

ΥΒΡΙΔΙΚΑ ΜΕΤΑΛΛΟΚΙΤΡΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΣΤΗΝ ΕΠΑΓΩΓΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΙΝΣΟΥΛΙΝΟΜΙΜΗΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΟ ΔΙΑΒΗΤΗ ΤΥΠΟΥ II

Α. Σαλίφογλου*

Τμήμα Χημικών Μηχανικών, ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα
(*salif@auth.gr)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο διαβήτης είναι μια ασθένεια που πλήττει ολοένα και μεγαλύτερες πληθυσμιακές ομάδες σε όλη την υφήλιο. Οι μεταβολικές αποκλίσεις της κυτταρικής φυσιολογίας σχετίζονται είτε με έλλειψη ινσουλίνης είτε με ινσουλινοαντίσταση. Η παχυσαρκία σχετίζεται με το διαβήτη μέσω της ινσουλινοαντίστασης, με ιδιαίτερα έντονο το συσχετισμό αυτό στην περίπτωση του διαβήτη τύπου II ^[1,2]. Σημαντικότερος ιστός σε όλες τις περιπτώσεις είναι τα αδιποκύτταρα. Θεωρώντας ότι ο λιπώδης ιστός αποτελεί κύριο οργανικό ιστό, η διαφοροποίηση των κυττάρων του οποίου συνδέεται άμεσα με την πρόσληψη και καταβολισμό της γλυκόζης, ξεκίνησε ερευνητική προσπάθεια διερεύνησης των α) παραγόντων εκείνων που συμβάλλουν στη αδιπογένεση και αναδεικνύουν αντιδιαβητικούς παράγοντες, και β) μηχανιστικών οδών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη ώριμων αδιποκυττάρων ικανών να καταβολίσουν τη γλυκόζη. Στη προσπάθεια αυτή χρησιμοποιήθηκαν καλά καθορισμένα και φυσικοχημικά χαρακτηρισμένα μεταλλο-οργανικά υλικά ψευδαργύρου και βαναδίου, τα οποία σχεδιάστηκαν, συντέθηκαν, απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν φυσικοχημικά ^[3,4]. Επακόλουθη μελέτη τοξικότητας προσέφερε τα βιοτοξικά και μοριακά βιολογικά προφίλ των ενώσεων και έδωσε τη δυνατότητα περαιτέρω εντρύφησης στην κυτταρική διαφοροποίηση και ωρίμανση των αδιποκυττάρων. Η διαδικασία αυτή, παρουσία προτύπου μάρτυρα ινσουλίνης και των επιλεγμένων βάσει του προφίλ τοξικότητας ενώσεων του βαναδίου και ψευδαργύρου, κατέστη δυνατόν να ελέγχεται σε πραγματικό χρόνο με τη βοήθεια γενετικών δεικτών. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων δείχνουν α) το καθορισμένο αδιπογενετικό προφίλ των ενώσεων του βαναδίου και ψευδαργύρου με δομο-/χρονο- και δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, β) εκθέτουν το συσχετισμό σήματος κυτταρικής διαφοροποίησης και ωρίμανσης των αδιποκυττάρων μεταξύ της ινσουλίνης και των επιλεγμένων και εξετασθέντων συνθετικών υλικών. Συλλογικά, τίθενται οι βάσεις ανάπτυξης τεχνολογίας αντιμετώπισης του διαβήτη τύπου II μέσω μεταλλο-επαγόμενης κυτταρικής διαφοροποίησης που εξειδικευμένα στοχεύει στην αποτροπή ή/και θεραπευτική αντιμετώπιση της υπεργλυκαιμίας και ινσουλινοαντίστασης.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο διαβήτης αντικατοπτρίζει ένα ετερογενές σύνολο από (ιστο)κυτταρικές παθολογίες. Κύριος συντελεστής της φυσιολογίας αυτής είναι η ορμόνη ινσουλίνη. Οι δράσεις της ινσουλίνης στην κυτταρική διαφοροποίηση του λιπώδους ιστού και της ωρίμανσης των διαφοροποιημένων αδιποκυττάρων σηματοδοτούν καταρράκτες μηχανιστικών οδών με τελικό αποδέκτη τη γλυκόζη και τον καταβολισμό της προς αποφυγή ή καταπολέμηση της υπεργλυκαιμίας. Μεταλλοϊόντα έχουν εδώ και πολλά χρόνια εισέλθει στην ερευνητική αρένα των βιοανόργανων παραγόντων που επηρεάζουν θετικά τη φυσιολογία του ανθρώπου, ενώ ταυτόχρονα συνδράμουν θετικά στην αποσόβηση και θεραπεία πολλών ασθενειών. Μεταξύ των παθολογιών που εμπλέκουν μεταλλοϊόντα περιλαμβάνεται και εκείνη του διαβήτη. Κύριοι αντιπρόσωποι μεταλλοϊόντων φέρονται να είναι το βανάδιο και ο ψευδάργυρος, με άλλα μεταλλοϊόντα (π.χ. χρώμιο), να αποτελούν επίσης σημαντικούς υποψήφιους. Τα μεταλλοϊόντα αυτά της πρώτης σειράς των μεταβατικών μετάλλων είναι γνωστά για το ρυθμιστικό τους ρόλο στη φυσιολογία των οργανισμών (βακτηριακών και ευκαρυωτικών), επηρεάζοντας ουσιαστικά μεταβολικές διεργασίες σε κυτταρικό επίπεδο. Ο ρόλος αυτός στηρίζεται στη διαλυτή και βιοδιαθέσιμη μορφή των

μεταλλοϊόντων αυτών στα φυσιολογικά υγρά και άρα στις σύμπλοκες μορφές που αναδύονται από τις αλληλεπιδράσεις με φυσιολογικά οργανικά υποστρώματα που σχετίζονται με την παραγωγή ενέργειας μέσα στα κύτταρα.

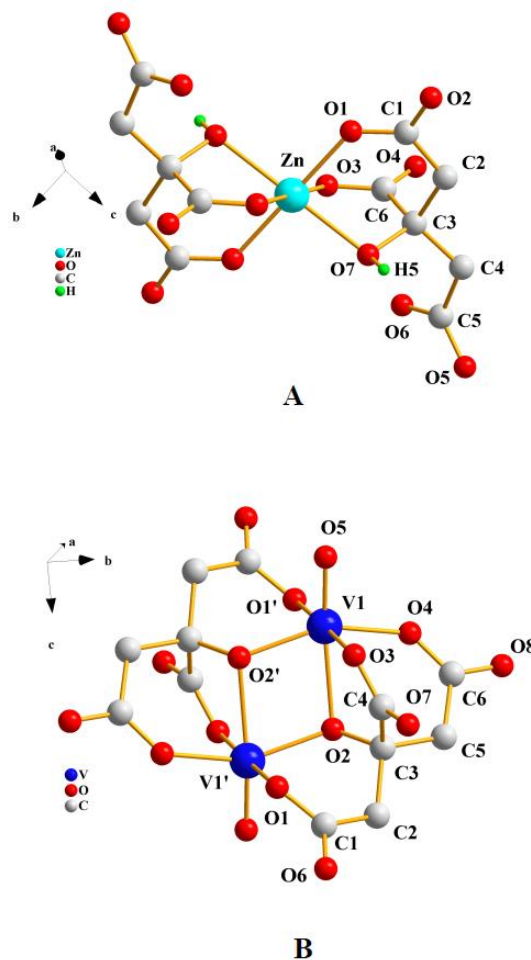
ΣΤΟΧΟΙ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Στο πλαίσιο της αντιμετώπισης της ασθένειας του διαβήτη τύπου II σε μοριακό επίπεδο, η ανάπτυξη βιοτεχνολογίας που αποβλέπει στη μεταλλοεπαγόμενη κυτταρική διαφοροποίηση του λιπώδους ιστού, έτσι ώστε να προκύψουν ώριμα, ενεργά αδιποκύτταρα ικανά να προσλάβουν και καταβολίσουν τη γλυκόζη, προδιαγράφει την ερευνητική προσπάθεια που καταβάλλεται για τη θεραπεία της ασθένειας αυτής στη βάση της ινσουλινομίμησης. Η προσπάθεια αυτή στοιχειοθετείται από την α) ανάπτυξη κατάλληλων μεταλλομορφών υβριδικού μεταλλο-οργανικού χαρακτήρα με υποστρώματα φυσιολογικής προέλευσης, ικανά να προάγουν μεταλλοσυμπλοκοποίηση σε υδατικά διαλύματα φυσιολογικού εύρους pH, β) διερεύνηση της δυνατότητας μεταλλοεπαγόμενης (και άρα ινσουλινομιμητικής) κυτταρικής διαφοροποίησης των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα, στο βαθμό που επιτυγχάνεται η πρόσληψη της γλυκόζης, γ) εξέταση των αλληλεπιδράσεων των μεταλλομορφών, που αναδύονται από τη δομική ειδοκατανομή αυτών στο διάλυμα, με βιομοριακούς στόχους που ενέχονται στις κυτταρικές διεργασίες ωρίμανσης των αδιποκυττάρων, και δ) επίδραση των διαλυτών και βιοδιαθέσιμων μεταλλομορφών σε εν δυνάμει μηχανισμούς διαφοροποίησης (σε σύγκριση με την πρότυπη ορμόνη ινσουλίνη), με απώτερο στόχο τη δημιουργία του κατάλληλου περιβάλλοντος μοριακής βιολογίας της πρόσληψης και καταβολισμού της γλυκόζης.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Τα βασικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν αντικατοπτρίζουν μεταλλοσύμπλοκα βαναδίου και ψευδαργύρου με κοινό υποκαταστάτη (ligand) το φυσιολογικό α-υδροξυκαρβοξυλικό οξύ, κιτρικό οξύ. Οι μεταλλοσύμπλοκες αυτές μορφές αναπτύχθηκαν συνθετικά σε υδατικό περιβάλλον, στη βάση της δομικής ειδοκατανομής που εξελίχθηκε ως συστηματική μέθοδος σύνθεσης υδατοδιαλυτών-βιοδιαθέσιμων μορφών βιολογικής σημασίας, στο Εργαστήριο (Σχήμα 1). Ο φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των υλικών αυτών, στη στερεά κατάσταση και στο διάλυμα, στηρίχθηκε μεταξύ άλλων στη στοιχειακή ανάλυση, φασματοσκοπία FT-IR, UV-Visible, κυκλική βολταμμετρία (βανάδιο), TGA-DTG, και κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ.

Στην επακολουθούσα βιολογική μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η ευαίσθητη στην ινσουλίνη χημικά-επαγόμενη διαφοροποιημένη κυτταρική σειρά 3T3-L1. Τόσο τα προ-αδιποκύτταρα όσο και τα ώριμα αδιποκύτταρα καλλιεργήθηκαν σε φιάλες κυτταροκαλλιέργειας των 75 cm², υπό κατάλληλες συνθήκες (5% CO₂ στους 37 ° C και τυπική υγρασία) σε αυξητικό μέσο Eagle τροποποιημένο κατά Dulbecco (DMEM) (Sigma, Steinheim, Germany). Η ωρίμανση των προ-αδιποκυττάρων σε αδιποκύτταρα, που περιέχουν λιπιδικά σταγονίδια, επιτυγχάνεται με την



Σχήμα 1. Δομή του συμπλόκου ανιόντος στο $(\text{NH}_4)_4[\text{Zn}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2]$ (A) και $\text{Na}_4[\text{V}_2\text{O}_2(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7)_2] \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (B).

παρουσία ενός κατάλληλου κοκτέιλ αδιπογενών ορμονών (δεξαμεθαζόνη, ισοβουτυλο-μεθυλοξανθίνη και ινσουλίνη).

Για να εξεταστούν τα ποσοστά επιβίωσης των κυττάρων, μετά τη διέγερση με τα σύμπλοκα είδη Zn(II)-cit και V(IV)-cit (vide infra), αμφότερα τα προ-αδιποκύτταρα 3T3-L1 και τα ώριμα αδιποκύτταρα, διαφοροποιημένα με ινσουλίνη, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, επιστρώθηκαν σε πλάκες 96 φρεατίων (2500 κύτταρα/φρεάτιο) και επωάστηκαν με τις προαναφερθείσες ενώσεις για 24 και 48 h σε DMEM.

Τα προ-αδιποκύτταρα 3T3-L1 διαφοροποιήθηκαν σε ώριμα αδιποκύτταρα με βάση συγκεκριμένο πρωτόκολλο διαφοροποίησης. Σύμφωνα με αυτό, τα προ-αδιποκύτταρα υποβλήθηκαν σε αγωγή είτε με 10 ng/mL ινσουλίνης και/ή επιλεγμένες ενώσεις του βαναδίου και ψευδαργύρου (0.5-25 μM).

Για την ποσοτική εκτίμηση της επιτυχούς διαφοροποίησης των κυττάρων σε ώριμα αδιποκύτταρα, η χρώση oil Red O πραγματοποιήθηκε την 8^η ημέρα της διαδικασίας διαφοροποίησης.

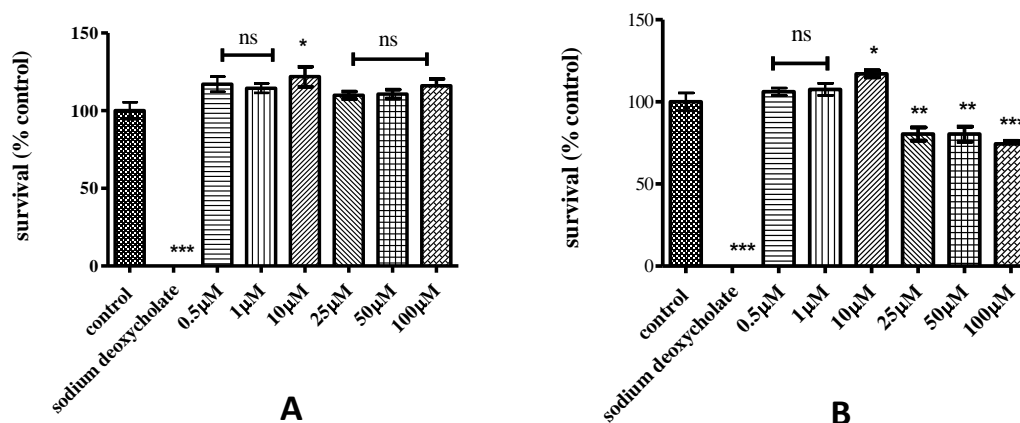
Το ολικό RNA εξήχθη από τα κύτταρα την 8^η ημέρα της διαδικασίας διαφοροποίησης, χρησιμοποιώντας Trizol (Life Science, Chemilab, Berkeley, California). Η σύνθεση του cDNA διεξήχθη με το kit συνθέσεως cDNA της iScript (BioRad), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η RT-PCR εκτελέστηκε σε σύστημα Rotor Gene Q (Qiagen), χρησιμοποιώντας το kit QuantiTect SYBR Green PCR και κατάλληλα αντιδραστήρια (Qiagen).

Δεδομένου ότι η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά αποτελεί παράδειγμα έκφρασης μεταναστευτικών χαρακτηριστικών, η αναστολή της ενδογενούς μεταναστευτικής ικανότητας των προ-αδιποκυττάρων 3T3-L1 εκτιμήθηκε, επίσης, μέσω in vitro δοκιμής χάραξης (scratch assay)^{5,6}. Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα εμβολιάστηκαν σε τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας 35 mm σε DMEM.

Η αποτίμηση των πειραματικών αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω στατιστικής επεξεργασίας των δεδομένων και αποδόθηκε με τη βοήθεια των κατάλληλων διαγραμμάτων (vide infra).

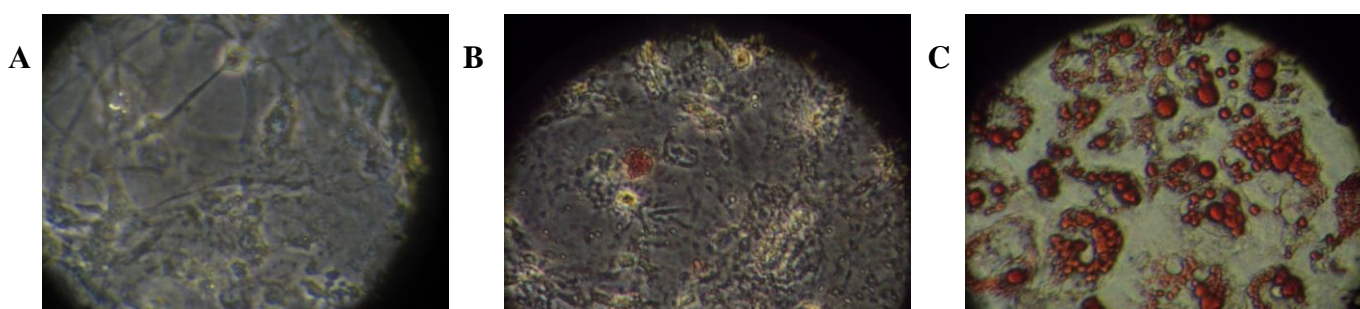
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η συγκεκριμένη μελέτη βασίστηκε σε καλά σχεδιασμένα δυαδικά μεταλλοσύμπλοκα είδη του βαναδίου και ψευδαργύρου με το φυσιολογικό κιτρικό οξύ. Οι δύο μεταλλομορφές, $(\text{NH}_4)_4[\text{Zn}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2]$ (Zn(II)-cit) (**A**) και $\text{Na}_4[\text{V}_2\text{O}_2(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7)_2] \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (V(IV)-cit) (**B**), εξετάστηκαν στη συνέχεια φυσικοχημικά, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στα επακολουθούντα βιολογικά πειράματα. Προς το σκοπό αυτό, προτεραιότητα είχε η διερεύνηση του βιοτοξικού προφίλ των συγκεκριμένων ενώσεων. Τα προκύπτοντα αποτελέσματα δείχνουν ότι η σύμπλοκη μορφή Zn(II)-cit φαίνεται να είναι μη τοξική στα προ-λιποκύτταρα, ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις (100 μM) τόσο για βραχείες (24 ώρες) όσο και για μεγαλύτερες χρονικές περιόδους (48 ώρες) επώασης (Σχήμα 2A). Το V(IV)-cit δοκιμάστηκε, επίσης, στο ίδιο εύρος συγκεντρώσεων (0.5-100 μM) υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες και βρέθηκε ότι είναι ατοξικό σε συγκεντρώσεις στην περιοχή 0.5-10 μM, με τοξικότητα να εμφανίζεται σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από 25 μM (Σχήμα 2B). Η επίδραση στην επιβίωση των κυττάρων τείνει να εξαρτάται τόσο από τη συγκέντρωση όσο και από το χρόνο. Τα σύμπλοκα Zn(II)-cit και V(IV)-cit χρησιμοποιήθηκαν επίσης για την εξέταση των ώριμων λιποκυττάρων. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το Zn(II)-cit δεν επηρεάζει την κυτταρική επιβίωση, ενώ το V(IV)-cit μειώνει την κυτταρική επιβίωση σε συγκεντρώσεις ίσες ή μεγαλύτερες από 10 μM.



Σχήμα 2. Ποσοστιαία (%) επιβίωση των 3T3-L1 προ-λιποκυττάρων κατόπιν έκθεσης σε διάφορες συγκεντρώσεις (0.5-100 μM) του Zn(II)-cit (A) και του V(IV)-cit (B) για 24 h.

Αναφορικά με το βιογενετικό προφίλ των ενώσεων του ψευδαργύρου και του βαναδίου, τα πειράματα ανέδειξαν διακριτή και διαφορετική μεταλλοεπαγόμενη αδιπογενετική δραστηριότητα για τα δύο διαφορετικά μεταλλοϊόντα. Έτσι, τόσο το σύμπλοκο Zn(II)-cit όσο και το V(IV)-cit χρησιμοποιήθηκαν σε πολλές συγκεντρώσεις (0.5-25 μM) για την πλήρη αντικατάσταση της ινσουλίνης. Υψηλότερες συγκεντρώσεις (25 μM) και των δύο συμπλόκων χρησιμοποιήθηκαν, επίσης, σε συνδυασμό με ινσουλίνη, σε μια προσπάθεια να εξεταστούν πιθανές συνεργικές, προσθετικές ή ανταγωνιστικές επιδράσεις. Ο ψευδάργυρος επέδειξε έντονη επαγωγή αδιπογένεσης σε όλες τις συγκεντρώσεις που εξετάστηκε (0.5-25 μM), καθώς οι αποθέσεις λιπιδίων ήταν εμφανείς μετά από μορφολογική παρατήρηση με χρώση oil Red O, σε σύγκριση με το μάρτυρα (μη επεξεργασμένα κύτταρα) (Σχήμα 3). Με βάση τη δοκιμασία χρώσης με oil Red O, το Zn(II)-cit έδειξε μια ελαφρά συνεργική και/ή ενισχυτική σχέση με την ινσουλίνη σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα ή μόνο με το Zn(II)-cit στην ίδια συγκέντρωση. Παρομοίως, η μεταλλομορφή V(IV)-cit χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή της ωρίμανσης των κυττάρων σε αδιποκύτταρα. Η συσσώρευση λιπιδίων στην καλλιέργεια ήταν εμφανής κυρίως σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0.5-10 μM). Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (25 μM) δεν παρατηρήθηκε αδιπογενετικότητα, πιθανώς λόγω τοξικότητας.



Σχήμα 3. Αντιπροσωπευτικές μικρογραφίες της διαφοροποίησης προ-αδιποκυττάρων 3T3-L1, με χρώση oil Red O. (A) μη επεξεργασμένα κύτταρα, πριν από τη χρώση, (B) μη επεξεργασμένα κύτταρα, μετά τη χρώση, (C) ώριμα αδιποκύτταρα διαφοροποιημένα παρουσία ινσουλίνης

Για την περαιτέρω επικύρωση και αξιολόγηση του αδιπογενετικού δυναμικού των συμπλόκων μεταλλομορφών Zn(II)-cit και V(IV)-cit, εξετάστηκε η σχετική έκφραση mRNA των στενά

συνδεδεμένων βιοδεικτών (PPAR- γ , GLUT-1,3,4, ADIPOQ, INS- και GCK). Οι στόχοι αυτοί επιλέχθηκαν με βάση τη φυσιολογία των συγκεκριμένων προ-λιποκυττάρων και ώριμων αδιποκυττάρων και το μοριακό βιολογικό προφίλ αυτών κατά τη διάρκεια διαφοροποίησης και ωρίμανσης. Η μοριακή βιολογία έδειξε διακριτά μεν αλλά διαφορετικά δε μοτίβα έκφρασης (expression patterns) των γονιδίων που είναι συναφή με την κυτταρική διαφοροποίηση των προ-αδιποκυττάρων και τελική ωρίμανση των προκυπτόντων κυττάρων στην τελική τους μορφή που είναι ικανή να οδηγήσει στην πρόσληψη και καταβολισμό της γλυκόζης.

Η συλλογική πειραματική διαδικασία προσέφερε ολοκληρωμένη εικόνα για τη δομο-/δοσο-εξαρτώμενη μοριακή βιολογία της κυτταρικής διαφοροποίησης του λιπώδους ιστού, αναδεικνύοντας τα συγκεκριμένα μεταλλοσύμπλοκα σε βιώσιμους ινσουλινομιμητικούς μεταλλοφαρμακευτικούς παράγοντες για την αντιμετώπιση της παθολογίας του διαβήτη τύπου II.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η διεξαχθείσα μελέτη α) προβάλλει την επίδραση των δομικών χαρακτηριστικών του κιτρικού ως υποκαταστάτη στη (βιο)χημεία των σύνθετων δυαδικών συμπλόκων μεταλλομορφών Zn(II)-cit και V(IV)-cit, καθιστώντας τους έτσι ικανούς βιομιμητικούς παράγοντες της ινσουλίνης αναφορικά με την αδιπογένεση, β) περιγράφει τη βιολογική επίδραση των υβριδικών συμπλόκων μορφών ψευδαργύρου και βαναδίου με βάση μέταλλο/δομή σε βιολογικές διεργασίες που συνδέονται με τη δράση ινσουλίνης σε προ-αδιποκύτταρα και ώριμα αδιποκύτταρα, και γ) αποσαφηνίζει τη διαφορετική διεγερτική δράση δομικά καθορισμένων συμπλόκων μορφών ψευδαργύρου ή βαναδίου σε συγκεκριμένους μοριακούς στόχους μηχανιστικών οδών ινσουλινομίμησης, συμπεριλαμβανομένων των PPAR- γ , GLUT 1,3,4, ADIPOQ, INS-R και GCK, σχετικών με την αποτελεσματική ωρίμανση των κυττάρων. Συλλογικά, τα πειραματικά αποτελέσματα στοιχειοθετούν τη βάση για την ανάπτυξη μοριακής βιοτεχνολογίας μεταλλο-επαγόμενου αδιπογενετικού δυναμικού με στόχο την αντιμετώπιση της υπεργλυκαιμίας και ινσουλινοαντίστασης στην περίπτωση του διαβήτη τύπου II ^[1-3, 4].

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ο συγγραφέας και οι συνεργάτες του εκφράζουν τις θερμές ευχαριστίες προς το Ινστιτούτο Βιολογίας του Εθνικού Κέντρου Επιστημονικής Έρευνας "Δημόκριτος", Αθήνα, για τη δωρεά της κυτταρικής σειράς 3T3-L1.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] H. Sakurai, Y. Kojima, Y. Yoshikawa, K. Kawabe, H. Yasui. *Coord. Chem. Rev.* 226 (2002) 187–198.
- [2] G. Vardatsikos, N.R Pandey, A.K Srivastava. *J. Inorg. Biochem.* 120 (2013) 8–17.
- [3] I.G Fantus, E. Tsiani. *Mol. Cell. Biochem.* 182(1-2) (1998) 109-119.
- [4] J. Jansen, W. Karges, L Rink. *Food Nutr. Bull.* 20(6) (2009) 399–417.
- [5] O. Tsave, M.P Yavropoulou, M. Kafantari, C. Gabriel, J.G Yovos, A. Salifoglou. *J. Inorg. Biochem.* 163 (2016) 323-331.
- [6] C.C Liang, A.Y Park, J.L Guan, *Nature Protocols* 2 (2007) 2.