



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

38^ο
ΕΤΗΣΙΟ
ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ
ΙΑΤΡΙΚΟ
ΣΥΝΕΔΡΙΟ

**ΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΠΡΟΧΩΡΗΜΕΝΗΣ ΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΣΗΣ
ΕΠΑΓΟΥΝ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗΣ-1 ΣΕ
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΩΝ
ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ
NUCLEAR FACTOR-κΒ**

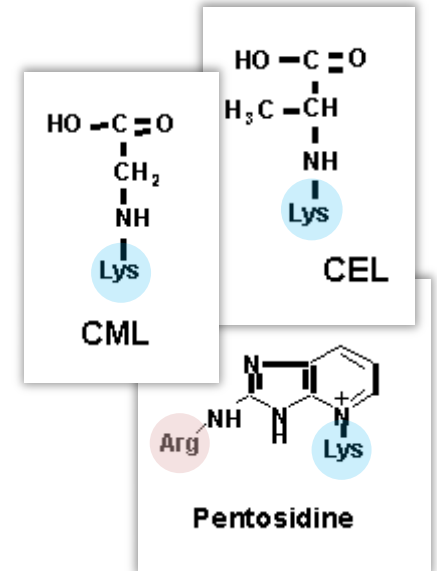
Χρήστος Αδαμόπουλος, Χριστίνα Πιπέρη,
Γεωργία Νταλαγιώργου, Ευανθία Διαμάντη-Κανδαράκη,
Αθανάσιος Γ. Παπαβασιλείου

Αθήνα, 18-05-2012

Εισαγωγή I

Τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης Advanced Glycation End-products, AGEs

- Μόρια υψηλής δραστηριότητας
- **Ενδογενούς** και **εξωγενούς** προέλευσης
- Παθογένεια διαβητικών επιπλοκών, αθηρωμάτωσης, γήρατος & του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών (**Polycystic Ovary Syndrome, PCOS**)



Αλληλεπίδραση AGEs με τον υποδοχέα τους **RAGE** (Receptor for **AGEs**)

↓

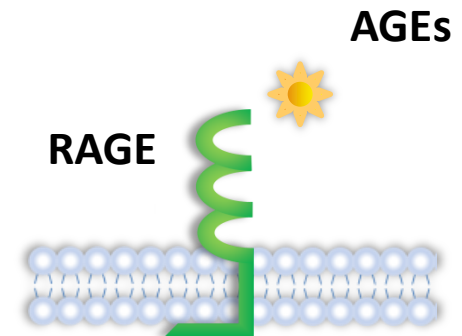
Ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια

↓

Ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων
π.χ.: **NF-κB** (Nuclear Factor-κB)

↓

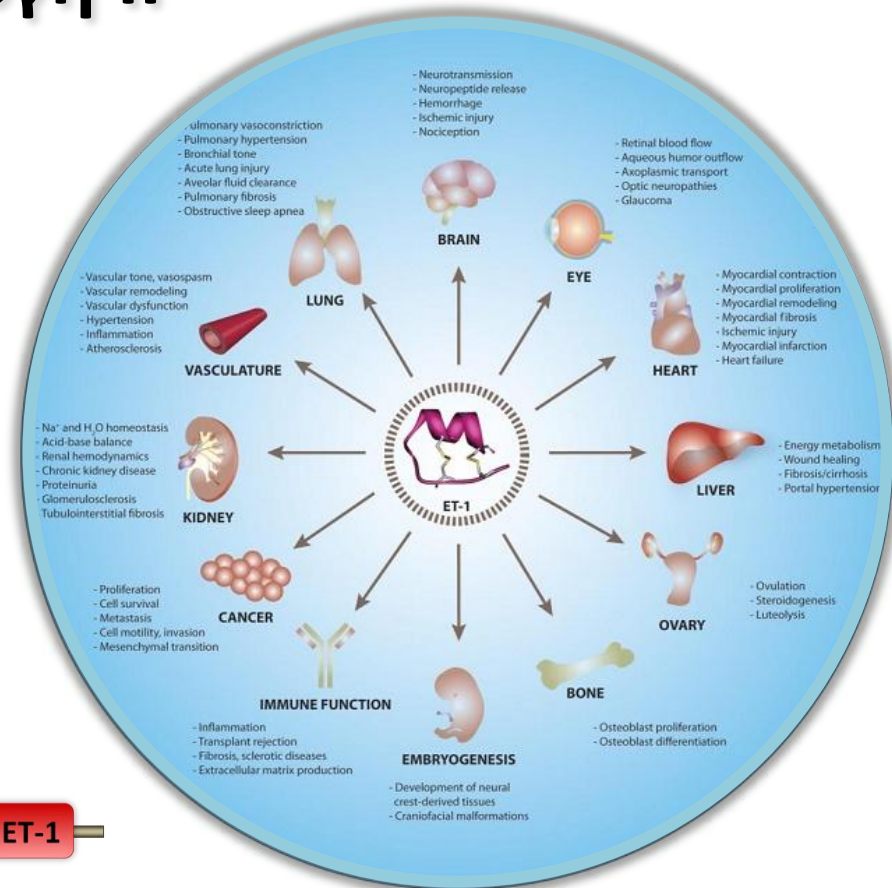
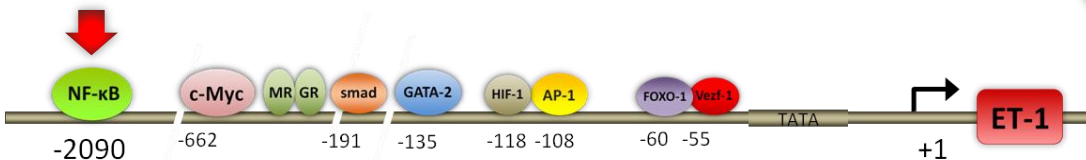
Μεταγραφή γονιδίων στόχων (π.χ. μόρια προσκόλλησης, ενδοθηλίνη-1)



Εισαγωγή II

Ενδοθηλίνη-1 (endothelin-1, ET-1)

- Αγγειοσυσταλτικό πεπτίδιο
- Πολλαπλές βιολογικές δράσεις
- Δείκτης ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας
- Εμπλέκεται στην αγγειοσύσπαση & στην παθογένεια της αθηροσκλήρωσης



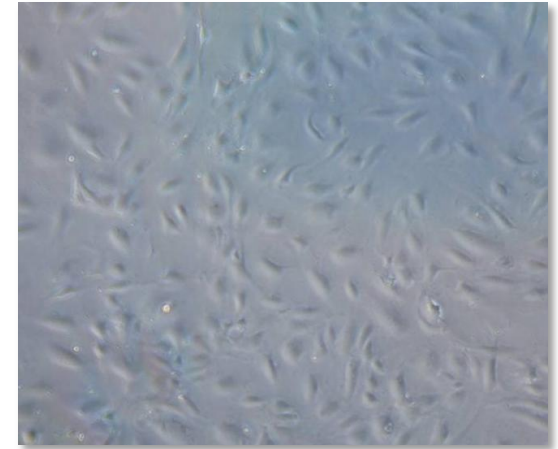
(Stow LR et al, FASEB J, 2011)

Σκοπός

Η διερεύνηση του ρόλου των AGEs στη γονιδιακή ρύθμιση και πρωτεϊνική έκφραση της ενδοθηλίνης-1 στο ενδοθήλιο

Υλικά & Μέθοδοι I

- Καλλιέργειες ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων αορτής (**Human Aortic Endothelial Cells, HAECs**)
- Χορηγήση γλυκοζυλιωμένης αλβουμίνης (**AGE-BSA**)
 - συγκεντρώσεις: **100 & 200 µg/ml**
 - χρόνοι: **24, 48, 72h**
- Προσδιορισμός έκφρασης
 - **ET-1** - ποσοτική PCR (**Real Time - PCR**)
 - **RAGE** - κυτταρομετρία ροής (**FACS**)
 - **p-ERK1/2** - ανοσοαποτύπωση κατά Western
- Μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου **ET-1** μέσω του **NF-κB**
 - δοκιμασία μεταβολής της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (**Electro-Mobility Shift Assay, EMSA**)



Υλικά & Μέθοδοι II

- Ανοσοϊστοχημική διερεύνηση των **AGEs**, **RAGE** & **ET-1** στο ενδοθήλιο αορτής **φυσιολογικών επίμυων** μετά από χορήγηση τρίμηνης δίαιτας χαμηλής ή υψηλής περιεκτικότητας σε AGEs (**LOW-AGEs** & **HIGH-AGEs**).



φυσιολογικοί ενήλικοι
αρουραίοι Wistar
Αριθμός = 20

ΟΜΑΔΑ 1
Αριθμός = 10
HIGH-AGEs

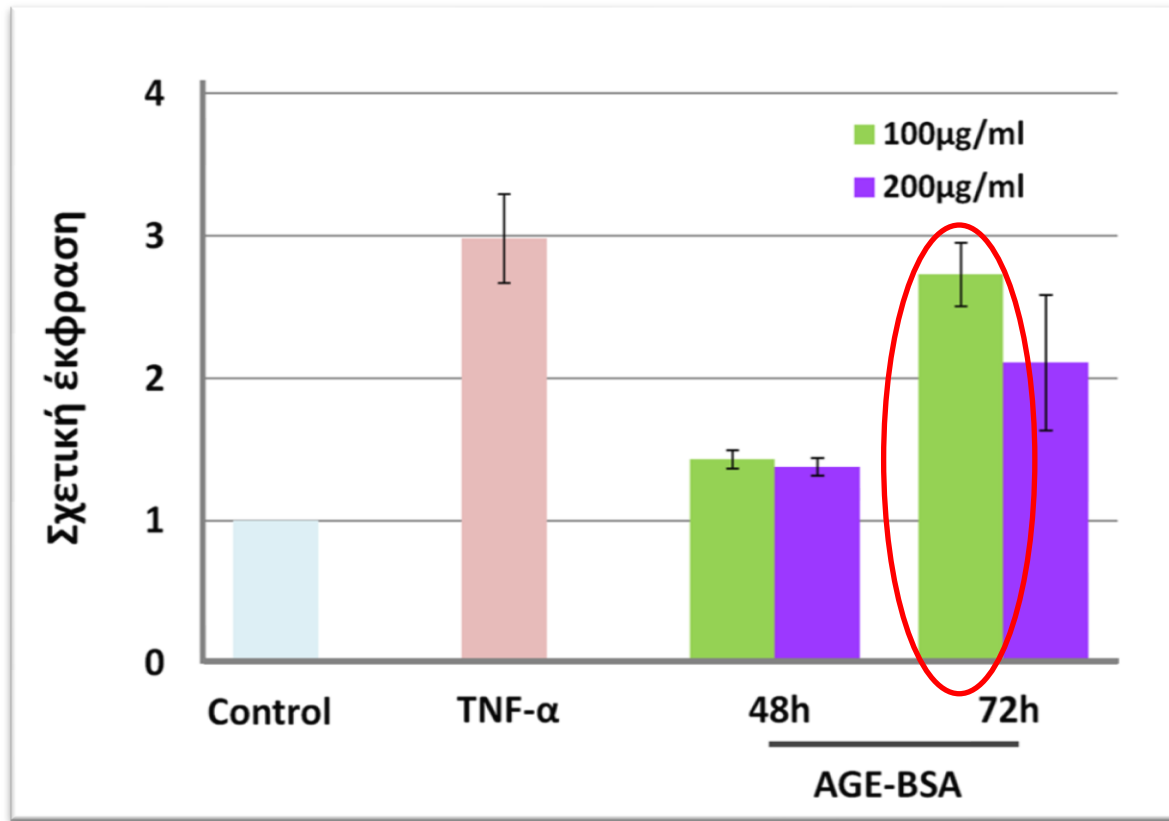
ΟΜΑΔΑ 2
Αριθμός = 10
LOW-AGEs

Η παρασκευή της **HIGH-AGEs** τροφής επιτεύχθηκε μετά από έκθεση της τροφής στους για 30min στους 190 °C.



Αποτελέσματα I

Επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) της ET-1 σε HAECs μετά από χορήγηση AGE-BSA



TNF-α: θετικός μάρτυρας

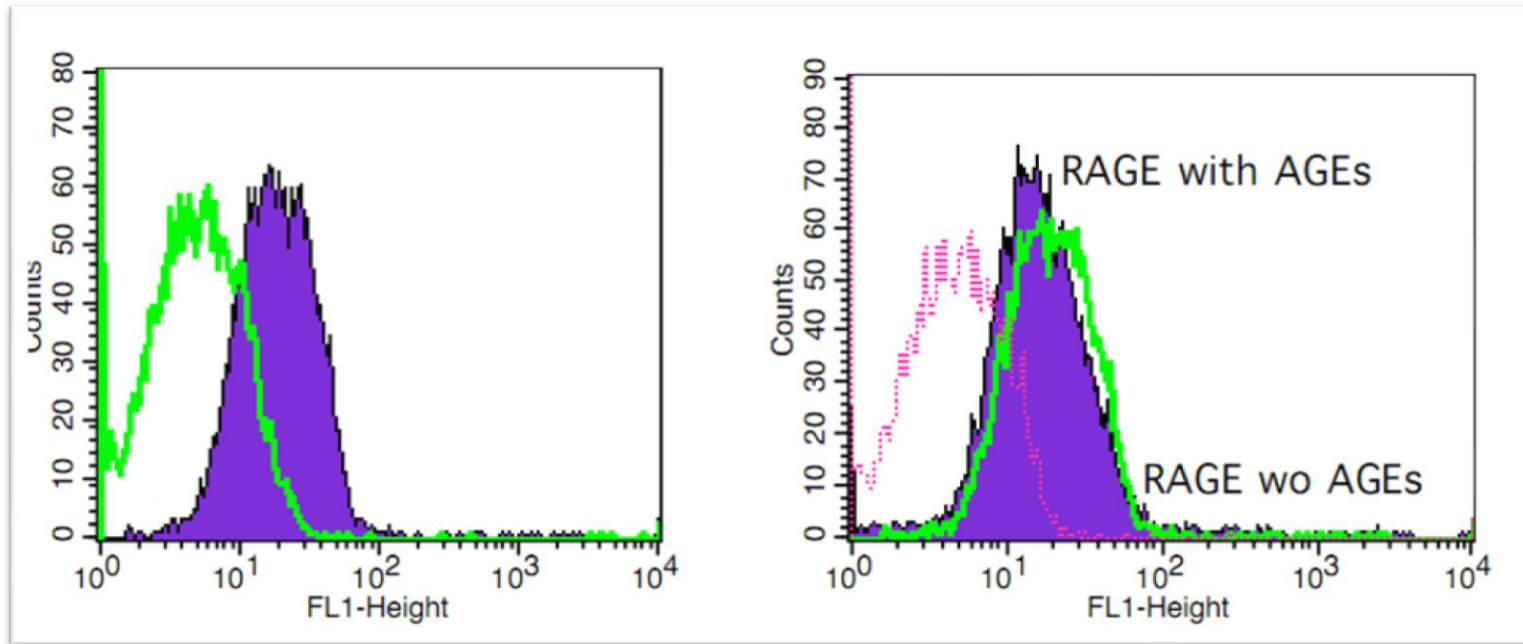
- Απομόνωση ολικού RNA
- Σύνθεση cDNA (RT-PCR)
- Ποσοτική PCR (Real Time PCR)

Forward Primer	-CCAAGGAGCTCCAGAAACAG-
Reverse Primer	-GATGTCCAGGTGGCAGAAGT-

Οι ειδικοί εκκινήτες σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού **Primer 3** και ελέγχθηκαν με το λογισμικό **Primer-BLAST**

Αποτελέσματα II

Η έκφραση του RAGE παρέμεινε αμετάβλητη μετά από την επίδραση του AGE-BSA



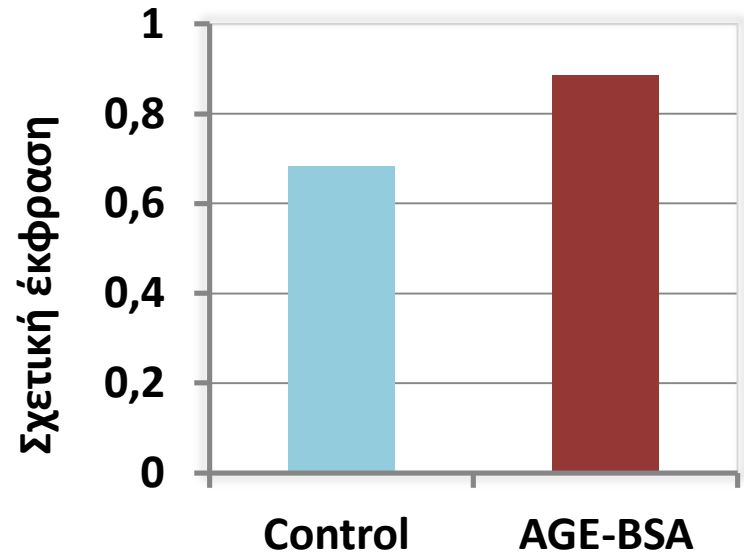
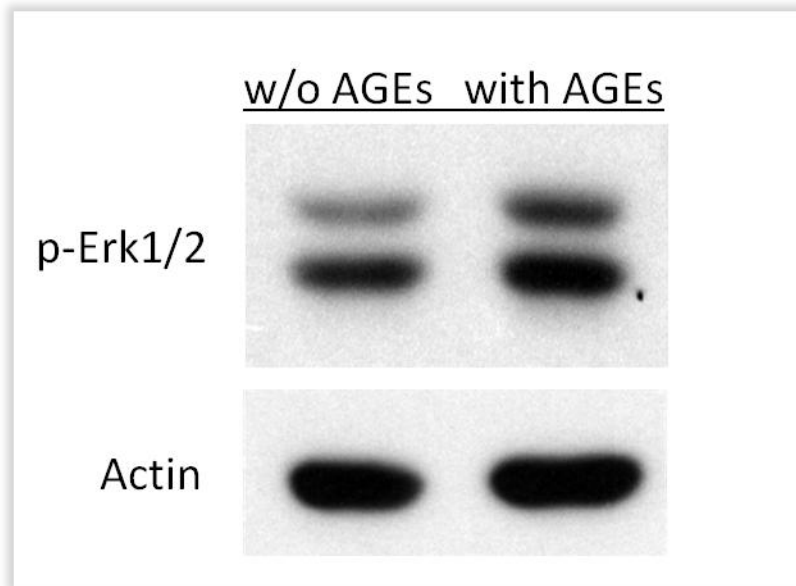
Κυτταρομετρία Ροής

Χρόνος: 72h

Συγκέντρωση: 100μg/ml

Αποτελέσματα III

Επαγωγή της ενεργοποιημένης/ φωσφορυλιωμένης MAP κινάσης ERK1/2 μετά από επίδραση AGE-BSA



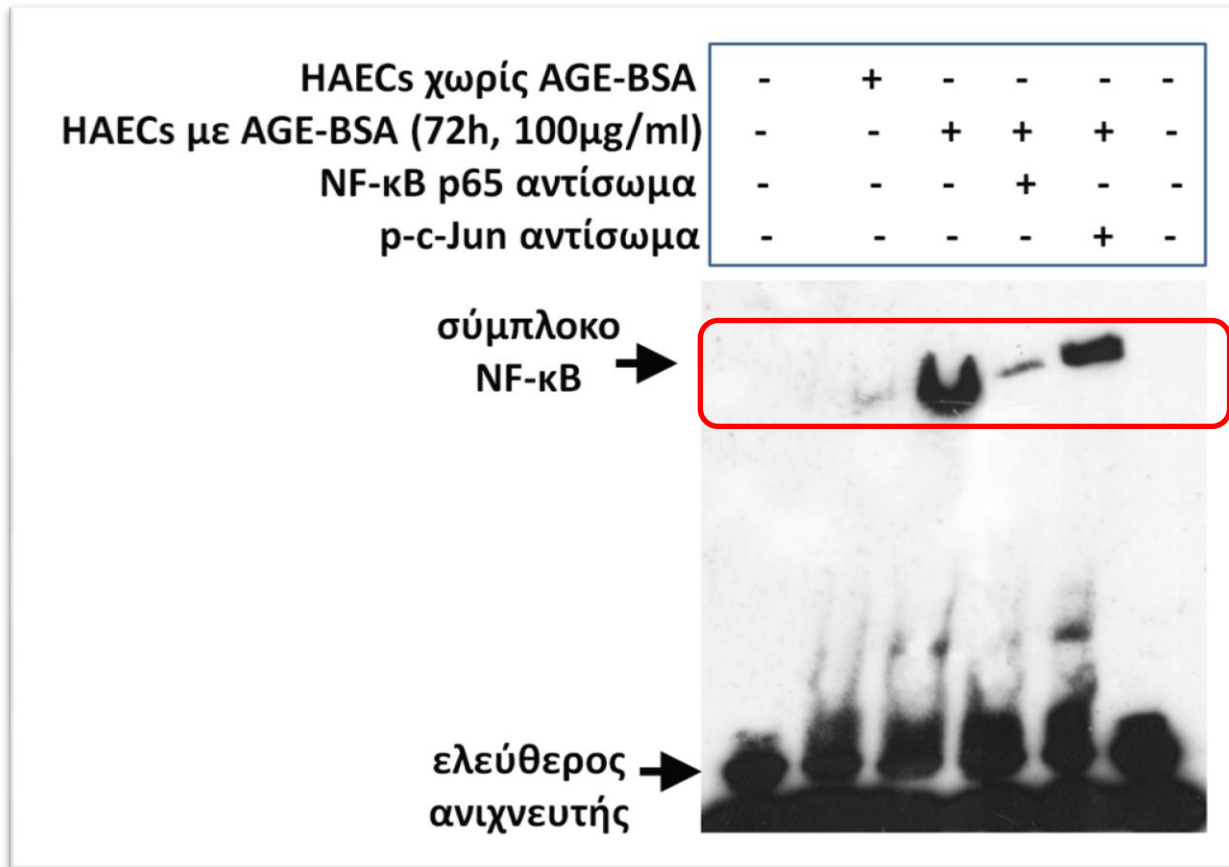
Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Χρόνος: 72h

Συγκέντρωση: 100μg/ml

Αποτελέσματα IV

Πρόσδεση του AGE-επαγόμενου μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ στον υποκινητή του γονιδίου της ET-1



EMSA

Χρόνος: 72h

Συγκέντρωση: 100μg/ml

Αποτελέσματα V

in vivo

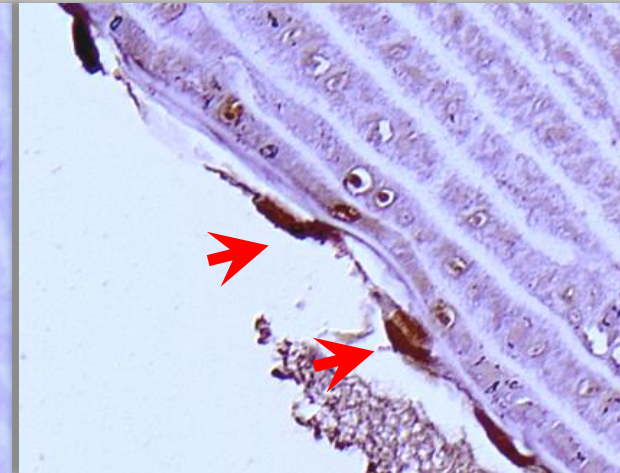
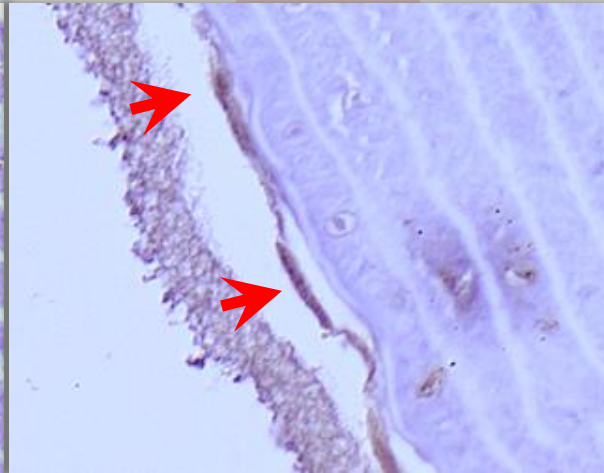
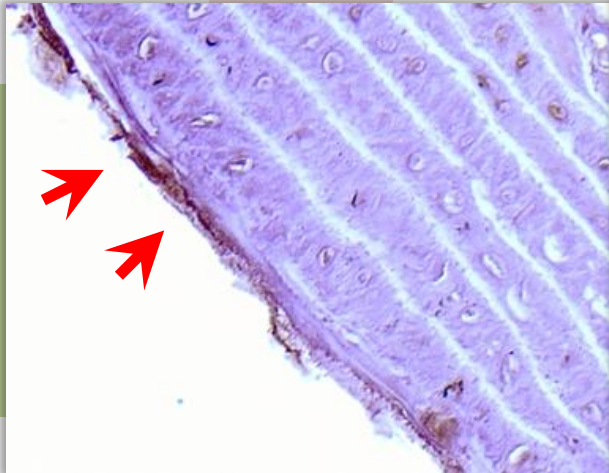
Υψηλά επίπεδα έκφρασης των AGEs, RAGE και ET-1 στο ενδοθήλιο των ζώων που είχε λάβει δίαιτα με HIGH-AGEs

AGEs

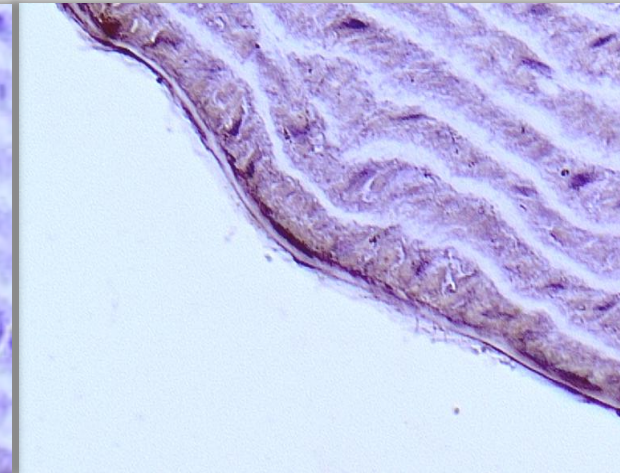
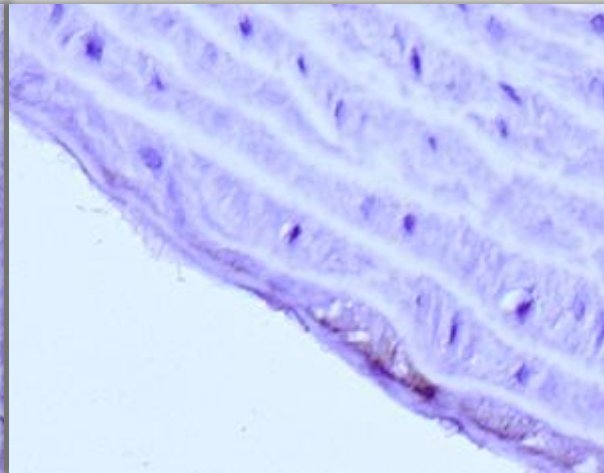
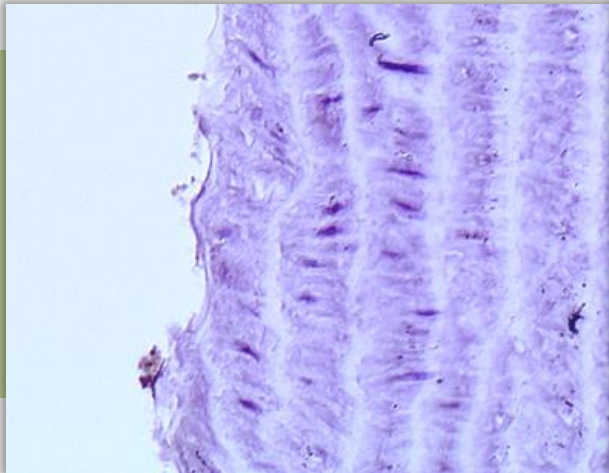
RAGE

ET-1

HIGH-AGES



LOW-AGES



Συμπεράσματα

- Επαγωγή και ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης της **ET-1** μέσω:

AGE → RAGE → ERK1/2 → NF-κB

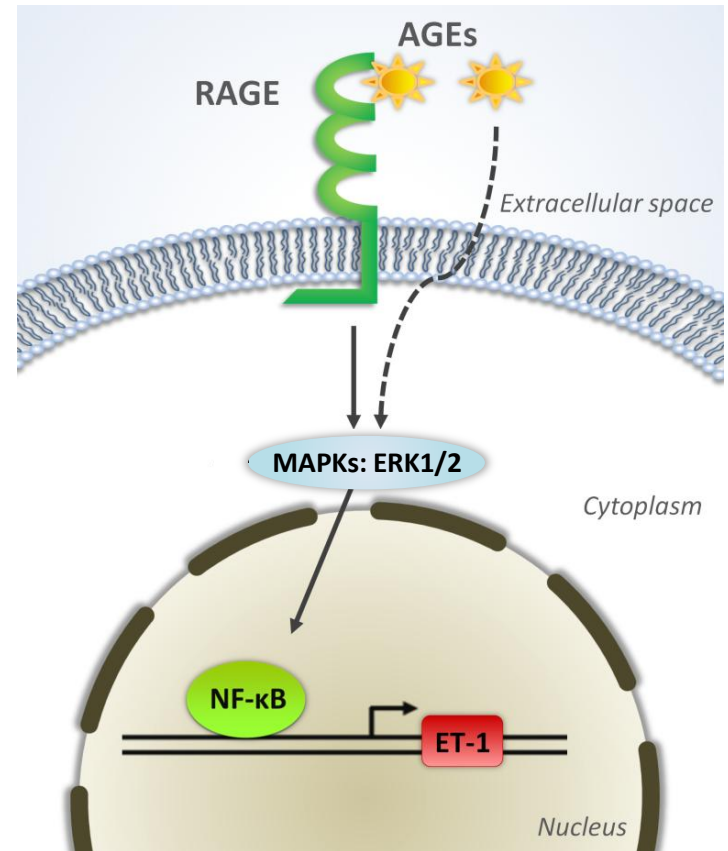
Ενδοθηλιακή Δυσλειτουργία

παχυσαρκία

**μικροαγγειακές
διαβητικές επιπλοκές**

αθηρογένεση

PCOS



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ, ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ . Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.