

**Οι μηχανισμοί των επιπλοκών
του σακχαρώδους διαβήτη
Νεότερες απόψεις**

Η υπεργλυκαιμία αποτελεί τη βασική μεταβολική διαταραχή στο σακχαρώδη διαβήτη. Οι χρόνιες βλάβες, που παρατηρούνται στους ιστούς των ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη, σχετίζονται γενικά με το βαθμό και τη διάρκεια της υπεργλυκαιμίας. Σε κυτταρικό επίπεδο, η υπεργλυκαιμία προκαλεί βλάβες στους ιστούς με τους εξής μηχανισμούς: (α) Μεταβολική εκτροπή της γλυκόζης και των άλλων σακχάρων μέσω της οδού των πολυολών, (β) αυξημένη παραγωγή προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (advanced glycation end-products, AGEs), (γ) ενεργοποίηση ορισμένων ισομορφών της πρωτεϊνικής κινάσης C (protein kinase C, PKC), (δ) υπερδραστηριότητα της οδού της εξοζαμίνης και (ε) οξειδωτική καταπόνηση των κυττάρων. Τα αποτελέσματα πρόσφατων μελετών οδήγησαν στη διατύπωση της υπόθεσης ότι οι τέσσερις πρώτοι μηχανισμοί πιθανότατα έχουν ως κοινή υποκείμενη αιτία την οξειδωτική καταπόνηση των κυττάρων, η οποία προκαλείται από την αυξημένη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου στα μιτοχόνδρια. Αυτή, με τη σειρά της, οφείλεται στην αύξηση του ποσού της γλυκόζης που μεταβολίζεται στο κύτταρο. Η υπόθεση αυτή αποσκοπεί σε μια βαθύτερη ερμηνεία των βλαπτικών μηχανισμών που πυροδοτεί η υπεργλυκαιμία και ενοποιεί τις επιμέρους υποθέσεις για την πρόκληση των επιπλοκών του διαβήτη.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η υπεργλυκαιμία αποτελεί τη βασική μεταβολική διαταραχή στο σακχαρώδη διαβήτη.^{1,2} Οι χρόνιες βλάβες, που παρατηρούνται στους ιστούς των ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη, σχετίζονται γενικά με το βαθμό και τη διάρκεια της υπεργλυκαιμίας. Παράγοντες που επίσης επηρεάζουν την εμφάνιση, την έκταση και την εξέλιξη των βλαβών είναι η υπέρταση και ορισμένοι άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες, καθώς και το γενετικό υπόστρωμα των ασθενών. Όπως είναι γνωστό, ο σακχαρώδης διαβήτης προσβάλλει τόσο τα μικρά όσο και τα μεγάλα αγγεία. Η μικροαγγειοπάθεια είναι η κύρια αιτία τύφλωσης, νεφρικής ανεπάρκειας και εν μέρει της διαβητικής νευροπάθειας. Είναι γνωστό ότι οι μικροαγγειοπαθητικές επιπλοκές (έμφραγμα του μυοκαρδίου, περιφερική αρτηριοπάθεια και αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια) είναι 2-4 φορές συχνότερες στα άτομα με διαβήτη.

Δύο μεγάλες μελέτες, η DCCT (Diabetes Control and Complications Trial), σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 1,

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2006, 23(2):131-139
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2006, 23(2):131-139

**A. Νικολόπουλος,
N. Τεντολούρης,
N. Κατσιλάμπρος**

*Α΄ Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική,
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Διαβητολογικό
Κέντρο, «Λαϊκό» Νοσοκομείο, Αθήνα*

**Mechanisms of the complications
of diabetes: Newer aspects**

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Μακροαγγειοπαθητικές επιπλοκές
Μικροαγγειοπαθητικές επιπλοκές
Παθογένεση επιπλοκών
Σακχαρώδης διαβήτης

*Υποβλήθηκε 16.11.2004
Εγκρίθηκε 8.2.2005*

και η UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study group), σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2, απέδειξαν το ρόλο της υπεργλυκαιμίας ως αιτίου της μικροαγγειοπάθειας και των σχετιζόμενων με αυτή επιπλοκών του διαβήτη. Η σχέση, ωστόσο, της υπεργλυκαιμίας και της μακροαγγειοπάθειας φαίνεται ότι είναι διαφορετική.

Η υπεργλυκαιμία προκαλεί βλάβη επιλεκτικά σε ορισμένους ιστούς, όπως είναι, για παράδειγμα, το ενδοθήλιο των αγγείων.³ Οι ευαίσθητοι στη βλαπτική δράση της υπεργλυκαιμίας ιστοί δεν έχουν την ικανότητα να μειώνουν το ρυθμό πρόσληψης γλυκόζης όταν οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης στο αίμα είναι υψηλές. Η διαφορετική ευαισθησία των ιστών στη βλαπτική δράση της υπεργλυκαιμίας οφείλεται στην έκφραση διαφορετικών μεταφορέων γλυκόζης στην επιφάνεια των κυττάρων τους. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα, που αναφέρθηκαν ως παράδειγμα, φέρουν στην επιφάνειά τους μεταφορείς γλυκόζης GLUT 1 (glucose transporters τύπου 1), των οποίων η λειτουργία δεν εξαρτάται από την παρουσία ινσουλίνης. Τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης εντός των κυττάρων αυτών για μεγάλα χρονικά διαστήματα απο-

τελούν καθοριστικό παράγοντα της μετέπειτα βλάβης τους.⁴

2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΕ ΤΟΥΣ ΟΠΟΙΟΥΣ Η ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑ ΠΡΟΚΑΛΕΙ ΒΛΑΒΗ ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ

Οι μηχανισμοί που πυροδοτούνται από την υπεργλυκαιμία και προκαλούν τελικά ιστική βλάβη παραμένουν στην ουσία υποθετικοί, καθώς η ύπαρξη και η λειτουργία τους *in vivo* δεν έχει αποδειχθεί με βεβαιότητα. Οι κυριότεροι από αυτούς είναι:

- Μεταβολική εκτροπή της γλυκόζης και άλλων σακχάρων μέσω της οδού των πολυολών
- Αυξημένη παραγωγή προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (advanced glycation end-products, AGEs)
- Ενεργοποίηση ορισμένων ισομορφών της πρωτεϊνικής κινάσης C (protein kinase C, PKC)
- Υπερδραστηριότητα της οδού της εξοζαμίνης
- Οξειδωτική καταπόνηση των κυττάρων.

Πρόσφατες εργασίες του Brownlee καταλήγουν στην υπόθεση ότι οι προτεινόμενοι τέσσερις πρώτοι μηχανισμοί οφείλονται στην οξειδωτική καταπόνηση των κυττάρων, η οποία προκαλείται από την αυξημένη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου στα μιτοχόνδρια, που με τη σειρά της οφείλεται στην αύξηση του ποσού της γλυκόζης που μεταβολίζεται στο κύτταρο. Η υπόθεση αυτή του Brownlee αποσκοπεί σε μια βαθύτερη ερμηνεία των βλαπτικών μηχανισμών που πυροδοτεί η υπεργλυκαιμία, ενοποιώντας τις επιμέρους υποθέσεις.⁵

2.1. Οδός των πολυολών

Το κυριότερο ένζυμο της οδού των πολυολών είναι η αναγωγή της αλδόζης. Στην οδό αυτή χρησιμοποιείται ως συνένζυμο NADPH (αναχθέν φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο) και ως υπόστρωμα γλυκόζη. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιούνται επίσης διάφορα σάκχαρα και παράγωγά τους, που μετατρέπονται στις αντίστοιχες αλκοόλες (πολυόλες). Η γλυκόζη μετατρέπεται σε σορβιτόλη και η γαλακτόζη σε γαλακτιτόλη.

Η σορβιτόλη οξειδώνεται, στη συνέχεια, σε φρουκτόζη από το ένζυμο αφυδρογονάση της σορβιτόλης. Στη δεύτερη αυτή αντίδραση χρησιμοποιείται NAD⁺ (οξειδωθέν νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο), το οποίο ανάγεται σε NADH (αναχθέν νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο).

Το ρυθμιστικό ένζυμο της οδού των πολυολών είναι η αναγωγή της αλδόζης. Το ένζυμο αυτό βρίσκεται στα νεύρα, στον αμφιβληστροειδή, στους φακούς του οφθαλμού, στο σπείραμα και στο τοίχωμα των αγγείων. Στους ιστούς αυτούς, η πρόσληψη γλυκόζης γίνεται με μεταφορείς γλυκόζης άλλους πλην του GLUT 4 και για την είσοδο της γλυκόζης στα κύτταρα αυτών των ιστών δεν είναι απαραίτητη η παρουσία ινσουλίνης. Η συγκέντρωση της γλυκόζης μέσα στα συγκεκριμένα κύτταρα βαίνει παράλληλα με τη συγκέντρωσή της στο αίμα. Η χημική συγγένεια της αναγωγάσης της αλδόζης για τη γλυκόζη είναι μικρή (υψηλή K_m) και, επομένως, η οδός των πολυολών είναι φυσιολογικά ανενεργής. Όταν όμως, λόγω της υπεργλυκαιμίας, η συγκέντρωση της γλυκόζης μέσα στα κύτταρα αυτά αυξηθεί, αυξάνει και ο μεταβολισμός μέσω της οδού των πολυολών. Μια από τις φυσιολογικές λειτουργίες της αναγωγάσης της αλδόζης είναι η αδρανοποίηση των γλυκοτοξινών, όπως π.χ. της μεθυλογλυοξάλης, ουσιών που έχουν τη δυνατότητα να γλυκοζυλιώνουν πρωτεΐνες και άλλα μόρια με ταχύτητα πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με τη γλυκόζη.⁶ Πράγματι, η μεθυλογλυοξάλη αποτελεί το καταλληλότερο υπόστρωμα για την αναγωγή της αλδόζης (έχει τη χαμηλότερη K_m).

Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί για να εξηγήσουν τη σημασία της ενεργοποίησης της οδού των πολυολών και της πρόκλησης, τελικά, βλαβών στα κύτταρα. Οι κυριότεροι από αυτούς είναι:

- Η προκαλούμενη από τη σορβιτόλη οσμωτική λύση των κυττάρων
- Η αδρανοποίηση των διαύλων Na⁺-K⁺ που εξαρτώνται από το ATP
- Η αύξηση του λόγου NADH/NAD⁺ στο κυτταρόπλασμα
- Η μείωση της συγκέντρωσης του NADPH στο κυτταρόπλασμα.

Η σορβιτόλη δεν διαχέεται ελεύθερα μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Όταν η οδός της πολυόλης ενεργοποιείται, η ενδοκυττάρια συγκέντρωση σορβιτόλης αυξάνει. Αρχικά, είχε υποθεθεί ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της σορβιτόλης στα ενδοθηλιακά και τα νευρικά κύτταρα προκαλεί την είσοδο ύδατος και την οσμωτική λύση των κυττάρων. Οι συγκεντρώσεις όμως της σορβιτόλης στα αγγεία και τα νεύρα των διαβητικών ασθενών έχουν μετρηθεί και βρέθηκαν να είναι χαμηλές.

Σύμφωνα με τη δεύτερη υπόθεση, η ενεργοποίηση της οδού των πολυολών προκαλεί μείωση της δραστικό-

τητας του ενζύμου Na⁺-K⁺-ΑΤΡάση, αδρανοποίηση δηλαδή των εξαρτώμενων από το ΑΤΡ διαύλων Na⁺-K⁺, λόγω μειωμένης σύνθεσης της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης. Η αδρανοποίηση των εξαρτώμενων από το ΑΤΡ διαύλων Na⁺-K⁺ παρατηρείται πράγματι στο διαβήτη, φαίνεται όμως ότι οφείλεται στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), που, με τη σειρά της, αυξάνει την παραγωγή δύο αναστολέων της Na⁺-K⁺-ΑΤΡάσης, του αραχιδονικού οξέος και της προσταγλανδίνης E₂ (PGE₂).⁷

Σύμφωνα με μια πιο πρόσφατη υπόθεση, η οξείδωση της σορβιτόλης από το NAD⁺ αυξάνει το λόγο του NADH/NAD⁺ στο κυτταρόπλασμα, με συνέπεια την αδρανοποίηση του ενζύμου αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, GADPH). Η αδρανοποίηση αυτού του ενζύμου έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των συγκεντρώσεων των φωσφορικών τριοζών, που, με τη σειρά τους, αυξάνουν το σχηματισμό μεθυλογλυοξάλης και διακυλογλυκερόλης (DAG). Η μεθυλογλυοξάλη γλυκοζυλιώνει ταχέως πρωτεΐνες και οδηγεί στο σχηματισμό προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (AGEs), ενώ η DAG ενεργοποιεί την PKC.

Σύμφωνα με την τέταρτη υπόθεση, η αναγωγή της γλυκόζης σε σορβιτόλη προκαλεί καταπόνηση του NADPH. Το NADPH είναι απαραίτητο για την αναγέννηση της αναχθείσας γλουταθειόνης, που είναι σημαντικός αδρανοποιητής των ελευθέρων ριζών οξυγόνου και η έλλειψή της προκαλεί οξειδωτική καταπόνηση των

κυττάρων.⁸ Επιπλέον, η υπεργλυκαιμία αδρανοποιεί την αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, που αποτελεί τη σημαντικότερη πηγή του NADPH, μειώνοντας περαιτέρω τις συγκεντρώσεις του NADPH σε ορισμένα αγγειακά και νευρικά κύτταρα.⁹

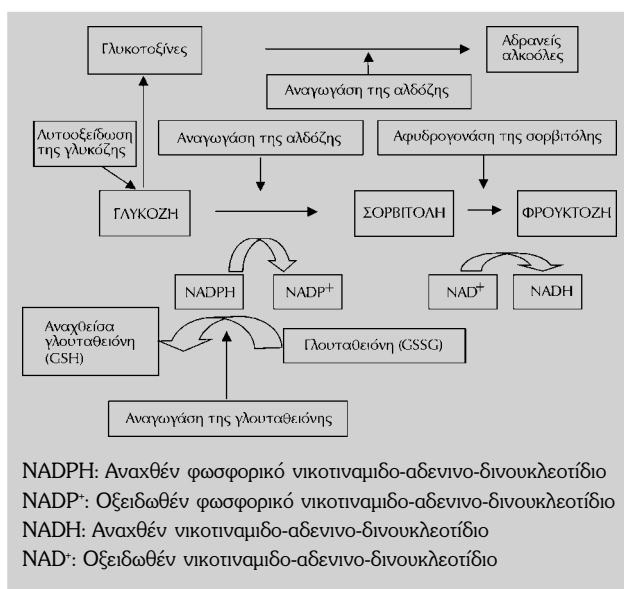
2.2. Σχηματισμός προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (AGEs)

Η γλυκόζη και ορισμένα παράγωγά της αντιδρούν με πρωτεΐνες αλλά και άλλα βραδέως ανακυκλούμενα μόρια, όπως τα πυρηνικά οξέα, προκαλώντας τη γλυκοζυλίωσή τους. Οι αρχικές αντιδράσεις της γλυκοζυλίωσης είναι αντιστρεπτές, τα τελικά προϊόντα όμως έχουν σταθερή δομή και δεν διασπώνται εύκολα. Οι τελικές αντιδράσεις γλυκοζυλίωσης είναι επομένως μη αντιστρεπτές.

Προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης βρίσκονται σε αυξημένο ποσοστό σε εξωκυττάρια δομές των αγγείων του αμφιβληστροειδούς¹⁰ και του σπειράματος¹¹ διαβητικών ατόμων. Διατυπώθηκε, αρχικά, η άποψη ότι τα προϊόντα αυτά προέρχονται από τη μη ενζυμική γλυκοζυλίωση εξωκυττάρων πρωτεϊνών. Τελικά, έχει διαπιστωθεί ότι τα ενδοκυττάρια παραγόμενα προϊόντα αυτοοξείδωσης της γλυκόζης έχουν την ικανότητα να γλυκοζυλιώνουν πρωτεΐνες με ταχύτητα πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με τη γλυκόζη.¹¹ Σήμερα, κυριαρχεί η άποψη ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης μέσα στα κύτταρα ευθύνεται για την παραγωγή των AGEs τόσο ενδοκυττάρια όσο και έξω από τα κύτταρα.¹²

Η αύξηση του σχηματισμού των AGEs μπορεί να προξενήσει βλάβες στα κύτταρα με τρεις κυρίως μηχανισμούς.

- Οι ενδοκυττάρια πρωτεΐνες, όταν γλυκοζυλιώνονται, δυσλειτουργούν
- Οι αλληλεπιδράσεις των γλυκοζυλιωμένων συστατικών με τα λοιπά συστατικά της διάμεσης εξωκυττάριας ουσίας αλλά και με τους υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων (integrins) διαταράσσονται
- Οι γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες του πλάσματος συνδέονται με AGE-υποδοχείς, που βρίσκονται στην επιφάνεια ορισμένων κυττάρων, όπως είναι τα μακροφάγα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα του μεσαγγείου, με αποτέλεσμα να πυροδοτούνται διάφοροι βλαπτικοί μηχανισμοί, που με τη σειρά τους έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου στο μιτοχόνδριο και την παθολογική έκφραση πολλών γονιδίων.¹³



Εικόνα 1. Σχηματική παράσταση της οδού των πολυολών.

Μέσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ο σχηματισμός των AGEs γίνεται ταχύτατα.¹⁵ Ένας από τους κύριους στόχους της γλυκοζυλίωσης είναι ο βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (basic fibroblast growth factor, b-FGF).¹⁴ Η γλυκοζυλίωση του b-FGF αναστέλλει τις μιτωτικές διαίρεσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Μια από τις πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας που γλυκοζυλιώνονται είναι το κολλαγόνο, κυρίως οι τύποι I και IV, με συνέπεια την αλλοίωση των λειτουργικών του ιδιοτήτων.¹⁵ Σε πειραματόζωα, η γλυκοζυλίωση του κολλαγόνου του τοιχώματος των μεγάλων αγγείων καθιστά τα αγγεία αυτά ανελαστικά.¹⁶

Οι γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες του πλάσματος συνδέονται με AGE-υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνεια ορισμένων κυττάρων.¹⁷ Σε κυτταροκαλλιέργειες, τα μακροφάγα και τα κύτταρα του μεσαγγείου του σπείραματος, όταν ορισμένοι υποδοχείς στην επιφάνειά τους συνδεθούν με AGEs, παράγουν κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες [ιντερλευκίνη 1 (IL-1), insulin-like growth factor-I (IGF-I), tumor necrosis factor- α (TNF α), transforming growth factor- β (TGF β), macrophage colony stimulating factor (MCSF), macrophage granulocyte colony stimulating factor (MGCSF) και platelet derived growth factor (PDGF)],¹⁸⁻²⁰ ενώ τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν μόρια που αυξάνουν την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στην επιφάνεια του αγγείου και επάγουν τη φλεγμονή [thrombomodulin, ιστικός παράγοντας, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)].²¹

Ένας ειδικός τύπος υποδοχέα για τα AGEs, ο RAGE²² (receptor for AGEs), του οποίου η δομή μοιάζει με εκείνη των ανοσοσφαιρινών, όταν συνδεθεί με AGEs προκαλεί την απελευθέρωση ελευθέρων ριζών οξυγόνου και ενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα NF κ B (nuclear factor kappa-B), που με τη σειρά του προκαλεί την παθολογική έκφραση πολλών γονιδίων.¹³

2.3. Ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης

Η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) αποτελεί μια ομάδα ενζύμων (υπάρχουν ισομορφές από α έως ϵ) που παρεμβαίνουν στη μεταφορά μιας φωσφορικής ομάδας από το ATP σε ειδική θέση σε μια πρωτεΐνη-στόχο. Δρουν, δηλαδή, φωσφορυλιώνοντας το υπόστρωμά της. Για την ενεργοποίηση της κινάσης απαιτείται φωσφατιδυλική σερίνη, ιόντα Ca⁺⁺ και διακυλογλυκερόλη (DAG).

Η υπερβολική και συνεχής ενεργοποίηση της PKC είναι ένας από τους μηχανισμούς με τους οποίους η υπεργλυκαιμία προκαλεί βλάβες στους ιστούς. Η υπεργλυκαιμία προκαλεί *de novo* σύνθεση DAG μέσω των

φωσφορικών τριοζών, οι συγκεντρώσεις των οποίων αυξάνουν λόγω της αυξημένης γλυκόλυσης.²³ Επιπλέον, η αύξηση του λόγου NADH/NAD⁺, που οφείλεται στη μετατροπή της σορβιτόλης σε φρουκτόζη, και η αναστολή του ενζύμου GADPH (αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης) από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, που παράγονται στα μιτοχόνδρια, εκτρέπουν την 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη από την οδό της γλυκόλυσης προς την παραγωγή φωσφορικής διυδροξυ-ακετόνης και DAG. Ενεργοποίηση της PKC επίσης προκαλείται από τη σύνδεση των AGEs με τους υποδοχείς τους στην επιφάνεια των κυττάρων.²⁴ Η υπεργλυκαιμία ενεργοποιεί κυρίως τις β και δ ισομορφές της PKC, στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στον αμφιβληστροειδή και στο σπείραμα. Επιπλέον, ενεργοποίηση και των άλλων ισομορφών της PKC έχει διαπιστωθεί σε διαβητικούς επίμυες, όπως της PKC- α και της PKC- ϵ στον αμφιβληστροειδή και της PKC- α και PKC- δ στο σπείραμα.^{25,26}

Η ενεργοποίηση της PKC- β μειώνει τη ροή αίματος στον αμφιβληστροειδή και το νεφρό,²⁷ πιθανόν μέσω μειωμένης παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου (NO), το οποίο, ως γνωστό, είναι αγγειοδιασταλτικός παράγοντας, ή και αύξησης της απελευθέρωσης της ενδοθηλίνης-1 (ET-1), ουσίας με αγγειοσυσπαστική δράση. Σε πειραματόζωα, έχει βρεθεί ότι η ενεργοποίηση της PKC μειώνει την παραγωγή NO στο σπείραμα²⁸ και τα λεία μυϊκά κύτταρα,²⁹ ενώ σε καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων ότι εμποδίζει την εξαρτώμενη από την ινσουλίνη ενεργοποίηση της ενδοθηλιακής συνθετάσης του NO (endothelial nitric oxide synthase, e-NOS).³⁰ Η υπεργλυκαιμία αυξάνει την ικανότητα της ET-1 να διεγείρει τη MAPK (mitogen activated protein kinase) στα κύτταρα του μεσαγγείου, μέσω ενεργοποίησης ισομορφών της PKC.³¹ Η ενεργοποίηση της PKC από την υπεργλυκαιμία αυξάνει επίσης τη διαπερατότητα του ενδοθηλίου.³² Η PKC αυξάνει την έκλυση του παράγοντα VEGF (vascular endothelial growth factor) από τα λεία μυϊκά κύτταρα.³³ Ο VEGF είναι παράγοντας που αυξάνει τη διαπερατότητα των αγγείων. Η PKC πιθανόν ευθύνεται, τουλάχιστον εν μέρει, για την αύξηση της εναπόθεσης της ινωδονεκτίνης και του κολλαγόνου τύπου IV στην εξωκυττάρια ουσία του μεσαγγείου χώρου του σπείραματος.^{34,35} Η υπεργλυκαιμία, μέσω ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης, έχει ενοχοποιηθεί για την αύξηση της δραστηριότητας του αναστολέα της ινωδόλυσης και του PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1),³⁶ καθώς και για την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF κ B (nuclear factor kappa-B).³⁷ Η ενεργοποίηση, επομένως, της πρωτεϊνικής κινάσης από την υπεργλυκαιμία προκαλεί διαταραχές της ροής και της ηκτι-

κόπτας του αίματος, αύξηση του πάχους της βασικής μεμβράνης του ενδοθηλίου και της διαπερατότητας των αγγείων και την παθολογική έκφραση πολλών γονιδίων.

2.4. Οδός της εξοζαμίνης

Πρόσφατα, παρουσιάστηκε η υπόθεση ότι η υπεργλυκαιμία προκαλεί βλάβες μέσω εκτροπής του μεταβολισμού της γλυκόζης διά της οδού της εξοζαμίνης.³⁸⁻⁴⁰ Η γλυκόζη μετατρέπεται σε 6-φωσφορική φρουκτόζη, η οποία ακολούθως αντιδρά με γλουταμίνη. Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο αμιδοτρανσφεράση της γλουταμίνης/6-φωσφορικής φρουκτόζης (glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase, GFAD), που αποτελεί το ρυθμιστικό ένζυμο της οδού της εξοζαμίνης.

Το ένζυμο αυτό αναστέλλεται από την αζασερίνη. Τα προϊόντα της αντίδρασης είναι γλουταμικό οξύ και 6-φωσφορική γλυκοζαμίνη, η οποία μετατρέπεται στη συνέχεια σε ουριδυλ-διφωσφορική-N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη (UDP-GluNAc). Η ενεργοποίηση της οδού της εξοζαμίνης αυξάνει τη μεταγραφή ορισμένων γονιδίων, όπως του TGF α , του TGF β και του PAI-1,^{38,39,41} με τρόπο που δεν είναι απόλυτα γνωστός.

Σύμφωνα με τα μέχρι τώρα δεδομένα, η ενεργοποίηση των γονιδίων αυτών οφείλεται στη γλυκοζυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 (ο Sp1 μετατρέπεται σε Sp1-O-GlcNAc και αυτή η μετατροπή τον ενεργοποιεί).⁴² Ενδεχομένως, με την ενεργοποίηση της οδού της εξοζαμίνης γλυκοζυλιώνονται και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες που δεν έχουν εντοπιστεί μέχρι σήμερα.

Συνολικά, η ενεργοποίηση της οδού της εξοζαμίνης από την υπεργλυκαιμία φαίνεται να προκαλεί την παθολογική έκφραση ορισμένων γονιδίων και τη δυσλειτουργία ορισμένων πρωτεϊνών και να συμμετέχει στην παθογένεια των επιπλοκών του διαβήτη.

2.5. Οξειδωτική καταπόνηση των κυττάρων

Ο Brownlee⁵ παρουσίασε πρόσφατα μια υπόθεση, σύμφωνα με την οποία και οι τέσσερις προηγούμενοι μηχανισμοί πυροδοτούνται από την υπερπαραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου μέσα στα μιτοχόνδρια, η οποία, με τη σειρά της, οφείλεται στην αυξημένη ποσότητα γλυκόζης που μεταβολίζεται μέσα στα κύτταρα. Για να κατανοηθεί η υπόθεση του Brownlee, θα πρέπει να ανακληθούν στη μνήμη, εν τάχει, κάποια σημεία του μεταβολισμού της γλυκόζης. Η οξείδωση της γλυκόζης στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων καταλήγει στο σχηματι-

σμό NADH και πυρουβικού (πυροσταφυλικού) οξέος. Το NADH ανάγει το πυρουβικό οξύ σε γαλακτικό οξύ ή εισέρχεται στο μιτοχόνδριο, όπου λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα. Το πυρουβικό οξύ εισέρχεται επίσης στο μιτοχόνδριο, όπου μεταβολίζεται μέσω του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων σε CO₂ και H₂O. Για κάθε μόριο πυρουβικού οξέος που μεταβολίζεται στον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων παράγονται 4 μόρια NADH και ένα μόριο FADH₂ (αναχθέν φλαβινο-αδενινο-νουκλεοτίδιο). Το NADH που παράγεται στο κυτταρόπλασμα αλλά και το NADH που παράγεται στο μιτοχόνδριο είναι δότες ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα. Η ενέργεια που παράγεται από τη μεταφορά ηλεκτρονίων χρησιμοποιείται για τη σύνθεση ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορύλιωσης. Τα πρωτόνια που παράγονται κατά τη μεταφορά των ηλεκτρονίων ωθούνται έξω από την εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Δημιουργείται έτσι μια διαφορά δυναμικού μεταξύ των δύο επιφανειών της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου, απαραίτητη για τη μεταφορά των ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα. Όταν η διαφορά δυναμικού μεταξύ των δύο επιφανειών της μεμβράνης είναι μεγάλη, παράγεται υπεροξειδίο του υδρογόνου και, μάλιστα, αν η διαφορά αυτή υπερβεί ένα όριο, η παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου αυξάνει σημαντικά.⁴³ Οι πρωτεΐνες αποσύνδεσης ή αποσυζευκτικές πρωτεΐνες (uncoupling proteins, UCPs) της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου λειτουργούν ως διαύλοι πρωτονίων. Η είσοδος πρωτονίων διά των διαύλων αυτών στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου μειώνει τη διαφορά δυναμικού μεταξύ των επιφανειών της εσωτερικής μεμβράνης. Στην περίπτωση αυτή, η ενέργεια που παράγεται από τη μεταφορά των ηλεκτρονίων δεν χρησιμοποιείται για τη σύνθεση ATP αλλά διαχέεται στο περιβάλλον ως θερμότητα. Αν εμποδιστεί το NADH που παράγεται στο κυτταρόπλασμα να εισέλθει στο μιτοχόνδριο, η παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου συνεχίζεται, ενώ αν εμποδιστεί η είσοδος του πυρουβικού οξέος, σταματά η παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου. Φαίνεται λοιπόν ότι η υπερτροφοδοσία του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων συνεπεία της υπεργλυκαιμίας ευθύνεται για την υπερπαραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου και για την οξειδωτική καταπόνηση του κυττάρου. Πράγματι, η υπερβολική έκφραση της αποσυζευκτικής πρωτεΐνης 1 (UCP-1) στην επιφάνεια της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου, που εμποδίζει την παραγωγή υπεροξειδίου, ή η ενεργοποίηση του ενζύμου διασμούτωσης του υπεροξειδίου του μαγγανίου (manganese superoxide dismutase, Mn-SOD), που το αδρανοποιεί, προστατεύουν το κύτταρο από τις βλαπτικές συνέπειες της

υπεργλυκαιμίας, επιβεβαιώνοντας ότι το υπεροξειδίο είναι η τοξική μορφή οξυγόνου που ευθύνεται για την οξειδωτική καταπόνηση του κυττάρου και παράγεται με αυτόν το μηχανισμό. Και οι τέσσερις προηγούμενοι μηχανισμοί φαίνεται να πυροδοτούνται από την υπερπαραγωγή υπεροξειδίου μέσα στο μιτοχόνδριο.⁴⁴

Όταν ενεργοποιείται η οδός των πολυολών, αυξάνει η συγκέντρωση της σορβιτόλης μέσα στα κύτταρα. Η αύξηση της συγκέντρωσης της σορβιτόλης σταματά από την UCP-1 και το ένζυμο Mn-SOD, πιθανώς επειδή το υπεροξειδίο ενεργοποιεί την αναγωγή της αλδόζης. Η ενεργοποίηση της αναγωγής της αλδόζης ίσως οφείλεται στην αναστολή από το υπεροξειδίο του ενζύμου αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, GADPH), με συνέπεια την αύξηση των συγκεντρώσεων των φωσφορικών τριοζών.

Η μεθυλογλυοξάλη, που παράγεται από την 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη, έχει τη δυνατότητα να γλυκοζυλιώνει πρωτεΐνες με ταχύτητα πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με τη γλυκόζη. Η UCP-1 και το ένζυμο Mn-SOD εμποδίζουν τη γλυκοζυλίωση πρωτεϊνών από τη μεθυλογλυοξάλη, ενδεχομένως επειδή η άρση της αναστολής του ενζύμου GADPH επιτρέπει τη συνέχιση του μεταβολισμού της γλυκόζης από την 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη στο πυρουβικό οξύ. Η UCP-1 και το ένζυμο Mn-SOD εμποδίζουν επίσης την *de novo* σύνθεση διακυλογλυκερόλης (DAG), που ενεργοποιεί την PKC, καθώς και την εκτροπή του μεταβολισμού της γλυκόζης προς την οδό της εξοζαμίνης.

2.6. Υπεργλυκαιμική μνήμη

Ένα ποσοστό ασθενών με διαβήτη εξακολουθεί να εμφανίζει επιπλοκές παρά την αποκατάσταση της ευγλυκαιμίας. Αυτή είναι η προτεινόμενη από τον Brownlee έννοια της υπεργλυκαιμικής μνήμης. Ο Brownlee αποδίδει την υπεργλυκαιμική μνήμη σε μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA.⁴⁵ Το DNA του μιτοχονδρίου δεν διαθέτει επιδιορθωτικούς μηχανισμούς, ιντρόνια ή ιστόνες, με αποτέλεσμα οι μεταλλάξεις σε αυτό να είναι 20 φορές συχνότερες σε σχέση με το πυρηνικό DNA. Οι μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA προκαλούν δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας και συνεχή υπερπαραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου παρά την αποκατάσταση της ευγλυκαιμίας. Παρόλα αυτά, δεν έχουν μέχρι τώρα ανευρεθεί μεταλλάξεις στο DNA των μιτοχονδρίων. Επομένως, ο προτεινόμενος μηχανισμός προς το παρόν αποτελεί, όπως προαναφέρθηκε, υπόθεση.

3. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΛΗΨΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΛΟΚΩΝ ΤΟΥ ΔΙΑΒΗΤΗ

Η αποκατάσταση της ευγλυκαιμίας είναι ο κύριος στόχος της αντιδιαβητικής αγωγής. Ο καλός γλυκαιμικός έλεγχος μειώνει την εμφάνιση και τη βαρύτητα των επιπλοκών, όπως κατέδειξαν δύο μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες, η DCCT¹ στους ασθενείς με διαβήτη τύπου 1 και η UKPDS² στους ασθενείς με διαβήτη τύπου 2. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης DCCT, ο καλός γλυκαιμικός έλεγχος στα άτομα με διαβήτη τύπου 1 που δεν παρουσίαζαν επιπλοκές όταν εισήχθησαν στη μελέτη, μείωσε τον κίνδυνο εμφάνισης αμφιβληστροειδοπάθειας κατά 76%, της μικρολευκωματινυρίας κατά 34% και της κλινικά έκδηλης νευροπάθειας σε διάστημα 5 ετών κατά 69%. Σημαντική ήταν επίσης η μείωση του κινδύνου της περαιτέρω εξέλιξης των ήδη υπάρχουσών επιπλοκών στην ομάδα των ασθενών που είχαν επιπλοκές όταν εισήχθησαν στη μελέτη. Αλλά και στα άτομα με διαβήτη τύπου 2, η μελέτη UKPDS έδειξε ότι η μείωση της τιμής της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης κατά μία περίπου μονάδα μείωσε τον κίνδυνο εμφάνισης μικροαγγειοπαθιακών επιπλοκών κατά 25%. Παρατηρήθηκε επίσης μια μείωση του κινδύνου εμφράγματος του μυοκαρδίου κατά 16%, που όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της UKPDS, η ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης στα άτομα με διαβήτη τύπου 2 μείωσε τον κίνδυνο εμφάνισης τόσο των μικροαγγειοπαθιακών όσο και των μακροαγγειοπαθιακών επιπλοκών. Μάλιστα, στην ίδια μελέτη δείχθηκε ότι η καλή ρύθμιση της αρτηριακής υπέρτασης έχει, ίσως, μεγαλύτερη σημασία από τη ρύθμιση του σακχάρου στην πρόληψη των επιπλοκών του διαβήτη.

Τόσο η DCCT όσο και η UKPDS έδειξαν ότι ο καλός γλυκαιμικός έλεγχος μειώνει την εμφάνιση των επιπλοκών, χωρίς όμως να τις αποτρέπει εντελώς. Αλλά και όταν επιτευχθεί η ευγλυκαιμία, η διατήρησή της είναι δυσχερής. Στη μελέτη UKPDS καταδείχθηκε ότι τόσο στα άτομα που ακολούθησαν συμβατική θεραπεία, όσο και σε αυτά που υποβλήθηκαν σε εντατικοποιημένο σχήμα θεραπείας, η τιμή της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης αυξανόταν με την πάροδο του χρόνου, αντανακλώντας ίσως τη σταδιακή επιδείνωση της λειτουργίας του β-κυττάρου. Αλλά και στη μελέτη DCCT, που περιελάμβανε ασθενείς με τύπου 1 διαβήτη, ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών παρουσίασε επιπλοκές 9 χρόνια μετά από την έναρξη της μελέτης, παρά το γεγονός ότι τα επίπεδα της γλυκόζης διατηρήθηκαν σε σχεδόν φυσιολογικά όρια. Η δυνατότητα φαρμακευτικής παρέμβασης για την

πρόληψη ή την επιβράδυνση των επιπλοκών του διαβήτη θα ήταν επομένως επιθυμητή. Διάφορες κατηγορίες φαρμάκων έχουν δοκιμαστεί ή δοκιμάζονται, με την ελπίδα ότι θα βρεθούν ασφαλή και αποτελεσματικά σκευάσματα, τα οποία θα προλαμβάνουν ή θα επιβραδύνουν τις επιπλοκές του διαβήτη. Οι αναστολείς της αναγωγής της αλδόζης βρέθηκαν να βελτιώνουν κάποιες παραμέτρους της διαβητικής νευροπάθειας⁴⁶ σε πειραματόζωα, ενώ δεν είχαν επίδραση στην εξέλιξη της διαβητικής νευροπάθειας και της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας.⁴⁷ Τα αποτελέσματά τους όμως στη θεραπεία της διαβητικής νευροπάθειας δεν ήταν τα αναμενόμενα. Επιπλέον, ορισμένα από τα φάρμακα αυτής της κατηγορίας προκάλεσαν σοβαρές αλλεργικές αντιδράσεις σε σημαντικό ποσοστό ασθενών. Κανένα φάρμακο της συγκεκριμένης κατηγορίας δεν κυκλοφορεί σήμερα στην αγορά. Η αποτυχία των αναστολέων της αναγωγής της αλδόζης στην πρόληψη των επιπλοκών του διαβήτη σημαίνει είτε ότι ο μηχανισμός των πολυολών είναι λιγότερο σημαντικός, είτε ότι τα επίπεδα που επιτυγχάνονται ενδοκυττάρια είναι χαμηλότερα από τα απαιτούμενα για την αναστολή του ενζύμου.

Μια δεύτερη κατηγορία φαρμάκων είναι οι αναστολείς του σχηματισμού προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (AGE-inhibitors). Ο πρώτος αναστολέας αυτής της κατηγορίας είναι η αμινογουανιδίνη.⁴⁸ Η αμινογουανιδίνη συνδέεται με τα ενδιάμεσα προϊόντα γλυκοζυλίωσης και εμποδίζει τη μετατροπή τους σε σταθερά, μη διασπώμενα τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης. Ένας άλλος αναστολέας αυτής της κατηγορίας, με εντελώς διαφορετική δομή, είναι η ουσία OPB-9195. Αυτή φαίνεται ότι έχει ευνοϊκά αποτελέσματα στην πει-

ραματική διαβητική νεφροπάθεια και δρα εμποδίζοντας την υπερβολική εναπόθεση κολλαγόνου τύπου IV. Επιπλέον, η χορήγησή της ομαλοποιεί την έκφραση του TGFβ.⁴⁹

Σε μια μεγάλη διπλή-τυφλή μελέτη σε διαβητικούς τύπου 1 με σαφή νεφροπάθεια, τα αποτελέσματα από τη χρήση αμινογουανιδίνης ήταν ενθαρρυντικά.⁵⁰ Ενθαρρυντικά είναι επίσης τα αποτελέσματα των πρώτων κλινικών δοκιμών στη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια.⁵¹

Μια τρίτη κατηγορία φαρμάκων είναι οι αναστολείς της πρωτεϊνικής κινάσης C. Οι πρώτοι, μη εκλεκτικοί αναστολείς της πρωτεϊνικής κινάσης C, όπως η σταυροπορίνη, ο GF109203X και ο H7, ήταν τοξικοί και αναποτελεσματικοί. Σήμερα, δοκιμάζεται η ένωση LY-333531, που είναι εκλεκτικός αναστολέας των ισομορφών β₁ και β₂ του ενζύμου²⁷ και χορηγείται από του στόματος. Τα αποτελέσματα στην πειραματική νευροπάθεια, αμφιβληστροειδοπάθεια και νευροπάθεια υπήρξαν ενθαρρυντικά. Οι πρώτες κλινικές μελέτες βρίσκονται σε εξέλιξη.

Όσον αφορά στη χρήση αντιοξειδωτικών παραγόντων στην πρόληψη των επιπλοκών του διαβήτη, η υπόθεση της υπεργλυκαιμικής μνήμης ίσως εξηγήσει γιατί τα μέχρι τώρα χρησιμοποιούμενα φάρμακα, όπως είναι η βιταμίνη E, δεν είχαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα.⁵² Οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες εξουδετερώνουν τα ήδη σχηματισμένα τοξικά παράγωγα του οξυγόνου, αλλά δεν σταματούν την παραγωγή υπεροξειδίου στα μιτοχόνδρια. Σήμερα, δοκιμάζονται μόρια με μικρό μοριακό βάρος, που μιμούνται τη δραστηριότητα των ενζύμων δισμουτάση/καταλάση του υπεροξειδίου.⁵³⁻⁵⁵

ABSTRACT

Mechanisms of the complications of diabetes: Newer aspects

A. NIKOLOPOULOS, N. TENTOLOURIS, N. KATSILAMBROS

1st Department of Propedeutic Medicine, Medical School, University of Athens, Diabetes Centre, "Laiko" General Hospital, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2006, 23(2):131-139

Hyperglycemia is the basic metabolic disturbance in patients with diabetes. The chronic complications of the disease are associated with both the duration and the degree of hyperglycemia. At the cellular level, increased blood glucose causes tissue injuries by one or more of the following mechanisms: (a) increased glucose metabolism through the polyol pathway; (b) increased production of end-glycation products; (c) activation of the protein kinase-C; (d) increased activation of the hexosamine pathway, and (e) oxidative stress and damage of the tissues. The results of recent studies suggest that the first four mechanisms are attributable to mitochondrial overproduction of hydrogen superoxide as a result of excess glucose metabolism. This hypothesis attempts to explain and unify the mechanisms underlying glucose induced tissue damage in diabetes.

Key words: Diabetes mellitus, Macroangiopathic complications, Microangiopathic complications, Pathogenesis of complications

Βιβλιογραφία

- DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP. The effect of intensive treatment of diabetes and progression of long-term complications in insulin dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993, 329:997–986
- UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS) GROUP. Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998, 352:837–853
- SKYLER J. Diabetic complications: The importance of glucose control. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1996, 25:243–254
- GIARDINO I, EDELSTEIN D, BROWNLEE M. BCL-2 expression of antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation end-products in bovine endothelial cells. *J Clin Invest* 1996, 97:1422–1428
- BROWNLEE M. Biochemistry end molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001, 414:813–820
- VANDER JAGT DL, ROBINSON B, TAYLOR KK, HUNSAKER LA. Reduction of trioses by NADH-dependent aldo-keto reductases: Aldose reductase, methylglyoxal, and diabetic complications. *J Biol Chem* 1992, 267:4364–4369
- XIA P, KRAMER RM, KING GL. Identification of the mechanism for the inhibition of Na, K-adenosine triphosphatase by hyperglycaemia involving activation of protein kinase C and cytosolic phospholipase A₂. *J Clin Invest* 1995, 96:733
- LEE AY, CHUNG SS. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J* 1999, 13:23–30
- ZHANG Z, APSE K, PANG J, STANTON RC. High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase via cAMP in aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 2000, 275:40042–40047
- STITT AW, LI YM, GARDINER TA, BUCALA R, ARCHER DB, VLASSARA H. Advanced glycation end-products (AGEs) co-localize with AGE-receptors in the retinal vasculature of diabetic and of AGE-infused rats. *Am J Pathol* 1997, 150:523–531
- NISHIO T, HORII Y, SHIIKI H, YAKAMOTO H, MAKITA Z, BUKALA R ET AL. Immunohistochemical detection of advanced glycosylation end-products within the vascular lesions and glomeruli in diabetic nephropathy. *Hum Pathol* 1995, 26:308–313
- WELLS-KNECHT KJ, ZYZAK DV, LITCHFIELD JE, THORPE SR, BAYNES JW. Mechanism of autoxidative glycosylation: Identification of glyoxale and arabinose intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry* 1995, 34:3702–3709
- DEGENHARDT TP, THORPE SR, BAYNES JW. Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell Mol Biol* 1998, 44:1139–1145
- CHANG EY, SZALLASI Z, ACS P, RAIZADA V, WOLEE PC, FEWTRELL C ET AL. Functional effects of overexpression of protein kinase C- α - β - δ - ϵ - ζ in mast cell line RBL-2H3. *J Immunol* 1997, 159:2624–2632
- GIARDINO I, EDELSTEIN D, BROWNLEE M. Non enzymatic glycosylation *in vitro* and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity: A model for intracellular glycosylation in diabetes. *J Clin Invest* 1994, 94:110–117
- TANAKA S, AVIGAD G, BRODSKY B, EIKENBERRY EF. Glycation induces expansion of the molecular packing of collagen. *J Mol Biol* 1988, 263:4392–4398
- HUIJBERTS MS, WOLFFENBUTTEL BH, BOUDIER HA. Aminoguanidine treatment increases elasticity and decreases fluid filtration of large arteries from diabetic rats. *J Clin Invest* 1993, 92:1407–1411
- LI YM, MITSUHASHI T, WOJCIECHOWICZ D, SHIMIZU N, LI J, STITT A ET AL. Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation end-product receptors: Relationship of p60 to OST-48 and p90-80K-H membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:11047–11052
- VLASSARA H, BROWNLEE M, MANOGUE KR, DINARELLO CA, PASAGIAN A. Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: Role in normal tissue remodelling. *Science* 1988, 240:1546–1548
- KIRSTEIN M, ASTON C, HINTZ R, VLASSARA H. Receptor-specific induction of insulin-like growth factor I in human monocytes by advanced glycosylation end product-modified proteins. *J Clin Invest* 1992, 90:439–446
- ABORDO EA, WESTWOOD ME, THORNALLEY PJ. Synthesis and secretion of macrophage colony stimulating factor by mature human monocytes and human monocytic THP-1 cells induced by human serum albumin derivatives modified with methylglyoxal and glucose-derived advanced glycation end-products. *Immunol Lett* 1996, 53:7–13
- SCHMIDT AM, HORI O, CHEN JX, LI JF, CRANDALL J, ZHANG J ET AL. Advanced glycation end-products interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice: A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest* 1995, 96:1395–1403
- LI J, SCHMIDT AM. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end-products. *J Biol Chem* 1997, 272:16498–16506
- KOYA D, KING GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 1998, 47:859–866
- SCIVITTARO V, GANZ MB, WEISS MF. AGEs induce oxidative stress and activate protein kinase C- β (II) in neonatal mesangial cells. *Am J Physiol* 2000, 278:F676–F683
- SHIBA T, INOGUCHI T, SPORTSMAN JR, HEATH WF, BURSELL S, KING GL. Correlation of diacylglycerol level and protein kinase C activity in rat retina to retinal circulation. *Am J Physiol* 1993, 265:E783–E793
- DERUBERTIS FR, CRAVEN PA. Activation of protein kinase C in glomerular cells in diabetes: Mechanism and potential links to the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Diabetes* 1994, 43:1–8
- ISHII H, JIROUSEK MR, KOYA D, TAKAGI C, XIA P, CLERMONT A ET AL. Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC β inhibitor. *Science* 1996, 272:728–731

29. CRAVEN PA, STUDER RK, DERUBERTIS FR. Impaired nitric oxide dependent cyclic guanosine monophosphate generation in glomeruli from diabetic rats: Evidence for protein kinase C mediated suppression of the cholinergic response. *J Clin Invest* 1994, 93:311–320
30. GANZ MB, SEFTEL A. Glucose-induced changes in protein kinase C and nitric oxide are prevented by vitamin E. *Am J Physiol* 2000, 278:E146–E152
31. KUBOKI K, JIANG ZY, TAKAHARA N, HA SW, IGARASHI M, YAMAUCHI T ET AL. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and *in vivo*: A specific vascular action of insulin. *Circulation* 2000, 101:676–681
32. GLOGOWSKI EA, TSIANI E, ZHOU X, FANTUS IG, WHITESIDE C. High glucose alters the response of mesangial cell protein kinase C isoforms to endothelin-1. *Kidney Int* 1999, 55:486–499
33. HEMPEL A, MAASCH C, HEINTZE U, LINDSCHAU C, DIETZ R, LUFT EC ET AL. High glucose concentrations increase endothelial cell permeability via activation of protein kinase C alpha. *Circ Res* 1997, 81:363–371
34. WILLIAMS B, GALLACHER B, PATEL H, ORME C. Glucose-induced protein kinase C activation regulates vascular permeability factor mRNA expression and peptide production by human vascular smooth muscle cells *in vitro*. *Diabetes* 1997, 46:1497–1503
35. STUDER RK, CRAVEN PA, DERUBERTIS FR. Role for protein kinase C in the mediation of increased fibronectin accumulation by mesangial cells grown in high-glucose medium. *Diabetes* 1993, 42:118–126
36. PUGLIESE G, PRICCI F, PUGLIESE F, MENT P, LENTIL L, ANDREANI D ET AL. Mechanisms of glucose enhanced extracellular matrix accumulation in rat glomerular mesangial cells. *Diabetes* 1994, 43:478–490
37. FEENER EP, XIA P, INOGUCHI TA, SHIDA T, KUNISAKI M, KING GL. Role of protein kinase C in glucose- and angiotensin II-induced plasminogen activator inhibitor expression. *Contrib Nephrol* 1996, 118:180–187
38. YERNENI KK, BAI W, KHAN BV, MEDFORD RM, NATARAJAN R. Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappa B in vascular smooth muscle cells. *Diabetes* 1999, 48:855–864
39. SAYESKI PP, KUDLOW JE. Glucose metabolism to glucosamine is necessary for glucose stimulation of transforming growth factor-alpha gene transcription. *J Biol Chem* 1996, 271:15237–15243
40. KOLM-LITTY V, SAUER U, NERLICH A, LEHMANN R, SCHLEICHER ED. High glucose-induced transforming growth factor beta 1 production is mediated by hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1998, 101:160–169
41. DANIELS MC, KANSAL P, SMITH TM, PATERSON AJ, KUDLOW JE, McCLAIN DA. Glucose regulation of transforming growth factor-alpha expression is mediated by products of the hexosamine biosynthesis pathway. *Mol Endocrinol* 1993, 7:1041–1048
42. CHEN YA, SU M, WALIA RR, HAO Q, COVINGTON JW, VAUGHAN DE. Sp1 sites mediate activation of the plasminogen activator inhibitor-1 promoter by glucose in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1998, 273:822–831
43. KADONAGA JT, COUREY AJ, LADIKA J, TJIAN R. Distinct regions of Sp1 modulates DNA binding and transcriptional activation. *Science* 1988, 242:1566–1570
44. KORSHUNOV SS, SKULACHEV VP, STARKOV AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 1997, 416:15–18
45. NISHIKAWA T, EDELSTEIN D, DU XL, YAMAGISHI S, MATSAMURA T, KANEDA Y ET AL. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000, 404:787–790
46. JUDZEWITSCH RG, JASPAN JB, POLONSKY KS, WEINBERG CR, HALTER JB, HALAR E ET AL. Aldose reductase inhibition improves nerve conduction velocity in diabetic patients. *N Engl J Med* 1983, 308:119–125
47. ENGERMAN RL, KERN TS, GARMENT MB. Capillary basement membrane in retina, kidney, and muscle of diabetic dogs and galactosemic dogs and its response to 5 years aldose reductase inhibition. *J Diabetes Complications* 1993, 7:241–245
48. BROWNLEE M, VLASSARA H, KOONEY A, URICH P, CERAMI A. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science* 1986, 232:1629–1632
49. NAKAMURA S, MAKITA Z, ISHIKAWA SD, YASAMURA K, FUZII W, YANAGISAWA K E AL. Progression of nephropathy in spontaneous diabetic rats is prevented by OPB-9195, a novel inhibitor of advanced glycation. *Diabetes* 1997, 46:895–899
50. APPEL G, BOLTON K, FREEDMAN B, WUERTH JP, CARTWRIGHT K. Pimagedine lowers total urinary protein and slows progression of overt diabetic nephropathy in patients with type I diabetes. *J Am Soc Nephrol* 1999, 10:153A
51. RASKIN P, CALTRAN D, WILLIAM M, WUERTH JP, CARTWRIGHT K. Pimagedine reduces progression of retinopathy and lowers lipid concentrations in patients with type I diabetes. *J Am Soc Nephrol* 1999, 10:179A
52. CERIELLO A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a causal antioxidant therapy. *Diabetes Care* 2003, 26:1589–1596
53. FAULKNER KM, LIOCHEV SI, FRIDOVICH I. Stable Mn(III) porphyrins mimic superoxide dismutase *in vitro* and substitute for it *in vivo*. *J Biol Chem* 1994, 269:23471–23476
54. DOCTROW SR, HUFFMAN K, MARCUS CB, MUSLEH W, BRUCE A, BAUNDRY M ET AL. Salen-manganese complexes: Combined superoxide dismutase/catalase mimics with broad pharmacological efficacy. *Adv Pharmacol* 1997, 38:247–269
55. SALVEMINI D, WANG ZQ, ZWEIER JL, SAMOUILOV A, MACARTHUR H, MISKO TP ET AL. A non peptidyl mimic of superoxide dismutase with therapeutic activity in rats. *Science* 1999, 286:304–306

Corresponding author:

N. Tentolouris, 33 Lakonias street, GR-115 23 Athens, Greece
e-mail: ntentol@med.uoa.gr