

**Effekten av hyperglykemi og metylglyksal
på syntesen av proteoglykaner i epitelceller
fra distale tubuli *in vitro***



Camilla Neerland Berglund

Mastergrad i klinisk ernæring

Avdeling for ernæringsvitenskap, Det medisinske fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Våren 2007

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Avdeling for ernæringsvitenskap fra august 2005 til april 2006.

Jeg vil takke min veileder Svein Olav Kolset for å ha introdusert meg for glykobiologi og for en spennende oppgave. Du har vist stort engasjement og vært en dyktig veileder.

Jeg vil rette en ekstra stor takk til Katja Svennevig for all oppfølging og hjelp, både på laben og under skriveprosessen. Videre vil jeg takke Sigrid Johnsen Vesteng. Det har vært en glede og jobbe med deg!

Takk til familie og venner for all støtte gjennom mange år som student. En spesiell takk til pappa for all hjelp med oppgaven.

Til slutt vil jeg takke Robert. Du er alltid der når jeg trenger oppmuntring og gode ord.

Oslo, April 2007

Camilla Neerland Berglund

Summary

Background: Diabetic nephropathy poses an increasing health problem in the Western world, and research to new leads for diagnosis and therapy is warranted. Morphologically, diabetes nephropathy is characterized by thickening of the glomerular basement membrane (GBM), expansion of the mesangial matrix and podocyte loss. In addition to the GBM, the tubular basement membrane (TBM) also shows thickening, which is already evident at the silent stage of the disease. Long-term exposure to high levels of blood glucose leads to the formation of advanced glycated end products (AGEs). Levels of AGEs correlate with the degree of diabetes nephropathy and both AGEs and hyperglycemia can affect the synthesis and turnover of extracellular matrix components. Changes in kidney function in diabetes could be due to changes in the kidney basement membranes. This study explored the possibility that AGEs and hyperglycemia affect proteoglycan synthesis in cultured epithelial cells from distal tubules.

Methods: The Madin Darby Canine Kidney I (MDCK I) cells were cultured on plastic for 2, 4 or 8 days. To mimic the metabolic environment of diabetes *in vivo* the MDCK I cells were cultured in medium with 25 mM glucose or media with different concentrations of methylglyoxal (MGO) (0.2, 0.5 and 1.0 mM). Medium with low glucose (5 mM) was used as a control and medium with mannitol (5 mM glucose and 20 mM mannitol) was used as a negative osmotic control in all the work with high glucose. The cells were labelled with [³⁵S]-sulphate 24 h before harvesting. The labelled material was purified by Sephadex G-50 fine chromatography and DEAE-ion exchange chromatography, and analysed by SDS-PAGE. The amount of cells, protein and proliferation were determined for all the different conditions after 2, 4 and 8 days.

Results: A reduction in the proteoglycan synthesis was induced by 25 mM glucose, in comparison with 5 mM glucose when labelled with [³⁵S]-sulphate. 0.2 and 0.5 mM MGO increased the proteoglycan expression the first two days, but after 4 and 8 days the amount of proteoglycans was decreased. We found a reduced adhesion when culturing MDCK I cells in 1 mM MGO for 4 days. Although all the cells were floating in the medium, they were still viable and attached to the plastic when they were transferred to fresh medium. MGO also induced an increase in protein content and a decrease in cell number, indicating hypertrophy.

Conclusion: The changes in expression of [³⁵S]-proteoglycans induced by high glucose and MGO indicates an involvement of hyperglycemia and AGEs in the regulation of synthesis and turnover of proteoglycans.

Innholdsfortegnelse

FORORD	2
SUMMARY	3
INNHOLDSFORTEGNELSE	5
FORKORTELSER	9
1 INNLEDNING	11
1.1 DIABETES MELLITUS	11
1.1.1 <i>Diabetes type I</i>	11
1.1.2 <i>Diabetes type II</i>	12
1.1.3 <i>Senkomplikasjoner</i>	12
1.1.4 <i>Forekomst og kostnader</i>	14
1.2 NYRENES FILTRASJON	14
1.2.1 <i>Den glomerulære filtrasjonsbarrieren</i>	16
1.2.2 <i>Mesangialceller</i>	18
1.3 PROTEOGLYKANER	21
1.3.1 <i>Proteoglykansyntese</i>	22
1.3.2 <i>Funksjon</i>	22
1.3.3 <i>Proteoglykaner og nyrer</i>	23
1.3.4 <i>Proteoglykaner og patologi</i>	23
1.4 HYPERGLYKEMI	24
1.4.1 <i>Effekt av hyperglykemi</i>	25
1.5 METYLGLYOKSAL, MGO	28

1.6	DIABETES NEFROPATI	30
1.6.1	<i>Patologiske endringer i diabetes nefropati</i>	31
1.6.2	<i>Hyperglykemi og diabetes nefropati</i>	31
2	PROBLEMSTILLING	33
3	MATERIALER	35
3.1	CELLELINJER	35
3.2	KJEMIKALIER.....	35
3.3	UTSTYR.....	37
3.4	APPARATUR.....	37
4	METODER	39
4.1	CELLEFORSØK	39
4.1.1	<i>MDCK I celler</i>	39
4.1.2	<i>Generelt celledyrkningsoppsett</i>	39
4.2	CELLEDYR KING I ULIKE MEDIER	40
4.2.1	<i>Dyrking av celler i høy glukosekonsentrasjon</i>	40
4.2.2	<i>Dyrking av celler i metylglyoksal (MGO)</i>	41
4.2.3	<i>Splitting av celler</i>	42
4.3	NEDFRYSING AV CELLER	43
4.4	TINING AV CELLER.....	43
4.5	TELLING AV CELLER	43
4.6	BCA-MÅLING AV PROTEIN.....	44
4.7	WST-1 TEST.....	46
4.8	ANALYSE AV [³⁵ S]-PROTEOGLYKANER	47
4.8.1	<i>Innmerking med [³⁵S]-sulfat</i>	47

4.8.2	<i>Rensing av [³⁵S]-proteoglykaner</i>	47
4.9	SCINTILLASJONSTELLING	50
4.10	SDS-GELELEKTROFORESE	50
4.11	AUTORADIOGRAFI	52
5	RESULTATER	53
5.1	EFFEKT AV HYPERGLYKEMI PÅ NYREEPITELCELLER	53
5.1.1	<i>De ulike medienes osmolaritet</i>	54
5.1.2	<i>Effekt av hyperglykemi på cellevekst i nyreepitelceller</i>	54
5.1.3	<i>Effekt av hyperglykemi på syntese av [³⁵S]-makromolekyler i nyreepitelceller</i>	58
5.1.4	<i>Kronisk og akutt hyperglykemi</i>	62
5.1.5	<i>Effekt av kronisk og akutt hyperglykemi på syntese av [³⁵S]-makromolekyler</i>	65
5.2	EFFEKTEN AV MGO PÅ NYREEPITELCELLER.....	68
5.2.1	<i>Effekt av MGO på cellevekst i nyreepitelceller</i>	69
5.2.2	<i>Effekten av MGO på syntese av [³⁵S]-makromolekyler i nyreepitelceller</i>	72
6	DISKUSJON	77
6.1	EFFEKT AV HYPERGLYKEMI PÅ CELLEVEKST	77
6.2	EFFEKT AV HYPERGLYKEMI PÅ PROTEOGLYKANSYNTESE.....	78
6.3	MGO OG CELLEFORSØK	80
6.4	EFFEKT AV MGO PÅ CELLEVEKST	81
6.5	EFFEKT AV MGO PÅ PROTEOGLYKANSYNTESE	82
7	KONKLUSJON	85
8	REFERANSER	86

Forkortelser

AGE	Avanserte glykerte endeprodukter
cpm	“counts per minute”
CS	Kondroitinsulfat
DAG	Diacylglycerol
DS	Dermatansulfat
DSPG	Dermatansulfatproteoglykaner
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium Special
DMSO	Dimetyl sulfoxide
ECM	Ekstracellulær matriks
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	Føtalt kalveserum
GAG	Glykosaminoglykan
GalNAc	N-acetyl-galaktosamin
GAPDH	Glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase
GBM	Glomerulær basalmembran
GFR	Glomerulær filtrasjonsrate
GlcA	Glukuronsyre
GlcNAc	N-acetyl-glukosamin
GLUT	Glukosetransportmolekyl
GSH	Glutathion
HbA _{1c}	Glykert hemoglobin A _{1c}
HexA	Hekseronsyre
HS	Heparansulfat
IdoA	Iduronsyre

MDCK	Madin Darby Canine Kidney
MGO	Metylglyoksal
MMP	Matriks metalloproteinaser
NDST	N-deacetyl/N-sulfotransferase
PAPS	3'fosfoadenosin 5'fosfosulfat
PG	Proteoglykan
PKC	Protein kinase C
RAGE	AGE reseptor
ROS	Reaktive oksygenforbindelser
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TBM	Tubulær basalmembran
TGF- β_1	Transforming growth factor β
TIMP	Tissue inhibitors of matrix metalloproteases
UDP	Uridin difosfat
U-PA	Urokinase plasminogen aktivator

1 Innledning

1.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus er ulike stoffskiftesykdommer som karakteriseres ved kronisk hyperglykemi. De vanligste typene er diabetes type I og diabetes type II, men en rekke andre undergrupper er definert, og flere vil sannsynligvis bli definert i fremtiden (WHO 1999). Alle former for diabetes er assosiert med mikro- og makrovaskulære senkomplikasjoner.

1.1.1 Diabetes type I

Diabetes type I kjennetegnes av absolutt eller nesten absolutt insulinmangel. Denne mangelen er et resultat av autoimmun ødeleggelse av insulinproduserende β -celler i bukspyttkjertelen. Ødeleggelsen skjer gradvis og klinisk diabetes vil oppstå når samlet insulinproduksjon er redusert til 10-20 % av det normale. Årsaken til at immunforsvaret angriper β -cellene er ikke kartlagt, men både genetiske faktorer og miljøfaktorer spiller en rolle i sykdomsutviklingen.

Insulin er et anabolt hormon som er nødvendig for opptak og omsetning av glukose i insulinsensitive celler. Ved mangel på insulin vil glukose akkumuleres i plasma. Det vil bli økt produksjon av glukose fra glykolyse i lever og skjelettmuskulatur og glukoneogenese i lever, samtidig som insulinavhengig fasilitert transport over cellemembraner vil opphøre. Muskel- og fettceller har vesikler med glukosetransportmolekyler (GLUT4) i membranen og ved binding av insulin til spesifikke reseptorer translokerer disse til cellemembranen (Saltiel 2001).

Normalt ligger fastende blodglukosekonsentrasjon på 5 mM, mens konsentrasjonen ved absolutt insulinmangel kan stige opp mot 50 mM. Glukose filtreres i glomerulus og blir fullstendig reabsorbert i proksimale tubuli. Ved glukosekonsentrasjonen høyere enn 12 mM

overstiges reabsorpsjonkapasiteten i nefronene og glukose tapes i urinen. Glukose vil gjøre urinen hyperosmolar og urinvolumet øker. Dette vil føre til økt væskebehov og tørste.

Mangel på insulin fører til et skifte i metabolismen med økt katabolisme av muskel- og fettvev. Proteiner og fett vil overta for glukose som de viktigste energikildene. Økt nedbryting og omsetning av fett og protein fører til økt dannelse av ketonlegemer som reduserer pH i plasma. Klassiske symptomer på hyperglykemi er økt tørste og vannlating, vekttap, nedsatt allmenntilstand og kvalme. Denne typen diabetes oppdages ofte tidlig i sykdomsforløpet da symptomene er svært karakteristiske og dramatiske. Dehydrering og metabolsk acidose kan ubehandlet utvikle seg til diabetisk koma og død (Frayn 2003).

1.1.2 Diabetes type II

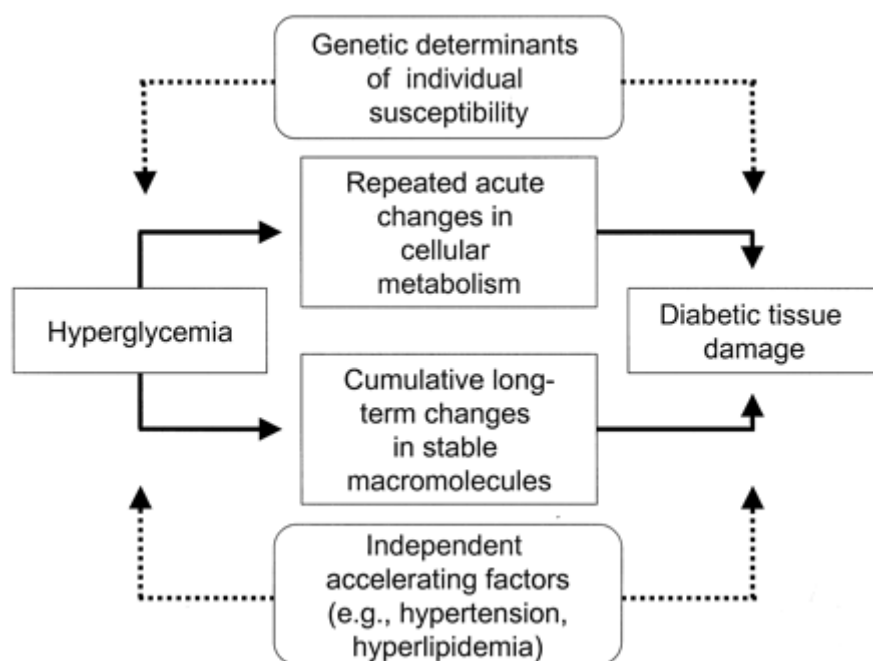
Diabetes type II er et resultat av insulinresistens og en relativ eller absolutt insulinmangel. Insulinresistensen kan være en følge av overvekt, sedat livsstil, ugunstig kosthold eller som en bivirkning av enkelte medikamenter. Insulinresistens fører til at insulinfølsomme celler ikke responderer adekvat på insulinmengdene i blodet. Bukspyttkjertelen prøver å kompensere for insulinresistensen ved å øke insulinproduksjon og sekresjon. Dette vil etterhvert føre til overbelastning og ødeleggelse av β -cellene hos individer som er genetisk disponert for diabetes. Denne formen for diabetes utvikles ofte gradvis og det kan gå mange år før de klassiske symptomene som tørste og vekttap gir seg til kjenne. En følge av dette er at mange går med sykdommen uten å vite det og har utviklet flere senkomplikasjoner ved diagnositidspunktet. De fleste med diabetes type II har bevart noe insulinproduksjon og det beskytter mot opphoping av ketonlegemer og ketoacidose.

1.1.3 Senkomplikasjoner

Mikrovaskulære senkomplikasjoner er assosiert med økt blodgjennomstrømming, økt karpermeabilitet, unormal plasmaviskositet og endret funksjon av blodplater og endotel i mindre årer. Økt tykkelse av basalmembraner er felles for de ulike organsystemene, men det

er særlig årer til retina, nyre og perifere nerver som rammes. Mekanismene for utvikling av diabetes angiopati er ikke kjent, men en rekke studier tyder på at det er hyperglykemi som initierer de patologiske endringene. The Diabetes Control and Complications Trail fra USA viste at kronisk hyperglykemi er den viktigste faktoren når det gjelder utvikling og progresjon av mikrovaskulære senkomplikasjoner som nefropati, retinopati og perifer nevropati ved diabetes type I (DCCT 1993). En lignende studie fra England viste at streng glukosekontroll reduserer senkomplikasjoner hos individer med diabetes type II (UKPDS 1998).

De sentrale fellestrekkene ved makrovaskulære senkomplikasjoner er økt proliferasjon av glatt muskulatur og økt tykkelse av basalmembraner i åreveggene. Dette fører til økt lekkasje av proteiner fra sirkulasjonen og progressiv aterosklerose med obstruksjon av lumen i små og store årer. Risikoen for å utvikle hjerte- og karsykdom er mangedoblet ved diabetes og denne risikoøkningen er uavhengig av etablerte risikofaktorer som hyperkolestrolemi, hypertensjon og røyking (Juutilainen 2005). Dette indikerer at faktorer som er unike for diabetes påvirker utviklingen av makrovaskulære senkomplikasjoner.



Figur 1.1 Forklaringsmodell for utvikling av diabetesspesifikke senkomplikasjoner (Brownlee 2005).

1.1.4 Forekomst og kostnader

Forekomsten av diabetes i Norge er ikke kjent, men tall fra det nye nasjonale reseptregisteret viser at 2.6 % av menn og 2.2 % av kvinner bosatt i Norge ble behandlet med medikamenter for ulike former for diabetes i 2005 (Folkehelseinstituttet 2006). I tillegg avdekket Helseundersøkelsen i Nord-Trøndelag (HUNT) at det for hver person med diagnostisert diabetes type II, var minst en udiagnostisert (Midthjell 2001). I rene tall tilsvarer dette over 200.000 mennesker med diabetes i Norge hvorav 15-20.000 er diabetes type I. På verdensbasis anslås det at 221 millioner mennesker vil ha diabetes i 2010 (Amos 1997) og 366 millioner i 2030 (WHO 1999). Prevalensen av diabetes øker i hele verden på grunn av økt kroppsvekt, redusert fysisk aktivitet og økt levealder (Rosenbloom 1999).

For den enkelte medfører diabetes store påkjenninger i form av redusert livskvalitet, økt sykelighet og tidlig død. I tillegg medfører diabetes enorme kostnader for samfunnet. Diabetes kommer til å legge beslag på store deler av helsebudsjetter verden over. Det er senkomplikasjonene som koster mest, og mye penger og menneskelig lidelse kan spares ved å forebygge utvikling av diabetes type II og senkomplikasjoner hos de som har utviklet diabetes type I og II.

1.2 Nyrenes filtrasjon

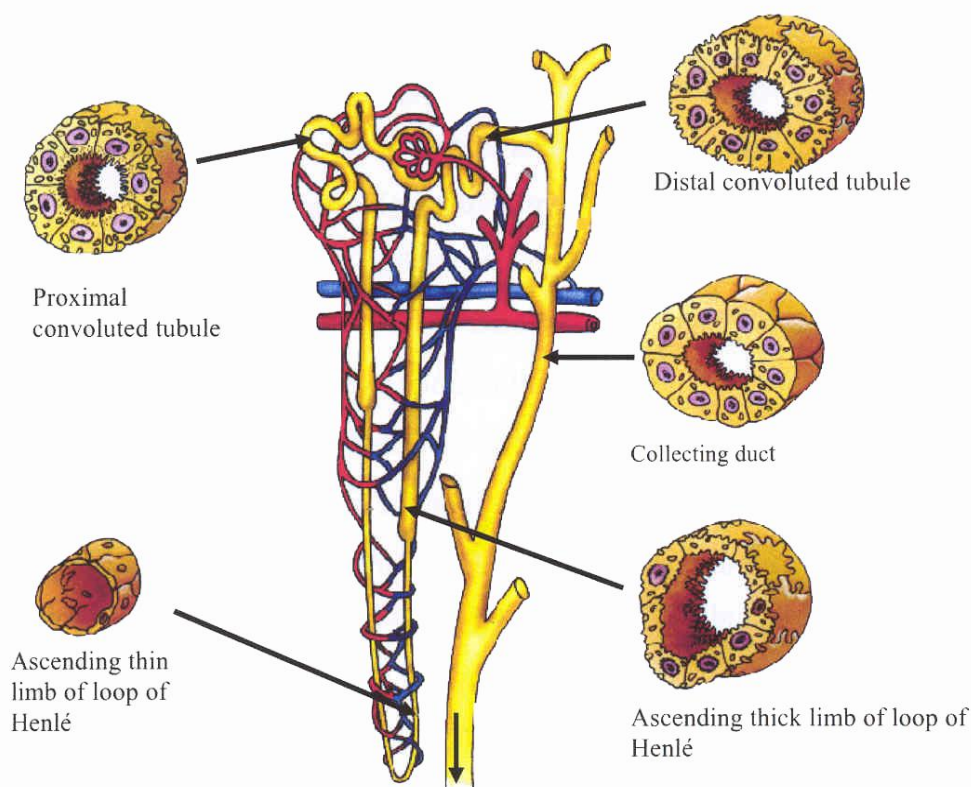
Nyrene er et viktig og effektivt reguleringsorgan for regulering av den ekstracellulære væskens volum og sammensetning. Denne funksjonen er basert på høy perfusjon av nyrene, med hele 20-25 % av hjertets minuttvolum. Hver nyre består av ca 1 million urinproduserende enheter som kalles nefroner og som består av glomerulus, proksimale tubuli, Henles sløyfe og distale tubuli.

Filtreringen starter i glomerulus. Dette er et kapillærsystem omgitt av en membran som kalles Bowmans kapsel. Det hydrostatiske trykket i glomeruluskapillærene er høyere enn kapillærtrykket ellers i kroppen og blodet filtreres over glomerulusmembranen ved hjelp denne trykkforskjellen. Filtratet, som mangler proteiner og celler, samles opp i Bowmans

kapsel og transporteres til proksimale tubuli. Her foregår aktiv og passiv reabsorpsjon og sekresjon og hele 80 % av isoton reabsorpsjon skjer i proksimale tubuli.

Henles sløyfe består av et tynt og et tykt segment. I det tynne segmentet skjer en passiv diffusjon med omgivelsene, mens det i det tykke segmentet skjer en aktiv transport av natrium og det dannes en gradient på 200 mOsm mot omgivelsene i horisontalplanet. Ved hjelp av dette motstrømssystemet dannes det en gradient på 300-1200 mOsm fra barken og inn til nyrebekkenet

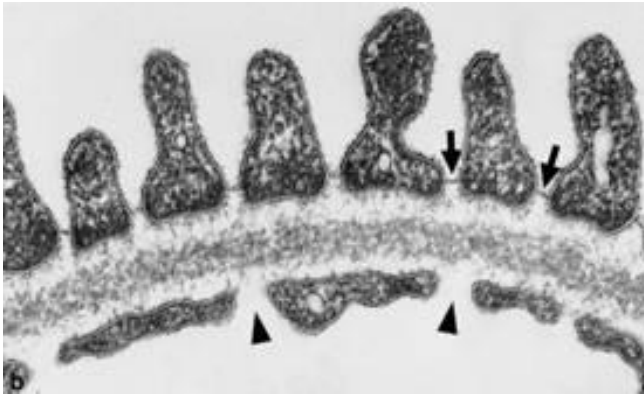
Filtratet går videre til distale tubuli og samlerørene. Her skjer finreguleringen av den ferdige urinens volum, osmolaritet, pH og elektrolyttkonsentrasjon. Dette er mekanismer som styres av hormonkontrollerte transportprosesser. ADH (antidiuretisk hormon) øker permeabiliteten til vann og dette gir reabsorpsjon mot den hyperosmolare nyremargen. Aldosteron øker aktiv natriumreabsorpsjon og kaliumsekresjon (Na^+/K^+ -ATPase).



Figur 1.2 Nefronets oppbygning. Hvert segment er bygget opp av celler som er tilpasset spesielle transport- og filtreringsfunksjoner (Web side 1).

1.2.1 Den glomerulære filtrasjonsbarrieren

Filtrasjonsbarrieren som skiller blodet i de glomerulære kapillærene fra ultrafiltratet i Bowmanns kapsel består av fenestret kapillærendotel, basalmembran og filtrasjonsspalter mellom podocytutløpere. Molekylenes permeabilitet avhenger av størrelse, form og ladning.



Figur 1.3 Den glomerulære filtrasjonsbarrieren. ↓ er filtrasjonsspalter mellom podocytter, basalmembran og ▲ er porer/fenestreringer i endotelet. (Webside 2)

1.2.1.1 Endotelceller

Glomerulus består av ca ti parallelle kapillærer med tverrforbindelser. Endotelet som kler disse kapillærene er avflatet og mindre tett enn endotelceller ellers i kroppen. Porene mellom enkelte celler kan være så store som 70 nm (Geneser 2001). Dette grove filteret tillater direkte kontakt mellom blodplasma og lamina rara interna i den glomerulære basalmembranen (GBM).

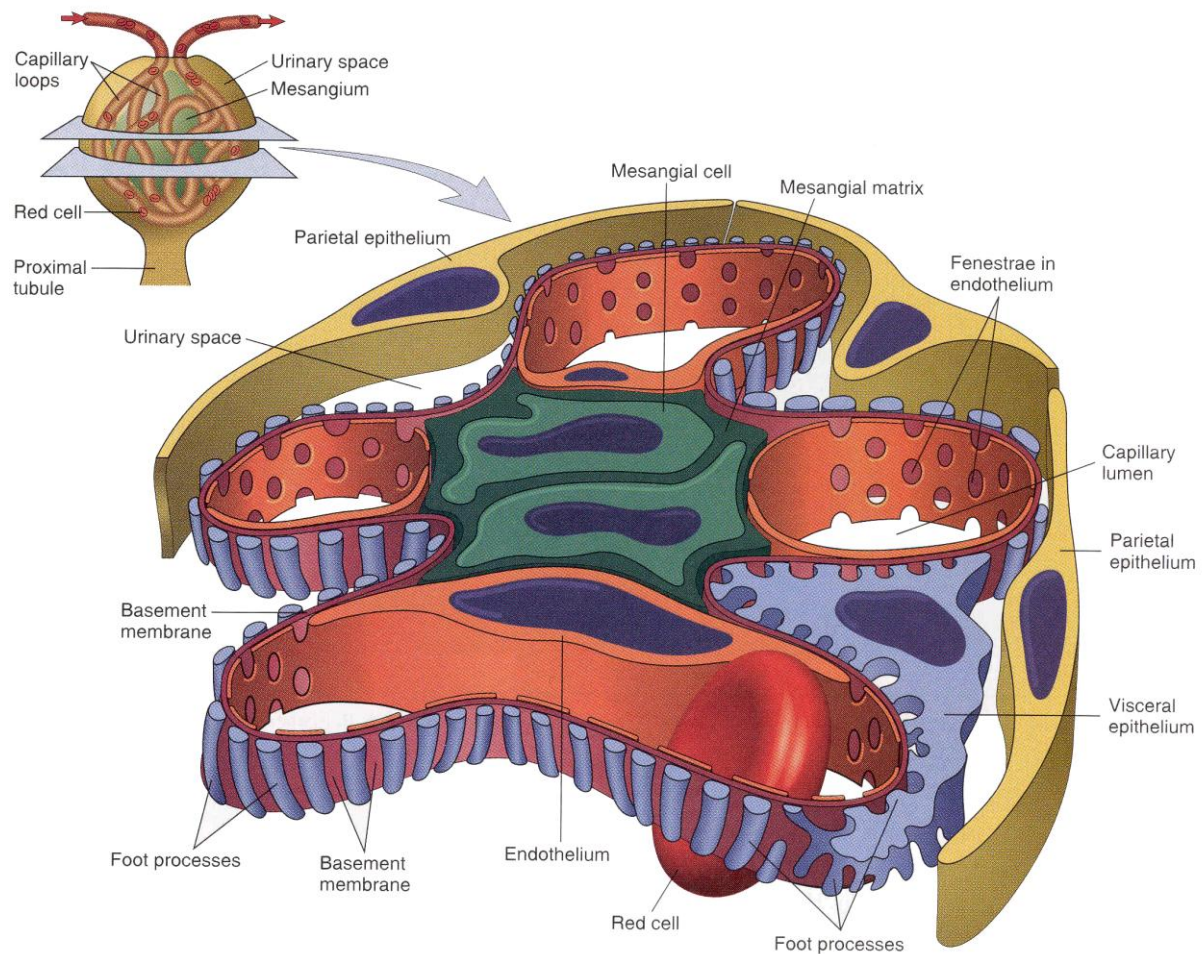
1.2.1.2 Glomerulær basalmembran

GBM består av tre distinkte lag, lamina rara interna, lamina densa og lamina rara externa. Lamina densa består av et nettverk av glykoproteinet laminin og kollagen type IV som filtrerer molekyler etter størrelse (Miner 1999). Kollagen og laminin bindes sammen av

entaktin/nidogen (En/Nd) og endotel- og epitelcellene er festet til GBM ved hjelp av integriner. Alle lagene inneholder heparansulfatproteoglykaner, men lamina rara externa og lamina rara interna inneholder spesielt mye (Thomas 1994). Dette er høyst negative makromolekyler som gjør det vanskeligere for negativt ladede molekyler å passere GBM enn nøytrale molekyler med tilsvarende størrelse og form (Raats 2000).

1.2.1.3 Podocytter

På den andre siden av GBM ligger podocytene. Dette er et enkelt lag med epitelceller som har en meget kompleks utforming. Hver podocyt har flere tusen utløpere (pediculi; ”liten fot”) som danner et helt karakteristisk ”glidelåsmønster” med utløpere fra andre podocytter. Utløperne når ikke helt sammen og mellomrommet mellom disse kalles filtrasjonsspalter. Disse spaltene varierer i størrelse, men er gjennomsnittlig på 35 nm og blir dekket av en svært tynn membran. Nefrin er identifisert som en viktig bestanddel av denne membranen og mye tyder på at dette molekylet er svært viktig for filtrasjon av proteiner (Ruotsalainen 1999). Et annet protein som er identifisert er podocin. Det er mulig at dette proteinet virker som et anker mellom komponentene i filtrasjonsspaltemembranen og podocytene (Roselli 2002). Det er mange holdepunkter for at podocytene og filtrasjonsspaltene er avgjørende for filtrasjon av molekyler etter størrelse. Podocytene bidrar også til den ladningsspesifikke ultrafiltrasjonen i GBM ved at utløperne har membraner med sterkt negativt ladede glykoproteiner og proteoglykaner (glykokalyks).



Figur 1.3 Skjematisk framstilling av Glomeruli (Kumar 1997).

1.2.2 Mesangialceller

Mellom kapillærene ligger det mesangialceller. Disse er innleiret i en egenprodusert ekstracellulær matriks og fungerer som et intraglomerulært skjelett ved å avstive kapillærene. Funksjonen til mesangialcellene er ikke klarlagt, men det er mye som tyder på at de spiller en viktig rolle i blodtrykksregulering og i nyrenes immunforsvar.

1.2.3.1 Epitelceller i tubuli

Epiteltev består av kontinuerlige cellelag som dekker utsiden av kroppen og omslutter organer og hulrom inne i kroppen. Cellene sitter tett sammen og fungerer som en selektiv barriere som beskytter mot skader, væsketap og invaderende mikroorganismer. Overflaten av

epitellaget er i kontakt med luft eller væske, mens undersiden er forankret i en basalmembran. Epitelceller er vanligvis polare, det vil si at de danner cellelag med to ulike membrandomener adskilt av cellekontakter mellom cellene. Cellene er forbundet av et kompleks bestående av zonulae occludens, zonula adhaerens og desmosomer som binder cellene sammen, til basalmembranen og formidler kommunikasjon mellom cellene.

Epitelcellenes struktur og funksjon henger nøye sammen i de ulike segmentene av nefronet. I proksimale tubulus har epitelcellene en struktur som legger til rette for transport av store væske- og stoffmengder. Celleoverflaten inn mot tubuluslumen (apikale) er rikelig utstyrt med mikrovilli og resten av celleoverflaten har mange innbuktninger og folder. Dette gir stor membranoverflate og er tilpasset stor transport. Celleforbindelsene (juxtaluminale zonulae occludentes) er ikke så tette i dette segmentet av nefronet og dette gjør det lett for væske og små ioner å passere mellom cellene. Cellene har rikt med mitokondrier basolateralt som sørger for energi til Na^+/K^+ -ATPasene som aktivt pumper natrium ut av cellene. Lav natriumkonsentrasjon i cytosol driver natriumkoblet transport fra tubulus og inn i cellene. Denne transportmekanismen sørger for opptak av en rekke substanser som glukose, aminosyrer og andre organiske molekyler. Cellene i distale tubulus og samlerørene har liten transportkapasitet sammenlignet med epitelcellene i proksimale tubulus. Cellene har lite mikrovilli og mindre overflate. De er tett bundet sammen og dette gjør det mulig å opparbeide store konsentrasjonsforskjeller mellom filtratet i tubuluslumen og vevsvæsken uten at stoffer diffunderer mellom cellene med sin konsentrasjonsgradient.

1.2.3.2 MDCK celler

Madine-Darby Canine Kidney (MDCK) er en epitelcellelinje etablert fra en cocker spaniel i 1958. Cellene er isolert fra distale tubuli og samlerørene og likner morfologisk på epitelceller i nyretubuli hos pattedyr. MDCK cellene er differensiert i to cellelinjer der MDCK I celler danner tette cellekontakter som i distale tubuli og MDCK II danner mindre tette kontakter som i proksimale tubuli (Herzlinger 1982/ Richardson 1981). Ved å dyrke MDCK celler på semipermeable filtre dannes *in vivo* liknende polariserte cellelag med apikale og basolaterale membrandomener. MDCK celler har syntese av PG og er gode modeller til å studere cellulære prosesser i nyreepitelceller (Barker 1981, Erickson 2001)

1.2.4 Ekstracellulær matriks (ECM)

Nefronenes ekstracellulære matriks består av basalmembranen som dekker hele den ytre overflaten av hvert nefron og samlerør, den tubulære basalmembranen (TBM), den glomerulære basalmembran og matriksen som omgir mesangialcellene. TBM kan videre deles opp i proksimale tubuli basalmembran, distale tubuli basalmembran og samlerørbasalmembran, hvor hver av disse membranene er forskjellige når det gjelder funksjon og molekylær oppbygning (Erickson 2001). Det er podocytter/epitelceller og endotelceller som produserer komponentene i basalmembranene og syntesen av disse kontrolleres av et kompleks nettverk av cytokiner. Mesangialmatriksen syntetiseres av mesangialcellene og har tilsvarende systemer for syntese og degradering som GBM og TBM. Det viktigste enkeltcytokinet som er identifisert i GBM så langt er TGF- β (transforming growth factor β). TGF- β øker produksjon av matrikskomponenter samtidig som det hemmer syntesen og aktiviteten til proteolytiske enzymer spesielt for mesangialceller.

Podocytter og endotelceller skiller ut proteolytiske enzymer som degraderer komponenter i ekstracellulær matriks. Disse enzymene er delt opp i undergrupper og de fleste tilhører matriks metalloproteinaser (MMP) som har Zn^{2+} og Ca^{2+} som kofaktorer og en serin-enhet i sitt aktive sete (Kanwar 2004). MMP-2 og MMP-9 har evnen til å katalysere hydrolyse av polypeptidbindinger i agrekan, elastin og kollagen IV og kollagen V. For å beskytte vevet mot uhensiktsmessig nedbryting, er aktiviteten av disse enzymene strengt regulert gjennom flere systemer som genuttrykk, sekresjon av proenzymmer som krever proteolyse for aktivering og spesifikke MMP-hemmere (TIMP). Serinoproteinase urokinase plasminogen aktivator (U-PA) aktiverer plasminogen til den aktive protease plasmin. Plasmin bryter ned en rekke proteiner i ECM som for eksempel fibronectin og laminin.

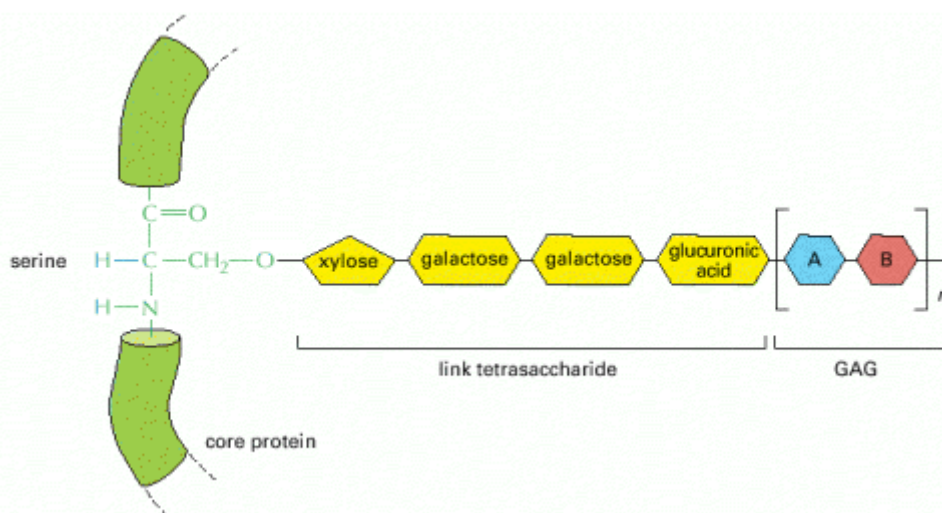
Integriner er transmembrane reseptorer som binder epitel- og endotelcellene til komponenter i ekstracellulær matriks (ECM). Integriner er viktige for samspillet mellom celler og komponentene i den glomerulære basalmembranen. De regulerer cellefunksjoner som adhesjon, migrasjon og vekst samtidig som de påvirker syntese og aktivitet til ekstracellulære proteolytiske enzymer. Et viktig integrin i nyrene er $\alpha_3\beta_1$.

Det er et komplekst gjensidig samspill mellom celler og matriks i den glomerulære basalmembranen. Cellene produserer matrikskomponentene, cytokiner og proteolytiske

enzymer. Matriksen fungerer som et reservoar for cytokiner som sammen med de ulike komponentene i matriks spiller en viktig rolle i regulering av celledfunksjonene.

1.3 Proteoglykaner

Proteoglykaner er en gruppe makromolekyler som består av glykosaminoglykankjeder (GAG-kjeder) som er kovalent bundet til en proteindell. Proteindelen utgjør bare en liten del av proteoglykanet og kan variere i størrelse fra 10 kDa til over 500 kDa. GAG er lineære polysakkarider med repeterende disakkarider der det ene sukkermolekylet er et sulfatert aminosukker og det andre inneholder en hekseronsyre (HexA). HexA komponenten er enten glukuronsyre (GlcA) eller iduronsyre (IdoA) (Kjellén 1991). Aminosukkeret er enten N-acetyl-glukosamin (GlcNAc) eller N-Acetylgalaktosamin (GalNAc). Begge sukkermolekylene i GAG er sulfaterte, men aminosukkeret er gjenstand for flest sulfateringer. Ved fysiologisk pH er proteoglykanene de mest negativt ladede makromolekylene i menneskekroppen. Antall GAG-kjeder varierer fra 1 til 100 og disse bidrar til opp mot 95 % av makromolekylets størrelse.



Figur 1.4 Proteoglykaner består av glykosaminoglykankjeder (GAG) som er festet til en proteinkjerne. Figuren viser hvordan GAG (det repeterende disakkaridet A-B) er festet til aminosyren serin i kjerneproteinet ved hjelp av et tetrasakkarid bestående av xylose, galaktose, galaktose og glukuronsyre (Alberts 2002).

1.3.1 Proteoglykansyntese

Syntesen av kjerneproteinet finner sted i ru endoplasmatisk retikulum. Her kobles xylose fra UDP-xylose til hydroksylgrupper på serin-residier i proteinkjernen før det fraktes til Golgi-apparatet. Gjennom Golgi-apparatet polymeriseres GAG-kjedene enzymatisk ved overføring av sukker til den ene enden av kjeden som ikke er festet til proteinet (Kjellén 1991). UDP-heksosamin og UDP-glukuronsyre fungerer som donorer, og forlengingen skjer ved hjelp av glykosyl transferaser (Prydz 2000). GAG-kjedene (spesielt heparansulfat) modifiseres videre ved N-deacetylering etterfulgt av N- og O-sulfatering som krever sulfatdonoren 3'fosfoadenosin 5'fosfosulfat (PAPS) og epimerisering av glukuronsyre (Champe 1994, Kolset 2004). Enzymet N-deacetyl/N-sulfotransferase (NDST) katalyserer både N-deacetyleringen og N-sulfateringen (Forsberg 1999). Det ferdige proteoglykanet fraktes i vesikler til cellemembranen der det inkorporeres i membranen eller skilles ut ved eksocytose. Noen proteoglykaner sorteres til intracellulære granula i visse celletyper (Kolset 2004).

1.3.2 Funksjon

Proteoglykansyntese foregår i alle celletyper, men ulike vev uttrykker forskjellige proteoglykaner med spesialiserte biologiske funksjoner (Iozzo 1998). De klassifiseres ut i fra GAG-kjedens struktur og deles inn i fire hovedgrupper: Heparansulfat (HS)/heparin, kondroitinsulfat (CS)/dermatansulfat (DS), keratansulfat (KS) og hyaluronan. GAG-kjedene i HS og heparin består av GlcNAc og GlcA/IdoA, mens GAG-kjedene i CSproteoglykaner og DSproteoglykaner består av GalNAc og GlcA/IdoA (Kjellén 1991). GAG-kjedene i KSproteoglykaner er bygget opp av GlcNAc og galaktose istedenfor HexA. Hyaluronan er en stor GAG-kjede som består av GlcA og GlcNAc som ikke er sulfaterte og GAG-kjeden er ikke bundet til noe kjerneprotein.

GAG-kjedene er svært hydrofile og danner en støtabsorberende, gellignende substans når de binder vann. Ekstracellulære matriksproteiner som kollagener, fibronktin og laminin har bindingssteder for sukkerkjedene og i brusk, løst bindevev og i basalmembraner dannes det store komplekser som gjør at disse vevene tåler mekanisk strekk og trykk (Iozzo 1998). I

tillegg til dette er proteoglykaner involvert i prosesser som celleadhesjon, celleproliferasjon og differensiering av celler. Disse interaksjonene medieres av spesielle bindingseter, interaksjoner mellom ioner og sulfaterte områder på GAG eller ved protein-protein interaksjoner med spesifikke domener på kjerneproteinet. (2000)

1.3.3 Proteoglykaner og nyrer

GBM og den mesangiale matriksen har forskjellig proteoglykaninnhold. Den glomerulære basalmembranen inneholder HSproteoglykanene agrin og perlekan (Groffen 1998). Agrin er en viktig bestanddel av alle lagene, mens perlekan for det meste er lokalisert i lamina rara interna (Groffen 1998). Det finnes også små mengder CS-/DSproteoglykaner; dekorin, versikan og biglykan, i GBM. Dekorin og biglykan inneholder både CS og DS. HSproteoglykaner i GBM er viktig for matriksens struktur og elektriske ladning og avgjør permeabiliteten til filtrasjonsbarrieren. I mesangimembranen er det mindre agrin og mer perlekan enn i GBM. Også her er det små mengder av biglykan, dekorin og versikan (Thomas 1994). Versikan danner komplekser med hyaluronan.

1.3.4 Proteoglykaner og patologi

Endringer eller defekter i proteoglykansyntesen er assosiert med en rekke sykdomstilstander som kreft, hjerte- og karsykdom og andre senkomplikasjoner ved diabetes.

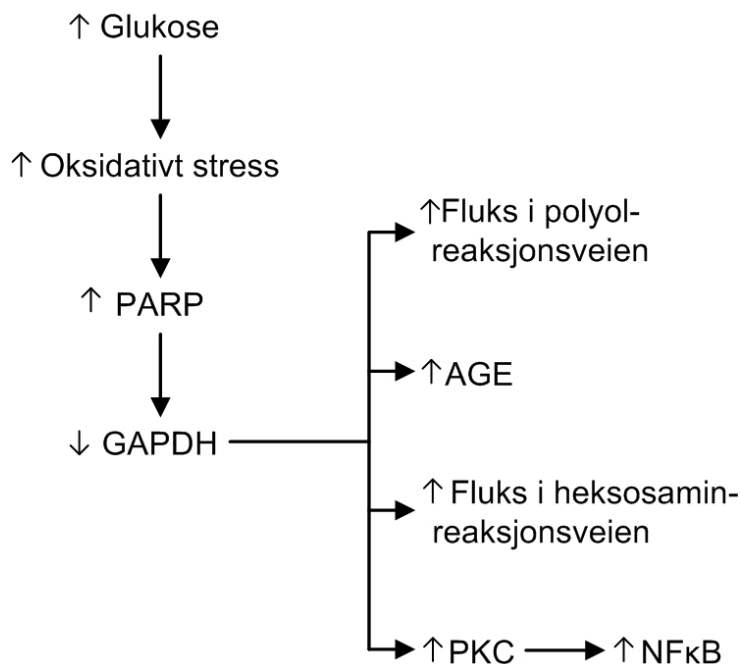
PG er delaktig i kreftutvikling, både i angiogenese, tumorvekst og metastasering. HS deltar i reguleringen av angiogenese *in vivo*. Heparanase spalter HS og kan gjøre plass til invaderende tumorvev i ekstracellulær matriks eller annet vev. Heparanase kan også påvirke HS-bundne vekstfaktorer som ved degradering av HS vil bli frigjort. Vekstfaktorene vil da bli tilgjengelige for kreftceller som trenger disse til økt celledeling (Kolset 1997).

Arterielle proteoglykaner er innblandet i patogenesen til aterosklerose gjennom evnen til å binde lipoproteiner i plasma til arterieveggen. De har også funksjoner når det gjelder cellulær

migrasjon, adhesjon og proliferasjon. Diabetes induserer endringer i arterielle proteoglykaner, med en reduksjon i HSproteoglykaner og økning i DSproteoglykaner. Heparansulfat virker antiaterogent ved å hemme binding av monocytter til sub-endothel ekstracellulærmatriks, regulere fibroblast vekstfaktor og hemme proliferasjon av glatt muskulatur i arteriene. Arterielle HSproteoglykaner er negativt assosiert med hyperglykemi og aterosklerose hos aper med streptozotocin-indusert diabetes (Edwards 2004).

Diabetes nefropati fører til tap av plasmaproteiner i urin. HSproteoglykaner i nyrebiopsier fra diabetikere er redusert i GBM og TBM og flere studier har vist at HSproteoglykaner er mindre sulfatert hos diabetikere enn hos friske kontroller. HSproteoglykaner er viktige for strukturen i basalmembranen ved at de binder andre matrikskomponenter og vekstfaktorer. Nedsatt sulfatering gjør basalmembranen mindre negativ. Resultatet av disse endringene er at filtrasjonsbarrieren blir mer permeabel for både større molekyler og molekyler som er negativt ladet (Kanwar 1983).

1.4 Hyperglykemi



Figur 1.6 Celleskade indusert av hyperglykemi. Høy intracellulær glukose induserer en omlegging av flere metabolske reaksjonsveier som kan bidra i utviklingen av både mikro- og makrovaskulære senkomplikasjoner. Felles for disse omleggingene er økt oksidativt stress og nedsatt aktivitet av GAPDH.

Det er ikke klart hvilke mekanismer som fører til vevsødeleggelse ved hyperglykemi, men høy intracellulær glukose induserer en omlegging av flere metabolske reaksjonsveier som kan bidra i utviklingen av både mikro- og makrovaskulære senkomplikasjoner (Figur 1.6). Felles for disse omleggingene er økt oksidativt stress og nedsatt aktivitet av glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (GAPDH) (Brownlee 2005).

1.4.1 Effekt av hyperglykemi

Celler som ikke kan regulere glukoseopptak ved hyperglykemi vil få høy intracellulær glukosekonsentrasjon. Høy intracellulær glukosekonsentrasjon vil føre til økt produksjon av superoksid anion i mitokondriene. Dette bidrar til økt oksidativt stress som kan gi DNA-skade. PARP katalyserer DNA-reparasjon og aktiveres av DNA-skade. GAPDH modifiseres av PARP slik at enzymets aktivitet reduseres. Nedsatt GAPDH-aktivitet øker fluksen i polyol- og heksosamin-reaksjonsveien, øker intracellulær dannelse av avanserte glykerte endeprodukter og aktiverer protein kinase C som igjen aktiverer NF- κ B (Brownlee 2005).

1.4.1.1 Polyol-reaksjonsveien

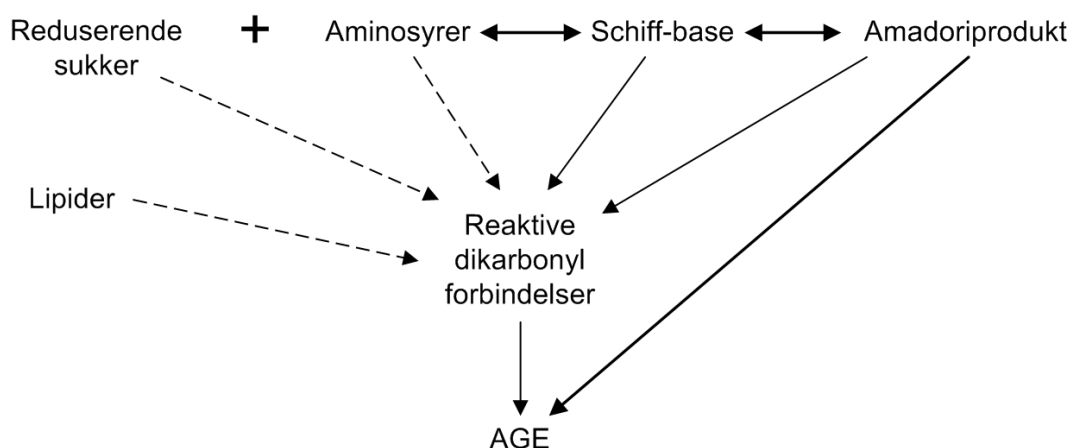
Aldose reduktase er det første enzymet i polyol-veien. Dette enzymet er avhengig av NADPH og katalyserer reduksjonen av en rekke karbonyl-forbindelser til sorbitol. Ved normale glukosekonsentrasjoner har dette enzymet lav affinitet for glukose og lite glukose vil derfor reduseres denne veien. Ved intracellulær hyperglykemi vil det bli en betydelig økning i enzymavhengig omdannelse av glukose til sorbitol og mengde tilgjengelig NADPH vil synke. NADPH er nødvendig for å regenerere redusert glutathion (GSH) og redusert intracellulært GSH fører til økt oksidativt stress. Sorbitol vil videre oksideres til fruktose av enzymet sorbitol dehydrogenase med samtidig reduksjon av NAD⁺ til NADH. NADH hemmer aktiviteten til enzymet GAPDH og det vil hope seg opp i cellen. Dette kan føre til økt dannelse av diacylglyserol (DAG) og metylglyoksal (MGO).

1.4.1.2 Avanserte glykerte endeprodukter (AGE)

Hyperglykemi fører til akkumulering av avanserte glykerte endeprodukter (AGE) på grunn av økt dannelse og redusert nedbrytning og utskillelse. Dette er prosesser som foregår både intracellulært og ekstracellulært og hvor mye AGE som akkumuleres vil avhenge av grad av hyperglykemi, de ulike cellenes muligheter for å transportere glukose inn i cellen, grad av AGE-nedbrytning i lever og utskillelse av AGE i nyrene. Dannelsen av AGE skjer gjennom en kompleks serie av kjemiske reaksjoner som kalles Maillard-reaksjonen. Glykeringen skjer spontant og er ikke avhengig av enzymer, men av glukosekonsentrasjon og tid. Prosessen starter med at et reduserende sukker reagerer med aminogruener på proteiner, nukleinsyrer eller lipider og danner Schiff-baser. Schiff-basene blir raskt omdannet til mer stabile Amadoriprodukter som gjennomgår ulike reaksjoner som dehydrering, oksidering, syklisering og rearrangering og danner til slutt ulike AGE (Omsland 2006).

En annen reaksjonsvei som fører til AGE-dannelse kalles glykooksidasjon og innebærer både oksidasjon og glykering. Dette er intracellulære reaksjoner som initieres ved autooksidasjon av karbohydrater, proteiner og lipider. Resultatet blir svært reaktive karbonylforbindelser, som for eksempel α -oksoaldehyder, som kan reagere med aminogruener og danne AGE. Disse reaktive forbindelsene kan reagere og danne AGE 10.000 ganger så raskt som glukose og regnes i dag for å være hovedforløperen til AGE-dannelse både intra- og ekstracellulært (Thornalley 2003). Eksempler på slike reaktive karbonylforbindelser er metylglyoksal (MGO) og glyoksal.

AGE-modifiserte molekyler vil ha endrede funksjoner intracellulært og ekstracellulært. Ekstracellulære AGE-modifiserte matrikskomponenter vil endre sine interaksjoner med andre matrikskomponenter og integriner og dette vil få konsekvenser for matriksens funksjonelle egenskaper. Plasmaproteiner og matrikskomponenter modifisert av AGE bindes til AGE-reseptorer på endotelceller, mesangialceller og makrofager og induserer reseptor-mediert produksjon av reaktive oksidanter eller endrer aktiviteten til transkripsjonsfaktoren NF- κ B slik at uttrykk av ulike gener endres. Dette gjelder blant annet tumornekrosefaktorer, interleukiner, vekstfaktorer og adhesjonsmolekyler (Basta 2004).



Figur 1.7 AGE dannelsen. Fete piler viser Maillard reaksjon og stiplede piler viser autooksidasjon.

1.4.1.3 Heksosamin-reaksjonsveien

Normalt deriveres fruktose-6-fosfat fra glykolysen for å levere UDP-N-acetylglukosamin (UDPGlcNAc) til syntese av proteoglykaner og glykoproteiner. Intracellulær hyperglykemi øker fluksen gjennom heksosamin-reaksjonsveien og resulterer i økt gentranskripsjon av TGF- β 1 og PAI-1. Mekanismene bak dette er ikke helt kartlagt. Hyperglykemi kan føre til økt mengde UDP-GlcNAc som er substrat for O-lenket glykosylering. O-lenket glykosylering av transkripsjonsfaktoren Sp1 resulterer i økt gentranskripsjon av TGF- β 1 og PAI-1, som begge bidrar i utviklingen av senkomplikasjoner i diabetes (Brownlee 2005).

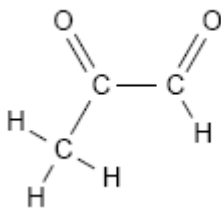
1.4.1.4 Protein kinase C

Ved økt fluks gjennom aldose reduktase reaksjonsveien vil den intracellulære konsentrasjonen av glyseraldehyd-3-fosfat øke og føre til en oppregulering av *de novo* syntese av DAG via dehydroksyacetonfosfat og glyserol-3-fosfat. DAG aktiverer protein kinase C (PKC) i mikrovaskulære celler, i retina og i glomerulus hos dyr med diabetes. Aktivering av PKC utløser forskjellige signaler i de ulike cellene som fører til f eks økt

vaskulær permeabilitet, NO-dysregulering, økt leukocytadhesjon og endringer i syntesen av enkelte vekstfaktorer som stimulerer til økt akkumulering av matriksproteinene fibronektin og kollagen type IV. Det er også sett en endring av aktivering av transkripsjonsfaktor NF- κ B koblet til økt uttrykk av fibrinolysehemmeren PAI-1 og endret uttrykk og aktivering av flere membranassosierte NADPH-avhengige oksidaser. Protein kinase C kan også aktiveres av AGE ved binding av AGE reseptorer.

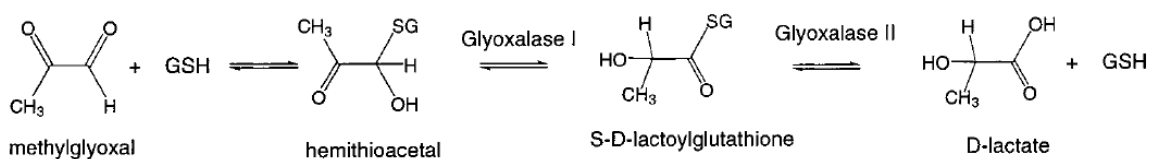
1.5 Metylglyoksal, MGO

MGO ($C_3H_4O_2$) er et α -ketoaldehyd og et dikarbonyl som dannes i celler som et biprodukt i den normale metabolismen og ved degraderingsreaksjoner som glukoseautooksidasjon og lipidperoksidering.



Figur 1.8 Kjemisk struktur MGO

Produksjon av MGO skjer primært fra triose-fosfat-intermediater som dannes i glykolysen. Dette inkluderer dihydroxy-aceton-fosfat og glyseraldehyd-3-fosfat. MGO genereres spontant ved eliminering av fosfatgruppen eller ved dekomposisjon av diol-fosfat-intermediater. Andre mindre kilder til MGO er P450-katalysert oksidasjon av ketonlegemer, spalting av Amadoriprodukter og oksidasjon av aminoaceton som dannes under katabolisme av treonin (Beisswenger 2003).



Figur 1.9 Glyoksalasesystemet (Himo 2001)

Under normale forhold holdes den intracellulære MGO konsentrasjonen lav av glyoksalase I og II som konverterer MGO til D-laktat. Glyoksalase I regenereres av redusert glutation og har derfor lavere aktivitet under forhold som forårsaker økt oksidativt stress. Det er vist at variasjon i evne til å detoksifisere MGO kan avgjøre om en diabetiker er disponert for rask utvikling av senkomplikasjoner eller ikke (Beisswenger 2003). Personer med raskt progresjon av senkomplikasjoner hadde høyere verdier av α -oksoaldehyder i plasma enn de som hadde en mer langsom utvikling. Glyoksalasesystemet utnyttes også i utviklingen av nye medisiner mot kreft og malaria (Thornalley 2003). Andre og mindre systemer for nedbryting MGO er NADPH-avhengig aldose-reduktase, betaine aldehyd dehydrogenase og 2-oxoaldehyd dehydrogenase som oksiderer MGO til pyruvat.

MGO er svært reaktiv og modifierer aminosyrer i proteiner, nukleinsyrer og fosfolipider opp til 10.000 ganger raskere enn glukose. MGO danner irreversible produkter med lysin og arginin, mens MGOs binding til cystein er reversibel. MGO er kanskje den viktigste forløperen til AGE både intra- og ekstracellulært (Thornalley 1996, Rosca 2005). MGO kan også modifierer og skade ubeskyttet plasmin DNA og forårsake mutasjoner og unormal genekspressjon (Papsoulis 1995).

MGO konsentrasjonen i plasma er hos friske kontroller målt i ulike forsøk til 0.08-0.2 μ M. Ved hyperglykemi vil celler som ikke kan kontrollere intracellulær glukosekonsentrasjon produsere økte mengder MGO. Samtidig vil det oksidative stresset øke og glyoksalase mediert detoksifisering vil være redusert. Plasmakonsentrasjon av MGO er økt hos diabetikere, men økningen avhenger av type diabetes, glykemisk kontroll og genetisk disposisjon for utvikling av senkomplikasjoner (Beisswenger 2003). Verdier målt i plasma hos diabetikere ligger i området 0.4-2.0 μ M og i forhold til friske kontroller er MGO-verdiene i plasma økt med 2-3 ganger for diabetes type II og 5-6 ganger for diabetes type I (Lapolla 2003). Glykemisk kontroll blir i klinikken overvåket med målinger av glykosylert hemoglobin (HbA_{1c}) som måler den gjennomsnittlige glukosekonsentrasjonen i plasma de siste 4-8 ukene. HbA_{1c} har vist seg å korrelere godt med risiko for utvikling av mikrovaskulære senkomplikasjoner, men er et dårlig mål på risiko for utvikling av hjerte- og karsykdom i diabetes type II (Bonora 2002, Rendell 2006). Glykemiske fluktuasjoner er en viktig risikofaktor for utvikling av hjerte- og karsykdommer og mye tyder på at glykemiske fluktuasjoner også spiller en potent rolle i utviklingen av diabetes nefropati (Gerich 2006,

Beisswenger 2003). Konsentrasjon av MGO i plasma korrelerer godt med glykemiske fluktuasjoner og kan bli en nyttig parameter sammen med HbA1c for overvåking av glykemisk kontroll og risiko for senkomplikasjoner i diabetesomsorgen (Nemet 2005).

MGO reagerer lett med proteiner og nukleinsyrer intra- og ekstracellulært og det er derfor svært vanskelig å måle den reelle MGO-konsentrasjonene i plasma. Man regner med at MGO går over cellemembranen ved diffusjon, men siden så mye som 99 % av intracellulær MGO er reversibelt eller irreversibelt bundet til proteiner i cytosol er det usikkert hvor stor andel av produsert MGO som diffunderer ut i plasma (Chaplen 1998, Roy 2004). De konvensjonelle målemetodene måler bare fritt MGO og MGO som er irreversibelt bundet til andre makromolekyler (Chaplen 1996, Thornalley 1996, Kalapos 1999, Vander Jagt 2003, Singh 2001, Baynes 1999). Chaplen har ved hjelp av nye metoder også målt MGO som er reversibelt bundet og funnet verdier av intracellulær MGO som er 100-1000 ganger høyere enn tidligere beregninger (Chaplen 1998). I ovarieceller fra hamster har han målt MGO til 0.31 mM. Samtidig er MGO-konsentrasjon i cytosol lavere enn i plasma på grunn av intracellulær glykosalase-aktivitet (Thornalley 2003). Inntil det finnes gode analysemetoder for måling av total MGO-konsentrasjon er det vanskelig å si noe om de reelle verdiene i plasma og cytosol.

1.6 Diabetes nefropati

Diabetes nefropati er en tilstand som manifesterer seg som en progressiv reduksjon i den glomerulære filtrasjonsraten (GFR), proteinuri og hypertensjon uten at det samtidig foreligger urinveisinfeksjon eller annen nyresykdom (WHO). Ca 30-40 % av de med diabetes type I og rundt 15-25 % av de med diabetes type II rammes av diabetes nefropati og dette er i dag den viktigste årsaken til nyresvikt i den vestlige verden.

Et tidlig tegn på diabetes nefropati er mikroalbuminuri (30-300 mg/ t), mens albuminuri (>300 mg / t) indikerer progresjon. Den glomerulære filtrasjonsraten avtar og albuminuri går over i proteinuri og nyresvikt kan bli utfallet.

1.6.1 Patologiske endringer i diabetes nefropati

En rekke morfologiske forandringer er sett i nyrevevet ved diabetes nefropati. Disse forandringene er karakterisert ved fortykket glomerulær og tubulær basalmembran, ekspandert mesangium, glomerulær hypertrofi, glomerulosklerose og tap av podocytter (Raptis 2001). Ekspansjon av mesangiet fører til at de glomerulære kapillærene får mindre tilgjengelig plass og blir tynnere. Redusert kapillærlumen gir mindre overflate for filtrasjon og nedsatt filtrasjonsrate (Gilbert 1995, Dalla 2001). Endringer i kapillærveggen fører til at det lettere oppstår infarkt og inflammasjon.

Komponentene i ekstracellulær matriks er viktig for nyrevevets struktur og organisering og for omliggende cellers morfologi, differensiering, proliferasjon, migrasjon og adhesjon. Endringene som er observert i basalmembraner og i mesangialmatriksen er et resultat av ubalanse i degradering og biosyntese av individuelle matrikskomponenter. Diabetes nefropati er forbundet med redusert mengde eller aktivitet av proteolytiske enzymer og økning i vekstfaktorer og dette vil gi akkumulering av matriks (Mason 2003).

1.6.2 Hyperglykemi og diabetes nefropati

Serumnivået av AGE korrelerer både med grad av mikroalbuminuri og diabetes nefropati (Thomas 2005). Ved diabetes nefropati skjer det endringer i sammensetningen av matriks i mesangiet og i GBM. Hyperglykemi og AGE kan påvirke denne sammensetningen på flere måter. Komponenter i ECM har lang levetid og blir eksponert for og modifisert av hyperglykemi og AGE (Bohlender 2005). AGE har evnen til å kryssbinde proteiner ved hjelp av kovalente bindinger slik at sammensetning og struktur av matrikser endres (Raptis 2001, Bohlender 2005). Dannelsen av kryssbindinger i ekstracellulær matriks fører også til økt stivhet og gjør at proteinene blir mer resistente mot proteolytisk degradering. Kryssbindingene kan også modifisere matrikskomponentene slik at de endrer affinitet til andre molekyler og det er blant annet sett en reduksjon i binding mellom AGE-modifisert

laminin og HSproteoglykaner og kollagen IV (Mason 2003). AGE gir økt stivhet i arterioler, som fører til økt blodtrykk (Schram 2005). Angiotensin II induserer TGF- β syntese og glykert albumin øker mRNA til TGF- β og ulike matrikskomponenter (Liu 2006). AGE kan binde seg til spesifikke reseptorer og mediere økt syntese av cytokiner og vekstfaktorer.

Integrinene er også med i reguleringen av ECM turnover. Metylglyoksal og hyperglykemi fører til reduksjon i integrin $\beta_1\alpha_3$ (Kitsiou 2003). Dette integrinet binder podocytene til basalmembranen og regulerer også syntese av MMP. Blant mange morfologiske endringer i glomerulus ved diabetes, er reduksjonen i antallet podocytter per glomerulus den sterkeste prediktoren for utvikling av diabetisk nefropati (Meyer 1999)

Det er observert endringer i syntese og sulfatering av proteoglykaner i nyrevev hos personer med diabetisk nefropati. HSproteoglykaner i GBM er viktige for å opprettholde adekvat filtrasjonbarriere og for å beskytte mot koagulasjon i kapilærene. En reduksjon i syntese av HSproteoglykaner og/eller reduksjon i antall eller i lengde av GAG-kjeder og/eller reduksjon i sulfateringen av disse vil gjøre at den glomerulære basalmembranen blir mindre negativt ladet og permeabiliteten for negative molekyler øker (Ha 2004, Yard 2002). Mange av proteoglykanenes funksjoner avhenger av deres evne til å binde og modulere aktiviteten til en rekke bioaktive proteiner som vekstfaktorer, cytokiner og proteinaser, og mange av disse bindingene er strukturavhengige og vil påvirkes av kvalitative endringer av proteoglykaner (Kuschert 1999, Ashikari-Hada 2004).

2 Problemstilling

Det er nødvendig å tilegne oss en bedre forståelse av tidlige patofysiologiske prosesser ved diabetes nefropati for å kunne forebygge sykdomsprogresjon i en pasientgruppe som krever enorme økonomiske og menneskelige ressurser. Det er observert en bedring i proteinuri hos pasienter som har inntatt medikamenter bestående av ulike blandinger av GAG-kjeder, og dette er en indikasjon på at endringer i proteoglykansyntese kan være en viktig faktor i utviklingen av mikroalbuminuri (Gambaro 2002, Achor 2005). Proteoglykaner er sentrale i den ladningsspesifikke filtrasjonen i glomeruli og viktige i strukturering av ECM. De fungerer som reservoar for cytokiner og vekstfaktorer og er viktige i reguleringen av biosyntese og degradering av andre matrikskomponenter. Kvalitative og kvantitative endringer av proteoglykaner kan føre til dårligere organisering av matriks og etterfølgende ekspansjon av ECM med lavere tetthet av negative ladninger. Mikroalbuminuri kan være et resultat av økt permeabilitet for albumin i glomeruli eller redusert reabsorpsjon av albumin i tubuli. I to nyere studier som ser på proteoglykaner i nyrer tidlig i sykdomsforløpet, er det funnet redusert sulfatering av HSproteoglykaner i tubuli, men ikke i glomeruli (Wijnhoven 2006, van den Born 2006). Det er også studier som viser at ladningsspesifikk reabsorpsjon i tubuli er forstyrret før filtrasjonen i glomeruli er affisert (Kunika 1996, 1997). Tykkelsen til TBM øker før klinisk manifestasjon av sykdommen og den observerte økningen av TBM korrelerer med HbA_{1c} (Brito 1998, Ziyadeh 1993). Endret ladning og økt tykkelse av TBM kan forstyrre funksjonen til det tubulære epitelet som normalt er bytte av vann, elektrolytter og metabolitter mellom peritubulære kapillærer og ultrafiltratet (Erickson 2001). Endret sammensetning av ultrafiltratet kan resultere i hyperfiltrasjon som kan være det som initierer endringer i glomeruli (Vervoort 2005).

Hensikten med dette arbeidet var å undersøke hvordan hyperglykemi påvirker vekst og proteoglykansyntese i epitelceller fra distale tubuli for å få en bedre forståelse av diabetes nefropati. Dette ønsket vi å oppnå ved å undersøke:

- hvilke effekter medium med høy glukosekonsentrasjon eller MGO har på proteoglykansyntese i MDCK I celler.

- hvilke effekter medium med høy glukosekonsentrasjoner eller MGO har på cellevekst i MDCK I celler.
- om eventuelle effekter av høy glukosekonsentrasjon kan skyldes økt osmolaritet i mediet.

3 Materialer

3.1 Cellelinjer

MDCK I celler	Sigma Aldrich	Oslo, Norge
---------------	---------------	-------------

3.2 Kjemikalier

Amplifier	Amersham Biosciences	New Jersey, USA
BC Assay: protein quantitation kit	Uptima Interchim	Montiuqon Cedex, Frankrike
Bromphenolblått 0.4 %	Sigma Aldrich	Oslo, Norge
BSA	Sigma Aldrich	Oslo, Norge
BSA standard	Uptima Interchim	Montiuqon Cedex, Frankrike
D-Mannitol	Sigma Aldrich	Oslo, Norge
DEAE Sephacel	Amersham Biosciences	New Jersey, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium Special (DMEM 1000 mg glucose/liter)	Sigma Aldrich	Oslo, Norge
Dulbecco's Modified Eagle's Medium Special (DMEM 4500 mg glucose/liter)	Sigma Aldrich	Oslo, Norge
Eddiksyre	Merck	Darmstadt, Tyskland
EDTA (dinatriumsalt)	Merck	Darmstadt, Tyskland
Etanol 96 %	Arcus kjemi	Vestby, Norge
Føtalt kalveserum	Sigma Aldrich	Oslo, Norge
Glysin	Sigma Aldrich	Oslo, Norge
Glyserol	Merck	Darmstadt, Tyskland
Guanidin hydrochloride	Fluka Chemicals GmbH	Deisenhofen, Tyskland
HCl	Merck	Darmstadt, Tyskland

Isopropanol	Arcus kjemi	Vestby, Norge
L-glutamin	Gibco Invitrogen	Oslo, Norge
2-mercaptoetanol	Sigma Aldrich	Oslo, Norge
Metanol	Merck	Darmstadt, Tyskland
Metylglyoksal 40 %	Sigma Aldrich	Oslo, Norge
MgSO ₄ x 7H ₂ O	Merck	Darmstadt, Tyskland
NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	Merck	Darmstadt, Tyskland
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Merck	Darmstadt, Tyskland
NaCl	Merck	Darmstadt, Tyskland
NaHCO ₃	Merck	Darmstadt, Tyskland
NaOH	Merck	Darmstadt, Tyskland
Natriumacetat trihydrat	Merck	Darmstadt, Tyskland
NH ₄ HCO ₃	BDH AnalaR®, BDH laboratory Supplies	Dorset, England
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich	Oslo, Norge
Proteasehemmer (“Protease inhibitor cocktail tablets”)	Roche	Oslo, Norge
Protein A-sepharose	Amersham biosciences	New Jersey, USA
Protein G-sepharose	Amersham biosciences	New Jersey, USA
Rainbow [¹⁴ C]-merket standard	Bio Rad	California, USA
Sephadex G-50 fine	Amersham biosciences	New Jersey, USA
SDS (sodium dodecyl sulphate)	Sigma Aldrich	Oslo, Norge
Triton X-100	Sigma Aldrich	Oslo, Norge
Trisma base	Arcus kjemi	Vestby, Norge
Trisma HCl	Sigma Aldrich	Oslo, Norge
Trypanblått	Sigma Aldrich	Oslo, Norge
Trypsin	Gibco Invitrogen	Oslo, Norge
[³⁵ S] Sulfat	PerkinElmer	Massachusetts, USA
WST-1 reagens	Roche	Oslo, Norge

3.3 Utstyr

6-brønners plastbrett (35 mm i diameter)	Costar
96-brønners mikrotiterplate	Greiner bio-one
Cellekulturflasker (25 cm ² og 75 cm ²)	Costar
Dual Color C ¹⁴ -merket, farget standard	Bio Rad
Bas Gauge 2025	Fuji
Tellekammer	Bürker
Omnifix engangssprøyte	Braun
Polyprepkolonner	Bio Rad
Sterilfilter, porestørrelse 0,22 µm	GE infrastructure
Tris-HCl gel 4-20 %	Bio Rad

3.4 Apparatur

Celloshaker variospeed	Costar
Elektroforeseapparatur	Bio Rad
Geltørker	Bio Rad
Inkubatorskap	Forma Scientific
Mikroskop	Leica
Spektrofotometer	Amersham Pharmacia
DNA Speedvac, DNA 100	Savant

4 Metoder

Hensikten med denne oppgaven var å undersøke endringer i distale tubuli ved diabetes nefropati. Til dette brukte vi MDCK I celler som vi dyrket i ulike konsentrasjoner av glukose og MGO og undersøkte ulike aspekter ved cellevekst og proteoglykansyntese.

4.1 Celleforsøk

4.1.1 MDCK I celler

Madine-Darby Canine Kidney (MDCK) er en epitelcellelinje etablert fra en cocker spaniel i 1958. Cellene er isolert fra distale tubuli og samlerørene og likner morfologisk på epitelceller i nyretubuli hos pattedyr. MDCK cellene er differensiert i to cellelinjer der MDCK I celler danner tette cellekontakter som i distale tubuli og MDCK II danner mindre tette kontakter som i proksimale tubuli (Herzlinger 1982, Richardson 1981). En rekke proteoglykaner er beskrevet i MDCK celler, og disse proteoglykanene er de samme som de man finner i menneskenyrer *in vivo* (Erickson 2001). MDCK celler er en velegnet modell for å studere proteoglykaner og cellulære prosesser i nyreepitelceller (Barker 1981). Ved å dyrke MDCK celler på semipermeable filtre dannes *in vivo* liknende polariserte cellelag med apikale og basolaterale membrandomener. I disse forsøkene ble cellene dyrket på plastikk hvor de fester seg og danner konfluente cellelag, men ikke blir polariserte. Dette er et enklere celleoppsett som har vist seg å fungere bra til slike forsøk (Omsland 2002).

4.1.2 Generelt celledyrkningsoppsett

MDCK I cellene ble dyrket i 25 cm² plastflasker tilsatt 10 ml DMEM lav glukose medium i inkubatorskap med 5 % CO₂ og 37 °C.

Løsninger:

Lav glukose medium (5 mM)

Ingredienser	Mengde	Konsentrasjon
DMEM medium (5 Mm glukose)	500 ml	
Føtalt kalveserum	25 ml	~5 %
L-glutamin	5 ml	~1 %
Penicillin/streptomycin	5 ml	~1 %

4.2 Celledyrking i ulike medier

4.2.1 Dyrking av celler i høy glukosekonsentrasjon

I forsøkene med hyperglykemi ble celler dyrket i medium med glukosekonsentrasjon som tilsvarer hyperglykemi hos en diabetiker (25 mM) sammenlignet med celler dyrket i et medium med glukosekonsentrasjoner tilsvarende blodglukoseverdier hos friske individer (5 mM). For å kontrollere at eventuelle forskjeller mellom høy og lav glukose ikke skyldtes ulik osmolaritet i mediene ble celler også dyrket i et medium med lav glukosekonsentrasjon (5 mM) tilsatt mannitol (20 mM). De ulike mediene hadde samme sluttkonsentrasjon av føtalt kalveserum, penicillin og L-glutamin.

Løsninger:

Lav glukose medium (5 mM)

Ingredienser	Mengde	Konsentrasjon
DMEM medium (5 Mm glukose)	500 ml	
Føtalt kalveserum	25ml	~5 %
L-glutamin	5 ml	~1 %
Penicillin/streptomycin	5 ml	~1 %

Høy glukose (25 mM)

Ingredienser	Mengde	Konsentrasjon
DMEM medium (25 Mm glukose)	500 ml	
Føtalt kalveserum	25ml	~5 %
L-glutamin	5 ml	~1 %
Penicillin/streptomycin	5 ml	~1 %

Lav glukose (5 mM) med mannitol (20 mM)

Ingredienser	Mengde	Konsentrasjon
DMEM medium (5 Mm glukose)	500 ml	
L-Mannitol	1.75 g	
Føtalt kalveserum	25ml	~5 %
L-glutamin	5 ml	~5 %
Penicillin/streptomycin	5 ml	~1 %

4.2.2 Dyrking av celler i metylglyoksal (MGO)

Det finnes per i dag ingen gode metoder for å måle konsentrasjonen av MGO i plasma. MGO dannes intracellulært og cellemembranen er permeabel for dette lille molekylet. MGO er en meget reaktiv forbindelse og store deler av nydannet MGO vil binde seg til molekyler

intracellulært før det diffunderer ut av cellen. Konvensjonelle målemetoder måler bare fritt MGO og MGO som er irreversibelt bundet til andre molekyler. MGO som er reversibelt bundet til andre molekyler blir ikke målt med disse metodene (Chaplen 1998, Roy 2004). Irreversibelt bundet MGO viser seg imidlertid å være en betydelig andel av den totale MGO-konsentrasjonen. Konsentrasjonene som er valgt i våre forsøk er 0.2, 0.5 og 1.0, og disse konsentrasjonene er valgt på bakgrunn av andre studier som er gjort med MGO og MDCK I celler (Jan 2005).

Løsninger:

1 M stamløsning av MGO

Ingredienser	Mengde
Metylglukosid 40 %	180 µl
DMEM lav glukose medium	820 µl

4.2.3 Splitting av celler

Produsenten anbefaler at cellene splittes 1: 6 to ganger per uke, før de blir mer enn 70-80 % konfluente. For å splitte cellene tilsettes en trypsinløsning som inneholder EDTA. Cellene er festet til hverandre via caderiner og disse er avhengige av kalsium. EDTA binder kalsium og ved å vaske cellene med trypsinløsningen vil MDCK I cellene løsne fra hverandre. Trypsin bryter ned proteiner på celleoverflaten slik at cellene løsner fra platen og fra hverandre.

Prosedyre:

1. Mediet suges av cellene.
2. Cellene tilsettes 3 ml trypsinløsning (37 °C) i to-tre minutter, før løsningen suges av.
3. Deretter tilsettes 7 ml fersk trypsinløsning. Cellene inkuberes ved 37 °C i 5 % CO₂ til cellene har løsnet. Hvor lang tid dette tar vil variere noe ut i fra hvor konfluente cellene er når de splittes.
4. Trypsinløsningen med de løste cellene suges av og spennes ned ved 1200 rpm i 3 minutter.

5. Cellefraksjonen resuspenderes godt i 6 ml medium (37 °C) og fordeles i seks små flasker (25 cm²).
6. Flaskene tilsettes 9 ml medium, og plasseres i inkubatorskap ved 37 °C i 5 % CO₂. Korken på flasken løsnes litt, slik at CO₂ får tilgang og kan bidra til at pH justeres i mediet.

4.3 Nedfrysing av celler

En liten flaske (25 cm²) med konfluente celler trypsineres, spinnes ned og resuspenderes forsiktig i 1 ml nedfrysningsløsning. Cellene fryses ned ved -70 °C og oppbevares i flytende nitrogen.

Løsninger:

Nedfrysningsmedium

Ingredienser	Mengde	Konsentrasjon
DMSO	0.1 ml	10 %
Føtalt kalveserum	0.9 ml	90 %

4.4 Tining av celler

Det er viktig at ampullen med celler tines raskt. Både celler og nedfrysningsmedium overføres til en liten flaske (25 cm²) og tilsettes 10 ml medium med lav glukose. Etter 1-2 dager bør cellene være konfluente.

4.5 Telling av celler

Cellene telles visuelt i mikroskop ved hjelp av et Bürker tellekammer (hemocytometer). Celletelling kan brukes til å studere cellevekst, kontrollere hvor mange celler som såes ut og bestemme forholdet mellom døde og levende celler.

Prosedyre:

1. Cellene trypsineres og sentrifugeres i 3 minutter ved 1200 rpm.
2. Deretter resuspenderes cellene godt i ønsket volum av mediet.
3. 50 µl celledensjon blandes med 50 µl sterilfiltrert 0.4 % trypanblått. Døde celler mister membranintegritet og blir permeable for trypanblått.
4. Tellekammeret fuktes med litt vann og en liten glassplate plasseres over området der cellene skal telles. Celledensjon settes til på siden av tellekammeret, og celledensjonen trekkes under glassplaten ved hjelp av kapillærkrefter.
5. Cellene telles deretter i mikroskop. Tellekammeret består av to kammer med flere 16 ruters nettverk. De cellene som befinner seg innenfor ett av de 16-ruters nettverkene telles.
6. Konsentrasjonen av celler per ml i utgangsløsningen er antall celler i et 16-ruters nettverk multiplisert med 10.000.

4.6 BCA-måling av protein

Proteinmengden i prøvene måles ved hjelp av BCA (bicinchoninic acid) proteinmåling. Denne metoden baseres på peptidkjedenes evne til å redusere Cu^{2+} til Cu^{+} . Cu^{+} -ionene chelateres deretter av BCA og det dannes et vannløselig, lilla kompleks. Absorbansen i prøvene bestemmes ved hjelp av et spektrofotometer og proteinmengden (mg/ml) beregnes deretter ut i fra en standardkurve. Følsomheten for denne metoden ligger i området 1-20 µg/ml. Metoden er modifisert etter Smith *et al* (Smith 1985).

Prosedyre:

1. Cellene dyrkes i 6-brønners plater frem til ønskelig tidspunkt for proteinmåling.
2. Mediet suges av, og cellene i hver brønn vaskes tre ganger med 1 ml 1x PBS (fosfatbufret, fysiologisk saltvann)

3. Hver brønn tilsettes 1 ml milliQ-vann før celler og cellerester løsnes fra platen med en celledraske og overføres til eppendorfrør.
4. Løsningen homogeniseres ved hjelp av sonikator. Rester av membraner og cytoskjelett spinnes ned og kastes.
5. Standarder lages ut ifra en BCA-stamløsning (2 mg/ml). 25 µl prøve eller standard appliseres til en 96-brønners mikrotiterplate.
6. Deretter tilsettes 200 µl A+B løsning per brønn.
7. Mikrotiterplaten settes på ristebrett i 2 minutter og inkuberes deretter i 30 minutter ved 37 °C.
8. Absorbansen leses av ved 562 nm i et spektrofotometer og proteinkonsentrasjonen i prøvene beregnes ut i fra en standardkurve.

Løsninger:

10 x PBS pH 7.2-7.4

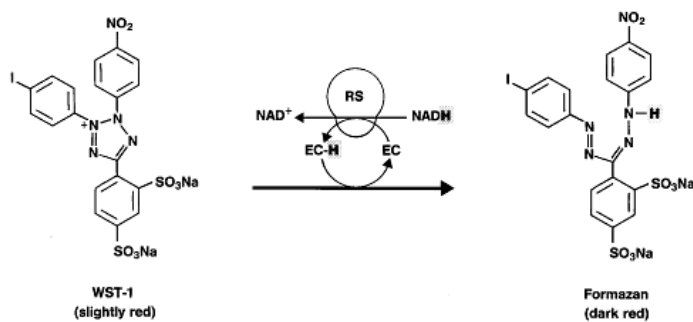
Ingredienser	Mengde
NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	3.9 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	14.1 g
NaCl	85.2 g
MilliQ-vann	Opp til 1000 ml

A+B løsning

Ingredienser	Deler	Konsentrasjon
Assay reagent A (ferdig fra leverandør)	1	2 %
Assay reagent B (ferdig fra leverandør)	49	98 %

4.7 WST-1 test

Celleproliferasjonen kan måles ved hjelp av en WST-1 test. WST-1 er en celleproliferasjonsreagens som er designet for spektrofotometrisk kvantifisering av cellevekst og cellens vitalitet. Tetrazoliumsaltet spaltes til formazan av mitokondriell dehydrogenase. Absorbansen er et uttrykk for mengde spaltet tetrazoliumsalt. Denne metoden er et alternativ til metoder som baseres på bruk av radioaktivitet.



Figur 4.1: Tetrazoliumsaltet (WST-1) spaltes til formazan av mitokondriell dehydrogenase.

Prosedyre:

Cellene dyrkes og splittes som normalt i ønsket medium.

1. En liten flaske (25 cm²) trypsineres og fordeles i seks rør.
2. Cellene spinnes ned og resuspenderes i 3 ml av ønsket medium. Det er viktig at celleantallet er likt i de ulike brønnene, så celleantall må bestemmes før utsåing. Anbefalt celledetthet er $0.1-5.0 \times 10^4$ celler per brønn.
3. 100 µl cellesuspensjon tilsettes hver brønn i en 96 brønners plate.
4. Etter 24 timer tilsettes 10 µl WST-1 reagens hver av brønnene.
5. Cellene inkuberes i 30 minutter ved 37 °C i 5 % CO₂.
6. Absorbansen avleses ved 450 nm.

-
7. Effekten på celleproliferasjonen beregnes ut i fra absorbansverdien og sammenliknes med kontroll.

4.8 Analyse av [³⁵S]-proteoglykaner

4.8.1 Innmerking med [³⁵S]-sulfat

Proteoglykaner er store molekyler som består av proteiner med høyt sulfaterte sukkerkjeder. GAG-kjeden blir sulfatert i Golgiapparatet, og ved å tilsette [³⁵S]-sulfat til mediet vil proteoglykanene merkes radioaktivt via biosyntesen. [³⁵S]-sulfat vil gå inn i den totale sulfatpoolen og bidra i *de novo* syntesen av proteoglykaner.

4.8.2 Rensing av [³⁵S]-proteoglykaner

Etter innmerking vil fraksjonene inneholde mye fritt [³⁵S]-sulfat og [³⁵S]-merkede makromolekyler hvor [³⁵S]-proteoglykaner er den dominerende komponenten (Svennevig 1995). I dette arbeidet brukes gelkromatografi for å rense prøvene for fritt [³⁵S]-sulfat og små [³⁵S]-molekyler og ionebytterkromatografi for å rense prøvene for [³⁵S]-merkede makromolekyler som ikke er proteoglykaner.

4.8.2.1 Sephadex G-50 fine gelkromatografi

Sephadex G-50 fine er et gelfiltrasjonsmateriale som normalt brukes til å separere proteiner i området 0.5-10 kDa. Molekyler i denne størrelsesorden vil ikke trenge inn i gelmaterialet, men passere i væskefasen utenfor og elueres ut. Proteoglykaner går utenom gelen, mens små molekyler som f. eks fritt sulfat, vil trenge inn og bli forsinket under eluering.

Prosedyre:

1. 10 ml plastpipetter kuttes av ved 7 ml merket og spissen tettes lett med litt glassvatt. Hver søyle fylles opp til 4.0 ml med Sephadex G-50 fine løsning.
2. Medium suges av og løse celler spinnes ned og fjernes. 0.05 M NaCl i 0.05 M Tris pH 8.0 tilsettes slik at total mengde blir 1.0 ml. Mediet blandes deretter med likt volum 8 M Guanidin-HCl løsning.
3. Cellene løses i 1.5 ml 4 M Guanidin-HCl løsning i minimum 30 minutter. Cellefraksjonen suges av og 0.5 ml av samme løsning brukes til å vaske ut av brønnene.
4. 1 ml av hver fraksjon settes på søylen. Dette elueres ut uten oppsamling.
5. Prøven elueres deretter ut i 1.5 ml 0.05 M NaCl i 0.05 M Tris med pH 8.0 og samles opp.

Løsninger:

0.05 M NaCl i 0.05 M Tris HCl pH 8.0

Ingredienser	Mengde	Konsentrasjon
NaCl	6.25 ml	4 M
Tris base	25 ml	1 M
MilliQ-vann	468 ml	

pH justeres til 8.0 ved hjelp av 5.0 M HCl.

Sephadex G-50 fine løsning

Ingredienser	Mengde	Konsentrasjon
Sephadex G-50 fine pulver	5 ts	
0.05 M NaCl i 0.05 M Tris HCl pH 8	500 ml	

Løsningen svelles over natt.

8.0 M guanidin HCl-løsning, pH 6.0

Ingredienser	Mengde	Konsentrasjon
Guanidin-HCl	152.84 g	
Acetatbuffer	Ca. 200 ml	0.2 M
4 % Triton X-100	8 ml	

Guanidin-HCl løses i acetatbuffer, og volumet justeres til 200 ml. Løsningen renses ved omrøring med 1 ts kull over natt og filtreres før den tilsettes 4 % Triton X-100.

4.8.2.1 DEAE ionebytterkromatografi

DEAE ionebytterkromatografi er en metode for å separere proteoglykaner fra andre makromolekyler. DEAE er en svak anionbytter som binder proteoglykaner ved hjelp av ionebindinger. Svakt negative, nøytrale eller positivt ladede molekyler vil binde svakt eller gå rett gjennom kolonnen. Proteoglykaner vil elueres ut ved høy saltkonsentrasjon. Denne metoden er modifisert etter Salmivirta *et al* (Salmivirta 1998).

Prosedyre:

1. Poly-prepkolonner fylles opp til 0.6 ml med DEAE sephacelsuspensjon og ekvilibrerer med 3 ml 0.2 M NH_4HCO_3 .
2. 500 μl av prøven settes på kolonnen og kolonnene vaskes med 6 ml 0.2 M NH_4HCO_3 , 6 ml 0.2 M NaCl og 6 ml 0.2 M NH_4HCO_3 .
3. Materialet som er bundet til kolonnene elureres ut med 2 M NaCl i 12 fraksjoner á 500 μl .
4. Deretter vaskes kolonnene med 5 ml 2.0 M NaCl, 3 ml MilliQ-vann og 3 ml 0.2 M NH_4HCO_3 , for å klargjøres til nye forsøk.

Løsninger:

2.0 M NaCl

0.2 M NaCl

0.2 M NH_4HCO_3

4.9 Scintillasjonstelling

Ved scintillasjonstelling måles radioaktivitet i en prøve (fotoner per minutt) ved hjelp av en tellervæske. [^{35}S]-sulfat sender ut β -partikler. Tellervæsken inneholder fluorescenssubstanser som eksiteres av energien fra disse β -partiklene. Når substansene returnerer til sin grunntilstand vil de frigjøre fotoner, og mengde fotoner korrelerer med mengde radioaktivitet. Hver prøve telles i tre minutter, og måles som cpm (counts per minute).

4.10 SDS-gelelektroforese

Ved SDS gelektroforese separeres makromolekyler etter størrelse under denaturerende forhold. Molekylets størrelse og vekt er omvendt proporsjonal med molekylets vandringslengde i gelen.

Prosedyre:

1. Hver prøve som skal settes på gel bør ha en cpm-verdi på minimum 10.000. Størrelsen på brønnene varierer mellom de ulike geltypene. For å oppnå tilstrekkelig cpm samtidig som volumet ikke skal overstige størrelsen på brønnen, kan det være nødvendig å oppkonsentrere prøven ved vakumsentrifugering.
2. Prøven tilsettes prøvebuffer i forholdet 1:5 (4x prøvebuffer). Prøvebufferen inneholder sukrose slik at prøven synker ned i brønnene.

3. Prøvene kokes i 5 minutter på 100 °C. Etter koking sentrifugeres prøvene i kort tid for å få ned kondensert væske.
4. Minigelapparatet fylles med 500 ml kjørebuffer i hvert kammer.
5. Prøvene appliseres på gelen, og kjøres deretter i 60 minutter på 180 V.
6. Gelen fikseres i fikseringsløsning i minimum 30 minutter på ristebrett.
7. Deretter legges gelen i Amplifier i 20 minutter.
8. Gelen legges på filterpapir og dekkes med plastfolie. Ved hjelp av en geltørker tørkes gelen under vakum ved 65 °C.

Løsninger:

4X prøvebuffer

Ingredienser	Mengde	Konsentrasjon
Tris-HCl pH 6.8	2.5 ml	1 M
Glyserol	4.0 ml	
SDS	0.8 g	
Bromphenolblått, 0.1 %	1.0 ml	
Beta-mercaptoetanol	1.0 ml	
MilliQ-vann	Opp til 10 ml	

5X Kjørebuffer

Ingredienser	Mengde
Glysin	360 g
Trizma base pH 8.7	75 g
MilliQ-vann	Opp til 2500 ml

pH justeres til 8.4 ved hjelp av 5.0 M HCl

Fikseringsløsning

Ingredienser	Mengde
Metanol	250 ml
MilliQ-vann	1250 ml
Konsentrert eddiksyre	250 ml

4.11 Autoradiografi

Gelen legges på en røntgenfilm ved $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Eksponeringstid vil avhenge av mengde radioaktivitet som ble applisert på gelen. Ved framkalling vil radioaktivitet danne mørke felter på filmen.

5 Resultater

Hovedformålet med denne oppgaven var å studere effekten av hyperglykemi og MGO på proteoglykansyntese i epitelceller i distale tubuli. Videre ønsket vi å se hvilke effekter hyperglykemi og MGO har på cellevekst. For å undersøke dette har vi dyrket MDCK I celler i ulike konsentrasjoner av glukose og MGO. Som en del av forsøkene med hyperglykemi ønsket vi å se om eventuelle forskjeller i resultatene mellom glukosekonsentrasjonene kunne skyldes ulik osmolaritet i mediene.

Resultatene deles inn i to hoveddeler. I den første delen presenteres resultatene fra forsøk som er gjort med MDCK I celler dyrket under hyperglykemiske forhold og i den andre presenteres resultater fra forsøk som er gjort med MDCK I celler som er eksponert for ulike konsentrasjoner av MGO.

5.1 Effekt av hyperglykemi på nyreepitelceller

I disse forsøkene ble MDCK I celler dyrket i medium med høy glukosekonsentrasjon sammenliknet med celler som ble dyrket i medium med lav glukosekonsentrasjon. Eventuelle forskjeller i resultatene fra celler dyrket i medium med høy og lav glukosekonsentrasjon kan teoretisk skyldes ulik osmolaritet i de to mediene. MDCK I celler ble derfor også dyrket med lav glukose og mannitol for å undersøke osmolaritetens innvirkning. Mannitol er ikke metabolsk tilgjengelig for cellene og vil teoretisk bare påvirke cellene i kraft av økt osmolaritet (Brenner 1996).

De ulike mediene benevnes som ”høy glukose”, ”lav glukose” og ”mannitol”. ”Høy glukose” tilsvarer en glukosekonsentrasjon på 25 mM, lav ”glukose” tilsvarer en glukosekonsentrasjon på 5 mM og ”mannitol” tilsvarer 5 mM glukose og 20 mM mannitol. De ulike mediene er ellers like og har samme sluttkonsentrasjon av føtalt kalveserum, L-glutamin og penicillin. I alle forsøkene er lav glukose valgt som kontroll.

5.1.1 De ulike medienes osmolaritet

De ulike medienes osmolaritet ble testet ved klinisk kjemisk avdeling på Ullevål universitetssykehus (Tabell 5.1). Resultatene viser at osmolariteten til DMEM høy glukose og DMEM lav glukose med mannitol er tilnærmet like, mens DMEM lav glukose lå 5.3 % lavere enn disse (hhv ~338, ~338 og ~321 mOsm/HgH₂O).

Medium	Osmolaritet (mOsm/HgH ₂ O)
DMEM høy glukose (4.5 g glukose/l) uten glutamin	~339
DMEM høy glukose (4.5 g glukose/l), 1 % glutamin	~338
DMEM lav glukose (1.0 g glukose /l), 1 % glutamin	~321
DMEM lav glukose (1.0 g glukose /l) + 3.5 g glukose, 1 % glutamin	~340
DMEM lav glukose (1.0 g glukose/l) + 3.5 g mannitol, 1 % glutamin	~338

Tabell 5.1: Oversikt over de ulike medienes osmolaritet (mOsm/HgH₂O). Mediene er testet ved klinisk kjemisk avdeling på Ullevål universitetssykehus.

Innledningsvis ble det gjort forsøk for å se hvordan cellene i de ulike mediene ville oppføre seg over tid. Cellene ble dyrket i lav glukose, høy glukose eller mannitol i 6-brønners plater. På dag 2, 4 og 8 ble cellene høstet og parallelle brønner ble brukt til å måle celleantall, proteinmengde og syntese av [³⁵S]-makromolekyler og [³⁵S]-proteoglykaner. Til hvert av disse forsøkene ble det brukt tre parallelle brønner og lav glukose er valgt som kontroll i alle forsøkene.

5.1.2 Effekt av hyperglykemi på cellevekst i nyreepitelceller

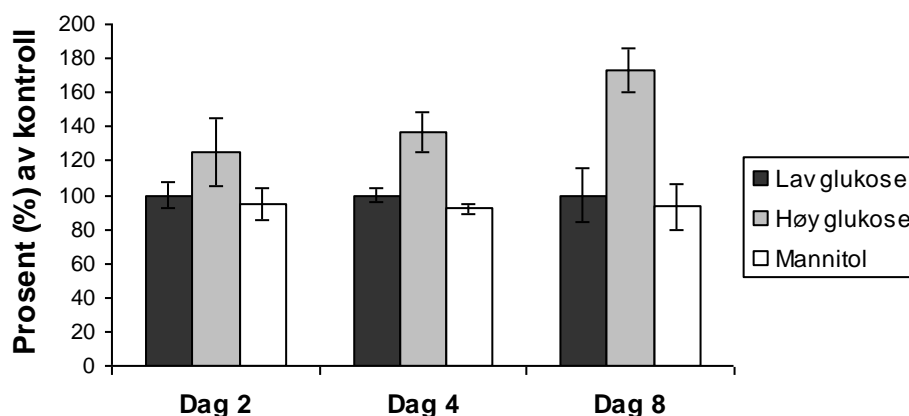
MDCK I celler ble dyrket i ulike medier for å se på potensielle endringer i cellevekst. Ved hyperplasi vil proteinmengde per celle være relativt konstant, mens det ved hypertrofi vil være økt proteinmengde per celle uten at det foreligger en økning i DNA-syntese (Yang 2004). Ved å sammenligne celleantall og proteinmengde i cellefraksjonen vil vi få en indikasjon på om hyperglykemi induserer hyperplasi eller hypertrofi i MDCK I celler.

5.1.2.1 Effekt av hyperglykemi på antall celler

Hensikten med dette forsøket var å undersøke hvilke effekter ulike glukosekonsentrasjoner har på vekst i MDCK I celler.

Cellene ble dyrket i lav glukose, høy glukose eller mannitol i 2, 4 og 8 dager. Etter høsting ble cellene farget med trypanblått og talt i mikroskop. Døde celler mister membranintegritet og blir permeable for trypanblått.

Andel døde celler holdt seg relativt konstant på mellom 3 og 5 % og det var ingen klare forskjeller mellom de ulike mediene. Figur 5.1 viser antall levende celler i de ulike mediene. Resultatene er et gjennomsnitt av tre uavhengige forsøk og presenteres som prosent av kontroll.



Figur 5.1: Antall levende celler talt i mikroskop. MDCK I celler ble dyrket i lav glukose, høy glukose og mannitol i 2, 4 og 8 dager. Cellene ble høstet, farget med trypanblått og talt i mikroskop. Resultatene er et gjennomsnitt av tre uavhengige forsøk og er presentert som prosent av kontroll.

Figur 5.1 viser at forskjellene mellom celler dyrket i høy og lav glukose øker over tid. Antall celler i brønnene med lav glukose settes til 100 % (kontroll). Celleantall i brønnene med høy glukose var etter 2 dager økt til 125 ± 20 %, etter 4 dager til 157 ± 12 % og etter 8 dager til 173 ± 13 % i forhold til kontroll. Dette betyr at det er en stor forskjell i veksthastighet mellom høy og lav glukose, men at forskjellene flates ut over tid. Både for høy og lav glukose var det en sterk økning i det reelle celleantallet per brønn etter 2 og 4 dager. Etter 8 dager var det betydelig mindre tilvekst. Dette kan forklares med redusert proliferasjon ved økt celletetthet (cellekontaktinhibering).

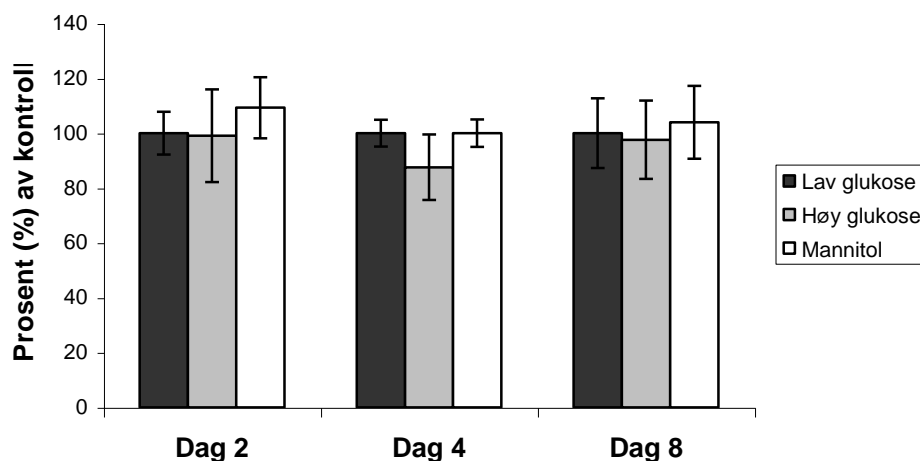
Antall celler i brønnene med mannitol var litt redusert i forhold til lav glukose. Etter 2 dager var mannitol 95 ± 10 % av kontroll, etter 4 dager 92 ± 3 % av kontroll og etter 8 dager 93 ± 13 % av kontroll. Andel døde celler i cellefraksjonene i brønnene med mannitol og lav glukose var likt, så det kan virke som om mannitol bremser celletilveksten. Det er imidlertid kun døde celler som var festet til plasten ved høsting som er med i disse tellingene og forskjeller i antall døde celler i mediet er en mulig feilkilde.

Hyperglykemi øker celleantall, mens mannitol gir en svak reduksjon i celleantall. Det er ingen forskjeller i andel døde celler mellom de ulike mediene.

5.1.2.2 Effekt av hyperglykemi på mengde protein i cellefraksjonen

Hensikten med dette forsøket var å undersøke om hyperglykemi fører til hypertrofi i nyreepitelceller. Endret proteinmengde per celle kan være et tegn på endret cellemorfologi og ved hypertrofi vil proteinmengde per celle være økt.

Cellene ble dyrket i de ulike mediene i 2, 4 og 8 dager og proteinmengde i cellefraksjonen ble bestemt ved hjelp av BCA-proteinmåling. Figur 5.2 viser et gjennomsnitt av tre uavhengige forsøk som presenteres som prosent av kontroll.



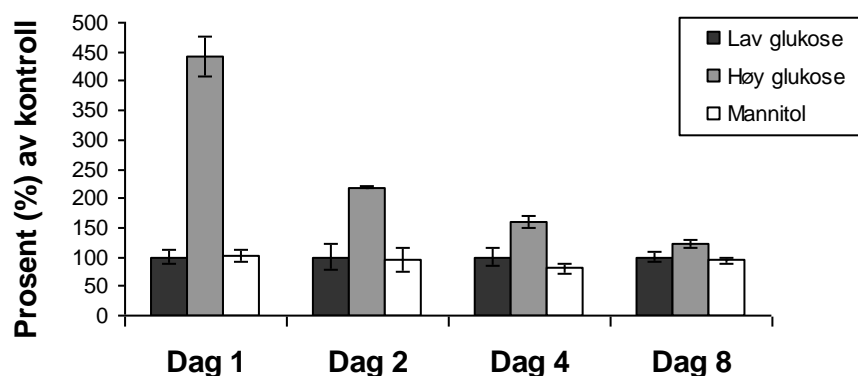
Figur 5.3 Mengde protein i cellefraksjonen relatert til antall celler. Proteinmengde i cellefraksjonen relatert til antall celler etter 2, 4 og 8 dagers dyrking i lav glukose, høy glukose og mannitol. Resultatene er et gjennomsnitt av tre uavhengige forsøk og presenteres som prosent av kontroll.

Etter 2, 4 og 8 dager var proteinmengden i cellefraksjonen etter behandling med høy glukose henholdsvis $123 \pm 16 \%$, $137 \pm 22 \%$ og $169 \pm 13 \%$ i forhold til proteinmengden i cellefraksjonen etter behandling med lav glukose. Proteinmengde fra mannitolbehandlede celler var dag 2, 4 og 8 henholdsvis $103 \pm 2 \%$, $92 \pm 14 \%$ og $96 \pm 5 \%$ i forhold til kontroll. Disse målingene korrelerer godt med celletellingene og mengde protein delt på antall celler fra parallelle brønner er nesten helt like mellom de ulike mediene (Figur 5.3).

Disse resultatene er en indikasjon på at morfologien til MDCK I celler påvirkes lite av hyperglykemi og hyperosmolaritet.

5.1.2.3 Effekt av hyperglykemi på celleproliferasjon

Hensikten med dette forsøket var å sammenligne resultatene fra WST-1 test med celletelling for å se om dette er en metode som kan brukes til måle proliferasjonen til MDCK I celler som dyrkes i ulike glukosekonsentrasjoner.



Figur 5.4. Celleproliferasjon målt med WST-1 test. Mitokondriell dehydrogenase-aktivitet i celler dyrket i lav glukose, høy glukose og mannitol etter 1, 2, 4 og 8 dager. Resultatene er et gjennomsnitt av to forsøk og presenteres som prosent av kontroll.

WST-1 er en metode som bestemmer mengde mitokondriell dehydrogenase i en prøve. Levende celler vil produsere dette enzymet, mens døde celler ikke gjør det. Samtidig vil celler som er i deling være mer metabolsk aktive enn celler som ikke er i deling. På bakgrunn av dette blir WST-1 brukt til å måle celleviabilitet, celletoksisitet og celleproliferasjon.

Celler ble dyrket i flasker med høy glukose, lav glukose og mannitol. 24 timer før enzymmåling ble likt antall celler fra de ulike mediene sådd ut i 96-brønners plater og tilsatt tetrazoliumsalt. Tidspunktene for enzymmåling var 1, 2, 4 og 8 dager og absorbansen ble avlest i spektrofotometer. Resultatene er et gjennomsnitt av to uavhengige forsøk og er presentert som prosent av kontroll (Figur 5.4).

Celleproliferasjonen øker kraftig ved dyrking av celler i høy glukose, men flater ut etter hvert som celletettheten øker. Cellene som ble dyrket i høy glukose hadde en økning av mitokondriell dehydrogenase etter dag 1 til 441 % i forhold til kontroll. Dag 2 var målingen 219 %, dag 4 var den 159 % og dag 8 var den 122 % i forhold til kontroll.

Det er kun små forskjeller i mengde mitokondriell dehydrogenase i brønnene med mannitol og i brønnene med lav glukose, men som i celletellingene er det også i disse målingene en tendens til at mannitol ligger litt under lav glukose. På dag 2 var mannitol redusert til 97 ± 20 % av kontroll, på dag 4 var den 81 ± 10 % og på dag 8 var den 94 ± 6 %.

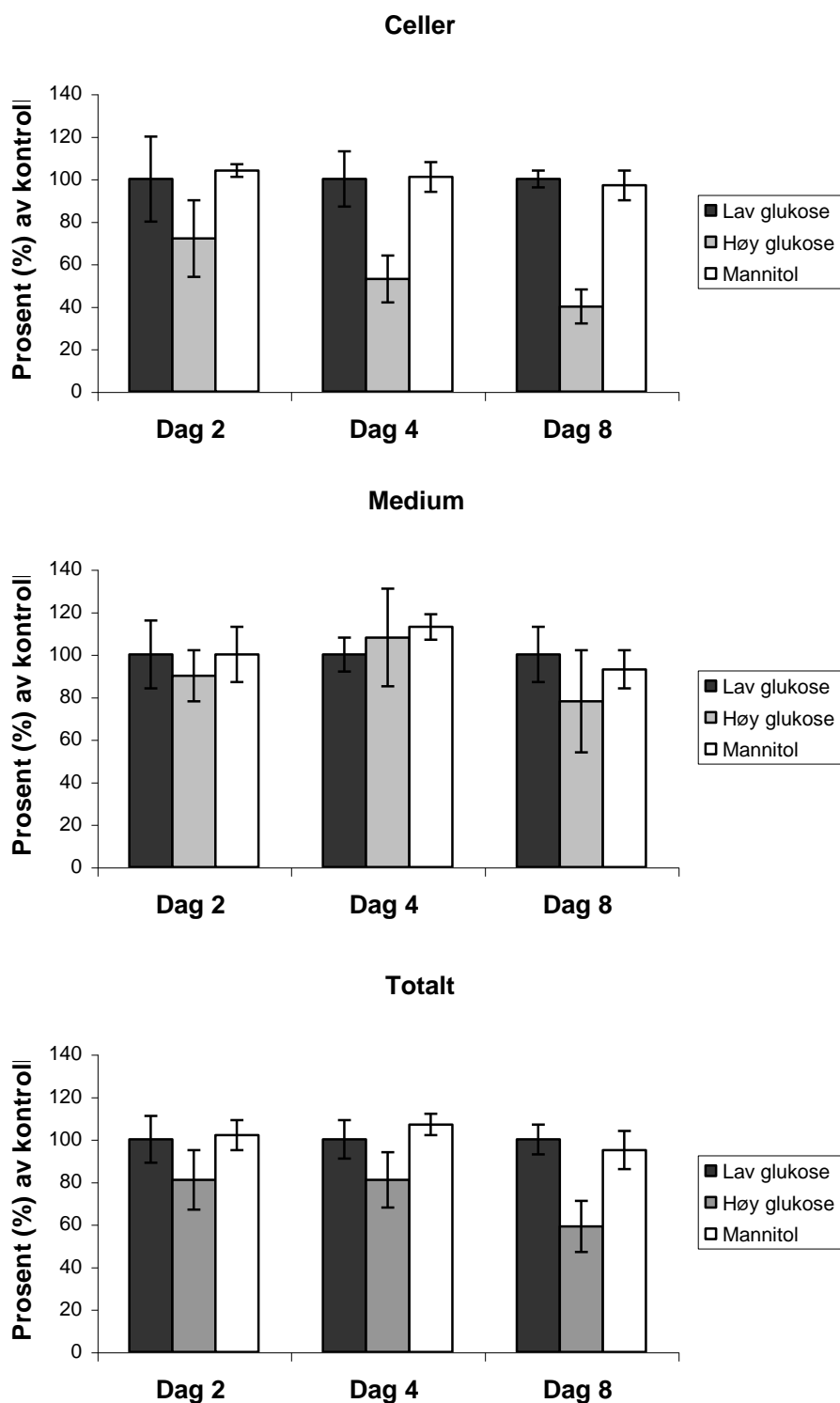
MDCK I celler som ble dyrket i høy glukose hadde en økt proliferasjon i forhold til celler som ble dyrket i lav glukose. Forskjellene i proliferasjon mellom høy og lav glukose avtok over tid og dette passer med resultatene fra celletellingene der celletilveksten avtok ved økt celletetthet. Cellene som ble dyrket i mannitol hadde en tendens til redusert proliferasjon i forhold til celler dyrket i lav glukose. Dette passer med celletellingene der celletilveksten er noe redusert i brønnene med mannitol i forhold til i brønnene med lav glukose.

5.1.3 Effekt av hyperglykemi på syntese av [³⁵S]-makromolekyler i nyreepitelceller

Hensikten med disse forsøkene var å se om hyperglykemi har effekt på syntese av proteoglykaner og andre makromolekyler i nyreepitelceller.

5.1.3.1 Kvantitativ analyse av [³⁵S]-makromolekyler

Cellene ble dyrket i 2, 4 og 8 dager i de ulike mediene og 24 timer før høsting ble brønnene tilsatt [³⁵S]-sulfat. Proteoglykaner er store molekyler som består av sulfaterte



Figur 5.5 [^{35}S]-makromolekyler relatert til antall celler. MDCK I celler ble dyrket i lav glukose, høy glukose eller mannitol i 2, 4 og 8 dager. 24 timer før høsting ble cellene tilsatt [^{35}S]-sulfat. Celle og mediefraksjonene ble renset med Sephadex G-50 fine før mengde radioaktivitet ble bestemt ved scintillasjonstelling. Figuren viser endring av mengde [^{35}S]-makromolekyler relatert til antall celler i cellefraksjonen, mediefraksjonen og totalt i celle- og mediefraksjonen. Resultatene er et gjennomsnitt av tre uavhengige forsøk og presenteres som prosent av kontroll.

glykosaminoglykankjeder festet til en proteinkjerne. Ved å tilsette [³⁵S]-sulfat til mediet vil disse kjedene bli radioaktivt merket under biosyntesen. Prøvene vil inneholde mye fritt [³⁵S]-sulfat og små [³⁵S]-molekyler og må renses. Sephadex G-50 fine er et gelmateriale som separerer molekyler etter størrelse og molekyler som er større enn 10 kDa vil ikke trenge inn i gelmaterialet, men elueres direkte ut. Etter rensing med Sephadex G-50 fine vil prøvene inneholde både [³⁵S]-proteoglykaner og andre [³⁵S]-makromolekyler som [³⁵S]-glykoproteiner og [³⁵S]-glykolipider. Mengde [³⁵S]-sulfat i prøvene, som er et mål for [³⁵S]-makromolekyler, ble bestemt ved scintillasjon. Resultatene er et gjennomsnitt av tre uavhengige forsøk og er relatert til antall celler i parallelle brønner. Endringer er presentert som prosent av kontroll. Figur 5.5 viser mengde [³⁵S]-makromolekyler fordelt på cellefraksjonen, mediefraksjonen og totalt i celle- og mediefraksjonen.

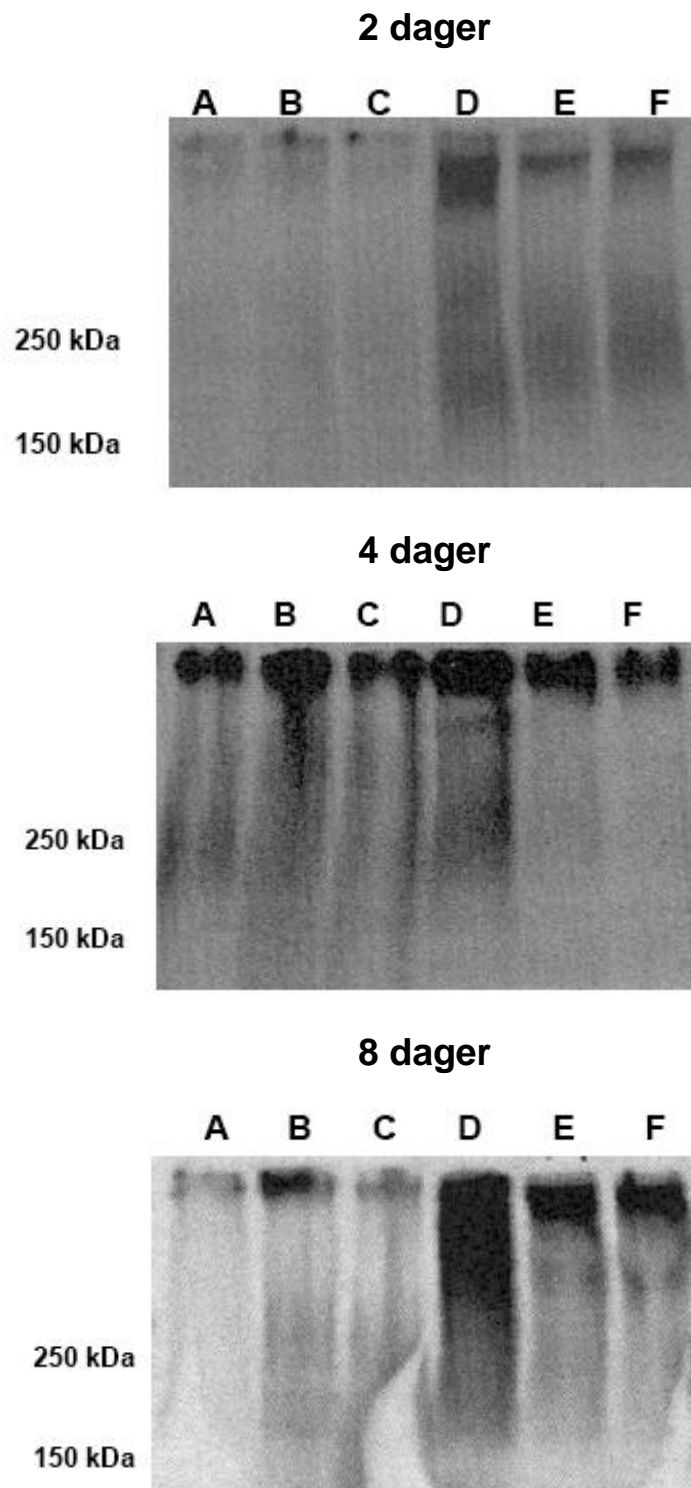
I cellefraksjonen er det en gradvis reduksjon i [³⁵S]-makromolekyler i høy glukose sammenlignet med lav glukose. På dag 2 er den endret til 72 ± 13 % i forhold til lav glukose, på dag 4 er den 53 ± 8 % og på dag 8 er den 40 ± 11 %. I mediefraksjonen er reduksjonen i [³⁵S]-makromolekyler i høy glukose i forhold til lav glukose mindre, med 81 ± 9 % på dag 2, 81 ± 13 % på dag 4 og 59 ± 9 % på dag 8.

Det er kun små forskjeller mellom mengde [³⁵S]-makromolekyler relatert til antall celler i mannitol og lav glukose både i celle- og mediefraksjonen. Totalt i celle- og mediefraksjonene er målingene i forhold til lav glukose 102 ± 7 % dag 2, 107 ± 12 % dag 4 og 95 ± 9 % dag 8.

Hyperglykemi fører til en reduksjon i mengde [³⁵S]-makromolekyler per celle i forhold til kontroll. Forskjellene mellom høy og lav glukose øker over tid og det er i cellefraksjonen forskjellen er størst. Mengde [³⁵S]-makromolekyler i lav glukose og mannitol tilnærmet like når scintillasjontallene relateres til antall celler.

5.1.3.2 Kvalitativ analyse av [³⁵S]-proteoglykaner

SDS gelelektroforese brukes til kvalitativ analyse av [³⁵S]-makromolekyler. Molekylene separeres etter størrelse under denaturerende forhold. Ved autoradiografi visualiseres



Figur 5.6 Autoradiografi etter SDS-gelelektroforese fra celler dyrket i 2 dager, 4 dager og 8 dager i høy glukose, lav glukose og mannitol. Celle- og mediefraksjon er renset med Sephadex G-50 fine. A, B og C er cellefraksjonen. D, E og F er mediefraksjonen. A er høy glukose, B er lav glukose og C er mannitol. D er høy glukose, E er lav glukose og F er mannitol.

[³⁵S]-sulfat som lager mørke felter på filmen. [³⁵S]-proteiner danner smale bånd og kan skilles fra [³⁵S]-proteoglykaner som danner brede bånd på grunn av store variasjoner i størrelse innenfor hvert proteoglykan. Cellene ble dyrket i 2, 4 og 8 dager i de ulike mediene og 24 timer før høsting ble brønnene tilsatt [³⁵S]-sulfat. Prøvene ble rensset for fritt [³⁵S]-sulfat og små [³⁵S]-molekyler ved hjelp av Sephadex G-50 fine før SDS-gelelektroforese. Resultatene er fra ett representativt forsøk og er ikke relatert til antall celler.

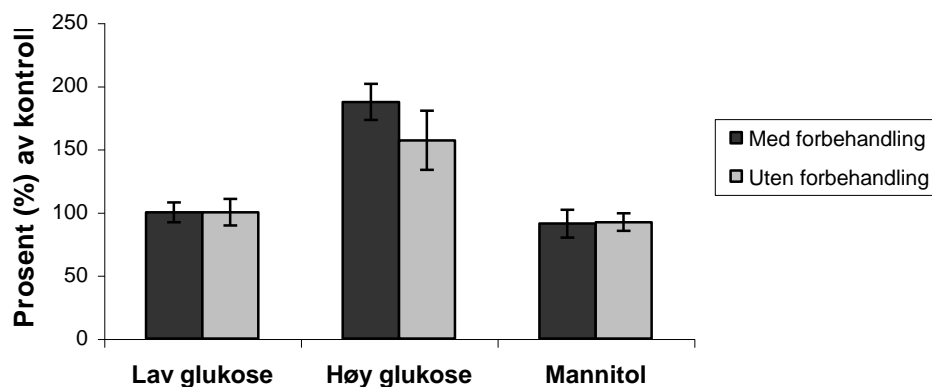
Gelene viser at det er likt proteoglykanmønster, men ulike nivåer. I cellefraksjonene dag 2, 4 og 8 er det redusert mengde [³⁵S]-proteoglykaner i prøvene fra celler som er inkubert i høy glukose og i mannitol i forhold til celler inkubert i lav glukose. I mediefraksjonen er det for samtlige tidspunkter en økning i [³⁵S]-proteoglykaner fra celler dyrket i høy glukose i forhold til celler dyrket i lav glukose. For celler dyrket i mannitol er det også en svak reduksjon i [³⁵S]-proteoglykaner i mediefraksjonene i forhold til i mediefraksjonen fra celler dyrket i lav glukose. På disse gelene er det applisert likt volum av prøvene for de ulike dyrkningsbetingelsene, så mengde [³⁵S]-proteoglykaner er ikke relatert til antall celler. Gelen fra dag 4 har ligget lenger på film enn gelene fra dag 2 og 8.

5.1.4 Kronisk og akutt hyperglykemi

Hensikten med disse forsøkene var å undersøke om hyperglykemi har de samme effektene på MDCK I celler på kort og lang sikt. I de innledende forsøkene fant vi en reduksjon i [³⁵S]-makromolekyler ved hyperglykemi og denne reduksjonen økte over tid. For å undersøke om dette var en trend som ville fortsette over lengre tid, ble det benyttet to forskjellige forsøksoppsett. I den første forsøksrekken ble cellene dyrket i de ulike mediene i 14 dager før de ble sådd ut på 6-brønners plater. I den andre forsøksrekken ble cellene dyrket i lav glukose fram til utsåing på 6-brønners plater i de ulike mediene. Den første forsøksrekken benevnes ”med forbehandling” og den andre forsøksrekken benevnes ”uten forbehandling”. I forsøkene med forbehandling ble celleantall bestemt før splitting og utsåing på brønner for at antall celler fra de ulike mediene hele tiden skulle være tilnærmet likt.

5.1.4.1 Effekt av kronisk og akutt hyperglykemi på celleantall

Hensikten med dette forsøket var å undersøke om kronisk og akutt hyperglykemi har samme effekt på cellevekst i MDCK I celler.



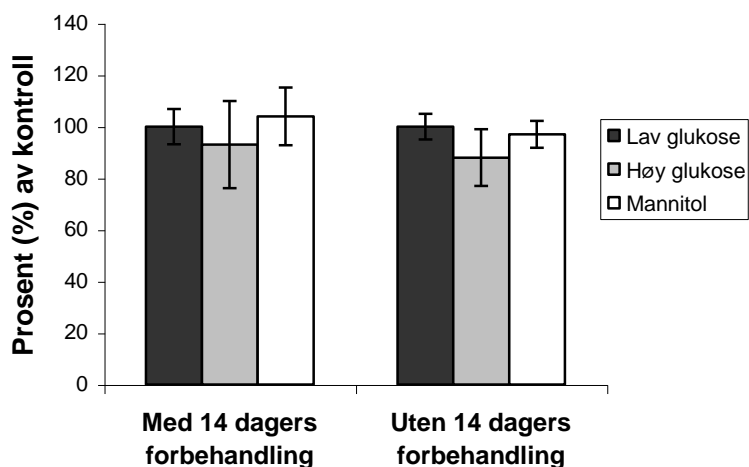
Figur 5.7 Celleantall med og uten 14 dagers forbehandling. Celler med og uten forbehandling ble dyrket i 6-brønners plater i de ulike mediene. Etter 4 dager ble cellene høstet, farget med trypanblått og talt i mikroskop. Resultatene er et gjennomsnitt av tre uavhengige forsøk og er presentert som prosent av kontroll.

Celler fra de to forsøksrekkene ble dyrket i lav glukose, høy glukose og mannitol i 6-brønners plater. Etter 4 dager ble cellene høstet, farget med trypanblått og talt i mikroskop. Resultatene er et gjennomsnitt av tre uavhengige forsøk og presenteres som prosent av kontroll (Figur 5.7).

Det var bare små forskjeller i antall celler mellom de to forsøksrekkene, men økningen fra lav glukose til høy glukose var litt høyere i forsøkene med forbehandling. I forsøkene med forbehandling økte celletallet til 187 ± 14 % og for forsøkene uten forbehandling økte celletallet til 157 ± 24 %. Antall celler dyrket i mannitol var redusert i begge forsøksrekkene til henholdsvis 91 ± 11 % og 92 ± 7 % av kontroll.

5.1.4.2 Effekt av kronisk og akutt hyperglykemi på mengde protein

Hensikten med disse forsøkene var å se om mengde protein per celle endret seg for celler som ble dyrket i høy glukose over lengre tid. Celler med og uten forbehandling ble dyrket i 6-brønners plater i lav glukose, høy glukose og mannitol. Etter 4 dager ble proteinmengden i cellefraksjonen målt med BCA-proteintest og relatert til antall celler i parallelle brønner. Resultatet er et gjennomsnitt av tre uavhengige forsøk og er presentert som prosent av kontroll.



Figur 5.8 Proteinmengde i cellefraksjonen relatert til antall celler med og uten 14-dagers forbehandling. Celler med og uten forbehandling ble dyrket i 6-brønners plater i lav glukose, høy glukose og mannitol. Etter 4 dager ble proteinmengden i cellefraksjonen målt med BCA-proteintest og relatert til antall celler i parallelle brønner. Resultatet er et gjennomsnitt av tre uavhengige forsøk og er presentert som prosent av kontroll.

I begge forsøksrekkene var det et litt lavere proteinnivå i celler som var dyrket i høy glukose i forhold til celler dyrket i lav glukose og mannitol. I forsøkene med forbehandling ble proteinmengden redusert til 93 ± 17 % og i forsøkene uten forbehandling til 87 ± 11 % av kontroll.

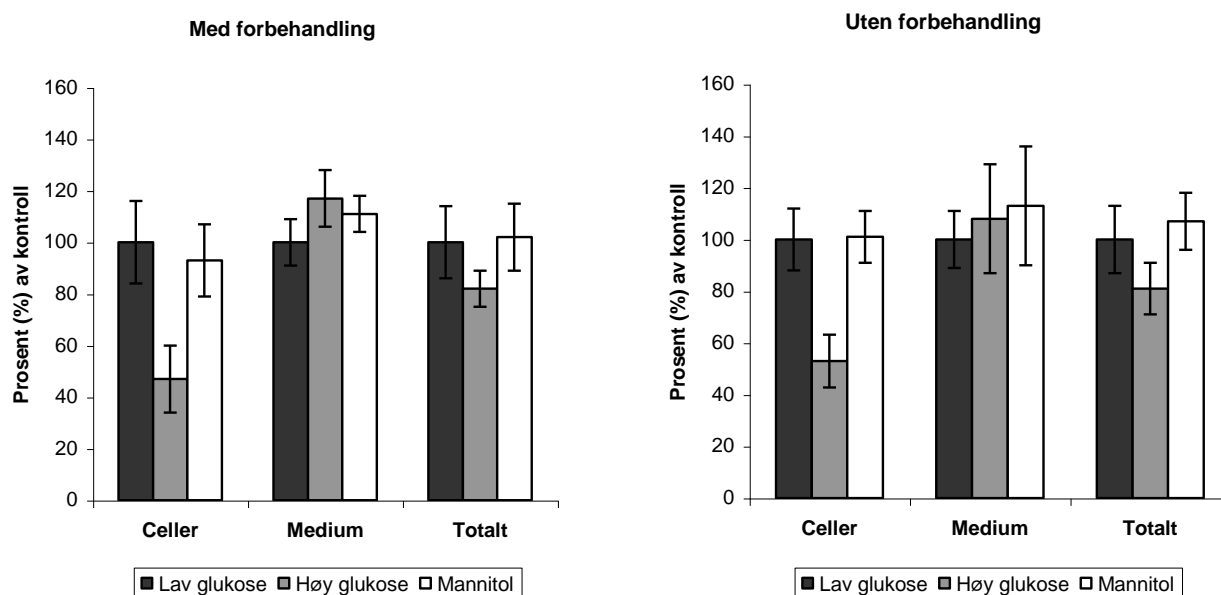
Proteinmengde i cellefraksjonen fulgte antall celler i begge forsøksrekkene og disse forsøkene gir ingen indikasjon på at det skjer en endring i celled morfologi ved dyrking av MDCK I celler i høy glukose på kort eller lang sikt.

5.1.5 Effekt av kronisk og akutt hyperglykemi på syntese av [³⁵S]-makromolekyler i nyreepitelceller

Hensikten med disse forsøkene var å se hvilke effekter hyperglykemi har på syntese av proteoglykaner og andre makromolekyler i nyreepitelceller på kort og lang sikt.

5.1.5.1 Kvantitativ analyse av [³⁵S]-makromolekyler

Celler med og uten forbehandling ble dyrket i 4 dager i de ulike mediene. Etter 3 dager ble brønnene tilsatt [³⁵S]-sulfat. Prøvene ble rensert ved hjelp av Sephadex G-50 fine gelkromatografi og mengde [³⁵S]-sulfat ble målt med scintillasjon. Resultatene er et gjennomsnitt av to uavhengige forsøk og er relatert til antall celler fra parallelle brønner (Figur 5.9).



Figur 5.9 [³⁵S]-makromolekyler med og uten forbehandling. Celler med og uten forbehandling ble sådd ut i brønner i de ulike mediene. Etter 3 dager ble mediene tilsatt [³⁵S]-sulfat og etter ytterligere 1 dag ble cellene høstet. Celle- og mediefraksjon ble rensert med Sephadex G-50 fine og mengde [³⁵S]-sulfat ble målt ved scintillasjonstilling. Resultatene er et gjennomsnitt av to uavhengige forsøk og er relatert til antall celler fra parallelle brønner.

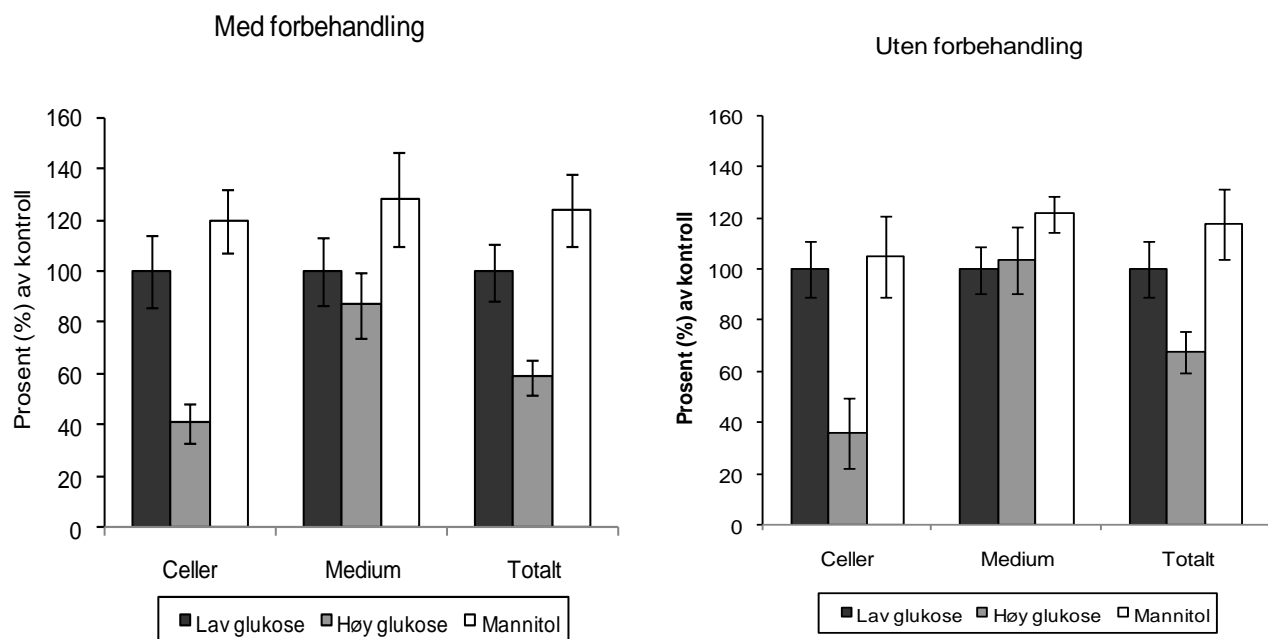
I cellefraksjonen var det en reduksjon etter behandling med høy glukose til 47 ± 13 % i forsøkene med forbehandling og til 53 ± 11 % i forsøkene uten forbehandling i forhold til lav glukose. I mediefraksjonen var det en økning fra celler som var behandlet i høy glukose til 117 ± 11 % i forsøkene med forbehandling og til 108 ± 23 % i forsøkene uten forbehandling.

Totalt i celle- og mediefraksjonen blir dette for forsøkene med forbehandling $82 \pm 7 \%$ og uten forbehandling $81 \pm 13 \%$ i forhold til kontroll. Ved mannitolbehandling var endringene i forhold til kontroll små i begge forsøksrekkene. Totalt i celle- og mediefraksjonen var det en økning til $102 \pm 13 \%$ i forsøkene med forbehandling og i forsøkene uten forbehandling en økning til $107 \pm 11 \%$.

I forsøkene med og uten forbehandling er det kun små forskjeller i mengde [^{35}S]-makromolekyler i de ulike mediene.

5.1.5.2 Kvantitativ analyse av [^{35}S]-proteoglykaner

For å separere [^{35}S]-proteoglykaner og andre [^{35}S]-makromolekyler kan man utnytte at proteoglykanene er sterkt negativt ladet. DEAE er en svak anionbytter som binder proteoglykaner ved hjelp av ionebindinger. Svakt negative, nøytrale eller positivt ladede molekyler vil binde seg svakt til materialet eller gå rett gjennom. Proteoglykanene elueres ut



Figur 5.10 Mengde [^{35}S]-proteoglykaner med og uten forbehandling. Celler med og uten forbehandling ble sådd ut i brønner i de ulike mediene. Etter 3 dager ble mediene tilsatt [^{35}S]-sulfat og etter ytterligere 1 dag ble cellene høstet. Celle- og mediefraksjon ble renset med Sephadex G-50 fine og DEAE ionebytterkromatografi. Mengde [^{35}S]-sulfat ble målt ved scintillasjonstelling. Resultatene er et gjennomsnitt av to uavhengige forsøk og er relatert til antall celler.

med høy saltkonsentrasjon og mengde inkorporert [³⁵S]-sulfat bestemmes med scintillasjon. Dette gir et indirekte mål på mengde proteoglykaner i prøven. Celler med og uten forbehandling ble sådd ut i brønner med høy glukose, lav glukose og mannitol. Etter tre dager ble cellene tilsatt [³⁵S]-sulfat. Cellene ble høstet etter 24 timer og prøvene ble rensset ved hjelp av Sephadex G-50 fine gelkromatografi. [³⁵S]-proteoglykaner ble separert fra andre [³⁵S]-makromolekyler ved hjelp av DEAE-ionebytterkromatografi. Resultatene er relatert til antall celler og er et gjennomsnitt av to uavhengige forsøk (Figur 5.10).

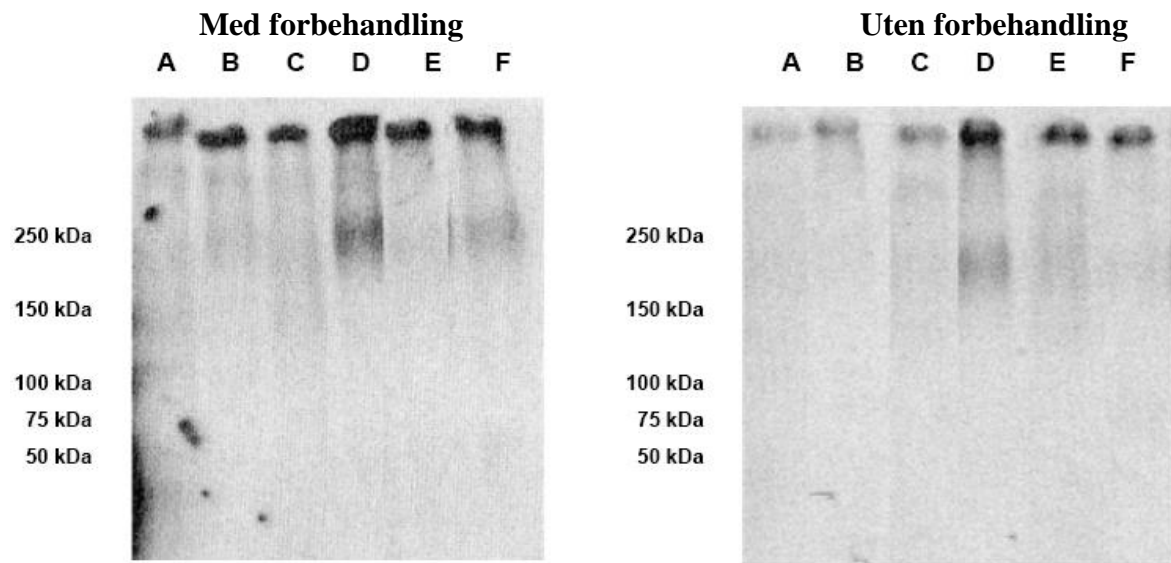
I forhold til lav glukose var det en reduksjon i [³⁵S]-proteoglykaner i cellefraksjonen til 41 ± 14 % i forsøkene med forbehandling og til 36 ± 8 % i forsøkene uten forbehandling. I mediefraksjonen var det en reduksjon til 87 ± 13 % med forbehandling og en økning til 104 ± 13 % uten forbehandling. Totalt i celle- og mediefraksjon var reduksjonen til 59 ± 11 % i forsøkene med forbehandling og til 68 ± 7 % i forsøkene uten forbehandling i forhold til kontroll.

I forsøkene med mannitol var det en økning av [³⁵S]-proteoglykaner i forhold til lav glukose i begge forsøksrekkene. I forsøkene med forbehandling var det økning i cellefraksjonen til 105 ± 12 %, i mediefraksjonen til 122 ± 12 % og totalt i celle- og mediefraksjonen til 118 ± 6 %. De tilsvarende tallene for forsøkene uten forbehandling var 119 ± 12 %, 129 ± 18 % og 124 ± 17 %. Fordelingen av [³⁵S]-proteoglykaner i celle- og mediefraksjonen er ganske lik i de ulike mediene. Cellefraksjonen inneholder 30-40 % og mediefraksjonen inneholder 60-70 % av [³⁵S]-proteoglykanene i alle forsøkene.

Hyperglykemi førte til en reduksjon i [³⁵S]-proteoglykaner både i forsøkene med og uten forbehandling, mens mannitol førte til en økning i forhold til kontroll i begge forsøksrekkene.

5.1.5.3 Kvalitativ analyse av [³⁵S]-proteoglykaner

Ved SDS gelelektroforese separeres makromolekyler under denaturerende forhold. Molekylets størrelse og vekt er proporsjonal med molekylets vandringslengde i gelen. Materialet er først rensset med Sephadex G-50 fine. Resultatene er fra et representativt forsøk og mengde proteoglykaner er ikke relatert til antall celler (Figur 5.11).



Figur 5.11 Autoradiografi etter SDS-gelelektroforese med og uten forbehandling. Autoradiografi etter SDS-PAGE fra celler dyrket i 4 dager i de ulike mediene. 24-timer før høsting ble cellene tilsatt [^{35}S]-sulfat. Etter høsting ble celle- og mediefraksjon renset med Sephadex G-50 fine. A er høy glukose, B er lav glukose og C er mannitol fra cellefraksjonen. D er høy glukose, E er lav glukose og F er mannitol i mediefraksjonen. Resultatene er ikke relatert til antall celler.

Figur 5.11 viser at det er likt proteoglykanmønster, men ulik mengde [^{35}S]-proteoglykaner fra de ulike dyrkningsmediene. I cellefraksjonene er det mest [^{35}S]-proteoglykaner fra celler behandlet med lav glukose. Det er en svak reduksjon i cellefraksjonen fra mannitolbehandlede celler, mens det er en kraftig reduksjon i cellefraksjonen fra celler behandlet i høy glukose. I mediefraksjonen var det økt [^{35}S]-proteoglykaner fra celler dyrket i høy glukose i forhold til lav glukose og en svak reduksjon i mannitolbehandlede celler. Trenden var den samme i forsøkene med og uten forbehandling.

5.2 Effekten av MGO på nyreepitelceller

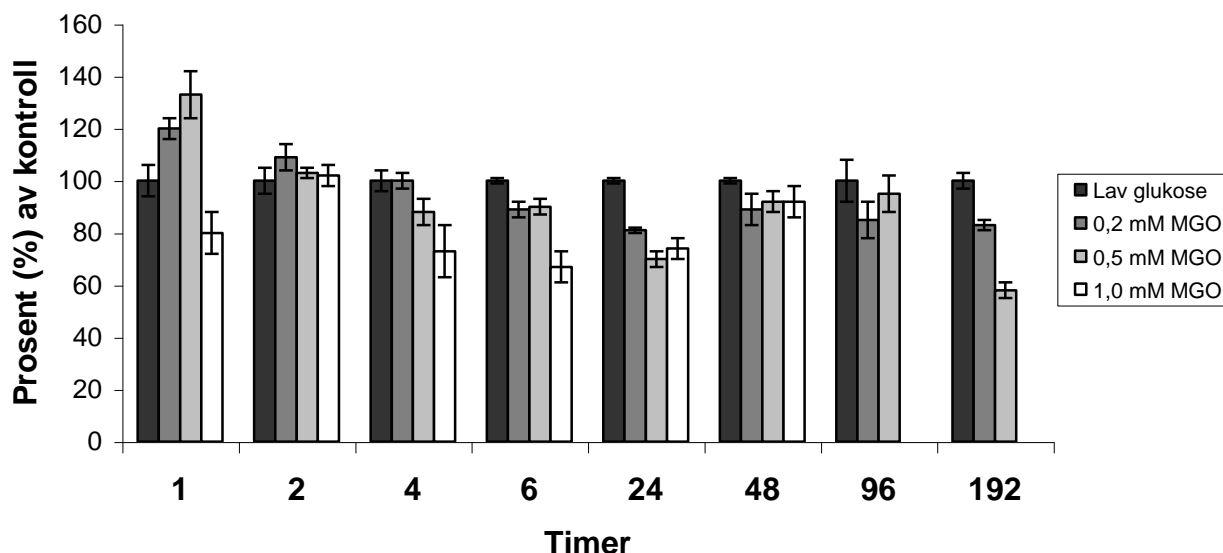
Hensikten med disse forsøkene var å se på hvilke effekter MGO har på proteoglykansyntese i nyreepitelceller. Vi ønsket også å undersøke hvilke effekter MGO har på cellevekst.

5.2.1 Effekt av MGO på cellevekst i nyreepitelceller

Ved å beregne antall levende og døde celler, proteinmengde og celleproliferasjon ønsket vi å kunne si noe om cellevekst i nyreepitelceller som eksponeres for ulike konsentrasjoner av MGO.

5.2.1.1 Effekt av MGO på celleantall

Hensikten med dette forsøket var å undersøke hvilke effekter ulike konsentrasjoner av MGO har på antall levende og døde celler. Cellene ble dyrket i medium med lav glukosekonsentrasjon (5 mM) og etter 24 timer ble det tilsatt ulike mengder MGO til brønnene tilsvarende MGO konsentrasjoner på 0, 0.2, 0.5 eller 1.0 mM. Cellene ble høstet etter 1, 2, 4, 6, 24, 48, 96 og 192 timer og cellefraksjonen ble farget med trypanblått og talt i mikroskop. Forsøket ble utført tre ganger og to av disse viste samme trend. Resultatene er et gjennomsnitt av disse to forsøkene og presenteres som prosent av kontroll. Kontroll er celler dyrket i medium med lav glukosekonsentrasjon uten MGO (Figur 5.12).



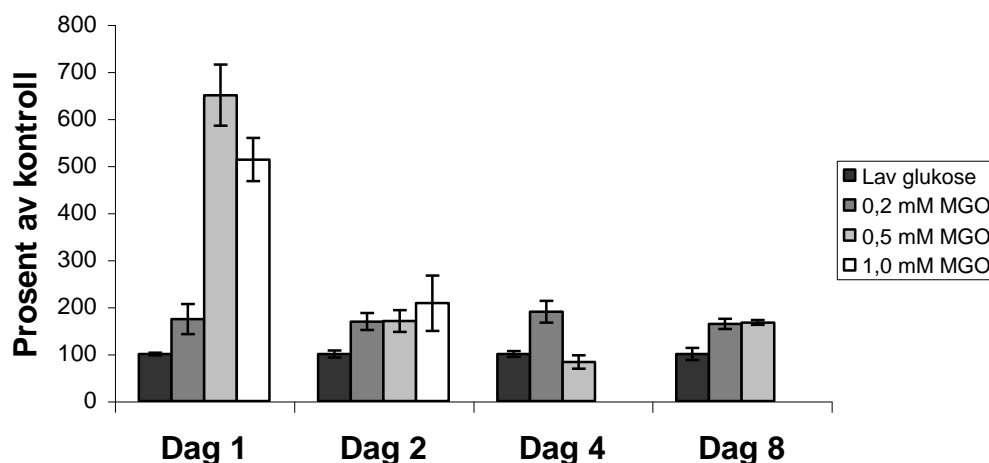
Figur 5.12 MGO og antall celler. Cellene ble dyrket i 0, 0.2, 0.5 og 1.0 mM MGO i 1, 2, 4, 6, 24, 48, 96 og 192 timer. Cellene ble høstet, farget med trypanblått og talt i mikroskop. Bare celler som var festet til plasten ved høsting er med i disse tellingene. Resultatene er et gjennomsnitt av to uavhengige forsøk og presentert som prosent av kontroll.

Det er en gradvis nedgang i celleantall ved økende konsentrasjoner og tid. Etter 96 timer i 1.0 mM MGO hadde alle cellene løsnet fra platen. Cellene hadde bevart membranintegritet og når de ble overført til nytt medium uten MGO festet de seg til platen og delte seg normalt. Det var ingen signifikante forskjeller i antall døde celler mellom de ulike MGO konsentrasjonene, men det kan skyldes at det bare er celler som var festet til platen ved høsting som er med i disse beregningene. Døde og levende celler som var løse i mediet er utelatt og det kan foreligge en underestimering av døde og/eller levende celler.

5.2.1.2 Effekt av MGO på proteinmengde per celle

Hensikten med dette forsøket var å undersøke om MGO har noen effekt på mengde protein per celle for å få en indikasjon på om MGO fører til hypertrofi MDCK I celler.

Cellene ble dyrket i 0, 0.2, 0.5 og 1.0 mM MGO i 1, 2, 4 og 8 dager. Proteinmengden i cellefraksjonen ble bestemt ved hjelp av BCA-proteintest. Forsøkene ble utført to ganger og resultatene er et gjennomsnitt av disse. Resultatene presenteres som prosent av kontroll og de er relatert til antall celler i cellefraksjonen (Figur 5.13).



Figur 5.13 Mengde protein relatert til antall celler. Cellene ble dyrket i 0, 0.2 og 0.5 mM MGO i 1, 2, 4 og 8 dager. Proteinmengde ble målt i cellefraksjonen og relatert til antall celler. Resultatene er et gjennomsnitt av to uavhengige forsøk og presentert som prosent av kontroll. Kontroll er medium uten MGO.

Proteinmengde i cellefraksjonen øker voldsomt i 0.5 og 1.0 mM MGO, og er etter en dag målt til henholdsvis 650 ± 65 % og 513 ± 46 % i forhold til kontroll. Proteinmengden reduseres etter hvert, men den ligger allikevel 60-90 % over kontroll til og med dag 8. Et unntak er 0.5 mM MGO etter 4 dager som er redusert til 83 ± 14 % i forhold til kontroll.

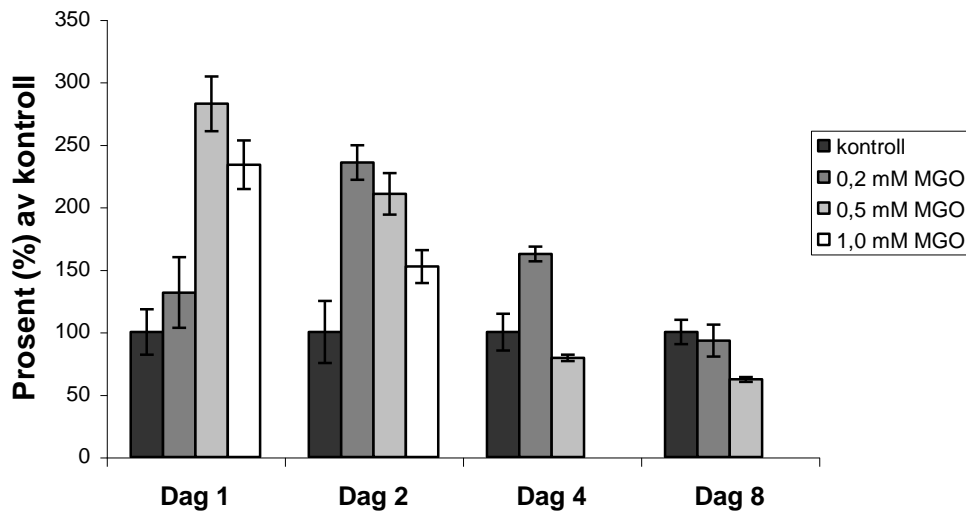
De økte proteinmengdene per celle er en indikasjon på at MDCK I celler reagerer med hypertrofi når de eksponeres for MGO.

5.2.1.3 Effekt av MGO på celleproliferasjon og celletoksisitet

WST-1 er en metode som bestemmer mengde mitokondriell dehydrogenase i en prøve. Levende celler vil produsere dette enzymet, mens døde celler ikke gjør det. Samtidig vil celler som er i deling være mer metabolsk aktive enn celler som ikke er i deling. På bakgrunn av dette blir WST-1 brukt til å måle celleviabilitet, celletoksisitet og celleproliferasjon.

Celler ble dyrket i flasker med 0, 0.2, 0.5 og 1.0 mM MGO. 24 timer før enzymmåling ble likt antall celler fra de ulike mediene sådd ut i 96-brønners plater og tetrazoliums salt ble tilsatt. Tidspunktene for enzymmåling var 1, 2, 4 og 8 dager og absorbansen ble avlest i spektrofotometer. Det ble gjort to uavhengige forsøk som viste samme trend. Resultatene fra et av disse forsøkene er vist i figur 5.14 som viser endring i mitokondriell dehydrogenase som prosent av kontroll.

Sammenliknet med proliferasjon av celler dyrket uten MGO var det en økning i proliferasjon i samtlige konsentrasjoner av MGO etter 1 og 2 dager. Først dag 8 var proliferasjonen i 0.2 mM MGO redusert i forhold til kontroll. Etter dag 4 hadde alle cellene som ble eksponert for 1.0 mM løst, så det er bare målt proliferasjon på dag 1 og 2 for denne konsentrasjonen. Forsøket ble gjort tre ganger og resultatene fra to av disse viste samme trend. Figur 5.15 viser et gjennomsnitt av disse to forsøkene og er presentert som prosent av kontroll.



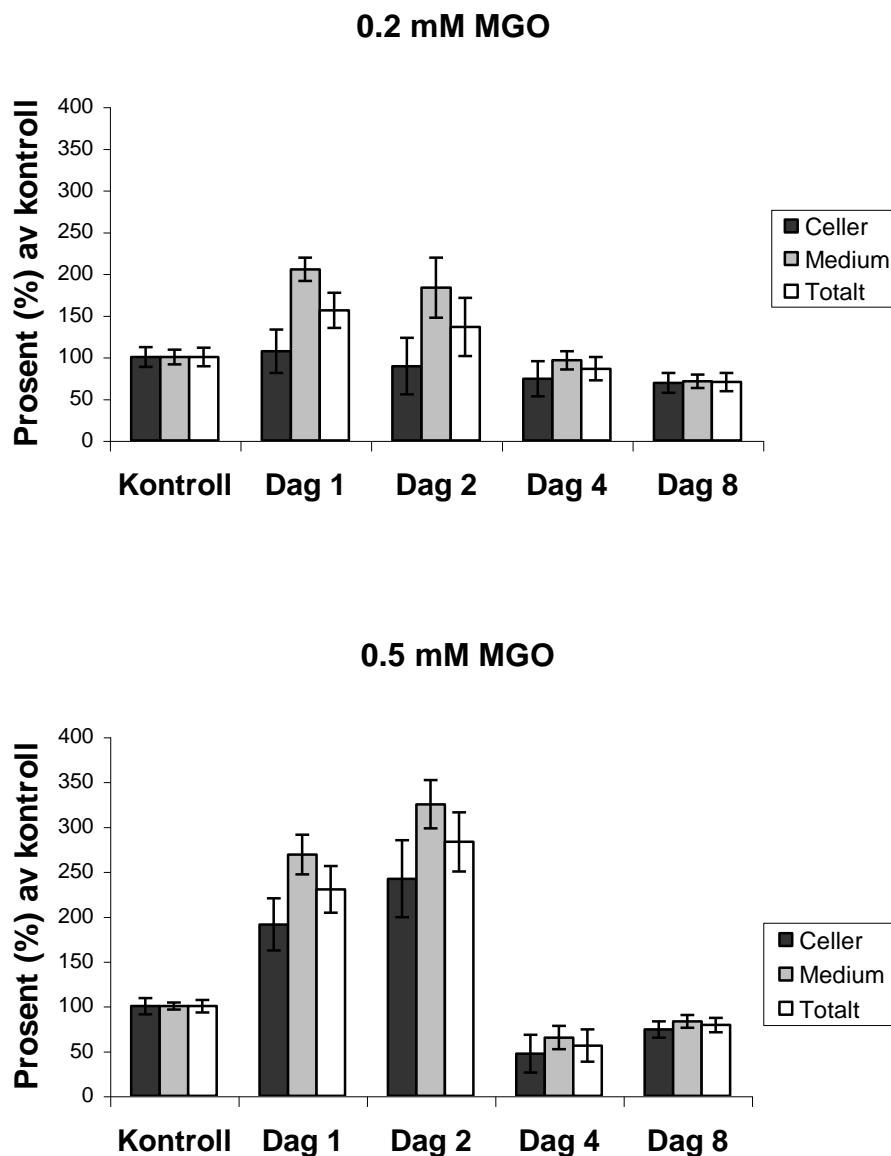
Figur 5.14 Mitokondriell dehydrogenase målt med WST-1 test. Cellene ble dyrket i 0, 0.2, 0.5 og 1.0 mM MGO i 1, 2, 4 og 8 dager. Resultatene er fra et representativt forsøk og presenteres som prosent av kontroll. Dag 4 og 8 hadde alle cellene som ble eksponert for 1.0 mM MGO løsnet fra underlaget og er derfor ikke med i resultatene.

5.2.2 Effekten av MGO på syntese av [^{35}S]-makromolekyler i nyreepitelceller

5.2.2.1 MGO og syntese av [^{35}S]-makromolekyler

Hensikten med dette forsøket var å undersøke om ulike konsentrasjoner av MGO har noen effekt på syntese av [^{35}S]-makromolekyler i MDCK I celler.

Celler ble dyrket i 0, 0.2 og 0.5 mM MGO i 1, 2, 4 og 8 dager. 24 timer før høsting ble cellene tilsatt [^{35}S]-sulfat. Celle- og mediefraksjon ble rensset for fritt [^{35}S]-sulfat og små [^{35}S]-molekyler ved hjelp av Sephadex G-50 fine før mengde [^{35}S]-makromolekyler ble målt ved scintillasjontelling. Prøvene inneholder i tillegg til [^{35}S]-proteoglykaner også andre sulfaterte makromolekyler og scintillasjontallene gjelder for alle [^{35}S]-makromolekyler i prøven.



Figur 5.15 MGO og syntese av [³⁵S]-makromolekyler. Cellene ble dyrket i 0, 0.2 og 0.5 mM MGO i 1, 2, 4 og 8 dager. 24 timer før høsting ble mediene tilsatt [³⁵S]-sulfat. Celle- og mediefraksjon ble rensert med Sephadex G-50 fine og mengde [³⁵S]-makromolekyler er målt ved hjelp av scintillasjonstelling. Resultatene er et gjennomsnitt av to uavhengige forsøk og er relatert til antall celler.

Det var en økning i [³⁵S]-makromolekyler i forhold til kontroll dag 1 og 2 ved eksponering av cellene for 0.2 og 0.5 mM MGO, og det var i mediefraksjonen denne økningen var størst. Økningen var spesielt stor for 0.5 mM MGO som totalt i celle- og mediefraksjonen var til $230 \pm 26 \%$ i forhold til kontroll på dag 1 og til $283 \pm 33 \%$ på dag 2. Tilsvarende økte [³⁵S]-makromolekyler for 0.2 mM MGO til henholdsvis $156 \pm 21 \%$ og $136 \pm 35 \%$. Etter 4 og 8 dager var mengde [³⁵S]-makromolekyler redusert i forhold til kontroll både i 0.2 og 0.5 mM MGO. Dag 4 var den totale mengden [³⁵S]-makromolekyler i 0.2 mM MGO redusert til $86 \pm$

14 % av kontroll og 0.5 mM MGO redusert til 56 ± 18 % av kontroll. Etter 8 dager var det en reduksjon til henholdsvis 70 ± 11 % for 0.2 mM MGO og 79 ± 8 % for 0.5 mM MGO.

Korte eksponeringstider gir en økning i [³⁵S]-makromolekyler og lang eksponering gir en reduksjon. Det er mest [³⁵S]-makromolekyler i mediefraksjonen og det er i denne det er størst endring mellom kontroll og 0.2 og 0.5 mM MGO.

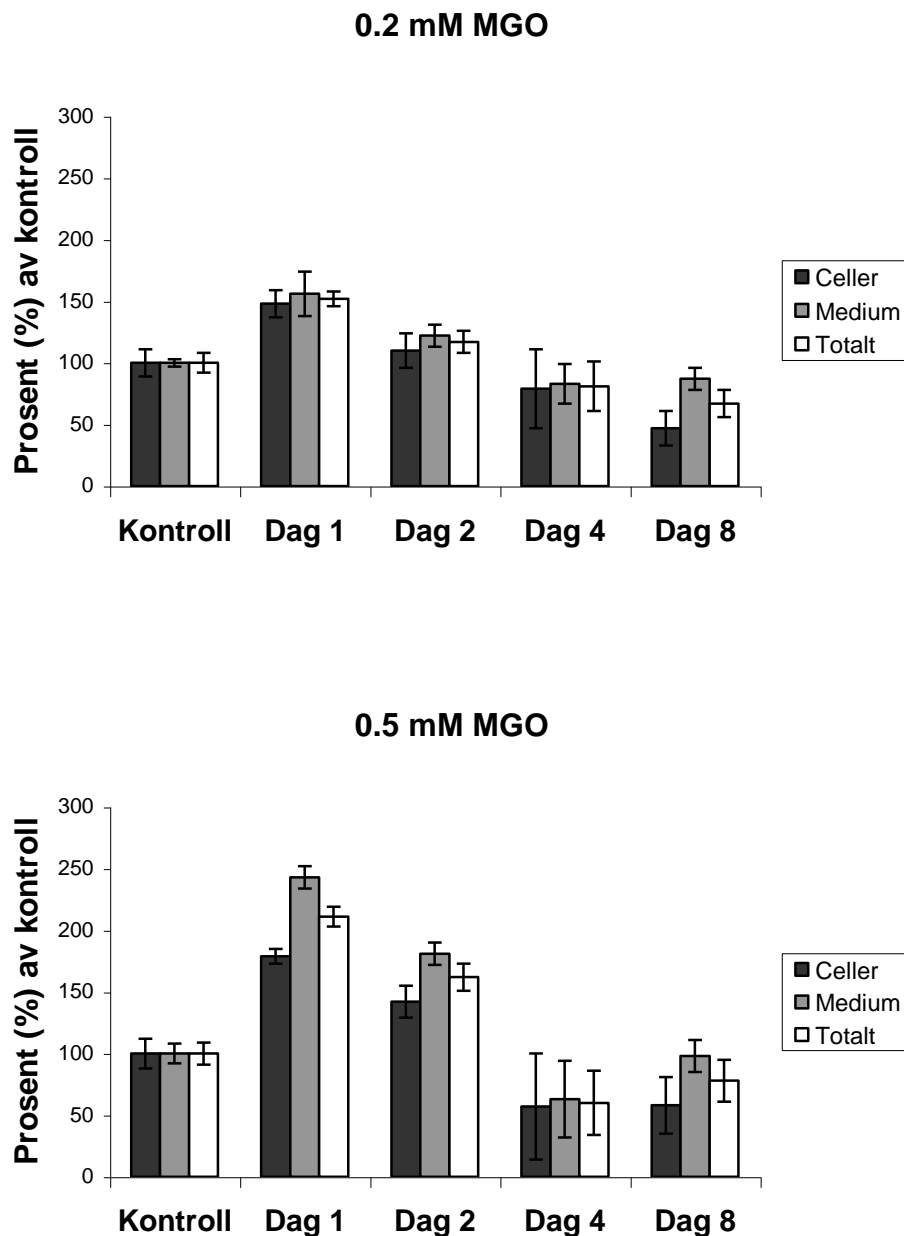
5.2.2.2 MGO og syntese av [³⁵S]-proteoglykaner

Hensikten med dette forsøket var å undersøke om ulike konsentrasjoner av MGO har noen effekt på syntese av proteoglykaner i MDCK I celler.

Celler ble dyrket i 0, 0.2 og 0.5 mM MGO i 1, 2, 4 og 8 dager. 24 timer før høsting ble cellene tilsatt [³⁵S]-sulfat. Celle- og mediefraksjon ble rensert for fritt [³⁵S]-sulfat og små [³⁵S]-molekyler ved hjelp av Sephadex G-50 fine. Deretter ble [³⁵S]-proteoglykanene separert fra andre [³⁵S]-makromolekyler med DEAE-ionebytterkromatografi og mengde [³⁵S]-proteoglykaner ble beregnet ved hjelp av scintillasjonstelling. Forsøket er gjort tre ganger hvor resultatene fra to av disse viste samme trend. Resultatene er et gjennomsnitt av disse to forsøkene og presenteres som prosent av kontroll. Mengde [³⁵S]-sulfat i form av [³⁵S]-proteoglykaner er relatert til antall celler.

Etter 1 og 2 dager var det en økning i [³⁵S]-proteoglykaner totalt i celle- og mediefraksjonen for celler som var behandlet med 0.2 mM MGO til 152 ± 6 % og 117 ± 9 % i forhold til kontroll og for celler som var behandlet med 0.5 mM MGO var økningen til 211 ± 8 % og 162 ± 11 % i forhold til kontroll. Ved eksponeringstider på 4 og 8 dager var det en reduksjon i [³⁵S]-proteoglykanmengden både ved 0.2 og 0.5 mM MGO-behandling. For 0.2 mM MGO var det en reduksjon disse dagene til 80 ± 26 % og til 67 ± 11 % i forhold til kontroll og for 0.5 mM ble tallene redusert til 57 ± 26 % og 78 ± 17 %.

Korte eksponeringstider med lave konsentrasjoner av MGO fører til en økning av [³⁵S]-proteoglykaner i MDCK I celler og lengre eksponeringstider fører til en reduksjon. I mediefraksjonen er det mest [³⁵S]-proteoglykaner og størst prosentvis endring mellom kontroll og MGO etter 1 og 2 dager.

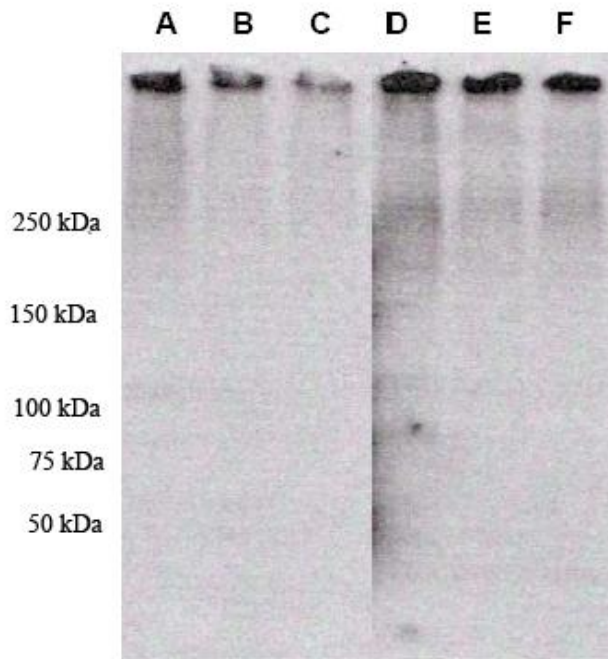


Figur 5.16 MGO og kvantitativ analyse av [³⁵S]-proteoglykaner relatert til celleantall. Cellene er dyrket i 0, 0.2 og 0.5 mM MGO i 1, 2, 4 og 8 dager. 24 timer før høsting ble cellene tilsatt [³⁵S]-sulfat. Celle- og mediefraksjon er renset med Sephadex G-50 fine gelkromatografi og DEAE-ionebytterkromatografi. Mengde [³⁵S]-sulfat er målt ved scintillasjonstelling og relatert til antall celler. Resultatene er et gjennomsnitt av to forsøk og presenteres som prosent av kontroll.

5.2.2.3 Kvalitativ analyse av [³⁵S]-proteoglykaner

Hensikten med dette forsøket var å gjøre en kvalitativ analyse av [³⁵S]-proteoglykaner i MDCK I celler som eksponeres for ulike konsentrasjoner av MGO.

Cellene er dyrket i 0, 0.2 og 0.5 mM MGO i 4 dager. 24 timer før høsting ble cellene tilsatt [³⁵S]-sulfat og prøvene ble renset ved hjelp av Sephadex G-50 fine gelkromatografi. Likt volum av de ulike prøvene ble applisert på gelen og molekylene i prøven separeres etter størrelse ved hjelp av SDS gelelektroforese. Molekylets størrelse er proporsjonal med molekylets vandringslengde i gelen.



Figur 5.17 SDS-page av celler dyrket i 4 dager i 0, 0.2 eller 0.5 mM MGO og renset med Sephadex G-50 fine. A, B og C viser kontroll, 0.2 og 0.5 mM MGO i mediefraksjonen. D, E og F viser kontroll, 0.2 og 0.5 mM MGO i cellefraksjonen. Resultatene er fra et representativt forsøk og er ikke relatert til antall celler.

Radioaktiviteten i gelen visualiseres ved autoradiografi og [³⁵S]-proteoglykaner sees som brede, mørke bånd på filmen. Resultatene er fra et representativt forsøk og er ikke relatert til antall celler.

Figur 5.17 viser det samme som de reelle scintillasjonstallene. Det er en liten reduksjon i [³⁵S]-proteoglykaner i både celle- og mediefraksjonen for celler som er behandlet med 0.2 og 0.5 mM i forhold til celler som er dyrket i lav glukose. Når [³⁵S]-proteoglykaner deles på antall celler blir forskjellene mindre.

6 Diskusjon

Hovedfunnene i denne oppgaven var en reduksjon i proteoglykansyntesen ved dyrking av MDCK I celler i medium med høy glukosekonsentrasjon i forhold til celler dyrket i medium med lav glukosekonsentrasjon. Denne effekten var ikke et resultat av ulik osmolaritet i mediene. Ved dyrking av MDCK I celler i medium med MGO var det ved korte eksponeringstider en betydelig økning i mengde proteoglykaner, mens det ved lengre eksponeringstider var en reduksjon. Videre fant vi at MGO-behandling førte til redusert celledeling og økt proteinmengde per celle, noe som kan være en indikasjon på hypertrofi (Yang 1998). Celler som ble dyrket i 1.0 mM MGO i 96 timer løsnet fra platen og fra hverandre uten å miste membranintegritet.

Disse forsøkene er foretatt på epitelceller i isolerte systemer, mens epitelceller *in vivo* blir utsatt for en langt mer komplisert regulering. Nyreepitelceller er ikke i direkte kontakt med blodsirkulasjonen, men vil ved hyperglykemi eksponeres for glukose, AGE, cytokiner og vekstfaktorer i interstitiumet og i urinen. *In vivo* vil glukosekonsentrasjonen variere mye i løpet av et døgn avhengig av individets glukosekontroll, mens vi i dette arbeidet brukte konstant høy glukosekonsentrasjon (25 mM). I forsøkene med MGO har vi valgt konsentrasjoner på bakgrunn av resultater i en annen studie som undersøker effekt av MGO på celledød i MDCK I celler (Jan 2005).

6.1 Effekt av hyperglykemi på cellevekst

I våre forsøk førte hyperglykemi til en økt celledeling som flatet litt ut ved økt celletetthet. Celler som ble dyrket i høy glukose i 14 dager før de ble sådd ut i brønner, hadde samme tilvekst som celler som ble dyrket i lav glukose fram til de ble sådd ut i brønner i høy glukose. Dette kan bety at det er økt celletetthet som fører til en avflating av celletilveksten i høy glukose over tid og ikke glukose i seg selv.

Celleantall og proteinmengde i cellefraksjonen følger hverandre uavhengig av glukosekonsentrasjon i mediet og dette er en indikasjon på at hyperglykemi ikke påvirker MDCK I cellers morfologi. I et forsøk med MDCK I og MDCK II celler og hyperglykemi, ble det funnet en økning i proteinmengde per celle i proksimale, men ikke i distale tubuli (Yang 1998). Våre resultater tyder på at måling av protein, som er en mindre tidkrevende metode enn å telle celler i mikroskop, kan brukes som et mål på endringer i celletilvekst i MDCK I celler som dyrkes i ulike glukosekonsentrasjoner.

Resultatene fra WST-1 målingene følger trenden vi fant ved celletellingene i mikroskop. Forskjellene i proliferasjon mellom høy og lav glukose avtok over tid og dette passer med resultatene fra celletellingene der celletilveksten flatet ut ved økt celletetthet. Mengde spaltet tetrazoliumsalt er ikke direkte proporsjonale med antall viable celler i prøvene, så WST-1 test kan ikke brukes som en alternativ metode til celletellinger i forsøk med MDCK I celler som dyrkes i ulike glukosekonsentrasjoner.

I forsøkene der celler ble dyrket i mannitol var det en svak reduksjon i antall celler i forhold til celler som ble dyrket i lav glukose, men det var ingen økning i andel døde celler. Tilsvarende reduksjon var det i proteinmengde og mitokondriell dehydrogenase og det kan bety at mannitol hemmer cellevekst i MDCK I celler. I forsøk med endotelceller har mannitol vist seg å gi en svak reduksjon i antall celler og en liten økning i nekrose (McGinn 2003, Wu 1999). I våre forsøk er det bare celler som var festet til plasten ved høsting som er med i celletellingene. Mediene ble ikke undersøkt med hensyn til løse celler og antall døde og/eller levende celler kan være underestimert. Mikroskopisk undersøkelse av flaskene før splitting og i brønnene før høsting viste riktignok lite løse celler i mediet.

6.2 Effekt av hyperglykemi på proteoglykansyntese

HSproteoglykaner spiller en viktig rolle i ladningsspesifikk filtrasjon i glomeruli og dette er illustrert ved en rekke observasjoner. I rotter har man induisert albuminuri ved enzymatisk (heparanase) fjerning av HS i GBM og ved hjelp av monoklonalt HS-antistoff (Kanwar 1980, van den Born 1992). Det er også en rekke humane og eksperimentelle studier der det er funnet en reduksjon av HS i GBM ved diabetes og at denne reduksjonen korrelerer med økende proteinuri (Raats 2000, Yard 2001). Flere nyere studier finner ikke kvalitative eller

kvantitative endringer i HSproteoglykaner i glomeruli ved mikroalbuminuri, men det er funnet slike endringer i tubuli (van den Born 2006, Wijnhoven 2006, van den Haven 2006). Kvalitative undersøkelser av proteoglykaner i MDCK I celler har vist at 85 % av syntetiserte proteoglykaner er HSproteoglykaner (Svennevig 1995).

Det ble målt en gradvis nedgang over 8 dager i mengde [³⁵S]-makromolekyler når MDCK I celler ble dyrket i høy glukose. For å se hvordan hyperglykemi påvirket cellene på lengre sikt, dyrket vi cellene i flasker i de ulike mediene i 14 dager før de ble sådd ut på brønner. For å sikre så like forhold som mulig, brukte vi celleantall som grunnlag for hvor mye cellene skulle splittes. Cellene ble splittet to ganger i uka og likt antall celler ble sådd ut i alle flaskene og i brønnene.

Trenden med økt reduksjon av syntese og sekresjon av [³⁵S]-makromolekyler over tid fortsatte ikke ved lengre tids eksponering (forsøk med 14-dagers forbehandling i høy glukose før utsåing i brønner). Etter 4 dager var det en reduksjon i mengde [³⁵S]-makromolekyler i celle- og mediefraksjonen for celler som var dyrket i høy glukose med forbehandling på 18 % og uten forbehandling på 19 %. For [³⁵S]-proteoglykaner var de tilsvarende tallene 41 % og 32 %, men her var det store variasjoner innenfor hvert forsøk. I cellefraksjonen var reduksjonen av proteoglykaner ved hyperglykemi 59 % i forsøkene med forbehandling og 64 % i forsøkene uten. I en studie der MDCK I celler ble dyrket i medium med høy glukosekonsentrasjon, ble det observert en reduksjon i [³⁵S]-proteoglykaner i celle- og mediefraksjonen på 50 % etter 8 dager (Borrebæk 2001). Det ble ikke funnet endringer i andel HSproteoglykaner eller endringer av lengde og antall av GAG-kjeder eller i sulfatering av disse, men en generell nedgang i antall proteoglykaner.

Nedgangen i [³⁵S]-proteoglykaner kan skyldes kvalitative eller kvantitative endringer i syntese og degradering av proteoglykaner. Hyperglykemi hemmer aktiviteten til enzymet UDP-glukose dehydrogenase (Ullrey 1978). Dette enzymet katalyserer dannelsen av ulike UDP-sukkere som er substrat til GAG-kjedene. Studier har vist at modifiseringer av enzymets aktivitet kan endre struktur og funksjon til proteoglykaner (Wegrowski 1998). Ved hyperglykemi skjer det en nedregulering av enzymet NDST, som er viktig for den initielle sulfateringen av HS-kjeder (Forsberg 1999). Samtidig er det observert en betydelig økning av heparanase i biopsier fra tubuli hos pasienter med diabetes (van den Haven 2006).

Heparanase spalter av HS-kjeder på HSproteoglykaner, og det er funnet en økning i HS i urin

hos diabetikere med mikroalbuminuri. Det er mange mulige mekanismer som kan være årsak til reduksjonen vi har observert på syntese og sekresjon av [³⁵S]-proteoglykaner ved dyrking av MDCK I celler i høy glukose.

Enkelte forsøk har vist at endringer i proteoglykansyntesen ved dyrking av celler i høy glukosekonsentrasjon kan skyldes økt osmolaritet i mediet (Nahman 1992). Det er lite som tyder på at dette er tilfellet i våre forsøk. Vi fant en liten reduksjon i mengde [³⁵S]-proteoglykaner i celler som var dyrket i medium med mannitol i forhold til kontroll, men det var også færre celler i disse brønnene. Relatert til antall celler var det enten ingen forskjell eller en økning i mengde [³⁵S]-proteoglykaner i forhold til i lav glukose. I tilsvarende forsøk med mesangialceller og mannitol som osmotisk kontroll og i tilsvarende forsøk på mesangial- og epitelceller med L-glukose som osmotisk kontroll var det ingen effekt av økt osmolaritet på proteoglykansyntesen (Kolm 1996, van Det 1996).

6.3 MGO og celleforsøk

Så lenge det ikke finnes sikre målemetoder for MGO-konsentrasjoner i plasma hos diabetikere og friske, er det vanskelig å velge hvilke konsentrasjoner en skal bruke i celleforsøk. Vi har valgt MGO konsentrasjoner på bakgrunn av resultatene fra en annen studie der MDCK I celler eksponeres for 0.5 –3.0 mM MGO i 24 timer (Jan 2005). Etter 24 timer var 68 % av cellene ved 3.0 mM MGO døde, mens det for 1.0 og 2.0 mM var 7 % døde celler. Vi ønsket at cellene våre skulle overleve forsøk på opp til 8 dager, så vi valgte 0.2, 0.5 og 1.0 mM MGO som konsentrasjoner til våre forsøk.

MGO produseres intracellulært og selv om dette er et lite molekyl som teoretisk vil diffundere over cellemembranen, vil ikke konsentrasjonen av MGO være lik intra- og ekstracellulært (Thornalley 1996, Roy 2004). MGO er svært reaktivt og danner både reversible og irreversible bindinger med ulike molekyler i cytosol. I våre forsøk vil MGO-konsentrasjonen i mediet reduseres over tid, mens det *in vivo* vil dannes nytt MGO for hver hyperglykemiske episode pasienten har (Akhand 2001). MGO vil binde seg til ulike molekyler i mediet og det er vanskelig å estimere hvor stor andel av MGO som er fritt til å vandre gjennom cellemembranen. Toksiske mekanismer mediert av MGO *in vivo* er trolig

avhengig av intracellulære konsentrasjoner, mens i celleforsøk der MGO er tilsatt mediet vil endringer være basert på ekstracellulære konsentrasjoner (Roy 2004).

6.4 Effekt av MGO på cellevekst

Etter 4 dager med 1.0 mM MGO hadde alle cellene løsnet fra platen og fløt fritt i mediet. Det viste seg at de fleste av disse cellene fortsatt levde (hadde bevart membranintegritet) og når de ble overført til medium uten tilsatt MGO, festet de seg til platen og delte seg normalt. Dette underbygger teorien om at MGO modifierer argininholdige deler av integriner ($\alpha_1\beta_3$) slik at cellene ikke fester seg til ECM, men tapes i urinen (Pedchenko 2005). Flere studier har vist at diabetikere har nedsatt antall podocytter og at podocyt tap er proporsjonalt med alvorlighetsgrad av diabetes nefropati (Meyer 1999, Pagtalunan 1997). Forsøk med endotelceller viser at disse løsner fra kollagen IV når de utsettes for MGO (Dobler 2006). Et tegn på endotelskade hos pasienter med diabetes er løse endotelceller i plasma, men grad av dette er ikke direkte koblet til grad av hyperglykemi som målt ved nivå av HbA1c (McClung 2005). Det er gjort forsøk med streptozotosinbehandlede rotter som viser at løse celler i urinen er viable og at et klart flertall av disse cellene er podocytter (de uttrykker nefrin eller podocin) (Petermann 2004, Vogelmann 2003).

Hyperglykemi har i flere studier vist seg å endre uttrykk av integriner. Høy glukose (25 mM) gir reduksjon av integrin $\alpha_3\beta_1$ (30-35%) og endret binding mellom endotelceller og kollagen IV (ulike integriner medierer binding mellom endotelceller og kollagen IV, avhengig av glukosekonsentrasjon) (Kitsiou 2003). Forsøkene viser at endring av integriner følges av en reduksjon i MMP-2 (70 % i mediet) og reduksjon av aktiviteten til MMP-2 (økning av MMP-2 hemmeren TIMP-2 på 250 %). En konsekvens av dette kan være redusert antall podocytter og økt akkumulering av ECM på grunn av redusert nedbrytning.

MGO behandling førte til en svak reduksjon av antall celler over tid i alle konsentrasjoner, men det er ingen forskjeller mellom andel døde celler i de ulike konsentrasjonene. Jan *et al* (Jan 2005) har vist at MGO induserer både apoptose og nekrose i MDCK I celler, men at det er apoptose som dominerer. Ved eksponering av cellene for 1.0 og 2.0 mM MGO i 24 timer var andelen apoptotiske celler på 7 %, mens andel nekrotiske celler var knapt målbar. Ved apoptose vil det ta flere timer fra den apoptotiske prosessen er i gang til cellene mister

membranintegritet. Trypanblått vil ikke registrere celler som er i tidlig apoptose og det gjør at andelen døde celler fra de første 24 timene kan være underestimert. En annen svakhet med dette forsøket er at det kun er celler som var festet til platen ved høsting som er med i celletellingene. Med tanke på hvordan MGO kan påvirke integriner er det muligheter for at det er løse celler i mediet som ikke er med i beregningene av celleantall. Resultatene fra WST-1 kan gi en mistanke om dette, siden mitokondriell dehydrogenaseaktivitet går kraftig opp, mens celleantall går ned. WST-1 test vil måle mitokondriell dehydrogenase fra alle celler i brønnen uavhengig om de er festet til platen eller er løse i mediet.

I forsøkene med protein var det bare proteinmengde i cellefraksjonen som ble målt, så den observerte økningen i protein per celle er ikke et resultat av eventuelle løse celler i mediet. Økningen i mengde protein per celle er en indikasjon på at MGO fører til endret morfologi i MDCK I celler. I to tidligere studier der MDCK I celler ble utsatt for AGE i mediet, var det også en økning i proteinmengde per celle (Yang 1998, 2004). Det ble også målt en signifikant økning i trombospondin-1 (TSP-1) som øker TGF- β aktivitet. TGF- β kan stoppe cellesyklus i G₁ ved induksjon av cyklin-avhengig kinase inhibitor (CKI) p27^{KIP1} (p27) og dette resulterer i et skifte fra hyperplasi til hypertrofi (Kamesaki 1998, Wolf 2000).

6.5 Effekt av MGO på proteoglykansyntese

Etter dag 1 og dag 2 var det en økning i [³⁵S]-merkede makromolekyler og [³⁵S]-proteoglykaner i celler som ble inkubert i 0.2 og 0.5 mM MGO. Det var en betydelig økning både i celle- og mediefraksjonen, men økningen var størst i mediefraksjonen. Mengde [³⁵S]-proteoglykaner er relatert til antall celler i parallelle brønner. Dersom det har vært løse celler i mediet ved celletellingene vil [³⁵S]-proteoglykaner i mediefraksjonen være relatert til for få celler og beregnet mengde [³⁵S]-proteoglykaner per celle vil være overestimert.

Cellefraksjonen vil ikke være påvirket av løse celler i mediet og siden mengde [³⁵S]-makromolekyler og [³⁵S]-proteoglykaner også er økt i cellefraksjonen er det sannsynlig at det foreligger en reell økning i [³⁵S]-innmerking per celle både i celle- og mediefraksjonen i MDCK I celler når de eksponeres for lave konsentrasjoner av MGO i få dager. MGO dannes raskt ved fluktuasjoner i plasmaglukose og effekten etter kort eksponering kan være like biologisk interessant som effekten etter 4 og 8 dager. Disse resultatene passer med forsøk som er gjort med MDCK II celler og primære endotelceller foretatt ved vårt laboratorium

(upubliserte data). Ved korte eksponeringstider og lave konsentrasjoner av MGO er det en økt mengde [³⁵S]-proteoglykaner også i disse cellelinjene. Hvorvidt dette er et resultat av økt syntese og/eller redusert degradering er ikke undersøkt. AGE er vist å redusere MMP-2 og det kan resultere i redusert degradering av matrikskomponenter (Gharagozlian 2006).

Etter 4 og 8 dager var det en reduksjon i [³⁵S]-makromolekyler og [³⁵S]-proteoglykaner i celler som ble dyrket i 0.2 og 0.5 mM MGO. Forsøk gjort med MDCK I celler og AGE førte til en reduksjon av total [³⁵S]-proteoglykaner i celle- og mediefraksjon på 67 % etter 8 dager og det var ingen endringer i andel HSproteoglykaner, antall GAG-kjeder per proteinkjerne, lengde av GAG-kjedene eller sulfatering av disse, men en generell reduksjon i antall proteoglykaner (Borrebak 2001).

7 Konklusjon

I forsøkene der MDCK I celler ble dyrket i medium med høy glukosekonsentrasjon var det en reduksjon i [³⁵S]-proteoglykaner som forsterket seg over 8 dager. Denne effekten var ikke et resultat av høyere osmolaritet i mediet.

I forsøkene med MDCK I celler som ble dyrket i medier med ulike konsentrasjoner av MGO, var det en økning i [³⁵S]-proteoglykaner etter 1 og 2 dager, men en reduksjon etter 4 og 8 dager. MGO behandling av cellene førte også til dårligere adhesjon til underlaget og mellom cellene uten at cellene var skadet. Etter 4 dager i 1.0 mM MGO var cellene løse i mediet. Behandling med MGO førte også til en reduksjon i celleantall og økning i proteinmengde.

Effektene vi fant av MGO- og høy glukosebehandling på mengde [³⁵S]-proteoglykaner i MDCK I celler er en indikasjon på at hyperglykemi og AGE er involvert i reguleringen av syntese og /eller degradering av proteoglykaner i tubuli. Endringer i proteoglykaner kan føre til en tykkere og dårligere organisert TBM med lavere tetthet av negative ladninger.

Proteoglykaner kan være viktige i den ladningsspesifikke reabsorpsjonen i tubuli og det vil være interessant å undersøke hvilke kvantitative og kvalitative effekter MGO og hyperglykemi har på spesifikke matriksproteoglykaner som agrin og perlekan og celleoverflateproteoglykaner som syndekan og glypikan. I en videreføring av disse studiene vil det være naturlig å dyrke cellene på semipermeable filtre for at cellene skal bli polare. Det vil da være mulig å undersøke om høy glukose og MGO har effekt på sortering av proteoglykaner.

8 Referanser

Achour A, Kacem M, Dibej K. One year course of oral sulodexide in the management of diabetes nephropathy. *J Nephrol* 2005; 18: 568-574.

Akhand AA, Hussain K, Kato M, Miyata T et al. Glyoxal and methylglyoxal induce aggregation and inactivation of ERK in human endothelial cells. *Free Radic.Biol.Med* 2001; 31: 1228-35.

Akhtar M, Al MH. Molecular basis of proteinuria. *Adv Anat Pathol* 2004; 11: 304-9.

Alberts B, Johnson A, and Lewis J. Molecular Biology of the Cell. 2002. Garland Publishing.

Ashikari-Hada S, Habuchi H, Kariya Y, Itoh N, Reddi AH, Kimata K. Characterization of growth factor-binding structures in heparin/heparan sulfate using an octasaccharide library. *J Biol Chem.* 2004 ;279: 12346-54.

Barker G, Simmons NL. Identification of two strains of cultured canine renal epithelial cells (MDCK cells) which display entirely different physiological properties. *Quarterly journal of experimental physiology* 1981; 66: 61-72.

Basta G, Schmidt A, De Caterina R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovascular Research* 2004; 63: 582-592.

Baynes JW, Thorpe SR. Role of Oxidative Stress in Diabetic Complications, A New Perspective on an Old Paradigm. *Diabetes* 1999; 48: 1-9.

Bohlender JM, Franke S, Stein G, Wolf G. Advanced glycation end products and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289: F645-F659.

Borrebaek J, Prydz K, Fjeldstad K, Vuong TT, Berg TJ, Holkov C et al. The AGE product N epsilon-(carboxymethyl)lysine serum albumin is a modulator of proteoglycan expression in polarized cultured kidney epithelial cells. *Diabetologia* 2001; 44: 488-94.

Brenner and Barry M. Brenner and Rector's the kidney. 1996. Philadelphia: Saunders.

Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005; 54: 1615-25.

Champe P and Harvey R. Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry. 1994. J.B.Lippincott Company.

Chaplen WR, Fahl WE, Cameron DC. Evidence of high levels of methylglyoxal in cultured Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry* 1998; 95: 5533-5538.

Chaplen WR, Fahl WE, Cameron DC. Method for Determination of Free Intracellular and Extracellular Methylglyoxal in Animal Cells Grown in Culture. *Analytical Biochemistry* 1996; 238: 171-178.

Dalla VM, Saller A, Mauer M, Fioretto P. Role of mesangial expansion in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Journal of Nephrology* 2001; 14: 51-57.

DCCT/EDIC. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-86.

Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva: WHO 1999.

Dobler D, Ahmed N, Song L, Eboigbodin KE, Thornalley PJ. Increased Dicarbonyl Metabolism in Endothelial Cells in Hyperglycemia Induces Anoikis and Impairs Angiogenesis by RGD and GFOGER Motif Modification. *Diabetes* 2006; 55:1961-1969.

Edwards IJ, Wagner JD, Vogl-Willis CA, Litwak KN, Cefalu WT. Arterial heparan sulfate is negatively associated with hyperglycemia and atherosclerosis in diabetic monkeys. *Cardiovasc Diabetol* 2004; 3: 6.

Erickson AC, Couchman JR. Basement membrane and interstitial proteoglycans produced by MDCK cells correspond to those expressed in the kidney cortex. *Matrix Biol* 2001; 19: 769-78.

Forsberg E, Pejler G, Ringvall M, Lunderius C, Tomasini-Johansson B, Kusche-Gullberg M et al. Abnormal mast cells in mice deficient in a heparin-synthesizing enzyme. *Nature* 1999; 400: 773-6.

Frayn KN. Metabolic regulation: A humane perspective. Blackwell Publishing; 2003.

Fukunaga M, Tsuruda K. Actinobacillus actinomycetemcomitans induces lethal effects on the macrophage-like human cell line U937. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16: 284-9.

Gambaro G, Kinalska I, Oksa A. Oral sulodexide reduces albuminuria in microalbuminuric and makroalbuminuric type 1 and type 2 diabetetic patients: The Di.N.A.S. randomized trial. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1615-1625.

Geneser F and Dørup J. Histologi : på molekylærbiologisk grundlag. 2001. København: Munksgaard.

Gerich JE. Postprandial hyperglycemia and cardiovascular disease. *Endocr Pract* 2006; 12 Suppl 1: 47-51.

Gharagozlian S, Henriksen T, Kolset SO. High glucose and N(epsilon)-(carboxymethyl) lysine bovine serum albumin modulate release of matrix metalloproteinases in cultured human endothelial cells. *European Journal of Nutrition* 2006; 45: 283-290.

Gilbert RE, Cox A, Dziadek M, Cooper ME, Jerums G. Extracellular Matrix and Its Interactions in the Diabetic Kidney: A Molecular Biological Approach. *Journal of Diabetes and Its Complications* 1995; 9: 252-254.

Groffen AJ, Ruegg MA, Dijkman H. Agrin is a major heparan sulfate proteoglycan in the human glomerular basement membrane. *Journal of Histochem Cytochem* 1998; 46: 19-27.

Groffen AJ, Veerkamp JH, Monnens LA, van den Heuvel LP. Recent insights into the structure and functions of heparan sulfate proteoglycans in the human glomerular basement membrane. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 2119-2129.

Ha TS, Song CJ, Lee JH. Effects of advanced glycosylation endproducts on perlecan core protein of glomerular epithelium. *Pediatr Nephrol* 2004; 19: 1219-24.

Herzlinger DA, Easton TG, Ojakian GK. The MDCK epithelial cell line expresses a cell surface antigen of the kidney distal tubule. *J Cell Biol* 1982; 93: 269-77.

Himo F, Siegbahn PEM. Catalytic Mechanism of Glyoxalase I: A Theoretical Study. *Journal of American Chemistry Society* 2001; 123: 10280-10289.

Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 609-52.

Jan CR, Chen CH, Wang SC, Kuo SY. Effect of methylglyoxal on intracellular calcium levels and viability in renal tubular cells. *Cell Signal* 2005; 17: 847-55.

Kalapos MP. Methylglyoxal in living organisms: chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicol Lett* 1999; 110: 145-175.

Kamesaki H, Nishizawa K, Michaud GY, Cossmann J, Kiyono T. TGF- β_1 Induces the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p27^{Kip1} mRNA and Protein in Murine B Cells. *The Journal of Immunology* 1998; 160: 770-777.

Kanwar YS, Linker A, Farquhar MG. Increased permeability of the glomerular basement membrane to ferritin after removal of glycosaminoglycans (heparan sulfate) by enzyme digestion. *Journal of Cell Biology* 1980; 86: 688-693.

Kanwar YS, Rosenzweig LJ, Linker A, Jakubowski ML. Decreased de novo synthesis of glomerular proteoglycans in diabetes: Biochemical and autoradiographic evidence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 2272-2277.

Kanwar YS, Wada J, Lin S, Danesh FR, Chugh SS, Yang Q, Banerjee T, Lomasney JW. Update of extracellular matrix, its receptors, and cell adhesion molecules in mammalian nephrogenesis. *American Journal of Renal Physiology* 2004; 286: 202-215.

Kitsiou PV, Tzinia AK, Stetler-Stevenson WG, Michael AF, Fan WW, Zhou B et al. Glucose-induced changes in integrins and matrix-related functions in cultured human glomerular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284: F671-F679.

Kjellén L, Lindahl U. Proteoglycans: Structures and interactions. *Annual Review of Biochemistry* 1991; 60: 443-475.

Kolm V, Sauer U, B. Olgemoller B, Schleicher ED. High glucose-induced TGF-beta 1 regulates mesangial production of heparan sulfate proteoglycan. *American Journal of Renal Physiology* 1996; 5: 812-821.

Kolset SO, Drevon CA, Prydz K. [Proteoglycans and pathology--new aspects]. *Tidsskr Nor Laegeforen* 1997; 117: 951-4.

Kolset SO, Prydz K, Pejler G. Intracellular proteoglycans. Review. *Biochem. J.* 2004; 379: 217-227.

Kumar, Cotran, Robbins. *Basic pathology*. 6th edition edn. 1997.

Kunika K, Yamaoka T, Itakura M. Damage of charge-dependent renal tubular reabsorption causes diabetic microproteinuria. *Diabetes Res Clinical Practice* 1997; 1: 1-9.

Kunika K, Yamaoka T, Itakura M. Diabetic Damage Of Selective Renal Reabsorption Assessed By Albumin Negative Charge. *Diabetes Res Clinical Practice* 1996; 33: 181-189.

Kuschert GS, Coulin F, Power CA, Proudfoot AE, Hubbard RE, Hoogewerf AJ, Wells TN. Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry* 1999; 38: 12959-68.

Lapolla A, Flamini R, Dalla VA, Senesi A, Reitano R, Fedele D et al. Glyoxal and methylglyoxal levels in diabetic patients: quantitative determination by a new GC/MS method. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 1166-73.

Liu HC, Liao TN, Lee TC, Chuang LY, Guh JY, Liu SF, Hu MS, Yang YL, Lin SH, Hung MY, Huang JS, Hung TJ, Chen CD, Chiang TA, Chan JY, Chen SY, Yang YL. Albumin induces Cellular Fibrosis by Upregulating Transforming Growth Factor-Beta Ligand and Its Receptors in Renal Distal Tubule Cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 2006; 97: 956-968.

Mason RM, Wahab NA. Extracellular matrix in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 2003; 14: 1358-1373.

McClung JA, Naseer N, Saleem M, Rossi GP, Weiss MB, Abraham NG. Circulating endothelial cells are elevated in patients with type 2 diabetes mellitus independently of HbA_{1c}. *Diabetologia* 2005; 48: 345-350.

McGinn S, Poronnik P, King M, Gallery EDM, Pollock CA. High glucose and endothelial cell growth: novel effects independent of autocrine TGF-b1 and hyperosmolarity. *American Journal of Cell Physiology* 2003; 284: 1374-1386.

Meyer TW, Bennett PH, Nelson RG. Podocyte number predicts long-term urinary albumin excretion in Pima Indians with Type II diabetes and microalbuminuria. *Diabetologia* 1999; 42: 1341-4.

Miner JH. Renal basement membrane components. *Kidney Int* 1999; 56: 2016-24.

Nahman NS, Leonhart KL, Cosio FG, Hebert CL. Effects of high glucose on cellular proliferation and fibronectin production by cultured human mesangial cells. *Kidney international* 1992; 41: 396-402.

Nemet I, Turk Z, Duvnjak L, Car N, Varga-Defterdarovic L. Humoral methylglyoxal level reflects glycemic fluctuation. *Clin Biochem* 2005; 38: 379-83.

Omsland TK, Bangstad HJ, Berg TJ, Kolset SO. [Advanced glycation end products and hyperglycaemia]. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2006; 126: 155-8.

Omsland TK. Effekt av CML-BSA og høye glukosekonsentrasjoner på proteoglykansyntesen i dyrkede nyreceller. 2002.

Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S, Nelson RG, Myers BD, Rennke HG, Coplon NS, Sun L, Meyer TW. Podocyte Loss and Progressive Glomerular Injury in Type II Diabetes. *Journal of Clinical Investigation* 1997; 99: 342-348.

Papsoulis A, Al-Abed Y, Bucula R. Identification of N2-(1-carboxyethyl)guanine (CEG) as a guanine advanced glycosylation end product. *Biochemistry* 1995; 34: 648-655.

PedchenkoVK, Chetyrkin SV, Chuang P, Ham AJ, Saleem MA, Mathieson PW et al. Mechanism of perturbation of integrin-mediated cell-matrix interactions by reactive carbonyl compounds and its implication for pathogenesis of diabetic nephropathy. *Diabetes* 2005; 54: 2952-60.

Petermann AT, Pippin J, Krofft R, Blonski M, Griffin S, Durvasula R et al. Viable podocytes detach in experimental diabetic nephropathy: potential mechanism underlying glomerulosclerosis. *Nephron Exp Nephrol* 2004; 98: e114-e123.

Prydz K, Dalen KT. Synthesis and sorting of proteoglycans. *J Cell Sci* 2000; 113 Pt 2: 193-205.

Raptis AE, Viberti G. Pathogenesis of diabetic nephropathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001; 109 Suppl 2: S424-S437.

Richardson JCW, Scalera V, Simmons NL. Identification of two strains of MDCK cells which resemble separate nephron tubule segments. *Biochemica et Biophysica Acta* 1981; 673: 26-36.

Rosca MG, Mustata TG, Kinter MT, Ozdemir AM, Kern TS, Szweda LI, Brownlee M, Monnier VM, Weiss MF. Glycation of mitochondrial proteins from diabetic rat kidney is

associated with excess superoxide formation. *American Journal Physiol Renal Physiology* 2005; 289: 420-430.

Rosenbloom AL, Joe JR, Young RS, Winter WE. Emerging epidemic of type 2 diabetes in youth. *Diabetes Care* 1999; 22: 345-54.

Roy BM. Analysis of methylglyoxal toxicity in hybridoma cell culture. Master Thesis. Vanderbilt University 2004.

Raats CJ, van den BJ, Berden JH. Glomerular heparan sulfate alterations: mechanisms and relevance for proteinuria. *Kidney Int* 2000; 57: 385-400.

Salmivirta M, Safaiyan F, Prydz K, Andresen MS, Aryan M, Kolset SO. Differentiation-associated modulation of heparan sulfate structure and function in CaCo-2 colon carcinoma cells. *Glycobiology* 1998; 8: 1029-36.

Schram MT, Schalkwijk CG, Bootsma AH, Fuller JH, Chaturvedi N, Stehouwer CDA. Advanced glycation end products are associated with pulse pressure in type 1 diabetes. The EURODIAB prospective complications study. *Hypertension* 2005; 46: 232-237.

Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: A review. *Diabetologia* 2001; 44: 129-146.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150: 76-85.

Thomas GJ, Bayliss MT, Harper K, Mason RM, Davies M. Glomerular mesangial cells in vitro synthesize an aggregating proteoglycan immunologically related to versican. *Biochem J.* 1994 ; 302: 49-56.

Thomas MC, Forbes JM, Cooper ME. Advanced glycation end products and diabetic nephropathy. *Am J Ther* 2005; 12: 562-72.

Thornalley PJ. Glyoxalase I: Structure, function and critical role in the enzymatic defence against glycation. *Biochemical Society Trans* 2003; 31: 1343-1348.

UKPDS. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 1998; 352: 837-53.

Ullrey DB, Kalckar HM, Christopher CW. Further observations on metabolic responses in hamster cells: changes in UDPG dehydrogenase activity. *J Cell Physiol* 1978; 96: 23-30.

van den Born J, Pisa B, Bakker MAH, Celie JWAM, Straatman C, Thomas S, Viberti GC, Kjellen L, Berden JHM. No change in Glomerular Heparan Sulfate Structure in Early Human and Experimental Diabetic Nephropathy. *The Journal of Biological Chemistry* 2006; 281: 29606-

van den Hoven MJ, Rops AL, Bakker MA, Aten J, Rutjes N, Roestenberg P, Goldschmeding R, Zcharia E, Vlodaysky I, van der Vlag J, Berden JH. Increased expression of heparanase in overt diabetic nephropathy. *Kidney International* 2006; 70: 2100–2108.

van Det NF, van den Born J, Tamsma JT, Verhagen NA, Berden JH, Bruijn JA, Daha MR, van der Woude FJ. Effects of high glucose on the production of heparan sulfate proteoglycan by mesangial and epithelial cells. *Kidney International* 1996; 49:1079-1089.

Vander Jagt DL, Hunsaker LA. Methylglyoxal metabolism and diabetic complications: roles of aldose reductase, glyoxalase-I, betaine aldehyde dehydrogenase and 2-oxoaldehyde dehydrogenase. *Chemical Biological Interactions* 2003; 1; 341-351.

Vervoort G, Veldman B, Berden JH, Smits P, Wetzels JF. Glomerular hyperfiltration in type 1 diabetes mellitus results from primary changes in proximale tubular sodium handling without changes in volume expansion. *European Journal of Clinical Investigation* 2005; 35: 330-336.

Vogelmann SU, Nelson WJ, Myers BD, Lemley KV. Urinary excretion of viable podocytes in health and renal disease. *American Journal of Renal Physiology* 2003; 40-48.

Wegrowski Y, Perreau C, Bontemps Y, Maquart FX. Uridine diphosphoglucose dehydrogenase regulates proteoglycan expression: cDNA cloning and antisense study. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 250: 206-11.

Wijnhoven TJM, Lensen JFM, Rops ALWMM, van der Vlag J, Kolset SO, Bangstad HJ, Pfeffer P, van den Hoven MJW, Berden JHM, van den Heuvel LPWJ, van Kuppevelt TH. Aberrant Heparan Sulfate Profile in the Human Diabetic Kidney Offers New Clues for Therapeutic Glycomimetics. *American Journal of Kidney Diseases* 2006; 48: 250-261.

Wolf G. Cell cycle regulation in diabetic nephropathy. *Kidney International* 2000; 58: 59-66.

Wolf G, Neilson EG. Angiotensin II induces cellular hypertrophy in cultured murine proximal tubular cells. *American Journal of Renal Physiology* 1999; 259: 768-777.

Wu QD, Wang JH, Fennessy F, Redmond HP, Bouchier-Hayes D. Taurine prevents high-glucose-induced human vascular endothelial cell apoptosis. *American Journal of Cell Physiology* 1999; 277: 1229-1238.

Yang YL, Chuang LY, Guh JY, Liu SF, Hung MY, Liao TN, Huang YL. Thrombospondin-1 mediates distal tubule hypertrophy induced by glycated albumin. *Journal of Biochemistry* 2004; 379: 89-97.

Yang YL, Guh JY, Yang ML, Lai YH, Tsai JH, Hung WC, Chang CC, Chang LY. Interactions between high glucose and transforming growth factor- β in cell cycle protein regulations in MDCK cells. *Journal of American Soc. Nephrology* 1998; 9: 182-193.

Yard B, Feng Y, Keller H, Mall C, van Der WF. Influence of high glucose concentrations on the expression of glycosaminoglycans and N-deacetylase/N-sulphotransferase mRNA in cultured skin fibroblasts from diabetic patients with or without nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 386-91.

Yard BA, Kahlert S, Engelleiter R, Resch S, Waldherr R, Groffen AJ et al. Decreased glomerular expression of agrin in diabetic nephropathy and podocytes, cultured in high glucose medium. *Exp Nephrol* 2001; 9: 214-22.

Internettsider

1. <http://www.msms.doc.k12.ms.us/biology/anatomy/urinary.kidney3/gif.html>
2. [http:// www.intramural.niddk.nih.gov/.../normal_kidney.asp](http://www.intramural.niddk.nih.gov/.../normal_kidney.asp)