vol. 490 71–92 (Academic Press Inc., 2011).
27. Moon, H. W., Han, H. G. & Jeon, Y. J. Protein quality control in the endoplasmic reticulum and cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
28. Hendershot, L. M. The ER chaperone BiP is a master regulator of ER function. *Mt. Sinai J. Med.* **71**, 289–297 (2004).
29. Doroudgar, S., Völkers, M., Thuerauf, D. J., Khan, M., Mohsin, S., Respress, J. L., Wang, W., Gude, N., Müller, O. J., Wehrens, X. H. T., Sussman, M. A. & Glembotski, C. C. Hrd1 and ER-associated protein degradation, ERAD, are critical elements of the adaptive ER stress response in cardiac myocytes. *Circ. Res.* **117**, 536–546 (2015).

30. Ogata, M., Hino, S. -i., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tanii, I., Yoshinaga, K., Shiosaka, S., Hammarback, J. A., Urano, F. & Imaizumi, K. Autophagy Is Activated for Cell Survival after Endoplasmic Reticulum Stress. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 9220–9231 (2006).
31. Cicchini, M., Karantza, V. & Xia, B. Molecular pathways: Autophagy in cancer-A matter of timing and context. *Clin. Cancer Res.* **21**, 498–504 (2015).
32. Sano, R. & Reed, J. C. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* vol. 1833 3460–3470 (2013).
33. Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X. Z., Batchvarova, N., Lightfoot, R. T., Remotti, H., Stevens, J. L. & Ron, D. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* **12**, 982–995 (1998).
34. McCullough, K. D., Martindale, J. L., Klotz, L. O., Aw, T. Y. & Holbrook, N. J. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1249–59 (2001).
35. Zhou, H. & Liu, R. ER stress and hepatic lipid metabolism. *Frontiers in Genetics* vol. 5 (2014).
36. Fujita, Y. & Inagaki, N. Renal sodium glucose cotransporter 2 inhibitors as a novel therapeutic approach to treatment of type 2 diabetes: Clinical data and mechanism of action. *J. Diabetes Investig.* **5**, 265–275 (2014).
37. Navale, A. M. & Paranjape, A. N. Glucose transporters: physiological and pathological roles. *Biophysical Reviews* vol. 8 5–9 (2016).
38. Steen, O. & Goldenberg, R. M. The Role of Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors in the Management of Type 2 Diabetes. *Canadian Journal of Diabetes* vol. 41 517–523 (2017).
39. Ehrenkranz, J. R. L., Lewis, N. G., Kahn, C. R. & Roth, J. Phlorizin: A review. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* vol. 21 31–38

- (2005).
40. Patoulias, D. SGLT-2 Inhibitors: Are They a Promising Treatment Option in T2DM Patients with NAFLD? (2017) doi:10.14712/18059694.2018.15.
 41. Ghosh, R. K., Bandyopadhyay, D., Hajra, A., Biswas, M. & Gupta, A. Cardiovascular outcomes of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors: A comprehensive review of clinical and preclinical studies. *International Journal of Cardiology* vol. 212 29–36 (2016).
 42. Heerspink, H. J. L., Perkins, B. A., Fitchett, D. H., Husain, M. & Cherney, D. Z. I. Sodium Glucose Cotransporter 2 Inhibitors in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Circulation* **134**, 752–772 (2016).
 43. Nauck, M. A. Update on developments with SGLT2 inhibitors in the management of type 2 diabetes. *Drug Design, Development and Therapy* vol. 8 1335–1351 (2014).
 44. Weir, M. R., Kline, I., Xie, J., Edwards, R. & Usiskin, K. Effect of canagliflozin on serum electrolytes in patients with type 2 diabetes in relation to estimated glomerular filtration rate (eGFR). *Curr. Med. Res. Opin.* **30**, 1759–1768 (2014).
 45. Zinman, B., Wanner, C., Lachin, J. M., Fitchett, D., Bluhmki, E., Hantel, S., Mattheus, M., Devins, T., Johansen, O. E., Woerle, H. J., Broedl, U. C. & Inzucchi, S. E. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* **373**, 2117–2128 (2015).
 46. Neal, B., Perkovic, V., Mahaffey, K. W., de Zeeuw, D., Fulcher, G., Erond, N., Shaw, W., Law, G., Desai, M. & Matthews, D. R. Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* **377**, 644–657 (2017).
 47. Jakher, H., Chang, T. I., Tan, M. & Mahaffey, K. W. Canagliflozin review – Safety and efficacy profile in patients with T2DM. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* vol. 12 209–215 (2019).
 48. List, J. F., Woo, V., Morales, E., Tang, W. & Fiedorek, F. T. Sodium-glucose cotransport inhibition with dapagliflozin in type 2 diabetes.

- Diabetes Care* **32**, 650–657 (2009).
49. Poole, R. M. & Dungan, R. T. Ipragliflozin: First global approval. *Drugs* **74**, 611–617 (2014).
 50. Ndefo, U. A., Anidiobi, N. O., Basheer, E. & Eaton, A. T. Empagliflozin (Jardiance): A Novel SGLT2 Inhibitor for the Treatment of Type-2 Diabetes. *P T* **40**, 364–8 (2015).
 51. Sattar, N., Fitchett, D., Hantel, S., George, J. T. & Zinman, B. Empagliflozin is associated with improvements in liver enzymes potentially consistent with reductions in liver fat: results from randomised trials including the EMPA-REG OUTCOME® trial. *Diabetologia* **61**, 2155–2163 (2018).
 52. Jung, C.-H. & Mok, J.-O. The Effects of Hypoglycemic Agents on Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Focused on Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors and Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists. *J. Obes. Metab. Syndr.* **28**, 18–29 (2019).
 53. Kuchay, M. S., Krishan, S., Mishra, S. K., Farooqui, K. J., Singh, M. K., Wasir, J. S., Bansal, B., Kaur, P., Jevalikar, G., Gill, H. K., Choudhary, N. S. & Mithal, A. Effect of empagliflozin on liver fat in patients with type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease: A randomized controlled trial (E-LIFT Trial). *Diabetes Care* **41**, 1801–1808 (2018).
 54. Petito-da-Silva, T. I., Souza-Mello, V. & Barbosa-da-Silva, S. Empagliflozin mitigates NAFLD in high-fat-fed mice by alleviating insulin resistance, lipogenesis and ER stress. *Mol. Cell. Endocrinol.* **498**, 110539 (2019).
 55. Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J. & Wittwer, C. T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. (2009) doi:10.1373/clinchem.2008.112797.
 56. Kamei, S., Iwamoto, M., Kameyama, M., Shimoda, M., Kinoshita, T., Obata, A., Kimura, T., Hirukawa, H., Tatsumi, F., Kohara, K., Nakanishi,

- S., Mune, T., Kaku, K. & Kaneto, H. Effect of Tofogliflozin on Body Composition and Glycemic Control in Japanese Subjects with Type 2 Diabetes Mellitus. *J. Diabetes Res.* **2018**, (2018).
57. Komiya, C., Tsuchiya, K., Shiba, K., Miyachi, Y., Furuke, S., Shimazu, N., Yamaguchi, S., Kanno, K. & Ogawa, Y. Ipragliflozin improves hepatic steatosis in obese mice and liver dysfunction in type 2 diabetic patients irrespective of body weight reduction. *PLoS One* **11**, (2016).
 58. Honda, Y., Imajo, K., Kato, T., Kessoku, T., Ogawa, Y., Tomeno, W., Kato, S., Mawatari, H., Fujita, K., Yoneda, M., Saito, S. & Nakajima, A. The selective SGLT2 inhibitor ipragliflozin has a therapeutic effect on nonalcoholic steatohepatitis in mice. *PLoS One* **11**, (2016).
 59. Ji, W., Zhao, M., Wang, M., Yan, W., Liu, Y., Ren, S., Lu, J., Wang, B. & Chen, L. Effects of canagliflozin on weight loss in high-fat diet-induced obese mice. *PLoS One* **12**, (2017).
 60. Xu, L., Nagata, N., Nagashimada, M., Zhuge, F., Ni, Y., Chen, G., Mayoux, E., Kaneko, S. & Ota, T. SGLT2 Inhibition by Empagliflozin Promotes Fat Utilization and Browning and Attenuates Inflammation and Insulin Resistance by Polarizing M2 Macrophages in Diet-induced Obese Mice. *EBioMedicine* **20**, 137–149 (2017).