



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας**

**"ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ"**

**«ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *tRNA<sup>Leu</sup>* ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΔΙΑΒΗΤΗ»**

**ΦΡΑΝΤΖΑΣ ΧΡΙΣΤΟΦΟΡΟΣ**

*Λάρισα 2017*



**«Ανίχνευση μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό γονίδιο  $tRNA^{Leu}$  σε ασθενείς με διαβήτη»**

**«Detection of mutations in the mitochondrial  $tRNA^{Leu}$  in diabetic patients»**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ**

**Ζίφα Αιμιλία,**

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας / Νευροβιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας  
& Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Ζίφα Αιμιλία,**

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας / Νευροβιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας  
& Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Μαμούρης Ζήσης,**

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας &  
Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Μπαργιώτα Αλεξάνδρα,**

Επίκουρος Καθηγήτρια - Μόνιμη Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας  
Τομέας Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## Πίνακας περιεχομένων

<b>1.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	6
1.2 ABSTRACT.....	7
<b>2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	8
2.1 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ- ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ.....	8
2.2 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΔΟΜΗ.....	8
2.3 ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ.....	10
2.4 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA.....	12
2.5 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ.....	13
2.6 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ.....	17
2.6.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ.....	17
2.6.2 Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 1.....	17
2.6.3. Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2.....	19
2.6.4. Διαβήτης Κύησης.....	19
2.6.5. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ – ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ A3243G ΣΤΟ TRNA LEU (UUR).....	20
2.6.6. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ.....	22
2.7. ΕΠΠΛΟΚΕΣ.....	23
2.7.1. ΟΞΕΙΕΣ ΕΠΠΛΟΚΕΣ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ.....	23
2.7.2. ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΑ.....	24
2.7.3. ΜΑΚΡΟΧΡΟΝΙΕΣ ΕΠΠΛΟΚΕΣ ΤΟΥ ΔΙΑΒΗΤΗ.....	24
2.7.4 ΔΙΑΒΗΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΑΓΓΕΙΟΠΑΘΕΙΑ.....	26
2.8. ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ-ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΑ.....	28
2.9. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	29
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	30
3.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA.....	30
3.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ PCR (Polymerase Chain Reaction) .	32
3.2.1. Η ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	33
3.2.2. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.....	35
3.3. SSCP- ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΗΣ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ.....	36
3.3.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ.....	36
3.3.2. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.....	37

3.3.3 ΧΡΩΣΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΜΕ ΔΙΑΛΥΜΑ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ .....	38
3.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA.....	40
3.4.1 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.....	40
3.4.2 ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ.....	40
3.4.3 ΛΥΟΦΙΛΙΩΣΗ.....	41
3.5 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ .....	41
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>45</b>
4.1 Ενίσχυση με PCR του γονιδίου της Λευκίνης του mtDNA.....	45
4.2 Ανάλυση δειγμάτων με τη μέθοδο SSCP.....	46
4.3 Ταυτοποίηση μεταλλάξεων.....	46
<b>5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>47</b>
<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>48</b>

## 1.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μεταβολική ασθένεια η οποία χαρακτηρίζεται από αύξηση της συγκέντρωσης του σακχάρου στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης, είτε ως αποτέλεσμα ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης λόγω της καταστροφής των παγκρεατικών β-κυττάρων είτε λόγω ελάττωσης της ευαισθησίας των κυττάρων του σώματος στην ινσουλίνη. Τα αυξημένα ποσοστά γλυκόζης στο αίμα προκαλεί τα κλασσικά συμπτώματα του διαβήτη, πολυουρία, πολυδυψία και πολυφαγία.

Από έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει βρεθεί ότι ένας μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν σε μιτοχονδριακά γονίδια tRNA συνδέεται με την εμφάνιση της συγκεκριμένης νόσου. Στην πλειοψηφία των μιτοχονδριακών μορίων tRNA έχουν ανιχνευθεί και πολυμορφικές και παθογόνες μεταλλάξεις. Οι πολυμορφικές μεταλλάξεις δεν αλλάζουν την δομή των μιτοχονδριακών tRNA. Στη συγκεκριμένη έρευνα, πραγματοποιήθηκε ανίχνευση μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό γονίδιο του tRNA<sup>Leu</sup>. Συγκεκριμένα, από δείγματα αίματος 57 ατόμων που έχουν διαγνωσθεί με διαβήτη τύπου 2 και λαμβάνουν φαρμακευτική αγωγή με αντιδιαβητικά δισκία, απομονώθηκε το γενετικό υλικό DNA και στη συνέχεια με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR ενισχύθηκε το τμήμα του DNA που επιθυμούσαμε από τα παραπάνω αναφερθέντα γονίδια. Ακολούθησε η ανίχνευση πολυμορφισμών στα προϊόντα της PCR με τη μέθοδο SSCP, και τέλος μελετήσαμε τη ταυτοποίησή τους ύστερα από την αλληλούχιση τους (sequencing). Δεν ανιχνεύτηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο του tRNA<sup>Leu</sup>. Παρόλα αυτά εντοπίστηκε μία μετάλλαξη, η T3197C στο 16s ριβοσωμικό RNA η οποία φαίνεται να συσχετίζεται με τον διαβήτη καθώς και με άλλες ασθένειες.

## 1.2 ABSTRACT

Diabetes mellitus, or simply diabetes, is a group of metabolic diseases in which a person has high blood sugar, either because the pancreas does not produce enough insulin due to pancreatic b cell destruction, or because cells do not respond to the insulin that is produced. This high blood sugar produces the classical symptoms of polyuria, polydipsia and polyphagia.

The investigations have been carried out, it has been found that a large number of mutations in mitochondrial genes detected tRna associated with occurrence of the disease. The majority of mitochondrial tRNA molecules have been detected and polymorphic and pathogenic mutations. Polymorphic mutations do not alter the structure of mitochondrial tRNA. In this research , a detection of mutations in mitochondrial genes tRNA<sup>Leu</sup>. Specifically , blood samples from 57 individuals who have been diagnosed with type 2 diabetes and are receiving medication , the isolated genetic material DNA and then using the polymerase chain reaction PCR amplified segment of the DNA that like the above -mentioned genes. Followed by detection of polymorphisms in the products of the PCR method SSCP, and then studied the identification after the sequencing (sequencing). No mutations were detected in the tRNA<sup>Leu</sup> gene. However, a mutation, T3197C, was detected in 16s ribosomal RNA which appears to be associated with diabetes as well as other diseases.

## 2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 2.1 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ- ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ

Τα μιτοχόνδρια είναι ευδιάκριτα οργανίδια που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα σχεδόν όλων, των ευκαρυωτικών κυττάρων και κατέχουν σημαντική θέση στην βιολογία του κυττάρου. Σε κάθε ευκαρυωτικό κύτταρο περιέχονται πολλά μιτοχόνδρια με τον αριθμό τους να ποικίλει ανάλογα με τις απαιτήσεις του κυττάρου σε ενέργεια (Alberts, και συν. n.d.) . Τα μιτοχόνδρια είναι ικανά να συντήκονται, να χωρίζονται και να μετακινούνται μέσα στο κύτταρο. Οι αλλαγές αυτές πραγματοποιούνται ώστε η ενεργειακή ισορροπία του κυττάρου να κρατηθεί σταθερή (Picard and Turnbull 2013).

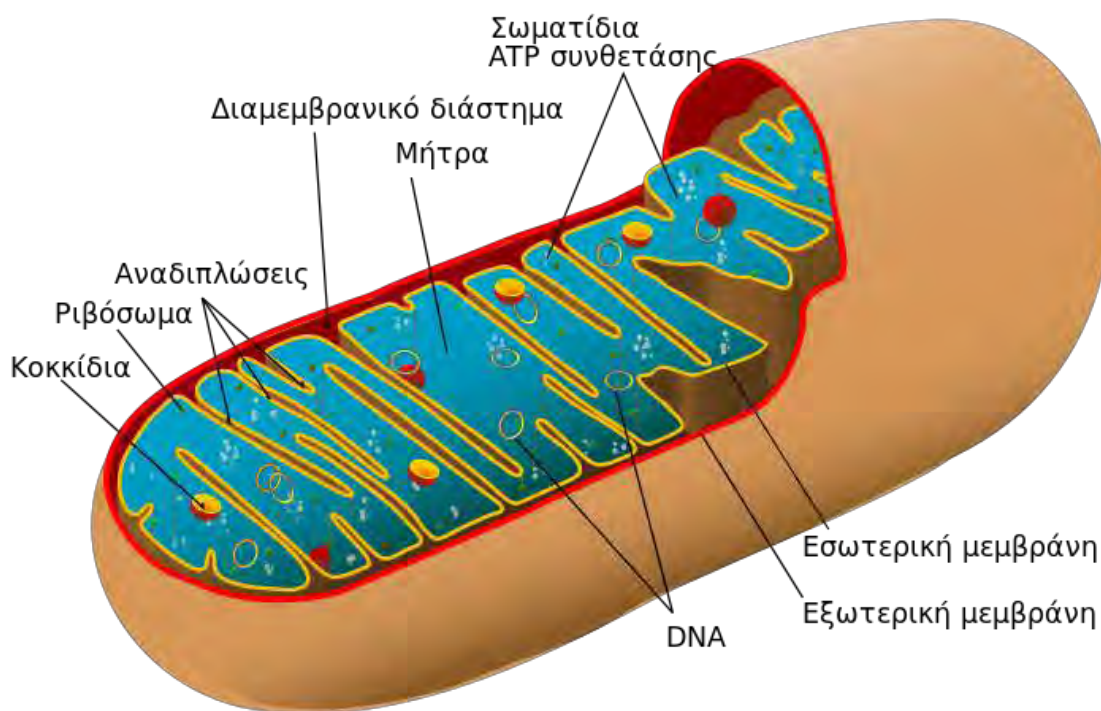
Η προέλευση των μιτοχονδρίων είναι αμφίβολη. Υπάρχουν δύο θεωρίες που εξηγούν την προέλευση τους. Κατά την πρώτη θεωρία, το γονιδίωμα των οργανιδίων (μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες) έχει αυτογενή καταγωγή μέσα στα ευκαρυωτικά κύτταρα και προέρχεται από θραύσματα του πυρηνικού γονιδιώματος που εγκολλώθηκαν σε μεμβράνες και σχημάτισαν τα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες (Cavalier-Smith 1975). Ενώ κατά την δεύτερη θεωρία, υποστηρίζεται ότι το γονιδίωμα των οργανιδίων έχει εξωγενή προέλευση, και συγκεκριμένα προέρχεται από βακτηριακούς προγόνους οι οποίοι εισέβαλλαν ή εγκολλώθηκαν από τα πρωτοευκαρυωτικά κύτταρα (Alberts, και συν. n.d.). Η θεωρία αυτή καλείται αλλιώς και «θεωρία της ενδοσυμβίωση» και υποστηρίζεται από διάφορες μοριακές αποδείξεις (Gray 1992). Μία από τις μοριακές από τις μοριακές αποδείξεις που συνηγορούν υπέρ της ενδοσυμβιωτικής θεωρίας προέρχεται από την αλληλούχιση των rRNA γονιδίων. Διαπιστώθηκε ότι οι rRNA αλληλουχίες τόσο των χλωροπλαστών όσο και των μιτοχονδρίων έχουν μεγαλύτερη συγγένεια με τις βακτηριακές αλληλουχίες παρά με τις πυρηνικές αλληλουχίες των ευκαρυωτικών κυττάρων. Σήμερα πιστεύεται ότι τα ευκαρυωτικά κύτταρα αποτελούν γενετικές χίμαιρες που περιέχουν ένα μίγμα από διακριτές εξελικτικές γραμμές (Avisé 1994).

### 2.2 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΔΟΜΗ

Τα μιτοχόνδρια όταν εξετάζονται κάτω από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο φαίνεται να έχουν πολύ χαρακτηριστική δομή. Κάθε μιτοχόνδριο έχει αλλαντοειδές ή σκωληκόμορφο σχήμα και το μήκος τους κυμαίνεται από ένα έως πολλά μικρόμετρα. Ακόμη, το μέγεθος τους φαίνεται να είναι αντίστοιχο των βακτηρίων. Τυπικά,



υπάρχουν περίπου 2000 μιτοχόνδρια ανά κύτταρο, αντιπροσωπεύοντας το 25% περίπου του κυτταρικού όγκου. Ο αριθμός τους ποικίλλει ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου σε ενέργεια. Κάθε μιτοχόνδριο περιβάλλεται από δύο πολύ εξειδικευμένες μεμβράνες, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στις λειτουργίες του. Η εξωτερική και η εσωτερική μεμβράνη δημιουργούν δύο μιτοχονδριακά διαμερίσματα : το στρώμα ή θεμέλια ουσία<sup>1</sup> (matrix) και το διαμεμβρανικό χώρο (Alberts, και συν. n.d.).



**Εικόνα 1:** Δομή μιτοχονδρίου

Η εξωτερική μεμβράνη περιέχει πολλά μόρια πορίνης, η οποία σχηματίζει ευρείς υδρόφιλους διαύλους διαμέσου της διπλοστοιβάδας των λιπιδίων. Από την άλλη, η εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη έχει χαρακτηριστική σύσταση σε λιπίδια και περιέχει ποικίλες μεταφορικές πρωτεΐνες και πρωτεΐνες που είναι συστατικά των αλυσίδων μεταφοράς ηλεκτρονίων που είναι απαραίτητες για την οξειδωτική φωσφορυλίωση.

Η εσωτερική μεμβράνη είναι πολύ πτυχωμένη, με τις πτυχές αυτές να αναφέρονται ως ακρολοφίες, οι οποίες προβάλλουν προς το μιτοχονδριακό στρώμα

<sup>1</sup> Μεγάλος εσωτερικός χώρος που περιβάλλεται από την εσωτερική μεμβράνη.

και αυξάνουν πολύ την επιφάνεια της εσωτερικής μεμβράνης στην οποία συντελείται η σύνθεση του ATP.

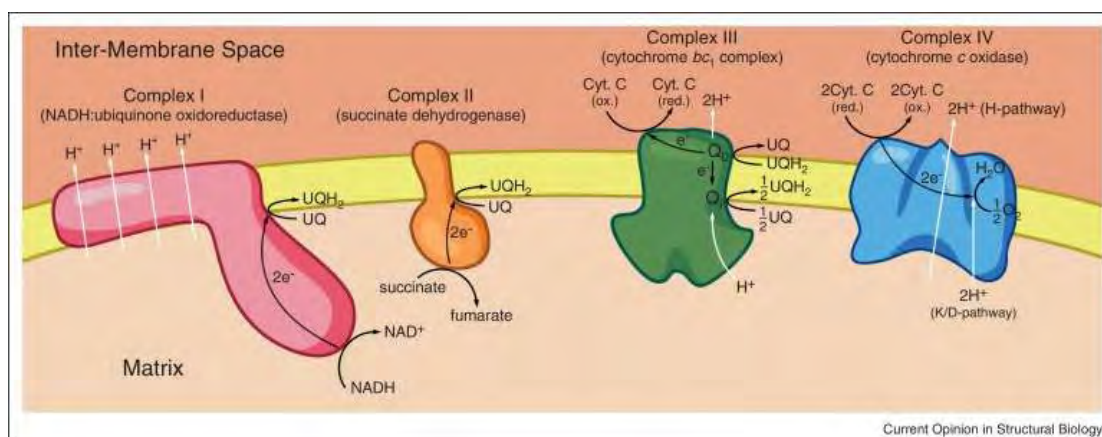
### 2.3 ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν το κομβικό οργανίδιο στη διαδικασία παραγωγής της ενέργειας που προέρχεται από την τροφή για αυτό και περιγράφονται ως το βιοχημικό εργοστάσιο παραγωγής ενέργειας του κυττάρου. Οι πρώτες αναφορές όσον αφορά στα μιτοχόνδρια έγιναν το 1840. Το 1894 ο Richard Altmann τα ταυτοποίησε ως κυτταρικά οργανίδια και τα ονόμασε βιοβλάστες ενώ ο όρος μιτοχόνδρια καθιερώθηκε το 1898 από τον Carl Benda (Ernster and Schatz n.d.). Η δομή του μιτοχονδρίου έγινε λεπτομερώς γνωστή όμως πολλά χρόνια αργότερα και επέτρεψε την κατανόηση πολλών βιοχημικών μηχανισμών. Παράγουν το μεγαλύτερο μέρος της κυτταρικής ATP, μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Στο στρώμα εντοπίζονται η πυροσταφυλική αφυδρογονάση (PDH), και ως διαδικασίες ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος, η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων και μέρη του κύκλου της ουρίας. Η αναπνευστική αλυσίδα, η σύνθεση της ATP και τα ένζυμα που συμμετέχουν στην σύνθεση της αίμης, συσχετίζονται με την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Murray, και συν. 2011).

Μεγάλη σημασία στη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης έχει η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Τα μόρια της αλυσίδας αυτής λειτουργούν ως μεταφορείς ηλεκτρονίων κατά την οξείδωση των θρεπτικών συστατικών από ένζυμα που δρουν στο στρώμα των μιτοχονδρίων. Η ροή ηλεκτρονίων μέσω της αλυσίδας αυτής είναι ισχυρά εξώθερμη και η ενέργεια που εκλύεται χρησιμοποιείται για την παραγωγή ATP, η οποία είναι μια ενδόθερμη αντίδραση (Gropper, Smith και Groff 2007)

Η αναπνευστική αλυσίδα περιλαμβάνει τέσσερα συμπλέγματα (μιτοχονδριακά αναπνευστικά συμπλέγματα I, II, III και IV) όπως επίσης τον λιποδιαλυτό μεταφορέα ηλεκτρονίων (ουβικινόνη) μεταξύ των συμπλεγμάτων I/II και IV και τον υδατοδιαλυτό μεταφορέα ηλεκτρονίων (κυτόχρωμα C) μεταξύ των συμπλεγμάτων III και IV. Τα συμπλέγματα I, II, και IV αντλούν πρωτόνια από το στρώμα του μιτοχονδρίου στη διαμεμβρανική περιοχή και παράγουν μια ηλεκτροχημική βαθμίδωση στην εσωτερική μεμβράνη. Η ενέργεια από τα πρωτόνια ρέει προς το στρώμα όπου χρησιμοποιείται από την ATP συνθετάση (ή αλλιώς σύμπλεγμα V) για

την δημιουργία ATP. Η ζεύξη μεταξύ των μεταφορέων ηλεκτρονίων και της ATP συνθετάσης ονομάζεται οξειδωτική φωσφορυλίωση .



**Εικόνα 2:** Μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα

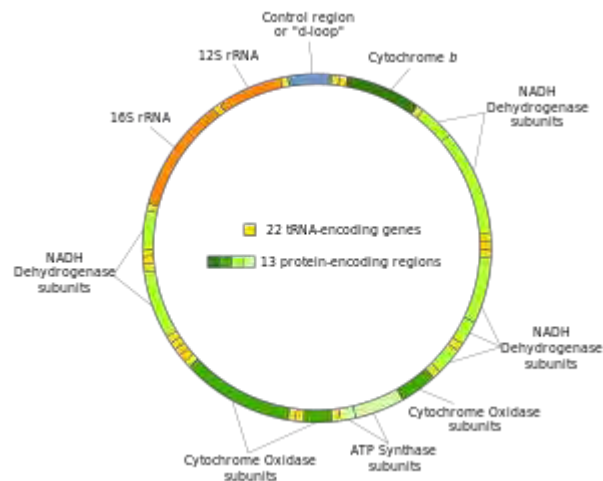
Διακρίνονται δύο μονοπάτια μεταφοράς ηλεκτρονίων διαμέσου της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας. Το πρώτο ξεκινά από το NADH και ηλεκτρόνια του NADH τα οποία μεταφέρονται μέσω του Συμπλέγματος I στην ουβικινόνη, μετατρέποντας την ουβικινόνη σε ουβικινόλη, έπειτα η ουβικινόλη οξειδώνεται από το Σύμπλεγμα III και τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται μέσω αυτού στο c κυτόχρωμα, και εν τέλη το c κυτόχρωμα οξειδώνεται από το σύμπλεγμα IV μεταφέροντας ηλεκτρόνια στο οξυγόνο και παράγοντας μόρια νερού μέσα στο σύμπλεγμα IV. Το δεύτερο μονοπάτι συνδέεται με τον κύκλο του Krebs στο στρώμα του μιτοχονδρίου και ξεκινά από την οξείδωση του ηλεκτρικού. Ηλεκτρόνια από το ηλεκτρικό μεταφέρονται στην ουβικινόνη μέσω του συμπλέγματος II, έπειτα στο c κυτόχρωμα μέσω του συμπλέγματος III και τέλος στο οξυγόνο μέσω του συμπλέγματος IV. Στο πρώτο μονοπάτι, για κάθε ηλεκτρόνιο που μεταφέρεται πέντε πρωτόνια μεταφέρονται από το στρώμα στον διαμεμβρανικό χώρο. Από την άλλη, το δεύτερο μονοπάτι είναι λιγότερο αποτελεσματικό καθώς για κάθε ηλεκτρόνιο μεταφέρονται 3 πρωτόνια από το στρώμα στο διαμεμβρανικό χώρο (Sun, et al. 2013).

Τα μιτοχόνδρια λειτουργούν, και ως ενδοκυτταρική δεξαμενή ασβεστίου άλλων ιόντων όπως Καλίου, Νατρίου, Μαγνησίου (Murray, και συν. 2011) . Επιπλέον, είναι υπεύθυνα για την αναγέννηση του συμπλέγματος θείου σιδήρου (Alston, και συν. 2016) Τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν, επίσης, σημαντικό ρόλο στον «προγραμματιζόμενο κυτταρικό θάνατο» την απόπτωση (Alston, et al. 2016). Τα

μιτοχόνδρια περιβάλλονται από μία εσωτερική και μία εξωτερική μεμβράνη. Η εξωτερική μεμβράνη περιέχει πορίνες, που επιτρέπουν σε μικρότερα μόρια μεγέθους μέχρι 10 kDa να περάσουν. Αντίθετα, η εσωτερική μεμβράνη είναι αδιαπέραστη και στα μικρά μόρια (με εξαίρεση το H<sub>2</sub>O, τα αέρια O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> και την NH<sub>3</sub>). Όλα τα υπόλοιπα υποστρώματα του μιτοχονδριακού μεταβολισμού μαζί με τα προϊόντα τους θα πρέπει, επομένως, να μετακινηθούν μέσω της εσωτερικής μεμβράνης με τη βοήθεια ειδικών μεταφορέων (Murray, και συν. 2011).

## 2.4 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA

Το μιτοχονδριακό DNA είναι ένα κυκλικό, δίκλωνο, υπερελικώμενο (με εξαίρεση στα πρωτόζωα όπου είναι ραβδόμορφο) μόριο που εντοπίζεται στη μήτρα των μιτοχονδρίων, το μέγεθος του ανέρχεται στις 16.569 bp και αποτελεί λιγότερο από το 1% του ανθρώπινου γονιδιώματος (Murray, et al. 2011). Το μόριο καλύπτεται από πρωτεΐνες, περίπου 40 μόρια πρωτεϊνών έχουν συσχετιστεί με το μιτοχονδριακό DNA και συνεχίζουν να προστίθενται καινούρια (Bogenhagen, et al. 2003). Παρόλο που το νουκλεοειδές δεν διαχωρίζεται από το υπόλοιπο στρώμα μέσω μια μεμβράνης (όπως γίνεται με το πυρηνικό γονιδίωμα που εντοπίζεται στον πυρηνικό φάκελο), φαίνεται να δημιουργείται ένα διαμέρισμα στο μιτοχόνδριο, όπου περιέχεται το DNA από μία ουσία η οποία δεν έχει αναγνωριστεί ακόμη (Kolesnikov 2016). Υπάρχει σε πολλαπλά αντίγραφα από 2 έως 10 σε κάθε μιτοχόνδριο, με αποτέλεσμα να υπάρχουν 1000-100000 αντίγραφα του μορίου σε κάθε κύτταρο. Η αντιγραφή, η μεταγραφή και η μετάφραση του μιτοχονδριακού DNA πραγματοποιούνται καθ' όλη την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου ανεξάρτητα από τις αντίστοιχες διαδικασίες του πυρηνικού DNA. Αν και τα μιτοχόνδρια περιέχουν το δικό τους DNA, το οποίο κωδικοποιεί μια ποικιλία πρωτεϊνών και μορίων RNA, δεν περιέχει όλες τις απαραίτητες πληροφορίες για τη σύνθεση όλων των λειτουργικών και δομικών αναγκών των οργανιδίων –γι' αυτό χαρακτηρίζονται ημιαυτόνομα οργανίδια- και γίνεται εισαγωγή μορίων από το κυτταρόπλασμα (ενζύμων, ρυθμιστικών και ριβοσωματικών πρωτεϊνών) που η σύνθεσή τους ελέγχεται από το πυρηνικό DNA. Οι διαδικασίες της αντιγραφής και της μεταγραφής στηρίζονται σε πυρηνικούς παράγοντες. Οι πυρηνικοί παράγοντες που προορίζονται για τα μιτοχόνδρια μεταφράζονται στα ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος και τροποποιούνται μετα-μεταφραστικά με μια αλληλουχία-οδηγό στο N-άκρο, ώστε να εισαχθούν στα μιτοχόνδρια με τη βοήθεια μεταφορέων.



**Εικόνα 3: Μιτοχονδριακό DNA**

Το μιτοχονδριακό DNA κωδικοποιεί 13 πρωτεϊνικές υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας (από το σύνολο των 67), 7 υπομονάδες της αφυδρογονάσης NADH (σύμπλοκο I), κυτόχρωμα b του συμπλόκου III, 3 υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος (σύμπλοκο IV), 2 υπομονάδες της ATP συνθάσης. Ακόμη κωδικοποιεί μεγάλα (16S) και μικρά (12S) mt ριβοσωμικά RNAs καθώς επίσης 22 μόρια μιτοχονδριακών tRNA (Harding 1991).

Υπάρχουν αρκετά σημεία που η βιολογία των μιτοχονδρίων διαφέρει ουσιαστικά από αυτή των πυρηνικών γονιδιωμάτων, και αυτό συνεπώς επηρεάζει το μοντέλο και την διαδικασία της εξέλιξής του. Τέτοια σημεία είναι: ο αριθμός επαναλήψεων των μορίων (ploidy), ο τρόπος κληρονομής (μεταβιβάζεται με μητρική μη μενδελική κληρονομικότητα), ο βαθμός ανασυνδυασμού, περιέχει ελάχιστες αμετάφραστες περιοχές, το δραστικό μέγεθος του πληθυσμού, ο ρυθμός μεταλλάξεων, οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης, διαφορές στο γενετικό κώδικα (Murray, και συν. 2011).

## **2.5 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ**

Ο όρος μιτοχονδριακές ασθένειες αναφέρεται σε μια κλινικά ετερογενή ομάδα μιτοχονδριακών διαταραχών κατά τις οποίες οι ιστοί και τα όργανα τα οποία προσβάλλονται είναι εκείνα με την μεγαλύτερη ανάγκη σε ενέργεια. Τα συμπτώματα των ασθενειών που προέρχονται από μιτοχονδριακές μεταλλάξεις μπορούν να εμφανιστούν από την νεογνική ηλικία ή και μετέπειτα στην παιδική-ενήλικη ηλικία (Lightowers, Taylor and Turnbull 2015) Ο επιπολασμός των ασθενειών αυτών στους

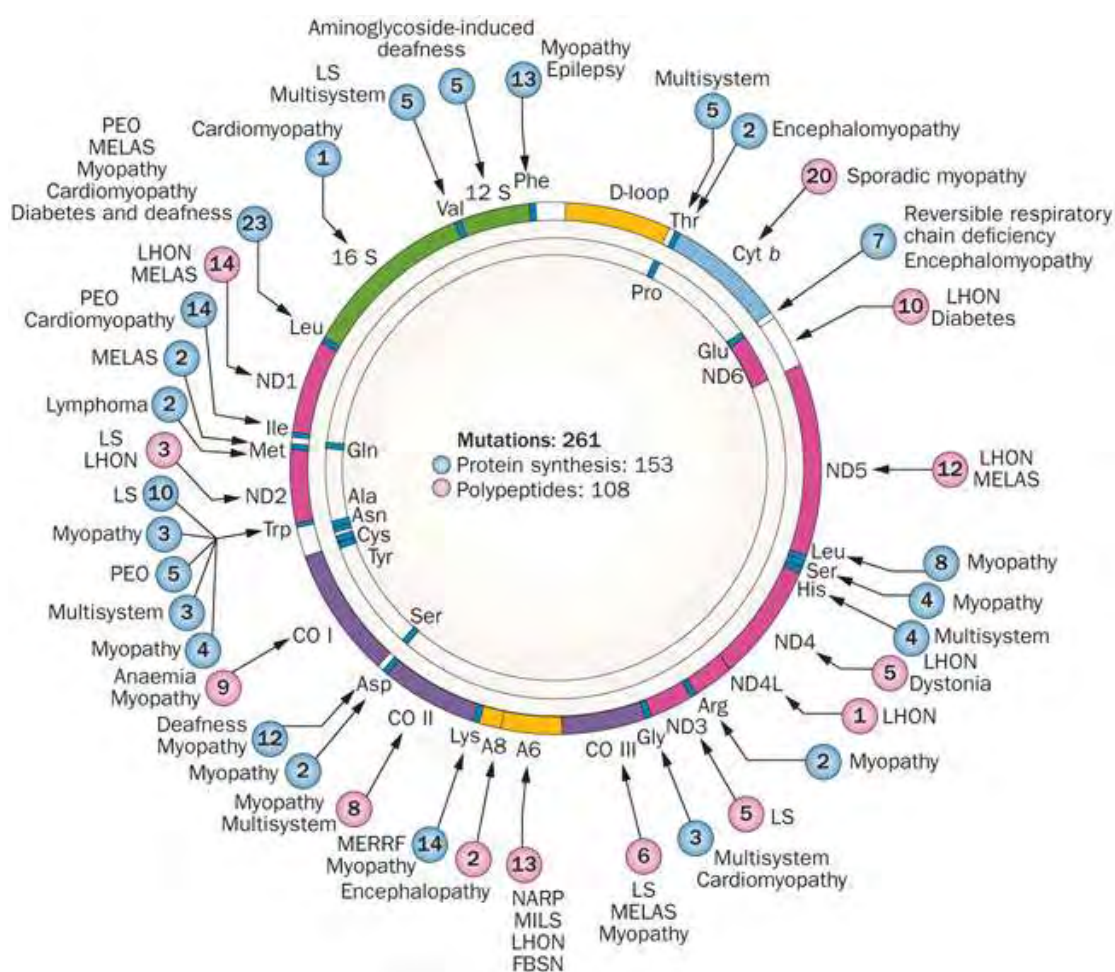
ενήλικες είναι 12,5 ανά 100000 (Gorman, et al. 2015) και 4,7 ανά 100000 στα παιδιά (Skladal, Halliday and Thorburn 2003). Η συσχέτιση μεταξύ μεταλλάξεων και ασθενειών στις περισσότερες μιτοχονδριακές διαταραχές είναι ελλιπής.

Η φύση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος δίνει την δυνατότητα εμφάνισης ετεροπλασμίας λόγω των πολλών αντίγραφων που περιέχονται σε κάθε μιτοχόνδριο και κατ' επέκταση σε κάθε κύτταρο. Τα αντίγραφα αυτά μπορεί να προέρχονται είτε από τον «άγριο» τύπο γονιδίου (φυσιολογικό γονίδιο) είτε από το μεταλλαγμένο. Από την άλλη, μπορεί να εμφανίζουν ομοπλασμία όπου όλα τα γονίδια είναι φυσιολογικά. Οι ετεροπλασμικές μεταλλάξεις εμφανίζουν ένα μεταβλητό όριο, δηλαδή ένα επίπεδο στο οποίο το κύτταρο μπορεί να φέρει τα μεταλλαγμένα γονίδια αλλά να μην παρουσιάζει την ασθένεια (Stewart and Chinnery 2015) Όταν όμως ο αριθμός μεταλλαγμένων γονιδίων υπερβαίνει το συγκεκριμένο όριο εμφανίζονται μεταβολικές δυσλειτουργίες στο κύτταρο και κλινικά συμπτώματα στον ιστό. Σημειακές μεταλλάξεις και μεγάλου βαθμού ελλείψεις είναι οι δυο πιο συχνές περιπτώσεις μεταλλάξεων που προκαλούν μιτοχονδριακές ασθένειες, με τις πρώτες να μεταβιβάζονται συνήθως από την μητέρα στους απόγονους της και τις δεύτερες να πρωτοεμφανίζονται κατά την διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης.

Σημειακές μιτοχονδριακές μεταλλάξεις (συμπεριλαμβανομένων και των μη αναστρέψιμων) αποτελούν μία σημαντική αιτία για διάφορες ασθένειες του ανθρώπου, με επικράτηση στο πληθυσμό 1/200 (Chinnery, et al. 2012). Σημειακές μεταλλάξεις έχουν εντοπιστεί σε κάθε μιτοχονδριακό γονίδιο και έχουν συσχετισθεί με ένα μεγάλο εύρος ασθενειών, από την μη συνδρομική νευροαισθητήρια κώφωση μέχρι και την MELAS (Μιτοχονδριακή εγκεφαλομυοπάθεια, γαλακτική οξέωση, με επεισόδια παρόμοια των εγκεφαλικών επεισοδίων). Τα κλινικά συμπτώματα μπορεί να εμφανιστούν κατά την παιδική ή ενήλικη ζωή, με τις μεταλλάξεις να μεταβιβάζονται από την μητέρα περίπου στο 75% των περιπτώσεων και περίπου στο 25% των περιπτώσεων να συμβαίνουν κατά την γονιμοποίηση (Sallevelt, et al. 2017)

Μεμονωμένες, μεγάλες σε έκταση ελλείψεις εμφανίζουν έναν επιπολασμό 1,5/100000 (Gorman, et al. 2015), με περίπου το 65% των περιπτώσεων να εμφανίζουν χρόνια προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία, περίπου το 30% των περιπτώσεων το σύνδρομο Kearns-Sayre (οφθαλμο-κρανιακή και σωματική νευρομυική διαταραχή με ακανόνιστες κόκκινες ίνες) και λιγότερο από το 5% των

περιπτώσεων να εμφανίζουν το σύνδρομο Pearson. Το σύνδρομο Pearson είναι η πιο σοβαρή ασθένεια που έχει συσχετισθεί με μεγάλες ελλείψεις στο μιτοχondριακό γενετικό υλικό και οι ασθενείς εμφανίζουν κατά τις πρώτες μέρες της ζωής τους σιδηροβλαστική αναιμία και δυσλειτουργία της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος. Η κατάσταση των ασθενών συχνά είναι τόσο σοβαρή που καταλήγει σε βρεφικό θάνατο (Rotig, et al. 1990).



**Εικόνα 4:** Ασθένειες που οφείλονται σε μεταλλάξεις του μιτοχondριακού DNA.

(Dimauro, Schon, et al. 2013)

Οι ασθενείς με το σύνδρομο Kearns – Sayre εμφανίζουν τα πρώτα τους συμπτώματα κοντά στην ηλικία των 20 ετών, όπως είναι η βλεφαρόπτωση και/ ή χρόνια προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία και χρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια. Πολλές φορές μπορεί να προσβληθούν περισσότερα συστήματα και ο ασθενής να εμφανίζει μυοπάθεια, αταξία ή διαταραχές στην καρδιακή σύσπαση (Mancuso, et al. 2015) Η χρόνια προοδευτική εξωτερική

οφθαλμοπληγία είναι η πιο απλή περίπτωση έλλειψης στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα και τα συμπτώματα της είναι οφθαλμοπληγία, βλεφαρόπτωση και μυοπάθεια.

Τέλος, οι μεταλλάξεις που γίνονται σε γονίδια που κωδικοποιούν tRNA είναι σημειακές και εμφανίζουν διάφορους φαινότυπους ανάλογα με τον ιστό που προσβάλλουν, για παράδειγμα οι καρδιοπάθειες συχνά συσχετίζονται με μεταλλάξεις στο γονίδιο του tRNA της ισολευκίνης, ο διαβήτης εμφανίζεται συχνά όταν υπάρχει η μετάλλαξη T14709C στο γονίδιο του tRNA του γλουταμινικού οξέος και τέλος πολλαπλά λιπώματα έχουν εμφανιστεί σε ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο του tRNA της λυσίνης. Όλα τα παραπάνω είναι συσχετίσεις και όχι η εξήγηση για την εμφάνιση συγκεκριμένων φαινότυπων (Dimauro and Davidzon, Mitochondrial DNA and disease 2005).



## **2.6 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ**

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια χρόνια νόσος που χαρακτηρίζεται από διαταραχή του μεταβολισμού των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών. Οφείλεται σε διαταραχή είτε της έκκρισης είτε της δράσης της ινσουλίνης είτε σε συνδυασμό και των δύο, με αποτέλεσμα την σχετική ή πλήρη έλλειψη της ινσουλίνης (American Diabetes Association 2017). Το κύριο χαρακτηριστικό του σακχαρώδη διαβήτη, η χρόνια υπεργλυκαιμία, είναι υπεύθυνη για βλάβες σε πολλά όργανα και ιδιαίτερα στους νεφρούς, τον αμφιβληστροειδή χιτώνα, στα νεύρα και στις αρτηρίες.

### **2.6.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ**

Ο σακχαρώδης διαβήτης μπορεί να κατηγοριοποιηθεί στις παρακάτω γενικές κατηγορίες (American Diabetes Association 2017)

1. Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 ( εμφανίζεται λόγω της αυτοάνοσης καταστροφής των β-κυττάρων του παγκρέατος, οδηγώντας συνήθως σε απόλυτη έλλειψη ινσουλίνης)
2. Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2 ( εμφανίζεται λόγω σταδιακής μείωσης της έκκρισης ινσουλίνης από τα β κύτταρα του παγκρέατος σε συνδυασμό με μία προ υπάρχουσα αντίσταση στην ινσουλίνη)
3. Σακχαρώδης Διαβήτης κύησης (αποκαλείται ο διαβήτης, η διάγνωση του οποίου γίνεται στο 2ο ή 3ο τρίμηνο της εγκυμοσύνης, σε γυναίκες που δεν είχαν διαγνωστεί με διαβήτη πριν την έναρξη της κύησης)
4. Συγκεκριμένοι τύποι σακχαρώδη διαβήτη που οφείλονται σε άλλες αιτίες, παραδείγματος χάρη το σύνδρομο μονογονιδιακού διαβήτη ( όπως ο νεογνικός διαβήτης, νεανικός διαβήτης της ενηλικίωσης [MODY]), ασθένειες της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος (όπως η κυστική ίνωση) και ο διαβήτης προκαλούμενος από φαρμακευτικές ή χημικές ουσίες (όπως η χρήση γλυκοκορτικοειδών που χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση του HIV/AIDS, ή στη μετεγχειρητική περίοδο μετά από μεταμόσχευση.

### **2.6.2 Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 1**

Παλιότερα γνωστός και ως ινσουλινοεξαρτώμενος ή νεανικός διαβήτης. Ως σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 ορίζεται , όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το

μεταβολικό σύνδρομο το οποίο χαρακτηρίζεται από αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος με αποτέλεσμα την πλήρη έλλειψη ή την ελάχιστη έκκριση ινσουλίνης (Bluestone et al. 2010) . Έχει υπολογισθεί ότι όταν εκδηλωθεί η νόσος έχει ήδη απολεσθεί περίπου το 90% των β-κυττάρων και από εκεί και πέρα ο ρυθμός καταστροφής είναι διαφορετικός σε κάθε ασθενή, με τους νεότερους σε ηλικία ασθενείς να εμφανίζουν ταχεία καταστροφή. Παρόλο που τα περισσότερα αυτοάνοσα νοσήματα επηρεάζουν εμφανίζονται πιο τακτικά στις γυναίκες, ο Διαβήτης τύπου 1 φαίνεται να εμφανίζεται πιο συχνά στα νεαρά αγόρια και τους ενήλικες άντρες (Ostman et al. 2008)

Η αιτία πίσω από την αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος θεωρείται πως είναι η αλληλεπίδραση περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων. Στους γενετικούς παράγοντες περιλαμβάνονται γονίδια που εντοπίζονται σε διαφορετικές θέσεις, με τα περισσότερα να εντοπίζονται στο HLA σύστημα ιστοσυμβατότητας (Noble et al. 2010). Δείκτες της αυτοάνοσης φύσης της νόσου αποτελούν αντιησιδιακά αυτοαντισώματα , αυτοαντισώματα έναντι της ινσουλίνης, της δεκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού οξέος (GAD<sub>65</sub>) και αυτοαντιγόνα συσχετιζόμενα με το ινσουλίνωμα IA2A και για τον μεταφορέα ψευδαργύρου 8 (Ziegler & Nepom 2010) (Bingley 2010). Η συγκέντρωση των αντισωμάτων έναντι στην ινσουλίνη φαίνεται να επηρεάζει την ηλικία εμφάνισης του διαβήτη τύπου 1 στα νεογνά (Bingley 2010; Parikka et al. 2012) Στους περιβαλλοντικούς παράγοντες φαίνεται η εποχή γέννησης να επηρεάζει την εμφάνιση διαβήτη τύπου 1 (Kahn et al. 2009), καθώς επίσης η έκθεση των ατόμων σε διάφορους ιούς και άλλα αλλεργιογόνα.

### Ιδιοπαθής σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1

Σε αυτή την σπάνια μορφή διαβήτη κατατάσσονται μερικές μορφές σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 που δεν εμφανίζουν σαφή αιτιολογία, αφού δεν υπάρχουν ενδείξεις αυτοάνοσης καταστροφής των β-κυττάρων του παγκρέατος. Παρατηρείται κυρίως σε άτομα Ισπανικής ή Αφρικανικής καταγωγής και παρουσιάζει σαφή κληρονομικότητα, χωρίς όμως να συσχετίζεται με γονίδια που βρίσκονται στο HLA σύστημα ιστοσυμβατότητας (Gianani et al. 2010) .

### **2.6.3. Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2**

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 είναι η μορφή διαβήτη με τον μεγαλύτερο επιπολασμό παγκοσμίως. Παλαιότερα ήταν γνωστός ως μη-ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης ή διαβήτης των ενηλίκων, παρόλα αυτά οι ονομασίες αυτές δεν είναι πλέον αποδεκτές καθώς οι διαβητικοί τύπου 2 κάποια στιγμή καταλήγουν σε ένα φαρμακευτικό σχήμα το οποίο περιέχει ινσουλίνη καθώς επίσης πλέον εμφανίζεται και σε μικρότερες ηλικίες (Τεντολούρας et al. n.d.) (Rosenbloom et al. 2008).

Πρόκειται για μια ανομοιογενή ομάδα ασθενών, στην οποία περιλαμβάνονται άτομα με διαταραχή στην έκκριση της ινσουλίνης και άλλοτε συνύπαρξη διάφορου βαθμού ινσουλινοαντίστασης (American Diabetes Association 2017) . Σε ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό (περίπου 80%) οι ασθενείς αυτοί είναι παχύσαρκοι ή εμφανίζουν κεντρική κατανομή του λίπους τους κατά την διάγνωση της ασθένειας. Ο διαβήτης τύπου 2 χαρακτηρίζεται και αυτός από αλληλεπίδραση γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Αυτός ο τύπος διαβήτη χαρακτηρίζεται από ισχυρότερη γενετική προδιάθεση σε σύγκριση με τον διαβήτη τύπου 1, ακόμη και αν τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση του δεν έχουν εντοπιστεί ακριβώς. Από την άλλη, στους περιβαλλοντικούς παράγοντες περιλαμβάνονται κυρίως η παχυσαρκία και η απουσία σωματικής άσκησης από την καθημερινότητα του ασθενούς (Rosenbloom et al. 2008; Taksali et al. 2008). Η συχνότητα της αυξάνεται με την πρόοδο της ηλικίας και μπορεί να υπάρχει ασυμπτωματικά ή σχεδόν ασυμπτωματικά . Συνήθως διαγιγνώσκεται στα πλαίσια ενός τυπικού προσυμπτωματικού ελέγχου (Rosenbloom et al. 2008). Τέλος, οι ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 δεν χρειάζονται ινσουλίνη για να επιβιώσουν, στην αρχή της νόσου, και σπάνια θα εμφανίσουν διαβητική κετοοξέωση.

### **2.6.4. Διαβήτης Κύησης**

Ως σακχαρώδης διαβήτης κύησης ορίζεται η διάγνωση ή η διαπίστωση οποιουδήποτε βαθμού διαταραχής στην ανοχή της γλυκόζης, που παρουσιάζεται για πρώτη φορά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Χαρακτηρίζεται κυρίως από αντίσταση στην ινσουλίνη και σε μικρότερο βαθμό από διαταραχή της ινσουλινοέκκρισης. Ο διαβήτης κύησης εμφανίζεται συνήθως κατά το 2ο και 3ο τρίμηνο της κυοφορίας, όταν οι συγκεντρώσεις των ορμονών που ανταγωνίζονται την

δράση της ινσουλίνης είναι υψηλές στο αίμα. Παχύσαρκες εγκυμονούσες άνω των 30 χρόνων με έστω και ένα συγγενή πρώτου βαθμού που πάσχει από Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2, έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο για την εμφάνιση διαβήτη κύησης (Solomon et al. 1997). Συνίσταται έλεγχος της εγκυμονούσας με την διαδικασία της ανοχής στη γλυκόζη κατά το χρονικό διάστημα της 24ης με 28ης εβδομάδας (American Diabetes Association 2017).

Η σωστή διάγνωση και αντιμετώπιση του διαβήτη της κύησης είναι σημαντική γιατί έχει επιπτώσεις στο έμβρυο όσο και στη μητέρα. Έγκυες με διαβήτη της κύησης εμφανίζουν συχνότερα υδράμνιο υπέρταση ή τοξιναιμία της κύησης καθώς και πρόωρο τοκετό τέλεια. Η συχνότητα της καισαρικής τομής είναι πολύ συχνότερη σε περιπτώσεις με διαβήτη της κύησης σε σχέση με φυσιολογικές γυναίκες η μακροσωμία του εμβρύου είναι η σημαντικότερη αιτία για τη διενέργεια της καισαρικής τομής (American Diabetes Association 2017; HAPO Study Cooperative Research Group et al. 2008).

Όλες οι επιπλοκές που εμφανίζουν τα νεογνά διαβητικών μητέρων παρουσιάζονται με αυξημένη συχνότητα και στον διαβήτη της κύησης και συγκεκριμένα ο ίκτερος 16%, η υπογλυκαιμία 7%, υπασβεστιαμία 1% και οι τραυματικές βλάβες κατά τον τοκετό 3%. Ο κίνδυνος για εμφάνιση παχυσαρκίας και διαβήτη τύπου 2 κατά την εφηβική και ενήλικη ζωή είναι σημαντικά αυξημένος (HAPO Study Cooperative Research Group et al. 2008).

#### **2.6.5. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ – ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ A3243G ΣΤΟ TRNA LEU (UUR)**

Ο μιτοχονδριακός διαβήτης εμφανίζεται για πρώτη φορά συνήθως στην ενήλικη ζωή. Κληρονομείται από τη μητέρα, καθώς μόνο η μητέρα μεταφέρει τα μιτοχόνδρια της στην επόμενη γενιά, και συχνά συσχετίζεται με απώλεια της ακοής και πιο συγκεκριμένα των υψηλών τόνων. Η πιο συχνή μετάλλαξη η οποία οδηγεί σε μιτοχονδριακό διαβήτη είναι η A32 43G μετάλλαξη στο γονίδιο του tRNA (Leu, UUR) των μιτοχονδρίων (J. Antonie Maassen 2004) (Maassen, et al. 2006)

Η αλλοίωση στο γονίδιο του tRNA αυτού, οδηγεί σε ανεπαρκή σύνθεση διάφορων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών και σε μια γενικευμένη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Παρόλο που ο φαινότυπος της μετάλλαξης αυτής μοιάζει με του

διαβήτη τύπου 2, η θεραπεία με συχνά χρησιμοποιούμενα φάρμακα όπως η μετφορμίνη, πρέπει να αποφεύγεται εξαιτίας της τάσης των ατόμων αυτών να εμφανίζουν γαλακτική οξέωση, η οποία αποτελεί μία εμφανής αλλά σπάνια παρενέργεια του φαρμάκου.

Ο A3243G τύπος μιτοχονδριακού διαβήτη χαρακτηρίζεται από μειωμένη παραγωγή ινσουλίνης ως ερέθισμα στην υψηλή γλυκόζη αίματος, υποδηλώνοντας πως το πρόβλημα εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια των β κύτταρων του παγκρέατος. Όμως, πρόσφατες έρευνες έχουν αποδείξει πως η A3243G μετάλλαξη συσχετίζεται με ηπατική δυσλειτουργία (Taakashi, et al. 2008) και μειωμένη πρόσληψη γλυκόζης από τους σκελετικούς μυς (Lindroos, et al. 2009).

Το σύνδρομο αυτό στην αρχή είναι ελαφρύ και επιδεινώνεται με το πέρασμα του χρόνου. Μία πιθανή εξήγηση σε αυτό είναι ότι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία επιδεινώνεται λόγω των ελεύθερων ριζών που οφείλονται στην υπεργλυκαιμία, οξειδωτική καταστροφή και επιδεινούμενη υπεργλυκαιμία (Green, Brand και Murphy 2004). Τα β- κύτταρα του παγκρέατος φαίνεται πως είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην οξειδωτική καταστροφή. Τα β- κύτταρα τα οποία εκτίθενται σε συνεχή υπεργλυκαιμία, η οποία έχει ως συνέπεια την αυξημένη ποσότητα ενδοκυττάριου ασβεστίου, είναι επιρρεπή σε μεγάλη μείωση της ποσότητας του ADP και της κατανάλωσης του (Wiederkehr and Wollheim 2008), οδηγώντας σε υψηλότερο δυναμικό στη μεμβράνη και κατά συνέπεια μεγαλύτερη παραγωγή ελευθέρων ριζών. Ακόμη, τα β- κύτταρα έχουν σχετικά χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που παράγουν αντιοξειδωτικά ένζυμα (Lenzen, Drinkgern and Tiedge 1996) και τα επίπεδα γαλακτικής αφυδρογονάσης είναι χαμηλά (Sekine N 1994), έτσι η γλυκόζη μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια ως υπόστρωμα και δημιουργείται υψηλό δυναμικό στη μεμβράνη.

Έχουν προταθεί και άλλοι λόγοι για την επιδείνωση του μιτοχονδριακού διαβήτη με τα χρόνια. Μειωμένος αριθμός ενεργών β-κυττάρων μπορεί να μειώσει την απόκριση έκκρισης της ινσουλίνης παρουσία γλυκόζης, με αποτέλεσμα να ενεργοποιεί το μηχανισμό παραγωγής ινσουλίνης σε υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης. Επιπλέον, η γενικευμένη αναπνευστική καταστολή στο κύτταρο έχει ως αποτέλεσμα μειωμένο σχηματισμό ATP, το οποίο θα επηρεάσει την απελευθέρωση ινσουλίνης που προκαλείται από τη γλυκόζη.

Όπως αναφέρθηκε, τα κύτταρα περιέχουν πολλά μιτοχόνδρια, τα οποία μπορεί να φτάσουν μέχρι και χιλιάδες ανά κύτταρο και το καθένα μιτοχόνδριο περιέχει πολλαπλά αντίγραφα μιτοχονδριακού DNA. Όμως, οι μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA εντοπίζονται μόνο σε ένα ποσό των μιτοχονδριακών DNA μορίων και αυτή η κατάσταση αναφέρεται ως ετεροπλασμία. Σε κύτταρα που εντοπίζεται η μετάλλαξη A3243G, η έκταση της ετεροπλασμίας σχετίζεται με την κατανάλωση οξυγόνου από τα μιτοχόνδρια, η οποία φαίνεται να μειώνεται απότομα όταν η ετεροπλασμία φθάσει περίπου στο 70% (Maassen, et al. 2006). Αντίθετα, δεν είναι ξεκάθαρο ότι η ετεροπλασμία επιδεινώνεται με την ηλικία, επομένως αυτό δεν εξηγεί την καθυστερημένη έναρξη και εξέλιξη του μιτοχονδριακού διαβήτη.

Από κλινικής άποψης, ο μιτοχονδριακός διαβήτης πρέπει να διαφοροποιείται από άλλες μη συχνές μονογονιδιακές ασθένειες, όπως ο διαβήτης MODY, εξαιτίας ελαττωμάτων στους παράγοντες γλυκοκινάσης ή ηπατικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Αυτές οι ασθένειες εμφανίζονται συχνά σε μικρή ηλικία (Gat-Yablonski G 2006). Η μετάλλαξη A3243G εντοπίζεται επίσης στο σύνδρομο MELAS (Goto Y 1990).

#### 2.6.6. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ

Το 1997 η Αμερικάνικη Διαβητολογική Εταιρεία πρότεινε και αργότερα ο Παγκόσμιος οργανισμός Υγείας (1999) υιοθέτησε την αναθεώρηση των διαγνωστικών κριτηρίων για το σακχαρώδη διαβήτη (1,2), τα οποία παραμένουν μέχρι και σήμερα ίδια και αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα. (American Diabetes Association 2017)

<b><u>Κριτήρια Διάγνωσης Σακχαρώδη Διαβήτη</u></b>
<b>Γλυκόζη Νηστείας <math>\geq 126</math> mg/dl.</b> <i>Νηστεία ορίζεται ως η μη λήψη θερμίδων για 8 ώρες.</i>
<b>Δοκιμασία ανοχής γλυκόζης. τιμή γλυκόζης στις 2 ώρες <math>\geq 200</math>mg/dl.</b> <i>Η δοκιμασία πρέπει να πραγματοποιείται όπως ορίζεται από ΠΟΥ, χρησιμοποιώντας ένα φορτίο γλυκόζης 75g άνδρης γλυκόζης διαλυμένη στο νερό.</i>
<b>Γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη <b>HbA1C <math>\geq 6,5\%</math>.</b></b>
<b>Σε ασθενή με συμπτώματα υπεργλυκαιμίας ή με υπεργλυκαιμικό επεισόδιο, τυχαία τιμή γλυκόζης <math>\geq 200</math> mg/dl.</b>

*\*Σε περίπτωση απουσίας ξεκάθαρης υπεργλυκαιμίας οι δοκιμασίες πρέπει να επαναληφθούν.*

### ***Πίνακας 1: Διαγνωστικά κριτήρια Σακχαρώδη Διαβήτη***

## **2.7. ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ**

### **2.7.1. ΟΞΕΙΕΣ ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ**

#### **Διαβητική Κετοοξέωση**

Η οξεία απορρύθμιση του διαβήτη προκαλεί υπεργλυκαιμία, η οποία μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση διαβητικής κετοοξέωσης. Εμφανίζεται συνήθως σε άτομα με διαβήτη τύπου 1, ιδιαίτερα σε παιδιά και εφήβους και σπάνια σε άτομα με διαβήτη τύπου 2. Η διαβητική κετοοξέωση οφείλεται σε μία κατάσταση απόλυτης και σχετικής έλλειψης ινσουλίνης και σε αύξηση των αντισταθμιστικών δρώντων ορμονών. Λόγω της έλλειψης ινσουλίνης η γλυκόζη δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή ενέργειας. Έτσι, οργανισμός εξαρτάται από τη χρησιμοποίηση του λίπους ως πηγή ενέργειας. Η διάσπαση του λίπους οδηγεί στη δημιουργία και κετοξικών σωμάτων. Η διαβητική κετοοξέωση χαρακτηρίζεται από την τριάδα της οξέωσης (συνχά το pH μικρότερο από 7,3), της κέτωσης (αύξηση της συγκέντρωσης του υδροξυβουτυρικού και ακετοξικού οξέος στο πλάσμα και στα ούρα), και της υπεργλυκαιμίας (κατά κανόνα το σάκχαρο αίματος είναι μεγαλύτερο από 300 mg/dl. Συμπτώματα της διαβητικής κετοοξέωσης είναι η πολυουρία, πολυδιψία, οξεωτική αναπνοή, η απόπνοια οσμής “σάπιου μήλου” λόγω της κυκλοφορίας κετονικών σωμάτων. Καθώς επίσης, συνυπάρχει σοβαρού βαθμού αφυδάτωση. Με φθίνουσα σειρά συχνότητας τα συνήθη αίτια κετοοξέωσης είναι: παράλειψη ή μείωση της χορηγούμενης ινσουλίνης, μη διαγνωσμένος σακχαρώδης διαβήτης και παρεμπόδιουσα νόσος (συνήθως οξεία λοίμωξη). Η διαβητική κετοοξέωση αν δεν αντιμετωπιστεί έγκαιρα οδηγεί σε κώμα και στο θάνατο (Westerberg 2013).

## Υπερωσμωτικό μη Κετωσικό Κώμα

Ως Υπερωσμωτικό μη κετωσικό κώμα ορίζεται το σύνδρομο με την ανεύρεση ωσμωτικότητας πλάσματος μεγαλύτερη των 350mOsm/L, τιμών γλυκόζης μεγαλύτερη των 600mg/dl και απουσία κετοξέωσης σε ένα διαβητικό ασθενή που παρουσιάζει διαταραχή του επιπέδου συνείδησης. Το Υπερωσμωτικό μη κετωσικό κώμα εμφανίζεται σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας που έχουν διαβήτη τύπου 2 και αρκετά συχνά μπορεί να είναι η πρώτη εκδήλωση διαβήτη τύπου 2. Σε αντίθεση με το κετοοξικό κώμα, υπάρχουν συμπτώματα επί αρκετές ημέρες πριν την εγκατάσταση του, καθώς επίσης χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη αφυδάτωση ενώ συνυπάρχουν υπερνατριαιμία και διαταραχές του επιπέδου συνείδησης (Westerberg 2013; Pasquel & Umpierrez 2014).

### 2.7.2. ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΑ

Ως υπογλυκαιμία ορίζεται η διαταραχή που χαρακτηρίζεται από χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα, με χαρακτηριστικό, αλλά και μη ειδική συμπτωματολογία. Επειδή τα συμπτώματα της υπογλυκαιμίας είναι μη ειδικά για να αποδοθούν σε αυτή πρέπει να αποδειχθεί η ύπαρξη της τριάδας του Whipple, δηλαδή η ύπαρξη χαμηλής τιμής γλυκόζης στο πλάσμα (<55 mg/dl) με ταυτόχρονη εκδήλωση συμπτωματολογίας δηλωτικής υπογλυκαιμίας και επακόλουθη εξαφάνιση των συμπτωμάτων με τη διόρθωση της υπογλυκαιμίας. Τα συμπτώματα από την ενεργοποίηση του αυτόνομου νευρικού συστήματος είναι η εφίδρωση, ο τρόμος, η ωχρότητα, η ταχυκαρδία και το αίσθημα προκαλούν παλμών, το αίσθημα πείνας και αυξημένη παραγωγή σιέλου. Νευρογλυκοπενικά συμπτώματα είναι η σύγχυση, η απώλεια προσανατολισμού στο χώρο και το χρόνο, η επιθετική συμπεριφορά, οι σπασμοί, η απώλεια συνείδησης και το κώμα. Στην μη ειδική συμπτωματολογία της υπογλυκαιμίας περιλαμβάνονται η κεφαλαλγία, η ζάλη και η αδυναμία (S. Oyer 2013).

### 2.7.3. ΜΑΚΡΟΧΡΟΝΙΕΣ ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΤΟΥ ΔΙΑΒΗΤΗ

Οι μακροχρόνιες επιπλοκές του διαβήτη είναι αρκετά συχνές και στους δύο τύπους του διαβήτη και διακρίνονται σε μακροαγγειοπάθειες και μικροαγγειοπάθειες.



## Παθογενετικοί μηχανισμοί των μακροαγγειοπαθειών

Ο όρος διαβητική μακροαγγειοπάθεια περιγράφει την κλινική έκφραση της αθηρωμάτωσης στα διαβητικά άτομα. Οι κλινικές εκδηλώσεις της διαβητικής μακροαγγειοπάθειας περιλαμβάνουν τη στεφανιαία νόσο, την περιφερική αποφρακτική αρτηριοπάθεια και την εγκέφαλο αγγειακή νόσο. Εκτός της υπεργλυκαιμίας, η δυσλιπιδαιμία που παρατηρείται στο διαβήτη τύπου 2 έχει ιδιαίτερη σημασία στην έναρξη και την εξέλιξη της αθηρωμάτωσης. Αν και οι τιμές της ολικής χοληστερόλης είναι συγκρίσιμες μεταξύ διαβητικών και μη διαβητικών ατόμων ο διαβήτης τύπου 2 χαρακτηρίζεται από αύξηση των τριγλυκεριδίων τόσο σε κατάσταση νηστείας όσο και μετά τα γεύματα, μείωση των τιμών της HDL χοληστερόλης και από την ύπαρξη μικρών και πυκνών μορίων LDL χοληστερόλης, τα οποία είναι εξαιρετικά αθηρογόνα (Alexander et al. 2000).

Η παρατεταμένη υπεργλυκαιμία προκαλεί μη ενζυματική γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών στους ιστούς με σχηματισμό προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης. Η εναπόθεση γλυκοζυλιωμένων ινών κολλαγόνου και ελαστίνης και πρωτεογλυκάνων στο αγγειακό τοίχωμα προκαλεί πάχυνση και αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου. Τα προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης προάγουν τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων, τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την ενεργοποίηση των παραγόντων πήξης, ασκούν χημειοτακτική δράση στα φλεγμονώδη κύτταρα και αναστέλλει τη δράση του μονοξειδίου του αζώτου (Henry 2001).

## Στεφανιαία Νόσος

Η στεφανιαία νόσος αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου στους διαβητικούς ασθενείς. Οι αθηρωματικές βλάβες στις στεφανιαίες αρτηρίες έχουν συνήθως πολυεστιακή εντόπιση και προσβάλλονται ακόμη και οι περιφερικοί μικροί κλάδοι. Οι τυπικές στηθαγικές εκδηλώσεις μπορεί να απουσιάζουν λόγω της συνυπάρχουσας διαβητικής νευροπάθειας (Al-Nozha et al. 2016).

## Περιφερική Αποφρακτική Αρτηριοπάθεια

Η συχνότητα της περιφερικής αποφρακτικής αρτηριοπάθειας είναι σημαντικά αυξημένη στα διαβητικά άτομα. Οι αποφρακτικές βλάβες είναι πολυεστιακές και

συχνά εντοπίζονται κάτω από το τριχασμό της ιγνυακής αρτηρίας. Τα συμπτώματα που εμφανίζονται λόγω της περιφερικής αρτηριοπάθειας είναι το αίσθημα ψύχους στα κάτω άκρα, η διαλείπουσα χωλότητα και σε βαρύτερες περιπτώσεις το άλγος ηρεμίας (Κατσιλάμπρος et al. 2000)

#### Εγκεφαλοαγγειακή Νόσος

Οι αποφρακτικές βλάβες των καρωτίδων και των αρτηριών του εγκεφάλου είναι βαρύτερες στα διαβητικά άτομα και ο κίνδυνος εμφάνισης αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου μεγαλύτερος, μικρότερος όμως από τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων, μεταξύ των διαβητικών. Οι κλινικές εκδηλώσεις των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων δεν διαφέρουν όμως από εκείνες των μη διαβητικών ατόμων (Roy et al. 2006).

#### **2.7.4 ΔΙΑΒΗΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΑΓΓΕΙΟΠΑΘΕΙΑ**

Ως διαβητική μικροαγγειοπάθεια αναφέρεται η προσβολή των πολύ μικρών τριχοειδών και προ τριχοειδών αγγείων, που έχει ως συνέπεια την επιβάρυνση της μικροκυκλοφορίας. Οι βλάβες αφορούν τον αμφιβληστροειδή, τους νεφρούς και το νευρικό ιστό. Η διαβητική μικροαγγειοπάθεια προκαλεί προοδευτική στένωση του αυλού των αγγείων με συνέπεια την ανεπαρκή αιμάτωση και την υποξία του προσβαλλόμενου ιστού και κατ' επέκταση οργάνου. Στις κλινικές εκδηλώσεις της διαβητικής μικροαγγειοπαθειας περιλαμβάνεται η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, η διαβητική νεφροπάθεια και η διαβητική νευροπάθεια.

#### Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια

Η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια οφείλεται στην αύξηση της διαπερατότητας των τριχοειδών αγγείων στον αμφιβληστροειδή του οφθαλμού. Σχετίζεται άμεσα με τη διάρκεια και τη ρύθμιση του διαβήτη. Η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια επηρεάζει ένα στα τρία άτομα με διαβήτη και είναι ο κύριος λόγος απώλειας της όρασης σε νεαρά άτομα. ασθενείς με διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια έχει αναφερθεί πως έχουν χαμηλότερη ποιότητα ζωής χαμηλότερο φυσική συναισθηματική και κοινωνική κατάσταση και καταναλώνουν περισσότερους πόρους από το σύστημα υγείας (Cheung et al. 2010).

#### Διαβητική Νεφροπάθεια

Η διαβητική νεφροπάθεια αποτελεί τη συχνότερη αιτία νεφρικής ανεπάρκειας. Η ιστολογική εμφάνιση των βλαβών και η εξέλιξή της είναι ίδια και στους δύο τύπους διαβήτη.

Η εξέλιξη της νεφροπάθειας διακρίνεται σε πέντε στάδια. Τα δύο πρώτα στάδια χαρακτηρίζονται από αύξηση της σπειραματικής διήθησης και αύξηση των διαστάσεων των νεφρών. Η καλή ρύθμιση του διαβήτη στο στάδιο αυτό μπορεί να προκαλέσει υποχώρηση των μορφολειτουργικών διαταραχών από τους νεφρούς. Το τρίτο στάδιο (ή στάδιο της λανθάνουσας διαβητικής νεφροπάθειας) χαρακτηρίζεται από μικρολευκωματινουρία δηλαδή απώλεια στα ούρα μικρών ποσοτήτων λευκωματίνης. Το τέταρτο στάδιο (ή στάδιο της πρωτεϊνουρίας) αφορά την κλινική διαβητική νεφροπάθεια και χαρακτηρίζεται από σταθερή απώλεια λευκωματίνης. Στο στάδιο αυτό ο ρυθμός έκπτωσης της νεφρικής λειτουργίας είναι συνεχής. Στο στάδιο αυτό συνυπάρχει σταθερά υπέρταση και το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών έχει αμφιβληστροειδοπάθεια (Haneda et al. 2015).

#### Διαβητική νευροπάθεια

Η χρονιά αύξηση της γλυκόζης στο αίμα προκαλεί βλάβη στο νευρικό ιστό. Η διαβητική νευροπάθεια προσβάλλει άτομα με διαβήτη τύπου 1 και τύπου 2. Η συχνότητα της διαβητικής νευροπάθειας είναι της τάξης του 30% και αυξάνει με την ηλικία και τη διάρκεια του διαβήτη. Διακρίνεται σε νευροπάθεια των περιφερικών σωματικών νεύρων και σε νευροπάθεια του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Η περιφερική νευροπάθεια προσβάλλει τα σωματικά νεύρα στα άνω και κάτω άκρα με τα οποία γίνονται αντιληπτά τα εξωτερικά ερεθίσματα (Zilliox, et al. 2011). Το φυτικό νευρικό σύστημα νευρώνει το σύνολο των οργάνων και η βλάβη του προκαλεί ποικίλες κλινικές εκδηλώσεις. Από το καρδιαγγειακό χαρακτηριστικές εκδηλώσεις είναι η ορθοστατική υπόταση, η ταχυκαρδία ηρεμίας και η ανώδυνη ισχαιμία, το έμφραγμα του μυοκαρδίου. Οι διαταραχές της στύσης ως συνέπεια της αυτόνομης νευροπάθειας είναι συχνές στους άντρες με διαβήτη (Spallone, et al. 2011). Η νευροπάθεια του γαστρεντερικού εκδηλώνεται με γαστροπάρεση διαταραχές της κινητικότητας του οισοφάγου και της χοληδόχου κύστης και διαβητική διάρροια ή δυσκοιλιότητα .

## 2.8. ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ- ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΑ

Τα μιτοχόνδρια εκτελούν μία πληθώρα βιοενεργειακών λειτουργιών οι οποίες είναι υποχρεωτικές για τη ρύθμιση της ενδοκυττάριας παραγωγής ενέργειας. Η αλλοίωση βιοενεργειακών δραστηριοτήτων ενδέχεται να έχει δραματικές συνέπειες για την κυτταρική λειτουργία μέσω της διαταραχής του ενεργειακού φορτίου και της ισορροπίας του κυττάρου.

Αν και η δομή του μιτοχονδριακού DNA περιγράφηκε πριν από 50 χρόνια (Clayton and Vinograd 1967), οι ασθένειες που οφείλονται σε βλάβες στο μονοπάτι της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης έχουν περιγραφεί πολύ νωρίτερα ενώ οι παθολογικές μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού γονιδιώματος δεν είχαν περιγραφεί μέχρι και το 1988. Πλέον έχει καταστήθει σαφές ότι ανάμεσα στις μεταβολικές ασθένειες περιλαμβάνεται και ο σακχαρώδης διαβήτης. Ωστόσο ορισμένοι μηχανισμοί του ρόλου του μιτοχονδρίου σε αυτή την παθολογία εξακολουθούν να χρειάζονται περαιτέρω διευκρίνιση.

Η πιο σημαντική λειτουργία του μιτοχονδρίου είναι η παραγωγή ενέργειας στην μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) μέσω της λειτουργίας της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

Στην μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα εντοπίζονται τέσσερα πρωτεϊνικά συμπλέγματα τα οποία ονομάζονται σύμπλεγμα I, II, III και IV. Κατά τον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος η γλυκόζη μεταβολίζεται και δημιουργεί δότες ηλεκτρονίων. Ο κύριος δότης ηλεκτρονίων είναι το NADH, το οποίο προσφέρει ηλεκτρόνια στο σύμπλεγμα I. Ένας άλλος δότης ηλεκτρονίων που παράγεται κατά τον κύκλο του τρικαρβοξυλικού, από την δεϋδρογονάση του ηλεκτρικού είναι το FADH<sub>2</sub> το οποίο προσφέρει ηλεκτρόνια στο σύμπλεγμα II. Ηλεκτρόνια και από τα δύο συμπλέγματα μεταφέρονται στο συνένζυμο Q. Έπειτα από τους συνένζυμο Q μεταφέρονται στο σύμπλεγμα III, το κυτόχρωμα C, στο σύμπλεγμα IV και εν τέλει στο μοριακό οξυγόνο.

Το σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι έτσι δομημένο ώστε τα επίπεδα ATP να είναι απόλυτα ελεγχόμενα. Καθώς τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται, μερική από την ενέργεια τους χρησιμοποιείται για να μεταφερθούν πρωτόνια διαμέσου της μεμβράνης στα συμπλέγματα I, III και IV. Αυτό δημιουργεί μια διαφορά δυναμικού

στο μήκος της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η ενέργεια από την διαφορά δυναμικού είναι αυτή που οδηγεί στη σύνθεση του ATP από την ATP συνθάση. Εναλλακτικά, οι πρωτεΐνες αποσύνδεσης μπορούν να μειώσουν την διαφορά δυναμικού, δημιουργώντας θερμότητα κρατώντας έτσι την παραγωγή ATP σταθερή.

Όλα αυτά συμβαίνουν στα φυσιολογικά κύτταρα. Αντίθετα στα διαβητικά κύτταρα, στα οποία βρίσκεται μεγάλη ποσότητα γλυκόζης, υπάρχει και μεγαλύτερη ποσότητα γλυκόζης διαθέσιμη προς οξειδωση στο κύκλο του τρικαρβοξυλικού, που έχει ως αποτέλεσμα να παραχθούν μεγαλύτερες ποσότητες δοτών ηλεκτρονίων στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Έτσι, η διαφορά δυναμικού στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων αυξάνεται μέχρι να φτάσει στο κρίσιμο όριο. Σε αυτό το σημείο, η μεταφορά ηλεκτρονίων στο σύμπλεγμα III σταματά, οδηγώντας έτσι τα ηλεκτρόνια να παραμείνουν στο συνένζυμο Q, το οποίο δίνει σταδιακά τα ηλεκτρόνια στο μοριακό οξυγόνο δημιουργώντας έτσι υπεροξειδία. Η μιτοχονδριακή ισομορφή του ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου αποικοδομεί αυτή την ελεύθερη ρίζα οξυγόνο σε υπεροξειδίο του υδρογόνου, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε H<sub>2</sub>O και O<sub>2</sub> μέσω άλλων ενζύμων (Brownlee 2005).

Αυτή η επιταχυνόμενη μείωση του συνενζύμου Q και η παραγωγή ελευθέρων ριζών πιστεύεται ότι είναι η αρχή για τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία που διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στις μεταβολικές διαταραχές που σχετίζονται με το διαβήτη και την ιστοπαθολογία των διαφόρων ιστών.

## **2.9. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση και η ταυτοποίηση μεταλλάξεων σε μιτοχονδριακά γονίδια tRNA σε 57 άτομα που έχουν διαγνωσθεί με διαβήτη τύπου II και λαμβάνουν φαρμακευτική αγωγή. Το γονίδιο που μελετήθηκε είναι το tRNA<sup>Leu</sup>. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μελέτη για το ρόλο των μεταλλάξεων του mtDNA στη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και κατά πόσο συσχετίζεται με την εμφάνιση της νόσου του σακχαρώδη διαβήτη.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στην παρούσα πειραματική μελέτη χρησιμοποιήθηκε βιολογικό υλικό από 57 ανώνυμα δείγματα αίματος από διαγνωσμένους ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 που λαμβάνουν φαρμακευτική αγωγή με αντιδιαβητικά δισκία. Τα κριτήρια ένταξης στην έρευνα ήταν ο ασθενής να έχει τιμές:

- Γλυκόζης νηστείας  $\geq 120\text{mg/dl}$
- Γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη  $\geq 6,5$

Τα δείγματα συλλέχθηκαν από μικροβιολογικά εργαστήρια της περιοχής της Λάρισας και αποθηκεύτηκαν στους  $-20^{\circ}\text{C}$  μέχρι την έναρξη της διαδικασίας της απομόνωσης του DNA.

#### 3.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA

Για την απομόνωση του ολικού DNA χρησιμοποιήθηκαν δύο πρωτόκολλα απομόνωσης: το πρωτόκολλο χλωροφορμίου/ισοπροπανόλης και το kit απομόνωσης NucleoSpin Tissue (Macharey-Nagel) για το οποίο ακολουθήθηκαν τα βήματα που αναφέρονται στο πρωτόκολλο του kit.

Πρωτόκολλο χλωροφορμίου/ισοπροπανόλης:

- Αφού ξεπάγωσαν τα δείγματα, σε σωλήνες Eppendorf των 1.5ml, έγινε ανάμιξη 0,5ml ολικού αίματος με 1ml SSC (Standard Saline Citrate) 1x. Ακολούθησε έντονη ανάδευση στο vortex και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 3 λεπτά.
- Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο υγρό και έγινε διάλυση του ιζήματος σε 1 ml SSC 1x. Ακολούθησε έντονη ανάδευση στο vortex και φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 3 λεπτά.
- Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο υγρό και ακολούθησε διάλυση του ιζήματος σε 0,6 ml οξικού νατρίου 0,2M, 25μl SDS 10% και 15μl διαλύματος πρωτεΐνάσης K (10mg/ml)<sup>2</sup> και ακολούθησε επώαση για 2 ώρες στους  $55^{\circ}\text{C}$  υπό ανάδευση.

---

<sup>2</sup> Η πρωτεΐνάση K συντελεί στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών.

- Μετά την επώαση, προστέθηκε 1ml φαινόλης, ακολούθησε έντονη ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 13000 rpm στους 4°C
- Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκε σε νέους σωλήνες Eppendorf 1.5ml, όπου προστέθηκε 1ml χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκόολης (24:1)<sup>3</sup> και ακολούθησε έντονη ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 13000 rpm στους 4°C.
- Στη συνέχεια έγινε μεταφορά του υπερκείμενου σε νέος σωλήνες Eppendorf 1,5ml και προστέθηκε 1ml ισοπροπανόλης και έγινε επώαση για 20 λεπτά στους -20°C. Μετά την επώαση έγινε φυγοκέντρωση για 20 λεπτά στους 4°C για την κατακρήμιση του DNA.
- Μετά την φυγοκέντρωση, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε 1ml αιθανόλης 70%<sup>4</sup> και ακολούθησε φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στους 4°C
- Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και έγινε επώαση στους 50°C μέχρι να εξατμιστεί εντελώς η αιθανόλη.
- Αφού στέγνωσε το ίζημα, προστέθηκαν 100μl ddH<sub>2</sub>O για επαναδιαλυτοποίηση του DNA και το απομονωμένο DNA αποθηκεύτηκε στους -20°C.

Μετά την ολοκλήρωση της απομόνωσης του DNA, έγινε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης 1,5% με σκοπό την ποιοτική ανίχνευση του mtDNA. Εφόσον η ποσότητα και η ποιότητα του DNA ήταν ικανοποιητικές, ακολούθησε ενίσχυση με τη μέθοδο της PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης).

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή πηκτής αγαρόζης 1,5% είναι:

- 40ml TAE 1x
- 0.6gr αγαρόζης
- 5μl βρωμιούχο αιθίδιο

<sup>3</sup> Η φαινόλη και το μείγμα χλωροφόρμιου/ισοαμυλικής αλκόολης είναι οργανικοί διαλύτες οι οποίοι είναι κατάλληλοι για την εκχύλιση του μείγματος και την απομάκρυνση των πρωτεϊνών και του RNA. Συγκεκριμένα, η φαινόλη καθαρίζει το DNA από τις πρωτεΐνες ενώ το χλωροφόρμιο απομακρύνει τα υπολείμματα της φαινόλης.

<sup>4</sup> Η αιθανόλη προστίθεται για τον καθαρισμό του DNA από τυχόν υπολείμματα από οργανικούς διαλύτες.

Σε κωνική φιάλη των 100ml τοποθετήθηκαν τα 40ml TAE και τα 0,6gr αγαρόζης. Ακολούθησε θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1-2 λεπτά μέχρι την πλήρη διάλυση της αγαρόζης. Στη συνέχεια, προσθέσαμε 5μl βρωμιούχου αιθιδίου<sup>5</sup>. Έπειτα, το διάλυμα μεταφέρθηκε σε κατάλληλες οριζόντιες πλάκες ηλεκτροφόρησης όπου είχαν τοποθετηθεί τα κατάλληλα καλούπια για το σχηματισμό «πηγαδιών». Χρειάστηκαν περίπου 20-30 λεπτά για την πλήρη πήξη του πηκτώματος αγαρόζης.

Έπειτα και αφού η συσκευή συμπληρώθηκε με το ίδιο διάλυμα TAE 1x, έγινε η φόρτωση του δείγματος στη πηκτική αγαρόζης, μέχρι η πηκτική να είναι πλήρως βυθισμένη στο διάλυμα αυτό. Ακολούθησε ανάμιξη 3 μl loading buffer με 3μl δείγματος και τοποθέτησή τους με ιδιαίτερη προσοχή σε κάθε πηγαδάκι της πηκτικής.

Το loading buffer (6x) 10ml περιέχει:

1. 1 ml χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης
2. 5 ml γλυκερόλη, (συμβάλλει στην καθίζηση του δείγματος μέσα στα πηγαδάκια)
3. 0,5 ml TBE 20x
4. 3,5 ml dd-H<sub>2</sub>O

Η τάση που εφαρμόστηκε είναι 100 Volt και τα δείγματα «έτρεξαν» στο πήκτωμα μέχρις ότου διένυσαν τα 2/3 της διαδρομής για περίπου 20-30 λεπτά. Στο τελικό στάδιο, το πήκτωμα παρατηρήθηκε σε συσκευή UV. Όσα δείγματα έδωσαν θετικό αποτέλεσμα χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

### **3.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ PCR (Polymerase Chain Reaction)**

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR (Polymerase Chain Reaction), είναι μία πολύ γρήγορη και οικονομική τεχνική που χρησιμοποιείται για να πολλαπλασιάσει με ακρίβεια μικρά τμήματα του DNA. Κάτι τέτοιο είναι απαραίτητο, γιατί για να γίνει ανάλυση των μεταλλάξεων ή των πολυμορφισμών σε μοριακό επίπεδο, είναι απαραίτητες αρκετά μεγάλες ποσότητες του DNA. Απομονωμένα

---

<sup>5</sup> Το βρωμιούχο αιθίδιο εμφανίζει την χαρακτηριστική ιδιότητα του φθορισμού στο υπεριώδες όταν παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA. Με αυτό τον τρόπο δίνει πρότυπα ζωνώσεων που αντιστοιχούν στην ποσότητα του DNA που δέσμευσε το βρωμιούχο αιθίδιο.



τμήματα DNA θα ήταν αδύνατο να μελετηθούν επαρκώς χωρίς την μέθοδο της PCR. Η PCR ανακοινώθηκε στην επιστημονική κοινότητα για πρώτη φορά το 1985. Σήμερα αντιμετωπίζεται σαν μια από τις πιο σημαντικές επιστημονικές ανακαλύψεις της δεκαετίας και έχει αλλάξει, με επαναστατικό τρόπο, τη μελέτη του DNA. Ο εφευρέτης της μεθόδου Karry Mullis, τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ το 1993. Μέχρι το 1993, η PCR χρησιμοποιήθηκε σε περισσότερες από 7.000 επιστημονικές εργασίες.

### **3.2.1. Η ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ**

Για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA χρησιμοποιώντας την μέθοδο PCR, το δείγμα του DNA αρχικά θερμαίνεται έτσι ώστε να αποδιαταχθεί το δίκλωνο DNA και να διαχωριστεί σε δυο μονόκλωνα τμήματα. Στη συνέχεια ένα ένζυμο, η TAQ πολυμεράση, συνθέτει δυο συμπληρωματικούς κλώνους DNA χρησιμοποιώντας τους αρχικούς κλώνους ως πρότυπα (μήτρες). Αυτή η διαδικασία καταλήγει στον πολλαπλασιασμό του DNA, με κάθε ένα από τα καινούργια μόρια να περιέχει έναν παλιό και έναν καινούργιο κλώνο DNA. Ο κύκλος αυτός αποδιάταξης και σύνθεσης νέου DNA μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές, συνήθως 30 ή 40, καταλήγοντας στο σχηματισμό περισσότερων από 1 δισεκατομμύριο ακριβών αντιγράφων του αρχικού τμήματος του DNA. Το υπόλοιπο γονιδίωμα δεν πολλαπλασιάζεται, και έτσι δεν ανιχνεύεται με τις μοριακές τεχνικές.

Σήμερα, η όλη διαδικασία της PCR έχει αυτοματοποιηθεί με τα καινούργια και πιο άρτια μηχανήματα, και μπορεί να τελειώσει μόλις σε λίγες ώρες. Η όλη διαδικασία των κύκλων της θέρμανσης και της μείωσης της θερμοκρασίας προγραμματίζεται από ένα μηχάνημα, τον θερμικό κυκλοποιητή (PCR thermal cycler), το οποίο έχει τη δυνατότητα να αυξομειώνει την θερμοκρασία της αντίδρασης κάθε λίγα λεπτά ή δευτερόλεπτα, έτσι ώστε να επιτρέψει τη σύνθεση νέων τμημάτων DNA.

Η αντίδραση εκτελείται κυρίως σε όγκο 15-100 μl σε eppendorf των 0,2-0,5 ml στον θερμικό κυκλοποιητή. Τα στάδια ενίσχυσης για την PCR στον θερμικό κυκλοποιητή ήταν τα ακόλουθα (τα στάδια 2-4 επαναλαμβάνονται για 35 κύκλους):

1. Αρχικό στάδιο: Η θερμοκρασία ανέρχεται στους 95ο C και διατηρείται για 4 λεπτά.

2. Στάδιο αποδιάταξης: Η θερμοκρασία ανέρχεται στους 95ο C για 30 δευτερόλεπτα.
3. Στάδιο υβριδισμού: Η θερμοκρασία κατέρχεται στους 55ο C για 40 δευτερόλεπτα, επιτρέποντας έτσι την υβριδοποίηση των εκκινητών, οι οποίοι βρίσκονται σε περίσσεια, με το μονόκλωνο DNA-εκμαγείο.
4. Στάδιο επιμήκυνσης: Η θερμοκρασία ανέρχεται ξανά στους 72ο C για 40 δευτερόλεπτα, όπου η Taq πολυμεράση λειτουργεί βέλτιστα.
5. Στάδιο τελικής επιμήκυνσης: Η θερμοκρασία παραμένει στους 72ο C για 10 λεπτά, ύστερα από τον τελευταίο κύκλο PCR.
6. Τελικό στάδιο: Η θερμοκρασία κατέρχεται στους 4ο C.

Για την ενίσχυση του DNA και συγκεκριμένα του γονιδίου TA, που απομονώθηκε από τα δείγματα αίματος ατόμων με διαβήτη, πραγματοποιήθηκε η μέθοδος PCR. Το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε είναι το FwTA και RevTA. Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 1) αναφέρονται τα χαρακτηριστικά του ζεύγους εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε:

tRNA <sup>Leu</sup>	Όνομα Primer	Αλληλουχία	Μήκος (bp)
Forward Primer	FwLeu 5' - 3'	AGGACAAGAGAAATAAGGCC	265
Reverse Primer	RevLeu 3' - 5'	CACGTTGGGGCCTTTGCGTA	

**Πίνακας 2:** Χαρακτηριστικά των εκκινητών

Το ζεύγος εκκινητών FwLeu και RevLeu ενισχύει το τμήμα των 75 bp που κωδικοποιεί τα γονίδια tRna<sup>Leu</sup>.

Για μία αντίδραση PCR των 50 μl χρησιμοποιήθηκαν:

- DNA 1-2 μl
- 50 pmol από το κάθε primer 1 + 1 μl
- 10 x PCR Buffer 5 μl

- 40  $\mu$ M dNTPs 1  $\mu$ l
- 50 mM MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ l
- 1U Taq πολυμεράση (5U/ $\mu$ l) 0,25  $\mu$ l
- dd H<sub>2</sub>O μέχρι τα 50  $\mu$ l 38-39  $\mu$ l

### 3.2.2. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Αφού ολοκληρώθηκε η αντίδραση της PCR ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της σε πήκτωμα αγαρόζης 2% η οποία βασίστηκε στο διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθός τους. Η παρασκευή της αγαρόζης καθώς και η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι ακριβώς η ίδια που αναφέρθηκε παραπάνω για την απομόνωση του DNA με τη διαφορά ότι εδώ έγινε παρουσία μάρτυρα μοριακών μεγεθών τμημάτων DNA, καθώς είναι ο μόνος τρόπος για την απόδειξη ότι δεν ενισχύθηκαν μη ειδικά προϊόντα. Στη συνέχεια όσα δείγματα έδωσαν θετικό αποτέλεσμα χρησιμοποιήθηκαν στην εφαρμογή της μεθόδου SSCP για την ποιοτική ανάλυση πολυμορφισμών.

### 3.3. SSCP- ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΗΣ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ

#### 3.3.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ

Η αρχή της συγκεκριμένης μεθόδου διαφέρει από την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης επειδή εδώ πρόκειται για κάθετη ηλεκτροφόρηση. Πλεονέκτηματα της πηκτής πολυακρυλαμίδης είναι το ότι έχει μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα και ότι τα αποτελέσματα διαχωρισμού είναι πιο ευδιάκριτα. Επίσης, τα δείγματά στα πηκτώματα μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία δωματίου.

Η διαδικασία ακολουθήθηκε 3 φορές, κάθε φορά τοποθετούταν δύο πηκτώματα στη συσκευή. Για δύο πηκτώματα πολυακρυλαμίδιου πυκνότητας 12% και όγκου 130 ml χρησιμοποιήθηκαν:

1. 15 gr Ακρυλαμίδιο
2. 0,375 gr Δις-Ακρυλαμίδιο
3. 10 ml TBE 10x
4. 12,5 ml Γλυκερόλη 50%
5. 125 μl TEMED
6. 650 μl APS

#### *Διαδικασία*

1. Προετοιμάστηκε η συσκευή παρασκευής της πηκτής.
2. Σε ποτηράκι ζέσεως έγινε καλή ανάδευση με μαγνητάκι στα υλικά εκτός από TEMED, APS.
3. Έγινε φιλτράρισμα του περιεχομένου του ποτηριού με διηθητικό χαρτί σε έναν ογκομετρικό σωλήνα, συμπληρώθηκε μέχρι τα 100 ml με ddH<sub>2</sub>O και το διάλυμα μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη.
4. Έπειτα προστέθηκαν τα υπόλοιπα υλικά ώστε να αρχίσει ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης (TEMED, καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS και APS που ξεκινάει τον πολυμερισμό).
5. Έγινε γρήγορη περίχυση του διαλύματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθετήθηκαν τα χτενάκια δημιουργίας πηγαδιών.

6. Σταθεροποιήθηκε η πηκτική, αφαιρέθηκαν τα χτενάκια και καθαρίστηκαν με βελόνα τα πηγάδια.
7. Προστέθηκε buffer TBE 0.5x στη συσκευή.
8. Τοποθετήθηκαν τα δείγματα στα πηγάδια και άρχισε η ηλεκτροφόρηση στα 220V.

### 3.3.2. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Σε eppendorf του 0,5 ml έγινε προσθήκη 5 μl PCR προϊόντος και 10 μl αποδιατακτικού διαλύματος. Το αποδιατακτικό διάλυμα στα 3 ml περιείχε:

1. 95% φορμαμίδιο
2. 20 mM EDTA
3. 10 mM NaOH
4. 0,05 % κυανό του ξυλενίου
5. 0,05 % κυανό της βρωμοφαινόλης

Ακολούθησε αποδιάταξη των δειγμάτων σε θερμικό κυκλοποιητή σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα:

- ✓ 92° C για 2 λεπτά
- ✓ 95° C για 2 λεπτά
- ✓ 97° C για 7 λεπτά

Πριν την ολοκλήρωση του τελικού σταδίου της αποδιάταξης, έγινε τοποθέτηση των δειγμάτων απ' ευθείας στον πάγο για την αποφυγή της επαναδιάταξης των μονόκλωνων μορίων DNA. Στη συνέχεια έγινε φόρτωση των αποδιεταγμένων δειγμάτων στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου αφού προηγήθηκε η πλήρωση της συσκευής με ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5x. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων έγινε σε τάση 220 V για 22 ώρες και σε θερμοκρασία δωματίου. Για τη λήψη αποτελεσμάτων ακολούθησε χρώση του πηκτώματος με νιτρικό άργυρο.

### 3.3.3 ΧΡΩΣΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΜΕ ΔΙΑΛΥΜΑ ΝΙΤΡΙΚΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ

Ακολούθησε η χρώση των πηκτωμάτων, η οποία περιλαμβάνει πλύσεις με τρία διαφορετικά διαλύματα με σκοπό την εμφάνιση των ζωνών στο πήκτωμα. (για 2 πηκτώματα)

#### 1<sup>ο</sup> διάλυμα:

- Σε ογκομετρικό κύλινδρο έγινε προσθήκη 800 ml ddH<sub>2</sub>O, 20 ml αιθανόλης 100% και 1ml οξικού οξέος
- Τοποθέτηση των πηκτωμάτων στον αναδευτήρα
- Ακολούθησε ανακίνηση του διαλύματος και η πρώτη πλύση με προσθήκη 200 ml του διαλύματος σε κάθε πήκτωμα για 3 λεπτά
- Απομάκρυνση του διαλύματος μετά τα 3 λεπτά
- Προσθήκη ξανά 200 ml διαλύματος σε κάθε πήκτωμα για 3 λεπτά για να γίνει μια δεύτερη πλύση και έπειτα απομάκρυνση του διαλύματος
- Ακολούθησαν 2 φορές πλύσεις με ddH<sub>2</sub>O για 1 λεπτό

#### 2<sup>ο</sup> διάλυμα:

- Σε ογκομετρικό κύλινδρο έγινε προσθήκη 400 ml διαλύματος νιτρικού αργύρου
- Τοποθέτηση των πηκτωμάτων στον αναδευτήρα
- Προσθήκη σε κάθε πήκτωμα από 200 ml διαλύματος για 20 λεπτά
- Ξέπλυμα των πηκτωμάτων 2 φορές με ddH<sub>2</sub>O

#### 3<sup>ο</sup> διάλυμα:

- Προσθήκη σε ποτήρι ζέσεως 6 gr NaOH, 0,02 gr NaBH<sub>4</sub>, 2 ml φορμαλδεΐδης και συμπλήρωση με ddH<sub>2</sub>O μέχρι ο τελικός όγκος του διαλύματος να φθάσει 400ml
- Προσθήκη 200 ml διαλύματος σε κάθε πήκτωμα
- Τοποθέτηση των πηκτωμάτων στον αναδευτήρα
- Παραμονή των πηκτωμάτων στο διάλυμα μέχρι την εμφάνιση των ζωνών
- Απομάκρυνση του διαλύματος και μια πλύση με ddH<sub>2</sub>O

Στο τέλος της διαδικασίας τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου συσκευάστηκαν σε διαφανείς μεμβράνες για να γίνει η σύγκριση των αποτελεσμάτων. Έγινε επιλογή των δειγμάτων που εμφάνισαν διαφορετικά πρότυπα ηλεκτροφόρησης και ακολούθησε η διαδικασία του καθαρισμού των PCR προϊόντων των επιλεγμένων δειγμάτων, ώστε να σταλούν για αλληλούχιση.

### **3.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA**

Τα δείγματα που εμφάνισαν διαφορετικά πρότυπα πριν σταλούν για ταυτοποίηση της DNA αλληλουχίας τους (DNA sequencing) υπόκεινται σε καθαρισμό.

#### **3.4.1 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

Η διαδικασία του καθαρισμού των PCR προϊόντων έγινε με το SureClean Plus kit της Bioline. Το πρωτόκολλο καθαρισμού που ακολουθήθηκε είναι:

1. Στα eppendorfs που περιέχουν το δείγμα μετά την διαδικασία της PCR προστίθενται 6μl της ροζ χρωστικής που περιέχεται στο kit και ακολούθησε έντονη ανάδευση σε vortex για 30 δευτερόλεπτα.
2. Στο μείγμα προστίθενται 40μl διαλύματος SureClean και ακολούθησε έντονη ανάδευση σε vortex.
3. Τα δείγματα επώστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και έπειτα ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 14000 rpm για 10 λεπτά.
4. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο υγρό και προστέθηκε 80 μl αιθανόλης 70% έπειτα έγινε έντονη ανάδευση σε vortex.
5. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 14000rpm και απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού. Τα eppendorfs τοποθετήθηκαν στους 35°C με ανοιχτά καπάκια μέχρι την πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης.
6. Τέλος, προστέθηκαν 17μl ddH<sub>2</sub>O για την επαναδιαλυτοποίηση του DNA.

#### **3.4.2 ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ**

Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία του καθαρισμού των PCR προϊόντων ακολουθεί η διαδικασία της φωτομέτρησης 1 μl κάθε δείγματος DNA αραιωμένο με 49 μl ddH<sub>2</sub>O. Έγινε υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος ανάλογα με τις τιμές φωτομέτρησης και τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση. Στη συνέχεια έγινε η αποστολή των δειγμάτων σε λυοφιλιωμένη μορφή.



### 3.4.3 ΛΥΟΦΙΛΙΩΣΗ

Η διαδικασία της λυοφιλίωσης περιλαμβάνει:

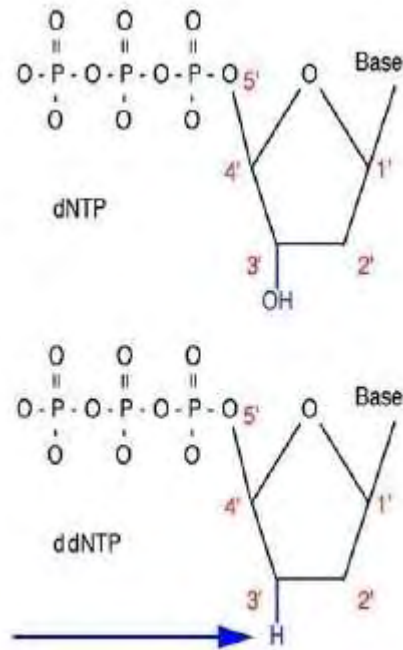
1. Προσθήκη 300 ml παγωμένης αιθανόλης 100% και 10ml NaOAc 3M
2. Ελαφρά ανάδευση και τοποθέτηση στους  $-20^{\circ}\text{C}$  overnight
3. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στους  $4^{\circ}\text{C}$  στις 13000rpm για 20 λεπτά
4. Απομάκρυνση του υπερκείμενου
5. Τοποθέτηση των δειγμάτων στο φούρνο, στους  $37^{\circ}\text{C}$ , για περίπου 1 ώρα, μέχρι την απομάκρυνση της αιθανόλης.

Με την αποστολή των δειγμάτων έγινε και η αποστολή των κατάλληλων εκκινητών σε συγκέντρωση 10 pmol/ml για την διαδικασία της αλληλούχισης.

### 3.5 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ

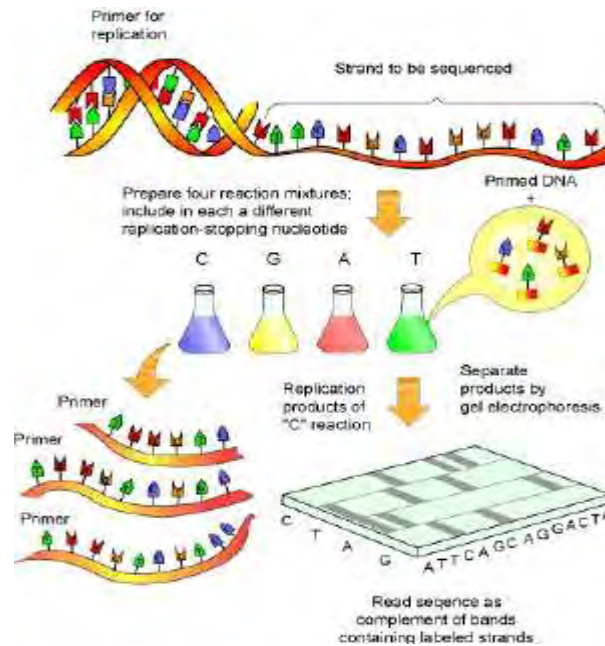
*Μέθοδος τερματισμού νουκλεοτιδικής αλυσίδας με δι-δεοξυνουκλεοτίδια  
–Μέθοδος κατά Sanger-*

Το προς ανάλυση τμήμα του DNA χρησιμεύει ως εκμαγείο για τη σύνθεση αντιγράφων τα οποία έχουν το ίδιο σημείο έναρξης αλλά διακόπτονται σε διαφορετικά σημεία. Η αρχή της μεθόδου κατά Sanger βασίζεται στην εισαγωγή τροποποιημένων δεσοξυνουκλεοτιδίων που ονομάζονται διδεσοξυνουκλεοτίδια ddNTP. Το υδρογόνο αντί υδροξυλίου στη θέση 3' της δεσοξυριβόζης και η ενσωμάτωση τους στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα εμποδίζει την περαιτέρω επιμήκυνση της καθώς δεν είναι εφικτός ο σχηματισμός φωσφοδιεστερικού δεσμού. (εικόνα 5)



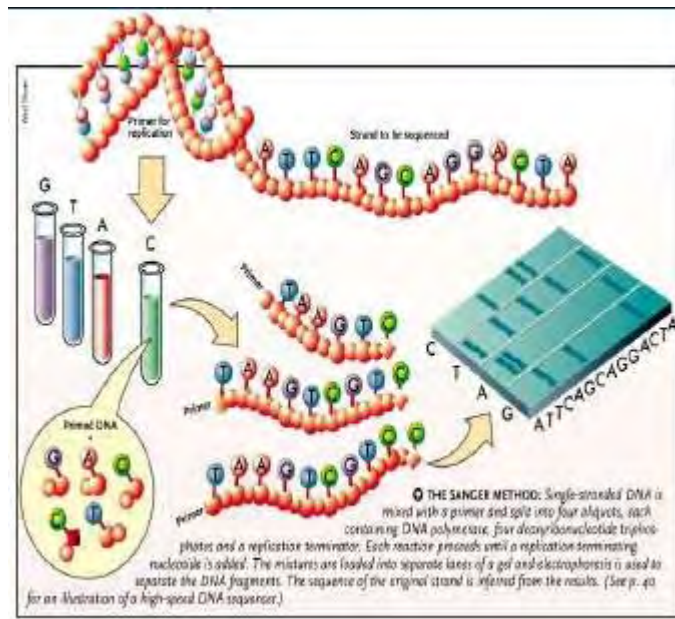
**Εικόνα 5:** Αντικατάσταση του υδροξυλίου με υδρογόνο στη μέθοδο Sanger

Σύμφωνα με την διαδικασία της μεθόδου κατά Sanger πραγματοποιούνται παράλληλα τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις αντιγραφής της αλληλουχίας που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο από την DNA πολυμεράση. Απαραίτητο είναι ένα συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο, συμπληρωματικό του αρχικού τμήματος που χρησιμεύει ως εκκινητής (primers). Κάθε μία από τις τέσσερις αντιδράσεις περιέχει ένα διαφορετικό ddNTP το οποίο είναι ραδιοσημασμένο μαζί με όλα τα dNTP. (εικόνα 6)



**Εικόνα 6:** Διαδικασία της μεθόδου αλληλούχισης κατά Sanger

Καθώς αρχίζει ο πολυμερισμός του εκκινητή, οι θέσεις για παράδειγμα της κυτοσίνης καταλαμβάνονται από το φυσιολογικό dC, οπότε εξακολουθεί ο πολυμερισμός, αλλά κάποια στιγμή γίνεται ενσωμάτωση ddC, οπότε έχουμε λήξη του πολυμερισμού. Παρόμοιες επωάσεις γίνονται παρουσία του καθενός από τα υπόλοιπα διδεοξυριβονοκλεοτίδια με αποτέλεσμα τη λήξη του πολυμερισμού στις θέσεις G, A ή T. Θα προκύψει ένα μίγμα από σεσημασμένες αλυσίδες, που τελειώνουν με ένα ddNTP στο 3' άκρο, τα μήκη των οποίων εξαρτώνται από τη σχετική θέση της συγκεκριμένης βάσης από το άκρο του DNA. Ακολουθεί διαχωρισμός με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και λήψη αποτυπώματος σε φιλμ (Sanger, Nicklen and Coulson 1977). (εικόνα 3)



**Εικόνα 7:** Διαχωρισμός με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και λήψη αποτυπώματος σε φιλμ

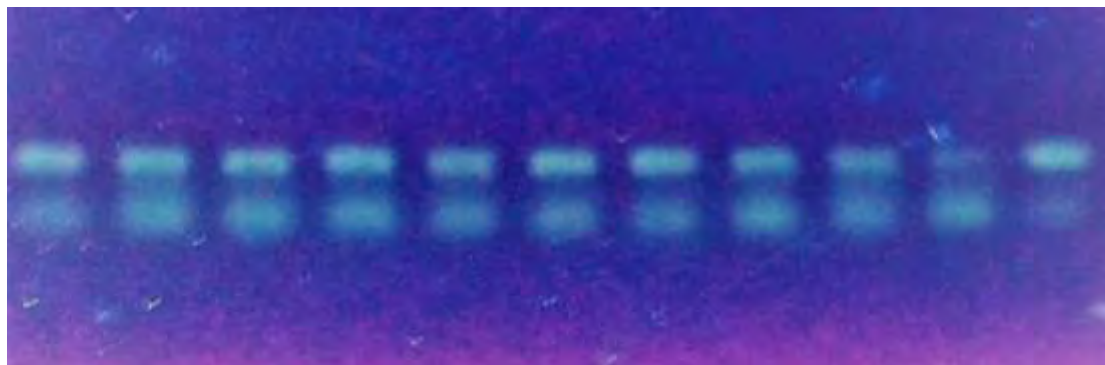
Σήμερα χρησιμοποιούνται ευρέως συστήματα αυτόματης ανάλυσης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας όπου εφαρμόζεται η μέθοδος κατά Sanger αλλά στην πρώτη φάση γίνεται εκθετικός πολλαπλασιασμός του DNA-στόχου με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Χρησιμοποιούνται τέσσερις διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές, μια για κάθε βάση, laser για την διέγερση των φθοριοχρωμάτων, ανιχνευτές για τη συλλογή των εκπομπών. Τα τελικά προϊόντα ηλεκτροφορούνται όλα μαζί για να μειώνονται τα προβλήματα που οφείλονται στη διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα από σειρά σε σειρά του πηκτώματος. Τα συστήματα αυτά διαθέτουν ειδικά software, τα οποία δίνουν σε σύντομο χρονικό διάστημα το αποτέλεσμα.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκαν 57 δείγματα αίματος από άτομα που έχουν διαγνωσθεί πως πάσχουν από διαβήτη τύπου 2 και λαμβάνουν φαρμακευτική αγωγή με αντιδιαβητικά δισκία. Τα δείγματα αίματος συλλέχθηκαν από μικροβιολογικά εργαστήρια της περιοχής της Λάρισας. Σκοπός της εργασίας ήταν η ανίχνευση και η ταυτοποίηση μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό γονίδιο tRNA<sup>Leu</sup> στους ασθενείς αυτούς. Για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των μεταλλάξεων ακολουθήθηκε μία πειραματική διαδικασία η οποία περιλάμβανε αρχικά την απομόνωση του DNA από τα κύτταρα του αίματος, ακολούθησε η ενίσχυση του επιλεγμένου γονιδίου στα δείγματα με τη μέθοδο της PCR χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους εκκινητές και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση με τη μέθοδο της SSCP για την κατάταξη των δειγμάτων σε πρότυπα, ανάλογα με την ηλεκτροφορητική τους ικανότητα. Στη συνέχεια, τα δείγματα στα οποία ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί, στάλθηκαν για αλληλούχιση με σκοπό τη μελέτη των αλληλουχιών τους. Η μέθοδος αυτή διεκπεραιώθηκε στο τμήμα Ιατρικής Σχολής Θεσσαλίας και τα αποτελέσματα στη συνέχεια μελετήθηκαν για την αναζήτηση στις αλληλουχίες των πιθανών μεταλλάξεων.

### 4.1 Ενίσχυση με PCR του γονιδίου της Λευκίνης του mtDNA

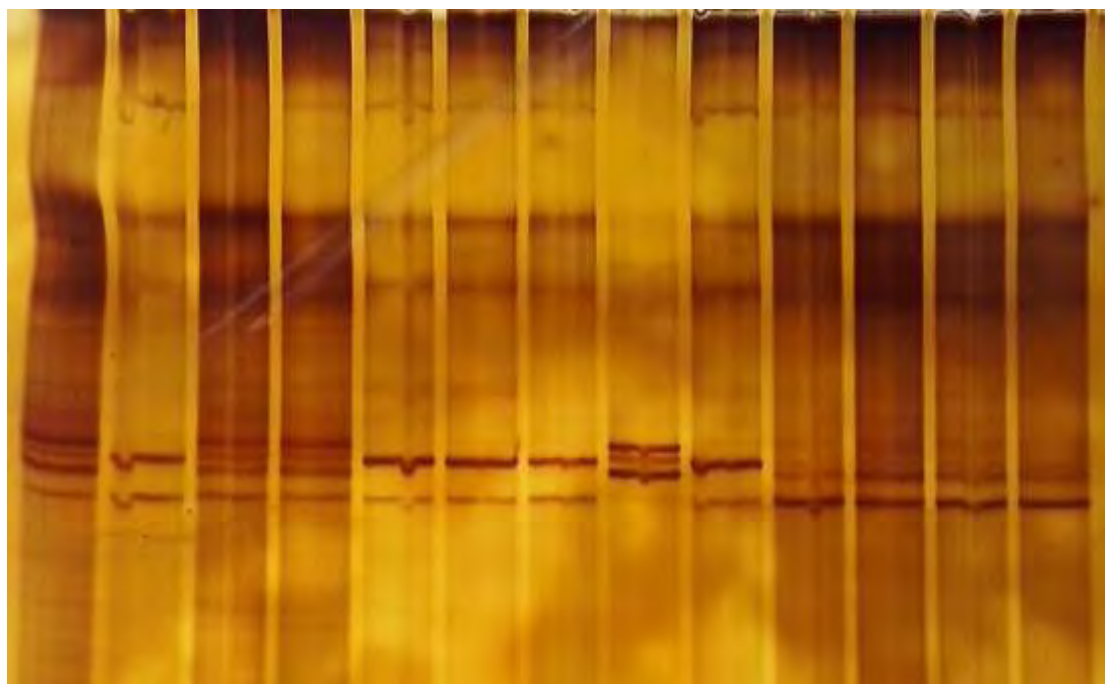
Το ζεύγος εκκινητών FwLeu και RevLeu χρησιμοποιήθηκε για να ενισχυθεί το τμήμα των 75 bp που κωδικοποιεί το γονίδιο tRNA<sup>Leu</sup>. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος στα αποτελέσματα της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης ώστε να επιβεβαιωθεί ότι το τμήμα που ενισχύθηκε είναι το επιθυμητό (75 bp).



**Εικόνα 8:** πηκτωμα αгарόζης όπου απεικονίζονται τα PCR προϊόντα μερικών εκ των δειγμάτων.

## 4.2 Ανάλυση δειγμάτων με τη μέθοδο SSCP

Ακολούθησε η μέθοδος SSCP έτσι ώστε να διαχωριστούν σε πρότυπα ανάλογα με την ηλεκτροφορητική τους ικανότητα. Παρακάτω απεικονίζεται το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης της ανάλυσης SSCP.



*Εικόνα 9:* Πήκτωμα πολυακρυλαμίδης όπου απεικονίζονται μερικά από τα πρότυπα, βάση των οποίων επιλέχθηκαν ποια δείγματα θα σταλούν για αλληλούχηση

## 4.3 Ταυτοποίηση μεταλλάξεων

Τα δείγματα τα οποία παρουσίασαν διαφορετικό πρότυπο στην ανάλυση SSCP στάλθηκαν για αλληλούχηση. Με τη βοήθεια της πρότυπης αλληλουχίας που λήφθηκε από τη βάση δεδομένων του NCBI και διάφορων γραφημάτων, ταυτοποιήθηκαν οι μεταλλάξεις. Συγκεκριμένα, και στα 57 δείγματα δεν βρέθηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο του tRNA<sup>Leu</sup>. Παρόλα αυτά βρέθηκε μια σημειακή μετάλλαξη T3197C, στο γειτονικό γονίδιο του 16s ριβωσομικού rRNA, σε 10 από τα 57 δείγματα.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε για την ανίχνευση και ταυτοποίηση μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά γονίδια tRNA σε ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη με σκοπό να διαπιστώσουμε το ρόλο των μεταλλάξεων του mtDNA στη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και πως αυτή μπορεί να ευθύνεται για την εμφάνιση της νόσου του σακχαρώδους διαβήτη.

Μεταλλάξεις στο γονίδιο του tRNA<sup>Leu</sup> δεν βρέθηκαν στα 57 δείγματα γενετικού υλικού που αναλύσαμε. Βρέθηκε όμως μια σημειακή μετάλλαξη T3197C στο γονίδιο που κωδικοποιεί το 16s ριβοσωμικό RNA σε 10 από τα 57 δείγματα.

Η μετάλλαξη T3197C βρίσκεται σε κωδική περιοχή του γονιδίου του 16s rRNA και φαίνεται να εμπλέκεται και να επηρεάζει την σταθερότητα του 16s ριβοσωμικού RNA (Bai, και συν. 2007).

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε Γερμανούς διαβητικούς ασθενείς με οικογενειακό ιστορικό μητρικά κληρονομήσιμου διαβήτη βρέθηκε πως το 10,6% από το σύνολο των 122 ασθενών έφερε την συγκεκριμένη μετάλλαξη (Klemm T. 2001).

Επιπλέον, στην έρευνα των (Bai, et al. 2007) βρέθηκε πως η συγκεκριμένη μετάλλαξη όταν συνυπάρχει με την σημειακή μετάλλαξη G13708A εμφανίζουν προστατευτική δράση έναντι της εμφάνισης του καρκίνου του μαστού, με επιζήμια όμως έκβαση σε διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Ακόμη, η T3197C μετάλλαξη σε συνδυασμό με την A12308G σημειακή μετάλλαξη, εμφανίζουν θετική συσχέτιση με την εμφάνιση του εκφυλισμού της ωχράς κυλίδας (Udar, et al. 2009). Η μετάλλαξη αυτή, μεταξύ άλλων φαίνεται να είναι ισχυρά συνδεδεμένη με την εμφάνιση ανθεκτικής επιληψίας, μία μορφή επιληψίας στην οποία οι ασθενείς δεν ανταποκρίνονται στην συνήθη φαρμακευτική αγωγή, σύμφωνα με έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε δείγματα εγκεφαλικού ιστού που λήφθηκαν από παιδιά στα οποία πραγματοποιήθηκε χειρουργική εκτομή (Luna, et al. 2014). Τέλος, σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2012 σε άτομα που έπασχαν από άσθμα η συγκεκριμένη μετάλλαξη εντοπίστηκε στο 3,9% επι του συνόλου των δειγμάτων (76 ασθενείς με άσθμα) (Zifa, et al. 2012).

Κλείνοντας, πρέπει να αναφέρουμε πως παρόλο που η συγκεκριμένη μετάλλαξη εντοπίζεται σε πολλές ασθένειες φαίνεται να είναι φυσιολογική για την Καυκάσια φυλή, μιας και εμφανίζεται πολύ συχνά και στις υγιείς ομάδες των ερευνών .

## Βιβλιογραφία

- Alberts, Bruce, και συν. *Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας*. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης, n.d.
- Alston, Charlotte L, C Mariana Rocha, Nichola Z Lax, Doug M Turnbull, και Robert W Taylor. «The genetics and pathology of mitochondrial disease.» *Journal of pathology*, 2016.
- Alexander, C.M., Landsman, P.B. & Teutsch, S.M., 2000. Diabetes mellitus, impaired fasting glucose, atherosclerotic risk factors, and prevalence of coronary heart disease. *The American journal of cardiology*, 86(9), pp.897–902.
- Al-Nozha, M.M., Ismail, H.M. & Al Nozha, O.M., 2016. Coronary artery disease and diabetes mellitus. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 11(4), pp.330–338.
- American Diabetes Association, 2017. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes care*, 40(Suppl 1), pp.S11–S24.
- Avise, John C. «Molecular Markers, Natural History and Evolution.» *Chamman and Hall*, 1994.
- Bai, Ren-Kui, Suzanne M Leal, Daniel Covarrubias, Aiyi Liu, και Lee-Jun C Wong. «Mitochondrial Genetic Background Modifies Breast Cancer Risk.» *Cancer Reaserch*, May 2007.
- Bingley, P.J., 2010. Clinical applications of diabetes antibody testing. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 95(1), pp.25–33.
- Bluestone, J.A., Herold, K. & Eisenbarth, G., 2010. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature*, 464(7293), pp.1293–1300.
- Bogenhagen, Daniel F, Yousong Wang, Ellen L\ Shen, και Ryuji Kobayashi. «Protein Components of Mitochondrial DNA Nucleoids in Higher Eukaryotes.» *Mol. Cel. Proteomics*, 2003: 1205-1216.
- Boron, Walter F, και Emile L Boulpaep. *Ιατρική Φυσιολογία - Κυτταρική & Μοριακή Προσέγγιση*. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης, 2006.
- Brownlee, Michael. «The Pathobiology of Diabetic Complications.» *Diabetes*, June 2005: 1615-1625.
- Cavalier-Smith, T. «The origin of nuclei and eukaryotic cells.» *Nature*, 1975: 463-468.
- Cheung, N., Mitchell, P. & Wong, T.Y., 2010. Diabetic retinopathy. *The Lancet*, 376(9735), pp.124–136.
- Chinnery, Patrick F, Hannah R Elliot, Gavin Hudson, David C Samuels, και Caroline L Relton. «Epigenetics, epidemiology and mitochondrial DNA diseases.» *Internation Journal of Epidemiology*, 28 January 2012: 177-187.
- Clayton, David A, και Jerome Vinograd. «Circular Dimer and catenate forms of mitochondrial DNA in Human Leukaemic Leucocytes.» *Nature*, 1967: 652-657.



- Dimauro, Salvatore, Eric Schon, Valerio Carelli, και Michio Hirano. «The clinical maze of mitochondrial neurology.» *Nature Reviews Neurology*, July 2013.
- Dimauro, Salvatore, και Guido Davidzon. «Mitochondrial DNA and disease.» *Annals of medicine*, 2005: 222-232.
- Ernster, Lars, και Gottfried Schatz. «Mitochondria: A historical review (PDF).» *The Journal of Cell Biology*, n.d.: 227s-255s.
- Gat-Yablonski G, Shalitin S, Phillip M. «Maturity onset diabetes of the young-review.» *Pediatric Endocrinology reviews*, August 2006: 514-520.
- Gianani, R. et al., 2010. Dimorphic histopathology of long-standing childhood-onset diabetes. *Diabetologia*, 53(4), pp.690–698.
- Gorman, Grainne S, και συν. «Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease.» *Annals of Neurology*, 28 March 2015.
- Goto Y, Nonaka I, Horai S. «A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies.» *Nature*, 13 December 1990: 651-653.
- Gray, M. W. «The endosymbiotic hypothesis revisited.» *Internation reviews of Cytology* 141 (1992): 233-257.
- Green, Katherine, Martin D Brand, και Michael P Murphy. «Prevention of Mitochondrial Oxidative Damage as a Therapeutic Strategy in Diabetes.» *Diabetes*, February 2004: S110-S118.
- Gropper, Sareen S, Jack L. Smith, και James L. Groff. *Διατροφή & Μεταβολισμός*. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2007.
- Haneda, M. et al., 2015. A new classification of Diabetic Nephropathy 2014: a report from Joint Committee on Diabetic Nephropathy. *Clinical and experimental nephrology*, 19(1), pp.1–5.
- HAPO Study Cooperative Research Group et al., 2008. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *The New England journal of medicine*, 358(19), pp.1991–2002
- Harding, A E. «Mitochondrial genes and neurological disease.» *Trends in Neuroscience*, 1991 April 1991: 132-138.
- Henry, R.R., 2001. Preventing Cardiovascular Complications of Type 2 Diabetes: Focus on Lipid Management. *Clinical diabetes: a publication of the American Diabetes Association*, 19(3), pp.113–120.
- J. Antonie Maassen, Leen. M. 't Hart, Einar van Essen, Rob J. Heine, Giel Nijpels, Roshan S. Jahangir Tafrechi, Anton K. Raap, George M.C. Janssen, Herman H.P.J. Lemkes. «Mitochondrial Diabetes - Molecular Mechanisms and Clinical Presentation.» *Diabetes*, February 2004: S103-S109.
- Kahn, H.S. et al., 2009. Association of type 1 diabetes with month of birth among U.S. youth: The SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Diabetes care*, 32(11), pp.2010–2015.

- Klemm T., S. Neumann, B. Trülsch, F. Pistrosch, M. Hanefeld, R. Paschke. «Search for mitochondrial DNA mutation at position 3243 in German patients with a positive family history of maternal diabetes mellitus.» *Experimental and clinical Endocrinology & Diabetes*, 2001: 283-287.
- Kolesnikov, A A. «The Mitochondrial Genome - Nucleoid.» *Biochemistry (Moscow)*, 2016: 1057-1065.
- Lenzen, S, Igurd, Jens Drinkgern, και Markus Tiedge. «Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues.» *Free Radical Biology and Medicine*, 1996: 463-466.
- Lightowers, Robert N, Robert W Taylor, και Doug M Turnbull. «Mutations causing mitochondrial disease: What is new and what challenges remain?» *Science*, 25 September 2015: 1494-1499.
- Lindroos, Markus M, και συν. «m.3243A>G Mutation in Mitochondrial DNA Leads to Decreased Insulin Sensitivity in Skeletal Muscle and to Progressive  $\beta$ -Cell Dysfunction.» *Diabetes*, March 2009: 543-549.
- Luna, Brenda, και συν. «Bayesian Network and Mechanistic Hierarchical Structure Modeling of Increased likelihood of Developing Intractable Childhood Epilepsy from the Combined Effect of mtDNA Variants, Oxidative Damage, and Copy Number.» *Journal of molecular neuroscience*, December 2014: 752-766.
- Maassen, J A, L M 't Hart, G M.C Janssen, E Reiling, J A Romijn, και H H Lemkes. «Mitochondrial diabetes and its lessons for common Type 2 diabetes.» *Biochemical Society Transactions*, 01 October 2006: 819-823.
- Mancuso, Michelangelo, και συν. «Redefining phenotypes associated with mitochondrial DNA single deletion.» *Journal of Neurology*, May 2015: 1301-1309.
- Murray, Robert K., Kathleen M. Botham, Victor W. Rodwell, David A. Bender, Peter J. Kennelly, και Anthony P Weil. *Harper's Illustrated Biochemistry*. Π.Χ. Πασχαλίδης, 2011.
- Noble, J.A. et al., 2010. HLA class I and genetic susceptibility to type 1 diabetes: results from the Type 1 Diabetes Genetics Consortium. *Diabetes*, 59(11), pp.2972–2979.
- Ostman, J. et al., 2008. Gender differences and temporal variation in the incidence of type 1 diabetes: results of 8012 cases in the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden 1983-2002. *Journal of internal medicine*, 263(4), pp.386–394.
- Picard, Martin, και Doug M. Turnbull. «Linking the metabolic state and mitochondrial DNA in Chronic Disease, Health and Aging.» *Diabetes*, 2013: 672-678.
- Parikka, V. et al., 2012. Early seroconversion and rapidly increasing autoantibody concentrations predict prepubertal manifestation of type 1 diabetes in children at genetic risk. *Diabetologia*, 55(7), pp.1926–1936.
- Pasquel, F.J. & Umpierrez, G.E., 2014. Hyperosmolar hyperglycemic state: a historic review of the clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Diabetes care*, 37(11), pp.3124–3131.

- Rosenbloom, A.L. et al., 2008. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2006-2007. Type 2 diabetes mellitus in the child and adolescent. *Pediatric diabetes*, 9(5), pp.512–526.
- Rotig, Agnes, και συν. «Pearson's marrow-pancreas syndrome. A multisystem mitochondrial disorder in infancy.» *The Journal of Clinical Investigation*, November 1990: 1601-1608.
- Roy, M., Rendas-Baum, R. & Skurnick, J., 2006. Mortality in African-Americans with Type 1 diabetes: The New Jersey 725. *Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association*, 23(6), pp.698–706.
- Sallevelt, Suzanne C E H, και συν. «De novo mtDNA point mutations are common and have a low recurrence risk.» *Journal of medical genetics*, 20 January 2017: 78-83.
- Sanger, F, S Nicklen, και A R Coulson. «DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, December 1977: 5463-5467.
- Sekine N, Cirulli V, Regazzi R, Brown LJ, Gine E, Tamarit-Rodriguez J, Girotti M, Marie S, MacDonald MJ, Wollheim CB, et al. «Low lactate dehydrogenase and high mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase in pancreatic beta-cells. Potential role in nutrient sensing.» *Journal of biological chemistry*, 18 February 1994: 4895-4902.
- Skladal, Daniela, Jane Halliday, και David R Thorburn. «Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children.» *Brain*, 01 August 2003: 1905-1912.
- Solomon, C.G. et al., 1997. A prospective study of pregravid determinants of gestational diabetes mellitus. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 278(13), pp.1078–1083.
- S. Oyer, D., 2013. The Science of Hypoglycemia in Patients with Diabetes. *CDR*, 9(3), pp.195–208.
- Spallone, Vincenza, και συν. «Cardiovascular autonomic neuropathy in diabetes: clinical impact, assessment, diagnosis, and management.» *Diabetes/Metabolism research and reviews*, 6 October 2011.
- Stewart, James B, και Patrick F Chinnery. «The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease.» *Nature Review Genetics*, 18 August 2015: 530-542.
- Sun, Fei, Qiangjun Zhou, Xiaoyun Pang, Yingzhi Xu, και Zihe Rao. «Revealing various coupling of electron transfer and proton pumping in mitochondrial respiratory chain.» *current opinion in structural biology*, August 2013: 526-538.
- Taakashi, Yutaka, και συν. «Hepatic Failure and Enhanced Oxidative Stress in Mitochondrial Diabetes.» *Endocrine Journal*, 02 07 2008: 509-514.

- Taksali, S.E. et al., 2008. High visceral and low abdominal subcutaneous fat stores in the obese adolescent: a determinant of an adverse metabolic phenotype. *Diabetes*, 57(2), pp.367–371.
- Udar, Nitin, και συν. «Mitochondrial DNA Haplogroups Associated with Age-Related Macular Degeneration.» *Retina*, June 2009: 2966-2974.
- Westerberg, D.P., 2013. Diabetic Ketoacidosis: Evaluation and Treatment. *American Family Physician*, 87(5), pp.337–346.
- Wiederkehr, Andreas, και Claes B Wollheim. «Impact of mitochondrial calcium on the coupling of metabolism to insulin secretion in the pancreatic  $\beta$ -cell.» *Cell Calcium*, July 2008: 64-76.
- Ziegler, A.-G. & Nepom, G.T., 2010. Prediction and pathogenesis in type 1 diabetes. *Immunity*, 32(4), pp.468–478.
- Zifa, Emily, και συν. «Mitochondrial genetic background plays a role in increasing risk to asthma.» *Molecular Biology Reports*, April 2012: 4697-4708.
- Zilliox, L, και συν. «Assessing autonomic dysfunction in early diabetic neuropathy - The survey of autonomic symptoms.» *Neurology*, 22 March 2011: 1099-1105.
- Κασιλάμπρος, Ν., Τεντολούρης, Ν. & Τσαπόγας, Π., 2000. Κλινική και εργαστηριακή διερεύνηση της περιφερικής αρτηριοπάθειας των κάτω άκρων στο διαβήτη. In Η. Ν. Μυγδάλης, ed. *Στρατηγικές στη διερεύνηση και την αντιμετώπιση του σακχαρώδη διαβήτη*. Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις Ζήτα, pp. 151–172.
- Τεντολούρας, Ν. et al., Διαιτητική αντιμετώπιση σακχαρώδη διαβήτη. In Ζ. Α., ed. *Κλινική διατροφή & διαιτολογία με στοιχεία παθολογίας*. pp. 341–384.