



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
—ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837—

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Ιατρική Γενετική: Κλινική και Εργαστηριακή Κατεύθυνση»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη της πρωτεΐνης δεσμευτικής της θειορεδοξίνης
(ΤΧΝΙΡ) σε πλακούντες μητέρων με διαβήτη κύησης**

Θεοδώρα Α. Λουκανάρη

Επιβλέπουσα: **Βασιλική Παπαευαγγέλου, Καθηγήτρια Παιδιατρικής
Λοιμωξιολογίας**

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2019



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
—ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837—

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Ιατρική Γενετική: Κλινική και Εργαστηριακή Κατεύθυνση»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη της πρωτεΐνης δεσμευτικής της θειορεδοξίνης
(TXNIP) σε πλακούντες μητέρων με διαβήτη κύησης**

Θεοδώρα Α. Λουκανάρη

Επιβλέπουσα: **Βασιλική Παπαευαγγέλου, Καθηγήτρια Παιδιατρικής
Λοιμωξιολογίας**

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2019

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη της πρωτεΐνης δεσμευτικής της θειορεδοξίνης (TXNIP) σε πλακούντες μητέρων με διαβήτη κύησης

Θεοδώρα Α. Λουκανάρη

A.M.: 20160646

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: **Βασιλική Παπαευαγγέλου**, Καθηγήτρια Παιδιατρικής-Λοιμωξιολογίας

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ : **Βασιλική Παπαευαγγέλου**, Καθηγήτρια Παιδιατρικής-Λοιμωξιολογίας
Ελένη Φρυσίρα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Γενετικής
Ιωάννα Traeger – Συνοδινού, Καθηγήτρια Γενετικής

Ιούνιος 2019

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια χρόνια ασθένεια που περιλαμβάνει μια σειρά μεταβολικών δυσλειτουργιών, με χαρακτηριστικό τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα (υπεργλυκαιμία). Σε υγιή άτομα, τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα ρυθμίζονται από ορμόνες και ειδικότερα την ινσουλίνη, που ελέγχει τη μετακίνηση της γλυκόζης από την κυκλοφορία του αίματος στα κύτταρα. Στους πάσχοντες από διαβήτη παρατηρείται είτε έλλειψη ινσουλίνης είτε ινσουλινοαντίσταση, με τις δύο καταστάσεις να συνυπάρχουν σε κάποιες περιπτώσεις.

Ως διαβήτη κύησης ορίζεται η ινσουλινοαντίσταση που διαγιγνώσκεται ή αναγνωρίζεται για πρώτη φορά κατά την εγκυμοσύνη. Η υπεργλυκαιμία κατά την κύηση σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο επιπλοκών για τη μητέρα, το έμβρυο ή το νεογνό, ενώ μητέρες και παιδιά μητέρων με διαβήτη κύησης θεωρούνται αυξημένου κινδύνου για εμφάνιση διαβήτη στη μετέπειτα ζωή. Η εγκυμοσύνη είναι γενικά μια διαβητογόνος κατάσταση. Κάθε κύηση χαρακτηρίζεται από κάποιο βαθμό ινσουλινοαντίστασης, η οποία προκαλείται από πλακουντιακές ορμόνες.

Η πρωτεΐνη δεσμευτική της θειορεδοξίνης (TXNIP) ρυθμίζει την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου μέσω δέσμευσης και αναστολής της θειορεδοξίνης. Το σύστημα της θειορεδοξίνης (Trx system) αποτελεί το κύριο αντιοξειδωτικό σύστημα του οργανισμού κατά του οξειδωτικού στρες. Υψηλά επίπεδα γλυκόζης έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης της TXNIP. Η πρωτεΐνη TXNIP κατέχει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό της γλυκόζης, το οξειδωτικό στρες και την απόπτωση των β- κυττάρων του παγκρέατος, ενώ έχει επιπλέον δράσεις όπως η καταστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και της μεταγραφής, η ρύθμιση της φλεγμονώδους αντίδρασης και η καταστολή όγκων.

Στην παρούσα μελέτη επιχειρήθηκε ο προσδιορισμός των επιπέδων της πρωτεΐνης TXNIP σε πλακούντες υγιών γυναικών (μαρτύρων) και γυναικών με διαβήτη κύησης (ασθενών) με σκοπό την εύρεση πιθανών διαφορών στα επίπεδα έκφρασης και συσχέτιση με σωματομετρικές και βιοχημικές παραμέτρους. Μετά από εκχύλιση των πρωτεϊνών από τον πλακουντιακό ιστό ακολούθησε ηλεκτροφόρηση με τεχνική Western blot.

Από τη στατιστική ανάλυση παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων μαρτύρων και ασθενών στα επίπεδα της πρωτεΐνης TXNIP, που βρέθηκε αυξημένη στους μάρτυρες. Επίσης, στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στο μέσο βάρος της μητέρας, το BMI πριν τον τοκετό και στα επίπεδα γλυκόζης, που ήταν αυξημένα στους ασθενείς. Τα επίπεδα της TXNIP επηρεάζονται από τη λήψη ινσουλίνης και την παχυσαρκία και πιθανόν αυτοί οι παράγοντες να μεταβάλλουν το αναμενόμενο αποτέλεσμα. Επιπλέον παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ TXNIP και διαστολικής πίεσης, καθώς και TXNIP και επιπέδων γλυκόζης.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: σακχαρώδης διαβήτης κύησης

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: διαβήτης κύησης, TXNIP, Western blot, TRX, γλυκόζη

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a chronic disease that includes a series of metabolic dysfunctions, characterized by high blood glucose (hyperglycemia). In healthy individuals, blood glucose levels are regulated by hormones, in particular insulin, which controls the glucose transportation from the bloodstream into the cells. Diabetic patients have either insulin deficiency or insulin resistance and both conditions coexist in some cases.

Gestational diabetes is defined as the insulin resistance first diagnosed or detected during pregnancy. Pregnancy hyperglycemia is associated with an increased risk of complications for the mother, the fetus or the neonate, while mothers with gestational diabetes and their off-springs are considered to be at increased risk of developing diabetes later in life. Pregnancy is generally a diabetic condition. Each pregnancy is characterized by some degree of insulin resistance, which is caused by placental hormones.

The thioredoxin interacting protein (TXNIP) is a regulator of the redox stage of the cell by binding to and inhibiting thioredoxin. The thioredoxin system (Trx system) is the body's main antioxidant system against oxidative stress. High glucose levels result in increased expression of TXNIP. The TXNIP protein has an important role in glucose metabolism, oxidative stress and pancreatic β -cell apoptosis while having additional effects such as suppression of cell growth and transcription, regulation of inflammatory response and tumor suppression.

In this study we attempted to determine TXNIP protein levels in placenta of healthy women (controls) and women with gestational diabetes (patients), in order to find possible differences in the expression levels and correlations with somatometric and biochemical parameters. The protein extraction from the placental tissue was followed by Western blot electrophoresis.

Statistical analysis revealed a statistically significant difference between the control and patient groups and TXNIP levels found to be increased in the control group. Also, statistically significant differences were observed in maternal average weight, BMI before delivery and glucose levels, that were elevated in patients. TXNIP levels are affected by treatment with insulin and obesity and these factors may alter the expected results. In addition, a statistically significant negative correlation was observed between TXNIP and diastolic blood pressure and between TXNIP and glucose levels.

SUBJECT AREA: gestational diabetes mellitus

KEY WORDS: gestational diabetes, TXNIP, Western blot, TRX, glucose

Στους γονείς μου και την αδερφή μου, Άννα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία αποτελεί το σημείο ολοκλήρωσης των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Από τη φοίτηση στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα της Ιατρικής Γενετικής και ειδικότερα από την εκπόνηση αυτής της εργασίας στη Μονάδα Έρευνας του Αττικού Νοσοκομείου αποκόμισα πολλές γνώσεις και εμπειρίες που με έφεραν ακόμη πιο κοντά στους στόχους μου.

Γι' αυτόν τον λόγο θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Άννα Παπαδοπούλου για την καθοδήγηση, τις συμβουλές και τις διορθώσεις της και για την στήριξή της σε όλη της διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης την κυρία Βασιλική Παπαευαγγέλου που ανέλαβε την επίβλεψη της εργασίας, καθώς και τα έτερα μέλη της τριμελούς επιτροπής, κυρία Ελένη Φρυσίρα και κυρία Ιωάννα Traeger – Συνοδινού, που υπήρξαν εξαιρετες διδάσκουσες κατά τη φοίτησή μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Μαριλένα Παπαϊωάννου για την μεγάλη και καθοριστική βοήθειά της, την εξαιρετική συνεργασία μας και τις πολύ ωραίες στιγμές που περάσαμε μαζί στο εργαστήριο.

Ευχαριστώ επίσης τον κύριο Γιώργο Κανελλόπουλο για την επικοινωνία που είχαμε, τη βοήθεια και την συνεργασία.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τον κύριο Γιώργο Παπαδόπουλο, καθηγητή στατιστικής στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών για την καθοδήγηση και την καλή του διάθεση να με βοηθήσει σε ό,τι χρειάστηκε.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά και την αδερφή μου, όπου είναι αφιερωμένη αυτή η εργασία, για τη στήριξή τους σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Αυτή η στήριξη ήταν καθοριστική και απαραίτητη για την πορεία μου μέχρι σήμερα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iv
ABSTRACT	v
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	vii
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	viii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	ix
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	x
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	xi
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	xii
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Διαβήτη κύησης (Gestational Diabetes Mellitus).....	9
1.2 Πλακούντας.....	15
1.3 Το σύστημα της θειορεδοξίνης και η πρωτεΐνη δεσμευτική της θειορεδοξίνης	17
1.3.1 Το σύστημα της θειορεδοξίνης	17
1.3.2 Η πρωτεΐνη δεσμευτική της θειορεδοξίνης (TXNIP).....	18
1.3.3 Λειτουργίες και κλινικές καταστάσεις που σχετίζονται με την TXNIP	20
1.3.4 Η TXNIP στον διαβήτη	21
1.4 Στόχος του πειράματος	27
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	28
2.1 Λήψη Ιστού και Πειραματικές ομάδες	28
2.2 Εκχύλιση Πρωτεϊνών.....	29
2.3 Προσδιορισμός συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης.....	30
2.3.1 Αρχή της Μεθόδου	30
2.3.2 Πρωτόκολλο BCA Assay.....	30
2.4 Western Blot.....	32
2.4.1 Βασικές Αρχές Western Blot.....	32
2.4.2 Western Blot.....	34
2.5 Στατιστική ανάλυση	37
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	38
3.1 Σύγκριση των μέσων μεταξύ των ομάδων μαρτύρων και ασθενών.....	38
3.2 Συσχετίσεις των μέσων εντός του συνόλου των δειγμάτων.....	41
3.3 Συσχετίσεις των μέσων εντός των μαρτύρων.....	42
3.4 Συσχετίσεις των μέσων εντός των ασθενών.....	42
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	43
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	46
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ- ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ- ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	48
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	50
Υλικά και Μέθοδοι	50
ΑΝΑΦΟΡΕΣ	51

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Επίπεδα έκφρασης του RNA του γονιδίου TXNIP (HPA RNA-seq normal tissue).....	19
Σχήμα 2: Μέσα επίπεδα TXNIP στον πλακούντα μαρτύρων και ασθενών, * P<0,05.....	39
Σχήμα 3: Μέσο βάρος μαρτύρων και ασθενών, P<0,05	39
Σχήμα 4: Μέσος BMI μαρτύρων και ασθενών πριν και μετά τον τοκετό, *P<0,05.....	40
Σχήμα 5: Μέση συστολική και διαστολική πίεση μαρτύρων και ασθενών	40
Σχήμα 6: Μέσα επίπεδα Gluc0, Gluc60 και Gluc120 μαρτύρων και ασθενών, **P<0,01	40

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Δομή του υποδοχέα ινσουλίνης (Ζίφα Αιμιλία, Σημειώσεις μαθήματος «Κυτταρικός κύκλος- Ρύθμιση, μονοπάτια μεταγωγής σήματος», Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας).....	11
Εικόνα 2: Το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης (Plows et al., 2018).....	13
Εικόνα 3: Τομή ώριμου πλακούντα (Σωτηρίου Σ., Διδακτορική Διατριβή, 2005).	16
Εικόνα 4: Το σύστημα της θειορεδοξίνης (Mustacich and Powis, 2000).....	18
Εικόνα 5: Η ρύθμιση της TRX από την TXNIP (Spindel et al., 2012).....	19
Εικόνα 6: Μηχανισμός επαγωγής μεταβολικών ασθενειών από τις ROS και την TXNIP (Mahmood et al., 2013).	21
Εικόνα 7: Η TXNIP λειτουργεί σαν ένας ομοιοστατικός διακόπτης που ρυθμίζει την περιφερική πρόσληψη γλυκόζης (Parikh et al., 2007).	23
Εικόνα 8: Κυτταρικές λειτουργίες της TXNIP (Shalev, 2014).	23
Εικόνα 9: Ο ρόλος της TXNIP στην τοξικότητα γλυκόζης στο β- κύτταρο και την μειωμένη περιφερική πρόσληψη γλυκόζης (Parikh et al., 2007).....	26
Εικόνα 10: Θέσεις προτύπων και δειγμάτων στο πιάτο ELISA.....	31
Εικόνα 11: Western blot film από δείγματα μαρτύρων.....	37
Εικόνα 12: Western blot film από δείγματα ασθενών.....	37
Εικόνα 13: Υπόμνημα για επεξήγηση χρωμάτων	41

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Τιμές για Διάγνωση Διαβήτη Κύησης	10
Πίνακας 2: Σωματομετρικές και βιοχημικές μετρήσεις	28
Πίνακας 3: Συστατικά του διαλύματος εκχύλισης (custom lysis buffer).....	29
Πίνακας 4: Αραιώσεις για την πρότυπη καμπύλη	30
Πίνακας 5: Διάλυμα 30% ακρυλαμίδης.	34
Πίνακας 6: Διάλυμα για το πήκτωμα συσσώρευσης.	34
Πίνακας 7: Διάλυμα για το πήκτωμα διαχωρισμού.	34
Πίνακας 8: Διάλυμα ηλεκτροφόρησης,	35
Πίνακας 9: Διάλυμα μεταφοράς.	35
Πίνακας 10: Διάλυμα PBST.	36
Πίνακας 11: Μέσα μεγέθη παραμέτρων που μετρήθηκαν για τις ομάδες μαρτύρων και ασθενών	38
Πίνακας 12: Συσχετίσεις μεταξύ των μέσων των παραμέτρων του συνόλου των δειγμάτων	41
Πίνακας 13: Συσχετίσεις μεταξύ των μέσων των παραμέτρων εντός των μαρτύρων	42
Πίνακας 14: Συσχετίσεις μεταξύ των μέσων των παραμέτρων εντός των ασθενών	42

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε την περίοδο Φεβρουαρίου 2018 με Μάρτιο 2019, στη Γ' Παιδιατρική κλινική του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου «Αττικόν». Τα πλακουντιακά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν, λήφθηκαν από εγκύους που πραγματοποίησαν τοκετό στη Γ' Μαιευτική και Γυναικολογική κλινική του νοσοκομείου. Η καταγραφή των ανθρωπομετρικών και σωματομετρικών στοιχείων των συμμετεχόντων στην έρευνα έγινε από το προσωπικό της κλινικής στα πλαίσια της τακτικής παρακολούθησης.

Επιβλέπουσα του πειραματικού μέρους της εργασίας ορίστηκε η κυρία Άννα Παπαδοπούλου, βιοχημικός. Το πειραματικό μέρος της εργασίας έγινε στη Μονάδα Έρευνας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου «Αττικόν». Το πειραματικό μέρος ολοκληρώθηκε τον Σεπτέμβριο του 2018 και ακολούθησε η συγγραφή της διπλωματικής διατριβής.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Διαβήτη κύησης (Gestational Diabetes Mellitus)

Ως διαβήτη κύησης ορίζεται η διαταραχή στην ανοχή της γλυκόζης που αναγνωρίζεται ή εμφανίζεται για πρώτη φορά κατά την εγκυμοσύνη. Ο διαβήτη κύησης συνήθως υποχωρεί μετά τον τοκετό, ωστόσο ο ορισμός περιλαμβάνει και την περίπτωση Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2 που διαγιγνώσκεται πρώτη φορά κατά την κύηση και συνεχίζει να υφίσταται μετά τον τοκετό.

Ο διαβήτη κύησης εμφανίζεται με μέση συχνότητα 7% των κυήσεων, δηλαδή πλέον των 200,000 περιπτώσεων το χρόνο. Σχετίζεται με μητρική και εμβρυϊκή νοσηρότητα και οφείλεται σε ινσουλινοαντίσταση και διαταραχή της λειτουργίας των β-κυττάρων του παγκρέατος [1].

Στους παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο για διαβήτη κύησης συμπεριλαμβάνονται η παχυσαρκία της μητέρας, το ιστορικό διαβήτη σε προηγούμενη κύηση καθώς και η ηλικία της μητέρας. Είναι γεγονός πως η επιδημία παχυσαρκίας και διαβήτη σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των γυναικών με αδιάγνωστο ΣΔτ2 [2]. Επίσης, το οικογενειακό ιστορικό διαβήτη (γενετική προδιάθεση) και το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών είναι παράγοντες που φαίνεται να επιβαρύνουν σε μέτριο βαθμό την πιθανότητα εμφάνισης διαβήτη κύησης. Η σωματική άσκηση το έτος πριν την εγκυμοσύνη έχει προστατευτικό ρόλο. Τέλος, παράγοντες όπως η έκθεση σε τοξικές ουσίες και η κοινωνικο-οικονομική κατάσταση ερευνώνται ως προς το κατά πόσο αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη κύησης [3].

Ο έλεγχος για διαβήτη κύησης γίνεται μεταξύ 24^{ης} και 28^{ης} εβδομάδας. Η αξιολόγηση κινδύνου για εμφάνιση διαβήτη κύησης θα πρέπει να γίνεται κατά την πρώτη επίσκεψη της εγκύου. Σε γυναίκες με χαρακτηριστικά που αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης διαβήτη κύησης (όπως παχυσαρκία, ιστορικό διαβήτη κύησης, γλυκοζουρία, ισχυρό ιστορικό διαβήτη) θα πρέπει να γίνεται έλεγχος άμεσα και, ακόμη και αν τα αποτελέσματα είναι φυσιολογικά, ο έλεγχος πρέπει να επαναλαμβάνεται την 24^η με 28^η εβδομάδα της κύησης [2].

Δύο είναι οι προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση του διαβήτη κύησης. Η πρώτη προσέγγιση βασίζεται στην υπόδειξη της International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups consensus (IADPSG). Σε αυτήν την περίπτωση γίνεται διαγνωστικό OGTT (oral glucose tolerance test) όπου πραγματοποιείται μέτρηση της γλυκόζης νηστείας (FPG < 92 mg/dL, φυσιολογικές τιμές). Στη συνέχεια γίνεται μέτρηση μία ώρα μετά τη λήψη σκευάσματος 75 γραμμαρίων γλυκόζης διαλυμένης σε νερό (Gluc60 < 180 mg/dL) και δύο ώρες μετά τη λήψη του σκευάσματος (Gluc120 < 153 mg/dL). Αυτήν την προσέγγιση υιοθετεί και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization- WHO), [4], [5].

Η δεύτερη προσέγγιση είναι μια διαδικασία δύο βημάτων, υποδεικνυόμενη από το National Institutes of Health (NIH). Αρχικά, γίνεται μέτρηση μία ώρα μετά τη λήψη σκευάσματος 50 γραμμαρίων γλυκόζης (Gluc60). Αν η τιμή βρεθεί ίση ή μεγαλύτερη από 140 mg/dL, γίνεται μέτρηση της γλυκόζης νηστείας (FPG). Αυξημένη θεωρείται η τιμή ίση ή μεγαλύτερη από 95 mg/dL. Ακολουθεί λήψη σκευάσματος 100 γραμμαρίων γλυκόζης και μέτρηση μετά από μία (Gluc60), δύο (Gluc120) και τρεις (Gluc180) ώρες. Αυξημένες τιμές θεωρούνται όσες είναι ίσες ή μεγαλύτερες από 180 mg/dL στη μία ώρα, 155 mg/dL στις δύο ώρες και 140 mg/dL στις τρεις ώρες. Αν βρεθούν αυξημένες τουλάχιστον δύο τιμές από τις τέσσερις τελευταίες, τότε τίθεται η διάγνωση διαβήτη [6], [7], (Πίνακας 1).

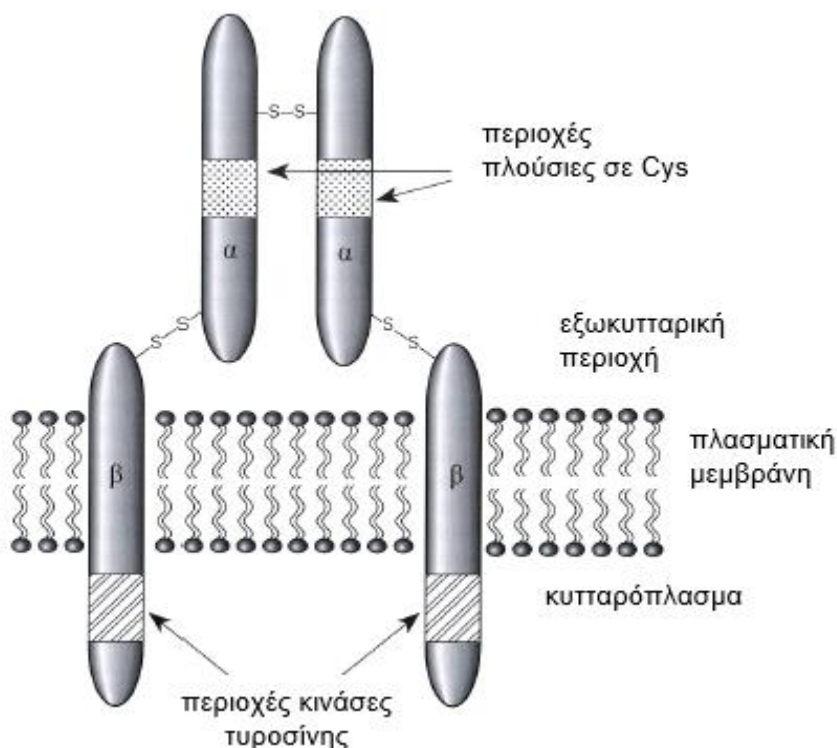
Πίνακας 1: Τιμές για Διάγνωση Διαβήτη Κύησης

IADPSG/ WHO		
	Φυσιολογικές τιμές	Τιμές Διαβήτη
FPG	<92 mg/dL (<5,1 mmol/L)	≥92 mg/dL (≥5,1 mmol/L)
Gluc60 (μετά από τη λήψη 75 g γλυκόζης)	<180 mg/dL (<10 mmol/L)	≥180 mg/dL (≥10 mmol/L)
Gluc120 (μετά από τη λήψη 75 g γλυκόζης)	<153 mg/dL mg/dL (<8,5 mmol/L)	≥153 mg/dL mg/dL (≥8,5 mmol/L)
NIH		
	Φυσιολογικές τιμές	Τιμές Διαβήτη
Gluc60 (μετά από τη λήψη 50 g γλυκόζης)	<140 mg/dL (<7,8 mmol/L)	≥140 mg/dL (≥7,8 mmol/L)
<ul style="list-style-type: none"> • Αν η παραπάνω τιμή βρεθεί μεγαλύτερη από το όριο: 		
FPG	<95 mg/dL (<5,3 mmol/L)	≥95 mg/dL (≥5,3 mmol/L)
Gluc60 (μετά από τη λήψη 100 g γλυκόζης)	<180 mg/dL (<10 mmol/L)	≥180 mg/dL (≥10 mmol/L)
Gluc120 (μετά από τη λήψη 100 g γλυκόζης)	<155 mg/dL (<8,6 mmol/L)	≥155 mg/dL (≥8,6 mmol/L)
Gluc180 (μετά από τη λήψη 75 g γλυκόζης)	<140 mg/dL (<7,8 mmol/L)	≥140 mg/dL (≥7,8 mmol/L)
Διάγνωση τίθεται αν δύο από τις τέσσερις τελευταίες τιμές βρεθούν πάνω από το όριο.		

Η εγκυμοσύνη είναι γενικά μια διαβητογόνος κατάσταση. Κάθε κύηση χαρακτηρίζεται από κάποιο βαθμό ινσουλινοαντίστασης, κυρίως προς το 2^ο τρίμηνο. Η ινσουλινοαντίσταση προκαλείται από πλακουντιακές ορμόνες και άλλους παράγοντες που θα αναφερθούν στη συνέχεια. Η ινσουλινοαντίσταση ως ένα βαθμό θεωρείται μια φυσιολογική προσαρμογή του οργανισμού ώστε να εξασφαλιστεί η επαρκής διοχέτευση μητρικής γλυκόζης στο έμβρυο και να καλυφθούν οι ανάγκες διατροφής και ανάπτυξης του [8].

Σε υγιή άτομα, τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα ρυθμίζονται από ορμόνες και ειδικότερα την ινσουλίνη. Η ινσουλίνη παράγεται από το πάγκρεας, μαζί με άλλα ένζυμα που συμβάλλουν στην πέψη, και εκκρίνεται από τα β-παγκρεατικά κύτταρα. Η ινσουλίνη ελέγχει τη μετακίνηση της γλυκόζης από την κυκλοφορία του αίματος στα κύτταρα, όπου θα χρησιμοποιηθεί ως καύσιμο. Για να προσδιοριστεί ο μηχανισμός με τον οποίο προκαλείται η αντίσταση στην ινσουλίνη, πρέπει να κατανοηθεί ο τρόπος δράσης της ινσουλίνης. Αρχικά, για να αυξήσει η ινσουλίνη την πρόσληψη γλυκόζης από έναν ιστό-στόχο πρέπει να συνδεθεί με έναν υποδοχέα (Εικόνα 1). Ο υποδοχέας της ινσουλίνης είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας με δράση τυροσινικής κινάσης. Αποτελείται από δύο α-υπομονάδες και δύο β-υπομονάδες [9]. Οι α-υπομονάδες βρίσκονται στην εξωκυτταρική περιοχή και διαθέτουν θέση σύνδεσης της ινσουλίνης. Με την πρόσδεση της ινσουλίνης στις α-υπομονάδες η διαμόρφωσή τους αλλάζει. Αυτή η αλλαγή διαμόρφωσης μεταφέρεται στις β-υπομονάδες που βρίσκονται στο εσωτερικό του κυττάρου. Η πρόσδεση της ινσουλίνης πυροδοτεί την αυτοφωσφορυλίωση των

καταλοίπων τυροσίνης του υποδοχέα, με αποτέλεσμα να αποκτά τις ιδιότητες κινάσης της τυροσίνης. Στη συνέχεια ο υποδοχέας φωσφορυλιώνει ως κινάση άλλες ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες, όπως τις πρωτεΐνες- υπόστρωμα υποδοχέα ινσουλίνης.(Insulin Receptor Substrate- IRS). Έπειτα, οι IRS ενώνονται με την υπομονάδα p85 ενός μορίου- τελεστή, της φωσφοϊνοσιτίδης-3-κινάσης (Phosphoinositide 3-kinase, PI3K) και τη φωσφορυλιώνουν. Ο σχηματισμός του συμπλόκου IRS/PI3K σηματοδοτεί το μεταφορέα γλυκόζης του κυττάρου να μετατοπιστεί προς την μεμβράνη για να πραγματοποιηθεί η μεταφορά γλυκόζης μέσα στο κύτταρο [8]. Οι υποδοχείς της ινσουλίνης εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στο ήπαρ, τον λιπώδη ιστό και τους σκελετικούς μύες. Επιπλέον έχουν βρεθεί σε κύτταρα του εγκεφαλικού παρεγχύματος, του μυοκαρδίου, των νεφρικών σωληναρίων, των πνευμονικών κυψελίδων, καθώς και του πλακούντα [10].



Εικόνα 1: Δομή του υποδοχέα ινσουλίνης (Ζίφα Αιμιλία, Σημειώσεις μαθήματος «Κυτταρικός κύκλος- Ρύθμιση, μονοπάτια μεταγωγής σήματος», Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας).

Στους πάσχοντες από διαβήτη παρατηρείται είτε έλλειψη ινσουλίνης, επειδή το πάγκρεας δεν παράγει αρκετή ορμόνη, είτε ινσουλινοαντίσταση, δηλαδή ο οργανισμός δε χρησιμοποιεί την παραγόμενη ινσουλίνη αποτελεσματικά. Σε πολλές περιπτώσεις μπορεί να συνυπάρχουν και οι δύο καταστάσεις. Σε αυτήν την περίπτωση, η γλυκόζη δε μετακινείται αποτελεσματικά από την κυκλοφορία του αίματος στα κύτταρα, με αποτέλεσμα τα επίπεδά της στο αίμα να παραμένουν υψηλά. Αυτό οδηγεί αφενός στην αποδυνάμωση των κυττάρων που απαιτούν γλυκόζη για ενέργεια και αφετέρου στη βλάβη οργάνων που εκτίθενται στην υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης [1].

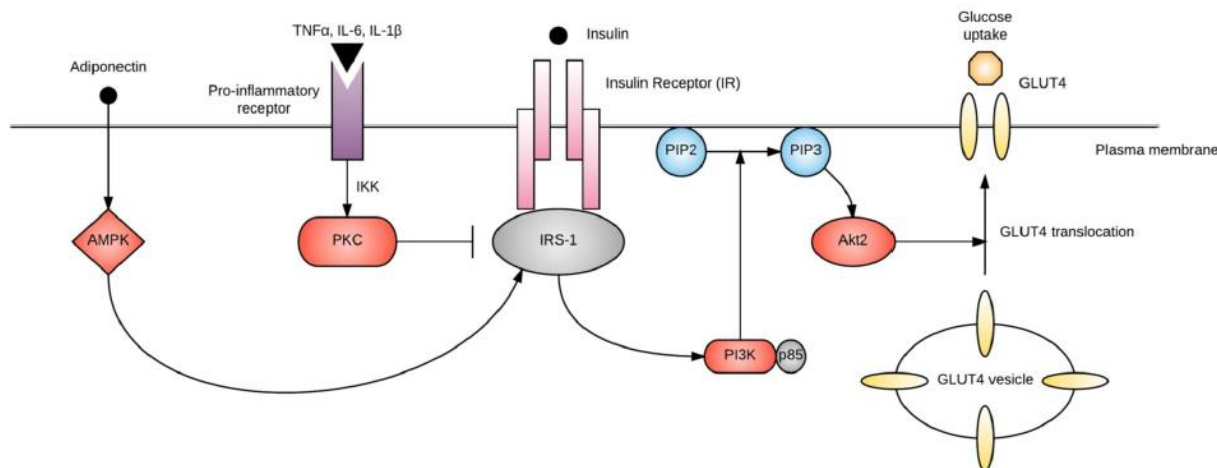
Όπως αναφέρθηκε, η εγκυμοσύνη είναι μια διαβητογόνος κατάσταση. Στην αρχή της κύησης η ευαισθησία στην ινσουλίνη και η πρόσληψη γλυκόζης από τον λιπώδη ιστό αυξάνονται, ώστε να καλυφθούν οι ενεργειακές ανάγκες στη συνέχεια της κύησης [11]. Όσο η κύηση εξελίσσεται ωστόσο, ορμόνες, πλακουντιακές ή μη, όπως οιστρογόνα, προγεστερόνη, λεπτίνη, κορτιζόλη, πλακουντιακό γαλακτογόνο, πλακουντιακή αυξητική ορμόνη προκαλούν ινσουλινοαντίσταση [12]. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να αυξάνεται η

γλυκόζη στο αίμα και να μεταφέρεται δια μέσου του πλακούντα ώστε να αναπτυχθεί το έμβρυο. Επιπλέον, αυξάνεται η ενδογενής παραγωγή γλυκόζης και η διάσπαση των λιπών. Αυτό οδηγεί σε περαιτέρω αύξηση της γλυκόζης στο αίμα, καθώς και αύξηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFAs), [13].

Για να διατηρηθεί η ομοιόσταση της γλυκόζης εν μέσω αυτών των μεταβολών, τα β-κύτταρα του παγκρέατος υφίστανται υπερτροφία ώστε να αυξηθεί η έκκριση ινσουλίνης και να ρυθμιστούν τα επίπεδα γλυκόζης [14]. Μετά τον τοκετό, τα επίπεδα της ινσουλίνης επιστρέφουν στις φυσιολογικές τιμές [15]. Η εμφάνιση του διαβήτη κύησης σε κάποιες περιπτώσεις είναι αποτέλεσμα δυσλειτουργίας των β-κυττάρων που αποτελεί μέρος ιστορικού χρόνιας ινσουλινοαντίστασης που δεν είχε διαγνωστεί, η οποία γίνεται εντονότερη λόγω της κύησης [17]. Η δυσλειτουργία των β-κυττάρων, καθώς και η ινσουλινοαντίσταση στους ιστούς αποτελούν κρίσιμα στοιχεία για την παθοφυσιολογία του διαβήτη κύησης [16].

Η δυσλειτουργία των β-κυττάρων του παγκρέατος είναι η κατάσταση στην οποία τα κύτταρα χάνουν την ικανότητα να εντοπίζουν τα επίπεδα γλυκόζης ώστε να απελευθερώνουν επαρκώς ινσουλίνη ως απόκριση. Λόγω της ινσουλινοαντίστασης, η πρόσληψη γλυκόζης από τους ιστούς μειώνεται και προκαλείται υπεργλυκαιμία. Τα β-κύτταρα εντείνουν την παραγωγή ινσουλίνης ώστε να εξισορροπήσουν την κατάσταση και αυτό οδηγεί σε υπερφόρτωσή τους [16]. Η συμβολή της γλυκόζης στη διαταραχή της λειτουργίας των β-κυττάρων ονομάζεται γλυκοτοξικότητα και φαίνεται επιπλέον να οδηγεί σε απόπτωσή τους [18].

Σημαντικός στην εμφάνιση του διαβήτη κύησης είναι και ο ρόλος των ορμονών που επηρεάζουν την αξιοποίηση των λιπών και της γλυκόζης. Από τους πιο σημαντικούς ρυθμιστές είναι πρωτεΐνες που παράγονται από τον λιπώδη ιστό, όπως η αδιπνεκτίνη [16]. Ο διαβήτης κύησης χαρακτηρίζεται από χαμηλά επίπεδα αδιπνεκτίνης [19]. Η αδιπνεκτίνη φυσιολογικά ενισχύει την σηματοδότηση της ινσουλίνης και την οξείδωση των λιπαρών οξέων, εμποδίζοντας παράλληλα τη γλυκονεογένεση.[20]. Για να εκπληρώσει αυτές τις δράσεις η αδιπνεκτίνη ενεργοποιεί την AMPK (5' AMP-activated protein kinase) στα κύτταρα με ευαισθησία στην ινσουλίνη. Η AMPK με τη σειρά της συνεισφέρει στη δράση της IRS-1 (Insulin Receptor Substrate) που ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα PPAR γ (Proliferator-activated receptor- α) στο ήπαρ [16], (Εικόνα 2). Μια μικρή ποσότητα αδιπνεκτίνης εκφράζεται και στην συγκυτιοτροφοβλάστη του πλακούντα, όπου ρυθμίζεται από κυτοκίνες όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων TNF- α , η ιντερλευκίνη-6 (IL-6), η ιντερφερόνη- γ (IFN- γ) και η λεπτίνη [21]. Φαίνεται πως φυσιολογικά η αδιπνεκτίνη εμποδίζει την σηματοδότηση της ινσουλίνης και την μεταφορά αμινοξέων διαμέσου του πλακούντα, περιορίζοντας την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Πιθανόν η μεθυλίωση του γονιδίου της αδιπνεκτίνης οδηγεί στη μητρική ευαισθησία στη γλυκόζη και την εμβρυϊκή μακροσωμία, που εμφανίζονται στον διαβήτη [22].



Εικόνα 2: Το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης (Plows et al., 2018)

Ο λιπώδης ιστός αποτελεί ένα ακόμη όργανο του ενδοκρινικού συστήματος που κατέχει ρόλο στην παθοφυσιολογία του διαβήτη κύησης. Ο λιπώδης ιστός αφενός εξασφαλίζει την επαρκή ενέργεια, όπου είναι απαραίτητο και αφετέρου παράγει ρυθμιστικούς παράγοντες που προαναφέρθηκαν, όπως την αδιπονεκτίνη και τις κυτοκίνες (TNF- α, IL- 6, IL- 1b) [16]. Ο διαβήτης έχει συνδυαστεί με μειωμένη διαφοροποίηση και αυξημένο μέγεθος των λιποκυττάρων (υπερτροφία), που συνοδεύονται από ελαττωμένη έκφραση γονιδίων των ρυθμιστών του σηματοδοτικού μονοπατιού της ινσουλίνης. Ο συνδυασμός της ινσουλινοαντίστασης και της μειωμένης διαφοροποίησης των λιποκυττάρων εμποδίζει την ικανότητα του λιπώδους ιστού να αποβάλλει την περίσσεια ενέργειας και αυτό οδηγεί σε λιποτοξικότητα και γλυκοτοξικότητα σε περιφερικά όργανα [23], [24]. Παράλληλα, ο διαβήτης κύησης έχει συσχετιστεί με αυξημένο αριθμό μακροφάγων του λιπώδους ιστού που εκκρίνουν προ- φλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως TNF- α, IL- 6 και IL- 1β. Οι συγκεντρώσεις αυτών των κυτοκινών έχουν βρεθεί αυξημένες στον διαβήτη κύησης [25], [26]. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα του TNF- α στο πλάσμα συσχετίζονται ισχυρά με την ινσουλινοαντίσταση [27].

Οι πλακουντιακές ορμόνες επίσης εμπλέκονται στην εμφάνιση του διαβήτη κύησης. Οι πλακουντιακές ορμόνες που παράγονται κατά την εγκυμοσύνη (οιστρογόνα, προγεστερόνη, προλακτίνη, κορτιζόλη, χοριακή γοναδοτροπίνη, πλακουντιακό γαλακτογόνο, πλακουντιακή αυξητική ορμόνη) προκαλούν μειωμένη φωσφορυλίωση του υποδοχέα της ινσουλίνης. Αυτό οδηγεί σε ινσουλινοαντίσταση [1]. Έχει βρεθεί ότι η κυριότερη ορμόνη που συμμετέχει στην ινσουλινοαντίσταση είναι το πλακουντιακό γαλακτογόνο [28]. Συγκεκριμένα, το έμβρυο προσπαθεί να λάβει όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ποσότητα τροφής από τη μητέρα, ενώ η μητέρα προσπαθεί να περιορίσει την άμετρη αυτή λήψη. Το πλακουντιακό γαλακτογόνο που εκκρίνεται εμποδίζει την δράση της μητρικής ινσουλίνης με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σακχάρου στο αίμα της. Ως αντίδραση σε αυτό, η μητέρα αυξάνει την έκκριση ινσουλίνης και η έκκριση μπορεί να κλιμακωθεί πολύ πάνω από το φυσιολογικό. Αν η μητέρα δεν καταφέρει να αντιμετωπίσει αυτή την ανισορροπία, παρουσιάζεται ο διαβήτης κύησης [29].

Ο διαβήτης κύησης, συνεπώς, εμφανίζεται όταν η παγκρεατική λειτουργία δεν επαρκεί για την αντιμετώπιση της ινσουλινοαντίστασης που δημιουργείται λόγω της κύησης και την αυξημένη κατανάλωση ενέργειας για τη διατήρηση της κύησης του αναπτυσσόμενου εμβρύου [30].

Η υπεργλυκαιμία κατά την κύηση σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο επιπλοκών για τη μητέρα, το έμβρυο ή το νεογνό. Μητέρες και παιδιά μητέρων με διαβήτη κύησης

θεωρούνται αυξημένου κινδύνου για εμφάνιση διαβήτη στη μετέπειτα ζωή [6]. Μητέρα με διαβήτη κύησης μπορεί να εμφανίσει υψηλή πίεση και προεκλαμψία [31]. Επίσης, η υπεργλυκαιμία κατά την κύηση αυξάνει τον κίνδυνο πρόωρου τοκετού και την πιθανότητα καισαρικής τομής [6]. Επιπλέον, έγκυοι με διαβήτη κύησης μπορεί να εμφανίσουν αμφιβληστροειδοπάθεια [32], λοιμώξεις [33] καθώς και μεταβολικό σύνδρομο υπό μορφή υπέρτασης, δυσλιπιδαιμίας και ινσουλινοαντίστασης [34]. Γενικά, η πιθανότητα εμφάνισης ΣΔτ2 τα επόμενα 5 με 10 έτη είναι μεγάλη σε γυναίκες με διαβήτη κύησης [35].

Στο νεογνό η εμβρυϊκή έκθεση σε αυξημένα επίπεδα γλυκόζης μπορεί να οδηγήσει σε μεταβολικό σύνδρομο ή εμφάνιση Διαβήτη τύπου 2 αργότερα στη ζωή [36]. Επίσης, νεογνά μητέρων με διαβήτη κύησης έχουν κατά 3-5% αυξημένο κίνδυνο να γεννηθούν με συγγενείς ανωμαλίες [37]. Τέλος, ο διαβήτης κύησης αυξάνει τον κίνδυνο μακροσωμίας (βάρος νεογνού από 4,5 κιλά και πάνω) που μπορεί να οδηγήσει αργότερα σε παιδική/ νεανική παχυσαρκία. Επιπλέον, λόγω του διαβήτη κύησης έχει βρεθεί δυστοκία ώμων, νευρική παράλυση, κατάγματα, ίκτερος και αυξημένη πιθανότητα εμβρυϊκής ή βρεφικής θνησιμότητας [38].

Ο διαβήτης κύησης έχει επιπλοκές και στον σχηματισμό και τη λειτουργία του πλακούντα. Έχει βρεθεί πως λόγω του διαβήτη κύησης προκαλούνται μορφολογικές αλλαγές στον πλακούντα [39] καθώς και διαταραχές στη μεταφορά θρεπτικών [40]. Επιπλέον, ο διαβήτης κύησης μειώνει την προσφορά μητρικού οξυγόνου μέσω του πλακούντα. Η υπεργλυκαιμία προκαλεί μειωμένο πολλαπλασιασμό της τροφοβλάστης και οδηγεί σε καθυστέρηση ανάπτυξης του πλακούντα τις πρώτες εβδομάδες της κύησης [41].

Η διαχείριση του διαβήτη κύησης μπορεί να γίνει αρχικά με έλεγχο των επιπέδων γλυκόζης. Επίσης, είναι σημαντική η κατάλληλη διαίτα για την αντιμετώπιση της υπεργλυκαιμίας και την επίτευξη φυσιολογικών επιπέδων γλυκόζης, παράλληλα με την παροχή επαρκών θερμίδων ώστε να διατηρείται το μητρικό βάρος. Η κατανάλωση υδατανθράκων θα πρέπει να είναι ελεγχόμενη και ορθώς κατανεμημένη στα γεύματα. Όταν η γλυκόζη βρεθεί μεγαλύτερη από 140 mg/dL μία ώρα μετά από γεύμα ή/και μεγαλύτερη από 120 mg/dL δύο ώρες μετά από γεύμα, συστήνεται ινσουλινοθεραπεία. Η δόση ινσουλίνης που θα χορηγηθεί καθορίζεται από τον δείκτη μάζας σώματος της εγκύου πριν την εγκυμοσύνη και από το βάρος κατά την εγκυμοσύνη. Τέλος, μπορεί να χορηγηθεί φαρμακευτική αγωγή, θα πρέπει ωστόσο να πρόκειται για φάρμακα που δεν περνούν τον πλακουντιακό φραγμό ή αν τον περνούν, να μην είναι τερατογόνα. Οι φαρμακευτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται είναι η μετφορμίνη (metformin) και η γλυβουρίδη (glyburide, σουλφονουλουρία 2^{ης} γενιάς, δεν περνά τον πλακουντιακό φραγμό ακόμη και σε μεγάλη συγκέντρωση), [1].

1.2 Πλακούντας

Ανάμεσα στις πολλές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα κατά την περίοδο της εγκυμοσύνης συγκατάλεγεται και η ανάπτυξη του πλακουντιακού ιστού. Ο πλακούντας είναι ένα προσωρινό όργανο το οποίο αναπτύσσεται παράλληλα με το έμβρυο. Κατά τον τοκετό ο πλακούντας αποβάλλεται μέσω του κόλπου μετά την έξοδο του νεογνού.

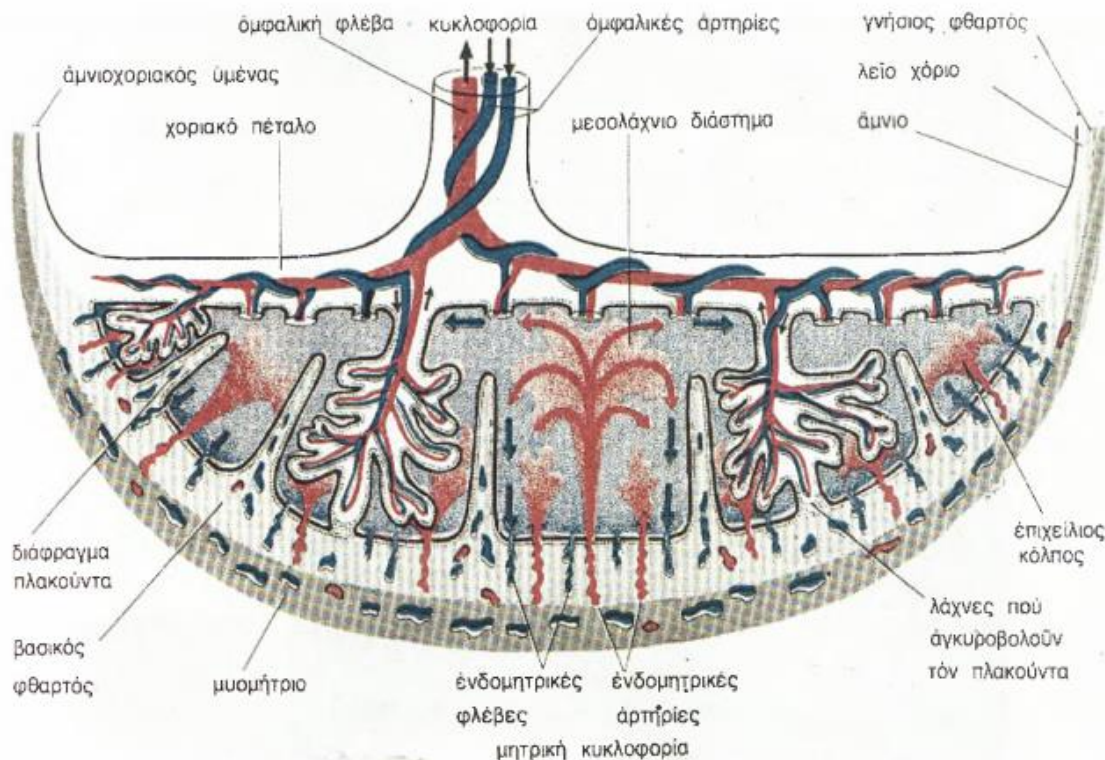
Κατά την πρώτη εβδομάδα της ανάπτυξης του εμβρύου συμβαίνει η διαφοροποίηση των κυττάρων του μοριδίου (πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη) σε κύτταρα της εμβρυοβλάστης και κύτταρα της τροφοβλάστης. Τα κύτταρα της εμβρυοβλάστης (εσωτερικά) θα εξελιχθούν σε έμβρυο, ενώ της τροφοβλάστης (περιφερειακά) σε πλακούντα και υμένες.

Στη δεύτερη εβδομάδα της κύησης η τροφοβλάστη ερχόμενη σε επαφή με το ενδομήτριο πολλαπλασιάζεται και διαφοροποιείται σε συγκυτιοτροφοβλάστη (εξωτερικό στρώμα) και κυτταροτροφοβλάστη (εσωτερικό στρώμα). Στην αρχή της τρίτης εβδομάδας τα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης πολλαπλασιάζονται και εισχωρούν στην συγκυτιοτροφοβλάστη σχηματίζοντας τις λάχνες. Ενώ τις πρώτες εβδομάδες της ανάπτυξης του εμβρύου οι λάχνες καλύπτουν όλη την επιφάνεια του κυήματος, σταδιακά στη θέση πρόσφυσης του κυήματος μεγαλώνουν και επεκτείνονται. Με αυτόν τον τρόπο σχηματίζεται το λαχνωτό χόριο, από όπου προέρχεται το εμβρυϊκό τμήμα του πλακούντα [42].

Μετά την εμφύτευση του εμβρύου το ενδομήτριο υφίσταται ιστολογικές μεταβολές. Τα κύτταρα του ενδομητρίου, υπό την επίδραση ορμονών, μετατρέπονται σε φθαρτογενή κύτταρα (φθαρτός). Ο φθαρτός περιλαμβάνει τρεις περιοχές: τον βασικό φθαρτό (μεταξύ εμβρύου και λαχνωτού χορίου), τον θυλακοειδή φθαρτό (μεταξύ εμβρύου και μήτρας) και τον γνήσιο ή τοιχωματικό φθαρτό (το υπόλοιπο ενδομήτριο). Ο βασικός φθαρτός είναι η περιοχή που σχηματίζει το μητρικό τμήμα του πλακούντα και συμφύεται με το λαχνωτό χόριο.

Ο ώριμος πλακούντας αποτελείται τελικά από δύο επιφάνειες, τη μητρική και την εμβρυϊκή (Εικόνα 3). Στη μητρική υπάρχουν οι κοτυληδόνες (καθεμία περιλαμβάνει λάχνες), ενώ η εμβρυϊκή επενδύει την αμνιακή κοιλότητα, όπου συγκλίνουν προς τον ομφάλιο λώρο τα χοριακά αγγεία (μεγάλες αρτηρίες και φλέβες), [43].

Ο πλακούντας έχει δισκοειδές σχήμα και μέση διάμετρο 22 cm. Το πάχος του είναι περίπου 2,5 cm, μεγαλύτερο στο κέντρο και μικρότερο περιφερειακά. Το βάρος του αυξάνεται μέχρι τη 40^η εβδομάδα της κύησης και κατά τον τοκετό είναι περίπου 500 g [44].



Εικόνα 3: Τομή ώριμου πλακούντα (Σωτηρίου Σ., Διδακτορική Διατριβή, 2005).

Ο ρόλος του πλακούντα είναι η θρέψη και η προστασία του εμβρύου κατά την εγκυμοσύνη. Ο πλακούντας διαχωρίζει το αίμα του εμβρύου από το αίμα της μητέρας, ενώ παράλληλα παρέχει μια σύνδεση μεταξύ τους, η οποία επιτρέπει στον πλακούντα να εκτελεί λειτουργίες που δεν μπορεί να εκτελέσει το ίδιο το έμβρυο [45].

Μέσω του πλακούντα επιτρέπεται η ανταλλαγή αερίων, ώστε το έμβρυο να τροφοδοτείται με οξυγόνο, βοηθά την επαρκή θρέψη του εμβρύου και τη ρύθμιση της θερμοκρασίας του. Επίσης, συμβάλλει στην απομάκρυνση άχρηστων προϊόντων του μεταβολισμού του εμβρύου, ενώ αποτελεί προστατευτικό φραγμό για το έμβρυο έναντι μικροβίων που θα μπορούσαν να προκαλέσουν φλεγμονή [46]. Ακόμη, συμμετέχει στη μεταφορά αντισωμάτων από τη μητέρα στο έμβρυο συμβάλλοντας ως ένα βαθμό στην ανοσοποίηση του. Τέλος, μέσω του πλακούντα παράγονται ορμόνες που καθιστούν τον οργανισμό της εγκύου ικανό να υποστηρίξει την κύηση.

1.3 Το σύστημα της θειορεδοξίνης και η πρωτεΐνη δεσμευτική της θειορεδοξίνης

1.3.1 Το σύστημα της θειορεδοξίνης

Το σύστημα της θειορεδοξίνης αποτελεί το κύριο αντιοξειδωτικό σύστημα του οργανισμού κατά του οξειδωτικού στρες [47]. Το σύστημα παρέχει τα απαραίτητα ηλεκτρόνια για οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, μέσω των οποίων απομακρύνονται ενεργές μορφές οξυγόνου και αζώτου με ταχύ ρυθμό. Αυτές οι ενεργές μορφές οξυγόνου και αζώτου ονομάζονται ελεύθερες ρίζες.

Οι ελεύθερες ρίζες χαρακτηρίζονται από ένα μη συζευγμένο οξυγόνο και είναι μόρια υψηλής ενεργότητας που παράγονται κατά την κυτταρική αναπνοή, το μεταβολισμό και τη φαγοκυττάρωση [48]. Η κύρια ενδοκυτταρική πηγή ενεργών μορφών οξυγόνου είναι η μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα [49].

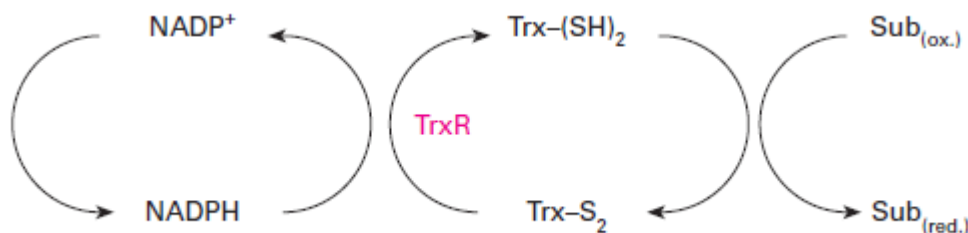
Οι ενεργές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), όπως και οι ενεργές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS), είναι απαραίτητες φυσιολογικά στο κύτταρο, μπορούν όμως να είναι και δυνητικά καταστρεπτικές. Τα μέτρια επίπεδα ROS συμβάλλουν στη διεκπεραίωση αρκετών κυτταρικών λειτουργιών, όπως η μεταγωγή σήματος, ο πολλαπλασιασμός και η γονιδιακή έκφραση [50].

Υψηλά επίπεδα ROS ή RNS μπορεί να είναι ζημιογόνα για κύρια κυτταρικά συστατικά, όπως λιπίδια, πρωτεΐνες ή νουκλεϊκά οξέα και να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο μέσω νέκρωσης ή απόπτωσης [51]. Επιπλέον η ανεξέλεγκτη οξείδωση αυτών των υποστρωμάτων μπορεί τελικά να έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ασθενειών. Η ανισορροπία που δημιουργείται όταν η ποσότητα των ελεύθερων ριζών που παράγονται υπερέρχει έναντι των κυτταρικών δυνατοτήτων απομάκρυνσής τους, ονομάζεται οξειδωτικό στρες [52].

Γενικά, το οξειδωτικό στρες προκαλείται από την απόκλιση από το φυσιολογικά αναγωγικό κυτταρικό περιβάλλον σε μια κατάσταση αυξημένης παραγωγής ROS. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί είτε λόγω της αυξημένης παραγωγής των ROS είτε από μειωμένη δραστικότητα των μηχανισμών που μειώνουν τις ROS [53].

Μεταξύ των ενζυμικών αμυντικών μηχανισμών έναντι στο οξειδωτικό στρες περιλαμβάνεται και το σύστημα θειορεδοξίνης [54]. Το σύστημα περιλαμβάνει αρχικά τη θειορεδοξίνη και την αναγωγάση της θειορεδοξίνης που καταλύει την αναγωγή της. Μέσω των κυστεϊνών που διαθέτει η θειορεδοξίνη παίζει σημαντικό ρόλο στο να διατηρεί το κυτταρικό περιβάλλον σε αναγωγική κατάσταση.

Συγκεκριμένα, η θειορεδοξίνη προκαλεί την αναγωγή των οξειδωμένων πρωτεϊνών μέσω δημιουργίας δισουλφιδικών δεσμών, μεταφέροντας ηλεκτρόνια από τα κατάλοιπα κυστεϊνών που διαθέτει. Αφού επιτελέσει αυτόν τον σκοπό, η θειορεδοξίνη βρίσκεται πλέον σε οξειδωμένη μορφή, οπότε η αναγωγάση της θειορεδοξίνης την ανάγει ξανά. Τα ηλεκτρόνια που είναι απαραίτητα για την αναγωγή της θειορεδοξίνης από την αναγωγάση παρέχονται από το NADPH (Εικόνα 4). Το σύστημα της θειορεδοξίνης, εκτός από τις μορφές της ίδιας της θειορεδοξίνης (TRX) και την αναγωγάση (TrxR), περιλαμβάνει το NADPH και τον ενδογενή αναστολέα της θειορεδοξίνης, την πρωτεΐνη δεσμευτική της θειορεδοξίνης (TXNIP), [55], [56].



Εικόνα 4: Το σύστημα της θειορεδοξίνης (Mustacich and Powis, 2000)

Η θειορεδοξίνη απαντά σε τρεις διαφορετικές μορφές που κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια. Οι μορφές αυτές είναι η Trx1, η Trx2 (μιτοχονδριακή) και η SpTrx/Trx3 που εκφράζεται έντονα στα σπερματοζωάρια [57], [58]. Η θειορεδοξίνη έχει διάφορους ρόλους ανάλογα με τον υποκυτταρικό εντοπισμό της. Έτσι, στο εξωκυτταρικό περιβάλλον έχει ενεργότητα χημειοτακτικής κυτοκίνης [56], στο κυτταρόπλασμα ρυθμίζει οξειδοαναγωγικά το περιβάλλον και τις λειτουργίες πρωτεϊνών, ενώ στον πυρήνα αλληλεπιδρά με μεταγραφικούς παράγοντες ρυθμίζοντας έτσι την έκφραση γονιδίων [59], [60], [61], [62].

Η μιτοχονδριακή θειορεδοξίνη (Trx2) παίζει ρόλο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη [15], ενώ υπερέκφρασή της διευκολύνει την ανάπτυξη αντίστασης στην απόπτωση που προκαλείται από τις ενεργές μορφές οξυγόνου [63]. Επιπλέον, η Trx2 είναι σημαντική για τη βιωσιμότητα του κυττάρου αφού φυσιολογικά αποτρέπει τον κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης [64]. Τέλος, έχει δειχθεί ότι μειώνει το οξειδωτικό στρες και αυξάνει τη βιοδιαθεσιμότητα του NO [65]. Η SpTrx ή Trx3, εκφράζεται στους όρχεις και εντοπίζεται στο σύστημα Golgi των σπερματοκυττάρων και σπερματίδων των θηλαστικών.

Η αναγωγή της θειορεδοξίνης (TrxR) είναι μια ομοδιμερής οξειδοαναγωγή με λειτουργία φλαβοπρωτεΐνης [66] που καταλύει την αναγωγή των θειορεδοξινών, καθώς και άλλων οξειδωμένων κυτταρικών συστατικών μέσω σχετιζόμενων με το NADPH αντιδράσεων [67]. Η TrxR είναι σημαντική για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αντιοξειδωτική λειτουργία και τη σηματοδότηση της οξειδοαναγωγής [68], [69].

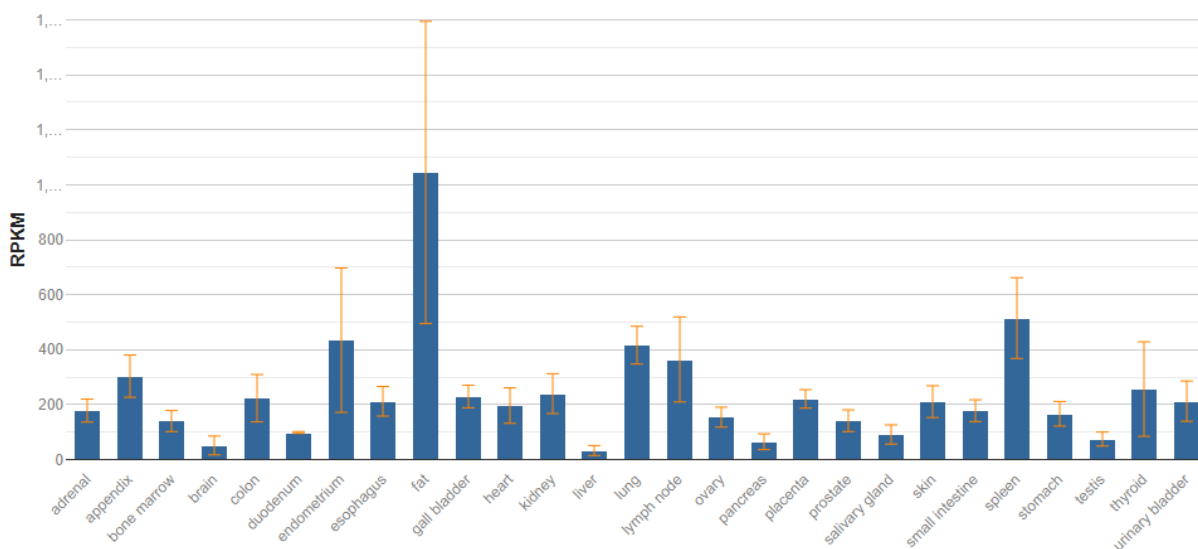
1.3.2 Η πρωτεΐνη δεσμευτική της θειορεδοξίνης (TXNIP)

Η πρωτεΐνη δεσμευτική της θειορεδοξίνης (TXNIP) αναγνωρίστηκε πρώτη φορά σε κυτταρικές σειρές HL-60 (λευχαιμίας) μετά από χορήγηση 1,25(OH)₂-D₃ (καλσιτριόλη) και είχε την ονομασία VDUP1 (vitamin D upregulated protein, πρωτεΐνη αυξανόμενη από τη βιταμίνη D), λόγω της ισχυρής ρύθμισης που υπόκειται από τη βιταμίνη D [70]. Στη συνέχεια, η TXNIP βρέθηκε ότι ρυθμίζει την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου μέσω δέσμευσης και αναστολής της θειορεδοξίνης [71] γι' αυτό ονομάστηκε και TBP2 (thioredoxin-binding protein 2, πρωτεΐνη δέσμευσης θειορεδοξίνης). Η πρωτεΐνη TXNIP κωδικοποιείται από το γονίδιο *TXNIP* που εδράζεται στη χρωμοσωμική θέση 1q21.1 και αποτελείται από 8 εξώνια. Η TXNIP ανήκει στην οικογένεια των α-arrestin (α-αρρεστίνες) πρωτεϊνών και δρα δεσμεύοντας τη θειορεδοξίνη.

Η πρωτεΐνη δεσμευτική της θειορεδοξίνης (TXNIP) είναι μια πρωτεΐνη παρούσα σε πολλούς ιστούς, συμμετέχει στην οξειδοαναγωγή και προάγει την απόπτωση [72]. Επιπλέον, η TXNIP είναι ένα από τα πιο σημαντικά ενδογενή μόρια που αλληλεπιδρούν με την TRX, καθώς είναι αρνητικός ρυθμιστής της λειτουργίας της [71]. Η TXNIP δρα δημιουργώντας δισουλφιδικούς δεσμούς με τη θειορεδοξίνη που βρίσκεται σε ανηγμένη μορφή [73]. Η Cys63 και Cys247 της TXNIP μπορούν να σχηματίσουν δισουλφιδικό δεσμό με τις θειόλες του ενεργού κέντρου της TRX και να καταστείλουν τη λειτουργία της, οδηγώντας σε οξειδωτικό στρες [73]. Η αύξηση των συμπλόκων TXNIP-TRX έχει

σαν αποτέλεσμα την παρουσία περισσότερων οξειδωμένων πρωτεϊνών κατά την έκθεση σε οξειδωτικό στρες [53].

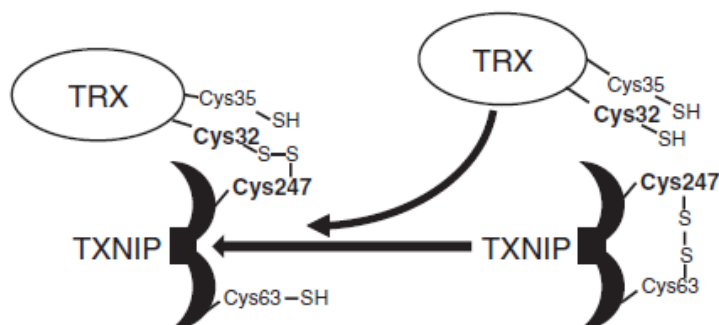
Η έκφραση της πρωτεΐνης TXNIP προκαλείται από στρες, όπως υπεριώδη ακτινοβολία, θερμικό σοκ, οξειδωτικό στρες καθώς και αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης [48]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα των κυττάρων. Σαν απόκριση σε οξειδωτικό στρες η TXNIP μετακινείται στο κυτταρόπλασμα ή στα μιτοχόνδρια όπου ρυθμίζει τη δράση της θειορεδοξίνης [47]. Στο Σχήμα 1 απεικονίζονται οι ιστοί όπου εντοπίζεται το μετάγραφο RNA του γονιδίου TXNIP [74].



Σχήμα 1: Επίπεδα έκφρασης του RNA του γονιδίου TXNIP (HPA RNA-seq normal tissue)

Η θειορεδοξίνη δεσμεύεται σε πρωτεΐνες (για παράδειγμα στην ASK1) και αναστέλλει τη λειτουργία τους. Όταν η TXNIP δεσμευτεί στη θειορεδοξίνη την απομακρύνει από αυτές τις πρωτεΐνες δρώντας ως ανταγωνιστικός αναστολέας. [75]. Συγκεκριμένα, η TXNIP με τη δέσμευση της TRX επηρεάζει έμμεσα τη λειτουργία άλλων πρωτεϊνών που βασίζονται στην παρουσία της TRX, όπως η PTEN, η ASK1 και το NLP3 φλεγμονόσωμα (NLP3- inflammasome) [76].

Παράλληλα, διαταραχές στη ροή του αίματος ή υψηλά επίπεδα γλυκόζης έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης της TXNIP, που οδηγεί σε μειωμένη ενεργότητα της αναγωγάσης της θειορεδοξίνης [77], [78]. Συγκεκριμένα, η TXNIP μειώνει την ενεργότητα της TrxR μέσω δημιουργίας δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ του καταλοίπου Cys247 που φέρει και του Cys32 του ενεργού κέντρου της TRX (Εικόνα 5). Γενικά, η σύνδεση μεταξύ TRX- TXNIP συμβαίνει μεταξύ οξειδωμένης μορφής της TXNIP και ανηγμένης μορφής της TRX [73].



Εικόνα 5: Η ρύθμιση της TRX από την TXNIP (Spindel et al., 2012)

Σε φυσιολογικές οξειδωτικές συνθήκες, η TXNIP δεσμεύεται στην TRX μέσω διαμοριακού δισουλφιδικού δεσμού και παρεμποδίζει την αναγωγική της δράση [79]. Κατά το οξειδωτικό στρες, τα υψηλά επίπεδα των ROS μπορεί να προκαλέσουν περαιτέρω οξείδωση αυτού του δεσμού και να οδηγήσουν στη δημιουργία θειοθειικών ενώσεων [80]. Τέτοια ενδιάμεσα προϊόντα μπορούν απευθείας να αντιδράσουν με διαθέσιμες θειόλες σχηματίζοντας δισουλφιδικούς δεσμούς, όπως αυτός μεταξύ της Cys32 και Cys35 της TRX, και σουλφονικού οξέος, όπως η Cys247 της TXNIP. Συνέπεια αυτών των γεγονότων είναι η TXNIP να αποδεσμεύεται από την TRX.

Οι ROS πιθανόν επίσης δίνουν το έναυσμα για την ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών μονοπατιών που θα δρούσαν στο σύστημα της θειορεδοξίνης, όπως η TrxR και το NADPH, ώστε να επαναφέρουν αναγωγικό περιβάλλον. Η αναγωγή του δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ των Cys63 και Cys190 των TXNIP, καθιστά την Cys63 διαθέσιμη να δημιουργήσει δισουλφιδικό δεσμό με την Cys247 ενός άλλου μορίου TXNIP. Έτσι η TRX μένει ελεύθερη να επιτελέσει το αναγωγικό της έργο. Μετά την αποκατάσταση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού, η αναγωγική ικανότητα της TRX πρέπει πάλι να εμποδιστεί. Οι ενεργές κυστεΐνες της TRX αντιδρούν με τους δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ των Cys63 και Cys247 των μορίων TXNIP, διαταράσσοντας την μεταξύ τους αλληλεπίδραση και αφήνοντας ξανά ελεύθερη την Cys63. Η Cys63 στη συνέχεια συζεύγνυται με την Cys190 άλλου TXNIP με αποτέλεσμα να αλλάζει η στερεοδομή του. Αυτό καθιστά και πάλι εφικτή τη σύνδεση της Cys247 της TXNIP με την Cys32 της TRX [81].

1.3.3 Λειτουργίες και κλινικές καταστάσεις που σχετίζονται με την TXNIP

Το σύστημα της θειορεδοξίνης συμμετέχει σε διεργασίες όπως η γήρανση των κυττάρων, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, η απόκριση σε οξειδωτικό στρες, η απόπτωση των κυττάρων και η ανοσολογική απόκριση. Επιπλέον, φαίνεται να εμπλέκεται στον καρκίνο, τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες, τη ρευματοειδή αρθρίτιδα καθώς και φλεγμονώδεις νόσους του αναπνευστικού [48].

Η πρωτεΐνη TXNIP έχει επιπλέον δράσεις όπως η καταστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και της μεταγραφής [82] και η ρύθμιση της φλεγμονώδους αντίδρασης [79]. Ακόμη, η TXNIP φαίνεται να δρα σαν ρυθμιστής του μεταβολισμού [83], [84] και της καρδιακής λειτουργίας [85], [86], [87], [88].

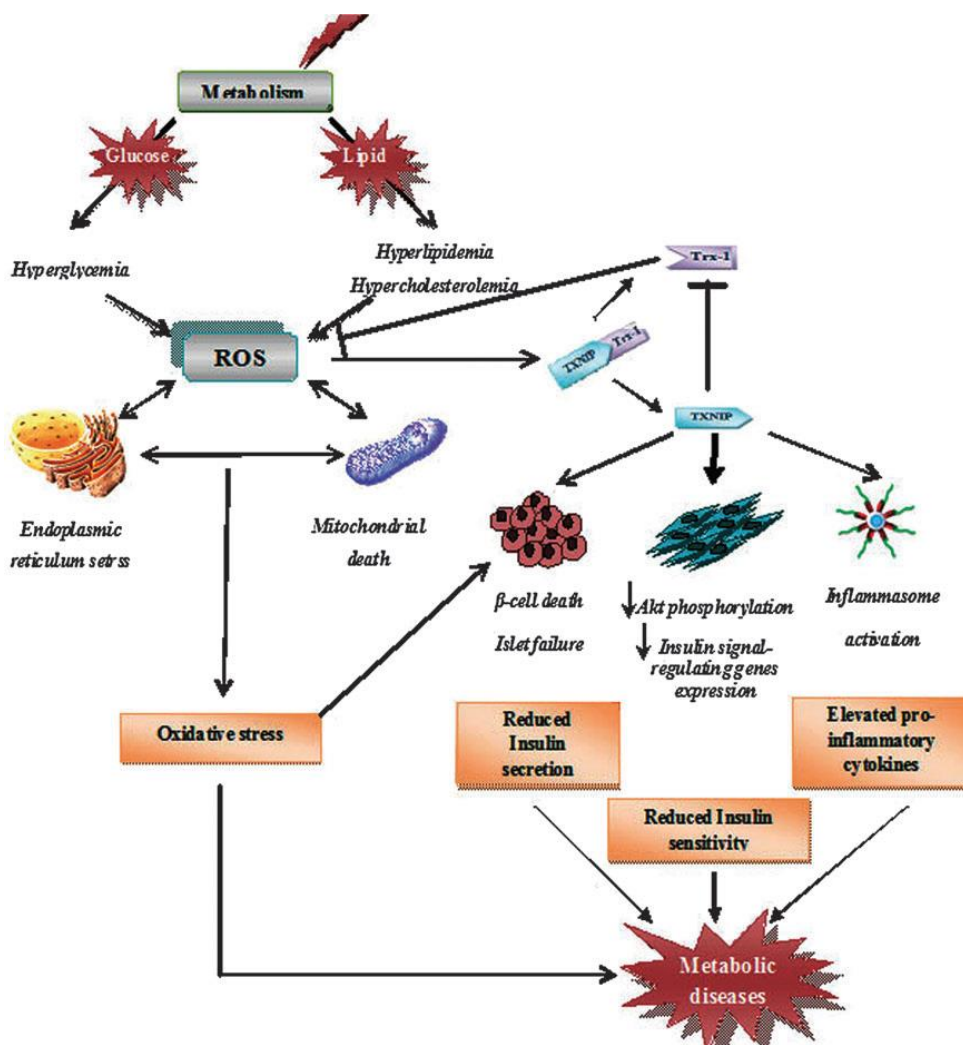
Η παρεμπόδιση της θειορεδοξίνης από την TXNIP μειώνει την ικανότητά της να αλληλεπιδρά με άλλα κυτταρικά μόρια, επηρεάζοντας την κυτταρική σηματοδότηση. Επομένως, η TXNIP φαίνεται να είναι ένα σημαντικό στοιχείο της παθογένειας πολλών καρκίνων και μεταβολικών ασθενειών [89]. Η TXNIP επιτελεί καθοριστικές λειτουργίες για την κυτταρική ανάπτυξη και δρα σαν ογκοκαταστολέας [90]. Σε αντίθεση με την TRX που αυξάνει σε πολλούς καρκίνους, η TXNIP μειώνεται έντονα σε ποικίλους καρκινικούς ιστούς και κυτταρικές σειρές [91], [92], [93]. Η TXNIP έχει βρεθεί να ενεργεί ως καταστολέας της μεταγραφής [94], [95] υποδηλώνοντας την TXNIP ως ογκοκατασταλτικό παράγοντα, που αποσιωπάται από γενετικούς και επιγενετικούς μηχανισμούς στα καρκινικά κύτταρα. Λόγω των ιδιοτήτων της να προάγει την κυτταρική ανάπτυξη και να παρεμποδίζει την απόπτωση, η TRX μπορεί να είναι θεραπευτικός στόχος για νέα αντικαρκινικά φάρμακα [81].

Μελέτες καταδεικνύουν την TXNIP ως καταστολέα όγκων σε κύτταρα του θυροειδούς. Αυτό μπορεί να καταστήσει την TXNIP πιθανό προγνωστικό δείκτη ή θεραπευτικό στόχο για τον καρκίνο του θυροειδούς [96]. Καθοριστικός είναι επίσης ο ρόλος της TXNIP στην απόπτωση των β-κυττάρων του παγκρέατος [72]. Γενικά, η TXNIP δρα ως ρυθμιστής της ηπατικής παραγωγής γλυκόζης [97] και συμμετέχει σε μηχανισμούς σχετικούς με τη συγκέντρωση γλυκόζης και τις διεργασίες όπου εμπλέκεται η ινσουλίνη.

1.3.4 Η TXNIP στον διαβήτη

Αποδείξεις δείχνουν πως η πρωτεΐνη TXNIP κατέχει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό της γλυκόζης [97], το οξειδωτικό στρες και την απόπτωση των β- κυττάρων του παγκρέατος [98]. Μείωση στην TXNIP αποκατέστησε την ρυθμιζόμενη από τη γλυκόζη παραγωγή ινσουλίνης, μείωσε την απόπτωση των β- κυττάρων και την παραγωγή των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS), [99]. Συνεπώς, η TXNIP μπορεί να συνδεθεί στενά με τον προ- διαβήτη και τον διαβήτη και έχει νόημα να μελετάται σε σχέση με αυτήν την κλινική κατάσταση και τις επιπλοκές της.

Οι ROS και η TXNIP είναι οι δύο κρίσιμοι επαγωγείς των μεταβολικών ασθενειών [48]. Η χρόνια υπεργλυκαιμία και η μακρόχρονη έκθεση σε υψηλά επίπεδα οξέων οδηγούν σε αυξημένη παραγωγή ROS, η οποία κινητοποιείται από τα μιτοχόνδρια και το ενδοπλασματικό δίκτυο. Αυτή η στρεσογόνος κατάσταση προκαλεί δυσλειτουργία στα β-κύτταρα του παγκρέατος. Η χρόνια υπεργλυκαιμία προκαλεί επιπλέον παραγωγή της TXNIP, ενώ οι ROS αποσυνδέουν το σύμπλεγμα TXNIP/TRX. Η αποσύνδεση του συμπλέγματος αυξάνει τη διαθεσιμότητα της TXNIP, προκαλώντας βλάβες σε ρυθμιστικά συστήματα όπως των μυών και του παγκρέατος. Συγκεκριμένα, ενεργοποιεί το NLRP3 φλεγμονόσωμα (NLRP3 inflammasome) οδηγώντας σε απελευθέρωση των ενεργών μορφών κυτοκινών προ-φλεγμονής, ιντερλευκίνη 18 και 1β (IL-18, IL-1β). Επίσης, μειώνει την έκκριση ινσουλίνης από το β- κύτταρα. Το προ-φλεγμονώδες στάδιο που αναπτύσσεται χειροτερεύει το κυτταρικό περιβάλλον και οδηγεί στην ανάπτυξη μεταβολικών ασθενειών (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Μηχανισμός επαγωγής μεταβολικών ασθενειών από τις ROS και την TXNIP (Mahmood et al., 2013).

Διαβητικά πειραματόζωα είχαν αυξημένη έκφραση της TXNIP στα αγγεία, και μειωμένη ενεργότητα της θειορεδοξίνης, η οποία επανήλθε μετά από θεραπεία με ινσουλίνη. Από αυτά φαίνεται πως η αλληλεπίδραση της θειορεδοξίνης με την TXNIP είναι ένας από τους μηχανισμούς που παίζουν ρόλο στο αγγειακό οξειδωτικό στρες κατά τον σακχαρώδη διαβήτη. Η παρεμπόδιση της λειτουργίας της θειορεδοξίνης στην υπεργλυκαιμία λόγω αλληλεπίδρασης με την TXNIP είναι η μοριακή βάση για τα αυξημένα επίπεδα των ενεργών μορφών οξυγόνου που προκαλούν το οξειδωτικό στρες [100].

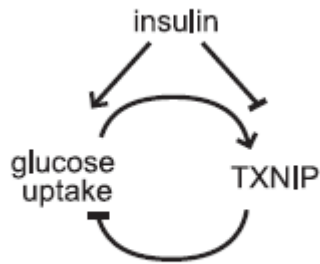
Συγκεκριμένα, το TXNIP είναι ένα γονίδιο που η έκφρασή του καταστέλλεται από την ινσουλίνη και ενισχύεται από τη γλυκόζη. Σε υγιή άτομα, η έκφρασή του σχετίζεται αντιστρόφως με την ολική πρόσληψη γλυκόζης από το σώμα. Η επαγόμενη έκφραση του TXNIP σε καλλιέργειες λιποκυττάρων μείωσε σημαντικά την πρόσληψη γλυκόζης, ενώ η αποσιώπηση σε λιποκύτταρα και σκελετικούς μύες ενίσχυσε την πρόσληψη γλυκόζης, δείχνοντας πως η TXNIP είναι ρυθμιστής της πρόσληψης γλυκόζης. Η έκφραση του TXNIP αυξάνεται στους μύες προ-διαβητικών και διαβητικών ατόμων. Συγκεκριμένα, η έκφραση της TXNIP αυξάνεται όσο η ανοχή στη γλυκόζη μειώνεται, υποδεικνύοντας ότι τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο πλάσμα μπορεί να είναι ερέθισμα που προάγει την έκφραση του γονιδίου TXNIP στον σκελετικό μυ [101].

Η έκφραση του TXNIP σχετίζεται ισχυρά με τα εξωκυτταρικά επίπεδα γλυκόζης. Η γλυκόζη προκαλεί τη μεταγραφή του γονιδίου της TXNIP μέσω μεταγραφικών παραγόντων που προσδένονται στον υποκινητή του [102], [103]. Σε ποντίκια όπου έγινε αποσιώπηση του γονιδίου της TXNIP (TXNIP-null) παρατηρήθηκε υπογλυκαιμία, υπο-ινσουλιναιμία, μειωμένη παραγωγή γλυκόζης και πρόβλημα στη διαχείριση της γλυκόζης από το ήπαρ. Η ηπατική έκφραση του TXNIP είναι απαραίτητη για τη διατήρηση φυσιολογικής παραγωγής γλυκόζης, αφού η πρωτεΐνη είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική ομοιόσταση της γλυκόζης στο ήπαρ [88].

Η διαθέσιμη θειορεδοξίνη δε μεταβάλλεται στα TXNIP-null ποντίκια, ωστόσο, η δράση της TXNIP στο να ρυθμίζει την ομοιόσταση της γλυκόζης μπορεί να καταργηθεί από μία μετάλλαξη κυστεΐνης που εμποδίζει τη σύνδεση με τη θειορεδοξίνη. Συγκεκριμένα, η αποσιώπηση του γονιδίου της TXNIP δεν επηρεάζει τη συνολική αναγωγική δραστηριότητα της θειορεδοξίνης ή την οξειδωτική της κατάσταση, αλλά η επίδραση της TXNIP στον μεταβολισμό της γλυκόζης εξαρτάται από την παρουσία της Cys247, που είναι απαραίτητη για την πρόσδεσή της στη θειορεδοξίνη [97].

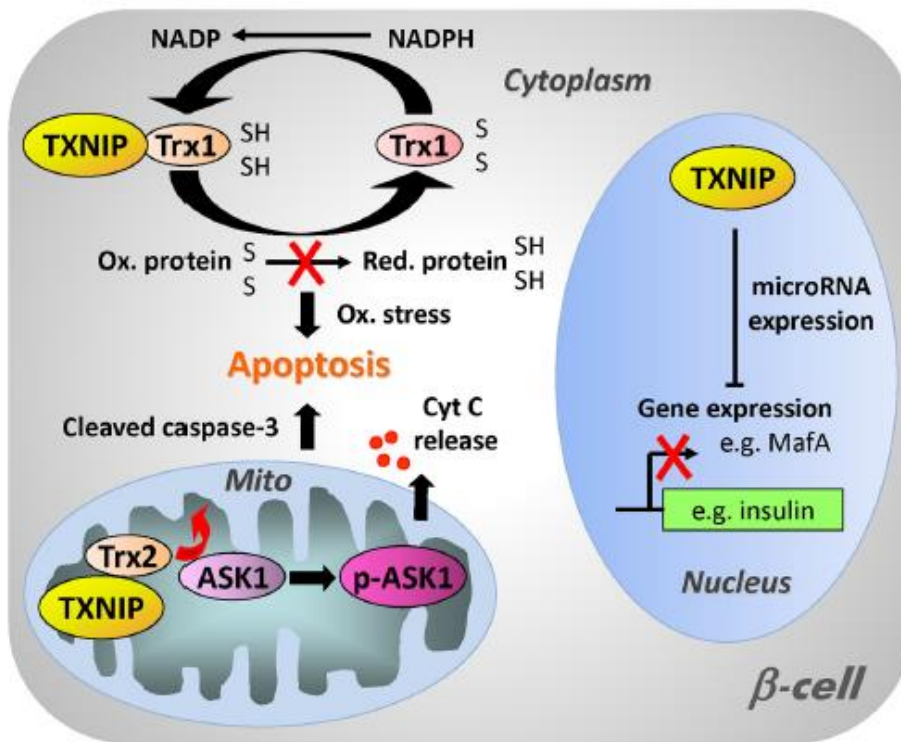
Η TXNIP είναι ένας από τους πιο θετικά ρυθμιζόμενους παράγοντες ως απόκριση στην γλυκόζη και η έκφραση του γονιδίου της ρυθμίζεται επιπλέον από γλυκοκορτικοειδή και δείκτες φλεγμονής (π.χ. ο παράγοντας νέκρωσης όγκων, tumor necrosis factor- α , TNF- α), [75], [104]. Το γεγονός ότι η TXNIP μπορεί να αυξήσει την παραγωγή γλυκόζης όταν η έκφρασή της αυξάνεται συνιστά έναν παθολογικό μηχανισμό, αφού οι καταστάσεις που προκαλούν αύξηση στην έκφραση της TXNIP επιταχύνουν την ηπατική παραγωγή γλυκόζης, συμβάλλοντας στην υπεργλυκαιμία. Η υπεργλυκαιμία με τη σειρά της αυξάνει την έκφραση της TXNIP ενισχύοντας περαιτέρω την ηπατική παραγωγή γλυκόζης. Η TXNIP έχει βρεθεί να διεγείρει η ίδια την έκφρασή της μέσω ανατροφοδοτικού βρόγχου (feed- forward loop) [105], που σημαίνει ότι κάθε ενίσχυση της TXNIP, όπως για παράδειγμα από τη γλυκόζη, ενισχύεται περαιτέρω με αυτόν τον τρόπο.

Η TXNIP παίζει ρόλο και στον έλεγχο της περιφερικής πρόσληψης γλυκόζης και ίσως είναι σημαντικός στόχος της επίδρασης της ινσουλίνης [101]. Η TXNIP φαίνεται να είναι μέρος του μηχανισμού αρνητικής επανατροφοδότησης που ρυθμίζει την πρόσληψη γλυκόζης από τα κύτταρα (Εικόνα 7). Αυτός ο μηχανισμός ίσως εξυπηρετεί φυσιολογικά στο να αποτρέπεται η υπερπρόσληψη γλυκόζης [106].



Εικόνα 7: Η TXNIP λειτουργεί σαν ένας ομοιοστατικός διακόπτης που ρυθμίζει την περιφερική πρόσληψη γλυκόζης (Parikh et al., 2007).

Στο κυτταρόπλασμα, η TXNIP δεσμεύει και εμποδίζει την θειορεδοξίνη 1 (Trx1), επιδρώντας έτσι στην ικανότητά της να μειώνει τις οξειδωμένες πρωτεΐνες. Αυτό οδηγεί σε οξειδωτικό στρες και αυξημένη ευαισθησία στην απόπτωση. Επιπλέον, η TXNIP μπορεί να εισέλθει στα μιτοχόνδρια, όπου αλληλεπιδρά με την θειορεδοξίνη 2 (Trx2). Με αυτόν τον τρόπο απελευθερώνεται η κινάση απόπτωσης ASK1 με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c (Cyt C) από τα μιτοχόνδρια, διάσπαση της κασπάσης 3 (caspase- 3) και τελικά την απόπτωση [72]. Η TXNIP έχει βρεθεί επιπλέον να ρυθμίζει την πιο κρίσιμη λειτουργία των β- κυττάρων, την παραγωγή ινσουλίνης [107]. Η TXNIP στον πυρήνα προκαλεί την έκφραση συγκεκριμένου microRNA, του miR-204, το οποίο με τη σειρά του στοχεύει ευθέως στην 3'-UTR του MafA. Ο MafA είναι μεταγραφικός παράγοντας των β- κυττάρων που ρυθμίζει την μεταγραφή του γονιδίου της ινσουλίνης ως απόκριση στα επίπεδα γλυκόζης [108]. Το miR- 204, του οποίου η έκφραση έχει προκληθεί από την TXNIP, ρυθμίζει αρνητικά την έκφρασή του MafA. Αυτό οδηγεί σε μειωμένη μεταγραφή και παραγωγή ινσουλίνης [107], (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Κυτταρικές λειτουργίες της TXNIP (Shalev, 2014).

Η αύξηση της έκφρασης του miR-204 και η μείωση του MafA και της παραγωγής ινσουλίνης παρατηρήθηκε τόσο *in vitro* σαν απόκριση της υπερέκφρασης του TXNIP στα β- κύτταρα, όσο και *in vivo* σε μοντέλα ποντικών με διαβήτη, δείχνοντας ότι αυτό το μονοπάτι ίσως παίζει ρόλο στην δυσλειτουργία των β- κυττάρων στον διαβήτη [107], [94], [109]. Επιπλέον, η ανεπάρκεια της TXNIP συνδέθηκε με αύξηση στην παραγωγή ινσουλίνης και αυτή η επίδραση αμβλύνεται από την υπερέκφραση miR-204 [107].

Η ινσουλίνη έχει βρεθεί να καταστέλλει την έκφραση του *TXNIP in vitro* σε β- κύτταρα [110] όπως και σε μυϊκό και λιπώδη ιστό [101], υποδηλώνοντας ότι αυτή η επίδραση δεν εξαρτάται από μεταβολές στη γλυκόζη. Ωστόσο, *in vivo* η υπεργλυκαιμία δείχνει να υπερισχύει των επιδράσεων της ινσουλίνης, αφού τα επίπεδα της TXNIP αυξάνονται δραματικά στον διαβήτη, ακόμη και υπό καθεστώς υπερινσουλιναϊμίας [98].

Η TXNIP εμφανίζεται ως σημαντικός παράγοντας στη βιολογία των παγκρεατικών β- κυττάρων. Η έκφραση της TXNIP στα β- κύτταρα έχει βρεθεί να ρυθμίζεται έντονα από πολλούς παράγοντες και να αυξάνεται δραματικά στα διαβητικά νησίδια του Langerhans [111]. Τα αυξημένα επίπεδα TXNIP προκαλούν την απόπτωση β- κυττάρων, ενώ η έλλειψη της TXNIP έχει βρεθεί ότι είναι προστατευτική έναντι του Διαβήτη τύπου 1 και 2, με το να αναστέλλει την απόπτωση των β- κυττάρων, διατηρώντας έτσι την κυτταρική μάζα του παγκρέατος [109]. Η έλλειψη TXNIP δρα προστατευτικά και προάγει την επιβίωση των β- κυττάρων ακόμη και σε συνθήκες υψηλής γλυκόζης [98], [112].

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η TXNIP εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα των β- παγκρεατικών κυττάρων, ενώ το οξειδωτικό στρες οδηγεί στη μετανάστευση της TXNIP στα μιτοχόνδρια. Εκεί, η TXNIP δεσμεύεται και οξειδώνει την Txn2, μπλοκάροντας την πρόσδεσή της στην ASK1. Συνεπώς, επιτρέπεται η φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της ASK1, που σηματοδοτεί με τη σειρά της την έναρξη του μιτοχονδριακού μονοπατιού της απόπτωσης [72]. Όπως έχει αναφερθεί, η έκφραση της TXNIP προκαλείται από διάφορα είδη στρες, όπως η UV ακτινοβολία, οι ακτίνες γ, το θερμικό σοκ και το H₂O₂, καθώς και από αυξημένη γλυκόζη. Η υπερέκφραση της TXNIP καθιστά τα κύτταρα περισσότερο ευπαθή στο οξειδωτικό στρες και προάγει την απόπτωση [94]. Τα παγκρεατικά β- κύτταρα είναι ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες λόγω των χαμηλών επιπέδων έκφρασης αντιοξειδωτικών ενζύμων [113] και η απώλεια λειτουργικής μάζας β- κυττάρων μέσω απόπτωσης είναι καθοριστικό στοιχείο της παθογένειας διαβήτη τύπου 1 και 2 [114], [115]. Τα φυσιολογικά επίπεδα της έκφρασης του *TXNIP* δεν είναι επιβλαβή για τη βιολογία του β- κυττάρου και μόνο η παθολογική αύξηση, όπως παρατηρείται στον διαβήτη, προκαλεί δυσλειτουργία β- κυττάρων και κυτταρικό θάνατο [111].

Υπάρχουν πολλά σηματοδοτικά μόρια που εμπλέκονται στην επαγωγή της δυσλειτουργίας των β- κυττάρων και η παρεμπόδιση αυτών των μορίων μπορεί να παρέχει μια βάση για νέες αντιδιαβητικές θεραπείες. Οι ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) και η TXNIP είναι οι πιο σημαντικοί μεσολαβητές που συμμετέχουν στο μονοπάτι της γλυκοτοξικότητας των β- κυττάρων. Μια χρόνια αύξηση στα επίπεδα γλυκόζης και ελεύθερων λιπαρών οξέων ενισχύει την παραγωγή των ROS από τα μιτοχόνδρια και το ενδοπλασματικό δίκτυο. Η περίσσεια ROS διαταράσσει αρκετούς μηχανισμούς ρύθμισης της λειτουργίας των β- κυττάρων και προκαλεί στρες και κυτταρικό θάνατο [116]. Συνεπώς, τα υψηλά επίπεδα της θειορεδοξίνης (TRX) θα μπορούσαν να είναι αποτελεσματικά στο να καταστείλουν την εξέλιξη του διαβήτη. Στην πραγματικότητα η υπερέκφραση της TRX διατηρεί τις λειτουργίες του β- κυττάρου, ειδικά την ικανότητα έκκρισης ινσουλίνης.

Η χρόνια υπεργλυκαιμία ενισχύει την έκφραση της TXNIP [117], επομένως, η TXNIP θεωρείται ένας κύριος ρυθμιστής της παθογένειας του ΣΔτ2 μέσω των επιβλαβών της επιδράσεων στα παγκρεατικά κύτταρα, ειδικά στην γλυκοτοξικότητα και την απόπτωση

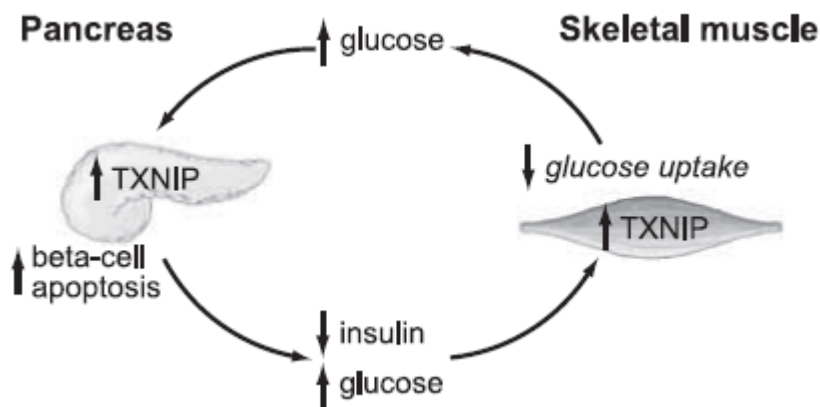
των β- κυττάρων. Επιπρόσθετα με την δραστηριότητα απόκρισης στο στρες, δεδομένα δείχνουν ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες, η TXNIP συμμετέχει στη ρύθμιση της γλυκόζης και των ελεύθερων λιπαρών οξέων, κάνοντας εμφανή τον σημαντικό ρόλο της στο στρες, τη φλεγμονή και άλλες φυσιολογικές διαδικασίες [118].

Ποντίκια με έλλειμα στο TXNIP (Hcb- 19) και ΣΔτ1 επέδειξαν αύξηση στην κυτταρική μάζα των β- κυττάρων υπό φυσιολογικές συνθήκες. Επίσης, εμφάνισαν αντοχή στην καταστροφή β- κυττάρων και στον διαβήτη [109]. Το έλλειμα στο TXNIP επιδρά και στην περιφερική πρόσληψη γλυκόζης, αφού προάγει την πρόσληψη γλυκόζης από τον σκελετικό μυ και τον λιπώδη ιστό [101] και εμποδίζει την ηπατική παραγωγή γλυκόζης [97]. Όλα αυτά συνεισφέρουν σε βελτιωμένη ομοιόσταση γλυκόζης. Τα προστατευτικά αποτελέσματα της έλλειψης της TXNIP εξαρτώνται και από τη θειορεδοξίνη. Αντίθετα, κάποια μεταβολικά και περιφερικά αποτελέσματα της δράσης του, όπως η παρεμπόδιση πρόσληψης γλυκόζης, βρέθηκε να είναι ανεξάρτητα από τη θειορεδοξίνη και αποδίδονται στις επικράτειες α- αρρεστίνης της TXNIP [53].

Σε ποντίκια με ΣΔτ2 η έλλειψη TXNIP οδηγεί σε διατήρηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα τους φυσιολογικά για πάνω από 6 μήνες [119]. Αυτό συνδέεται με μείωση της απόπτωσης β- κυττάρων και αύξηση της κυτταρικής τους μάζας, όπως και με βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη. Αυτές οι ευεργετικές επιδράσεις λαμβάνουν χώρα ενόψει σοβαρής παχυσαρκίας, δείχνοντας έτσι πως η έλλειψη TXNIP μπορεί να αποσυνδέσει τον διαβήτη από την παχυσαρκία [119]. Ποντίκια με αποσιώπηση του TXNIP που έλαβαν διατροφή υψηλής περιεκτικότητας σε λίπη, όπως ήταν αναμενόμενο είχαν σημαντικά αυξημένο λίπος συγκριτικά με τα αντίστοιχα ποντίκια αγρίου τύπου, ωστόσο εμφάνισαν προστασία από την ινσουλινοαντίσταση που προκλήθηκε από την υψηλή σε λιπαρά δίαιτα. Παράλληλα τα TXNIP- null ποντίκια είχαν βελτίωση στην διαθεσιμότητα γλυκόζης, τη γλυκολυτική ροή και τη σύνθεση γλυκογόνου, υποδεικνύοντας ότι η TXNIP είναι αρνητικός ρυθμιστής του μεταβολισμού της γλυκόζης [120]. Όλα αυτά δείχνουν πως η έκφραση της TXNIP αυξάνεται σημαντικά υπό καθεστώς διαβήτη σε μοντέλα τρωκτικών με ή χωρίς παχυσαρκία.

Το TXNIP δεν αποτελεί δείκτη προδιάθεσης για εμφάνιση ΣΔτ2, ωστόσο φαίνεται να παίζει ρόλο στην ομοιόσταση της γλυκόζης στους μύες και τον λιπώδη ιστό. Η έκφραση του TXNIP ρυθμίζεται αμοιβαία από τη γλυκόζη και την ινσουλίνη. Η αύξηση της έκφρασης μπορεί να παρεμποδίσει την πρόσληψη γλυκόζης και επίσης η έκφραση αυξάνεται σε άτομα με ΣΔτ2 και προ-διαβήτη [101].

Η παρατηρούμενη αύξηση των επιπέδων TXNIP στα β- κύτταρα είναι αποτέλεσμα της υπεργλυκαιμίας. Ακόμη και μικρής διάρκειας μεταγευματικά υψηλά όρια γλυκόζης (όπως συχνά παρατηρείται στον προ-διαβήτη) μπορεί να οδηγήσουν σε σταδιακή, σωρευτική αύξηση στην έκφραση του TXNIP πριν από την αρχική εκδήλωση διαβήτη. Η ανεπάρκεια ινσουλίνης ή η υπογλυκαιμία μπορεί να οδηγήσουν σε προβληματική περιφερική πρόσληψη γλυκόζης. Τα παγκρεατικά β- κύτταρα είναι αρχικά ικανά να εξισορροπήσουν το πρόβλημα με το να εκκρίνουν παραπάνω ινσουλίνη, όμως στο τέλος η εξισορρόπηση αποτυγχάνει. Η προκαλούμενη υπεργλυκαιμία μπορεί να αυξήσει την έκφραση του TXNIP στα παγκρεατικά κύτταρα, πράγμα που προκαλεί απόπτωση [101]. Μέσω του βρόχου ανατροφοδότησης οποιαδήποτε αύξηση στην έκφραση του TXNIP μπορεί να μεγεθυνθεί περαιτέρω οδηγώντας σε εντονότερη απόπτωση β- κυττάρων, επιπλέον βλάβη στην ομοιόσταση γλυκόζης και ενίσχυση αυτού του φαύλου κύκλου [111], (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Ο ρόλος της TXNIP στην τοξικότητα γλυκόζης στο β- κύτταρο και την μειωμένη περιφερική πρόσληψη γλυκόζης (Parikh et al., 2007).

Εξελικτικά, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η βασική έκφραση του *TXNIP* μπορεί να ήταν ευεργετική στο πλαίσιο της προϊστορικής έλλειψης τροφίμων και της έκθεσης σε μικρόβια. Ωστόσο, υπό τις τρέχουσες συνθήκες μιας διατροφής πλούσιας σε γλυκόζη, όπως η διατροφή του δυτικού κόσμου, η αύξηση της TXNIP αρχίζει να έχει επιβλαβείς επιδράσεις.

Στην πραγματικότητα, το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την TXNIP μπορεί να θεωρηθεί σαν μηχανισμός άμυνας του κυττάρου και η TXNIP ίσως παίζει σημαντικό ρόλο της μεταβολικής μετάβασης από την κατάσταση τροφοδότησης στην κατάσταση νηστείας [121]. Επιπλέον, η TXNIP αναστέλλει την μεταγραφή του γονιδίου της ινσουλίνης οδηγώντας σε μειωμένη παραγωγή της, ενώ παράλληλα προωθεί την ηπατική παραγωγή γλυκόζης και ίσως βοηθά στην πρόληψη της υπογλυκαιμίας, προάγοντας την επιβίωση σε συνθήκες έντονης νηστείας.

Η TXNIP φαίνεται να είναι ελκυστικός νέος θεραπευτικός στόχος για τον διαβήτη και την προαγωγή της ενδογενούς παραγωγής μάζας β- κυττάρων [107]. Επιπλέον τα αποτελέσματα δείχνουν γενετικά και φαρμακολογικά στοιχεία όχι μόνο για την πρόληψη αλλά και την αντιστροφή των επιπλοκών του διαβήτη κατά την αναστολή της TXNIP [119]. Η γενετική διαγραφή όπως και η φαρμακευτική παρεμπόδιση της TXNIP των β-κυττάρων έχει φανεί να προστατεύει έναντι διαβήτη τύπου 1 και 2.

Απουσία TXNIP μακροπρόθεσμα προκάλεσε σε ποντίκια αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του ήπατος [122]. Στόχος είναι τα επίπεδα της TXNIP να ρυθμιστούν στα ομαλά μη-διαβητικά όρια ώστε να αποφευχθούν οι επιπτώσεις των πολύ χαμηλών επιπέδων της ή της πλήρους απουσίας της.

1.4 Στόχος του πειράματος

Στόχος του πειράματος ήταν η μελέτη της πρωτεΐνης δεσμευτικής της θειορεδοξίνης (TXNIP) σε πλακούντες μητέρων που εμφάνισαν διαβήτη κύησης.

Είναι γνωστό πως τα παιδιά που γεννιούνται από διαβητικές μητέρες αποτελούν ομάδα υψηλού κινδύνου για εμφάνιση διαβήτη ή μεταβολικού συνδρόμου στην ενήλικη ζωή. Η πρόωμη ανίχνευση του πληθυσμού υψηλού κινδύνου είναι σημαντική, γιατί προσφέρει τη δυνατότητα πρωτογενούς πρόληψης.

Η ποσότητα της πρωτεΐνης TXNIP προσδιορίστηκε σε πλακούντες υγιών γυναικών και γυναικών με διαβήτη κύησης ώστε να διαπιστωθούν πιθανές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης. Επίσης, έγινε προσπάθεια συσχέτισης της έκφρασης της TXNIP με σωματομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά της μητέρας και του νεογνού.

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Λήψη Ιστού και Πειραματικές ομάδες

Η παρουσία της πρωτεΐνης TXNIP μελετήθηκε σε πλακουντιακό ιστό. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από την Γ' Γυναικολογική-Μαιευτική και την Γ' Παιδιατρική Κλινική της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ στο ΠΓΝ «Αττικόν» στην Αθήνα. Ο πλακούντας κατά τη λήψη διαχωρίστηκε σε τρεις στιβάδες, τη μητρική, την ενδιάμεση και την εμβρυϊκή. Ο πλακουντιακός ιστός που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία προήλθε από την μητρική στιβάδα. Μετά την λήψη τα δείγματα διατηρήθηκαν σε υπερκατάψυξη στους -80 °C.

Για το σκοπό της μελέτης συγκεντρώθηκαν δείγματα από δύο πειραματικές ομάδες. Η μία πειραματική ομάδα αποτέλεσε την ομάδα μαρτύρων (M). Τα δείγματα της ομάδας μαρτύρων παραλήφθηκαν από πλακουντιακό ιστό γυναικών χωρίς διαβήτη κύησης. Η δεύτερη πειραματική ομάδα αποτέλεσε την ομάδα ασθενών (P). Τα δείγματα της ομάδας ασθενών παραλήφθηκαν από πλακουντιακό ιστό γυναικών με διαβήτη κύησης. Η ομάδα M συμπεριέλαβε 26 δείγματα και η ομάδα P 33 δείγματα.

Στα στοιχεία που μετρήθηκαν συμπεριλήφθηκαν σωματομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά τόσο για τη μητέρα όσο και για το νεογνό. Οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2). Ο δείκτης BMI υπολογίστηκε ως βάρος σε κιλά προς ύψος σε μέτρα στο τετράγωνο. Όπου Gluc0 είναι τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας, Gluc60 τα επίπεδα γλυκόζης μία ώρα μετά από τη λήψη σκευάσματος γλυκόζης και Gluc120 τα επίπεδα γλυκόζης δύο ώρες μετά από τη λήψη σκευάσματος γλυκόζης. Επιπλέον των παρακάτω στοιχείων, καταγράφηκε το ιστορικό λήψης ινσουλίνης ή μετφορμίνης για τη ρύθμιση των επιπέδων σακχάρου στην ομάδα των ασθενών.

Πίνακας 2: Σωματομετρικές και βιοχημικές μετρήσεις

Σωματομετρικές μετρήσεις
Ηλικία μητέρας
Βάρος μητέρας πριν τον τοκετό
Βάρος μητέρας μετά τον τοκετό
BMI μητέρας πριν τον τοκετό
BMI μητέρας μετά τον τοκετό
Συστολική πίεση μητέρας
Διαστολική πίεση μητέρας
Βάρος νεογνού
BMI νεογνού
Βιοχημικές μετρήσεις στη μητέρα
Gluc0
Gluc60
Gluc120

2.2 Εκχύλιση Πρωτεϊνών

Η εκχύλιση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε σε δείγμα πλακουντιακού ιστού περίπου 400 mg. Συγκεκριμένα, περίπου 0,4 g ιστού ξεπλύθηκαν αρχικά με διάλυμα PBS 1x (phosphate buffered saline, pH 7,4). Αφού απομακρύνθηκε το PBS προστέθηκε 1 mL από το διάλυμα εκχύλισης (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Συστατικά του διαλύματος εκχύλισης (custom lysis buffer).

Αντιδραστήρια	Ποσότητα για κάθε δείγμα	Τελική Συγκέντρωση
Tris HCl	100 µL	10 mM
MgCl ₂ 10 mM	100 µL	1 mM
Glycerol 99%	100 µL	1 mM
CHAPS	0,005 g	4,43 mg/mL
100x Protease Inhibitor 100x Phosphatase Inhibitor	62,5 µL 62,5 µL	1x
β- mercaptoethanol	2,5 µL	
H ₂ O	700 µL	
Total	1127,5 µL	

Ο ιστός ομογενοποιήθηκε με χρήση ομογενοποιητή (IKA T25 Basic Turrax) και τα φιαλίδια επωάστηκαν στον πάγο για 25 λεπτά.

Μετά την πάροδο των 25 λεπτών ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 16000 g για 20 λεπτά στους 4°C. Με τη φυγοκέντρηση αυτή δημιουργήθηκαν 2 φάσεις. Στο ίζημα υπήρχαν υπολείμματα ιστού, ενώ στο υπερκείμενο η ολική πρωτεΐνη. Το υπερκείμενο αποθηκεύτηκε στους -80°C.

2.3 Προσδιορισμός συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης

2.3.1 Αρχή της Μεθόδου

Η μέθοδος δικινσονικού οξέος (bicinchoninic acid assay- BCA assay) αναπτύχθηκε το 1985 από τους Smith *et al.* Η BCA assay είναι μια βιοχημική μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης σε διάλυμα. Αυτό γίνεται μέσω μέτρησης με χρωματογραφική τεχνική της χρωματικής αλλαγής του διαλύματος από πράσινο σε ιώδες, κατ' αναλογία με τη συγκέντρωση πρωτεΐνης.

Η μέθοδος BCA βασίζεται στην αντίδραση διουρίας, όπου πεπτιδία με τρία ή περισσότερα αμινοξέα σχηματίζουν έγχρωμη χηλική ένωση με δισθενή ιόντα χαλκού σε αλκαλικό περιβάλλον. Έτσι, στο πρώτο στάδιο της μεθόδου BCA λαμβάνει χώρα η αντίδραση διουρίας, όπου τα δισθενή ιόντα χαλκού ανάγονται σε μονοσθενή και δίνουν ελαφρώς μπλε χρώμα στο διάλυμα.

Στο δεύτερο στάδιο σχηματίζεται χηλικό σύμπλοκο μεταξύ του BCA και των μονοσθενών ιόντων χαλκού, το οποίο δίνει ιώδες χρώμα που απορροφά στα 540 nm. Η ένταση του χρώματος που δημιουργείται είναι ανάλογη του αριθμού των πεπτιδικών δεσμών που συμμετέχουν στην αντίδραση [123].

Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε κάθε διάλυμα δείγματος προσδιορίζεται με σύγκριση της απορρόφησης με αυτή διαλυμάτων πρωτεϊνών γνωστής συγκέντρωσης (πρότυπα).

2.3.2 Πρωτόκολλο BCA Assay

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε με χρήση του BCA Protein Assay Kit (Cell Signaling Technology) σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

Αρχικά, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα αλβουμίνης γνωστής συγκέντρωσης. Το πυκνότερο διάλυμα αλβουμίνης παρασκευάστηκε με συγκέντρωση 2000 µg/mL και ακολούθησαν αραιώσεις σύμφωνα με τον πίνακα (Πίνακας 4).

Πίνακας 4: Αραιώσεις για την πρότυπη καμπύλη

Πρότυπο	Custom Lysis Buffer	Πρότυπο που αραιώθηκε	Τελική Συγκέντρωση (µg/mL)
A	0 µL	-	2000
B	66 µL	200 µL Πρότυπο A	1500
C	100 µL	100 µL Πρότυπο A	1000
D	100 µL	100 µL Πρότυπο B	750
E	100 µL	100 µL Πρότυπο C	500
F	100 µL	100 µL Πρότυπο E	250
G	100 µL	100 µL Πρότυπο F	125

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο BCA χρειάστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο η παρασκευή τριών διαλυμάτων. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε πιάτο ELISA 96 θέσεων.

Αρχικά, παρασκευάστηκε το Reconstitution Buffer (Working Reconstitution Buffer και απιονισμένο νερό), το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του Compatibility Reagent Solution (Reconstitution Buffer και Compatibility Reagent). Τέλος, παρασκευάστηκε το BCA Working Reagent με τα διαλύματα Reagent A και Reagent B σε αναλογία 50:1 αντίστοιχα. Το BCA Working Reagent είναι φωτοευαίσθητο, γι' αυτό και φυλάχθηκε στο σκοτάδι μέχρι τη χρήση.

Τα δείγματα που μετρήθηκαν αραιώθηκαν πριν τη μέτρηση σε αραιώση 1:5 με τελικό όγκο 20 μL (16 μL νερό και 4 μL δείγματος).

Όλα τα διαλύματα (πρότυπα και δείγματα) φορτώθηκαν στο πιάτο εις διπλούν για μεγαλύτερη ακρίβεια της μέτρησης. Σε κάθε θέση του πιάτου φορτώθηκαν 9 μL διαλύματος όπως φαίνεται στην Εικόνα 10.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Πρότυπο A	Πρότυπο E	Δείγμα 1									
B	Πρότυπο A	Πρότυπο E	Δείγμα 1									
C	Πρότυπο B	Πρότυπο F	Δείγμα 2									
D	Πρότυπο B	Πρότυπο F	Δείγμα 2									
E	Πρότυπο C	Πρότυπο G	...									
F	Πρότυπο C	Πρότυπο G	...									
G	Πρότυπο D	Blank	...									
H	Πρότυπο D	Blank	...									

Εικόνα 10: Θέσεις προτύπων και δειγμάτων στο πιάτο ELISA.

Στη συνέχεια προστέθηκαν σε όλες τις θέσεις, εκτός από του Blank, από 4 μL Compatibility Reagent Solution. Το πιάτο αναδεύτηκε ελαφρώς για 1 λεπτό και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 15 λεπτά.

Μετά το πέρας της επώασης προστέθηκαν σε όλες τις θέσεις 260 μL BCA Working Reagent. Το πιάτο αναδεύτηκε ελαφρώς για 1 λεπτό και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 30 λεπτά.

Στη συνέχεια το πιάτο παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και ακολούθησε φωτομέτρηση στη συσκευή Digi Scan με χρήση του λογισμικού DigiWin 3.0.

2.4 Western Blot

2.4.1 Βασικές Αρχές Western Blot

Η Western Blot είναι μια τεχνική που επιτρέπει τον ημιποσοτικό προσδιορισμό συγκεκριμένων πρωτεϊνών μέσα από ένα μείγμα ολικής πρωτεΐνης και περιλαμβάνει το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μέγεθος μέσω ηλεκτροφόρησης, τη μεταφορά τους σε στερεό μέσο (μεμβράνη) και τον εντοπισμό των επιθυμητών πρωτεϊνών μέσω ανοσοαποτύπωσης.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα διαλύονται σε ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο περιέχει γλυκερόλη, χρωστική ουσία (συνήθως μπλε της βρωμοφαινόλης), απορρυπαντικό SDS (sodium dodecyl sulfate) και β-μερκαπτοαιθανόλη [124].

Η γλυκερόλη καθιστά το δείγμα πιο πυκνό ώστε να βυθιστεί στον πυθμένα των βοθρίων του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης. Η χρωστική ουσία χρησιμεύει στην οπτική παρακολούθηση της εξέλιξης της ηλεκτροφόρησης. Το απορρυπαντικό SDS αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τις φορτίζει αρνητικά, ώστε να μετακινηθούν στο πήκτωμα κατά την ηλεκτροφόρηση. Το SDS δεσμεύεται στις πρωτεΐνες ανάλογα με το μήκος τους, με αποτέλεσμα η ταχύτητα κίνησης των πρωτεϊνών στο πήκτωμα να εξαρτάται από το μοριακό τους βάρος. Οι μικρότερες πρωτεΐνες μετακινούνται ταχύτερα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος. Τέλος, η β-μερκαπτοαιθανόλη ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ των κυστεϊνικών ομάδων της ίδιας ή διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων, ώστε να προσδεθεί επιτυχώς το SDS και να επιτευχθεί ο διαχωρισμός με βάση το μέγεθος. Η αποδιάταξη ολοκληρώνεται με τη θέρμανση των δειγμάτων. Για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών χρησιμοποιείται μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους, που ηλεκτροφορείται παράλληλα με τις πρωτεΐνες.

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης με εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης. Το πήκτωμα δημιουργείται από το συμπολυμερισμό του ακρυλαμίδιου με N,N-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο (bis-acrylamide). Το ακρυλαμίδιο είναι το μονομερές του πολυμερισμού, ενώ το N,N-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο είναι ο διασταυρωτής, που δημιουργεί τις διασυνδέσεις μεταξύ διαφορετικών αλυσίδων πολυακρυλαμίδιου. Το κάθε πήκτωμα αποτελείται από δύο μέρη, το πήκτωμα συσσώρευσης (stacking gel) και το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel). Το πήκτωμα συσσώρευσης είναι ελαφρώς όξινο (pH 6,8), με χαμηλότερη συγκέντρωση ακρυλαμίδης και επιτρέπει στις πρωτεΐνες να σχηματίσουν μια λεπτή, σαφώς καθορισμένη ζώνη. Το πήκτωμα διαχωρισμού είναι βασικό (pH 8,8), με υψηλότερη συγκέντρωση ακρυλαμίδης. Το σύστημα ηλεκτροφόρησης που εφαρμόζεται είναι διακεκομμένο (discontinuous ή Laemmli system), λόγω των διαφορών αγωγιμότητας που υπάρχουν μεταξύ του πηκτώματος συσσώρευσης, του πηκτώματος διαχωρισμού και του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης.

Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, στην πάνω πλευρά υπάρχει το ηλεκτρόδιο της καθόδου (αρνητικό φορτίο), ενώ στο κάτω μέρος το ηλεκτρόδιο της ανόδου (θετικό φορτίο). Το ελαφρώς όξινο pH του πηκτώματος συσσώρευσης δημιουργείται από τα ιόντα χλωρίου (Cl⁻) που περιέχει. Επίσης, στο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης υπάρχουν ιόντα γλυκίνης, τα οποία στο όξινο pH του πηκτώματος συσσώρευσης έχουν ουδέτερο προς ελαφρώς αρνητικό φορτίο. Κατά τη μετακίνηση των αρνητικά φορτισμένων πρωτεϊνών στο πήκτωμα συσσώρευσης, η κίνησή τους περιορίζεται. Τα ιόντα χλωρίου έχουν ισχυρότερο αρνητικό φορτίο συγκριτικά με τις πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα να προπορεύονται αυτών. Στον αντίποδα, τα ιόντα γλυκίνης από το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης έπονται των πρωτεϊνών, λόγω του ότι έχουν ασθενέστερο αρνητικό φορτίο στο όξινο περιβάλλον του πηκτώματος. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται ότι

όλες οι πρωτεΐνες που έχουν φορτωθεί στο πήκτωμα θα φτάσουν ταυτόχρονα στην επιφάνεια του πηκτώματος διαχωρισμού.

Όταν η ακολουθία γλυκίνη- πρωτεΐνες- ιόντα χλωρίου φτάσει στο πήκτωμα διαχωρισμού, λόγω του υψηλότερου pH που επικρατεί, το αρνητικό φορτίο των ιόντων γλυκίνης γίνεται ισχυρότερο, με αποτέλεσμα τα ιόντα αυτά να αποκτούν μεγαλύτερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα και να προπορεύονται πλέον των πρωτεϊνών, μαζί με τα ιόντα χλωρίου. Σε αυτή τη φάση της ηλεκτροφόρησης, όπου αυξάνουμε και την τάση, οι πρωτεΐνες κινούνται πλέον ελεύθερα και διαχωρίζονται βάσει μεγέθους, περιοριζόμενες μόνο από τους πόρους του πηκτώματος, που λειτουργεί ως μοριακός ηθμός.

Η ηλεκτροφόρηση ολοκληρώνεται όταν το μέτωπο της χρωστικής του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης φύγει από το πήκτωμα. Ακολουθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών (Transfer) σε στερεό μέσο, όπως η μεμβράνη νιτροκυταρίνης. Η μεταφορά πραγματοποιείται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου σε συσκευή όπου η μεμβράνη τοποθετείται πάνω στο πήκτωμα, ανάμεσα σε φίλτρα Whatman και βυθίζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς. Η κατασκευή τοποθετείται έτσι ώστε η μεμβράνη να βρίσκεται προς την πλευρά του ηλεκτροδίου ανόδου (θετικό), ενώ το πήκτωμα προς το ηλεκτρόδιο καθόδου (αρνητικό). Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται η μεταφορά των αρνητικά φορτισμένων πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη.

Ακολουθεί το στάδιο του blocking. Η μεμβράνη επωάζεται σε κάποια αδρανή πρωτεΐνη (π.χ. καζεΐνη), με αποτέλεσμα να μπλοκάρονται οι θέσεις της μεμβράνης στις οποίες δεν έχει προσροφηθεί πρωτεΐνη από το δείγμα. Έτσι, εμποδίζεται η μη ειδική πρόσδεση αντισωμάτων στη μεμβράνη [125]. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται για 16 με 18 ώρες στους 4°C με το πρωτογενές αντίσωμα. Το πρωτογενές αντίσωμα αναγνωρίζει εκλεκτικά την προς ανάλυση πρωτεΐνη.

Μετά από πλύσεις για την απομάκρυνση της περίσσειας αντισώματος ακολουθεί στάδιο επώασης με αντι-αντίσωμα (δευτερογενές αντίσωμα) που προσδένεται στο πρωτογενές αντίσωμα. Η επιλογή του δευτερογενούς αντισώματος γίνεται ανάλογα με το σε ποιο ζωικό είδος έχει αναπτυχθεί το πρωτογενές (π.χ. Αν το πρωτογενές προέρχεται από κουνέλι, το δευτερογενές θα είναι αντι-αντίσωμα που αναγνωρίζει ειδικά το πρωτογενές από αυτό το ζωικό είδος).

Ο εντοπισμός των επιθυμητών πρωτεϊνών γίνεται με τη μέθοδο ECL (enhanced chemiluminescence). Το δευτερογενές αντίσωμα φέρει ένζυμο, όπως η υπεροξειδάση του χρένου (horseradish peroxidase- HRP/ χρένο- Αρμοράκια η αγροτική, πλώδες σταυρανθές). Η μέθοδος ECL βασίζεται στην επώαση της μεμβράνης σε υπόστρωμα του ενζύμου HRP, τη λουμινόλη. Με την οξείδωση της λουμινόλης από το HRP παράγεται φως.

Οι μεμβράνες στη συνέχεια εκτίθενται σε φιλμ σε σκοτεινό θάλαμο. Στα σημεία όπου υπάρχουν οι επιθυμητές πρωτεΐνες έχει λάβει χώρα η οξείδωση της λουμινόλης, μέσω του ενζύμου HRP που είναι προσδεμένο στο δευτερογενές αντίσωμα. Επομένως, στο φιλμ απεικονίζονται οι αντίστοιχες ζώνες.

2.4.2 Western Blot

Σε κάθε δείγμα ολικής πρωτεΐνης εντοπίστηκε η πρωτεΐνη δεσμευτική της θειορεδοξίνης (TXNIP), καθώς και η β-ακτίνη ως ενδογενής πρωτεΐνη αναφοράς (housekeeping protein).

Αρχικά, παρασκευάστηκε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης με χρήση διαλύματος ακρυλαμίδης 30%. Τα δείγματα φορτώθηκαν εις διπλούν σε δύο διαφορετικά πηκτώματα και ηλεκτροφορήθηκαν στο ίδιο πείραμα. Στο ένα πήκτωμα έγινε ο εντοπισμός της TXNIP και στο δεύτερο της β-ακτίνης, καθώς τα δύο μόρια έχουν παρόμοιο μοριακό βάρος. Το διάλυμα ακρυλαμίδης 30% παρασκευάστηκε σύμφωνα με τον Πίνακα (Πίνακας 5).

Πίνακας 5: Διάλυμα 30% ακρυλαμίδης.

Συστατικά	Ποσότητα	Τελική Συγκέντρωση
Acrylamide	29 g	0,29 g/mL
Bis- acrylamide	1 g	0,01 g/mL
H ₂ O	up to 100 mL	

Το διάλυμα διατηρήθηκε σε stock στους 4°C.

Για το κάθε πήκτωμα χρειάστηκαν δύο διαλύματα, ένα για το πήκτωμα συσσώρευσης (stacking gel) και ένα για το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel). Το πήκτωμα συσσώρευσης έχει μεγαλύτερους πόρους από του διαχωρισμού και χρησιμεύει στην ευθυγράμμιση των δειγμάτων στην κορυφή του πηκτώματος διαχωρισμού κατά την έναρξη της ηλεκτροφόρησης. Το πήκτωμα διαχωρισμού παρασκευάστηκε με πυκνότητα 8%, ενώ το πήκτωμα συσσώρευσης με πυκνότητα 5%. Τα διαλύματα για το πήκτωμα συσσώρευσης και διαχωρισμού παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τους Πίνακες (Πίνακας 6 και Πίνακας 7).

Πίνακας 6: Διάλυμα για το πήκτωμα συσσώρευσης.

Συστατικά	Ποσότητα για 2 gels
H ₂ O	5,54 mL
Tris 0,5 M, pH 6,8	2,52 mL
SDS 10%	100 µL
Acrylamide 30%	1,66 mL
APS 10%	100 µL
TEMED	10 µL
Total	9,93 mL

Πίνακας 7: Διάλυμα για το πήκτωμα διαχωρισμού.

Συστατικά	Ποσότητα για 2 gels
H ₂ O	9,2 mL
Tris 1,5 M, pH 8,8	5 mL
SDS 10%	200 µL
Acrylamide 30%	5,4 mL
APS 10%	200 µL
TEMED	12 µL
Total	20,012 mL

Στην ειδική συσκευή για την παρασκευή του πήκτωματος τοποθετήθηκε πρώτα το διάλυμα για το πήκτωμα διαχωρισμού και αφού έπηξε (πολυμερισμός της ακρυλαμίδης σε πολυακρυλαμίδιο) τοποθετήθηκε το πήκτωμα συσσώρευσης με τα ειδικά χτενάκια για το σχηματισμό των βοθρίων.

Η ποσότητα ολικής πρωτεΐνης που ηλεκτροφορήθηκε από κάθε δείγμα ήταν 80 µg. Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 10 µL 4x Laemmli Sample Buffer (BioRad) με β-μερκαπτοαιθανόλη και διάλυμα εκχύλισης μέχρι να συμπληρωθούν 40 µL, που είναι και ο τελικός όγκος που φορτώθηκε σε κάθε βοθρίο του πήκτωματος.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer) που παρασκευάστηκε σύμφωνα με τον πίνακα (Πίνακας 8).

Πίνακας 8: Διάλυμα ηλεκτροφόρησης.

Συστατικά	Ποσότητα	Τελική Συγκέντρωση
10x Tris- Glycine stock	100 mL	1x
SDS	1 g	1 g/L
H ₂ O	up to 1000 mL	

Τα δείγματα θερμάνθηκαν πριν φορτωθούν στο πήκτωμα για 5 λεπτά στους 95°C.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε πάγο. Αρχικά, εφαρμόστηκε τάση 90 V για περίπου 15 λεπτά, μέχρι τα δείγματα να φτάσουν στο τέλος του πήκτωματος συσσώρευσης και στη συνέχεια τάση 120 V για περίπου μιάμιση ώρα.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης ακολούθησε η μεταφορά των πρωτεϊνών (Transfer) από το πήκτωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (nitrocellulose membrane, Macherey-Nagel). Η μεταφορά πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer) που παρασκευάστηκε σύμφωνα με τον πίνακα (Πίνακας 9).

Πίνακας 9: Διάλυμα μεταφοράς.

Συστατικά	Ποσότητα	Τελική Συγκέντρωση
10x Tris- Glycine stock	100 mL	1x
SDS	1 g	1 g/L
CH ₃ OH	200 mL	200 mL/L
H ₂ O	up to 1000 mL	

Για τη μεταφορά τοποθετήθηκαν στην ειδική κασετίνα με τη σειρά ειδικό σφουγγαράκι- τρία Whatman 3MM paper- πήκτωμα- μεμβράνη- τρία Whatman 3MM paper- ειδικό σφουγγαράκι. Τα Whatman 3MM papers, η μεμβράνη και τα σφουγγαράκια είχαν βυθιστεί σε Transfer buffer πριν την τοποθέτηση στην κασετίνα. Η ίδια διάταξη πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά για καθένα από τα δύο πήκτωμα. Οι κασετίνες τοποθετήθηκαν στο δοχείο μεταφοράς ώστε η πλευρά με το πήκτωμα να βρίσκεται προς την κάθοδο και η πλευρά με τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης προς την άνοδο. Η μεταφορά πραγματοποιήθηκε σε πάγο. Εφαρμόστηκε τάση 100 V για 1 ώρα.

Μετά το τέλος της μεταφοράς οι μεμβράνες ξεπλύθηκαν σε διάλυμα PBST με ελαφριά ανάδευση τρεις φορές. Το PBST παρασκευάστηκε σύμφωνα με τον πίνακα (Πίνακας 10).

Πίνακας 10: Διάλυμα PBST.

Συστατικά	Ποσότητα	Τελική Συγκέντρωση
10x PBS	100 mL	1 x
Tween 20	1 mL	1 mL/L
H ₂ O	up to 1000 mL	

Ακολούθησε προσωρινή χρώση των μεμβρανών με χρωστική Ponceau με ανάδευση για 5 λεπτά, ώστε να διαπιστωθεί αν είχε επιτευχθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών στις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης. Στη συνέχεια οι μεμβράνες ξεπλύθηκαν σε PBST μέχρι η χρωστική να ξεπλυθεί εντελώς.

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία του blocking με επώαση των μεμβρανών σε ξεχωριστά δοχεία για 1 ώρα σε γάλα 5% διαλυμένο σε PBST. Με αυτόν τον τρόπο μπλοκάρονται οι θέσεις μη ειδικής πρόσδεσης του αντισώματος στη μεμβράνη.

Τα πρωτογενή αντισώματα για την β-ακτίνη και το TXNIP παρασκευάστηκαν σε 5% γάλα σε PBST σε αραιώση 1:1000. Για την β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα β-Actin Rabbit mAb (Cell Signaling Technology) και για την TXNIP χρησιμοποιήθηκε TXNIP Rabbit mAb (Cell Signaling Technology). Καθεμία από τις δύο μεμβράνες επώαστηκε σε διαφορετικό αντίσωμα. Πραγματοποιήθηκε επώαση των μεμβρανών overnight στους 4°C με ελαφριά ανάδευση.

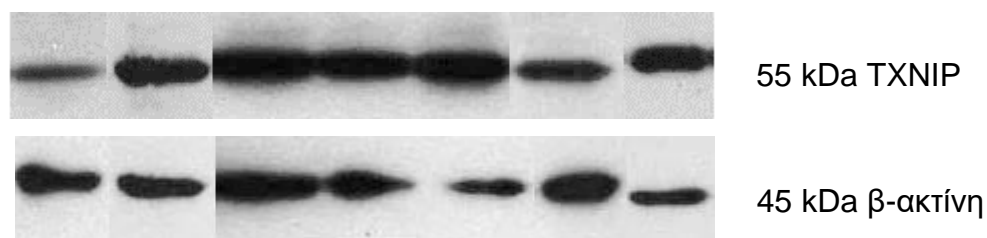
Μετά από την επώαση overnight, απομακρύνθηκαν τα πρωτογενή αντισώματα. Οι μεμβράνες ξεπλύθηκαν με PBST επί τρεις φορές με ελαφριά ανάδευση για 10 λεπτά. Παρασκευάστηκε το δευτερογενές αντίσωμα, Anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody (Cell Signaling Technology), σε 5% γάλα σε PBST σε αραιώση 1:2000. Οι μεμβράνες επώαστηκαν με το δευτερογενές αντίσωμα σε ξεχωριστά δοχεία για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετά το πέρας της επώασης το δευτερογενές αντίσωμα απομακρύνθηκε και οι μεμβράνες ξεπλύθηκαν με PBST επί τρεις φορές με ελαφριά ανάδευση για 10 λεπτά.

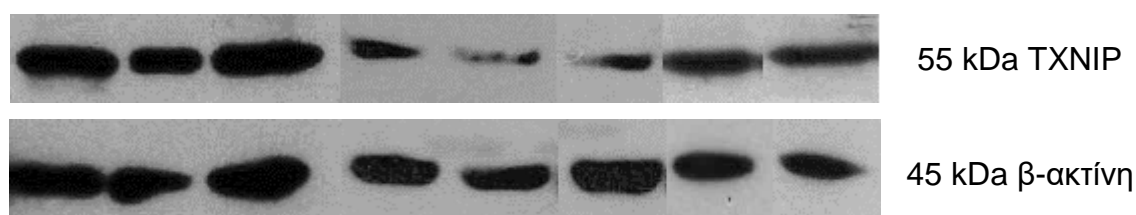
Ακολούθησε η επώαση των μεμβρανών σε υπόστρωμα για το HRP. Χρησιμοποιήθηκε το Clarity Western ECL Substrate (BioRad) σύμφωνα με τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρείας. Συγκεκριμένα παρασκευάστηκε διάλυμα από τα Reagent A και Reagent B σε αναλογία 50:50 και σε συνολική ποσότητα επαρκή για την κάλυψη των δύο μεμβρανών. Οι μεμβράνες επώαστηκαν στο υπόστρωμα ECL για 5 λεπτά στο σκοτάδι.

Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε η περίσσεια διαλύματος ECL και οι μεμβράνες τοποθετήθηκαν σε κασετίνα εμφάνισης. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης αποτυπώθηκαν σε film (Fujifilm- fuji medical X-ray film, super RX-N) στον σκοτεινό θάλαμο.

Η ένταση των ζωνών πρωτεϊνών που εμφανίστηκαν στο film μετρήθηκαν με χρήση του λογισμικού ImageJ (National Institutes of Health). Ενδεικτικά, στις παρακάτω εικόνες (Εικόνα 11, Εικόνα 12) παρουσιάζονται films από δείγματα μαρτύρων και ασθενών.



Εικόνα 11: Western blot film από δείγματα μαρτύρων



Εικόνα 12: Western blot film από δείγματα ασθενών

2.5 Στατιστική ανάλυση

Βάσει των μετρήσεων των ζωνών των films με το λογισμικό ImageJ εκτιμήθηκε η ποσότητα πρωτεΐνης TXNIP και β-ακτίνη για κάθε δείγμα. Η κανονικοποιημένη ποσότητα πρωτεΐνης TXNIP προς β-ακτίνη προέκυψε από το πηλίκο του εμβαδού ζώνης για την TXNIP προς το εμβαδό ζώνης της β-ακτίνης για κάθε δείγμα.

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο SPSS (Version 25, IBM). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα. Για την εύρεση των διαφορών των μέσων μεταξύ των δύο ομάδων για κάθε στοιχείο που μετρήθηκε πραγματοποιήθηκε Levene's test for equality of variances και στη συνέχεια t- test for equality of means. Οι διαφορές μεταξύ των μέσων των δύο ομάδων θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές για $P < 0,05$, ενώ θεωρήθηκε τάση διαφοροποίησης όταν $P < 0,1$.

Για τη συσχέτιση μεταξύ των τιμών των παραμέτρων προσδιορίστηκε ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης του Pearson (r). Πραγματοποιήθηκε ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ των παραμέτρων τόσο για το σύνολο των δειγμάτων, όσο και εντός της κάθε ομάδας. Επιπλέον, αναλύθηκε η ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ της ποσότητας της πρωτεΐνης TXNIP και σωματομετρικών παραμέτρων του νεογνού.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

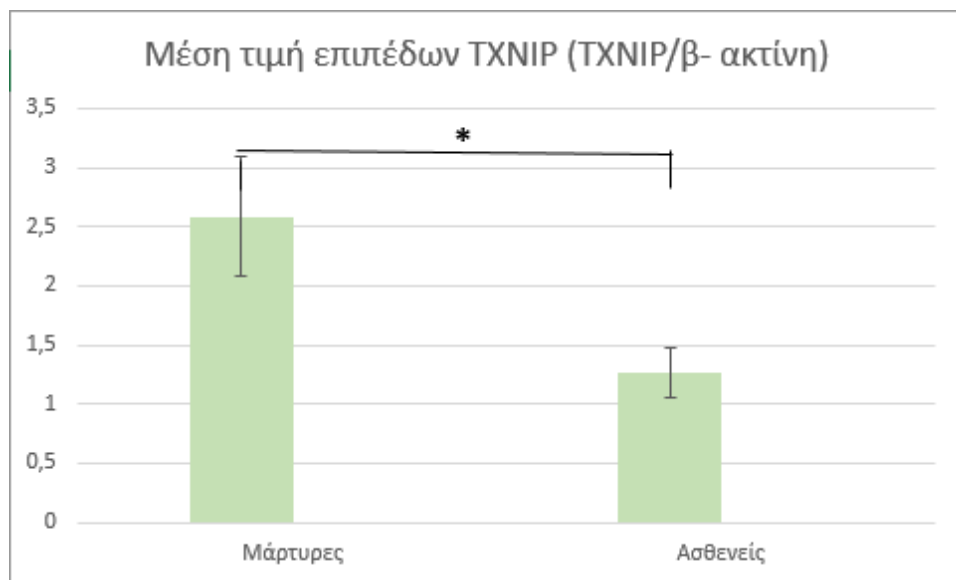
3.1 Σύγκριση των μέσων μεταξύ των ομάδων μαρτύρων και ασθενών

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 11) απεικονίζονται τα μέσα μεγέθη της ποσότητας πρωτεΐνης TXNIP στον πλακούντα, αλλά και των σωματομετρικών παραμέτρων που μετρήθηκαν, για την ομάδα μαρτύρων και την ομάδα ασθενών.

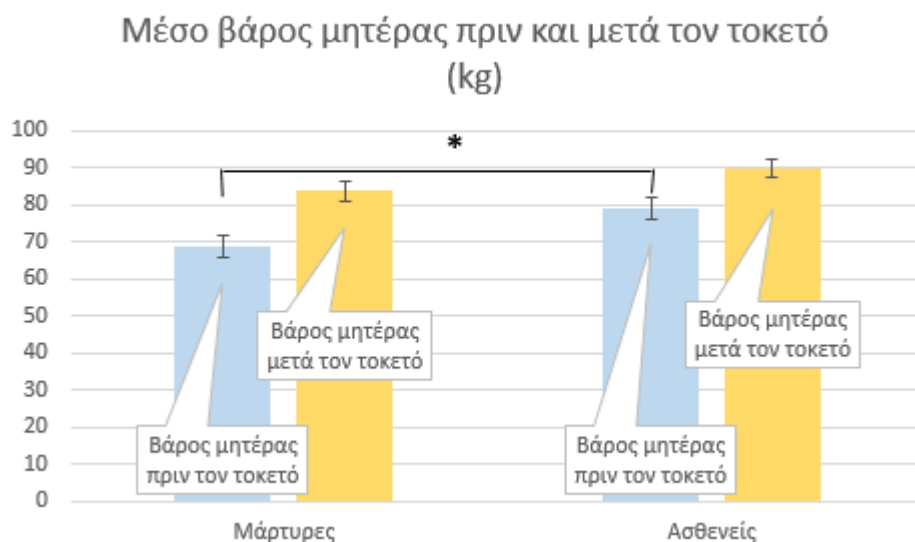
Πίνακας 11: Μέσα μεγέθη παραμέτρων που μετρήθηκαν για τις ομάδες μαρτύρων και ασθενών

	Μονάδα μέτρησης	Μάρτυρες (N=26)	Ασθενείς (N=33)	P
Πρωτεΐνη TXNIP στον πλακούντα				
TXNIP	(TXNIP/β-ακτίνη)	2,59±0,51	1,27±0,21	0,024**
Ηλικία και σωματομετρικά χαρακτηριστικά μητέρας				
Ηλικία μητέρας	έτη	32,4±1,31	34,16±0,85	0,245
Βάρος μητέρας πριν τον τοκετό	kg	68,78±2,85	79,09±2,88	0,017*
Βάρος μητέρας μετά τον τοκετό	kg	83,73±2,73	89,91±2,59	0,115
BMI μητέρας πριν τον τοκετό	kg/m ²	26,3±1,07	29,01±0,85	0,05*
BMI μητέρας μετά τον τοκετό	kg/m ²	31,99±0,98	33,03±0,84	0,427
Συστολική πίεση μητέρας	mm Hg	117,96±2,36	121,16±2,55	0,38
Διαστολική πίεση μητέρας	mm Hg	74±2,33	78,13±1,77	0,157
Βιοχημικές μετρήσεις μητέρας				
Gluc0	mg/L	76,2±2,73	92,97±2,14	0*
Gluc60	mg/L	121,3±26,23	196,87±5,73	0*
Gluc120	mg/L	91,32±5,51	151,03±6,11	0*
Σωματομετρικά χαρακτηριστικά νεογνού				
Βάρος νεογνού	kg	3,16±0,07	3,23±0,08	0,554
BMI νεογνού	kg/m ²	12,18±0,54	12,28±0,21	0,843

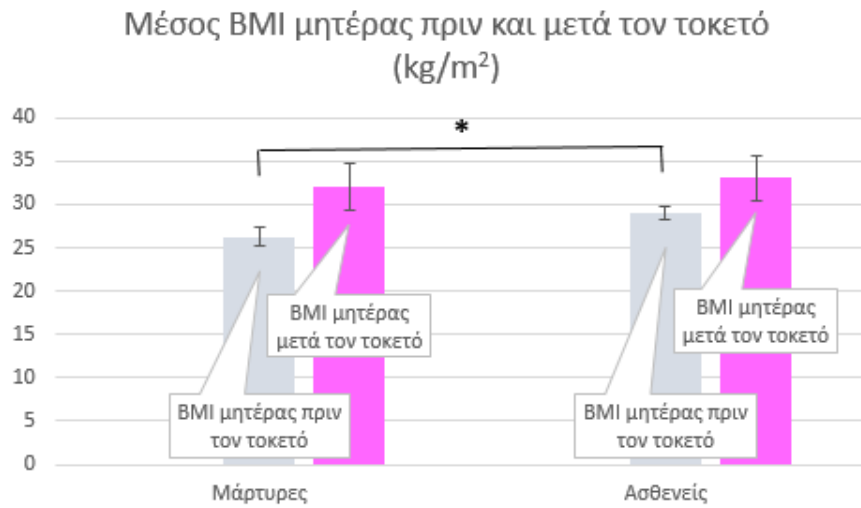
Στα παρακάτω γραφήματα (Σχήμα 2, Σχήμα 3, Σχήμα 4, Σχήμα 5) απεικονίζονται με τη σειρά η σύγκριση των μέσων επιπέδων πρωτεΐνης TXNIP στον πλακούντα μεταξύ της ομάδας μαρτύρων και της ομάδας ασθενών, του μέσου βάρους της μητέρας μεταξύ των δύο ομάδων, του μέσου BMI μεταξύ των δύο ομάδων και των μέσων επιπέδων συστολικής και διαστολικής πίεσης. Επίσης, στο τελευταίο γράφημα (Σχήμα 6) απεικονίζεται η σύγκριση των μέσων επιπέδων γλυκόζης μεταξύ των δύο ομάδων.



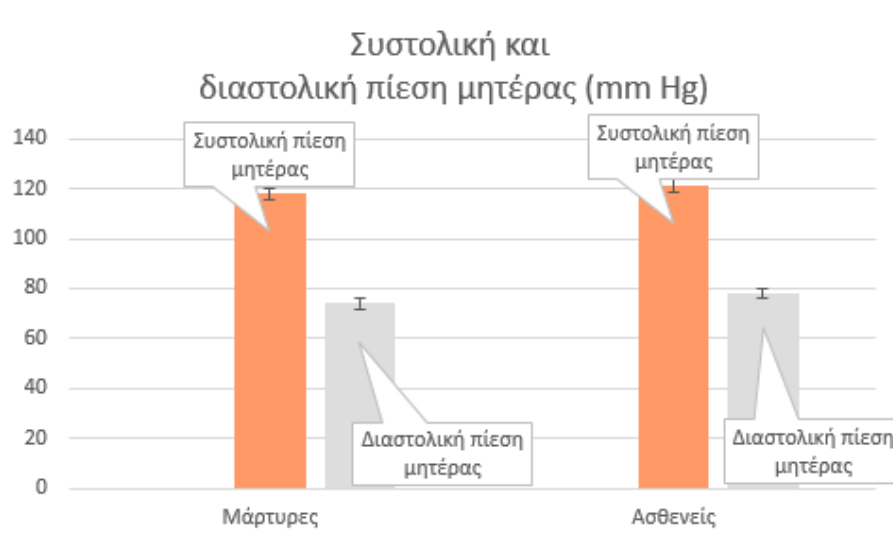
Σχήμα 2: Μέσα επίπεδα TXNIP στον πλακούντα μαρτύρων και ασθενών, * $P < 0,05$



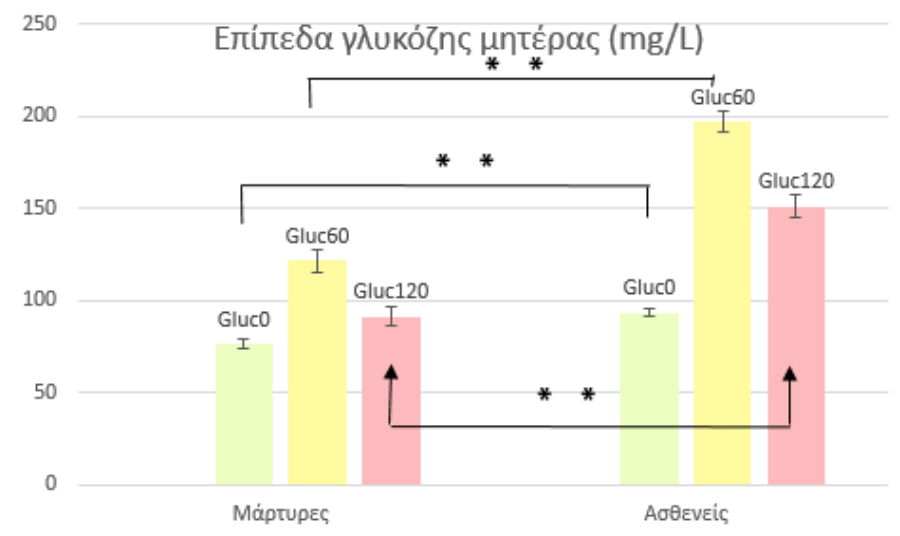
Σχήμα 3: Μέσο βάρος μαρτύρων και ασθενών, $P < 0,05$



Σχήμα 4: Μέσος BMI μαρτύρων και ασθενών πριν και μετά τον τοκετό, *P<0,05



Σχήμα 5: Μέση συστολική και διαστολική πίεση μαρτύρων και ασθενών



Σχήμα 6: Μέσα επίπεδα Gluc0, Gluc60 και Gluc120 μαρτύρων και ασθενών, **P<0,01

3.2 Συσχετίσεις των μέσων εντός του συνόλου των δειγμάτων

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 12) απεικονίζονται οι συσχετίσεις των μέσων για τις διάφορες παραμέτρους που μετρήθηκαν στο σύνολο των δειγμάτων. Στο υπόμνημα (Εικόνα 13) φαίνεται η επεξήγηση των χρωμάτων του πίνακα. Όπου r , ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης του Pearson.

Πίνακας 12: Συσχετίσεις μεταξύ των μέσων των παραμέτρων του συνόλου των δειγμάτων

	TXNIP	Ηλικία μητέρας	Βάρος μητέρας πριν τον τοκετό	Βάρος μητέρας μετά τον τοκετό	BMI μητέρας πριν τον τοκετό	BMI μητέρας μετά τον τοκετό	Συστολική πίεση μητέρας	Διαστολική πίεση μητέρας	Gluc0	Gluc60	Gluc120
TXNIP								αρνητική		αρνητική	αρνητική
Ηλικία μητέρας											
Βάρος μητέρας πριν τον τοκετό				θετική	θετική	θετική	θετική	θετική		θετική	θετική
Βάρος μητέρας μετά τον τοκετό			θετική		θετική	θετική	θετική	θετική			
BMI μητέρας πριν τον τοκετό			θετική	θετική		θετική	θετική	θετική		θετική	θετική
BMI μητέρας μετά τον τοκετό			θετική	θετική	θετική		θετική				
Συστολική πίεση μητέρας			θετική	θετική	θετική	θετική		θετική			
Διαστολική πίεση μητέρας	αρνητική		θετική	θετική	θετική		θετική				
Gluc0										θετική	θετική
Gluc60	αρνητική		θετική		θετική				θετική		θετική
Gluc120	αρνητική		θετική		θετική				θετική	θετική	

$r=1$
$0,01 \leq P \leq 0,05$
$P \leq 0,01$
χωρίς συσχέτιση

Εικόνα 13: Υπόμνημα για επεξήγηση χρωμάτων

3.3 Συσχετίσεις των μέσων εντός των μαρτύρων

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 13) απεικονίζονται οι συσχετίσεις των μέσων για τις διάφορες παραμέτρους που μετρήθηκαν εντός των μαρτύρων. Στο παραπάνω υπόμνημα (Εικόνα 13) φαίνεται η επεξήγηση των χρωμάτων του πίνακα. Όπου r, ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης του Pearson.

Πίνακας 13: Συσχετίσεις μεταξύ των μέσων των παραμέτρων εντός των μαρτύρων

	TXNIP	Ηλικία μητέρας	Βάρος μητέρας πριν τον τοκετό	Βάρος μητέρας μετά τον τοκετό	BMI μητέρας πριν τον τοκετό	BMI μητέρας μετά τον τοκετό	Συστολική πίεση μητέρας	Διαστολική πίεση μητέρας	Gluc0	Gluc60	Gluc120
TXNIP											
Ηλικία μητέρας											
Βάρος μητέρας πριν τον τοκετό				θετική	θετική	θετική					θετική
Βάρος μητέρας μετά τον τοκετό			θετική		θετική	θετική				θετική	θετική
BMI μητέρας πριν τον τοκετό			θετική	θετική		θετική					
BMI μητέρας μετά τον τοκετό			θετική	θετική	θετική						θετική
Συστολική πίεση μητέρας								θετική			
Διαστολική πίεση μητέρας							θετική				
Gluc0											
Gluc60				θετική							θετική
Gluc120			θετική	θετική						θετική	

3.4 Συσχετίσεις των μέσων εντός των ασθενών

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 14) απεικονίζονται οι συσχετίσεις των μέσων για τις διάφορες παραμέτρους που μετρήθηκαν εντός των ασθενών. Στο παραπάνω υπόμνημα (Εικόνα 13) φαίνεται η επεξήγηση των χρωμάτων του πίνακα. Όπου r, ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης του Pearson.

Πίνακας 14: Συσχετίσεις μεταξύ των μέσων των παραμέτρων εντός των ασθενών

	TXNIP	Ηλικία μητέρας	Βάρος μητέρας πριν τον τοκετό	Βάρος μητέρας μετά τον τοκετό	BMI μητέρας πριν τον τοκετό	BMI μητέρας μετά τον τοκετό	Συστολική πίεση μητέρας	Διαστολική πίεση μητέρας	Gluc0	Gluc60	Gluc120
TXNIP											
Ηλικία μητέρας											
Βάρος μητέρας πριν τον τοκετό				θετική	θετική	θετική	θετική	θετική			
Βάρος μητέρας μετά τον τοκετό			θετική		θετική	θετική	θετική	θετική			
BMI μητέρας πριν τον τοκετό			θετική	θετική		θετική	θετική	θετική			
BMI μητέρας μετά τον τοκετό			θετική	θετική	θετική		θετική				
Συστολική πίεση μητέρας			θετική	θετική	θετική	θετική		θετική			
Διαστολική πίεση μητέρας			θετική	θετική	θετική		θετική				
Gluc0											
Gluc60											θετική
Gluc120										θετική	

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν για πρώτη φορά τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης TXNIP σε πλακούντες μητέρων με διαβήτη κύησης σε σύγκριση με τα επίπεδα της ίδιας πρωτεΐνης σε πλακούντες μητέρων χωρίς διαβήτη κύησης. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με Western blot, όπου υπολογίστηκε η έκταση και η ένταση των ζωνών της πρωτεΐνης TXNIP σε δείγματα πλακούντα από τις αντίστοιχες ομάδες μελέτης. Τα αποτελέσματα συσχετίστηκαν με βιοχημικούς δείκτες και σωματομετρικά χαρακτηριστικά των μητέρων και των νεογνών τους.

Από τη σύγκριση των μέσων μεταξύ των ομάδων μελέτης, τα επίπεδα της πρωτεΐνης TXNIP στα δείγματα πλακούντων από μητέρες χωρίς διαβήτη κύησης βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα σε σχέση με αντίστοιχα δείγματα ασθενών.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η έκφραση της TXNIP επάγεται ισχυρά από τη γλυκόζη σε κυτταρικές σειρές β-παγκρεατικών κυττάρων και σε ανθρώπινα νησίδια του Langerhans [126]. Επιπλέον, σε ασθενείς με διαβήτη και προ-διαβήτη βρέθηκε αυξημένη έκφραση της TXNIP σε δείγματα σκελετικού μυός [101]. Έχει προταθεί ότι η αυξημένη έκφραση της TXNIP παρεμποδίζει την ινσουλινοεξαρτώμενη πρόσληψη γλυκόζης στο σκελετικό μυ και τα λιποκύτταρα. Αντίθετα, η αποσιώπηση του TXNIP αυξάνει την πρόσληψη γλυκόζης [127]. Δεν υπάρχουν στοιχεία για το αν ισχύει το ίδιο και για τον πλακουντιακό ιστό.

Στη μελέτη των Guzmán *et al.* παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικά αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στους ασθενείς [128], κάτι που βρέθηκε και στην παρούσα μελέτη. Η TXNIP σχετίζεται άμεσα με τη γλυκόζη, αφού αφενός η έκφρασή της επάγεται από τη γλυκόζη και αφετέρου η ίδια η TXNIP μειώνει την πρόσληψη γλυκόζης από τα κύτταρα του σκελετικού μυός [129]. Συγκεκριμένα, η TXNIP ρυθμίζει την πρόσληψη γλυκόζης από τα κύτταρα δεσμευόμενη στον μεταφορέα γλυκόζης GLUT1 και επάγοντας την ενδοκυττάρωσή του [129]. Ομοίως δρα η TXNIP και για τον μεταφορέα γλυκόζης GLUT4, που αποτελεί τον κύριο μεταφορέα γλυκόζης στον μυϊκό και τον λιπώδη ιστό [130].

Σε συνθήκες στρες η AMPK (5' AMP-activated protein kinase) φωσφορυλιώνει την TXNIP στη θέση S308. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η TXNIP να αποδεσμεύεται από τον μεταφορέα γλυκόζης (GLUT1/ GLUT4) και να αποδομείται. Ο μεταφορέας δεν θα υποστεί ενδοκυττάρωση κι έτσι αυξάνεται η εισροή γλυκόζης στο κύτταρο [129]. Με αυτόν τον τρόπο επιτρέπεται στα κύτταρα να χρησιμοποιήσουν σαν καύσιμο τη γλυκόζη για να επανέλθει η ομοιόσταση της ενέργειας. Υπερέκφραση της TXNIP οδηγεί σε καταστολή της κυτταρικής πρόσληψης γλυκόζης, ενώ η αποσιώπηση του γονιδίου TXNIP αυξάνει την πρόσληψη γλυκόζης στους περιφερικούς ιστούς [130].

Η TXNIP είναι αντιστρόφως ανάλογη της ολικής απορρόφησης γλυκόζης από τα κύτταρα, η οποία διεγείρεται από την ινσουλίνη [131]. Όπως αναφέρθηκε [1.1 Διαβήτης κύησης (Gestational Diabetes Mellitus), Εικόνα 1] για να αυξησει η ινσουλίνη την πρόσληψη γλυκόζης από έναν ιστό στόχο προσδένεται σε έναν υποδοχέα. Μετά από αυτή τη σύνδεση ο υποδοχέας φωσφορυλιώνει άλλες ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες, όπως τις IRS, που με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν τελικά την PI3K. Το TXNIP ωστόσο ενεργοποιεί την PTEN, που παρεμποδίζει τη σύνδεση του συμπλόκου IRS/PI3 με αποτέλεσμα να ρυθμίζει αρνητικά την πρόσληψη γλυκόζης [131].

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικά υψηλά επίπεδα γλυκόζης στην ομάδα των ασθενών, καθώς και αρνητική συσχέτιση μεταξύ TXNIP και Gluc60 και Gluc120. Αυτό πιθανόν να δείχνει πως η πρόσληψη γλυκόζης είναι αυξημένη στους περιφερικούς ιστούς των ασθενών, οι οποίοι παρουσιάζουν μειωμένο TXNIP.

Από μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε νεογνά που είχαν εκτεθεί σε μητρικό διαβήτη κύησης φάνηκε αυξημένη μεθυλίωση και μειωμένη έκφραση του γονιδίου *TXNIP* στον υποδόριο λιπώδη ιστό, ενώ δεν παρατηρήθηκε κάτι τέτοιο σε ιστούς σχετιζόμενους με τον μεταβολισμό [127]. Αντίστοιχη έρευνα θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί σχετικά με τη μεθυλίωση και έκφραση του γονιδίου στον πλακούντα μητέρων με διαβήτη κύησης.

Η *TXNIP* είναι μόριο κριτικής σημασίας για τη διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης στο έμβρυο. Έχει βρεθεί πως υπό συνθήκες μητρικής νηστείας η εμβρυϊκή *TXNIP* καταστέλλει την υπερβολική έκκριση ινσουλίνης, ώστε η γλυκόζη του εμβρύου να διατηρηθεί σε φυσιολογικά επίπεδα [132]. Συνεπώς, θα είχε ενδιαφέρον να μελετηθούν τα επίπεδα *TXNIP* σε νεογνά που εκτέθηκαν σε μητρικό διαβήτη κύησης.

Σε άτομα με ΣΔτ2 παρατηρείται ταυτόχρονη αύξηση των δεικτών για το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (ER stress), δεικτών φλεγμονής, συμπεριλαμβανομένου του NLRP3 φλεγμονοσώματος και της *TXNIP* σε ανοσοκύτταρα [133]. Κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται στον ΣΔτ1. Θα ήταν ενδιαφέρον να ερευνηθεί τι συμβαίνει με αυτούς τους δείκτες στον Διαβήτη Κύησης.

Το ότι η γλυκόζη επάγει την έκφραση της *TXNIP* ενώ η ινσουλίνη καταστέλλει την έκφρασή της [110] φυσιολογικά πιθανόν να λειτουργεί ως ένας αντισταθμιστικός μηχανισμός που προστατεύει τα β- κύτταρα από την οξειδωτική βλάβη και την απόπτωση [134]. Εκτός από την ινσουλίνη φαίνεται πως και η μετφορμίνη ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση της *TXNIP* και ίσως αυτό να συνεισφέρει στην αποτελεσματικότητά της ως θεραπεία για τον διαβήτη [131].

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι μητέρες με διαβήτη κύησης λάμβαναν ινσουλίνη ή ήταν σε ειδική διαίτα προκειμένου να ρυθμιστεί ο διαβήτης. Πρόκειται λοιπόν για ελεγχόμενο διαβήτη κύησης. Αυτά τα ευρήματα πιθανόν να εξηγούν το ότι η *TXNIP* εμφανίζεται μειωμένη στην ομάδα ασθενών της παρούσας έρευνας. Άτομα της ομάδας ασθενών έχουν λάβει ινσουλίνη ή μετφορμίνη για τη διαχείριση του διαβήτη. Σε στατιστική ανάλυση της ποσότητας *TXNIP* εντός των ασθενών, μεταξύ όσων έλαβαν ινσουλίνη ή μετφορμίνη και όσων δεν έλαβαν, βρέθηκε πράγματι μικρότερη μέση ποσότητα πρωτεΐνης *TXNIP* στους ασθενείς που έλαβαν ινσουλίνη ή μετφορμίνη (τα αποτελέσματα αυτά δεν παρουσιάζονται). Ωστόσο, η διαφορά αυτή δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική.

Όπως αναφέρθηκε [8] η εγκυμοσύνη είναι μια διαβητογόνος κατάσταση και κάθε κύηση χαρακτηρίζεται από κάποιο βαθμό ινσουλινοαντίστασης. Αυτό ίσως να εξηγεί και τα αυξημένα επίπεδα *TXNIP* στους μάρτυρες.

Σε μελέτη των Guzmán et al., που πραγματοποιήθηκε για να διερευνηθεί η συσχέτιση μεταξύ του οξειδωτικού στρες, βιοχημικών δεικτών και έκφρασης γονιδίων προέκυψε συσχέτιση μεταξύ της *TXNIP* και του βάρους [128]. Συγκεκριμένα, στη μελέτη αυτή εξετάστηκε η έκφραση γονιδίων, μεταξύ των οποίων και του *TXNIP* σε περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα ασθενών με ΣΔτ2. Συμπεριλήφθηκαν άνδρες σε τρεις ομάδες, μάρτυρες, ασθενείς διαβήτη με φυσιολογικό βάρος και υπέρβαροι ασθενείς διαβήτη. Βρέθηκε αυξημένη έκφραση του *TXNIP* στους ασθενείς συγκριτικά με τους μάρτυρες, ωστόσο αξίζει να σημειωθεί πως τα άτομα αυτά δεν βρίσκονταν σε θεραπεία με ινσουλίνη. Η συσχέτιση μεταξύ του BMI και της *TXNIP* βρέθηκε αρνητική στους υπέρβαρους χωρίς να είναι στατιστικά σημαντική. Στην παρούσα εργασία βρέθηκε επίσης αρνητική, μη στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της *TXNIP* και του BMI των γυναικών τόσο στο σύνολο των δειγμάτων (Πίνακας 12) όσο και εντός των ασθενών (Πίνακας 14) και των μαρτύρων (Πίνακας 13), (δεν αναγράφονται οι μη στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις). Στη δική μας μελέτη, το BMI της μητέρας πριν τον τοκετό είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς, Αξίζει να σημειωθεί η παρατήρηση πως οι τιμές των μέσων του BMI και για τις δύο ομάδες είναι μεταξύ 25- 30 kg/m², επομένως

βρίσκονται στα επίπεδα τιμών που θεωρούνται αυξημένου βάρους. Αυτή η διαφορά δεν ισχύει ωστόσο στο τέλος της κύησης (τα επίπεδα του TXNIP τα μελετάμε σε τελειόμηνο πλακούντα).

Οι Guzmán et al. παρατήρησαν επίσης αυξημένη διαστολική και συστολική πίεση στους ασθενείς υψηλού βάρους σε σχέση με τους μάρτυρες, χωρίς ωστόσο η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική [128]. Όμοια αποτελέσματα παρουσιάζονται και στην παρούσα μελέτη (Πίνακας 11). Επιπλέον, προκύπτει στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ της TXNIP και της διαστολικής πίεσης εντός του συνόλου των δειγμάτων (Πίνακας 12) καθώς και εντός των ασθενών (Πίνακας 14). Γενικά, έχει βρεθεί πως κάποια αντιυπερτασικά φάρμακα δρουν ως παρεμποδιστές της έκφρασης της TXNIP [131]. Ο παράγοντας αυτός δεν έχει ληφθεί υπόψιν στην παρούσα έρευνα, αφού δεν καταγράφηκε η λήψη αντιυπερτασικών φαρμάκων από τα άτομα της ομάδας των ασθενών. Μια τέτοια πιθανότητα μπορεί να επηρεάζει τα επίπεδα της TXNIP και συνεπώς να μειώνει τη μέση έκφρασή της στην ομάδα των ασθενών.

Δεν είναι ξεκάθαρο αν η αυξημένη έκφραση του *TXNIP* είναι επακόλουθο του διαβήτη η παράγοντας που τον προκαλεί. Ωστόσο, διάφοροι παρεμποδιστές της TXNIP μπορεί να συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο υπογλυκαιμικών επεισοδίων αλλά και αυξημένο κίνδυνο καρκινογένεσης, αφού έχει βρεθεί μειωμένη έκφραση της TXNIP σε καρκινικά κύτταρα [131]. Απαιτείται επομένως περαιτέρω έρευνα σχετικά με την πιθανότητα η TXNIP να λειτουργήσει ως θεραπευτικός στόχος για τον διαβήτη ή την καρκινογένεση.

Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της πρωτεΐνης TXNIP σε πλακούντες μητέρων με διαβήτη κύησης και μαρτύρων, καθώς και πιθανές συσχετίσεις των επιπέδων αυτών με άλλους σωματομετρικούς και βιοχημικούς δείκτες. Μελλοντική έρευνα θα μπορούσε να συμπεριλάβει μεγαλύτερη ομάδα δειγμάτων ώστε να γίνουν εμφανείς επιπλέον στατιστικά σημαντικές διαφορές και συσχετίσεις. Επίσης, παράγοντες όπως η παχυσαρκία και η λήψη άλλης φαρμακευτικής αγωγής δεν έχει ληφθεί υπόψιν. Τέλος, είναι πολύ σημαντικός παράγοντας η λήψη ινσουλίνης ή μετφορμίνης, αφού επηρεάζουν την έκφραση της TXNIP. Μελλοντική μελέτη θα ήταν χρήσιμο να συμπεριλάβει τον παράγοντα αυτόν στη δημιουργία των πειραματικών ομάδων.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός όρος
3'- UTR, 3' Untranslated Region	3' αμετάφραστη περιοχή
ASK1- Apoptosis Signal regulating Kinase 1	Κινάση απόπτωσης
BCA assay, Bicichoninic acid assay	Μέθοδος δικινσονικού οξέος
Bis- acrylamide	Δις- ακρυλαμίδιο
Caspase- 3	Κασπάση 3
Cys	Κυστεΐνη
Cyt c, Cytochrome c	Κυτόχρωμα c
ER stress, Endoplasmic reticulum stress	Στρες ενδοπλασματικού δικτύου
Feed forward loop	Ανατροφοδοτικός βρόγχος
FFAs- Free Fatty Acids	Ελεύθερα λιπαρά οξέα
FPG- Fasting Plasma Glucose	Γλυκόζη νηστείας
Gestational Diabetes Mellitus	Διαβήτης κύησης
Glyburide	Γλυβουρίδη
GLUT1, GLUT4	Μεταφορείς γλυκόζης
GWAS- Genome Wide Association Study	Μελέτη συσχέτισμού ολόκληρου του γονιδιώματος
HbA1	A1 υπομονάδα αιμοσφαιρίνης
HbA1c	Γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη
Housekeeping protein	Ενδογενής πρωτεΐνη αναφοράς
HRP- horseradish peroxidase	Υπεροξειδάση του χρένου
IFN- γ	Ιντερφερόνη γ
IL- 18	Ιντερλευκίνη 18
IL- 1 β	Ιντερλευκίνη 1 β
IL- 6	Ιντερλευκίνη 6
IRS- Insulin Receptor Substrate	Υπόστρωμα υποδοχέα ινσουλίνης

Maturity Onset Diabetes of the Young	Μονογονιδιακός Διαβήτης
Nitrocellulose membrane	Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης
NLRP3- inflammasome	NLRP3 φλεγμονόσωμα
NO	Οξειδία αζώτου
OGTT- Oral Glucose Tolerance Test	Δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη- Καμπύλη σακχάρου
PI3K- Phosphoinositide 3- kinase	Φωσφοϊνοσιτίδη 3- κινάση
PTEN- Phosphatase and Tensine homolog	Ομόλογη της τενσίνης φωσφατάση
RNS- Reactive Nitrogen Species	Ενεργές μορφές αζώτου
ROS- Reactive Oxygen Species	Ενεργές μορφές οξυγόνου
Running buffer	Διάλυμα ηλεκτροφόρησης
Separating gel	Πήκτωμα διαχωρισμού
Stacking gel	Πήκτωμα συσσώρευσης
TBP2, Thioredoxin Binding Protein	Πρωτεΐνη δέσμευσης θειορεδοξίνης
TNF- α , Tumor Necrosis Factor 1	Παράγοντας νέκρωσης όγκων
Transfer buffer	Διάλυμα μεταφοράς
TRX	Θειορεδοξίνη
TrxR	Αναγωγάση της θειορεδοξίνης
TXNIP	Πρωτεΐνη δεσμευτική της θειορεδοξίνης
Type 1 Diabetes Mellitus	Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1
Type 2 Diabetes Mellitus	Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2
VDUP-1, Vitamin D Upregulated Protein	Πρωτεΐνη αυξανόμενη από τη βιταμίνη D
α - arrestin	α - αρρεστίνες
Metformin	Μετφορμίνη

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ- ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ- ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

3'- UTR	3' Untranslated Region
AMPK	5' AMP-activated protein kinase
APS	Ammonium persulfate
ASK1	Apoptosis Signal-regulating Kinase 1
BCA- assay	Bicinchoninic Acid assay
Cyt c	Cytochrome c
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ER stress	Endoplasmic Reticulum stress
FFAs	Free Fatty Acids
FPG	Fasting Plasma Glucose
GDM	Gestational Diabetes Mellitus
GWAS	Genome- Wide Association Study
HRP	Horseradish Peroxidase
IFN- γ	Interferon- γ
IL- 1 β	Interleucine- 1 β
IL- 6	Interleucine- 6
IL-18	Interleucine- 18
IRS	Insulin Receptor Substrate
MafA	MAF transcription factor A
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
OGTT	Oral Glucose Tolerance Test
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBST	Phosphate Buffered Saline with Tween 20
PI3K	Phosphoinositide 3- kinase

PPRAa	Proliferator- Activated Receptor alpha
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
T1DM	Type 1 Diabetes Mellitus
T2DM	Type 2 Diabetes Mellitus
TBP2	Thioredoxin Binding Protein
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TNF-α	Tumor Necrosis Factor a
VDUP-1	Vitamin D Upregulated Protein
ΣΔτ1	Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 1
ΣΔτ2	Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2
Gluc60	Επίπεδα γλυκόζης μία ώρα μετά τη λήψη σκευάσματος γλυκόζης
Gluc120	Επίπεδα γλυκόζης δύο ώρες μετά τη λήψη σκευάσματος γλυκόζης
Gluc180	Επίπεδα γλυκόζης δύο ώρες μετά τη λήψη σκευάσματος γλυκόζης
IADPSG	International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups
WHO	World Health Organization
NIH	National Institutes of Health

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Υλικά και Μέθοδοι

- PBS: διατήρηση ωσμωτικής κατάστασης κυττάρων, περιέχει ιόντα αλάτων που εξισορροπούν την ποσότητα των ιόντων αλάτων στο εσωτερικό των κυττάρων, είναι διάλυμα ισότονο με το εσωτερικό των κυττάρων, διατηρεί το pH των πρωτεϊνών

Συστατικά για PBS 10x (pH 6,8)	Ποσότητα
NaCl	40 g
KCl	1g
Na ₂ HPO ₄ -2H ₂ O	7,2 g
KH ₂ PO ₄	1,2 g
H ₂ O	Up to 500 mL

- Tris- HCl 0,5 M pH 6,8

Συστατικά για το Tris- HCl 0,5 M (pH 6,8)	Ποσότητα
Tris-Base	12,114 g
HCl	Until pH 6,8
H ₂ O	Up to 200 mL

- Tris- HCl 1,5 M pH 8,8

Συστατικά για το Tris- HCl 1,5 M (pH 8,8)	Ποσότητα
Tris-Base	36,342 g
HCl	Until pH 8,8
H ₂ O	Up to 200 mL

- 10x Tris- Glycine

Συστατικά για το 10x Tris- Glycine	Ποσότητα
Tris-Base	30,3 g
Glycine	144 g
H ₂ O	Up to 1000 mL

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- [1] A. A. Siddiqui, S. A. Siddiqui, S. Ahmad, S. Siddiqui, I. Ahsan, and K. Sahu, "Diabetes: Mechanism, Pathophysiology and Management-A Review," *Int. J. Drug Dev. Res.*, vol. 5, no. 2, pp. 1–23, 2013.
- [2] American Diabetes Association, "Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus," *Diabetes Care*, vol. 33, no. 1, pp. 62–69, 2010.
- [3] F. Galtier, "Definition , epidemiology , risk factors," *Diabetes Metab.*, vol. 36, pp. 628–651, 2010.
- [4] International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel *et al.*, "International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Recommendations on the Diagnosis and Classification of Hyperglycemia in Pregnancy," *Diabetes Care*, vol. 33, no. 3, pp. 676–682, Mar. 2010.
- [5] "Diagnostic criteria and classification of hyperglycaemia first detected in pregnancy: a World Health Organization Guideline.," *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 103, no. 3, pp. 341–63, Mar. 2014.
- [6] A. Kharroubi and H. Darwish, "Diabetes mellitus: The epidemic of the century," *World J Diabetes*, vol. 6, no. 6, pp. 850–867, 2015.
- [7] J. P. Vandorsten *et al.*, "NIH consensus development conference: diagnosing gestational diabetes mellitus.," *NIH Consens. State. Sci. Statements*, vol. 29, no. 1, pp. 1–31, Mar. 2013.
- [8] L. A. Barbour, "New concepts in insulin resistance of pregnancy and gestational diabetes: Long-term implications for mother and offspring," *J. Obstet. Gynaecol. (Lahore)*, vol. 23, no. 5, pp. 545–549, 2003.
- [9] Ζ. Αιμιλία, *Σημειώσεις μαθήματος "Κυτταρικός κύκλος- ρύθμιση, μονοπάτια μεταγωγής σήματος."* Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- [10] A. S. Kaplan, "The insulin receptor," *J. Pediatr.*, vol. 104, no. 3, pp. 327–336, 1984.
- [11] G. Di Cianni, R. Miccoli, L. Volpe, C. Lencioni, and S. Del Prato, "Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes," *Diabetes. Metab. Res. Rev.*, vol. 19, no. 4, pp. 259–270, Jul. 2003.
- [12] P. M. Catalano, E. D. Tyzbir, N. M. Roman, S. B. Amini, and E. A. H. Sims, "Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 165, no. 6, pp. 1667–1672, Dec. 1991.
- [13] R. L. Phelps, B. E. Metzger, and N. Freinkel, "Carbohydrate metabolism in pregnancy," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 140, no. 7, pp. 730–736, Aug. 1981.
- [14] J. A. Parsons, T. C. Brelje, and R. L. Sorenson, "Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion.," *Endocrinology*, vol. 130, no. 3, pp. 1459–1466, Mar. 1992.
- [15] L. Nonn, R. R. Williams, R. P. Erickson, and G. Powis, "The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 23, no. 3, pp. 916–22, Feb. 2003.
- [16] J. Plows, J. Stanley, P. Baker, C. Reynolds, and M. Vickers, "The

- Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 11, p. 3342, Oct. 2018.
- [17] T. A. Buchanan and A. H. Xiang, “Gestational diabetes mellitus,” *J. Clin. Invest.*, vol. 115, no. 3, pp. 485–491, Mar. 2005.
- [18] F. M. Ashcroft, M. Rohm, A. Clark, and M. F. Brereton, “Is Type 2 Diabetes a Glycogen Storage Disease of Pancreatic β Cells?,” *Cell Metab.*, vol. 26, no. 1, pp. 17–23, Jul. 2017.
- [19] M. A. Williams, C. Qiu, M. Muiy-Rivera, S. Vadachkoria, T. Song, and D. A. Luthy, “Plasma Adiponectin Concentrations in Early Pregnancy and Subsequent Risk of Gestational Diabetes Mellitus,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 89, no. 5, pp. 2306–2311, May 2004.
- [20] T. Yamauchi *et al.*, “Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase,” *Nat. Med.*, vol. 8, no. 11, pp. 1288–1295, Nov. 2002.
- [21] J. Chen *et al.*, “Secretion of adiponectin by human placenta: differential modulation of adiponectin and its receptors by cytokines,” *Diabetologia*, vol. 49, no. 6, pp. 1292–1302, Jun. 2006.
- [22] L. Bouchard, M.-F. Hivert, S.-P. Guay, J. St-Pierre, P. Perron, and D. Brisson, “Placental Adiponectin Gene DNA Methylation Levels Are Associated With Mothers’ Blood Glucose Concentration,” *Diabetes*, vol. 61, no. 5, pp. 1272–1280, May 2012.
- [23] A. Kautzky-Willer *et al.*, “Increased Intramyocellular Lipid Concentration Identifies Impaired Glucose Metabolism in Women With Previous Gestational Diabetes,” *Diabetes*, vol. 52, no. 2, pp. 244–251, Feb. 2003.
- [24] S. Forbes, S. D. Taylor-Robinson, N. Patel, P. Allan, B. R. Walker, and D. G. Johnston, “Increased prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in European women with a history of gestational diabetes,” *Diabetologia*, vol. 54, no. 3, pp. 641–647, Mar. 2011.
- [25] M. Fasshauer, M. Blüher, and M. Stumvoll, “Adipokines in gestational diabetes,” *lancet. Diabetes Endocrinol.*, vol. 2, no. 6, pp. 488–99, Jun. 2014.
- [26] J.-M. Atègbo *et al.*, “Modulation of Adipokines and Cytokines in Gestational Diabetes and Macrosomia,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 91, no. 10, pp. 4137–4143, Oct. 2006.
- [27] J. P. Kirwan *et al.*, “TNF- Is a Predictor of Insulin Resistance in Human Pregnancy,” *Diabetes*, vol. 51, no. 7, pp. 2207–2213, Jul. 2002.
- [28] S. Handwerger and M. Freemark, “The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development,” *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, vol. 13, no. 4, pp. 343–56, Apr. 2000.
- [29] K. Κριμπάς, *Κοινωνιοβιολογία*. 2007.
- [30] H. Schneider, J. Shaw, and P. Zimmet, “Guidelines for the Detection of Diabetes Mellitus - Diagnostic Criteria and Rationale for Screening,” *Clin Biochem Rev.*, vol. 24, pp. 77–80, 2003.
- [31] B. M. Sibai and M. G. Ross, “Hypertension in gestational diabetes mellitus: Pathophysiology and long-term consequences,” *J. Matern. Neonatal Med.*, vol. 23, no. 3, pp. 229–233, 2010.

- [32] A. Bhatnagar, A. Ghauri, M. Hope- Ross, and P. Lip, “Diabetic retinopathy in pregnancy,” *Curr. Diabetes Rev.*, vol. 5, pp. 151–156, 2009.
- [33] S. Veeraswamy, B. Vijayam, V. K. Gupta, and A. Kapur, “Gestational diabetes: The public health relevance and approach,” *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 97, no. 3, pp. 350–358, 2012.
- [34] E. P. Gunderson *et al.*, “Duration of Lactation and Incidence of the Metabolic Syndrome in Women of Reproductive Age According to Gestational Diabetes Mellitus Status: A 20-Year Prospective Study in CARDIA (Coronary Artery Risk Development in Young Adults),” *Diabetes*, vol. 59, pp. 495–504, 2010.
- [35] D. Feig, B. Zinman, X. Wang, and J. Hux, “Risk of development of diabetes mellitus after diagnosis of gestational diabetes,” *CMAJ*, vol. 179, no. 3, pp. 229–234, 2008.
- [36] W. H. Tam *et al.*, “Glucose Intolerance and Cardiometabolic Risk in Children Exposed to Maternal Gestational Diabetes Mellitus in Utero,” *Pediatrics*, vol. 122, no. 6, pp. 1229–1234, 2008.
- [37] M. Doblado and K. H. Moley, “Glucose metabolism in pregnancy and embryogenesis,” *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.*, vol. 14, no. 6, pp. 488–493, 2007.
- [38] K. Pippitt, M. Li, and H. Gurgle, “Diabetes Mellitus: Screening and Diagnosis,” *Am. Fam. Physician*, vol. 93, no. 2, pp. 103–109, 2016.
- [39] E. Taricco *et al.*, “Effects of gestational diabetes on fetal oxygen and glucose levels in vivo,” *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.*, vol. 116, no. 13, pp. 1729–1735, Dec. 2009.
- [40] G. Desoye and S. H. Mouzon, “The Human Placenta in Gestational Diabetes Mellitus,” *Diabetes Care*, vol. 30, no. Supplement 2, pp. S120–S126, Jul. 2007.
- [41] A. Vambergue and I. Fajardy, “Consequences of gestational and pregestational diabetes on placental function and birth weight,” *World J. Diabetes*, vol. 2, no. 11, pp. 196–203, 2011.
- [42] “10.2 Development of the placental villi,” 1999. [Online]. Available: <http://www.embryology.ch/anglais/fplacenta/villosite01.html>. [Accessed: 18-Nov-2018].
- [43] Σωτηρίου Χ. Σωτήριος, “Συγκριτική ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών 70 και 90 του θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins P70&P90) στις χοριακές λάχνες του πλακούντα, στις παλίνδρομες και στις φυσιολογικές τελειόμηνες κυήσεις.” Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2005.
- [44] G. J. Burton and A. L. Fowden, “The placenta: a multifaceted, transient organ.,” *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 370, no. 1663, p. 20140066, Mar. 2015.
- [45] G. J. Burton and E. Jauniaux, “What is the placenta?,” *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 213, no. 4, p. S6.e1-S6.e4, Oct. 2015.
- [46] N. M. Gude, C. T. Roberts, B. Kalionis, and R. G. King, “Growth and function of the normal human placenta,” *Thromb. Res.*, vol. 114, no. 5–6, pp. 397–407, Jan. 2004.
- [47] J. Lu and A. Holmgren, “The thioredoxin antioxidant system,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 66, pp. 75–87, 2014.

- [48] D. F. D. Mahmood, A. Abderrazak, K. El Hadri, T. Simmet, and M. Rouis, "The Thioredoxin System as a Therapeutic Target in Human Health and Disease," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 19, no. 11, pp. 1266–1303, 2013.
- [49] H.-C. Lee and Y.-H. Wei, "Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging.," *Exp. Biol. Med.*, vol. 232, no. 5, pp. 592–606, May 2007.
- [50] R. B. Mikkelsen and P. Wardman, "Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms," *Oncogene*, vol. 22, no. 37, pp. 5734–5754, Sep. 2003.
- [51] J. L. Martindale and N. J. Holbrook, "Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival," *J. Cell. Physiol.*, vol. 192, no. 1, pp. 1–15, Jul. 2002.
- [52] S. V. Avery, "Molecular targets of oxidative stress," *Biochem. J.*, vol. 434, no. 2, pp. 201–210, Mar. 2011.
- [53] O. N. Spindel, C. World, and B. C. Berk, "Thioredoxin Interacting Protein: Redox Dependent and Independent Regulatory Mechanisms," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 16, no. 6, pp. 587–596, 2012.
- [54] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, and J. Telser, "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 39, no. 1, pp. 44–84, Jan. 2007.
- [55] E. S. Arnér and A. Holmgren, "Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase.," *Eur. J. Biochem.*, vol. 267, no. 20, pp. 6102–9, Oct. 2000.
- [56] J. Nordberg and E. S. Arnér, "Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system.," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 31, no. 11, pp. 1287–312, Dec. 2001.
- [57] S. Gromer, S. Urig, and K. Becker, "The thioredoxin system-From science to clinic," *Med. Res. Rev.*, vol. 24, no. 1, pp. 40–89, Jan. 2004.
- [58] G. Spyrou, E. Enmark, A. Miranda-Vizuete, and J. Gustafsson, "Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin.," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 5, pp. 2936–41, Jan. 1997.
- [59] R. J. Arai *et al.*, "Nitric oxide induces thioredoxin-1 nuclear translocation: possible association with the p21Ras survival pathway.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 348, no. 4, pp. 1254–60, Oct. 2006.
- [60] Y.-M. Go, P. J. Halvey, J. M. Hansen, M. Reed, J. Pohl, and D. P. Jones, "Reactive aldehyde modification of thioredoxin-1 activates early steps of inflammation and cell adhesion.," *Am. J. Pathol.*, vol. 171, no. 5, pp. 1670–81, Nov. 2007.
- [61] K. Hirota *et al.*, "Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB.," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 39, pp. 27891–7, Sep. 1999.
- [62] H. Schenk, M. Klein, W. Erdbrügger, W. Dröge, and K. Schulze-Osthoff, "Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, no. 5, pp. 1672–6, Mar. 1994.
- [63] Y. Chen, J. Cai, T. J. Murphy, and D. P. Jones, "Overexpressed Human Mitochondrial Thioredoxin Confers Resistance to Oxidant-induced Apoptosis in Human Osteosarcoma Cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 36, pp. 33242–33248,

Aug. 2002.

- [64] R. Zhang *et al.*, “Thioredoxin-2 Inhibits Mitochondria-Located ASK1-Mediated Apoptosis in a JNK-Independent Manner,” *Circ. Res.*, vol. 94, no. 11, pp. 1483–1491, Jun. 2004.
- [65] H. Zhang *et al.*, “Endothelial-Specific Expression of Mitochondrial Thioredoxin Improves Endothelial Cell Function and Reduces Atherosclerotic Lesions,” *Am. J. Pathol.*, vol. 170, no. 3, pp. 1108–1120, Mar. 2007.
- [66] J. E. Oblong, P. Y. Gasdaska, K. Sherrill, and G. Powis, “Purification of human thioredoxin reductase: properties and characterization by absorption and circular dichroism spectroscopy,” *Biochemistry*, vol. 32, no. 28, pp. 7271–7, Jul. 1993.
- [67] E. S. J. Arnér, “Focus on mammalian thioredoxin reductases — Important selenoproteins with versatile functions,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1790, no. 6, pp. 495–526, Jun. 2009.
- [68] Q. A. Sun *et al.*, “Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases,” *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 35, pp. 24522–30, Aug. 1999.
- [69] A. A. Turanov *et al.*, “Mammalian thioredoxin reductase 1: roles in redox homeostasis and characterization of cellular targets,” *Biochem. J.*, vol. 430, no. 2, pp. 285–293, Sep. 2010.
- [70] K. S. Chen and H. F. DeLuca, “Cloning of the human 1 α ,25-dihydroxyvitamin D-3 24-hydroxylase gene promoter and identification of two vitamin D-responsive elements,” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1263, no. 1, pp. 1–9, 1995.
- [71] A. Nishiyama *et al.*, “Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3) up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression,” *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 31, pp. 21645–50, Jul. 1999.
- [72] G. Saxena, J. Chen, and A. Shalev, “Intracellular shuttling and mitochondrial function of thioredoxin-interacting protein,” *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 6, pp. 3997–4005, 2010.
- [73] P. Patwari, L. J. Higgins, W. A. Chutkow, J. Yoshioka, and R. T. Lee, “The Interaction of Thioredoxin with Txnip,” *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 31, pp. 21884–21891, Aug. 2006.
- [74] “TXNIP thioredoxin interacting protein [Homo sapiens (human)].” [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10628#gene-expression>. [Accessed: 22-Feb-2019].
- [75] H. Yamawaki, S. Pan, R. T. Lee, and B. C. Berk, “Fluid shear stress inhibits vascular inflammation by decreasing thioredoxin-interacting protein in endothelial cells,” *J. Clin. Invest.*, vol. 115, no. 3, pp. 733–738, Mar. 2005.
- [76] N. Wu *et al.*, “AMPK-dependent degradation of TXNIP upon energy stress leads to enhanced glucose uptake via GLUT1,” *Mol Cell*, vol. 49, no. 6, pp. 1167–1175, 2013.
- [77] F.-X. Yu, S.-R. Goh, R.-P. Dai, and Y. Luo, “Adenosine-Containing Molecules Amplify Glucose Signaling and Enhance Txnip Expression,” *Mol. Endocrinol.*, vol. 23, no. 6, pp. 932–942, Jun. 2009.
- [78] T. Zitman-Gal, J. Green, M. Pasmanik-Chor, V. Oron-Karni, and J. Bernheim, “Endothelial pro-atherosclerotic response to extracellular diabetic-like environment: Possible role of thioredoxin-interacting protein,” *Nephrol. Dial.*

- Transplant.*, vol. 25, no. 7, pp. 2141–2149, Jul. 2010.
- [79] R. Zhou, A. Tardivel, B. Thorens, I. Choi, and J. Tschopp, “Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation,” *Nat. Immunol.*, vol. 11, no. 2, pp. 136–140, 2010.
- [80] G. I. Giles, K. M. Tasker, and C. Jacob, “Oxidation of biological thiols by highly reactive disulfide-S-oxides,” *Gen. Physiol. Biophys.*, vol. 21, no. 1, pp. 65–72, 2002.
- [81] J. Hwang *et al.*, “The structural basis for the negative regulation of thioredoxin by thioredoxin-interacting protein,” *Nat. Commun.*, vol. 5, p. 2958, 2014.
- [82] J.-H. Jeon, K.-N. Lee, C. Y. Hwang, K.-S. Kwon, K.-H. You, and I. Choi, “Tumor Suppressor VDUP1 Increases p27^{kip1} Stability by Inhibiting JAB1,” *Cancer Res.*, vol. 65, no. 11, pp. 4485–4489, Jun. 2005.
- [83] P. Patwari *et al.*, “Thioredoxin-independent regulation of metabolism by the alpha-arrestin proteins,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 37, pp. 24996–5003, Sep. 2009.
- [84] C. W. Peterson, C. A. Stoltzman, M. P. Sighinolfi, K. S. Han, and D. E. Ayer, “Glucose Controls Nuclear Accumulation, Promoter Binding, and Transcriptional Activity of the MondoA-Mlx Heterodimer,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 30, no. 12, pp. 2887–2895, Jun. 2010.
- [85] Y. Wang, G. W. De Keulenaer, and R. T. Lee, “Vitamin D₃ -up-regulated Protein-1 Is a Stress-responsive Gene That Regulates Cardiomyocyte Viability through Interaction with Thioredoxin,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 29, pp. 26496–26500, Jul. 2002.
- [86] J. Yoshioka *et al.*, “Thioredoxin-Interacting Protein Controls Cardiac Hypertrophy Through Regulation of Thioredoxin Activity,” *Circulation*, vol. 109, no. 21, pp. 2581–2586, Jun. 2004.
- [87] G. Xiang *et al.*, “Catalytic Degradation of Vitamin D Up-regulated Protein 1 mRNA Enhances Cardiomyocyte Survival and Prevents Left Ventricular Remodeling after Myocardial Ischemia,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 47, pp. 39394–39402, Nov. 2005.
- [88] J. Yoshioka *et al.*, “Targeted Deletion of Thioredoxin-Interacting Protein Regulates Cardiac Dysfunction in Response to Pressure Overload,” *Circ. Res.*, vol. 101, no. 12, pp. 1328–1338, Dec. 2007.
- [89] R. Watanabe, H. Nakamura, H. Masutani, and J. Yodoi, “Anti-oxidative, anti-cancer and anti-inflammatory actions by thioredoxin 1 and thioredoxin-binding protein-2,” *Pharmacol. Ther.*, vol. 127, no. 3, pp. 261–270, Sep. 2010.
- [90] J. Zhou, Q. Yu, and W.-J. Chng, “TXNIP (VDUP-1, TBP-2): A major redox regulator commonly suppressed in cancer by epigenetic mechanisms,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 43, no. 12, pp. 1668–1673, Dec. 2011.
- [91] M. Ikarashi, Y. Takahashi, Y. Ishii, T. Nagata, S. Asai, and K. Ishikawa, “Vitamin D₃ up-regulated protein 1 (VDUP1) expression in gastrointestinal cancer and its relation to stage of disease,” *Anticancer Res.*, vol. 22, no. 6C, pp. 4045–8, 2002.
- [92] S. Ohta *et al.*, “Downregulation of metastasis suppressor genes in malignant pheochromocytoma,” *Int. J. Cancer*, vol. 114, no. 1, pp. 139–143, Mar. 2005.
- [93] L. M. Butler *et al.*, “The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 99, no. 18, pp. 11700–11705, Sep. 2002.

- [94] A. H. Minn *et al.*, “Gene expression profiling in INS-1 cells overexpressing thioredoxin-interacting protein,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 336, no. 3, pp. 770–778, Oct. 2005.
- [95] S. H. Han *et al.*, “VDUP1 upregulated by TGF- β 1 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits tumor cell growth by blocking cell-cycle progression,” *Oncogene*, vol. 22, no. 26, pp. 4035–4046, Jun. 2003.
- [96] J. A. Morrison *et al.*, “Thioredoxin interacting protein (TXNIP) is a novel tumor suppressor in thyroid cancer,” *Mol. Cancer*, vol. 13, no. 1, pp. 1–13, 2014.
- [97] W. A. Chutkow, P. Patwari, J. Yoshioka, and R. T. Lee, “Thioredoxin-interacting protein (Txnip) is a critical regulator of hepatic glucose production,” *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 4, pp. 2397–2406, 2008.
- [98] J. Chen, G. Saxena, I. N. Mungrue, A. J. Lusic, and A. Shalev, “Thioredoxin-Interacting Protein: A Critical Link Between Glucose Toxicity and β -Cell Apoptosis,” *Diabetes*, vol. 57, no. 4, pp. 938–944, Apr. 2008.
- [99] S. Rani *et al.*, “Decreasing Txnip mRNA and Protein Levels in Pancreatic MIN6 Cells Reduces Reactive Oxygen Species and Restores Glucose Regulated Insulin Secretion,” *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 25, no. 6, pp. 667–674, 2010.
- [100] P. C. Schulze, J. Yoshioka, T. Takahashi, Z. He, G. L. King, and R. T. Lee, “Hyperglycemia promotes oxidative stress through inhibition of thioredoxin function by thioredoxin-interacting protein,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 29, pp. 30369–30374, 2004.
- [101] H. Parikh *et al.*, “TXNIP regulates peripheral glucose metabolism in humans,” *PLoS Med.*, vol. 4, no. 5, pp. 0868–0879, 2007.
- [102] A. H. Minn, C. Hafele, and A. Shalev, “Thioredoxin-Interacting Protein Is Stimulated by Glucose through a Carbohydrate Response Element and Induces β -Cell Apoptosis,” *Endocrinology*, vol. 146, no. 5, pp. 2397–2405, May 2005.
- [103] C. A. Stoltzman, C. W. Peterson, K. T. Breen, D. M. Muoio, A. N. Billin, and D. E. Ayer, “Glucose sensing by MondoA:Mix complexes: A role for hexokinases and direct regulation of thioredoxin-interacting protein expression,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, no. 19, pp. 6912–6917, May 2008.
- [104] Z. Wang, Y. P. Rong, M. H. Malone, M. C. Davis, F. Zhong, and C. W. Distelhorst, “Thioredoxin-interacting protein (txnip) is a glucocorticoid-regulated primary response gene involved in mediating glucocorticoid-induced apoptosis,” *Oncogene*, vol. 25, no. 13, pp. 1903–1913, Mar. 2006.
- [105] J. Chen, G. Jing, G. Xu, and A. Shalev, “Thioredoxin-Interacting Protein Stimulates Its Own Expression via a Positive Feedback Loop,” *Mol. Endocrinol.*, vol. 28, no. 5, pp. 674–680, May 2014.
- [106] M. Brownlee, “Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications,” *Nature*, vol. 414, no. 6865, pp. 813–820, Dec. 2001.
- [107] G. Xu, J. Chen, G. Jing, and A. Shalev, “Thioredoxin-interacting protein regulates insulin transcription through microRNA-204,” vol. 19, no. 9, pp. 1141–1146, 2013.
- [108] I. Artner *et al.*, “MafA and MafB Regulate Genes Critical to β -Cells in a Unique Temporal Manner,” *Diabetes*, vol. 59, no. 10, pp. 2530–2539, Oct. 2010.
- [109] J. Chen *et al.*, “Thioredoxin-interacting protein deficiency induces Akt/Bcl-xL signaling and pancreatic beta-cell mass and protects against diabetes,” *FASEB J.*, vol. 22, no. 10, pp. 3581–3594, Oct. 2008.

- [110] M. Shaked, M. Ketzinel-Gilad, Y. Ariav, E. Cerasi, N. Kaiser, and G. Leibowitz, "Insulin counteracts glucotoxic effects by suppressing thioredoxin-interacting protein production in INS-1E beta cells and in *Psammomys obesus* pancreatic islets," *Diabetologia*, vol. 52, no. 4, pp. 636–644, Apr. 2009.
- [111] A. Shalev, "Thioredoxin-Interacting Protein: Regulation and Function in the Pancreatic β -Cell," *Mol. Endocrinol.*, vol. 28, no. 8, pp. 1211–1220, 2014.
- [112] J. Chen, G. Fontes, G. Saxena, V. Poitout, and A. Shalev, "Lack of TXNIP Protects Against Mitochondria-Mediated Apoptosis but Not Against Fatty Acid-Induced ER Stress-Mediated β -Cell Death," *Diabetes*, vol. 59, no. 2, pp. 440–447, Feb. 2010.
- [113] R. P. Robertson, J. Harmon, P. O. Tran, Y. Tanaka, and H. Takahashi, "Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection.," *Diabetes*, vol. 52, no. 3, pp. 581–7, Mar. 2003.
- [114] T. Mandrup-Poulsen, "Apoptotic signal transduction pathways in diabetes.," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 66, no. 8, pp. 1433–40, Oct. 2003.
- [115] D. Mathis, L. Vence, and C. Benoist, " β -Cell death during progression to diabetes," *Nature*, vol. 414, no. 6865, pp. 792–798, Dec. 2001.
- [116] G. Leibowitz *et al.*, "Glucose regulation of β -cell stress in type 2 diabetes," *Diabetes, Obes. Metab.*, vol. 12, pp. 66–75, Oct. 2010.
- [117] D. M. Muoio, "TXNIP Links Redox Circuitry to Glucose Control," *Cell Metab.*, vol. 5, no. 6, pp. 412–414, Jun. 2007.
- [118] T. Y. Hui *et al.*, "Mice Lacking Thioredoxin-interacting Protein Provide Evidence Linking Cellular Redox State to Appropriate Response to Nutritional Signals," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 23, pp. 24387–24393, Jun. 2004.
- [119] G. Xu, J. Chen, G. Jing, and A. Shalev, "Preventing β -Cell Loss and Diabetes With Calcium Channel Blockers," *Diabetes*, vol. 61, no. 4, pp. 848–856, Apr. 2012.
- [120] W. A. Chutkow *et al.*, "Deletion of the alpha β -Arrestin Protein Txnip in Mice Promotes Adiposity and Adipogenesis While Preserving Insulin Sensitivity," *Diabetes*, vol. 59, no. 6, pp. 1424–1434, Jun. 2010.
- [121] S. S. Sheth *et al.*, "Thioredoxin-interacting protein deficiency disrupts the fasting-feeding metabolic transition," *J. Lipid Res.*, vol. 46, no. 1, pp. 123–134, Jan. 2005.
- [122] S. S. Sheth *et al.*, "Hepatocellular carcinoma in Txnip-deficient mice," *Oncogene*, vol. 25, no. 25, pp. 3528–3536, Jun. 2006.
- [123] "Chemistry of Protein Assays," *Thermo Fisher Scientific*. [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemistry-protein-assays.html#/legacy=www.piercenet.com>. [Accessed: 04-Aug-2018].
- [124] E. F. F. and T. M. J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, 1987.
- [125] Νικόλαος Λάμπρου, *Σημειώσεις Αναλυτικής Βιοτεχνολογίας*. Αθήνα: Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2014.
- [126] H. Cha-Molstad, G. Saxena, J. Chen, and A. Shalev, "Glucose-stimulated expression of Txnip is mediated by carbohydrate response element-binding

- protein, p300, and histone H4 acetylation in pancreatic beta cells,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 25, pp. 16898–16905, 2009.
- [127] A. Houshmand-Oeregaard *et al.*, “DNA methylation and gene expression of TXNIP in adult offspring of women with diabetes in pregnancy,” *PLoS One*, vol. 12, no. 10, pp. 1–18, 2017.
- [128] M. Andrews Guzmán, M. Arredondo Olguín, and M. Olivares Gronhert, “Glycemic control and oxidative stress markers and their relationship with the thioredoxin interacting protein (TXNIP) gene in type 2 diabetic patients.,” *Nutr. Hosp.*, vol. 31, no. 3, pp. 1129–33, Sep. 2014.
- [129] N. Wu *et al.*, “AMPK-Dependent Degradation of TXNIP upon Energy Stress Leads to Enhanced Glucose Uptake via GLUT1,” *Mol. Cell*, vol. 49, no. 6, pp. 1167–1175, 2013.
- [130] A. N. Waldhart *et al.*, “Phosphorylation of TXNIP by AKT Mediates Acute Influx of Glucose in Response to Insulin,” *Cell Rep.*, vol. 19, no. 10, pp. 2005–2013, 2017.
- [131] N. M. Alhawiti, S. Al Mahri, M. A. Aziz, S. S. Malik, and S. Mohammad, “TXNIP in Metabolic Regulation: Physiological Role and Therapeutic Outlook,” *Curr. Drug Targets*, vol. 18, no. 9, pp. 1095–1103, 2017.
- [132] H. Mogami *et al.*, “Thioredoxin binding protein-2 inhibits excessive fetal hypoglycemia during maternal starvation by suppressing insulin secretion in mice,” *Pediatr. Res.*, vol. 67, no. 2, pp. 138–143, 2010.
- [133] A. Szpigiel *et al.*, “Lipid environment induces ER stress, TXNIP expression and inflammation in immune cells of individuals with type 2 diabetes,” *Diabetologia*, vol. 61, no. 2, pp. 399–412, 2018.
- [134] A. T. Gateva, Y. S. Assyov, T. Velikova, and Z. A. Kamenov, “Higher levels of thioredoxin interacting protein (TXNIP) in patients with prediabetes compared to obese normoglycemic subjects,” *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.*, vol. 13, no. 1, pp. 734–737, 2019.
- [135] Y.-C. Zhao, J. Zhu, G.-Y. Song, and X.-S. Li, “Relationship between thioredoxin-interacting protein (TXNIP) and islet β -cell dysfunction in patients with impaired glucose tolerance and hypertriglyceridemia.,” *Int. J. Clin. Exp. Med.*, vol. 8, no. 3, pp. 4363–8, 2015.
- [136] Παπαδόπουλος Γιώργος, «Εισαγωγή στις Πιθανότητες και τη Στατιστική», Εκδόσεις Gutenberg, 2015.